

Title	不均等分割照射のマウス扁平上皮癌及び正常組織に対する効果
Author(s)	根本, 建二; 坂本, 澄彦
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1990, 50(12), p. 1601-1607
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/14918
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

不均等分割照射のマウス扁平上皮癌及び正常組織に対する効果

東北大学医学部放射線医学教室

根本建二 坂本澄彦

(平成2年1月29日受付)

(平成2年5月24日最終原稿受付)

The Effects of Uneven Fractionated Irradiation on Mouse Squamous Cell Carcinoma and Normal Tissue

Kenji Nemoto and Kiyohiko Sakamoto

Department of Radiology, Tohoku University School of Medicine

Research Code No. : 407.1

Key Words : Fractionation, Uneven fractionation, Animal tumor, Acute skin reaction

In uneven fractionated radiotherapy combining large doses and small doses, we studied the influence of the order of their combination on tumors and on normal tissues, using squamous cell carcinoma and skin reaction of mice. The number of fractions was 6, and we used various combinations of 4 small doses and 2 large doses (4 times larger). The antitumor effect was smallest when a large dose was given at the end of treatment, but in skin reactions, there was no difference in effect even when the order of the combination of large and small doses was changed.

I. はじめに

通常の放射線治療では治療期間中1回線量を変えることは行われていないが、このことが放射線治療上最適であるとの証拠はない。小線量と大線量を組み合わせた治療は、外照射と小線源治療の組合せであるが子宮癌、頭頸部癌などの治療には広く用いられており、良好な成績が得られている。従って、外照射単純でも小線量と大線量を組み合わせた分割法を用いることにより、治療成績が向上する可能性もあると考えられる。

臨床的にはまずはじめに大線量、ついで小線量を数回照射することを繰り返す行う不均等分割照射の報告がある^{1)~4)}。しかし、その組合せの順序についての検討はなされていない。今回我々は動物腫瘍を用いて大線量と小線量を組み合わせた多分割照射(不均等分割照射)に於て大線量と小線量の組合せの順序が抗腫瘍効果、正常組織反応に及

ぼす影響について検討を行った。

II. 材料及び方法

1. 動物及び腫瘍

動物はWHT/Htマウス(雌, 6~8週齢), 腫瘍は同系に自然発生し継代移植されている組織学的には扁平上皮癌を用いた⁵⁾。

2. 効果判定法

1) TCD50法

マウスの両側腋窩の皮下移植にて継代されている腫瘍が0.4~0.7gの大きさになったとき外科的に摘出, ハサミで細切後腫瘍片を0.2%trypsinと0.08%pancreatinを含むPBS溶液に加え37°Cで15分間digestionし洗浄後10%ウシ胎児血清, 0.4%polyethylene oxideを含むTyrode溶液で10⁶個/mlの単細胞浮遊液を作成した。マウス右下腿部皮下にその0.01ml(10⁴cells)を注射し, 腫瘍が直径4.5~5.5mmになったときにX線照射を

開始した。各分割法につき120~160匹のマウスを用い、これを4~5群に分けて graded dose を照射した。注射から腫瘍の直径が5mm になるまでの期間は平均8日であり、7~9日目に直径が4.5~5.5mm になったもののみを実験に用いた。照射開始後、90日間局所再発の有無を週2回観察し、50%のマウスを治癒せしめる線量 (TCD 50 値) を求めた。この間約1/3のマウスが肺転移のために死亡したが、簡便のため90日以内に腫瘍の直径が1cm になったものは再発、90日目に腫瘍を認めなかったものを治癒とし、死亡時に腫瘍の直径が約1cm 以下のものはデータから除外した。TCD 50 値と95%信頼限界の計算はSAS社のコンピュータ統計パッケージプログラムを用いて probit 法により行った。

2) Regrowth delay 法

1)と同様の手順でマウス右下腿に腫瘍を移植し、直径が4.5~5.5mm になったときに照射を開始した。マウスは1群12~16匹を用いた。照射開始後、週3回腫瘍の長径及び短径をノギスを用いて測定し、照射開始時より長径×短径が4倍になる時間 (GT 4) を求めた。

regrowth delay time は

GT 4 (irradiated tumor) -

GT 4 (untreated tumor)

により求めた。

3) マウスの皮膚反応

マウス foot の急性皮膚反応を Denekamp らのスコア法⁹⁾によって経時的に観察、記録した (Table 1)。観察は照射開始後30日間週3回行い、1群12~16匹のマウスを用いた。スコアが最も

Table 1 Mouse foot skin reactions

0.5	Slight hair loss and/or very slight reddening.
1.0	Severe reddening, often with distended blood vessels or slight swelling.
1.5	Scaly appearance with moist breakdown of one small area.
2.0	Breakdown of larger area and/or toes stuck together.
2.5	Breakdown of about 50 per cent of the skin of the foot.
3.0	Breakdown of most of the skin.
3.5	Breakdown of entire skin of foot with severe moist exudation.

大きくなる7日間のスコアの平均 (7 day average skin reaction) を求めた。

3. X線照射

X線照射には深部治療装置を用い、250KV, 20 mA の条件で0.5mmCu+1mmAl フィルターを使用した。マウスを無麻酔下で厚さ4mm の鉛の箱に入れ、マウスの右下肢のみを外に出し SSD 60cm, 線量率0.7Gy/min で右下肢全体を照射した。この際 TLD 素子による測定では、マウスの脾臓及び胸線への散乱線量は局所線量の0.1%以下であった。腫瘍を低酸素状態で照射するときは照射開始の3分前にマウス右下腿付け根をゴムで固く縛ってから照射した。

4. 線量分制法

今回実験に用いた分割法をまとめて Table 2 に示す。不均等分割の場合は分割回数を8回とし、小線量6回とその4倍の大線量2回を表のような組合せで用いた。即ち、初めの2回に大線量を用いたもの (UFS-1)、終わりの2回に大線量を用い

Table 2 Uneven fractionation scheme used

D=4d (d=2.98Gy-5.36Gy)

Time intervals were 6 hours when irradiation was given twice a day

Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
UFS-1/9D	D		D		d	d	d	d	d	d
UFS-2/9D	D		d	d	d	d	d	d		D
UFS-3/9D	d	d	d	d	d	d		D		D
UFS-1/4D	D	D	d×2	d×2	d×2					
UFS-2/4D	D	d×2	d×2	d×2						D
UFS-3/4D	d×2	d×2	d×2	D	D					

たもの(UFS-3), 初めと終わりに大線量を用いたもの(UFS-2)である. 治療期間は4日, 9日について検討した. コントロールとして10 fraction/4ay (10F/4D), 10F/9Dの均等分割照射も行った.

III. 結 果

4.17Gy, 16.7Gyを腫瘍を通常の状態では照射後, 1, 2, 4日後にそれぞれ29.3Gy, 16.7Gyを通常の状態, あるいは腫瘍を移植した下肢をゴムで縛り腫瘍を低酸素状態にして照射したときの照射間隔と tumor regrowth delay の関係を Fig. 1 に示す. ここでいう通常の状態とは腫瘍を移植したマウスの右下肢をゴムで縛っていない状態である. 腫瘍を移植した下肢をゴムで縛り腫瘍を低酸素状態にして照射したときは, 4.17+29.3Gy, 16.7+16.7Gyのどちらの場合にも照射間隔が大きくなると regrowth delay が小さくなった. これに対して腫瘍を通常の状態では照射したときは4.17+29.3 Gy の場合, 照射間隔1日と比較して照射間隔2日では regrowth delay が小さく, 照射間隔4日では regrowth delay が大きくなっていった. 16.7+16.7Gy の場合, 照射間隔1日と比較して照射間

隔2日では regrowth delay が小さく, 照射間隔4日では照射間隔1日と2日の間の値であった.

不均等分割照射で用いられた各分割法の線量—治療曲線を Fig. 2 に示す. 治療期間が4日, 9日いずれに於ても UFS-1, 即ち初めの2回に大線量を照射した場合の TCD 50値が最も小さく, UFS-3, 即ち終わりの2回に大線量を照射したときの TCD 50値が最も大きかった. 均等10分割照射の TCD 50値は治療期間が4日の時には UFS-2 と UFS-3の間の値, 治療期間が9日の時には UFS-1 と UFS-2の間の値であった. 分割法毎の TCD 50値と95%信頼限界をまとめて Table 3 に示す.

各分割法に於ける皮膚反応と線量の関係を Fig. 3 に示す. 腫瘍の場合とは異なり, 治療期間が4日, 9日いずれに於ても UFS-1, UFS-2, UFS-3の間に明らかな差は認められなかった.

各分割法で50Gyを照射したときの治療期間中の腫瘍の増殖曲線を Fig. 4 に示す. 治療期間が4日の場合には各分割法で治療期間中の腫瘍の大きさには明らかな差は認められなかったが, 治療期間が9日の場合には UFS-1, 2で治療した場合に

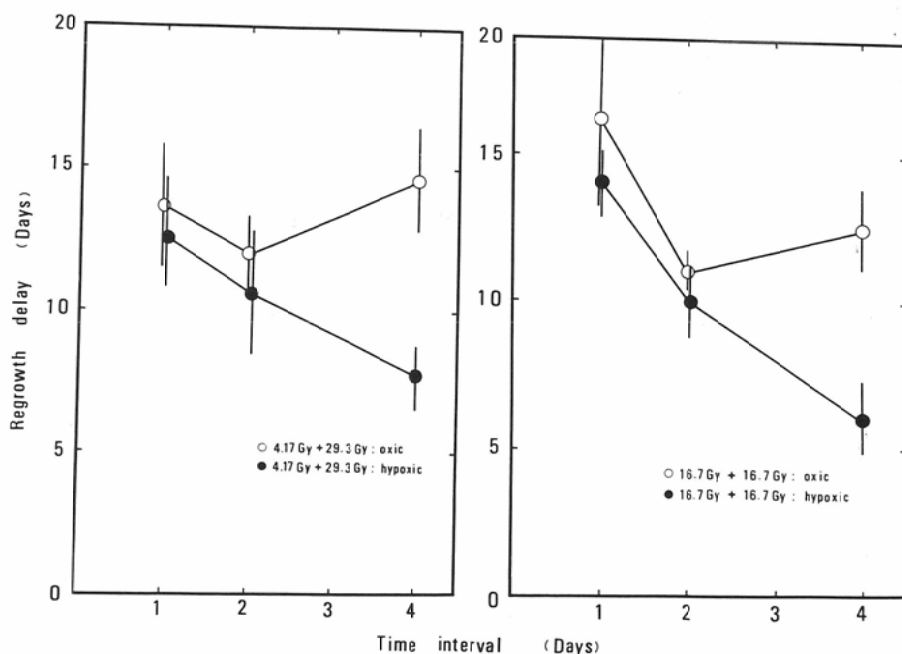


Fig. 1 The regrowth delay of tumors irradiated with 33.5Gy divided into 4.17Gy and 29.3Gy (left panel) and into two equal doses (right panel) given at varying time intervals. Data points represent the mean \pm 1SEM.

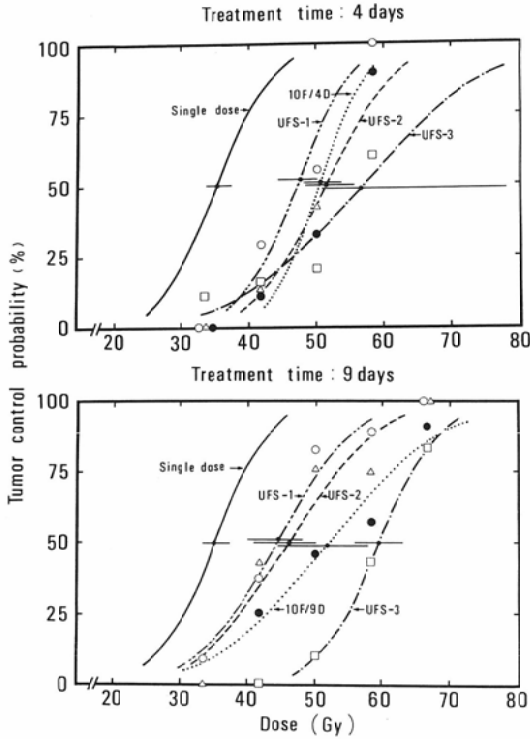


Fig. 2 Tumor control probability at 90 days plotted against total dose. The 95% confidence limits is shown as a bar.

Table 3 TCD 50 for each schedule

Scheme	TCD 50(Gy)	95% confidence limits(Gy)
UFS-1/9D	44.42	40.02—48.03
UFS-2/9D	46.17	40.73—50.30
UFS-3/9D	59.63	50.65—63.10
10F/9D	52.09	44.60—57.91
UFS-1/4D	47.28	44.27—50.28
UFS-2/4D	51.38	47.90—55.65
UFS-3/4D	56.90	50.70—78.10
10F/4D	50.44	47.91—53.77

腫瘍の縮小が早期に起こり、治療開始から5日目頃より UFS-1, 2で治療した腫瘍の大きさは UFS-3で治療した腫瘍の大きさと比べて小さかった。

IV. 考案

不均等分割照射法について検討するに当たり、まず大線量と小線量照射後の再増殖、再酸素化について検討するために2分割照射実験を行った。腫瘍を移植した下肢をゴムで縛り腫瘍を低酸素状態にして照射したときは、4.17+29.3Gy, 16.7+16.7Gy のどちらの場合にも照射間隔が大きくなると regrowthdelay が小さくなった。放射線傷害からの腫瘍細胞の回復は通常時間でほぼ完了する

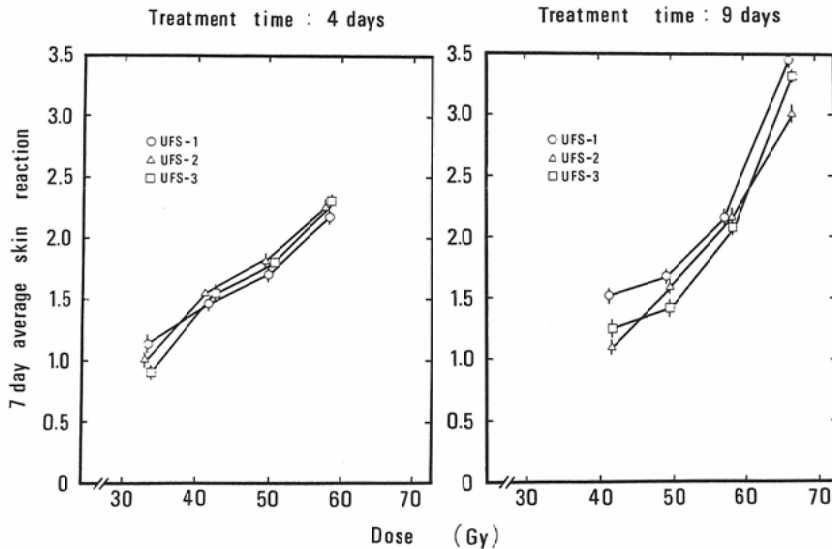


Fig. 3 Seven day average skin reaction versus total X-ray dose. Data points represent the mean ± ISEM.

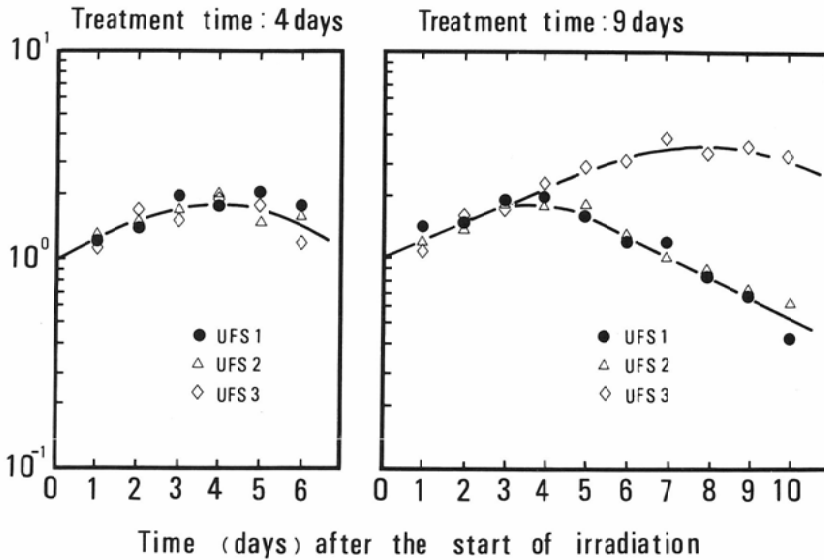


Fig. 4 Change of relative tumor area during uneven fractionated irradiation.

ので、今回用いられた1日以上照射間隔では回復は完了していると考えられる。また、低酸素状態での照射では再酸素化の影響を無視できる。従って、照射間隔が長くなると効果が減少するのは2分割の間に再増殖が起きるためと考えられた。また、大線量照射後と小線量照射後で再増殖の起き方に明らかな差は認められなかった。

腫瘍を通常の状態に照射したときは4.17+29.3 Gyの場合、照射間隔1日と比較して照射間隔2日では regrowth delay が小さく、照射間隔4日では regrowth delay が大きくなっていった。16.7+16.7Gyの場合、照射間隔1日と比較して照射間隔2日では regrowth delay が小さく、照射間隔4日では照射間隔1日と2日の間の値であった。もし2回目の照射時間に生存している腫瘍細胞の全てが低酸素細胞であれば、2回目の照射を通常の状態で行っても低酸素状態で行っても regrowth delay に差がないと考えられる。しかし、4.17+29.3Gyの場合も16.7+16.7Gyの場合も、照射間隔1日、2日では2回目の照射の状態で行っても低酸素状態で行っても regrowth delay は明らかな差が認められなかったが、照射時間が4日では2回目の照射を通常の状態で行った方が regrowth delay が大きかった。このことは4.17Gy、16.7Gy

照射後に再酸素化起こるには4日程度かかることを示していると考えられる。

不均等分割照射実験では大線量と小線量の組合せによる多分割照射の効果について検討したが、Fig. 2に示した様に治療の初期に大線量を用いた方が抗腫瘍効果が大きかった。今回の実験では総線量の2/3は大線量によって与えられており、主にこの違いは大線量が与えられたときの腫瘍の状態の違いによるものと考えられる。

放射線抵抗性の低酸素細胞の影響については、腫瘍が治療されていないときは腫瘍が小さいほど低酸素細胞分画が少ない腫瘍が多い⁷⁾。また、再酸素化が起きるメカニズムの一つに腫瘍の縮小による血流の改善が挙げられており、これらの点からは腫瘍が小さいときに大線量を照射した方が有利と考えられる。そこで、不均等分割法による治療期間中の腫瘍の大きさについて検討したが、Fig. 4に示した様に治療期間が9日間のときはUFS-1、UFS-2ではUFS-3と比較して治療の後半の腫瘍の大きさが小さかったが、治療期間が4日間のときには治療期間中に各分割法間で腫瘍の大きさの差は認められなかった。しかし、大線量が照射されたときの腫瘍の大きさでは治療期間が4日、9日何れにおいてもUFS-3で腫瘍が大きいとき

に大線量が照射されとおり、低酸素細胞の影響が大きくなったため UFS-3 が最も抗腫瘍効果が小さかったとも考えられる。しかし、2 分割照射による実験では再酸素化は腫瘍の縮小と関係なく起きているとする報告もあり⁸⁾、Fig. 1 も 4.17Gy, 16.7Gy 照射後には腫瘍の縮小が始まる前の 4 日目には再酸素化が起きていることを示している。また、Kallman⁹⁾、Howes¹⁰⁾らによれば分割法が変わると再酸素化の起こり方が変わることが分かっており、分割法による効果の差を低酸素細胞分画の違いのみにより説明することは今回の結果のみからは困難と考える。

再増殖の影響については、UFS-1, 2, 3 は同じ治療期間で比較しているため分割法毎の time factor は無視できる。しかし、大線量と小線量の照射後の再増殖の起こり方に違いがあればその照射の順序が抗腫瘍効果に影響するはずである。そこで、大線量照射後と小線量照射後では再増殖の起こり方に違いがあるかどうかについて検討したが、Fig. 1 は 4.17Gy, 16.7Gy 照射後の再増殖がほぼ同様に起きていることを示している。この様に 2 分割照射の結果からは分割法による抗腫瘍効果の違いに対する再増殖の関与についても明らかな証拠は得られなかった。

低酸素細胞は通常の状態の細胞と比較して SLDR が起きにくく^{11)~13)}、はじめに大線量を照射し、次いで小線量を照射した方が有効であるとする意見があり、今回の結果もこれと一致するものではあったが、酸素状態の違いによる SLDR の起こり方の違いが今回の結果にどの程度影響しているかは今後の検討課題である。

マウス皮膚反応の線量-効果曲線は UFS-1, UFS-2, UFS-3 の間で明らかな差は検出されず、腫瘍の分割照射に対する反応とは異なっていた。正常組織には腫瘍組織とは異なり通常は低酸素細胞は存在しないと考えられており、この点で腫瘍組織とは大きく異なっているが、これが皮膚反応に於て分割法による反応の差がなかったことにどの程度影響しているかは不明である。

以上のことから、本実験系での治療効果比という点では UFS-1、即ち治療の初期に大線量を用い

る分割法が最も優れており、UFS-3、即ち治療の終わりに大線量を用いる分割法が最も劣っていると考えられた。現在臨床的に用いられている分割法は、初めから終わりまで 1 回線量及び照射間隔を変えないのが通常であるが、果してそれが最も優れた分割法であるかは明らかではない。今回の実験では大線量と小線量を組み合わせた多分割照射に於て、その組合せの順序を変えると全く同一の TDF を用いても抗腫瘍効果が変わることが示され、均等分割照射法と比較しても優れた照射法が存在する可能性が示唆された。今後さらに種々の腫瘍系を用いた不均等分割照射の研究が必要と考えられた。

V. まとめ

1 回大線量と小線量を組み合わせた多分割照射の腫瘍及び正常組織に対する効果について検討した。同じ治療期間で同じ線量を照射しても腫瘍に対する効果は大線量と小線量の組合せの順序で異なり、治療の初期に大線量を照射した方が有効であったが、急性の皮膚反応は組合せの順序に影響されなかった。

本論文の要旨は昭和 63 年 3 月 31 日の第 47 回日本医学放射線学会総会（東京）に於て発表した。

文 献

- 1) 鎌田力三郎：不均等分割照射法の臨床的研究，癌の臨床，22：88—91，1976
- 2) 鎌田力三郎，浦橋信吾，栗原龍太郎，中条秀夫，阿部光幸，百々義広，西台武弘，網野三郎，阿部公彦，川名弘二：不均等分割照射法，癌の臨床，25：1233—1241，1979
- 3) Eichhorn HJ： Different fractionation schemes tested by histological examination of autopsy specimens from lung cancer patients. Br J Radiol 54：132—135，1981
- 4) Holsti LR, Salmo M, Elkind MM： Unconventional fractionation in the treatment of primary and secondary lung tumors. Prog Radio-Oncology II：325—330，1982
- 5) Hewitt HB, Sakamoto K： The comparative survival of clonogenic cells of a murine epithelioma after irradiation in mice breathing air, oxygen and carbon dioxide, or hyperbaric oxygen. Br J Radiol 44：457—463，1971
- 6) Denekamp, J.： Change in the rate of repopulation during multifraction irradiation of mouse skin. Br J Radiol 46：381—387，1973

- 7) Moulder JE, Rockwell S: Hypoxic fraction of solid tumors: Experimental techniques, method of analysis, and a survey of existing data. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 10: 695-712, 1984
 - 8) 芝本雄太, 西村恭昌, 西台武弘, 高橋正治, 阿部光幸: マウス EMT6 肉腫における 1 回 15Gy 照射後の再酸素化現象, *日本医放会誌*, 46: 1319-1323, 1986
 - 9) Kallman RF, Jardine LJ, Johnson CW: Effect of different schedules of dose fractionation on the oxygenation status of a transplantable mouse sarcoma. *J Nat Cancer Inst* 44: 369-377, 1970
 - 10) Howes AE, Page A, Fowler JF: The effect of single and fractionated doses of X-rays on the effective proportion of hypoxic cells in C3H mouse mammary tumors. *Br J Radiol* 45: 250-256, 1972
 - 11) Foster CJ, Malone J, Orr JS: The recovery of the survival curve shoulder after protracted hypoxia. *Br J Radiol* 44: 540-545, 1971
 - 12) Hall EJ: The effect of hypoxia on the repair of sublethal radiation damage in cultured mammalian cells. *Rad Res* 49: 405-415, 1972
 - 13) Suit H, Urano M: Repair of sublethal radiation injury in hypoxic cells of a C3H mouse mammary carcinoma. *Rad Res* 37: 423-434, 1969
-