

放射線のマウス肝ミトコンドリアへの影響 (第 1 報)

山口大学医学部放射線医学教室 (指導 桜井孝教授)

川 崎 祥 二 桜 井 孝

(昭和43年6月27日受付)

Effects of X-Irradiation on Mouse Liver Mitochondria (Part I)

Shoji Kawasaki and Ko Sakurai

Department of Radiology, Yamaguchi University, Medical School, Ube, Japan

(Director; Prof. Dr. Ko Sakurai)

Oxidative phosphorylation, adenosinetriphosphatase (ATPase) activity, protein content, and ferrous ion induced lipid peroxide formation of mouse liver mitochondria were observed after the whole body X-irradiation (400 rads). In addition, ATPase activity during the swelling and formation of lipid peroxide were studied.

The results are as follow;

1. Oxidative phosphorylation decreased while ATPase activity increased at 3 to 6 hours after irradiation, and recovered to the normal level at 24 hours.
2. Protein contents of mitochondria were decreased temporary after the whole body X-irradiation.
3. Lag period until the formation of lipid peroxide from the addition of ferrous ion, was remarkably accelerated with whole body X-irradiation.
4. In the process of the swelling of mitochondria induced by ferrous ion, at first peroxide was formed in the reaction medium, and DNP-stimulated ATPase activity decreased, and then ferrous ion-induced swelling and Mg^{2+} -stimulated ATPase activity appeared. Endogeneous ATPase activity occurred at the end of the swelling.

緒 言

放射線により細胞内脱水素酵素活性が、変動すると考えられる。また、細胞内のエネルギー生産に関与するミトコンドリアへの影響については、Hallら¹⁾、Kawasaki²⁾、桜井、川崎¹²⁾、Utsmis¹⁶⁾、Yost¹⁸⁾ によつて、放射線の全身一時照射により、酸化的磷酸化能が低下し、uncoupling することが報告されている。

一方、我々は、還元グルタチオンに放射線防護作用があり、肝ミトコンドリアのATPase 活性の増加を抑制する効果があること⁸⁾、並びに、ビタ

ミンB群に、放射線障害からの修復効果があること⁷⁾を報告した。

また、著者⁵⁾¹²⁾は、放射線により、ラット肝ミトコンドリアの lipid peroxidation が促進されることを観察し、E.D. Wills and J. Rotblat¹⁷⁾、Ohara¹¹⁾ は、不飽和脂肪酸が、放射線により peroxide を、あるいは化学的構造の変化することを報告している。

我々は、マウス肝ミトコンドリアの酸化的磷酸化能、ATPase 活性、蛋白質量の変化および lipid peroxidation に対する放射線の影響、並びに、

ミトコンドリアの Fe^{++} イオンによる膨潤と、ATPase 活性、lipid peroxide 生成の関係を観察し、得られた結果を報告する。

材料及び方法

実験動物：dd 系雄マウス週令8～10週（20グラム前後）のものを使用した。

照射方法：照射した放射線の条件は、200kVp, 17.8 mA, フィルター 1.0 mmCu + 1.0 mmAl, F.S.D. 50cm, H.V.L. 1.55mmCu, 線量率, 30R/分, 照射線量は 400 rads である。線量測定には、Victoreen Radocon Type 線量計, Prob Model 612で補正した東芝製深部線量率計を使用した。

ミトコンドリアの分離、放射線照射後、3, 6, 12, 24, 48時間にそれぞれ断首し、ただちに肝臓をとりだし、冷蔗糖溶液中に入れ、Hogeboomの変法²⁾に従って分離し、50 μM Tris を含む 0.25 M蔗糖液に懸濁し、ストックミトコンドリアとした。また、対照群も同様の方法にて分離した。

Fe^{++} イオンによるミトコンドリアの膨潤および過酸化脂質の測定：ミトコンドリアの Fe^{++} イオンにより生成する過酸化脂質の測定には thio-barbiturate (TBA) 反応および酸素消費量の測定¹⁾で行った。TBA反応は、0.15 M KCl—0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 中で Fe^{++} (40 μM) とストックミトコンドリアを反応させ、反応液を各時間取りだし、2% Na-thiobarbiturate (0.25 ml), 5 N HCl (0.125 ml), 40% Trichloroacetic acid (TCA) (0.25ml) と混じ、100°Cで10分間煮沸し、それにエタノールを加えて遠心し、上清の吸光度 (535m μ) を、島津製分光光度計にて測定した。

ATPase 活性の測定：反応液は、0.1M Sucrose, 20mM KCl, 5 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM ATP (adenosinetriphosphate) で、それに、 10^{-3}M MgCl_2 (Mg^{++} -stimulated ATPase) あるいは、 10^{-4}M 2,4-dinitrophenol (DNP-stimulated ATPase) あるいは、なにも加えないもの (None-stimulated ATPase) に分けて測定した。反応液量は 2.0ml とし、反応時間15分、温度25°Cで、反応停止には冷8% TCAである。

酸化的磷酸化能：前述¹²⁾の回転白金電極にて酸

素の消費量を測定した。反応液は0.05M Sucrose, 20mM KCl, 5mM K-phosphate, 0.1mM EDTA である。反応は 2.5ml の反応溶液にストックミトコンドリアを加え、次に基質として、コハク酸 (10mM) を加え、次いで、100m μ mole atom/ml のADPを加え、ADPがATPに磷酸化されるに要する酸素量から計算した。

ミトコンドリアの膨潤：ミトコンドリアの膨潤は、0.15 M KCl—0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) にストックミトコンドリアおよび、40 μM $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を加え、島津分光光度計にて、520m μ の吸光度を測定した。

結果及び考察

酸化的磷酸化能：ミトコンドリアの酸化的磷酸化能を ADP/0 比であらわすと、酸化的磷酸化能は、図1で見えるように、放射線 400rads 照射後 3～6時間に約70%、すなわち1.37～1.40に低下をきたすが、48時間後には回復する。これは前報のラット肝ミトコンドリアの場合と同様に、マウス肝ミトコンドリアにおいても、電子伝達系と磷酸化過程との間に uncoupling がおきたものと思われる。

ATPase 活性：放射線 400rads 照射後、 Mg^{++} -stimulated ATPase 活性は増加する (図1)。照射後3時間で、その増加がみられ、6時間後にピークに達し、その後、徐々に回復する。

これまでの多くの報告では、反応液中に、 Mg^{++} イオンとDNPの両者を含む場合の報告であるが、我々のように、 Mg^{++} -stimulated ATPase の増加があることから、放射線で、肝ミトコンドリアの構造の変化が暗示される。

ミトコンドリアの蛋白質量：ミトコンドリアの蛋白質量の経時的変動を図1に示す。放射線照射により、一時的な減少を示し、その後、回復する。このことは、前報と考えあわせ放射線により、ミトコンドリアの細胞内膨潤が起り、その結果、蛋白質量の減少があるものと考えられる。これは、Hall¹⁾らのミトコンドリア蛋白質量の減少する報告と一致する。

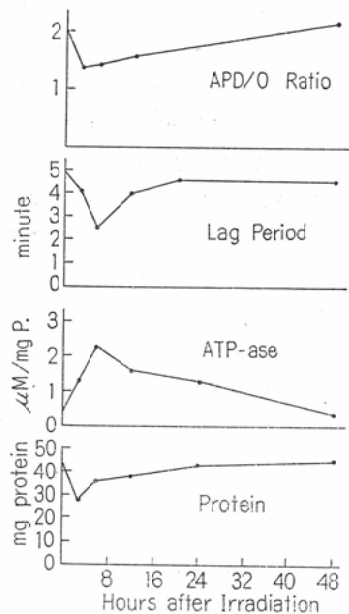
ミトコンドリアの Fe^{++} イオンによる膨潤、分離ミトコンドリアは、Tris-HCl-buffer 中で、 Fe^{++}

Fig. 1. ADP/O ratio, adenosine triphosphatase activity, protein content and lag period of mouse liver mitochondria at various intervals after whole body X-irradiation.

* ADP/O ratio was calculated with the oxygen consumption.

** Lag period was the time the formation of lipid peroxide from the addition of ferrous ion.

*** Adenosine triphosphatase activity was showed with the Pi release in the condition of the presence of Mg^{++} -stimulant.

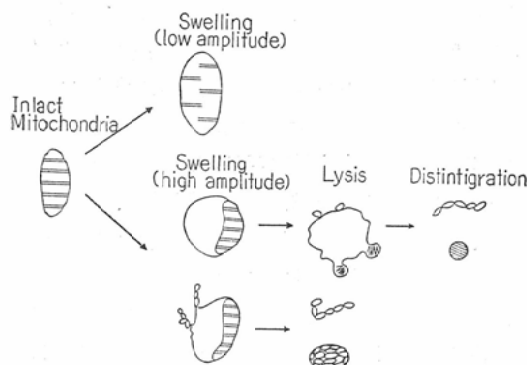


イオンによつて膨潤分解をきたす。この膨潤の直前に lipid peroxide を生成する。lipid peroxide の生成は intact のミトコンドリアでは、 $40\mu M$ の Fe^{++} イオンの添加により、約5分間の lag period がある。放射線の全身照射により、その lag period が短くなり、促進される(図1)。しかしながら、この lag-period は Fe^{++} イオンの濃度によつて、影響されるが⁶⁾、肝ミトコンドリアの in vitro 照射では¹³⁾、20,000R でも、その変化はみられない。

これらのことから、放射線により、マウス肝ミトコンドリアは、エネルギー生産系の、uncoupling を起し、構造的には膨潤し、ミトコンドリアの正常な状態から変化し、構造の変化により、 Mg^{++} -stimulated ATPase 活性の増加および過酸

化脂質形成の促進がみられるものと推察される。すなわち図2にみられるような、膨潤、分解の過程があることも考えられる。また、ミトコンドリアの uncoupling により、細胞内エネルギー生産系の変化および高エネルギー化合物の減少があるのではないと思われる。

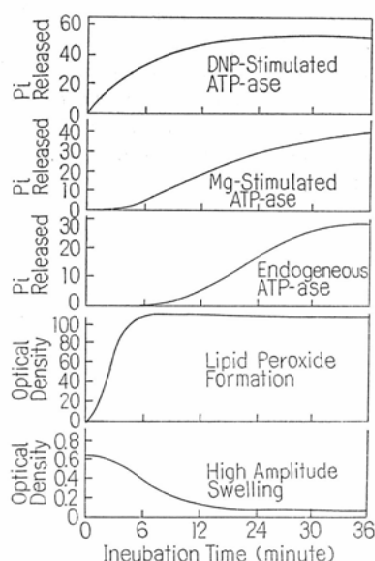
Fig. 2. Scheme of the swelling of mitochondria.



ミトコンドリアの Fe^{++} イオンによる過酸化脂質の生成および ATPase 活性の変化: ミトコンドリアは、Tris-HCl-KCl buffer 中で、 Fe^{++} の添加により、lipid peroxidation を行う。この lipid peroxidation とミトコンドリアの ATPase 活性の関係を観察した(図3)。 Fe^{++} イオンを添加すると、DNP-stimulated ATPase 活性がみられ、だんだんとその活性が落ちてくる。その活性がみられなくなる直前に、lipid peroxide の形成があり、その形成が終ると、 Mg^{++} -stimulated ATPase 活性および膨潤が始る。膨潤が終ると、non-stimulant ATPase 活性 (endogenous ATPase) があらわれる。 Mg^{++} -stimulated ATPase および、non-stimulant ATPase 活性がほとんど同時に終る。この時には、Hunter³⁾ らの報告のように膨潤一分解をきたし、ミトコンドリアが分子状態になったものと推察される。

一般に、アデノシンスクレオチドは、細胞内代謝機構で重要な化合物で、アロステック作用などの、いろいろの役目をはたしている。ミトコンドリアの障害から、ATP 合成能の低下をもたらし、細胞内代謝の異常が起ることが暗示される。我々が、前報⁷⁾ で報告したように、ビタミンB群

Fig. 3. ATPase activity and lipid peroxide formation during ferrous ion-induced swelling (High-amplitude swelling). Basic medium were contained 2×10^{-3} M ATP and 40 μ M ferrous ion in 0.15 M KCl-0.02 M Tris-buffer. DNP-stimulated ATPase; 10^{-4} M 2, 4-dinitrophenol in medium Mg^{++} -stimulated ATPase; 10^{-3} M $MgCl_2$ in medium Endogenous ATPase; absence of stimulant in medium.



に、放射線障害からの回復効果が、またATPに放射線防護効果^{7,9)}が認められることから暗示される。また、細胞内に、SH基を含む酵素はhexokinase, G-6-P dehydrogenase, succinate dehydrogenase等、脂肪酸代謝系、アミノ酸代謝系、解糖系に多量存在するが、SH基を含むグルタチオンによっても、放射線防護効果の認められる⁸⁾ことから、放射線による細胞内エネルギー生産系の異常¹⁰⁾が、細胞をより病的な状態にもたらしめるのではないかと考えられる。

結 語

放射線全身一時照射(400rad)を行い、マウス肝ミトコンドリアの酸化的磷酸化能、過酸化脂質の生成、ATPase活性、蛋白質量の変化を経時的に観察した。また、ミトコンドリアの膨潤、過酸化脂質形成時のATPase活性を測定した。

1. 放射線照射後3, 6時間に、酸化的磷酸化能は低下し、ATPase活性は増加するが、その後

回復に向う。

2. ミトコンドリアの蛋白質量は、照射後、一時減少する。

3. 放射線照射により、過酸化脂質の形成が始まるまでのlag periodは、著しく促進される。

4. Fe^{++} イオンによつて惹起されるミトコンドリアの膨潤の過程には、はじめに、過酸化脂質形成があり、次いで、DNP-stimulated ATPase活性が低下し、後、膨潤および Mg^{++} -stimulated ATPase活性がみられる。膨潤の終るころ、non-stimulant ATPaseがあらわれる。

以上のことから若干の考察を加えた。

謝辞：本研究は文部省科学研究費(入江班研究)の援助を受けた。感謝の意を表する。

文 献

- 1) Hall, J.C., Goldstein, A.L. and Sonnenblick, B.D.: Recovery of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria after whole-body irradiation., J. Biol. Chem. 238(1963) 1137.
- 2) Hogeboom, G.H.: Method in Enzymology, Vol. I, p. 16. Academic. 1955.
- 3) Hunter, F.E. et al.: Studies on the mechanism of swelling, lysis and disintegration of isolated liver mitochondria exposed to mixtures of oxidized and reduced glutathione., J. Biol. Chem. 239 (1964) 614.
- 4) Inaba, K.: The effect of X-ray on the energy metabolism of mouse Ehrlich ascites tumor cells., Nippon Acta Radiologica 22 (1963) 1198.
- 5) Kawasaki, S.: Effect of whole body X-irradiation on the swelling of rat liver mitochondria., J. Rad. Res. 6 (1965), 11.
- 6) Kawasaki, S. and Sakurai K.: Studies on swelling and formation of lipid peroxide induced by ferrous ion of isolated liver mitochondria. I. Relation among lipid peroxidation, swelling and ATPase in isolated mitochondria., Bull. Yamaguchi Med. School 14 (1967), 323.
- 7) 川崎祥二, 桜井孝: 放射線障害に対する各種物質の回復効果, 日医放学雑誌, 28巻 (1969), 1375.
- 8) 川崎祥二, 桜井孝: グルタチオンの放射線防護効果, 印刷中.
- 9) 永井純: エツクス線とアデノシン三リン酸(第3編) 日医放学雑誌, 26巻 (1966), 1145頁.
- 10) 中沢透: ミトコンドリアに対する放射線の作用. 放射線生物研究. 2巻 (1967) 2頁.
- 11) Ohora, S.: The relation between the chemical structure and biochemical properties of

- unsaturated fatty acid irradiated with the X-ray., *Nippon Acta Radiologica* 23(1963), 941.
- 12) 桜井孝, 川崎祥二: マウス肝ミトコンドリアの構造と機能に及ぼす放射線の影響. 山口医大蛋研年報, 2巻 (1967), 42頁.
- 13) 桜井孝, 川崎祥二: マウス肝ミトコンドリアの酸化的磷酸化能, ATPase 活性. 膨潤及び過酸化脂質形成 への放射線の *in vitro* 照射の影響, 山口医学. 16巻 (1968), 1頁
- 14) Saslaw, L.D. and Waravdekar, V.S.: Behavior of unsaturated fatty acid in the thiobarbituric acid test after radiolysis., *Rad. Res.* 24 (1965), 374.
- 15) Thomas, L.B. and Yost, H.T.: The mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation in rat spleen and liver mitochondria after whole body irradiation., *Rad. Res.* 12 (1960) 613.
- 16) Utsumi, K. et al.: Effect of X-ray irradiation on lipid peroxidation and swelling of mitochondria induced by ferrous ion., *Nippon Acta Radiologica* 26 (1966), 345.
- 17) Wills, E.D. and Rotblat, J.: The formation of peroxide in tissue lipid and unsaturated fatty acids by irradiation., *Int. J. Rad. Biol.* 8 (1964), 551.
- 18) Yost, M.T., Robson, H.H. and Yost, H.T.: Uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver and spleen mitochondria by exposure to total-body irradiation., *Rad. Res.* 32 (1967), 187.