



Title	吉田腹水肉腫の細胞周期について : Autoradiographによる研究
Author(s)	戸部, 竜夫; 加藤, 敏郎; 平井, 栄長 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1964, 24(2), p. 91-94
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19915
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

吉田腹水肉腫の細胞周期について (Autoradiograph による研究)

群馬大学医学部放射線医学教室 (主任 戸部竜夫教授)

戸部 竜夫 加藤 敏郎
平井 栄長 弥富 晃一

(昭和39年3月10日受付)

On the Cell Cycle of Yoshida Ascites Tumor. An autoradiographic study.

By

Tatsuo Tobe, Toshio Kato, Eicho Hirai and Koichi Yatomi.

Department of Radiology, School of medicine,

Gunma University, Maebashi, Japan.

(Director: Prof. T. Tobe)

The generation time and the duration of each phase of cell cycle in Yoshida ascites tumor, 4 days after inoculation, were investigated using autoradiography with $^3\text{HTDN}$.

Successive samples of tumor cells were aspirated from individual male rats, injected 100 μc (2.5 C/mM) of $^3\text{HTDN}$ intraperitoneally, and prepared for autoradiography by the stripping technique.

The percentage of labeled metaphase cells, labeling and mitotic indices were determined in each sample, and the estimates of the following were obtained.

1. The mean generation time to be 19 hours.
2. The average duration of DNA synthetic time (S), post-DNA synthetic time (G_2) and mitotic time (M) to be 12.4 hours, 5.5 hours and 45 minutes respectively.
3. Pre-DNA synthetic time (G_1) to be negligible.

緒 言

Thymidine がDNA合成の特異的前駆物質であることは既に Friedkin らによつて証明されており¹⁾, 従つて $^3\text{H-thymidine}$ ($^3\text{HTDN}$) はDNA合成の研究に当つて好適な材料として使用されている。一方DNAの合成が細胞分裂に入る前の或る限られた期間に行なわれることも衆知のことである^{2)~4)}。即ち $^3\text{HTDN}$ 摂取細胞の経時的観察によつて細胞周期 (cell cycle) の測定が可能である^{5)~7)}。

所謂 G_1 , S, G_2 , M 期の長さが各種生物・細胞について測定されているが、その値は生物及び細胞の種類によつて著しい差を示しており^{6)~14)}、吉田肉腫の世代時間 (generation time) についても諸家の報告は必ずしも一致していないようである。

我々は吉田肉腫細胞に対する放射線の影響を従来種々の角度から検討して来たが、 $^3\text{HTDN}$ を用いた現在進行中の一連の実験に当つては、先ずその cell cycle を明確にする必要があるので以下

の如き実験を行った。

実験材料並びに方法

体重約 120 g の埼玉系雄性ラットの腹腔内に約 4×10^7 個の吉田腹水肉腫細胞を移植後 4 日目に実験を行なった。(このような移植条件では 3 ~ 4 日目に純培養状態となり 8 ~ 10 日目に腫瘍死を遂げる。)

$^3\text{HTDN}$ (Radiochemical Centre, Amersham, England; 2.5C/mM) $100\mu\text{c}$ をラットの腹腔内に注入し、注入直前及び注入後 30 分から 30 分 ~ 2 時間毎に 47 時間まで腹水を穿刺し、塗沫標本を作成する。メタノール固定、乾燥後ストリップ法により氷室(約 +4°C)内で 7 日間露出して autoradiograph を作成し(Fuij ET-2E 原子核乾板使用)、ギムザ染色を施し次の 3 項目について観察した。

1) labeling index :

全腫瘍細胞 1,000 個中の黒化銀粒子陽性細胞数を % として表わす。

2) percentage of labeled metaphase cells:

有糸核分裂中期細胞 100 個中の黒化銀粒子陽性細胞数を % として表わす。

3) mitotic index :

全腫瘍細胞 1,000 個中の有糸核分裂細胞数を % として表わす。

尚、各標本について細胞を含まない任意の数個所における $100\mu\text{m}^2$ 当りの黒化銀粒子数を測定し、その平均値を back ground とした。その値は大部分の標本において大略 2 個であつたので、黒化銀粒子数 3 個以上のものを摂取陽性とした。残余の一部標本においては back ground が更に多く、この場合には個々の標本について得られた値を以つて back ground とした。このような実験方法によるときは陽性細胞核上の黒化銀粒子数は $^3\text{HTDN}$ 注入後の経過の前半では平均約 15 個であるが、後には減少して大略半数程度であつた。

実験結果

使用したラット 3 匹について得られた成績は極めてよく一致した。

1) labeling index :

$^3\text{HTDN}$ 注入後 30 分では約 30% で未だ飽和に達

せず、1 時間後では夫々 44%, 44.2%, 45% で平均 44% となりその後は多少の変動を示すが全観察期間に亘つて概ねこの値を維持する。従つて、 $^3\text{HTDN}$ の腹腔内における有効時間は 1 時間以内と考えられるので S 期の算出に際しては有効時間を 1 時間として補正を行ない、labeling index も 1 時間後の平均値 44% を用いた。

2) percentage of labeled metaphase cells :

全分裂中期細胞中に占める黒化銀粒子陽性細胞の割合を経時的に示すと図の如くなる。

即ち、陽性細胞は $^3\text{HTDN}$ 注入後 1 時間では未だ認められず、1.5 ~ 2 時間目に出現し始め、5% 以下である。以後急速に増加し 10 時間目に最高値の 92% となり、9 ~ 12 時間目には大略一定値を示すものと考えられる。以後次第に減少し 23 時間前後において最低となり、その傾斜は注入後最高値に到達する上昇曲線に比して緩かであつて非対称性を示す。23 時間以後、曲線は再び上昇し 29 時間頃に第 2 の山に達し以後再び下降して約 38 時間目に谷を、約 45 時間目に第 3 の山を作る。

このように黒化銀粒子陽性細胞の率が最高 92% に止まり 100% に達しないのは、 $^3\text{HTDN}$ の β 線エネルギーが低い (18KeV) ために、その一部はフィルム上に達して粒子形成にあづかることなく検出から免がれること、又分裂前の中間期に止まる細胞及び多倍体細胞の存在によるものであることが言われている。事実本実験においても一部の標本にあつては 100 個又はそれ以上の粒子を算する細胞は数% に達することがあるのを観察した。

第 2 の山が第 1 の山よりも低いのは、 $^3\text{HTDN}$ を摂取した分裂中期細胞の出現が世代を重ねるにしたがつてますます asynchronous となつて行くことが主な原因であろう。

3) mitotic index

各例とも全期間中 25 ~ 31% であつた。そこで M 期の算出に際しては $^3\text{HTDN}$ 注入 1 時間後の 3 例の値 (26%, 28%, 31%) の平均 28% を用いた。

以上の観察結果から汎のことが知られる。

Generation time は図の第 1 の曲線と第 2 の曲線の相対応する 2 点間の時間として与えられる

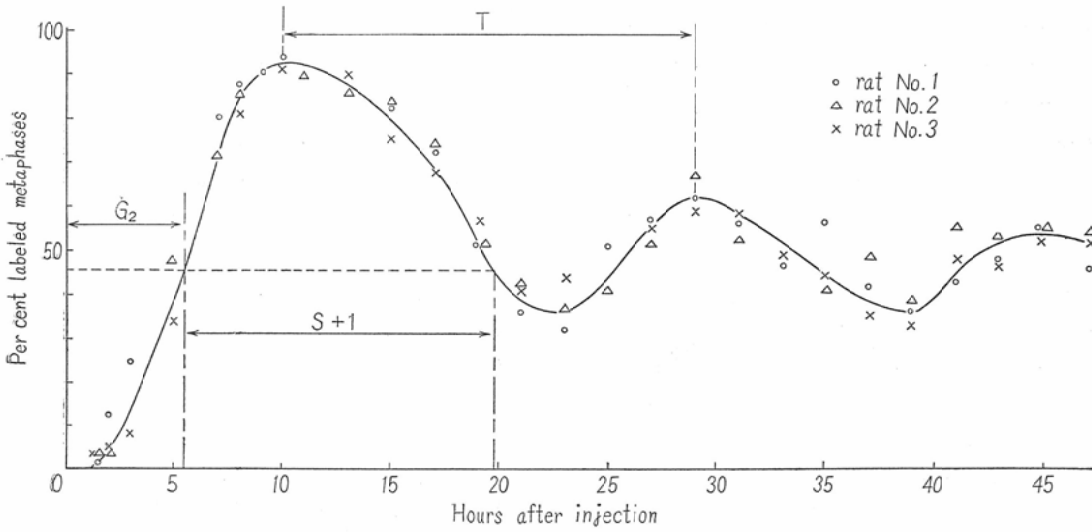


Fig. 1. The percentage of labeled metaphase cells at various intervals after intraperitoneal injection of ³HTDN. Each symbol represents a single animal and the curve is drawn free-hand. T: generation time. S: DNA synthetic time. G₂: post-DNA synthetic time.

から第1のピーク10時間目と第2のピーク29時間目をとると、その値は約19時間となる。

又注入後黒化銀粒子陽性中期細胞の出現し始める迄の時間はDNA合成完了時から中期までの最短時間、即ちminimum G₂であり、第1の曲線の肩即ち plateauの始まるの部分に達する迄の時間は maximum G₂であって、第1のピーク値の半ばに達する迄の時間として定義される average G₂ は約5.5時間と実測される。

DNA合成期Sは実測した値をもとに式(1)から算出される¹⁰⁾。

$$L_{corr.} = \log_e 2 \cdot S/T \dots\dots\dots (1)$$

但し T: generation time (19h)

L_{corr.}: labeling index の補正值

L_{corr.} は実測された L_{exper.} 即ちlabeling index (44%), maximum percentage of labeled metaphase cells (92%), ³HTDN の腹腔内における有効時間 t (1h) 及び generation time T (19h) から式(2)によって求められる⁷⁾。

$$L_{corr.} = L_{exper.} \cdot 100/\max. \text{ percent of lab. meta.} \cdot (1-t/T) \dots\dots\dots (2)$$

即ち、S期は12.4時間となる。一方第1の山の

上昇脚と下降脚の中央高を示す時間の差は約14時間であつてこれは近似的に(S+1)時間と等しいからS期は13時間となり、計算で求められたS期とよく一致する。

分裂時間MはSの場合と同様な式(3)によつて約45分と求められた。

$$m.i. = \log_e 2 \cdot M/T \dots\dots\dots (3)$$

但し m.i.: mitotic index (28%)

以上の結果から S, G₂, M の和は 18.65時間であつて generation time の実測値19時間と略々等しく、従つて labeling index や mitotic index の変動を考慮に入れても G₁ は近似的に 0 と見做しうる。

考 案

腫瘍の増殖は細胞分裂によつて行なわれ、従つてその動態を律するものは主として分裂から分裂までの時間即ち generation time 又は doubling time であることは論を俟たない。

実験腫瘍の generation time の測定には種々の方法が試みられているが、autoradiograph 法は generation time は勿論 celly cycle の各期の長さをも知りうる点ですぐれている。我々は吉

田腹水肉腫が asynchronous, exponential growth を営む際の cell cycle について述べた。

吉田肉腫の generation time に関しては諸家の報告がある。即ち、佐藤ら¹⁶⁾はその一定期間内における細胞数の増加の態度を検索して16時間、岡田・牟田¹⁷⁾はX線照射後の核分裂像消失時間に基いて16~44時間、松本¹⁸⁾は細胞分裂係数の周期的変動から16時間という値を得ている。これらの差異は実験方法のみならず実験条件、即ち、動物の系統、肉腫の株、又移植後日数等によつて生じたものであろう。入手時間の異なるラットを用いて行つた別の実験では事実我々は、やゝ長い generation time 21時間という成績を得たが、Klein & Revesz¹⁹⁾も Ehrlich 癌の generation time が移植数日数によつて著しく変動することを明かにしている。

我々の成績は約19時間であつて、その実験方法が異なるにも不拘佐藤ら及び松本の成績と類似しており、大略この値が吉田腹水肉腫の代表的 generation time と考えられる。

Cell cycle を構成する各時期に関しては、本邦では核分裂時間に関する報告があるのみである。それらは generation time の測定の場合と同様に実験方法や条件に差異があることにもよるが、約50~140分という広範囲に亘る値が報告されている。(広野²⁰⁾, 牧野・中原²¹⁾, 佐藤ら¹⁶⁾, 小原²²⁾, 岡田・牟田¹⁷⁾, 松本¹⁸⁾) 我々は generation time 及び mitotic index の実測値から算出して約45分なる値を得た。これは諸報告中最短の時間であるが、S期の計算値(12.4時間)がその実測値(13時間)と極めてよく一致することは我々が計算に用いた式(1), (3)の信憑性を物語るものであり²³⁾, 同時に又吉田腹水肉腫細胞の指数函数的増殖を首肯させる。

一方 G₁ 期は事実上 0 と見做し得、これは Hornsey ら⁴⁾が Ehrlich 癌において観察した成績と一致しており、吉田腹水肉腫の悪性度を裏書

きしているものと思われる。これは又放射線の作用点を考究するに当つて銘記さるべきことである。

総 括

吉田腹水肉腫の cell cycle を ³HTDN を用いた autoradiograph 法によつて測定し、generation time 19時間、G₁ 期 0.5時間、S 期 12.4時間、G₂ 期 5.5時間、M 期 45分という結果を得た。

本論文の要旨は第148回日本医学放射線学会関東部に発表した。

文 献

- 1) Friedkin, M., Tilson, D., & Roberts, D.: J. Biol. Chem., 220 : 627, 1956. —2) Howard, A. & Felc, S.R.: Heredity (Suppl.) 6 : 261, 1953. —3) Lajtha, L.G., Oliver, R., & Ellis, F.: Brit. J. Cancer 8 : 367, 1954. —4) Hornsey, S., & Howard, A.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 63 : 915, 1956. —5) Cronkite, E.P., Bond, V.P., Fliedner, T.M., & Rubini, J.R.: Lab. Invest. 8 : 263, 1959. —6) Painter, R.B., & Drew, R.M.: Lab. Invest. 8 : 278, 1959. —7) Monesi, V.: J. Cell. Biol. 14 : 1, 1962. —8) Sherman, F.G., & Quastler, H.: Exptl. Cell Research. 17 : 420, 1959. —9) Edwards, J., Koch, A.L., Youcis, P., Freese, H.L., Laite, M.B., & Donalson, J.T.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 7 : 273, 1960. —10) Stanners, C.P., & Till, J.E.: Biochim. Biophys. Acta. 37 : 406, 1960. —11) Kuyper, C.M.A., Smetes, L.A., & Pieck, A.C.M.: Exptl. Cell Research. 26 : 217, 1962. —12) Bender, M.A., & Prescott, D.M.: Exptl. Cell Research. 27 : 221, 1962. —13) Fry, R.J.M., Leshner, S., & Kohn, H.I.: Exptl. Cell Research 25 : 469, 1961. —14) Pilgrim, C., & Maurer, W.: Naturwissenschaften 49 : 544, 1962. —15) Oehlert, W., Lauf, P., & Seemayer, N.: Naturwissenschaften 49 : 137, 1962. —16) 佐藤春郎, 熱海明, 佐藤博, 中村久也: 癌, 43 : 303, 1952. —17) 岡田重文, 牟田信義, 日医放射線会誌, 14 : 79, 1954. —18) 松本健二: 日医放射線会誌, 17 : 1281, 1958. —19) Klein, G., & Revesz, L.: J. Nat. Cancer Inst. 14 : 229, 1953. —20) 広野巖: 癌, 41 : 201, 1950. —21) 牧野佐二郎, 中原皓: 癌, 43 : 302, 1952. —22) 小原準之輔: 日医放射線会誌, 15 : 624, 1955. —23) Smith, C.L., & Dendy, P.P.: Nature 193 : 555, 1962.