

五倍性の核型をもつ HeLa 細胞株について*

昭和41年12月7日 受付

信州大学医学部細菌学教室

田波 洋 山田 喜紹 田崎 忠勝

信州大学医学部学生

村上 昇

On a penta-ploid strain of HeLa cell line.

Yoh Tanami, Yoshitsugu Yamada, Tadakatu Tazaki,
Department of Bacteriology, Faculty of Medicine,
Shinshu University.

Noboru Murakami

Student of the Faculty of Medicine, Shinshu University

ヒトや動物細胞を長期間培養しつづけると、二倍性の細胞は数ヶ月後に消滅してしまい、長期間培養可能な cell line (細胞系) が得られた場合、それらの核型は三倍性ないし四倍性の heteroploid に変わつて了つているのがふつうである^①。

1951年 Gey^{②③}らによつて子宮頸部癌組織より確立された HeLa 細胞系^(註)の核型も、やはり三倍性から四倍性の間に分布しており、僅かずつだが、染色体数は年とともに減少してゆく傾向にあることが知られている (図1)。

ところが、私どもがここ数年来維持して来た HeLa 細胞 (以下 HeLa-TY 系と呼ぶ) の核型をしらべたところ、従来報告のない高五倍性であることがわかつたので、ここに報告したい。

材料と方法

HeLa TY 系の由来 1960年、国立予研の竹森博士から岐阜衛研に分与された uncloned HeLa を、名古屋大学医学部細菌学教室を経由して、1962年7月私どもが分与をうけ現在まで植えついでいる。

比較のため、同系統の uncloned HeLa として予研 (堀江博士) 及び伝研 (故小田博士) で夫々維持されている2系 (夫々 HeLa 堀江系, HeLa 小田系と呼ぶ)、と東北大学医学部細菌学教室で維持されてい

【脚注】 1951年2月8日、Gey は黒人婦人の子宮頸部癌 (epidermoid carcinoma) の生検材料の一部をローラーチューブ法で培養しはじめ、遂に長期間培養株を確立した。HeLa 細胞系は現存するヒト由来の確立細胞系としては最も歴史が古く、初期のポリオ・ウイルス増殖実験でよく用いられた^④。

る HeLa S3 (東北) についても核型分析を行った。

培養液 Hanks の BSS を基礎とした Eagle 培養液に LAH (0.25%), 仔牛血清 (10%), ペニシリン G (100units/ml), ジヒドロストレプトマイシン (100 µg/ml) を加えたものを用いた。細胞は 60ml 培養角瓶で、37°C で単層培養し、植えつぎの際は EDTA (0.002%) 液で軽く処理後、注射器で細胞をガラス壁から吹き落して新しい瓶にうえるという方法を用いた。

染色体標本のつくり方^④ 新しい細胞培養に24時間後コルヒチン (2 µg/ml) を加え5~16時間培養する。EDTA 処理で細胞を壁から剝し、軽く遠心沈殿 (500 rpm 3分間) して細胞を沈め、1.12% クエン酸水溶液に再浮遊させて10~15分間、室温で低浸透圧処理をする。再び軽く遠沈して細胞を集め、上清を捨てて、沈渣をカルノー液 (氷醋酸1部, メタノール3部) に浮べて固定する。室温で10分間処理したのも再び遠沈して細胞を集め上清をすてて、少量のカルノー液 (出発時の約 1/10 量) に浮べて濃い細胞浮遊液をつくる。

この細胞浮遊液を、予じめ0°C の蒸留水に浸しておいた、清浄なセガラス (HCl アルコールでよく磨いておく) 上に滴下し、ヘアドライヤーの風を斜めからあてて乾かす。染色体の染色にはゲンチアナ紫醋酸溶液 (45%) またはダーリア液 (1%) を用いた。

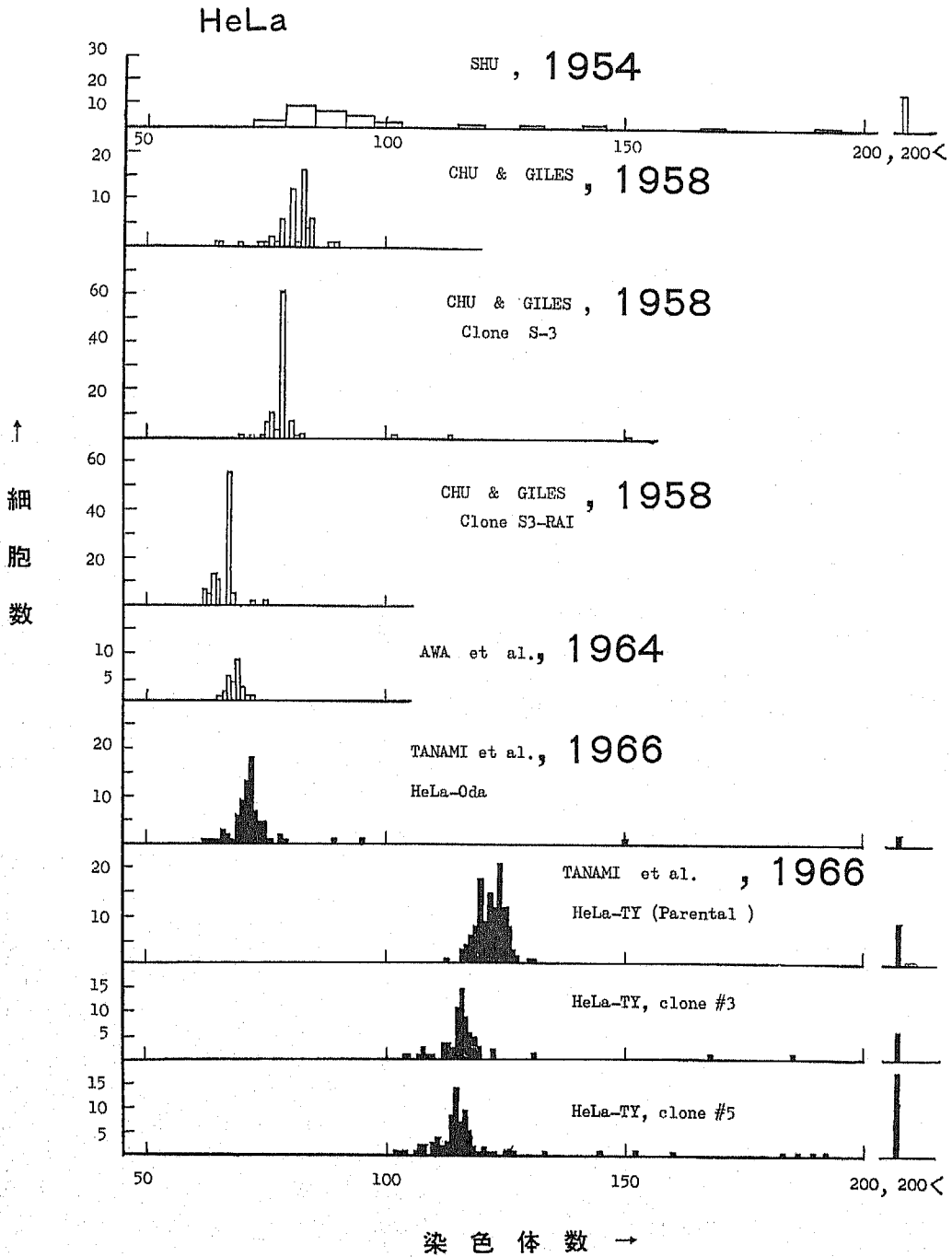
核型分析 はすべて顕微鏡写真像に基づいて行つた。HeLa-TY細胞の位相差顕微鏡写真を図2に示す。

実験成績

細胞あたりの染色体数の分布 HeLa-TY 細胞 (親

*本研究の要旨は、昭和41年5月、日本組織培養学会第21回研究会 (福岡) で発表した。

図 1 HeLa cell lines の 染色体数 の 分布



株)とそれから得られた2株のクローン (No.3 および No.5) の染色体数の分布を、図1に黒いヒストグラムで示した。比較のために、同系統の HeLa 堀江

株と HeLa 小田株の成績、および先人の成績のうち主要なものを (これらは白色のヒストグラムで) 示した。

図 2 HeLa-TY (クローン# 5) 細胞の位相差顕微鏡写真。中央に巨大な細胞が見られる。



ここにみられるように、1954年の Hsu & Moorhead^⑥の成績では uncloned HeLa の染色体数は80~90の間にモードがある低四倍性だったが、1958年 Chu & Giles^⑦の報告ではモードは82に移っている。更に同年 Chu & Giles^⑦が分離したいくつかの亜株 (S1, S3, および S3の亜株) についての成績では染色体数のモードは73~78の範囲にちらばっている (株によつて異なる)。

最近の報告 (阿波他, ^⑧1964) では HeLa S3株は正三倍性 (染色体数のモードは69) に落付いている。私どもがしらべた成績では東北大の HeLa S3株の染色体数のモードは68で、2本の dicentric な染色体を含んでいる。染色体数が北大株 (69本) より1本少ないのはそのためではないかと考えられる。

これらに対し、HeLa-TY系 (親株) では細胞の大部分 (99%) は染色体数が100~130の間に分布 (モードは124) する約五倍性である点は明らかに異つている。HeLa-TY 親株より分離した2株のクローン (No. 3 と No. 5) の染色体数は115をモードとする正五倍性で、染色体数のばらつきも親株よりはるかに狭い (図1)。

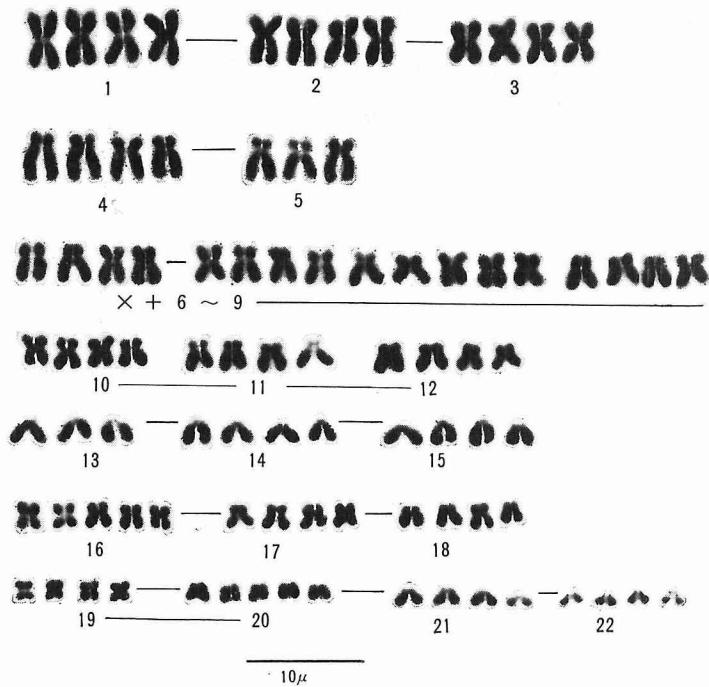
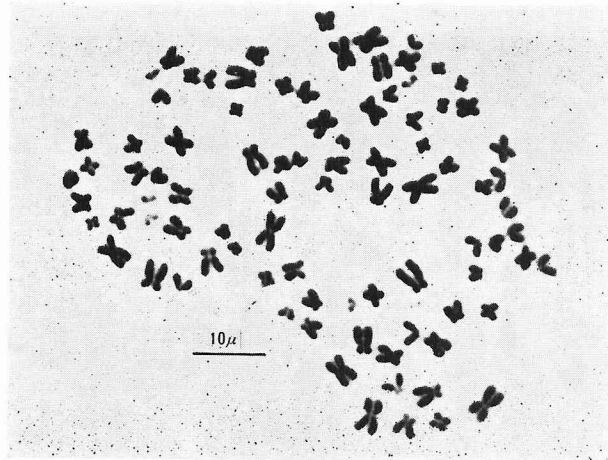
長期培養細胞系では、一般に、染色体数もそれらの形態もはげしく変化しているので idiogram の分析を行うことはあまり意味がないこととされているが、

参考までに試みたいいくつかの成績を図3~5に示そう。これらは夫々低四倍性 (小田株), 高五倍性および高十倍性 (後二者は HeLa-TY 親株) の染色体標本だが、興味深いことには、正常ヒト (♀) 細胞の核型を構成している23組の染色体要素が (近似的にはあるが) 夫々約4個, 約5個, および約10個ずつ揃つている事が見出された。(ただし互いに区別の困難な X, 6~12群の染色体群については、はつきりしたことはいえない)。同様の傾向については、実は正三倍性の HeLa S3 (北大株) について阿波ら^⑧ (1964) が既に指摘している。このようにヒトの培養細胞が長期間に亘る継代中、染色体数にはげしい変化をおこしているにも拘らず (しかも HeLa は悪性腫瘍由来であるにも拘らず) 各染色体要素の組合せは、正常の核型と同様のパターンを維持していることは大変興味深い。

なお HeLa-TY 亜株では1~5%の率で染色体数が250前後の約十倍性細胞が、更に低い頻度 (0.1%位) ではあるが二十倍性に近い hyperpolyploid の細胞も見出されている。それらの染色体像を図6~9に示した。

HeLa-TY と同系統の uncloned HeLa 堀江および小田株の染色体数はモード72の附近に分布し、高三倍性であることが認められた (図1)。

図 3 HeLa (小田株) にみられた低四倍性 (89本) の核型



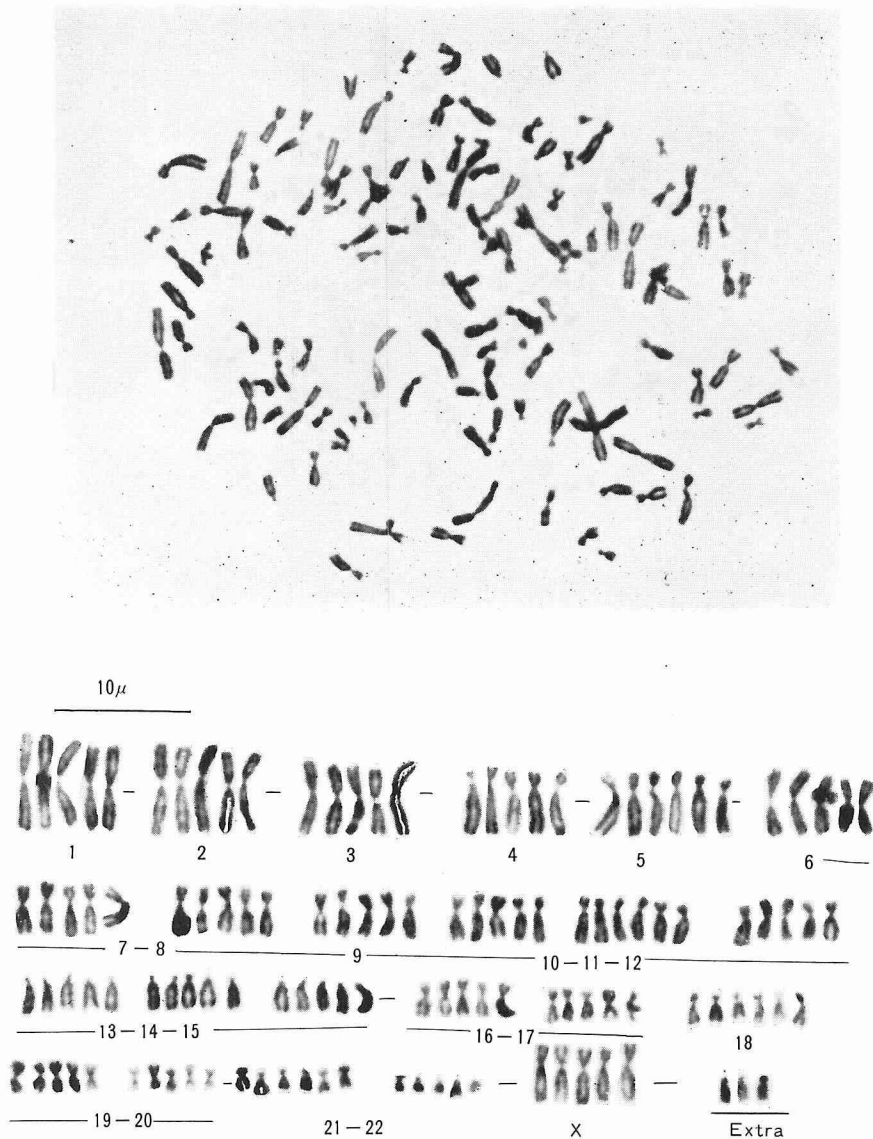
考 え 方

確立された五倍性の動物細胞系としてはネコ肺由来の細胞 (中西⁹, 1960) とヒト正常白血球由来の Detroit 系¹⁰ (B17株, 染色体数のモードは120) が知られているが, HeLa については報告がない。Ruddle¹⁰ら (1958) が上の Detroit-B17 株細胞の起因として考えているように, 私どもの HeLa-TY 系の場合

も高三倍性のふつうの細胞系から (恐らく培養環境の悪化という selective factor によつて) 当時の “stem line 細胞” の2倍——即ち約六倍性の細胞が select されて増殖し, 次第にもとの stem line 細胞とすりかわつたのち, 染色体数が漸減して約五倍性になつたものと推量される。

このような hyperpolyploid の HeLa 細胞の生物学的性質に (三倍性とは異つた) 何らかの変化がおこ

図 4 HeLa-TY (親株) 細胞に見られた約五倍性 (123本) の核型とその Idiogram



つてはないかと、いくつかのウイルスに対する感受性をしらべてみた。定性的な実験では、少くともポリオ・ウイルス (1, 2, 3型), 単純ヘルペス・ウイルスおよびヤギ肺炎 agent (長野株) などについては, HeLa S3 株との間に感受性のちがいは認められなかった。

まとめ

HeLa 細胞系の一亜系, HeLa-TY, の染色体数は 100~130の間に分布する約五倍性であることが見出さ

れた。この HeLa-TY (親株) から分離した 2 株のクローンのいずれも五倍性であることが見出されたので, 上の性質は遺伝的に安定なものであることが窺える。

Idiogram 分析の結果, これらの細胞は, 近似的にはあるが, 正常ヒト (♀) と同様の 23 組の染色体要素群をほぼ均等にもっていることが認められた。

ウイルスに対する感受性は, ポリオ・ウイルス, ヘルペス・ウイルス, ヤギ肺炎 agent などについてしらべた限りでは三倍性の HeLa 細胞と同様であった。

図 5 HeLa-TY (親株) にみられた約10倍性核型とその Idiogram

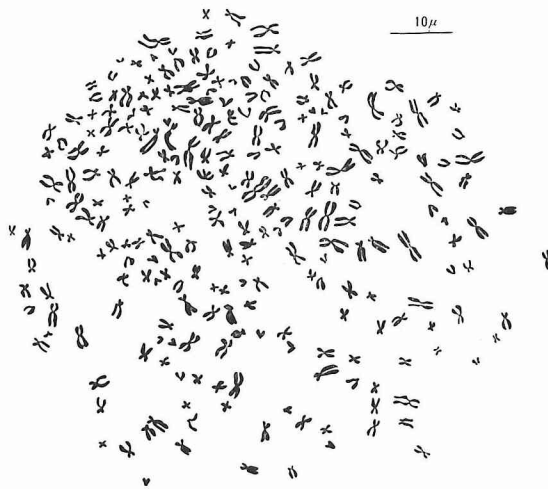


図 6 HeLa-TY (クローン#5) 細胞の大部分 (95%) を占める, 約五倍性の染色体像の一例。2本の dicentric な染色体が見える (矢印)。

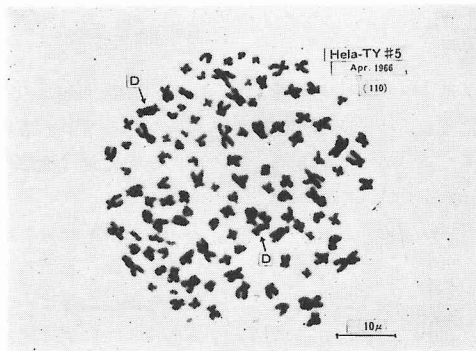


図 7, 8 HeLa-TY (クロン#5) ではこのよう
な約10~12倍性の染色体像が約5%の高頻度
でみられた。4~5本の dicentric な染色体
がみえる (矢印)。

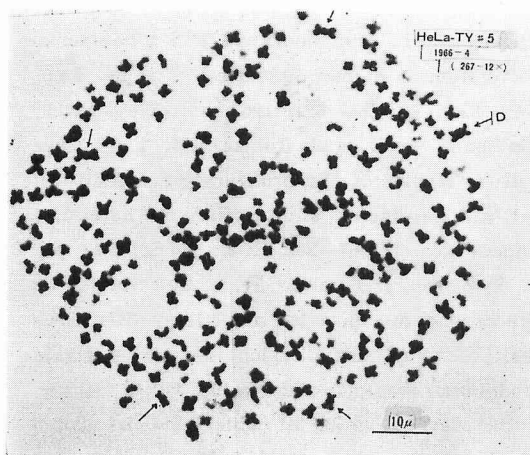


図 8 同上

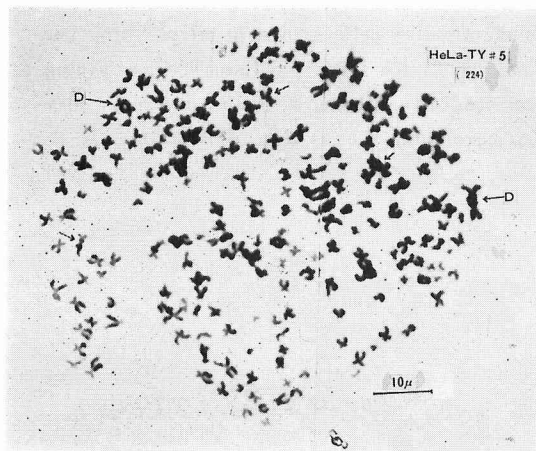
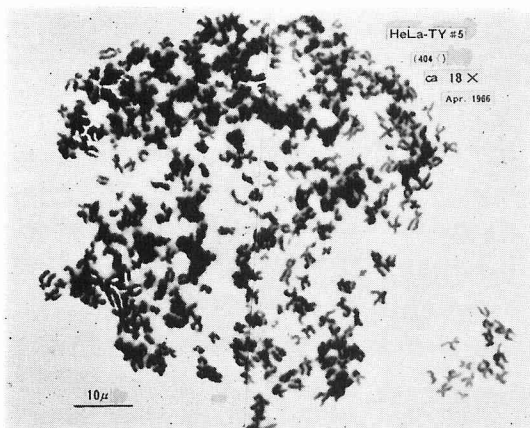


図 9 HeLa-TY (クロン#5) 株にみられた約18
倍性の hyperpolyploid の染色体像。



文 献

- ①Hayflick, L., and Moorhead, P. S. : The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585-621, 1961
- ②Gey, G. O., Coffman, W. D., and Kubicek, M. T. : Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**, 264-265, 1952
- ③Scherer, W. F., Syverton, J. T., and Gey, G. O. : Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* **97**, 695-710, 1953
- ④Rothfels, K. H., and Siminovitch, L. : An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown *in vitro*. *Stain Technol.* **33**, 73-75 1958
- ⑤Hsu, T. C. : Cytological studies on HeLa, a strain of human cervical carcinoma. *Texas Rep. Biol. & Med.* **12**, 833-846, 1954
- ⑥Hsu, T. C., and Moorhead, P. S. : Mammalian chromosomes *in vitro*. VIII. Heteroploidy in human cell strains. *J. Nat. Cancer Inst.* **18**, 463-471, 1957
- ⑦Chu, E. H. Y., and Giles, N. H. : Comparative chromosomal studies on mammalian cells in culture. I. The HeLa strain and its mutant clonal derivatives. *J. Nat. Cancer Inst.* **20**, 383-401, 1958
- ⑧Awa, A., Makino, S., and Miyamoto, N. : Notes on comparative chromosome analyses in human cell lines in tissue culture. A preliminary note. *Proc. J. Acad.* **40**, 422-426, 1964
- ⑨Nakanishi Y. H. : The development of a kitten lung cell strain and its chromosomes. *Z. für Zellforsch.* **51**, 138-151, 1960
- ⑩Ruddle, F. H., Berman, L., and Stulberg, C. S. : Chromosome analysis of five long-term cell culture populations derived from nonleukemic human peripheral blood (Detroit strains). *Cancer Res.* **18**, 1048-1059, 1958