

原 著

同調培養したヒト由来培養細胞株の細胞周期各段階に
おける紫外線感受性の研究

小 西 宏 明
信州大学医学部皮膚科学教室

ULTRAVIOLET SENSITIVITIES OF SYNCHRONIZED HUMAN
CULTURED CELLS AT VARIOUS STAGES OF CELL CYCLE

Hiroaki KONISHI
Department of Dermatology, Shinshu University School of Medicine

KONISHI, H. *Ultraviolet sensitivities of synchronized human cultured cells at various stages of cell cycle.* Shinshu Med. J., 29: 20-29, 1981

Ultraviolet sensitivities in three kinds of cultured cells of human origin were compared at various stages of the cell cycle. Two human skin cell lines and one human liver cell line were cultured synchronously by using mitotic cells. At selected times after collection of the mitotic cells, they were irradiated with UV of 250 and 290 nm obtained from a 3 KW xenon arc grating monochrometer, and their colony-forming abilities during the cell cycle were compared. UV sensitivities of the three kinds of cells to both wavelenghtes increased progressively from G₁ and reached to a maximum at about the beginning of S. Then, the sensitivities began to decrease from the middle S and throughtout the remainder of the cell cycle. Any difference of the sensitivity patterns of the three kinds of cells to both wavelenghtes of UV could not be found.

(Received for publication ; July 25, 1980)

Key words ; 紫外線感受性 (ultraviolet sensitivity)
同調培養 (synchronized culture)
ヒト細胞 (human cells)
JTC-17

I 序

哺乳動物由来培養細胞株の紫外線感受性は、細胞周期 (cell cycle) の各段階 (stage) によって異なる。ただ、細胞株によってその感受性の高い段階が必ずしも一致していない。細胞周期を分裂期 (M期)、DNA合成前期 (G₁期)、DNA合成期 (S期)、DNA合成後期 (G₂期) の4段階に分けると、ヒト細胞では253.7 nmの殺菌灯紫外線に対して HeLa S3 細胞株では Djordjevic と Tolmach¹⁾によると S中期, Watanabe と Horikawa²⁾によると S中期およびM期, Downes³⁾らによる HeLa 細胞株では G₂~S移行期, Todd⁴⁾らによる Chang 肝細胞株ではS初期付近がコロニー形成率からみた最も感受性の高い段階であると報告されている。このような差異は、実験に用いた細胞株の由来器官の差異のみならず、実験条件も互いにやや異なるなどに起因しよう。例えば細胞の同調方法にしても Watanabe と Horikawa は colcemid によるM期 block, Downes らは thymidine および nitrous oxide による block, Todd らは thymidine block といずれも代謝 block による同調であり、Djordjevic と Tolmach のみが物理的な採集法によっている。また皮膚科学的な観点からは、由来器官を皮膚に定めての紫外線感受性の研究が求められる。照射紫外線波長にしても、核酸代謝を重視すれば当然その最大吸収波長である250nm前後を照射するこれまでの報告も一応うなずけるが、臨床では細胞膜および細胞質蛋白の最大吸収波長を含む照射研究も省略できない。まして生物の棲息する地表にはおおむね290nmより短い波長の紫外線は到達していない。したがって地表到達波長域紫外線の単独照射、およびそれらの光エネルギーを吸収して励起する化学物質による光毒性効果などの、より現実的な研究が必要である。

著者らは、これまでヒト培養細胞株 XX-male に対する xanthene 系色素の光毒性効果を研究し報告してきた⁵⁾。

今回は、ヒト皮膚細胞周期の各段階での紫外線感受性がいかに変化するかを研究した。すなわちヒト健常皮膚由来2種を選び、対照としてヒト健常肝由来1種、計3種の培養細胞株を採集法により同調培養し、250 nmおよび290nmの紫外線を照射する条件で実験し、いささかの成績を得たので報告する。

II 実験材料ならびに方法

A 細胞株

XX-male 皮膚細胞株 (JTC-17)^{6,7)}、ターナー皮膚細胞株、Chang 肝細胞株⁸⁾のいずれも上皮性形態を示すヒト由来培養細胞株3種を実験材料として用いた。XX-male 皮膚細胞株はXXの女性タイプ性染色体をもち、外観が男性であるXX-male syndromeの成人皮膚、ターナー皮膚細胞株は性染色体がX1本のみで外観が女性でありながら第二次性徴の発達しないTurner syndromeの子供皮膚より、いずれもFuruyamaらによりほとんど同時期に樹立されたヒト健常皮膚由来の細胞株である。

B 同調培養法

Terashima と Tolmach⁹⁾の採集同調法を改良したRobbins と Marcus¹⁰⁾の方法に準じた。

塩化カルシウムのみを除いたEagle MEMにL-セリン20mg/l、仔牛血清7%を加えた培養液を綿栓した大型の平角型培養ビンに入れ、その中で細胞を2日間準備培養、ほぼfull-growthの状態とした。培養ビンを軽く振り、ビン壁より遊離しやすいM期細胞を遊離させてガーゼで濾過採集し、仔牛血清および塩化カルシウムを添加後、採集細胞数をFuchs-Rosenthal血球計算盤で計数した。あらかじめ温度およびpHを調整しておいた培養液入りの直径6cmガラスシャーレ50~100枚に一定細胞数(約500細胞)ずつを正確に分注、培養を開始した。同時にカバーガラスを洗めた同様のシャーレ20枚ほどを用意し、このシャーレにも細胞を分注してpulse-labeling用とした。培養はすべて37°Cの炭酸ガス細胞培養器にて行った。培養液は、M期細胞採集用以外はすべてL-セリン20mg/lおよび仔牛血清20%を加えたEagle MEMを用いた。なお、採集分注の操作はできる限り37°Cで行い操作中の温度やpHの変化は最小にとどまるようにした。

C Pulse-labeling と低バックグラウンドカウンターによる計測⁹⁾¹¹⁾

カバーガラスを洗めた培養シャーレより3~4時間毎に細胞の着生したカバーガラスを取り出し、0.05μCi/mlの³H-チミジンを含む培養液中で37°C、20分間pulse-labelingを行った。ラベルした細胞を酢酸アルコール(1:3)で20分間固定、水洗10分後風乾し、低バックグラウンドカウンター(日本無線医理学研究所製、LBC-22型低バックグラウンド放射能自

動計測装置)にて10分間ずつ2-3回カウントを計測した。なおカウント計測のコントロールとして pulse-labeling を行わなかった細胞着生カバーガラスおよび未使用のカバーガラスを固定水洗操作後、同様に計測した。カウント計測後のカバーガラスを細胞染色し、顕微鏡下で最低100視野以上の細胞数をランダムに計数し、検査した視野面積とカバーガラスの全面積から着生総細胞数を計算、細胞1ヶ当たりの平均カウント数 (cpm/cell) を求めた。この結果から、ラベルされたチミジンの取り込み時期、すなわち DNA 合成期を指標として細胞周期の各段階の同定を行った。

通常は、このような実験にはオートラジオグラフィを用いるが、同法は結果を得るのに1-2カ月を要する不便さがある。一方、すでに述べた低バックグラウンドカウンターによる方法は、2-3日で結果の得られる利点がある。そこで著者は、予備実験として両方法を同一サンプルで同時に行い、両結果を比較した。pulse-labeling を行った細胞着生カバーガラスを固定後2枚に切り、一方は上述の低バックグラウンドカウンター法を行い、他方のオートラジオグラフィは、サクラ NR-M 2原子乳剤の2倍希釈液、40°C, dipping 法で行い、ラベルされた細胞株のパーセント値を求めた。その結果は図1に示すごとく、両方法の成績はほぼ一致した。そこで著者は以後の実験では、オートラジオグラフィに代えて低バックグラウンドカウンター法を採用した。

D 紫外線照射

照射光源として、3 KWキセノンランプと回折格子型分光器(島津ボシュロム製)を組み合わせたモノクロメーター(東芝製)を用いた。照射波長は、1) 核酸および核蛋白の最大吸収波長に近い250nm、2) 太陽光線として地上に到達する最短波長であり、同時にアルブミン等可溶性蛋白の長波長側最大吸収波長に近い290nm、の2波長、半値巾は共に10nmとした。

同調培養しているシャーレを3-4時間毎に取り出し、着生細胞を Hanks 塩溶液 (pH 7.2-7.4, フェノールレッドを含まない無色) で2度洗滌後、シャーレのふたをとり、この着生細胞を室温にて直接照射した。照射後培養液を加え、10-11日間培養、10%中性ホルマリン溶液にて固定、0.1%クリスタルバイオレット水溶液で染色し細胞コロニーを計数、照射線量-生存率曲線を求めた。すべての実験操作は通常の室内光のもとで行い、特別な遮光操作はしなかった。

III 結 果

A 細胞周期の段階の同定

XX-male 細胞株の同調培養において、³H-チミジンの取り込みを低バックグラウンドカウンターによる方法と、オートラジオグラフィによる方法とで同時に測定した結果は、すでに図1に示してある。この図より細胞周期の各段階の時間を求めると、M期細胞採集時を0時とした時の培養経過時間が G₁ 期は0-9.3時までの9.3時間、S期は9.3-20.3時までの11時間、G₂ 期は20.3-26.5時までの6.2時間となり、細胞の1周期時間、すなわち世代時間は26.5時間と求められる。

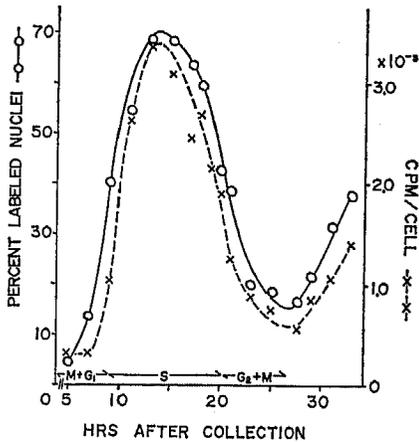


図1 同調培養した XX-male 細胞株の同一サンプルによる ³H-チミジン取り込み測定方法の比較

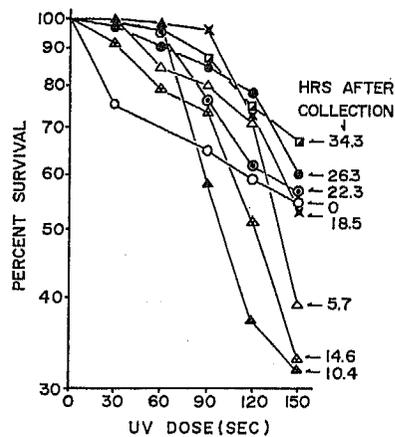


図2 XX-male 細胞株に対する250nm紫外線照射各線量による細胞生存率

なおこの場合の G₁ 期および G₂ 期の時間には、M期の一部が含まれている。ただ、この時間はあくまでも測定例の1つであり、特に同調培養操作においては、操作中の僅かな温度や pH の変化、シャーレへの分注完了までの操作時間の長短などによっても周期時間が変動しやすく、しかも一般に延長する傾向がある。したがって各段階の出現時間は、ずれを生じやすい。そこで実験のたびに pulse-labeling を行い各段階を同定した。

B 細胞周期各段階と紫外線感受性

同調培養した3種の培養細胞株の細胞周期各段階の

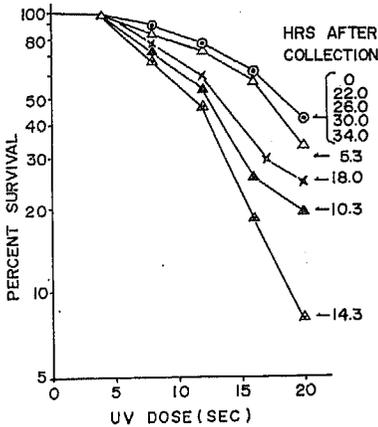


図3 XX-male 細胞株に対する290nm紫外線照射各線量による細胞生存率

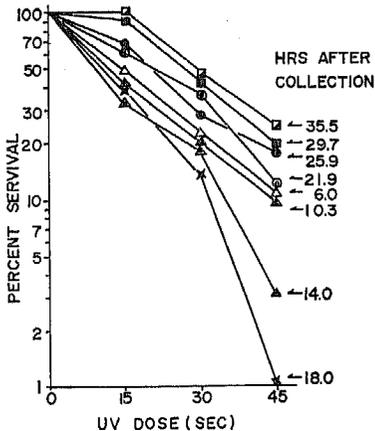


図4 ターナー皮膚細胞株に対する250nm紫外線照射各線量による細胞生存率。照射線量率2.7erg/mm²·sec

細胞に、半値巾10nmで250nmおよび290nmの紫外線を照射して得た照射線量-生存率曲線を、図2から図7までに示す。この曲線は細胞の分裂増殖による補正はしていない。また、これらの結果より得られた同一照射線量に対する生存率を採集時からの培養時間（以後単に培養時間と記す）に対してプロット、pulse-labeling の結果と対比作成した細胞周期各段階の紫外線感受性曲線を図8、9、10に示す。

1 XX-male 細胞株 (図2, 3, 8)

250nmの紫外線照射に対し、データのばらつきはや

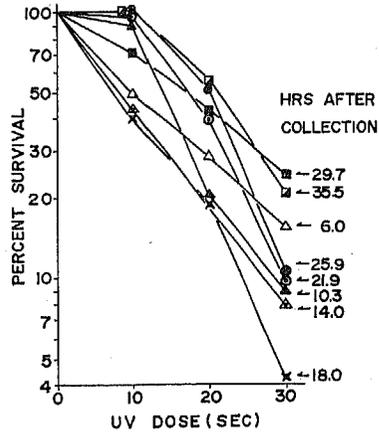


図5 ターナー皮膚細胞株に対する290nm紫外線照射各線量による細胞生存率。照射線量率8.0erg/mm²·sec

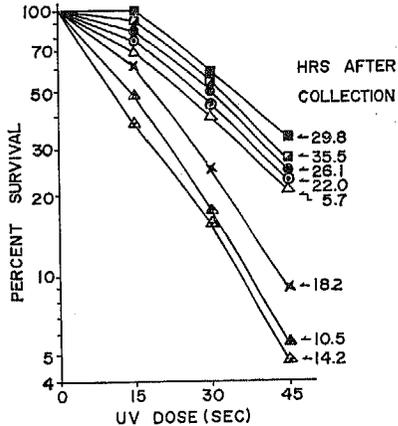


図6 Chang 肝細胞株に対する250nm紫外線照射各線量による細胞生存率。照射線量率2.7 erg/mm²·sec

やあるが、培養時間10時間付近で最も生存率が低下し、以後漸増して22~26時間以後はほぼ一定値を示す。図8の下図で示すように、培養時間10時間付近はG₁期からS期への移行期、22~26時間付近はほぼS中期に相当する。

同じく290nmの紫外線照射に対して、生存率は培養

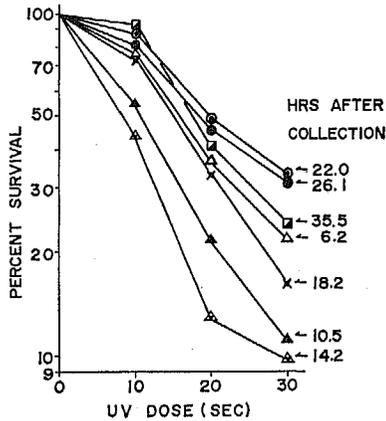


図7 Chang 肝細胞株に対する290nm紫外線照射各線量による細胞生存率。照射線量率 8.0erg/mm²・sec

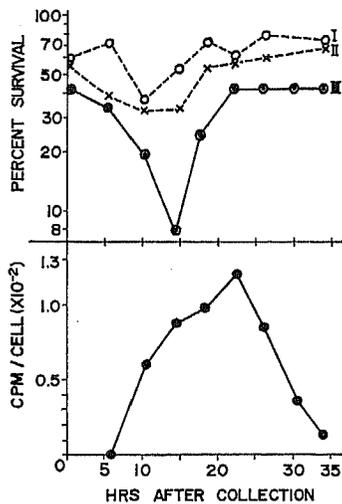


図8 XX-male 細胞株の細胞周期の段階と紫外線感受性
 上図 I : 250nm 120秒照射 II : 250nm 150秒照射 III : 290nm 20秒照射, 下図 : 0.05μCi/ml ³H-チミジン 20分 pulse-labeling

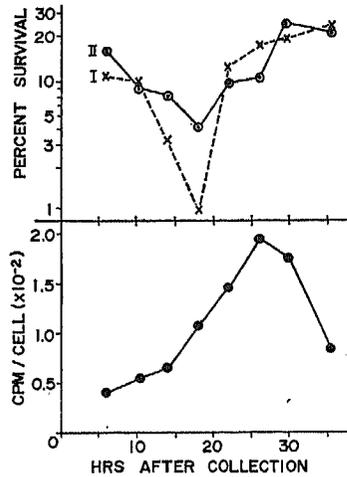


図9 ターナー皮膚細胞株の細胞周期の段階と紫外線感受性
 上図 I : 250nm 45秒照射(照射線量 1.2×10^2 erg/mm²) II : 290nm 30秒照射(照射線量 2.4×10^2 erg/mm²)
 下図 : 0.05μCi/ml ³H-チミジン 20分 pulse-labeling

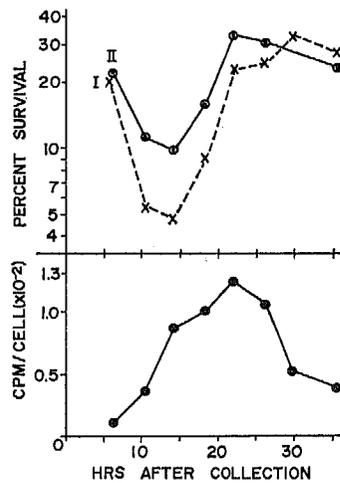


図10 Chang 肝細胞株の細胞周期の段階と紫外線感受性
 上図 I : 250nm 45秒照射(照射線量 1.2×10^2 erg/mm²) II : 290nm 30秒照射(照射線量 2.4×10^2 erg/mm²)
 下図 : 0.05μCi/ml ³H-チミジン 20分 pulse-labeling

時間の経過とともに低下、14時間付近で最低となり、以後ふたたび上昇して22時間以後はほぼ一定値を示す。14時間付近はS初期、22時間付近はほぼS中期に相当する。

すなわち XX-male 細胞株は250nm, 290nmの両波長紫外線に対して、G₁期からS期への移行期、ないしはS初期付近で最も感受性が高く、最低の生存率を示した。

なお図2, 3の採集後の培養時間0時間とは、M期細胞の照射結果を示す。細胞採集に先立ってM期細胞採集用の培養液を Hanks 塩液と交換、同様にM期細胞を採集し、同塩溶液に分散したままの細胞を直ちに照射、以後培養液を加えて培養を継続し形成コロニーを計数した。

また、XX-male 細胞株での照射紫外線量は測定していない。少なくとも、250nmの単位時間当たりの線量(照射線量率)は、あとのターナー皮膚細胞株、Chang 肝細胞株の実験の場合より相当低いと考えられる。

2 ターナー皮膚細胞株(図4, 5, 9)

250nmの紫外線照射に対して、生存率は培養時間10.3時間以後で低下しはじめ、18時間で最低となり、以後ふたたび上昇して25.9時間以後はほぼ一定値を示す。18時間付近はG₁期からS期への移行期、25.9時間付近はS中期に相当する。

同じく290nmの紫外線照射に対しても、生存率が最低値を示すのは培養時間18時間付近であり、G₁期からS期への移行期に相当する。

すなわちターナー皮膚細胞株は、250nm, 290nmの両波長紫外線に対して、XX-male 細胞株とほぼ同様に、G₁期からS期への移行期で最も感受性が高く、最低の生存率を示した。

なおこの場合の照射線量率は、熱電対による測定により250nmの照射条件で約2.7erg/mm²·sec, 290nmの照射条件で約8.0erg/mm²·sec とした。

3 Chang 肝細胞株(図6, 7, 10)

250nmの紫外線照射に対し、生存率は培養時間60時間以後より低下し始め、14.2時間で最低となり、以後ふたたび上昇して22時間以後はほぼ一定値を示した。14.2時間付近はS初期、22時間付近はS中期に相当する。

同じく290nmの紫外線照射に対しても、250nmの場合と同様の傾向を示し、生存率が最低値をとるのは14.2時間目のS初期であった。

すなわち Chang 肝細胞株は、250nm, 290nmの両波長紫外線に対して XX-male 細胞株の場合と同様

に、S初期で最も感受性が高く、最低の生存率を示した。

なおこの場合の照射線量率は、ターナー皮膚細胞株の場合と同様250nmの照射条件で約2.7erg/mm²·sec, 290nmの照射条件で約8.0erg/mm²·sec とした。

以上ヒト由来培養細胞株3種の紫外線照射に対する感受性は、G₁期からS期への移行期付近ないしはS初期に高く、S中期以後からG₂期、それにG₁期に同レベルの低い共通パターンを示した。M期細胞の紫外線照射に対する感受性についてはXX-male 細胞株のみの実験であり他の2株の細胞については検討してなく、またこの周期の細胞に対する照射は細胞浮遊状態下でのものであり、したがって照射条件も他の周期の細胞のそれと多少異なるが、250nmおよび290nm紫外線照射に対する感受性は、低いという結果を得た。

すなわち、表皮由来2種および肝由来1種の計3種培養細胞株の相違、ならびに250nmおよび290nmの波長の相違による紫外線感受性の差異は、今回の実験条件では認められなかった。

IV 考察

紫外線の生物に対する作用は、主として照射された分子の励起によってひきおこされる反応である。一方X線の作用は照射された分子のイオン化によりひきおこされる反応であり、紫外線の場合と異なるという¹²⁾。

紫外線照射に対応して皮膚はその表皮細胞の増殖、メラニン生成、そして淡色メラニンの暗化などの防御反応を示すと云われている¹³⁾⁻¹⁵⁾が、ここではふれない。

実験的には、細胞死をもたらす紫外線照射の主要な細胞内標的はDNAとされている。紫外線照射を受けたDNAにおきる変化としてピリミジンダイマーの生成¹⁶⁾、蛋白質との結合¹⁷⁾⁻¹⁹⁾、チロジン、セリン、システイン²⁰⁾²¹⁾、リジン²²⁾、トリプトファン光酸化物²³⁾²⁴⁾等のアミノ酸との結合、そして一重鎖DNAで確認されているピリミジン hydrate の生成²⁵⁾等があげられる。そしてこれらの変化のうち、ピリミジンダイマー、特にチミンダイマーの生成が紫外線による細胞死の主要な原因であり、この生成ダイマーを除去し修復する能力の大小がその細胞の紫外線に対する感受性(あるいは抵抗性)を決定すると考えられている。照射によって生成するダイマーはDNA内に任意に分布しており²⁶⁾、この修復機構はヒト細胞では切除修復

が主体であり²⁷⁾²⁸⁾, 光回復も認められている²⁹⁾。この切除修復は、1) endonuclease がダイマーをもつ DNA 鎖に切れ目を入れる 2) exonuclease がダイマーを隣接スクレオタイドごと除去する 3) DNA polymerase が正常部分 DNA を鋳型としてその gap を埋める 4) 修復された segment は DNA ligase の作用により、もとの DNA 鎖につながるの順序で進行する³⁰⁾。

太陽光線の照射を受けるとヒト細胞株ではピリミジンダイマーが生成するが、ガラスフィルターにより紫外線を除去するとそれを生成しない²⁸⁾。265nm 紫外線の同一照射線量に対するダイマー生成率は、ヒト細胞の由来器官が相違していてもほぼ等しく、切除修復率もほぼ等しい²⁷⁾。またこの切除修復は完全に行われるのではなく、50~60%止まりのまま進行し、残りは非常な長時間をかけて除去される³¹⁾という。これは、生成したダイマーの一部が核蛋白にマスクされて endonuclease の作用を受けなくなった故とされている³²⁾。xeroderma pigmentosum (XP) の細胞にはこの endonuclease が欠除しており、これが紫外線に対する高い感受性と臨床的な光線皮膚障害をもたらす原因となっている³⁰⁾³³⁾³⁴⁾。

著者の成績では、XX-male 皮膚細胞株、ターナー皮膚細胞株、Chang 肝細胞株ともに G₁ から S への移行期または S 初期に感受性が最も高く、HeLa S3 で Djordjevic と Tolmach¹⁾ および Watanabe と Horikawa²⁾ が最も高いと報告している S 中期では、すでに明らかに感受性は低下していた。G₁ から S への移行期に最も感受性が高く、M 期が最も低いとする Downes ら³⁾の HeLa 細胞株による結果と著者の結果は一致する。Todd ら⁴⁾の結果は、pulse-labeling を行わず細胞数の増加で細胞周期をみているため各段階を正確には同定し難いが、ほぼ著者の結果と一致している。Watanabe と Horikawa のいう M 期にある高感受性は、XX-male では認められなかった。なお Watanabe と Horikawa は、高感受性を示した M および S 期で照射によるチミンダイマーの生成率が最も高いこと、照射後培養を 36 時間行っても生成したチミンダイマーの除去は 50% 程度しかなく、この除去率は段階による差のないことを報告している。一方 HeLa 細胞株を使った Cornelis³⁵⁾の報告では、M 期細胞のみダイマーの除去がおきなかったとしている。Downes らもチミンダイマー生成率と alkaline sucrose sedimentation により測定した DNA 損傷が M から S 期

に向かって増加するが、生成率がこの損傷程度を示す函数とはならず、むしろクロマチンの幾何学的形態に依存すると述べている。

ヒト細胞に見られるような切除修復をほとんど行わず、新生成修復を行う嚙歯類細胞での報告³⁶⁾³⁷⁾をみると、マウス L 細胞株では G₁ 期³⁸⁾, G₂ 期³⁹⁾, チャイニーズハムスター細胞株で S および G₁ 期⁴⁰⁾, チャイニーズハムスター卵巣細胞で G₁ から S への移行期⁴¹⁾, S 初期⁴²⁾ がこれら細胞株の生存率からみた 253.7nm 殺菌灯紫外線感受性の最も高い段階とされている。これらの知見も含めて判断すると、L 細胞の G₂ 期の例外を除いて少なくとも S 後期での高い感受性の報告はなく、およそ G₁ から S 中期に至る段階での高い感受性が平均像として浮かび出てくる。今回の実験でも DNA 合成開始段階に最も高い感受性が認められたことは、ピリミジンダイマーの生成のみならず、この段階に出現する DNA 一重鎖が通常の状態である二重鎖よりも光付加物を作りやすいことを考えれば、一応の説明がつく。

実験に用いる株化された細胞は、細胞内の由来器官特異性酵素活性バランスが培養により急速に変化して平均化すること⁴³⁾, 一方 DNA の複製および修復機構等の種の特徴や紫外線感受性 endonuclease 欠損等の細胞由来個体の代謝異常遺伝等は、よく保持されることが知られている。今回用いた 3 種の培養細胞株のうち、Chang 肝細胞株について HeLa 細胞の混入の可能性が指摘されている⁴⁴⁾ が、3 種ともにほぼ同一の紫外線感受性を示したことは、ヒト細胞としてほぼ同様に平均化していることを示すものであろう。

V 結 論

ヒト健常皮膚由来細胞株 2 種を同調培養し、紫外線に最も高い感受性を示す細胞周期の段階をコロニー形成で求めた。対照にはヒト肝由来細胞 1 種を用いた。なお照射光源は 3 kw キセノンランプモノクロメーターとし照射波長は 250nm および 290nm、いずれも半値巾 10nm とした。3 種の細胞株ともに両波長紫外線に対して G₁ から S への移行期ないしは S 初期に最も感受性が高く、M 期から G₁ 中期および S 中期から G₂ 期は感受性が低い結果を得た。

すなわち、ヒト細胞株の皮膚および肝という由来器官の差、由来個体の差、ならびに 250nm と 290nm の波長の差などによる感受性の相違を認めることが出来なかった。

本論文の一部は第61回日本皮膚科学会信州地方会、および第18回日本化学療法学会総会で発表した。

おわりに

おわりにあたり培養細胞株を分けていただいた兵庫医大遺伝学教室古山順一助教授に深く感謝いたします。またオートラジオグラフ手技の指導を頂いた本学第一解剖学教室永田哲士教授、放射能測定の方針を頂いた中央放射線部滝沢正臣博士、本論文の方針を頂いた当教室高瀬吉雄教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Djordjevic, D. and Tolmach, L. : Responses of synchronous populations of HeLa cells to ultraviolet irradiation at selected stages of the generation cycle. *Radiat Res*, 32 : 327-346, 1967
- 2) Watanabe, M. and Horikawa, M. : Analysis of differential sensitivities of synchronized HeLa S3 cells to radiations and chemical carcinogens during the cell cycle : (II) Ultraviolet light. *Biochem Biophys Res Commun*, 58 : 185-191, 1974
- 3) Downes, C. S., Collins, A. R. S. and Johnson, R. T. : DNA damage in synchronized HeLa cells irradiated with ultraviolet. *Biophys J*, 25 : 129-150, 1979
- 4) Todd, P., Dalen, H. and Schroy, C. B. : Survival of synchronized cultured human liver cells following single and fractionated exposures to ultraviolet light. *Radiat Res*, 69 : 573-582, 1977
- 5) Takase, Y., Nijo, S. and Konishi, H. : In "Sunlight and man", Fitzpatrick, T. B. (ed.), pp.445-457, University of Tokyo Press, Tokyo, 1974
- 6) Furuyama, J., Mori, Y. and Kikkawa, H. : A male bearing XX sex chromosome constitution in human. *Proc XII Intern Congr Genet*, 1 : 216, 1968
- 7) Sato, A. : Changes in chromatin pattern during long term of tissue culture of human male skin cells exhibiting XX chromosome. 26th Meeting of Japan Tissue Culture Assoc., 1968
- 8) Chang, R. S. : Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. *Proc Soc Exp Biol Med*, 87 : 440-443, 1954
- 9) Terashima, T. and Tolmach, L.J. : Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. *Exp Cell Res*, 30 : 344-362, 1963
- 10) Robbins, E. and Marcus, P. I. : Mitotically synchronized mammalian cells, a simple method for obtaining large populations. *Science*, 144 : 1152, 1964
- 11) 寺島東洋三 : 成長周期解析法と同調培養法, 遺伝情報 I, 日本生物物理学会編, pp. 187-198, 吉岡書店, 京都, 1965
- 12) 近藤宗平 : 放射線基礎生物学, 量子生物学 I, 日本生物物理学会編, pp. 230-281, 吉岡書店, 京都, 1965
- 13) 水野信行 : 紫外線をかけた時の表皮の変化. 皮の臨, 10 : 12-22, 1968
- 14) 高瀬吉雄 : 紫外線と生物環境, 光と皮膚, 小堀辰治, 安田利顕監修, pp. 5-15, 金原出版, 東京, 1973
- 15) 清寺 真, 高橋正昭, 棚橋善郎 : ヒト皮膚の光線に対する防御機構について, 光と皮膚, 小堀辰治, 安田利顕監修, pp. 75-92, 金原出版, 東京, 1973
- 16) Setlow, R. B. and Setlow, J. K. : Evidence that ultraviolet-induced thymine dimers in deoxyribonucleic acid cause biological damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 48 : 1250-1257, 1962
- 17) Alexander, P. and Moroson, H. : Crosslinking of deoxyribonucleic acid to protein following ultraviolet irradiation of different cells. *Nature*, 194 : 882-883, 1962
- 18) Smith, K. C. : Dose-dependent decrease in extractability of DNA from bacteria following irradiation with ultraviolet light or with visible light plus dye. *Biochem Biophys Res Commun*, 8 : 157-163, 1962
- 19) Smith, K. C. and O'leary, M. E. : Photo-induced DNA-protein crosslinks and bacterial killing : A correlation at low tempera-

- tures. Science, 155 : 1024-1026, 1967
- 20) Smith, K. C. and Aplin, R. T. : A mixed photo-product of uracil and cystein (5-S-cystein, 6-hydroxyuracil). A possible model for the *in vivo* crosslinking of DNA and protein by ultraviolet light. Biochemistry, 5 : 2125-2130, 1966
 - 21) Smith, K. C. and Meun, D. H. C. : Kinetics of the photochemical addition of (35S) cysteine to polynucleotides and nucleic acids. Biochemistry, 7 : 1033-1037, 1968
 - 22) Shetlar, M. D., Schott, H. N., Martinson, H. G. and Lin, E. T. : Formation of thymine-lysine adducts in irradiated DNA-lysine system. Biochem Biophys Res Commun, 66 : 88-93, 1975
 - 23) Yoakum, G. H. : Tryptophan photoproduct (s) : Sensitized induction of strand breaks (or alkaliabile bands) in bacterial deoxyribonucleic acid during near-ultraviolet irradiation. J. Bacteriol, 122 : 199-205, 1975
 - 24) Glatzer, L., Rincon, D. A. and Eisenstark, A. : The binding of near-ultraviolet light-induced tryptophan photoproduct(s) to DNA. Biochim Biophys Acta, 418 : 137-145, 1976
 - 25) Smith, K. C. : In "The biologic effects of ultraviolet irradiation," Ulbach, F. (ed.), pp. 47-56, Pergamon Press, Oxford, 1969
 - 26) Shoyab, M. : Organization of UV-induced, repair replicated DNA in the cellular genome of cultured human and mouse cells. Exp Cell Res, 121 : 9-14, 1979
 - 27) Regan, J. D., Trosko, J. E. and Carrier, W. L. : Evidence for excision of ultraviolet-induced pyrimidine dimers from the DNA of human cells *in vitro*. Biophys J, 8 : 319-325, 1968
 - 28) Trosko, J. E., Krause, D. and Isoun, M. : Sunlight-induced pyrimidine dimers in human cells *in vitro*. Nature, 228 : 358-359, 1970
 - 29) Sutherland, B. M. : Photoreactivating enzyme from human leukocyte. Nature, 248 : 109-112, 1974
 - 30) Robbins, J. H. and Moshell, A. N. : DNA repair processes protect human beings from premature solar skin damage : Evidence from studies on xeroderma pigmentosum. J. Invest Dermatol., 73 : 102-107, 1979
 - 31) Buhl, S. N., Stillmann, R. M., Setlow, R. B. and Regan, J. D. : DNA chain elongation and joining in normal human and xeroderma pigmentosum cells after ultraviolet irradiation. Biophys J, 12 : 1183-1191, 1972
 - 32) Wilkins, R. J. and Hart, R. W. : Preferential DNA repair in human cells. Nature, 247 : 35-36, 1974
 - 33) Cleaver, J. E. : DNA damage and repair in light-sensitive human skin disease. J Invest Dermatol, 54 : 181-195, 1970
 - 34) Setlow, R. B. : Repair deficient human disorders and cancer. Nature, 271 : 713-717 1978
 - 35) Cornelis, J. J. : The influence of inhibitions on dimer removal and repair of single-strand breaks in normal and bromodeoxyuridine substituted DNA of HeLa cells. Biochim Biophys Acta, 521 : 134-143, 1978
 - 36) Lehmann, A. R. : Postreplication repair of DNA in ultraviolet irradiated mammalian cells. J Mol Biol, 66 : 319-337, 1972
 - 37) 藤原美定 : 紫外線による DNA 損傷の修復, 光と皮膚, 小堀辰治, 安田利顕監修, pp. 179-192, 金原出版, 東京, 1973
 - 38) Thompson, L. H. and Humphrey, R. M. : Proliferation kinetics of mouse L-P59 cells irradiated with ultraviolet light : A timelapse photographic study. Radiat Res, 41 : 183-201, 1970
 - 39) Rauth, A. M. and Whitmore, G. F. : The survival of synchronized L cells after ultraviolet irradiation. Radiat Res, 28 : 84-95, 1966
 - 40) Sinclair, W. K. and Morton, R. A. : X-ray and ultraviolet sensitivity of synchronized chinese hamster cells at various stages of cell cycle. Biophys J, 5 : 1-25, 1965

- 41) Clarkson, J. M. : The induction of thymine dimers by ultraviolet light as a function of cell stage. *Int J Radiat Biol*, 34 : 583-586, 1978
- 42) Riddle, J. C. and Hsie, A. W. : An effect of cell-cycle position on ultraviolet-light-induced mutagenesis in chinese hamster ovary cells. *Mutat Res*, 52 : 409-420, 1978
- 43) Lieberman, I. and Ove, P. : Enzyme activity levels in mammalian cell culture. *J Biol Chem*, 233 : 634-636, 1958
- 44) Lavappa, K. S., Macy, M. L. and Shannon, J. E. : Examination of ATCC stocks for HeLa marker chromosomes in human cell lines. *Nature*, 259 : 211-213, 1976

(55. 7. 25 受稿)