

Title	放射線, 手術による癌の治療および治療後再発と転移との関係に関する研究
Author(s)	浦野, 宗保; 碓井, 貞仁; 小池, 幸子 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1975, 35(3), p. 152-157
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/15233
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

放射線, 手術による癌の治療および治療後再発と 転移との関係に関する研究

放射線医学総合研究所臨床研究部 (主任: 梅垣洋一郎部長)

(* 現所属: 千葉大学医学部第二外科学教室)

浦野 宗保 碓井 貞仁* 小池 幸子
安藤 興一 根住 直史

(昭和49年9月12日受付)

(昭和49年10月11日最終原稿受付)

Pulmonary Metastasis after Surgery or Radiotherapy and Its Relation with Recurrence

M. Urano, S. Usui*, S. Koike, K. Ando and N. Nesumi

Division of Clinical Research, National Institute of Radiological Sciences

4-9-1 Anagawa, Chiba 280

(Director: Y. Umegaki, M.D.)

*Present Address: The 2nd Department of Surgery, University of Chiba School of Medicine.

Research Code No.: 407

Key Words: Metastasis, Postoperative radiotherapy, C3H mouse mammary carcinoma, Recurrence

Studies were made on the incidence of pulmonary metastasis after various treatment regimes. Experimental animal tumors were 3rd generation isotransplants of a spontaneous mouse mammary carcinoma. Single cell suspension of this tumor was transplanted into the mouse right thigh and animals were treated by one of the treatment regimes when tumors reached 250 mm³. Pulmonary metastases were examined macroscopically up to 120th posttreatment day. The incidence of metastasis was not influenced by any treatment regimes except a regime combined with chemotherapy. These results indicated that metastasis had naturally been induced in approximately 20% of animals until the beginning of treatment. A large number of animals with pulmonary metastasis was able to survive for a long period after treatment, indicating that metastasis might be induced from a few number of tumor cells and proliferate very slowly. It was of interest that high incidence of pulmonary metastasis was observed in approximately 80% of animals which possessed recurrent tumors after combined surgery and radiotherapy.

I. 緒 言

癌の治療に伴なり最大の問題は遠隔転移であり、外科手術や放射線治療で局所治療に成功しても、転移、特に血行性転移により死に到ることが

多い。この血行性転移の形成や抑制等に関し多くの秀れた研究がなされているが¹⁾³⁾⁵⁾⁸⁾⁹⁾¹¹⁾、これらの中で放射線治療が転移を誘発することを示唆しているものがある²⁾。もし放射線治療により転

移が誘発されるならばその存り方を根本的に考え直さざるをえないだろう。そこでわれわれは、比較的特異的に血行性肺転移をきたすC3Hマウス自然発生乳癌を用い、手術単独治療、あるいは放射線単独治療や併用療法と転移との関係、および治療後再発と転移との関係等について検討を加えた。

II. 実験材料および方法

(i) 実験動物—腫瘍系：実験動物には当研究所にて自家繁殖されたC3H/He系マウスを、8～10週令にて雌雄ほぼ同数用いた。これらマウスはSPF (Specific Pathogene Free) 状態にて繁殖させ、且つ研究期間中を通じ同状態にある小動物舎にて飼育した(詳細は文献17)。尚飲水にはHClを添加し、市販の固型飼料は加圧滅菌の後自由に給えた。実験腫瘍には同系雌マウスに自然発生した乳癌の第3世代を用いた。即ち自然発生と第1世代乳癌とを液体窒素冷蔵庫に貯蔵し、実験の必要に応じて第2世代を同系マウス側腹部皮下に移植、増殖せしめ、これを実験に供した¹⁸⁾。

(ii) 単細胞浮遊液の作製と移植(詳細は文献14)：第2世代乳癌を摘出し、ハサミにて切り刻んだ後、約3倍量の5%仔牛血清を含むハンクス氏液に希釈し、約15分間静置した。その上澄をとり、Swinnny filterにて濾過し、これを1600rpmにて遠沈後、その沈渣を約倍量のハンクス氏液で希釈し、これを単細胞浮遊液とした。細胞数の計測はトリパンブルー染色法にて非染色細胞のみを血球計算盤上で計数した。この単細胞浮遊液10 μ l (2～5 \times 10⁵の非染色細胞を含む)をマウス右大腿部皮下に移植した。尚マウスは移植後乱数表にしたがい、幾つかの実験群に任意に分けた。また手術および照射等の治療は腫瘍が平均8mm直径(250mm³)に増殖した時に開始した。

(iii) 腫瘍の摘出および移植部位の切断：腫瘍摘出術は次のように行なつた。即ち腫瘍が筋層や皮膚に浸潤していない時には腫瘍の単純摘出にとどめたが、筋層や皮膚への浸潤を伴う時には、それらを含め摘出後縫合した。移植部位、即ち右大腿部の切断は、腫瘍より頭側約1cmの部位にて

腫瘍自体には手をふれることなく行なつた。尚手術前マウスはネプタール60mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、術者には、大腿切断術群をのぞき、それがいずれの実験群に属するかを知らせることなく手術を行なつた。

(iv) 放射線照射：深部治療用X線発生装置を200kVp, 20mAにて作動し、半価層0.8mmCuのX線で、線量率660rads/minにて局所のみを照射した。照射条件は腫瘍頭側大腿部を締めで血流遮断することによりHypoxicな条件とした(詳細は文献17)。

(v) 抗癌剤投与とTD₅₀法：抗癌剤としてはCyclophosphamide (Endoxan, シオノギ製薬)を用いた。これを生理食塩水にて10mg/mlに希釈したものを0.01ml/g、即ち100mg/kgを腹腔内投与した。

抗癌剤の腫瘍細胞に対する致死作用を調べるためにTD₅₀法を用いた(詳細は文献14)。即ち単細胞浮遊液を倍数希釈し、あらかじめ乱数にてグループ分けされた各マウスに移植した後、腫瘍の移植率を100日間にわたり観察した。そして各移植細胞数毎の移植率に基づきlogit分析法にてTD₅₀(50%の移植率に必要な細胞数)を計算した。

(vi) 転移および再発の観察：局所再発の有無は、手術または照射後週1回定期的に肉眼的に治療部位を観察し、再発腫瘍が10mm直径に再増殖した時、これを再発とした。この時同時にマウスをト殺し肺転移の有無を調べた。再発をきたさないマウスについては、治療後一定期間後にト殺し、両側肺を摘出し、必要ならばBouin氏液にて固定後、肉眼的にその有無を調べた。研究期間中死亡したマウスについては剖検により、肺転移および局所再発の有無を検討した。

III. 実験結果

肺転移発生率を治療開始後70日迄と71～120日迄の2つの期間にわけ、各治療群毎に検討した。結果は表1に示す如くで、腫瘍摘出術、大腿部切断術、放射線照射による各単独治療、腫瘍摘出術と術後照射の併用、およびこれに抗癌剤を併用した治療の各治療群毎に治療後の肺転移発生率をみ

Table 1: Incidence of pulmonary metastasis in animals treated with various regimes.
Tumors were 3rd generation isotransplants of a C3H mouse mammary carcinoma.

Days	Extirpation alone	Amputation alone	Extirpation +2850 rads ^{a)}	Extirpation +Cyclophosphamide ^{b)} +2850 rads ^{a)}	Radiation 6200 rads alone
0—70	1/11 (9.1%)	7/25 (28.0%)	4/19 (21.1%)	1/16 (6.3%)	4/18 (22.2%)
71—120	2/2 (100.0%)	3/24 (12.5%)	3/15 (20.0%)	4/15 (26.7%)	3/13 (23.1%)
Total ^{c)}	3/13 (23.1%)	10/49 (20.4%)	7/34 (20.6%)	5/31 (16.1%)	7/31 (22.5%)

^{a)} A postoperative dose of 2850 rads was given at 24 hours after extirpation.

^{b)} Cyclophosphamide of 100 mg/kg was administered immediately after surgery.

^{c)} No significant difference were found between any treatment methods

Table 2: TD₅₀ values of C3H mouse mammary carcinoma cells for animals treated with cyclophosphamide before or after transplantation

Cyclophosphamide (mg/kg)	Administered at	TD ₅₀ in 100 days (95% C.L.)	Surviving fraction
0	—	1.2 (0.87—1.6) × 10 ⁴	1.0
100	24 hours after transplantation	2.6 (1.3—5.2) × 10 ⁴	0.46
100	24 hours before transplantation	1.2 (0.57—2.6) × 10 ⁴	1.0

C.L.=Confidence limit.

Table 3: Recurrence frequency after various treatment regimes and incidence of pulmonary metastasis in animals with "recurrent" C3H mouse mammary carcinoma.

	Extirpation alone	Amputation alone	Extirpation +2850 rads ^{a)}	Extirpation +Cyclophosphamide ^{a)} +2850 rads	Radiation 6200 rads alone
Total number of animals ^{b)}	23	49	43	41	35
Number of recurrence ^{b)}	10	0 ^{c)}	9	10	4
Incidence of pulmonary metastasis ^{b)}	1 (10.0%)	—	8 (88.9%)	8 (80.0%)	3 (75.0%)

^{a)} See footnotes of Table 1 for detailed treatment schedules.

^{b)} Total number of animals=Number of animals with recurrence+Number of animals served for metastasis studies listed in Table 1.

^{c)} Recurrence after amputation means that in amputated area.

^{d)} Metastasis in animals with recurrence.

ると、70日以内と71～120日の間ではやや差があるが、全期間を通じ合計してみると、三者併用療法を除き、20.4～23.1%で、いずれの治療法にても転移発生に差をみなかった。ここで興味あることは大腿部切断術後でも他の治療法と同じ転移率を示したことである。この術式では腫瘍そのものに手をふれず、また表3に示す如く、局所(切断部)再発は皆無であつた。このことは腫瘍が移植

後 250mm³ に増殖するまでに、約20%の個体に肺転移が発生していたことを示すものであろう。いま1つ興味あることは、治療後100日を過ぎても、尚腫瘍死にいたらない肺転移が認められたことである。このことは転移腫瘍の増殖が著しくゆるやかであつたことを示すものであろう。

一方、三者併用群にては他法に比べ有意差はないが転移率がやや低かつた。このことは Cyclo-

phosphamide 100mg/kgの投与が、肺転移した腫瘍細胞に対し致死作用を持つためと考えられる。TD₅₀法にて致死作用を調べると表2に示す如くで、同量の投与にて細胞の生存率は0.46に下げられている。この薬剤は免疫抑制効果を持つといわれているので⁷⁾、腫瘍細胞移植後24時間前に同量を被移植マウスに投与しTD₅₀値を調べたところ、無処置群のそれと変わらず、乳癌細胞に対しては免疫抑制効果を示さなかつた。したがって三者併用群にては、この薬剤により転移率がやや低下したと考えられ、免疫抑制による転移率の上昇は認められなかつた。

次に局所再発について観察すると腫瘍摘出術単独では23匹中10匹(43.5%)に再発を認めたのに対し、術後照射2850radsを併用すると20.9%に減少した(表3)。これら再発腫瘍が平均10mm直径に増大した時、それらマウスの肺転移について検討したところ、手術単独治療群と何らかの形で放射線照射を行なつた群とは大きな差が認められた。即ち、腫瘍摘出術後の再発10例中、肉眼的肺転移をきたしたものは1例のみであつたのに対し、後者では少なくとも75%に肺転移を認めた。腫瘍摘出術と術後照射の併用およびこれらに抗癌剤を加えた三者併用群でそれぞれ9例の再発中8例、10例の再発中8例に転移が検出された。また6200radsの放射線照射単独後の再発4例中肺転移をきたしたものは3例であつた。

ついで腫瘍摘出術単独群と、術後照射を行なつた群(抗癌剤を加えたものを含む)の2つについて、腫瘍の再発時期について検討した。結果は図1に示す如くで、術後照射群において再発時期は著しく遅延した。logit分析法にて全再発腫瘍の半数が再発をきたす時期(50% Tumor Recurrence Time)を計算すると、腫瘍摘出術後では34日であるのに対し、術後照射を行なつた後では59日であつた。かかる結果より、放射線照射後の再発では手術単独治療に比較して肺転移の確率は高いが、反面、再発時期が遅延するといえるであろう。

IV. 討 論

われわれの今回の研究で興味あることは、転移

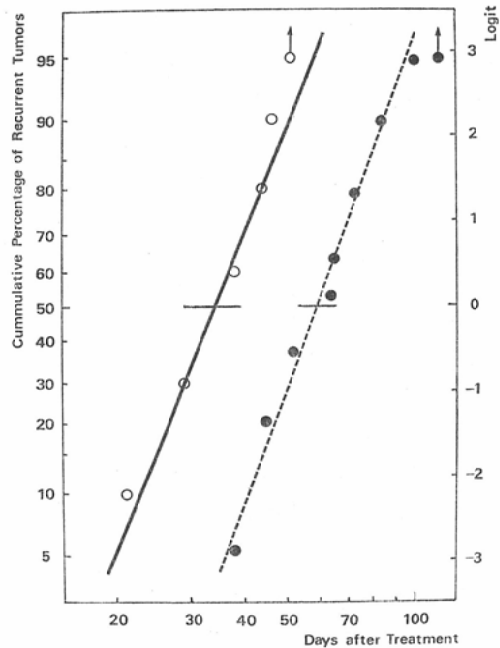


Figure 1: Recurrence time distribution of a C3H mouse mammary carcinoma treated by tumor extirpation which was or was not followed by postoperative radiotherapy. Open or solid circles indicate tumors treated by surgery alone or those received surgery and radiotherapy respectively. A single dose of 2850rads was given as the postoperative radiotherapy. The 50% recurrence times for tumors treated by surgery alone and for those received surgery and postoperative radiotherapy were 34.1 (28.9-40.1) and 59.3 (53.3-66.0) days respectively.

率は手術や放射線照射により左右されないという以外に、放射線照射後の再発に伴つて転移が高率に発生したこと、照射後の50% recurrence timeが手術後のそれに比べ延長したことであろう。ここで照射後の再発率と再発時間について考えると、これらはいずれも照射線量に依存する¹⁷⁾。即ち照射線量が大きい程再発率は低く、再発時間は延長する。われわれが2850radsという低い線量をえらんだのは、幾ばくかの再発を期待したからに他ならない。より興味あることは、照射後の再発に伴つて転移率が上昇したことで、その理由としては幾つかの因子が考えられる。例えば、照射による腫瘍細胞そのものの変化、腫瘍構築の変

化,あるいは,腫瘍増殖能の変化等である.腫瘍構築の変化としては,Tumor cordが照射後再発腫瘍においては非照射腫瘍のそれに比しはるかに小さいことが知られているが¹²⁾,これら因子の中でもつとも大きなものは腫瘍増殖の変化であろうと考えられる.

われわれと同様のC3Hマウス乳癌を用いた研究によると,転移率は腫瘍の増大と共に増加するという⁴⁾.このことは腫瘍が長く同一組織内にとどまれば,それだけ転移の確率が高くなることを意味するものであろう.一方再発腫瘍の特徴は,細胞自身の変化,例えばMicrocolony formation¹⁰⁾として知られるDivision probability¹⁸⁾の減少の他,所謂Tumor bed effect¹³⁾により,腫瘍増殖が著しく遅くなることである.この時腫瘍細胞の世代時間はほとんど変化せず,腫瘍の倍加時間が延長する.即ちGrowth fractionの減少とcell lossの増加により特徴づけられる²⁾⁶⁾.したがって,手術単独治療後の再発に比べ,照射後再発腫瘍では10mm直径に増大するのにそれだけ長期間を必要とし,転移の機会が増加することと,その間におけるcell lossの増加とにより,照射後再発腫瘍においては肺転移率が高くなると考えられる.

いま1つ興味あることは,治療後100日以上を経過しても,局所再発を伴わない転移が存在したことである.即ち転移腫瘍の増殖が,われわれの腫瘍では著しくゆるやかであったことを示している.例えば,10⁵コの生きた細胞を大腿部皮下に移植した時,腫瘍は通常20~30日で250mm³に増殖する¹⁵⁾.また移植後腫瘍が一定の大きさに達する時間は,当然のことながら移植細胞数に比例するとともに,腫瘍の倍加時間もそれに依存し,移植細胞数が少ない程,倍加時間が長くなる¹⁶⁾.したがって治療後100日以上を経過して尚肺転移を持った個体が生存しえたことは,1つの肺転移は非常に少ない細胞の定着により発生しえたことを示すものといえるだろう.このことはわれわれと同じC3Hマウス乳癌を用い,Suit et alが再発死と転移死との時間分布を調べた研究結果にも示されており¹⁴⁾,われわれの結果とよく一致して

いる.

V. 結 語

C3Hマウス自然発生乳癌の第3世代を用い,手術,放射線治療,それらの併用療法,あるいは化学療法を加えた三者併用療法に伴う肺転移の発生率を検討した.その結果,化学療法を加えることにより有意差はないが転移率がやや減少する以外,他のいかなる治療法とも転移率にまったく関係なく,腫瘍が治療開始時の大きさに達するまでに自然に起つたと考えられる転移率と同じであつた.しかしながら,放射線治療を何らかの型でおこなつた後の再発に伴う転移は多く,腫瘍摘出後の再発に伴うそれに比べはるかに高率であつた.これは照射後の再発腫瘍の倍加時間が延長し,cell lossが増加したためと考えられた.また治療後再発を伴わない個体では転移腫瘍の増殖は遅く,これは転移がごく少数の腫瘍細胞の定着により起りうることを示すものと思われる.

References

- 1) Baserga, R., Kisieleski, W. and Halvorsen, K.: *Cancer Res.* 20 (1960), 910—917.
- 2) Brown, J.M.: *Radiat. Res.* 43 (1970), 627—653.
- 3) Collins, V.: *Cancer* 15 (1962), 387—395.
- 4) Dubravsky, N., Mason, K. and Withers, H.R.: 5th International Congress of Radiat. Res., July 1974, Seattle, Wa.
- 5) Feder, B.H., Stein, J.J., Smith, T.K., Schafefein, J.W., Bontelle, J.L. and Conroy, R.M.: *Radiology* 90 (1968), 1181—1184.
- 6) Hermens, A.F. and Barendsen, G.W.: *Europ. J. Cancer* 5 (1969), 173—189.
- 7) Makinodan, T., Santos, G.W. and Quinn, R.P.: *Pharm. Rev.* 22 (1970), 189—247.
- 8) 三富利夫, 未舛恵一: 第32回日本癌学会, 1973年10月, 東京.
- 9) 佐藤春郎, 鈴木磨郎: 癌の臨床, 18 (1972), 605—608.
- 10) Sinclair, W.K.: *Radiat. Res.* 21 (1964), 584—611.
- 11) Suit, H.D., Sedlacek, R.S. and Gillette, E.L.: *Radiology* 95 (1970) 189—194.
- 12) Tannock, I. and Howes, A.: *Radiat. Res.* 55 (1973), 477—489.
- 13) Urano, M. and Suit, H.D.: *Radiat. Res.* 45 (1971), 41—49.

- 14) Urano, M., Fukuda, N. and Koike, S.: *Cancer Res.* 33 (1973), 2849—2855.
 - 15) Urano, M., Fukuda, N., Tsunemoto, H., Koike, S. and Ando, K.: *Nippon Acta Radiol.* 33 (1973), 697—701.
 - 16) 未発表データ.
 - 17) Urano, M., Fukuda, N., Ando, K., Koike, S. and Tanaka, N.: *J. Natl. Cancer Inst.* 53 (1974), 517—525.
 - 18) Whitmore, G.F. and Till, J.E.: *Ann. Rev. Nucl. Sci.* 13 (1964), 347—374.
-