

| | |
|--------------|---|
| 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2報 世代時間と分裂各期の長さの信頼限界について |
| 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. 112-116 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/19603 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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2報 世代時間と分裂各期の長さの
 信頼限界について

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

島 山 正

(昭和42年3月25日受付)

Quantitative Studies on Microautoradiography of Tritium Labeled Compound in vivo

2. Confidence Limits of Cell Cycle

Taiju Matsuzawa and Tadashi Hatakeyama

Department of Radiation Research and Ophthalmology,

Tohoku University School of Medicine

A autoradiographic study using ^3H -thymidine has been undertaken to investigate the confidence limits of cell cycle of actively proliferating Ascites Hepatoma 13R cells in the peritoneal cavity of the rats. Donryu rats weighing $126 \pm 4\text{g}$ were used for this experiment. Tumor cells of 2×10^9 were inoculated to each animal before preparation of slides for autoradiography.

Nine cases among twelve cases which came successfully into pulse labeling were selected as experimental samples.

After addition of ^3H -thymidine, the tumor cells were sampled almost at hourly intervals.

The mean, the standard deviation and the coefficient variation (CV) of the generation time and the duration of M, G_2 , S and G_1 phase are as follows;

- | | |
|----------------------------|------------------|
| 1) generation time | |
| mean | 16.78 hours |
| standard deviation | ± 0.44 hours |
| CV | 2.62% |
| 2) duration of M phase | |
| mean | 0.69 hours |
| standard deviation | ± 0.02 hours |
| CV | 2.89% |
| 3) duration of G_2 phase | |

| | |
|-------------------------------------|-------------|
| mean | 1.7/hours |
| standard deviation | ±0.05 hours |
| CV | 2.93% |
| 4) duration of S phase | |
| mean | 9.3/hours |
| standard deviation | ±0.30 hours |
| CV | 3.2% |
| 5) duration of G ₁ phase | |
| mean | 5.07 hours |
| standard deviation | ±0.42 hours |
| CV | 8.30% |

After administration of ³H-thymidine the standard deviation of each point become larger and larger with passing time, consequently the fiducial limits of G₁ phase become the lowest in those of cell cycle and every phases.

The coefficient of variation of the first S phase is 3.3%, whereas that of the second S phase is 15.9%, the standard deviation of the second S phase is approximately 5 times larger than that of the first S phase.

研究の背景及び目的

第1報¹⁾で述べた如く in vivo において ³H-thymidine の pulse labeling が成立した場合には標識された分裂期の細胞を指標として、その細胞の世代時間と分裂期各期 (G₁, S, G₂, M) の長さを測定することができる²⁾³⁾。このようにして求められた世代時間及び分裂各期の長さは本来増殖している全細胞の平均値として得られるわけであるが、その再現性については尚不明である。この実験では ³H-thymidine による標識分裂細胞/全分裂細胞 × 100% の経時的変動をマイクロオートラジオグラフによつて求め、得られた世代時間及び分裂各期の長さの信頼限界を或る一定条件下の腹水腫瘍細胞について検討する。

実験材料及び方法

動物—第1報よりは大きい 128 ± 4 g のど入りゆうラット12匹を使用、日本ラット株式会社より購入。

腫瘍—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。2 × 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腹水腫瘍中に 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マイクロピペットで採取し、塗抹標本を夫々数枚作成して ³H-thymidine の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、やはりそれぞれ数枚宛の塗抹標本を作成した。塗抹標本の作成にあたっては事前に腫瘍細胞液を用い38°Cに保たれた載物ガラスのほぼ半分を被い、しかも細胞が重ならないよう均等に塗抹するための練習が繰返された。

オートラジオグラフィ—は第1報と同様 dipping 法により行なわれた。感光乳剤「さくら」NR—M₂ を稀釈することなくそのまま使用 (dipping するときの感光乳剤の温度は43°Cに保たれた。塗抹標本はそれぞれ10日間、20日間の露出を行ない同時に現像し、ギームサ液で染色した。出来上がった標本について次の検査を行なった。

1. 標識指数 (labeling index=L.I.) の測定

まず pulse labeling が成立したか否かを確かめるために ³H-thymidine 注射後 5分から40分迄に採取された標本について標識指数を求めた。分母となつた腫瘍細胞は2,000個である。平衡に達した

あとの標識指数についてその信頼度を検討した。

2. 世代時間及び分裂各期の長さの測定

pulse labeling が成立した例で経時的に採取された標本について、分裂細胞数 100箇を数えて標分識裂細胞数/全分裂細胞数 × 100% を縦軸に時間を横軸にとり、普通方眼紙上にプロットした図について Quastler 等²⁾の方法によつて世代時間 (t_g), G_2 期の長さ (t_{g2}), S 期の長さ (t_s) をそれぞれ実測によつて求めた, M期の長さ (t_m) は2,000箇の腫瘍細胞から求められた分裂指数 (mitotic index) = M.I. = 分裂細胞数 (N_m)/全細胞数 (N) × 100%をまず求め、

$$\frac{N_m}{N} = \log_e 2 \times \frac{t_m}{t_g} \text{ から}$$

t_m を計算によつて求めた。

G_1 期の長さ (t_{g1}) は $t_{g1} = t_g - (t_{g2} + t_s + t_m)$ からやはり計算によつて求められた。

実験結果

この実験では20日間の露出後10分以内に平衡に達した9例について pulse labeling が成立したものととして、世代時間及び分裂各期の長さの測定を行なつた。第1報に比べて腫瘍細胞が多く、使用した ³H-thymidine の量が同じであるために10日間の露出では銀粒子数が充分でないで20日間の露を行なつた標本について実験の結果を整理したものである。

実験結果の虚理については次の式によつて行なつた。

$$\bar{x} = \frac{\sum_i X_i}{n} \dots\dots\dots \text{平均値 (sample mean)}$$

X_i = それぞれの標本

n = 標本数

$$S^2 = \frac{\sum_i X_i^2 - (\sum_i X_i)^2 / n}{n-1} \dots\dots\dots \text{分散 (mean variance)}$$

$$S = \sqrt{S^2} \dots\dots \text{標準偏差 (standard deviation)}$$

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S^2}{n}} = \frac{S}{\sqrt{n}} \dots\dots \text{標準誤差 (standard error)}$$

$$CV = \frac{100S}{\bar{x}} \dots\dots \text{偏位係数 (coefficient of variation or coefficient of variability)}$$

95%の信頼限界(confidence interval)

$$= \bar{x} \pm t_{0.05} \times S_{\bar{x}}$$

1) 標識指数について

pulse labelingが成立した9例について ³H-thymidine 注射後40分の標識指数を求めると平均値及び標準偏差はそれぞれ50.4%, 及び± 1.4%となる。

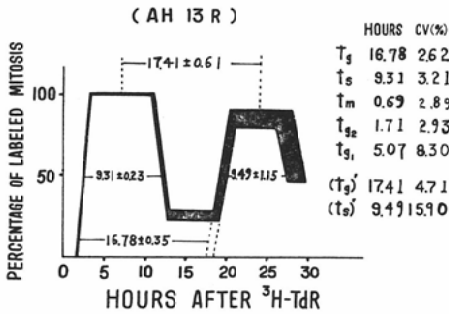
2) 世代時間の長さについて

Table 1, Figure 1 に成績を示す。標識分裂細

Table 1

| | Cell Cycle (1) | | | | | Cell Cycle (2) | |
|--|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| | t_g | t_s | t_m | t_{g2} | t_{g1} | (t_g') | (t_s') |
| Mean ($\bar{x} = \frac{\sum X_i}{n}$) (Hours) | 16.78 | 9.31 | 0.69 | 1.71 | 5.07 | 17.41 | 9.49 |
| Standard Deviation ($S = \sqrt{\frac{\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2 / n}{n-1}}$) (Hours) | 0.44 | 0.30 | 0.02 | 0.02 | 0.42 | 0.82 | 1.51 |
| Standard Error ($S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{S^2}{n}}$) (Hours) | 0.15 | 0.10 | 0.006 | 0.006 | 0.14 | 0.27 | 0.50 |
| 95% Confidence Interval ($\bar{x} \pm t_{0.05} S_{\bar{x}}$) (Hours) | 16.39 ~ 17.13 | 9.08 ~ 9.54 | 0.65 ~ 0.73 | 0.65 ~ 0.73 | 4.87 ~ 5.29 | 16.80 ~ 18.02 | 8.34 ~ 10.64 |
| Coefficient of Variation ($\frac{100S}{\bar{x}}$) (%) | 2.62 | 3.21 | 2.89 | 2.89 | 8.30 | 4.71 | 15.90 |

Fig. 1. Confidence Interval of Cell Cycle



胞の百分率を縦軸に ^3H -thymidine 注射後の時間を横軸にとり、普通方眼紙上にプロットして得られた第1の山の起始点と、第2の山の上行脚の直線部分を延長してX軸と交わる点を結ぶ時間を t_g とし、第1の山の中点と第2の山の中点を結ぶ時間を t_g' としてそれぞれの世代時間が求められた。95%の信頼限界における t_g の値は 16.78 ± 0.35 時間であり、標準偏差は0.44時間であるのに比べ、 t_g' の値は 17.41 ± 0.61 時間で標準偏差は0.82時間である。 t_g と t_g' との間には有意の差は認められないが、 $(t_g)'$ は t_g に比べて標準偏差が大きく従って偏位係数 (CV) = (coefficient of variation) が t_g の約1.8倍大きくなっている。CVの値は測定者の技術の程度によっても左右されるが、この実験では同じ測定者の得た結果であるため、その測定値の小さい程精度が高く t_g の精度は t_g' の精度より1.8倍高いことになる。

3) DNA合成期 (S期) の長さについて

Figure 1に示す如く第1の山と第2の山の上行脚、下行脚のそれぞれの中点を結ぶ時間を求めS期の長さ (t_s 及び t_s') とした。 t_s は95%の信頼度においては 9.3 ± 0.23 時間であるのに対して t_s' では 9.49 ± 1.15 時間である。

標準偏差は t_s が0.3時間であるのに t_s' は1.51時間でありはるかに大きい。CVは t_s は3.21%であるの衝 t_s' では15.90%にも達する。この方法による t_s' の精度は極めて低く、DNA合成期の長さの測定には不適である。

4) M期の長さについて

分裂指数の平均値 2.89 ± 0.08 を用い、分裂指数

$= MI = \frac{Nm}{N} \log_2 \times \frac{t_m}{t_g}$ から計算されたM期の平均の長さ (t_m) は 0.69 ± 0.04 時間であり、標準偏差は0.02時間でありCVは2.89%である。

5) G_2 期の長さについて

$t_{g_2} + \frac{t_m}{2}$ の長さが実測によつて第1の山の上行脚の1/2の高さ (49%) において求められた。この値と t_m の長さから t_{g_2} の長さが計算された。平均値及び標準偏差はそれぞれ1.71及び ± 0.05 時間であり、この方法ではCVは2.93%でかなり小さい。

6) G_1 期の長さについて

$t_{g_1} = T_g - (t_s + t_m + t_{g_2})$ として計算によつて求められた。平均値は5.07時間であり、標準偏差は0.42時間CVは8.30%にも達し精度は分裂各期のうちで最も低い。

7) 世代時間及び分裂各期の信頼度の比較

世代時間及び分裂各期の信頼度を第1の山についてCVを基準にして比較すると $t_g, t_{g_2}, t_m, t_s, t_{s_1}$ の順序となり t_s が最も高く t_{g_1} が最も低い。 t_g, t_{g_2}, t_m, t_s など実測に基づいて得られた値の信頼度はかなり高く、CVが約3%以下にとどまるのに反し、計算だけによつて求められる t_{s_1} の信頼度は急激に低下して8.30%となる。 t_{g_1} の信頼度の低さは世代時間又は他の分裂各期の誤差が加算されて来ることに基づいているが、そのほか ^3H -thymidine 投与後の時間の経過が長いことにも原因が求められる。

8) 図2について

図2に標識分裂細胞の百分率の経時的変動の95%における信頼限界を図示する。一般に信頼度は ^3H -thymidine 注射後の時間の経過と共に低下し誤差の範囲が広がる傾向を示す。最も誤差の少ないのは第1の山の頂上でこの平均値は98%でCVは0.9%である。第1の山と第2の山の谷の平均は21.1%で標準偏差は4.8%でありCVは大きく22.9%である。第2の山は上行脚、下行脚、頂上値共に第1の山に比べて巾広く誤差が大きい、とくに頂上値と下行脚の誤差は著しく大きくなる。

考 察

このようにして得られた世代時間、分裂各期の長さは上記の一定の条件で得られた精度であり、その腫瘍細胞個有の世代時間及び分裂各期の長さであるということは出来ない。なぜならば、その腫瘍細胞が個有の世代時間を保持でき、対数増殖を営むことができるのは、広い容積の発育環境及び一定の栄養が絶えずに保たれていなければならない。

腫瘍の発育と共に蛋白質⁶⁾、糖質⁷⁾の量の変動する生体内では、腫瘍細胞の発育に必要な栄養条件が段々に変化する。又細胞増殖によつて細胞数が増加するにつれて相対的に容積がせまくなる。増殖細胞は一般に一定のDNA量の合成が行なわれないかぎり分裂に結びつかないため、環境の変化につれて世代時間は漸次変化する。従つてその腫瘍細胞の世代時間はその遺伝的個性と環境との相関に基づいて決定されるもので、生体内では一定の値が長期間保持されることはむづかしく、この世代時間も一定の大きさのラット腹腔内の一定の腫瘍細胞数の世代時間であると考えなければならない。

結 論

1) 128±4g前後のドンリュウラットの腹腔内に 2×10^7 箇の細胞移植後3.5日のAH13Rの腹水腫瘍を用い³H-thymidine 100 μ Ciを腹腔内に注射し、12例中のpulse labelingの成立した9例について標識分裂細胞の百分率の時間的変動をグラフ上にプロットして世代時間及び分裂各期の長さを測定した。³H-thymidine注射後、時間の経過と共に信頼度は低下する。

2) 95%の信頼度における長さの範囲(時間)は

$$t_g = 16.78 \pm 0.35 \quad t_s = 9.31 \pm 0.23$$

$$t_m = 0.69 \pm 0.04 \quad t_{g_2} = 1.71 \pm 0.14$$

以上CVは約3%以下であり

$$t_{g_1} = 4.54 \pm 0.21$$

でCVは8.30%で信頼度は低い。

3) 標識後2回目の細胞周期、世代時間、分裂各期の長さを測定に加えた場合、その信頼度は著しく低下する。

4) このようにして得られた世代時間、分裂各期の長さは上記の一定の条件下で得られた精度であり、その腫瘍細胞個有の世代時間、分裂各期の長さということは出来ない。この理由に関しては後報で詳述する。

Reference

- 1) *in vivo* に於けるトリチウム標識化合物マイクロオートラジオグラフの精度 第1報 pulse labeling について、日本医放会誌1967年投稿中。松沢大樹、佐々木俊作、島山正。
- 2) Oehlert W., and Seemayer N., Lauf P.: Autoradiographic research on the cell generation cycle of the Ehrlich ascites carcinoma in the white mouse. *Beitr Path Anat.* 1962, 127: 63—78.
- 3) Pilgrim C.: Autoradiographic determination of the duration of DNA doubling in different cell types of mice and rats according to a new double labelling method. *Anat Anz.* 1964, 115: 128—33.
- 4) Lennartz K.J., et al.: Autoradiographic determination of the duration of DNA-doubling and the generation time in Ehrlich ascites tumor in mice by double labelling with C14 and H³-thymidine. *Z. Zellforsch* 1964, 63: 478—85.
- 5) Wegener K., et al.: Autoradiographic determination of the DNA doubling time and other division phases of the cell cycle in fetal rat cell types. *Z. Zellforsch* 1964, 63: 309—26.
- 6) Eidam C.R., Merchant D.J.: The plateau phase of growth of the L-M Strain Mouse Cell in a protein free Medium. I. patterns of protein and Nucleic acid synthesis and turnover. *Exptl Cell Res.* 1965, 37: 132—139.
- 7) Merchant, D.J., and Eidam, C.R.: The plateau phase of growth of the L-M Strain Mouse cell in a protein free medium. II. prolongation of the plateau phase by supplemental glucose. *Exptl. Cell Res.* 1965, 37: 140—146.