



Title	X線照射されたHeLa S3細胞のコロニーの解析
Author(s)	増田, 康治
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1969, 28(10), p. 1396-1403
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/15926
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

X線照射された HeLa S3 細胞のコロニーの解析

九州大学医学部放射線基礎医学教室 (主任: 吉永春馬教授)

増 田 康 治

(昭和43年4月27日受付)

Colony Forming Ability of X-irradiated HeLa S3 Cells

By

Kouji Masuda

Department of Experimental Radiology

(Director: Prof. Haruma Yoshinaga)

Faculty of Medicine, Kyushu University, Katakasu, Fukuoka, Japan

The colony forming ability of X-irradiated HeLa S3 cells was studied by means of single cell culture method. Eagle minimum essential medium (1959), supplemented with 20% calf serum, 50 μ g of streptomycin and 50 units of penicillin per milliliter, was used.

Assuming a colony having more than 50 normal cells at the end of incubation developed from a single surviving cell, and applying this assumption at 10, 14, or 18 days after irradiation:

- 1) The surviving fraction 10 days post irradiation equalled the surviving fraction at 18 days.
- 2) The average size of surviving colonies 18 days post inoculation exceeded that at 10 days.
- 3) For abortive colonies, size distributions were equal at 10, 14, or 18 days after inoculation, and no increase in colony number was observed by incubation period, and
- 4) Medium replacement 7 days after inoculation did not affect cell reproductive survival.

Non-irradiated cells which divided into more than 20 cells 14 days after inoculation continued to multiply and grow.

These findings support the criterion for survival that a colony having more than 50 normal cells at the end of 10-18 days incubation developed from a single surviving cell.

Cell reproductive capacity was depressed by X-irradiation. The average size of survival colonies varied inversely with dose. The per-centage of abortive colonies per dish—especially isolated giant cell colonies—varied directly with dose.

The dose-response curves and survival colony size distributions suggest that the damage which caused delay in division may differ from that which caused loss of cell reproductive capacity.

Analysis of abortive colony size distributions by dose, suggests that dose variation resulted in various mechanisms which caused the loss of cell reproductive ability.

緒 言

Puck¹⁾らによつて in vitro での単離細胞培養法 (single cell culture method) が開発され、細胞に対する放射線作用の定量的研究が容易とな

り、細胞に対する放射線の作用機構について多くの知見が得られてきた¹⁾²⁾⁴⁾⁶⁾。

この方法によつて観察するとき、電離放射線で照射された細胞の動態を形態学的に分けると少な

くとも四つの型があげられる。1) 全く分裂できずに巨大細胞（ここでは形態的に大きい、核が分枝状である、多核であるものを意味する）になる。2) 分裂できずに、崩壊し消失する。3) ある一定回数だけ分裂出来るがそれ以上には分裂、増殖出来ず、小さいコロニーを形成する。4) その線量に応じた細胞分裂遅延の後、その障害を回復して再び分裂を始め、増殖し続ける。このことから培養後のある一定日でのコロニーの大きさから放射線の細胞増殖能におよぼす効果（以下において個々の細胞が分裂して、大きなコロニーになる能力の有無によつて、細胞の生死という語を用いる）を判定できる。Puck¹⁵⁾ によると、成長の遅い生存細胞由来コロニーと死細胞由来コロニーとはコロニーの中にしめる巨大細胞の割合から区別できるが、培養14日目に50個以上の細胞からできているコロニーを1個の細胞に由来し、その後分裂し続け得るコロニーと認定できるとする。その後この説を支持する報告や、それを批判する報告¹⁴⁾、あるいは、32個以上、50、64、128のいずれでも可とする結果⁹⁾などが報告された。いずれにせよこの方法では判定日でのコロニーは照射時に1個であつた細胞が分裂増殖し、コロニーを形成するか、あるいは分裂不能になるとの前提に立っている。

ここでは細胞のコロニー形成動態を通じて、コロニーの判定基準について検討を加え、さらに生存細胞由来コロニーと abortive コロニー（十分に大きくなり得ないコロニー）との大きさの経日的変化、およびそれらと線量との関係から、放射線による細胞死の機構と線量との関係について検討する。

材料および方法

細胞：子宮頸部癌由来細胞 HeLa S3

培養方法：Puck らの単離細胞培養法¹⁵⁾に準じて行つた。培養液には、Eagle 基礎培養液⁵⁾に20%仔牛血清を添加したものを、ストレプトマイシン50 γ /ml、ペニシリン50単位/ml 加えて常用した。継代培養は培養液を入れた角ビンにゴム栓をして、37°Cで静置して行つた。

照射前処理：培養2～3日目の対数増殖期にあ

る細胞を実験に供した。培養液を除去し、0.1%トリプシンを入れた Ca⁺、Mg⁺ を含まぬ塩類緩衝液¹²⁾で数回静かに洗滌した後、約10分間37°Cに保ち、静置してトリプシン処理した。処理後同量の培養液を加えてトリプシンの作用を抑えた後、血球計算板で細胞数を計数した。その際同時に、95%以上の細胞が1コ細胞であることを確かめた。培養液で稀釈した後、各照射群ともに必要な細胞数だけ、培養液（5ml）の入つたガラスシャーレ（60mm ϕ ）に移植し、微炭酸培養器中（37°C、5%CO₂）に4～5時間静置した。

照射中の処理：空気中で照射した。照射前後をふくめて約10分間25°Cであつた。

照射後処理：照射後直ちに培養器にうつし、観察に必要な日数10～19日間培養した。培養後、10%中性フォルマリンで固定、0.1%クリスタル紫で染色した。培養期間中、培養液を交換しても生存率に影響しないので¹¹⁾、培養液の交換はしなかつた。

シャーレ中の、一個の分離した細胞をふくめて総てのコロニーを鏡検し、コロニーの幾何学的大きさ、コロニー当りの細胞数を計数した。

照射：倍電圧平滑整流回路による X線。180 kVp, 20mA, Al 1.0mmフィルター、半価層 0.35 mm Cu, 焦点細胞間距離75cm, 線量率93rad/分。細胞の吸収線量の計算には、ガラス面からの光電効果の電子による吸収を考慮して R \rightarrow rad 換算係数1.22¹²⁾を用いた。

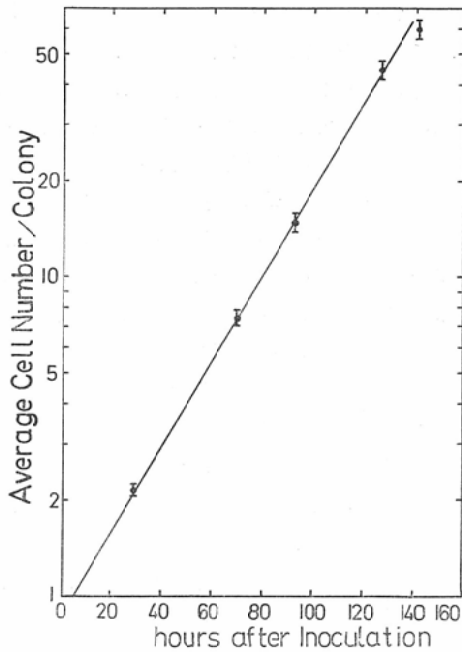
培養初期の細胞の増殖を window 法に準じて観察した。つまりシャーレの任意の位置に、約5mm ϕ の境界を印し、その中にみられるコロニーを位相差顕微鏡で経時的に観察した。7～8コの窓をつくつたシャーレに約100個の細胞を植えた。培養14～15日目に判定して、大きなコロニーになつているコロニーの培養初期の平均成長曲線をもつて細胞の成長曲線とし、平均分裂時間を計算した。

細胞の増殖能に関する線量効果関係は培養14～15日目に50個以上の細胞からなるコロニー数を生存細胞数として求めた。

結 果

1. 照射、非照射細胞の増殖

Fig. 1. HeLa S3 cells clonal growth curve



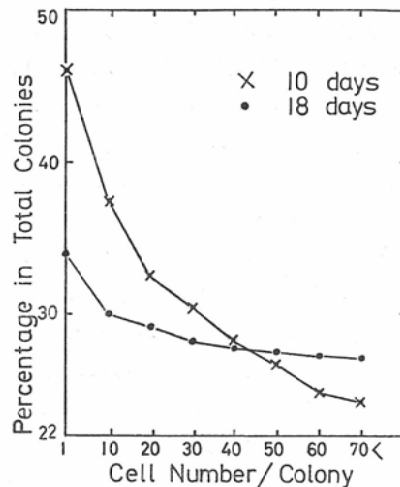
Incubated at 37°C and pH 7.4, Medium: 80% Eagle MEM + 20% calf serum.

シャーレに移植された細胞は3~4時間でその90%以上がシャーレ底に定着し、5~13時間の増殖誘導期の後、細胞分裂を開始した。移植された細胞の動態は二つに分けられた。一つは細胞分裂をくり返し、14日目には総て約100個以上の目に見える大きいコロニーを形成した。それらの移植後120~140時間以内での世代時間は20~52時間で、平均24時間であつた。図1は window 法によつて観察されたコロニーにおける細胞増殖曲線である。

残りの細胞は、数度の細胞分裂の後、あるいは細胞分裂しないままにシャーレから剝離して視野から消失した。消失したコロニーの大部分は最大細胞数が10個以下であり、まれに20個に達した後消失するものもあつた。

X線照射された細胞群のうちには先に述べた様に生存細胞と同様にある一定の回数とはいへ分裂をくり返し得るものがある。その頻度は線量の少ない程多くみられるために、ある一定日でのコロニーの大きさから生死判定をするとき、判定基準

Fig. 2. Variance of colonies having more than a limited number of cells, by incubation periods after irradiation (181 rads)



によつて幾分生存率が変つてくる。

図2は181rad照射された細胞の生存率が生死判定基準を変えることによつて変化する様子を培養10日目と18日目とについて示したものである。図の横軸は判定基準とするコロニー当りの細胞数、縦軸はその時の生存率を示す。判定基準を10個以上の細胞からなるコロニーとすると培養10日目が、また60、70以上とすると培養18日目の方が生存率は高くなり、判定基準を40~50個以上の細胞からなるコロニーとする時、培養10~18日目では培養日数に無関係に一定である。

2. コロニーの大きさの経日的変化

図3、4はそれぞれ181rad照射群と非照射群とについて生存細胞由来コロニー、および abortive コロニーの大きさの経日的変化を示したもので横軸にはコロニーの大きさ、縦軸には頻度を示した。

生存細胞由来コロニーは照射群、非照射群ともに培養日数が10日から18日と増すにしたがつて大きい方に移行し、かつ分散が大きくなる。また照射群は非照射群に比して小さい。

Abortive コロニーは培養日数の増すにつれて、コロニーの大きさにかかわらず一律に減少している。これらを総括して表1に示した。

Table 1. Surviving and abortive colony size in control and irradiated culture, by incubation periods.

Incubation period (days)	Surviving colonies counted		Abortive colonies counted	
	Number	Average diameter \pm SD (mm)	Number	Cell number per colony \pm SD
Control				
10	668	0.652 \pm 0.189	111	26.2 \pm 6.7
14	849	1.146 \pm 0.333	50	18.6 \pm 5.1
18	485	2.084 \pm 0.663	17	16.2 \pm 7.0
181 rads irradiated				
10	424	0.538 \pm 0.152	317	16.5 \pm 6.6
14	709	0.955 \pm 0.326	267	15.7 \pm 7.3
18	657	1.424 \pm 0.515	160	12.4 \pm 5.7

Fig. 3. Variation of survival colony size distributions of X-irradiated and, non-irradiated HeLa S3 cells by incubation periods.

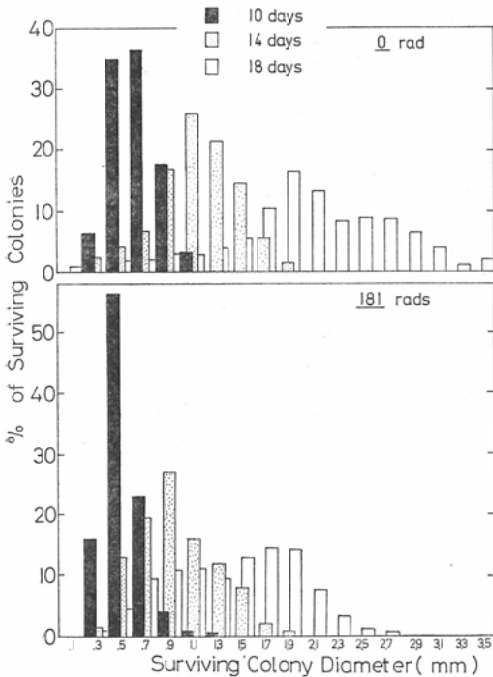
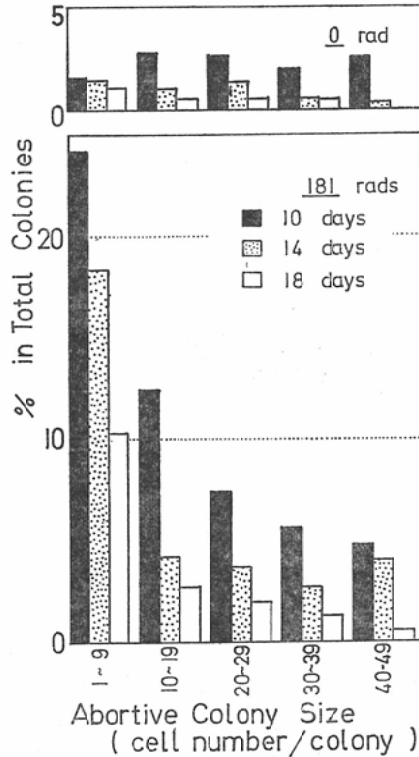


Fig. 4. Distribution of abortive colony size of X-irradiated and non-irradiated HeLa S3 cells, by incubation periods.



3. 線量と生存細胞由来コロニーの大きさとの関係

照射線量と生存率, 生存細胞由来コロニーの大きさ, abortive コロニーの頻度, 並びにその大きさについて表2に示す. 図5は線量と生存率との関係を片対数グラフ上に示したものである. 今日までにすでに多く報告されているようにいわゆる

C-typeの曲線で初めはゆるやかな傾斜であるが, 線量の増加とともに直線に近づく. 外挿数は 4.2, D_0 (37%線量) は75rad であつた.

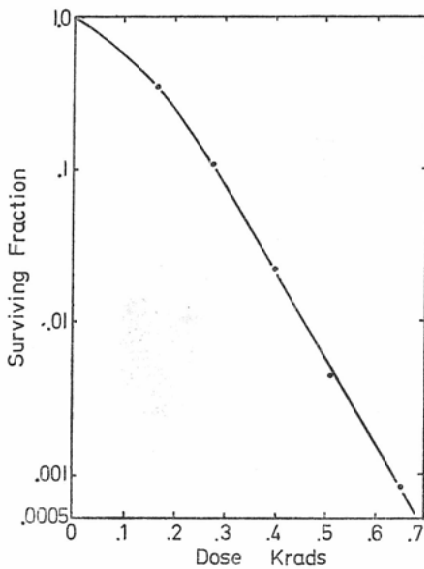
培養14日目の生存細胞由来のコロニーの大きさの分布と照射線量との関係を図6に示す. コロニ

Table 2. Surviving and abortive colony size at 14 th day after X-irradiation, by dose.

Dose (rads)	Surviving colony				abortive colony cell			Survival (%)
	Number of cells plated	Number of colonies	Number	Average diameter \pm SD (mm)	Number	(% in total colony/colony)	number per colony	
0	404	333	327	1.505 \pm 0.397	6	2	19.7	100
165	1210	442	341	1.130 \pm 0.456	101	23	14.7	34.7
280	3620	496	321	0.979 \pm 0.406	175	35	13.6	10.9
405	10900	469	199	0.853 \pm 0.380	270	58	10.7	2.26
513	32700	508	121	0.748 \pm 0.294	387	76	7.2	0.455
654	98400	693	66	0.666 \pm 0.240	627	90	3.60	0.083
Total		2941	1375		1566			

plating efficiency: 81.8%

Fig. 5. Dose response curve of HeLa S3 cells reproductive capacity

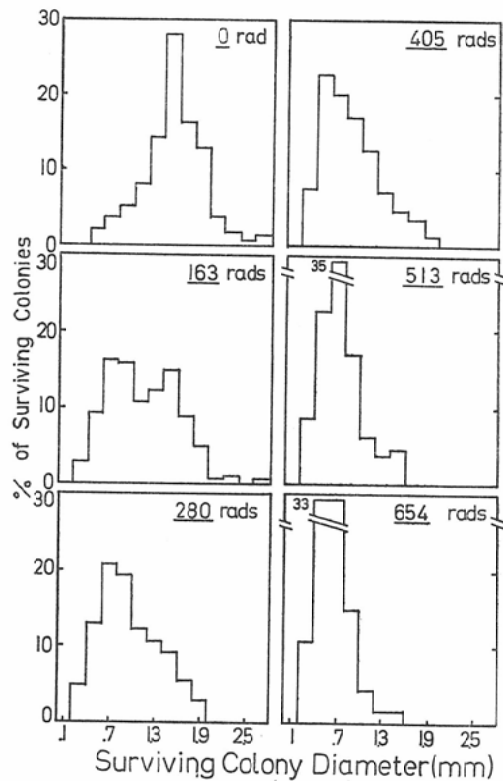


の大きさはその長径をもつて表示した。図の横軸はコロニーの大きさで、縦軸には生存細胞の由来のコロニー中の百分率を示す。非照射群ではコロニーの平均直径は 1.505mmであるのが、線量の増加とともに小さい方へ移行して、654rad 照射群では 0.666mmと半分以下であり、直径最大のコロニーの大きさも 2.6mmから 1.4mmと小さくなった。

4. 線量と abortive コロニーの大きさとの関係

分離した細胞、および多少とも接近してみられる細胞集団を一つのコロニーとみなした。培養14

Fig. 6. Surviving colony size distribution 14 days after X-irradiation, by dose.



日目の abortive コロニーの大きさと照射線量との関係を図7に示す。コロニーの大きさはコロニー当りの構成細胞数を計数して表示した。横軸にはコロニーの大きさ(細胞数)を、縦軸にはシャーレ当りの全コロニー中の割合を%で表示し、そのうち1コのみ巨大細胞だけのコロニーを斜線で表

Fig. 7. Abortive colony size distribution 14 days after X-irradiation, by dose.

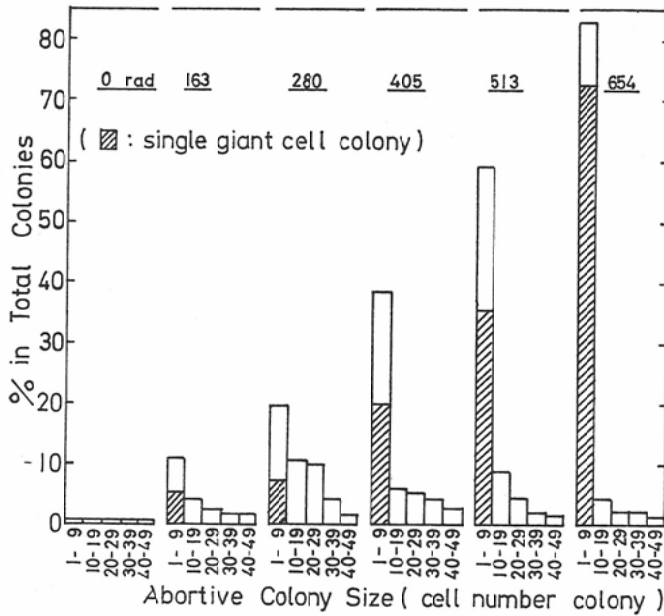
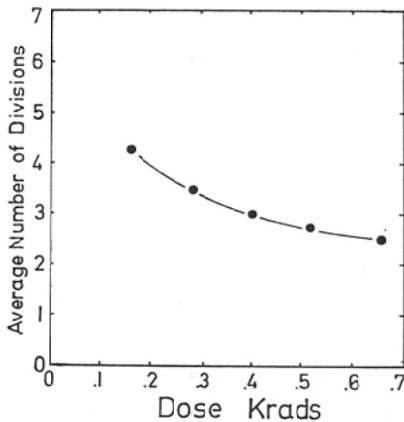


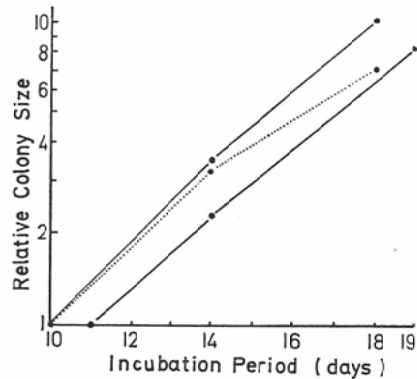
Fig. 8. Variation of the average number of divisions of which non surviving cells are capable.



わした。

非照射群にも abortive コロニーが散見されるが、2%とごくわずかである。線量の増加につれて、全コロニー中のabortive コロニーの割合が増し、654rad 群では90%をしめる。また、abortive コロニーの大きさも線量の増加に伴って小さくなり(図8), 対照群では平均20であるが、654rad照射群では平均4で、大部分は10個以下の細胞からな

Fig. 9. Cell Clonal Growth Curve



The solid line is growth curve of non-irradiated cells and the dotted line is that of irradiated (181 rads) cells.

るコロニーで、さらにそのうちでも1個の巨大細胞のままであるものが多数を占めている(図7)。

論 議

1. コロニーの大きさからの生死判定基準

1) 非照射細胞の中に、分裂して増殖出来るものと、数度の細胞分裂にとどまるものがあり、前者は培養14日目には約100個以上の細胞からな

るコロニーを形成し、後者は大部分が10個以下(まれに20個)の細胞からなるコロニーに止まり、かつ培養期間中に剝離するものが多い。

2) 判定日において、コロニー当りの細胞数50個をコロニーの生死判定基準とするとき、培養10日目と18日目とで生存率にあまり差がないことから(図2)、それ以下の細胞からなるコロニーは10~18日の範囲では培養日数を増してもそれ以上には大きくなると考えられる。

3) 50個以上の細胞からなるコロニーの大きさは培養日数が10日から18日と増すにつれて大きくなるが(図3)、50個未満の細胞からなるコロニーの大きさは培養10日、14日、18日目では次第に小さくなる傾向にあり、かつ全コロニー数に対する割合は次第に減少している(表1、図4)。

4) 培養期間中に培養液を交換しても生存細胞由来(50個以上の細胞から出来ている)コロニーは大きくなるが数は増さない。また総コロニー中の abortive コロニーの数は一定であり、それらの大きさも変わらないことから、培養液を交換する時に50個未満の細胞から出来ていたコロニーは培養液を新しくても生存コロニーと判定されるように大きくはならないと考えられる¹¹⁾。

このような4点から細胞の生死判定基準として、培養10~18日において、50個以上の細胞からなるコロニーを生存細胞由来コロニーとし、50個未満の時、それをもはやそれ以上には増殖出来ないコロニーとするのは妥当である。

2. HeLa S 3 細胞の増殖能に関する線量効果関係は他に報告されている哺乳動物細胞の増殖能に対するX線の線量効果関係と同様に、片対数グラフ上で初め肩をもち、線量の増加につれて直線に近づく曲線であらわされる。二等分割照射法によつて得られた知見によると、線量効果関係の直線部に相当する程度の線量を照射された生存細胞は、線量の大きさに無関係に同一程度の障害を受けている⁹⁾。

ところで、生存細胞由来コロニーの大きさと線量との関係を見ると、線量の増加とともに、コロニーの大きさは小さい方へ移行する(図6、表2)。つまりこのことはコロニーの大きさを決める

機構が線量の大きさに依存して影響されることを意味する。生存コロニーの大きさが線量とともに小さくなる原因として、照射後分裂開始までの時間の延長、第一回目の細胞分裂後の分裂遅延などがあげられる。Sinclairによると、小さいコロニーの出現は遺伝的影響によるものであり、それを構成する細胞の移植率は低く、世代時間は長い¹⁶⁾。また多くの研究者によつて、X線照射された哺乳動物細胞の分裂は遅延し¹⁰⁾¹⁷⁾¹⁸⁾、その程度は線量の大きさに依存する¹⁹⁾¹⁶⁾¹⁸⁾。また照射後第一回目の細胞分裂の後には正常の世代時間で分裂するが⁷⁾、次第に遅延してくる⁹⁾ことが報告されている。

生存コロニーの中にしめる細胞の大きさが培養日数(10、18日)、並びに照射、非照射にかかわりなくほぼ一定である⁹⁾と仮定すると、コロニーの大きさから細胞の分裂時間を計算出来る。表1から培養10~18日での細胞増殖曲線を求めると、(図9)照射群の分裂時間は非照射群のそれに比して長い。

一方また、細胞の増殖能に関する障害は回復可能であり⁷⁾、照射後第一回目の細胞分裂が始まるまでに回復するのに反して、分裂時間の延長は、照射直後はもちろん第一回目の細胞分裂の後もみられる⁹⁾。

これらのことは細胞分裂を不能にさせる機構と分裂時間の遅延を来たす機構とが異なることを示唆している。

3. abortive コロニーの大きさと線量との関係を見ると、少線量の時は abortive コロニーの大部分はある一定回数だけ分裂をくり返したものであるが、線量が増すにしたがつて、abortive コロニーのコロニー当りの細胞数は次第に小さい方へ移行し、abortive コロニーの中で、一度も分裂できずに巨大細胞になる割合が多くなり、654 rad 照射では abortive コロニーの95%以上は一個の分離した巨大細胞である(図7)。このことは HeLa¹⁵⁾ 細胞や yeast⁹⁾ を用いた他の報告によく一致する。

この反応の多様性から致死障害には数種類あると考えられてきた。それに対して Whitmore ら¹⁹⁾

はこの放射線に対する細胞の反応のちがいは同一の障害の表現型のちがいにすぎないとの説を出した。その基礎には、1) 放射線は細胞の分裂能を抑制する。2) この抑制された分裂能は総ての細胞について同じであり、また継代されるとの二つの仮定をおいている。それに基づいて抑制された分裂能からコロニーの大きさの分布を理論的に計算し、実験値とよく一致をすることをあげている。yeastを用いた実験によると⁹⁾、しかし、abortive コロニーの大きさの分布は必ずしも理論値と実験値とは一致しないし、生存コロニー中の細胞の中にも全く分裂しないものと、分裂するものとがあり、分裂するものの中でも成長速度はさまざまである。

線量の少ない時は abortive コロニーの中では一定回数だけ分裂したコロニーの割合が多く、線量が大きくなる程、分裂できずに1個の巨大細胞になる細胞の割合が多くなることは、細胞死の型が線量の大きさによつて異なることを示唆している。少線量によつて生ずる細胞死は、おこりやすいが結果のあらわれるまでの時間が長い反応で、一方大線量によつてみられる細胞死は、反応しにくい結果のあらわれるまでの時間が短かいともいえる。

個体レベルでは線量の大きさによつて個体死の発生機構が異なり、比較的少線量の時は骨髄障害による死が主たる死因であるが、線量の増加につれて腸管障害、神経障害が主死因になつてくることが明らかにされている。細胞レベルでも細胞死の機構と線量の大きさとの関係を明らかにすることは放射線障害発現機構を解明する手掛りの一つであると考えられる。

総括

HeLa S3細胞のコロニー形成動態、および照射、非照射細胞のコロニーの大きさの分布を経日的に観察して、コロニー判定基準について追試した。さらに培養14日目におけるコロニーの大きさと線量との関係とから、X線による細胞の増殖能停止機構について考察した。

1. 培養10~18日目におけるコロニーの大きさ、50細胞/コロニーは細胞の増殖能に関する生死判定基準として妥当である。

2. X線照射によつて細胞の増殖能は抑制され、生存細胞のコロニーの大きさは線量の増加につれて小さい方に移行する。abortive コロニーの大きさもまた小さい方に移行し、一度も分裂せずに巨大細胞になる割合が高まる。

3. 線量と生存細胞由来コロニーの大きさとの関係から、細胞死と分裂時間の延長とはその発現機構が別であると考えられる。

4. 線量と abortive コロニーの大きさとの関係から、細胞死の機構は線量の大きさによつて異なると示唆される結果を得た。

文 献

- 1) Bedford, J.S. and Hall, E.J.: *Int. J. Rad. Biol.* 7, 377-383, 1964.
- 2) Belli, J.A. and Bonte, F.J.: *Radiat. Res.* 18, 272-276, 1963.
- 3) Berry, R.J.: *Radiat. Res.* 30, 237-247, 1967.
- 4) Berry, R.J. and Cohen, A.B.: *Brit. J. Radiol.* 35, 489-491, 1962.
- 5) Eagle, H.: *Science* 130, 432-437, 1959.
- 6) Elkind, M.M. and Sutton, H.: *Radiat. Res.* 13, 556-593, 1960.
- 7) Elkind, M.M., Sutton, H. and Moses, W.B.: *J. cell. comp. Physiol.* 58 suppl. 1, 113-134, 1961.
- 8) Elkind, M.M., Han, A. and Volz, K.W.: *J. nat. Cancer Inst.* 30, 705-721, 1963.
- 9) James, A.P.: *Nature* 213, 843-844, 1967.
- 10) Marin, G. and Bender, M.A.: *Exp. Cell. Res.* 43, 413-423, 1966.
- 11) Masuda, K.: *Nipp. Act. Radiol.* 28, 1968, 1252-1255.
- 12) Masuda, K.: *Nipp. Act. Radiol.* 28, 1968, 99-101.
- 13) Merchant, D.J., Kahn, R.H. and Murphy, W.H.: *Handbook of cell and organ culture.* p. 240 Burgess Publishing Company. Minneapolis U.S.A. 1964.
- 14) Nias, A.H.W., Gilbert, C.W., Lajtha, L.G. and Lange, C.S.: *Int. J. Rad. Biol.* 9, 275-290, 1965.
- 15) Puck, T.T. and Marcus, P.I.: *J. exp. Med.* 103, 653-666, 1956.
- 16) Sinclair, W.K.: *Radiation Research* pp. 607-631 North-Holland Publishing Company Amsterdam 1967.
- 17) Traut, H.: *Nature* 209, 92-93, 1966.
- 18) Yamada, M. and Puck, T.T.: *Proc. nat. Acad. Sci.* 47, 1181-1191, 1961.
- 19) Whitmore, G.T., Till, J.E. and Gulyas, S.: *Radiat. Res.* 30, 155-171, 1967.