

Title	放射線とプレオマイシンの併用効果に投与間隔が及ぼす影響-In vivoとin vitroの実験の比較検討-
Author(s)	伊東, 久夫; 富永, 紳一; 西口, 郁 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1987, 47(12), p. 1596-1605
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/17399">https://hdl.handle.net/11094/17399</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 放射線とブレオマイシンの併用効果に投与間隔が及ぼす影響

—In vivo と in vitro の実験の比較検討—

慶応義塾大学医学部放射線医学教室

伊東 久夫 富永 紳一 西口 郁  
中山 俊威 橋本 省三

(昭和62年1月19日受付)

(昭和62年5月21日最終原稿受付)

## Effect of Time Intervals between Bleomycin and Irradiation on Cell Lethality

—Comparison between In Vivo and In Vitro Experiments—

Hisao Ito, Shinichi Tominaga, Iku Nishiguchi,  
Toshitake Nakayama and Shozo Hashimoto  
Department of Radiology, Keio University School of Medicine

---

Research Code No. : 407

---

Key words : Chemo-radiotherapy, Bleomycin, Plateau phase cells,  
Intestinal microcolony assay, Lung colony assay

---

Experiments have been carried out to determine the effect on the cell survivals of different time intervals between bleomycin (BLM) and irradiation in either in vivo or in vitro system. When BLM (100mg/kg) was given between 24 and 0 hours before a dose of 13.5Gy, an enhancement by BLM of the response of the intestinal epithelial cells to irradiation was found. Especially, when BLM was given 2 hours before irradiation, the maximum enhancement was observed with the dose modifying factor of 1.4. When 8 mm FSa tumor in the right thighs were treated by combination of BLM (50mg/kg) and irradiation (20Gy), the different time intervals between the two agents did not modify tumor growth. The same results were observed with 4-days old lung micrometastases.  $V_{79}$  cells both in the exponentially growing phase and in the plateau phase (more than 80% of cells were in  $G_1$ -like stage in the cell cycle) were treated with BLM with/without irradiation. The cells in the plateau phase were more sensitive to the drug than those in the proliferative phase. When BLM (30ug/ml) was combined with irradiation (7.5Gy) at the different time intervals, a significant enhancement of the response by BLM was found in the cells in the plateau phase, and BLM, given 1 hour before irradiation, gave the least survival rate with the dose-modifying factor of 1.4. These results suggest that the plateau phase cells show the very similar response as the intestinal epithelial cells, when they were treated by BLM combined with irradiation. We think that the plateau phase cells are suitable to expect the in vivo damage of the normal tissue from in vitro experiments.

### はじめに

悪性腫瘍の非観血的治療法としては、通常放射線療法と化学療法が行なわれているが、両者はし

ばしば併用される。進行癌の原発巣の治療にこの両者を併用する場合は、抗腫瘍効果の増強を期待し、正常組織に対する障害を不変かあるいは軽減

できること、すなわち、治療効果比の改善を目的としている<sup>1)</sup>。

Bleomycin (BLM) は他の抗癌剤と異なり、骨髄抑制作用が無く、扁平上皮癌<sup>2)</sup>や悪性リンパ腫<sup>3)</sup>に有効な薬剤で、頭頸部腫瘍や子宮頸癌患者に頻用され、放射線療法と併用されることも多い<sup>4)5)</sup>。併用療法の臨床治療成績は、口腔内腫瘍に対しては極めて有効であったとする報告から<sup>6)</sup>、併用効果が認められないばかりか、正常組織の障害のみがみられた<sup>7)</sup>というものまでいろいろある。食道癌<sup>8)</sup>や子宮頸癌<sup>5)</sup>においても、正常組織の障害のみが増加したと報告されている。両者の併用効果を検討するため基礎的な研究も多数行なわれ、動物腫瘍に対して相乗効果を認めた報告<sup>9)</sup>、効果が一定しないとする報告<sup>10)</sup>、腫瘍と正常組織の両者に相乗効果があり治療効果比の改善はないという報告<sup>11)</sup>など、評価もまちまちである。培養細胞を用いた研究も多く、BLM の作用は分子レベルから細胞レベルまで興味深い報告があるが<sup>12)</sup>、放射線と併用した場合、相加効果のみを認めた報告<sup>13)</sup>と、相乗効果がある<sup>14)</sup>とするものなどいろいろで、実験系により結果が異なっている。

本研究は、BLM と放射線の投与間隔や投与順序が併用効果に及ぼす影響を、*in vivo* と *in vitro* で検討し、併用時の作用機序について考察した。

### 実験材料と方法

#### 1. 動物実験

1) 実験動物：本実験に用いた動物は全て C<sub>3</sub>H マウスで、静岡実験動物研究所より 8 週齢で購入し、クリーンラックで 5～7 日間飼育後、実験に供した。intestinal epithelial assay と lung micrometastasis の実験にはメス、大腿部への腫瘍移植実験にはオスマウスを用いた。

2) Intestinal epithelial assay：放射線照射あるいは BLM を投与したマウスの結腸 crypt における上皮細胞の生存数の assay には、Withers らにより開発された microcolony assay を用いた<sup>15)</sup>。すなわち、処置後 5 日目にマウスを殺して大腸を剔出し、パラフィンに封埋して HE 染色組織標本作製した。大腸の横断面 1 スライスごとに、再生している crypt 数を顕微鏡下に算定し、1 つ

以上の幹細胞より再生している crypt に対して、Poisson correction を用いて生存細胞数を算出した。1 実験点あたり 5 匹のマウスを用い、マウスあたり異なる 2 ケ所より標本を採取して、10 枚のスライドより得られた生存細胞数の平均値から、1 実験点を図示した。

3) 移植腫瘍：C<sub>3</sub>H マウスに methylcholanthrene で誘発した線維肉腫 (FSa) を移植腫瘍に用いた。摘出した腫瘍より壊死部分を除去し、トリプシン処理により単一細胞浮遊液を作製した<sup>16)</sup>。トリパンプルーによる腫瘍細胞の viability は約 90～95% であった。腫瘍の移植には下記の 2 通りの方法を用いた。

(1) leg tumor：8～9 週齢のオス C<sub>3</sub>H マウスの右大腿部皮下に、2～3 × 10<sup>6</sup>/mouse の FSa 細胞を移植し、腫瘍の直径が 8mm に達したところで治療を行なった。治療後、ノギスを用いて腫瘍の 3 方向を週 3 回計測し、腫瘍の形態を楕円体として容積を算出して腫瘍サイズとした。治療時のサイズが 5 倍に達するまでに要した日数を各マウスについて算出し、1 群 7～8 匹のマウスを用いて平均日数を求め、各群の 5 倍の容積に達するまでの日数とした。無治療腫瘍が 5 倍に達するまでの日数を対象群として、各治療群の日数より対象群の日数を差し引き、growth delay を算出した。

(2) lung micrometastases：本実験には 8～9 週齢のメスマウスを用い、腫瘍移植の前日に 5Gy の全身照射を行なっておく。上述の如く作製した単一細胞浮遊液を 2 分し、1 群は 100Gy の大線量を照射して生細胞がないように処理する。この大線量照射 FSa 細胞 4.8 × 10<sup>6</sup>/ml と、もう 1 群の非照射生細胞 8 × 10<sup>4</sup>/ml を混和し、マウス 1 匹あたり 0.25ml を尾静脈より静注し、人工肺転移巣を作製した<sup>17)</sup>。腫瘍移植前日の全身照射と、大線量照射細胞を生細胞に混和する手技は、一定の肺転移巣を作製するのに有効である。腫瘍移植 4 日目に局所的に胸部の治療照射を行ない、照射 13 日目にマウスを殺し、肺を剔出してブアン液で固定した。したがって、照射 24 時間前に Bleomycin (BLM) を投与した群は、移植 3 日目に投与を開始した。無治療対象群は、腫瘍移植 14 日目に肺を剔出した。

肺にできた人工肺転移結節数を肉眼的に算定し、1群7匹のマウスを用いて平均値と標準誤差を算出した。

## 2. 培養細胞実験

1) 培養細胞：本実験には chinese hamster 由来の  $V_{79}$  細胞を用いた。継代培養、実験に用いた細胞ともに、37°C、5%炭酸ガス培養器の中で、 $F_{10}$  培地 (Gibco) に10% fetal bovine serum (Gibco) を添加した培地を用いて静置培養した。10<sup>6</sup>個の  $V_{79}$  細胞を60mm プラスチックシャーレ (Falcon, 3002) に播種し、24~36時間後の対数増殖期にあるものと、5日間連日新鮮な培地に交換して培養を続け、plateau phase にあるものの2種を実験に用いた。

2) 効果判定：各種処理後、0.1%トリプシン液処理により細胞浮遊液を作製し、その1部をプラスチックシャーレ (上述) に移し、colony を形成させ生存率により判定した。移植する細胞数は、生存細胞数がシャーレあたり50~100個になるよう希釈調整した。6日間37°C、5%炭酸ガス培養器の中で静置培養した後、95%エチルアルコール中に0.2%にクリスタルバイオレットを含む染色液で染色し、肉眼で colony 数を算定した。1つの実験点は5枚のシャーレより得られた値の平均値である。dose-response curve には平均値と標準偏差を示し、曲線は weighted least squares regression analysis により算出した。

## 3. Bleomycin (BLM)

BLM を動物に投与する場合は、マウス体重(g)あたり0.01mlを注射するように薬剤を生理食塩水で溶解し、調整後腹腔内に投与した。培養細胞に用いた場合は、濃度による影響を検討した実験以外は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, 0.02M, pH7.0) を用いて、1000 $\mu$ g/mlの溶液を作製し、終末濃度が30 $\mu$ g/mlになるように培地に混和して調整した。BLM の処理時間は1時間とし、処理後直ちに BLM を含む培地を除き、処理細胞面を0.02M PBS (pH7.0) で3回洗浄後、新鮮な培地と交換するかトリプシン処理を行なった。

## 4. 放射線照射

lung micrometastases と培養細胞の照射は、

200KVp, 20mA の X 線 (島津, 信愛号, 半価層1.5 mmCu) を線量率60cGy/min にて用い、lung micrometastases の治療は胸部のみを局所照射した。intestinal epithelial assay などの全身照射には6MV リナック X 線 (三菱 ML6MA) を2 Gy/min にて用い、大腿部腫瘍の治療は6MV の電子線を3 Gy/min で用いた。電子線照射は腫瘍の上に5mm厚の水等価物質 (フローティーション・ベット・パット, サクラ医療器) を bolus に置き、右下肢のみを局所的に照射した。すべてのマウスの照射は、固定具で固定し無麻酔下に行なった。

## 5. Flow Cytometry (FCM) 解析

単一細胞浮遊液とした後、遠沈した細胞を70%冷エタノールで固定して、解析時まで4°Cに保存した。FCM 解析の1時間前に、12.5%エタノール中に50 $\mu$ g/ml の mithramycin, 7.5mM MgCl<sub>2</sub> を含む溶液に再浮遊・染色して、457nm の波長のレーザーを用いて細胞中の DNA 量を測定した<sup>18)</sup>。

### 実験結果

#### 1. $V_{79}$ 細胞の Proliferative Phase と Plateau Phase の細胞の Flow Cytometry 解析

$V_{79}$  細胞の播種36時間後と5日目、すなわち、proliferative phase と plateau phase の細胞の FCM 解析の結果を Fig. 1 に示した。proliferative phase に比べて plateau phase の細胞は、S、G<sub>2</sub>+M 期の細胞の割合が著しく低下し、G<sub>2</sub>+M

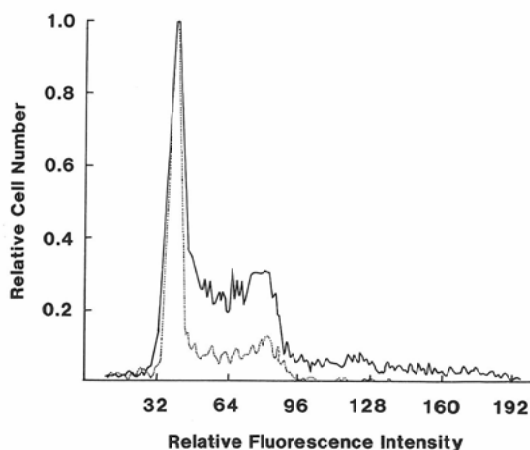


Fig. 1. Flow cytometric measurements of  $V_{79}$  cells in the exponentially proliferative phase (—) and in the plateau phase (·····).

期の細胞は全体の5%以下になっていたが、細胞分裂の完全停止は起こっていない。しかし、plateau phaseの細胞は大部分がG<sub>1</sub>like stageにあった。

## 2. BLMの単独投与効果

### 1) 動物実験

BLM 50, 100mg/kgを腹腔内投与5日後、Cryptの生存細胞数をintestinal epithelial assayにて検討したが、無治療対象群と差異を認めなかった。

腫瘍に対しては、BLM25, 50mg/kgの投与にて、leg tumorとlung micrometastasisの治療効果を検討したが、無治療群との間に有意差はなかった。

### 2) 培養細胞

BLM15, 30, 60, 90, 120 $\mu$ g/mlを1時間作用させ、処理後直ちにトリプシン処理により単一細胞浮遊液をつくり、生存率を検討してFig. 2に示した。proliferative, plateau phaseいずれの細胞も、30 $\mu$ g/mlに変移点をもつ2相性の生存曲線となった。proliferative phaseの細胞は、30 $\mu$ g/ml以上の濃度ではほぼ一定の生存率となったが、plateau phaseの細胞は低濃度でもproliferative

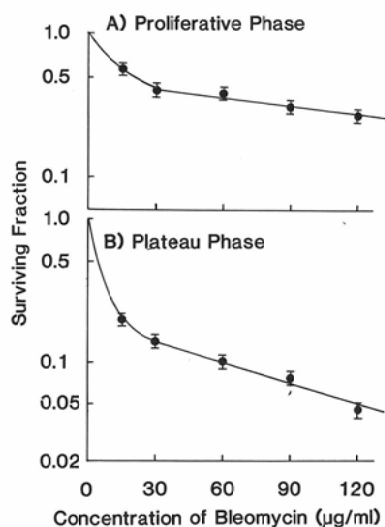


Fig. 2 Cell survival curves as a function of bleomycin concentration for cells in the proliferative phase (top) and in the plateau phase (bottom).

phaseの細胞より生存率は低く、さらに、30 $\mu$ g/ml以上の濃度で生存率は低下しつづけた。すなわちplateau phase細胞の方が、BLMに対する感受性が高く濃度依存性も大きいことを示していた。

## 3. BLMと放射線の併用効果と投与間隔の影響

### 1) 動物実験

#### (1) 腸管上皮に対する障害

マウスに13.5Gyの全身照射を行なうとともに、BLM100mg/kgを照射48時間前より48時間後までの間に適宜投与して、その併用効果を結腸のintestinal epithelial assayにより検討し、Fig. 3に示した。照射48~24時間前にBLMを併用しても、腸管上皮細胞数は照射単独の場合と同様で、併用効果はみられなかった。しかし、照射24~0時間前にBLMを投与すると、腸管上皮細胞数は照射単独の場合に比べて減少し、特にBLMを照射2時間前に投与すると著しい生存細胞数の減少が認められた。照射後BLMを併用した場合は、照射単独よりは生存細胞数が多少減少したが、照射数時間前に投与した場合と異なり、著しい併用効果はみられなかった。

#### (2) 腫瘍に対する併用効果

マウスの大腿部に移植した腫瘍が8mmに達したところで、20Gyの局所照射を行ない、BLM50mg/kgを照射24, 6, 2, 0時間前、照射2, 6, 24時間後に併用した。各治療群の腫瘍容積が5倍に達するまでに要した日数より、無治療対象群の腫瘍

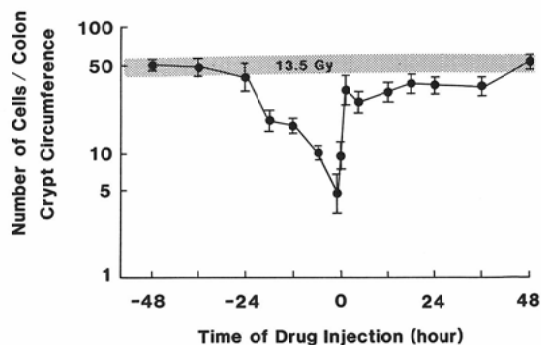


Fig. 3 Crypt cell survival as a function of time between administration of bleomycin (100mg/kg) and irradiation (13.5Gy).

容積が5倍になるのに要した日数を引いたgrowth delayをTable 1に示した。照射6～2時間前にBLMを投与した群では、照射後BLM投与群よりやや大きなgrowth delayを示したが、20Gy照射単独群との間には有意な差が認められなかった。

Table 2は4日目の人工肺転移巣を、BLM30 mg/kgと7.5Gyの放射線で治療した場合の肺の腫瘍結節数である。大腿部腫瘍と同様に、BLMは照射24, 6, 2, 0時間前、照射2, 6, 24時間後に投与した。併用群は照射単独群に比べて腫瘍結節数が多少減少し、併用効果を思わせるが、両者の併用間隔の差異による違いは認められなかった。

## 2) 培養細胞に対する併用効果

Table 1 Growth Delays from Tumor Volumes at Treatment to 5 Fold

Treatment	Growth Delay (M±S.E.)
Radiation alone (20Gy)	23.4±3.0 days
BLM (50mg/kg) alone	2.0±1.2
BLM 24 hrs before Radiation	23.4±9.8
" 6 " "	29.9±3.6
" 2 " "	27.9±6.6
" 0 " "	22.1±5.5
" 2 after " "	21.0±3.1
" 6 " "	22.9±4.4
" 24 " "	22.0±1.5

Growth Delay: difference between times needed to gave 5 fold increase in a volume of treated and untreated tumors.

Table 2 Numbers of Lung Nodules

Treatment	No. of Lung Nodules (M±S.E.)
No Treatment	146±16
Radiation (7.5Gy) alone	78±11
BLM (30mg/kg) alone	122±17
BLM 24 hrs before Radiation	60±9
" 6 " "	69±11
" 2 " "	71±7
" 0 " "	59±13
" 2 after " "	63±10
" 6 " "	74±6
" 24 " "	62±9

proliferative phaseとplateau phaseのV<sub>79</sub>細胞に対して、7.5Gyの照射とBLM30μg/mlを併用して細胞生存率を検討した。BLMを照射3時間前より2時間後まで30分毎に1時間作用させた場合の生存率をFig. 4に示した。照射1時間前にBLMを作用させた群は、BLMを除いて直ちに照射し、0時間とは照射後直ちにBLMを加えたことを意味する。したがって、照射中BLMが存在した群は、照射30分前にBLMを加えたもののみとなる。放射線によるPLD回復の影響を除外するため照射は一斉に行ない、すべての細胞の処理が終了するまで処理を終えた細胞は37℃に保ち、一斉にトリプシン処理を行なった。BLM処理からトリプシン処理までの時間が各群異なり、BLM作用に対するPLD回復がまちまちにおこっている可能性があるため、それぞれの点に対応するBLM単独作用の生存率を求め、併用群で得られた生存率をBLM単独作用により得られた生存率で割り算した値を図示した。すなわち

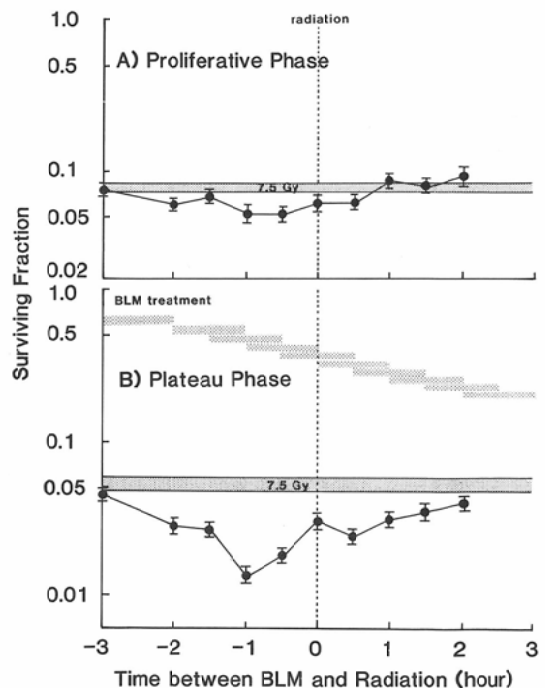


Fig. 4 V<sub>79</sub> cell survivals in the proliferative phase (top) and in the plateau phase (bottom) as a function of time between administration of bleomycin (30μg/ml) and irradiation (7.5Gy).

生存率＝

$$\frac{\text{併用療法後トリプシン処理まで} \\ 37^\circ\text{Cに保った細胞生存率}}{\text{BLM 単独作用後トリプシン処理まで} \\ \text{併用群と同じ期間}37^\circ\text{Cに保った細胞生存率}}$$

として、BLM と放射線の併用効果から、BLM 単独作用を差し引いてあるため、もし相加作用なら併用作用で得られた生存率と、放射線単独作用で得られる生存率は同一となる。

proliferative phase の細胞は BLM と放射線を併用しても、BLM 単独作用を差し引くと、照射1時間～30分前に BLM を併用した群で、生存率が放射線単独の場合よりわずかに低下しているが、両者はほぼ相加的に作用していると考えられる。一方、plateau phase の細胞では、併用群の生存率は BLM 単独の作用を差し引き後も、放射線単独作用による生存率より有意に低く、両者の間に相乗作用があることが示唆された。特に照射1時間前に BLM を併用した場合、生存率は最低となった。

#### 4. 併用時の線量反応関係

##### 1) 動物実験

腫瘍に対する BLM と放射線の併用効果は、放射線単独効果と比べて明確な修飾作用を示さなかったため、結腸上皮に対してのみ線量反応関係を検討した。放射線照射2時間前と2時間後に BLM 100mg/kg を併用し、intestinal epithelial assay

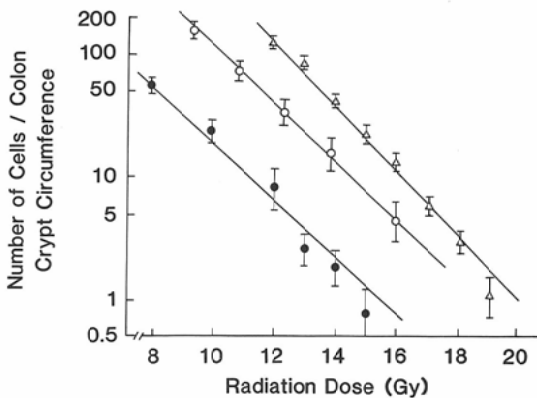


Fig. 5 Radiation survival curves for intestinal crypt cells exposed to irradiation alone ( $\Delta$ ), with bleomycin (100mg/kg) 2 hours before irradiation ( $\bullet$ ) or with the drug 2 hours after irradiation ( $\circ$ ).

にて定量した結腸の上皮細胞数と照射線量との関係を Fig. 5 に示した。照射単独に比べて BLM 併用群の dose-response curve は、いずれも左方に移動しているが、照射2時間前に BLM を投与した場合は著しい左方移動がみられ、dose modifying factor は1.4となった。しかし、曲線の傾きはほとんど変化がなく、Dg 値の変化が示唆された。

##### 2) 培養細胞

BLM ( $30\mu\text{g/ml}$ ) を照射1時間前と、照射直後に作用させた場合の dose-response curve を Fig. 6 に示した。併用時の生存率は BLM 単独作用により得られた生存率で割り算して図示してある。proliferative, plateau phase いずれの細胞も、照射直後に BLM を作用させた場合は、放射線単独作用の場合とほぼ同じ生存率を示した。一方、照射1時間前に BLM を作用させると、proliferative phase の細胞は生存曲線がわずかに左方に移動したのに対して、plateau phase の細胞の左方移動は著明で、BLM と放射線の相乗作用が確認された、いずれの生存曲線も傾きは放射線単独

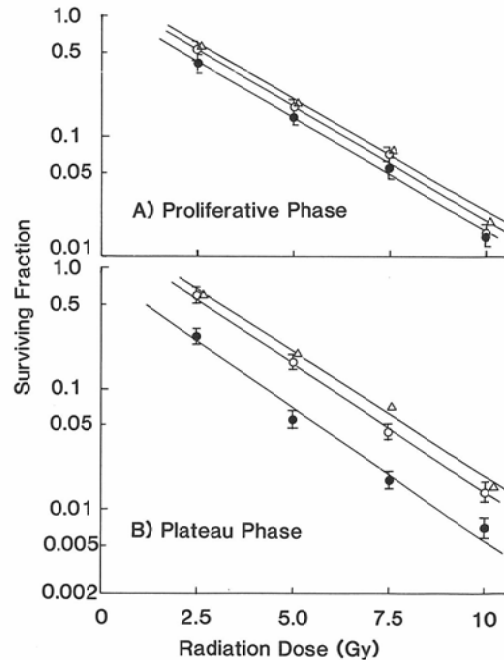


Fig. 6 Radiation survival curves for  $V_{79}$  cells exposed to irradiation alone ( $\Delta$ ), with bleomycin ( $30\mu\text{g/ml}$ ) 1 hour before irradiation ( $\bullet$ ) or with the drug immediately after irradiation ( $\circ$ ).

照射の場合と同じで、併用群では、Dg 値が小さくなっていることが示唆された。plateau phase の細胞に BLM を併用した場合の dose modifying factor は 1.4 となった。

### 5. Plateau Phase の細胞の Potentially Lethal Damage (PLD) の回復

plateau phase の細胞に対して、7.5Gy 照射 1 時間前と直後に BLM 30 $\mu$ g/ml を 1 時間作用させ、BLM 作用後 0～3 時間 37 $^{\circ}$ C に保ち、PLD 回復を検討して Fig. 7 に示した。BLM 単独作用の場合は、1 時間後に最大の回復に達し約 2.5 倍の生存細胞数が認められた。BLM と放射線照射併用群では、照射直後に BLM を作用させた場合は、BLM 単独作用の場合と同様に、約 1 時間後に最大となる PLD 回復が認められ、その程度も BLM 単独作用の場合と同じであった。一方、BLM を照射前に作用させておくと、多少の PLD 回復はみられたが、BLM 単独あるいは照射後作用させた場合に比べて、回復の程度は少なかった。

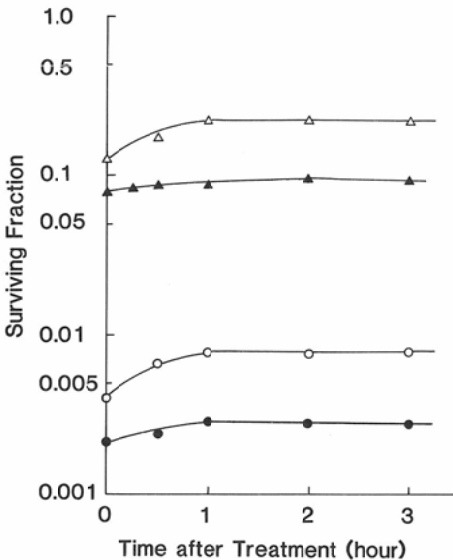


Fig. 7 Recovery of V<sub>79</sub> cells in the plateau phase as a function of time (at 37 $^{\circ}$ C) between treatments and trypsinization. The treatments are as follows: bleomycin (30 $\mu$ g/ml) alone ( $\Delta$ ), a dose of 7.5Gy alone ( $\blacktriangle$ ), bleomycin (30 $\mu$ g/ml) was given immediately after a dose of 7.5Gy ( $\circ$ ) or the drug given 1 hour before irradiation ( $\bullet$ ).

BLM 処理直後 (0 時間) における生存率を、照射前に BLM を作用させた場合と照射後作用の場合で比較すると、前者は後者に比べて明らかに低下している。したがって、plateau phase の細胞では BLM を照射 1 時間前に併用すると相乗効果が認められるのは、PLD 回復の抑制と BLM の殺細胞効果によることが示唆される。

### 考 察

放射線と BLM を併用して子宮頸癌の治療を行なった場合、直腸・結腸障害が高頻度に発生したため<sup>9)</sup>、併用時の結腸上皮の生存細胞数を動物実験により検討した。BLM を放射線照射前に投与すると、結腸上皮の生存細胞数は相乗的に減少したが、Phillips らも小腸上皮細胞を用いて同様の結果を報告している<sup>19)</sup>。相乗作用の出現する理由として、(1) sublethal damage の回復を BLM が抑制する、(2) BLM が G<sub>2</sub>-M 期に細胞を同調し、放射線感受性を高くする、(3) BLM そのものの殺細胞効果、が考えられ、Phillips らは BLM の殺細胞効果を主因と推測した<sup>19)</sup>。いずれにしても、相乗効果が認められる場合は、dose-response curve の shoulder が消失してくることで一致している<sup>20)</sup>。

腫瘍に対する BLM と放射線の併用効果は、Twentyman らが投与スケジュールに関係なく、相加効果しかないと報告している<sup>10)</sup>。我々の用いた腫瘍は BLM に対する感受性が低く、併用効果が認めにくい欠点はあるが<sup>11)</sup>、大腿部の大きな腫瘍は併用間隔、順序に関係なく併用効果は明らかでなかった。腫瘍内には正常組織と異なり多数の hypoxic cells が存在し<sup>21)</sup>、この細胞が腫瘍の BLM に対する感受性を低下させ<sup>22)</sup>、併用療法時に正常組織と異なる反応をおこしている可能性がある。そこで 8mm の大きなサイズの腫瘍と共に 4 日目の人工肺転移巣を用いて検討した。4 日目の人工肺転移巣は約 15～20 個の腫瘍細胞からなり、hypoxic cells はほとんど存在しない腫瘍と考えられる。人工肺転移巣は BLM に対してある程度の感受性を示したが、いずれのサイズの腫瘍でも投与スケジュールに関係なく、相加効果しか認められず、Twentyman の報告と一致した。



BLM と放射線の併用時に、腸管に対して相乗効果、腫瘍には相加効果が認められたが、その原因が細胞の種類の違いによる本質的な差によるのか、細胞のおかれている状態によるかを検討するため、 $V_{79}$ 細胞の proliferative phase と plateau phase を用いて、投与スケジュールの違いによる併用効果を検討した。

BLM 単独投与に対する反応を、plateau phase と proliferative phase の細胞で比較した報告では、前者の感受性が相対的に高いとするもの<sup>23)</sup>と、低いという報告<sup>24)</sup>がある。plateau phase の細胞は培養条件に依存性が高く、培地中の必要な物質の欠乏、毒性物質の蓄積、pH の変化、あるいは Bleomycin-hydrolase の活性などの因子が変化、BLM に対する感受性が変動するため、実験結果が一定しないといわれている<sup>12)</sup>。さらに plateau phase の細胞を用いた実験は、腫瘍内の non-cycling cells のモデルとして考えた場合、in vivo の腫瘍における non-cycling の腫瘍細胞に対する研究手段に乏しく、実験の意義が不明とされ<sup>12)</sup>、BLM に対する腫瘍細胞の感受性の研究では、plateau phase の細胞は重視されていない。

我々の用いた培養条件では、plateau phase における細胞は大部分が  $G_1$ -like stage にあり、proliferative phase の細胞に比べて BLM に対する感受性が高くなっていた。この条件下に、plateau phase の細胞を用いて放射線と BLM の併用効果を検討すると、投与スケジュールが併用効果に及ぼす影響や相乗効果の出現が、proliferative phase の細胞に比べて明確になった。この反応は、腸管上皮細胞に認められた反応と極めて類似していた。dose-response curve による解析でも、腸管上皮細胞と plateau phase の細胞は同一の傾向を示し、 $D_0$  には変化がなく  $D_g$  が小さくなり、dose-modifying factor も両者いずれも 1.4 であった。両者の一致が偶然である可能性も否定できないが、分裂休止期にある細胞が主体を占めると考えられる正常組織と plateau phase の細胞の類似点は、治療に対する正常組織の反応を、in vitro の実験から予想する上での 1 つのモデルとして、考慮しておく必要があると思われる。

本実験では、腸管上皮細胞は照射 2 時間前に、plateau phase の細胞では 1 時間前に BLM を投与すると、明らかな相乗効果がみられることを示した。照射前に BLM を併用すると相乗効果が認められるという同様の報告が多い<sup>25)</sup>。BLM の細胞に対する作用はいろいろ報告されているが、主な殺細胞効果は DNA 鎖の切断と考えられている<sup>26)</sup>。一方、この DNA 鎖の切断は修飾が極めてはやくおこり<sup>27)</sup>、proliferative phase、plateau phase いずれの細胞にも PLD 回復が認められている。BLM と放射線を併用すると腸管上皮細胞に対して相乗効果を示したが、その機序の解明に同一の反応を示す plateau phase の細胞を用いて、in vitro で PLD 回復を検討した。plateau phase の細胞は BLM が照射前に投与されると、照射後 BLM が投与された場合に比べて、PLD 回復が抑制され、相乗効果の一因として PLD 回復の抑制が関与すると考えられる。しかし、BLM 処理後直ちにトリプシン処理を行なっても、照射前・後の BLM 投与は生存率に明らかな差を生じ、PLD 回復の抑制のみでは相乗効果を説明することはできない。前述の如く、Phillips らは BLM の殺細胞効果そのものが相乗効果に関与すると報告しているが<sup>19)</sup>、plateau phase の細胞では BLM により DNA 鎖の切断を生じた場合、直後に放射線が作用すると、DNA 切断の修復が抑制され細胞死がおこり、相乗効果が出現するものと推測している。したがって、in vitro の plateau phase にあたるような細胞周期の細胞が多く存在し、この細胞が BLM に対して高い感受性を持つ臓器・組織では、放射線照射に BLM を先行させると正常組織の障害が高度になる可能性があると考えられる。

#### まとめ

放射線と Bleomycin (BLM) の併用効果に、両者の投与間隔・投与順序が及ぼす影響を、in vivo と in vitro の実験により比較検討した。in vivo の実験では、正常組織として intestinal epithelial assay により  $C_3H$  マウスの結腸上皮を定量し、腫瘍としては  $C_3H$  マウスに syngeneic な線維肉腫 (FSa) を、大腿部と肺 (人工肺転移) に移植し定量する方法を用いた。in vitro の実験には、 $V_{79}$  細

胞を proliferative phase と plateau phase において用い、コロニーの形成により生存率を求めた。

(1) BLM 単独投与の場合は、in vivo の実験では薬剤の効果を認めなかったが、in vitro の実験では生存率の低下がみられ、特に、plateau phase の細胞は proliferative phase のものより感受性が高かった。

(2) BLM と放射線を併用した場合、明らかな相乗効果は、in vivo では結腸上皮のみに、in vitro では plateau phase の細胞で認められた。最大の効果は結腸上皮では照射 2 時間前に、plateau phase の細胞では 1 時間前に BLM を併用すると出現し、いずれの場合も dose modifying factor は 1.4 と同一になった。

(3) plateau phase の細胞に、照射 1 時間前と照射直後に BLM を併用した場合を比較すると、照射前に BLM を投与した群では、PLD 回復の抑制と殺細胞効果の増強を認めた。

以上のことより、放射線と BLM の併用効果を in vitro の実験により推測する場合、正常組織の反応は plateau phase の細胞の方がよく反映すると思われる。

本論文の要旨は第 29 回日本放射線影響学会（昭和 61 年、金沢）において発表した。また、本研究の一部は、文部省科学研究費（61770802）、成人病研究所記念財団研究助成金（昭和 61 年度）および資生会研究所助成金（理事長大島武雄）によったことを記して謝意を表する。

#### 文 献

- 1) Fu KK: Biological basis for the interaction of chemotherapeutic agents and radiation therapy. *Cancer* 55: 2123—2130, 1985
- 2) Ichikawa T, Nakano I, Hirokawa I: Bleomycin treatment of the tumors of penis and scrotum. *J Urol* 102: 699—707, 1969
- 3) 木村禮代二, 坂井保信, 近田千尋, 他: 悪性リンパ腫の化学療法。—Bleomycin の効果を中心に—, *日本臨床*, 27: 1593—1601, 1969
- 4) 池田 恢, 西山謹, 真崎規江, 他: 口腔底扁平上皮癌の治療成績と放射線治療の役割, *日本医放会誌*, 45: 877—893, 1985
- 5) 伊東久夫, 土器屋卓志, 吉岡達夫, 他: 子宮頸癌治療における高線量率腔内照射法とブレオマイシンの併用効果に関する検討, *癌と化学*, 6: 1433—1438, 1979
- 6) Shanta V, Krishnamurthi S: The combined therapy of oral cancer. (In) Carter SK, Ichikawa T, Mathe G eds: *Fundamental and Clinical Studies of Bleomycin*. 159—170, 1976, University Park Press, Baltimore
- 7) Shah PM, Shukla SN, Patel KM, et al: Effect of bleomycin-radiation combination in management of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 48: 1106—1109, 1981
- 8) Earle JD, Gelber RD, Moertel CG, Hahn RG: A controlled evaluation of combined radiation and bleomycin therapy for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 6: 821—826, 1980
- 9) Takabe Y, Miyamoto T, Watanabe M, et al: Synergism of X-rays and bleomycin on ehrlich ascites tumor cells. *Br J Cancer* 36: 391—395, 1977
- 10) Twentyman PR, Kallman RF, Brown JM: The effect of time between X-irradiation and chemotherapy on the growth of three solid mouse tumors. V. Bleomycin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5: 1499—1501, 1979
- 11) Molin J, Sogaard PE, Overgaard J: Experimental studies on radiation-modifying effect of bleomycin in malignant and normal mouse tissue in vivo. *Cancer Treat Rep* 65: 583—589, 1981
- 12) Twentyman PR: Bleomycin-Mode of action with particular reference to the cell cycle. *Pharmac Ther* 23: 417—441, 1984
- 13) Bienkowska ZW, Dawson KB, Peacock JH: Action of actinomycin, bleomycin and X rays on HeLa cells. *Brit J Radiol* 46: 619—621, 1973
- 14) Terashima T, Takabe Y, Yasukawa M: Combined effects of X-rays and Bleomycin on cultured mammalian cells. *Gann* 66: 701—703, 1975
- 15) Withers HR, Mason KA: The kinetics of recovery in irradiated colonic mucosa of the mouse. *Cancer*, 34: 896—903, 1974
- 16) Ito H, Barkley T, Peters LJ, et al: Modification of tumor response to cyclophosphamide and irradiation by preirradiation of the tumor bed. Prolonged growth delay but reduced curability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11: 547—553, 1985
- 17) Milas L, Hunter N, Ito H, et al: Effect of tumor type, size and endpoint on tumor radioprotection by WR-2721. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10: 41—48, 1984
- 18) Hunter N, Peters LJ, Gradina DJ, et al: Radiation sensitivity of murine fibrosarcoma cells

- separated by centrifugal elutriation. *Radiat Res* 80 : 389—397, 1979
- 19) Phillips TL, Ross GY, Goldenstein LS, et al : The interaction of radiation and bleomycin in intestinal crypt cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5 : 1509—1512, 1979
- 20) Wharam MD, Phillips TL, Kane L, et al : Response of a murine solid tumor to in vivo combined chemotherapy and irradiation. *Radiology* 109 : 451—455, 1973
- 21) Thomlinson RH, Gray LH : The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Brit J Cancer* 9 : 539—549, 1955
- 22) Roizin-Twvle L, Hall EJ : The effect of bleomycin on aerated and hypoxic cells in vitro, in combination with irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5 : 1491—1494, 1979
- 23) Ray GR, Hahn GM, Bagshaw MA, et al : Cell survival and repair of plateau-phase cultures after chemotherapy-relevance to tumor therapy and to the in vitro screening of new agents. *Cancer Chemother Rep* 57 : 473—475, 1973
- 24) Mauro F, Falpo B, Briganti G, et al : Effect of antineoplastic drugs on plateau phase cultures of mammalian cells. II. Effects of bleomycin and hydroxyurea. *J Natn Cancer Inst* 52 : 715—722, 1974
- 25) 増田康治, 高木東介, 脇坂信一郎 : X線とブレオマイシンの併用効果に関する基礎的検討, 日医放会誌, 42 : 691—700, 1982
- 26) Terashima T, Yasukawa M, Umezawa H : Breaks and rejoining of DNA in cultured mammalian cells treated with bleomycin. *Gann* 61 : 513—516, 1970
- 27) Moore CW, Little JB : Rapid and slow DNA rejoining in non-dividing diploid fibroblasts treated with bleomycin and ionizing radiation. *Cancer Res* 45 : 1982—1986, 1985
-