

Title	in vitro培養細胞HeLa S3の線量効果関係におよぼす培養液交換の意義
Author(s)	増田, 康治
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1968, 28(9), p. 1252-1255
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16954
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

in vitro 培養細胞 HeLa S3 の線量効果関係に およぼす培養液交換の意義

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2月17日受付)

Effect of Medium Replacement on Surviving Fraction and Clonal Growth of X-Irradiated HeLa S3 Cells

By

Kouji Masuda

Department of Experimental Radiology (Director: Prof. H. Yoshinaga)

Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka

Effects of replacement of medium on the surviving fraction of X-irradiated HeLa S3 cells cultured in vitro were studied by the single cell culture method.

Eagle minimum essential medium (1959), supplemented with 20 per cent calf serum was subjected to various doses of X-irradiation, in air. Medium was replaced seven days after irradiation.

The dose response curve exhibited an extrapolation number (N) of 1.9 and 37 per cent dose-slope (D_0) of 90 rads. It was not altered by replacement of the growth medium. For surviving colonies, medium replacement induced clonal growth; it did not alter the cell number per abortive colony or abortive colony number per dish.

X-irradiated (less than 10_4R) Eagle MEM supplemented with 20 per cent calf serum did not affect the cell-plating efficiency of HeLa S3 cells.

緒 言

X線照射された細胞の増殖能に関する障害には、細胞個々における吸収線量の大小によつて回復不可能な程度の障害と可能な程度のものがあることは、分割照射法によつて明らかで⁴⁾、回復可能な障害は照射中にも回復するために、一回照射した時より二分割照射した時に、又高線量率で照射した時より、低線量率で照射した時に障害が少ない⁵⁾⁶⁾。又その回復可能な程度の障害は照射後第1回目の細胞分裂が始まる迄に完全に回復する⁴⁾。

ところで Berry¹⁾ は哺乳動物細胞 HeLa S3 を X, γ 線照射して、1000 rad 以上 (生存率 10^{-3} 以下) の線量を受けた細胞の生存率は、照射後7日

目に新鮮な培養液と交換することによつて上昇することを報告した。それによると、培養液交換によつて非照射群の細胞移植率には差がみられないが、1600 rad ($^{60}Co-\gamma$ 線) 照射された細胞の生存率は培養液交換によつて約6倍に上昇する。あらかじめ照射された培養液との交換では3倍に上昇する。つまり回復可能な障害が培養7日目にも残っており、その回復を促進させるべき培養液中の物質が、X線照射によつて減少することを示している。この回復可能な障害が照射後7日目になを残っており、それが培養液の交換によつて回復するということは放射線の作用機構を考える上に重要な意味を持つている。

この実験では、Berry の報告を追試し、更に培

養液交換が細胞増殖におよぼす効果について、生存細胞由来コロニーの大きさと、abortive コロニー（分裂し続ける能力のないコロニー）の大きさを指標として観察した。

材料および方法

子宮頸部癌由来培養細胞 HeLa S3を Puckら¹⁰⁾の単離細胞培養法に準じて培養した。詳細は他にゆずる⁷⁾⁸⁾。

培養液は 80% Eagle 基礎培養液と20%牛血清とに 1ml 当り50単位ペニシリンと 50 μg 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、実験には仔牛血清を非働化して用いた。

0.1%トリプシン液で消化した後、ほぼ同量の培養液を加えて静かにピペット操作をした。

血球計算板で細胞濃度を算定して、あらかじめ 5 ml の培養液を入れた組織培養用ガラスシャーレ（直径60mm）に細胞を移植し、4~5時間微炭酸培養器中に静置してからX線照射した。

14日間培養の後、固定、染色しコロニー当り50コ以上の細胞から成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。

培養液交換は培養7日目に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て行つた。

生存細胞由来のコロニーの大きさは顕微鏡を用いてその長径を測定し、abortive コロニー（コロニー当りの細胞数が50個未満のコロニー）の大きさはコロニー当りの細胞数で表示した。

照射された培養液の細胞移植率におよぼす効果をみるために、細胞移植の6時間前にX線照射した培養液を用いた。

シャーレは一測定点当り4枚ずつ使用した。

照射方法：倍電圧平滑整流X線発生装置。180 kVp, 20mA, Al 1.0mm濾過, HVL 0.35mmCu, 線量率 93.2rad/分。焦点細胞間距離 75cm, 室温 (24°C) の空气中で照射した。照射された細胞の R→rad 換算係数はシャーレ表面からの散乱を考慮して1.22⁷⁾を用いた。

結果

1. 培養液交換の生存率におよぼす影響
照射後7日目に新鮮な培養液と交換したとき

と、交換しないときの生存率の結果を表1、および図1に示す。培養液交換群と非交換群とを比較すると、細胞移植率は34.6±3.65%と38.5±2.66%とで統計的には有意差はなく、生存率も、実験した線量の範囲では全く差がみられない。生存率曲線は共に片対数グラフ上で、初め肩をもち、線量の増加と共に直線に近づくいわゆる多標的説に基いて説明される曲線である。

Fig. 1. Dose response curve of X-irradiated HeLa S3 cells.

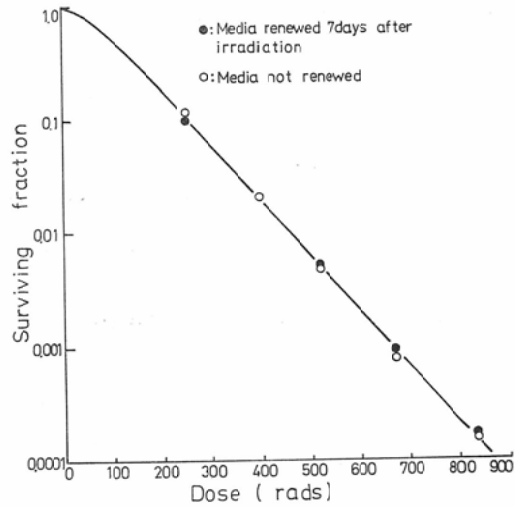


Table 1 Effect of media replacement on survival ratio, by dose.

dose (rads)	survival ratio ± SE	
	control	media replaced
0 (plating eff.)	38.5 ± 2.66%	34.6 ± 3.65%
257	9.71 ± 3.81	11.1 ± 0.92
398		1.93 ± 0.133
526	0.537 ± 0.051	0.487 ± 0.066
675	0.0925 ± 0.0094	0.0743 ± 0.0124
835	0.0157 ± 0.0025	0.0170 ± 0.0041

外挿数1.9, D₃₇ (片対数グラフに示された線量効果曲線の直線部分に相当する線量部分で生存率を37%に低下させるに必要な線量)は90 rad である。

2. 生存細胞由来コロニーの幾何学的大きさにおよぼす培養液交換の影響

Table 2 Effect of media replacement on survival colony size and percent of abortive colonies per dish, by dose.

media replacement		counted colonies	% aborted colonies	survival colony size (mm)	
non-irradiated	(-)	249	6.4	1.09 ± 0.25	
	(+)	313	8.6	1.15 ± 0.32	
irradiated	188 rads	(-)	24	0.86 ± 0.30	
		(+)	201	26	0.94 ± 0.30
	433 rads	(-)	302	62	0.71 ± 0.26
		(+)	185	63	0.83 ± 0.29

(-) : media not replaced. (+) : media replaced 7 days after irradiation.

単離された細胞の増殖におよぼす培養液交換の影響をみる指標として、生存細胞由来コロニーの長径を測定し、図2および表2に示した。非照射群、照射群ともに、コロニーの大きさのヒストグラムでのモードは培養液交換によつても変わらない。平均コロニーサイズは、各線量群共に、培養液の交換によつて統計的に有意な差はみられないが、大きくなる傾向にある。

3. abortive コロニーの大きさにおよぼす培養液交換の影響

表2, および図3に示すように照射線量の増大

Fig. 2. Distribution of sizes of surviving colonies of X-irradiated HeLa S3 cells, by dose.

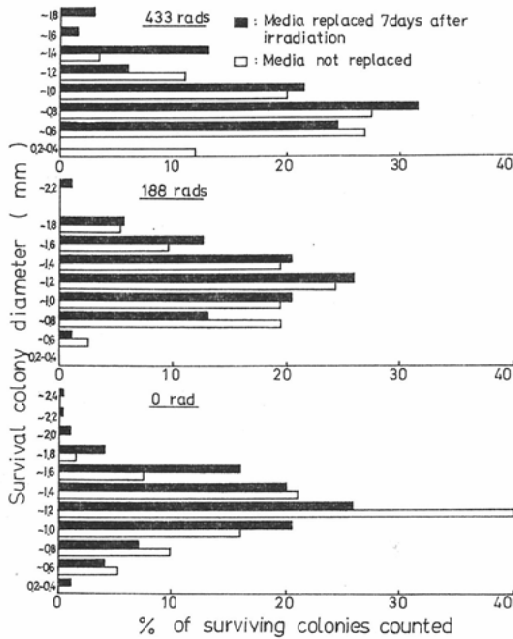
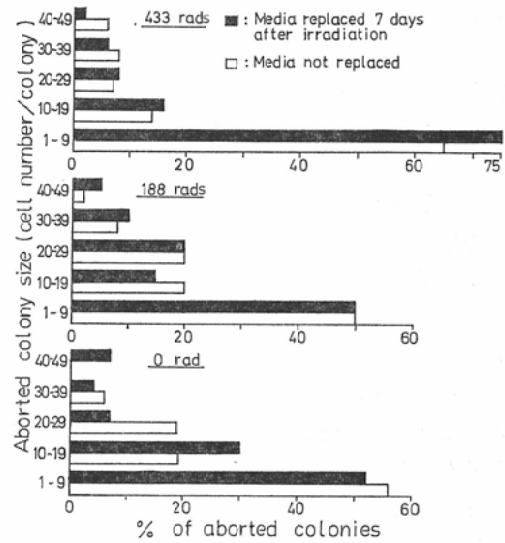


Fig. 3. Distribution of sizes of aborted colonies of X-irradiated HeLa S3 cells, by dose.



に伴つて培養14日目にみられるシャーレ当りの abortive コロニーの頻度は多くなり、その大きさの分布は小さい方に移行する。これらの傾向は培養液交換によつては影響を受けない。

Table 3 Plating efficiency of inoculated HeLa S3 in irradiated media.

dose (R)	colony number/dish	plating efficiency ± SE
0	132.2	69.6 ± 1.4
100	127.3	67.0 ± 1.2
1000	129.0	67.9 ± 1.3
10000	137.8	72.5 ± 3.9

190 cells were plated in all dishes.

4. 照射された培養液の細胞移植率におよぼす影響

表3に示すように照射された培養液は 10^4 R以下の線量範囲では細胞移植率に影響を与えない。

考 察

Berryらは前述のごとく1300rad以上照射した時の生存率は照射後7日目に培養液を交換することによつて上昇することを報告したが、80% Eagle基礎培養液と20%仔牛血清とからなる培養液を用いたところ、X線照射された細胞の生存率は、7日後に培養液を交換しても変らなかつた。

なを大線量照射された培養液は細胞に毒性を示すが²⁾³⁾⁹⁾細胞の移植率は 10^4 R照射された培養液と非照射培養液とでは有意差はみられない(表3)。このことから 10^3 R程度照射された培養液中には細胞増殖に影響をおよぼす程の毒性物質は生じていないと考えられる。

生存細胞由来コロニーの幾何学的大きさは培養液の交換によつて大きくなる。このことは、80% Eagle基礎培養液と20%仔牛血清とで培養されたHeLa S3細胞は5~13時間の増殖誘導期の後分裂を始め、4~7日間は分裂時間23~25時間で対数増殖し、その後増殖率が低下する⁸⁾が、培養液交換によつて再び盛んに増殖することからも首肯出来る。

abortiveコロニーのシャーレ当りの頻度と、コロニー当りの細胞数の分布は培養液を交換した群としない群との間で差がなく、培養液交換によつてはabortiveコロニーのコロニー当りの細胞数は生存細胞由来コロニーと異なつて増加しないと考えられる。このことは又コロニーの判定基準(コロニー当りの細胞数が50個以上の時、それを1個の生存細胞に由来したコロニーとし、未満の時それをabortiveコロニーとする)の妥当性を示唆している。

80% Eagle基礎培養液と20%仔牛血清、HeLa S3細胞を用いたこの実験によると培養7日目に培養液を交換しても、X線照射された細胞の生存率は変わらず、“unhappy cell¹⁾”(増殖能におよぼされたX線の障害は回復可能な程度のものであるが、培養液が不良であるために回復出来ないでい

る細胞)の心配はないといえる。つまり細胞の増殖能におよぼすX線の障害は照射後少なくとも次の細胞分裂が始まる迄にはその一部は回復可能である⁴⁾が、照射7日後に培養液を交換することによつて回復可能となる障害はない、あるいは障害は残つているが、Eagle基礎培養液中では回復不可能であるかもしれない。いずれにせよEagle基礎培養液、HeLa S3細胞、X線を用いた実験では培養途中(7日目)に培養液を交換する必要はない。

結 語

20%の仔牛血清を添加したEagle基礎培養液に培養されたHeLa S3細胞の増殖能におよぼすX線の効果を、培養14日目のコロニー形成能からみた。線量効果曲線の外挿数は1.9、 D_{37} は90radである。

培養7日目に新しい培養液と交換したが生存率は変らなかつた。培養液交換によつて生存細胞由来コロニーのコロニー当りの細胞数は増加するが、abortiveコロニーは、シャーレ当りのその頻度においても、コロニー当りの細胞数においても、共に変らない。

10^4 R以下で照射された培養液はHeLa S3細胞の細胞移植率に影響をおよぼさない。

文 献

- 1) Berry, R.J.: Brit. J. Radiol. 37 (1964), 948—951.
- 2) Garcia, J., Ervin, F.R. and Koelling, R.A.: Nature 213 (1967), 682—683.
- 3) Cook, A.M. and Berry, R.J.: Nature 210 (1966), 324.
- 4) Elkind, M.M. and Sutton, H.: Radiation Research 13 (1960), 556—593.
- 5) Gray, L.H. and Scholes, M.E.: Brit. J. Radiol. 24 (1951), 285—291.
- 6) Hall, E.J. and Bedford, J.: Radiation Research 22 (1964), 305—315.
- 7) Masuda, K.: Nipp. Act. Radiol. 28 (1968), 98—101.
- 8) Masuda, K.: (unpublished data).
- 9) Pollard, E.C., Ebert, M.J., Miller, C., Kolacz, K. and Barone, T.F.: Science 147 (1965), 1045.
- 10) Puck, T.T. and Marcus, P.I.: J. exp. Med. 103 (1956), 653—666.