

培養哺乳類細胞の X 線傷害と回復

X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture

Elkind MM, Sutton H . Nature 4659:1293-5,1959*

無限増殖能の維持能力という尺度でみると、微生物の X 線感受性は重要な大分子への感受性よりも大きいことが一般に知られている。このこと自体、X 線の致死効果が細胞の遺伝装置に関連していることを示唆する大きな理由となっている。Puck & Marcus[1] は、培養哺乳類細胞の X 線感受性が、細菌や酵母菌の 10～100 倍以上大きいことを示してこの考えを支持し、哺乳類細胞の感受性部位が染色体であるという非常に合理的な説を提示している。

遺伝装置の機能の正常性が細胞生存に必要であるとすれば、ほとんどの体細胞の生存曲線が S 字型 (すなわち多重ヒット型) であることから、X 線照射後の生存細胞は親世代よりさらに X 線感受性が高いことが予想される。このことは、多重ヒット性は閾値型の反応を示す (= 傷害が蓄積されて初めて効果が観察される) こと、生存細胞に亜致死量の傷害が蓄積される事実からも考えられる。

我々はこの遺伝性傷害の存在を、2 系統の細胞系、すなわちチャイニーズハムスター *Oricetus griseus* [2] (卵巣組織クローン A, および雌肺組織株 V) の培養で検討した。我々は、基本的に X 線照射後の生存細胞すべてにおいて、その放射線感受性に遺伝性傷害が見られないこと、その蓄積傷害が照射後の初回分裂前に修復されることを見いだした。

使用した培養液は HU-15 で、その組成はグルタミンを含む Eagle のアミノ酸およびビタミン液 [3] 1mM, Earle の NCTC-109 [4] 4%, カルシウムを含む Puck の生食水 F [5] の 6.5 倍濃度液、非透析仔牛胎児血清 (Colorado Serum 社) である。いずれの細胞系統もこの培養液で培養し、倍加時間は約 12 時間であった。

X 線装置は、Machlett OEG-60 X 線管、55kV 全波整流電源を使用した。管電流 12mA, 0.175mm アルミニウムフィルターを使用し、吸収線量率は 720rad/分であった。9cm ペトリ皿にプレーティングし、カバーと培養液を除いた状態で、室温にて加湿した炭酸ガス濃度 2% の空気中で照射した。37°C, 炭酸ガス濃度 2% の空気中で 12～18 日間培養後に生存したクローンを染色、カウントした。増殖不全コロニーの同定には投影法を使用した。増殖不全コロニーの有無は基本的に結果に影響しなかった。プレーティング効率は約 70% であったが、10～90% の実験でも結果は基本的に同じであった。

観察結果の検討に当たっては、簡単のために多重ヒットモデルを仮定するが、我々の結論は S 字型、閾値型生存曲線一般に等しく適用できるものである。対数曲線部分^{†1}のヒット数は、クローン A で 4～5, クローン V で 6～7 であった。

蓄積傷害の修復を調べるために分割照射を行った。図 1 に単独クローン A 細胞の生存曲線を示す。照射 2 時間前にトリプシン処理、プレーティングを行った (標準誤差は測定点よりも大きいものを表示)。さらに図の下部には、505rad 照射、37°C で様々な期間培養後、2 回目に 487rad を照射した場合の回復曲線を示した。照射間に回復がなければ、2 回の線量は完全に相加的となるはずで、992rad 照射後の生存率は 0.0019 である。逆に照射間に完全に回復すれば、1 回照射後、2 回照射後の生存率はそれぞれ 0.082, 0.095 となり、その積 0.0078 が照射間の完全回復に対応する生存率となる。ここで着目すべきは、(1) 37°C において細胞は経時的に傷害部位の修復と感受性の変動を示す回復を示し、(2) クローン A 細胞では 10 時間で完全に回復し、その後約 25 時間まで一定で、(3) 25 時間以降生存率は上昇し、これはおそらく照射後の細胞分裂開始と同時に生存の細胞多数性 (cellular multiplicity) によるものである。

最後の点については、2 つの実験に基づいている。第 1 に、我々はこれらの細胞について「細胞多数性の原理」が成り立つことを示した。すなわち、1 個以上の細胞を有するコロニー^{†2}の生存率は、コロニーの各細胞の平均感受性が等しく、かつ照射後のコロニー形成を抑制するにはそれぞれが不活化される必要があるという条件下においては、平均細胞多数性に応じて上昇する。第 2 に、初回の 505rad 照射後の細胞分裂遅延の推定は、照射細胞と非照射対照群のコロニー成長の比較によっている。比較はコロニーが同じ大きさ、細胞数約 100 個に達した時点で行っている。このようなコロニーが生存コロニーであることを確実に同定できる。図 1 の生存曲線から、この分裂遅延が約 30 時間であることがわかる。

これに加えて我々は、室温において対照群の細胞分裂を伴うことなく、回復が起こることも示した。

図 1 の回復曲線のプラトー部分が、初回照射による蓄積傷害からの完全修復を示すものであることを実証するために、505rad 照射後、37°C, 18.1 時間後の生

* National Institutes of Health, U.S. Public Health Service (アメリカ国立衛生研究所)

^{†1} 訳注. 原文は lag-phase であるが log-phase の誤記と思われる。

^{†2} 訳注. 原文は clone であるが colony の意と思われる。

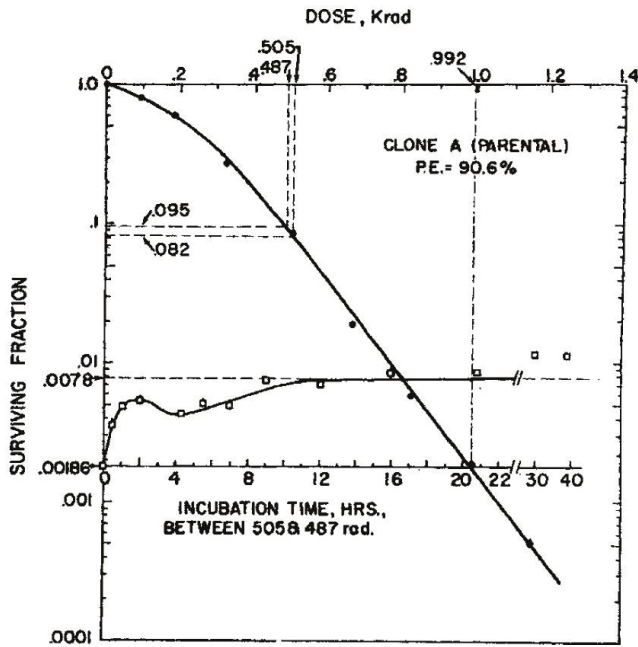


図 1. 37°C培養下における X 線照射細胞の回復。

生存曲線を求めた。図 2 は、初回 505rad に相当する生存値からスタートして、非分割照射による生存曲線を描きなおしたものである。この曲線は計測データに非常によく当てはまり、いずれの曲線でも指数曲線部分において、最大回復率がヒット数倍だけ上方に移動することを示している。また図 2 から、少なくとも完全回復領域においては、初回照射、2 回目照射の間の平行性が失われており、従って 2 回目の曲線は、初回の傷害からの修復の程度を示すものである。

前掲の図は大規模な実験結果の一部であり、詳細については続報の予定である。この結果から、体細胞一般について以下の点が注目される。(1) 大部分の生存細胞は、照射後、初回分裂の前に蓄積傷害を完全に修復する。すなわち、ヒット数が n であれば、指数曲線部分において生存細胞は、最大 $n-1$ 個の傷害を修復する。(2) 回復動態は、細胞の生理学的状態に依存するか、または回復環境の変動に大きく左右されるか、あるいはその両者である。この変動は、感受性の変化および不活化部位の修復の複合的な影響によるものと思われる。(3) 量的には大きく異なるが、対数曲線部分の細胞も同様に反応する。(4) 細胞は、修復機能の低下を示すことなく傷害/修復のサイクルを繰り返すことができる。

このような知見が興味をひくいくつかの領域がある。染色体が X 線感受性領域であり、染色体の破損が致死性の原因となるヒットであるとすれば、新たな修復特性を考慮する必要がある。第 1 に、この修復機構は生存細胞で完結する。第 2 に、破損を修復する細胞の能力は、照射を繰り返しても損なわれない。一方 Puck

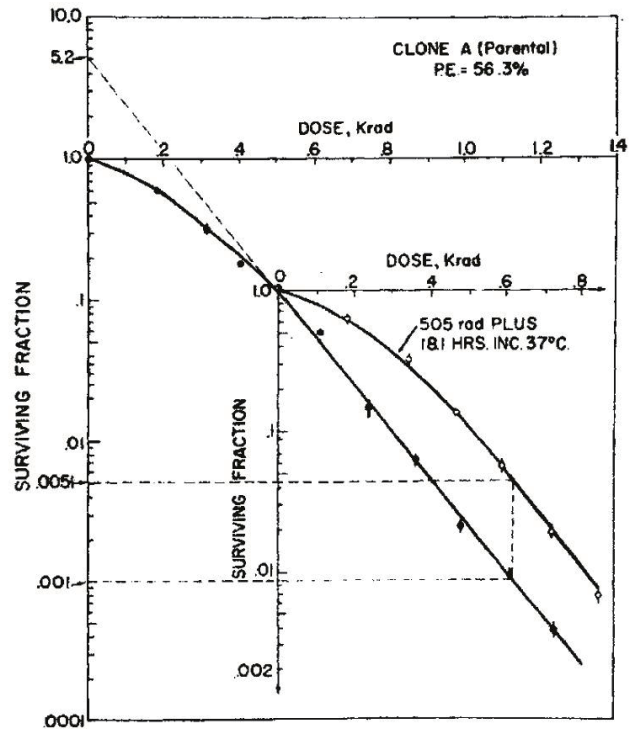


図 2. 505rad 照射, 37°C, 18.1 時間培養後、非分割照射を繰り返した場合の完全回復を示す生存曲線。

の報告 [6] では、5~7 回の平均致死線量を生き延びた細胞の子孫に突然変異の特徴が多いとしており、これは彼らの検体には適用されうる可能性があり、その場合は回復後およびクローン発育中の放射線誘発染色体に脆弱性がある、変異の生成と致死性は一般に必ずしも関係しない、あるいは染色体は主たる感受性部位ではないなどの可能性もある。

この結果を適用するもうひとつの領域は、腫瘍の放射線治療である。治療計画では分割照射が一般的であり、照射間には完全回復ではなくとも充分な時間がある。ヒット数がわずか 2 であるとしても、単純な計算から、回復を充分考慮しないと、分割照射による細胞の生存が予想よりも数倍も多くなる可能性がある。もちろん、一般的な意味での回復は放射線治療医には以前から良く知られていることである。しかしこの結果は、この現象に細胞学的な根拠を与えるものであり、その効果を利用、制御するために行うべき研究の方向性を示すものである。

線量率が細胞生存に及ぼす影響、回復の生化学的および細胞遺伝学的背景について、更なる実験が計画中あるいは進行中である。

1958 年 8 月以来再クローニングの必要なく継代している卵巣組織のクローン A 細胞を提供された Dr. T. T. Puck, 1958 年 12 月に再クローン化した雌肺組織 V 株を提供された Dr. Denys Ford, チャイニーズハムスターの培養用組織を提供された D. George Yerganian に謝意を表す。

【参考文献】

- ¹ Puck, T. T., and Marcus, P. I., *J. Exp. Med.*, **103**, 653 (1956).
- ² Yerganian, G., *J. Nat. Cancer Inst.*, **20**, 705 (1958).
- ³ Eagle, H., *Science*, **122**, 501 (1955).
- ⁴ Evans, V. J., Bryant, J. R., McQuilkin, W. T., Fioramonti, M. C., Sanford, K. K., Westfall, B. B., and Earle, W. R., *Cancer Res.*, **16**, 87 (1956).
- ⁵ Puck, T. T., Cieciura, S. J., and Robinson, A., *J. Exp. Med.*, **108**, 945 (1958).
- ⁶ Puck, T. T., *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.*, **44**, 772 (1958).