



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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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用いた。腫瘍組織をイーグル MEM 培地で 1~2mm 四方の大きさに細切り、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

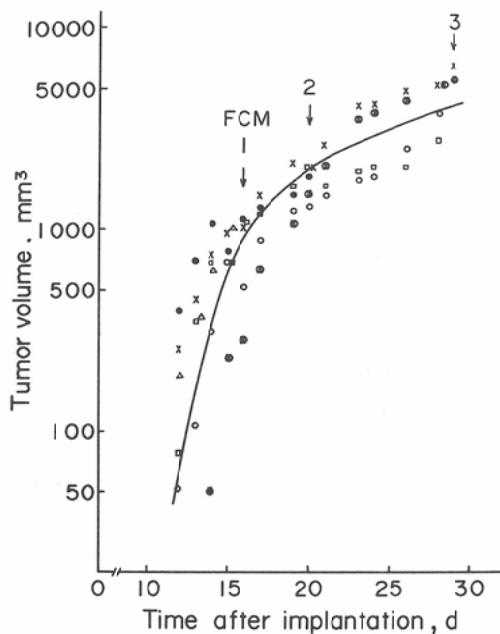


Fig. 1 Growth curve of the solid tumor (FM3A) transplanted to the subcutaneous tissue of C3H mice

た。マウスを無麻酔下で背臥位に固定し、腫瘍部に5mm厚の水ボーラスをあて、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40μmのナイロンメッシュで濾過して組織塊を除去し、4℃, 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匹のマウスの大脳内側皮下に1~2mm四方の腫瘍片を

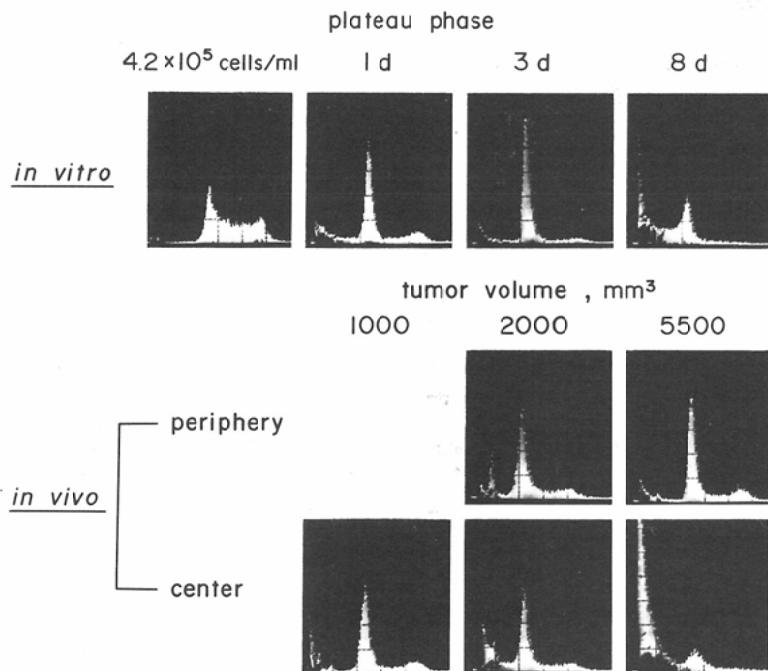


Fig. 2 DNA histograms of cells sampled from the periphery and the center of various sizes of the transplanted solid tumor (FM3A), compared with those of cultured cells

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、それを橢円体とみなして $4/3\pi \left(\frac{a \times b \times c}{8} \right)$ で算出した。腫瘍容積は約1,000mm³までは急激に、それ以上の大きさ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ば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。

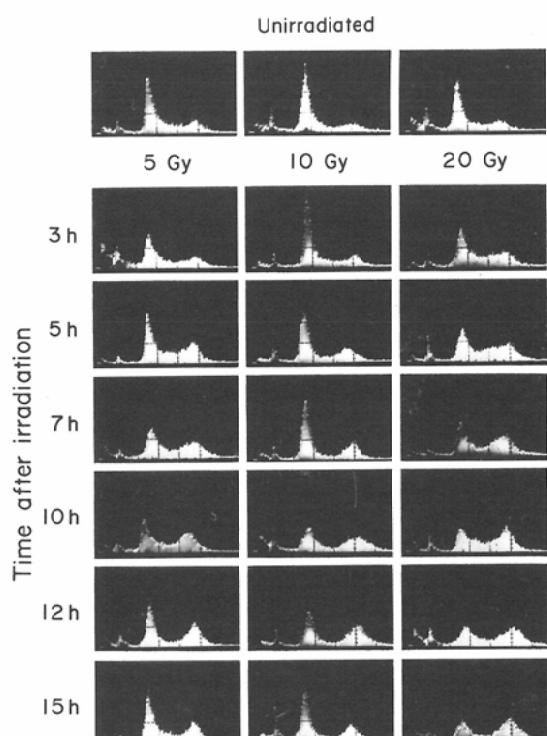


Fig. 3 DNA histograms of the transplanted solid tumor (FM3A) after irradiation of 5, 10 and 20 Gy

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

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

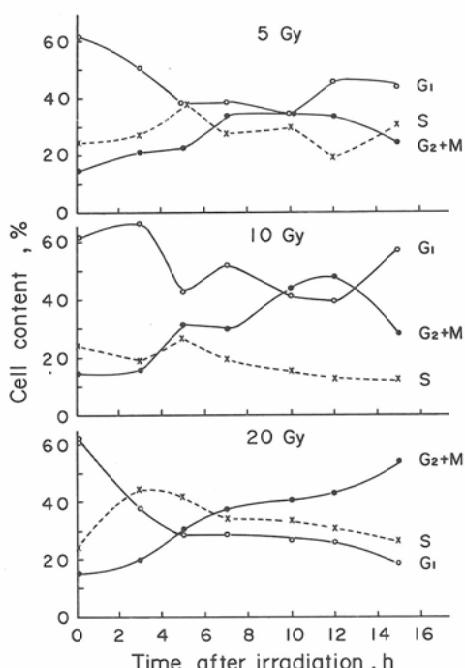


Fig. 4 Sequential changes of cells in G₁, S and G₂+M phases after irradiation

In every dose group, cell accumulation into G₂+M phases was noted to occur at 5~6 hours 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G₁期61.2%，S期24.5%，G₂+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G₂+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、20Gyでは12時間後もG₂+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 案

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と出現している。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G₂+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、20Gy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、G₂+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G₂+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G₂+M期の経時的変動に近似している。

それではG₂+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、G₂+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G₂+M期への蓄積が最大となる時点で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脳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、G₁期61.2%，S期24.5%，G₂+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