OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	培養液中の血清濃度とX線照射された細胞の生存率
Author(s)	増田, 康治
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1970, 29(12), p. 1484-1487
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20604
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

培養液中の血清濃度とX線照射された細胞の生存率

九州大学医学部放射線基礎医学教室（主任 吉永春馬教授）
増田康治

（昭和44年7月17日受付）

Media and Surviving Fraction of X-irradiated HeLa S3 Cells

K. Masuda
Department of Experimental Radiology, Faculty of Medicine, Kyushu University

The effect of serum on the reproductive capacity of X-irradiated HeLa S3 cells was studied, using single cell culture method and Eagle MEM supplemented with 5% or 20% calf serum. It was found that the survival rate depended on the serum concentration within 24 hours after irradiation. Although the feeder layer (2×10^3 R irradiated 1×10^4 HeLa cells) changed the survival rate of cells cultured in 5% calf serum, no effect on the survival rate of cells cultured in 20% calf serum was observed. It was suggested that the serum affected the radiosensitivity of the cells by modifying the course of damage received by irradiated cells.

緒　言

放射線生物学は哺乳動物細胞の利用によつて最近急速に進歩した．特に障害の回復については Elkind らの報告[1]以来，多くの研究がなされている[2]．一方線量効果関係の解析[3]，あるいはそれを修飾する因子の解析を通じて[4]放射線障害の発生機構をさぐろうとする研究も多い．

放射線照射に対する細胞の生存率が培養液の状態によつて影響されるかどうかについては，Hollaender and Stapleton[5]が E. coli を用いて生存率が培養液によつて影響されることを初めて報告した．哺乳動物細胞については，Puck ら[6]が HeLa S3 細胞を用いて，栄養分を除去すると細胞の分裂能を抑えるが，コロニー形成能には影響しないと報告している．その後培養液が線量効果関係を修飾する因子の1つとしてとり上げられ Chinese hamster の ovary cell[7]，マウスの白血病細胞[8]，あるいは廿日ねずみの fibroblast[9]を用いて，培養液が細胞生存率，分裂能にどのように影響するかが検討されてきた．

それらによると，培養液の状態が生存率に影響するのは照射前あるいは後であり，照射中の培養液の状態の変化は生存率に影響しない．照射前の影響の仕方については，1) 細胞集団の分布を変える，2) 何らかの機構によつて細胞の感受性，あるいは照射後の回復能に影響する等のことが考えられる．Hahn らの報告[7]は前者の可能性を示唆するものである．つまり培養液中の血清の濃度を15%から5%にすると，分裂時間，特に G_1 期の時間が延長する．この G_1 期は放射線に比較的耐性と考えられている時期であり，この期の細胞が細胞集団中で多数をしめると細胞集団の生存率は上昇する．

ここでは培養液に含まれる血清の濃度のちがいが HeLa S3 細胞の放射線障害を修飾するかどうか，特に照射後の培養液の影響とその作用機構とについて検討し，照射後の細胞の動態について考察した．

実験方法

材料：子宮頸部癌由来細胞 HeLa S3 を常用した．培養液は Eagle MEM[10]に仔牛血清を添加して用いた．20%仔牛血清添加培養液で継代された細胞を実験に供した．照射は浮遊状態で行い，照射後5 ml の培養液を入れたシャーレ内に移植し

た．判定は培養14日目に固定，染色して50コ以上の細胞から出来ているコロニーを生存細胞由来コロニーとして計数した．詳細は他書にゆずる[11]．

照射： 180kVp (80kVeff) X線，線量率92.5 rad/分．照射前，中，後にわたり95% O_2＋5 %CO_2を通気しながら，37℃で照射した．

実験の一部においては，2×10^3R 照射された細胞をシャーレ当り 1×10^4 コずつ feeder layer として，細胞移植24～36時間前に移植した．

実験結果

1． 血清濃度と線量効果関係

照射前，中の血清濃度を20%とし，照射直後に一群は5%血清添加培養液に，他の一群は20%血清添加培養液に移植して両者の生存率を比較した．その線量効果関係を図1に示す．この実験で細胞移植率は5%血清添加培養液に移植した群の方が20%血清群よりも低かつたが，生存率は図1から判るように，5%血清群が高い．

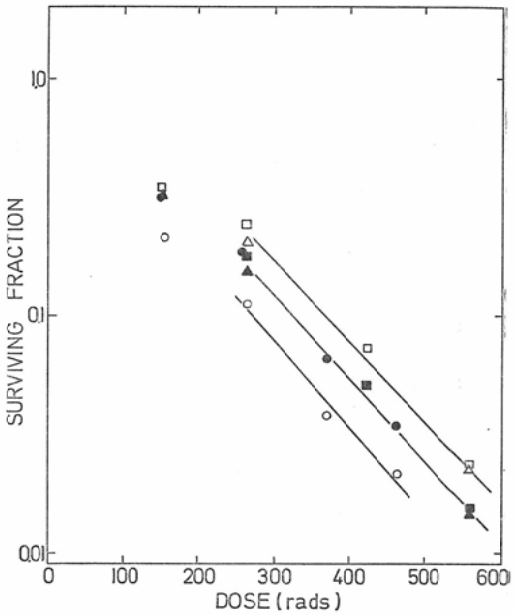
照射前～中，照射後24時間，24時間以降の三区間に培養期間を分けて培養液中の血清の濃度を変え，血清の濃度が生存率に影響する時期について検討した．表1に示す通り，① 20→5→5%血清，②20→5→20，③ 20→20→5，④ 20→20→20の4群について比較すると，細胞移植率は①→④の順に高い．生存率は①と②，③と④とではそれぞれ統計的有意差はないが，①と②の方が③と④群より高い．このことから血清の濃度が生存率に寄与するのは照射後24時間以内であると考えられる．

次にこれら血清の生存率におよぼす影響を feeder layer とされた細胞がどのように修飾するか，また血清濃度のちがいが分割照射法でみられる回復に影響するかどうかについて検討した．

2． feeder layer 下における血清濃度の生存率におよぼす影響

照射前，中の血清濃度を20%とし，照射後あらかじめ feeder layer したシャーレに移植して，20%血清添加培養液中に移植した群と5%血清群との生存率を比較した．図1に示すように生存率は照射線量 152rad～464rad の範囲では，20%血清添加培養液中に移植した群が5%血清群よりも生存率，細胞移植率ともに大きく，生存率では 1.6 倍である．

Fig. 1 Dose response curves of HeLa S3 cells irradiated with X-rays and incubated in the conditions shown after irradiation.



□, △ : Eagle MEM＋5% CS, feeder layer (−), ■, ▲ : Eagle MEM＋20% CS, feeder layer (−). ○ : Eagle MEM＋5% CS, feeder layer (＋). ● : Eagle MEM＋20% CS, feeder layer (＋).

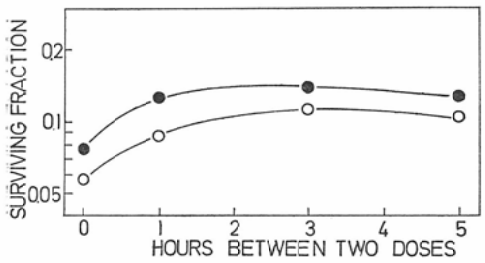
Table 1 Effect of serum concentration in the media on the survival rate of X-irradiated HeLa cells. Media column shows the serum concentration of media used before and during, 24hours following irradiation and for final incubation.

medium	plating eff.	survival rate	
		260rads	555rads
20— 5— 5	56%	19.6± 3.7%	2.43±0.36%
20— 5—20	71	20.7± 1.8	2.03±0.25
20—20— 5	90	16.7± 1.1	1.61±0.18
20—20—20	106	15.5± 0.8	1.43±0.04

3． 分割照射における血清濃度の影響

照射前から，照射中にかけての血清濃度を5%，20%として 462rad を二等分割照射し，照射後20%血清添加培養液中に feeder layer したシャ

Fig. 2 Survival rate of oxygenated HeLa S3 cells exposed to single and two divided doses of X-rays and incubated in the growth media supplemented with calf serum between irradiation.



● : in the growth media supplemented with 20% calf serum,
○ : in the growth media supplemented with 5% calf serum.

ーレに移植した．細胞移植率，生存率ともに20%血清群で大きい．分割間かく1，3，5時間では血清濃度5%，20%のいずれの群でも生存率は1回照射より分割照射の方が高い（図2）．

考　察

HeLa S3細胞を用いて細胞増殖能におよぼす放射線の影響，および線量効果関係を修飾する因子として培養液中の血清の濃度の影響について検討した．

培養液が生存率に影響する時期については，De Oca[9]は照射前，照射後に働く，Hahn[7]は照射中は効果がないと報告している．照射前の培養液の状態によつて照射された細胞の生存率が変るのは，前にものべたように，細胞集団の分布を変える[7]，何らかの機構によつて細胞の感受性，あるいは照射後の回復能に影響する，ことが考えられる．照射後に限つてみると回復現象に寄与しているか，あるいは障害の進行を修飾すると考えられる．

照射前中の血清の濃度を20%と一定にし，照射後の培養液中の血清濃度を5%，20%とすると（図1），5%血清群の方が細胞移植率は低いが生存率は高い．このことから照射後の血清濃度が細胞の生存率に影響することは明らかである．ところで照射後の培養液中の血清濃度のちがいが生存率に影響するのは，表1に示すように照射後24時間以内であると考えられる．このことは先に報告した結果[12]と矛盾しない．

血清濃度と照射された細胞の生存率との関係はfeeder layerの有無によつて異なり，feeder layerのある時は図1に示す通り照射後の培養液中の血清濃度を5%，20%とすると，生存率，細胞移植率ともに20%血清群が高い．またfeeder layerの有無は20%血清添加培養液に移植した細胞の生存率には影響しない．しかし5%血清群においては細胞移植率には影響しないが生存率はfeeder layerのある群で低い．

照射後の培養液の状態が移植された細胞の生存率に影響するのは，前にもふれたように，回復か，障害の進行かが考えられ，回復現象を修飾するか否かは分割照射することによつて明らかになる．照射中の血清濃度を5%，あるいは20%として分割照射を行つたところいずれでも同様の回復曲線を示した．このことから照射後の培養液中の血清濃度が照射された細胞の生存率に影響するのは細胞の受けた障害が進行するのを修飾するためであると考えられる．

障害の進行と血清とはどんな関係にあるのか，feeder layerとされた細胞はどんな機構でそのことに関与するのかは将来に残された問題であり，検討中である．

要　約

1．HeLa S3細胞のコロニー形成能に対するX線の線量効果関係，および照射後の培養液に含まれる血清濃度が線量効果関係におよぼす影響をみた．

2．照射後の培養液中の血清濃度が5%と20%とでは生存率が異なる．

3．20%血清添加培養液中に移植した細胞の生存率はfeeder layerの有無によつて影響されない．しかし5%血清群では細胞移植率は影響されないが，生存率はfeeder layerした状態では低下する．

4．照射後の培養液中の血清濃度のちがいが生存率に影響するのは照射後24時間以内であり，細胞の受けた障害が進行するのを修飾するためであると考えられる．

文　献

1) Elkind, M.M. and H. Sutton: Nature 184 (1959), 1293—1295.
2) Berry, R.J. and R. Oliver: Nature 201 (1964), 94—96, Belli, J.A. et al.: Nature 211 (1966), 662—663.
3) Bender, M.A. and P.C. Gooch: Int. J. Rad. Biol. 5 (1962), 133—145, Powers, E.L.: Phys. Med. Biol. 7 (1962), 3—28.
4) Pick, M.C. and T. Alper:Brit. J. Radiol. 37 (1964), 458—462.
5) Hollaender, A. and G.E. Stapleton: Brit. J. Radiol. 27 (1954), 117—121.
6) Morkovin, D. and T.T. Puck: Radiation Research 9 (1958), 155.
7) Hahn, G.M. and M.A. Bagshaw: Science 151 (1966), 459—461.
8) Berr, J.Z. et al.: Nature 199 (1963), 193—194.
9) De Oca H.M. et al.: J. Nat. Cancer Inst. 30 (1963), 57—66.
10) Eagle H.: Science 130 (1959), 432—437.
11) Masuda, K.: J. Radiation Research 9 (1968), 116—128.
12) Masuda, K.: Nipp. Act. Radiol. 28 (1968), 1252—1255.
13) Yamada, Masa-atsu and T.T. Puck: Proc. Nat. Acad. Sci 47 (1961), 1181—1191.