

Title	分割照射における腫瘍細胞動態のFlow Cytometryによる解析 II. 移植腫瘍の1回照射についての検討
Author(s)	酒井, 邦夫; 藤田, 勝三; 日向, 浩 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1985, 45(2), p. 398-402
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16992
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

分割照射における腫瘍細胞動態の Flow Cytometry による解析

II. 移植腫瘍の1回照射についての検討

新潟大学医学部放射線医学教室

*新潟大学医療技術短期大学部

酒井 邦夫 藤田 勝三* 日向 浩
末山 博男 佐藤 洋子

（昭和59年5月21日受付）

（昭和59年7月20日最終原稿受付）

Flow Cytometric Analysis of Cell-kinetics after Fractionated Irradiation

II. A Study on Transplanted Solid Tumor after Single Dose Irradiation

Kunio Sakai, Shozo Fujita*, Hiroshi Hinata, Hiroo Sueyama and Yoko Sato

Department of Radiology, Niigata University School of Medicine

*College of Biomedical Technology, Niigata University

Research Code No. : 407

Key Words : Flow cytometry, Cell-kinetics, Fractionated irradiation

Cell-kinetics after irradiation of the solid tumor (FM3A) transplanted to the subcutaneous tissue of C3H mice were analysed by flow cytometry (FCM). The results obtained were as follows.

1. DNA histograms of cells sampled from the periphery of the tumor showed almost the same pattern, regardless of the size of tumor.
2. Flow cytometric analysis of the unirradiated solid tumor revealed cells in G₁ phase to be 61.2%, S phase 24.5% and G₂ + M phase 14.3%.
3. DNA histograms of solid tumor irradiated with 5, 10 and 20 Gy demonstrated cell accumulation into G₂ + M phases 5—6 hours after irradiation. The proportion and duration of cell accumulation into G₂ + M phases increased with radiation dose.

I. はじめに

前報¹⁾では培養細胞を対象として検討した結果 flow cytometry (FCM) が放射線照射後の細胞動態の解析に有用であり、分割照射における線量時間関係の検討にも役立つ可能性のあることを述べた。

本論文では、移植腫瘍を対象として、放射線照射後の細胞動態を FCM により解析した結果について報告する。

II. 材料および方法

移植腫瘍は、マウス乳癌由来の FM3A 細胞を 4～5 週齢の同系雄性マウス (C3H/HeN) の右大腿内側皮下に継代移植したものをを用いた。腫瘍組織をイーグル MEM 培地中で 1～2mm 四方の大きさに細切し、これを移植針を用いて移植した。移植 12～15 日後に腫瘍の大きさは 400～500mm³ に達する。

放射線照射にはコバルト遠隔照射装置を用い

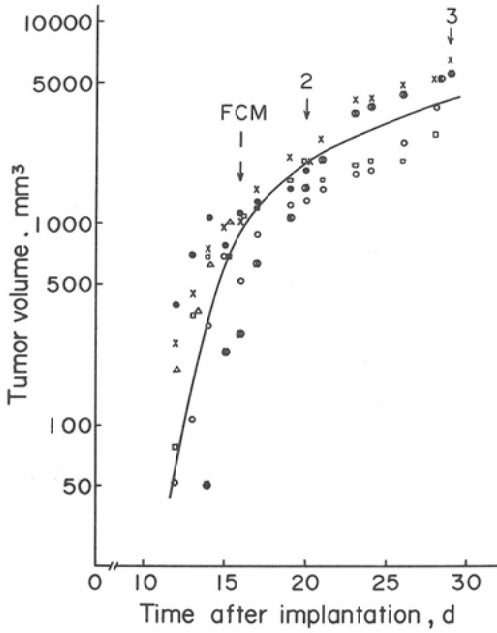


Fig. 1 Growth curve of the solid tumor (FM3A) transplanted to the subcutaneous tissue of C3H mice

た。マウスを無麻酔下で背臥位に固定し、腫瘍部に5mm厚の水ボラスをあて、線量率1.35Gy/minで5, 10, 20Gyずつ局所照射した。

各照射群(各群10匹)について、照射3, 5, 7, 10, 12, 15時間後に頸椎脱臼によりマウスを屠殺し腫瘍を摘出した。腫瘍の辺縁部を、血清を含まない培地中で細切し、0.125%トリプシンで10分間処理した。これを40 μ mのナイロンメッシュで濾過して組織塊を除去し、4 $^{\circ}$ C, 700rpmで3分間遠心後上清をすて、牛血清を含む培地に細胞を分散した。その細胞懸濁液にPI液(ヨウ化プロピジウム0.05mg/0.1%クエン酸ナトリウム)を加えてDNA染色を行った。

DNA量測定は、米国 Ortho 社製 Cytofluorograf (ICP22A) を用い、前報に準じた方法で行った。

III. 結 果

1) 非照射移植腫瘍の DNA ヒストグラム

移植腫瘍の成長曲線を Fig. 1に示す。6匹のマウスの大腿内側皮下に1~2mm 四方の腫瘍片を

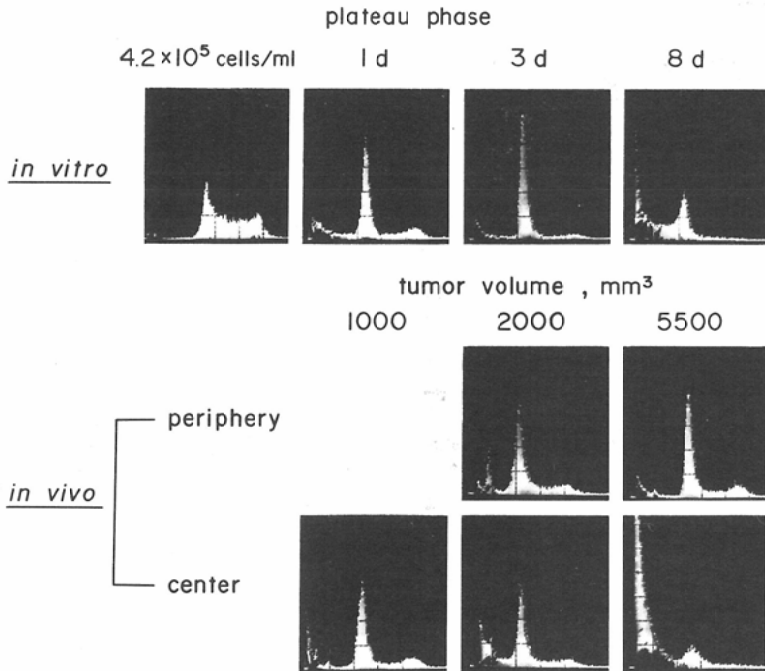


Fig. 2 DNA histograms of cells sampled from the periphery and the center of various sizes of the transplanted solid tumor (FM3A), compared with those of cultured cells

移植し、腫瘍が触れるようになってから、その長径(a), 短径(b), 厚さ(c)を計測した。腫瘍容積は、それを楕円体とみなして $4/3\pi \left(\frac{a \times b \times c}{8} \right)$ で算出した。腫瘍容積は約1,000mm³までは急激に、それ以上の大きになると緩やかに増大している。

腫瘍容積が1,000, 2,000および5,500mm³に達したところで、それぞれの腫瘍の辺縁部と中心部から試料を採取し、DNA ヒストグラムを求めた。その結果を、培養細胞の場合と対比して Fig. 2 に示す。

腫瘍容積1,000mm³の場合は、東京医大式穿刺針で腫瘍のはぼ中心部から採取した試料のDNA ヒストグラムである。これは培養細胞の定常状態初期のパターンに近似している。

腫瘍容積2,000mm³では、辺縁部、中心部ともに基本的には1,000mm³の腫瘍中心部と同じパターンを示す。しかし、2,000mm³中心部の試料では、DNA 量が2C (G₁期) より少ない成分の出現が認められる。

腫瘍容積5,500mm³の中心部では、2C に低いピークを認めるのみで、3C(S期), 4C (G₂+M期) はほぼ消失し、2C より DNA 量の少ない成分の著しい増加が認められる。これは培養細胞の定常状態後期 (plateau に達してから8日目) のヒストグラムに近似している。しかし腫瘍容積5,500mm³においても、辺縁部から採取された試料では1,000mm³中心部および2,000mm³辺縁部のそれと基本的に同じパターンを示す。

2) 移植腫瘍の DNA ヒストグラムの照射後の経時的変動

Fig. 3に移植腫瘍の DNA ヒストグラムの照射後の経時的変動を示す。試料は全て腫瘍の辺縁部

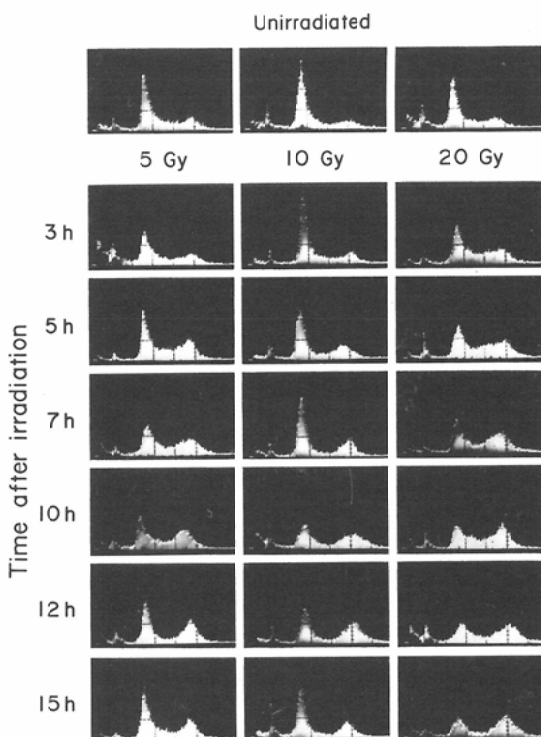


Fig. 3 DNA histograms of the transplanted solid tumor (FM3A) after irradiation of 5, 10 and 20Gy

The cells were sequentially sampled from the periphery of the tumor 3 to 15hours after irradiation.

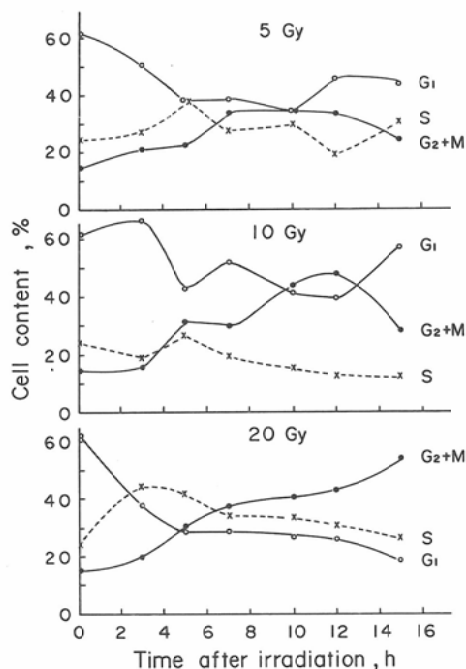


Fig. 4 Sequential changes of cells in G₁, S and G₂+M phases after irradiation

In every dose group, cell accumulation into G₂+M phases was noted to occur at 5~6hours after irradiation.

から採取した。これらの DNA ヒストグラムから、前報に準じて細胞周期各期の百分率を算出した。その結果を Fig. 4 に示す。

非照射腫瘍（6 個）における細胞周期各期の割合は、平均して G_1 期 61.2%，S 期 24.5%， G_2+M 期 14.3% であった。

放射線照射後の細胞動態をみると、いずれの線量においても、照射 5～6 時間後に G_2+M 期の割合が増加しはじめる。5Gy では 7～12 時間後、10Gy では 12 時間後に最高となり、それぞれ 34%、48% に達し、15 時間後には減少する。しかし、20 Gy では 12 時間後も G_2+M 期は増加傾向にあり、15 時間後には 53% に達している。

IV. 考 察

がんの放射線治療において、細胞周期による感受性の差をうまく利用できれば、より効果的な治療が実施できる可能性がある²⁾。前報では、培養細胞について、FCM による照射後の細胞動態の解析が分割照射における照射間隔の決定に役立つ可能性のあることが示唆された。本報では、同系の腫瘍細胞（FM3A）をマウス大腿皮下に移植した固型腫瘍を用いて、照射後の細胞動態を解析した。

摘出した非照射腫瘍組織を肉眼的に辺縁部と中心部とに分けて試料を採取し、両者の DNA ヒストグラムを比較したところ、腫瘍容積 2,000mm³ では類似していたが、5,500mm³ では著しく異なるパターンを示した。5,500mm³ 中心部でみられた 2C より DNA 量の少ない成分は、よくみると 2,000mm³ の中心部でも量は少ないが出現している。これはおそらく壊死におちいった死細胞に由来するものと思われる。

腫瘍辺縁部から採取した試料では、腫瘍の大きさの如何にかかわらず、ほぼ一定のパターンを示した。これらのことは、照射による細胞動態を in vivo で観察する場合、とくに腫瘍が大きい場合には、腫瘍辺縁部から試料を採取することが大切であることを示している。赤木ら³⁾も、固型腫瘍では同一の腫瘍であっても試料採取部位によって DNA ヒストグラムが異なることを指摘している。

5, 10, 20Gy 照射後の腫瘍組織辺縁部の DNA ヒ

ストグラムを経時的に追跡すると、照射 5～6 時間後から G_2+M 期の割合が増加しはじめる。この割合は、照射 15 時間後までの追跡では、5Gy の場合は 7～12 時間後、10Gy の場合は 12 時間後、20 Gy の場合は 15 時間後に最大となり、それぞれ 34%、48%、53% を占めるに至る。線量が多くなると、 G_2+M 期への蓄積は大きくなり、また長時間持続するようになる。

Pallavicini ら⁴⁾は、C3H マウスに移植した KHT 肉腫に 1,700rad 照射し、照射後の細胞動態を FCM で分析している。この KHT 肉腫では G_2+M 期は 15.8% であるが、照射 3 時間後で 16.2%、5 時間後 24.0%、10 時間後 40.8%、15 時間後 51.4% と増加し、24 時間後には 61.6% となっている。これらの値は、われわれの用いた FM3A 移植腫瘍における 20Gy 照射後の G_2+M 期の経時的変動に近似している。

それでは G_2+M 期への蓄積は、分割照射においてどのような意義をもっているのであろうか。培養細胞では、 G_2+M 期への蓄積と 2 分割照射における細胞周期の部分同調による生存率減少とが時間的に対応していることが示された。すなわち G_2+M 期への蓄積が最大となる時点で次の照射を行うことがより効果的であった。移植固型腫瘍でも同様のことが期待できると思われるが、この方面の研究はまだ余り進んでいないためにその確証は得られていない。今後移植腫瘍を対象として、照射後の DNA ヒストグラムの変化と対比させながら、分割照射のあり方について検討を進める必要がある。

V. 結 語

マウス乳癌由来の FM3A 細胞を同系雄性マウスの大腿内側皮下に移植した固型腫瘍を対象として、照射後の細胞動態を FCM により解析した。

1. 試料採取部位によって DNA ヒストグラムのパターンは異なる。しかし腫瘍辺縁部から採取した試料では、腫瘍の大きさにかかわらずほぼ一定のパターンを示した。

2. 非照射腫瘍における細胞周期各期の割合は、 G_1 期 61.2%，S 期 24.5%， G_2+M 期 14.3% であった。

3. 5, 10, 20Gy 照射後の細胞動態では、いずれの線量においても、照射 5～6 時間後に G_2+M 期の割合が増加した。線量が多くなると、 G_2+M 期への蓄積は大きくなり、また長期間持続した。

本研究は、文部省科学研究費（課題番号57440057）の援助を受けた。論文の要旨は、第69回日本医学放射線学会北日本地方会および第43回日本医学放射線学会において発表した。

文 献

- 1) 酒井邦夫, 藤田勝三, 日向 浩, 末山博男, 佐藤洋子: 分割照射における腫瘍細胞動態の Flow Cytometry による解析. I. 培養細胞についての検

- 討. 日本医放会誌, 投稿中
- 2) 坂本澄彦: 放射線治療の歴史と展望. *Oncologia*, 8: 54-63, 1984
- 3) 赤木 清, 中沢 緑, 村田貴央, 白石友邦, 播磨敬三, 沢田 敏, 長谷川武夫, 田中敬正: FCM による腫瘍細胞動態に対する放射線効果の解析. 癌の臨床, 27: 1523-1527, 1981
- 4) Pallavicini, M.G., Lalande, M.E., Miller, R.G. and Hill, R.P.: Cell cycle distribution of chronically hypoxic cells and determination of the clonogenic potential of cells accumulated in G_2+M phases after irradiation of a solid tumor in vivo. *Cancer Research*, 39: 1891-1897, 1979