

哺乳類の細胞に対する X 線の作用

Action of x-rays on mammalian cells

Puck TT, Marcus P. J Exp Med 103:653-66,1956

高等動物における電離放射線の作用機序の研究は、細菌学におけるプレート法 [1], ウイルス学におけるブランク法 [2] のような単独哺乳類細胞の増殖能を正確に計測する方法がないことが障害となっていた。動物細胞の増殖能を定量的あるいは半定量的に精測する方法が報告されているが [3], いずれも非常に多くの細胞間の複雑な相互作用のために、個々の細胞の状態を知ることは困難である。照射による「細胞死」の定義は様々で、「細胞致死線量」には 100r あたりから 100,000r まで大きな幅がある [3-5]。個々の動物細胞の代謝状態の放射線感受性への影響についてはほとんど理解されていない。動物の全身照射における致死線量が、特定の種類の細胞の増殖過程に及ぼす放射線生物学的障害の程度は不明である。これまで、単独変異細胞から大量の細胞を充分迅速に培養する方法がなかったため、哺乳類の細胞変異の頻度が、微生物の場合のように [7] 実験的に求められることはほとんどなかった [6]。哺乳類の単独細胞を簡単、迅速に肉眼的なコロニーに増殖させる (実験誤差の範囲で) 100% 効率的なプレート法 [8,9] の開発により、このような細胞も細菌と同様に正確に研究することができるようになった。本稿では、ヒト子宮頸癌由来の単独 Hela 細胞 [10] の増殖能に対する高エネルギー放射線の影響を定量的に調べる実験について述べる。

方法と材料

単独 Hela 細胞をペトリ皿上でコロニーに増殖させるプレート法については別記の通りである [9]。フィーダー細胞層を利用する方法、緩徐なトリプシン処理によりフィーダー細胞を不要とする方法、いずれでも同様な結果が得られることから、初期数回の実験後、フィーダー細胞の利用は中止した。ほとんどの実験でクローン株 S3 を使用した。生存曲線の一部は野生型 Hela 細胞、他は変異株 S1 を使用したが、基本的に同じ結果が得られた。

既知数の Hela 細胞単分散懸濁液を、標準成長培地 [9] 4 ~ 5cc を入れた 60mm のペトリ皿に入れたが、変法として 10 ~ 15% ブタ血清のみを血清成分とする方法も用いた (ヒト血清ではなくブタ血清を使用すると、よりコンパクトなコロニーとなるため、より多くのコロニーが得られる [9])。標準法では、プレートを 37℃、CO₂ 濃度 5% の空气中で少なくとも 5 時間、24 時間以

下培養し、この間に細胞がガラスに付着する。照射直前にプレートを確認すると、細胞の 90% が単独細胞状態で分裂間期にある。蓋をしたペトリ皿を一定間隔で Westinghouse X 線管 (230kVp, 15mA, アルミニウム 1mm, 銅 0.5mm フィルター使用) で照射する。これを米国度量衡局法で校正した Victoreen R メーターで計測した。メーターは、試料と正確に同じ位置に置き、細胞照射の条件を模するためにペトリ皿の蓋で覆った。表示値は、標準温度、標準圧力で校正した。

照射後のプレートは、CO₂ 容器に最低 9 日間、後述のように場合によっては 17 日間保存した [9]。実験によっては、懸濁液中に毒性物質が産生される場合は、照射後ただちに新鮮な培養液に置換したが、その後経験を積むにつれて、この実験の線量の範囲では実験結果に影響を及ぼすことはないことがわかった。また、照射細胞が産生する毒性物質が真の生存細胞の発育を抑制しうるか、という点を知る必要があった。これは次に示す実験によって、今回の線量範囲では無視しうることがわかった。この実験では、数千個の細胞を含むプレートを、生存細胞が確実に残存しない 2,000 ~ 4,000r で照射し、その直後に既知量の正常細胞を加えて培養した。いずれの場合も、コロニーの個数は、照射後のプレートに加えた正常細胞の個数に近い値であった。非照射細胞は、この条件下で 100% のコロニー形成能を示した。このことから、この実験では細胞に対して、放射線照射以外には大きな負荷が加わることはないと考えられた。本稿を通じて、「生存」 (survival) 「生存可能」 (viable) 「死滅」 (killing) という言葉は、微生物学において標準的に使われる用法、すなわち、個々の細胞が増殖して肉眼的コロニーを形成する能力のみをさしている。D₀ は、細胞を 1/e=37% に減ずるのに必要なレントゲン量 (r) で、生存曲線の傾きの指標となる。

実験結果

生存細胞の増殖率の減少と増殖不全コロニーの形成

個々の Hela 細胞を植えたプレートに照射すると、その一部が死滅するが、その割合は線量に依存する。しかしその一方で、生存細胞は緩徐に増殖する。このプレート上の 2 つの効果を写真 1, 2 に示す。2 枚のプレートは、一方に 300r を照射した以外は全く同じ条件下にある。後者では、増殖するコロニー数が少なく、増殖したコロニーも非照射対照にくらべて小さい。この放射線量の増加に伴う増殖能の低下を、図 1 に定量的

* From the Department of Biophysics, Florence R. Sabin Laboratories, University of Colorado Medical Center, Denver (コロラド大学医療センター Florence R. Sabin 研究所生物物理学部門)

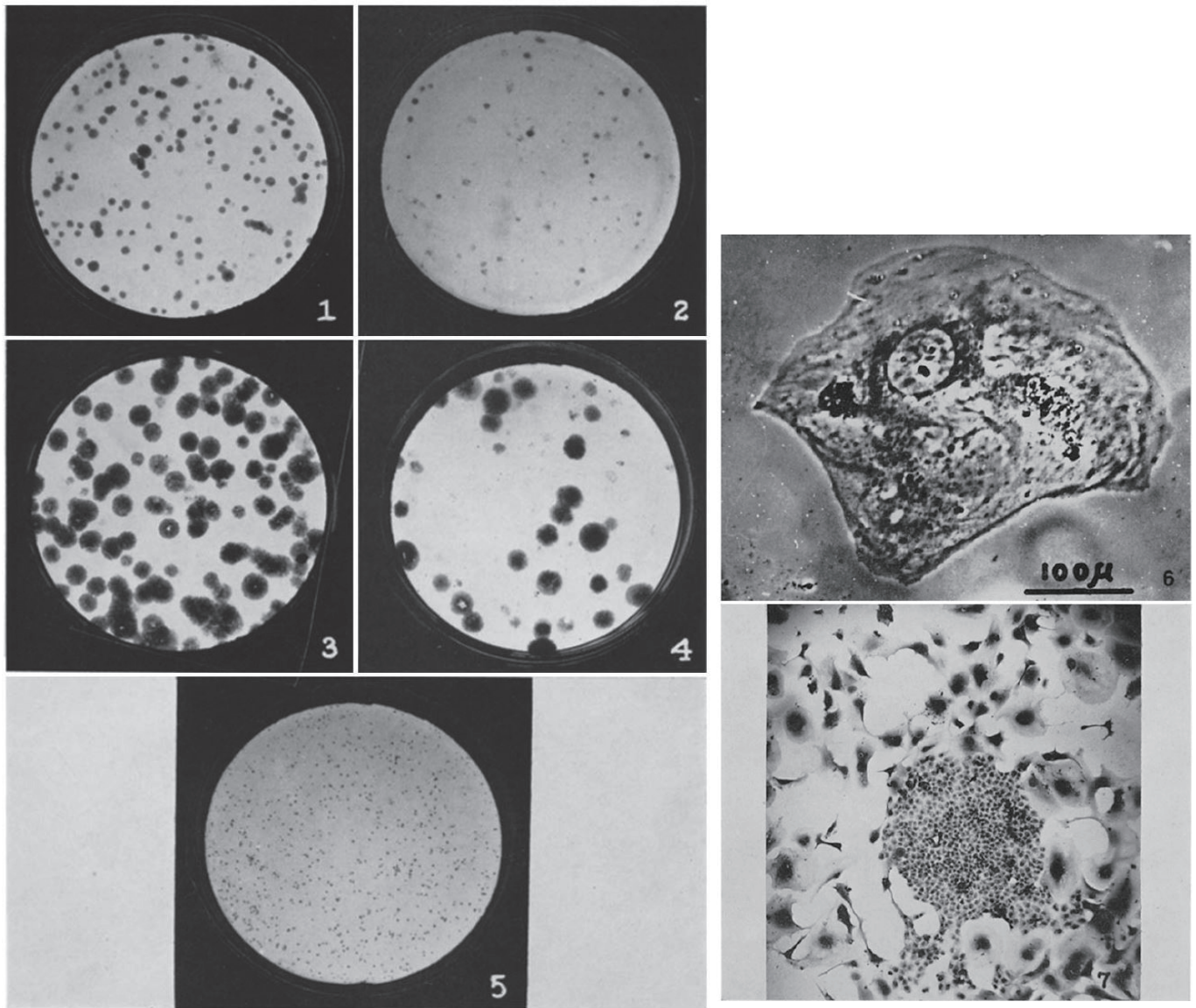


写真 1. HeLa 細胞 S3 株, 200 個を植え, 増殖培地で 9 日間培養して得られたコロニー. 実寸大.

写真 2. 写真 1 と同条件, 培養前に 300r を照射. 実寸大.

写真 3. 写真 1 と同条件 (無照射), 9 日ではなく 17 日間培養. 実寸大.

写真 4. 写真 2 と同条件 (300r 照射), 9 日ではなく 17 日間培養. 実寸大.

写真 5. 細胞 5700 個を植え, 900r で照射. 培養 12 後に Bouin 溶液で固定, HE 染色. このようなプレート 2 枚で, 1 コロニーのみ発育した. スポットは, いずれも 1 個の巨細胞. 実寸大.

写真 6. 図 5 のようなプレートから得られた巨細胞. 位相差顕微鏡像.

写真 7. 巨細胞を形成した放射線により不活化された細胞の中で発育した正常コロニー. 光顕像. 25 倍. 巨細胞は, 正常細胞の径の 7~10 倍になることがわかる.

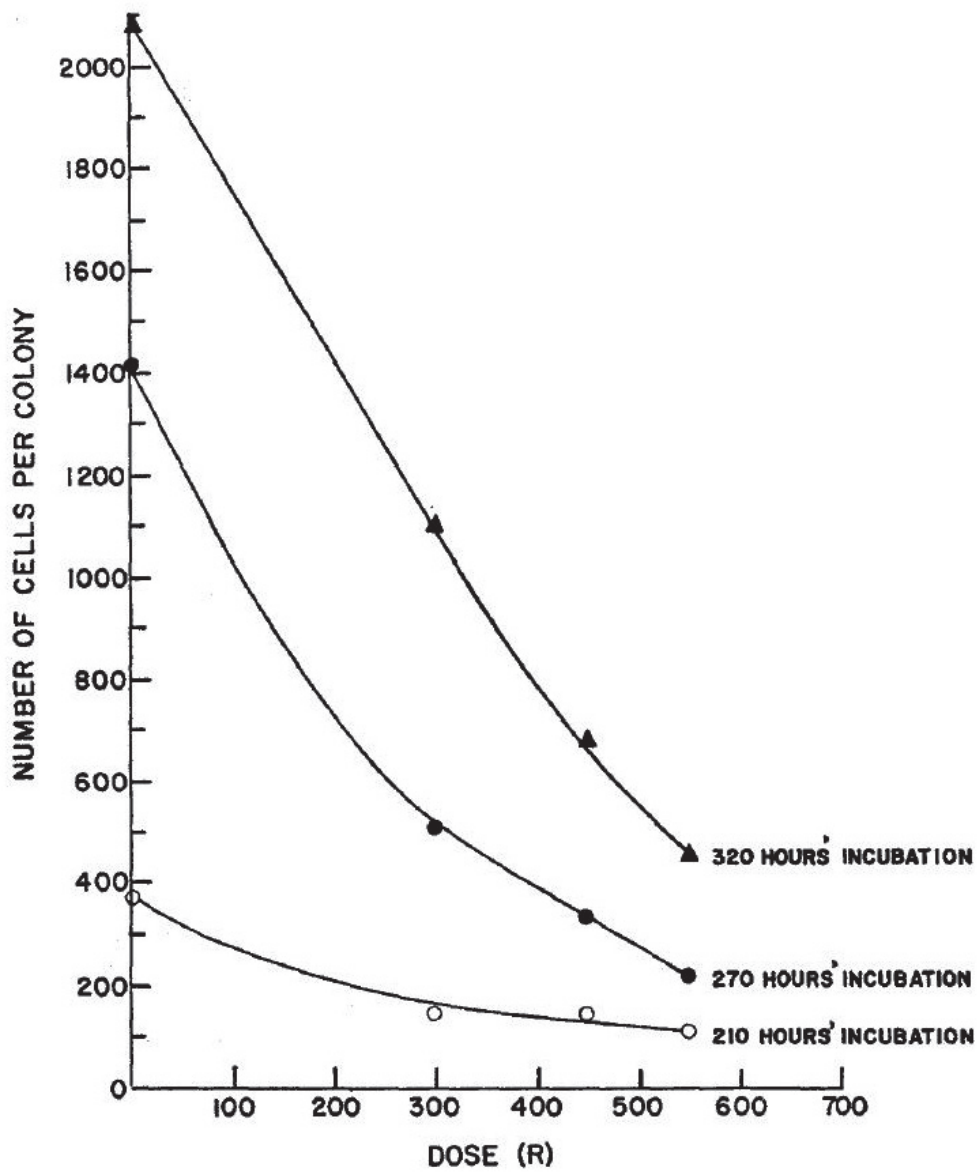


図1. X線が単独 HeLa 細胞に及ぼす成長遅延作用. 標準的な方法で植えた単独 HeLa 細胞を照射し, 記載の時間培養, 固定, 染色した. 各プレートすべてのコロニーについて顕微鏡下に細胞数カウントしたが, 多すぎる場合は, 10 ~ 20 コロニーを無作為に抽出してカウントした. 増殖不全コロニーの混在を防ぐため, 細胞が 50 個以上のコロニーだけをカウントした. 横軸: 照射線量 (r), 縦軸: コロニー当りの細胞数. 上段より培養時間 320 時間, 270 時間, 210 時間.

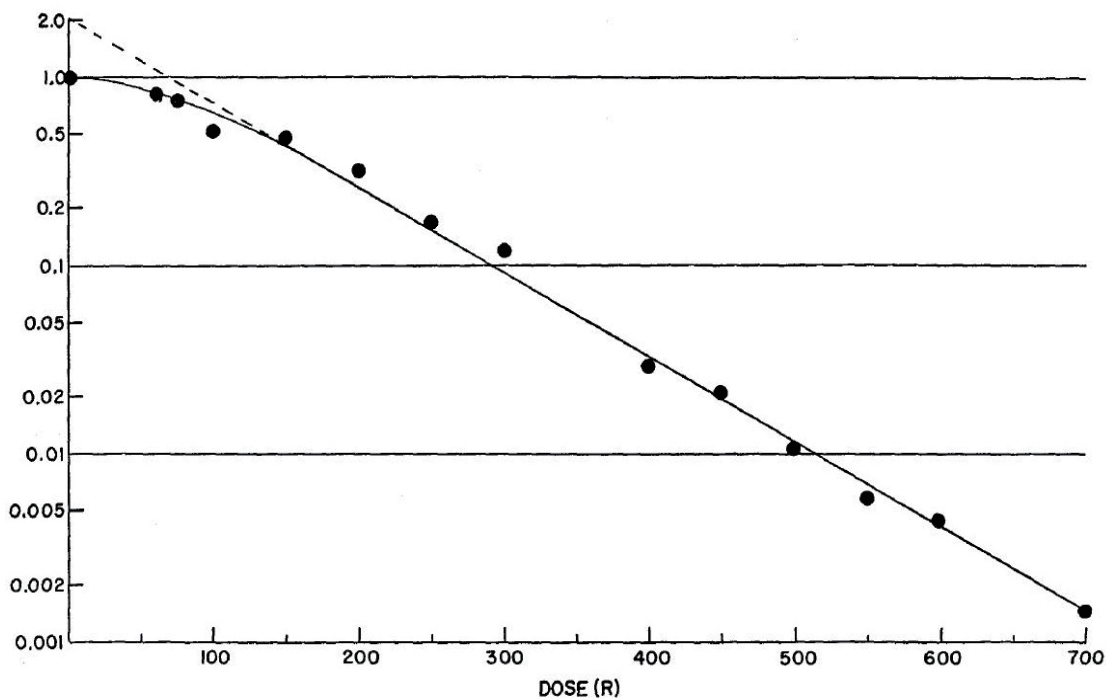


図2. X線量に対する HeLa 細胞の増殖能の残存率. データは実験誤差の範囲で $S = [(1 - e^{-D/96})^2]$ に当てはまる.

に記した。すなわち、コロニー当たりの平均細胞数を対照プレートと、照射プレートの生存細胞について求めたものである。増殖遅延効果は、照射線量 550r の生存細胞が作る最大のコロニーの細胞数が、非照射プレートの平均的コロニーの細胞数よりも少ないことからわかる。

この増殖遅延作用のため、生存細胞のカウントはやや困難なものとなる。これは、対照プレートの全ての細胞から発生するコロニーを形成するのに十分な培養期間では、増殖遅延生存細胞を同定するには不十分な場合があるためである。また、照射によって致死的障害を受けた細胞も、すべての活動を直ちに停止するわけではなく、増殖停止までに 5～6 世代は増殖を続けるため、状況はさらに複雑なものとなる。この点において、細胞のふるまいは照射した細菌のそれと非常に類似している [11]。照射線量の関数としての明確な増殖能の残存率は、培地での培養時間を延長することにより得られる。最終的には、最も増殖が遅い生存コロニーでも直径 3～4mm に達するが、非増殖コロニーは限られた大きさに達してそれ以上大きくならないかあるいは退縮することもある。この過程を写真 3, 4 に示す。それぞれ照射線量 0r, 300r の場合のコロニーの肉眼的状態を示しており、培養期間は写真 1, 2 では 9 日であったがここでは 17 日間である。写真 2 で状態の悪いコロニーが長期間の培養では増殖を維持できていないこと、写真 4 のプレートでは増殖能の残存を細菌の場合と同じようにカウントできることがわかる。

非増殖コロニーは通常増殖速度が遅いことで識別できるが、真の生存細胞は後述のように巨細胞を形成しやすいことから識別される。生存の判定基準を正常細胞の 50% 以上残存とする場合、コロニーを形成する生存細胞の正確なカウントは、培養 17 日後ではなく 11～13 日後に可能である。肉眼で明らかに増殖していると考えられるコロニーすべてをカウントする、標準的な方法を採用した。疑問のあるコロニーについては、顕微鏡で 50 個以上の正常細胞を増殖能維持の指標として確認した。この方法で得られるコロニー数は確実で、その後の培養でも変化しない。

典型例を示す。200 個の S3 細胞を植えた一連のプレートに 300r を照射し、それぞれ 9, 12, 17 日間培養する。9 日後に染色したプレートには、肉眼で識別できる径 0.1～1.0mm のコロニー 117 個が認められた。さらに増殖するコロニー数のカウントは、肉眼だけでは難しい。12 日後、17 日後のプレートでは、径 1mm 以下にとどまるものと、2～5mm の大きなコロニーを形成するものに分れるため、このような不確実性は払拭される。後者の数は、12 日、17 日でそれぞれ 31, 35 で、サンプリングエラーの範囲である。しかし、正常細胞 50 個を含むコロニーを生存コロニーとするという判定基準を適用すると、3 枚のプレートは 9, 12, 17 日目で

35, 36, 36 個であった。増殖能の喪失を示唆する判定基準に、ある程度の恣意性は不可避である。本研究における実際的な定義は、微生物において有用性が証明されている実験に生物学的に類似しており、再現性にも優れていると考えられる。

生存曲線の形状

この方法で求めた Hela 細胞 S3 株の生存曲線を図 2 に示す。生存率は、それぞれの線量について 2 回あるいは 3 回のプレーティングを行なって求め、サンプリングエラーの範囲ではほぼ一定の値が得られた。曲線上の各点は、1 点を除いて全て数ヶ月間に行った 2～10 回の独立した実験の平均値である。このような一連の独立した実験から得られた各線量における生存率の標準偏差は、平均値の 10～25% に収まっている。予想される通り、生存コロニーをカウントできるためには 1 プレート当たり $10^4 \sim 10^5$ 個もの細胞が必要となる 500r 以上では、各点の再現性は低下する。800r 以上では、このように細胞が著しく密集するため実験方法を変更する必要がある。

図 2 の生存曲線に肩 (shoulder) が存在することは明らかであり、これは多重ヒットメカニズムの証左である。この曲線は、大腸菌のような単数体細胞に見られる単一ヒット曲線 [12] と対照的である。Hela 細胞の生存曲線には、 $D_0 = 96r$ の肩がある。すなわち、この直線領域では線量が 96r 増加すると生存率が 37% 減少することになる (考察参照)。

照射により不活化された細胞の運命

コロニーを自ら維持できない細胞は、次の 3 つの運命のどれかを辿る。培養後 17～20 日後、一定回数分裂後に 50 個以下の少数細胞からなる小さなコロニーを形成する、あるいは単独細胞のまま残る、あるいは固定染色プレート上に痕跡を残すことなく消失する。最初の 2 つの過程ではこれと同時に、単独細胞の場合であっても「増殖不全コロニー」(abortive colony formation) と言われる細胞塊を形成し、非増殖細胞が成長を続けて、径 0.8mm にも達する巨細胞を形成する。

低線量では、致死細胞のほとんどはなお数回増殖し、4～5 回の分裂に相当する 20～40 個の細胞から成る小さな非生存コロニーを作る。実際には、このような小さなコロニーを染色すると巨細胞を含んでおり、中には巨細胞のみから成るものもある。X 線量が大きくなると、分裂回数が減り、増殖不全コロニーの細胞数も減少する。600r 以上では、初回分裂する能力も大きく減弱し、800r 以上では事実上すべての細胞が単独細胞のまま残る。さらに、持続不可能なコロニーを形成する巨細胞の比率も線量とともに増加する。この関係を表 1 に示す。 10^4 個もの細胞を植えたプレートを 1,000r あるいはそれ以上で照射すると、培養、染色で

表 1. X 線量の増加に伴い、増殖不全コロニー当りの細胞数が減少し、このような非生存軍における巨細胞の比率が上昇して、800～1,000r では事実上すべてが巨細胞となることを示す。

X 線量 (r)	平均細胞数／増殖不全コロニー	増殖不全コロニーに占める巨細胞の比率 (%)
50	27.	6.7
200	23.	23.
400	13.	28.
600	1.7	100.
1000	1.0	100.

* 非照射群における巨細胞の出現率は 0.19%

はほとんどが単独の巨細胞である (図 5～7)。

巨細胞形成にいたる生合成過程を停止するために必要な放射線量はさらに大きい。単独細胞群に 10,000r 以上を照射しても、植えた細胞の 5～20% が巨細胞になる。

照射により生ずる巨細胞の特徴

このような巨細胞の出現率は非常に高く、ほとんど正常細胞と混在せずに任意の量を得ることもできる。例えば、単独細胞群を 600r で照射すると、約 20% が増殖不全コロニーに成長する。表 1 から分かるように、巨細胞の平均出現比は 1.7 で、ここから得られる巨細胞は初回培養細胞数の 30～35% となる。線量をさらに小さくすると、初期の正常細胞より多い巨細胞が得られるが、より多くの生存、増殖した正常細胞と混在している。1,000r 以上 10,000r 以下では、巨細胞の出現率は初回培養細胞数の 10～15% に低下するが、非常に高純度の試料が得られる。このようなパラメータを調整することにより、任意の純度で 10⁶ 個あるいはそれ以上の巨細胞を得ることも可能である。

この奇妙な細胞の研究は始まったばかりであるが、現状では以下の知見が得られている。

ガラス面に付着して伸展した巨細胞は、概ね円形の不規則な形状であるが、楕円形、長円形の場合もある。直ちにトリプシン処理すると、直径約 50 ミクロンの球型となり、細胞容積は 6 × 10⁴ μ³ で、正常 HeLa 細胞の 15 倍にもなる。細胞質の染色性は正常細胞より低濃度であるが、核は濃染する。核は常に大きく、数個の巨大な核小体を含むこともある。正常な 2 個の核小体を見ることもあるが、正常細胞より特に多いわけではない。核の破碎、ロゼット状変形もしばしば認められる。

この細胞は代謝率が大きく、培地の pH 変化は同容積の分裂細胞のそれにほぼ匹敵する。消耗した培地を定期的に交換すれば、長期にわたって活発な代謝状態を維持できる。この方法で、37℃で 3 週間、多くの細胞を維持することができた。

巨細胞は、正常細胞と同じくガラス面に強く付着する。トリプシン処理により剥離して培養液に再懸濁すると再び新しいガラス面に付着して以前と同じ形態、性状を示すようになる。トリプシン処理後のガラス面再付着は、おそらく新たな外タンパク層の分泌能の指標となりうる。

以前に報告した照射細胞の「フィーダー層」は、すべてこの巨細胞からなり [8,9]、トリプシン処理による傷害のため細胞内容の広範な漏出、増殖能を失った単独細胞のコロニー形成を促進する

大型の濃染核物質を形成する能力は、このような細胞が生合成能、異化能を保持していることの直接的な証拠である。巨細胞が実際に増殖能を失っているか否かは、非常に興味深い問題である。完全培地を 3～4 日毎に定期的に交換しつつ 20 日間培養して巨細胞を観察すると全く増殖しないが、正常細胞は同条件下で 1 世代 20 時間で増殖する。多数の細胞を使用して、さらに詳しく有糸分裂の状態を研究した。少なくとも 10⁵ 個の細胞について、顕微光で有糸分裂像を検討した。巨細胞には、ときに初期 (early prophase) の形態が見られたが、早期 (late prophase)、中期 (metaphase)、終期 (telephase) の像は 1 例も認めなかった。この早期、中期、終期に相当する有糸分裂像は、非照射細胞では 3～6% に認められた。我々の標準条件下では、放射線誘発巨細胞は、事実上完全にその増殖能を欠いていると結論できる。

巨細胞は増殖能を失っているが、ウイルスによる破壊にも非常に感受性が高い。Newcastle 病の粒子 200 個を巨細胞 10⁵ 個のプレートに加えると、5 日以内にほぼ完全な細胞変性をきたす。正常 HeLa 細胞および照射による巨細胞の混合培地にこのウイルスを加えると、選択的に巨細胞が破壊されるが、これはおそらく表面積が大きいためである。ウイルスが潜在する HeLa 細胞をこの巨細胞上に植えると、大量の細胞破壊が起こる。この現象の詳細については別項に譲る。

考 察

以上のデータから、HeLa 細胞の X 線による 4 種類の反応が区別される。(a) 単独細胞の肉眼的コロニー形成能の消失。この反応は 75r 付近に肩があり、生存細胞数は 96r 増加する毎に 37% 減少する。これによって 600r までの線量で致死損傷を受けた細胞は、1～5 世代分裂する能力を残している。分裂の停止後、かなりの割合の細胞が増殖を続けて巨細胞を形成する。(b) 生存細胞の成長遅延。この作用は定量が難しいが、100～200r で既に明らかとなる。(c) 600r 以上では、再生装置への傷害が出現し、細胞は 1 回も分裂しなくなる。しかしこのような細胞もなお巨細胞を形成することから、代謝装置はなお機能していることがわかる。

(d) さらに大線量になると、巨細胞の生成も停止するため細胞が消失する。この過程は他に比べて放射線感受性が小さく、10,000～20,000r 照射後も、もとの細胞のかかなりの部分がなお巨細胞を形成する。

これらの実験が示す HeLa 細胞の増殖能喪失の著しい感受性は、温血動物細胞の再生装置の放射線感受性が微生物のそれよりもはるかに高いことを示している。Hela 細胞の 96r における D_0 値は、大腸菌 [12] では 4,000r, T2 バクテリオファージ [13], Newcastle ウイルス [15] では 40,000r, イースト菌の単数体, 2 倍体, 3 倍体, 4 倍体では 5,000～18,000r [15a, b], フカミゾヒゲムシ (*Chilomonas paramecium*) [16] では 15,000r 以上に相当する。正常ヒト組織ではなく癌組織に由来する HeLa 細胞は、X 線感受性も異常である可能性を考え、正常組織由来のヒト細胞による同様の実験を進めている。ここで、HeLa 細胞の死滅効果の主座は、細胞の遺伝的なものにあるのか、あるいは生理学的なものなのかという点が問題となる。また遺伝的である場合、単一遺伝子なのか、あるいは 1 つ以上の染色体の大きな部分をしめるのかという問題がある。

以下の考察は、少なくとも 800r 以上では、致死的效果が遺伝装置に発生していることを (絶対的な証拠ではないが) 示唆するものである。

(a) 死滅細胞がなお何回か増殖する能力は、分裂機構が基本的に保たれていることを示す。この表現遅延現象は、細菌の致死性あるいはその他の変異に特徴的なものである [11,17]。細胞の自己複製部分内にとどまらず、細胞自らにより修復されず、4 ないし 5 世代にわたって発現が遅れ、その後すべての子孫に現れるような損傷は考えにくい。

(b) 96r という小さな値は、その不活化によって不可逆的な障害を引き起こす非常に感受性の高い構造の存在を示唆するものである。この放射線量は、細胞当たりわずか 10^{-12} カロリーである。効率が 100% としても、このエネルギー量では細胞あたり原子結合 2×10^7 本を切断するだけで^{*}、これがランダムに分布することを考えれば、特定の構造物の内部で切断される結合は実際には非常に少ない。遺伝構造のこのような著しく微細な変化に対する感度は良く知られている。一方、これほど少量のエネルギーの吸収により再生能を破壊できるような、非遺伝的細胞内構造の存在は知られていない。

(c) 生存曲線の形状は、倍数体細胞の遺伝構造に局限するヒットから予想されるものと質的に合致しており、また以下の解析から量的にはヒット数 2 と考えられる。

すなわち、放射線照射によって、異なる m 種類のユニットに少なくとも 1 回の電離事象が発生すると特定の機能が失われ、各種類のユニットがそれぞれ n 個存

在し、その全てが不活化されて初めて機能が失われるとすると、この機能が生存する個体の比率は、以下の式の S で表わされる。

$$S = [(1 - e^{-D/D_0})^n]^m \quad (1)$$

ここで D は X 線量、 D_0 は各部位における 37% 致死線量である。この式は Lurla [18] が提唱したもので、その適用可能性については Atwood and Norman [19] が詳細に検討している。ここで n をヒット数と呼ぶ。遺伝現象においては、単数体では $n=1$, 2 倍体では $n=2$, 3 倍体では $n=3 \dots$ である。 n をヒット数と呼ぶ理由は、それが全て不活化されるとその複製物において特定の機能の喪失にいたる遺伝構造の個数を表わすためである。 $n=1$ では、生存曲線は線量に対して直線あるいは対数曲線となる。 $n>2$ では、生存数の対数を線量に対してプロットすると、初期に肩があり、その後は直線的に低下する (図 2)。式 (1) は、すべての部位の放射線感受性が等しいと仮定している。線量が増加すると、より多くの放射線抵抗性部位が細胞死に寄与するようになり、その都度、生存曲線の傾きは大きくなるであろう [19]。最初の直線部分だけに注目して、放射線の致死効果に最も感受性が高い m 個の部位だけを考える。各部位における n, m, D_0 の値は次の方法で求められる。すなわち、直線部分の外挿と縦軸との交点は $S_0=n^m$, 直線部分の傾きは $-m/D_0$ となる。

これを図 2 の生存曲線に当てはめると、以下の値が得られる。

$$n = 2, m = 1, D_0 = 96.$$

この時、

$$S = [(1 - e^{-D/96})^2]$$

は実験精度の範囲で各点によくあてはまる^{**}。

このデータから、致死作用は単純な単一遺伝子変異による可能性は非常に考えにくい。96r という値は、既知のいかなる単一遺伝子変異とも全く一致しない。この数字から、Lea [20] の方法により感受性領域を求めるとおよそ $1 \mu^3$ となり、これは広く認められている単一遺伝子の大きさの 10^5 倍以上にもなる [21]。このような容積計算の理論的不確実性は多く指摘されているところであるが [19,22], 10 倍あるいは多くとも 100 倍以上の誤差となることはほとんどない。今回のよう

^{*} 96r は、 $96 \times 2 \times 10^{-6}$ あるいは 2×10^{-4} Cal/g に等しい。これらの細胞の質量は約 4×10^{-9} g であることから [9], 1 細胞当りの最大エネルギーは約 8×10^{-12} Cal である。原子結合エネルギーが平均 20,000 Cal/g (原子量) に過ぎないと仮定すると、最大 $(8 \times 10^{-13}) / (2 \times 10^4) = 4 \times 10^{-17}$ g (原子量) すなわち $6 \times 10^{23} \times 4 \times 10^{-17}$ 原子である。

^{**} 図 2 の外挿値は 2.1 となるが、これは実験精度の範囲で 2 に等しいと考える。ただし、より大きな n が細胞殺傷過程に部分的に関与する結果、平均値が $n=2.1$ となっている可能性はありうる [19]

な非常に大きな開きは、単一遺伝子メカニズムを否定するに充分である。

当該部位は、正常な修復が行われない染色体の切断による致死作用をもつ染色体の可能性が高い。

細胞内の1つの染色体対が、他よりも放射線感受性が高いか、あるいは致死効果が2カ所以上の染色体切断による有糸分裂架橋形成、転座、遺伝子不平衡などの発現によるものであるとすれば、このデータは定量的に説明可能である。

これらあるいは他の可能性についての実験を進めている。

これと同様の実験結果を、Lucke and Sarachek [15a]も報告している点は興味深い。彼らは生存曲線から求めたn値と、酵母細胞の単数体、2倍体、3倍体、4倍体の遺伝的倍数性の間に1対1の対応を見出している。またm値がいずれの場合も1であることも示している。Zirkle and Tobias [15b]は、2倍体酵母細胞の生存曲線で、より大きなm値を報告している。

HeLa細胞の顕著な放射線感受性は、この殺傷作用が哺乳類の全身照射の平均致死線量を決定する過程に重要な寄与をしてことを強く示唆するものである。ヒトの50%致死線量である500rでは、HeLa細胞と同等の感受性を持つ細胞の99%が死滅する。このような細胞がなお数世代にわたって増殖したり、巨細胞として生存する能力は、放射線障害に特徴的な症状完成までの遅延に関与するものと思われる。様々なヒト正常由来のクローン細胞のX線感受性、その代謝状態の変化による影響の比較試験が現在進行中である。様々なX線量における生存細胞の変異発生に関する実験については間もなく発表予定である。

この実験で認められた巨細胞形成と、大腸菌の照射で認められるへび状の細胞 [23]の間には顕著な類似性が認められる。哺乳類細胞における巨細胞形成は、Grahamら [24]も観察しており、彼らは腫瘍を照射してその出現を慎重に観察し、様々なX線量に対して塗抹標本中の巨細胞出現率 (%) を腫瘍感受性の指標としている。我々の成績は、Grahamらのものと完全に一致しており、in vitro の観察結果が人体のものと密接に関連していることは明らかである。図2に示す生存曲線を実験的に拡大する研究が進行中である。細胞の放射線感受性が均一であると仮定すれば、このデータから様々な大きさの腫瘍を死滅させるために必要な線量を推測することができるはずである。様々な正常細胞、悪性細胞についてこの関係を調べることが必要であることは明らかである。

要約

ヒト頸癌 HeLa 細胞の単独細胞を使い、非照射細胞が100%肉眼的コロニーを形成する条件下でX線照射の及ぼす影響を定量的に検討した。この方法では、多数の細胞間の相互作用による複雑さを回避できる。

単独細胞の生存能 (15日以内に肉眼的コロニーを形成する能力と定義) をX線量に対してプロットすると、典型的な2ヒット生存曲線となる。初めの75rまで肩があり、その後は対数目盛上で直線となり96rで生存率が37%となる。この放射線感受性は、すべての既知の微生物にくらべて数十倍から数百倍である。

致死作用が放射線誘起性の遺伝障害によることを示す(確証ではないが)証拠があるが、これは単純な単一遺伝子の不活化によるものではない。作用点は染色体である可能性がある。

100rあるいは既にそれ以下で、成長遅延作用が認められる。800r以下では、増殖能が障害された細胞がなお数回分裂することができる。これ以上の線量では細胞分裂はすべて障害される。

線量に関わらず放射線死した細胞のかなりの部分が1つあるいはそれ以上の巨細胞を形成する。巨細胞は活発な代謝を営み大多数を占めるようになるが、この実験条件下で増殖することはない。巨細胞を数多く得る方法についても述べた。巨細胞は特にウイルスの作用に鋭敏である。

照射細胞の一部は、おそらく変性により、プレートから消失する。この作用は非常に低効率で、10,000rを照射しても培養した細胞の5~10%が巨細胞となる。

【参考文献】

1. Wilson, G. S., and Miles, A. A., Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 4th edition revised by G. S. Wilson and A. A. Miles, 1955, 99.
2. Luria, S. E., Animal Virology, New York, John Wiley and Sons, 1953, 39.
3. Reviewed by Stroud, A. N., and Bruetz, A. M., *Texas Rep. Biol. and Med.*, 1954, **12**, 931.
4. Halberstaedter, L., Goldhaber, G., and Doljanski, L., *Cancer Research*, 1941, **2**, 28.
5. Reid, T. R., and Gifford, M. P., *J. Nat. Cancer Inst.*, 1952, **13**, 431.
6. Russel, W. L., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1952, **16**, 327.
7. Demerec, M., and Latarjet, R., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1946, **11**, 38.
8. Puck, Theodore T., and Marcus, Philip I., *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1955, **41**, 432.
9. Puck, T. T., Marcus, P. I., and Cieciura, S., *J. Exp. Med.*, 1956, **103**, 273.
10. Gey, G. O., Coffman, W. D., and Kubicek, M. T., *Cancer Research*, 1952, **12**, 264; Scherer, W. F., Syverton, J. T., and Gey, G. O., *J. Exp. Med.* 1953, **97**, 695.
11. Demerec, M., and Cahn, E., *J. Bact.*, 1952, **65**, 27.
12. Lea, D. E., Actions of Radiations on Living Cells, Cambridge, Cambridge University Press, 1947, 318.
13. Watson, J. D., *J. Bact.*, 1950, **60**, 701.
14. Puck, T. T., Marcus, P. I., and Cieciura, S., data to be published.
15. (a) Lucke, W. H., and Saracher, A., *Nature*, 1953, **171**, 1014. (b) Zirkle, R. E., and Tobias, C. A. *Arch. Biochem. and Biophysics*, 1953, **47**, 282.
16. Ducoff, H. S., *Radiation Research*, 1954, **1**, 130, abstract 15.
17. Newcombe, H. G., *Genetics*, 1948, **33**, 447; 1953, **38**, 134.
18. Luria, S. E., *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1947, **33**, 253.
19. Atwood, K. C., and Norman, A., *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1949, **35**, 696.
20. Lea, D. E., Actions of Radiations on Living Cells, Cambridge, Cambridge University Press, 1947, 83.
21. Muller, H. J., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1941, **9**, 151.
22. Puck, T. T., in Nickson, J. J., Symposium on Radiobiology, New York, John Wiley and Sons, 1952, 385.
23. Lea, D. E., Actions of Radiations on Living Cells, Cambridge, Cambridge University Press, 1947, 300.
24. Graham, R. M., and Goldie, K. R., *Cancer*, 1955, **8**, 71; Graham, R. M., and Graham, J. B., *Cancer*, 1955, **8**, 59.