The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	放射線照射による細胞動態変化のflow cytometryによる解析-培養細胞についての検討-
Author(s)	酒井, 邦夫; 藤田, 勝三; 日向, 浩 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1984, 44(3), p. 523-525
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19490
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

研究速報

放射線照射による細胞動態変化の flow cytometry による解析
—培養細胞についての検討—

新潟大学医学部放射線医学教室
酒井 邦夫　藤田 勝三*　日向 浩
末山 博男　佐藤 洋子

（昭和58年12月12日受付）
（昭和58年12月28日最終原稿受付）

Flow Cytometric Analysis of Cytokinetic Change by Radiation
A Study on Cultured Mammalian Cells

Kunio Sakai, Shozo Fujita, Hiroshi Hinata,
Hiroo Sueyama and Yoko Sato
Department of Radiology, Niigata University School of Medicine

Research Code No. : 407
Key Words : flow cytometry, cell kinetics

Cultured mammary carcinoma cells (FM 3 A) were exposed to 2, 4, 6 and 10 Gy of ^{60}Co γ rays. The cells were stained with propidium iodide 2 to 30 hours after irradiation. DNA contents of the cells were analyzed by Cytofluorograf (ICP 22A, Ortho Inc.).

The DNA histograms of every dose group exhibited maximum accumulation to G_2+M phases at 6 to 8 hours after irradiation. The histograms of the cells exposed to 2 Gy returned to the normal pattern at 15 hours after irradiation. Those of cells exposed to more than 4 Gy, however, showed longer accumulation time in G_2+M phases.

I. はじめに

細胞内のDNA含量の差を蛍光量の差におきかえて，細胞1個1個のDNA量を短時間に測定できるFlow Cytometry（FCM）が開発され，わが国においても近年急速に普及しつつある．FCMは，細胞集団の動態を明らかにすることができる．本法により腫瘍細胞の細胞周期が把握できれば，その周期による感受性の差をうまく利用して，がんの放射線療法や化学療法をより効果的に実施できる可能性がある．

本論文では，放射線照射による細胞動態の変化について，培養細胞を対象として検討した結果を報告する．

II. 材料および方法

培養細胞はFM3A（C3Hマウス乳癌由来）を用いた．細胞浮遊液（細胞濃度4.2×10^5cells/ml）20 mlを底面積25cm^{2}のフラスコに入れ，密栓して5 mm厚アクリル板にのせ，下方から^{60}Coγ線を2，4，6，10Gy照射した．各照射群について照射2～30時間後にPI液（ヨウ化プロピジウム0.05 mg/0.1%クエン酸ナトリウム1ml）[1]で細胞のDNA染色を行った．

DNA量測定は，米国Ortho社製Cytofluorograf（ICP 22 A）で行った．直径10μmの蛍光

*新潟大学医療技術短期大学部

体（ラテックス）により装置を調整し，また，それを内部標準蛍光体として細胞試料にも適量添加した．細胞10,000個のDNA量を測定してDNAヒストグラムを求めた．これより細胞周期各期の百分率を算出して細胞動態の解析を行った．

III. 結　果

1）非照射細胞のDNAヒストグラム

正常ヒト末梢血から分離したリンパ球とFM3A細胞（細胞濃度4.2×10^5cells/ml）のDNAヒストグラムをFig. 1に示す．横軸はチャンネル数（相対的DNA量），縦軸はその細胞数をあらわす．増殖しないリンパ球のDNA量は100chに集中している．増殖期にあるFM 3 A細胞は120ch（2 C, G_1期相当）に第1ピーク，220ch（4 C, G_2＋M期相当）に第2ピークを有する2峯性パターンを示した．左方の低いピークは試料に添加したラテックスで，これが常に25chになるようにgainを設定した．このヒストグラムをもとに，赤木ら[2]の方法により細胞周期各期の百分率を算出した．細胞濃度4.2×10^5cells/mlの場合，G_1期53.0%，S期34.3%，G_2＋M期12.7%であった．

2）細胞濃度によるDNAヒストグラムの変化

FM3A細胞の増殖曲線をみると，10^6cells/mlまで対数的に増殖し，細胞集団の倍加時間は12.5時間であった．DNAヒストグラムは10^4～10^5cells/mlまでほぼ類似のパターンを示した．しかし，10^5cells/ml後半から10^6cells/mlにかけて，2Cの増加傾向ならびに3Cおよび4Cの減少傾向があらわれ，plateau phaseに達するとこれらの傾向はさらに顕著になった．

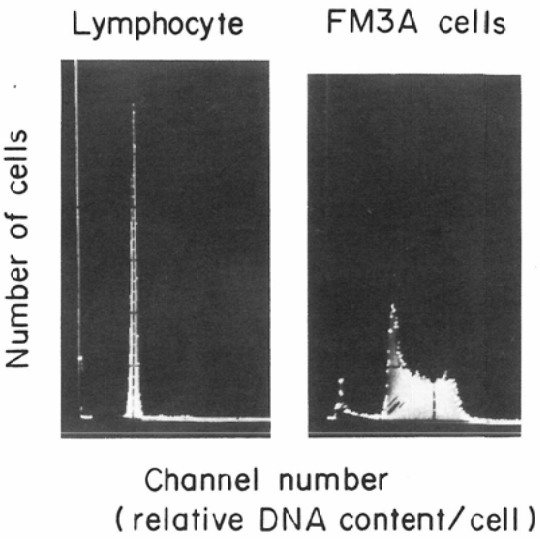

Fig. 1　DNA histograms of human lymphocytes (left side) and cultured mammary carcinoma cells, FM3A, (right side) stained with propidium iodide.

3）照射によるDNAヒストグラムの変化

Fig. 2に，2，4，6，10Gy照射後のDNAヒス

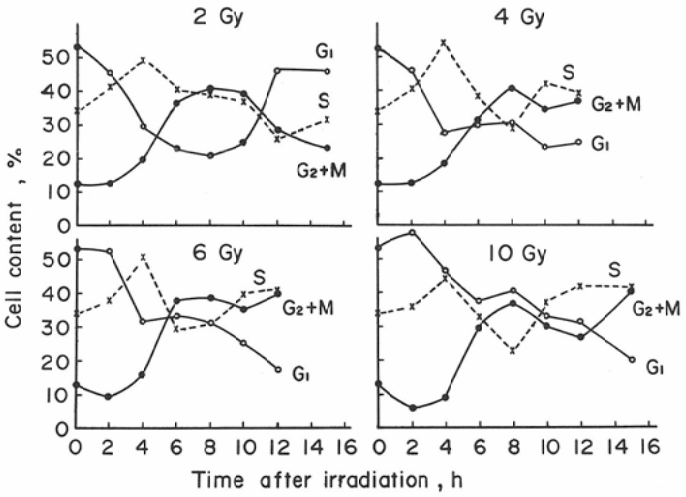

Fig. 2　Sequential changes of cell cycle phase distributions of FM3A cells exposed to 2, 4, 6 and 10 Gy. Percentages of cells in each phase were calculated from DNA histograms.

トグラムの経時的変化を細胞周期各期の百分率で示した．いづれの線量においても，G_2+M期への蓄積は照射6～8時間後に最高となり，およそ40%に達した．それに伴ってG_1期が減少し，S期の変動は最も少なかった．2Gy照射では15時間後にほぼ非照射群のパターンに復帰したが，4，6，10Gy照射では30時間後においても非照射群のパターンには復帰しなかった．

IV．考　察

がんの放射線治療では，通常は均等分割照射法が用いられている．しかし，細胞の放射線感受性は細胞周期によって異なることが知られているので[3]，腫瘍細胞の状態や照射による細胞動態の変化を把握し，それに基づいた線量配分が確立できれば，より効果的な治療を行い得ると考えられる．

細胞動態の解析には，従来顕微分光光度計を用いる方法やオートラジオグラフィーが用いられていたが，これらは多大の時間と労力を要するという欠点があった．FCMは細胞10,000個のDNA量を10数秒間で測定できるという大きな利点がある．

照射された細胞がG_2+M期に蓄積されてくる時間は，2Gy照射では照射6時間後から10時間後までの約4時間でその後は減少し，15時間後にはほぼ非照射群の値に戻っている．4，6，10Gy照射ではG_2+M期への蓄積は15時間後まで続いた．赤木ら[4]も，HeLa細胞に300，600，900rad照射し，線量増加に従ってG_2+M期への蓄積が長く続くことを報告している．

細胞集団が放射線感受性が高いとされるG_2+M期に多く蓄積したときに次の照射を行えば，放射線効果をより高めることができると推測される．FCMは細胞動態を短時間に解析できるので，放射線治療における個別的な線量配分の検討にも有用な方法であると考えられる．

V．結　語

FM3A細胞に^{60}Coγ線を2，4，6，10Gy照射し，FCMによる細胞動態の解析を行った．G_2+M期への蓄積は照射6～8時間後に最高となり約40%に達した．2Gyでは照射後15時間で非照射群の値にほぼ復帰したが，線量が多くなるとG_2+M期への蓄積は長時間続いた．

本研究は，文部省科学研究費（課題番号57440057）の援助を受けた．論文の要旨は，第68回日本医学放射線学会北日本地方会において発表した．

文　献

1) Krishan, A.: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. J. Cell Biol., 66 : 188—193, 1975
2) 赤木　清，田中敬正：Flow cytometryによる細胞動態の解析—特にG_0 fractionについて—．文部省科学研究費，がん特別研究I，昭和57年度報告書“腫瘍治療における細胞動態学的基礎および応用に関する研究”，24—31，1982
3) Terashima, T. and Tolmach, L.J.: Changes in x-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. Nature, 190 : 1210—1211, 1961
4) 赤木　清，中沢　緑，村田貴央，白石友邦，播磨敬三，沢田　敏，長谷川武夫，田中敬正：FCMによる腫瘍細胞動態に対する放射線効果の解析，癌の臨床，27：1523—1527，1981