

# 사람의 培養細胞染色體의 放射線感受성에 關한 研究

姜 永 善·金 英 眞·李 正 吉

(서울大·文理大·動物學科)

## Studies on the Radiosensitivity of the Chromosomes in Cultured Human Cells

Yung Sun KANG, Yung Jin KIM and Chung Keel LEE

(Dept. of Zoology, Seoul National University)

(1967. 1. 14. 接受)

### SUMMARY

The present experiment was performed to investigate the frequencies of chromosome aberration with special regard to the chromosome groups and the various time intervals after X-irradiation (60r) in normal human foetus cells grown in culture. The cytological preparations were prepared at every 5 through 30 hours after X-irradiation by the air-drying method.

1. The frequencies of chromosome aberration are on the whole decreased as time elapses after irradiation and this is thought to be due to gradual recovery with time. However, a slight increase in frequencies is observed at 25 and 30 hours after irradiation respectively. This shows that the cells at these periods are more sensitive to X-irradiation, and those cells are thought to be at G<sub>2</sub> and late S stages at the time of irradiation respectively, so it is evident that G<sub>2</sub> and late S stages are more sensitive to X-irradiation than any other stages.

2. The frequencies of chromosome aberration are decreased in descending order of chromosome group number. The differences among these frequencies are highly significant statistically. Therefore it can be concluded that there is a highly significant difference in radiosensitivity among chromosome groups. That is, the chromosomes of the group A are the most radiosensitive, followed by B, C, D, E and G in descending order.

### 緒 論

放射線은 오래前부터 遺傳的인 變化的인 誘發要因으로 알려져 왔다. 이것은 특히 放射線을 照射받은 個體에 있어서 染色體異常이라든가 또는 遺傳子 突然變異를 일으키게하여 形質遺傳에 영향을 끼치므로 해서 많은 學者들의 關心을 모아 왔던 것이다.

일찍이 Ford 및 Mole(1959), 그리고 Puck(1958) 등은 특히 組織培養法을 사용하여 放射線에 의한 染色體異常頻度를 形態的인 面에서 觀察하였으며, 그 후에도 많은 學者들에 의해서 이 方面의 研究가 계속 推進되어 왔다. (Bender and Gooch, 1963; Gooch *et al.*, 1964; Court Brown *et al.*, 1965; Milliard, 1965; Doida *et al.*, 1965).

Bender(1957), Chu *et al.*(1961) 및 Brewen(1965) 등은 사람의 培養細胞에 放射線을 照射한 후 여러 時間 間격에 따른 染色體의 放射線 感受性에 대하여 調査한 바 있다. 그러나 이들은 時間 間격을 너무나 길게 잡음으로 해서 generation time 내에서의 보다 자세한 變化樣相을 살필 수 없었다. 더구나 각 染色體群에 따른 放射線 感受性에 관하여는 先人의 業績을 거의 찾아볼 수 없는 상태이다. 筆者들은 위의 두 가지 점에 유의하고 正常人의 體細胞를 培養하여 그 generation time 내에서의 放射線에 대한 感受性의 變化를 좀더 상세히 살피고, 또 한편 이들의 染色體群 사이에 放射線 感受性의 差異가 있는가를 살펴봄으로써 放射線의 사람細胞에 미치는 遺傳的인 效果에

내하여 보다더 명확한 자료를 얻고자 本實驗에着手하였다.

材料 및 方法

實驗材料로는 6個月 韓國人의 人工流産兒 (male)를 사용하여, 그 肺組織의 가장자리 部分을 떼어내어 培養하였다.

X-線 照射는 General Electric Maximar 250-III 型을 利用하여 200 kV, 10 mA 에서 動作시켜 TH<sup>2</sup>Filter (HVL; 1 mm Cu)를 사용한 가운데 60 r 의 線量으로 培養細胞에 照射시켰다.

다음 培養細胞를 6 group 으로 나누어 X-線 照射後 30 時間까지 5 時間마다 각각 acetic-alcohol(acetic acid 1 : absolute alcohol 3)로 固定을 하였으며, 固定 4 時間 전에 colchicine(10<sup>-4</sup> g/ml), 30 分 前에는 低調液(serum 1 : distilled water 4)을 處理하였다. 顯微標本은 Rothfels 및 Siminovich(1958)의 air drying 方法에 의하여 작성하였으며, giemsa(5%)로 染色하였다.

染色體 觀察에 있어서는 Wild의 位相差顯微鏡을 사용하여 全 段階를 통해 中期分裂相이 좋은 것만을 선택하였으며 특히 染色體 異常을 일으킨 中期分裂相은 전부 顯微鏡 寫眞을 통하여 idiogram 을 만든 후 그 異常頻度를 比較分析하였다.

結果 및 論議

X-線 照射 후 30 時間까지의 染色體 異常頻度는 表 1 에 나타나 있는 바와 같으며, 觀察된 染色體 異常의 type 中 dicentric 와 chromatid deletion 을 보면 Fig. 1, 2 와 같다.

Table 1. Aberration frequencies in cells fixed in various postirradiation periods.

Time after exposure (h. hrs)	Dose (r)	No. of cells scored	Total aberrations	Aberrations per cell
5	0	130	2	0.015
	60	86	55	0.639
10	0	108	4	0.037
	60	98	34	0.346
15	0	100	2	0.020
	60	92	26	0.282
20	0	100	1	0.010
	60	90	25	0.277
25	0	98	4	0.040
	60	119	37	0.310
30	0	116	6	0.051
	60	98	33	0.336
Total	0	652	19	0.029
	60	583	210	0.360

위의 表에서 보는 바와 같이 X-線 照射 후 時間이 경과함에 따라 染色體異常의 頻度가 대체로 감소하고 있으나 25 時間과 30 時間에서는 약간의 증가를 보여준다. 時間

의 경과에 따라 染色體異常의 頻度가 감소하는 것은 일찍이 Chu(1961) 등이 지적한 바와 같이 染色體의 回復現象으로 說明할 수 있다. 따라서 放射線에 대한 感受性이 cell cycle 의 어느 時期에서나 같다고 하면 당연히 放射線照射 후 時間이 경과함에 따라 그 染色體異常의 頻度가 감소해야 할 것이다. 그러나 本實驗結果에 의하면 X-線照射後 25 時間과 30 時間에는 오히려 증가되는 경향이 있는데 이것은 이 時期에 나타난 細胞들이 X-線照射時 初해이던 cell cycle 내의 時期가 放射線에 대해 다른 어느 時期보다도 민감함을 나타내주는 것이라고 하겠다. 특히 사람이 있어서의 generation time 은 學者에 따라 약간의 차이는 있으나 대체로 22~25 時間 정도로 생각되고 있으며 G<sub>2</sub> 는 4~6 時間, S 는 7~8 時間, G<sub>1</sub> 은 9~10 時間, 그리고 M 는 1 時間 정도로 구분하고 있다. (Baserga and Kisielecki, 1963; Bullough, 1963; Moorhead et al., 1963; Siskin, 1964).

放射線에 의한 mitotic delay 역시 잘 알려져 있는 사실로서, Chu(1961)등에 의하면 mitotic delay 의 時間은 放射線의 用量에 비례하여 增加한다고 하였고, Bender(1962)는 in vitro 에서 200 r 의 X-線을 照射하였을 때 6 時間 정도의 mitotic delay 가 일어난다고 보고한 바 있다. 本實驗에서는 60 r 의 X-線을 照射하였으므로 위의 경우보다는 mitotic delay 의 時間이 짧을 것으로 생각되며, 더구나 照射後 5 時間에 固定한 標本에서 많은 中期分裂相을 觀察할 수 있었다는 점으로 미루어 보아 最大限 5 時間이 넘지 않으리라고 추측된다. 따라서 照射後 25 時間과 30 時間에 固定한 細胞들은 X-線照射後 각각 G<sub>2</sub> 및 late S 時期에 있었다고 보겠으므로 여기서 우리는 G<sub>2</sub> 와 late S 時期가 放射線에 특히 민감하다고 說明할 수 있다. 이 점은 植物細胞를 材料로 한 Das 및 Alfert(1962)와 Evans 및 Scott(1964)등의 研究結果와 대체로 一致한다. 그러나 최근 이들 cell cycle 의 각 時期별 放射線感受性에는 差異가 없다는 보고가 있음에 비추어 이 점에 관해서는 앞으로 좀더 상세한 研究가 이루어져야 할 것이다.

染色體의 각 group 에 따르는 染色體異常頻度는 表 2 와 같다. 表에서 보는 바와 같이 染色體 group 에 따르는 染色體異常의 頻度를 보면 대체로 染色體 group 의 순서로 차차 감소해가는 경향을 보이고 있다. 여기서 (a) 및 (b) 란의 수치는 각 group 에 속하는 染色體 한 개에 대한 異常頻度를 百分率로 表示한 것이며, (c) 란의 수치는 group A 에 속하는 染色體의 平均길이에 대한 각 group 의 染色體의 相對的 異常頻度を 나타내고 있다.

Wakonig-Vaartaja(1963)는 보다큰 染色體를 가진 種이 작은 染色體를 가진 種보다 放射線에 더 민감하다고 하였는데, 이러한 現象은 보다 크기가 큰 染色體가 작은

Table 2. Frequencies of chromosome aberrations with chromosome groups.

Chromosome groups		A	B	C	D	E	F	G
Control (a)	No. of chromosomes with aberrations	7	3	7	1	1	0	0
	(aberrations per chromosome) x 100	0.178	0.115	0.071	0.025	0.025	0.000	0.000
Treatment (b)	No. of chromosomes with aberrations	72	34	78	16	19	0	1
	(aberrations per chromosome) x 100	2.058	1.457	0.891	0.457	0.257	0.000	0.034
Relative rate of aberrations to group A (c)		1.880	1.738	1.357	1.005	0.639	—	0.166

$X^2=58.62$        $DF=5$        $p<0.01$

것에 비해 放射線에 대하여 보다 큰 target를 제공해주는 것이기 때문이라 생각된다. 따라서 染色體의 길이와 放射線에 의한 영향 사이에는 매우 밀접한 相互關係가 있으리라는 結論을 내릴 수 있다. 그런데 각 group別 染色體의 平均길이는 각각 다른 것이므로 本實驗에서는 group A에 속하는 染色體의 平均길이를 기준으로 하여 각 group의 染色體異常 頻度를 내어 이들을 比較 分析하였으며 染色體 하나 하나의 길이 測定에 관하여는 Human Chromosome Study Group이 제안한 system을 따랐다(Tjio and Puck, 1958; Ford *et al.*, 1953; Levan and Hsu, 1959; Chu and Giles, 1959; Makino, 1964).

이들 각 group別 染色體異常 頻度間의 有意性 여부를 알아내기 위하여 chi-square test法을 사용하였으며, 이때 group F에서는 단 한개의 染色體異常도 觀察할 수 없었으므로 여기서 除外하였다. 그 結果는  $X^2=58.62(p<0.01)$ 로써 高度의 有意性을 나타내어 結局 染色體의 각 group別 放射線感受성에 큰 差異가 있는 것으로 생각된다. 즉 group A의 染色體가 가장 放射線에 민감하며 그 다음은 B, C, D, E, 및 G의 順序가 된다.

筆者들은 여기서 染色體의 폭은 고려하지 않았으므로 만일 이들 폭의 차이를 생각한다면  $X^2$ 值가 분명히 감소



Fig. 1. Metaphase figure with dicentric



Fig. 2. Met. ph so figure with chrom. tid deletion

할 것이다. 그러나 가장 폭이 큰 染色體가 가장 폭이 작은 것에 대하여 最大限度로 2倍가 넘지 못할 것이므로  $X^2$ 值는 여전히 有意하게 되며 染色體의 각 group別 放射線感受성에는 差異가 있다는 結論을 내릴 수 있다.

摘 要

韓國人 人工流産兒의 肺組織을 培養하여 60r의 X-線을 照射한 후 30時間까지 每 5時間마다 固定을 하였으며, air drying 方法에 의하여 顯微標本을 作成한 후 다음과 같이 染色體異常의 頻度를 比較觀察하였다.

1) X-線 照射後 時間이 경과함에 따라 대체로 染色體의 異常頻度는 감소의 경향을 보이고 있는데, 이것은 染色體의 回復現象에 起因한 것으로 생각된다. 그러나 照射 후 25時間과 30時間에는 약간의 增加를 보이고 있는 바 이것은 이 時期에 나타난 細胞들이 X-線 照射後  $G_2$  및 late S 時期에 있었던 것으로 이들 時期가 放射線에 특히 민감함을 보여 주는 것이다.

2) 染色體異常의 頻度는 대체로 染色體 group number의 順序로 감소하고 있는데, 이들 頻度間의 差異는 統計적으로 매우 有意하므로 染色體 group에 따른 放射線感受성에는 큰 差異가 있다고 보겠다. 이때 가장 放射線에 민감한 것은 group A를 이루는 染色體이며, 그 다음은 B, C, D, E, 및 G의 順序가 된다.

## 文 獻

- Baserga, R. and W.E. Kisielski, 1963. Autobiographies of cells. *Sci. Am.* 209:8, 103-108.
- Bender, M.A., 1957. X-ray induced chromosome aberrations in normal diploid human tissue cultures. *Science* 126, 974-975.
- Bender, M.A. and P.C. Gooch, 1962. Types and rate of X-ray induced chromosome aberrations in human blood irradiated *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 48, 522-532.
- Bender, M.A. and P.C. Gooch, 1963. Chromatid-type aberrations induced by X-rays in human leucocyte cultures. *Cytogenetics* 2, 107-116.
- Brewen, J.G., 1965. Cell cycle and radiosensitivity of the chromosomes of human leucocytes. *Int. J. Rad. Biol.* 9, 391-397.
- Bullough, W.S., 1963. Analysis of the life-cycle in mammalian cells. *Nature* 199, 859-862.
- Chu, E.H.Y. and N.H. Giles, 1959. Human chromosome complements in normal somatic cells in culture. *Am. J. Human Genet.* 11, 63-79.
- Chu, E.H.Y., N.H. Giles and K. Passano, 1961. Types and frequencies of human chromosome aberrations induced by X-rays. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47, 830-839.
- Court Brown, W.M., K. Buckton and A.S. McLean, 1965. Quantitative studies of chromosome aberrations in man following acute and chronic exposure to X-rays and gamma rays. *Lancet* 7398, 1239-1241.
- Das, N.K. and M. Alfert, 1962. Sensitivity of interphase cells to chromosome breakage by X-rays. *Nature* 195, 302-304.
- Doida, Y., T. Sugahara and M. Horikawa, 1965. Studies on some radiation induced chromosome aberrations in man. *Rad. Res.* 26, 69-83.
- Evans, H.J. and D. Scott, 1964. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*. *Genetics* 49, 17-38.
- Ford, C.E., P.A. Jacobs and L.Lajtha, 1958. Human somatic chromosome. *Nature* 181, 1565-1568.
- Ford, C.E. and R.H. Mole, 1959. Chromosomes and carcinogenesis: Observation on radiation-induced leukemias. *Prog. Nuclear Energy, Ser. VI*: 2, 11-21.
- Gooch, P.C., M.A. Bender and M.L. Bandolph, 1964. Chromosome aberrations induced in human somatic cells by neutrons. *I.A.E.A. Rep.* 1, 325-342.
- Human Chromosome Study Group, 1960. A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. *J. Hered.* 51, 214-221.
- Kang, Y.S. and Y.J. Kim, 1963. The chromosome studies on cancer cells. Some effects of P<sup>32</sup> and X-ray irradiation on chromosomes of the cultured HeLa cells S<sub>3</sub> strain. *J. Nuc. Sci., Korea* 3, 130-136.
- Levan, A. and T.C. Hsu, 1959. The human idiogram. *Hereditas* 45, 665-674.
- Makino, S., 1964. Chromosomal studies in normal human subjects and in 300 cases of congenital disorders. *Cytologia* 29, 13-31.
- Milliard, R.E., 1965. Abnormalities of human chromosomes following therapeutic irradiation. *Cytogenetics* 4, 277-294.
- Moorhead, P.S. and V. Defendi, 1963. Asynchrony of DNA synthesis in chromosomes of human diploid cells. *J. Cell Biol.* 16: 1, 202-209.
- Puck, T.T., 1958. Action of radiation on mammalian chromosome anomalies by X-irradiation of euploid human cells *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44, 772-780.
- Rothfels, K.H. and L. Siminovitch, 1958. An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown *in vitro*. *Stain Technol.* 33, 73-77.
- Sisken, J.E., 1964. Methods for measuring the length of the mitotic cycle and the timing of DNA synthesis for mammalian cells in culture. *In: Methods in Cell Physiology* 1, 387-401.
- Tjio, J.H. and T.T. Puck, 1958. The somatic chromosomes of man. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44, 1229-1237.
- Wakonig-Vaartaja, R., 1963. Correlation of chromosome size and radiosensitivity. *Nature* 198, 1105-1106.