

分割照射における腫瘍細胞動態の Flow Cytometry による解析

I. 培養細胞についての検討

新潟大学医学部放射線医学教室

*新潟大学医療技術短期大学部

酒井 邦夫 藤田 勝三* 日向 浩
末山 博男 佐藤 洋子

（昭和59年5月21日受付）

（昭和59年7月20日最終原稿受付）

Flow Cytometric Analysis of Cell-kinetics after Fractionated Irradiation

I. A Study on Cultured Mammalian Cells

Kunio Sakai, Shozo Fujita*, Hiroshi Hinata, Hiroo Sueyama and Yoko Sato

Department of Radiology, Niigata University School of Medicine

*College of Biomedical Technology, Niigata University

Research Code No. : 407

Key Words : Flow cytometry, Cell-kinetics, Fractionated
irradiation

Cultured mammary carcinoma cells (FM3A) were exposed to 2, 4, 6 and 10 Gy of ^{60}Co γ rays. The cells were stained with propidium iodide 2 to 30 hours after irradiation. The cellular DNA contents were measured by a cytofluorometer. The surviving fractions after fractionated irradiation (2 Gy + 2 Gy) at various intervals were compared with the DNA histograms. The results obtained were as follows.

1. The DNA histogram of exponentially growing cells showed two peaks at 2C (G_1 phase) and 4C ($G_2 + M$ phases).

2. In every dose group, cell accumulation at the $G_2 + M$ phases occurred at 6 hours after irradiation. The histogram pattern of cells exposed to 2 Gy returned to the unirradiated one within 15 hours after irradiation. When the doses were more than 4 Gy, cell accumulation into $G_2 + M$ phases persisted even at 15 hours after irradiation.

3. Surviving fractions after two equally fractionated irradiation of 4 Gy increased at time interval upto 4 hours, and decreased in 8 to 10 hours intervals. This is considered to be due to partial synchronization of cell cycle at radiosensitive phase, corresponding to the cell accumulation at the $G_2 + M$ phases.

4. Flow cytometric analysis of cell-kinetics of tumor cells was considered to be valuable in the determination of optimum time intervals in fractionated irradiation.

I. 目 的

感受性の差を利用してより効果的な治療を実施できる可能性がある。

がんの放射線療法や化学療法を行うにあたり、
腫瘍細胞の動態が把握できれば、細胞周期による

近年、細胞内 DNA 含量を蛍光量におきかえて、

細胞1個1個の相対的DNA量を短時間に測定する flow cytometry (FCM) が開発され、細胞動態の研究や化学療法によるがん治療などの分野で急速に普及しつつある。

本論文では、培養細胞について、FCM により放射線照射後の細胞動態を解析し、その結果を2分割照射後の細胞致死効果と対比して報告する。

II. 材料および方法

培養細胞は FM3A (C3H マウス乳癌由来) を使用した。継代培養は、イーグル MEM 培地 (牛血清10%添加) を用い、37℃炭酸ガスインキュベーター内で行った。

放射線照射はコバルト遠隔照射装置で行った。細胞浮遊液 (細胞濃度 4.2×10^5 cells/ml) 20ml を底面積 25cm^2 のフラスコ (Nunc, 163371) に入れ、密栓して5mm厚アクリル板にのせ、下方から線量率 0.8Gy/分 で2, 4, 6, 10Gy ずつ照射した。各照射群について、照射2~30時間後にPI液 (ヨウ化プロピジウム $0.05\text{mg}/0.1\%$ クエン酸ナトリウム 1ml)¹⁾ で4℃、1時間以上細胞のDNA染色を行った。

DNA量測定は、米国 Ortho 社製 Cytofluorograf (ICP22A) で行った。本装置は、コンプレッサーで加圧注入したトランス液とシース液の層流を利用して、細胞1個ずつが $200\mu\text{m}$ の穴を通過するとき、水銀アークランプの紫外線でDNAにとり込まれた蛍光色素を励起し、その蛍光量から相対的DNA量を測定するものである。毎秒1,000個の細胞を測定することができる。装置の調整には、直径 $10\mu\text{m}$ で蛍光量が異なる2種類の蛍光体 (ラテックス、相対的蛍光量 $1/8$, $8/8$) を用いた。細胞試料に内部標準蛍光体として $1/8$ ラテックスを適量添加した。細胞10,000個の相対的DNA量を測定してDNAヒストグラムを得た。これにより、細胞周期各期の百分率を算出して細胞動態の解析を行った。

2分割照射後の細胞生存率はコロニー法で求めた。0.25%寒天培地を用い、ディッシュ当り100個の細胞を植え、照射後8日間のインキュベーションを行い、倒立顕微鏡 (倍率40) を用いてコロニー数をかぞえた。非照射細胞のコロニー形成率は

93.8%であった。

III. 結 果

1) 非照射細胞の DNA ヒストグラム

正常ヒト末梢血から遠心法により分離したリンパ球と FM3A 細胞 (細胞濃度 4.2×10^5 cells/ml) のDNAヒストグラムを Fig. 1に示す。横軸はチャンネル数 (相対的DNA量)、縦軸はそれに対応する細胞数をあらわす。増殖しないリンパ球は100chに集中している。

対数増殖期にある FM3A 細胞は、120ch ($2C$, G_1 期) に第1ピーク、220ch ($4C$, G_2+M 期) に第2ピークを有する2峯性パターンを示した。左方の低いピークは試料に添加したラテックスで、これが常に25chになるようにgainを設定した。このヒストグラムから赤木ら²⁾の方法により、細胞周期各期の百分率を算定した (Fig. 2)。細胞濃度 4.2×10^5 cells/ml の場合、 G_1 期53.0%, S 期34.3%, G_2+M 期12.7%であった。

2) 細胞濃度による DNA ヒストグラムの変化

FM3A 細胞の増殖曲線といろいろな細胞濃度におけるDNAヒストグラムを Fig. 3に示す。細

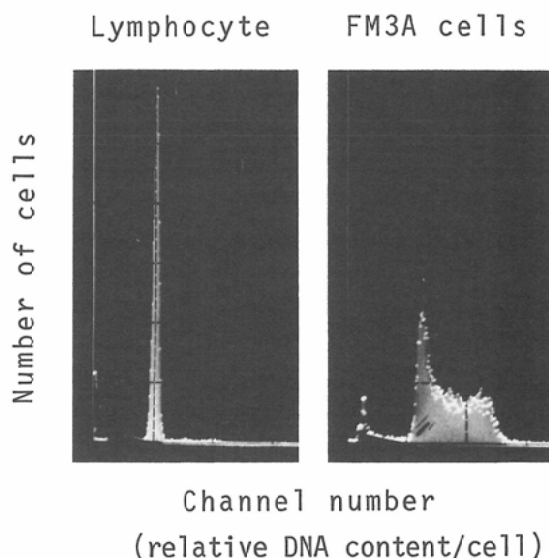


Fig. 1 DNA histograms of human lymphocytes (left side) and cultured cells derived from murine mammary carcinoma, FM3A (right side).

The DNA histograms of other figures (Fig. 2, 3 and 4) use the same ordinate and abscissa.

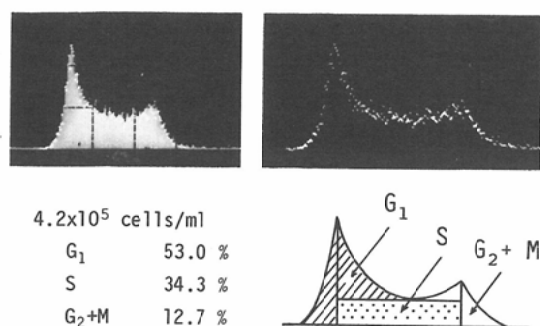


Fig. 2 Schematic illustration of the method to determine the cell cycle distribution from DNA histogram

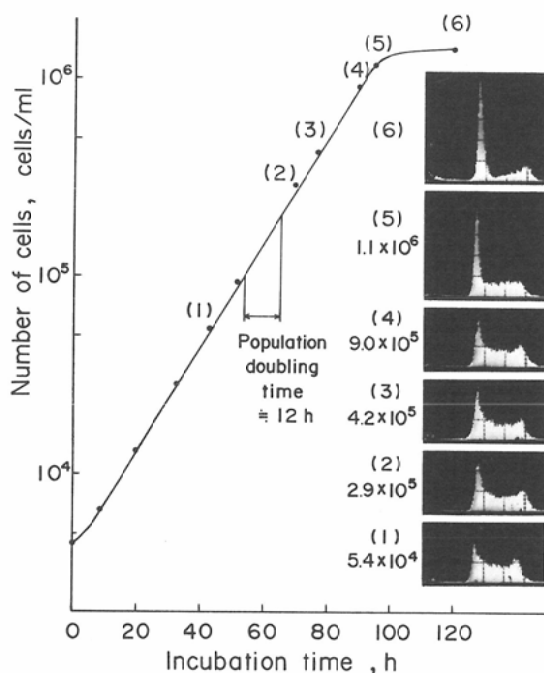


Fig. 3 Growth curve of FM3A cells and DNA histograms of the cells at various concentrations

Population doubling time of the cells was about 12 hours. The DNA histograms of exponentially growing cells showed two peaks at 2C (G₁ phase) and 4C (G₂+M phases) with somewhat predominant one at 2C.

胞増殖は10⁶ cells/ml まで対数的で、細胞集団の倍加時間 (population doubling time) は約12時間であった。

DNA ヒストグラムは、細胞濃度が10⁴~10⁵ cells/ml 後半まではほぼ類似のパターンを示し、10⁶

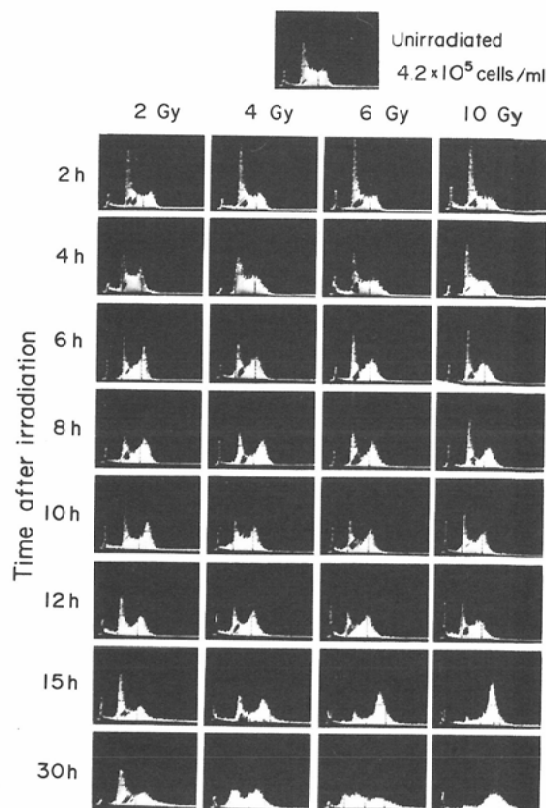


Fig. 4 DNA histograms of FM3A cells exposed to 2, 4, 6 and 10 Gy

The cells were sequentially collected at specified times after irradiation, stained with PI solution and determined for cellular DNA content.

cells/ml に達すると2C の増加傾向ならびに3C および4C の減少傾向がみられた。plateau phase に達するとそれらの傾向はさらに顕著となる。

3) 照射による DNA ヒストグラムの変化

Fig. 4, 5に、2, 4, 6, 10Gy 照射後の DNA ヒストグラムと細胞周期の百分率の経時的变化を示した。いずれの線量においても、照射4時間後にS期の増加がみられ、次いで照射6時間後からG₂+M期への蓄積がはじまる。8時間後にはG₂+M期は約40%に達している。

2Gy 照射では、G₂+M期は12時間後に減少しはじめ、15時間後では非照射群のパターンにほぼ復帰している。4, 6, 10Gy 照射では、15時間後においてもG₂+M期への蓄積は持続し、線量の増加

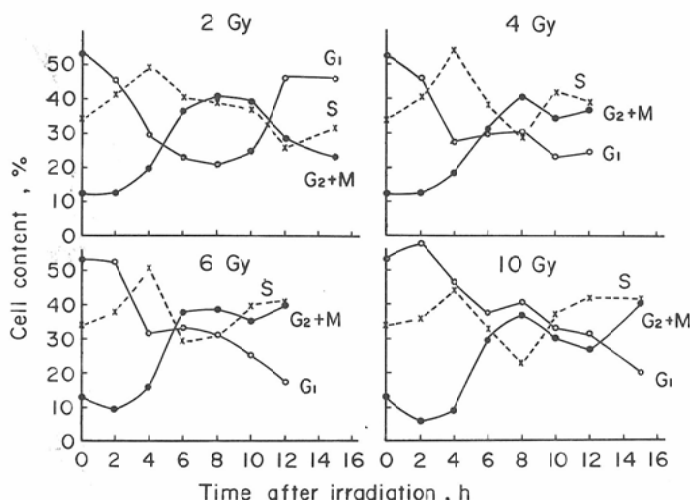


Fig. 5 Sequential changes of cells in G_1 , S and G_2+M phases after irradiation
In every dose group, cell accumulation into G_2+M phases was noted to occur at 6 hours after irradiation.

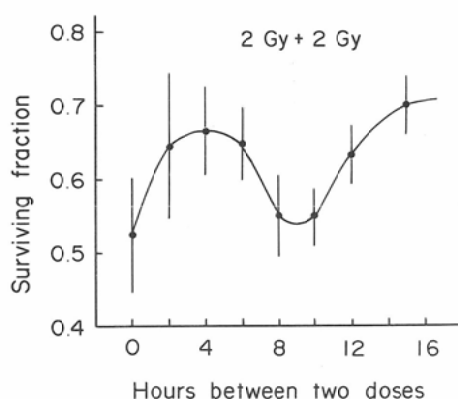


Fig. 6 Surviving fractions of FM3A cells after fractionated irradiation (2Gy+2Gy) at various time intervals

に伴って5C, 6Cの成分が出現している。

4) 分割照射間隔の細胞生存率への影響

4Gyを均等に2回に分割し、0～15時間の間隔をおいて照射した。照射間隔0時間、すなわち4Gy 1回照射のときの細胞生存率は52.5%であった。細胞生存率は、照射間隔が4時間までは増加するが8～10時間で減少し、それ以上になると再び増加している (Fig. 6)。

IV. 考 案

がんの放射線治療では、通常は均等分割照射法

が用いられている。しかし、細胞の放射線感受性は細胞周期によって異なることが知られているので³⁾、照射による細胞動態を把握し、それに基づいた線量配分が確立できれば、より効果的な治療を行い得ると考えられる。

細胞動態の解析には、従来微速度映画撮影、顕微分光光度計を用いる方法やオートラジオグラフィが用いられていたが、これらは多大の時間と労力を要するという欠点があった。本研究で利用したFCM装置には、細胞のDNA量を毎秒1,000個という極めて高速で測定できるという利点がある。ただし、測定時に細胞が1個1個分散していなければならないという制約がある。本研究で利用したFM3A細胞は、懸濁培養であるために容易に単離細胞となる。このことは、DNA染色後に蛍光顕微鏡で確認された。

FM3A細胞を照射すると、照射6時間後に G_2+M 期への蓄積がはじまり、線量の増加に伴い蓄積時間は延長する。赤木らも⁴⁾、HeLa細胞に300, 600, 900 rad照射し、線量の増加に従って G_2+M 期への蓄積が長く続くことを報告している。また、窪田⁵⁾は、HeLa細胞に2.3, 10Gy照射し、照射後のS期の増加とそれに引き続いた G_2+M 期への蓄積を観察し、その蓄積時間が線量に依

存している可能性をのべている。

2Gy 照射では、照射15時間後には非照射群のパターンに復帰したが、4Gy 以上の照射群では復帰せず、照射30時間後には5C, 6Cの成分の出現がみられた。5C, 6C成分の多い試料をオルセイン染色により観察したところ、2核細胞や巨細胞が多く認められた⁶⁾。

分割照射の細胞致死効果については、Elkindら⁷⁾の実験がよく知られている。照射間隔による細胞生存率の変化は、亜致死障害の回復と細胞周期によって説明されている。

FCMによる細胞動態解析の結果、2Gy 照射では照射6時間後から G_2+M 期への蓄積がはじまり、8~10時間後にピークに達することが示された。一方、2Gy+2Gyの2分割照射の細胞致死効果をみると、細胞周期の同調による生存率減少は、照射間隔8~10時間において認められることが示された。これらのことから、DNAヒストグラムの変化(G_2+M 期への蓄積)と細胞周期の同調効果とが対応していることが推測される。すなわち、分割照射においては、照射後のDNAヒストグラムを観察することにより、 G_2+M 期への蓄積が最大となる時点で次の照射を行えば、細胞周期の同調による照射効果の向上がもたらされる可能性がある。この点は分割照射における至適照射間隔を定める上で極めて重要な意義があるので、移植腫瘍等を対象としてさらに検討をすすめるべき課題であると思われる。

V. 結 語

FM3A細胞に⁶⁰Co γ 線を2, 4, 6, 10Gy照射し、FCMによる細胞動態の解析を行った。また、コロニー法により分割照射の細胞生存率を求め、FCMによる細胞動態の解析結果と対比した。

1. 非照射細胞のDNAヒストグラムは、対数増殖期にあるものは2C(G_1 期)と4C(G_2+M 期)にピークを有し、2Cがやや優位の2峯性パターンであった。plateau phaseに達すると2Cが更に優位となり、3C, 4Cの成分が減少した。

2. 対数増殖期にある細胞は、照射により、6時間後から G_2+M 期への蓄積がはじまり、8時間

後には約40%に達した。2Gyでは、照射15時間後に非照射群のパターンにはほぼ復帰したが、4Gy以上では15時間後においても G_2+M 期への蓄積は持続し、線量の増加に伴って5C, 6Cの成分が出現した。

3. 4Gyの均等2分割照射における細胞生存率は、照射間隔が4時間までは増加するが、8~10時間で減少し、それ以上になると再び増加した。細胞周期の同調による生存率減少とFCMでの G_2+M 期への蓄積現象とは時間的に対応していることが示された。

4. FCMによる細胞動態の解析は、分割照射における時間的線量配分の検討に役立つことが示された。

本研究は、文部省科学研究費(課題番号57440057)の援助を受けた。論文の要旨は、第68回日本医学放射線学会北日本地方会および第23回日本医学放射線学会生物部会において発表した。

文 献

- 1) Krishan, A.: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.*, 66: 188—193, 1975
- 2) 赤木 清, 田中敬正: Flow cytometryによる細胞動態の解析—特に G_0 Fractionについて—。文部省科学研究費, がん特別研究 I, 昭和57年度研究報告書“腫瘍治療における細胞動態学的基礎および応用に関する研究”, 24—31, 1982
- 3) Terasima, T. and Tolmach, L.J.: Changes in x-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature*, 190: 1210—1211, 1961
- 4) 赤木 清, 中沢 緑, 村田貴央, 白石友邦, 播磨敬三, 沢田 敏, 長谷川武夫, 田中敬正: FCMによる腫瘍細胞動態に対する放射線効果の解析。癌の臨床, 27: 1523—1527, 1981
- 5) 窪田宣夫: HeLa細胞のCell Cycle Progressionに対するHyperthermiaと放射線の影響。日本医放会誌, 42: 188—199, 1981
- 6) Hurwitz, C. and Tolmach, L.J.: Time-lapse cinemicrographic studies of X-irradiated HeLa S₃ cells. II. Cell fusion. *Biophysical J.*, 9: 1131—1143, 1963
- 7) Elkind, M.M. and Sutton, H.: Radiation response of mammalian cells grown in culture. 1. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. *Radiat. Res.*, 13: 556—593, 1960