

Title	コロニー内の細胞の相互作用について
Author(s)	粟冠, 正利; 佐藤, 行彦
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1980, 40(7), p. 722-726
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18373
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

コロニー内の細胞の相互作用について

東北大学医学部放射線基礎医学教室

栗 冠 正 利

同 放射線医学教室

佐 藤 行 彦

(昭和54年11月28日受付)

(昭和54年12月24日最終原稿受付)

Cellular interaction within irradiated colonies

Masatoshi Sakka and Yukihiko Sato

Tohoku University School of Medicine

Research Code No.: 402

Key Words: HeLa S3, Cell to cell contact, Pedigree analysis

HeLa S3 cells were allowed to grow logarithmically on a plate. When a colony had more than 50 cells, it was irradiated with 180 kVp X-rays and each cell in the colony was followed by time-lapse cinemicrography *in situ*. Pedigrees were classified into 3 classes: A. all cells were viable, B. at least 1 cell was lethal, C. all cells were lethal. Sister cells were identified immediately before irradiation and viability of each sister was tested from 50 to 200 hrs after irradiation. On the assumption of independent extinction, the combined frequencies of AxA, AxB etc above were calculated. Observation supported this assumption when a colony was irradiated with 2000 rads. In a colony irradiated with 1000 rads, however, observed frequency was significantly lower than expected. Number of cells in contact during irradiation did not affect the time of cellular extinction. These experiments showed that extinction *in situ* was independent on neighbouring cells but was dependent on sister cells when a dose was low.

コロニー内にある細胞の照射後の生存率は細胞間接触と無関係という所見⁹⁾と之を否定して接触があると生存率が上昇するという所見¹⁰⁾とがある。放射線は染色体や核酸に直接作用するので細胞は再生を経て死ぬ。ところが細胞接触は細胞表面におこるので接触によっておこる変化は遺伝的というよりもっと直接的な“膜的”なものであろう²²⁾。我々はコロニーを造っている細胞の放射線による破壊を映画法で追跡し細胞間の相互作用の有無を検討した。

材料方法

HeLaS3 細胞を池本の TD 40 培養ビン中に Eagle MEM+10% 小牛血清 6g 中に約 1,000 コ (約 20 コ/cm²) まき対数的生長を行わせ数 10 コの細胞からなる 1 コロニーになるまでと、同じコロニーに対し 180kVp X線照射後約 200 時間まで同一視野を顕微鏡映画 (16 ミリ, 8 分に 1 コマ) 撮影し細胞ごとに系図を分析し細胞生死頻度の観測値と期待値とを比較した。検定は日本規格協会の推計紙上で行い有意水準は常例の通りである。線

量測定は TLD 法 (長瀬・ランダウア社) によった。

成績

1. 2,000ラド (20Gy) の作用

照射時の細胞のエージ (分裂後の時間で示す) は範囲1.06—17.73, 中央値4.67, 平均5.21, SD 3.56で右にスキュー (長時間値に尾を引く) していた。照射前の世代時間は平均27.9, SD 5.4 であったから照射時に細胞はおおむね G1 から早い S期にいた。

Table 1 Classification of pedigrees at different times after X-irradiation of 20 Gy

Type of pedigrees	Time in hours after irradiation				
	50	75	100	125	150
A	55	24	5	2	—
B	4	7	13	9	6
C	12	35	46	55	60
Others*	3	8	10	8	8
Total	74	74	74	74	74

* O-pedigrees and overlaps.

2,000ラドをうけたコロニー内の各細胞は200時間までに大部分破壊された。系図別頻度は0型 (分裂しないで破壊) 26, 1型 (1回分裂後姉妹共破壊) 14, 0.1型 (1回分裂後姉破壊, 妹はもう1回分裂後両孫娘共破壊) 7, 1.1型 (姉妹の両孫娘共破壊) 1, 第2世代以後まで生長後破壊した大型1, 単純な細胞癒合を含むもの15, 多極分裂を含むもの7であった。

照射直前の分裂を起点として細胞は姉妹に組分けできる。照射後25時間毎に区切りその時刻迄に任意の細胞は次の A, B 又はCの何れかに相当するはずである。

A : 細胞系図は全部生存, B : 系図の一部の枝に破壊あり, C : 系図の全枝が破壊。今姉妹細胞の運命が独立であると仮定すると姉妹の運命の組み合わせは全観察頻度 (生存及び破壊の他に “その他” 即ち視野外に去ったもの及び重なりあって追跡不能となったものの3つ) を用いて組み合わせAとAとの積 (以下同様), AとB, AとC, BとB, BとC, CとCという期待値に適合するはずである。もし細胞の生死が姉妹間で独立でないならば上の組み合わせの観測値は期待値と一致しない

Table 1-1 Combination of observed pedigrees between sister cells at different times after irradiation

Combination of pedigrees between sister cells	Time in hours after single X-irradiation of 20 Gy				
	50	75	100	125	150
A & A*	7 (-)§	1			
A & B	1	1			
A & C	5 (+)	3 (=)			
B & B		1	2		
B & C		1	4 (+)	5 (-)	4 (+)
C & C		6 (+)	6 (=)	7 (+)	8 (-)
Others	4	4	5	5	5
Total	17	17	17	17	17

* Both sisters have pedigree A, etc.

A : all cells in a pedigree are viable

B : at least one cell in a pedigree is lethal

C : all cells in a pedigree are lethal

§ (-) : observed value is significantly lower than an expected value

(=) : no significant difference between observed and expected values

(+) : observed value is significantly higher than an expected value

であろう。観測と期待との比較は Table 1 及び Table 1—1 の通りである。Table 1 の50時間のAの頻度は55でその全細胞中の出現率は55/74である。従って任意の系図の運命が独立であるという仮定の下にAとAという組み合わせをとる期待値は、 $(55/74) \times (55/74) = 3025/5476$ である。ところで姉妹細胞間の組み合わせをみると50時間においてAとAとの組み合わせが出現した観測頻度は7/17である。推計紙上で検定すると期待値は按分線3025:2451であり観測値は7:10であるから観測値は期待値より低い。同じ50時間にAとCとの組み合わせが独立におこる期待値は Table 1 から $(55/74) \times (12/74) = 660/5476$ に対し姉妹間の観測値は Table 1—1 から 5/17である。按分線は660:4816に対し5:12で観測値は期待値より有意に高い。Table 1—1 及び Table 2—2 の差はすべて同様に検定した。姉妹細胞は照射時には接触していたが

Table 2 Classification of pedigrees at different times after X-irradiation of 10 Gy

Type of pedigrees	Time in hours after irradiation				
	50	75	100	125	150
A	34	29	19	15	5
B	7	5	6	3	1
C	7	11	12	12	13
Others	3	6	14	21	32
Total	51	51	51	51	51

Table 2-2 Combination of observed pedigrees between sister cells at different times after irradiation

Combination of pedigrees between sister cells	Time in hours after single X-irradiation of 10 Gy				
	50	75	100	125	150
A & A	10 (=)	7 (-)	4 (-)	2 (-)	
A & B	3 (-)	2 (-)	2 (-)	1 (-)	
A & C	3 (-)	4 (-)	3 (-)	3 (-)	2 (-)
Others	5	8	12	15	19
Total	21	21	21	21	21

Signs and symbols in this table are explained in Table 1.

姉妹間の細胞破壊の観測値と期待値との合い方は全く不規則で姉妹間の生死の運命は全く依存性がない。つまり姉妹間の接触が相互の生死に影響を与えていない。

照射中及びその前後にトリプシンは一切使わないので細胞は姉妹以外にも接触していたのである。照射後50時間迄に破壊した細胞が照射時に接触していた周囲の細胞数は平均4.75コ、以下75時間5.21, 100時間5.53, 125時間5.20で何れも差がない。細胞破壊時刻が接触細胞数によって影響されないことは次の値からも明らかである。即ち照射時接触していた周囲の細胞数が4コ以下のものの平均破壊時間は92.64, SD 40.27, 同じく5コ以上では平均99.46, SD 42.82。

2. 1,000ラド (10Gy) の作用

照射時の細胞エージは範囲1.46—22.00, 中央値5.47, 平均6.04, SD 6.04で右にスキューしていた。照射前の世代時間は平均27.9, SD 5.4であったから照射時に細胞はおおむねG1から早いS期にいた。

1,000ラド照射はコロニー内細胞を完全には破壊できず細胞全数の3/4は一部又は全部が生残増加できた。前にならってA, B, C別の観測と期待比較結果を Table 2 及び Table 2—2 に示す。姉妹間の細胞破壊は50—150時間において期待値に比して観測値が低率であり姉妹間に救命的相互作用があったことが明らかである。

照射後50時間迄に破壊した細胞が照射時に接触

していた周囲の細胞数は平均5.14（うち1コは姉妹，以下同様），75時間4.55，100時間4.28，125時間4.75，150時間5.07で時間別平均値に差はない。照射時接触細胞4コ以下のものの破壊時間は平均86.95，SD 31.86，5コ以上ではそれぞれ68.75および26.38で4コ以下と5コ以上との間に差はない。

考 察

HeLa S3の数10コからなるコロニーに照射したとき1,000ラドの場合，姉妹間にだけ細胞破壊に対する救命的効果があった。それ以外に細胞間相互作用は認められず細胞破壊は相互独立であった。細胞の種類と培養条件とによって細胞間相互作用はいろいろ解釈できる。

1. 単層平板培養で対数的生長期にあって照射された細胞のコロニー形成能は細胞間相互作用をうけない⁹⁾²⁵⁾。プレート相に入ると生存率が上昇する³⁾¹⁰⁾¹³⁾¹⁷⁾。生存曲線を分析するとnが小，Doが大となる例²⁾¹¹⁾¹⁵⁾²⁰⁾，nだけ大となる例¹²⁾¹⁴⁾¹⁶⁾があるが主としてPLD修復にその原因を求めているものが多い。

2. 培養条件を工夫して細胞を小球状集塊にすると培養1日以後生存率が修飾され生存曲線の形が変わる⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾¹⁸⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾。この原因は細胞間接触に帰せられている。そうではなく酸素効果と細胞周期依存性によるという解釈もある¹⁹⁾。小球状集塊にすると対数的生長相にある細胞を照射しても生存率が修飾される点で平板培養とは差がある。細胞をベレットにすると無酸素性増感剤の効果はなくなる¹⁾。

3. これまでのところ対数的生長期にある単層平板培養を照射して姉妹細胞間に相互作用を認めたものは本報告が初めてである。このような結果を得た理由は放射線影響判定法の差によるものと思う。従来の論文はすべて照射後トリプシン処理して単離した細胞のコロニー形成能を報告しているが我々は照射後何の処理をも加えずに静置した細胞に200時間迄におこった破壊をみた。制がん効果の病理学的判定は依然として組織切片上の細胞の姿によっているので我々の行った経時的動的

形態研究は放射線病理学上意味を持つと考えてよいのではなかろうか。

本研究は文部省がん特別研究費401005によつたことを記して謝意を表す。

文 献

- 1) Agnew, D.A. and Skarsgard, L.D.: Chemical radiosensitization of anoxic mammalian cells. *Radiat. Res.*, 57: 246—259, 1974
- 2) Berry, R.J., Hall, E.J. and Cavanagh, J.: Radiosensitivity and oxygen effect for mammalian cells cultured in stationary phase. *Brit. J. Radiol.*, 43: 81—90, 1970
- 3) Chapman, J.D., Todd, P. and Sturrock, J.: X-ray survival of cultured Chinese hamster cells resuming growth after plateau phase. *Radiat. Res.*, 42: 590—600, 1970
- 4) Durand, R.E.: Cure, regression and cell survival. *Brit. J. Radiol.*, 48: 556—571, 1975
- 5) Durand, R.E. and Sutherland, R.M.: Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. *Exptl. Cell Res.*, 71: 75—80, 1972
- 6) Durand, R.E. and Sutherland, R.M.: Growth and radiation survival characteristics of V79—171 b Chinese hamster cells. *Radiat. Res.*, 56: 513—527, 1973
- 7) Durand, R.E. and Sutherland, R.M.: Dependence of the radiation response of an in vitro tumor model on cell cycle effects. *Cancer Res.*, 33: 213—219, 1973
- 8) Durand, R.E. and Olive, P.L.: Radiation-induced DNA damage in V79 spheroids and monolayers. *Radiat. Res.*, 78: 50—60, 1979
- 9) Elkind, M.M. and Whitmore, G.F.: The radiobiology of cultured mammalian cells. pp. 40—48, 74—85, 1967, Gordon and Breach, New York.
- 10) Evans, R.G., Bagshaw, M.A., Gordon, L.F., Kurjian, S.D. and Hahn, G.M.: Modification of recovery from potential lethal X-ray damage in plateau phase Chinese hamster cells. *Radiat. Res.*, 59: 597—605, 1974
- 11) Hahn, G.M.: Failure of Chinese hamster cells to repair sub-lethal damage when X-irradiated in the plateau phase of growth. *Nature*, 217: 741—742, 1968
- 12) Hahn, G.M. and Little, J.B.: Plateau phase cultures of mammalian cells. *Cur. Top. Radiat. Res. Quart.*, 8: 39—82, 1972
- 13) Hetzel, F.W., Kruuv, J. and Frey, H.E.: Repair of potentially lethal damage in X-irradiated V79 cells. *Radiat. Res.*, 68: 308—

- 319, 1976
- 14) Hill, R.P., Ng, R., Warren, B.F. and Bush, R.S.: The effect of intercellular contact on the radiation sensitivity of KHT sarcoma cells. *Radiat. Res.*, 77: 182—192, 1979
 - 15) Lehnert, S.: Changes in radiosensitivity of V-79 cells accompanying growth and cell division. *Radiat. Res.*, 63: 326—335, 1975
 - 16) Little, J.B.: Repair of sub-lethal and potentially lethal radiation damage in plateau phase cultures of human cells. *Nature*, 224: 804—806, 1969
 - 17) Little, J.B.: Factors influencing the repair of potentially lethal radiation damage in growth-inhibited human cells. *Radiat. Res.*, 56: 320—333, 1973
 - 18) 松沢大樹, 阿部光延, 中村 護: 相互癒着による癌細胞の放射線感受性の変化. *日本医放会誌*, 29: 319—321, 1969
 - 19) 篠原邦夫, 岡田重文: Radiosensitivities of murine lymphoma L5178 Y cells in a multicellular colony system. *J. Radiat. Res.*, 13: 109—116, 1972
 - 20) Stewart, J.R., Hahn, G.M., Parker, V. and Bagshaw, M.A.: Chinese hamster cell monolayer cultures. *Exptl. Cell Res.*, 49: 293—299, 1968
 - 21) Sutherland, R.M., Inch, W.R. and McCredie, J.A.: A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumor model. *Int. J. Radiat. Biol.*, 18: 491—495, 1970
 - 22) Sutherland, R.M., McCredie, J.A. and Inch, W.R.: Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular growth. *J. Nat. Cancer Inst.*, 46: 113—120, 1971
 - 23) Sutherland, R.M. and Durand, R.E.: Cell contact as a possible contribution to radiation resistance of some tumours. *Brit. J. Radiol.*, 45: 788—789, 1972
 - 24) Sutherland, R.M. and Durand, R.E.: Hypoxic cells in an in vitro tumour model. *Int. J. Radiat. Biol.*, 23: 235—246, 1973
 - 25) Szechter, A., Kowalsky, W.P. and Schwarz, G.: Average versus viable cell multiplicity in survival determination for mammalian cells in vitro. *Radiat. Res.*, 75: 432—433, 1978
-