



Title	培養細胞 Culb TC の分裂系図とガンマ線作用の映画法による分析
Author(s)	栗冠, 正利; 勝田, 甫; 高岡, 聡子
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1971, 31(5), p. 550-554
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17572
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

培養細胞 Culb TC の分裂系図とガンマ線作用の映画法による分析

東北大学医学部

栗 冠 正 利

東京大学医科学研究所

勝 田 甫 高 岡 聡 子

(昭和46年5月22日受付)

Construction of pedigrees of cultured hepatoma cells, Culb TC of the rat and the analyses of the effects of gamma rays

by

M. Sakka, Tohoku University School of Medicine, H. Katsuta and T. Takaoka
Institute of Medical Science, University of Tokyo

Research field code	Key Words
400	Cell death, Pedigree analysis, Hepatoma, Cinemicrography

Cinemicrogrammes of 4 NQO-induced hepatoma cells of the rat, Culb TC were recorded every 2 min for 130 h before and after 600 R of a single gamma irradiation. Each cell was followed up and cellular event was indicated in a pedigree. In control pedigrees, mean of the first generation time was 1810 min with a variance of 620^2 min for a sample size of 68. The second and the third generation time was 1992 and 2272 min, respectively with variance of 588^2 and 964^2 . After single 600 R, about half of total cell death occurred in the first post-irradiation generation and a quarter in interphase and the residual quarter took place in the second post-irradiation generation. It seems very probable that cell death takes place quite at random in each generation, because mean and variance of cell death was 2700 and 1556^2 min in interphase, 2132 and 1644^2 min in the first post-irradiation generation and 1730 and 1702^2 min in the second post-irradiation generation. Cellular events were given in tables and their biological characteristics were tested statistically. Difference in the behaviour of the population in usual kinetical analysis and in pedigree studies were discussed.

細胞再生系の細胞計数研究法では一般に或る時刻に集団から標本を抽出しその特性を記録し、また別の時刻に前とは無関係に別の標本を抽出しその特性を記録、以下同様にして時間ごとの特性変動から集団の挙動を察知することが多い。これとは別に集団中の特定細胞に着目しその挙動を連続的に追跡して増殖系図を描く方法がある。どちら

の方法も一長一短である。本報告の目的は(1)培養がん細胞の挙動を照射後約130時間にわたり顕微鏡映画で記録して分裂系図を合成したこと、(2)系図を分析して世代時間の平均値と分散を実測して示したこと、(3)これらの統計量が照射後どんな変動をうけたかを個々の細胞について示したことである。

材料と方法

細胞は大黒肝細胞の培養を4NQOで処理してがん化しそれを単腹腔に復元接種して生じた腹水肝がんを再培養したものである。

撮影はニコン顕微鏡16ミリ映画撮影装置を用い、10×10倍、毎2分1コマの間隔で撮影し、分析はnacのモーションアナライザを用いた。がん誘発法¹⁾²⁾³⁾、細胞学的研究⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾、映画法⁸⁾⁹⁾などについては勝田、高岡の別報に詳しい。

合成した系図は次の通りに分類した。

- 1 観察の始めから終り迄追跡できたもの。
- 2 始めには細胞があつたが終りには無くなったもの。

2-1 途中で死んだもの、これを記号化してDRとDSで表わした。それぞれHurwitzとTolmach¹⁰⁾¹¹⁾のDrとDsに相当する。

2-2 途中で視野外に去るもの、OUT。

3 始めは視野にないが途中から入り終りまであるもの、IN。

4 始めには視野になくて途中から入り(IN)、やがて視野から去る(OUT)。勿論終りにもない。

或る観察区間における細胞数の変化は次のように分類した。

1 観察の終りの細胞数が始めよりふえた。

1-1 期間中に細胞分裂DIVがおこつた。

1-2 期間中にINがおこつた。

2 終りの細胞数が始めよりへつた。

2-1 期間中にDR又はDSがおこつた。

2-2 期間中にOUTがおこつた。

2-3 期間中2細胞の細胞質癒合Fがおこつた。

2-4 期間中2細胞が接触Cした。輪廓不明となり2コと区別できなくなつた。

成績

I 対照

合計8336分中に観察した全系図は103であつた。分析結果を表1に示した。この表には600R照射後の系図をも併せて示してあるので照射効果の比較をする事ができる。103系図中全期間を通

表1 照射前後の細胞系図

	対照	照射
I 観察時間	8336	8236
II 全系図数*	103	105
III 1回以上分裂した系図	59	51
IV 2回以上分裂系図(IIIの内数)	37	17
V 分裂のない系図	2	5
VI 第1回分裂後、少く共一方が死亡した系図	10	21
VII 第2回分裂後、少く共一方が死亡した系図	6	8
VIII 死亡前に分裂のない系図	4	13
IX はじめにあり途中でOUTとなつた系図	37	28
X IN→OUT系図	17	12
XI 途中でIN、終り迄ある系図	13	0

* III欄以下の和は全系図数に等しくない。同一系図の一方がDIV、他方がOUTとなつたものは各欄に再度挙げてある。IX欄以下は細胞の増減に拘わらず全該当系図をあげた。

じて終始観察できた生存系図(INおよびOUTを除く)を集めそれが全観察期間中に行つた分裂回数の頻度分布を表2に示した。細胞分裂が2回以上観察できた系図から集めた平均世代時間 \bar{Y}_n 、分散(正しくは分散不偏推定量) s_n^2 、および標本の大きさ N_n は次の通りである。但し平均と分散の単位は何れも分、下つき n は世代数で照射世代は0世代と約束する。

$$N_1=68, \bar{Y}_1=1810, s_1^2=620^2$$

$$N_2=51, \bar{Y}_2=1992, s_2^2=588^2$$

表2 完全観察できた生存系図を分裂回数別に示した頻度分布

分裂回数	細胞数	
	対照	照射
0	2	3
1	8	20
2	34	20
3	41	2
4	46	0
F	1	4
全観察時間(分)	8336	8236
系図数	33	61
平均分裂回数	2.9	1.5

表2の2 照射後死亡細胞出現までに行われた細胞分裂

分裂回数	細胞数
0	8
1 + F*	4
1	25
2 + F**	1
2	14

* 1回分裂後Fをおこした系図。

** 2回分裂後Fをおこした系図。共に娘細胞間のFである。

$$N_3 = 27, \bar{Y}_3 = 2272, s_3^2 = 964^2$$

差の検定は推計紙上で順序による実測三角形法²³⁾

を用い $\bar{Y}_1 < \bar{Y}_2$ (差は 3.05 σ), $\bar{Y}_1 < \bar{Y}_3$ (差は 4.80 σ) であつた。第1世代時間の平均値が第2および第3世代値より有意に短いのは培養液交換を行なわなかつたため細胞が密集しない培養の早い時期に自由な増殖が行われたためであらう。

分裂系図を1000分づつの間隔に区切りその間の細胞特性を分類計数して表3に示した。

II 600Rカンマ線照射

培養瓶を室温で照射後10分から撮影を開始した。系図特性は表1に併記し、照射後の細胞特性の分類計数は表4に示した。表3と4を比較すれば照射効果を明らかにすることができる。

照射後に行つた細胞分裂 (Fを含むものを除く) は $N = 25$ で平均世代時間 $Y = 1636$, 分散 $s^2 =$

表3 対照細胞集団の増減特性表

時間区間 (分)	区間始め の細胞数	増加数		減少数				DIV/区間始め の細胞数
		IN	DIV	DS+DR	OUT	F	C	
1—1000	70	8	15	1	15	0	0	0.214
—2000	80	14	28	1	14	1	0	0.350
—3000	105	1	39	4	16	0	1	0.371
—4000	124	4	31	1	13	1	0	0.250
—5000	145	1	46	10	12	0	3	0.276
—6000	163	0	25	6	8	1	9	0.141
—7000	161	0	21	3	5	0	6	0.130
—8000	168	0	9	1	0	0	8	0.054
	1016	28	206	27	95	3	27	0.203*

* * 平均 (206/1016)

表4 600R照射後の細胞集団の増減特性

時間区間 (分)	区間始め の細胞数	増加数		減少数				DIV/区間始め の細胞数
		IN	DIV	DS+DR	OUT	F	C	
1—1000	77	9	15	3	3	1	0	0.195
—2000	94	5	32	8	16	1	0	0.340
—3000	110	4	21	12	10	5	0	0.191
—4000	107	4	8	6	15	1	0	0.075
—5000	96	2	2	11	7	1	1	0.021
—6000	80	0	0	7	7	0	0	0
—7000	65	1	0	8	3	1	1	0
—8000	54	0	0	3	1	0	0	0
	683	25	78	58	62	10	2	0.114*

* 平均 (78/683)

= 540²であつた。

照射から細胞死までの平均時間 $Y = 3754$, $s^2 = 1872^2$, $N = 62$ で範囲は 660 から 8070分におよび、世代時間の頻度分布は2000分までのもの12, 以後4000分まで21, 6000分まで21, 8000分まで7, 8002分以上1でこの分布は正規型にも対数正規型にも適合しなかつた。死亡細胞の統計量は対照の分裂細胞の世代時間に関する統計量とは有意差があり、600 R照射後の細胞死は対照の約2世代分を経過してからおこること、および死亡は極めてバラバラとおこる事が判る。そこで細胞死を照射後の世代別に分類計数する必要が生じた。

第0世代の死亡：死亡前に細胞分裂のおこらなかつた系図（集団動態論では間期死とよぶものに相当）上でおこつた死亡の照射から死亡までの平均時間 $Y = 2700$ 分, $s^2 = 1556^2$ 分, $N = 13$, この死亡は全系図の約13%にあたり全死亡の約 $1/4$ にあたる。

照射後第1世代（照射世代は第0世代と約束する）中に死んだ細胞の統計量は次の通りであつた。照射後死亡迄の平均時間 $Y = 3700$ 分, $s^2 = 1982^2$ 分, $N = 29$. これを照射後第1回分裂から死亡迄の時間に換算すると $Y = 2132$ 分, $s^2 = 1644^2$ 分となつた。この値は全死亡数の約半分、全系図の3割弱に相当する。

照射後第2世代で死んだ細胞の統計量は照射後死亡迄の平均時間 $Y = 4314$ 分, $s^2 = 1592^2$ 分, $N = 14$. これを照射後第2回分裂から死亡迄に換算すると平均 $Y = 1730$ 分, $s^2 = 1702^2$ 分である。この死亡数は全死亡の約 $1/4$ にあたる。

照射後第3世代の死亡は観察できななかつた。

考 察

1. 細胞事象のおこる時間について：系図法を用いた細胞の発育と放射線作用の時間因子の研究は古くから行われていた¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。併し哺乳動物細胞の世代時間を系図分析し個々の細胞について測定した報告は比較的少なく HeLa では Hsu¹⁵⁾, Froese¹⁶⁾, Marin と Bender¹⁷⁾, Hurwitz と Tolmach¹⁰⁾¹¹⁾, 佐々木弘²²⁾, チャイニズハムスタでは Froese¹⁶⁾ と Miltenburger¹⁸⁾¹⁹⁾, また廿日鼠の線維

芽細胞については Thompson と Suit²⁰⁾²¹⁾ があり大黒鼠肝がん細胞に関してはこの報告が初めてである。諸報告に与えてある統計量から判断すると世代時間の分布には正規型 (Froese), 対数正規型 (Hurwitz ら), 2つの分布の合成と考えられるもの (Hsu) などがある。我々の例では正規型も対数正規型も実測と適合しなかつたので対照の世代時間変動の検定に非パラメトリックな手法を用いた点は従来報告にない試みである。その結果、対照世代の変動は大きくはないが有意であつた。

600 R照射後の死亡は間期死が全死亡の約 $1/4$, 第1世代の死が約半分, 第2世代の死が残りの約 $1/4$ で、かつ世代中の死亡のおこり方はバラバラである。これは死亡時間の平均値とその分散が余り大きい差を持たない事で証明できる。この事実から³H-TdR で推定した世代時間（この方法は平均を与えるだけで分散は与えない）に基づいて照射直後の細胞事象を分類する実験法には危険性を含んでいる事を示唆するものと考えられる。

2. 細胞増殖の集団統計量について：ある時刻から次迄の短時間内の1コの細胞の挙動は2コにふえる(1+1), 1コのまま(1+0), 消滅する(1-1)の3通りしかとれない。併し集団の大小に寄与するものは増殖性細胞の分裂(DIVに相当)や死細胞出現(DRとDS)ばかりではない。表1, 3, 4をみると細胞分裂と死以外に集団の増減(腫瘍の生長と退縮に相当)に関する項, IN, OUTその他がある。従来多くの動態論は集団中から独立に標本を抽出して平均的増殖を分析しようとする試みである。ここにのべたのは1コの細胞から出発する系図を加算して集団を合成する動態論(表3と4はその1つの試み)であつてこれから発生した我々の認識を従来集団動態論の術語で記述するに当つてさまざまな困惑を感じないわけにはいかなかつた。例えば細胞死の定義は系図法では追跡中の細胞がDR又はDSを介して視野から消滅する事であるが細胞計数法では別の定義(無限増殖能力の損失, 色素排除能力の有無, 呼吸の停止またはそれらの混用その他)を下す事が多い。腫瘍の生長を表わす値も相続く

分裂の間の直接測定（本報告の主体をなすもの）、腫瘍倍化時間（本報告の表3と4の区間始めの細胞数から計算できる）、コルヒチン処理の分裂像蓄積から推定するもの（本報告では表3、4のD I Vから計算できる）、 $^3\text{H-TdR}$ オートラジオグラフを用いる世代時間の実効値推定（本報告では表2の分裂回数と細胞数の積の和を全細胞数で除した商で時間数を除した値で計算できる）等それぞれ別の意味を持つものがしばしば混用されている。更に最近数年間に導入されつつある新術語潜在倍化時間（Potential Doubling Time）、細胞損失乗数（Cell Loss Factor）、分裂の確率（Probability of Cell Division）などについては次報以後で検討したい。

本研究は主として文部省がん特別研究費によりまたその一部は日本ワックスマン財団の支援によつた事を記して感謝の意を表す。

文 献

- 1) 勝 田, 高 岡: 1968, 第27回日本癌学会総会記事, 95.
- 2) 勝 田, 高 岡: 1969, 第28回同誌, 83.
- 3) 勝 田, 高 岡: 1970, 第29回同誌, 39.
- 4) 勝 田, 高 岡: 1968, 第27回同誌, 92.
- 5) 安 藤, 勝 田: 1968, 同誌, 94.
- 6) 山 田, 寺 崎, 勝 田, 高 岡: 1968, 同誌, 166.
- 7) 同 : 1969, 第28回同誌, 155.
- 8) 勝 田: 1969, 細胞生物物理研究法, 131, 吉岡書店.
- 9) 勝 田: 1968, 化学と生物, 510.
- 10) Hurwitz, C. & L.J. Tolmach: (1969), Biophysical J., 9 607.
- 11) Hurwitz, C. & L.J. Tolmach: (1969), Biophysical J. 9 1131.
- 12) 中 泉, 持 田, 肥 沼: 1935, 日本レントゲン学会雑誌, 13, 182.
- 13) 足 沢: 1937, 同誌, 15, 259.
- 14) 持 田, 足 立: 1938, 同誌, 15, 457.
- 15) Hsu, T.C.: Texas Reports on Biology and Medicine, (1960), 18 31.
- 16) Froese, G.: Int. J. Rad. Biol., (1966), 10 353.
- 17) Marin, G. & M.A. Bender: (1966), Exp. Cell Res., 43 413.
- 18) Miltenburger, H.G.: Strahlentherapie, (1969), 138 429.
- 19) Miltenburger, H.G.: Strahlentherapie, (1969), 138 595.
- 20) Thompson, L.H. & H.D. Suit: (1967), Int. J. Rad. Biol., 13 391.
- 21) Thompson, L.H. & H.D. Suit: (1969), Int. J. Rad. Biol., 15 347.
- 22) 佐々木弘: 1970, 未印刷資料.
- 23) 吉 村: 1966, 推計紙の使い方ポケットブック, 日本規格協会.