



Title	HeLa細胞によるエックス線耐性の研究：耐性株におけるn, DoおよびDqについて
Author(s)	小祝, 聰一郎; 牟田, 信義
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1980, 40(6), p. 592-597
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16146
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

HeLa 細胞によるエックス線耐性の研究：

耐性株における n , D_o および D_q について

札幌医科大学放射線医学教室（主任：牟田信義教授）

小祝聰一郎 牟田 信義

（昭和54年11月10日受付）

（昭和55年1月16日最終原稿受付）

Studies on Radioresistance with HeLa Cells: On the Variations of n , D_o , and D_q Values of the Radioresistant HeLa Strains

Sôichirô Koiwai and Nobuyoshi Muta

Department of Radiology, Sapporo Medical College

(Chief: Prof. Nobuyoshi Muta)

Research Code No.: 407

Key Words: Radioresistance, HeLa cells, Radiation induced radioresistant cells

In our previous experiments (15, 16), HeLa cells were successively irradiated with 1 kR of X-rays. After receiving 3, 5, 8, 11, 14, and 17 kR the irradiated HeLa cells showed progressively increasing radioresistance.

In the present paper, the results of studies on the variation of the extrapolation number (n), mean lethal dose (D_o), and quasi-threshold dose (D_q) of survival curves for these radioresistant HeLa strains were reported.

The values of n of the original and radioresistant strains were all found between 2 and 3, and a change of the n values with an increase in the total dose received by the cell strains was not noticed. On the other hand, the values of D_o of the radioresistant strains progressively increased from 105 R in the original line to 148 R in the 17 kR strain with increasing doses of pre-irradiation. Similarly, the values of D_q had a tendency to increase in the radioresistant strains.

Repair of sublethal damage with the original and radioresistant strains was studied and the properties of the radioresistant strains were discussed.

1. 緒 言

腫瘍や組織培養細胞に繰返して照射を行うとその放射線抵抗性が増すことは古くから報告されている^{1)~14)}。我々の教室でも以前から HeLa 細胞を用いて実験を行ってきた^{15)~18)}。細胞にエック

ス線を 1 回 1,000R ずつ 3 回照射し、感受性の差を細胞増殖の抑制で比べてみると累代照射株は原株より感受性が低くなっていた。累代照射を重ねるにしたがい感受性の低下の度合は次第に大きくなつた¹⁵⁾¹⁶⁾。

今回は、コロニー形成法によって原株と累代照射株細胞の照射後生存率を調べ、その生存曲線からそれぞれの n (外挿数)、 D_0 (平均致死線量) および D_{q} (quasi-threshold dose) を求めた。

2. 材料と方法

放射線低感受性細胞の作り方は前に報告した¹⁵⁾¹⁶⁾。すなわち HeLa 細胞を 20%仔牛血清を加えたラクトアルブミン-ハンクス液で培養後48時間目にエックス線 (200kVp, 25mA, 0.3mmCu+0.5mmAl フィルター, HVL 1.01mmCu) で 1,000R 照射すると約 1 カ月後に培養瓶に 5, 6 個のコロニーが出来る。そのコロニーを 1 個ずつはがして培養し、増殖するのをまって第 2 回の照射を行なうと再びコロニーが出来る。この操作を繰返して細胞に合計 24,000R 照射した。累代照射株と原株との放射線感受性を比較するため、3, 5, 8, 11, 14 および 17kR 株にそれぞれ 1,000R の試験照

射を行ない、その後の細胞の増殖の模様を調べた。培養 2 日目に、1,000R 照射すると全株とも細胞の増殖がおさえられるが、試験照射後 7 日目まで種々の時間における、それぞれの非照射群に対する % で細胞数を比較してみるといずれも累代照射株の方が原株のそれより明らかに大きく、また累代照射を重ねるにしたがって放射線抵抗性が増加していった (Fig. 1)。

今回は、コロニー形成法によって原株と累代照射株細胞の照射後生存率を比べた。培養液は Eagle MEM に 20% の胎児牛血清を加え、シャーレはファルコンのプラスチックシャーレ (直径 6cm) を用いた。照射は 200kVp, 25mA のエックス線で 0.3mmCu+0.5mmAl のフィルター, HVL 0.98mmCu, 焦点細胞間距離 40cm, 線量率は 95.5 R/min で室温で照射した。照射後、炭酸ガス孵卵器で培養し出来たコロニーをカルノア液で固

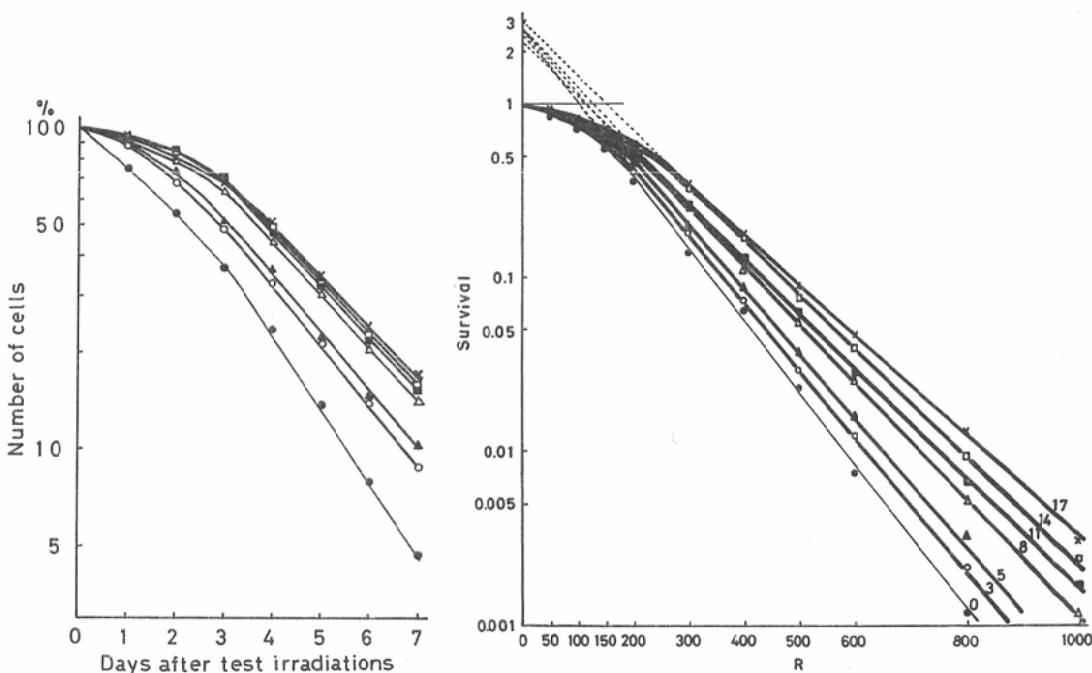


Fig. 1 Growth suppressive curves after test irradiation with 1 kR of X-rays of the original (●), 3 (○), 5 (▲), 8 (△), 11 (■), 14 (□), and 17kR (×) strains, as expressed in percentage of the number of cells in the corresponding control cultures.

Fig. 2 Survival curves of the original and 3, 5, 8, 11, 14, and 17kR pre-irradiated HeLa cells after irradiation with X-rays.

Table 1 The extrapolation numbers (n), mean lethal doses (D_0), quasi-threshold doses (D_q), and surviving fractions for the original and pre-irradiated HeLa cells.

Cell line	Original	3kR	5kR	8kR	11kR	14kR	17kR
n	2.6	2.5	2.6	2.6	2.3	2.9	2.5
D_0 (R)	105	112	117	130	137	141	148
D_q (R)	98	104	113	122	115	146	137
R				Surviving fraction (%), mean \pm SE			
0	100	100	100	100	100	100	100
50	85.4 \pm 1.8	87.0 \pm 2.2	88.4 \pm 3.2	88.2 \pm 1.8	86.9 \pm 2.6	90.8 \pm 2.4	91.3 \pm 1.9
100	72.6 \pm 1.9	71.7 \pm 2.6	75.7 \pm 4.3	77.1 \pm 2.2	76.1 \pm 2.8	81.4 \pm 1.9	81.7 \pm 2.6
150	55.4 \pm 2.6	57.2 \pm 2.5	61.8 \pm 5.3	64.9 \pm 1.5	65.2 \pm 2.6	68.6 \pm 3.2	70.8 \pm 3.6
200	36.5 \pm 3.5	41.0 \pm 4.0	46.6 \pm 4.3	49.6 \pm 2.7	51.1 \pm 3.5	56.8 \pm 1.4	58.8 \pm 2.9
300	13.9 \pm 2.0	17.8 \pm 2.9	20.2 \pm 3.6	25.8 \pm 4.1	26.0 \pm 2.2	32.2 \pm 3.7	34.2 \pm 3.2
400	6.39 \pm 0.79	7.33 \pm 1.21	8.77 \pm 2.06	11.3 \pm 1.9	12.9 \pm 1.2	17.1 \pm 2.7	17.6 \pm 1.7
500	2.33 \pm 0.57	2.93 \pm 0.43	3.64 \pm 0.56	5.58 \pm 0.94	6.35 \pm 0.76	7.63 \pm 1.03	8.86 \pm 1.07
600	0.778 \pm 0.169	1.21 \pm 0.20	1.60 \pm 0.38	2.60 \pm 0.58	2.86 \pm 0.41	4.06 \pm 1.02	4.54 \pm 0.58
800	0.120 \pm 0.069	0.213 \pm 0.045	0.324 \pm 0.116	0.532 \pm 0.184	0.675 \pm 0.110	0.969 \pm 0.160	1.28 \pm 0.25
1,000	0	0.0044 \pm 0.0099	0.0513 \pm 0.0393	0.118 \pm 0.038	0.169 \pm 0.024	0.232 \pm 0.060	0.303 \pm 0.056

定、ギームザ染色の後、50コ以上の細胞から出来ているコロニーの数をかぞえて各株の生存率を調べた。なお、照射から固定までの培養時間は各累代照射株で generation time が異なるため、それぞれの株について照射をうけない 1 コの細胞が 50 コ以上になるまでの時間を調べ、それに従った。

また、回復の速さを比べるため原株と 5, 11, 17kR 株にそれぞれ 300R 照射し、20分たってから第 2 回の 100, 200, 300R を照射した。更に回復の程度を見るため原株と 5, 17kR 株について 1 回 300R ずつ 2 回の分割照射を行ない、照射間隔を 20 分から 24 時間まで種々に変えた。

3. 結 果

原株と累代照射株との放射線感受性を比較する実験は各株について 5 回ずつ行なったが、それらの値を平均して Table 1 にまとめた。この表からわかるように、 n の値は原株では 2.6, 3kR 株では 2.5, 5kR, 8kR 株ではともに 2.6, 11kR 株では 2.3, 14kR 株では 2.9, 17kR 株では 2.5 といずれも 2 から 3 の間にあって、累代照射を重ねるに従って n の値がかかるとはいえない。しかし D_0 は原株が 105R であるのに対し、3, 5, 8, 11, 14 および 17kR 株ではそれぞれ約 112, 117, 130, 137, 141 および 148R と累代照射の回数がふえるにした

がい少しづつ増していく。また D_q も原株が 98R であるのに対して 3, 5, 8, 11, 14 および 17kR 株ではそれぞれ 104, 113, 122, 115, 146 および 137 と、ばらつきはあるがやはり累代照射の回数が増すとともに D_q の値も増す傾向がみられた。これらを Fig. にすると Fig. 2 のようになる。

Table 2 The surviving fractions after a single and fractionated irradiation of the original and pre-irradiated HeLa cells, expressed as percentage of the number of cells in the corresponding non-irradiated control cultures.

Cell line	Original	5kR	11kR	17kR
Dose (R)	Surviving fraction (%)			
0	100	100	100	100
100	67.7	73.6	79.1	77.2
200	38.0	49.3	50.4	55.2
300	14.9	18.2	27.5	32.8
400	6.87	8.90	12.1	18.3
500	3.03	3.36	5.77	9.29
600	0.984	1.52	3.17	4.06
300+100*	7.15	12.8	18.6	30.1
300+200*	3.24	5.31	10.3	16.0
300+300*	1.14	2.25	4.53	7.34

* The intervals between the first and second doses are 20 minutes.

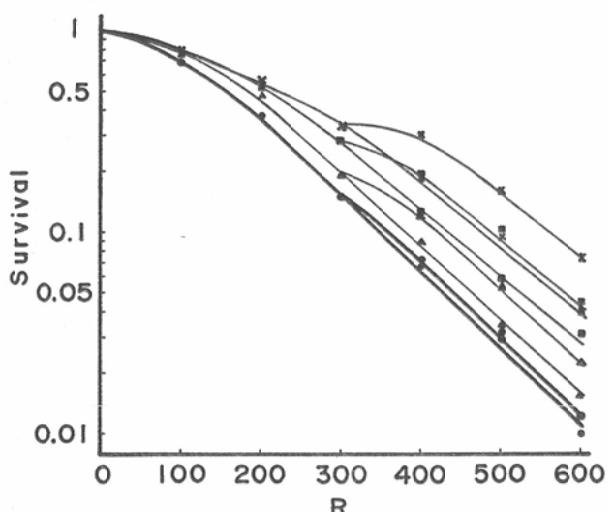


Fig. 3 The surviving fractions after a single and fractionated irradiation of the original (●), 5 (▲), 11 (■), and 17kR(×) strains. The intervals between the first and second doses are 20 minutes.

回復の速さを原株と累代照射株で比べた、分割照射の実験結果は Table 2 および Fig. 3 に示した。原株では第1回の照射後20分の間にほとんど回復がみられないが累代照射株ではいづれもあきらかに回復が認められた。

また、回復の程度を見た実験の結果は Table 3 と Fig. 4 に示した。ここで、第1回目の300R の照射で死に至らない損傷で生き残った細胞が完全に回復した場合に第2回の300R の照射から期待される生存率は 1, 2 回目照射時のそれぞれの生存率の積であり、原株では 0.0250 となる。同様に 5kR, 17kR 株ではそれぞれ 0.0396, 0.0949 である。したがってこの Table と Fig. 4 からわかるように原株では回復が完了するのに 12 時間以上を要するが、5kR, 17kR 株ではともに 9 時間以内に

回復が完了している。ただ、耐性の程度が大きい 17kR 株が 5kR 株と比べて特に速く回復するとはいえないようである。

4. 考 案

先ず Fig. 2 の意味、すなわち累代照射を重ねてゆくと n の値はふえずに D_0 の値が増加するということについて考察を加えてみる。これらの曲線は細胞の感受性そのものの変動の他に、放射線障害の相互作用やいろいろな回復機構による結果としてあらわされているので簡単には解明出来ないが、 n の値が変わらない、すなわち的の数は変わらないで、 D_0 が大きくなるということは的に当る有効弾の数が少なくなるということである。それには、(1) 的が小さくなるか、(2) 的に飛んでくる弾の数は同じでも、何かがそれを無効にす

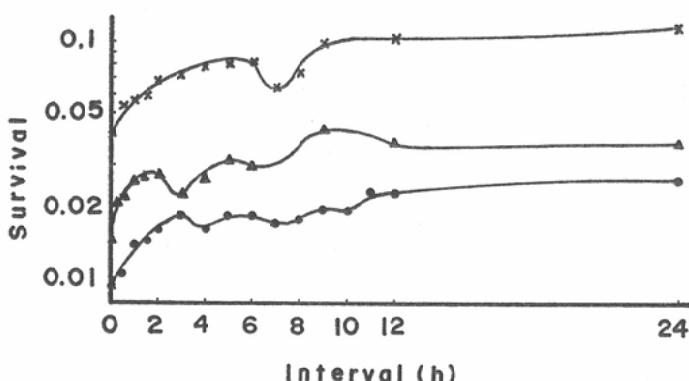


Fig. 4 Fractionated recovery curves of the original (●), 5 (▲), and 17kR (×) strains. These curves show survival fractions resulting from two doses of 300R at 37°C separated by intervals shown on the abscissa.

Table 3 The surviving fractions after a single and fractionated dose of the original and pre-irradiated HeLa cells, expressed as percentage of the number of cells in the corresponding non-irradiated control cultures.

Cell line		Original	5kR	17kR
Dose (R)	Interval	Surviving fraction (%)		
0	—	100	100	100
300	—	15.8	19.9	30.8
600	—	0.91	1.44	4.07
300+300	20 min		2.08	
300+300	30 min	1.06		5.25
300+300	40 min		2.21	
300+300	1h	1.39	2.56	5.61
300+300	1.5h	1.49	2.76	5.83
300+300	2h	1.62	2.76	6.89
300+300	3h	1.87	2.26	7.18
300+300	4h	1.62	2.67	7.80
300+300	5h	1.82	3.17	7.90
300+300	6h	1.85	2.92	8.24
300+300	7h	1.70		6.33
300+300	8h	1.75		7.47
300+300	9h	1.97	4.27	9.80
300+300	10h	1.90		
300+300	11h	2.35		
300+300	12h	2.30	3.79	10.3
300+300	24h	2.66	3.74	11.4
*		2.50	3.96	9.49

* If, between two doses, all accumulated damage has been repaired, the surviving fraction after the second dose would be determined from the products 0.158×0.158 , 0.199×0.199 , and 0.308×0.308 respectively.

るか（たとえば scavenger）、(3) 的における障害が回復し易い、あるいは回復が早い、したがって致死的障害にまで発展しないということが考えられる。(1) の目的が少さいというのは何が的かということが問題になるし、例えは DNA が的だとすると原株と 5kR 株では DNA の量が同じであることを以前、当教室の森田¹⁷が見ているので的が小さくなつたとはいいにくい。(2) の命中弾を無効にするということについては、放射線防護作用のある非蛋白 SH の量が、5kR 株では原株に比べて有意に多くなつていていることをやはり森

田¹⁷が報告している。森田の実験では、5kR 株と 17kR 株の非蛋白 SH 量の間には大きな差が見られなかつたが、原株に比べて両株とも有意に多いことから、同じ数の弾が当つても耐性細胞では非蛋白 SH によってより多くの命中弾が無効にされ、原株より障害が少なくなることが考えられる。(3) の回復については当然障害の程度とも関係しているのでいちがいにはいえないが、分割照射の結果からわかるように耐性株では原株に比べて回復が早い。しかし耐性の程度の大きい株が特に速く回復するとはいはず問題が残つてゐる。

以上のことから耐性細胞は原株に比べて障害をうけにくく、また回復しやすい性質をもつてゐるということが出来る。しかしこれらの原因が SH 量¹⁷ や generation time の差¹⁶だけでは説明出来ず、更に多くの要素が複雑に関係していると考えられる。二階堂と堀川¹⁹は HeLa S3 から分離した放射線感受性株と耐性株を使って放射線感受性を決める要素について研究し、非蛋白 SH の量が放射線感受性を決める主な役割をつとめていると報告している。我々も非蛋白 SH が要素の一つであると考えているが、更に感受性の機構を解明すべく研究を進めている。

5. まとめ

1. HeLa 細胞に 1 回 1,000R ずつ 3, 5, 8, 11, 14 および 17 回累代照射して作った放射線低感受性株についてコロニー形成法で照射後生存率を調べ、それぞれの n , D_0 および D_q を求めて原株と比較した。 n の値は原株、累代照射株ともいずれも 2 から 3 の間にあって、累代照射を重ねるに従つて n の値がかわるとはいえない。しかし D_0 は原株の 105R から 17kR 株の 148R まで、累代照射の回数がふえるにしたがつて増していった。また D_q も、ばらつきはあるが累代照射の回数が増すとともに増加する傾向がみられた。

2. 回復を比べるため、原株と累代照射株に 1 回 300R ずつ 2 回の分割照射を行なつた。原株では回復が完了するのに 12 時間以上を要するが、5kR, 17kR 株ではともに 9 時間以内に回復が完了した。

3. 以上の結果と森田¹⁷⁾の非蛋白 SH についての研究結果から放射線耐性細胞の性質について考察を加えた。

文 献

- 1) Hill, E., Morton, J.J. and Witherbee, W.D.: Studies on X-ray effects, IV. Direct action of X-rays on transplantable cancers of mice. *J. Exp. Med.*, 29: 89—96, 1919
- 2) Russ, S.: Experimental studies upon the lethal doses of X-rays and radium for human and other tumours. *Brit. J. Radiol.*, 29: 275—292, 1924
- 3) Mottram, J.C.: On the relationship between β and γ radiation in the treatment of tumours. *Brit. J. Radiol.*, 5: 768—774, 1932
- 4) Snellman, B.: Attempt to develop reduced radio-sensitivity in Jensen rat sarcoma by means of roentgen irradiation. *Acta Radiol.*, 16: 545—556, 1935
- 5) Schubert, G.: Die Strahlenresistenz in Biologie und Medizin. *Z. Krebsforsch.*, 60: 216—233, 1954
- 6) Dittrich, W., Höhne, G. and Schubert, G.: Development of a radioresistant strain of Ehrlich carcinoma in mice. In *Progress in Radiobiology* (Mitchell, Holmes, and Smith, Eds.), pp. 381—385, 1956 Oliver and Boyd, Edinburgh
- 7) Whitfield, J.F. and Rixon, R.H.: Radiation resistant derivatives of L strain mouse cells. *Exp. Cell Res.*, 19: 531—538, 1960
- 8) Rhynas, P.O.W. and Newcombe, H.B.: A heritable change in radiation resistance of strain L Mouse cells. *Exp. Cell Res.*, 21: 326—331, 1960
- 9) 奥村秀夫, 金万元子, 間世田桂子, 小宮協子, 高野宏一: 放射線耐性ならびにウイルス耐性細胞株の染色体分析. 第20回日癌総会報告, 昭36 (日癌会記事 XX : 75—76. 1962)
- 10) 菅原 努, 堀川正克: 放射線耐性細胞の研究. *日本医学会誌*, 22: 649—650, 1962
- 11) Berry, R.J.: Quantitative studies of relationships between tumor cell ploidy and dose response to ionizing radiation in vivo. Modification of radiation response in a previously irradiated tumor. *Radiat. Res.*, 18: 236—245, 1963
- 12) Révész, L., Glas, U. and Hilding, G.: Relationship between chromosome number and radiosensitivity of tumour cells. *Nature (London)*, 198: 260—261, 1963
- 13) Bhaskaran, S. and Dittrich, W.: Genomveränderungen bei erworbener Strahlenresistenz. *Strahlentherapie*, 122: 270—278, 1963.
- 14) Balmukhanov, S.B., Yefimov, M.L. and Kleinbock, T.S.: Acquired radioresistance of tumour cells. *Nature (London)*, 216: 709—711, 1967
- 15) 牟田信義: 放射線耐性の研究. *日本医学会誌*, 24: 545—563, 1964
- 16) Muta, N. and Koiwai, S.: Studies on radioresistance with HeLa cells. Establishment of a radioresistant line. *Radiat. Res.*, 43: 332—340, 1970
- 17) Morita, K.: Sulphydryl contents of the radioresistant HeLa cells and their cross resistance to nitrogen mustard. *Radiat. Res.*, 56: 405—410, 1973
- 18) Koiwai, S. and Muta, N.: Studies on radioresistance with HeLa cells: Radiosensitivity and chromosome constitution. *Radiat. Res.*, 59: 717—723, 1974
- 19) Nikaido, O. and Horikawa, M.: Analysis of the factors in determining radiosensitivity in mammalian cells by using radio-sensitive and -resistant clones isolated from HeLa S3 cells in vitro. *J. Radiat. Res.*, 17: 154—173, 1976