The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	in vitro 培養細胞の増殖能に対するX線の効果と細胞濃度との関係
Author(s)	増田, 康治
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1968, 28(5), p. 579-582
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16917
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

in vitro 培養細胞の増殖能に対するX線の効果と細胞濃度との関係

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42年12月9日受付）

The Effect of Plated Cell Numbers on the Surviving Fraction 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

Using a single cell culture method, the effect of the number of plated cells on the survival of X-irradiated HeLa S3 cells was studied.

By increasing the number of plated cells in a petri dish by a factor of three, a two-third reduction in the surviving fraction of cells was achieved at several dose levels. Concerning plating efficiency, no statistically significant decrease in growth was observed with an increase in plated cell numbers.

Replacement of growth media seven days postincubation did not alter the decrease in the surviving fraction of groups containing larger numbers of cells.

It is therefore concluded that the surviving postirradiation fraction with cell reproductive capacity decreases, not only with increasing dose, but with increasing cell numbers, as well.

緒　言

Puck ら[5)6)]によつて哺乳動物細胞の in vitro 培養法が確立されて以来，多くの研究者が，線量効果の解析にこの定量的取り扱いをとり入れ，線量効果関係の数学的解析から，放射線の生物作用の機構を解明する努力をしてきたが，これらの研究においては，放射線の影響は細胞の吸収線量にのみ依存し，細胞の生存率は確率的に決定されるものであるとの前提に立つている．つまり移植細胞数の多少にかかわらず，生存率は同一吸収線量に対して一定であると考えられている．

Elkind and Sutton[3)] は生存率曲線は細胞濃度の影響を受けないことを報告した．その後細胞濃度と生存率との関係が検討され，400R以下の少線量でも，各線量毎に細胞数を同一にした時と，線量の増加と共にシヤーレ当りの細胞数を増した場合とでは生存率曲線が異なり，後者の場合生存率が低下するとの報告[2)]や，10^{-5}程度の生存率を来たす線量（1400rad）で細胞数を10倍にすると生存率が低下するとの報告[1)]がある．一方 Sinclair[7)] はChinese hamster cell を用いて，各線量毎に細胞数を同一とした場合と，線量の増加に伴つてシヤーレ当りの細胞数を増した場合とで生存率曲線は全く変らないことを報告しており，in vitro 培養細胞の増殖能に対する放射線の効果と細胞濃度との関係について一定した知見は得られていない．

もし照射された細胞の生存率が移植細胞数に影響されるとすれば，生存率曲線から，細胞の放

射線感受性の比較，防護効果の有無，RBEの算出，あるいは放射線作用機構の解析等を行うに際しては慎重を要する．

以下において，少線量，少細胞数偏差において，生存率が細胞濃度に影響されるか否かを検討した．

材料及び方法

1．材料

細胞はHeLa S3を用いた．角型培養瓶中で37℃で継代培養し，実験に供する材料は2乃至3日間単層培養した対数増殖期にあるものを常用した．

培養液は80％ Eagle 基礎培養液と20％血清とに1ml 当り50単位のペニシリンと50μg のストレプトマイシンとを添加したものを常用した．血清は継代培養には成牛血清を，実験に仔牛血清を，共に56℃で30分間非働化して用いた．

トリプシン消化には Ca^{++}, Mg^{++} を含まぬ緩衝塩類溶液[4]で作製した 0.1％トリプシン液を用いた．

2．細胞の処理

照射前：培養液をとり除き，トリプシン液で2度静かに洗浄の後，大部分の細胞が球形になり相互連絡を失う迄，37℃のフラン器内に静置し，トリプシン消化をした．トリプシン消化後，ほぼ同量の培養液を加えて，静かに数回のピペット操作をして細胞塊をほぐした．

血球計算板で細胞濃度を算定し，培養液で稀釈し，所定の濃度の単離細胞浮遊液を得た．この細胞濃度算定に際して，95％以上の細胞が単離であることも確かめた．

あらかじめ5ml の培養液を入れた組織培養用ガラスシヤーレ（60mmφ）に必要な細胞数ずつ，つまり各線量群毎にほぼ 100個の生存細胞由来コロニーが得られるような細胞数と，これと比較するために高濃度群として3倍の細胞数とを移植した．シヤーレは一測定点当り4枚ずつ使用した．移植後4乃至5時間目に37℃の空中で照射した．

照射後：微炭酸培養器中（37℃）で14日間培養後，固定，染色し，コロニー当り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みなして計数した．培養液は培養期間中一般には交換しなかつた．

次に移植細胞数を変えることによつておこる可能性のある他の現象，すなわち移植率やコロニー成長度の変動，又培養液交換の効果についても検討を加え，本実験の結果を批判する材料とした．

コロニーの大きさは顕微鏡を用いて測定し，その長径をもつて表示した．培養液交換の生存率等におよぼす効果をみるためには，培養7日目に培養液を駒込ピペットで静かに，出来るだけ完全にとり除き，直ちに新しい培養液を加える操作を行つた．

3．照射

倍電圧平滑整流のX線250kVp 5mA, Al 1.0mm濾過板，HVL1.45mmCu，焦点細胞間距離45cm，線量率44.4R/min．レントゲン→ラド換算には培養容器のガラスによる電子密度の増加を考慮し，この実験では上記の線質に対して係数1.37を用いた．線量は鉄化学線量計で較正した線量率計（島津製）で測定した．

結　果

1．細胞濃度の生存率におよぼす影響

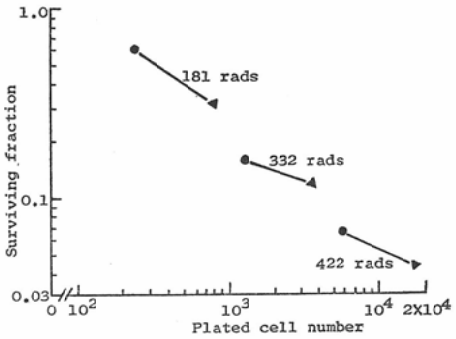
得られた結果の一例を表1に示す．すなわち，181rad，332rad，422rad の3群ともに，移植細

Table 1. Effect of plated cell numbers on surviving fractions of X-irradiated HeLa S3 cells, by dose.

dose (rads)	plated cell number per dish	survival colony number per dish	mean	survival (%)
181	242 726	47, 60, 70, 64 149, 129, 136, 106	60 130	59.4 42.9
332	1210 3630	77, 88, 73, 75, 68 192, 189, 180, 166, 163	76 178	15.0 11.7
422	6040 18120	199, 154, 160, 140 311, 312, *, *	163 312	6.47 4.12

*: The number of colonies could not be counted, because some of colonies were superimposed.
Plating efficiency =42%.

Fig. 1 Effect of plated cell number on surviving fracton of HeLa S3 cells, by X-ray dose



● : Sufficient number of plated cells to maintain approximately 100 colonies at each dose level.

▲ : Number of plated cells 3 times that of (●).

Table 2. Effect of plated cell numbers on plating efficiency

plated cell number per dish	mean colony number per dish	plating eff. ± S. D.
Glass dish		
108	105.5	97.5± 5.1%
324	280.0	86.5± 3.8
Polystyrene dish		
108	100.8	93.5± 2.2
324	301.3	93.0± 5.1

胞数が多い程，同一照射線量に対して生存率が低く，細胞数が3倍になることによつて生存率は0.6～0.8倍に低下する．この結果を図示したのが図1である．但し基準濃度の細胞数として，生存細胞由来コロニーがほぼ100個出来るような数を選んだが，出来たコロニー数には約50%の増減を生じた．

2．移植細胞数の細胞移植率におよぼす影響

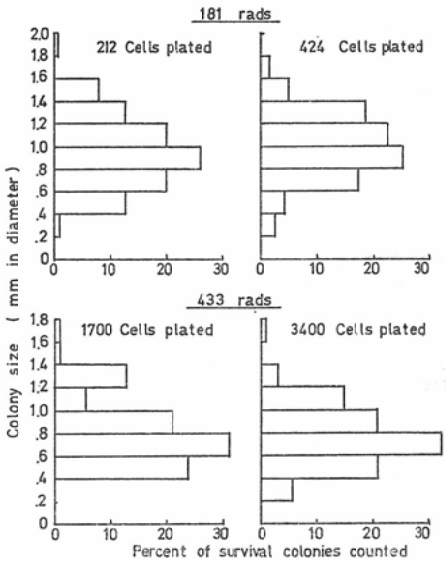
移植細胞数のちがいによつて生存率が変るのは放射線照射の影響としてではなく，細胞移植率の差のあらわれであるのかどうかを検討した結果が表2である．

移植細胞数の細胞移植率におよぼす影響は，細胞移植率が移植細胞数の多い方で低い傾向にあつたが，統計的には有意差はなかつた．

3．移植細胞数のコロニー成長におよぼす影響

図2は，181rad 照射群と433rad 照射群とについて，移植細胞数を2倍にすることによつてみ

Fig. 2 Effect of plated cell number on surviving colony size and distribution of irradiated cells 14 days after plating.



られる培養14日目の生存細胞由来コロニーの大きさの分布を図示したものである．

コロニーの大きさは照射線量の大きい程小さい方に移行するが，181rad 照射群も433rad 照射群も共に移植細胞数は生存細胞由来コロニーの大きさに影響をおよぼさない．

4．培養液交換の影響

表3に示すように非照射群，被照射群共に培養7日目に培養液を交換しても生存細胞由来コロニー数に変動はなく，又移植細胞数の多い群で，その培養液を交換しても生存率の上昇はみられない．このことは，培養液交換を行つても，移植細胞数の生存率におよぼす影響は変らないことを示す．

Table 3. Effect of plated cell numbers on survival, by new media

	plated cell number per dish	medium replacement	survival (%)
non-irradiated	212	(−)	27.5 *
	212	(+)	26.8 *
irradiated (181 rads)	212	(−)	49.5
	212	(+)	52.1
	424	(+)	34.1

+ : media renewed 7 days after plating.

− : medianot renewed.

* : plating efficiency.

考　案

以上の結果を総括すると，in vitro 培養 HeLa S3 細胞の増殖能をもつて放射線照射効果の判定基準とするとき，細胞の生存率は照射線量の増加に伴つて低下するだけでなく，同一線量でも移植細胞数に影響を受けて，移植細胞数の多い程生存率が低下する．

この照射後の生存率が移植細胞数によつて変化をうける理由としては，1) 移植細胞数が多くなると細胞移植率が低下し，その結果一見照射による生存率が低下した如き結果を示す，2) 移植細胞数が増すことによつて，培養液中の細胞1個当りの必須物質の量が少なくなり，その結果コロニー形成能からみた生存率が低下する，3) 移植細胞数が多くなるとコロニーが重なり合い，コロニー数計数時に数えおとす，等のことが考えられる．

移植細胞数の細胞移植率におよぼす影響については表2に示すように，移植細胞数が3倍の群でも統計的には有意の差はみられず，実数として約10%の低下がみられるとしても，表1に示す照射による生存率の低下 0.6～0.8倍は説明出来ない．

生存細胞由来のコロニーの大きさは，主として分裂時間の延長，分裂遅延等によつて影響される．従つて生存率が移植細胞数に影響を受ける原因として，移植細胞数の増加によつて細胞1個当りの必須物質の量が相対的に少なくなり，その結果細胞増殖の抑制，あるいは回復の抑制がおこるということが考えられるが，このことは図2に示されるように，移植細胞数を増してもコロニーの大きさが変らないことから否定的である．この点に関しては表3に示すように培養液交換をしても生存率が変らないことからも裏付けされる．

又，この実験で用いられた直径60㎜のシャーレでは，シャーレ当りのコロニー数が約300をこえるようになると，隣接コロニーが重なりあつてくるために，コロニー数は生存細胞数より少なく算定される可能性があるが，この実験で得られたコロニー数は422rad の3倍濃度群以外は，シャーレ当り平均50～200と少ないので，コロニー数の数えおとしはなかつたと考えられる．

Bender and Gooch[2] は分裂不能になつた細胞が生存細胞に直接損傷を与える，あるいは毒性物質を産出するのではないかとのべている．しかし照射された細胞は細胞移植率に影響を与えないし[3]，生存率にも影響しない[7]ことから首肯しにくい．

HeLa 細胞を用いた実験では移植細胞数が生存率に影響をおよぼすが，Chinese hamster cell を用いた実験[3)7)]では影響をおよぼさない．このことから，移植細胞数が生存率に影響をおよぼすという現象は，ある種の細胞にのみみられることかもしれない．

培養細胞を用いる線量効果関係の解析に際して，移植細胞数を一定にした実験方法と，生存コロニー数を一定とするような移植細胞数の操作を行う方法と，いずれが適当であるのかは不明であるが，少なくとも生存率の線量効果関係を比較検討する時には，どちらかの方法に統一することが妥当である．又先にのべたような理由によつて，少なくとも細胞の増殖能に対する線量効果関係から，直接的に放射線の作用構機を明らかにしようとする試みは非常な困難を伴うといえる．

結　語

シャーレ当りの移植細胞数は，in vitro 培養細胞，HeLa S3 の増殖能に対する X線の効果に影響をおよぼし，同一線量でも移植細胞数の多い程生存率は低下する．

（稿を終るに臨み吉永春馬教授の御指導御校閲を深く感謝致します．）

文　献

1) Bedford, J.B., and Hall, E.J.: Nature 209 (1966), 1363.
2) Bender, M.A., and Gooch, P.C.: Int. J. Rad. Biol. 5 (1962), 133—145.
3) Elkind, M.M., and Sutton, H.: Radiation Research 13 (1960), 556—593.
4) Merchant, D.J., Kahn, R.H., and Murphy, W.H.: Handbook of cell and organ culture, 2nd edition, p. 240. Burgess Publishing Company, U.S.A. 1964.
5) Puck, T.T., Morkovin, D., Marcus, P.I., and Cieciura, S.J.: J. exp. Med. 106 (1957), 485—500.
6) Puck, T.T., and Marcus, P.I.: J. exp. Med. 103 (1956), 653—666.
7) Sinclair, W.K.: Radiation Research 21 (1964), 584—611.