



Title	細胞周期パラメーターの算出
Author(s)	奥村, 寛; 小野沢, 正子; 松沢, 大樹 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1971, 31(8), p. 959-963
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16487
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

細胞周期パラメーターの算出

愛知県がんセンター研究所放射線部

奥村 寛 小野沢正子 松沢 大樹

愛知学院大学歯学部第1口腔外科学教室

森 田 仁

(昭和46年7月10日受付)

Evaluation of Cell Cycle Parameters

Yutaka Okumura, Masako Onozawa, Taiju Matsuzawa and Hitoshi Morita*

Department of Experimental Radiology, Aichi Cancer Center Research Institute, Chikusa-ku, Nagoya, Japan

Research Code No: 401

Key Words: Thymidine-³H Labeled Mitosis, Cell Cycle, Yoshida sarcoma Mitosis

Cell cycle is consisted of G_1 , S, G_2 and M phases. Duration in each phases has deviation around a mean time. This report described a simple method for evaluating mean duration and standard deviation for each phases, by means of plotting labeled mitoses data on probit paper. The distribution of the duration in each phase was assumed as the normal distribution. Cell cycle parameters of LY-1 cell, a sub line from Yoshida sarcoma, were obtained by this method: G_1 ; 9.8 ± 5.9 (hr), S; 10.8 ± 1.4 (hr), G_2 ; 4.2 ± 1.1 (hr). The results were compared with those obtained by Monte Carlo method, where log-normal distribution was assumed for duration in each phases, and showed well coincidence with them. It might be concluded that this method was simple and convenient to evaluate cell cycle parameters.

1. 緒 論

細胞周期はDNA合成期及び分裂期を指標にして、 G_1 , S, G_2 , M 期に分けられる。細胞周期及び各期の長さは細胞の性質を決める基本的な因子の一つであり、増殖、分裂機構及び放射線感受性等の研究のために正確に知る必要がある¹⁾²⁾¹²⁾²²⁾。各期の長さは細胞をトリチウム—サイミジン (³H-TdR) で標識し、経時的に標識されたM期の細胞の割合を測ることによって求めたlabeled mitoses 曲線から求めることができる¹⁵⁾。各期の長さは一個一個の細胞によって一定の分散を伴って変動する⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾ために実測されたlabeled mitoses 曲線は標識後の時間とともにだらかに

なる。そのため各期を正確に求めることは困難になる。Barrett³⁾が電子計算機を用い、モンテカルロ法による各期の平均の長さ及び標準偏差を求める方法を報告して以来、この方法が代表的なものとなった。モンテカルロ法とは電子計算機によるモデル実験をすることであり、人為的にパラメーターを設定し、実測値と一致するまで繰返し計算する必要がある。Steel等¹⁹⁾はBarrettの方法を発展させ最適パラメーターを自動的に求める方法を報告しているが、モンテカルロ法は簡便な方法とは言えない。またlabeled mitoses 曲線の数学的解析が多く報告⁴⁾⁵⁾¹³⁾²⁰⁾²¹⁾されているがいずれも複雑である。

*Present adress: First Department of Oral Surgery, Aichi Gakuin University, Chikusa-ku, Nagoya

我々は各期の平均時間及び標準偏差を求める簡便な方法を開発し、吉田肉腫の sub line である LY-1 の labeled mitoses 曲線に適用した。

2. 実験方法

細胞は吉田肉腫の sub line LY-1 腹水癌を、どりゅうラットの腹腔内に移植したものをを用いた。オートラジオグラフはさくら乳剤 NR-M₂ を用い dipping 法によつて行なつた。詳細はすでに報告²⁴⁾ したものと同じであるので省略する。

3. 理論

細胞周期のM期は他の期にくらべ短かいので、他の解析方法³⁾⁶⁾と同様に G₁ 及び G₂ 期に含めた。G₁, S, G₂ 期の時間に対する分布をそれぞれ f₁(t), f_s(t), f₂(t) とする。またそれらの平均値及び標準偏差を T₁, T_s, T₂ 及び σ₁, σ_s, σ₂ とする。labeled mitoses 曲線 H(t) は Barrett³⁾ の示したように、

$$H(t) = H_0(t) - H_1(t) + H_2(t) - H_3(t) + \dots \quad (1)$$

で表わされる。ここで、

$$\left. \begin{aligned} H_0(t) &= \int_0^t f_2(t) dt \\ H_1(t) &= \int_0^t f_2(t') f_s(t-t') dt' \\ &= f_2(t) * f_s(t) \\ H_2(t) &= f_2(t) * f_s(t) * f_1(t) * f_2(t) \\ H_3(t) &= f_2(t) * f_s(t) * f_1(t) * f_2(t) * f_s(t) \end{aligned} \right\} \quad (2)$$

と順次 f₁(t), f_s(t), f₂(t) が加えられていく。* はコンボリューション積分を意味する。f(t) が正規分布をしていると仮定すると、H_i(t), (i = 0, 1, 2, ...) の平均値及び標準偏差は Table 1 のように表わされる。Fig. 1 及び Fig. 2 に平均時間及び標準偏差を規定し、(1)式による計算結果を示した。Fig. 1 は G₁ 期の標準偏差を変えたときの

Table 1. Mean time and standard deviation (SD) of the function in the equation (1).

	mean	SD
H ₀ (t)	T ₂	σ ₂
H ₁ (t)	T ₂ + T _s	$\sqrt{\sigma_2^2 + \sigma_s^2}$
H ₂ (t)	2T ₂ + T _s + T ₁	$\sqrt{2\sigma_2^2 + \sigma_s^2 + \sigma_1^2}$
H ₃ (t)	2T ₂ + 2T _s + T ₁	$\sqrt{2\sigma_2^2 + 2\sigma_s^2 + \sigma_1^2}$

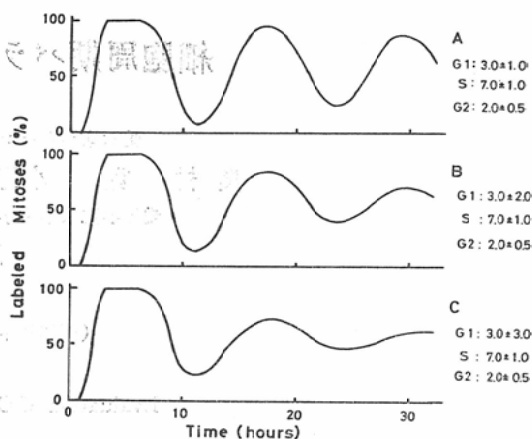


Fig. 1. Calculated labeled mitoses curves (1). Standard deviation of G₁ duration was changed.

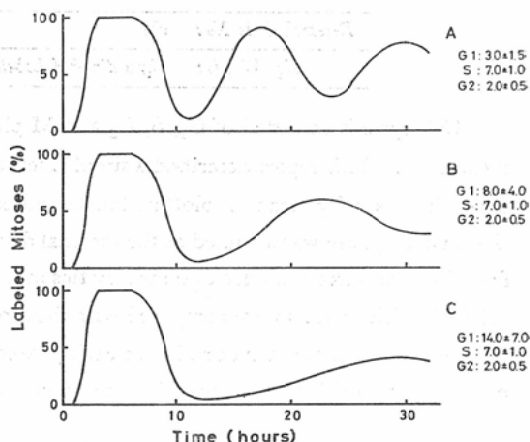


Fig. 2. Calculated labeled mitoses curves (2). Mean and standard deviation of G₁ duration were changed.

labeled mitoses 曲線の変化を示した。Fig. 2 に G₁ 期の平均時間及び標準偏差が大きくなる時の変化を示した。同一の G₁ 期の平均時間でも標準偏差が大きくなるに従い第2の山はなめらかになり、また G₁ 期の長さが大きくなるに従い第2の山が認められなることがわかる。

4. 各期の平均時間及び標準偏差の算出

実験によつて、得られた標識分裂細胞の割合を正規確率紙 (probit paper) にプロットする (Fig. 3). 次に実験値に合わせて第1の山の登り、下り及び第2の山の登りを直線で引く。各直線は

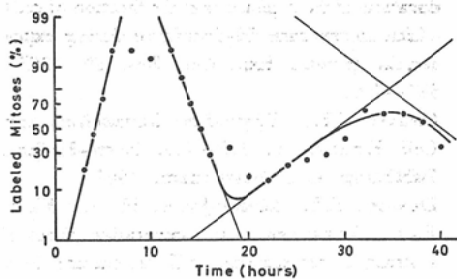


Fig. 3. Labeled mitoses data of LY-1 cell plotted on probit paper. Thin lines were drawn according to the data and bold curves were composition of the lines.

Table 2. Parameters of cell cycle.

phase	mean	SD
G ₁	9.8 hr	5.9 hr
S	10.8	1.4
G ₂	4.2	1.1

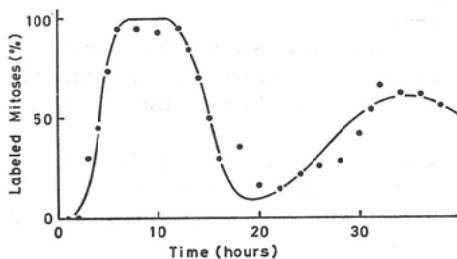


Fig. 4. Labeled mitoses curve plotted on linear scale. Curve is from Fig. 3.

$H_0(t)$, $H_1(t)$ 及び $H_2(t)$ を示す。それらの直線と 50%ラインと交差する時間及び傾斜 (16%から50%または50%から80%に到る時間) が Table 1 に示した平均値及び標準偏差を示す。 $H_0(t)$, $H_1(t)$, $H_2(t)$ の平均値及び標準偏差が定まれば T_1 , T_2 , T_3 及び σ_1 , σ_2 , σ_3 が算出できる。また各値が定まれば Table 1 より $H_4(t)$ も定まる。Fig. 3 に $H_4(t)$ を直線に加えた。また各直線を合成した $H(t)$ を太い線で示した。算出したパラメーターの値は Table 2 にまとめた。Fig. 4 は Fig. 3 を linear scale に書き直したものである。実測値を黒丸で、理論的に求めた値を曲線で示し、両者を比較した。

5. 考 察

細胞周期をトリチウム—サイミジンを用いて測定する実験方法ではトリチウムの細胞に及ぼす作用、ラジオオートグラフの検出能、それらが原因となる実験の再現性等避けられない問題がある。従つて labeled mitoses 曲線から細胞周期パラメーターを求めることは必然的にある程度の誤差が含まれることになる。labeled mitoses 曲線について詳細な解析をしても⁴⁾⁵⁾¹³⁾²⁰⁾²¹⁾、このような実験の精度から考え、必ずしも有効であるとは言えない。

Barrett⁹⁾ が報告した Monte Carlo 法による細胞周期パラメーターの解析は次の仮定に基づいている。(1) 各期の長さは他の期と独立している。(2) 各期の長さの分布は対数正規分布をしている。しかし、各期の長さは他の期と独立しておらず逆相関にあることも報告⁷⁾¹⁰⁾¹⁶⁾ されている。また各期の長さは必ずしも対数正規分布であるとは言えず⁷⁾⁸⁾¹¹⁾¹⁶⁾、対数正規分布は近似であるとは言えない。

各期の長さの相関性については、まだ詳細なデータが求められていないので、現在計算の中に組み入れることはできない。各期の長さが一定の分散を伴つて変動することは細胞内の代謝過程の時間に変動があることを意味する。各期の代謝過程に必要な最低時間は生化学的に決められており、制御機構による時間的変動と考えられる。従つて各期の長さの変動は平均値より小さい方向より大きい方向に傾きやすく、正規分布より対数正規分布の方がより適切であるという考えが生ずる。また Siskin ら¹⁶⁾ は S 期は正規分布をするが G_1 , G_2 及び細胞周期は時間を逆数にとつたときに正規分布をするとして報告しており、対数正規分布が勝れているとは一般的に言えない。

以上に述べた各期の長さの相関性及び実験の精度から考えて正規分布でも十分近似として受け入れられる可能性がある。近似として正規分布として解析する場合には数学的にはるかに簡便になる。そこで対数正規分布で近似した Barrett の結果と正規分布で近似したこの論文の方法の結果と

比較すると、各期の平均値及び標準偏差ならびに理論的な labeled mitoses 曲線にはほとんど差がなかった。この比較については別に報告する。従って正規分布に近似し、理論を展開したこの細胞周期パラメーターの解析方法が Monte Carlo 法より有効であると考えられる。

6. 結 論

細胞周期のパラメーター、すなわち G_1 , S , G_2 期の平均時間及び標準偏差を求める新しい方法を追求した。この方法は各期の時間の分布を近似的に正規分布であると考え、正規確率紙より、各パラメーターを算定するものである。吉田肉腫の sub line LY-1 の腹水癌のトリチウム—サイミジンによる labeled mitoses 曲線を作製し、この方法によりパラメーターを求めた。各期の平均時間及び標準偏差は $G_1 = 9.8 \pm 5.9$ (hr), $S = 10.8 \pm 1.4$ (hr), $G_2 = 4.2 \pm 1.1$ (hr) であった。各期の長さの分布が対数正規分布であると仮定した Monte Carlo 法と比較したところ、各パラメーター及び計算による labeled mitoses 曲線には差がなかった。従ってこの方法は従来の方法より、より簡単な点から十分有効であると考えられる。

この論文をまとめるにあたり有益な討論をして下さった森田敏照博士に感謝します。本研究は文部省科学研究費の援助によって行われた。

文 献

- 1) Baserga, R.: The relationship of the cell cycle to tumor growth and control of cell division: A review. *Cancer Research* 25 (1956), 581—595.
- 2) Baserga, R.: Biochemistry of the cell cycle: A review. *Cell Tissue Kinet.* 1 (1968), 167—191.
- 3) Barrett, J.C.: A mathematical model of the mitotic cycle and its application to the interpretation of percentage labeled mitoses data. *J. Nat. Cancer Inst.* 37 (1966), 443—450.
- 4) Barrett, J.C.: Optimized parameters for the mitotic cycle. *Cell Tissue Kinet.* 3 (1970), 349—353.
- 5) Bronk, B.V., Dienes, G.J., and Paskin, A.: The stochastic theory of cell population. *Biophys. J.* 8 (1968), 1353—1398.
- 6) Cleaver, J.E.: The relationship between the

duration of the S phase and the fraction of cells which incorporate ^3H -thymidine during exponential growth. *Exp. Cell Res.* 39 (1965), 697—700.

- 7) Cleaver, J.E.: *Thymidine Metabolism and Cell Kinetics.* p. 112—115. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1967.
- 8) Dawson, K.B., Madoc-Jones, H. and Field, E.O.: Variations in the generation times of a strain of rat sarcoma cells in culture. *Exp. Cell Res.* 38 (1965), 75—84.
- 9) Hahn, G.M.: State vector description of the proliferation of mammalian cells in tissue culture. I. Exponential growth. *Biophys. J.* 6 (1966), 257—290.
- 10) Killander, D. and Zetterberg, A.: A quantitative cytochemical investigation of the relationship between cell mass and initiation of DNA synthesis in mouse fibroblast in vitro. *Exp. Cell Res.* 40 (1965), 12—20.
- 11) Kubitschek, H.E.: Normal distribution of cell generation rate. *Exp. Cell Res.* 26 (1962), 439—450.
- 12) Lamerton, L.F.: Radiation biology and cell population kinetics. *Phys. Med. Biol.* 13 (1968), 1—14.
- 13) Lipkin, M. and Deschner, E.: Comparative analysis of cell renewal in the gastrointestinal tract of newborn hamster. *Exp. Cell Res.* 49 (1968), 1—12.
- 14) Peterson, D.F., and Anderson, E.C.: Quantity production of synchronized mammalian cells in suspension culture. *Nature* 203 (1964), 642—643.
- 15) Quastler, Q. and Sherman, F.G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* 17 (1959), 420—438.
- 16) Siskin, J.E. and Morasca, L.: Intrapopulation kinetics of the mitotic cycle. *J. Cell Biol.* 25 (1965), 179—189.
- 17) Siskin, J.E. and Kinosita, R.: Variations in the mitotic cycle in vitro. *Exp. Cell Res.* 22 (1961), 521—525.
- 18) Stanners, C.P. and Till, J.E.: DNA synthesis in individual L-strain mouse cells. *Biochim. Biophys. Acta* 37 (1960), 406—419.
- 19) Steel, G.G. and Hanes, S.: The technique of labeled mitoses: Analysis by automatic curve fitting. *Cell Tissue Kinet.* 4 (1971), 93—105.
- 20) Takahashi, M.: Theoretical basis for cell analysis. I. Labeled mitosis wave method. *J. Theoret. Biol.* 13 (1966), 202—211.

- 21) Takahashi, M.: Theoretical basis for cell cycle analysis. II. Further studies on labeled mitosis curve method. *J. Theoret. Biol.* 18 (1968), 195—209.
- 22) Terashima, T. and Tolmach, L.J.: Variation in survival responses of HeLa cells to X-irradiation during the division cycle. *Biophys. J.* 3 (1963) 11—33.
- 23) Tibaux, G., Firket, H. and Hopper, A.F.:

A simple computer simulation model for growing cell populations: Analysis of synchronized HeLa cell cultures. *Cell Tissue Kinet.* 2 (1969), 333—345.
- 24) 松沢大樹, 畠山正: in vivo に於けるトリチウム標識化合物マイクロオートラジオグラフの精度. 第2報, 世代時間と分裂期の長さの信頼限界について. *日医放会誌*, 27 (1967), 112—116.