

| | |
|--------------|---|
| Title | X線および中性子を照射された培養細胞の映画法による動態解析 |
| Author(s) | 奥村, 寛; 小野沢, 正子; 佐々木, 弘 |
| Citation | 日本医学放射線学会雑誌. 1972, 31(12), p. 1286-1291 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/19639 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

X線および中性子を照射された培養細胞の 映画法による動態解析

愛知県がんセンター研究所放射線部

奥村 寛 小野沢 正子

九州大学医学部放射線基礎医学教室

佐々木 弘

(昭和46年11月13日受付)

Kinetics of Cultured Mammalian Cells Irradiated with X-rays and Neutron
Studied with Time Lapse Cinematography

Yutaka Okumura*, Masako Onozawa* and Hiroshi Sasaki**

*Department of Experimental Radiology, Aichi Cancer Center Research Institute,
Chikusa-ku, Nagoya, Japan

**Department of Experimental Radiology, Faculty of Medicine, Kyushu University,
Fukuoka, Japan

Research Code No: 400

Key Words: Cell Death, Division delay, Population Kinetics, Fast neutron, Time-lapse cinematography

A comparative study of kinetics of HeLa S3 cells irradiated with X-rays and fast neutron was performed with time lapse cinematography. Maximum division delay after irradiation with X-rays was observed when the cells were irradiated at late S and G2 phases, and was minimum at early G1 phase. The delay with neutron was unchanged through cell cycle. The cell cycle time of the irradiated generation was increased and was decreased in the successive generations for both X-rays and neutron.

The dependence of cell age at irradiation on the time of cell death was examined. The cells irradiated with X-rays at G1 and G2 phases survived longer than at S phase. Less age dependence was observed with neutron.

1. 緒 論

培養細胞におけるX線と中性子の生物学的効果は放射線感受性では中性子の平均致死線量 (D_0) および外挿値 (n) は、X線のそれよりも小さく¹⁾ ²⁾⁵⁾、酸素効果 (oxygen enhancement ratio) は中性子の方が小さい²⁾⁹⁾。また分割照射による Elkind-Sutton 型回復は中性子の方が小さいかあるいはほとんどない¹⁾³⁾⁵⁾。これらの報告はコロニー法

による結果である。コロニー法では照射後の短時間内の細胞におよぼす放射線の効果を解析することはできない。一方細胞集団の解析はこの不利を補うことができるがこの結果は細胞集団の平均値であり、個々の細胞の動態は解析できない。

映画法による解析はこれらの問題を解決できる。また映画法では個々の細胞を追跡するので、照射時の細胞令がわかり、同調を行なうことなく

細胞令と放射線効果との関係を調べることができる。従つて細胞令の同調に用いる薬剤の影響⁴⁾を問題にしなくてもすむ。

これまで映画法によりX線を照射された培養細胞の動態はいくつか報告されているが⁶⁾⁹⁾¹⁷⁾¹⁸⁾、個々の細胞の動きに主眼をおいた研究が多く、観察された細胞を集団として解析した報告は少ない。また中性子を照射された細胞を映画法により解析した結果はない。ここでは映画法により細胞の個々の動きを追跡するとともに、それらを細胞集団としての立場から解析し、今までの集団としての報告の結果と比較した。また致死障害発現という観点からX線と中性子の障害の相違を比較した。

2. 実験材料および方法

使用した細胞は HeLa S3 で、イーグルMEM に10%牛胎児血清を加えた培養液で、角ビンに入れて継代培養した。実験はいずれも継代後3~4日の指数関数的に増殖している細胞を使用した。

X線照射は島津製治療用X線装置 180KVp, 20 mA, フィルター 0.5mmAl + 0.5mmCu, 線量率 30rad/min の条件で行なつた。速中性子照射は東芝コッククロフト型装置を用い D-T 反応によつて生ずる14 MeV 中性子、線量率20rad/min で行なつた。照射線量はX線、速中性子ともに 300 rad を選んだ。細胞は95%空気 + 5% CO₂ を通気しながら、ファルコンシャーレ上に培養し、37°Cの保温装置に入れて照射した。

X線照射による細胞動態は映画撮影により解析した。映画は16mmシネカメラを顕微鏡に取付け、16mmミニコビーフィルムで1分1コマの速度で撮影した。1視野中に約50個の細胞が観察できた。撮影した映画フィルムの解析はコマ数計をつけた16mm映写機でスクリーン上に映写し細胞系図を作製した。中性子照射による解析は連続写真撮影により行ない、ニコンモータードライブカメラに35mmミニコビーフィルムを装填し、1コマ25分の間隔で連続撮影した。1視野中には約150個までの細胞が観察された。写真フィルムの解析はキャノンカルバーフィルムにプリントしてスライドを作製

し、これらをコダックのカロセル 800でスクリーン上に映写して行なつた。詳細は別に述べた¹⁾。

X線、中性子ともに、はじめに非照射の細胞を撮影して対照とし、途中で照射を行ない、その後継続して撮影した。途中でカメラの視野からはずれた細胞は解析から除外した。細胞が丸くなり2個に分かれた時点をもつて細胞分裂と判定し、細胞周期は分裂から次の分裂までを計測した。照射時の細胞令は照射前の最後の分裂から照射時までの経過時間により判定した。X線、中性子照射のいずれも致死と判定した細胞のみを解析した。細胞死は Hurwitz and Tolmach⁹⁾ の方法に従い、細胞が丸くなつた状態あるいはシャーレ壁に付着した状態で崩壊した時点をもつて判定した。

3. 結果

(1) 照射世代の細胞周期

照射時の細胞令と照射世代の細胞周期の関係を

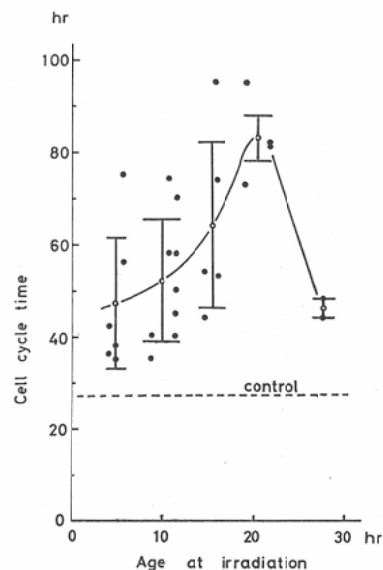


Fig. 1. Cell cycle time of the X-irradiated generation against cell age at irradiation. Each point represents of one cell. Open circles and vertical lines are mean and one standard deviation of data within the horizontal lines.

調べ、図1にX線、図2に中性子照射の結果を示した。照射世代の細胞周期の延長は分裂遅延を表わすものである。X線の場合は細胞令20時間前

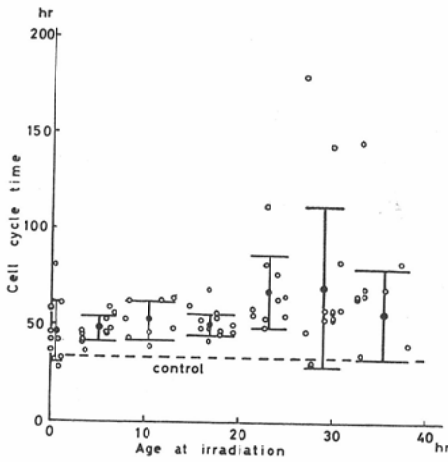


Fig. 2. Cell cycle time of neutron irradiated generation.

後で著しい分裂遅延が認められた。これに対し中性子は細胞令30時間前後の時期の標準偏差がかなり大きい、細胞令依存による遅延の差はX線より小さかった。

(2) 照射後の各世代における細胞周期の変動
照射世代を0代、照射後1度分裂した後の世代を1代、2度分裂後を2代として次の分裂に入った細胞について各世代の細胞周期をX線(図3)

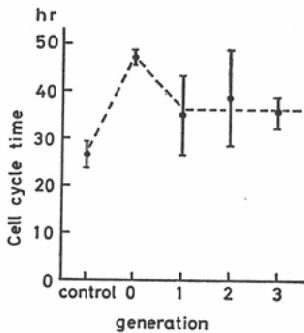


Fig. 3. Change in cell cycle time of generations after X-rays irradiation. Generation 0 is irradiated generation.

と中性子(図4)について調べた。X線では非照射の細胞周期26時間が0代は47時間に延長し、1代以後はほぼ同じ35時間前後になった。中性子照射は非照射群は平均33時間の細胞周期が0代は58時間と延長しそれ以後は次第に回復し1代で52時

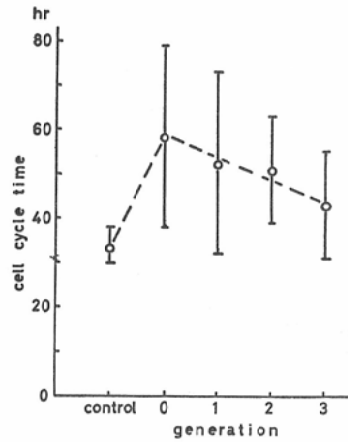


Fig. 4. Change in cell cycle time of generations after neutron irradiation.

間、2代で51時間であった。しかしX線も中性子も3代ではまだ非照射レベルまでもどらなかつた。

(3) 照射時の細胞令と細胞死の時間

観察時間内に死んだ細胞について照射時の細胞令と照射後致死障害が発現し細胞が死ぬまでの時間の関係を調べた。図5はX線、図6は中性子に

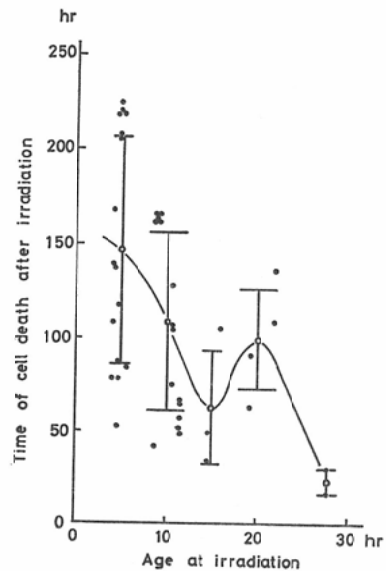


Fig. 5. Time of cell death after X-irradiation against irradiated cell age. Open circles and vertical lines are same as in Fig. 1.

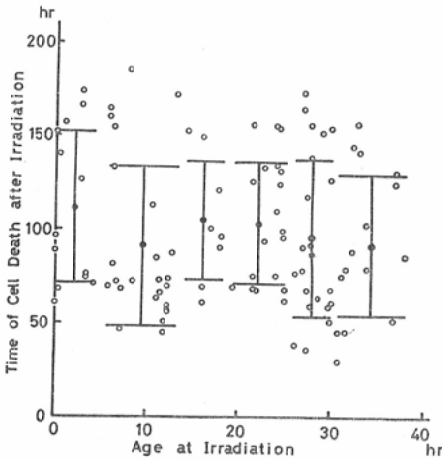


Fig. 6. Time of cell death after neutron irradiation.

ついでの結果である。X線は細胞令5時間と20時間で照射された細胞の致死までの時間が他の細胞令より長く、細胞令15時間に照射された細胞は致死までの時間が短いことが認められた。中性子については偏差が大きいがX線と比較して細胞令依存性が少ないことが観察された。

(4) 致死障害発現の経時的变化

図7に示すように細胞が1回分裂した後娘細胞

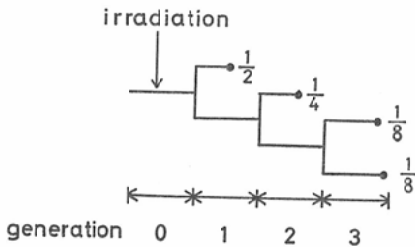


Fig. 7. Schematic representation of the lethal damage expression. Closed circles show the time of cell death. When a cell dies at first generation, fraction of lethal damage of the cell is expressed 1/2, and 1/4 and 1/8 for second and third generations respectively.

の2個のうちの1個が死んだ場合に致死障害の発現を $\frac{1}{2}$ 、2回分裂した後に1個の細胞が死んだ場合には $\frac{1}{4}$ 、すべての子孫細胞が死んだとき、および分裂を介さずに細胞が死んだ場合に致死障害は1発現したものとして、細胞集団としての致死

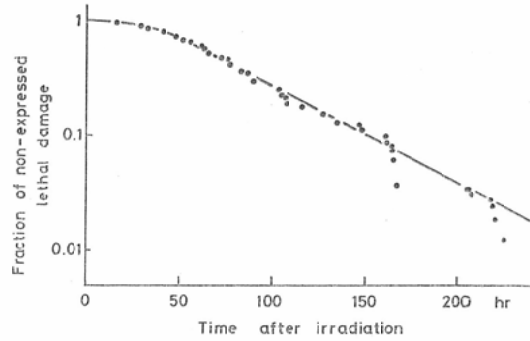


Fig. 8. Fraction of non-expressed lethal damage after X-irradiation calculated as Fig. 7.

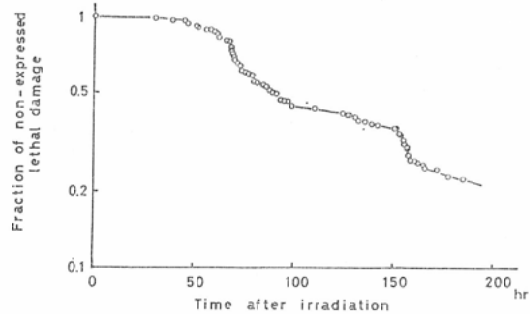


Fig. 9. Fraction of non-expressed lethal damage after neutron irradiation.

障害のパターンを経時的に調べた。図8はX線、図9は中性子照射後の致死障害未発現の割合である。X線についてはその未発現の減少は指数関数的であったが、中性子は照射後70時間と150時間前後で段階的に減少した。

4. 考 察

照射線量はX線、中性子ともに300radを選んだが、Masuda⁹⁾によるとこの線量照射による細胞生存率はX線および中性子についてそれぞれ12%と0.4%である。生物学的効果比(RBE)を考へて、いずれもreproductive deathを起す線量域であるのでこれらの結果はX線および中性子照射によるreproductive deathをおこす細胞の動態の比較である。連続写真撮影は映画撮影と比べ、視野が広く、多くの細胞が観察できる。X線照射細胞は映画撮影によつたが、中性子照射細胞は連続写真撮影に変えた。

細胞令と細胞周期の関係は Terasima and Tolmach¹⁶⁾ の報告から、この結果の G₁ 期は18.2時間、S 期 9.5時間、G₂ 期 5時間、M 期 0.5～0.7時間と推定される。

X線照射後の細胞令と分裂遅延に関する報告はいくつかあり⁶⁾¹⁴⁾¹⁶⁾、細胞の種類により多少結果は異なるが一般的には late S 期から G₂ 期における遅延が著しく、G₁ 期が一番小さい。この報告でもこれらの結果と一致した結果を得た。中性子照射による分裂遅延にはX線のような大きな細胞令依存性は認められなかった。なお、中性子照射による分裂遅延の周期依存の詳細については、さらに視野を広くし、多くの細胞について検討中である。X線における分裂遅延は分裂機構に受けた障害の回復に必要な時間と考えられているが、中性子においてこの細胞令依存性が少ないのは、分裂遅延という障害を細胞の各ステージで同じ程度に受けることが考えられる。

照射後の各世代の細胞周期を比較した結果はX線、中性子とも細胞周期の延長が著しく、1度分裂以後の細胞周期には順次回復が認められた。0代の細胞周期の延長は、X線については主にS期からG₂期の分裂遅延、中性子については細胞の各ステージでおこつた遅延によるものである。

照射時の細胞令と細胞死までの時間の関係はX線ではG₁期とG₂期が長くS期は短い。これは Terasima and Tolmach¹⁶⁾ による細胞令と細胞の生残率との相関とよく対応した。G₁期およびG₂期で照射された細胞は長時間生残している間に受けた障害からの回復が行なわれ、結果的にコロニー形成能が高く、S期で照射された細胞は致死が時間的に早く現われるため、コロニー形成による生残率も低いと考えられる。中性子照射による細胞令とコロニー形成能の関係は Masuda¹⁰⁾ がL細胞での実験を報告しており、細胞令依存性はX線と比較して非常に小さいという結果を得ている。この報告の中で細胞死は細胞令に無関係に、平均して発現しているのが認められた。

分裂遅延、コロニーによる生存率、細胞死の現われる時間などの障害に対して中性子はX線と比

較して細胞令依存性が低いことが特徴として認められた。X線の細胞令依存性は各周期における障害の大きさの違いと、受けた障害からの回復能の違いが考えられる。障害の大きさに影響をおよぼすものの1つにSH量が考えられる¹¹⁾。中性子での回復能の問題は、分割照射法による Elkind-Sutton 型の回復で調べられており、in vivo ではX線と変わらないという報告もあるが⁷⁾、in vitro ではほとんど回復がないかあるいは非常に小さいこと¹³⁾¹⁵⁾、および生残率曲線における外挿値が1、あるいは1に近いことより、X線と比較して回復能の低いことが考えられる。以上のことより中性子の障害の細胞令との相関性が小さいのは各周期における障害の大きさが同程度であることと、それらの障害からの回復の少ないことを反映しているのではないかと考えられる。

照射された細胞が分裂して死ぬ場合、2個の娘細胞の死ぬ時間が異なる時、どちらを親細胞の致死発現とするかは決められない。そこで一方の娘細胞が死んだとき親細胞の1/2が致死として発現したと考えた。これは照射細胞の致死時間の平均を求めることになる。これは分裂する細胞集団の統計的処理の一つである。生物学的に考察する場合、親の致死障害がどのように娘細胞に伝達するかはわかっていない。またその致死障害が致死として発現する過程が未解決である現在、この解析方法は生物学的に発展されるべきものである。これまでX線を照射された細胞集団を取扱つた実験で、低線量域から10 K rad 以下の線量の範囲で障害の発現がいずれも指数関数的であるという結果が得られている¹²⁾。映画法より求めた結果が図8であるが、集団として細胞を扱つた結果と一致した。これに比べて中性子照射後の致死障害発現は段階的でX線のようなランダム性は認められなかった。中性子の障害の段階的な発現の周期は約70時間であり、この周期が照射後の細胞周期とほぼ一致することから中性子照射後の致死障害は細胞周期と何らかの関係を持つていないかと推定できる。放射線障害を受けた細胞は非照射より遅い速度で細胞周期をまわることが分裂期までく

ると分裂を完了することができずにそこで致死障害の多くが発現すると考えられ、障害の少なかった細胞は分裂を終了して G_1 期に入ることができ、次のM期まで達した時に致死が発現すると考えられる。

5. 結 論

X線および速中性子を照射された HeLa S3 細胞の動態を映画法で解析することによりX線と中性子の障害の比較を行なった。分裂遅延はX線は G_1 期で照射された細胞は小さく、late S期から G_2 期で照射されたものは大きかった。中性子はX線のような細胞令依存性は少なく、周期のどの時期で照射されてもほぼ同じ割合で遅延した。照射後の細胞周期はX線、中性子ともに照射世代の延長が著しく、1度分裂以後は次第に非照射の値に近くなった。細胞令と細胞死の出現までの時間との相関はX線では G_1 期および G_2 期で照射された細胞は長く、S期で照射された細胞は早く死ぬことが認められたが、中性子を照射された細胞はX線のような細胞令との関係は認められなかった。致死障害発現の経時的变化をみると、X線はランダムに発現したが中性子は約70時間の周期で段階的に発現することが認められた。

(この論文をまとめるにあたり有益な討論をして下さった松沢大樹博士に感謝致します。本研究は文部省科学研究費の援助によって行われた。)

文 献

- 1) Broerse, J.J. and Barendsen, G.W.: Recovery of cultured cells after fast neutron irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 15 (1969), 335—339.
- 2) Broerse, J.J., Barendsen, G.W. and Kersen, G.R.: Survival of cultured human cells after irradiation with fast neutrons of different energies in hypoxic and oxygenated conditions. *Int. J. Radiat. Biol.* 13 (1968), 559—572.
- 3) Caldwell, W.L., Lamerton, L.F. and Bewley, D.K.: Increased sensitivity of in vitro murine leukaemia cells to fractionated X-rays and fast neutrons. *Nature* 208 (1965), 168—170.
- 4) Dewey, W.C., Furman, S.C. and Miller, H.H.: Comparison of lethality and chromosomal damage induced by X-rays in synchronized Chinese hamster cells in vitro. *Rad. Res.* 43 (1970), 561—581.
- 5) Evans, R.G., Pinkerton, A., Djordjevic, B., Mamacos, J., and Laughlin, J.S.: Changes in biological effectiveness of a fast neutron beam with depth in tissue equivalent material. *Rad. Res.* 45 (1971), 235—243.
- 6) Froese, G.: Division delay in HeLa cells and Chinese hamster cells. A time-lapse study. *Int. J. Rad. Biol.* 10 (1965), 353—367.
- 7) Hornsey, S. and Silini, G.: Recovery of tumor cells cultured in vivo after X-ray and neutron irradiations. *Rad. Res.* 16 (1962), 712—722.
- 8) Hurwitz, C. and Tolmach, L.J.: Time lapse cinematographic studies of X-irradiated HeLa cells. I. Cell progression and cell disintegration. *Biophys. J.* 9 (1969), 607—633.
- 9) Masuda, K.: Effects of 14 MeV neutrons on the reproductive capacity of HeLa S3 cells. *J. Rad. Res.* 9 (1968), 116—128.
- 10) Masuda, K.: Survival of synchronized L cells irradiated with 14 MeV neutron. *Int. J. Radiat. Biol.* 19 (1971), 85—86.
- 11) Ohara, H. and Terasima, T.: Variations of cellular sulfhydryl content during cell cycle of HeLa cells and its correlation to cyclic change of X-ray sensitivity. *Exptl Cell Res.* 58 (1969), 182—185.
- 12) Okumura, Y.: unpublished data.
- 13) Sasaki, H. and Yoshinaga, H.: Cinemicrographic and photographic observation of HeLa cells irradiated with X-rays and fast neutrons. *J. Rad. Res.* (to be published).
- 14) Schneider, D.O. and Whitmore, G.F.: Comparative effects of neutron and X-rays on mammalian cells. *Rad. Res.* 18 (1963), 286—306.
- 15) Sinclair, W.K.: Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro. *Rad. Res.* 33 (1968), 620—643.
- 16) Terasima, T. and Tolmach, L.J.: Variations in several responses of HeLa cells to X-irradiation during the division cycle. *Biophys. J.* 3 (1963), 11—33.
- 17) Thompson, L.H. and Suit, H.D.: Proliferation kinetics of X-irradiated mouse L cells studied with time-lapse photography. Experimental method and data analysis. *Int. J. Rad. Biol.* 13 (1967), 391—397.
- 18) Thompson, L.H. and Suit, H.D.: Proliferation kinetics of X-irradiated mouse L cells studied with time-lapse photography. II. *Int. J. Radiat. Biol.* 15 (1967), 347—362.