The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	腹水肝癌細胞の細胞周期と放射線感受性
Author(s)	松沢, 大樹; 中村, 護; 阿部, 光延
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1969, 29(3), p. 315-318
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17736
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

腹水肝癌細胞の細胞周期と放射線感受性

愛知県がんセンター研究所放射線部
松　沢　大　樹
東北大学医学部放射線医学教室
中　村　　護　　阿　部　光　延

(昭和43年10月11日受付)

Relationship Between Radiosensitivity and Cell Cycle Time in 5 Lines of Ascites Hepatoma

Taiju Matsuzawa
Department of Experimental Radiology, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya
Mamoru Nakamura and Mitsunobu Abe
Department of Radiology, Tohoku University School of Medicine, Sendai

The purpose of the present paper is to estimate the radiosensitivity of the ascites hepatoma cells as a function of their cell cycle.

The ascites hepatomas of 5 lines used in this experiment were AH 130 F(N), AH 13 R, AH 7974 F, and AH 66 F consisted of free tumor cells.

Each tumor cell suspension was γ-irradiated by the telecobalt source (Toshiba) in aerobic conditions. Five days after tumor cell transplantation into peritoneal cavity of rats, the total number of ascites tumor cells was estimated and the dose-survival curves were obtained in 5 lines of those cells respectinely. Except AH 66, D_0 and n of each ascites tumor cells were successively calculated from the dose-survival curves.

The D_0 of AH 130 F(N), AH 13 R, AH 7974 Fand AH 13 were 320, 270, 210 and 160 rads, and their duration of cell cycle were 12.6, 16.2 19.1 and 22.0 hours respectively.

These results lead to following conclusion. There is high correlation between the radiosensitivity of the ascites hepatoma cells and their cell cycle; the lower of the radiosensitivity, the shorter of the cell cycle.

癌細胞の放射線感受性を規定するパラメーターには染色体異常，分裂細胞数の減少などがあるが，放射線治療との関連を考えると，再増殖能(reproductive integrity)[1)2)]を指標として把握するのが最も妥当であると考えられる．

なぜならばどのような癌細胞であつても，その癌細胞が照射後に再増殖して宿主を倒す能力を持つているか否かということが，治療上決定的に重要な意義を持つからである．したがつてここでは癌細胞の放射線感受性はもつぱら再増殖能を指標としてとらえている．

再増殖能による放射線感受性のパラメーターは定量的であるという長所をもつ反面，その細胞集団の平均値としての感受性のパラメーターであるために集団内に含まれる少数の癌細胞の放射線感受性を詳細に把握できないという欠点がある．放射線治療上では，少数の細胞集団であつても，それが放射線抵抗性を示し，将来再増殖に結びつくものであれば患者にとつて致命的である．生物学的方法と治療手段との間にはこのような平均と偏移[3)]という問題の他に細胞数の減少と治癒が直結しないなど，なお大きな断層が存在する．

これらの断層を一つづつ埋めてゆくのが癌放射線治療への生物学的アプローチの確実な道程であろうと考えられる．

元来放射線治療の対象となる原発性の癌の多くはいくつもの clone を含んでいて，それぞれの clone の放射線感受性は違っていると考えなければならない．この論文では累代移植が行なわれて clone が簡単になつて来ている種々の肝癌細胞の

放射線感受性と増殖の早さ，つまり細胞周期の長さとの相関を検討した．

実験材料及び方法

1．材料，動物はどんりゆうラットで 200g 前後のものを使用した．日本ラット株式会社から購入したものである．

腫瘍は東北大学抗酸菌病研究所肺癌研究部門から分与されたものである．AH 130F（N），AH 13，AH13R．AH7974F，AH66Fがこの実験に使用されたが，いずれもラットの腹水中で個々の細胞が遊離して懸濁状となつて増殖する自由細胞型の腫瘍である．したがつて細胞数を血算盤によつて容易に計数することができる．

2．放射線感受性の測定[20]

照射は in vitro で行ない，酸素圧をコントロールして，その変化による放射線感受性の変動を防ぎ，照射後ラットの腹腔内で再増殖させて5日後癌細胞数を計数し，線量—生残率曲線を求め，この曲線から平均致死線量（mean lethal dose＝MLD＝D_0）と外挿指数（extrapolation number＝n）を得た．

in vitro の過程

4×10^6箇の腫瘍細胞移植4日後の腹水腫瘍細胞をラット数匹からヘパリンを含有する氷冷HANKS液（1l中にペニシリン10万単位，ストレプトマイシン50mgを含有）を注入後採取する．次に採取した癌細胞の懸濁液（$4-8\times10^7$/mlの細胞を含有）に熱帯魚飼育用の装置によつて小気泡を立てながら治療用コバルト発生装置（東芝）によつて種々の線量のγ線を照射した．東芝直読線量計によつて測定された線量率は68R/min．である．以上の操作は永冷下で行なわれ，器具はすべて滅菌したものを使用した．なお腫瘍細胞は速かに沈澱するので，稀釈，分割，注射等にあたつては駆込ピペットで撹拌して懸濁液を均等に保つように配慮した．凝固阻止，感染防止，細胞変質防止等とともにこの配慮は実験の精度を高めるためにきわめて重要である．

in vivo の過程

対照群では無照射懸濁細胞の一定量（$0.5\sim1.0\times10^6$…腫瘍の増殖の早さにより加減）を数匹（原則として7匹）のラットの腹腔内に注射した．照射癌細胞注射群では再増殖能を持つた生残細胞が対照群に近い数を含むと予備実験の結果から推定される懸濁液量を注射した．これは移植後 120時間（5日間）後ラットの腹腔内で再増殖した腫瘍細胞数がラット一匹あたり $1\sim5\times10^8$ 箇の範囲内に達することを目的としている．

何故ならばこの腫瘍細胞数の範囲では周囲組織への浸潤も殆んどなく，片対数座標で増殖曲線がよく直線性を保持するためである．細胞数の算定は白血球測定と同じ方法によった．対照および被照射両群において同一線量で7匹以上を使用し，移植 120時間後，Hanks 液で全腫瘍細胞を洗い出し，対照群および被照射群の再増殖細胞数（それぞれp.q とする）を計数して被照射移植細胞数（m），対照移植細胞数（n）から生残率（S）を求めた．

$$S=\frac{q}{p}\times\frac{n}{m}$$

実験結果は悉く推計学的吟味を経た．

3．細胞周期の測定

4×10^6箇の腫瘍細胞移植後 H^3-thymidine 100 μCi を腹水腫瘍中に注入し，それ以後 0.5～2時間の間隔で40時間にわたつて腹水を採取し塗抹標本を作成し，さくらの NR-M 2 のエムルジョンを用いて45℃で dipping を行なつた．それぞれの腫瘍について2匹宛動物が使用された．10～20日間の露出後現像しギームザで後染色を行なつた．細胞周期および分裂各期の長さは，全分裂細胞に対する標識分裂細胞の百分率の経時的変動[4)6)]を指標として測定計算された．

実験結果

実験結果を表1に総括して示してある．細胞周期はAH 130F（N），AH13R，AH7974F，AH13，AH66Fの順に短い．つまり上記の順に増殖が早い．線量生残率曲線は一般に片対数座標において図1に示すように直線をなす．ただしAH 66Fではゆるい拋物線型の曲線を示し，これを直線とみなすことは困難であつた．AH66F以外のそれぞれの腫瘍について求められた D_0 はAH 130F，AH13R，AH7974F，AH13の順に大きく，nもまた同様である．細胞周期のうちで S，G_2，M の各期には大差はなく，G_1 期の差が細胞周期の差の決定因子となつている．つまり，G_1 期の長い腫瘍細胞では放射線感受性が高く，G_1 期の短い腫瘍細胞の放射線感受性は低い．

Table 1.

Tumor	Radiosensitivity		cell cycle				
	D_0(R)	n	tg	tg_1	ts	tg_2	tm
AH 130 F (N)	320	3.1	12.6	0.2	9.4	2.4	0.6
AH13R	270	2.2	16.2*	3.8	9.8	1.9	0.7
AH7974F	210	1.9	19.1	4.3	10.6	2.5	0.7
AH13	160	1.4	22.0	6.3	11.8	3.3	0.6
AH66F	—	—	24.2	7.5	12.9	2.9	0.9

図 1

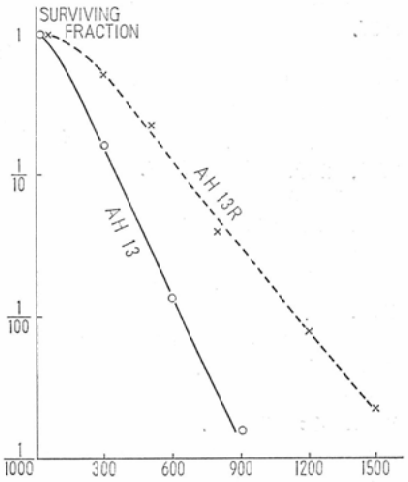
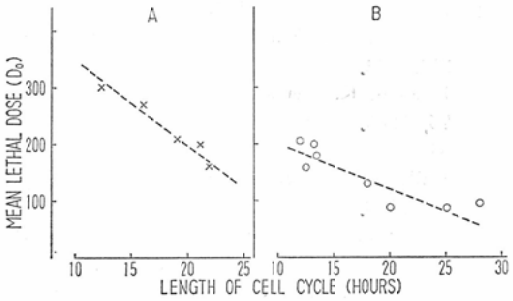


図 2



AH13RはAH13のナイトロミン耐性株であるが，放射線に対しても D_0で 110R，nで0.8の差があり，大きく抵抗性であることを示している．このときの細胞周期はAH13=22.0時間，AH13Rが16.2時間で，その差は 5.8時間である．

図2Aに細胞周期と D_0 との相関を示してある．相関曲線 y=b+ax に各点がかなりよく乗つていることが判る．ただし，b= 3.8 a=−0.76である．

以上の結果から，自由細胞によつて構成されている腹水肝癌では，増殖の早い腫瘍ほど放射線感受性が低いことになる．

考　按

1） 臨床上の放射線感受性との関連について

臨床上放射線感受性の高い腫瘍とは，照射後時間的に速く縮少する腫瘍のことである．

一般にその腫瘍細胞が分裂死 (mitotic death) によつて死滅する場合には縮少の速さは線量に依存せず，細胞の寿命の長さに依存して行なわれ，細胞の寿命の長い細胞集団ほど細胞数の減少が緩徐に行なわれていることが判っている．したがつて臨床上は細胞の寿命の長い細胞集団によつて構成される癌では，放射線感受性が低く細胞の寿命の短い細胞集団によつて構成される腫瘍では放射線の感受性が高いものとして把握され，この実験で得られた結果とは相反することになる．これはどのような理由に基づくものであろうか．照射を受けた癌細胞数の変動は，照射後の時間的経過から障害による細胞減少 (depopulation) と，回復による再増加 (repopulation) の二つの過程に分けることができる．臨床上の放射線感受性が障害過程を観察しているのに対し，生物学的なこの方法では回復過程で感受性をとらえている．つまり感受性のパロメーターの相違によつてこのような相反する結果が導き出されたものであり，治療上と放射線生物学上のの放射線感受性の意義は全く違つている．

2） 文献上の考察

文献の[1)6)~17)]上で今までに細胞周期と放射線感

受性の判っている細胞種について細胞周期と D_0 との相関を示したものが図2Bである．これらの資料は in vitro, in vivo, 癌細胞，正常細胞等きわめて雑多であるが，大綱は細胞周期の短い細胞ほど放射線抵抗性であり，われわれの実験結果とよく一致している．

細胞周期が短かいとなぜ放射線抵抗性になるであろうか．同調培養を用いた実験で，寺島ら[18)19)]は G_1 期とDNA合成期（S期）の二つの部分に放射線抵抗性の山を見出している．ところがSinclair[6)]等は細胞周期の短い（11時間）chinese hamster の同調細胞を用いて，DNA合成期だけが放射線抵抗性である結果を得ている．われわれが H^3-thymidine のオートラジオグラフで把握したDNA合成のpatternとSinclair等のとらえた放射線抵抗性の pattern とはよく一致している[3)]．つまりDNA合成が高度であるほど放射線抵抗性となつている．ここではDNA合成率そのものが放射線感受性を変えるものであるのか，あるいはDNAに対する蛋白質の存在様式が放射線感受性を変えるのかは問わない．DNA合成期にある細胞数の割合の多い細胞集団では放射線感受性が低くなつているという事実が問題である．なぜならば細胞周期の長短にかかわらずS期に大差のないということは，細胞周期の短い腫瘍では相対的にDNA合成を営んでいる細胞数の割合が多いことになり，細胞周期の短い腫瘍の放射線抵抗性をよく説明することができる．

3）実験の精度について

この実験結果は今までに文献的に知られている哺乳動物の増殖細胞に比べて MLD＝D_0 がかなり大きいと思われる値を示している．

これは照射後から再増殖能を調べるまでの時間が短かすぎるため，死ぬべき細胞を生残細胞として計数しているか，またはこれらの腹水肝癌細胞の放射線感受性が本質的に低いか，どちかである．照射後6回の細胞周期の長さに相当する時間を経過すると死ぬべき細胞は排除さることが知られている．したがつてこの実験では前者の影響はあつても比較的小さいものと考えられる．

結　語

自由細胞によつて構成されているAH 130F（N），AH13R，AH7974F，AH13の4種の腹水肝癌細胞の放射線感受性は上記の順に短い．つまり細胞周期の短かい腫瘍ほど放射線抵抗性である．ただし放射線感受性は再増殖能（reproductive integrity）を指標としている．AH66Fの生残曲線は片対数座標で曲線になつたため放射線感受性を上記の方法によつてとらえることは困難であつた．

文　献

1) Puck, T.T. & Marcus, P.J.: J. Exp. Med., 103 : 1956.
2) Puck, T.T., Morkovin, D., Marous, P.F. & Cieciura, S.T.: J. Exp. Med., 106 : 485, 1957.
3) 松沢大樹，癌の臨床，13巻，8号，575頁，1967.
4) Quastler, H. and ShermanF.G..: Exp. Cell Res., 17 : 420, 1959.
5) 松沢大樹，畠山正，日本医学放射線学会雑誌，27巻，2号，112頁，1967.
6) Sinclair, W.K. & Morton, R.A.: Radiation Res., 29 : 450, 1966.
7) Whitmore, G.F. et al.: Cellular Radiation Biology, 423 : The Williams & Wilkins Co., 1965.
8) Stanner, C.P. & Till, J.E.: Bioch. Biophys. Acta., 37 : 405, 1963.
9) Hornsey, S. & Silini, G.: Int. J. Red. Biol., 4 : 135, 1961.
10) Edward, J.L. et al.: J. Biophys. & Biochem. Cytol., 7 : 273, 1960.
11) Hewitt, H.B. & Wilson, C.W.: Brit. J. Cancer., 13 : 675, 1959.
12) Idem. ibid.; 13 : 675, 1959.
13) Defendi, V. & Manson, L.A.: Nature' 198: 359, 1963.
14) Dawson, K.B. et al.: Exptl. Cell Res., 38: 75, 1965.
15) Madoc-Jones, H.: 203 : 983, 1964
16) Williams, J.F. & Till, J.E.: Rad. Res., 29: 282, 1966.
17) Wegener, K., Hollweg, S. & Maurer, W.: Zeitshr. Zell Forsch., 63 : 309, 1964.
18) Terashima, T. & Tolmach, L.: Biophys. J., 3 : 11, 1963.
19) Terashima, T. & Tolmach, L.: Science, 140 : 490, 1963.
20) 粟冠正利，松沢大樹，佐々木俊作：日本医学放射線学会雑誌27巻，8号，1049頁，1967.