



Title	In vivoに於けるトリチウム標識化合物 ミクロオートラジオグラフの精度 第3報 DNA合成Patternについて
Author(s)	松沢, 大樹; 畠山, 正
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1967, 27(2), p. 117-121
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18342
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

特別掲載

In vivo に於けるトリチウム標識化合物

ミクロオートラジオグラフの精度

第3報 DNA 合成 pattern について

東北大学医学部放射線基礎医学教室

松 沢 大 樹

同 眼科学教室

畠 山 正

(昭和42年3月25日受付)

Quantitative Studies on Microautoradiography of Tritium Labeled Compound in vivo

3. Autoradiographic Determination of DNA Synthesis Pattern in Cell Cycle.

Taiju Matsuzawa and Tadashi Hatakeyama

Department of Radiation Research and Ophthalmology,

Tohoku University School of Medicine.

Since thymidine has been shown to be a specific precursor of DNA, the uptake of ^3H -thymidine into the cell nucleus was used as a measure of DNA synthesis pattern of ascites hepatoma 13R cells.

After addition of ^3H -thymidine the ascites tumor cells were sampled almost at hourly intervals. The slides were dipped directly into NR-M2 liquid emulsion. For exposure, the slides were stored in light tight boxes at 4°C during 20 days.

The experimentally determined mean grain counts over metaphases for each successive hourly sample were plotted on a normal scale.

1) DNA synthesis pattern of AH 13R cells shows asymmetric and up-side-down U-shape on a normal scale. The curve facing G_2 phase ascents almost perpendicularly, and it facing G_1 phase descends gradually making prolonged S-shape. The imperfectional plateau is seen at the top of the curve.

2) The duration of cell life cycle can be determined accurately on the curve.

The results were follows;

$tg:16.2$ $ts=9.8$ $tm=0.7$ $tg-=1.9$ $tg-=3.8$ hours respectively.

3) Even if cell life cycle were changed, the amount of DNA synthesis keeps a constant value.

Consequently DNA synthesis pattern in prolonged cell life cycle shows the prolonged asymmetric and up-side-down U-shape.

研究の背景及び目的

トリチウム標識化合物ミクロオートラジオグラフの定量性には標識された細胞の動きの定量性、

とトリチウム標識化合物それ自身の細胞内における変動の定量性の二つが考えられるが、第1報¹⁾、第2報²⁾においては前者についての報告が行な

われた。この実験では後者の定量性を問題とする。 ^3H -thymidine は S 期にある細胞だけにとりこまれ、そのとりこみの程度は S 期にある細胞でも一様でなく、DNA 合成の強さに応じてとりこまれる量が異なると考えられる。従つて metaphase 又は telephase という短かい時間を通過する細胞核の上に生ずる銀粒子数の平均値を数えることにより、その細胞集団の DNA 合成の平均の pattern を知ることが出来る筈である。これには DNA 合成に用いられる ^3H -thymidine 量と細胞核上の銀粒子数が定量的相関々係を持つていることがその前提となる。この問題については既に第 1 報において銀粒子数と DNA 合成に関与する ^3H -thymidine 量とは平行関係があることを示している。従つて銀粒子数によつて DNA に重合された ^3H -thymidine 量の定量が可能である、この報告では DNA 合成がどのような pattern で行なわれるか、それがオートラジオグラフィーでとらえられる細胞周期の定量的精度にどのような影響を与えるかを検討した。

実験材料及び方法

動物一若い 78 ± 4 g の ドンリュウラット 12 匹を使用、日本ラット株式会社より購入。

腫瘍一腹水肝癌 13R (AH13R) を使用、東北大学抗酸菌病研究所癌研究室（主任佐藤春郎教授）より分与されたものである。1 ~ 4 × 10⁷ 個の比較的大量の腫瘍細胞をラットの腹腔内に無菌的に移植し、3.5 日を経過したラットの腫瘍腹水中に ^3H -thymidine 100 μCi を生理的食塩水 1 ml に溶かして注射した。まず pulse labeling が成立したか否かを確かめるために注射後 5, 10, 15, 20, 40 分の腹水腫瘍細胞をガラスのミクロピペットで採取し、塗抹標本を 2 枚宛作して標識指数の経時的変動を検討した。次に 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31 時間後の腹水腫瘍細胞を同様に採取し、やはりそれぞれ 2 枚宛の塗抹標本を作成した。オートラジオグラフィーは前 2 報と同様 dipping 法により行なわれた。感光乳剤「さくら」 NR-M-2 が稀釈することなくそのまま使用され、dipping するときの乳剤の温度は 43°C に保たれた。2 枚宛作られた塗抹標本はそれぞれ 10 日間、20 日間の露出

時間の後、同じ標本箱の中で同時に現像されギムサ液によつて染色された。標識指数の上昇から pulse labeling が行なわれたか否かをまず検討し、作られた標本のうち 2 種類について標識された metaphase にある細胞の銀粒子数の平均値の経時的変動を方眼紙上にプロットして、DNA 合成の pattern が測定された。

実験結果

10 日間露出した標本が測定に使用された

A) in vivo における AH13R の DNA 合成 pattern について

Table I (A), Figure I 及び Figure II (A) に実験結果を示す。急激に立ち上り逆 S 字型を画いてながらに下降する縦に長い山型として図示される。銀粒子数は大きな分散を示す。標準誤差をとれば中央の peak の存在は明らかでなく、立ち上りから 5 時間以内は殆んど一様の強さで DNA 合成が行なわれていることを示している。ところがそれ以後はほぼ指数函数的に減少して

Fig. 1 DNA Synthesis pattern

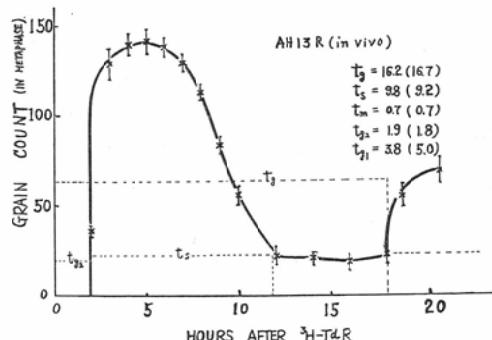


Fig. 2 DNA Synthesis patterns

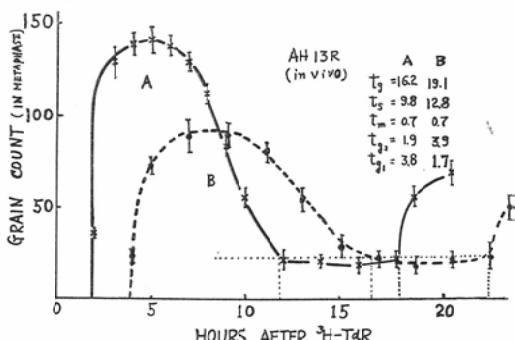


Table 1 Grain Count on Metaphases

Kours After ³ H-TdR	A			B		
	Mean Grain Count	Standard Deviation	Standard Error	Mean Grain Count	Standard Deviation	Standard Error
2	36	12.7	2.7			
3	129	45.6	8.3			
4	138	38.2	4.7	24	9.8	2.4
5	142	40.5	5.6	73	34.8	4.3
6	137	38.1	4.6			
7	139	42.2	5.9	89	43.6	8.4
8	114	36.3	4.4			
9	83	32.7	4.2	90	32.8	4.2
10	55	20.1	4.1			
11				82	33.9	4.3
12	22	10.9	3.4			
13				54	22.6	5.5
14	20	9.4	3.1			
15				28	13.4	3.4
16	18	8.7	2.4			
17				22	10.9	2.5
18	21	10.0	3.4			
19	55	20.4	3.8	18	8.6	2.4
21	68	32.8	4.2	23	10.8	3.3
23				22	10.4	3.2
24				50	23.1	3.9

Number of Metaphases = 30~60

バツクグランドのレベル迄下降する。Figure 1において零時点から第1の山の上向脚の起始点までの時間は G_2 期の長さ (t_{g2}) を表わし、第1の山の上向脚の起始点から下向脚のバツクグランドのレベル迄下降する点迄の時間は S 期の長さ (t_s) を表わす。又第1の山の上向脚の起始点と第2の山の上向脚の起始点迄の時間は世代時間の長さ (t_g) としてとらえることが出来る。更に M 期の長さ (t_m) は M.I. (mitotic index) = $\frac{N_m}{N} = \log_2 \times \frac{t_m}{t_g}$ から求めることが出来る。又 G_1 期の長さ t_{g1} は $t_{g1} = t_g - (t_g + t_s + t_m)$ から計算によって求められる。上求の如く求められた世代時間及び分裂各期の長さは $t_g = 16.2$, $t_s = 9.8$, $t_m = 0.7$, $t_{g2} = 1.9$, $t_{g1} = 3.8$ 時間であり、同じ条件下で標識分裂細胞の百分率を指標として求められた $t_g = 16.7$, $t_s = 9.3$, $t_m = 0.6$, $t_{g2} = 1.8$, $t_{g1} = 5.0$ と比べて極めて近似

していく、その世代時間の差はわずかに 0.5 時間にすぎない。この方法によつて求められた世代時間の精度が高い理由は、標識分裂細胞の百分率の経時的変動によつて細胞周期を求める方法³⁾ よりも実測値の変動をより連続的に把握し得るためである。

B) Table I (B), Figure II (B) に増殖能が低下して世代時間の延びている状態の AH13R の DNA 合成 pattern を示す。これは Figure II (A) が横に延ばされた形である。Figure II において A と B を比べると、B は A が只延びただけでなく、第1の山の起始点に著しい遅れがみられる。つまり G_2 期の延長が著明であり、細胞周期の長さは $t_g = 19.1$, $t_s = 12.8$, $t_m = 0.7$, $t_{g2} = 3.9$, $t_{g1} = 1.7$ となり G_1 期の長さがむしろ短縮しているのに比べてその他の各期は悉く延長している。この方法で求められる細胞周期の長さは DNA 合

成の pattern を同時にとらえることができる点で、よりダイナミックであり、合理的である。A と B の面積を比較すると、 $A \approx 1.2B$ となる。B は A に比べて細胞数が多く、A が 2×10^8 個であるのに B は 6×10^8 個で約 3 倍であり、DNA に結合した ^3H -thymidine 量は液体シンチレイションカウンターの測定では A が約 2×10^7 dpm であるのに B は 5×10^7 dpm であつた約 2.5 倍である。従つて A 細胞群の DNA に結合した ^3H -thymidine 量は $A = \frac{3}{2.5}B = 1.2B$ となり、この補正をほどこした場合、A と B の面積は等しくなる。つまり S 期の長さの如何にかかわらず DNA 合成量は等しくなり、増殖障害が起つても一定量の DNA が合成されない限り細胞増殖とは結びつかないことになる。

考 案

増殖している細胞の DNA 合成の pattern を random population においてこのやうな方法でとらえたのは、この報告が始めてであると考えられる。

1) この方法による DNA 合成 pattern の性格について

このようにしてとらえた DNA 合成 pattern は如何なるものを表わしているのであろうか。この実験では増殖細胞の集団としての DNA 合成をとらえているのであり、個々の細胞の DNA 合成 pattern そのままでないことは明らかである。併し細胞周期のとらえ方が細胞集団の平均値として求められている以上、細胞周期の中の DNA 合成としてはむしろ最も適当なとらえ方ともいえる。増殖障害が起つてもこの方法では、正確に DNA 合成の pattern をとらえることが出来る。A と B で補正を施せば DNA 合成量が等しくなる点は、DNA 合成の pattern を正しくとらえていることを物語ついている。更にもう一つの疑問は、約 5—10 分間という極めて短かい時間に細胞内にとりこまれた ^3H -thymidine が DNA に重合されて行く場合、果して固有の DNA 合成能をそのまま示すか否かという点にあり、その解答の一つは Table I に示された銀粒子数の大きな標準偏差に求めることができる。この大きな銀粒子数の標準偏差

は ^3H -thymidine の腹水内分布の不均等度によるものでなく、又単に cell geometry に基づくものもなく細胞固有の性質に基づくものである⁴⁾。分裂後に ^3H -thymidine で同時間 pulse labeling された二つの娘細胞がほぼ同じ銀粒子数をオートラジオグラフの上で示すが、他の細胞から生じた娘細胞と比べるとその銀粒子数が著しい差異をもつていることが知られている。従つて 5—10 分の短時間の pulse labeling によつてもその細胞個別の DNA 合成 pattern が得られると考えられる。併し何故細胞によつてこのような大きな銀粒子数の分散があるか尚不明であり、この問題は今後の課題として残される。

2) 細胞周期を求める方法について

a. 標識分裂細胞の百分率による方法より、より連続的な把握が可能であるため精度の高い細胞周期を得ることができ。例えれば百分率で S 期が延び DNA 合成がだらだら行なわれる場合には、標識されても充分な銀粒子数に達しない細胞があるため S 期が短かく、反対に G₂ 期は長く見積られる可能性があるが、この方法ではその危険はなく正確に細胞周期を測ることができる。

b. DNA 合成 pattern を同時に測定することができる所以、より有機的に細胞周期を把握することができる。

3) 他の DNA 合成 pattern の存在について

今迄の DNA 合成 pattern について数篇⁵⁾⁶⁾⁷⁾の報告があるが、未だ定説になつていない。吾々のこの AH13R でとらえた DNA 合成 pattern は今迄には寺島等⁸⁾が in vitro で同調培養 HeLa 細胞を用いて B 型に近い pattern を Kozuka⁴⁾等が映画法でやはり HeLa 細胞を用いて A 型に近い pattern を報告しているが、他の報告では吾々のとらえた DNA 合成 pattern とはかなり異なつてゐるものもある。吾々はこの方法で種々の腹水腫瘍又は培養細胞の DNA 合成の pattern を検討している。培養吉田肉腫細胞ではその DNA 合成 pattern はやはり急激に立上る上向脚をもつて始まり、指數函数的に減弱する下向脚をもつて終る。従つて AH13R を用い in vivo でとらえたこの DNA 合成 pattern とよく近似していそに

一貫性がみられる。

結 語

1) ^3H -thymidine によって標識された meta-phase にある細胞の染色体上の銀粒子数を計数することにより、その細胞集団におけるDNA合成の pattern を知ることができる。DNA合成 pattern は不対象の逆U字型をなす。

2) この方法によって細胞周期を測ることができるが、百分率の経時的変動によって計測された細胞周期よりも、より連続的な実測値の把握となるためにその精度は高い。この方法でとらえられた AH13R の細胞周期は $t_g = 16.2$, $t_s = 9.8$, $t_m = 0.7$, $t_{g2} = 1.9$, $t_{g1} = 3.8$ 時間であり、同じ材料を用いて標識分裂細胞の百分率によって求められた細胞周期とは、わずかに 0.5 時間の差が見出されるにすぎない。

3) 細胞周期が変化しても合成DNA量は一定であり、一定量のDNAが合成されないと分裂に結びつかない。

Reference

- 1) in vivo に於けるトリチウム標識化合物ミクロオートラジオグラフの精度 第1報 pulse labeling について。東北大学医学部放射線基礎医学教室、松沢大樹、佐々木俊作 同眼科学教室、畠山正、日本医学会誌。1966年投稿。

- 2) in vivo に於けるトリチウム標識化合物ミクロオートラジオグラフの精度、第2報 世代時間及び分裂各期の信頼限界東北大学医学部、放射線基礎医学教室、松沢大樹 同眼科学教室畠山正、日本医学会誌、1966年投稿。
- 3) Quastler, H. & Sherman, F.Q.: Cell population Kinetics in the Intestinal Epithelium of the Mouse. 1959, 17 : 420.
- 4) Kozuka, S. & Moore, G.E.: Microcinematographic and Autoradiographic Study on the Pattern of ^3H -Thymidine Uptake in the Life Cycle of the Individual Cell of the HeLa Strain in vitro. J Nat Cancer Inst. 1966, 36 : 623.
- 5) Stanner, C.P. & Till, J.E.: DNA synthesis in Individual L-Strain Mouse Cells. Biochim Biophys Acta. 1960, 37 : 406.
- 6) Edward, J.L. Koch, A.L., Young, P., Freese, H.L., Late, M.B. & Donaldson, J. T.: Some Characteristics of DNA Synthesis and the Mitotic Cycle in Ehrlich Ascites Tumor Cells. J Biophys Biochem Cytol. 1960, 7 : 273
- 7) Dendy, P.P. & Cleaver, J.E.: An Investigation of (a) Variation in Rate of DNA-Synthesis during S-phase in Mouse Cells (b) Effect of Ultra Violet Radiation on DNA-Synthesis. Int J Radiat Biol. 1965, 8 : 301.
- 8) Terashima, T., & Tolmach, L.J.: Growth and Nucleic Acid Synthesis in Synchronously Dividing Populations of HeLa Cells. Exptl Cell Res. 1963, 30 : 344.