

Title	組織培養細胞の微細構造に及ぼすX線照射の影響：特に細胞周期における放射線感受性の変動とその関係について 第1報
Author(s)	森田, 新六
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1968, 28(8), p. 1164-1175
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/19460">https://hdl.handle.net/11094/19460</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

# 組織培養細胞の微細構造に及ぼす X 線照射の影響

(特に細胞周期における放射線感受性の変動とその関係について)

## 第 1 報

千葉大学医学部放射線医学教室 (主任: 寛弘毅教授)

森 田 新 六

(昭和43年2月7日受付)

Effects of X-irradiation on the Ultrastructure of Tissue Culture Cells.  
—Especially, on the Changes of Radiosensitivity and their Relationship  
during the Growth Cell Cycle.—

1st Report

Shinroku Morita

Department of Radiology, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan.

(Director: Prof. Hirotake KAKEHI)

When we treat the malignant tumours with X-ray or  $\gamma$ -ray irradiation, we should always consider the radiosensitivity of the tumours. It is necessary for us to make the tumour cells more sensitive.

There are many basic investigations on the radiosensitivity of the tumour cells. As one of them, changes in X-ray survival response during the growth cell cycle were demonstrated using tissue culture cells by TERASIMA & TOLMACH (1963b).

On the other hand, there are many reports, which are concerned with the effects of X-irradiation on the Ultrastructure of the tissue cells.

I studied the effects of X-irradiation of 200 R to 2500 R on the mouse L-5 cells.

The purpose of this study is to see the relationship between the change of radiosensitivity and the ultrastructure of L-5 cells during their cell cycle, by means of the light and electron microscopes.

Next findings were observed.

1) The observations with the light microscopic pictures revealed the appearance of small particles in the nucleus, clearly stained nucleoli and vacuoli in the cytoplasm.

2) These changes are related to the cell cycle. The higher the radiosensitivity, the more frequent and earlier the changes.

3) As one of the changes, the electron dense nucleolus was revealed by means of electron microscopic observations.

4) There are two kinds of mitochondrial findings, the first is the dense swelling which are developed after the cell division with low dose irradiation, the second is the clear swelling which are brought by high dose irradiation without cell division.

5) The swelling of the endoplasmic reticulum is seen after the X-irradiation and it causes the vacuolization of the cytoplasm in some cases.

## 内容項目

## I 緒言

## II 研究材料及び研究方法

- 1) 組織培養細胞
- 2) 培養液
- 3) 培養方法
- 4) 同調培養方法
- 5) X線照射方法
- 6) 照射線量
- 7) 標本の固定方法, 染色方法, 及び包埋方法

## III 実験結果

## A 基礎的実験

- 1) 細胞周期
- 2) ランダム集団のX線生残曲線
- 3) 同調集団のX線生残曲線
- 4) 同調集団各時期のX線感受性の比較
- 5) 同調培養細胞の照射後増殖曲線

## B 光学顕微鏡的観察

- 1) 非照射細胞
- 2) X線照射細胞
- 3) 細胞周期との関連

## C 電子顕微鏡的観察

- 1) 非照射細胞
- 2) X線照射細胞
- 3) 細胞周期との関連

## IV 考察

## V 結語

## I 緒言

癌の放射線治療の際、癌組織の放射線感受性を出来るだけ高めて治療効果を最大限にすることが望まれ、あらゆる分野からの研究がなされつつある。この放射線感受性に関する基礎的研究の1つに、2, 3の培養細胞では、細胞周期の各期で放射線感受性が異なるという報告がある<sup>(17)(18)(19)(20)(21)(22)</sup>。

Terasima & Tolmach<sup>(19)(20)</sup>によれば、HeLa S 3細胞の細胞周期のうち分裂期とG<sub>1</sub>後期の細胞が、G<sub>1</sub>初期の細胞に比べて高い放射線感受性を示す。このことはマウスL細胞に於ても同様に示された(Terasima et al<sup>(21)</sup>)。

もし生体癌組織の細胞周期を同調することが出来得るならば、癌の放射線治療効果が一段と高め

られると考えられる。

一方、細胞の微細構造に対する放射線照射の影響を追求している研究分野があり、これらによれば、体内組織で、一番X線照射の影響が現われ易いのは、リンパ球<sup>(6)</sup>、卵胞細胞<sup>(1)(15)</sup>等の細胞であり、X線照射により細胞質、核質、核小体に変化を示す。又程度の差こそあれ、他の臓器組織例えば、肝臓<sup>(13)</sup>でも腸管粘膜<sup>(8)</sup>でも同様の変化を示している。

組織培養細胞に対しても同様の研究がなされている<sup>(5)(9)(11)(12)</sup>。

Goldfeder<sup>(6)</sup>はマウスのリンパ球、上皮性腫瘍細胞と紡錘細胞腫細胞との比較において、細胞の放射線感受性は、細胞質の種々の器官(特にミトコンドリア)の量と質が大いに関係あり、又種々の細胞間の感受性の差はこれら細胞質内の構成の違いによつて説明されると述べている。

そこで著者は今実験において、細胞の放射線感受性を決定する因子を追求する基礎的研究として、組織培養細胞を用いて、細胞周期の各期の放射線感受性の差と、細胞微細構造への放射線照射による影響との関連を追求した。

## II 研究材料及び研究方法

1) 組織培養細胞：同調培養を行なうために、増殖能力の活発な増殖系の株細胞(マウスL細胞(Earle)<sup>(8)</sup>のsubclone L-5細胞(B 929-L 2 J))を使用した。この細胞は放射線医学総合研究所で1964年7月にcloneされたものである。

2) 培養液：Ham<sup>(7)</sup>の作った培養液F・10はL細胞の培養にはカルシウムが少ないので、カルシウム濃度を80 mg/lにするために、CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>Oを40 mg/l加え、これに更に0.5%心臓抽出液と、5%仔牛血清(Lot 60, 千葉血清)を加えたものを使用した。

3) 培養方法：浮遊したL-5細胞に上記培養液を加えて静置すると、細胞は培養ビンの底に単層に附着し増殖する。培養ビンには180 mlの角ビンを用い、5%炭酸ガス-空気のChamber中に置き炭酸ガス培養を行つた。Chamberは放射線医学総合研究所寺島研究室特製の37°C恒温室の中に装置した。

4) 同調培養方法: 同調培養 (cell synchrony) とは分裂開始時期が別々で増殖しているランダム集団の細胞を, 何等かの方法を用いることによつて同一時期に分裂を起させ, 個々の細胞周期 (分裂から分裂までの期間でそれを普通 DNA 合成期 S (synthetic phase), 分裂期を M (mitotic phase), 分裂後 DNA 合成期 までの 期間を  $G_1$  (gap 1), DNA 合成後分裂までの 時期を  $G_2$  (gap 2) と分けることが出来る.) を同調させる方法である. 今実験においては Terasima 等<sup>21)</sup>により示された方法を用いた. 即ち 4本の培養ビンに  $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$  個の細胞を入れ, 約 40 時間培養し,  $37^\circ\text{C}$  の恒温室中で培養ビンをただ機械的に揺り動かすことにより, 約  $2 \sim 3 \times 10^4/\text{ml}$ , 全体で  $0.5 \sim 0.7 \times 10^6$  個の分裂期細胞を集めた. これは分裂期の細胞の形態が丸くなつて, 突起を出さなくなる為, 培養ビン壁への接着性が低下することを利用したもので, 分裂期細胞又は非常に初期の early  $G_1$  期 (分裂直後) の細胞が集まる. 実験に使用した細胞の細胞周期での時点はそれぞれ, 0 時間後 (Mitosis 期), 2 時間後 (Early  $G_1$  期), 6 時間後 (late  $G_1$  期), 15 時間後 (S 期), 21 時間後 (S  $\rightarrow$   $G_2$  期) でこの時間に X 線を照射し, 経時的にとり出して標本とした.

5) X 線照射方法: X 線照射装置は Toshiba-KXC 19 特製を使用した. 照射条件は常に一定であり, 管電圧 220 kVp, 管電流 20mA, フィルター  $0.5\text{Al} + 0.5\text{Cu}$  (HVL 1.2mmCu), 線量率  $81 \sim 84\text{R}/\text{min.}$ , 照射細胞と線源までの距離 (F.S.D) 50cm, 空气中, 室温とした. 照射する細胞を入れる容器には plastic petri dish を用い, 容器による X 線の吸収を無視出来るようにし, 深さ 0.3cm の培養液に浸つた状態の細胞を回転円盤上で照射した.

6) 照射線量: 照射線量は 200R, 500R, 1000R, 2500R の 4 種類を用いた. 200R は sublethal damage の線量, 500R, 1000R は mitotic death の線量, 2500R は interphase death の線量である.

7) 標本の固定方法, 染色方法, 及び包埋方法: 光学顕微鏡 (以下光顕と略す) 的観察には,

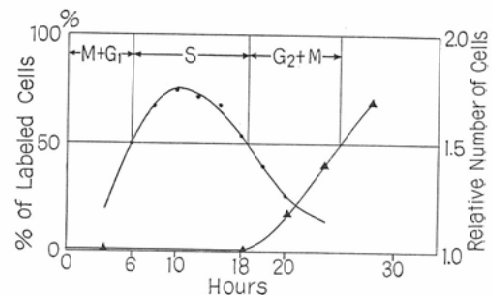
あらかじめ細胞をカバーガラスの表面に付着させて培養しておき, X 線照射後, 経時的にとり出して, 100%メタノールで約 10 分間固定し, 2%ギムザ染色液で約 1 時間染色した. 電子顕微鏡 (以下電顕と略す) 的観察には, plastic petri dish に付着した細胞を, 柔らかいラバークリーナーでかき集め, 1000 回転以下の低速で遠沈する. Epstein<sup>4)</sup>の方法を参考とし沈澱した細胞に 2%オスミウム酸 ( $\text{OsO}_4$ ) と Caulfield Buffer<sup>2)</sup> 1 対 1 の固定液を注入, 約 15 分間  $0 \sim 4^\circ\text{C}$  の氷室中で固定し, そのまま 1000 回転で遠沈し, ペレットとしロ紙上に半球状に盛り上げる. その後エタノール系列 (50%, 70%, 90%, 99% 各 15 分間, 100%, 30 分間 2 回) で脱水し, プロピレンオキサイド中を 30 分間 2 回通した後, エポン又はスチロールに包埋した. 包埋した細胞は  $20\text{m}\mu \sim 80\text{m}\mu$  の厚さに切り, 鉛染色後に電顕を用いて観察した.

### III 実験結果

#### A 基礎的実験

#### 1) 細胞周期 (Fig. 1) : L-5 細胞は同調培養

Fig. 1; A Fraction of the Generation Time of L-5 Synchronous Culture Cells.



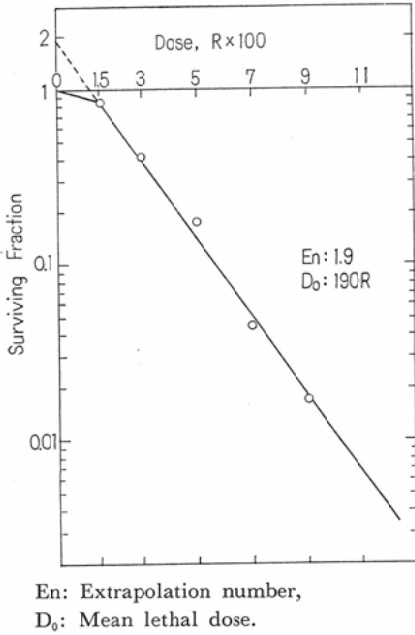
▲—▲; Growth curve of cells.

●—●; Percentage of labelled cells, which determined by means of  $^3\text{H}$  thymidine autoradiography.

M: Mitotic period,  $G_1$ : Pre-synthetic period, S: DNA-synthetic period,  $G_2$ : Post-synthetic period.

20 時間目頃より分裂を開始し, その世代時間は 24 時間前後である. トリチウムサイミジン ( $^3\text{H}$  TdR) を用いたオートラジオグラフで DNA 合成期 (S 期) を測定すると, 同調培養開始後 6~7 時間目より始まり, 11 時間程続くことが分かる.

Fig. 2; Survival Curve of L-5 Random Population.

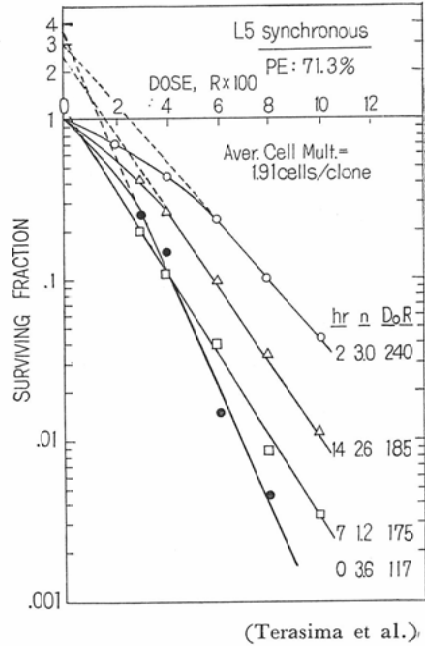


即ち細胞周期の各期はM+G<sub>1</sub>期 6~7時間, S期 11時間, G<sub>2</sub>+M期が約6時間となる.

2) ランダム集団のX線生残曲線 (Fig. 2): ランダム集団でのX線生残曲線はpuck<sup>16)</sup>のコロニー形成法により, コロニー中の細胞数が50個以上存するものを生存したコロニーとして数えると, Fig. 2の如く線量が増すにつれて, 生存率(対数)は直線的に低下する. この直線部の傾斜をD<sub>0</sub> (生存率が37%に低下するに要する線量で, 平均致死量 (mean lethal dose) と呼ぶ) で表わし今実験ではこの値が190Rである. 直線部を延長して縦軸をきる値, すなわち外挿数 (Extrapolation number En, n) は1.9となる.

3) 同調集団のX線生残曲線 (Fig. 3): 同調培養では細胞周期の各時期において放射線感受性が異なり Terasima et al<sup>22)</sup> によれば, M期とlate G<sub>1</sub>期の細胞の放射線感受性が, early G<sub>1</sub>期のそれに比べて, 約2倍高い. Fig. 3<sup>22)</sup>は各期の生残曲線を示す. 即ちM期 (0 hr. 図中黒丸)のカーブの傾斜が急で感受性の高いことを示し (n=3.6, D<sub>0</sub>=117R), early G<sub>1</sub>期 (2 hr. 図中白丸)のカーブの傾斜がゆるやかで感受性の低いこ

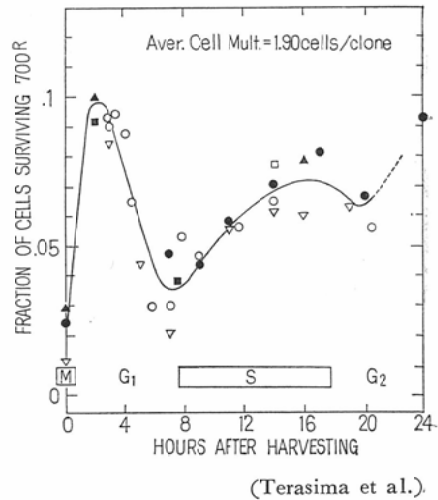
Fig. 3; Survival Curves of L-5 Synchronous Population.



- : Mitotic period,
- : Early G<sub>1</sub> period,
- : Late G<sub>1</sub> period,
- △—△: S period.

P.E.: Plating efficiency, Aver. Cell Mult.: Average-cell multiply, n: Extrapolation number, D<sub>0</sub>R: Mean lethal dose (Roentgen), hr: Hours.

Fig. 4; Change in Sensitivity during the Growth Cycle of L-5 Cells.

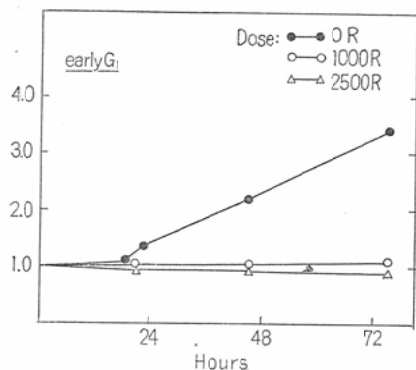


とを示す ( $n = 3.0$ ,  $D_0 = 240R$ ). 図中白三角印はS期の, 白四角印は late  $G_1$  期の生残曲線を示す.

4) 同調集団各時期のX線感受性の比較 (Fig. 4): Fig. 4<sup>22)</sup>は700R照射の細胞周期内各期の感受性の比較を曲線で示したものである. M期と late  $G_1$  期(約8時間目)が感受性が高く, early  $G_1$  期(2~3時間目)の感受性が低い.

5) 同調培養細胞の照射後増殖曲線 (Fig. 5): 同調培養の early  $G_1$  期の細胞にX線照射を行うと, 1000R照射ではわずかに分裂が認められるが, 2500R照射ではほとんど分裂を起さない.

Fig. 5; Increase Rates of L-5 Synchronous Culture Cells after X-ray Irradiation.



## B 光学顕微鏡的観察

1) 非照射細胞: 同調培養開始直後の early  $G_1$  期の細胞は, 核質が細胞質に比べて大きく, 核質も濃染性である. 培養時間の経過にともない細胞質の比率が増大してくる. 核質は淡赤色に染まり, クロマチン (chromatin) と核液が均等に混っている. 濃紫色の1~2コの核小体 (nucleolus) を有する. 細胞質 (cytoplasm) は網目状で空泡形成は少ない. Fig. 6は対照非照射細胞400倍, Fig. 7は同じく1000倍を示す. 又非照射細胞でも長時間培養を続けると分裂異常 (分葉核, 小核の出現) を数%の頻度 (96時間培養のものは1%以下) で見出すようになる.

2) X線照射細胞: X線照射を受けた細胞は一般に核質, 細胞質共に変化を生じ, 照射線量の増大, 照射後の経過時間の増加にともなう変化が

著しくなる. 主な変化は,

(i) 核質及び細胞質の大きさの異常: 核質及び細胞質の大きさの増加が示される. 特に細胞質の増大の傾向が強い. 線量の増加, 時間の経過にともない著しくなる.

(ii) 分裂異常: 照射により分裂異常が生ずる. 分葉核及び小核の出現, 巨大核形成がある.

200R照射細胞でも分裂後に生ずる. 線量の増加にともない頻度が著しくなる. Fig. 8は1000R照射後72時間経過したものに生じた分葉核及び小核である.

(iii) 核内小顆粒の出現: あたかも核質が崩壊したかのような濃紫染から濃紅染の小顆粒が現われる. 200R照射例でも生ずるが, 頻度は少ない. Fig. 9は1000R照射後48時間経過した例であるが, 小顆粒が核膜を通して, 核外にあふれ出している状態が観察された. 又他標本では, 核内に小顆粒が残らず, 細胞質内のみちらばっている例もあつた.

(iv) 核小体の変化: 核小体の淡青色均一化は, 核小体の周囲に濃染の顆粒を有する. 200Rの小線量で生ずるが頻度は少ない. Fig. 10は1000R照射後48時間経過例で, 核小体の変化とともに核内小顆粒の出現もみられる.

(v) 核小体の数の増加: 1000R又は2500R照射し, 77時間経過したものに観察された. Fig. 11は1000R照射後77時間経過したもので, 多数の核小体と分葉核と小核がみられる.

(vi) 核融解又は核空泡形成: Fig. 12は2500R照射後77時間経過したもので, 出現頻度は数%である. 高線量, 長時間経過例でないとし生じない.

(vii) 細胞質の空泡形成: 細胞質の変化は, まず大小の空泡形成である. Fig. 13は200R照射, 21時間経過例の特徴ある空泡形成である. この空泡は分裂後の48時間目には消失した. 非照射細胞でも72時間以上培養したのものには生ずるが, 照射細胞では頻度が著しくなる.

(viii) 細胞質の融解: Fig. 14は2500R照射77時間経過例にみられた細胞質の融解像で, この融解物質が吸収されると巨大空泡になるものと考えられる.

Table 1; Appearance of Small Particles in the Nuclei after the Irradiation of 1000R.

This is the comparison at the 3 points of the cell cycle and this shows that in the mitotic and the late G<sub>1</sub> periods the sensitivity is higher, the appearance of small particles are more quick and more frequent.

hours	0.5	5	21	48
cell cycle				
mitosis	○	○	○	•
early G <sub>1</sub>	•	•	△	◎
late G <sub>1</sub>	○	○	◎	•

◎ : ~30% ○ : 30~5% △ : 5~0% • : 0%

Table 2; Appearance of the Clearly Stained Nucleoli after the Irradiation of 1000 R.

hours	0.5	5	24	48
cell cycle				
mitosis	◎	◎	○	○
early G <sub>1</sub>	•	◎	○	○
late G <sub>1</sub>	○	○	◎	○

◎ : ~30% ○ : 30~5% △ : 5~0% • : 0%

3) 細胞周期との関連: 光顕で観察された諸変化と細胞周期各時点の感受性の変化との関連性を次の項目について検討してみた。

(i) 核内小顆粒の出現: Table 1 のごとく各時期とも1000 R照射時の比較では, M期とlate G<sub>1</sub>期で小顆粒の出現時間が早く, その時間での頻度も著しい. 500 R照射例, 200 R照射例でも同様の傾向にある.

(ii) 核小体の変化: 核小体の淡染色均一化についても同様なことがいえる. Table 2は1000 R照射時の比較である. 500 R照射例, 200 R照射例でも同様の傾向にある.

(iii) 細胞質空泡形成: 次に細胞質の空泡形成を各期で比較してみると, Table 3のごとく, 1000 R照射例では, 明らかな差を見出せないのに反し, 500 R照射例ではM期の方が early G<sub>1</sub> 期に比べて早期に, 高い頻度で変化を現わした(Table 4).

### C 電子顕微鏡の観察

1) 非照射細胞: 核質は2重膜により細胞質と境界される. 核膜は2重膜よりなり多数の小孔を

Table 3; Appearance of Vacuoles in the Cytoplasm after the Irradiation of 1000R.

Comparison at the 3 points of the cell cycle. There are no difference among them, as to the appearance time and frequency.

hours	0.5	5	15	24	48
cell cycle					
mitosis	•	•	◎	○	•
early G <sub>1</sub>	•	•	◎	◎	○
late G <sub>1</sub>	•	•	△	○	△

◎ : ~30% ○ : 30~5% △ : 5~0% • : 0%

Table 4; Appearance of Vacuoles in the Cytoplasm after the Irradiation of 500R.

Comparing the mitotic period with the early G<sub>1</sub> period, vacuoles appeared earlier and more frequently in the former.

hours	0.5	5	15	24	48
cell cycle					
mitosis	•	•	△	△	○
early G <sub>1</sub>	•	•	•	•	•

◎ : ~30% ○ : 30~5% △ : 5~0% • : 0%

みる. 核液は 130~180Åの小顆粒に満され, クロマチンの網様構造を示す. 時に小顆粒が消失して核液が粗になり, クロマチンが島状に残る状態も観察された.

核小体は核質にあり, 通常1~3個で, 毛絨状を呈し内部に多数の小孔を有する.

細胞質は形質膜により囲まれ内部にミトコンドリア (mitochondria), 小胞体 (endoplasmic-reticulum), R N P顆粒等を有する.

ミトコンドリアは2重膜で囲まれた円形ないし楕円形を呈し, 内部に3~4本のcristaeがある.

小胞体は薄い膜でできた嚢であり, あるいは合い接する2条の線様構造よりなり, そこに小顆粒 (R N P顆粒) を有する粗面小胞体と, 小顆粒のない滑面小胞体に分けることが出来る.

細胞質にはその他に, 小空泡, 脂肪滴, グリコーゲン顆粒等をみることがある (Fig.15).

### 2) X線照射細胞

(i) 核質の変化: 培養細胞の核は非照射細胞でも一定の構造を示し難いので照射による変化を握みにくい欠点がある.

X線照射した細胞のうち 200 R照射例ではほと

んど変化を示さない。

500R照射例では44時間経過したものに核小体がelectron denseになることを観察した (Fig.16)。

この変化は必ずしも全ての細胞に生ずるわけではない。核小体の凝集により生じたものと考えたい。

1000R及び2500R照射では21時間経過例に electron dense の核小体のみとめた。500R照射例にくらべて出現時間が早くなり、多少頻度も多くなっている。

クロマチンの変化については 5,000~20,000倍の範囲の観察の段階では、2500R照射例でも変化を示すことが少ないように思われる。

核液の消失については非照射細胞でも認められる現象なのでなんとも言えない。

核膜の破壊 (Fig.17) は1000R照射後、72時間経過した例にみられた。

(ii) 細胞質の変化：細胞質の諸器官のうちX線照射による変化を示しやすいのはミトコンドリアである。2つの型の変化を示す。

a) ミトコンドリアの変化1 (Fig.18)：ミトコンドリアの全体が electron dense に膨化した型で、正常の cristae は消失し太くなり、内部マトリックス (matrix) も狭少化している。円形又は長楕円形を示す。500R照射では、24時間経過例に、1000R及び2500R照射では40時間経過例にこの型が観察された。2500R照射21時間経過例にみられないのは、この変化が照射後一度分裂しないと出現してこない為と考えられる。Fig.18は1000R照射後72時間経過した例にみられたものである。

b) ミトコンドリアの変化2 (Fig.19)：ミトコンドリア全体の膨化で、内部マトリックスも拡大する。2重膜構造も間隙をひろげ不規則になる傾向がある。内部 cristae の破壊もみられる。ミトコンドリア内部に水分が浸入したことにより生ずると考えられる。500R照射では24時間経過例にはじめて出現した。1000R及び2500R照射例では3時間目から少しずつ現われる。照射後分裂しない細胞のミトコンドリアがこのような変化を示すものと考えられる。Fig.19は2500R照射後3時

間目のものである。

c) 小胞体の変化 (Fig.18)：小胞体の板状2重膜構造の間隙が広がり、膨化する。やはり水分の吸収により膨化したものと考えられる。500R照射例、1000R照射例では48時間後より、2500R照射例では3時間頃よりその傾向が現われる。

d) 空泡形成：非照射細胞に比べて空泡形成の数と大きさが増大する。

(iii) 細胞膜の変化：細胞膜 (plasma membrane) の破壊は高線量照射例で長時間培養したものにみられた。

3) 細胞周期との関連：細胞周期の各期での比較は、1000R照射例について検討したが、各期間に特徴的の差異を見い出せなかつた。今実験はポイントのとり方が大まかであり、光顕に比して電顕の観察細胞数も極端に少ないので、はつきりした結論を下せない。今後更に検討を要すると思われる。

#### IV 考 察

分裂期の細胞を集めるTerasima等<sup>21)</sup>の方法は、細胞の接着性の低下を利用して行なうもので、他の薬品を用いる方法 (BudR, Colcemid等)、培養条件を変えて行なう方法 (無蛋白培養液等) に比べて細胞の自然の状態を保ちうる点で優れている。反面細胞周期の後半では同調性が多少みだれてくる欠点がある。今実験ではその点を考慮に入れて比較を行なつた。

Early G<sub>1</sub> 期の細胞にX線照射を行ない、その後の増殖を72時間まで追求したが、その結果はWhitmore<sup>24)</sup>等の行つた L-60細胞の浮遊培養での実験と似かよっている。

200R照射例でも分裂異常を生じたが、これらは染色体の異常によるものと考えたい<sup>14)</sup>。

X線照射時の細胞の構造変化は光顕的観察では、核質の変化が主で、細胞質の変化は空泡形成にすぎない。細胞が退化から死へとたどる過程に於て核に現われる変化は、核濃縮 (Pycnosis)、核崩壊 (Karyorrhexis)、と核融解 (Karyolysis) であるという<sup>10)</sup>。変化の著しさはこの順序だという。X線照射を受けた細胞で死への過程をとるものは、これらと同様の変化をとるものと考えられ



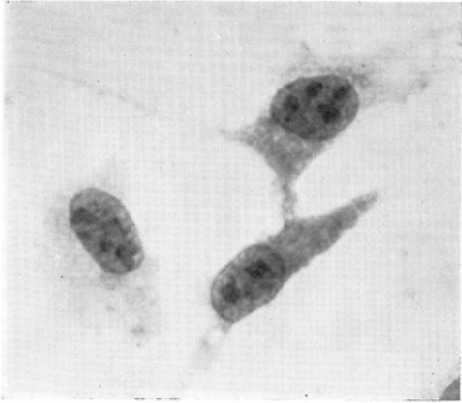


Fig. 6

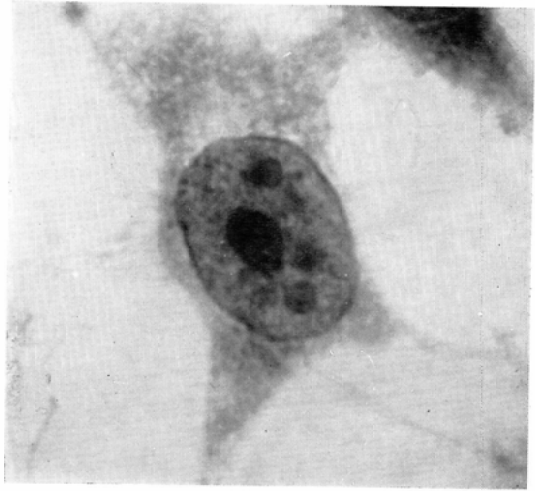


Fig. 7

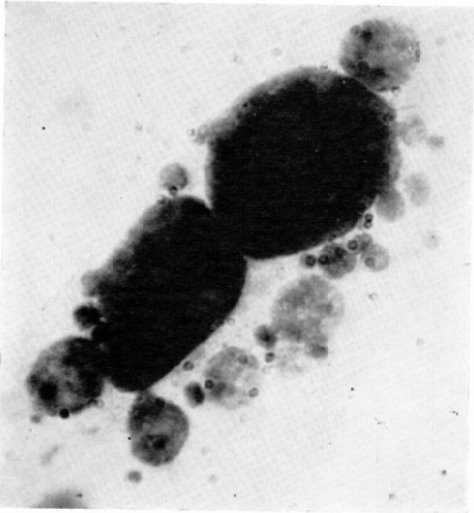


Fig. 8

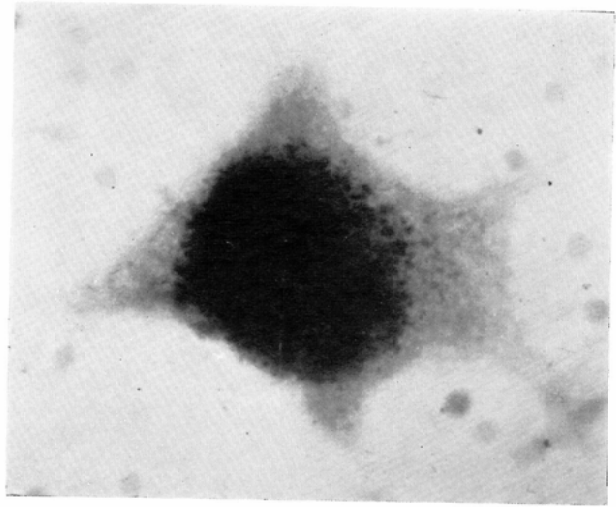


Fig. 9

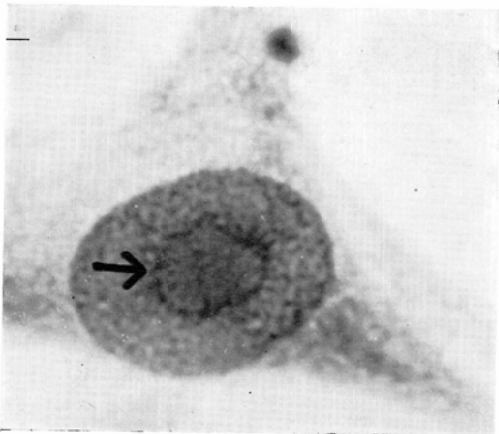


Fig. 10

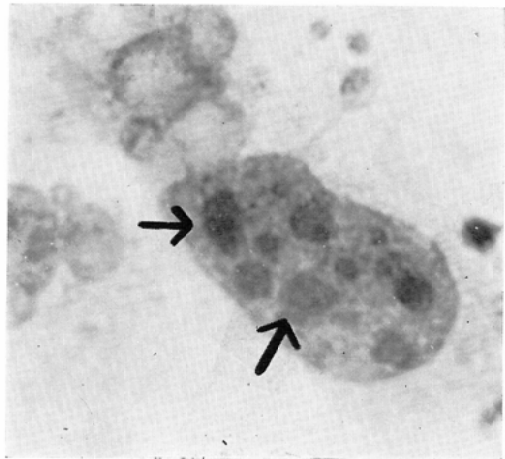


Fig. 11

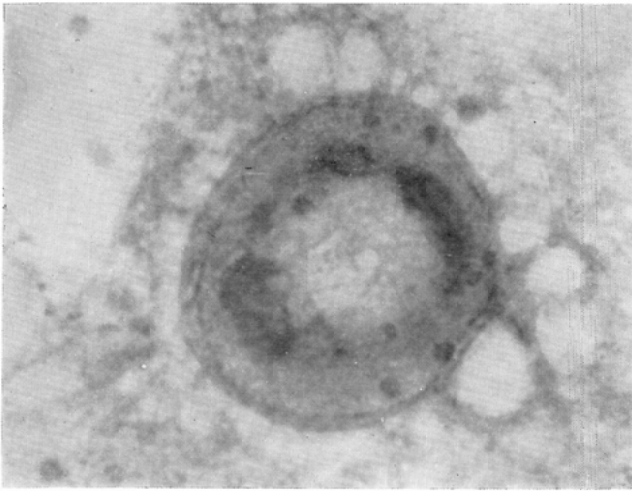


Fig. 12

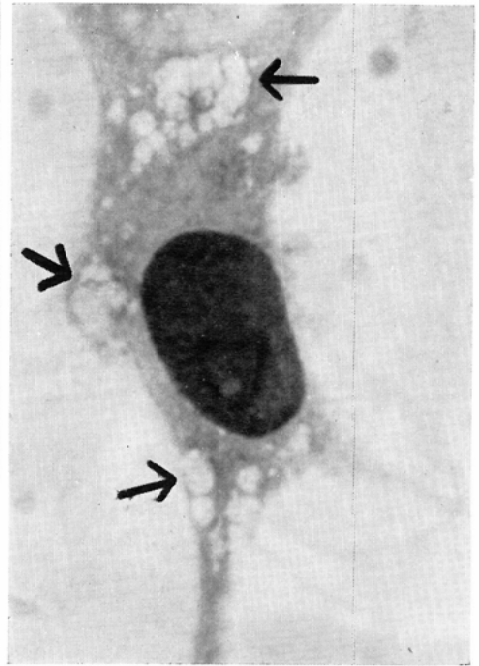


Fig. 13



Fig. 14

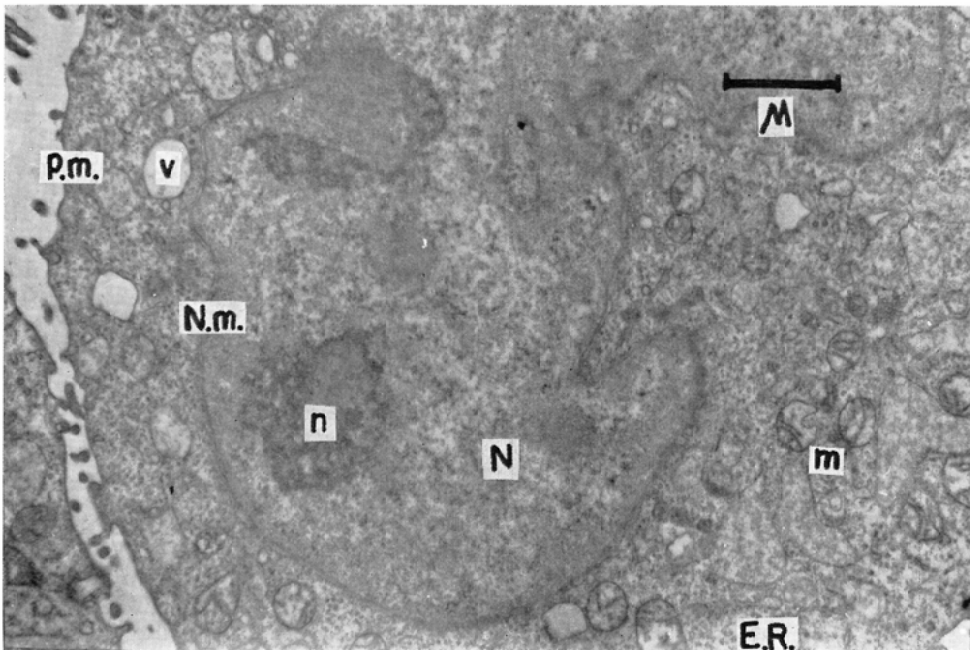


Fig. 15

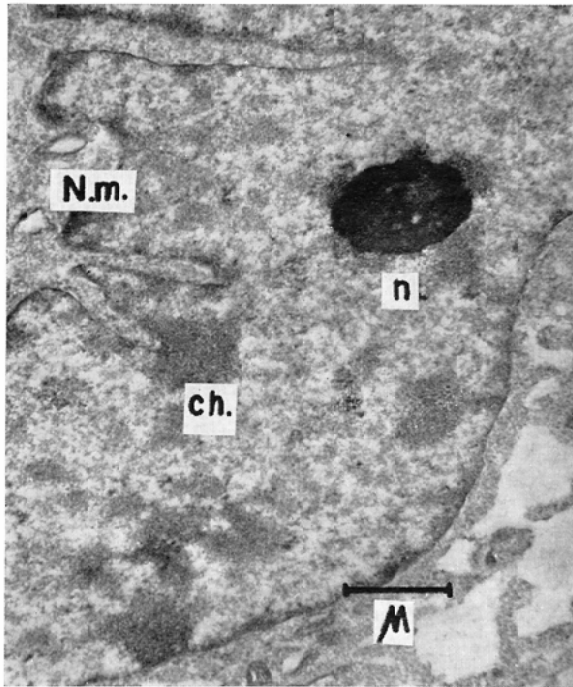


Fig. 16

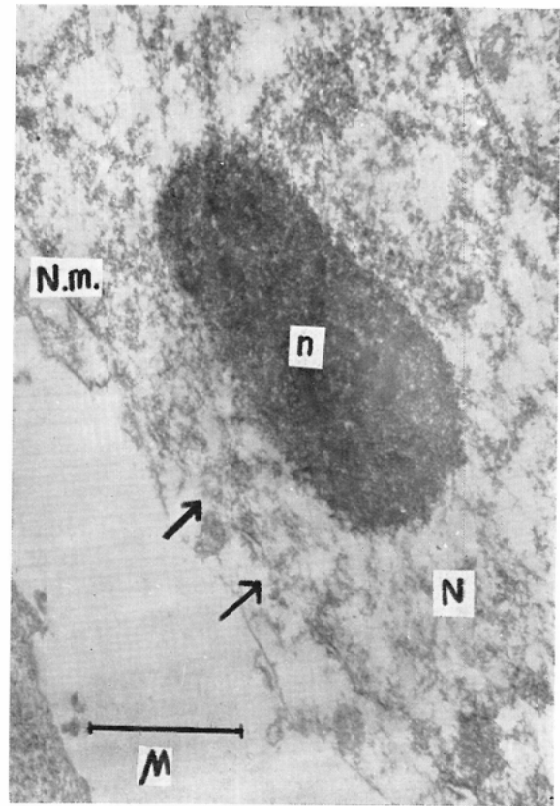


Fig. 17

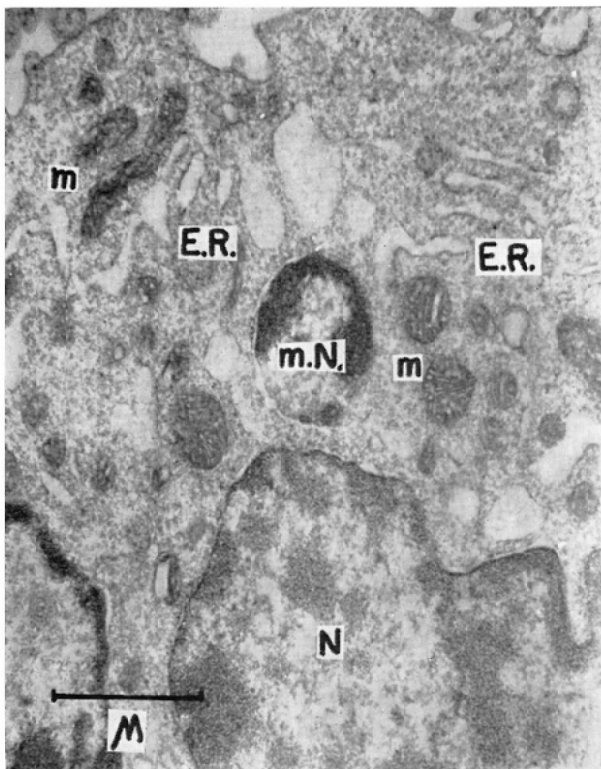


Fig. 18

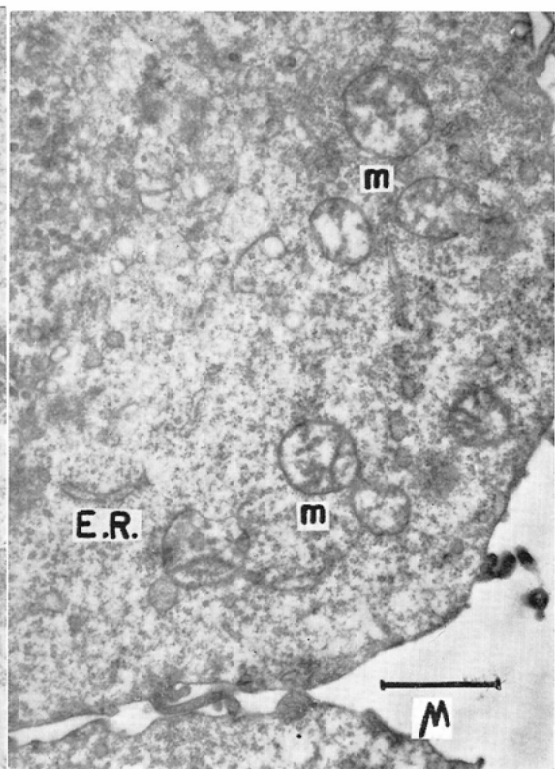


Fig. 19

### Illustration of Micrograph

- Fig. 6: Non-irradiated Control (400×). Twenty Hours after the Synchronous Culture of L-5 Cells.
- Fig. 7: Non-irradiated Control (1000×). Three nucleoli are stained with dark violet. Nucleus is homogenous and cytoplasm is netted without vacuolus.
- Fig. 8: Abnormal Mitosis (1000×). Seventy-two hours after the X-irradiation of 1000R. Nuclear lobulation and micro nuclei can be seen.
- Fig. 9: Appearance of Small Particles in the Nucleus. They overflow into the cytoplasm through the nuclear membrane. Twenty-one hours after the irradiation of 1000R (1000×).
- Fig. 10: Forty-eight Hours after the Irradiation of 1000R (1000×) Clearly stained nucleoli can be seen (arrow) and also the small particles in the nucleus can be seen.
- Fig. 11: Seventy-Seven Hours after the Irradiation of 1000R (1000×). Many nucleoli can be seen (arrows).
- Fig. 12: Seventy-Seven Hours after the Irradiation of 2500R (1000×). The vacuolus in the nucleus can be seen.
- Fig. 13: Twenty-one hours after the Irradiation of 200R (1000×). Appearance of small vacuoli in the cytoplasm (arrows). They vanished 48 hours after the irradiation, when the cells were divided.
- Fig. 14: Seventy-Seven Hours after the Irradiation of 2500R (1000×). Lytic regions in the cytoplasm are seen (arrow).
- Fig. 15: Non-Irradiated Control (15000×). N: Nucleus, n: Nucleolus, N.m.: Nuclear membrane m: Mitochondria, V: Vacuolus, P.m.: Plasma membrane, E.R.: Endoplasmic reticulum.
- Fig. 16: Forty-four Hours after the Irradiation of 500R (14000×). Electron dense nucleolus can be seen. n: Nucleolus, ch: Chromatin, N.m.: Nuclear membrane.
- Fig. 17: Seventy-seven Hours after the Irradiation of 1000R. Rupture of nuclear membrane (arrows) can be seen (21000×). n: Nucleolus, N.m.: Nuclear membrane, N: Nucleus.
- Fig. 18: Seventy-two Hours after the Irradiation of 1000R (20000×). Electron dense mitochondria and swelling of endoplasmicreticulum can be seen. m: Mitochondria (electron dense), E.R.: Endoplasmic reticulum (swelling), N: Nucleus, m.N.: Micro nucleus.
- Fig. 19: Three Hours after the Irradiation of 2500R (16000×). Swelling and enlargement of mitochondria and breakage of cristae can be seen. m: Mitochondria, E.R.: Endoplasmic reticulum.

る。今実験で現られた核の小顆粒を、核崩壊の一過程と考えるのには多少無理があるように思える。なぜならばこの変化が少線量でも頻度が少ないながらも出現するからである。今後光顕的には他のDNA染色法 (Feulgen 法) RNA染色法等を使用して検討する必要がある。又電顕的には今実験においてその実体を握めなかつた。これは小顆粒出現の頻度が少なかつたせいもあるが、細胞固定の過程が小顆粒をみつめるには不適當であつたように思われる。今後はスライドグラスに生えたままの形で電顕標本にする方法をとらねばならない。

小顆粒が核外にあふれ出して細胞質にちらばつている状態が観察されたが、これはX線照射により核膜の透過性が高まることと大いに関係があるように思われる。

核の融解像は核の空泡化で示される。今実験では高線量、長時間経過例にみられた。

核濃縮現象はその典型例は見い出せなかつた

が、クロマチンの微細構造が無くなり、等質性になつた状態の細胞は、2500R照射例に見い出された。典型的な核濃縮の像を生じさせるにはこの種の培養細胞では、もつと高線量、少なくとも10,000R以上が必要ではなからうかと推察した。

光顕的観察で現られた核小体の淡染色均一化が電顕で示された electron dense の核小体と同一であるかどうかは今実験では不明である。又この状態での核小体のRNA合成がどうなつているかを調べるのも今後の研究問題である。

細胞質の空泡形成は各期、各時間にみられるが、M期の200R、21時間経過例で特異的に現られ興味ある像を呈した。この空泡形成は48時間経過例には観察されなかつた。このことは分裂を行なつた細胞は新生され、障害を回復する<sup>10)</sup>ことと一致するに思われる。電顕像でも細胞質の空泡形成が同様に観察される。Hendee等<sup>9)</sup>は電顕的観察においてこの起源を小胞体にもとめている。今実験においては、空泡形成の一部が、小胞

体の膨化であることを確めた。

Rouiller はミトコンドリアの膨化 (swelling) を電顕的に透明腫脹 (clear swelling) と稠密腫脹 (dense swelling) の2種であると記載しているという<sup>10)</sup>。今実験でも2種の変化が示された。

透明腫脹は水分吸収によるものであり、高線量照射例のミトコンドリアに観察され、稠密腫脹は基質内物質の濃縮によるもので、低線量照射後一度分裂した細胞に観察された。

細胞周期各期での感受性の変化と、構造変化の関連性は、変化が感受性の高い程早期に現われるし、又頻度も著しくなっている。しかし異なつた線量でうけた変化が、光顕的に又電顕的に同じようにみえても、質的に同一であるかどうかは、今後の研究に待たねばならない。電顕的には今実験の方法では、光顕に対して観察細胞数が100分の1以下であるので、各細胞周期間の差を見出すには至らなかつた。今後他の方法で検討を加えたい。

## V 結 語

1) L-5 細胞のX線照射により光学顕微鏡的には核質の小顆粒の出現、核小体の淡染色均一化、細胞質の空泡形成を観察した。

2) これら諸変化と細胞周期での放射線感受性の差との間に関連があり、感受性の高い程これら諸変化の頻度が多く、かつ早期に出現する。

3) 電子顕微鏡的には、核小体の濃縮が認められた。

4) 細胞質ミトコンドリアの変化は2種類あり、1つは透明膨化する型、他方は稠密膨化する型である。前者は高線量照射例で分裂しない細胞に、後者は低線量照射例で一度分裂した細胞に観察された。

5) 小胞体は照射により膨化し細胞質空泡形成の一因となりうる。

稿を終るにのぞみ、終始懇篤な御指導ならびに御校閲をいただいた、恩師箕弘毅教授に深く感謝致します。また日夜御教示、御鞭撻いただいた第2解剖学教室永野俊雄教授、喰代修氏、放射線医学教室長沢初美嬢及び諸

学兄、又心良く研究の場を与えて下さり御指導下さつた放射線医学総合研究所寺島東洋三博士及び諸学兄姉に心から御礼申し上げます。尚本論文の一部は、第27回日本医学放射線学会総会に於いて発表した。

## 文 献

- 1) Bojin, F. and Paul, B.: J. Cell Biol. 30, 2, (1966), 227.
- 2) Caulfield, J.B.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, (1957), 837.
- 3) Earle, W.R.: J. Nat. Cancer Inst. 4 (1943) 165.
- 4) Epstein, M.A.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 3 (1957), 567.
- 5) Fogh, J. et al.: Ann. N.Y. Academy of Science 95, 2 (1963), 758.
- 6) Goldfeder, A.: Radiol. 84 (1965), 312.
- 7) Ham, R.G.: Exptl. cell Res. 29 (1963), 515.
- 8) Helander, H.: Rad. Res. 26 (1965), 244.
- 9) Hendee, W.R. and Alders, M.: Radiol. 88, 3 (1967), 588.
- 10) 妹尾左知丸編: 新細胞学, 朝倉書店 (1965), 589, 592, 595.
- 11) Kanno, I. et al.: J. Rad. Res. 6, 2 (1965), 82.
- 12) 加藤敏郎: 日医放雑, 22, 3 (昭和37年), 209.
- 13) Margnroth, J.K. and Themann: Strahl. Therap. 124 (1964), 546.
- 14) 中井準之助他編: 組織培養, 朝倉書店 (1964), 520.
- 15) Parsons, D.F.: J. Cell Biol. 14, 1 (1962), 31.
- 16) Puck, T. T. et al.: J. Exptl. Med. 103 (1956), 655.
- 17) Sinclear, W.K. and Morton, R.A.: Nature 199 (1963), 1158.
- 18) Sinclear, W.K. and Morton, R.A.: J. Biophys. 5 (1965), 1.
- 19) Terasima, T. and Tolmach, L.J.: Exptl. Cell Res. 30 (1963a), 344.
- 20) Terasima, T. and Tolmach, L.J.: J. Biophys. 3 (1963b), 11.
- 21) Terasima, T. et al.: Proceedings of the International Conference of Tissue Culture in Cancer Res. (Tokyo-1966).
- 22) Terasima, T. and Fujiwara, T.: The 8th Annual Meeting (Chiba-1965).
- 23) Whitfield, J.B. and Youdale, T.: Exptl. Cell Res. 38 (1965), 208.
- 24) Whitmore, G.F. et al.: Biochem. Biophys. 47 (1961), 66.