

ガラス固化体から発生する放射線の家畜飼料殺菌への
適用に関する研究（II）

1986 年 3 月

北海道大学獣医学部

本資料の全部または一部を複写・複製・転載する場合は、下記にお問い合わせください。

〒319-1184 茨城県那珂郡東海村大字村松4番地49
核燃料サイクル開発機構
技術展開部 技術協力課

Inquiries about copyright and reproduction should be addressed to:
Technical Cooperation Section,
Technology Management Division,
Japan Nuclear Cycle Development Institute
4-49 Muramatsu, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki, 319-1184
Japan

© 核燃料サイクル開発機構 (Japan Nuclear Cycle Development Institute)
2001

ガラス固化体から発生する放射線の家畜 飼料殺菌への適用に関する研究(Ⅱ)*

桑原幹典**

要旨

前年度に引き続きガラス固化体から発生する放射線の家畜飼料殺菌への有効利用を目的として、それに関連した基礎研究をおこなった。まず炭水化物については、グルコース(ブドウ糖)について前年度の段階で明らかになっていなかった化学反応中間体の同定を重水素化グルコースとクロマトグラフィを用いてさらにつづ込んだ研究をおこなった。次いで蛋白質については、含硫アミノ酸を含む蛋白質を中心に変性、分解の研究をおこなった。微生物に対する放射線の作用については大腸菌のプラスミド遺伝子を用いて照射によってもたらされる有機物との反応、さらにそれが支える遺伝子の変化のタイプを明らかにするため、S IスクレアーゼとM・luteusエンドスクレアーゼへのレスポンスを調べた。今年度から新たに γ 線によるマウス飼料の照射とそれが成育にもたらす影響を調べた。クロロフィル分解物による光線過敏症に関する研究をおこなうため、ホウレン草から分解物を抽出した。全て研究を継続中である。

* 本報告書は北海道大学獣医学部が動力炉核燃料事業団の委託により実施した研究の成果である。

** 北海道大学獣医学部

PNC TJ5600 86-005
March. 31, 1986

Studies on Utilization of Radiation from Nuclear Waste Glasses to Decontamination of Feed for Animals. Part 2*

Mikinori Kuwabara**

Abstract

The present experiments were made to get basic information about the utilization of radiation from nuclear waste glasses to decontamination of feed for a domestic animal. First, the effects of X-irradiation on glucose were investigated by the method combining ESR and liquid chromatography. Second, radiation-induced degradation as well as the formation of cross-links were studied for protein with sulfur-containing amino acids. Third, to characterize the products formed by radiation-induced reactions between plasmid pBR 322 DNA and organic molecules were analyzed by the method combining enzymatic digestion and gel electrophoresis. Fourth, the effects of γ -irradiated whole diet on the growth of mice were tested by feeding and weighing them at regular intervals. Finally, pheophorbide, one of degradation products of chlorophyll in plants, were extracted from spinach. In the next project this will be subjected to study photodermatoses of a domestic animal.

*Work performed by Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University

**Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University

目 次

第 1 章	序 論	1
第 2 章	グルコースの放射線分解	2
第 3 章	含硫アミノ酸を含む蛋白質の X 線による分解と変性過程	8
第 4 章	飼料照射に伴う微生物中核酸の変化に関する基礎的研究	13
第 5 章	放射線滅菌マウス飼料の安全性に関する研究	20
第 6 章	植物クロロフィル分解物の調製	24
第 7 章	総 括	28

第1章 序論

放射線は家畜飼料のみならず食品全般にわたり、その殺菌・殺虫、発芽防止等それらの保存・貯蔵に大変有効とされている。高レベル放射性ガラス固化体から発生する放射線をこの様な目的に有効に利用できれば、このガラス固化体の積極的利用という面で大変重要な意義をもたらす。

本研究では家畜飼料の滅菌や品質向上に放射線を適用した場合を想定して、そこに存在するいろいろな問題点を明らかにすべく、各種の基礎的実験をおこなった。まず飼料を照射した時考えられることとして炭水化物の分解と新しい化合物の生成、蛋白質の分解・変性の問題があるが、炭水化物については前年度に引き続きグルコース（ブドウ糖）をX線照射し、その時生成する反応中間体をESR法にて研究した。反応中間体の同定をより一層確かなものとするため重水素化されたグルコースについても同様な実験をおこない、両者の結果を比較検討した。一方蛋白質の方は含硫アミノ酸であるシスティンを含む蛋白質として仔牛胸線の染色体からヒストンH3を抽出しそれの分解・変性を研究した。含硫アミノ酸を含まない蛋白質と比べて分解されにくかつまた他のヒストン分子が存在するとそれに与える影響も特異的で、分解阻止に働く一方で架橋形成を誘発していることがわかった。この結果は蛋白質の分解・変性の解析に役立つことのみならず放射線誘発染色体異常生成の機構を明らかにする意味においても貴重な知見をもたらしてくれた。

微生物に対するX線照射の効果についてはX線照射に供なって細胞内有機化合物とDNAが反応し、それが遺伝子変化を誘発する一つの要因と類推されているので、DNA中に反応が起った部位の性状を明らかにすべく特殊な酵素（S1ヌクレアーゼ、M. luteus エンドヌクレアーゼ）を作用させ、その部位がこれらの酵素により認識されるか否かを調べた。その結果、DNAの構造上の変化が引き起こされていなかったが塩基損傷が引き起こされているのが確認された。

今年度からマウス飼料（ペレット）にX線をあて、それがマウスの生育にもたらす影響について研究を開始した。生まれてから3週間後からX線照射ペレットの飼育を始め現在迄約3ヶ月間の生育度を観察したところ、0～0.5 MGy照射の飼料ではほとんど影響はみられず順調に生育している。0.8 MGyと1 MGy照射飼料では1週間以内ですべてのマウスが死亡した。0.5 MGyから0.8 MGyまでの間に飼料を大きく変性する何かがおこっているものと推定される。研究を続行中である。

乾燥した牧草を食べることにより家畜はしばしば光線過敏症をひきおこすが、これはクロロフィルムの分解物であるフェフオーバイドaによるものと考えられている。この動物におよぼす生理学的病理学的研究をおこなうため、ホウレン草よりクロロフィルを抽出し、さらに酸加水分解によりフェフオーバイドaを作り最終的にショ糖によるカラムクロマトグラフィーにて精製した。現在活性酸素生成の機構を研究中である。

以上、炭水化物と蛋白質の研究については昨年に引き続き新しい知見が得られている。食品中の微生物の研究はさらにもっとつめた研究が必要である。X線照射飼料にマウスの飼育とクロロフィル分解物による光線過敏症の研究については今後意味ある研究成果を期待している。

第2章 グルコースの放射線分解

研究担当者 桑原幹典、稻波 修

遠藤大二、佐藤文昭

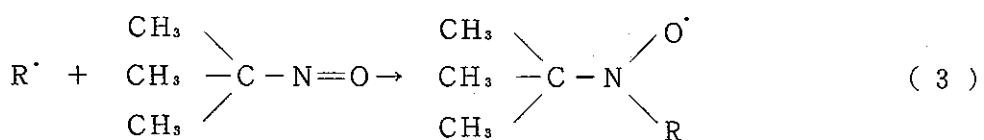
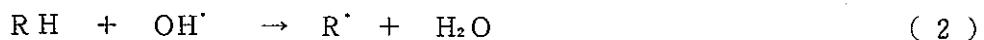
北海道大学獣医学部

グルコース（ブドウ糖）は炭水化物の代表的な化合物であり栄養学的な面からも色々な角度から研究されている。前年度我々はグルコースを食品照射時における変性過程を研究する際のモデルとして採用した結果を報告した。¹⁾ 実験方法として電子スピン共鳴法（ESR）を用い、グルコースの水溶液をX線照射したときOH[·]によりどの様な反応中間体が生成されるかを検討した。しかしながら、得られたESRシグナルを基にした中間体の構造の同定には不確かさが残った。今回重水素化したグルコースであるグルコース-6、6-d₂を用い水素-重水素置換効果を調べ、かつまたESRシグナルが複数からなり立っているので夫々のコンポーネントを液体クロマトグラフィで分離し、より正確な同定をおこなったので報告する。

実験 方 法

1. X線照射

グルコースを20mM純水に溶かし、さらに2-メチル-2-ニトロソプロパンを20mM溶かした。この溶液2mlをX線で2.4KGy照射した。こうすると水溶液が分解して活性酸素(OH[·])が作られ、これがグルコースに反応して様々な反応性を帯びたグルコースの中間体を生成する。この中間体は不安定で短寿命であるため一般的には測定困難であるが、2-メチル-2-ニトロソプロパンの様なニトロソ化合物を加えておくとそれを反応して付加体を作り、中間体としての構造を有したまゝ安定化される。²⁾これを反応式でまとめると次の様になる。



ここでRHはグルコース、R[·]はグルコースがOH[·]と反応して出来た反応中間体である。(3)式はR[·]がニトロソ化合物と反応して安定化される反応を表わしている。ここでR[·]は1種類に限らず多種類できると考えられるが、前回の報告でも述べた様に少なくとも2種類のR[·]が効率良く安定化された。

2. 液体クロマトグラフィ

上で述べた2種類の付加体を夫々分類するため逆相カラム(SEP-PAK C₁₈カートリッジ)で分類をおこなった。X線照射後、2mlの溶液をSEP-PAKに通し、次いで10%エタール水溶液に後10%ずつ段階的に60%に至るまでメタノール濃度を上げ溶出した。メタノール0

%の溶出でまず1種類の付加体が回収されそのESRスペクトルが記録された。さらに40%の溶出時でもう1つの付加体が回収され、同様にESRスペクトルが記録された。

3. フェノール硫酸法およびシップ試薬による糖の構造の分析

2.の方法に従って得られた各フラクション(0-60%メタノール抽出フラクション)を一度凍結乾燥し、再度純水2mlに溶かし夫々をフェノール硫酸法でこれらのフラクションに属している糖が還状構造を有しているか否かを検討した。次いで、もしグルコースが分解を受けて直鎖状になるとすると必ずアルデヒド基を有しているので、これを目安にシップの試薬を作用させてその結果より直鎖状の有無を測定した。

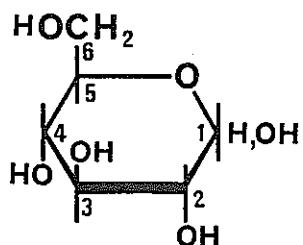
4. ESR測定

ESR測定は日本電子製電子スピン共鳴装置J E O L - M E Xバンドスペクトロメーターを用いて行なわれた。マイクロ波強度10mW、変調磁場強度0.02mT、時定数0.3秒にセットし、平型水溶液用セルを用いてスペクトルを記録した。

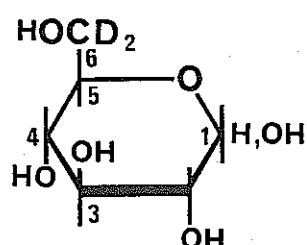
結 果 と 考 察

図1(a)はX線照射直後に記録されたESRスペクトルを示す。A、B、Hでラベルされた3種類のシグナルから構成されている。Hでラベルされたシグナルは安定化捕捉剤である2-メチル-2-ニトロソプロパンに³Hラジカルが付加したものであるが、これの与える意味については前回の報告書で述べた。X線照射された溶液をクロマトグラフィで分離した結果が(b)と(c)である。(b)はメタノールを含まない一番最初のフラクションにおいて回収されたグルコースの反応中間体と2-メチル-2-ニトロソプロパンの付加体の1つであり((3)式参照)、それによってもたらされたESRスペクトルである。一方(c)は40%エタノール水溶液で溶出されたフラクションの中に存在していた付加体によるESRスペクトルである。クロマトグラフィーによりこの2つの成分が鮮かに分離されたのがわかる。前年度の報告ではこの様な分離は試みなかったが、2種類の反応付加体の存在は示唆していたので、それをさらに確証したことになる。

次の問題はこの2種類のシグナルを与える付加体の構造の問題である。それを明らかにするためグルコースのC6部位の2個のH原子をD原子で置換したグルコース-6、6-d₂を用い上と全く同じ実験をおこなった。その結果を図2に示す。図2(a)はX線照射直後のESRスペク



グルコース



グルコース-6-d₂

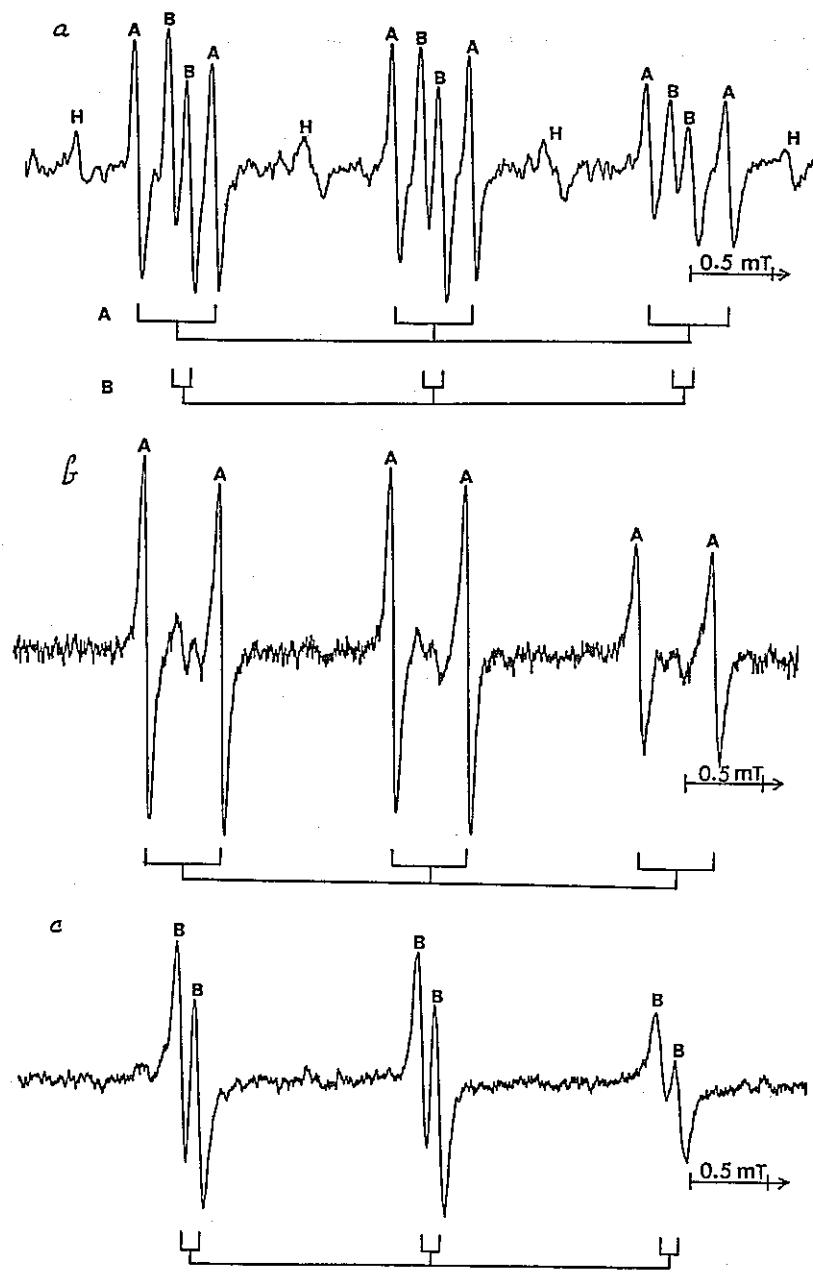


図1. (a) グルコースと2-メチル-2-ニトロソプロパンを水溶液に溶かし、X線照射後記録したESRスペクトル。ラベルA、B、Hは3種類のシグナルから成立していることを示している。(b) SEP-PAK C₁₈逆相カラムを用いて(a)における成分を分離したとき得られたスペクトル。溶出液にメタノールを含まない場合。(c) 40%メタノール水溶液で溶出された成分のESRスペクトル。詳細は本文中に記載されている。なおHでラベルされたシグナルはクロマトグラフ中に消失した。

トルで図1(a)と比べて解るとおりC₆部位でのH-D置換がはっきりと現われている。SEP-PACK_{C18}によるクロマトグラフィで分離した結果を(b)と(c)に示す。図2(b)はメタノールを含まないフラクションにおいて回収された付加体を反映しているESRスペクトルであり図1(b)のスペクトルに対応する。図1(b)でみられた6重線が図2(b)で9重線に変ったのがわかる。これはC₆部位のHがDに置換された結果でありそれ故反応式(1)で生じたOH[·]が反応式(2)でグルコースに作用しグルコースのC₆の2個のHの1つを引き抜き(R[·]の生成)、それが最終的に2-メチル-2-ニトロソプロパンと反応し付加体を形成したものと解釈される(反応式(3)参照)。図2(c)は40%のメタノール水溶液により溶出されたフラクションに含まれている付加体によるESRシグナルである。したがって、これは図1(c)のそれに相当する。驚いたことにこのスペクトルにおいてもH-D置換の効果が見られたことである。すなわち図1(c)の6重線が図2(c)において3重線に変化している。この場合も図1および2の(b)を与えた付加体と同様グルコースのC₆部位での反応中間体(R[·])の生成と見なされなければならない。

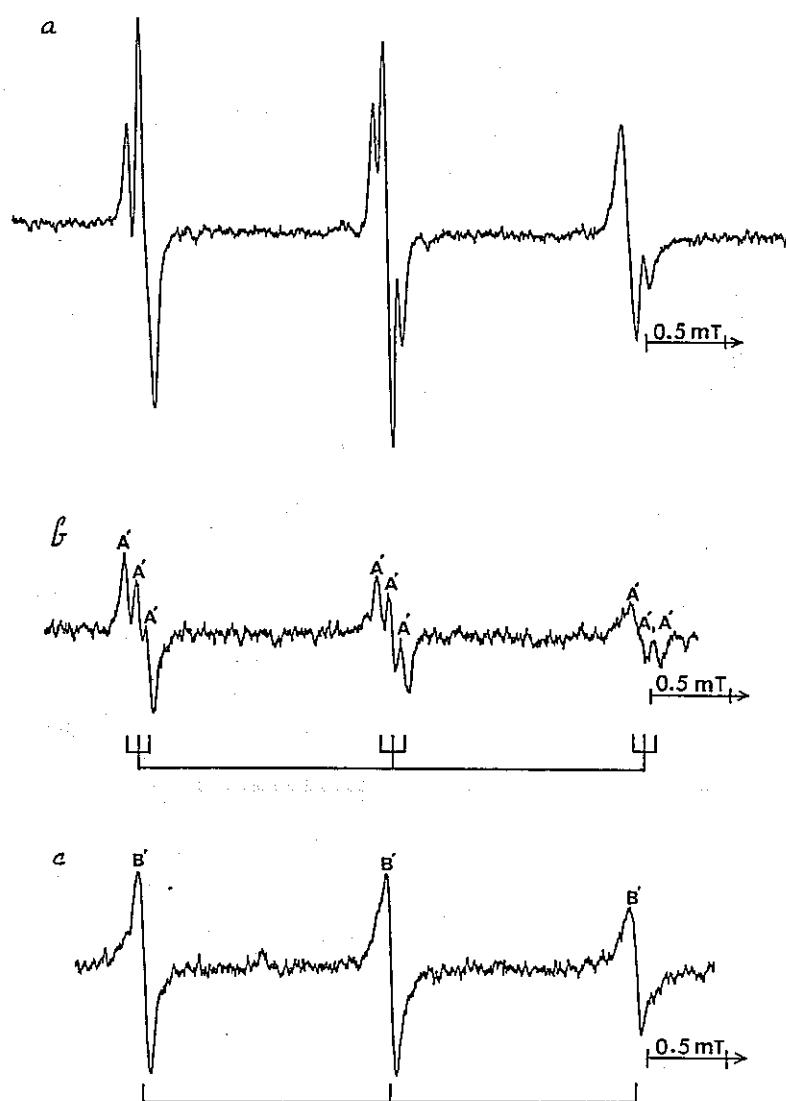


図2 (a) グルコース-6, 6-d₂と、2-メチル-2-ニトロソプロパンを水溶液に溶

かし、X線照射後記録されたESRスペクトル。(b)図1の場合と同じく逆相のカラムクロトグラフィにて分離された残分のESRスペクトル。ラベルA'は図1のシグナルAに対応するという意味を持っている。(c)同じく分離された残分のスペクトルB'は図1のシグナルBに相当している。

グルコースのC₆部位でのH引き抜きによるラジカルが2-メチル-2-ニトロソプロパンと付加体を作ったとき何故2種類の異なったシグナル(図1のAでラベルしたシグナルとBでラベルしたシグナル)を与えたのであろうか。図3はシグナルAを与えるグルコース中間体とシグナルBを与えるグルコースの中間体の構造上の差異を検討するために行った実験の結果である。横軸は溶出液の容積を表わし、0-2のフラクションはメタノールを含まない溶出液、2-3は10%メタノール溶出の場合、3-4は20%メタノール等々60%迄の濃度のメタノール溶出を表わす。上のグラフは夫々のフラクションに含まれるシグナルAの強度(---・---)とシグナルBの強度(-×-×-)をプロットしたものでメタノール濃度が低い段階でシグナルAが主に溶出し、メタノール濃度が上がるにつれてシグナルBが溶出してくるのがわかる。矢印AとBは図1(b)と(c)のスペクトルが記録された時に使用されたフラクションの位置を示す。下図はフェノール硫酸法によるグルコースとシッフ試薬によるアルデヒド検出の結果を示す。白抜きの

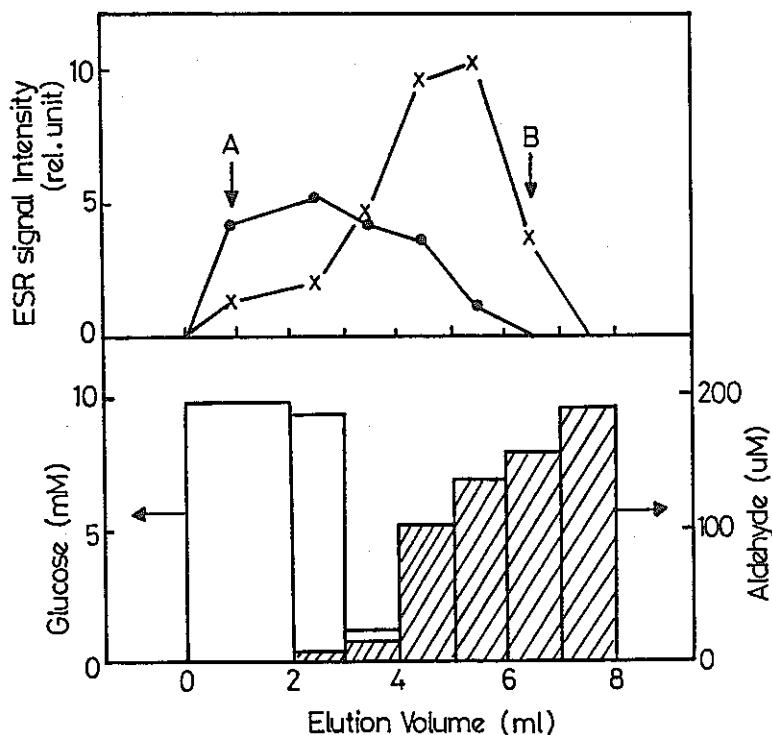
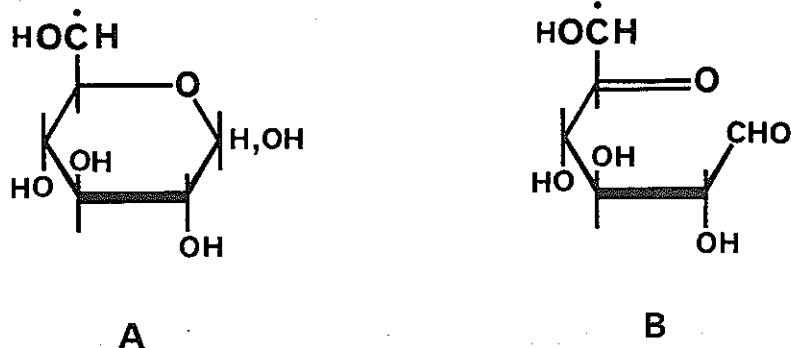


図3. グルコースと2-メチル-2-ニトロソプロパンの付加体を逆相カラムでクロマトグラフィを行った時、夫々のフラクションに含まれる成分AとBの強度をプロットしたもの(上図)。また、夫々のフラクションに含まれる成分をフェノール硫酸法とシッフ試薬法にて付加体の構造を調べたもの(下図)。詳しくは本文中参照。

ヒストグラムはフェノール硫酸法の結果、斜線入りのヒストグラムはアルデヒドの結果を意味する。アルコールの濃度が低い所の溶出では溶出してきた付加体はグルコースとして定量されるところから環状構造を有しているのがわかる。メタノールの濃度が上るにつれて溶出してくる付加体の構造はグルコースとしては認識されず、それ故環状構造が維持されていない。かわってアルデヒド基がはっきりと検出されている。これはグルコースの環状構造が壊れ、直鎖状に構造が変化したことを意味している。³⁾ 以上の結果から判断するとシグナルAとシグナルBに対応するグルコースの中間体は下図の様になると考えられる。



2-メチル-2-ニトロソプロパンと付加体を作る際の反応部位はC₆であっても、一方は未だ構造が環状を有しているのに対し、他方は直鎖状に変わってしまっている。このため与える ESR シグナルも異なり、また当然のことながら液体クロマトグラフィにおいても溶出するフラクションが異なってくる。

おとぎのめ

本研究では重水素化グルコースと液体クロマトグラフィを組み合わせ、前年度報告時では明らかでなかったスペクトルの同定が可能になったことを示した。反応中間体はX線照射によりOH⁻から作られ、それがグルコースからHを引き抜く事により作り出される。しかもその部位がC₆^{4, 5, 6)}であることが明らかにされた。現在迄いくつかグルコースに関する研究が見られるが、皆同じ結果でありしかも中間体の同定には夫々不確かさが残っていた。それ故今日の結果は非常に意味の大きいものであると云えよう。たゞし今回の研究は酵素存在下でX線照射しているため、かなりの中間体が酵素によりマスクされてしまい観測にかゝっていない様に思われる。今後無酸素化での照射実験を行う必要がある。

参 考 文 献

- 1) 桑原幹典、稻波 修、佐藤文昭：ガラス固化体から発生する放射線の家畜飼料殺菌への適用に関する研究、第2章 炭水化物の放射線化学、P N C S J 168 85-05、1985
 - 2) E. G. Janzen: Spin Trapping, Acc. Chem. Res. 4, 31(1971)
 - 3) C.von Sonntag: Free-Radical Reactions of Carbohydrates as Studied by

- Radiation Techniques, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 37, 7(1980)
- 4) M. Kuwabara, Y. Lion and P. Riesz: E. S. R. of Spin-Trapped Radicals from Sugars, Int. J. Radiat. Biol. 39, 451(1981)
 - 5) C. J. Thiery, JP. L. Angel, C. M. Frejaville and J. J. Raffi: ESR Spin-Trapping Analysis of γ -Induced Radicals in Polycrystalline α -D-Glucose, J. Phys. Chem. 87, 4485(1983)
 - 6) JP. Angel, C. Thiery, C. Battesti, P. Vincent and J. Raffi: HPLC and ESR Studies of Some Sugar-Nitroxide Solutions, Anal. Chem. 18(A8), 1013(1985)

第3章 含硫アミノ酸を含む蛋白質のX線による分解と変性過程

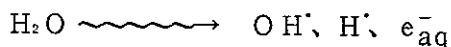
研究担当者 稲波 修、桑原幹典、佐藤文昭
北海道大学獣医学部

蛋白質を照射すると、分解、架橋体形成、アミノ酸残基の変化など、様々な変性が起きることを昨年報告した。しかしながら、実際の複雑な成分を持つ飼料や食品を照射する場合、その分解物を評価するのは容易ではない。Adamは実際の食品に近いモデル系として、二糖類であるトレハロースと蛋白質を含む水溶液を用い、照射の際に形成するトレハロースの分解物の同定と収率を測定した。¹⁾この研究によると、トレハロースに牛血清アルブミンやオブアルブミンなどシスティンを多く含むタンパク質を加えると、何も加えない場合と比較してトレハロースの分解物生成物であるグルコース、5-デオキシキシロヘキソジアルドースの生成量が著しく減少することを見い出した。一方、システィンを含まないミオグロビンを加えてやるとグルコースの生成はやはり減少するが、5-デオキシキシロヘキソジアルドースの生成量は逆に増大することを示した。この様に、蛋白質の-SH基と放射線との感受性との間には深い関連性があり、そのメカニズムも単純でないことを予想させる。著者らも、この放射線感受性における-SH基の役割に着目し、昨年より染色体の蛋白質であるヒストンのサブユニットを用い、検討してきた。ヒストンサブユニットはH1、H2A、H2B、H3、H4の5つのサブユニットより構成され唯一H3のみ2個の-SH基を持っていることが知られている。この点で、-SH基に着いた実験にはよいモデルであると考えられる。著者らはまず、これらのヒストンサブユニットの放射線感受性を調べ、次にH3に他のサブユニットを加えた溶液に照射し、加えたタンパク質の放射線感受性に影響を与えるかどうか検討した。

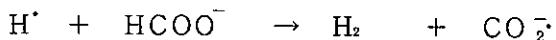
実験方法

全ヒストンは仔牛胸腺より Murray の方法²⁾にしたがって抽出した。ヒストンサブユニットは全ヒストンを Bio-Gel P-60 と Sephadex G-100 の 2 つのカラムクロマトグラフィーにかけ分画、単離した。ヒストンサブユニットは $4 \times 10^{-5} M$ となる様、0.5 ギ酸ナトリウムに溶解し、アルゴンガスで置換後 X 線照射を行った。照射による分子量変化は、SDS 存在下のポリアクリルアミドゲル電気泳動法³⁾により分析した。

この照射条件では次に示す反応が起きていると考えられる。まず水に放射線のエネルギーが吸収し、 OH^{\cdot} 、 H^{\cdot} 、 e_{aq}^- が生成する。



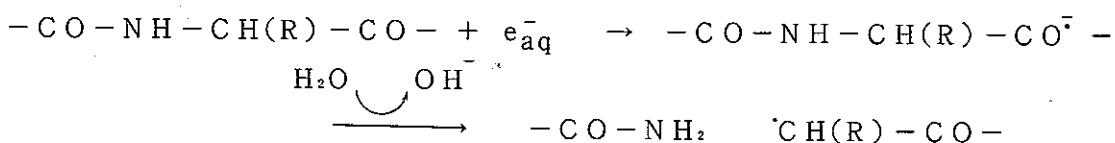
そして、 OH^{\cdot} と H^{\cdot} はギ酸イオンと反応する。



したがって、この照射条件では e_{aq}^- のみが蛋白質と反応すると考えられる。 OH^{\cdot} ラジカルは昨年報告した様に、条件によって分解を起こす場合と、架橋体を形成する場合がある。またその機序も明確にわかっていない。一方、水和電子(e_{aq}^-)とタンパク質の反応は最近の著者らの研究で、主に分解反応であり、それも脱アミノ反応による主鎖切断のみであることが示されている。⁴⁾ 反応形式が明確にわかっている点で、水和電子(e_{aq}^-)との反応系の方が実験結果の解釈を容易にするとと思われる。

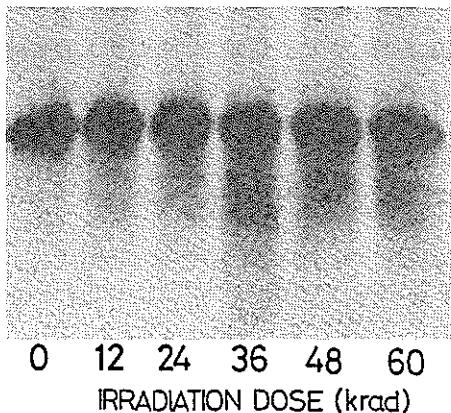
実験結果と考察

まず、蛋白質がシステイン残基を持つかそうでないかで放射線の感受性が影響されるか否か検討するため、単離したヒストンサブユニットの水溶液に照射し、分解の程度を比較した。結果を図 1 に示す。H2A、H2B、H4 の各フラクションでは照射することにより移動度の速いペードが生成されることが示された。これは、それぞれのタンパク質が水和電子(e_{aq}^-)と反応し、鎖切断を起こし、蛋白質の低分子化を導いているからと解釈される。著者らは、最近この分解のメカニズムは次に示す様な脱アミノ反応であることをスピントラッピング法を用いて同定した。⁴⁾

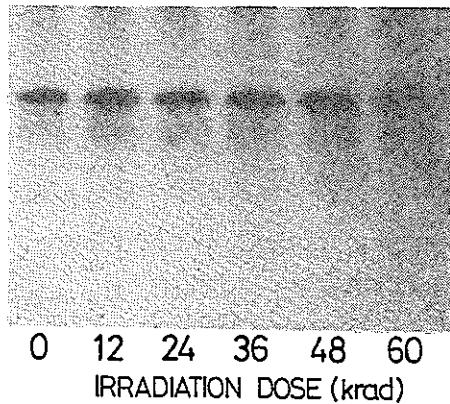


一方、H3 の場合には、他のサブユニットと比較して、用いた線量域でこの分解反応による断片化はほとんど起きていない(図 1)。ヒストン H3 を他のサブユニットと物理化学的性質について比較すると、2 個のシステイン残基を持つこと以外、そのアミノ酸組成、分子量、3 次構造などお互いによく似ていることが知られている。また、グルタチオン、システイン、システアミンなどの-SH 化合物は放射線によって損傷を受けた生体分子に対して水素供与体として作用し、⁵⁾ 化学的な修復の役割を担うことが報告されている。以上の事から類推すると、ヒストン H3 の-

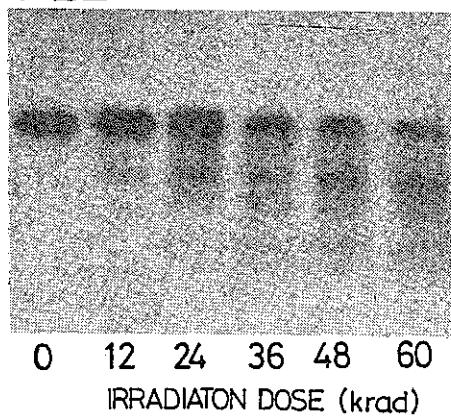
H2A



H3



H2B



H4

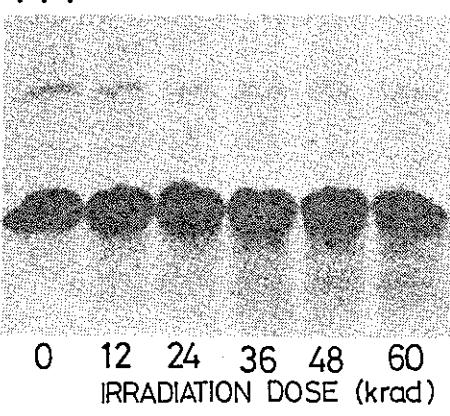


図 1. ヒストンサブユニットの照射による分子量変化。各ヒストンサブユニットを $4 \times 10^{-5} M$ となる様 0.5 M ギ酸ナトリウム水溶液に溶解後、Ar 飽和条件下で X 線照射を行い SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。照射線量は Kvad で示した。

S H 基が、上で述べた - S H 化合物と同様に、化学的修復に関与していると考えられる。

この推論が正しいかどうかさらに検討するために、ヒストン H 3 と他のサブユニットの一つである H 2 A を等モル含んだ水溶液に、同様に照射し、加えた H 2 A の放射線分解が H 3 によって抑制されるかどうか調べた。その結果を図 2 A に示す。さらに定量的に評価するために、得られた泳動パターンをデンシトメーターにかけ、その H 2 A の面積と線量との関係をプロットした(図 3)。図 3 から明らかな様に、照射中 H 3 が存在することにより、著しく H 2 A の分解が抑制されていることがわかる。直線の勾配から G 値(放射線を 100 eV 吸収した時変化した分子数)を求めると、H 2 A 単独では 0.50 であるのに対し、H 3 が存在することにより 0.27 までその分解の程度が低下していることが判明した。

また、興味深いことには、H 2 A と H 3 の混合溶液を照射することにより高分子の架橋体(図 2 A 矢印)が形成されることも示された。次にこの架橋体の性状を調べるために、照射後、試料を還元剤である 2-メルカプトエタノールで処理し、泳動を行ったところ、この架橋体は消失することが明らかとなつた。したがって、この架橋体はジスルフィド結合による H 3 の二量体であることが結論づけられた。

以上のことから推論すると、ヒストン H 3 の - S H 基が H 2 A の損傷部位に対して水素供与体として作用した後、次の反応式の様にジスルフィド結合を形成するものと考えられる。

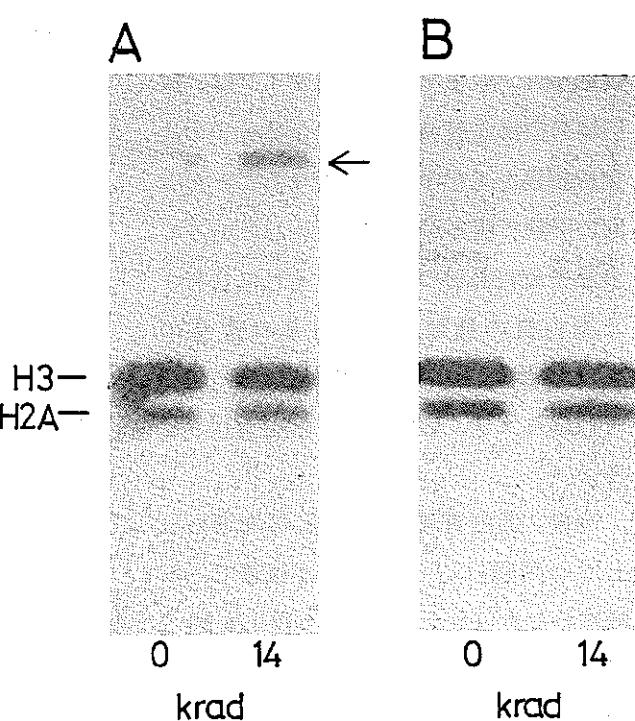
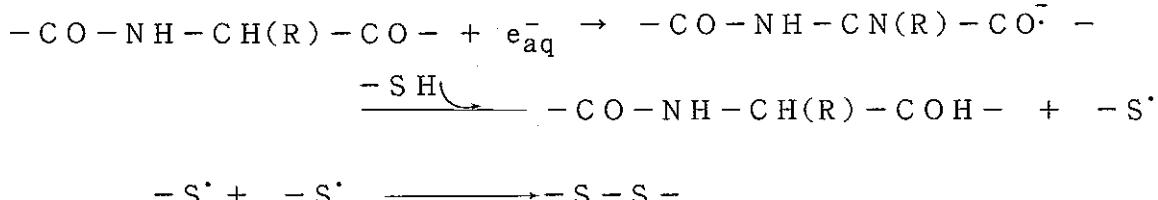


図 2. ヒストン H 3 と H 2 A の混合水溶液に対する照射による分子量変化。

(A) ヒストン H 3 と H 2 A をそれぞれ 2.5×10^{-5} M となる様 0.5 M ギ酸ナトリウム水溶液に溶解し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分析した際得られた泳動パターン。

(B) 照射後、試料を 0.1% 2-メルカプトエタノールで処理し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分析した際、得られた泳動パターン。

ま　と　め

蛋白質に含まれるシスティンは、放射線の損傷を軽減し、他の生体分子の放射線損傷をも化学的に修復することが今回の実験で明らかになった。したがって、食品や飼料照射の場合も、それに含有する蛋白質の種類、-SH基の含有の程度などによって、放射線分解物の種類や収率に大きく影響することを予想させる。

今後、蛋白質の放射線化学を進める上で問題は、その反応が複雑で、多岐にわたるOHラジカルとの反応を調べてゆかなければならぬ。現在、この点を今まで用いてきたゲル電気泳動を中心とした分子量変化だけでなく、ESR-スピントラッピング法など物理化学的手段を用いて検討することを予定している。

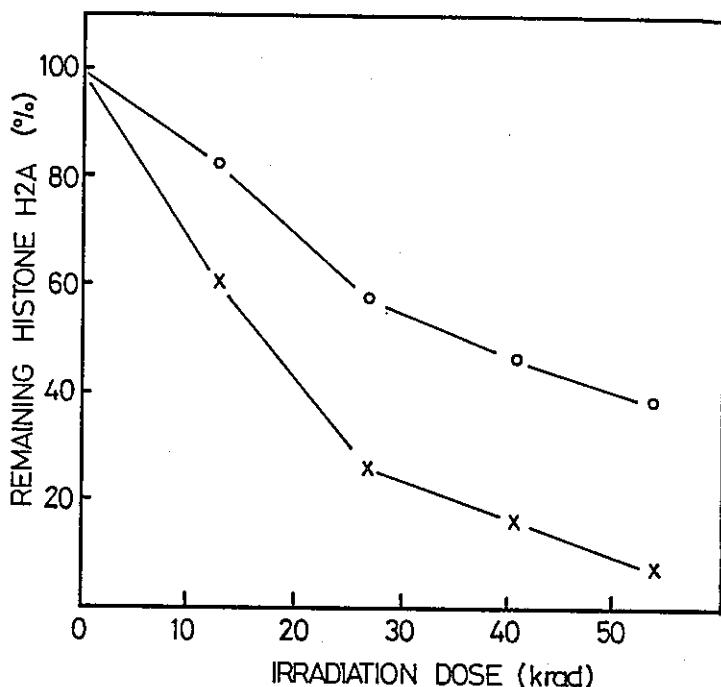


図3. ヒストンH3存在下(○—○)あるいは非存在下(×—×)におけるヒストンH2Aの分解反応に対する影響。各線量における泳動パターンをデンシトメーターで測定し、非照射のH2Aの面積を100%としてプロットした。

参　考　文　献

- 1) S. Adam: Radiolysis of α,α -Trehalose in Concentrated Aqueous Solution: the Effect of Co-irradiated Proteins and Lipids, Int. J. Radiat. Biol. 42. 531(1982).
- 2) K. Murray: The Acid Extraction of Histones from Calf Thymus Deoxyribonucleoprotein, J. Mol. Biol. 15. 409(1966).
- 3) U. K. Laemmli: Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature(London). 227, 680(1970).
- 4) O. Inanami, M. Kuwabara, M. Hayashi, G. Yoshii, B. Syuto and F Sato: Reaction of the Hydrated Electron with Histone H1 and Related Compounds Studied by e.s.r. and Spin-Trapping, Int. J. Radiat. Biol. 49. 47(1986).
- 5) K. Held, H. Harrop and B. D. Michael: Effects of Oxygen and Sulphydryl-Containing Compounds on Irradiated Transforming DNA. II. Glutathion, Cysteine and Cysteamine, Int. J. Radiat. Biol. 45. 615(1984).

第4章 飼料照射に伴う微生物中核酸の変化に関する基礎的研究

研究担当者 遠藤大二、平野孝一、桑原幹典、佐藤文昭
北海道大学 獣医学部 獣医放射線学教室

飼料に放射線を照射した場合は微生物が放射線の作用によって死滅し、殺菌効果が期待される。この殺菌の程度は、単純なモデル系としての水溶液中においては正確に予想することができるが、有機物が多量に存在する食品中においては殺菌の効果を正確に予測することは難しい。¹⁾殺菌効果は微生物中の核酸(DNA)の変化(損傷)と深く関係しているが、有機物を多量に含む水溶液中ではDNAの損傷は(1)放射線の直接エネルギー付与、(2)放射線によって活性化された水分子(水ラジカル)および(3)放射線によって活性化された有機物(有機ラジカル)三者の作用によって生じるからである。食品中においては有機物の組成、水の含有量などの条件は必ずしも一定しない。^{2,3)}従って、水および有機物等の条件によって殺菌効果が大きく変わる可能性がある。また、同時に生残した少数の微生物において突然変異が生じる確率も検討する必要がある。⁴⁾

本研究においては、食品中の微生物の生残と突然変異の基礎的な知見を得るために核酸の放射線による変化をプラスミドDNAを用いてしらべた。プラスミドDNAは生物的活性を有する遺伝物質であると同時に、他の因子を含まない純粋なDNAであり、照射をおこなう場合に化学的な取扱いが容易である。今回は有機物を多量に含む水溶液でDNAを照射し、有機物を介する放射線の作用(3)の有機ラジカルによるDNAの変化について検討した。

方 法

DNAとしては、大腸菌のプラスミドpBR322を用いた。プラスミドpBR322は大腸菌の中で自律的に増殖し全く同じ配列をもったDNAとして多量に得られるためスクレチオドの塩基配列も全て明らかにされており、組み替え遺伝子の手法にも最も多く使用されている。プラスミドpBR322は大腸菌*Escherichia coli* HB101株より抽出した。^{6,7)}保存菌株より分取された大腸菌をテトラサイクリンを3 μ g/mlとなる様に加えたLB培地でOD₆₀₀が1.0になるまで増殖した後、クロラムフェニコールを2mg/mlとなる様に加え、1夜の通気培養を行なった。この通気培養の間、大腸菌の菌数は増えず菌内のプラスミドpBR322のみが増加する。通気培養終了後、培地を毎分6,500回転の遠心することによって集菌した。その菌を5.0 mM glucose, 2.5 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1.0 mM EDTA, 5mg/mlリゾチームに懸濁し氷冷中で5分間大腸菌の細胞壁を消化した。粘性の増大した懸濁液にアルカリ性の溶菌液(0.2 N NaOH, 1% SDS)を加え、攪拌後、5分間細胞膜を溶解した。透明になった溶液を酢酸カリウム溶液(6.0 mlの5 M 酢酸カリウム, 11.5 ml H₂O, 28.5 ml 氷酢酸, pH 4.8)で中和し、水中で60分間静置した後、毎分10,000回転で10分間遠心し、粘性の低い上清を分取した。この上清には主としてプラスミドDNA、大腸菌のDNAの一部、RNAおよび蛋白質が含まれる。上清にイソプロパノールを加え、-80°Cで凍結した。室温で溶解した溶液を毎分10,000回転で20分間遠心することによってDNAとRNAを沈殿させた。沈殿を70%エタノールで洗浄し、再び1.0 mM Tris-HCl, 5.0 mM NaCl, 1 mM EDTA(pH 8.0)に溶解した。その溶液のA₂₆₀ unitあたり1 unitのRNase Aを加え37°Cで15分間インキュベートし、

溶液中のRNAを低分子化した。RNAの消化が終了した後、フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコール(49:49:2)と攪拌後遠心することによってRNase Aを除去した水溶液を得た。この水溶液中のDNAをエタノールによって沈澱した後、80%エタノールによって沈澱を洗浄した。この沈澱にはプラスミドDNA以外に低分子化したRNAを含まれているため、このRNAをイオン交換樹脂NACS 37で除去した。NACS 37は0.5M NaCl溶液で全ての核酸を吸着し、0.6M NaCl溶液で閉環状DNAのみを遊離する。プラスミドDNAは、閉環状の構造をとっているのでこの性質を利用して精製をおこなった。すなわち、エタノールによって十分に洗浄した核酸の沈澱を0.5M NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA(pH 8.0)に溶解し、NACS 37と室温において1時間攪拌した後、遠心によってNACS 37を沈澱させ、上清を捨てた。NACS 37にもう一度0.5M NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA(pH 8.0)を加えて同様の操作を行った後、0.6M NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA(pH 8.0)を加えて1時間攪拌した。この懸濁液の遠心上清には純度の高いプラスミドDNAが含まれていた。このDNAをエタノール存在下で遠心することによって得たDNAをプラスミドDNAの標品として用いた。

放射線の照射はX線を用いて行った。10mM Tris-HCl, 10mM NaCl, 1mM EDTA(pH 8.0)および有機物(本実験ではギ酸ナトリウム)の水溶液中にDNAが80 μg/mlとなる様に溶解し、亜酸化窒素ガスを通気させながら照射を行った。この条件では、放射線によって有機ラジカルが生じ、それがDNAと反応する。水を含まない状態での放射線の作用をしらべるために乾燥プラスミドDNAを照射して損傷の生成をしらべた。DNAをガラス管中で真空乾燥し、ガラス封入した後、X線照射をした。照射後、DNAを10mM Tris-HCl, 10mM NaCl, 1mM EDTA(pH 8.0)に溶解して分析を行った。

プラスミドDNAの変化は1%アガロースゲル中の電気泳動によって調べられた。⁵⁾ 照射されたDNA溶液25 μlに同量の40%ショ糖、0.02%プロムフェノールブルーを加え、泳動をおこなった。DNAの移動の速さはDNA分子量と立体構造に依存して決まることが知られている。通常使われる条件ではゲル内での移動は閉環状のプラスミドDNA、直鎖状のプラスミドDNAそして開環状のプラスミドDNAの順であることが知られている。プラスミドDNAは本来閉環状の構造をとるが鎖切断を生じると開環状または直鎖状の構造をとり、プラスミドDNA照射したときには、線量の増加とともに開環状そして直鎖状のDNAが増加する。^{5), 8)}

DNAの定量はゲル中のDNAを硝酸銀で定量的に染色することによっておこなった。泳動後のゲルをガラスプレート上にのせ50℃において風乾した。ゲルが完全に透明な薄膜になった後に1%酢酸中に入れ、膨潤させた。充分に膨潤した後にゲルをガラスからはがした。2回蒸留水で20分ずつ3回洗浄した後に銀染色液(50g/l, 炭酸ナトリウム溶液(A液)と2g/l硝酸アンモニウム, 2g/l硝酸銀, 10g/lケイタングステン酸, 0.2%ホルムアルデヒド(B液)を等量混合、混合後直ちに使用)に入れた。10分程度で発色が適当に進むのを確認した後に1%酢酸中で発色を停止させた。発色したゲルは水洗した後再び乾燥した。各バンドのDNA量はデンシトメーターを用いて定量した。

DNAの鎖切断以外の損傷を検出するためには二種の方法を用いた。第1に二本鎖DNA中に生じた一本鎖領域を認識して切断を生じるS1スクレアーゼを用いた。⁹⁾ S1スクレアーゼは3ヌ

クレオチド以上の塩基不対領域を認識することが知られている。反応緩衝液としては 50 mM 酢酸ナトリウム, 100 mM NaCl, 1 mM 硫酸亜鉛を用い、DNA 1 μ g に対して S 1 ヌクレアーゼ (Boehringer Manheim 社製) を 10 unit 加え、37°C で 30 分間反応させた。第 2 に、さらに多くの塩基損傷を認識する酵素 *M. luteus* 粗抽出物による処理をおこなった。¹⁰⁾ 反応用の緩衝液としては 0.1 M リン酸カリウム, pH 7.5, 10 mM 塩化マグネシウムを用い、DNA 8 μ g に対して *M. luteus* 粗抽出物をタンパク等量として 28.5 μ g 加え、37°C で 5 分間反応させた。

結果と考察

図 1 に緩衝液中および乾燥 DNA の線量-効果曲線を示す。放射線によって生じる DNA の損傷は DNA 分子にランダムに生じていると考えられる。従って、プラスミド DNA 分子あたりの平均鎖切断数 (x) は、鎖切断の生じていない閉環状 DNA の残存率を S とすれば次の式で表される。

$$S = e^{-x}$$

プラスミド DNA 分子あたりの平均鎖切断数は放射線の線量に比例し、その比例定数 (k) は DNA 損傷の生成収率を示しており、単位は $Gy^{-1} \cdot molecule^{-1}$ である。D を吸収線量とするプラスミド DNA についての線量-効果曲線は以下の式で表される。

$$S = e^{-kD}$$

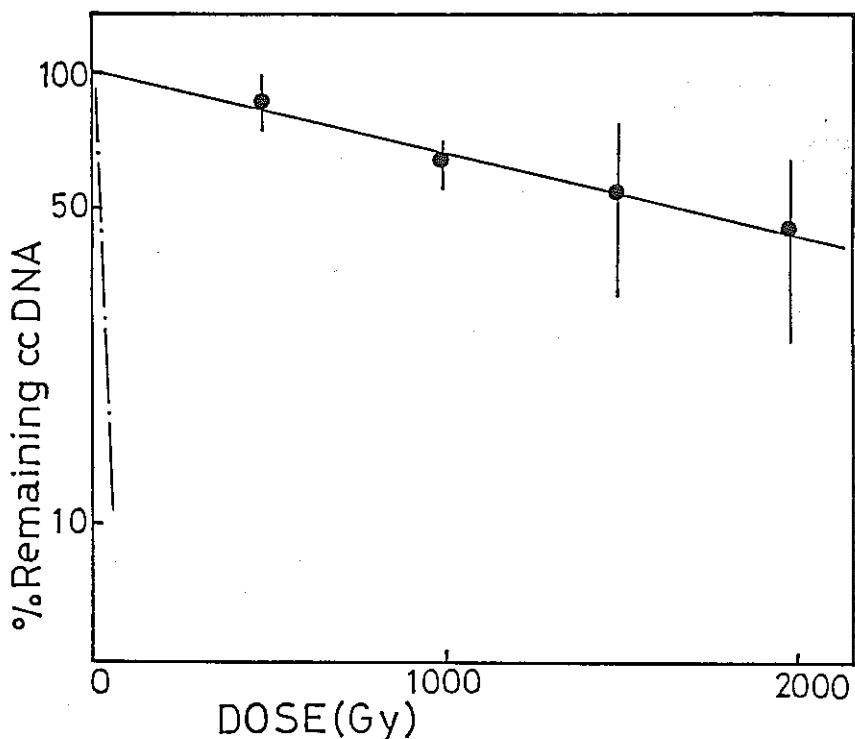


図 1. X 線照射されたプラスミド DNA の鎖切断に関する線量-効果曲線。プラスミドは亜酸下窒素飽和下の水溶液中 (- · -)、または乾燥状態 (●) で照射された。

それぞれの条件における鎖切断の生成収率は緩衝液中においては $2.5 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ であり、乾燥 D N A においては $0.41 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ であった。これらの収率から水溶液中における放射線の直接エネルギー付与による鎖切断の生成は有機物を含まない水溶液中で生成する鎖切断全体の 1.6 % 程度であることが示唆された。直接エネルギー付与による鎖切断はギ酸ナトリウムの存在に左右されないので、ギ酸ナトリウムが O H ラジカルを完全に除去し、D N A に鎖切断を生じないとしたら、高濃度のギ酸ナトリウム存在下においては D N A 鎖切断の収率はこの値になることが予想される。

様々なギ酸ナトリウム濃度において D N A を照射した場合の線量-効果曲線を図 2 に示す。ギ酸ナトリウムの濃度を上げるのに伴い、鎖切断の収率は下がったが乾燥 D N A とは同一にならず、収率は $0.73 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ 以下にはならなかった。1 M のギ酸ナトリウム存在下では水ラジカルは除去されて鎖切断の生成には寄与しないと考えられ、この結果からギ酸が放射線の作用を介して（ギ酸ラジカルによって）D N A の鎖切断を誘発していることが示唆される。また、ギ酸を介する D N A の鎖切断を生成収率は $0.73 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ から放射線の直接エネルギー付与による鎖切断の生成収率を差し引いた値、 $0.32 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ であると考えられる。

鎖切断以外の損傷の生成を検討するためにまず S 1 スクレアーゼによる処理を行った（図 3）。対照として調べた乾燥 D N A の鎖切断の生成収率は、S 1 スクレアーゼによる処理をおこなわな

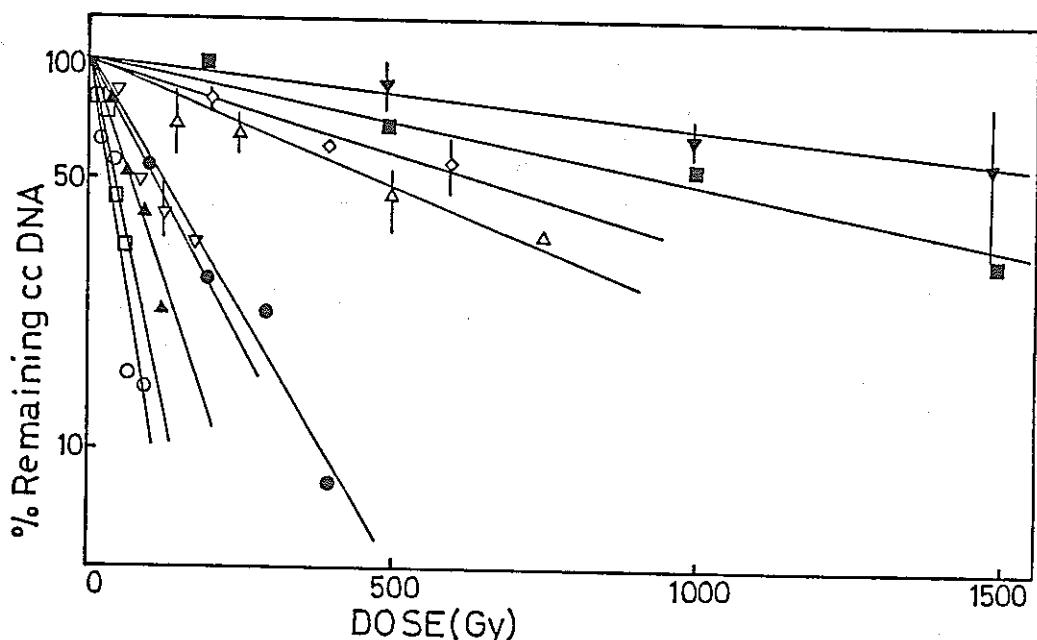


図 2. ギ酸ナトリウム存在下で X 線照射されたプラスミド D N A の鎖切断に関する線量-効果曲線。

ギ酸ナトリウム濃度：1.0 M (□)、0.5 MM (◇)、0.1 M (△)、0.05 M (●)
0.01 M (▽)、0.005 M (▲)、0.002 M (□)、0.001 M (○)、乾燥 D
N A (▼)

かった場合 $0.41 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ であるのに対して処理したものは $1.04 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ であった。従って、 $0.63 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ の鎖切断が S1 ヌクレアーゼ処理によって生じることが算出された。一方、 0.5 M ギ酸ナトリウム存在下で照射した場合でも S1 ヌクレアーゼ処理による鎖切断は $0.65 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ であった。従って、ギ酸ラジカルは S1 ヌクレアーゼにより認識される DNA の変化は生じないことが示唆された。

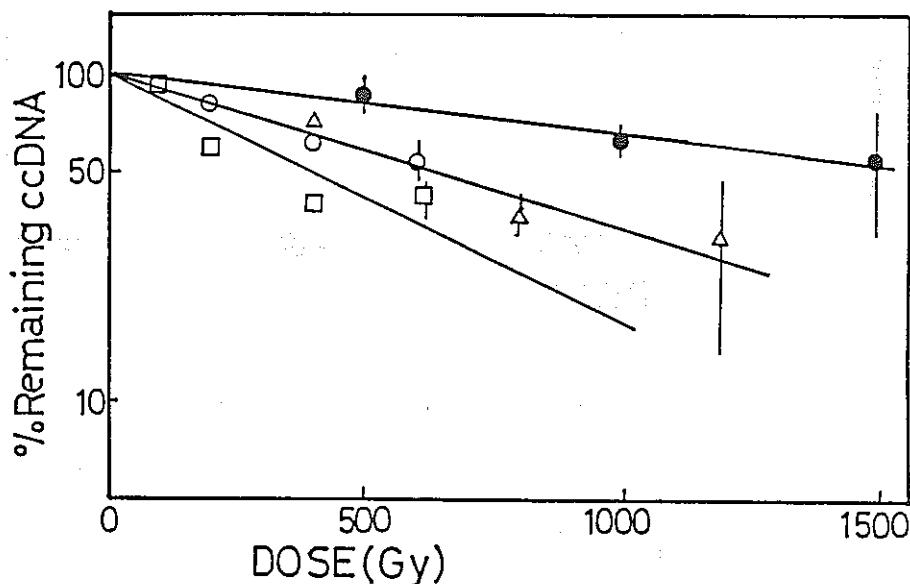


図 3. S1 ヌクレアーゼ処理されたプラスミド DNA の鎖切断に関する線量 - 効果曲線。プラスミドは 0.5 M ギ酸ナトリウム存在下において照射され (○, □) た後、S1 ヌクレアーゼによって処理された (□)。対照として乾燥 DNA についての線量 - 効果曲線 (●) および S1 ヌクレアーゼ処理後 (△) の結果を示す。

次に *M. luteus* 粗抽出物による鎖切断の生成を調べた (図 4)。乾燥 DNA の鎖切断の生成率は、*M. luteus* 粗抽出物による処理をおこなわなかった場合 $0.41 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ であるのに対して処理したものは $1.02 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ であった。従って $0.61 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ の鎖切断が *M. luteus* 粗抽出物処理によって生じることが算出される。一方、 0.5 M ギ酸ナトリウム存在下で照射した場合では *M. luteus* 粗抽出物処理によって鎖切断が $3.19 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ の収率で生成した。従って、ギ酸ラジカルは *M. luteus* 粗抽出物によって認識される DNA の変化を $2.58 \times 10^{-3} \text{ Gy} \cdot \text{molecule}^{-1}$ の収率で生じることが示唆された。この損傷は S1 ヌクレアーゼでは認識されない様な、DNA の塩基損傷であると考えられる。また、*M. luteus* 粗抽出物によって認識される損傷の収率は、ギ酸が放射線を介して誘発すると考えられる鎖切断の 8 倍以上であり、ギ酸は放射線によって主として塩基損傷を生じることが示唆された。

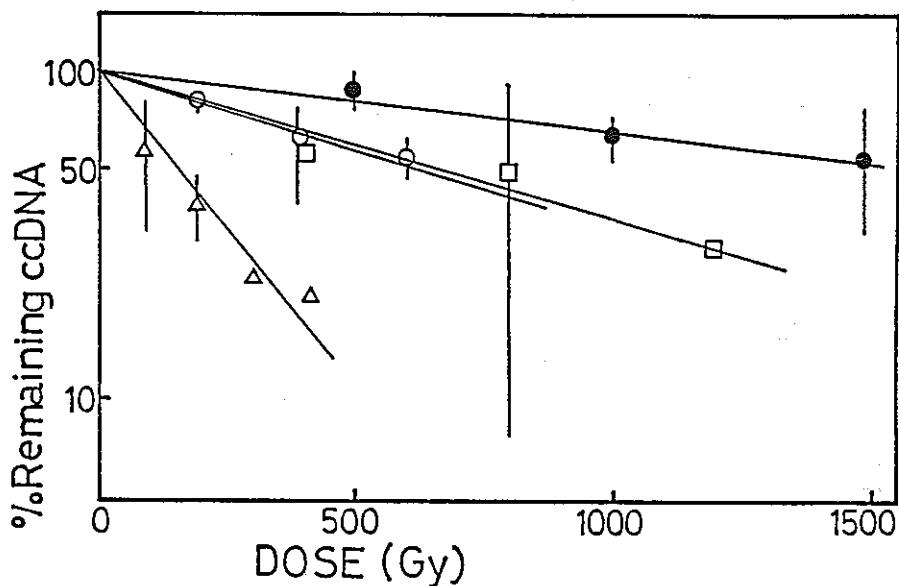


図4. *M. luteus* 粗抽出物によって処理されたプラスミドDNAの鎖切断に関する線量-効果曲線。プラスミドは0.5Mギ酸ナトリウム存在下において照射され(○, △)た後、*M. luteus* 粗抽出物によって処理された(△)。対照として乾燥DNAについての線量-効果曲線(●)および*M. luteus* 粗抽出物処理後の結果(□)を示す。

DNAの損傷は細胞内において修復されていることが知られている。一方、この修復は突然変異を生ずる要因となっていることも知られている。とりわけ、鎖切断以外の損傷の方が修復過程の中で突然変異をおこす遺伝子の変化につながる方が多い。^{11,12)}したがって、ギ酸の様な有機物が放射線を作用を介してDNAと反応すると、これが最終的には突然変異につながる遺伝子変化をひきおこす要因になっているかも知れない。今後、アミノ酸や糖を有機物とした同様の実験をおこないたいと考えている。

参考文献

- 1) J. Schubert: Mutagenicity and Cytotoxicity of Irradiated Foods and Food Components, Bull. Wld. Hlth. Org. 41, 873(1969).
- 2) R. A. Basson, M. Beyers and A. C. Thomas: A Radiation-chemical Approach to the Evaluation of the Possible Toxicity of Irradiated Fruits: Part I - The Effect of Protection by Carbohydrates, Food Chem. 4, 131(1979).
- 3) J. G. Niemand, L. Drijver, C. J. Pretorius, C. W. Holzapfel and H. J. van der Linde: A Study of the Mutagenicity of Irradiated Sugar Solutions: Implication for the Radiation Preservation of Subtropical

Fruits, J. Agric. Food Chem. 31, 1016(1983).

- 4) 遠藤大二、平野孝一、桑原乾典、佐藤文昭：ガラス固化体から発生する放射線の家畜飼料殺菌への適用に関する研究，第4章．放射線による食品中の微生物の死滅，PNC SJ 168 85-05 , 1985.
- 5) P. C. Seawell and A. K. Ganesan: Measurement of Strand Breaks in Supercoiled DNA by Gel Electrophoresis, in 'DNA Repair' eds by E. C. Friedberg and P.C. Hanawalt, Marcel Dekker, Inc., New York, 1981.
- 6) J. A. Thompson, R. W. Blakesley, K. Doran, C.J.Hough and R. D. Wells : Purification of Nucleic Acids by RPC-5 ANALOG Chromatography: Peristaltic and Gravity-Flow Applications in Methods in Enzymology Vol. 100, Recombinant DNA PartB' eds by R. Wu, L. Grossman and K. Moldave, Academic Press, New York, 1983.
- 7) H.C. Birnboim and J. Doty: A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA, Nucl. Acid Res. 7, 1513(1979).
- 8) S. Peats: Quantitation of Protein and DNA in Silver-Stained Agarose Gels, Anal. Biochem. 140, 178(1984).
- 9) H. Martin-Bertram: S1-Sensitive Sites in DNA after γ -Irradiation, Biochim. Biophys. Acta. 652, 261(1981).
- 10) M.C. Paterson and R. B. Setlow: Endonucleolytic activity from *Micrococcus luteus* that Acts on γ -Ray-Induced Damage in Plasmid DNA of *Escherichia coli* Minicells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2927 (1972).
- 11) R. M. Schaaper and L. A. Loe : Depurination Causes Mutations in SOS-Induced Cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1773(1981).
- 12) J. Blok and H. Loman: The Effects of γ -Radiation in DNA, Current Topics in Radiat. Res. Quarterly 9, 165(1973).

第5章 放射線滅菌マウス飼料の安全性に関する研究

研究担当者 遠藤大二、山本哲也、桑原幹典、佐藤文昭
北海道大学 獣医学部 獣医放射線学講座

マウスの飼料の放射線による滅菌は現在一部の市販飼料について使用されており、無菌的なマウスの飼育には1～10Mradの滅菌が用いられている。この線量ではマウスについての実験において毒性も突然変異源性も示されていない。^{1～5)}一方、微生物を用いた実験では飼料の成分から放射線によって毒性および突然変異源性がみられている。^{1,6,7)}微生物でみられた毒性、突然変異源性がマウスでみられなかった理由としては、マウスでは微生物にはみられない毒物に対する防衛機構があるため微生物を用いた試験の検出感度がマウスに比べて高いことが考えられる。¹⁾それゆえマウスの飼料に対する照射線量を大きくすることによりマウスに対する毒性をたかめることを考えた。この点を検討するため高線量を照射した飼料について毒性をしらべた。また、現在市販用飼料に用いられている線量において毒性が全くみられないことから、高線量における毒性の発現には線量に関して閾値が予想される。本研究の目的は高線量照射飼料の毒性をマウスを用いた実験で観察し、その線量一効果関係を明らかにすることにより、放射線殺菌マウス飼料の安全性を確認することにある。まず第一に、照射飼料の毒性が閾値を示すことを明らかにし、つづいてその閾値を求める。そのことによってマウスの飼料滅菌の安全域を求める試みを行いたい。

本年度は、マウスに対して毒性が現れるまで線量を増加させ、その毒性の表れかたを観察した。

方 法

一群7匹のC3H/He系のマウスを通常条件下で飼育し、照射されたエサを任意に摂取できる様与えた。マウスのエサとしては繁殖用のペレット（舟橋農場製MB-1）を用いた。マウスの生死の判別は毎日おこない、あわせて週に2回体重の測定をおこなった。

エサは⁶⁰Co-γ線によって照射した。線量率はFricke線量計によって定めた。

一部のマウスについては体内的各臓器の顕微鏡的な変化を観察するために組織切片を作成した。⁸⁾すなわち、切片作成のために解剖したマウスの各臓器の一部を切り出し、10%ホルマリン中に浸漬し固定した後、段階的に上昇するアルコールおよびキシレン中に浸漬することによって脱水した。脱水された臓器片を溶融パラフィン中に浸漬し、そのまま冷却した後、成型してパラフィンのブロックを作成した。パラフィンブロック中の臓器はミクロトームを用いて細胞一層分の厚さ(5μm)に薄切された後、スライドグラス上に粘付された。この切片からパラフィンをキシレンとアルコールによって除き、続けてヘマトキシリソとエオジンによって二重染色をおこなった。

結 果 と 考 察

マウスは通常3週齢で離乳し12週齢まで急速に成長することが知られている。図1に照射飼料を与えたマウスの体重増加を示す。非照射の飼料を与えた場合と比較して、1、10および50

Mr ad 照射された飼料では体重の増加について給与した飼料による変化がみられなかった。一方、80 および 100 Mr ad 照射された飼料を与えたマウスでは体重は増加せず逆に減少して死に至った。これらのマウスでは照射飼料給与 3 日後に黒く硬い独特の芳香臭を持つ排便がみとめられ、2 週後には便が肛門に付着し、さく瘦および衰弱がみとめられた。50 Mr ad 照射された飼料を与えたマウスでは黒く独特の芳香臭を持つ排便はみとめられたがさく瘦および衰弱はみとめられなかった。便の変化とマウスの死の関係については将来検討を加えたい。

高線量の放射線照射に伴って飼料は長時間高温下におかれるが、同程度の温度を加えた飼料では体重の増加について変化はみられなかった。また、便の変化も、みられなかった。

80 および 100 Mr ad 照射飼料を給与したマウスの死因を検討するため、さく瘦および衰弱の程度から死の直前と判断されたマウスの各臓器について切片を作成し、顕微鏡下で細胞および組織の変化をしらべた。肝臓、腎臓、心臓および骨髄については顕著な変化はみとめられなかつたが、胃および腸において壊死性の変化がみられた。胃では粘膜上皮の部分的剥離と胃底腺の腺細胞の壊死がみとめられ、この変化から胃での消化が不充分であることが示唆された(図 2)。また腸において粘膜上皮細胞の核が濃染し細胞の中心に移動している像が頻繁にみとめられ、同時に粘膜固有層の細胞が疎になった(図 3)。粘膜上皮細胞についての変化は腸上皮細胞が壊死し始めることを示しており、粘膜固有層についての変化は腸の水腫性の変化を示す。これらの所見は、腸粘膜からの栄養の吸収が困難になっていることを示唆する。

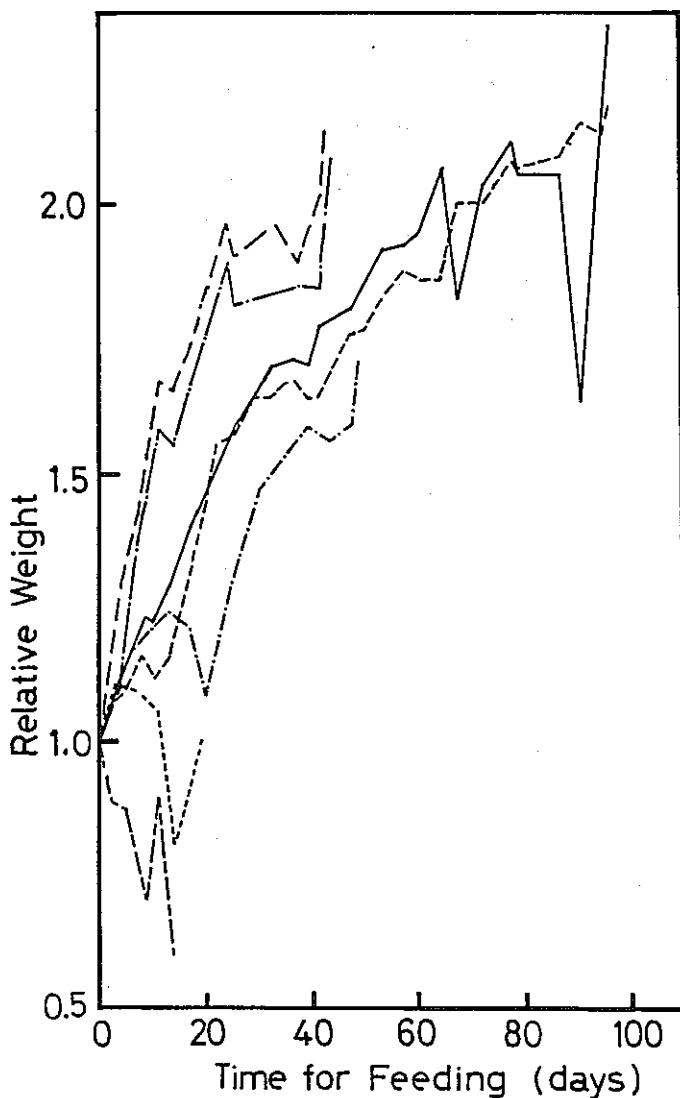


図 1. 照射飼料を給与されたマウスの体重変化。各群について 3 週齢時の平均値 (g) に対する相対的な変化を示す。各群に対して給与したエサは、対照(—)、10 kGy 照射(---)、100 kGy 照射(--)、500 kGy 照射(-----)、800 kGy 照射(… …)、1 MGy 照射(---)および加熱処理(—・—)したものである。

80および100Mrad 照射飼料を給与したマウスは、給与の開始後2週間前後に死に至ったが、横軸に飼料に対する線量をとり、縦軸に給与後30日の生残率をとったグラフを作製すると飼料による致死については、閾値が存在することが示唆される(図4)。この点については次年度以降検討を加えたい。

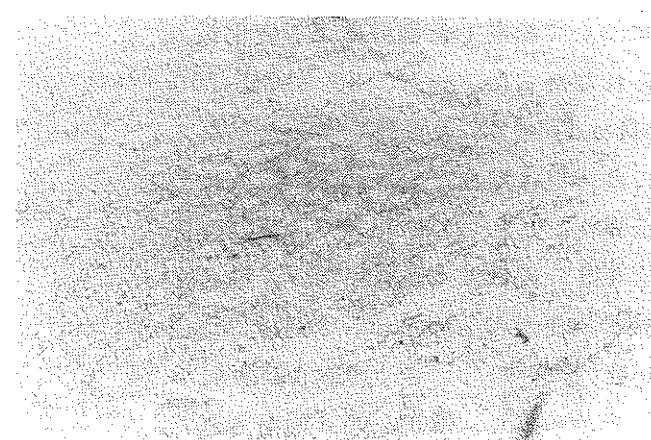


図2. 800kGy 照射飼料給餌開始後10日目のマウスの胃の腺部(200×)。

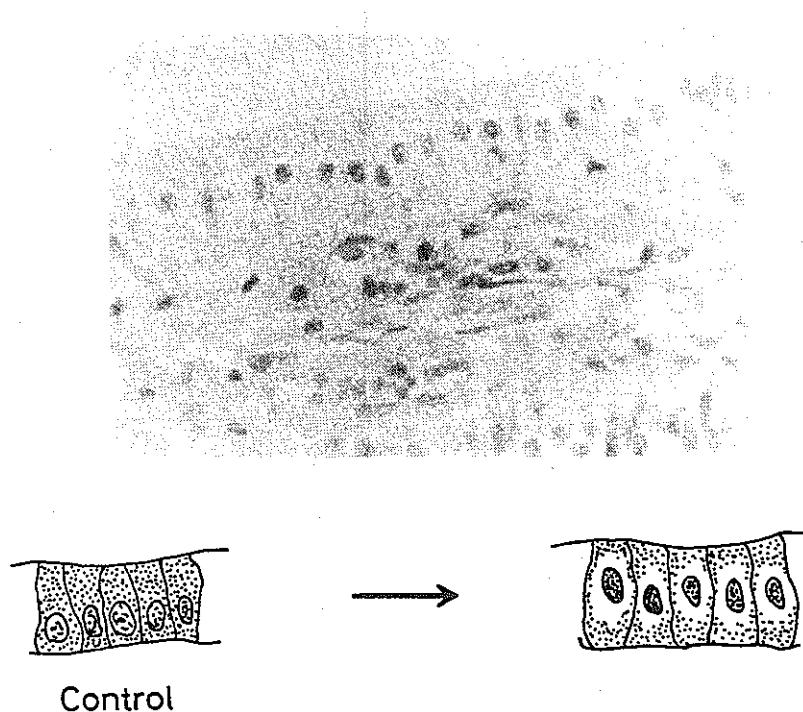


図3. 800kGy 照射エサ給餌開始後10日目のマウスの腸微織毛(600×)。写真の下に腸粘膜上皮細胞の変化に関する模式図を示す。

結論

照射された飼料は、高線量においては毒性を示し、この毒性については閾値が存在することが示唆された。

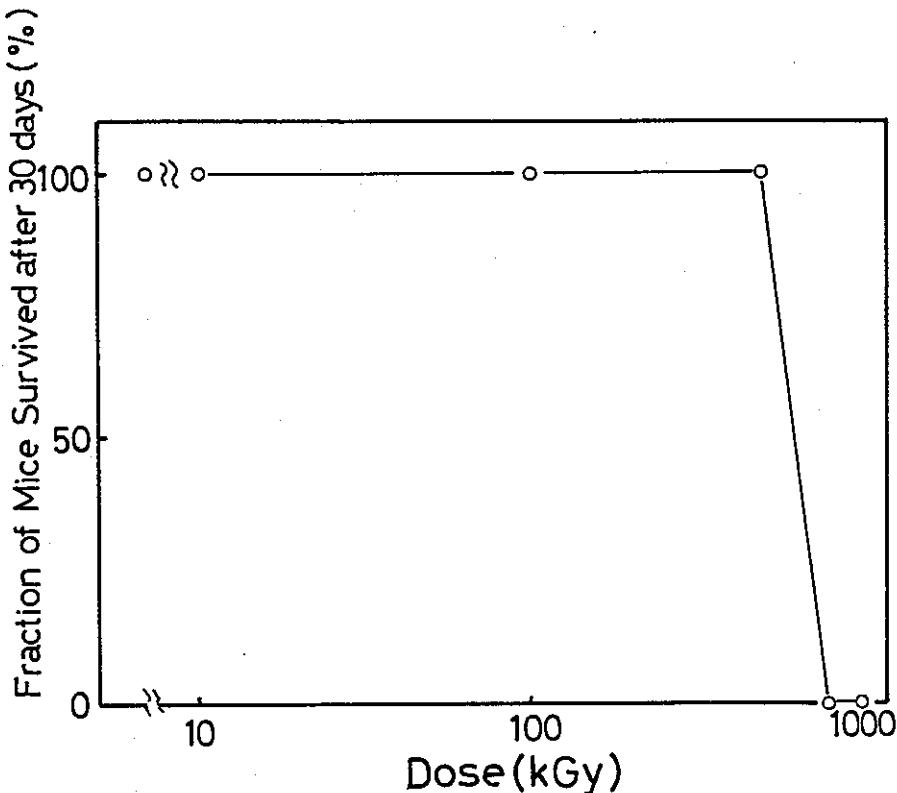


図4. 放射線照射飼料を給餌開始後30日目における生残率。

参考文献

- 1) J. Schubert: Mutagenicity and Cytotoxicity of Irradiated Foods and Food Components, *Bull. Wld. Hlth. Org.* 41, 873(1969).
- 2) L. E. van Petten, J. E. Calkins, R. F. McConell, H. M. Gottschalk and P. S. Elias: Long-Term Feeding Studies in Mice Fed a Diet Containing Irradiated Fish. I. Multigeneration Reproduction, Mutagenicity, Teratology, and Longevity Studies, *Toxicology Lett.* 7, 97 (1980).
- 3) H. G. Benson, T. J. Miller, H. M. Gottschalk and P. S. Elias: Long-Term Feeding Studies in Mice Fed a Diet Containing Irradiated Fish. II. 90-Day Toxicity Study, *Toxicology Lett.* 7, 103(1980).
- 4) R. P. Reddy, O. S. Reddi, P. Rita Pentiah, V. Usha Ran, K. Rudrane Devi and S. N. Goud: Micronucleus Test in Mice Fed on Irradiated Whole Diet, *Int. J. Radiat. Biol.* 39, 217(1981).
- 5) M. Bala Varma, S. Devaki Nandan, K. P. Rao and M. Sanjeeva Rao: Non-

- induction of Dominant Lethal Mutations in Mice Fed Gamma-Irradiated Glucose, Int. J. Radiat. Biol. 42, 559(1982).
- 6) R. A. Basson, M. Beyers and A. C. Thomas: A Radiation-Chemical Approach to the Evaluation of the Possible Toxicity of Irradiated Fruits Part I-The Effect of Protection by Carbohydrates, Food Chem. 4, 131 (1979).
 - 7) J. G. Niemand, L. den Drijver, C. J. Pretorius, C. W. Holzapfel and H. J. van der Linde: A Study of the Mutagenicity of Irradiated Sugar Solutions: Implications for the Radiation Preservation of Subtropical Fruits, J. Agric. Food Chem. 31, 1016(1983).
 - 8) 影山圭三, 渡辺陽之輔監修, 慶應義塾大学医学部病理学教室編集「病理組織標本の作り方」, 医学書院, 東京(1978).

第6章 植物クロロフィル分解物の調製

研究担当者 山本哲也、稻波 修、桑原幹典、佐藤文昭
北海道大学 獣医学部

牛や羊等、草食性の家畜が時として日光に対して過敏になり皮膚炎を起こし、さらに重篤な場合には死亡する事も在る。此の様な症状は光線過敏症 (photodermatoses)と呼ばれており、其の原因物質は飼料中に含まれる光感作物質であると古くから考えられていた。其の後、Clare¹⁾はこの光線過敏症原因物質が chlorophyll 分解物の一種である pheophorbide a である事を明らかにした。pheophorbide a とは chlorophylla から Mg と phytol 基が外れたものである(図1)。この光感作物質は牧草中や飼料中のみならず、クロレラ剤^{2~5)}やアワビ⁶⁾に含まれる場合が在り人への中毒症についても最近報告されている。こうした点からこの光線過敏症の作用機序を明らかにする事は重要であると考えられる。著者らはこの pheophorbide a を得る事から実験を開始した。今回は其の方法について報告する。

pheophorbide aを得る為に、植物から葉緑体色素を抽出した後、それから chlorophyll a の分離・精製を行ない、それを処理した。

葉緑体色素の粗抽出は以下の方法で行った。まずホウレンソウ (*Spinacia*) 200gを約1分間 100℃の沸煮水で処理した。次に乳鉢にホウレンソウを入れ海砂を加えよく磨り潰し、メタノール／石油エーテル (v/v = 50/50)で色素を抽出した。抽出した色素溶液はエバボレーションにより溶媒をとばし、再度エーテルに溶解させた。さらに不純物を除く為、この溶液を分液ロートに移し、水で3回洗浄した。

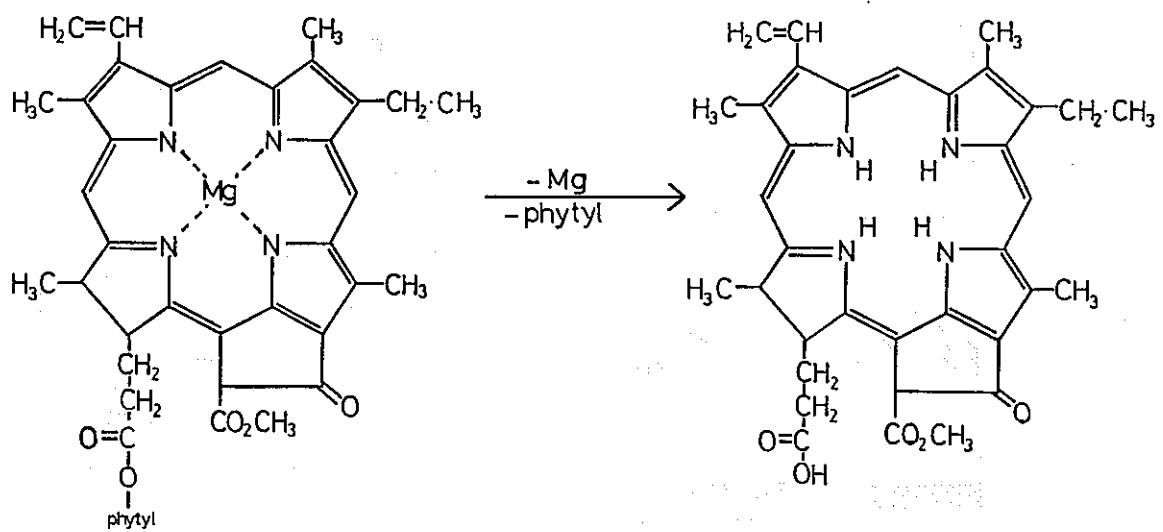


図 1. chlorophyll a (左) 及び pheophorbide a (右) の構造式

chlorophyll a の分離・精製はショ糖を担体としたカラムクロマトグラフィーを用いて行なった。まず細かく粉碎したショ糖を 80 °C で 12 時間置き活性化した。活性化したショ糖を 70 × 350 mm のカラム管につめた後、粗抽出した色素をカラムに吸着させ、石油エーテル / n-ブロパノール ($v/v = 99.5/0.5$) で展開した。展開後 2 時間のクロマトグラフィーのパターンを図 2 A に示した。図から明らかな様に 3 つの分画が得られる。夫れ夫れの分画を取り出しジエチルエーテルで抽出し可視吸収スペクトルにより同定を試みた。それぞれの分画から得られた吸収スペクトルを図 2 B に示す。吸収スペクトルのピーク及び其の比から、Fraction 1 は chlorophyll b、2 は chlorophyll a、3 は carotene であると同定した。さらに chlorophyll a を上記と同条件でクロマトグラフィーにかけ精製した。純度検定はセルロースプレートを用いた薄層クロマトグラフィーで、展開液として n-ヘキサン / ベンゼン / 酢酸 ($v/v = 10/20/0.3$) を用いて行ない、この物質が单一のものである事を確認した。

chlorophyll a からの pheophorbide a の作製は Hynninen の方法に従った。⁸⁾ chlorophyll a をエーテル / 塩酸 ($w/w = 70/30$) に溶解し、5 分間攪拌した後水層を除いた。次いでエーテル層を分液ロートに移し、蒸留水で 3 回洗浄した。処理された物質の可視吸収スペクトルを図 3 に示した。この吸収スペクトルのピーク及び其の比を調べる事により、この物質が、pheophorbide a である事が同定出来た。また純度検定はセルロースプレートを用い、n-ヘキサン / アセトン / n-ブロパノール ($v/v = 90/10/0.05$) を展開液として薄層クロマトグラフィーを行った。結果として、chlorophyll a が全て pheophorbide a に変わっている事を確認した。

以上の様な方法で pheophorbide a を得る事が出来た訳であるが、今後この光感作の生体に対する動力学的作用や毒性の度合などが研究する必要があると思われる。

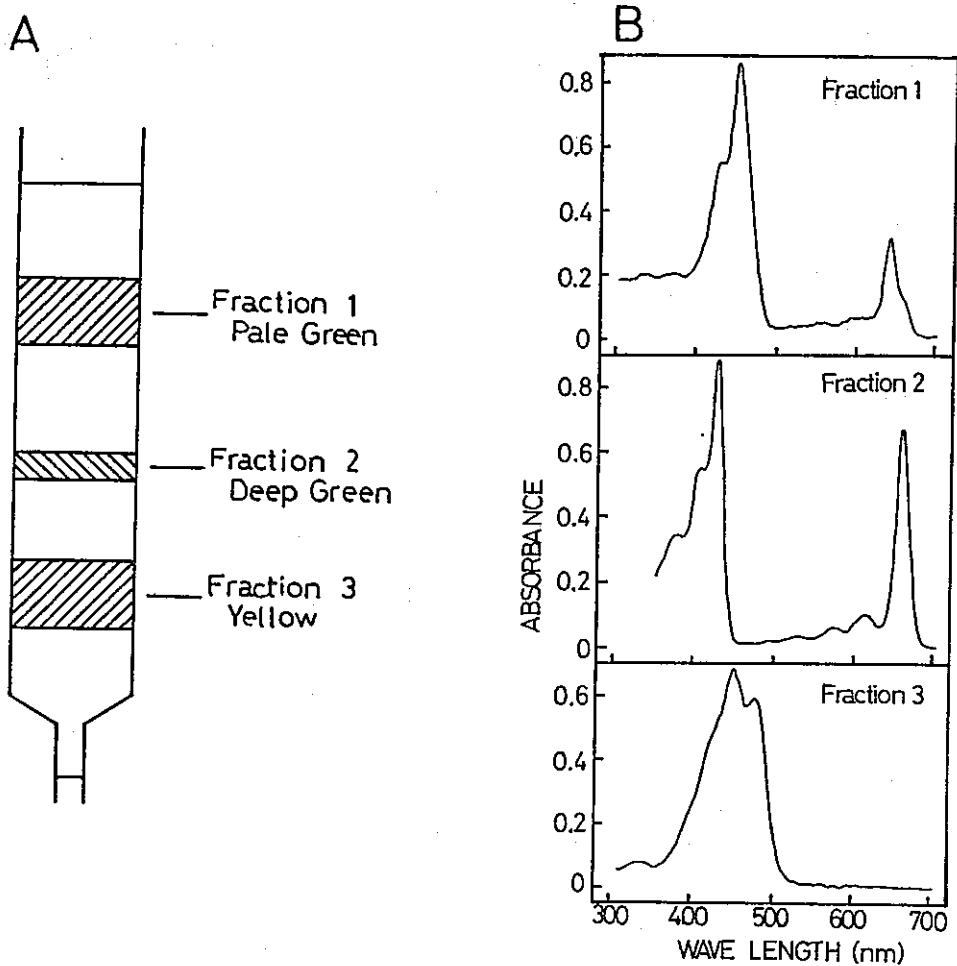


図 2. A 葉緑体色素のカラムクロマトグラフィー、展開約 2 時間後。担体は細かく粉碎し、
80 °Cで 12 時間置き活性化させたショ糖。展開液は石油エーテル / n-プロパンノール ($v/v = 9.5/0.5$)

B カラムクロマトグラフィーによって分離した各色素分画のジエチルエーテル中の可視吸収スペクトル曲線

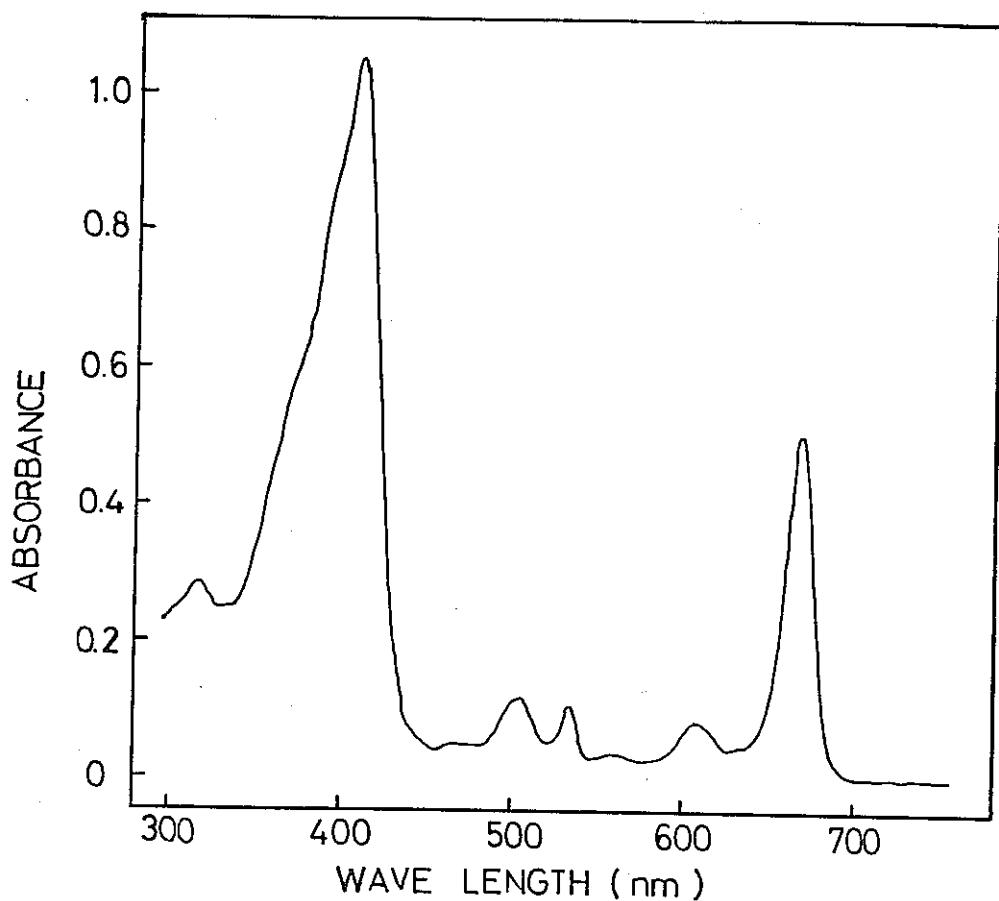


図3. chlorophyll a をエーテル／塩酸 ($w/w = 70/30$)で5分間処理した後の、ジエチルエーテル中の可視吸収スペクトル曲線

参考文献

- 1) N. T. Clare: Works of the Biological Section, RUAKURA Animal Research Station. J. New Zealand Inst. Chem. 17. 57(1953).
- 2) 駒井善明、大貫憲一、山岸 宏、白馬憲行：クロレラ錠喫食者に発生した光線過敏症皮膚炎について。食品衛生研究。28. 747(1978).
- 3) 田村行弘、西垣 進、真木俊夫、嶋村保洋、直井家寿太：光線過敏皮膚炎をおこしたクロレラ錠に対する生物・化学試験について。食品衛生研究。28. 747(1978).
- 4) 天野立爾、池 慶子、内山 充：クロレラ中のクロロフィル分解物に関する化学的試験。食品衛生研究。28. 739(1978).
- 5) 田村行弘、真木俊夫、嶋村保洋、西垣 進、直井家寿太：クロレラ錠摂取による光過敏症皮

- 膚炎の原因物質とその生成過程について。食衛試。20。173(1979)。
- 6) 竹中成憲、沢田玄弘、吉岡峰雄：毒性あわびに就いて。東京医事新書。1114。1359(1899)。
 - 7) H. H. Strain, M. R. Thomas and J. J. Katz: Spectral Absorption Properties of Ordinary and Fully Deuteriated Chlorophylls a and b. Biochim. Biophys. Acta. 75. 306(1963)。
 - 8) P. H. Hyyninen: Chlorophylls. IV. Preparation and Purification of Some Derivatives of Chlorophylls a and b. Acta. Chem. Scand. 27. 1771(1973)。

第7章 総括

炭水化物（グルコース）において永い間不明確であった放射線誘発反応中間体と ESR スペクトルの対応がはっきりと示された。本結果は今後炭水化物の研究を進める上で一つの基準として用いられることが出来る。またイオウを含む蛋白質での放射線誘発変性過程の研究では、その蛋白質自身放射線に対し耐性になっていると同時に、共存する他の蛋白質の変性も防ぐことがわかった。但し、イオウ蛋白質は他のイオウを含まない蛋白質を放射線から護るかわりに自分自身二量体化し変性していく。大変興味ある事実なので今後一層研究を押し進めたいと考えている。

微生物の研究については、定性的・定量的にはっきりしたデータを得るために大腸菌のプラスミド遺伝子（pBR322）を用いた。前年度で定量的分析の方法の確立について報告したので、今年度は具体的な遺伝子損傷（DNA損傷）の分析を試みた。DNAは放射線や化学物質の攻撃に弱いと考えられているが、その理由の一つに放射線を介してDNAと有機物が反応することがあげられる。これにより作り出されたDNAの損傷を定性的、定量的に調べるために特殊な酵素を反応させ、その酵素によって認識されるか否かで判定した。今後さらにこれらの損傷が生物学的にどの様な意味（特に突然変異）を持っているかを検討したい。

今年度から実験動物（C3Hマウス）を用いて照射飼料の毒性について研究始めた。驚いたことに500 kGy ものX線を飼料に与えてもマウスの成育に何ら支障がみられなかった。しかし800 kGy 以上照射飼料ではマウスは成長できず30日以内ですべて死亡した。500から800 kGy の間でドラマチックに飼料に影響を与える何かおこったものと考えられる。現在、この線量域に本当に閾値なるものが存在するのか否か、また存在するとしたらそこで何がおこっているのか研究を続行中である。

放射線照射は乾燥植物に対しても有効ではないかと考えている。それは乾燥植物によりもたらされる家畜の光線過敏症を照射により防ぐことができるのではないかと考えているからである。今年度はまずその原因物質と考えられるフォフォーバイドaを精製クロロフィルより調製した。

今後この物質を実験動物に与え病理学的研究を進め、最終的には放射線照射による脱毒性作用との関係を研究したいと考えている。