Osaka University Knowledge Archive

Title	ラット皮下移植グリオーマに対する放射線と5-FU の併用効果
Author(s)	高橋, 康; 片倉, 隆一; 吉本, 高志 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1992, 52(7), p. 1016-1023
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17693
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

日本医放会誌：52（7），1016—1023，1992（平4）

ラット皮下移植グリオーマに対する放射線と5-FUの併用効果

東北大学脳研脳神経外科
* 東京医科歯科大学歯学部歯科放射線学教室
高橋　康　片倉　隆一　吉本　高志
鈴木　二郎　佐々木武仁*

（平成3年5月17日受付）
（平成3年11月13日最終原稿受付）

Analysis on Combined Effect of X-rays with 5-FU on Rat Subcutaneous Gliomas

Kou Takahashi, Rhuichi Katakura, Takashi Yoshimoto, Jiro Suzuki and Takehito Sasaki*
Division of Neurosurgery, Institute of Brain Diseases, Tohoku University School of Medicine
*Department of Dental Radiology and Radiation Research, Tokyo Medical and Dental University

Research Code No. : 407

Key Words : Rat glioma, Radiotherapy, 5-FU, Combined therapy, Potentially lethal damage

In a series of experiments on the combined use of radio- and chemotherapy for malignant glioma, X-rays combined with ACNU or 5-FU treatment caused a supra-additive effect on multicellular spheroids in vitro. In the present experiment, the effect of X-rays combined with 5-FU treatment on subcutaneously transplanted rat gliomas of RGC-6 cells was analyzed. The dose-survival curve for X-rays given to tumors in air-breathing rats was biphasic with a terminal slope (D_0=4.3 Gy) that was parallel to that for tumors in previously killed rats. The hypoxic cell fraction thus obtained from the ratio of the surviving fraction in two parallel curves at 20 Gy was about 7% in the subcutaneous tumors in air-breathing rats. X-ray-induced, potentially lethal cellular damage recovered within 8 hours in these tumors. The surviving fraction of cells in the tumors decreased to a minimum at 4—6 hours after a 5-FU injection, but increased thereafter. A biphasic dose-response curve for 5-FU was also obtained for cells in these tumors, indicating the presence of 5-FU resistant cells. The effect of X-irradiation given at about 8 hours after a 5-FU injection was greater than the additive effect of both agents acting independently. This was true when an X-ray dose of more than 5 Gy was given.

I. はじめに

悪性グリオーマの治療では，手術療法単独よりも，放射線療法，化学療法，免疫療法などを併用した方が治療成績が向上することが報告されている[1)~4)]．しかし，悪性グリオーマに対する放射線療法は，周囲正常脳組織の照射を避けられないため線量に限度があり，また，ヒト悪性グリオーマ細胞は，ヒト悪性腫瘍細胞の中では，本来最も放射線抵抗性である[5)]．このため，脳の耐容線量限度内で局所制御を達成するには，併用療法によって何等かの増感効果を必要とする．

我々も，悪性グリオーマの補助療法として，放射線療法に化学療法として，1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-2(chloroethyl)-

3-nitrosourea hydrochloride（ACNU）と5-fluorouracil（5-FU）の併用療法を行ってきたが，一方これら3者の併用効果に関する基礎的実験として，培養グリオーマモデルである壊死部のある多細胞スフェロイドを用いて放射線とACNU，放射線と5-FU及びACNUと5-FUの併用効果を検討し報告してきた[6)~10)]．しかし培養下のスフェロイドと生体内の腫瘍とでは，薬剤の代謝動態や腫瘍への移行性などが異なる可能性があるため，本稿ではX線及び5-FUのより有効な併用方法を生体内グリオーマモデルとしてのラット皮下移植グリオーマを用いて検討した．

II．材料及び実験方法

1．培養細胞

N-nitrosomethylureaによって誘発されたラットグリオーマ細胞（Rat Glioma clone-6細胞；RGC-6細胞）[11)]を10％牛胎児血清（fetal bovine serum：FBS，Flow Laboratories）を添加したEagle's Minimum Essential Medium（MEM）Earle's液（非不可欠アミノ酸，1mMピルビン酸ナトリウム，ペニシリン，ストレプトマイシン含有）を用いて，37℃，5％CO_2＋95％air，100％湿度の条件下で，培養した．実験には，継代24時間目の対数増殖期の細胞を用いた．単層培養細胞からの単離細胞浮遊液は，0.04％ベルセン加0.1％トリプシン液を10分間作用後20回ピペッティングして作製し，エリスロシンB液で染まらない生細胞（99％以上）を算定した[12)]．

2．ラット皮下腫瘍

4週齢（体重80～100g）の雄Wistar rat（実験動物研究所，静岡）を購入し，さらに1週間飼育してから実験に使用し，腋窩，そけい部の皮下4カ所にRGC-6細胞2×10^6個を0.1mlの浮遊液として移植し，10日目の直径7～9mmの腫瘍を実験に使用した．

3．X線照射及び薬剤投与

腫瘍へのX線照射は，ラットを腹臥位とし，四肢を木板に固定後，自発呼吸下，あるいは照射5分前にラットをジエチルエーテル麻酔によって殺した後にそれぞれ全身照射にて行った．単離浮遊細胞は直径35mmのプラスチックシャーレに2mlの単離浮遊細胞液を入れ，室温にて照射した．X線照射には，島津深部治療用X線装置（SHT 250 M-3）を用い，250KV，20mA，フィルターは0.5 mmCu＋1mmAl，焦点表面間距離60cm，線量率0.63Gy/minの条件で行った．線量率は，ラットの皮下に熱蛍光線量計素子（UD-170L，Be0，松下電器）を埋め込み，X線照射後熱蛍光線量計（UD-5129P，松下電器）にて測定した．

5-FU（Hoffman-La Roche社製）は，室温で必要量を生理食塩水にて溶解し，0.2mlを腹腔内に投与した．

4．細胞生存率

細胞生存率は，in vitroの実験では，単離細胞浮遊液を作製し，稀釈後60mmプラスチックシャーレ（NUNC社製）にプレートし，11日間培養後，固定染色し，細胞数50個以上から成るコロニーを数え，対照群のコロニー形成率を100％として推定した[13)]．またin vivoの実験では，腫瘍を摘出し，メスで細切し，培養液，0.1％トリプシン液で各々1回洗浄後，0.04％ベルセン加0.1％トリプシン液で15分間，37℃で振盪処理後最終濃度0.001％になるようにDeoxyribonuclease I（from Bovine pancreas，Sigma Chem，Co.）を加え，さらに1分間37℃で振盪処理した後20回ピペッティングして遠心管に3分間静置し，上清を取り，その上清に同量の培養液を加えた．この酵素処理を3回施行し，2回目と3回目の上清を遠心後（1,200rpm，5分間），上清を捨て，培養液にて単離細胞浮遊液とした．2回目と3回目の処理で腫瘍中のすべてのコロニー形成能のある腫瘍細胞の約50％が単離細胞として得られた．生細胞数はエリスロシンB液を用いて改良型Neubauer血球算定盤にて算定した．これらの細胞のコロニー形成能を二重軟寒天コロニー法[14)]によって推定した．すなわち，プラスチックシャーレ（直径60mm，Falcol社製）に10％FBS加培養液を含む0.5％Noble Agar（Difco社製）で下層を作製し，その上に10％FBS加培養液を含む0.3％Noble Agar培地で適当な細胞濃度に稀釈した細胞をプレーティングした．その後単層培養細胞と同一の条件下で21日間培養し，顕微鏡下で直径200μm以上のコロニーを数

え，細胞生存率を算定した．1つの実験点は少なくとも3個の腫瘍の平均値と標準誤差（図中の点と範囲）によって示した．尚，この条件下でのコロニー形成率は25～40%である．

細胞生存率曲線の解析は多標的1ヒットモデルを用いた．

III. 結　　果

1）X線の細胞致死効果

X線照射による線量―細胞生存率曲線を，Fig. 1に示す．空気呼吸下で担腫瘍ラットをX線照射した時の腫瘍細胞の生存率曲線は5Gyに変曲点をもつ二相性曲線を示し，最終勾配の逆数のDoを最小二乗法で推定すると4.28Gyであった．またラットを殺したanoxiaの状態でX線照射した時のDoは4.73Gyであり，空気呼吸下の場合の生存率曲線の最終Doと統計学的には差がない．皮下腫瘍から単離浮遊細胞を作製し，プラスチックシャーレ中でX線照射した時の細胞生存率曲線は，一相性曲線を示し，Do 1.99Gy，Dq 1.89Gy，n 2.6であり5Gyまでは空気呼吸下のラット皮下腫瘍の生存率と一致した．この曲線とanoxiaの曲線から細胞生存率10^{-1}を得るのに必要な線量比として酸素増感比を計算すると3.3であった．低酸素細胞分画をX線線量20Gyにおける生存率比から推定すると7.0%であった．

X線（15Gy）照射後種々の時間ラットを生存させておいて，その後腫瘍を摘出して細胞生存率を求めた時の，照射後の時間―細胞生存率曲線をFig. 2に示す．照射後8時間位まで時間の経過とともに生存率が上昇し，以後24時間までほぼ一定となった．またX線照射後24時間目に腫瘍を摘出した時の線量―細胞生存率曲線をFig. 3に示す．この曲線はX線照射直後の曲線に比べてすべての線量で生存率が上昇していた．これらのことはX線による腫瘍細胞の潜在的致死損傷（Potentially lethal damage : PLD）はこの実験系の皮下腫瘍内の環境下では短時間に回復できることを示唆している．この細胞のスフェロイドではPLD

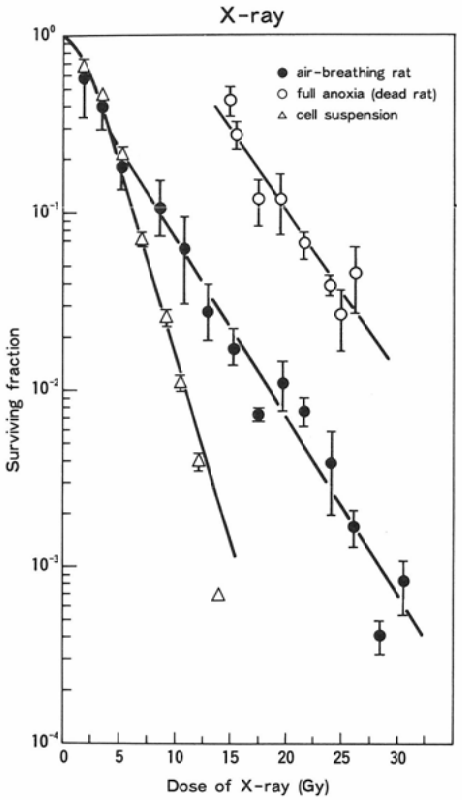

Fig. 1　X-ray dose survival curves for RGC-6 cells in subcutaneous rat gliomas. Tumors in air-breathing rats (●) or in killed rats (○) and tumor cells in suspension (△).

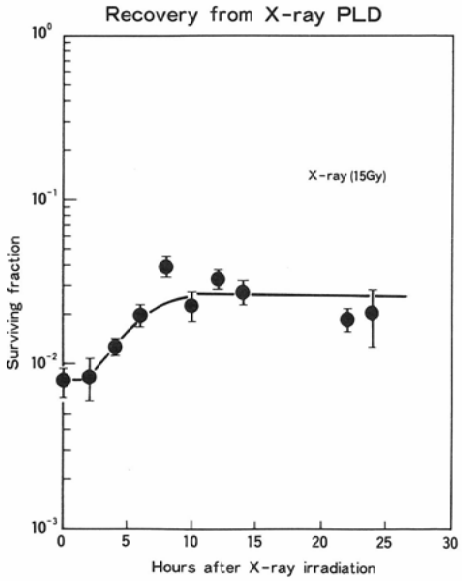

Fig. 2　Surviving fraction of RGC-6 cells in subcutaneous rat glioma was determined at various times after X-irradiation of 15Gy.

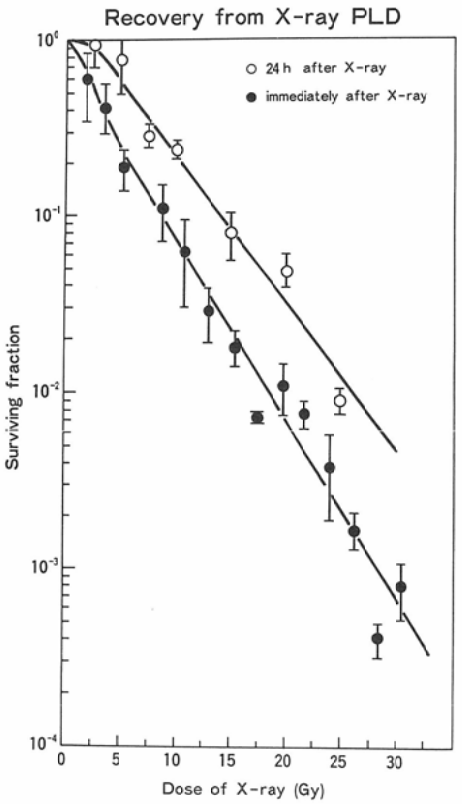

Fig. 3　X-ray dose-survival curves, determined at 0 h (●), 24h (○) after irradiation to subcutaneous rat gliomas.

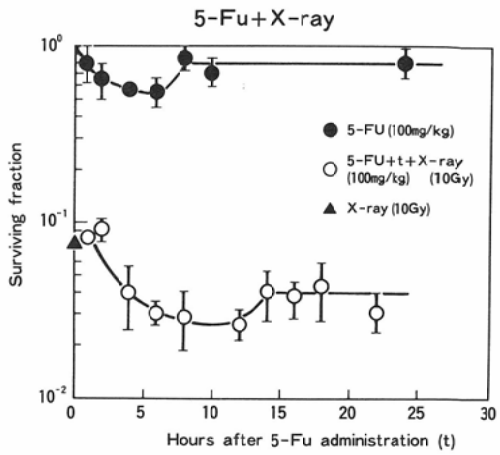

Fig. 4　Time-survial curve (●) for RGC-6 cells in subcutaneous rat gliomas after administration of 5-Fu (100mg/kg). Time-survival curve (○) for RGC-6 cells in subcutaneous rat glioma as a function of time interval between administration of 5-Fu (100mg/kg) and X-irradiation.

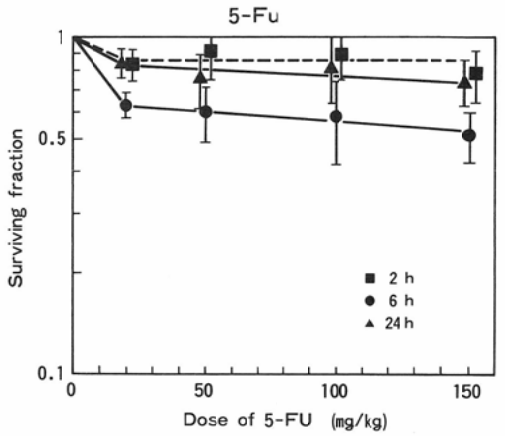

Fig. 5　Dose-survival curves of RGC-6 cells in subcutaneous rat gliomas. Tumors were resected 2h (■), 6h (●), and 24h (▲) after injection of 5-FU.

回復は認められない[8]．

2）5-FU の細胞致死効果

5-FU(100mg/kg)を投与し，種々の時間後に腫瘍を摘出した時の投与後時間―細胞生存率曲線を Fig. 4 の黒丸で示す．細胞生存率は5-FU 投与後，4～6時間で最も低下するが，それ以後では上昇した．この生存率の短時間での増加は5-FU による PLD からの回復と考えられた．5-FU 投与から腫瘍摘出までの時間を2，6及び24時間とした時の投与量―細胞生存率曲線を Fig. 5 に示す．2時間後より6時間後の方が生存率が低く，24時間後では再び高い値を示し，Fig. 4 で示した5-FU 投与後に見られる PLD からの回復と一致した所見を示した．6時間後の投与量―細胞生存率曲線では20mg/kg までは生存率は急峻に低下を示すが，20mg/kg から150mg/kg までは生存率は殆ど低下せず，5-FU に抵抗性細胞の存在が示唆された．

3）5-FU と X 線の併用効果

5-FU (100mg/kg) を投与後種々の時期に X 線(10Gy)を照射し，その直後に腫瘍を摘出した時の細胞生存率曲線を Fig. 4 の白丸で示す．5-FU 投与後6～12時間に X 線を照射した時に生存率が最も低下し，高い併用効果を示した．

5-FU(100mg/kg)投与後8時間と12時間後にお

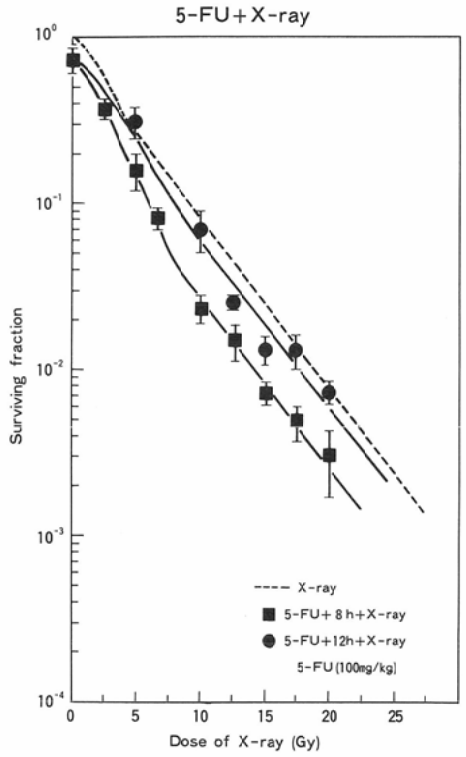

Fig. 6　Dose survival curves of RGC-6 cells in subcutaneous gliomas for X-rays given at 8h (■), 12h (●) after 5-Fu administration. Broken line shows survival curve determined immediately after X-irradiation alone.

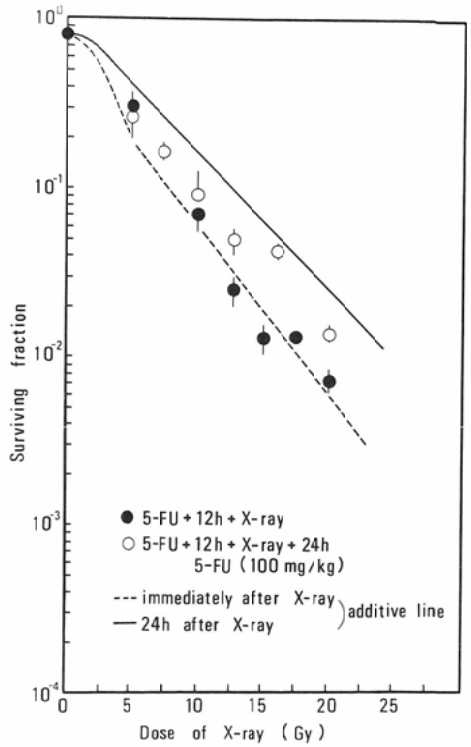

Fig. 7　Effect of 5-FU administration on the recovery from X-ray induced PLD. Subcutaneous rat gliomas were irradiated 12h after 5-FU (100mg/kgd) administration and resected immediately (●) or 24h (○) later. The broken or the solid line represents when the combined effect was additive of both agents acted independently, assayed either immediately (---) or 24h (—) after X-irradiation.

けるX線線量—細胞生存率曲線をFig. 6に示す．5-FU投与後8時間目にX線を照射した時には低線量域でほぼ両者が独立に作用したと想定したときの生存率と同じ値で，相加効果を示し，線量が大きい5Gy以上の場合にわずかに相加効果を上回る効果が得られた．一方，5-FU投与後12時間にX線照射した時には，併用効果は低く，X線単独と殆ど変らなかった．5-FU(100mg/kg)投与後12時間目にX線を照射し，その直後と24時間目に腫瘍を摘出した時の細胞生存率曲線をFig. 7に示す．点線と実線は各々，X線照射直後の細胞生存率曲線（Fig. 3）及びX線照射24時間後の細胞生存率曲線（Fig. 3）と5-FU（100mg/kg）単独の生存率より計算した各々の相加効果曲線の期待値である．5-FUとX線を併用し，直後に腫瘍を摘出した時の曲線は，Fig. 6と同様にほぼ相加効果を示したが，5-FUとX線併用後24時間後の細胞生存率曲線（Fig. 7の白丸）は，併用後24時間後の相加効果曲線（Fig. 7の実線）より低く，5-FUの前投与は見掛け上X線のPLD回復を抑制していることを示している．

IV．考　　察

1）X線線量—細胞生存率曲線について

Thomlinsonら[15]による腫瘍コード構造の壊死部近傍に存在すると考えられている低酸素細胞は放射線抵抗性であると言われている．本実験の皮下グリオーマに対する空気呼吸下でのX線照射による線量—細胞生存率曲線は，5Gyに変曲点を持つ二相性を示し，X線に抵抗性部分の勾配（放

射線感受性)は，anoxia の状態で X 線に照射した時の曲線の勾配とほぼ同じであった．腫瘍からの単離浮遊細胞は oxic であるので，この細胞の生存率曲線と anoxia の生存率曲線を比較すると，細胞生存率10^{-1}を与える等効果線量比(酸素増感比)は3.3で，この値は一般に報告されている酸素増感比[16]とほぼ一致した．以上のことは空気呼吸下で照射した腫瘍には低酸素細胞が存在し，生存曲線の最終勾配はこの低酸素細胞の放射線感受性を表わしていることを示す．空気呼吸下で照射した生存率曲線と anoxia の生存率曲線から，低酸素細胞分画は約7％と算定された．杉山らによれば，RGC-6細胞の中心壊死部のあるスフェロイドには低酸素細胞が存在すると報告している[9]が，ラット培養グリオーマ細胞9L 株によるスフェロイドの X 線による生存率曲線では，低酸素細胞の存在は認められないという報告がある[17]．しかし，ラット培養グリオーマ細胞9L 株による皮下移植細胞を用いた X 線細胞生存率曲線の再検討では，低酸素細胞が存在するとする報告もあり[18]，本実験でも低酸素細胞が腫瘍内に存在するものと考えられた．

2) X 線による PLD からの回復について

PLD からの回復は，X 線照射や薬剤により損傷を受け，通常の状態，例えば対数増殖期，では死に至る細胞が，適当な条件におかれると死に至る筈の細胞(PLD を受けた細胞)が回復して再発能力を持つようになることと定義され[19]，損傷を受けてからの時間経過とともに細胞の生存確率が上昇することによって検出される．

皮下グリオーマに X 線を照射し，直後に細胞生存率を検討した時よりも腫瘍摘出を数時間遅らせて細胞生存率を推定した時の方が，生存率が上昇した．これが真の PLD 回復かどうかを in vivo で証明することは極めて困難である．in vivo においては時間が経つうちに生存細胞が再増殖してくることやコロニー形成能を失った細胞が宿主の抗腫瘍性免疫などの機構によって排除されることなど種々の要因によって，コロニー法で推定する細胞生存率が上昇する可能性があるからである．しかしながら，in vitro における対数増殖期の RGC-6 細胞の doubling time は18時間である[7]ので，生存細胞の増殖によって数時間のうちに生存率が約3倍以上に上昇するとは考えられない．また，コロニー形成能を失った細胞の排除については in vivo では不明であるが，in vitro では数時間内での死細胞出現は15Gy 程度までの線量では見られない．以上のことを考察するならば，皮下グリオーマにおいて X 線照射数時間後にみられる細胞生存率の上昇は X 線による PLD からの回復によると考えられる．

3) 5-FU と X 線の併用について

杉山ら[9]の実験の RGC-6細胞を用いた中心壊死部のあるスフェロイドと本実験の皮下グリオーマとを X 線に対する感受性において比較すると，両者とも二相性の生存率曲線を示し，放射線抵抗性部分の Do は4.3Gy であり，両者とも X 線に対する感受性は酷似している．

ところで薬剤の組織内濃度をスフェロイドと皮下グリオーマで単純に比較することはできないので，薬剤に対する感受性については単純に比較できない．しかし，5-FU の壊死部のあるスフェロイドに対する効果は，処理時間が約10時間から24時間まで変動しても殆ど変らないこと[7]，スフェロイドに対する濃度―細胞生存率関係でも5-FU 抵抗性細胞の存在を示す二相性であること[6]，を考慮すると，両方の実験系を比較できると思われる．スフェロイドに対しては5-FU 濃度50μg/ml，150μ/ml で24時間処理で細胞生存率は各々0.5，0.2であるのに対し[6]，皮下グリオーマに対しては投与量50mg/kg，150mg/kg で効果が最大となる投与後6時間目の細胞生存率は各々0.6, 0.5である．このことは投与量50mg/kg はスフェロイドに対する50μg/ml に匹敵するが，150mg/kg の投与量は150μg/ml よりも効果が低いことを示している．5-FU の効果が皮下グリオーマで低いのは，5-FU の腫瘍内有効濃度が皮下グリオーマで低いためか，または有効時間が短いためと思われるが，詳細は不明である．

5-FU と X 線の併用においては，5-FU による持続的前処理は低酸素細胞の再酸素化におこし，低酸素分画が減少し，このために次の X 線照射に対

する感受性が高まって相加以上の併用効果を示すことがスフェロイドにおいて報告されている[8]．本実験でも5-FU投与後のX線照射時期が適切（8時間位）であれば，わずかに低酸素分画が低下する時期があることが示された（Fig. 6）．5-FUは増殖状態の細胞に選択的に作用するので，結果的にはそれら増殖期の細胞の酸素消費量が減少し，毛細血管から離れた位置にある低酸素細胞にまで酸素が拡散することがその理由として考えられる[8]．

V. 結　論

RGC-6細胞を用いたラット皮下グリオーマを作製し，5-FU及びX線のそれぞれ単独，および併用による細胞致死効果を検討した．

1）X線照射直後のX線線量―細胞生存率曲線は5Gyに変曲点のある二相性を示し，皮下グリオーマ中には低酸素細胞が存在し，定性的には壊死部のあるスフェロイドと類似した．低酸素細胞分画の大きさは約0.3cm³の腫瘍で約7％であった．

2）X線照射後種々の時間に腫瘍を摘出した時には8時間まで生存率の上昇が見られ，以後24時間まで生存率は一定であり，腫瘍細胞のPLD回復が存在すると考えられた．

3）5-FU単独の効果は，投与後4～6時間で最大に達するが，以後PLD回復が認められた．投与量―細胞生存率曲線は二相性となり，5-FU抵抗性細胞の存在が示された．

4）5-FU投与後約6～12時間目のX線照射で併用効果が大きく，特に8時間目にX線照射を行った時には，X線線量が約5Gy以上で相加以上の効果が得られた．

稿を終えるにあたり，御指導を賜りました坂本澄彦教授（東北大学医学部放射線医学教室）に深謝致します．

文　献

1）Greenberg HS, Ensminger WD, Chandler WF, et al: Intra-arterial BCNU chemotherapy for treatment of malignant gliomas of the central nervous system. J Neurosurg 61: 423—429, 1984
2）Levin VA, Wara WM, Davis RL, et al: Phase III comparison of BCNU and the combination of procarbazine, CCNU and vincristine administered after radiotherapy with hydroxyurea for malignant gliomas. J Neurosurg 63: 218—223, 1985
3）Takakura K, Abe H, Tanaka R, et al: Effects of ACNU and radiotherapy on malignant glioma. J Neurosurg 64: 53—57, 1986
4）生塩之敬，阿部　弘，鈴木二郎，他：悪性グリオーマに対するACNU及びACNU-tegaful併用化学療法の効果に関するPhase III study,脳神経, 37: 999—1006, 1985
5）Fertil B, Malaise EP: Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: Analysis of 101 published survival curves. Int J Radiat Oncol Biol Phys 11: 1699—1707, 1985
6）Kitahara M, Katakura R, Mori T, et al: Combined effect of ACNU and 5-FU on rat glioma cells in spheroids and monolayer cultures. Int J Cancer 38: 215—222, 1986
7）Kitahara M, Katakura R, Sasaki T, et al: Experimental combination chemotherapy of ACNU and 5-FU against cultured glioma model (spheroid) and subcutaneous rat glioma. Int J Cancer 40: 557—563, 1987
8）桑原健次，片倉隆一，佐々木武仁，他：培養グリオーマモデル（スフェロイド）における5-FU及びX線の併用効果．Neurol Med Chir (Tokyo) 27: 1139—1146, 1987
9）杉山　聡，森　照明，佐々木武仁，他：グリオーマ細胞に対するX線及びACNUの細胞致死効果―単層培養細胞とスフェロイドにおける比較―．Neurol Med Chir (Tokyo) 24: 758—766, 1984
10）杉山　聡，森　照明，佐々木武仁，他：グリオーマ細胞に対するX線とACNUの併用効果―単層培養細胞とススェロイドにおける解析―，Neurol Med Chir (Tokyo) 25: 707—714, 1985
11）Benda P, Someda k, Messer J, Sweet WH: Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. J Neurosurg 34: 310—323, 1971
12）Phillips H: Dye exclusion tests for cell viability. In: PF Kruse Jr and MK Patterson Jr (eds), Tissue Culture, Methods and Applicatins, p406—408, Academic Press, New York, 1983
13）Elkind MM, Whitmore GF: The Radiology of Cultured Mammalian Cells, p7—84, New York, Gordon and Breach, 1967, p7—84
14）Courtenay VD: A soft agar colony assay for Levis lung tumor and B16 melanoma taken directly from the mouse. Br J Cancer 34: 39—45, 1976
15）Thomlinson RH, Gray LH: The histological structure of some human lung cancers and the

possible implications for radiotherapy. Br J Cancer 9 : 539—549, 1955
16) 坂本澄彦：腫瘍における reoxygenation,癌の臨床, 22 : 116—119, 1976
17) Deen DF, Hoshino T, Williams ME, et al : Development of a 9L rat brain tumor cell multicellular spheroid system and its response to 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea and radiation. J Natl Cancer Inst 64 : 1373—1382, 1980
18) Moulder JE, Rockwell S : Hypoxic fractions of solid tumors : Experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. Int J Radiat Oncl Biol Rhys 10 : 695—712, 1984
19) Phillips RA, Tolmach LJ : Repair of potentially lethal damage in X-irradiated HeLa cells. Radiat Res 29 : 413—432, 1966