The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	肺コロニー形成に影響する因子に関する実験的研究
Author(s)	田中, 敬正
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1974, 34(10), p. 769-774
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18008
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

肺コロニー形成に影響する因子に関する実験的研究

天理病院放射線科
田　中　敬　正

(昭和49年5月27日受付)
(昭和49年6月26日最終原稿受付)

Experimental studies of factors influence lung colony formation

by

Yoshimasa Tanaka

Department of Radiology, Tenri Hospital, Tenri

Research Code No.: *407*

Key Words: *Lung colony assay, Vascular permeability, Anticoagulant*

El-LP-12 cells (Lung passaged subline of Ehrlich carcinoma) injected intravenously into dd Y mice result in the formation of visible lung colonies which are introduced as a model for pulmonary metastases. Various factors affecting lung metastases such as anticoagulant, HR cells and localized irradiation of the lungs prior to cell injection were examined and following results were obtained:

1) The relationship between the number of tumor nodules injected was found to be linear from $1 \times 10_6$ to $4 \times 10_6$ cells.

2) Administration of heparin or dextran sulfate prior to the intravenous injection resulted in a significant decrease in pulmonary metastases.

3) The number of lung colonies observed has been found to be affected by the simultaneous intravenous injection of a large number of heavily-irradiated cells (HR cells).

4) Localized irradiation prior to tumor cell inoculation significantly increased the incidence of pulmonary metastases in the irradiated lungs only. From the study of vascular permeability of the lung, dilatation of capillaries or increased permeability may be one of the main mechanism of this phenomenon.

I. 緒　言

癌の治療において，1つの重要な課題は，転移であり，放射線照射や抗癌剤と転移との関係については，大切な問題を含んでいるにかかわらず，まだ十分に解明されていない．これには一定の実験モデルが必要であり，われわれは，エールリッヒ癌 LP-12を用い[8)9)]，尾静脈より注入後肺に転移したコロニー数を算定し，注入細胞数との関係を調べた．また肺転移に及ぼす種々の因子について研究した．

また移植前に，肺照射をおこなうと肺転移を促進することが報告されている[2)4)5)6)12)]．これは予防照射と関聯して臨床面で極めて重要な問題であるが，そのくわしいメカニズムに関してはまだ十

分研究されていない[2]．今回は，移植前の照射が肺転移の促進を来す役割を経時的に調べ，その機構について，照射による肺血管系の変化とくに血管透過性の変化との関係において追求した．

II. 研究方法

本実験で用いたのは，エールリッヒ癌のsublineであるLP-12 (Lung passaged subline of Ehrlich carcinoma) であり[8)9)]，一定数以上の細胞数を尾静脈より注入すると，100%肺に転移を生ずる系であり，長谷川らにより ddY マウスなどにより確定されたものである[8)9)]．original のエールリッヒ癌の染色体は72が最も多いが（30%），この系は73が最多である（43%）[8)]．

実験動物としては，体重約25gの ddY（雄）マウス（船橋農場より購入）を用い，固形飼料（オリエンタルMF）および水にて飼育した．

腹腔内に移植した腹水癌を移植1週間後に採取して一定細胞数を尾静脈より注入した．

細胞数算定には，0.05% Erythrosin B で染色し，これで染色されてないものを，生存している癌細胞と見なして数えた．細胞注入後，10～12日に殺し，その肺をブアン固定し，両肺の表面に生じた肺コロニーの数を肉眼的に算定した．

照射には，すべてベータートロンによる電子線照射をおこなつた．肺照射には，左肺は鉛で蔽い，右肺のみを電子線（6 MeV，線量率 200 rads/分）で照射し，左肺を対照とした．照射野は 3.0× 2.0cm² であり，マウスの胸厚から見て，6 MeV で均一に照射されたと考えられる．

肺の血管透過性測定には，Song らの方法に従つた[17)]．健常マウスより心穿刺にて採取した血液1 ml をヘパリン処理試験管に入れ，30μCi の ^{51}Cr-Sodium chromate を加えた．

これを37℃の恒温槽で1時間培養した後，生理食塩水にて数回洗滌し，標識されなかつた ^{51}Cr を洗い流した．この標識赤血球に，20μCi の ^{125}I-HSA（人血清アルブミン）と混合して全量を2 ml とし，これの 0.1ml を尾静脈より注入した．1時間後，心穿刺にて 0.5ml を採血した．開胸し，全肺を摘出し，血液及び肺の放射能活性を Well 型 Scintillation counter で測定し，次式により照射後の血管透過性 (Vascular permeability) を測定した．

血管透過性＝血漿の血管外漏出 (ml/g. hr) ＝（肺内の全血漿量）－（肺血管内血漿量）

ここで

$$\text{全血漿量} = \frac{\text{肺1gあたりの}\ ^{125}\text{I 放射能活性}}{\text{血漿1ml あたりの}\ ^{125}\text{I 放射能活性}}$$

肺血管内血漿量 (ml/g)

$$= \text{肺血管内腔容積}^{*} \times \left(1 - \frac{\text{ヘマトクリット値}}{100}\right)$$

*

$$\text{肺血管内腔容積 (ml/g)} = \frac{\text{肺1gあたりの}\ ^{51}\text{Cr 放射能活性}}{\text{血液1ml の}\ ^{51}\text{Cr 放射能活性}}$$

III. 実験結果

1）肺コロニーの生成過程及びその組織像

癌細胞注入2日後の組織像を見ると，毛細血管周辺をロゼット様に並んだ癌細胞巣が見られる (Fig. 1)．日がたつにつれて，増大し，移植後10日前後より，肉眼的に見られるコロニーとなり，1～2㎜の直径になる (Fig. 2，Fig. 3)．Fig. 3 に見る如く，コロニーは肺内のみならず，肺表面にも均一に分布するため，肺表面のコロニー数を数えれば，全体のコロニー数を推定することが出来る．

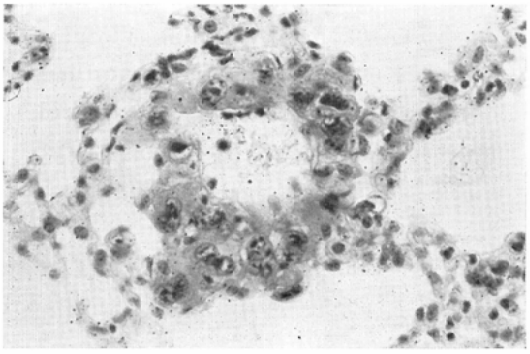

Fig. 1. Microscopic finding of the pulmonary metastases at 11 days after inoculation; Tumor cells surround a capillary vessel like a rosette (× 450).

Fig. 2. Bilateral pulmonary metastases in a male mouse following an intravenous inoculation of tumor cell suspension (4.4×10^5cells).

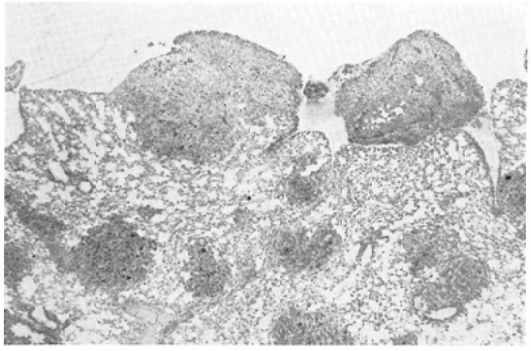

Fig. 3. Microscopic finding of the pulmonary metastases in 11 days after inoculation, showing innumerable nodules in the lung tissue (×40).

(2) 注入細胞数と肺コロニーとの関係 (Fig. 4)

注入細胞数と肺コロニー数（左右肺の表面に生じたコロニーの総数）との間には，Fig. 4に見る様に 1×10^6～4×10^6の間に於て直線関係が見られた．それ以上の細胞数では，コロニーが癒合して数えにくくなるし，それ以下ではやはり誤差が多くなるので，実験には出来る限り上記の直線関係内に入る様に，注入細胞数を加減した．これより注入前の細胞を色々の条件下で処理することにより，転移の状態を量的に把握することが可能であることがわかつた．

(3) HR cell (heavily irradiated cell) の影響 (Table 1)

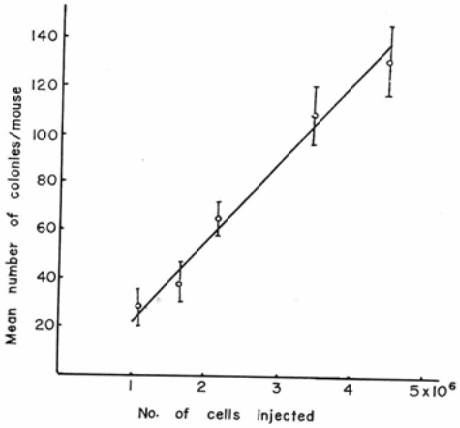

Fig. 4. The mean number of colonies/mouse in both lungs observed for different numbers of non-stained unirradiated cells injected. Errors shown are S.E.

Table 1. The effect of HR cells (heavily irradiated cells) on the number of lung colonies obtained.

No. of cells injected	No. of HR cells injected	Mean number of colonies/mouse
1.7×10^6	0	38.8± 4.1 *(10)
1.7×10^6	0.4×10^6	51.5± 5.5 (10)
1.7×10^6	2.0×10^6	63.3± 3.8 (10)
1.7×10^6	3.0×10^6	69.7± 6.5 (10)

*( ): No. of mice used.

生きたLP-12細胞にHR cell（この細胞に1万radsを照射して癌細胞を死滅さしたもの）を混入して注入すると，Table 1に見る如く，コロニー数が対照群に比べ非常にますことがわかつた．HR cell を 1.0×10^7コ以上では，マウスが急死する率が非常に多く見られたのでこれ以上注入することを中止した．これは大量の癌細胞が一時に肺血管に注入され，肺栓塞を来すためと考えられる．

(4) 抗凝固剤の効果 (Table 2)

ヘパリンを移植直前に 5,000U/kg を静脈注射した場合，及びデキストラン硫酸を 300mg/kgを腹腔内に，移植前2時間に注入した場合，コロニーの形成を対照群と比較したのが，Table 2である．抗凝固剤を加えると著明に肺転移の抑制が見

Table 2. Effect of pretreatment with heparin or dextran sulfate on pulmonary metastases after intravenous inoculation of LP-cells.

	Mean number of colonies/mouse
Heparin	25.5± 5.5 *(10)
Dextran Sulfate	38.6± 6.2 (9)
Control	49.0± 4.9 (10)

*( ): No. of mice used.

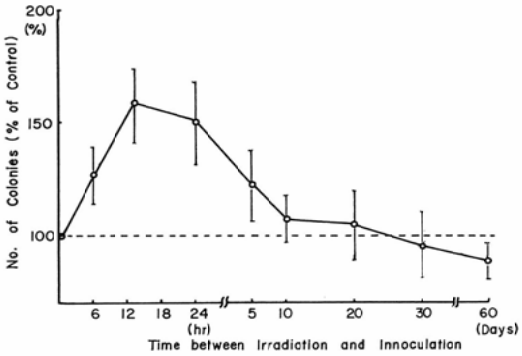

Fig. 5. The number of lung colonies (% of control) of intravenously injected LP-12 cells as a function of the time between irradiation of the lungs with 2,000 rads and the injection of the cells. The dotted line is the average value of control lungs.

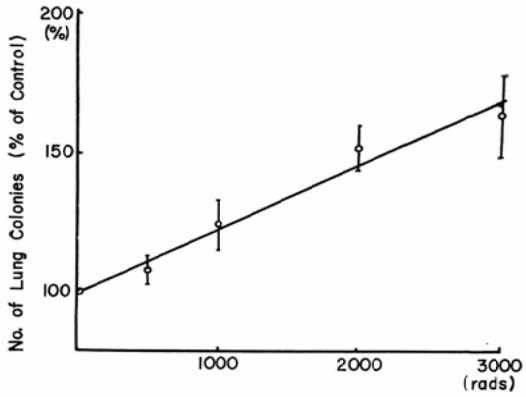

Fig. 6. The number of lung colonies (% of control) of intravenously injected LP-12 cells as a function of the lung dose delivered 24 hours prior to cell injection. The error bars represent standard errors of the mean.

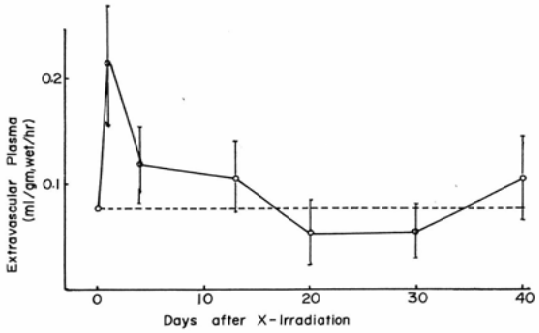

Fig. 7. Changes in extravasation rate of plasma following irradiation with 2,000 rads in a single exposure. The dotted line shows an average value of control lungs.

られる.

(5) 肺転移に及ぼす肺照射の影響

右肺のみに2000rads 電子線照射をおこない，その後経時的に LP-12細胞を移植し，そのコロニー形成を調べた．左肺は対照とした．

Fig. 5に示す如く，照射と移植の間が，12時間をピークとして，照射肺が対照肺に比べて転移がますことがわかつた．このあと徐々に減少して行き，30～60日では対照肺よりやや低値を示した．

照射と移植の間が24時間の場合，線量と照射肺のコロニー数との間の関係を見たのが Fig. 6 である．1000～3000rads の間に直線関係が見られた．

(6) 肺血管の透過性に及ぼす照射の影響

2000rads 照射後経時的に血管外漏出血漿量(Extravascular plasma) を調べた．Fig. 8に示す様に，12時間後に最高となり，その後徐々に減少して行くのが見られた．これは，Fig. 5のカーブとその傾向がよく似ているのがわかる．

IV. 考　察

転移の成立過程は，癌細胞が血中に入り，臓器の血管内面に定着し，フィブリンの凝集能力によつて，それらをとり囲むと，実験的にたしかめられている[1)15)18)].

その際，血液の凝固機構の障害が，流血中の癌細胞の定着に密接な関係があり，それらを取りまくフィブリン塊をとかす様な抗凝固剤や，癌細胞と血管内面との間の固着を阻止する様な物質は，癌の転移をさまたげることが考えられる[15)18)].

ヘパリンや，デキストラン硫酸は，抗凝固作用，fibrinolysis の促進，lipemia 低下の作用をもつていることはよく知られており[1)8)7)18)]，このため肺転移抑制が見られたと思われる．

腫瘍細胞に大線量を照射して死滅した細胞を混合すると，肺コロニー形成を著明にますことが見られた．これらのメカニズムに関しては，まだよくわかつていないが，HR細胞を腹腔内に注入しては，肺コロニー形成の増加が見られない所より，Hill らも述べている様に[10)]，免疫反応では説明しにくい．

RH細胞の代りに，プラスチックの微粒子を注入しても同様にコロニー数の増加が見られるということより[10)]，Revesz 等が述べている様なHR細胞の成分が癌細胞発育に役立つものとは考えられず[14)]，むしろ肺毛細血管系での栓塞，血流の停滞等と関係があると思われる．このことは，放射線治療の際に於ても，照射により死滅した細胞又はその debris が血中に増加し，これが転移を促進することが十分考えられるが[2)15)18)]，その際に抗凝固剤等の投与が必要であろう．

前もつて肺を照射すると，血管内に注入した癌細胞による肺転移を促進することが，われわれの実験によつてたしかめられたが，このことは Dao[4)]，Fisher[6)]，Milas[12)] 等がおこなつたラット，マウスでの実験とよく一致している．更にこの現象は，照射線量に関係し，照射後数時間以内にすでに認められ，数週後には照射前値にもどる一過性の性質のものであることが認められた．これらのメカニズムに関しては，まだ十分に解明されていない．諸家の報告によると[2)4)6)12)]，全身照射，肺のみの照射，いずれにおいても見られ，またわれわれの場合に於て，一方の肺を蔽つても上記の事実が同様に見られることは，免疫的現象としては解釈しにくい[2)]．

照射した肺に転移がますことは，照射による macrophage の喰食能の不活性化によるということも考えられる．しかし ^{125}I UdR でラベルした腫瘍細胞でおこなつた Brown らの研究によると[2)5)]，正常と照射肺の間に，腫瘍細胞の定着の間にすでに差があつたと報じている．勿論照射肺での腫瘍細胞の死の減少ということも除外は出来ないが，macrophage の喰食能は放射線耐性があり[13)]，又上記の現象が照射後2～3時間におこることなどより，これで説明することは困難であると考えられる．

この現象を説明するのに最も信頼しうるものとしては，照射により毛細血管の内皮細胞への直接の変化を来し，血管の拡張及び透過性の増加等の炎症性変化に導く結果と考えられる[2)11)]．これは更に血流速度の減少を来し，毛細血管の粘着性をまし，肺から腫瘍細胞の除去を低下さすことになるであろう．捕えられた腫瘍細胞は，内皮細胞から血管周囲の結締織に移動すると考えられる．

われわれの実験で，^{125}I-HSA と ^{51}Cr 標識赤血球を用いて，肺血管の透過性を調べ，これの照射後の増減の状態が，肺転移のそれと非常に似ていることがわかつた．このことは，Fidler らが述べている如く[5)]，血管透過性の増加が，転移形成に役立つていることを，裏がきするものと考えられる．照射による肺血管への障害は，血流の毛細血管外漏出及び肺胞壁の浮腫を来し，腫瘍細胞が生存するに好条件になると Dao らは[4)]，述べている．

以上のことは，放射線治療の際にも応用されることであつて，原発巣の腫瘍の治療が終了しないうちに，肺照射を不用意に行わないことであろう．どうしてもその必要があれば，抗凝固剤の使用が必要と思われる．

以上の如く，肺コロニー法は，転移の発生のメカニズムや，放射線等の転移発生に及ぼす影響を知りうるのみでなく[16)19)]，増殖能力のある腫瘍細胞の数の測定が出来るわけであり[10)]，in vitro, in vivo で照射された腫瘍の放射線感受性や，抗癌剤，放射線増感剤，化学防護剤の効果判定に，すぐれた方法であると考えられる．

V. 結　語

尾静脈より注入すると，主として肺に転移を生ずるエールリッヒ癌 LP-12を用いて，注入細胞数と，生ずるコロニー数との間の関係を調べ，肺転

移に及ぼす放射線の影響を調べた．また移植前の肺の照射が肺転移に及ぼす役割について研究し次の結果を得た．

(1)　注入細胞数と，コロニー数との間には，1×10^6～4×10^6の間において，直線関係が見られた．

(2)　抗血液凝固剤は，コロニー形成を抑制する．

(3)　HR細胞と共に注入すると，対照群に比べ，転移数が著明に増加することがわかつた．

(4)　照射された肺は，対照肺に比べ転移が促進され，照射後12時間に最高となり，このあと徐々に減少していつた．これは，毛細血管の拡張及び，透過性の増加が原因の1つと考えられる．

(本研究は文部省研究助成金の援助により行つた．)

文　献

1) Agostino, D. and Cliffton, E.E.: Anticoagulants and the development of Pulmonary metastases. Arch. of Surgery. 84 (1962), 87—91.
2) Brown, J.M. and Phil, D.: The effect of lung irradiation on the incidence of pulmonary metastases in mice. Brit. J. Radiol. 46 (1962), 613—618.
3) Cliffton, E.E. and Grossi, C.E.: Effect of human plasmin on the toxic effects and growth of blood-borne metastases of the brown pearce carcinoma and the V2 carcinoma of rabbit. Cancer. 9 (1956), 1147—1152.
4) Dao, T.L. and Yogo, H.: Enhancement of pulmonary metastases by X-irradiation in rats bearing mammary cancer. Cancer. 20 (1967), 2020—2025.
5) Fidler, I.J. and Zeidman, I.: Enhancement of experimental metastases by X-ray; a possible mechanism. J. Med. 3 (1972), 172—177.
6) Fisher, E.R. and Fisher, B.: Effects of X-irradiation on parameters of tumour growth, histology, and ultrastructure. Cancer. 24 (1969), 39—55.
7) Fisher, B. and Fisher, E.R.: Experimental studies of factors which influence hepatic metastases. VIII. Effect of anticoagulants. Surgery. 50 (1961), 240—247.
8) Hasegawa, Y., Irikura, T., Ishidate, M. and Mizuno, D.: Comparative studies on cytological differences between original and lung passaged subline of Ehrlich carcinoma. Gann. 61 (1970), 73—77.
9) Hasegawa, Y., Irikura, T. and Mizuno, D.: The effect of xenogenic and allogenic tumor cells on experimental metastases with Ehrlich carcinoma. Chem. Pharm. Bull. 18 (1970), 2322—2326.
10) Hill, R.P. and Bush, R.S.: A lung-colony assay to determine the radiosensitivity of the cells of a solid tumour. Int. J. Radiat. Biol. 15 (1969), 435—444.
11) Jolles, B. and Harrison, R.G.: Enzymatic processes and vascular changes in the skin radiation reaction. Brit. J. Radiol. 39 (1966), 12—18.
12) Milas, L. and Withers, H.R.: Increased incidence of tumor colonies in irradiated lungs. A transient phenomenon. Abstracts. IVth International Congress of Radiation Research. Evian. 146, 1970.
13) Perkins, E.H., Nettesheim, P. and Morita, T.: Radioresistance of the engulfing and degradative capacities of peritoneal phagocytes to kiloroentgen X-ray doses. J. of the Reticuloendothelial Society. 3 (1972), 71—82.
14) Révesz, L.: Effect of lethally damaged tumor cells upon the development of admixed viable cells. J. Nat. Cancer Inst. 20 (1958), 1157—1186.
15) 佐藤春郎，鈴木磨郎，山浦玄嗣，阿部郁夫：癌の転移，診断と治療，57 (1964)，1766—1770，
16) Shaeffer, J., El-Mahdi, A.M. and Constable, W.C.: Radiation control of microscopic pulmonary metastases in C3H mice. Cancer. 32 (1973), 346—351.
17) Song, C.W. and Levitt, S.H.: Vascular changes in Walker 256 carcinoma of rats following X-irradiation. Radiology. 100 (1971), 397—407.
18) Suemasu, K. and Ishikawa, S.: Inhibitive effect of heparin and dextran sulfate on experimental pulmonary metastases. Gann. 61 (1970), 125—130.
19) Wexler, H.: Accurate identification of experimental pulmonary metastases. J. Nat. Cancer Inst. 36 (1966), 641—645.