

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 Compaund in vivo

2. Confidence Limits of Cell Cycle

Taiju Matsuzawa and Tadashi Hatakeyama

Department of Radiation Research and Ophtalmology,

Tohoku University School of Medicine

A autoradiographic study using 3 H-thymidine has been undertakn 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 ± 4 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 diviation and the coefficient variation (CV) of the generation time and the duration of M, G₂, S and G₁ phase are as follows;

1) generation time

mean 16.78 hours standard diviation ± 0.44 hours CV 2.62%

2) duration of M phase

mean 0.69 hours standard divation ± 0.02 hours CV 2.89%

3) duration of G2 phase

mean 1.7/hours standard diviation ± 0.05 hours 2.93% 4) duration of S phase 9.3/hours standard diviation ± 0.30 hours 3.2%5) duration of G₁ phase 5.07 hours standard diviation ± 0.42 hours CV8.30%

After administration of 3H -thymidine the standard diviation of each point become larger and larger with passing time, consequently the fiducial limits of G_1 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 diviation 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 10 で述べた如く in vivo において 8 H-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 (G_1 , S, G_2 , M) の長さを測定することができる 238 . 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 8 H-thymidine による標識分裂細胞/全分裂細胞× 100 %の経時的変動を 100 %の経時的変動を 100 9の経時の変動を 100 9の経時の

実験材料及び方法

動物一第1報よりは大きい 128±48のどんりゆうラット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 援)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 100μCi 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、塗抹標本を夫々数枚作成して 3 H-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つては事前に腫瘍細胞液を用い38 $^\circ$ 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ーは第1報と同様dipping 法により行なわれた。感光乳剤『さくら』NR $-M_2$ 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月間,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。出来上がつた標本について次の検査を行なつた

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. 分母となった腫瘍細胞は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 20 の方法によつて世代時間 (t_g) , G_2 期の長さ (t_{g_2}) ,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.

$$\frac{Nm}{N} = \log c 2 \times \frac{t_m}{t_g}$$
から
 t_m を計算によつて求めた.

 G_1 期の長さ (t_{g_1}) は $t_{g_1}=t_g-(t_{g_2}+t_s+t_m)$ 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 ⁸H-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ので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って行なった

$$ar{x}=rac{\sum\limits_{i}^{\Sigma}Xi}{n}$$
 ……平均値(sample mean) $Xi=\mathcal{E}\lambda\mathcal{E}\lambda\mathcal{O}$ 標本 $n=$ 標本数 $S^2=rac{\sum\limits_{i}^{\Sigma}Xi^2-\left(\sum\limits_{i}^{\Sigma}Xi\right)^2/n}{n-1}$ ……分散(mean variance) $S=\sqrt{S^2}$ ……標準偏差 (standard diviation) $Sar{x}=\sqrt{rac{S^2}{n}}=rac{S}{\sqrt{n}}$ ……標準誤差 (standard error) $CV=rac{100S}{ar{x}}$ ……偏位係数 (coefficient of variation or coefficient of variability) $95\%\mathcal{O}$ 信頼限界(confidence interval) $=ar{x}\pm t_{0.05}\times Sar{x}$

1) 標識指数ついて

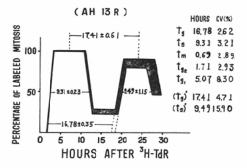
pulse labelingが成立した 9 例について ⁸H-thy_midine 注射後40分の標識指数を求めると平均値及び標準偏差はそれぞれ50.4%,及び± 1.4%となる.

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)		
		tg	t _s	t _m	t _{g2}	t _{g1}	(t _g ')	(t_s')
$ \begin{pmatrix} X = \frac{\Sigma Xi}{n} \end{pmatrix} $	(Hours)	16. 78	9. 31	0.69	1.71	5. 07	17. 41	9. 49
Standard, Diviation $ \begin{pmatrix} \Sigma Xi^2 - (\Sigma Xi) \\ S = \frac{i}{n-1} \end{pmatrix} $		0.44	0.30	0.02	0.02	0.42	0.82	1.51
$ \left(S\bar{x} = \sqrt{\frac{S^2}{n}}\right) $	(Hours)	0.15	0.10	0.006	0.006	0.14	0.27	0.50
95% Confidence Interval		16.39	9. 08 ~	0.65	0.65	4.87 ~	16.80	8. 34 ~
$(\bar{x}t_{005} S\bar{x})$	(Hours)	17.13	9.54	0.73	0.73	5.29	18.02	10.64
Coefficient of Vari $\left(\frac{100S}{\bar{x}}\right)$	(%)	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 ⁸H-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 tg とし、第1の山の中点と第2の山の中点を結ぶ 時間を tg '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 tg 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、tg′の値は 17.41±0.61時間で 標準偏 差は0.82時間である. tg とtg'との間には有意 の差は認められないが、(tg)'は tgに比べて標準 偏差が大きく従つて偏位係数 (CV) = (coefficient of varation)が tg の約 1.8倍大きくなつている. CVの値は測定者の技術の程度によつても左右さ 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 tg 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 ')てした。 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 t_s t_s 1.51時間でありはるかに大きい。CVは t_s t_s t_s 2.21%であるの衝 t_s 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

 $= MI = \frac{Nm}{N} \log_{c} 2 \times \frac{t_{m}}{tg}$ 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) G₂ 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就び ± 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) G₁ 期の長さについて

 t_{g_1} = $Tg-(t_s+t_m+t_{g_2})$ 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_{22} , t_m , t_s , t_{31} の順序となり t_s , が最も高く t_{31} が最も低い、 t_g , t_{32} , 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_{31} の信頼度は急激に低下して8.30%となる。 t_{31} 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 3 H-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 ⁸H-thymidine 注射後の 時間の経過と 共に低下し 誤差の範囲が広くなる傾向を示す. 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 C V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 C V 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が,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⁾ の量が変動する生体内では,腫瘍細胞の発育に必要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) $128\pm4g$ 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 3 H-thymidine 100μ 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。 3 H-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 $t_g=16.78\pm0.35$ $t_s=9.31\pm0.23$ $t_{m}=0.69\pm0.04$ $t_{g_2}=1.71\pm0.14$ 以上C V は約3%以下であり $t_{g_1}=4.54\pm0.21$

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 ミ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,畠山正:
- 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.
- 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 Anaz. 1964, 115:128—33.
- 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. 1. patterns of protein and Nucleic acid synthesis and turnoner. Exptl Cell Res. 1965, 37:132—139.
- 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.