

氏 名 ( 本 籍 )	さ 佐	とう 藤	ゆき 行	ひこ 彦
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医 博 第	7 9 2	号	
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 5 2 年 3 月 2 5 日			
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当			
研 究 科 專 門 課 程	東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科 ( 博 士 課 程 ) 生 理 学 系 專 攻			
学 位 論 文 題 目	顯 微 鏡 映 画 法 に よ る 細 胞 放 射 線 生 物 学 的 研 究 — 細 胞 並 び に 核 の 大 き さ の 経 時 的 変 化 の 解 析 —			

( 主 査 )

論 文 審 査 委 員 教 授 栗 冠 正 利 教 授 松 沢 大 樹

教 授 星 野 文 彦

# 論文内容要旨

細胞は、ある分裂から次の分裂までの間にその大きさを増していく。本研究は、細胞並びに核の大きさの経時的変化を、株化培養細胞の位相差顕微鏡映画フィルムを解析して一個の細胞の増殖動態を直接に追跡したもので、従来行なわれている細胞集団を対象とした細胞周期の統計的研究とは異なり、終始一個の細胞に着目して、細胞並びに核の大きさとその経時的変化率および世代時間を測定し、確定した値に基づいて解析を行なった。

## 材料と方法

1：対象となる培養細胞サンプルの用意 2：細胞の微速度映画撮影装置による撮影 3：映画フィルムの解析

培養細胞について、細胞の大きさをみるために、浮遊型細胞AH13（ラット腹水肝がん）を、また核の大きさをみるために、壁付着型細胞CulbTC（ラット肝由来）およびHeLa-S3を用い、イーグルMEM培地で、37℃、pH~7.4で培養した。細胞のX線照射は、180KVpで総線量500Rおよび1000Rとした。細胞は、1~3日間CO<sub>2</sub>インキュベータ内で開放系で培養後、ビンに密栓をし、倒立型位相差顕微鏡下で100~200倍、5分乃至10分間隔で3~5日撮影した。細胞の大きさに関するデータは、細胞並びに核の映画フィルムの投影像をモーションアナライザー上で紙に写しとり、紙の重さをもとに撮影の倍率（対物マイクロメーターの写真から測定）等のパラメーターを考慮した上、像がほぼ円形に見えるものはこれを球とみなして、球の半径 $r$ 、面積 $A$ 、表面積 $S$ 、体積 $V$ 並びにそれらの経時的変化率 $\frac{dr}{dt}$ 、 $\frac{dA}{dt}$ 、 $\frac{dS}{dt}$ 、 $\frac{dV}{dt}$ を計算し、細胞の球からのズレは、 $r$ 、 $A$ 、 $S$ 、 $V$ の分裂の直後と直前の比である増比、それを球のとき1になるように規格化した球比という量を導入して補正を加えた。こうして大きさの経時的変化、並びに大きさの時間についての一次微分の経時的変化等を算出し、これらの量の間の関連について検討した。

## 結果並びに考察

1：細胞を球とみなしうる場合、大きさを分裂の直後と直前とで比較すると、世代時間は1.5時間程度で、細胞の大きさは分裂直後の $2800\mu\text{m}^3$ から次の分裂直前の $5200\mu\text{m}^3$ に増し、体積ではほぼ2倍になることが認められた。このことは細胞が2個に分裂し、且つ細胞の大きさ（ $r$ 、 $A$ 、 $S$ 、 $V$ ）がほぼある範囲に保たれていることからみて妥当な結果である。

細胞では、AH13について $8.5 < r < 10.5\mu\text{m}$ （小さい値は分裂直後、大きい値は分裂直前、

以下同じ),  $250 < A < 350 \mu\text{m}^2$ ,  $950 < S < 1500 \mu\text{m}^2$ ,  $2800 < V < 5200 \mu\text{m}^3$  が得られ, 核では, CulbTCについて  $6.6 < r < 8.2 \mu\text{m}$ ,  $140 < A < 220 \mu\text{m}^2$ ,  $590 < S < 850 \mu\text{m}^2$ ,  $1300 < V < 2400 \mu\text{m}^3$ , HeLa-S3について  $8.0 < r < 9.1 \mu\text{m}$ ,  $200 < A < 260 \mu\text{m}^2$ ,  $820 < S < 1050 \mu\text{m}^2$ ,  $2200 < V < 3400 \mu\text{m}^3$  が得られた。

2: 大きさ  $r$ ,  $A$ ,  $S$ ,  $V$  の経時的变化率 ( $\frac{dr}{dt}$ ,  $\frac{dA}{dt}$ ,  $\frac{dS}{dt}$ ,  $\frac{dV}{dt}$ ) は, 細胞においては, 核における値よりも大きい値を示した。即ち細胞周期内で平均して, 細胞では, AH13で,  $\frac{dr}{dt} = 0.12 \mu\text{m/hr}$ ,  $\frac{dA}{dt} = 7.0 \mu\text{m}^2/\text{hr}$ ,  $\frac{dS}{dt} = 30 \mu\text{m}^2/\text{hr}$ ,  $\frac{dV}{dt} = 130 \mu\text{m}^3/\text{hr}$ , 核では, CulbTCで,  $\frac{dr}{dt} = 0.05 \mu\text{m/hr}$ ,  $\frac{dA}{dt} = 2.5 \mu\text{m}^2/\text{hr}$ ,  $\frac{dS}{dt} = 10 \mu\text{m}^2/\text{hr}$ ,  $\frac{dV}{dt} = 40 \mu\text{m}^3/\text{hr}$ , HeLa-S3で,  $\frac{dr}{dt} = 0.04 \mu\text{m/hr}$ ,  $\frac{dA}{dt} = 2.0 \mu\text{m}^2/\text{hr}$ ,  $\frac{dS}{dt} = 8 \mu\text{m}^2/\text{hr}$ ,  $\frac{dV}{dt} = 35 \mu\text{m}^3/\text{hr}$  であり,  $\frac{dV}{dt}$  について細胞と核の値を比べると, その差がよくわかる。一方, X線照射を受けた細胞の核についての  $\frac{dV}{dt}$  は, 対照のそれとほぼ同程度であった。併しX線照射を受けたある細胞は, もし照射を受けない細胞ならば当然分裂すると期待される大きさに至っても尚分裂せずに肥大をつづけ, 核の面積  $A$  は  $500 \sim 600 \mu\text{m}^2$  と, 対照の2~3倍に膨大した後に破裂するのがみられた。このとき面積変化率  $\frac{dA}{dt}$  は,  $2.5 \sim 3.5 \mu\text{m}^2/\text{hr}$  で, 照射を受けない細胞とほぼ同程度である。また細胞について, 大きさの変化率特に体積変化率  $\frac{dV}{dt}$  は, 細胞周期の後半において前半より幾分大きくなる傾向が個々の細胞についてみられた。

本研究では以上のように細胞と核の大きさの時間的变化という細胞の物理的一側面を追究した。

## 審査結果の要旨

細胞集団の大きさに対する放射線の作用は各方面から研究されているが、1世代内の細胞生長に及ぼす放射線作用を1コの細胞について直接観察した研究は少ない。本研究は、細胞の大きさ及び核の大きさの世代内における時間的変化を顕微鏡写真分析によって測定し、一般に利用されている統計学的研究に対し実質的な立脚点を与えようとするを目的とする。

細胞の大きさを測定するためにはAH13を用い、核の大きさを測定するためにはHeLaS3およびCulb TC細胞を用いて型の如く培養し、倍率100乃至200倍で10分毎に1コマ宛、スタンダード・サイズの顕微鏡映画を撮影した上、視察により球形に近い細胞を選択し、細胞の輪郭を上質ケント紙に転写してこれを切り取りその重量を測定し、半径 $r$ 、面積 $A$ 、球とみなしたときの表面積 $S$ 、球とみなしたときの体積 $V$ 、それぞれ時間当たりの変化率

$\frac{dr}{dt}$ 、 $\frac{dA}{dt}$ 、 $\frac{dS}{dt}$ 、 $\frac{dV}{dt}$  を計算した。細胞が完全に球であれば1世代の始めの体積 $V$ はその世代

の終わりに $2V$ になると期待して理論上算出できるが、球からズレがあるためにズレの大きさを補正する必要がある。このため補正項として増比及び球比を導入した上、大きさの、時間についての一次微分の経時的变化を算出した。これらは、著者の案出したプログラムに従って東北大学大計センターで行った。

細胞を球とみなし得る場合、分裂直前の大きさと直後の大きさはそれぞれ $5,200\mu m^3$ および $2,800\mu m^3$ で体積はほぼ2倍となることが直接測定された。以下、分裂直前(大きい値)一分裂直後(小さい値)を示すと

AH13の細胞体では $r$ は $10.5\mu m - 8.5\mu m$ 、 $A$ は $350\mu m^2 - 250\mu m^2$ 、 $S$ は $1,500\mu m^2 - 950\mu m^2$ 、 $V$ は $5,200\mu m^3 - 2,800\mu m^3$ となりCulb TC核では $r$ が $8.2\mu m - 6.6\mu m$ 、 $A$ が $220\mu m^2 - 140\mu m^2$ 、 $S$ が $850\mu m^2 - 590\mu m^2$ 、 $V$ が $2,400\mu m^3 - 1,300\mu m^3$ 、HeLaS3核では $r$ が $9.1 - 8.0\mu m$ 、 $A$ が $260 - 200\mu m^2$ 、 $S$ が $1,050 - 820\mu m^2$ 、 $V$ が $3,400 - 2,200\mu m^3$ となった。

$r$ 、 $A$ 、 $S$ 、 $V$ の時間的変化率は細胞体に関する値は核に関する値よりも大きい。この差は容積に関して最も著しかった。

X線500及び1,000R照射をうけた細胞核の $\frac{dV}{dt}$ は対照の値とほぼ同じであった。このことは、放射線の効果が発現しない事を意味するものではない。照射された細胞は、もし照射をうけないならば当然分裂すると期待される時間になっても尚分裂せずに体積増加を続ける。従って核の投影面積 $A$ は $500 \sim 600\mu m^2$ (対照の値の2~3倍)にまで膨大した後に破裂した。この時、面積変化率は毎時 $2.5 \sim 3.5\mu m^2$ で、この値は対照と同じであった。

このように、この研究は従来ほとんど無視されていた1コの細胞の世代内動態を直接明らかにして知見を加えた価値は大きい。

よって、本論文は学位を授与するに値するものと認める。