The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	7系の大黒鼠腹水腫瘍細胞の放射線反応
Author(s)	粟冠, 正利; 松沢, 大樹; 佐々木, 俊作
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1967, 27(8), p. 1049-1055
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/14838
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

7系の大黒鼠腹水腫瘍細胞の放射線反応

東北大学医学部放射線基礎医学教室
粟冠正利，松沢大樹，佐々木俊作

（昭和42年2月22日受付）

Dose Response Relations in 7 Lines of Ascites Tumour Cells in Rats

By

M. Sakka, T. Matsuzawa and S. Sasaki
Tohoku University School of Medicine, Japan.

Abstract

Cells of 7 lines of ascites tumours were irradiated aerobically in vitro. Cells were counted after 96 hours of intraperitoneal growth in Donryu rats and mean lethal dose and extrapolation number was calculated. Relative radiosensitivity was compared with known biological characters and the shape of dose response curve was discussed.

目　的

哺乳動物細胞の放射線感受性（以下之を放感性と略す）を比較する手段として使われている Do（生存率曲線指数的減少部平均線量）と n（いわゆる外挿数）を人癌治療効果解析に利用する為には生体外照射の生体外増殖系から出発し生体外照射の生体内増殖又は生体内照射の生体外増殖の段階を経て生体内照射の生体内増殖系に進むのが正しい．我々は癌細胞を生体外で正確に照射して生体内で能率良く増殖させて Do と n を決め放感性が既知の生物学的性質とどう関係しているかを知り併せて照射癌細胞の生態の一部を研究するためこの実験を行なつた．

材　料

我国では大黒鼠の腹水腫瘍が沢山造られているが其中には腹腔内で島又は固形腫瘍を造つて細胞計数上都合の悪いものがある．腹腔内で長時間自由細胞状態を保つものとしてＡＨ—13，ＡＨ—13Ｒ，ＡＨ— 130，ＡＨ—7974Ｆ，ＡＨ—66Ｆを選び他に吉田肉腫（ＹＳ），同 Giant Ⅴ型（ＧＶ），を追加した．何れも由来は東北大学抗酸菌病研究所佐藤春郎教授研究室である．大黒鼠は日本ラットＫＫ（浦和市）から求めた「どんりゆう」名称雌80— 110ｇのものにオリエンタル固形餌料ＭＦと水とを自由に与え気温25℃で１房３～５匹宛飼つた．

方　法

新しい鼠の腹腔内に細胞移植後４日目にエーテルで殺し直ちに氷冷 Hanks 液（１リツトル当りペニシリン10万単位とストレプトマイシン50㎎を加えた）を腹腔内に ５～10cm³ 注入し内容を採取し試験管に入れこれを氷冷水槽に浸しガンマ線照射（ＴＳＤ＝35㎝，シーメース，ユニヴアーサル線量計にガンマ線用チエムバ装着して計量し130R/分）した．照射の１分前から終了後30秒の間は通気ポンプ（熱帯魚飼育用）で試験管内に空気を送り低酸素による放感性低下を予防した．照射後，浮游液中１cm³ 当り約10^7細胞があるように Hanks 液を加え細胞数を調節し，～10^7細胞を新らしい鼠の腹腔内に移植し96時間増殖後，鼠を

殺し直ちに氷冷 Hanks 液（1リットル当りヘパリン40mgを加う）20cm³ で腹腔を洗いこの浮游液を白血球血算と同方法で計数した．細胞数が多い時は1匹当り5～6回，少ない時は10回計数しその平均値をとりこれを照射量ごとに半対数方眼紙に描きその幾何平均をもつて線量—効果反応とした．照射量ゼロを除いた各照射量の細胞数の幾何平均を通る直線を最小2乗法を用いて計算した．直線から予想した理論値と観察値の適合は細胞数の対数を用いてカイ2乗法で検定し$Pr\{\chi^2>\chi_0^2\}>0.99$準位を有意とした．この直線の傾きから Do を，また線量ゼロにおけるこの直線の縦軸との切片からnを推定した．別に塗抹標本（ギムーザ染色）の顕微鏡写真で細胞直径を測定した．細胞が腹腔内に游浮している時は球形でその半径をrとすれば表面積は$4\pi r^2$である．細胞を塗抹すると内容は乾固し2枚の円板になりその合計面積は球の表面積に等しいと仮定すると写真で実測した細胞半径をRとすれば$\pi R^2=2\pi r^2$の関係がありこれからもとの細胞容積を推定した．

成　績

I. 線量効果曲線　代表例としてAH—13を挙げる．照射の有無に拘らず1匹当り$(1.65\pm0.59)\times10^7$コ移植後96時間に無照射の時には大体7×10^8附近に集まつた．細胞数の対数（log S）照射量レントゲン（D）の間には 300— 900レントゲンの範囲で log S＝9.18—0.30Dの直線があてはまりD＝ 145レントゲン，n＝ 1.9を得た．図1の白点はこのようにして求めたAH—13の反応，また黒点はAH—13Rを示したものである．AH—13RはAH—13に比してナイトロミン抵抗性と言われているいるものである．図2にはHA—130とAH—7974Fの線量—効果曲線を示してある．この4系は 300から 500レントゲン以上では線量効果関係が指数的に反応することは検定の結果明らかになつた（表1）．

相対放感性（Do の逆数の比）で示すならばGV（Do＝ 115レントゲン）を1.00としてAH—13は0.79，AH—13Rは0.43，AH— 130は0.43，AH—7974Fは0.57となつた．AH—66Fの線量

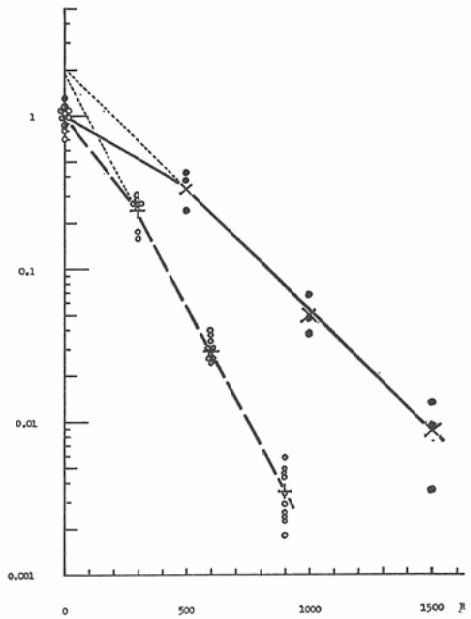

図1　AH-13（白点）と AH-13R （黒点）の線量反応曲線　縦軸は生存分率，横軸は照射量

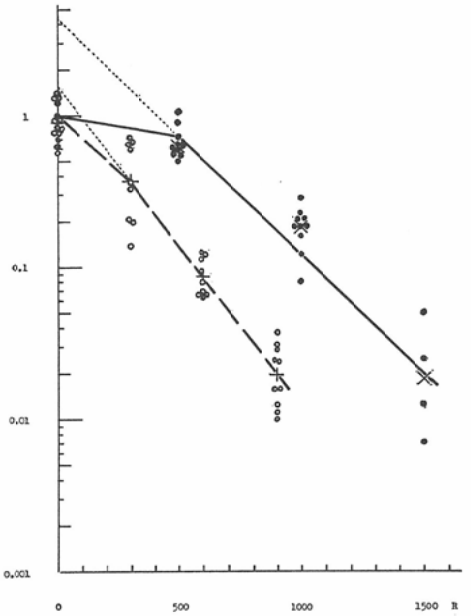

図2　AH-7974F （白点） と AH-130 （黒点）の線量反応曲線

効果曲線は図3のように0—1200レントゲンの間で指数的減少部を認めることができないので Do とnの指標は使えない．AH—66Fを除いた4系

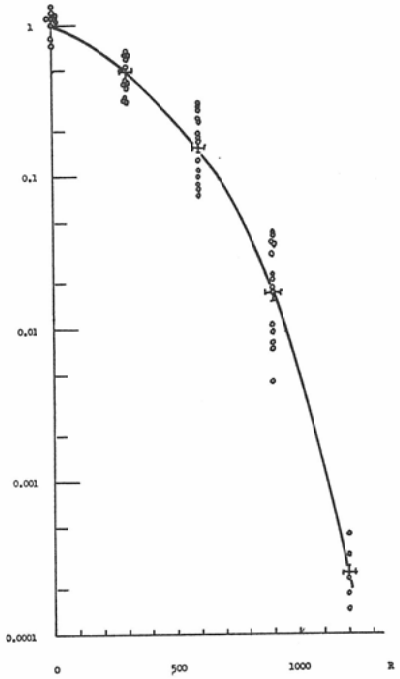

図3　AH-66F の線量反応曲線

表1　4系の腹水肝癌の線量効果関係
Dose Response Relations of 4 Ascites Hepatomas

腫瘍系統 Tumours	Do (Röntgen)	n	χ^2	自由度 D.F.
AH-13	145	1.9	0.0000	2
AH-13R	270	2.0	0.0000	2
AH-130	270	4.4	0.0404	2
AH-7974F	200	1.6	0.0000	2

の腹水肝癌とＹＳおよびＧＶの生物学的性質を相対放感性と並べて表２にかかげた結果，相対放感性の増加に伴なつて単調増加する性質は細胞容積である．其他の性質，即ち有系分裂係数，^{3}H-TdR標識係数，世代時間は相対放感性の増減に伴なう比例的変化がない．

II.　照射細胞の巨大化

照射細胞が巨大化する事は昔から知られている．移植後96時間のＡＨ—13とＡＨ—13Ｒ細胞容積分布は照射によつて平均容積が大きくなるだけでなく分散も大きくなる．ＡＨ—13Ｒの容積増加は照射量に正比例するようであるが線量範囲が狭いのでこれを断言することはできない（ＡＨ—13を見よ）．即ち，

腫瘍系統		対　照	500R	1000R
AH—13	直径	17.0 (±13.7%)	17.8 (±19.7%)	22.2 (±18.9%)
	容積	290 μ^3	333 μ^3	647 μ^3
	倍率	1.00	1.15	2.23
AH—13R	直径	18.2 (±11.3%)	23.2 (±11.6%)	25.9 (±15.6%)
	容積	355 μ^3	737 μ^3	1011 μ^3
	倍率	1.00	2.07	2.85

但し直径は写真測定の値で括弧内は分散不偏推定量の平方根を平均値の百分率で表わした．ＡＨ—13についいてもつと詳しく分析してみる．細胞200個について横軸に容積を，縦軸に細胞数累積和百分率をとると無照射対照の値は一直線上に乗る．つまり細胞数は容積の対数について正規分布している（図４）.照射すると線量が小さいと平均値と分散は同時に大きくなる．線量がますと，例えば 900レントゲンでは細胞の大きさは平均値と分散の単純増加ではなく少なく共２つの集団の集合を示す．即ち，

処　理		平均容積 (10の乗数)	標準偏差* (10の乗数)	集団中の分　率
対　照		2.39 (≒ 245 μ^3)	0.28	1.0
900R	I	2.51	0.28	～ 0.7
	II	2.74	0.56	～ 0.3

＊正しくは分散不偏推定量の平方根

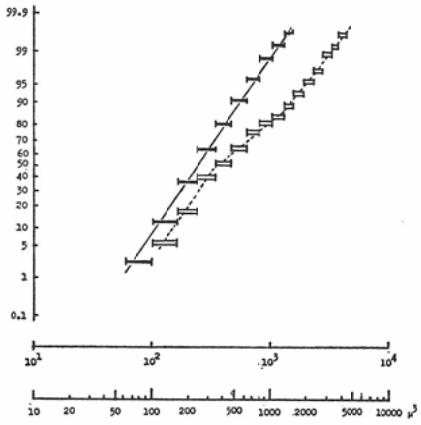

図４　AH-13 細胞の容積の分布．黒棒は無照射，白棒は 900R 照射後96時間の値．縦軸は累積百分率，横軸は容積の対数

表2　6系の腹水腫瘍細胞の相対感受性と生物学的性質の比較
Relative Sensitivity and Biological Characters of 6 Lines of Rat Ascites Tumours

腫瘍系 Tumours	相対感受性* Relative Sensitivity	分裂係数§ Mitotic Index %	標識係数§ Labeling Index %	世代時間 Generation Time (Hr)	染色体数モード Modal No. Chromosone	細胞容積† Volume of A Cell
AH-13	0.79	2.2— 4.5	51.0—56.5	22.0		290 μ^3 (±13.7%)
AH-13R	0.43	1.4— 3.5	59.0—65.5	19.3		355 μ^3 (±11.3%)
AH-130	0.43	3.0— 4.6	58.0—70.3	14.8	48	162 μ^3 (±16.0%)
AH-7974F	0.57					
吉田肉腫 Yoshida Sarcoma	0.79—0.89	2.2— 3.6	64.5—76.7	15.2	40	333 μ^3 (±10.2%)
GV	1.00	1.6— 3.1	37.8—45.5	24.4	80	1320 μ^3 (± 9.9%)

（説明）　*　Do の逆数の比，Ratio of Reciprocals of Do
§　n=1000～2000, α=0.99の上限と下限を示す．
Upper and Lower Limits for←—n=1000～2000 and α=0.99
†　無照射細胞の平均値．括弧内は平均値に対する標準偏差百分率．
Mean of Unirradiated Cells. Numbers in Bracket Indicate Standard Deviation in Percent of a Mean.

300と 600レントゲンでは平均値と標準偏差は0と 900レントゲンの間に落ちる．平均容積は線量に依存して単調増加に近い．

III　照射細胞の増殖曲線

照射96時間後に腹腔内に存在する細胞が総て同じ生活力を持つているとは限らない．その中には（イ）無照射対照細胞と同じ完全な増殖能力を持つもの，（ロ）照射によつて増殖力を損ぜられたもの，例えば細胞周期が遅れているが将来完全な増殖力を持つようになるもの，（ハ）照射によつて増殖力を損ぜられたもの，例えば細胞周期が遅れ将来増殖能力を失い集団から排除される運命にあるもの，（ニ）存在はしているが最早増殖力を持たず直ちに集団から失なわれるものなどが混じつている．照射後短時間には細胞数が少ないのでこれら細胞を計数法によつて区別することは難かしいが，指数的増殖がおこれば上の（ハ）と（ニ）は集団から除かれたと見てよかろう．この時には増殖曲線の内挿又は外挿値から照射後任意時間におこる理論的生存曲線，即ち指数的増殖部分の値で描いた生存率曲線を求めることができる．本実験では体重81±7 gの鼡を用い照射量ゼロと 500レントゲンでは（0.83±0.10）×10^7個のAH—13R細胞移植後 130時間までほぼ1日1回採取した．1,000と 1,500レントゲンでは0.78×10^7個移植後96時間から 258時間までほぼ1日1回採取した．測定の結果を図5に示してある．縦軸は細胞数，横軸は移植後時間である．照射から移植までは20分以内である．増殖曲線は左から照射量ゼロ，500，1,000および 1,500レントゲンの値を示している．実線は測定平均値について最少2乗法で求めた回帰線（半対数で直線）の適用範囲，点線はその外挿を表わす．これらの増殖曲線を分析するために次のような定義を設ける．定義1，指数的増殖期間，半対数座標上で直線があてはまる期間をゆう．適合は χ^2 法で検定し有意水準を Pr $\{\chi^2>\chi_0^2\}>0.99$をとる．定義2．2倍化時性，指数的増殖期間において細胞数が平均2倍にふえるに要する時間．定義3．停待時間，はじめの移植細胞数を通る水平線と指数的増殖曲線又はその外挿との交点に相当する時間．

照射量 (R)	指数的増殖時間	2倍化時間	停待時間
0	20— 80	14.0	6
500	20— 100	17.0	18
1000	96— 196	19.0	86
1500	124— 258	17.0	155

停待時間は照射量と共に長くなり，2倍化時間は 500— 15,00レントゲン区間ではどれも対照の

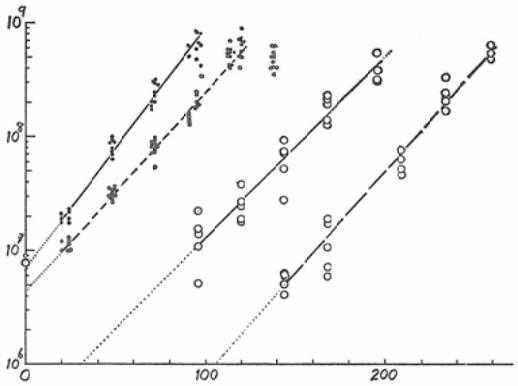

図5　AH-13R 細胞の腹腔内増殖曲線．移植後時間に対して細胞数を対数で示した．曲線は左から無照射対照，500R，1000R，および1500R照射の値である．

14.0時間より長くなつた．2倍化時間の長さは照射量とは関係がない．我々の用いた鼡81±7gの腹腔容積ではどの照射を行なつた場合でも全腹腔内細胞が～7×10^8個に至ると増殖は停止し飽和した．勿論鼡が大きれば飽和値はもっと大きくなるはずである．今，「生存率曲線」を「照射量に対し指数的増殖能力を持つている細胞の分率をめもつた曲線」と定義し，また照射に生き残つた細胞は移植直後から指数的増殖を続け腹腔内で細胞数が飽和すれば直ちに増殖を停止すると仮定するならば移植後任意時間の増殖曲線又はその外挿値から其時間の「生存率曲線」を描くことができる．移植直後，48時間および96時間後の「生存率曲線」を図6を示した．生存分率を測定する時間によつて曲線の傾き，肩の長さ，曲線の形も変わる．96時間の「生存率曲線」から推定したDoは230，nは4.6であるが96時間後の全存在細胞から求求めたDoは270でnは2.0である．併し0と48時間の「生存率曲線」は0から1,500Rにわたつて上に向つて凸の形をとるので放射線反応に共通な一般的母数としてDoとnには大きな意義はないだろうしまた「生存率曲線」が測定時間ごとにDoとnを変えるならば一体その生物学的意味をどう把えたら良かろうか．これは中々難問題である．

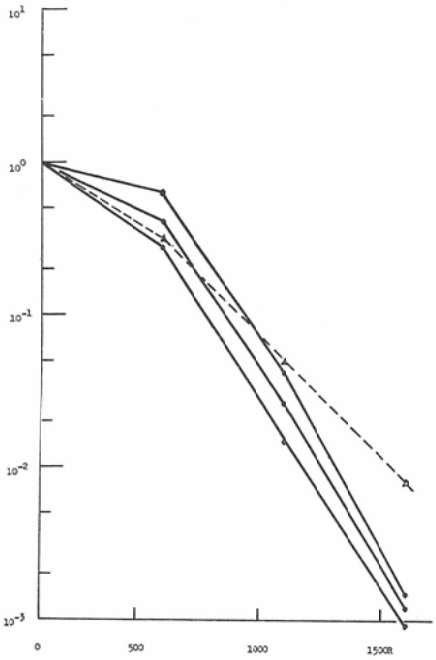

図6　AH-13R 細胞の線量反応曲線（破線）と増細胞生存曲線（実線）．左から移植後96，48および0時間の値を示す．

考　察

1．大黒鼡腹水腫瘍の感受性．吉田教授[1]によるとAH—130とAH—7974は移植後13日で半数の鼡を殺す．移植4日後の鼡にナイトロミンを与えるとAH—130では約80%の鼡が治癒するがAH—7974では治癒せず，半数はほぼ2週間で癌死した．この結果担癌鼡の余命延長で比較するとAH—7974FはAH—130よりナイトロミン抵抗性であると言われている．五十子[2]は20系の腹水肝癌のX線感受性を生体外照射細胞1×10^7個を腹腔内移植後60日の鼡の生存率で比較しAH—7974はもつとも抵抗性であると述べた．我々が照射後96時間の細胞数で比較するとAH—7974FのDoはAH—130の値より小さいので前者の放射線感受性は高いといえる．併し我々の用いたAH—7974Fが放感性の点でAH—7974と同じかどうかは未だ検査してないので我々の結果からAH—130とAH—7974Fの感受性の比較を行なうことは避けたい．たゞ我々の見解は細胞自身の放感性を比較する場合はDoを用いる方が良いという立場に立つている．何となれば担癌鼡余命は移植細

胞数，そのうち再生力を持つものの数，細胞の増殖速度，鼠を殺すに必要な細胞数，転移，悪液質など死命を制する全身的要素の組合せで決まり細胞自身の放感性だけでこのような全身的現象を説明するのは適当ではないと思うからである．

2．哺乳動物細胞の線量反応曲線．現在広く用いられている方法には（a）生体外培養コロニー計数に基ずく Puck と Marcus[3] 法がある．彼等の原報告では0—700ラド，生存率10^0—10^{-3}の範囲で Do をきめている．其後これに倣つた多くの報告では生存率は10^0—10^{-4}範囲に止まる．しかもこの方法の欠点は個々コロニーの大きさや任意のコロニーを造る細胞生態を考えなくても曲線が描ける点にある．（b）生体外培養で増殖曲線の測定を行ない増殖抑制とコロニー形成抑制力，照射細胞の大きさ，コロニーの大きさなどを同時に吟味すると測定時間が異なるに従つて線量反応曲線の形が異なることが Dewey ら[4]，Sinclair[5]，Nias ら[6]によつて指摘された．この方法でも生存率は10^0—10^{-4}範囲であるが曲線の形に注目したのは一進歩である．(c) 生体内測定法にはHewitt と Wilson[7]，Berry と Andrews[8] らの TD_{50} 法がある．Hewittらの例では0～2,400ラド，生存率10^0—10^{-5}範囲で Do がきまるので生存率は生体外コロニー法に比し1桁広くなつたが観察期間に数十日を要し動物を多く使う点が不利である．（d）脾コロニー計数法は判定時間は1週間程度だが使える細胞は骨髄系に限られ観察能率（投与細胞に対する観察可能細胞の分率）が極めて悪い．菅原，田中[9]は400—700Rでコロニーは20—2（生存率10^0—10^{-1}），田中ら[10]は0—400ラドで生存率10^0—5×10^{-2}を報告している．（e）其他いろいろの線量反応曲線が工夫されている．加納[11]は0—1,000レントゲン，生存率10^0—5×10^{-2}範囲でDoをきめている．我々の方法が上に挙げたものと多少異なる点は（イ）計数できる細胞は7×10^8に至るので相対標準偏差が小さくなる．（ロ）照射，移植後96時間で効果判定ができる．（ニ）移植細胞の90％以上が観察可能細胞になる．（ホ）無照射の場合，停待時間を終われば平均2倍化時間は世代時間にほぼ等しい．（ヘ）増殖と生存力を同時に観察できる．一方この方法の不利な点は〔ト〕計数細胞が生活細胞かどうかを判別するには他の手段を用いる必要がある．（チ）腹腔内で計数できた範囲は80g鼠で0.7×10^7—7×10^8，生存率5×10^{-3}であるから特別な工夫を凝らさない限り広い線量範囲をカバーした線量反応細胞が描けない．（リ）1個宛遊離していない細胞は計数が困難で不正確にあるなどの点を挙げるべきだろう．

3．増殖曲線．生存曲線は増殖能力を持つ細胞の生存確率を線量に対してとつたものであるからその細胞はすべて対照と同じに指数的増殖の時間相で計数する必要がある．生体内で指数的増殖がなりたつ時間は我々の例では4日，また Patt と Straube の例[12]では5日である．指数的増殖がなりたつためには，（イ）世代時間が一定な株から1個の細胞をとり（ロ）培地上で細胞が其性質をかえず（ハ）培地は物理，化学，生物学的に常に一定の性質を保ち（ニ）培地は無限に広く（ホ）死亡其他の異常細胞は直ちに集団から除かれる必要がある．これに近い条件下では長時間にわたつて指数的増殖がなり立つ[13]．併し固形腫瘍では上の条件（ハ）（ニ）（ホ）が満足しないために立方根生長[14][15]，又はロヂスチク生長[16]したり出発点の細胞の数に応じて条件（ハ）（ニ）の成立が阻止されるための指数的増殖がみられない．照射集団の2倍化時間は対照の値より長いがその原因の1つに細胞の巨大化がある．このため時間当りのみかけの数の増加が抑制されるのである．これは顕微鏡映画によつてはつきりした[18]．

総　括

1．5系の腹水肝癌細胞を生体外照射し腹腔内増殖させ96時間後の生存率曲線を描くと4系は指数的増殖部分があつて Do と n を決定できたが1系は常に上に向つて凸の曲線を得た．

2．指数的増殖を行なうことのできる細胞数だけを用いて「生存率曲線」を描くとこの曲線は生存を測定する時間によつてその形と傾きを変えた．

3．腹腔内増殖は細胞数1×10^7—5×10^8範囲

で指数形がよくあてはまる．81±7g鼠では7×10^8細胞で飽和し1～2日後に鼠は死んだ．鼠の余命は腹腹腔内癌細胞数の関数のようにみえる．

4．照射は停待時間と指数的増殖期の2倍化時間を延ばしこのため飽和に達する迄の時間が伸び鼠の余命は延びた．

この研究は文部省科学研究費「照射癌細胞の生態的研究」（代表者東京大学宮川教授）の援助を受けた．腫瘍の分与を受けた東北大学抗酸菌病研究所佐藤春郎教授並びに教室員各位に敬意を表し又永野憲一君の技術的助力に感謝する．

文　献

1）吉田：Ann. New York Acad. Sci. **63**, 852, (1956).
2）五十子：癌, **51**, 33 (1960).
3）Puck, T.T. & P.I. Marcus; J. exp. Med., **103**, 653 (1956)；Puck, T.T. ら；J, exp. Med., **106**, 485 (1957).
4）Dewey, W.C. ら；Int. J. Rad. Biol., **6**, 463 (1963).
5）Sinclair, W.K.; Radiation Res., **21**, 584 (1964).
6）Nias, A.H.W. ら；Int. J. Rad. Biol., **9**, 275 (1965).
7）Hewitt, H.B. & C.W. Wilson; Nature, **183**, 1060 (1959); Brit. J. Cancer, **13**, 69 (1959), **13**, 675(1959), **14**, 186(1960)；Hewitt, H.B.; Brit. J. Radiol., **39**, 308 (1966).
8）Berry, R.L. & J.R. Andrews; Radiology, **77**, 824 (1961)；Radiation Res., **11**, 76, (1962); Brit. J. Radiol., **36**, 49 (1963); Berry, R.J. & A.B. Cohen; Brit. J. Radiol., **35**, 489 (1962) Berry, R.J., Radiation Res., **18**, 236, (1963).
9）菅原，田中：日本医放会誌, **25**, 1255 (1966).
10）田中ら：日本医放会誌, **28**, 979 (1966).
11）加納：日本医放会誌, **25**, 1007 (1965).
12）Patt, H.M. & R.L. Straube; Ann. New York Acad. Sci., **63**, 728 (1956).
13）Earle, W.R., ら；Ann. New York Acad Sci., **63**, 666 (1955); Nias, A.H.W. & L.G. Lajtha; Nature, **202**, 613 (1964).
14）Mayneord, W.V.; Am. J. Cancer, **16**, 841, (1932).
15）Mendelsohn, M.L.: Cellular Radiation Biology, 498 (1965).
16）富永，宮下：癌の臨床, **9**, 277 (1963)；富永ら：癌の臨床, **10**, 727 (1964).
17）Klein, G. & L. Révész; J. Natl. Cancer Inst., 14, 229 (1953).
18）勝田ら：放射線を照射した癌細胞の生態に関する研究班（班長東京大学宮川教授）資料, 1966年12月4日.