



Title	Flow Cytometryによる放射線照射後の細胞動態の解析 (II)-Cell Sortingによる照射後G2 Block細胞の生存率の解析-
Author(s)	赤木, 清; 田中, 敬正
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1989, 49(11), p. 1420-1426
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/15678
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Flow Cytometryによる放射線照射後の細胞動態の解析（II）

—Cell Sortingによる照射後G₂ Block細胞の生存率の解析—

関西医科大学放射線科

赤木清田中敬正

（昭和63年11月17日受付）

（平成元年6月19日最終原稿受付）

Analysis of Cell Kinetics After Irradiation by Flow Cytometry (II)

—Evaluation of Clonogenic Potential of G₂ Block Cells After Irradiation by Cell Sorting—

Kiyoshi Akagi and Yoshimasa Tanaka

Department of Radiology, Kansai Medical University

Reserach Code No. : 402.9

Key Words : Radiation, Cell cycle, Flow cytometry

When the tumor cells are irradiated, the percentage of the cells in the G₂ + M phase and the duration of the cell cycle arrested increase with the irradiation dose. This post irradiation growth inhibition and changes in the cell kinetics observed within 48 hours of irradiation are closely correlated. Cells in the G₂ + M phase are reported to be sensitive to irradiation, but little is known about their clonogenic potential. These cells must be separated for evaluation of their clonogenic potential. In this study, the clonogenic potential of irradiated G₂ phase arrested cells was examined by the flow cytometric cell sorting technique. Fluorescent Hoechst staining, which allows determination of DNA content in living cells, was used. The results of DNA assay using Hoechst 33342 were agreed well with those using PI staining. The concentration of Hoechst 33342 required for the DNA assay and cell sorting in 5 µg at which vital staining is possible with 80% cell viability. Although the clonogenic potential of non-irradiated cells were not different between those in G₁ and G₂ + M phases, that of the cells arrested in the G₂ + M phase after irradiation was lower than that of the cells in the G₁ phase. The reduction in the clonogenic potential was more notable in the cells subjected to high dose irradiation. A greater number of cells were arrested for a longer period than the cells irradiated at a lower dose. The clonogenic potential of the cells correlated well with the duration of G₂ block.

はじめに

最近 Flow Cytometry (FCM) 装置を用いた細胞動態の解析が多く報告されている。その中で放射線によるG₂ Blockの現象が放射線の感受性の予知し得る指標との報告も数多い。以前より放射線では線量増加に従って、G₂+M期に蓄積される細胞の割合、又、Blockの維持時間が長くなること、照射後に起こる増殖抑制と48時間以内に起こ

る細胞動態の変化が良く相関する事、等報告されている^{1,2)}。

この細胞動態の変化が放射線の感受性の予知の指標となり得るには照射後蓄積されたG₂+M期細胞のその後の消長を調べる必要がある。そのためにはこのG₂ Block細胞を生細胞のまま分離し、その生存率を検討する必要がある。最近、JovinらによってHoechst 33342がこのDNA量にもと

ずく Cell sorting ができる蛍光色素であると報告されている³⁾。我々もこの色素のDNAの染色性、細胞毒性等について調べると共に、FCMで容易に得られるG₂ Blockの割合、その維持時間がその細胞の放射線感受性の指標となり得るかの基礎的検討のためにFlow cytometry cell sortingの技術を用いて、照射後のG₂ Block細胞を分離し、放射線量とそのG₂ Block細胞のコロニー形成能の関係について検討した。

実験材料及び方法

細胞：対数増殖期にあるHeLa細胞を用いた。この細胞はEagle Minimum Essential Medium (MEM 日水)+10%牛胎児血清(FCS)培地でCO₂インキュベーター内で継代培養している。

蛍光色素：Hoechst 33342はヘキスト・ジャパン(株)より購入した。蒸留水で希釈後培養液で各濃度1~20μMに調整し用いた。固定した細胞の核DNA量測定には50μg/mlのPI(Propidium Iodide シグマ社)染色を行った。

染色方法：① PI染色法；細胞を0.2Mのリン酸緩衝液(PBS)で洗浄後1mg/mlのRNaseで37°Cで30分インキュベイトする。再度PBSで洗浄後、Propidium Iodide 50μg/mlを加え、4°Cで2時間、遮光の上染色を行う。

② ヘキスト染色法；生細胞のヘキスト染色法はJovinsらの方法を用いた。Hoechst 33342 5μMの濃度で細胞濃度10⁷Cell/mlをCO₂インキュベーターで2時間染色する。その後リン酸緩衝液(PBS)で2回洗浄し、FCMでDNA量の測定とG₁期細胞とG₂+M期細胞とを分離、採取した。

FCM装置：FCM Cell sortingの装置はFACS III(Becton-Dickinson社製)を用いた。Hoechst 33342の励起波長は351nmの紫外線であるため5W Argon Laser(Spectra physics社製)で351nm, 50mWで励起を行い、蛍光波長は420nmのLong Pass Filterを用いて測定した。

照射装置：⁶⁰Co γ線遠隔照射装置で6cmのペトリ皿に対数増殖期の細胞を5mm厚のアクリル板の上に置き下方より0.8Gy/Min.の線量率で1, 3, 6, 9, 12Gy照射し、照射後経時に採取した。

無菌方法及び細胞分離：FCM装置のシース液

のFlow系を70%エタノールで10分間殺菌し、無菌のシース液で30分以上洗浄し、sortingを行う。分離方法はFACS IIIのマニュアル通りDrop delay Timeを調整し、G₁期細胞とG₂+M期細胞の分離を行った。細胞は直接MEM+10%FCSの培地の入った3.5cmφの培養皿で採取した。

コロニー形成能：蛍光色素の毒性及びSortingによる細胞損傷はコロニー法にて調べた。細胞数は直接FCM装置で計数するのではなく、10⁶個の細胞をG₁期とG₂+M期細胞に分離、採集した。血球板でトリパンブルー染色し、生細胞だけ計数し、必要個数だけ6cmφの培養皿に播種しコロニー形成能で生存率を求めた。

結果

1) Hoechst 33342の細胞毒性

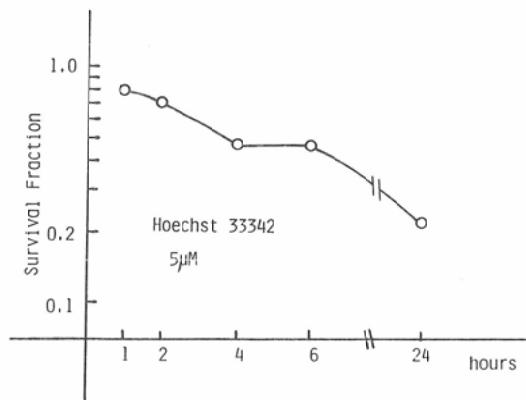


Fig. 1 Cytotoxicity of HeLa cells according to concentration of Hoechst 33342.

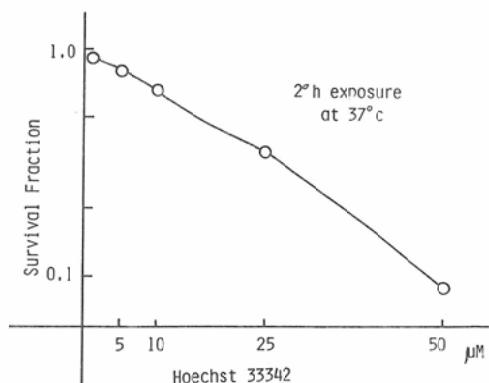


Fig. 2 Cytotoxicity of periods of exposures time at 5 μM concentration of Hoechst 33342.

Fig. 1にHoechst 33342の各濃度での2時間処理における細胞毒性を示す。DNA量測定およびSortingに必要な濃度は1~5μMであり、5μMの濃度でも生存率が70%で十分低毒性であることが判った。Fig. 2に5μMでの染色時間に伴う細胞毒性を示したもので、生存率は2時間接触でも70%，6時間接触でも50%と低毒性であった。

2) Hoechst 33342によるDNA量測定及び照射後の細胞動態の変化

Fig. 3にHoechst 33342 5μMを用いての1, 3, 6, 9, 12Gy照射後、24時間のDNAヒストグラムを示す。3Gyの照射でもG₂ Blockは起こるが、24時間経過するとCell cycleが進行し、対照群と同じDNAヒストグラムの形となった。6, 9Gy照射では、24時間経過してもG₂ Blockが存在している。Hoechst 33342染色による生細胞のDNA量

測定と固定した細胞のPI染色によるDNA量測定とでは少しピークチャンネルはズれるが同じDNAヒストグラムが得られた。

3) 細胞分離 (Cell sorting)

Fig. 4に示す範囲の6Gy照射後24時間に存在するG₁細胞とG₂+M期細胞を分離した。Cell sortingによって得られたG₁期とG₂+M期の分離した細胞を落射蛍光顕微鏡で観察するとG₂+M期の細胞は全体に大きく、分裂像を示している細胞が多い事が判る。又、その中にはG₁期細胞は見いだせないので分離収集精度が良いことを示す(photo 1, 2)。

4) 分離したG₁期細胞、G₂+M期細胞のコロニー形成能

Fig. 5に各線量での照射24時間後のG₁期、G₂+M期細胞の生存率を調べたもので、○が分離

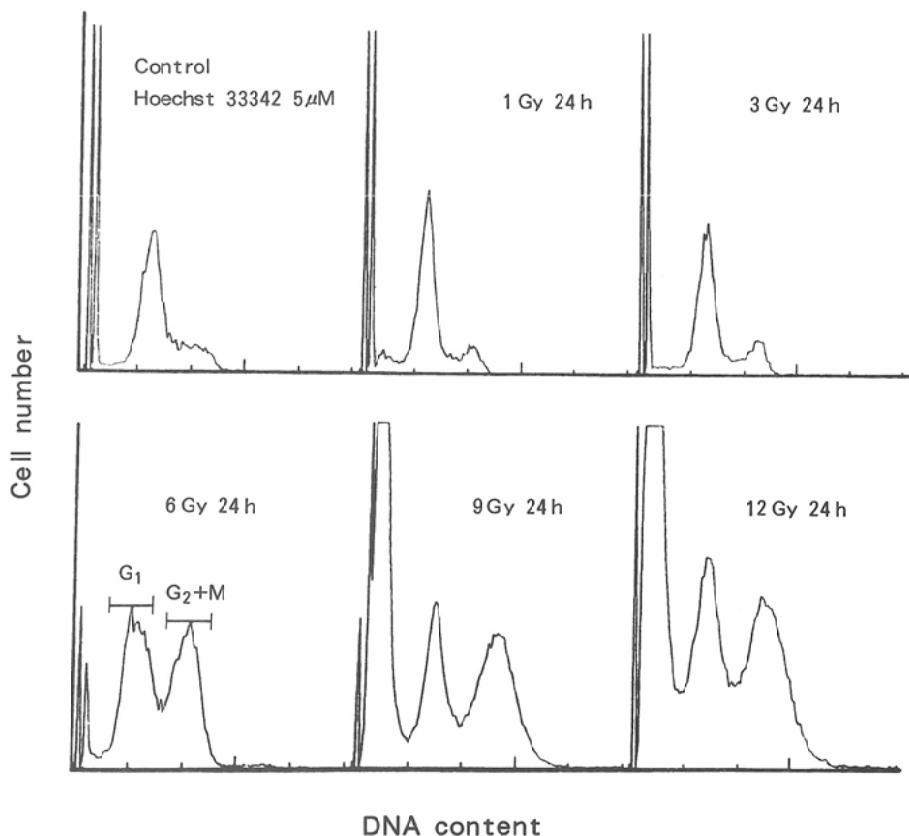


Fig. 3 DNA histogram after irradiation (1, 3, 6, 9, 12Gy) on HeLa cell by staining of hoechst 33342 and PI.

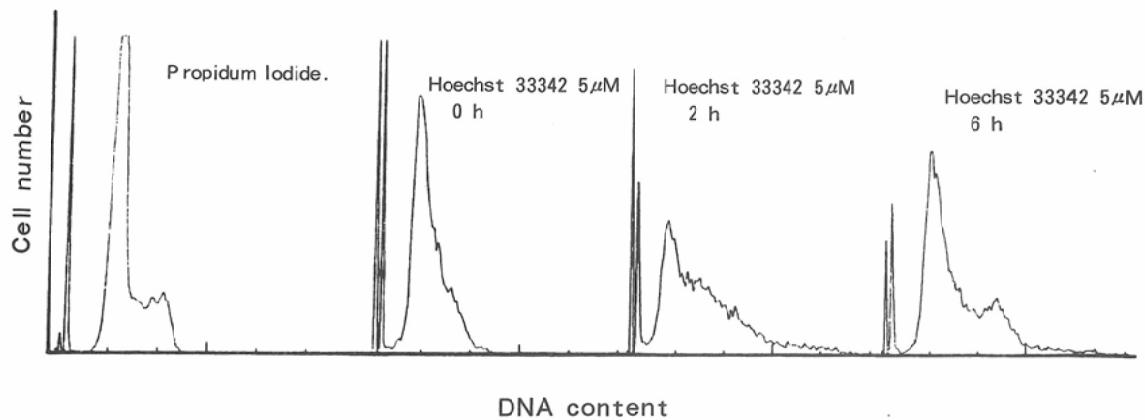
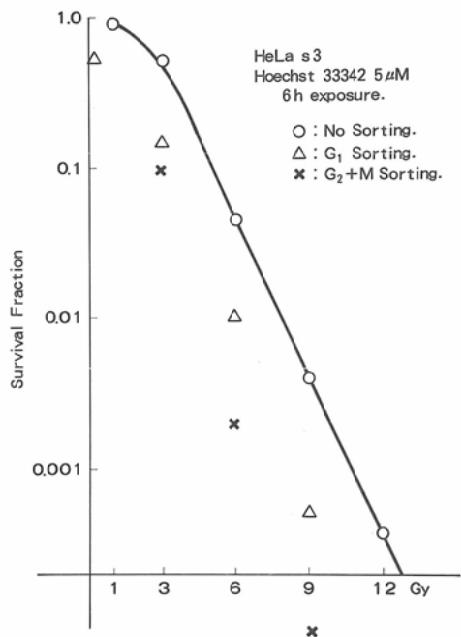
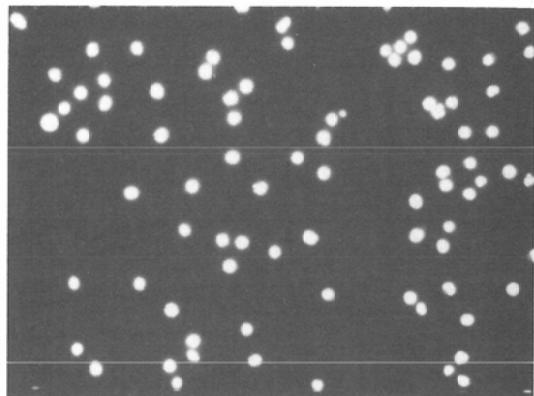
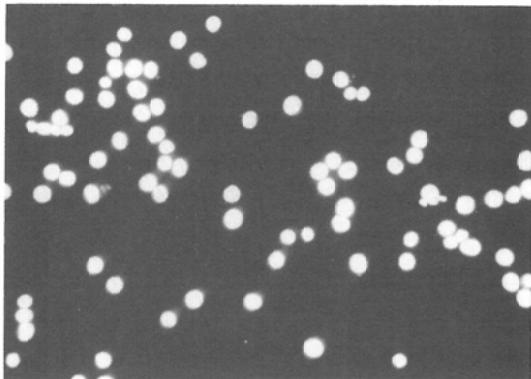


Fig. 4 Series of DNA histogram by staining of Hoechst 33342 and PI.

Fig. 5 Survival Curve of sorting cells in G₁ phase and G₂+M phase, 24 hours after irradiation.

しない細胞、△がG₁期細胞、×がG₂+M期細胞の生存率である。照射しなくてもCell sortingするだけで生存率が60%～50%位に減少する。これはLaser光での照射、sortingによる機械的な細胞損傷等が考えられる。非照射のG₁期細胞とG₂+M期の細胞ではコロニー形成能には差はないが、3Gy照射ではG₁期細胞の生存率は0.2でG₂+M期細胞では0.09と低く、6Gy照射ではG₁

Photo 1 24 hours after irradiation at 8Gy. Sorting cells in the G₁ phase.Photo 2 24 hours after irradiation at 8Gy. Sorting cells in the G₂+M phase. Observed many dividing cells.

期細胞は0.01でG₂+M期細胞では0.002とより生存率は低下する。線量増加に従ってG₂+M期の生存率が有意に低下していることが判った。

考 察

従来より放射線照射後に起こる細胞動態の解析は、①古くから³Hサイミジンを利用した AutoradiographyによるS期細胞の算出、②Flow cytometry (FCM)によるDNA量ヒストグラムからの数学的モデルの解析からG₁, S, G₂+M期細胞の分画の算出、③³Hサイミジンの代わりに抗BrdUモノクローナル抗体を用いてFCMによる細胞動態の解析が行われている。このFCMによる解析は Autoradiographyに比べて手技は簡単で短時間に結果がえられる。これら細胞動態の解析から放射線照射の影響はDNA合成の速度そのものには与えずにG₁-S-G₂とCell Cycleは進行し、低線量(数cGy)でもG₂ Blockが起り、分裂遅延が起こる事は既に報告されている¹¹⁾¹²⁾。我々の以前の実験でもG₂ Blockは低線量(2~3Gy)でも線量の大小に関係なく、照射後6~8時間から開始され、その割合も80%と高いが、その維持時間は線量増加に従って長くなる。G₂ Blockの解除時間は線量によって異なり、3Gyの線量では18時間後にはG₂ Blockの解除が始まる¹²⁾。そしてこのRadiation induced G₂ Blockの現象は可逆的な放射線障害の1つとして古くから研究されている。寺島、岡田らは³Hサイミジンを用いた Autoradiographyの研究で、この分裂遅延の機序についてG₂ Gapの間に放射線損傷を修復しているのではないかと報告している¹¹⁾¹⁸⁾。又、コルセミドを用いた同調培養法で細胞周期上、G₂+M期の細胞は放射線にたいして感受性が高いことについての論文は数多い¹²⁾。この放射線感受性と細胞動態との関係を解析するには照射後、蓄積されたG₂+M期の細胞だけを分離し、そのコロニー形成能を調べる必要がある。しかし、照射後、蓄積されたG₂+M期の細胞のコロニー形成能について調べた論文は数少ない。従来より³Hサイミジンを用いた AutoradiographyやFCMによる核DNA量測定により放射線、制癌剤による細胞動態の変化の中で特にG₂+M期細胞の蓄積に注目

し、この現象を利用して腫瘍細胞の放射線、制癌剤の感受性試験への有用性について報告されている⁸⁾。各細胞周期に存在する生細胞をそのまま分離する方法には2つの方法がある。1つはG₁期細胞よりG₂+M期細胞の方が大きい事を利用して、遠心分離で行う方法である。RiceらはG₁, S細胞を99%の純度でG₂+M期細胞を70%で得られると報告している¹⁴⁾。もう1つは今回我々が用いたDNA量に基づくVital Stainingによる Flow cytometry cell sortingの技術を用いた分離方法がある。これにはDNA量に基づく生細胞のDNA染色が必要である。1978年にJovinらによって最初にこのVital Stainigにはヘキスト染色の有用性が報告された³⁾¹⁵⁾。Hoechst 33342はBenzimidazole系の化合物で坑フィラリア剤として開発された物質で、特にadenine-thymidin対に親和性を持つ薬剤である。DNAに結合すると紫外線(351~365nm)の励起により、470nmの蛍光を発する。Jovinらによると、3T3B(Balb/C), CHO細胞などでは5~10μM, 90分, 37°Cで良好な染色が得られ、細胞毒性も少ないと報告している³⁾。星野らはRat 9L細胞、ヒトグリオプラストーマ細胞でも10μMで37°C 90分で比較的安定した染色ができ毒性も見られないと報告している⁴⁾。またPallavinciniら³⁾はKHT Sarcomaを5μMで37°C, 120分で染色して良好なDNAヒストグラムを得ている⁵⁾。このHoechst 33342による染色にも種々の問題がある。1つは細胞毒性とそのphase specificな毒性を解明する必要がある¹⁰⁾。これについて1980年LydonらはDAPI(4',6-dimino-2-phenylindole), Hoechst 33342でのVital stainingでFCM Cell sortingの手段では生存率及びMutagenicには影響を受けないと報告している¹³⁾。

1982年Friedらは細胞系による細胞毒性と細胞動態の違いについて調べている。これによるとHeLaS3細胞は毒性、細胞動態的にも非常に抵抗性であるが、B細胞由来のSK-DHL2細胞は高感受性であり、Human Lymphoma, Bone marrow cellはその中間的であると報告している⁹⁾。また1986年にはSiemanらはこのHoechst染色に於

ける Cell cycle specific な毒性について KHT sarcoma 由来の細胞では放射線照射に関係なく照射細胞も非照射細胞も染色時間に比例して細胞毒性は増加する。しかし、常に照射された細胞の方が細胞毒性は大きい。また Cell cycle specific な毒性については G₁, G₂+M 期細胞に比べて有意に S 期細胞の方が毒性が高いことを報告している⁷⁾。1988年 Erba らは L1210 細胞を用いて Hoechst 33342での偏差値の小さい解像力のよい DNA ヒストグラムのための至適濃度、染色性と細胞増殖、細胞動態、DNA 損傷について報告している¹⁰⁾。hoechst 33342 (0.5~5μg) は他の制癌剤と同様に DNA single strand break (ssb) を引き起こす。また UV 照射でも DNA ssb も増加する。良い DNA ヒストグラムを得るのに必要な量の 1/10 の 0.5μg/ml でも cell growth の抑制と G₂+M 期細胞の蓄積が認められる事を報告している。我々の実験では非照射の G₁ 期と G₂+M 期細胞ではコロニー形成能に差はないが、照射された細胞では G₁ 期よりも G₂+M 期の生存率の低下を示す。照射後24時間に存在する G₂+M 期細胞の線量増加に伴って生存率の減少を示すのは Hoechst 33342 の Cell Cycle Specific な毒性だけではなく、G₁, S 期細胞に比べて G₂ block 細胞の生存率が低下していることを示す。

Pallavincini らは in vivo (マウス KHT 脳腫瘍) でも 17Gy 照射後10時間に存在する腫瘍細胞の G₁, S, G₂+M 期の生存率を検討している⁵⁾。それによると、G₁ 期、G₂+M 期の割合は 47.4%, 40.8% と G₂+M 期の蓄積を見るが、その生存率は G₁ 期が 77.2%, G₂+M 期が 22.8% と報告し、G₂+M 期細胞の生存率の低下を報告している。この G₂ 期で Block された細胞は放射線損傷を修復途中の細胞の多いことが考えられ¹⁸⁾、G₂ block の維持時間が長いことが細胞のコロニー形成能即ち、生存率を指標とした放射線感受性と関係あることが示唆された。しかし、細胞系によって、低線量でも G₂ block 及びその維持時間が長くても亜致死障害からの回復が大きければ、その細胞動態の変化と生存率は関係が無いかも知れない。また線量増加に伴う G₂ block された細胞の生存率

の低下には Phase Specific な Hoechst 33342 の細胞毒性の増強と UV 照射による毒性の相乗効果も考えられ今後検討を要する。我々は照射後24時間に存在する G₂ Block 細胞のコロニー形成能について検討した。低線量照射では G₂ Block が起こっても、24時間経過すると、G₂-M-G₁ と Cell Cycle は進行し、DNA ヒストグラム上変化は見られないが、3Gy 照射後24時間に存在する G₂ 細胞の生存率は低い。6, 9, 12Gy と線量増加に従って明らかに G₂ Block 細胞のコロニー形成能は低下する。今後は放射線と同様に制癌剤でも起こる G₂ Block 細胞の消長を検討し、細胞動態を制癌剤感受性試験として用いるための基礎的検討には、この FCM Cell sorting の技術は大いに役立つと考えられた。

結 語

FCM Cell sorting の基礎的実験で以下の結果を得た。

① Hoechst 33342 による DNA 量測定は PI 染色による結果とよく一致した。ヘキスト染色による細胞毒性は低く Vital staining が可能な色素である。

② 放射線照射後、G₂+M 期に蓄積をみることがこの G₂ 期に Block された細胞のコロニー形成能は G₁ 期細胞より低下していることが判った。また G₂ Block の維持時間の長い高線量照射の G₂ Block 細胞の方が、より生存率が低下しており、G₂ Block の維持時間と G₂ Block 細胞の生存率が良く相関することが判った。

この研究は昭和63年度文部省科学研究費がん特別研究(課題番号 6210016 鈴木班)の援助により遂行された。

文 献

- 1) 赤木 清, 村田貴史, 田中敬正: FCM による腫瘍細胞動態に対する放射線効果の解析, 癌の臨床, 27: 1523-1527, 1981
- 2) 酒井邦夫, 藤田勝三, 他: 分割照射における腫瘍細胞動態の Flow Cytometry による解析, 日医放, 45: 396-397, 1985
- 3) Jovin DJ, et al: Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content. J Histochem Cytochem 25: 585-589, 1977
- 4) Hoshino T, et al: Clonogenicity of multiple population of human glioma cells in vitro sort-

- ed by DNA content. *Cancer* 50: 997-1002, 1982
- 5) Pallavicini MG, et al: Cell cycle distribution of chronically hypoxic cells and determination of the clonogenic potential of cells accumulated in G₂+M phase after irradiation of a solid tumor *in vivo*. *Cancer Res* 39: 1891-1897, 1979
- 6) Durand RE, Olive PL: Cytotoxicity, Mutagenicity and DNA damage by hoechst 33342. *J Histochem Cytochem* 30: 111-116, 1982
- 7) Siemann DW, Keng PC: Cell cycle specific toxicity of the hoechst 33342 stain in untreated or irradiated murine tumor cells. *Cancer Res* 46: 3556-3559, 1986
- 8) Gohde W, Meistrich M, Meyn R, et al: Cell-cycle phase-dependence of drug-induced cycle progression delay. *J Histochem Cytochem* 27: 470-473, 1979
- 9) Fried J, Doblin J, Takamoto S, et al: Effects of hoechst 33342 on survival and growth of tumor cell lines and on hematopoietically normal bone marrow cells. *Cytometry* 3: 42-47, 1982
- 10) Erba E, Ubezio P, Broggini M, et al: DNA damage cytotoxic effects and cell cycle perturbation of hoechst 33342 on L1210 cells *in vitro*. *Cytometry* 9: 1-6, 1988
- 11) Terashima T, Tolmack LJ: Changes in X-ray sensitivity on HeLa cells during the division cycle. *Nature* 190: 1210-1211, 1961
- 12) Raju MR, Tobey RA, Jett JH, et al: Age response for line CHO Chinese hamster cells exposed to X-irradiation and alpha particles from plutonium. *Radiation Res* 63: 422-433, 1975
- 13) Lydon MJ, Keller KD, Thomas DB: Vital staining and sorting by flow microfluorometry. *J Cell Phys* 102: 175-181, 1980
- 14) Rice GC, Dean PN, Gray JW, et al: An ultrapure *in vitro* phase synchrony method employing centrifugal elutriation and viable flow cytometry cell sorting. *Cytometry* 5: 289-298, 1984
- 15) Rice GC, Gray JW, Dean PN, et al: Fluorescence-activated cell sorting of the induction and expression of acute thermal tolerance within the cell cycle. *Cancer Res* 44: 2368-2376, 1984
- 16) Tobey RR, Crissman HA: Comparative effects of three nitrosourea derivatives on mammalian cell cycle progression. *Cancer Res* 35: 460-470, 1975
- 17) Hamori E, Arndt-Jovin DJ, Grimwade BG, et al: Selection of viable cells with known DNA content. *Cytometry* 1: 132-135, 1980
- 18) Watanabe I, Okada S: Study of mechanisms of radiation induced reproductive death of mammalian cells in culture: Estimation of stage at cell death and biological description of processes leading to cell death. *Radiation Res* 27: 290-306, 1966