

エラミミズ *Branchiura sowerbyi* における

## 二次鰓形成と尾部再生に対する X 線の効果

## 〔III〕 Chlorobuthanol の尾部再生に対する X 線保護効果

京都府立医科大学・生物学教室

田 中 紀 元

The Effects of X-Rays on the Secondary Gill Formation and the Tail Regeneration in  
*Branchiura sowerbyi*

(III) The Protective Effect of Chlorobuthanol Against X-Irradiation on Tail  
Regeneration in *Branchiura sowerbyi*

by

Norimoto Tanaka

Biological Laboratory, Kyoto Prefectural University of Medicine., Kyoto.

1) The highest degree of radiation protection, in tail regeneration, was observed in the *Branchiura sowerbyi* which were preserved in 20% chlorobuthanol solution at prior to and during the X-irradiation (6000 R).

2) This chlorobuthanol of 20% concentration is far removed from the lethal level for *Branchiura* regardless of tail regeneration.

3) There is no difference in the volume of dissolved oxygen between water and 20% chlorobuthanol solution as determined by Polarography.

4) The protective action of the chlorobuthanol is probably caused by the change of the oxygen content of the cells and considerably reduced oxygen consumption. However, other biological factors for example the nervous system, etc, must not be overlooked.

放射線照射を受けた生物が生物学的可視効果として現われるまでには次の4段階が想定される、

即ち；(1) 放射線吸収、(2) 放射線化学反応

(3) 生化学的反応連鎖そして(4) 可視的效果である。放射線照射に対しての化学的保護は上記のうち(2)に働き、可視的效果を修飾すると思われる。最も広く認められている保護は無酸素、システイン(およびその近縁物質)、AET(およびその近縁物質)等による照射前および照射中の処理で得られることは数多くの研究業績の蓄積がある。

Bacq and Alexander ('61)<sup>1)</sup>によれば Ethyl alcohol, Morphine, Ether あるいは Urethane のよ

うな麻酔剤あるいは鎮痛剤も弱い保護剤の中に加えられている。Cole et al ('52)<sup>2)</sup>は Ethanol を X 線照射する直前にマウスの腹腔内に注射すると放射線感受性が減少することを示した。また、同じ著者('61)<sup>3)</sup>は Urethane 処理によりマウスの放射線感受性が減少したことも示している。Patterson et al ('51)<sup>4)</sup>は Ethyl alcohol を注射することによりマウスの照射による死亡率の減少から、その保護効果を認めた。さらに、高本('59)<sup>5)</sup>は両生類幼生の赤血球を指標として Ethyl alcohol が温度によって保護効果があることを示し、これが代謝と関係しており、酸素消費に基く細胞内の hypoxia に基因するのではないかと考案し

ている。

本研究に用いた Chlorobuthanol [ $\text{CCl}_3 \cdot \text{C}(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \cdot \text{OH}$ ] (クロレトロン) は水生動物の麻酔剤としてよく知られている。この麻酔剤についての保護効果は今まで余り知られていないので、これを用いてエラミミズの尾部再生を指標としてこの薬剤のX線照射に対する保護効果を確認した。因みに、エラミミズに対するX線の効果についてはすでに田中・仲尾('63)<sup>6)</sup> および田中('64)<sup>7)</sup>の研究があり、6000RのX線照射によつて、尾部切断後14日目の尾部再生が100パーセント阻止されることがわかっている。

#### 材料及び方法

実験に使用したエラミミズは金魚の餌として売っているものの中、体長6cm位のものをを用いた。飼育方法は Nakamura ('41)<sup>8)</sup>の方法によつた。X線の照射条件は、80Kvp 4mA, No filtration, 焦点—被照射体間距離10cmで、線量率は300R/min, 総計6000Rを全身に一時照射した。照射直後に尾部を切断し、切断後の再生の基準については田中('64)<sup>7)</sup>の方法に従い、14日目に観察結果をまとめた。薬剤は飽和溶液を原液とし、水を加えて20パーセントとして用いた。この動物に対して Chlorobuthanol の20パーセントの濃度が致死障害を及ぼすかどうかについて予備実験を行なつた結果、此の溶液に2分間浸漬することにより運動が停止し、外刺激に対して反応がみられなかつた。4分間の麻酔時間後水を戻した所2分後には運動を開始した。さらに、40分間の麻酔時間をかけて水に戻した場合には全個体は2～5分後には完全に麻酔から回復した。すなわち、20パーセント溶液の40分間の浸漬では動物は完全に麻酔されるが致死効果は全く認められず、さらに、80分間の麻酔に対しても致死効果は認められなかつた。これを基として次の方法で実験を行なつた。

(1) 照射前25分間20パーセント Chlorobuthanol中に浸漬して麻酔し、引続き20分間のX線照射中も薬剤中に浸漬し、その後尾部を切断した。6000R

(2) 照射前50分間20パーセント Chlorobutha-

nol 中心に浸漬して麻酔し、引続き20分間のX線照射中も薬剤中に浸漬し、後に尾部を切断した。6000R

(3) 20パーセント Chlorobuthanol 中にて80分間麻酔した後実験動物の尾部を切断した OR

(4) 非照射、非薬剤処理の尾部の切断 OR

(5) 水中でX線照射後、尾部を切断した6000R

照射には各群とも同一容器を用い、水、薬剤各々5cc中に動物を入れて行なつた。照射時の室温は12.5°Cで、飼育は23～31°Cで行なつた。照射後の観察は田中<sup>7)</sup>の基準により、7日目、14日目にしない、14日目の結果をもつて諸種の考案をおこなつた。

#### 実験結果

実験結果を第1表(7日目観察)と第2表(14日目観察)に示した。

第1表では(3)と(4)の非照射群では通常の尾部再生がみられる。即ち、実験に使用した全ての個体において、切断された後部に尾部の再生が行なわれ、しかもその再生された全ての尾部にエラが形成されている。Chlorobuthanol にて処理した群に於てもその尾部再生に関しては非処理の対照群(4)との間に差異を認めることは出来ない。また(1)および(2)による浸漬時間の差異による尾部再生の効果も、実験後7日目における観察に於て、わずかな差異が認められるも、大きな差異とは思われない。即ち、非照射群に於てみられた変化が(2)においては8パーセント認められるが、(3)に於ては1個体もみられない。これが果して有意な差異かどうかは疑わしい。一方、以上の群に比して(5)における照射のみの個体群に大きな効果が示され、大部分が再生芽体の状態にある。

第2表の14日目観察では、非照射群の(3)および(4)では、あらゆる再生の過程を完了し、100パーセントの尾部再生率が得られている。そしてこれら2つの群の間の差異が認められないことは、この Chlorobuthanol が再生過程に影響を与えないことを示しているものと思われる。(1)と(2)との浸漬時間の差異による尾部再生の効果

TABLE. 1. Results of Tail Regeneration on 7th day After Operation and X-Irradiation.

(1) and (2) was Treated 20% Chlorobuthanol Prior to and During X-Irradiation.

The Proceeding than the TgGG was Indicated Regeneration+.

Tg: Regeneration of Complete Tail with Gills.

G: Secondary Gill Formation.

T: Regeneration of Incomplete Tail without Gills.

|   | TREATMENT                   | TAIL REGENERATION |     |      |             |       |      |     | REGENERATION |    | % OF TAIL REGENERATION |
|---|-----------------------------|-------------------|-----|------|-------------|-------|------|-----|--------------|----|------------------------|
|   |                             | Tg                | TgG | TgGG | TTT-G<br>GG | TTGGG | TGGG | GGG | +            | -  |                        |
| 1 | DRUG-TREAT<br>(45min) 6000r | 0                 | 0   | 0    | 3           | 25    | 0    | 0   | 0            | 28 | 0                      |
| 2 | DRG-TUREAT<br>(70min) 6000r | 0                 | 0   | 2    | 9           | 15    | 0    | 0   | 2            | 24 | 8                      |
| 3 | DRUG-TREAT<br>(80min) only  | 0                 | 0   | 25   | 0           | 0     | 0    | 0   | 25           | 0  | 100                    |
| 4 | NON-DRUG,<br>NON-IRRAD      | 0                 | 0   | 27   | 0           | 0     | 0    | 0   | 27           | 0  | 100                    |
| 5 | IRRADIATED<br>ONLY 6000r    | 0                 | 0   | 0    | 1           | 29    | 0    | 0   | 0            | 30 | 0                      |

TABLE. 2. Results of Ttil Regeneration on 14th Day After Amputation and X-Irradiation.

(1) and (2) was Treated with 20% Chlorobuthanol Prior to and During X-Irradiation (6000R). The Proceeding than the TgGG was Indicated Regeneration +.

Tg: Regeneration of Complete Tail with Gills.

G: Secondary Gill Formation.

T: Regeneration of Incomplete Tail without Gills.

|   | TREATMENT                   | TAIL REGENERATION |     |      |             |       |      |     | REGENERATION |    | % OF TAIL REGENERATION |
|---|-----------------------------|-------------------|-----|------|-------------|-------|------|-----|--------------|----|------------------------|
|   |                             | Tg                | TgG | TgGG | TTT-G<br>GG | TTGGG | TGGG | GGG | +            | -  |                        |
| 1 | DRUG-TREAT<br>(45min) 6000r | 0                 | 5   | 15   | 2           | 6     | 0    | 0   | 20           | 8  | 71                     |
| 2 | DRUG-TREAT<br>(70min) 6000r | 5                 | 7   | 6    | 4           | 4     | 0    | 0   | 18           | 8  | 69                     |
| 3 | DRUG-TREAT<br>(80min) only  | 25                | 0   | 0    | 0           | 0     | 0    | 0   | 25           | 0  | 100                    |
| 4 | NON-DRUG,<br>NON-IRRADIATED | 27                | 0   | 0    | 0           | 0     | 0    | 0   | 27           | 0  | 100                    |
| 5 | IRRADIATED<br>ONLY 6000r    | 0                 | 0   | 0    | 7           | 23    | 0    | 0   | 0            | 30 | 0                      |

は、ほとんど変わらないがやや (2) において再生過程の進んだ個体がみられることは第 1 表の結果と類似している。即ち、(2) では尾部再生を行ない、その尾部にエラが形成され、二次的に生じたエラはすでに消失し、完成された再生体のものが 26 匹中 5 匹いるに對し、(1) にてはそのような状態にある個体はいまだ 1 個体もみられない。しかし、田中<sup>7)</sup>の基準から再生プラスとなつたものは (1) にては 71 パーセント、(2) では 69 パーセント

の再生率を示し両者に於てほとんど差がみられない。これに反し、照射のみの個体群では再プラスとなつた個体はなく、再生率は 0 パーセントであつた。

#### 考 按

生体の放射線感受性は呼吸代謝の強度を変更した多くの処理によつて影響されるであろうことはよく知られたことである。放射線感受性に対するこの効果は多分細胞の酸素含量の変化に起因する

のであろう。Bacq and Alexander<sup>1)</sup>によつて示されている麻酔剤や鎮痛剤の効果も酸素を通しての保護効果であることとされている。同様に、Ethyl alcohol の保護機構については Hollaender et al ('53)<sup>9)</sup> が、E. coli を用いた実験から alcohol のように代謝されやすい物質の保護効果は酸素効果と結びついているという考え方があり、高本<sup>5)</sup>も両生類幼生の赤血球を指標とした研究から、X線誘発染色体異常が alcohol 処理群で減少し、この効果は温度処理を加えると変わることから代謝と関係した細胞内の hypoxia に基因すると言っている。さらに、Cole et al<sup>2)</sup> はマウスの死亡率を指標としての保護効果が Ethyl alcohol 処理によつて得られたことから、alcohol の保護効果を Catalase によるものとして説明している他の著者においても大体これら物質の保護作用は細胞、組織内の酸素含量の減少と結びつけた酸素効果として説明している。本実験で得られた保護効果とまた他の動物を用いて得られている同薬剤の保護効果(田中)<sup>10)</sup>とを上記の保護機構とすぐ結びつけることは独断的ではあるが、Chlorobuthanol 処理をおこなうことにより、麻酔され、これによつて動物の生理的機能が低下されるであろうことから、当然予想される呼吸代謝の低下と結びついた機構によつて保護作用が行なわれたと思われる。さらにいま一つの問題は、この方法においては Chlorobuthanol を体内に注射したのではなくその溶液に浸漬して行われたことから、Chlorobuthanol が酸素の溶存量を減少させ、あるいは溶液が酸素を溶存しにくくなったために生体自身があたかも anoxia の状態に近づいたのではないかということであるが、これは Polarography にて測定の結果、Chlorobuthanol 中の溶存酸素は対照とした水と変わらないことがわかった。それ故に、Chlorobuthanol 溶液中にて動物を処理したための間接的な影響は考えられず、この薬剤で麻酔されたが故の機能の低下によるものと解釈してよいと思われる。しかし、得られた保護効果の機構が必ずしも麻酔されたためによる機能低下のみに基因するかどうか簡単に断定しえない。即ち、神経系に対しての関連性なども想定しうる要因である

が、再性という複雑な現象を指標としているが故に酸素効果と断定するためには今後の研究を待たねばならぬ。しかし、田中('63)<sup>11)</sup>によれば濃度を変えて20パーセント以下にするとその保護効果は著しく減少するという知見もある。一方、hibernation をしている間は代謝は最小に減少するがしかし放射線の効果に対しては保護効果はなく、その効果の発現が遅延するだけであるということ Smith et al ('51)<sup>12)</sup> や Doull et al ('53)<sup>12)</sup> はみている。

このようにみえてくると、他の生物学的要因には無関係に呼吸代謝の強度のみを放射線感受性の一般的な基準としてとることには疑問ではあるが、すくなくとも基本的には本実験で得られた結果が保護効果が認められた。今後、X線照射にさいして麻酔による生体の機能低下あるいは Chlorobuthanol の化学構造と放射線に対する保護効果との関連性について種々の麻酔剤を用いてさらに明確な機作を確かめてゆきたい。

## 結 論

(1) 主として水生動物の麻酔剤として用いられる Chlorobuthanol (クロレトン) を用い、エラミズの尾部再生を指標としたX線照射の保護効果が20パーセント溶液の前処理および照射中の処理で顕著であることを知った。

(2) 100パーセントの尾部再生抑制に必要な線量(切断後14日の尾部再生の有無を指標として)として6000Rを照射し、照射のみの対照群(0%)と比較するに、処理した群に於て約70%の再生率を得た。

(3) Polarography での酸素溶存量は20パーセント Chlorobuthanol 溶液と水との間には大差はなかった。

(4) Chlorobuthanol の単独処理は尾部再生に対してほとんど影響しない。

(5) この Chlorobuthanol の保護効果の機構については、呼吸代謝機能の低下、あるいは本剤の化学構造、又は麻酔作用による他の生物学的要因等が可能であり、それらの関連性についてさらに研究をおこない明確にしたい。

稿を終るに当たり、本研究に数々の示唆を与えられ御指

導を賜った京都府立医科大学・生物学教室小野嘉三郎教授、放射線科教室金田弘教授に深甚なる感謝の意を表します。併せて、岐阜県立病院、放射線科科长奥孝行博士には多忙の折に御校閱を賜わったことを深く感謝致します。尚、Polarographyの測定に当り協力して頂きました京都大学・理学部動物学教室大学院学生湊清氏に深く感謝致します。

# 文 献

- 1) Z.M. Bacq and P. Alexander: Fundamentals of Radiobiology. (1961).
- 2) L.J. Cole and M.E. Ellis: Amer. J. Physiol., 170 (1952), 724—730.
- 3) L.J. Cole and S.R. Gospe: Radiat Res., 15 (1961), 684—693.
- 4) E. Paterson and J.J. Matterws: Nature, 168 (1951), 1126—1127.
- 5) 高本薫: Symposia Cell Chem., 9 (1959), 191—200.
- 6) 田中紀元, 仲尾善雄: 動物学雑誌, 72 (1963), 289—292.
- 7) 田中紀元: Nipp Act Radiol, 23 (1964), 1313—1325.
- 8) N. Nakamura: Jap.J. Zool., 9 (1941), 195—208.
- 9) Hollaender, A and G.E. Stapleton: Physiol. Rev., 33 (1953), 77.
- 10) 田中紀元: 未発表
- 11) 田中紀元: 日本放射線影響学会(第5回大会)にて発表(1963).
- 12) Smith, F and M.M. Grevan: Science, 113 (1951), 686.
- 13) Doull, J and Du Bois, K.P.: Proc.Soc.Exp Biol. N.Y., 84 (1953), 367.