

低温処置にて誘起される HeLa 細胞同調分裂

——抗腫瘍性薬剤効果増強にたいする一試み——

京都大学医学部第1外科学教室（指導：本庄一夫教授）

安 沢 良 一

〔原稿受付：昭和43年11月12日〕

Partial Synchronous Division of HeLa Cells Induced by Low Temperature

——An Attempt to Intensify the Effects of Anticancer Chemotherapeutics ——

by

RYOICHI YASUZAWA

From the 1st Surgical Division, Kyoto University Medical School

(Director : Prof. Dr. Ichio Honjo)

Recently, a series of experimental studies has been proceeded in our laboratory to improve the therapeutic effects of the currently available anticancer drug, based on an idea that by administrating anticancer drug to a synchronized cell population in the most sensitive phase, the effects of anticancer drug can be intensified.

The present study has been carried out to confirm an idea, stated above, with HeLa cell culture synchronized by application of temperature shift and to elucidate the mechanism of partial synchronization induced by subclinical temperature in relation to nucleic acid metabolism.

Logarithmic growing HeLa cells, being subjected at 20°C for 6 hours, showed characteristic growth curve after replacement at optimal temperature. Burst stepwise increase in actual cell number up to about 30 % were observed at 5th—6th hour after replacement.

Synthesis of DNA, studied by autoradiograph using ³H-thymidine, were arrested during low temperature and resumed burstly at 2nd—4th hour after replacement.

The tracing examination identified that the cells labelled at 2nd—4th hour after re-warming divided synchronously at 5th—6th hour.

These results of this experiment led following conclusion; the cells, having not finished their DNA synthesis just before cooling at 20°C and may had expected to finish the DNA synthesis while subjected in low temperature if cooling procedure may had not been performed, were inhibited to enter into DNA synthesizing phase during cooling period and finished their DNA synthesis simultaneously shortly after rewarming and divided into daughter cells passing through G-2 phase.

Attempt to intensify the effects of anticancer drugs by practical application of temperature induced partial synchrony is the final aim in our laboratory and we have a great expect to archieve more succesive effect when we will treat the cancer patients using synchrony, induced by local freezing, with local perfusions method.

緒 言

1946年 Gilman and Phillips¹³⁾ が Nitrogen Mustard に腫瘍発育抑制作用がある事を指摘して以来、数多くの抗腫瘍性薬剤が開発研究された。これらの薬剤は確かに癌治療に役立つてはいるが、しかし未だ多くの疑点をはらんでいる。その中の最も重要な問題はこれらもつ全身的副作用である。もつと新しいより効果的な抗癌剤の研究が行なわれている一方で、現存の抗癌剤の効果を増す為の研究も行なわれている。例えばその副作用を減弱させる目的で行なわれる高濃度での局所灌流法、他の適当な化学物質と併用する方法等がこれである。

われわれの教室では、同調分裂をおこなう細胞にその最も感受性の高い生活相に於て抗癌剤を投与すれば、その抗癌剤の効果は増強されるであろうという考えのもとに一連の実験¹⁹⁾⁴²⁾がなされてきた。

従来から細胞同調分裂の研究は、細胞レベルで細胞の生物学的又は生化学的特性を解明するために、多くの細胞学者により進められてきた。同調分裂細胞系を得る方法は次の3法に大別し得る。すなわち第1は温度変化を利用して誘起せしめる方法⁵⁾⁷⁾¹⁴⁾¹⁶⁾²⁰⁾²⁶⁾²⁷⁾³⁰⁾³⁵⁾³⁹⁾⁴⁰⁾⁴³⁾、第2は発育に必要な栄養成分を変えることにより誘起せしめる方法⁵⁾³¹⁾、そして最後に分裂期細胞のみを物理的に分離して行なう方法¹⁾⁴³⁾の3つである。

われわれの教室では臨床的に直ちに癌治療に応用し得る方法という観点から温度変異により誘起する方法について研究してきた。教室の高橋⁴²⁾は担癌動物の *in vivo* の研究でわれわれの考えが実験的に成立し得る事を証明した。著者は本実験で HeLa 細胞を用いて以上の知見を確認し subclinical temperature で誘起される部分的細胞同期 partial synchronization の機序を核酸代謝の面より解明した。

実験材料及び実験方法

1) 細胞株及び培養液

本実験に使用した細胞株は人子宮頸部癌由来の HeLa 細胞¹²⁾で、京都大学ビールズ研究所にて継代培養

を続けられたものである。

培養液は非働化された仔牛血清を20%の割合に含み、その組成は下記の如くである (YLE・CS20)。

YLE・CS20 (100ml)

Earle's BSS A	4.0 ml
Earle's BSS B	4.0 ml
Yeast Extract	0.07 g
Glucose	0.25 g
Lactalbumin Hydrolysate	0.5 g
d. d. w.	80 ml
Inactivated Calf Self Serum	20 ml
Penicillin	20 × 10 ⁴ U
Streptomycin	0.05 g
8.8% NaHCO ₃	1 ml

Earle's Balanced Salt Solution

A) NaCl	68.0 g
KCl	4.0 g
CaCl ₂	2.0 g
MgSO ₄	1.0 g
d. d. w.	500 ml
B) Na ₂ HPO ₄	1.25 g
Glucose	10.0 g
Phenol Red (0.4%)	125 ml
d. d. w.	500 ml

仔牛血清は京都屠殺場で採取された仔牛血液より冷凍超遠心分離器で分離し Seitz 濾過器にて濾過滅菌し、56 C 30分間非働化された後凍結保存した。

2) 培養容器

大、中及び小型角瓶が培養器に用いた。これらはそれぞれ 5 ~ 7 ml, 10 ~ 15 ml 及び 55 ~ 70 ml の培養液で培養するのに適しているものである。小型角瓶は低温実験に、大及び中型角瓶は継代培養に使用した。分裂指数及び ³H-thymidine 標識率を算定する実験のためにはあらかじめ小角瓶中に coverslip を入れたものを使用した。

3) 培養方法及び細胞分散法

培養は単層静置培養法によつた。培養角瓶は 37 C の孵卵器中に水中位に静置され、その中で HeLa 細胞は角瓶 4 面の中の 1 面に附着し増殖をはじめた。

培養角瓶の 1 面に細胞面を作つた細胞の分散法は培養液をすてた後、細胞面をなしている細胞塊を PBS 液にて軽く洗滌し、ついで EDTA を 0.02% の割合で含む

PCS液をそそぎ軽くピペットで攪拌して細胞を分散せしめた。分散された細胞は遠心分離法で集められ、 $5 \sim 10 \times 10^4/\text{ml}$ の割合で培養液中に分注した。

4) 低温処置実験及び細胞数算出法³²⁾

冷却実験は対数曲線増加期にある HeLa 細胞を培養瓶もろとも 30°C 、 20°C 或いは 15°C の流水中に 2 時間乃至 6 時間浸す方法によつた。冷却実験中培養液交換の必要ある場合はあらかじめその冷却温度に調整した新しい培養液をもつてした。

培養液中の細胞数の算定にあつては、EDTA液で角瓶面より分散された細胞を 0.05% crystal violet にて染色し、冷却実験中 1 時間毎に Bürger-Türk 血球計算盤ですくなくとも同一標本より 4 回計測し算定したが、細胞数偏差が 10% を越えるものは除外した。

5) 分裂指数計測法

分裂期にある細胞数を計測するためにはあらかじめ小角瓶中に coverslip を入れたものを用意した。HeLa 細胞は $3 \times 10^4/\text{ml}$ の割合で YLE・CS20 培養液 7 ml 中に接種された。小角瓶 coverslip 上に対数曲線的に増殖する細胞に 20°C 6 時間の低温処理をほどこし、後 37°C に復温した。低温中及び其の後毎 1 時間に coverslip をとり出し Feulgen 染色をほどこした。すなわち Methanol で 5 分間固定後、 60°C に加温せる 1 N HCl 中に 4 分間浸漬して水洗し、Schiff 試薬に 30 分以上接触せしめた後亜硫酸水に約 10 分間浸して水洗し、10% Giemsa 液で 10 分間後染色を施した。

このように染色した標本一枚ごとに無撰択に 2000 個以上の細胞を顕微鏡下で観察し、その中の有糸分裂像を示す細胞数を全細胞数に対する比として % で示し分裂指数とした。同時に Prophase, Metaphase, Anaphase

及び Telophase の各期有糸分裂像の割合をも計測した。

6) ^3H -thymidine 標識率算定法

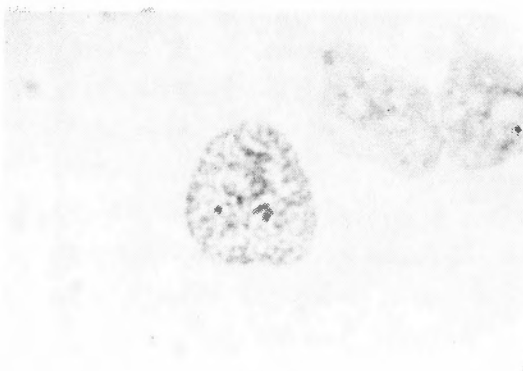
YLE・CS20 培養液を含む 30 本以上の小角瓶の各々に HeLa 細胞を $3 \sim 5 \times 10^4/\text{ml}$ の割合で接種分注し 3 日間静置単層培養した後 20°C 2 時間又は 6 時間冷却した。冷却実験中 1 時間毎に小角瓶をとり出し、仔牛血清の代わりに $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の割合で ^3H -thymidine を含む培養液と交換し、細胞は ^3H -thymidine と 1 時間接触せしめた後 coverslip をとり出し、PBS液で洗滌し、Methanol 固定後 Feulgen 染色を施した。Autoradiogram 作製は Sakura NR-M1 感光乳剤を用いて Dipping 法により行なつた¹⁸⁾。フィルムの露出は 3 ~ 4 日間冷暗室中にて行なつた。

Autoradiogramm は 1500 倍にて検鏡した。標本につき無撰択に 1000 個以上の細胞を検鏡し、黒化細胞の全細胞数に対する比を百分率で示し標識率とした。

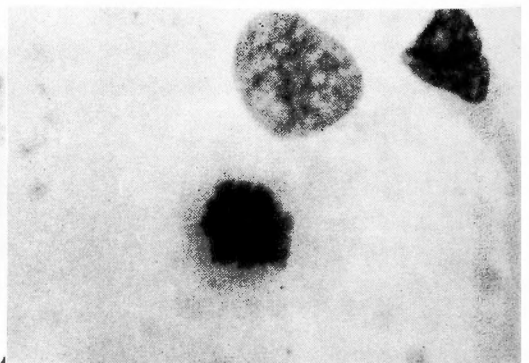
7) ^3H -thymidine による追跡実験

追跡実験は次の 2 つの細胞群について行なつた。 20°C に冷却される処置前 1 時間及び低温解除後 1 時間後より 1 時間それぞれ ^3H -thymidine を含む培養液と接触せしめた 2 群についておこなつた。1 時間接触後培養液はそれぞれ YLE・CS20 と再び交換し、第 1 群については以後低温処置を、第 2 群については 37°C の適温下培養を続け、この間経時的に毎 1 時に coverslip をとり出して Feulgen 染色を施し、Dipping 法により Autoradiogram を作製した。

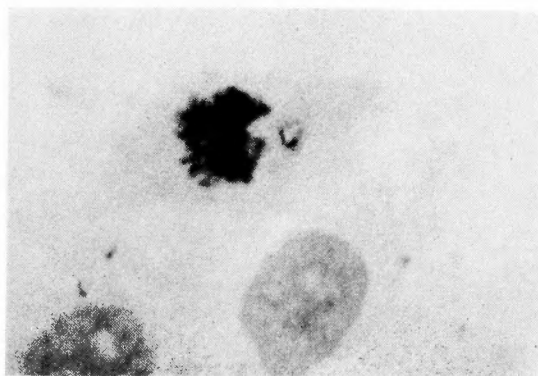
黒化分裂細胞数の比は有糸分裂を示す 100 個の細胞を無撰択に検鏡して、これに対する比を百分率で示した。



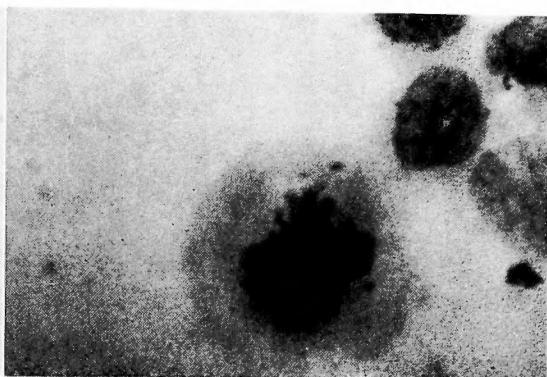
Early Prophase



Prophase



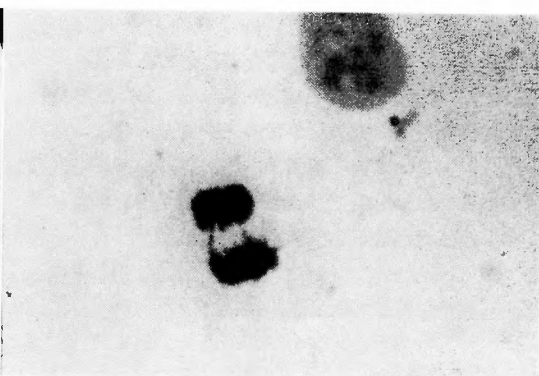
Early metaphase



Metaphase



Metaphase



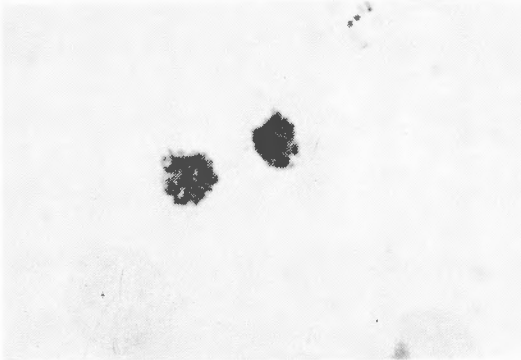
Anaphase



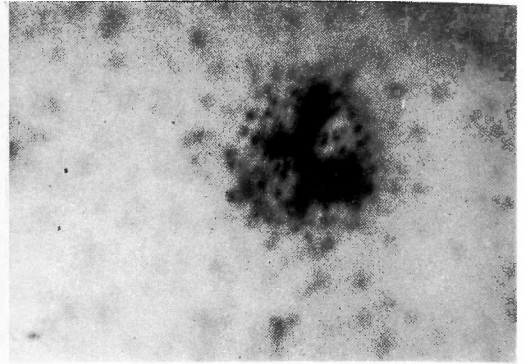
Anaphase



Anaphase, divided into three sister cells



Telophase



Labeled mitotic cell (All pictures; $\times 1500$)

実験結果

A) 増殖実験

1) 無処置対照群

基礎実験として YLE-CS20培養液 7 ml 中の小角瓶培養 HeLa 細胞の増殖曲線を求めた。第 1 図に示す通り、1, 2, 3, 5, 10 $\times 10^4$ ml の割合に HeLa 細胞を接種し、以後経時的に細胞数の変異を求めたところ、接種細胞数の少ないほど lag phase が長く、接種細胞数の多いものほど早急に stationary phase に入る事がわかった。接種細胞数が 3 \sim 5 $\times 10^4$ ml の場合は約 12 時間の lag phase の後 3 \sim 5 日間 logarithmic phase を示し、5 \sim 7 日目で stationary phase になった。以上の

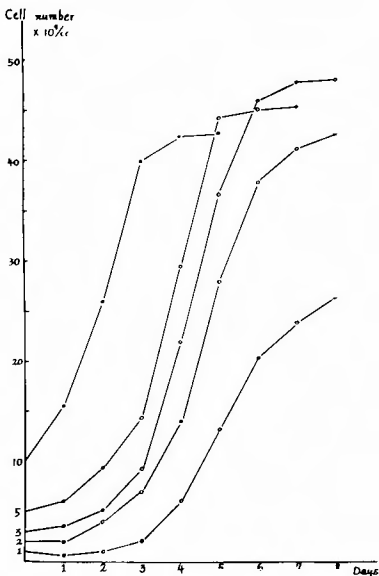


図 1 細胞実数増殖曲線

結果冷却実験は logarithmic phase すなわち YLE-CS 20 7 ml 中に 3 \sim 5 $\times 10^4$ ml の割合で接種分注されて 3 日後の細胞についておこなった。

2) 低温処置群

a) 30 C 6 時間冷却処置群の増殖曲線は第 2 図に示したが、低温環境下でも徐々に細胞数増加を示し、37 C 復温後の経過についても無処置対照群と大差は認められなかった。

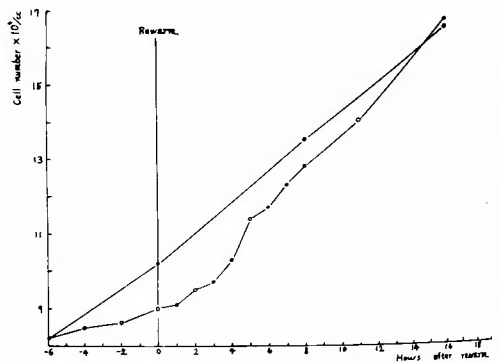


図 2 30 C, 6 時間処置群増殖曲線

- ● 無処置対照群
- ○ 処置群

b) 20 C 2 時間冷却処置群では第 3 図の点線の曲線に示す通り、低温環境下での細胞数増加は認められなかったが、37 C 復温後は徐々に連続的増加を示し、5 時間目で小さな peak は認めるものの充分な同調分裂を得る事は出来なかった。

c) 20 C 6 時間冷却処置群では第 3 図の実線の曲線に示す通り、特異的増殖曲線をえがいた。低温環境下では細胞数増加は認められず、37 C 復温後 2 時間目に少数ながら増加を示し (以下 A-peak と略す) 又 5 \sim 6 時間目にて急激な階段的増加を示し (以下 B-

peakと略す) 増加細胞実数の増加前細胞数に対する比は30%を越えた。

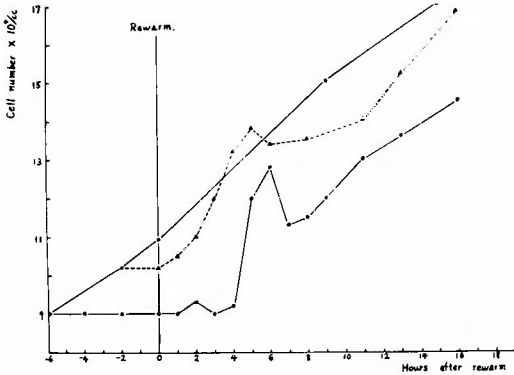


図3 20°C低温処置群増殖曲線
 ● — ● 無処置対照群
 △ △ 2時間処置群
 ○ — ○ 6時間処置群

d) 15°C 2時間及び6時間冷却処置群ではほぼ前項C群のそれと同様の増加曲線第4図を得たが、急激なる階段的増加の率は20°Cのそれより劣っている。第3図及び第4図に示した如く両群共通して B-peak直後に於いて増殖曲線が下降の傾向を示したのは、Axelrad¹⁾が指摘した如く、分裂直後の細胞は培養器面に対する附着力が減少し、培養液排棄後PBS液にて軽く洗滌する際に細胞層より剝離脱落し算定からもれるものが多いためである。第5図の下方の曲線は20°C 6時間冷却処置を施行した後の種々なる時期に上記の如き細胞数算定操作を行なった時に培養液中に剝離脱落して浮游する細胞数の変動を示したが、37°C環境下で

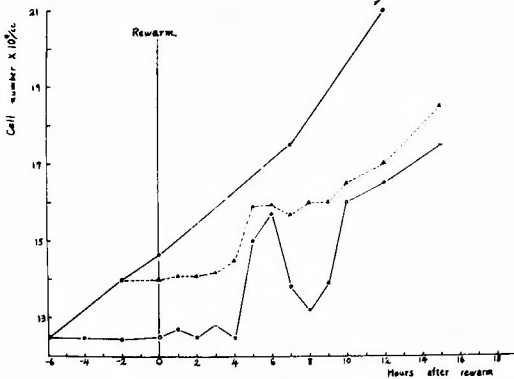


図4 15°C低温処置群増殖曲線
 ● — ● 無処置対照群
 △ △ 2時間処置群
 ○ — ○ 6時間処置群

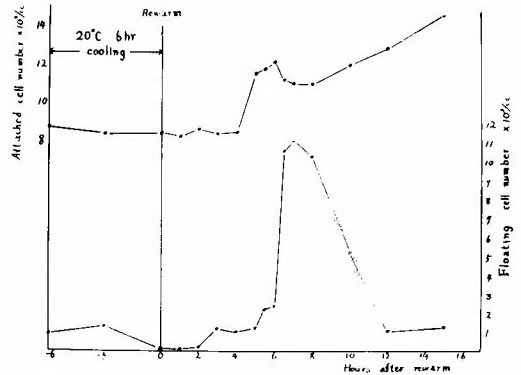


図5 20°C, 6時間処置群にて coverslip上増殖細胞数及び培養液中浮游細胞数変化

は寺島⁴³⁾の報告の如く1~2%である。しかしB-peak直後では $10^4/ml$ を越え、以後4時間目より大体対照群と同様1~2%であった。

B) 分裂指数変動曲線

前項で述べたように20°C 6時間冷却処置で略良好な同調分裂を得られると考えたのでこの低温条件について分裂指数の変動を追跡し第6図に示した。低温処置前対照値は3%であり、低温環境下では漸次減少して6時間目には1.5%を示したが、分裂像が或る一特定期に集る傾向は認められなかつた。37°C復温後細胞実数変動と平行して分裂指数変動を求めたが、2時間目で2.4%と一時増加し、5時間目に4.9%と急増加を示し以後対照値3%とほぼ同じ値をつづけた。

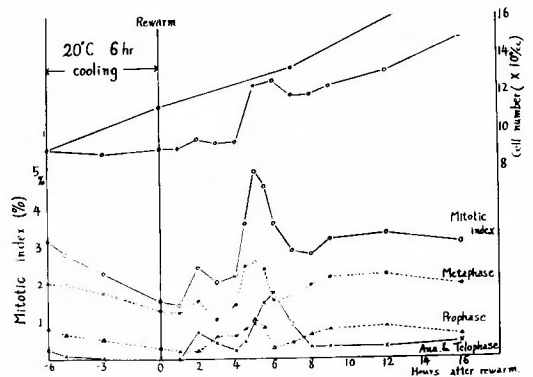


図6 20°C, 6時間処置群増殖曲線及び分裂指数変化曲線

分裂指数変動曲線と細胞実数変動曲線とを対比してみると、両曲線共A B 2つの peakを同時に示している事が認められた。

各標本の染色像より形態学的検討を加えると、復温

後1~2時間までは比染色性の低下, 細胞質の空胞形成像, 細胞膜よりの小突起膨出像等が認められたが, 3時間目以後のものではこれら変性を思わせる細胞像は認められなかつた。

C) ³H-thymidine を用いた Autoradiographic Examination

1) 毎1時 ³H-thymidine 標識率変動

毎1時間標識率については, 無処置対照群では略30%であつた。第7図に示す通り低温処置群では2時間, 6時間両群共低温環境下では³H-thymidine uptake は認められなかつた。この変動曲線上最も特徴的なのは37°C復温後2時間目である。

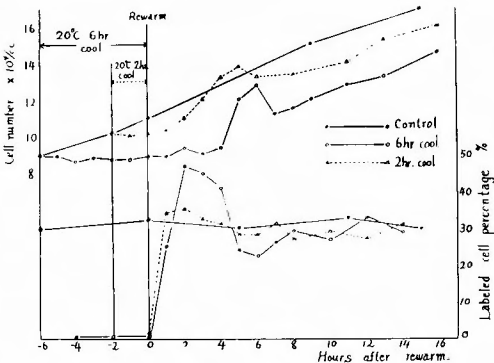


図7 毎1時間 ³H-thymidine 接触による標識率変化曲線

- - - ● 無処置対照群
- △ - - - △ 20°C, 2時間処置群
- - - - ○ 20°C, 6時間処置群

20°C 2時間冷却群ではこの復温後2時間目にて35%とわずかに対照群より高くなつたが, 以後の経過は大體これと平行した。

一方20°C 6時間処置群ではこの時期に47%と急激なる増加を示し, 引続き2時間は対照群より高くなるが, 細胞数増加を示す5~6時間目より逆に対照群より低い値をとり以後これと平行せる推移をみせた。

2) A及びB-peak についての追跡実験

細胞分裂が起るためには1世代周期中にてDNAの再生が先行する。A-, B-peak にみられる細胞分裂のためのDNA合成はいかなる時期に行なわれたかを明らかにするべく次の実験を行なつた。

標識率の急激なる増加が37°C復温後2時間目に起つたので, A-, B-peak のためのDNA合成期の追跡実験は以下2つの細胞群に対して行なつた。すなわち第1群は³H-thymidine を含む培養液と冷却開始前1時

間接触させたもの, 第2群は37°C復温後1時間目より2時間目の間1時間接触させたもので, 前述の方法と同様に復温後経時的に黒化分裂細胞を算定し, その結果は第8図に示した。

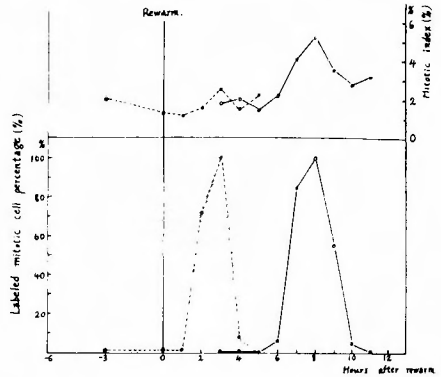


図8 追跡実験 (20°C, 6時間処置)

- - - ● 低温処置前1時間接触群
- - - - ○ 37°C復温後1時間目より1時間接触せる群

第1群では低温環境下では黒化分裂細胞はなく, 37°C復温後3時間目で分裂細胞は全て標識されており, このときの分裂指数は2.4%で前述のA-peakに相当するものと考えられた。第2群では復温後8時間目に黒化分裂細胞率は100%を示し, この時の分裂指数は5.2%となり前述のB-peakに相当するものと考えられる。なお前述の分裂指数増加期より遅れた時期に分裂指数の最高値を示したのは, この追跡実験では2度の培養液交換が必要であり, このためのadaptation time lagが存在するためと解釈した。

考 按

Spear³⁹⁾ の先駆的研究以来, 温度刺激による同調分裂の報告は数多く細胞学発展に輝かしき成果をもたらしている。Scherbaum and Zeuthen^{34) 35) 46)} は Tetrahymena pyriformis についてその増殖至適温度28°Cより高又は低温におき, 同調分裂を得るための温度と分裂の関係について検討した。彼等は16°C以下又は32~34°Cの間の温度刺激で同調分裂を誘起せしめ得る事を明らかにしたが, Bucinate⁴⁾ 及び Spear²⁹⁾ によれば高温よりも低温による方が優れた同調分裂を得ようである。Spear²⁷⁾ は動物組織について4°C10分処置では以後の分裂に何らの影響をも及ぼさないが, 4°C21時間処置では分裂細胞の変性をきたす事を報告した

が、同じ鶏胚組織について Newton²⁷⁾は21°Cが同調分裂の臨界温度でこれ以下の温度では分裂期に移れない事及び16°C24時間冷却が最も効果的であり、又L株細胞については4°C又は12°Cでは優れた結果を得るが25°Cでは効果がない事を示した。

かくの如く同調分裂を誘起するための低温条件については各細胞に特有の臨界温度があり、著者の実験した HeLa 細胞については20°C以下で良好な結果を得たのであるが、Newton²⁶⁾は HeLa 細胞について4°C1時間冷却で復温後18~20時間目に略90%の同調分裂を誘起せしめたと報告した。

分裂指数の変動より同調分裂を解明するために Hunter-Szybaiska¹⁶⁾は *Bacillus megaterium* について冷却実験を行なった。冷却中全ての細胞は Metaphase 及び early anaphase に留まり復温と同時に娘細胞に分裂して行く事実より、分裂細胞に対する冷却の効果は娘細胞にに分れて行く代謝過程、即ち metaphase より anaphase に行く過程を撰択的に制するためであると結論した。又教室の加藤¹⁹⁾は分裂指数を指標として固形癌について in vivo に於ける同調分裂を験し、低温時間の長いものほど同調化は高まるが、その出現は遅れる事を知った。しかし Spear³²⁾は鶏胚組織を用いて28°Cの時の分裂時間は38°Cにおけるその2倍のび、それ以下の温度ではもつとのびるか、全く停止される事をみている。

分裂指数というものは全細胞数の変動、分裂時間の变化、分裂期に出入する細胞の数によつて決定される以上、分裂指数のみで同調分裂の程度を論議するのは問題があろう。しかし著者の行なつた実験よりは同時に算定した細胞数増加曲線と対比して考えると、細胞数の部分的同調は細胞分裂の部分的同調と共に起り、分裂指数の増加は分裂時間の变化によるものでなく、分裂期に出入する細胞の数の变化によつてもたらされたものである事が明らかである。

又組織学的考察より著者は低温解除直後の細胞に可逆性の変性像を見出したか、これは Murry et al²⁵⁾が Glioblastoma の培養を用いて抗腫瘍性薬剤の効果判定に形態学的変化を指標としたのと同義的に考え、低温そのものの細胞毒とも表現すべき直接作用のためと解釈した。実際 Fay, T.¹⁰⁾によれば人癌冷却に32°C以下では有糸分裂細胞の消失を認るが、Smith et al³⁸⁾が報告した如く鶏胚未分化細胞及び人癌細胞にては32°C48時間冷却では形態学的変化は可逆的であるか、それ以下の温度又は72時間以上の冷却では変化は不可逆的に

なることを指摘している。

次いで温度変化により誘起される同調分裂の機構について核酸代謝の面より考察を続けよう。DNA については、正常肝、腎臓のようにあまり細胞分裂を行わない組織では、腸粘膜、胸腺、脾臓、骨髄、虫垂のように多数の細胞分裂がみられる組織に比し、非常にわづかしか labeled 核酸前駆物質のとりこみが認められない⁸⁾。即ちDNAはRNA等細胞の他の構成物質と動的平衡状態にあるのではなく、有糸分裂の時だけ合成される。

このようにDNA合成が細胞分裂に先行する以上、同調分裂を論ずる場合DNA合成が一代周期中のどの時期に起るかが大きな問題となつてくる。もしDNAが静止期の初期に起るとするならば、DNA合成完了後分裂開始までの時間が長いので、個々の細胞の個体差のために、たとえDNA合成を同一時刻に起させても、実際の細胞分裂の時期は個々の細胞ごとにずれる事になり、したがつて同調化の程度は低く、HeLa細胞のようにDNA合成がProphaseの直前に起るものでは²⁹⁾、DNA合成完了後分裂開始までの時間が短いので、個々の細胞によるこの期間の個体差がすくなく、したがつてDNA合成を同調させればそれにほぼ近似の度合で細胞分裂の同調が起る、すなわち同調化は高い程度のもとなる。

分裂周期中どの時期にDNAが合成されるかについて多くの研究がなされた。E. coli や *S. typhirinum* にあつては Schaechter³³⁾ and McGell²²⁾によれば静止期中連続的にDNAに合成される。又 Fautrez¹¹⁾の如く Blastula cell では静止期の初期に合成されるか、多くの動植物細胞については Swift⁴¹⁾ や Vendrely⁴⁰⁾の如く late interphase に合成期が存在するようである。腫瘍細胞については Edward⁹⁾ や Howard¹⁵⁾によれば Ehrlich ascites cell にてはDNA合成は late interphase におこる、すなわち有糸分裂が完了して数時間後に始まり、次の分裂が始まる直前には合成が完了する。

実際低温解除後の細胞数の変動を追求すると Hotchkiss¹⁴⁾の報告する如く至適温度にもどして直後に分裂が起る Bacteria の類と、Newton²⁶⁾ や Rapp³⁰⁾の実験の如く復温後ほぼその細胞の interphase に相当する時間を経て分裂する動物細胞の類に大別し得るようである。

以上の如く低温刺激で誘起される同調分裂の機序としては、分裂に先行するDNA合成とこれに影響を及

ほす温度との interaction として理解されるものである。ここに DNA 合成に関与する系列についての1つの仮説²⁷⁾がある。Bollum³⁾ や Ord²⁸⁾ 等によると動物細胞では Thymidine triphosphate 合成が DNA 合成の1つの controlling factor であり、DNA 合成が起るためには Thymidine triphosphate 合成に関与する1つ又はそれ以上の酵素が分裂周期中に再生されねばならないとした²⁹⁾。しかもこの酵素が温度に対して非常に labil であるため低温刺激を受けた細胞は Thymidine triphosphate を再生するために late telophase にまでもどされると推論した。

以上の仮説は未だ実験的に実証はされていないが、Newton²⁶⁾ にとつて彼の HeLa 細胞の 4°C 1時間冷却実験で 37°C 復温後丁度 interphase に相当する 18~20 時間後に起つた 90% の同調分裂を説明するには好都合のようにみえる。著者の行なつた HeLa 細胞 20°C 2時間又は 6 時間冷却実験では冷却開始時既に DNA 合成を完了した細胞群は冷却中分裂期に入る事を阻止され、冷却解除後分裂するが、DNA 合成未完了群でしかも冷却期中当然 DNA 合成を開始すると思われる細胞群は冷却解除後直ちに同調的に一斉に DNA 合成を完了して G₂ 期をへて同時に分裂するようであつた。

これを前述の Newton²⁷⁾ の仮説と比較するとき、酵素系再生に同調分裂誘起の因ありと肯定しながらも、sublethal temperature ともいうべき 4°C にての冷却と critical temperature である 20°C にての低温処置にて起る同調分裂の間にはその成立機序上差異を認めねばならない、即ち critical temperature 以下では全ての酵素系が一様に all or none law にのつとつて反応するのではなく、温度と共に関与する酵素系の量的関係が異なるのであろう。このため sublethal temperature では 90% という略 perfect synchrony を得る一方、critical temperature では partial synchrony を得るのであり、この間に量的に異なる種々の程度 of 同調を誘起せしめ得るのであろう。

最近三浦²³⁾ は細胞の成長過程に低温に対する感受性の異なる 2 つの時期を想定し、その境界である臨界点以後の時期に冷却された細胞は冷却解除後あまりおくれる事なく分裂するが、臨界点以前の低温感受性の高い時期に冷却された細胞は分裂直後の状態 Pseudotelophase にまでもどつてしまうであろうと考えた。更に松岡²⁴⁾ は成長過程の多くの代謝にそれぞれ低温に対する感受性の異なる臨界点の存在を想定し、冷却解除後直ちに次の段階に進むものと、冷却時行なつていた代

謝の最初の状態にまで戻るものがあるとした。

さてわれわれの最終目的とする同調分裂を応用せる癌治療であるが、教室の高橋⁴²⁾ が N-F Sarcoma 担癌マウスを 20°C 6 時間低温を施し復温後 2~4 時間にて DNA 合成の同調化を証明し、更に続いて加藤¹⁹⁾ は担癌動物に復温直後 DNA 合成阻害剤である Mitomycin C を投与して優れた治療成績を得た。しかしながらこの実験成績を直ちに臨床に応用するにあつては、なお解明すべき多くの問題が残されている。たとえば抗癌剤投与にあつて、いつ、如何に又どの種の抗癌剤を与えるべきか? 更に投与に際して何が最も簡単に確実な指標となるのだろうか? 若し全ての人体細胞が以上の同調分裂と同じ機序経過をたどつて同調分裂を行なうと仮定すると、抗癌剤特に DNA 合成阻害剤を低温解除後 1~2 時間目の DNA 合成期細胞の増加する時期に向つて投与すべきであろう。実際問題として細胞実数増加を示す B-peak に向つて投与する事は、各細胞について世代時間はまちまちであり、premitotic duration を容易に計測し得ないため不可能である。しかし腫瘍細胞に同調分裂を起させるために、もし担癌個体全体に低温刺激を与えた場合には、この同調分裂は腫瘍細胞のみならず正常細胞にも起る事実である以上、世代時間の長い肝臓、腎臓等主要臓器の同調化は低いといふものの、骨髓、造血器等比較的しばしば分裂する臓器では腫瘍細胞と同じ程度に高いと考えられるので、単純に担癌個体全体を冷却し、その後で全身的に制癌剤を投与してそれだけでよいというわけにはならない。われわれの最終目的を達成するためにはなお多くの困難な問題を解決しなければならぬであろう。組織又は細胞固有の低温に対する critical temperature の相異に活路を見出して、全身冷却による同調分裂を応用するより、むしろ局所冷却で誘起される同調分裂を応用し、これに局所灌流法を用いることにより更に優れた結果を得るものと信ずる。

総 括

YLE-CS 20 で HeLa 細胞を培養し、対数曲線増加期にあるものを一定時間低温に冷却した後もとの培養温度に復温する事によつて同調分裂を起させ、細胞実数及び分裂指数の変化ならびに ³H-thymidine のとりこみの変動等につき検索し次の成績をえた。

- 1) 本実験における HeLa については 20°C が臨界温度であり、これ以下では partial synchrony を誘起せしめ得る。20°C、6 時間低温処置では復温後 5~6 時間

目にて約30%の急激な階段的細胞数増加を示す。又この時に分裂指数の上でも partial synchrony を証明し得る。

2) DNA 合成は20°Cの低温環境下で阻止され、復温後2~4時間目に急激な増加と共に再開され、この時期に ³H-thymidine を培養液に加えた場合の標識率は47%である。

3) 20°C 6時間の冷却では復温後2時間目にも軽度ながら細胞実数の急激な増加と、分裂指数の上昇がみられる。これは低温処置前 DNA 合成を完了した細胞に由来する現象で、低温環境下では分裂期への移行を阻止され、復温後直ちに分裂するためである。

4) 20°C 6時間の冷却で復温後6時間目に認められる細胞実数の著明な増加と分裂指数の急上昇は次の細胞に由来するものと考えられる。すなわち低温処置前 DNA 合成を完了していない細胞で、もし低温処置が施されなかつたらこの期間中に DNA 合成を完了するであろう細胞は、低温環境下で DNA 合成を阻止され、復温後同時に DNA 合成をはじめ、G₂期を経て同時に分裂する。

5) 本実験の範囲内では低温処置時間の長いもの程同調の程度は高い。

6) 低温処置により誘起される同調分裂は、DNA 合成に関与する酵素系の再生が必要であるためであるとする Newton の仮説を肯定しながらも、4°C という sublethal temperature で起る perfect synchrony と20°C という critical temperature で起る partial synchrony ではその成立機序において差異を認めねばならない。全ての酵素系が臨界温度以下では all or none law に従って低温により影響をうけるのではなく、低温の程度により関与する酵素系も量的に変ってくるのであろう。

(稿を終るにあたり、本実験の御指導をおおいだ恩師熊本大学医学部教授横山育三先生に深甚の謝意を表します。)

REFERENCES

- 1) Axelrad, A. A. and McCulloch, E. A. : Obtaining suspensions of animal cell in metaphase from cultures propagated on glass. *Stain Technol.*, **33** : 67, 1958.
- 2) Bianchi, P. A., Butler, J. A., Grathorn, A. R. and Shooter, K. V. : The thymidine-phosphorylating kinases. *Biochem. et Biophys. Acta*, **48** : 213, 1961.
- 3) Bollum, F. J. and Van R. Potter, : Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver. 4) Soluble enzymes which convert thymidine to thymidine phosphates and DNA. *Cancer Research*, **19** : 561, 1959.
- 4) Buccinate, L. : Ulteriori ricerche sulla velocità della mitosi nelle cellule coltivate in vitro in funzione della temperatura. *Arch. Exptl. Zellforsch.* **5** : 1, 1928.
- 5) Burns, V. W. : Relations among DNA and RNA synthesis and synchronized cell division in *Lactobacillus acidophilus*. *Expt. Cell Research*, **23** : 582, 1961.
- 6) Campbell, A. : Synchronization of cell division. *Bact. Review*, **21** : 263, 1957.
- 7) Chèvremont, S. et Savage, J. R. K. : Action de températures subnormales suivies de réchauffement sur l'activité mitotique en culture de tissus. Contribution a l'étude de la préparation a la mitose. *Compt. Re d. Soc. Biol.*, **150** : 1046, 1956.
- 8) Davidson, J. N. : The biochemistry of the nucleic acid. (3rd Edition, 1957)
- 9) Edwards, J. L., Koch, A. L., Youcis, P., Freese, H. L., Late, M. B. and Donaldson J. T. : Some characteristics of DNA synthesis and the mitotic cycle in Ehrlich ascites tumor cells. (*J.*) *Biophys. Biochem. Cytol.*, **7** : 273, 1960.
- 10) Fay, T. : Observation on prolonged human refrigeration. *N. Y. State J. M. Sept.* **15** : 1351, 1940.
- 11) Fautrez, J. and Fautrez, F. : Desoxyribonucleic acid content of the cell nucleus and mitosis. *Nature*, **172** : 119, 1953.
- 12) Gey, G. O., Coffman, W. E. & Kubicek, M. T. : Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, **12** : 264, 1952.
- 13) Gilman, A. & Phillips, F. S. : The biological action and therapeutic application of β -chloroethylamines and sulfides. *Science*, **103** : 409, 1946.
- 14) Hotchkiss, R. D. : Cyclical behavior in pneumo-

- coccal growth and transformability occasioned by environmental changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **40** : 49, 1954.
- 15) Howard, A. & Hornsey, S. : Autoradiographic studies with mouse Ehrlich ascites tumor. *Ann. New York Acad. Sci.*, **63** : 915, 1956.
- 16) Hunter Szybalska, M., Szybalska, W. & Delamater, E. : Temperature synchronization of nuclear and cellular division of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*, **71** : 17, 1956.
- 17) Jacoby, F., Trowell, O. A. & Willmer, E. N. : Studies on the growth of tissues in vitro. 5) Further observations on the manner in which cell division of chick fibroblasts is affected by embryo tissue juice. *J. Exptl. Biol.*, **14** : 255, 1937.
- 18) 加藤四郎 : オートラジオグラフィー, 組織培養, 中井準之助編, 189, 1964.
- 19) Kato, T. : Experimental studies on application of hypothermia to cancer chemotherapy. *Archiv Für Jap. Chirur.*, **33** : 724, 1964.
- 20) Lark, K. G. & Maale, M. F. : The induction of cellular and nuclear division in *Salmonella typhimurium* by means of temperature shifts. *Biochem. et Biophys. Acta.*, **15** : 345, 1954.
- 21) 松岡健司 : 吉田肉腫の増殖に及ぼす環境と薬剤の影響について. 特に組織培養に於けるGABAの増殖促進作用, 日外会誌, **66** : 941, 1965.
- 22) Mc Fall, E. & Stent, G. S. : Continuous synthesis of desoxyribonucleic acid in *Escherischia coli*. *Biochem. et Biophys. Acta.* **34** : 380, 1959.
- 23) Miura, T. & Utakoji, T. : Studies on synchronous division of FL cells by chilling. *Exptl. Cell Research*, **23** : 452, 1961.
- 24) Moorhead, P. S. & Hsu, T. C. : Cytologic studies of He La, a strain of human cervical carcinoma. 3) Duration and characteristics of the mitotic phases. *J. Natl. Cancer Inst.*, **16** : 1047, 1956.
- 25) Murray, M. R., Peterson, E. R., Hirschberg, E. & Pool, J. L. : Metabolic and chemotherapeutic investigation of human glioblastoma in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **58** : 1147, 1954.
- 26) Newton, A. A. & Wildy, P. : Parasynchronous division of HeLa cells. *Exptl. Cell Research*, **14** : 391, 1958.
- 27) Newton, A. A. : Synchrony in cell division and growth. (edited by Zeuthen, E.) Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons Inc. New York-London-Sydney. 441, 1964.
- 28) Ord, M. G. & Stocken, L. A. : Desoxyribonucleic acid synthesis, — a serial story. In the *Cell Nucleus* (J. S. Mitchell, ed.) Butterworth, London, 151.
- 29) Painter, R. B. & Drew, R. M. : Studies on desoxyribonucleic acid metabolism in human cancer cell culture (HeLa). The temporal relationships of desoxyribonucleic acid synthesis to mitosis and turnover time. *Lab. Invest.*, **8** : 278, 1959.
- 30) Rapp, F. : Observations of measles virus infection of human cells. 3) Correlation of properties of clone of H. Fp.-2 cells with their susceptibility to infection. *Virology*, **10** : 86, 1960.
- 31) Rueckert, R. R. & Mueller, G. O. : Studies on unbalanced growth in tissue culture. 1) Induction and consequences of thymidine deficiency. *Cancer Research*, **20** : 1584, 1960.
- 32) Sanford, K. K., Earle, W. R., Evans, V. J., Waltz, H. K. & Shannon, J. E. : The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. *J. Natl. Cancer Inst.*, **11** : 773, 1951.
- 33) Schaechter, M., Bentzon, M. W. & Maaloe, D. : Synthesis of desoxyribonucleic acid during the division cycle of bacteria. *Nature*, **183** : 1207, 1959.
- 34) Scherbaum, O. : Cell growth in normal and synchronous dividing mass culture of *Tetrahymena pyriformis*. *Exptl. Cell Research*, **11** : 464, 1956.
- 35) Scherbaum, O. & Zeuthen, E. : Introduction of synchronous cell division in mass culture of *Tetrahymena pyriformis*. *Exptl. Cell Research*, **6** : 221, 1954.
- 36) Scott, D. B. & Chu, E. : Synchronized division of growing cultures of *Escherischia coli*. *Exptl.*

- Cell Research, **14** : 166, 1958.
- 37) Smith, C. L., Newton, A. A. & Wildy, P. : Desoxyribonucleic acid formation in multiplying HeLa cells. *Nature*, **184** : 107, 1959.
- 38) Smith, L. W. & Fay, T. : Temperature factors in cancer and embryonal cell growth. *Jour. A. M. A.*, **113** : 653, 1939.
- 39) Spear, F. G. : The effect of low temperature on mitosis in vitro. *Arch. Exptl. Zellforsch.*, **7** : 484, 1928.
- 40) Swann, M. M. : The control of cell division. A review 1. General mechanism *Cancer Research*, **17** : 727, 1957.
- 41) Swift, H. A. : Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Int. Rev. Cytol.*, **2** : 1, 1953.
- 42) Takahashi, M. : Intensification of effects of anticancer agents by use of hypothermia. *Archiv Für Jap. Chirur.*, **32** : 648, 1963.
- 43) Terashima, T. & Tolmach, L. J. : Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature*, **190** : 1210, 1961.
- 44) Vendreley, R. & Vendreley, C. : The results of cytophotometry in the study of DNA contents of the nucleus. *Int. Rev. Cytol.*, **5** : 171, 1956.
- 45) Yamada, M. & Takano, K. : Growth curve of HeLa strain cells in tissue culture. *Jap. J. M. Sc. & Biol.*, **9** : 27, 1956.
- 46) Zeuthen, E. & Scherbaum, O. : Synchronous division in mass cultures of the ciliate protozoon *Tetrahymena pyriformis*, as induced by temperature changes. (J. A. Kitching, ed.), *Cell Physiology*, London, Butterworth's Scientific Publications, 1954.