

組織培養法による放射線障害の 測定指標に関する研究

岡大医学部衛生学教室（指導：岡山医学部教授 大平昌彦）

中 谷 亨

〔昭和46年9月30日受稿〕

I 諸 論

原子力発電の全国的な実用化もすでに着々と実現しつつあるわが国の産業界において、原子力産業における衛生管理に対する期待は、日一日と増大しつつある。¹⁻⁵⁾

1969年にわが国で行なわれた国際産業医学会においても、この面に関する研究がきわめて活発に討議された。しかしその内容は現場における実践的な管理方策とともに、放射線障害の作用メカニズムの解明と防禦に関する基礎的な研究なども同時に討議された点に特徴があり、これは放射線産業に関する衛生学的なアプローチが今日なお、歴史が浅く、原子力の実践的な応用の急ピッチな進展に伴う放射線産業医学に対する要求とこれに対する態勢整備のアンバランスの実態を示していると考えられる。¹⁾

従来放射線の防禦に関しては、物理的な方策が採用されているが⁶⁾ Patt ら⁶⁾ が、動物実験による化学的防禦剤の研究を報告して以来今日まで数多くの化学的防禦剤が開発されつつある^{8, 20)}。しかし今日なお化学的防禦剤の応用は、薬剤の毒性および利用方法上の諸条件など数多くの未解明の問題があり、実用段階にあるとはいえないが⁹⁾、この面の研究の開発は、産業医学および衛生の分野において、従来物理的な防禦によってのみその予防対策を考えていた数多くの職業病対策に対する、より積極的な化学的手段の可能性を認め得たものとして意義はきわめて大きいばかりでなく、生体内における障害のメカニズムの解明にも数多くの成果をあげることができた点、今後さらに精力的に取り組まなければならない当面の課題といえよう。

II 研究目的

放射線障害に対する化学的防禦剤に関する研究は、上記したように数多くの重大な意義を有しており従

来の研究成果がこれを裏づけているが、放射線障害のメカニズムの解明に伴う系統的な新しい防禦物質^{6, 12)}の開発が進められるに従って、放射線障害の生体におよぼす影響の評価に関して、従来の動物実験による生存率では、あまりにも包括的であることが反省され、その影響をより単純化した評価方法が、実験手技の高度化に伴ってますます強く要求されるに至ったと考えられる。

その要求に応えるものとして、動物実験における生存率との対比において *in vitro* の現象の究明が試みられており、これを基礎にして組織培養法の応用が^{3, 21)}この面でも飛躍的に拡大しつつある。特に近年の組織培養法の実験手技の進展に伴って *in vivo* の結果と *in vitro* の結果の差そのものの要因の解明も進み、*in vitro* の実験がそれ自体として独立的に意義をもつに至ったといえよう。

しかし単純化したとはいえ組織培養法も、生体現象の観察であり、その評価については今なお検討が不十分であり、動物実験における生存率と同様、数的な変化として細胞数を測定することに終止している感があり、この点さらに異った立場からのアプローチが要求されている。

今回著者は、この分野での組織培養法の大幅な応用が進みつつある現状の中で、放射線障害の数量的評価の指標を検討する目的で研究を実施した。また同時にこの研究成果の上に、化学的防禦剤として AET (S-2-Amino ethylisothiuronium bromide) を用い、その防禦効果についてこれら指標を用いて検討を行なった。培養された細胞を用いて、放射線の生物学的効果、あるいは他の因子によるその修飾効果を検討しようとする立場にたつとき、いかなる指標によってその効果を適確に判定したらよいかは実際的にはきわめて困難な課題である。

今回は、細胞浮遊液培養法により培養されたL細胞を用い、それに対する放射線効果の判定指標とし

て細胞数計測の他、細胞容積、および細胞 DNA 量の経過を照射線量別に追跡するとともに、3 指標間の相互関係を統計的に検討した。Dewey²¹⁾らは、組織培養法を導入して行なわれる生化学的実験によく使用されている clone 法ならびに細胞浮遊液培養法の両者を比較検討し、細胞浮遊液培養法にあっては、放射線照射後の測定時期の差によって細胞数が著明に変動することを指適した。しかし細胞を構成するその内容というべきものの変化については検討するにいたっておらず、したがって細胞数の変化と平行させて細胞そのものの変化を他の側面から多角的に追跡した研究はまだまだ数少ない²⁵⁻³⁰⁾。

放射線照射による培養細胞数の変化については、安東^{19) 20)}が放射線障害に対する化学的防禦剤効果をスクリーニングする実験において、著者とほとんど同一の培養条件下にあった L 細胞について実験し、細胞計数値のパラッキの範囲を統計的に検討して報告している。著者はこの研究成果を参照しつつ、細胞総体の代表値の一つとしてその容積、ならびに細胞構成成分の代表値の一つとしての DNA 量を選んで測定し、細胞数以外のより有効な判定指標の確立を目的として実験を行なった。

III 研究方法

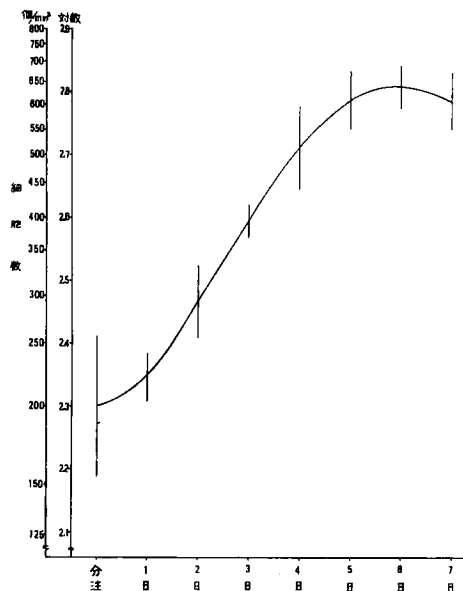
培養 L 細胞を用いこれに⁶⁰Co の γ 線の照射を行い、培養細胞系における放射線効果の評価指標として細胞数、細胞容積および DNA 含量の経時的推移を検討した。

A 使用細胞ならびに培養条件

使用細胞は岡山大学医学部衛生学教室において継代培養した L 株細胞 (東京大学伝染病研究所→岡山大学医学部妹尾病理学教室→当衛生学教室) を用い、細胞浮遊液培養法にて培養を行なった。

培養液は、YLE 培地 (Yeast extract-Lactalbumine-Earle medium) に牛血清を加え、さらにペニシリン (100 u/ml) およびストレプトマイシン (100 γ /ml) を添加調整し、培養液 pH は用に臨み 1.4% NaHCO₃ 液を滴下することによって 7.2-7.6 を保つよう修正した。牛血清濃度は細胞維持および増殖用培養液には 10%、実験用培養液には 5% の割合とした。なお添加牛血清濃度は細胞増殖に対して重要な影響を与えるものと考えられるが、著者の実験条件および実験規模の場合、本使用濃度において充分その適応性を認めうることを、図 1 に示すとくあらかじめ予備実験によって確認した。

図 1 血清 5% 加の細胞増殖曲線



細胞維持および増殖のための母培養は、角型培養瓶 (内径40×40×100mm) を用い、培養瓶内面に単層として増殖された細胞を先端にゴム片を取り付けた金属棒 (ラバクリーナ) を用いてかき落して細胞浮遊液とし、十分攪拌後その一部をとって細胞数を計数、細胞数200±20個/mlを目標として希釈、新たに準備された角型培養瓶に10mlあて分注、孵卵器中37℃に保持し、分注3日目に培地交換を行なった。この操作を1週間を周期として繰り返し、細胞を維持増殖せしめたが、その間細胞数は2.5~5倍に増殖した。

実験用培養は、前記角型培養瓶を用い、母培養角瓶の一部を用いて培養液を実験用に交換後細胞層を剝離、細胞数を計数、細胞数200±20個/mlに希釈、十分振盪攪拌しながら10mlあて培養瓶に分注し、孵卵器中37℃に保持した。分注2日後に⁶⁰Co の γ 線を照射し、ただちに培地交換、照射時、照射1日後、3日および5日の培養瓶あたりの細胞数、細胞容積および DNA 含量を照射群について測定し、同時に非照射群についても測定して比較した。測定時期については、あらかじめ細胞数を目安とした予備実験によって、分注5日までは細胞数は対数グラフ上で直線的に加速度をもって増殖することを認めたので、その成果を参考に決定した。

B 照射線源および照射条件

^{60}Co γ 線照射装置(東芝 RJ-107-2型回転治療装置, 2,000 curie)を使用し, 焦点被照射体間距離65cm, 線量率66-70r/min にて γ 線200 r, 400 r および800 r を一時照射した. 距離65cmにおける照射野は直径約15cmの円形であり, 培養瓶2本をならべても充分その中に位置せしめうる. したがって培養瓶2本づつ一時に照射し, その間培養瓶は回転盤上30 rpm にて回転せしめて照射むらを少なくすべく留意した. なお照射に際してはその都度 Victoreen の Condenser-r-meter を用いて線量率を測定し, 照射線量の正確を期した.

C 細胞数計数法

培養瓶内面にて単層培養された細胞をラバクリーナーを用いてよく剝離し, 培養液をピペットより噴出させまた充分振盪搅拌して均一な細胞浮遊液とする. この段階でトリプシン処理を行なうならば細胞の均等化にはなほだ有利ではあるが, 細胞容積およびDNA測定に対する支障が予想されたのでここでは省略した. 細胞浮遊液1mlをピペットにて試験管に採取し, “トリプシン(モチダ)溶液”0.1mlを加えて振盪37°C15-20分放置, 細胞が充分単離されるのを待って血球計算盤を用いて単位容積(mm³)あたりの細胞数を計数した. 核数計算法としては, 通常クリスタル紫などの色素液を用いて希釈染色し生細胞数のみを算定する方法がとられているが, 著者のばあいは希釈染色操作によってバラツキがはなはだしく増大することが認められたので, 原液のままただちに生細胞数を計数した. 同一試料につき6回の計数を繰り返し, その平均値の11/10をもって代表測定値としたが角形培養瓶中の細胞数は測定値 $\times 10^4$ 個として得られる.

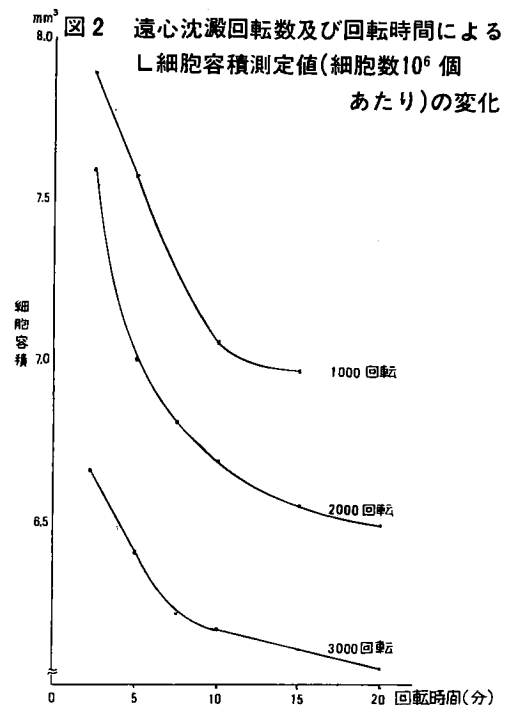
D 細胞容積測定法

特に作成せる目盛付遠心沈澱管を用いて測定した. 下部沈澱管部には(6(粗) \times 10(細))の目盛が分画してあり, 上部液注入部の容積は約5mlのものである. 各沈澱管の目盛は, あらかじめ水銀を用いて目盛検定を行ない, それぞれ沈澱管個々のFactorを決めて測定された細胞容積の補正に用いた. ちなみに水銀検定を行なった沈澱管14本の1目盛(粗)の容積は6.129-7.244mm³の間に分布した.

先に作成した細胞浮遊液中, 細胞数計数用に使用した残液9mlを用い, 2-3本の沈澱管に等量づつピペットを用いて注入した. 回転数2,000 rpm にて10分間遠心沈澱を行ない, それぞれの沈澱の目盛を

読みとり, 沈澱管のFactorを乗じて容積を補正し, その和をもって細胞浮遊液中の細胞容積とした. したがってこの値に10/9を乗ずれば培養瓶毎の細胞容積が得られ, さらに計測された細胞数にてこれを除することにより単位細胞数あたりの容積が得られる.

なおこの様な操作によって得られる細胞容積値は, 遠心沈澱回転数および回転時間の変動によって, 図2に示すごとく, かなりの変動をみた. したがって測定値はあくまでも, 相対的なものであって回転数2,000 rpm および回転時間10分の条件は厳重に守られる必要があった.



E 細胞DNA量測定法

McIntire ら²³⁾は, DNAは $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の低濃度で0.04N NaOHから定量的に沈澱する事実に着目し, これを利用して, 組織培養におけるDNA定量のための簡易法を報告している. 著者はこのDNA簡易定量法を追試検討し, 若干の変更を加えることにより, 今回の実験目的に適合しうることを認めたので, これを採用した. McIntire ら²³⁾の方法に従って著者が実施したDNA定量法は以下の通りである. まず細胞容積測定用目盛付沈澱管に集められた細胞沈澱を長い注射針をつけた注射器に吸引, 培養瓶単位で容量10mlの遠心沈澱管に移し, 生理食塩水にて洗浄, 細胞を遠心分離する.

ついで、細胞数 $2-3 \times 10^6$ 個に対し 0.4 N NaOH 0.4 ml を加え、沸騰浴中 1 時間加熱する。このアルカリ加水分解により RNA の附着は完全に除かれる。

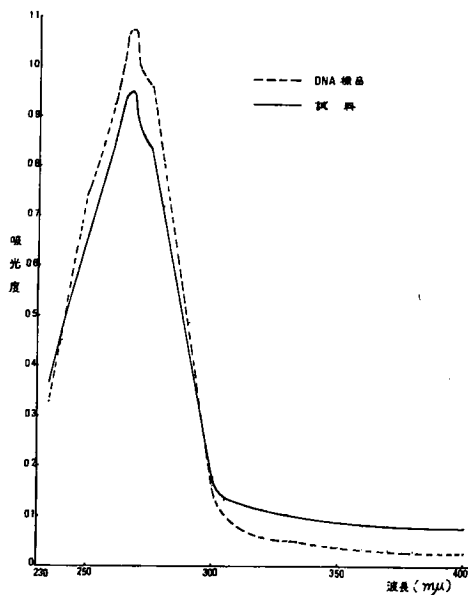
冷却した後、蒸留水を加えて NaOH 濃度を 0.04 N とし、液量の $1/20$ 量の 1% Salmine 溶液 (石津製薬プロタミン硫酸塩を使用) を添加、1.5 時間永冷して DNA を析出せしめる。 0.4°C に保ちつつ $2,000 \text{ rpm}$ で 10 分間遠心沈澱し粗 DNA を分離する。

ついで粗 DNA 沈澱に $10\% \text{ NaCl}$ 加 $0.1 \text{ NH}_2\text{SO}_4$ 5 ml を加え、沸騰浴中 30 分加熱して DNA を溶解せしめ、放冷、蒸発減量分の蒸留水を加え、混和、遠心沈澱を行なう。この操作で Purine および Pyrimidine が除かれる。

上記 DNA 抽出上澄液の紫外部 $268 \text{ m}\mu$ および $330 \text{ m}\mu$ の吸光度を読み、その差が試料中の DNA 量に比例するので、DNA 標品から得た標準曲線によって DNA 量を計算する。測定計器は日立 139 型分光光度計を用いた。DNA 標準曲線の作成については、原報では標準標品として Calf thymus DNA (N; 14.9% P; 8.53%) を使用しているが、著者は Sperm DNA を用いた。その紫外部吸収曲線は、図 3 に示すごとく、細胞から抽出された試料について作成した紫外部吸収曲線とほぼ一致していることが認められた。

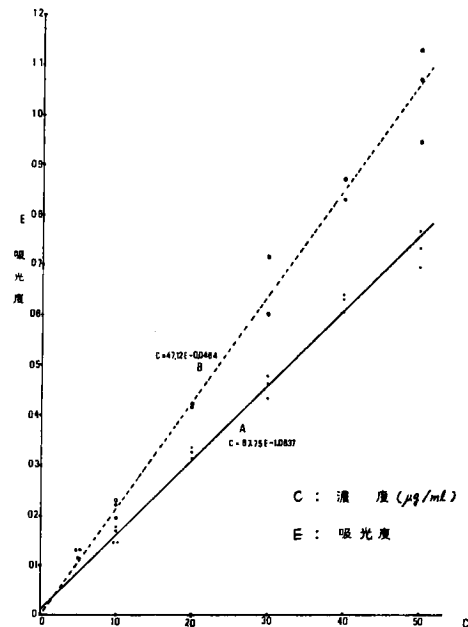
さて酸性抽出液中の DNA 濃度は著者の実験のば

図 3 DNA 標品および試料の紫外部吸収曲線



あい $10-50 \mu\text{g/ml}$ であり、DNA 濃度と吸光度とから最小二乗法によって回帰直線を求めると図 4 に示す

図 4 DNA 標準曲線



ごとく、A 直線については、 $C = 67.75E - 1.0837$ および B 直線については、 $C = 47.12E - 0.0464$ として表わしうる。ここで A 直線は DNA 標品に対し試料と同じ処理を施したばあいに得られたものであり、一方 B 直線は標品を直ちに、 $10\% \text{ NaCl}$ 加 $0.1 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ に加熱溶解せしめたばあいに得られたものである。原報では DNA の回収率はほとんど 100% であったとして、B 直線に相当する標準曲線によって DNA 量を計算しているが、著者のばあいは、DNA $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度で 77% 、濃度上昇とともにしだいに低下して $50 \mu\text{g/ml}$ 濃度で 71% の回収率であり、実験操作における $23\% - 29\%$ 程度の DNA 損失が見込まれねばならなかった。この点回収率は悪かったが、その再現性は高く、本測定法は充分使用可能なものとして判断された。したがって DNA 濃度は A 直線を用いて計算し、さらに培養瓶あたりの DNA 量に換算した。すなわち $\text{DNA 量} / \text{培養瓶} = C \times 5 \times 10^6 / 6 (\mu\text{g})$ となる。またこれを細胞数にて除すれば、単位細胞数あたりの DNA 量が得られる。

IV 実験結果とその考察

1. 照射後経過別細胞数, 細胞容積および細胞 DNA 量の変化

⁶⁰Co の γ 線を 800 r 照射した後の培養瓶あたりの細胞数, 細胞容積および細胞 DNA 量の推移を, 照射後 1 日, 3 日および 5 日において追跡し, その測定結果から単位細胞あたりの細胞容積, ならびに単位細胞数あたりと, 単位容積あたりの DNA 量を求め, 同時に行なった非照射対照群についての値と比較検討した。

なお, この照射群と非照射群との比較にあたっては, 培養に関する照射以外のすべての複雑な因子を消去する心があり, そのため両群それぞれ対応する培養瓶ごとの差を求めてその有意性を検討することとした。すなわち照射群と対照群とが実験開始の時点では, 互いに同一条件であることが必要であり, 照射群と対照群の分注に際して互に対応する培養瓶に共通の番号を付してこれら両者の差を検討した。したがってこれら共通する番号の培養瓶については, 照射の有無以外は全く同一条件とみなしうる。

表 1 放射線障害の経時的変代 (800 γ) 対応する各瓶毎の平均値の差 (対照群-照射群) の検定 (t-test)

	細胞数 培養瓶 ($\times 10^6$)	細胞容積 培養瓶 (mm^3)	細胞容積 単位細胞数 ($\text{mm}^3/10^6$)	DNA 培養瓶 (μg)	DNA 単位細胞数 ($\mu\text{g}/10^6$)	DNA 単位細胞容積 ($\mu\text{g}/10\text{mm}^3$)
1 日後	※ ※ 76.7 \pm 18.1	※ 1.27 \pm 0.43	※ -1.71 \pm 0.57	7.33 \pm 4.52	※ -14.67 \pm 5.20	-1.72 \pm 2.57
3 日後	※ ※ 144.0 \pm 18.1	※ 2.72 \pm 0.92	※ ※ -1.34 \pm 0.35	※ ※ 36.50 \pm 9.89	※ ※ -8.75 \pm 2.46	4.38 \pm 3.68
5 日後	※ ※ 255.5 \pm 24.0	※ ※ 5.97 \pm 0.42	※ ※ -1.52 \pm 0.29	※ ※ 54.83 \pm 12.60	※ ※ -12.33 \pm 2.29	2.67 \pm 2.38

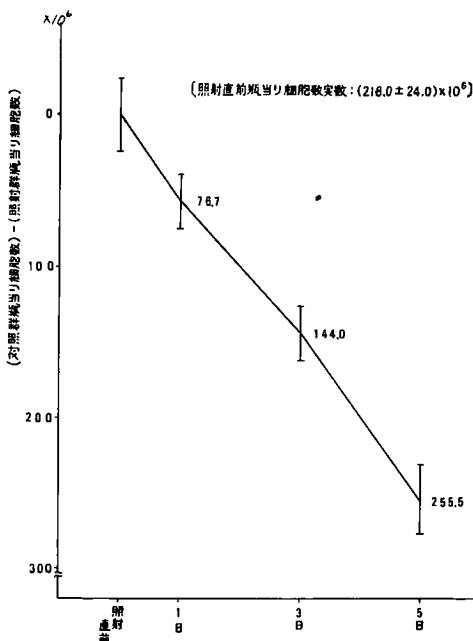
註(1) 照射前, 対照群の計測値は下の通り

細胞数 培養瓶 ($\times 10^6$)	細胞容積 培養瓶 (mm^3)	細胞容積 単位細胞数 ($\text{mm}^3/10^6$)	DNA 培養瓶 (μg)	DNA 単位細胞数 ($\mu\text{g}/10^6$)	DNA 単位細胞容積 ($\mu\text{g}/10\text{mm}^3$)
218.0 \pm 24.0	15.73 \pm 1.19	7.37 \pm 0.45	132.67 \pm 10.94	61.63 \pm 2.13	85.72 \pm 5.29

(2)※: 5%の危険率で有意差がある。 ※※: 1%の危険率で有意差がある。

培養瓶あたりの細胞数, 細胞容積および DNA ともに, 表 1 図 5 ~ 7 に示す如く 1, 3 および 5 日と時間の経過とともに対照群との差は拡大し, 照射による発育の抑制が明らかであった。しかし単位細胞数あたりの細胞容積および DNA 量としてみると表

図 5 培養瓶あたりの細胞数経時変化(800 γ) (対照群と照射群の差を示す)



1, および図 8, 9 の通りで, 1, 3 および 5 日後ともにその差は有意であるが, とりわけ 1 日においてすでにその差が顕著に現われている。このことは本法が放射線影響に関して極めて鋭敏な反応を捕捉し得ることを物語っていると考えられる。

図6 培養瓶あたりの細胞容積(800 r)
(対照群の値)-(照射群の値)

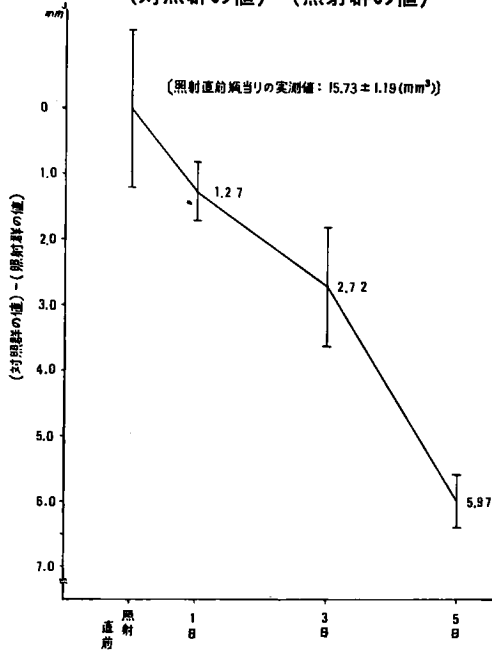


図8 単位細胞数あたりの細胞容積
の変化(800 r)
(対照群値)-(照射群値)

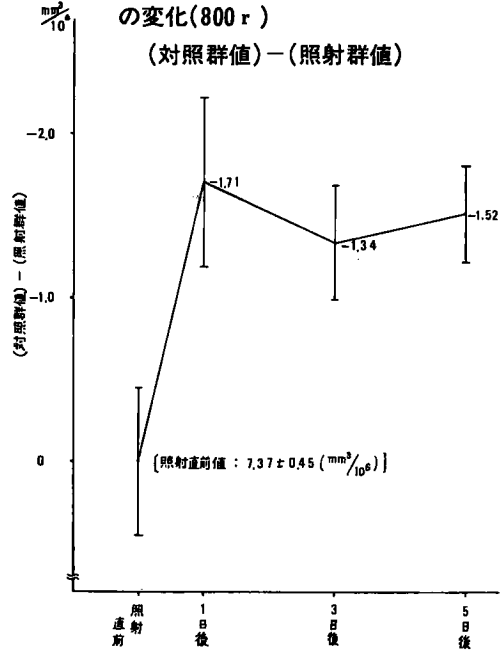


図7 培養瓶あたりのDNA量の変化(800 r)
(対照群値)-(照射群の値)

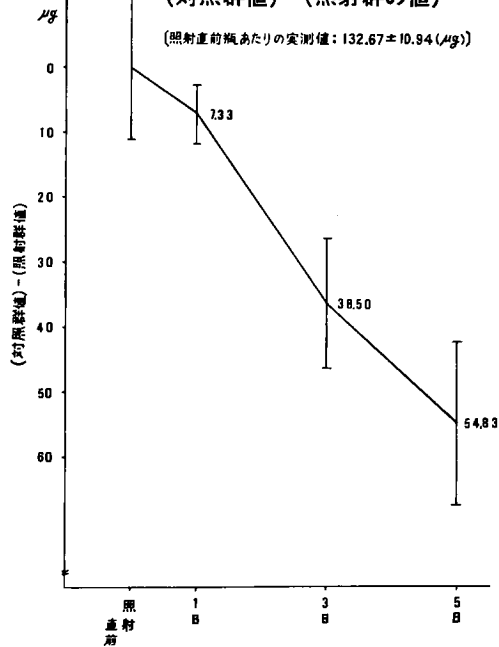
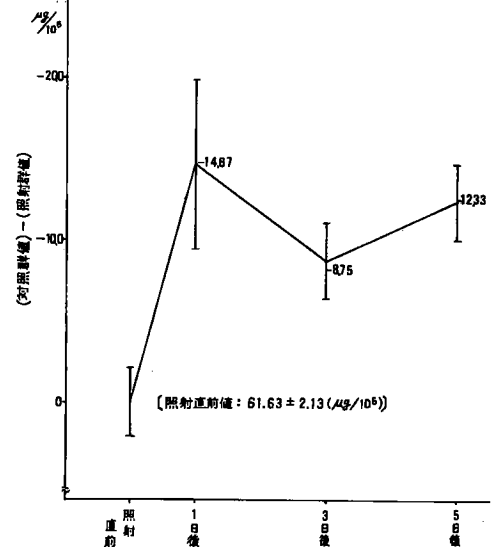


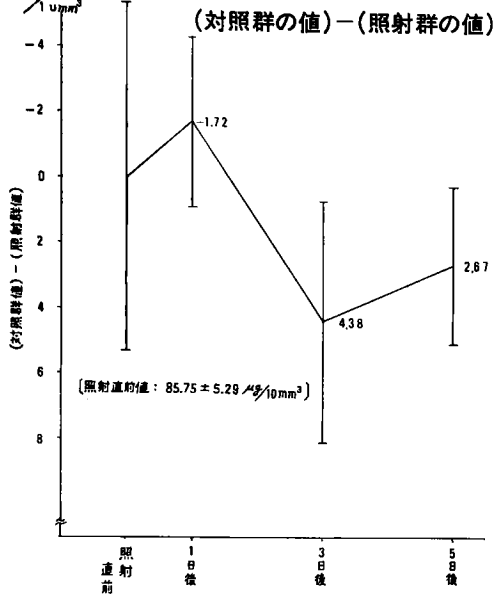
図9 単位細胞あたりのDNA量の変化(800 r)
(対照群値)-(照射群値)



さらに一定細胞容積あたりのDNA量について検討すると、図10に示す如くこれは有意差を認め得るにいたらなかった。

以上の結果を総括すると、従来の培養瓶あたりの細胞数の変化のみを指標としたばあいと異なり、細

図10 単位細胞容積(10mm³)当りのDNA量
の変化(800 r)



胞に対する放射線照射の影響を細胞容積および細胞DNA量について検討することによって、放射線障害の実態をより明らかにする点で有利であり、新しい指標としての利用についても十分期待し得ると思われる。

2. 照射線量別細胞数, 細胞容積および細胞DNA量の変化

前項において⁶⁰Coのγ線800 rを照射した後の経過別の各指標の推移を観察したが、本項においては照射線量別に200 r, 400 r および800 rのγ線をそれぞれ照射したL細胞群につき、照射後5日における細胞数, 細胞容積および細胞DNA量を測定した。

図11 培養瓶あたりの細胞数(照射後5日)
(対照群の値) - (照射群の値)

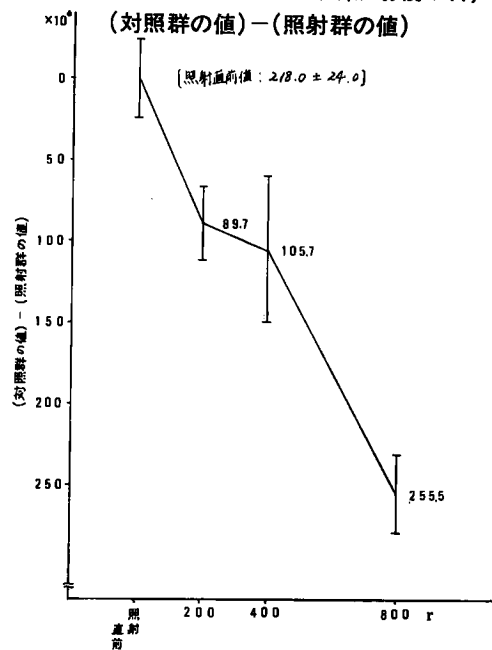


表2 放射線障害の放射線量による変化(5日後)
対応する各瓶の平均値の差(対照群-照射群)の検定(t-test)

	細胞数 培養瓶 (×10 ⁶)	細胞容積 培養瓶 (mm ³)	細胞容積 単位細胞数 (mm ³ /10 ⁶)	DNA 培養瓶 (μg)	DNA 単位細胞数 (μg/10 ⁶)	DNA 単位細胞数 (μg/10mm ³)
200 r	※※ 89.7 ± 22.6	1.12 ± 0.59	※ -0.54 ± 0.18	10.00 ± 7.24	※ -3.58 ± 1.34	2.98 ± 2.54
400 r	※ 105.7 ± 43.7	※※ 2.00 ± 0.54	※ -0.69 ± 0.40	※※ 41.67 ± 8.60	-1.60 ± 3.57	※※ 8.57 ± 2.51
800 r	※※ 255.5 ± 24.0	※※ 5.97 ± 0.42	※※ -1.52 ± 0.29	※※ 54.83 ± 12.60	※※ -12.33 ± 2.29	2.67 ± 2.38

註(1) 照射前, 対照群の計測値は次の通り

細胞数 培養瓶 (×10 ⁶)	細胞容積 培養瓶 (mm ³)	細胞容積 単位細胞数 (mm ³ /10 ⁶)	DNA 培養瓶 (μg)	DNA 単位細胞数 (μg/10 ⁶)	DNA 単位細胞数 (μg/10mm ³)
218.0 ± 24.0	15.73 ± 1.19	7.37 ± 0.45	132.67 ± 10.93	61.63 ± 2.13	85.72 ± 5.29

(1) ※ : 5%以下の危険率で有意差がある。 ※※ : 1%以下の危険率で有意差がある。

図12 培養瓶あたりの細胞容積の変化 (照射後5日)

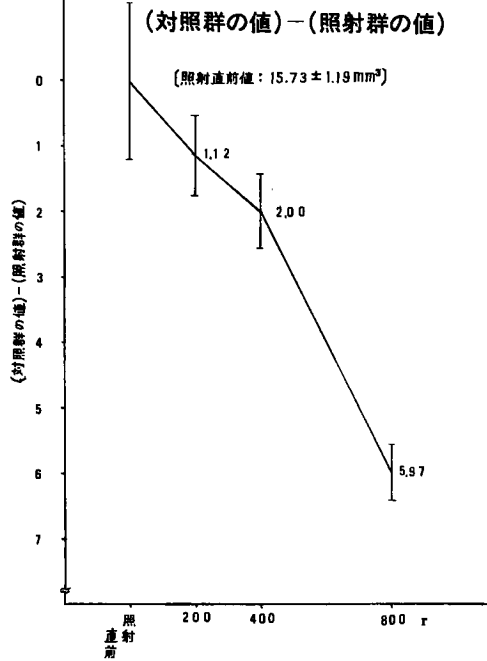


図14 培養瓶当りのDNA量の変化(照射後5日) (対照群値) - (照射群値)

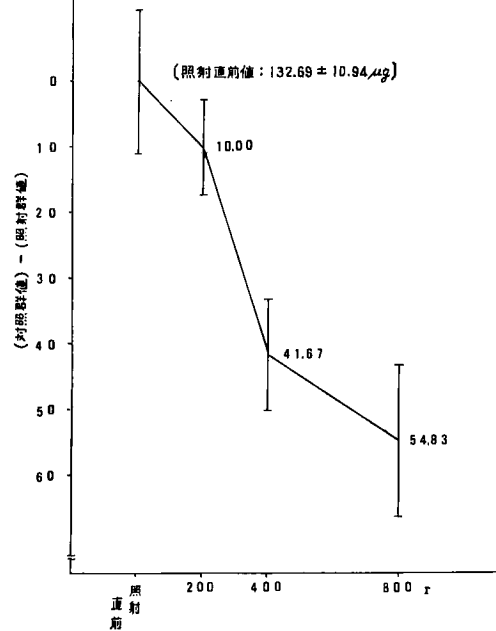


図13 単位細胞数当りの細胞容積(照射5日) (対照群値) - (照射群値)

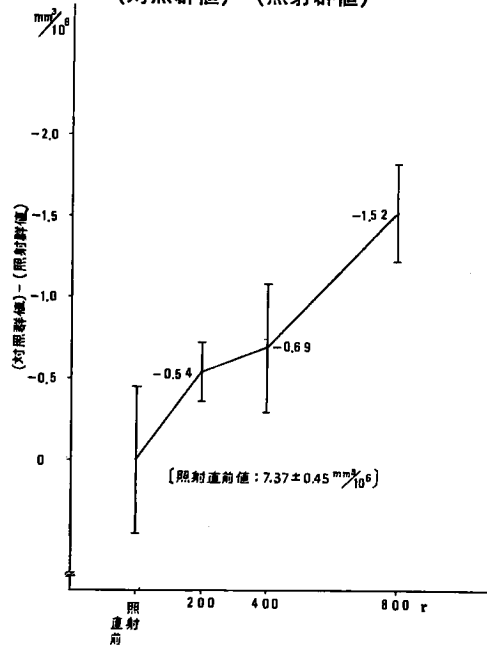
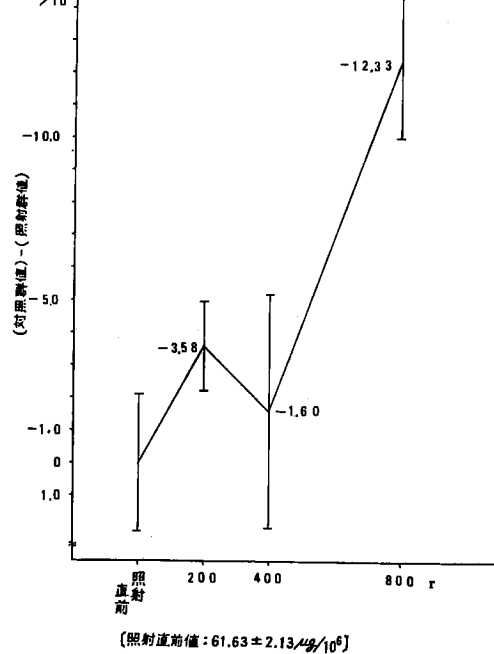
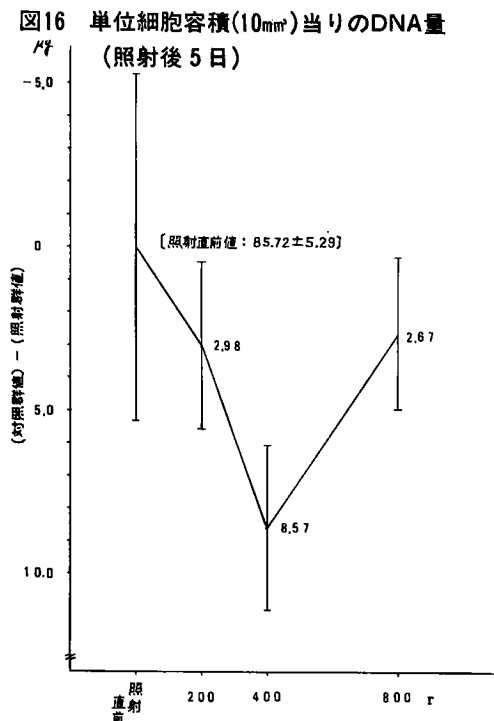


図15 単位細胞数当りのDNA量の変化 (照射後5日) (照射群値) - (対照群値)





その結果は、表2ならびに図11~16に示すごとくである。

細胞数では照射線量の増加とともに減少し、非照射群に対して有意差のあることが認められた。細胞容積、細胞DNA量については、培養瓶あたりでみると、照射線量の増加に伴って測定値は減少しており200 r では認められなかったが400 r 以上では統計的な有意差を認め得た。

ところが一定細胞数あたりの細胞容積ならびにDNA量として計算してみると、これらは線量の増加とともに増大しており、しかも200 r においてすでに照射群との間に有意差が認められた。

一方細胞容積あたりの細胞DNA量については400 r にのみ有意差が認められたに過ぎなかった。

以上の結果からみると、γ線照射によって細胞

はその数的な増殖が抑制されるのみでなく、分裂機能が阻害されて、おそらくは細胞の巨大化がおり、DNA量にも変化をきたした細胞が増加したものと考えられ、その影響をみるためにこれを指標とすることの、可能性が示唆される。

3 3指標間の相関

上記したごとく、細胞数、細胞容積および細胞DNA量のγ線照射による影響を、照射後の経過別および照射線量別に検討し、それぞれに一定の傾向を観察してきた。ここではこれら三者の相互関係が、線量あるいは照射後の経過によってどのように変化していくかを追求することにより、L細胞に対する放射線影響の測定指標としての細胞数、細胞容積および細胞DNA量の相対的値を比較検討してみよう。表3はγ線照射群と非照射群との各測定値についてこれら3指標間の関係を示したものである。

非照射群および800 r 照射群では、いずれも細胞数と細胞容積、細胞数と細胞DNA量および細胞容積と細胞DNA量において高い有意性をもって相関がみとめられる。しかるに200 r および400 r においては200 r、5日後細胞容積とDNA量との相関を除いては、すべて有意性をみとめることができなかった。とくに200 r における細胞数と細胞容積、細胞数と細胞DNA量における相関がきわめて低いことが注目された。

800 r の場合のごとく3指標がいずれも高い相関にある場合は、そのうちの1つをみることにより、その放射線影響の程度を知ることができるが、低線量において、これら3指標間の相関がきわめて低いことは、それぞれがむしろ独立に意義を有しており、それらを検討することによって放射線影響を多面的に判定するに役立つであろう。

以上のごとく考察するとき、放射線障害の実態が単に細胞の数的増加のみでなく、細胞容積および細胞DNA量に対しても重大な影響をおよぼしながら、細胞数に対するとは異った現象を示し、これを測定することが放射線障害の新しい指標となり得ること

表3 三指標間の相関と有意性

	非照射群	5日目	200 r	5日目	400 r	5日目	800 r	5日目
細胞数：細胞容積	0.55	※※	-0.28		0.59		0.68	※※
細胞数：DNA量	0.48	※※	0.19		0.78		0.78	※※
細胞容積：DNA量	0.47	※※	0.85	※	0.55		0.93	※※

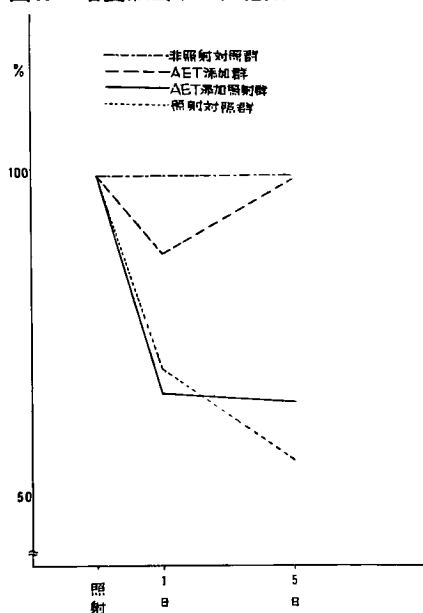
を示唆していると考えられる。もちろん細胞学的な検討の必要性が感じられるが、これは今後に残された問題であろう。

4 AETの防禦効果の検討

培養細胞に対するAETの放射線障害に対する防禦効果についてはEverら¹³⁾、およびO. Vos¹⁴⁻¹⁵⁾および安東¹⁹⁻²⁰⁾によってそれぞれ細胞数と細胞蛋白質量、clone数、および細胞数を指標として報告されている。著者はこのAETの放射線防禦効果が、細胞数、細胞容積、および細胞DNA量の3指標にどのように現われてくるかについて検討した。すなわち非照射及照射対照群、AET 10^{-4} mol. 添加群、AET 10^{-4} mol. 添加後 γ 線800 r照射群の4群について、照射後1日目および5日目における3指標の値を測定した。なおAETの添加はAET添加両群とも照射直前に行ない、照射後直ちに培地を交換した。したがって細胞とAETの接触時間は約20分であった。

これら測定値を対照群を100とした指数によって図17~22に示した。

図17 培養瓶当りの細胞数



AET添加による影響は細胞数において1日後に減少を示しながら5日後には完全に回復しており、細胞DNA量においてその傾向が認められるが、細胞容積については5日後に1日後よりも障害が拡大

図18 培養瓶当りの細胞容積

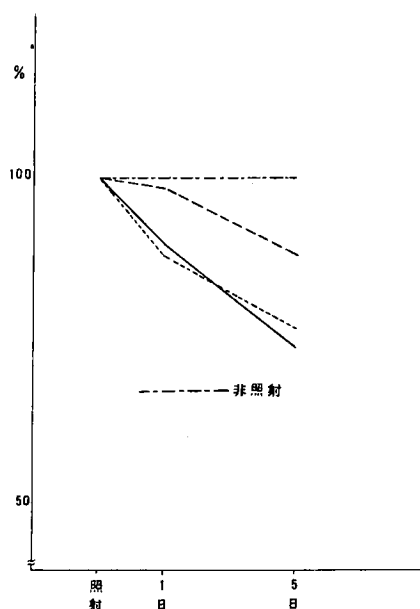
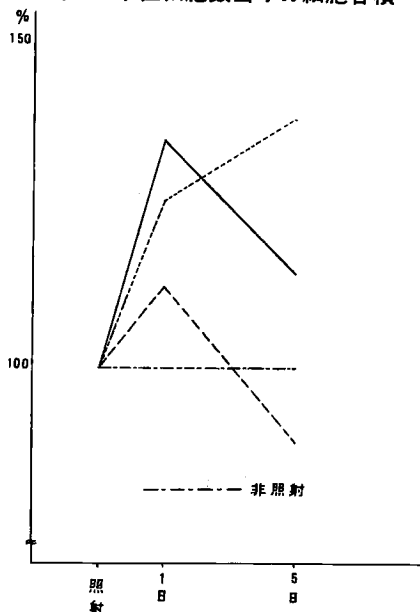


図19 単位細胞数当りの細胞容積



されている。しかしいずれの指標についてみても、照射対照群に対するよりは障害の程度が小さい。

一方AET添加後照射群については、照射対照群よりはAET添加群により類似した経過を示しており、放射線照射に対して1日後よりは5日後に回復

図20 培養瓶当りのDNA量

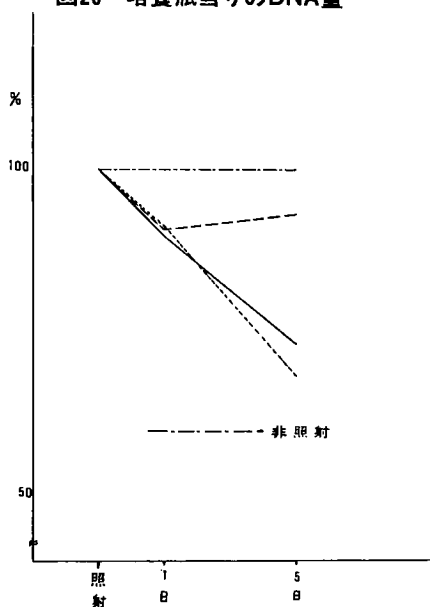


図22 細胞容積(10mm³)当りのDNA量

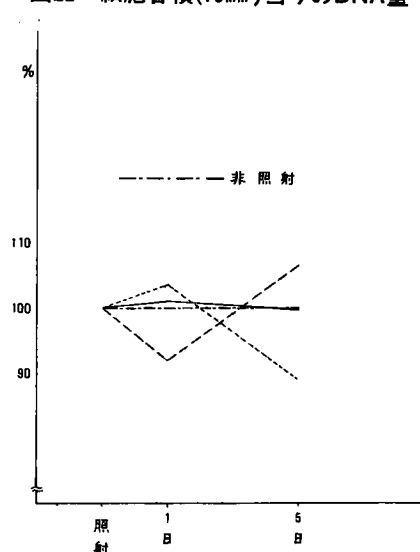
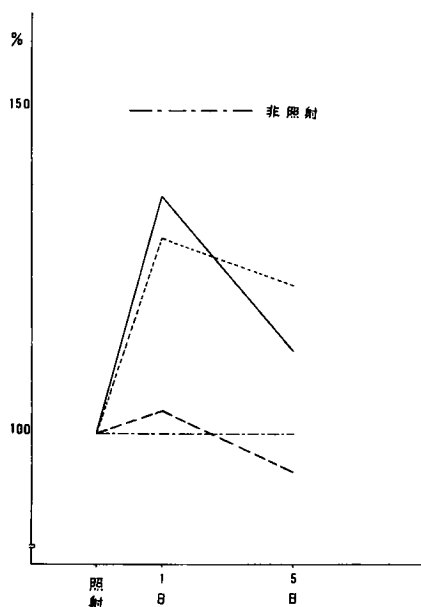


図21 単位細胞数当りのDNA量



しつつある状況が認められ、障害に対する防禦効果の存在が十分推測される。この点従来の結果^{13-15, 19-20)}とも一致して、AETの放射線障害に対する防禦効果の指標としても、これら3指標および3指標の組合せが有効に利用しうることが認められた。

V 結 論

以上実験結果を総括すると以下の3点に要約しうる。

1. 放射線照射L株細胞の障害は Mitotic phase の延長、分裂抑制の型で現われるが、このことは細胞数とともに細胞容積および細胞 DNA 量とその組合せを指標とすることにより、放射線障害の実態をより明らかに理解することができる。

2. 培養L株細胞の細胞数、細胞容積ならびに細胞 DNA 量、3者間の相関関係は、800 r 程度の高線量領域においては、有意の相関を示し、このことは細胞数計測のみを行えば充分であることを意味している。ところが200 r や400 r 程度の領域においては、相関関係は不安定であり、これは2因子以上の測定により細胞反応効果を多角的にとらえることになると解される。

3 AET(S-2-Amino-ethyl isothiuronium bromide) は、照射L株細胞の巨大化(すなわち一定細胞数あたり細胞容積および細胞 DNA 量および一定細胞容積当りの細胞 DNA 量の増大)を経時的にはばみ、細胞分裂促進の型で防禦効果が認められ、その様相が3指標を用いて明らかにした。

稿を終るにあたり終始御指導、御校閲いただいた恩師大平昌彦教授、青山英康助教授に深甚の謝意を表します。さらに本研究の遂行に際し御指導、御

協力いただいた黒田健元講師，本並一二三元技官に心より感謝します。

またL株細胞の分与にあづかった妹尾佐知丸教授ならびに妹尾病理学教室員各位，またX線照射に際して多大の御便宜を与えられた山本道夫教授ならび

に放射線科教室各位に深甚の謝意を表します。

(なお本論文の要旨は，第34回日本衛生学会において報告した。)

文 献

- 1) Ohira M. : Radiation Hazards, 'Occupational Health in Japan' XVI International Congress on Occupational Health, 91-94, 1969
- 2) 大平昌彦・他：わが国産業界における電離放射線の利用と従事労働者健康管理の実態 第1報 電離放射線の利用状況および被ばく量について，産業医学，6，24-35，1964
- 3) 大平昌彦・他：わが国産業界における電離放射線の利用と従事労働者健康管理の実態 第2報 電離放射線労働従事者の血液像およびCMIによる自覚調査成績，産業医学7，64-74，1965
- 4) 大平昌彦：放射線障害の化学的防禦，第70回岡山医学会総会特別講演要旨，岡山大学医学部衛生学教室，1961
- 5) 国連科学委員会：放射線生物学の基礎I～IV放射線の影響に関する国連科学委員会報告書(付録F)，自然，63，29-81，1959
- 6) Patt H. et al : Cysteine protection against X irradiation, Science, 110, 213-214, 1949
- 7) 勝原良：新化学物質の放射線障害防護作用等に関する実験的研究，日本医学放射線学会雑誌，19，73-91，1959
- 8) Bacq Z. M. et al : Ein Chemischer Schutz gegen Roentgenstrahlungen, Strahlentherapie, 95, 215-237, 1954
- 9) Bacq Z. M. et al : The amines and particulary Cysteamine as protectors against roentgen rays, Acta Radiol., 41, 47-55, 1954
- 10) Langendorff M. et al : Untersuchungen uber einen biologischen Strahlenschutz XL VIII, Mitteilunge : Die quantativen Beziehungen beim Strahlenschutz durch Cysteamine, Strahlentherapie, 120, 269-274, 1963
- 11) Flemming K. : Modellversuche zum Chemischen Strhlenschutz, III Mitteilung : Schutzwirsung nichtreduzierender Stoffe gegen Permeabilitatsstohrungen bei roentogen bestrahlten Erythrozyten, Strahlentherapie, 120, 456-469, 1963
- 12) Doherty D. G. et al : Protective effect of S- β -Aminoethylisothiuronium Br H Br and related compounds against X-radiation death in mice., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89, 312-314, 1955
- 13) Per Eker et al : Studies an the Groth-inhibiting and Radioprotective Effect of Cystamine, Cysteamine, and AET on mammalian cells in Tissue culture, Radiat. Res., 21, 165-179, 1964
- 14) O. Vos et al : Protection of tissue culture cells against ionizing radiation 1, The effect of biological amines, disulphide compounds and thiols., Int. J. Radiat. Biol., 5, 543-557, 1962
- 15) O. Vos et al : Protection of tissue culture cells against ionizing radiation. 2, The activitye of hypoxia, dimethyl sulphoxide, dimethyl sulphone, glycerol and cysteamine at room temperature and at 19C, Int. J. Radiat. Biol. 5, 609-621, 1962
- 16) 大平昌彦・他：組織培養法による放射線障害に対する化学的防禦剤の効果の研究，第1報 Cysteine の放射線防禦効果の検討，医学と生物学，61，24-28，1961
- 17) 大平昌彦・他：組織培養法による放射線障害に対する化学的防禦剤の効果の研究，第2報， γ 線照射に対する Cysteamine および Pantothenic acid の防禦効果の検討，医学と生物学，61，48-53，1961
- 18) 大平昌彦・他：組織培養法による放射線障害に

- 対する化学的防禦剤の効果の研究, 第3報, X線照射に対する Cysteamine, Cysteamine および Pantothenic acid の防禦効果の検討, 医学と生物学, **61**, 80~84, 1961
- 19) 安東規雄: 組織培養法による放射線障害の化学的防禦に関する研究, 第1編, L培養細胞に対する Cysteine および2-Mercaptoethylamine (MEA) のX線防禦効果, 岡山医学会雑誌, **77**, 181~200, 1965
- 20) 安東規雄: 組織培養法による放射線障害の化学的防禦に関する研究, 第2編, 培養L細胞に対する S-2 Aminoethylisothiuronium Br-H. (AET), Cysteamine および α -Homocysteinethiolactome (HCT) のX線防禦効果, 岡山医学会雑誌, **77**, 201~214, 1965
- 21) W. C. Dewey et al: Comparison of cell-multiplication and colonyformation as criteria for radiation damage in cell grown in vitro, *Int. J. Radiat. Biol.*, **6**, 463-471, 1963
- 22) Bernard Shapiro et al: The Distribution and the Chemical Form of the Radiation-protective Agent A. E. T. in Mammary Tumor-bearing Mice. *Cancer Res.*, **23**, 223-228, 1963
- 23) Floyd C. McIntire et al: A Simple Method for Determination of Desoxypentose Nucleid Acid in Tissue Cultures, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **95**, 458-461, 1957
- 24) J. S. Bedford et al: Survival of Hela cell cultured in vitro and exposed to protracted gamma irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **7**, 377-383, 1963
- 25) W. A. Crempel: The Modification of Post-irradiation DNA Degradation in *Escherichia coli* Br., *Radiat. Res.*, **41**, 312-325, 1970
- 26) Yasuko Hyodo-taguchi: Effect of X-Irradiation on DNA Synthesis and Cell Proliferation in the Intestinal Epithelial Cells of Goldfish at Different Temperatures with Special Reference to Recovery Process, *Radiat. Res.*, **41**, 568-578, 1950
- 27) 増田原治: In vitro 培養細胞の増殖能に対するX線の効果と細胞濃度との関係, 日本医学放射線学会雑誌, **28**, 578~582, 1968
- 28) Atsuta Joe et al: The Effect of X-irradiation on RNA Synthesis during Tryptophan pyrrolase Induction in Rat Liver, *J. Radiat. Res.*, **9**, 135-140, 1968
- 29) 竹内正: 細胞レベルの放射線致死効果, 日本臨床細胞学会雑誌, **7**, 164~167, 1968
- 30) Kanno Iwao et al: Effect of X-ray Radiation on Hela Cell, *J. Radiat. Res.*, **6**, 82-95, 1965

**Studies on some indicators to measure effects of irradiation
on L-strain cells in tissue culture.**

by

Tohru Nakatani

Department of Hygiene Okayama University Medical School
(Director: Professor Masahiko Ohira)

There are very few studies of the indicators which measure the effects of irradiation, even though it is very important in assessing the mechanism of radiation injuries and evaluating the effect of chemical protection against radiation hazard. Previous studies used either in vivo survival or in vitro cell counts to measure radiation effects.

The study describes the use of cell volume, intracellular DNA, and cell counts as indicators of the effects of irradiation on cells in tissue culture, and demonstrated the effects of AET (S2-Amino-ethylisothiuronium bromide) as chemical protection against radiation hazards as measured by these three indicators.

The results are as follows:

1) Combined use of the three indicators demonstrated that the effect of radiation on L-strain cell in tissue culture resulted from extension of the cell's mitotic phase and inhibition of cell division.

2) A positive correlation in the indicators was found with high dose irradiation (800 r) of cells in tissue culture, but there was no correlation noted at lower test doses (200 r and 400 r). This finding demonstrated that it is necessary to study irradiation effects using these indicators in combination, especially at low dose exposures.

3) The study demonstrated that AET inhibited growth of irradiated L-strain cells and furthermore promoted cell division in tissue culture, thus showing the capacity for AET to tissue cells against irradiation.

4) Use of cell growth indicators such as cell volume, intracellular DNA, and cell counts, in combination, seems superior to previous methods of cell studies related to irradiation effects.