

Title	3H-Thymidine, 3H-Cytidine のIn Vitro Labeling の臨床的応用
Author(s)	松井, 謙吾
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1965, 25(8), p. 930-942
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/18616">https://hdl.handle.net/11094/18616</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

特別掲載

## $^3\text{H}$ -Thymidine, $^3\text{H}$ -Cytidine の In Vitro Labeling の臨床的応用

横浜市立大学医学部放射線科 (主任 伊東乙正教授)

松 井 謙 吾

(昭和40年9月21日受付)

Clinical Application of In Vitro Labeling of Human Tumors  
with Tritiated Thymidine and Cytidine

Kengo Matsui

Department of Radiology, Yokohama University, School of Medicine.

The histological grading of human tumors have contributed greatly toward a rational formulation of therapy plans and an evaluation of response to therapy. However, neoplasms which appear to be similar histologically may behave in different manner clinically, and show a different response to radiotherapy.

The problem of cellular proliferation of human tumors that is based on the counting of mitotic figures in histologic preparations is difficult and unreliable, because mitotic figures are difficult to recognize unless special techniques are applied.

By using the technique of autoradiography and in vitro incubation of tritiated nucleosides as the precursors of DNA and RNA, which were developed by Rubini et al. in 1961, author examined an assessment of the percentages of tumor cells showing nuclear labeling after in vitro exposure to  $^3\text{H}$ -Thymidine and  $^3\text{H}$ -Cytidine.

Since the aim of this study is an evaluation of this technique in clinical laboratory practice, the specimens were taken at random from available biopsical and surgical materials, during the course of radiation therapy.

### Results

1) Labeling indices were counted in human squamous cell carcinoma from uterus, oral cavity, skin and lung (46 cases), and adenocarcinoma from stomach, breast and rectum (54 cases).

2) DNA labeling indices of squamous cell carcinoma varied 3 to 25% (mean 12.5%), and RNA labeling indices 50 to 90% (mean 78%). In cases of adenocarcinoma, they were 3 to 18% (mean 9.3%) for DNA, and 20 to 80% (mean 49.6%) for RNA.

3) In each case the RNA labeling index was found much greater than DNA labeling index. Both labeling indices of squamous cell carcinoma were higher than that of adenocarcinoma. This fact seemed to be indicative for difference in radiosensitivity of these tumors.

4) DNA and RNA labeling indices decreased more profoundly in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma, during the course of radiation therapy.

Time dose relationship between DNA and RNA labeling indices against dose has been plotted by taking DNA and RNA synthesis block by irradiation as an indicator.

Thus this method was found highly useful for evaluation the effect of irradiation.

Exact evaluation of above mentioned time dose relationship remains for future intensive study.

5) Some modifications in the technique of in vitro labeling methods were introduced and discussed in detail.

## 緒 言

人悪性腫瘍の治療に当り、病理組織学的検索は治療方針決定や予後判定に必要な欠くべからざるものである。然し組織学上同一所見を呈しながらも、治療に対し臨床に異つた反応を示す事は、我々の良く経験する所であり、従来の組織学的検査に加うるに、histochemical な面からの観察が漸次重視せられて来た<sup>5)16)33)41)49)</sup>。

最近までは顕微鏡下に見られる細胞分裂のみが、細胞増殖サイクルの中で他の時期から明らかに区別出来、分裂から次の分裂までの時間が一代として増殖度の指標となり (generation time)、臨床的には分裂細胞の頻度とか (mitotic index)、腫瘍の増大を外部より測定する事により倍加時間を求め、之によつて増殖度 (doubling time) を推定して来た<sup>16)38)</sup>。

然しこの分野の研究は1955年 Hughes<sup>4)22)</sup> による <sup>3</sup>H-Thymidine の合成と autoradiograph の手法の導入によつて急速な進歩がもたされ、従来の組織レベルの病理形態学的研究に加えて、細胞レベル又は細胞下レベルの生化学的乃至動力学的知見が得られる様になつた。

現在では、DNA合成は分裂間期の或る一定時期でしか合成されない事が知られており、このDNA合成期 (S期) を中心に分裂間期を3期に分ける事が出来る。即ち分裂直後より G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, の順に分けられ分裂期Mに移行する。DNA合成は当然S期で行われるが、RNA及び蛋白合成は分裂間期を通して行われ、分裂期は代謝活性から見て異化的な時期で、合成度は低いか、或いはほとんど消失しているとされている<sup>13)33)40)54)</sup>。

<sup>3</sup>H-Thymidine はS期に於いて選択的に DNA (Desoxyribonucleic acid) に合成されるので細胞レベルに於けるDNA合成能の有無如何を autor-

-adiogram 上の感光銀粒子の有無及び grain counting により知る事が出来る。<sup>3</sup>H-Cytidine, <sup>3</sup>H-Uridine は大部分が分裂間期に於いて RNA (Ribonucleic acid) に取り込まれるので、<sup>3</sup>H-Thymidine と相俟つて細胞分裂とRNA合成との関連を研究する事が出来る<sup>13)40)</sup>。然しながら従来これらの <sup>3</sup>H-nucleoside を用いた研究は専ら動物実験或いは組織培養の材料を使用したものであつて、臨床への応用は極めて制限されていた。

その理由の第一は <sup>3</sup>H-Thymidine は細胞核の染色体中に取り込まれ、そこでβ線の細胞内照射が行われるために生体の somatic な障害のみならず<sup>8)</sup>、genetic な障害が大いに問題とされた。第二に <sup>3</sup>H-nucleoside を人体に使用するには、一回に数 mc 以上を要し、極めて高価となるためである。然し μc order の <sup>3</sup>H-Thymidine を局注した報告<sup>20)21)25)</sup>はいくつか見られる。かゝる意味に於いて臨床的に広く応用する為には、検体を体外に取り出し in vitro で標識する方法によらねばならない<sup>27)37)41)</sup>。

本研究は人悪性腫瘍の増殖機構及び、その放射線に対する影響を上記の方法を用いて行われたもので、従来の組織学的研究に加えて biochemical な面をも考慮に加え、更に有力な指針を得ようと企てられたものである。

## 研究目的

人悪性腫瘍のDNA及びRNA代謝の有無如何を知るために、<sup>3</sup>H-Thymidine, <sup>3</sup>H-Cytidine の labeling index を求め、細胞分裂能及び蛋白合成能を示す指標とした。更に之によつて放射線照射線量と核酸合成阻止率との関係を求め、squamous cell carcinoma と adenocarcinoma との放射線感受性を比較検討した。

Table 1. Patient cases

Histology \ Cases	Skin Cancer	Uterus Cancer	Cancer of Oral Cavity	Lung Cancer	Breast Cancer	Stomach Cancer	Rectum Cancer	Total
Sq. cell carcinoma	10	19	16	1	—	—	—	46
Adeno-carcinoma	—	—	—	—	24	29	1	54

## 研究材料

## 1) 研究対照

研究対照とした人悪性腫瘍は扁平上皮癌では皮膚癌10例, 子宮癌19例, 口腔内癌16例, 肺癌1例, 腺癌では胃癌29例, 乳癌24例, 直腸癌1例である。(Table 1)

## 2) 使用標識化合物

$^3\text{H}$ -Thymidine 及び  $^3\text{H}$ -Cytidine を使用, その性状は次表の如きである (Table 2.)

## 3) 使用感光乳剤

主として Kodak AR-10 及び NTB-3 を使用, 一部サクラ NR-M2 をも使用した。

Table 2. Used  $^3\text{H}$ -nucleoside

	made in	Specific activity	Purity
$^3\text{H}$ -Thymidine	Amersham	4~14.8 c/mM	98~100%
$^3\text{H}$ -Cytidine	Amersham	1.94 c/mM	100%

Table 3. Constitution of YLE medium<sup>36)</sup>.

Lactalbumine hydrolysate	5g (NB Co)
Yeast extract	1g (Difco)
Earle's saline	1000ml
NaCl	6.80 g
KCl	0.40 g
CaCl <sub>2</sub>	0.20 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.14 g
NaHCO <sub>3</sub>	1.10 g
Glucose	1.00 g/1000 ml

## 4) 使用培養液

培養液は基材として YLE を使用した。その組成は Table 3 の如くである<sup>14)34)36)</sup>。この YLE 90% に Bovin Serum 10% の割合で混じり, Penicillin 及び Streptomycin を添加し, 1cc 当り  $2\mu\text{C}$  の  $^3\text{H}$ -Thymidine,  $^3\text{H}$ -Cytidine を加えて培養を行った。一方  $^3\text{H}$ -Cytidine に対しては10倍量の Cold Thymidine を加え DNA への  $^3\text{H}$ -Cytidine の合

成を無視し得る様に考慮した。

## 研究方法

1) 人悪性腫瘍は壊死部を極力さけて, 腫瘍部の中央より Biopsy 或いは切除標本をとり, 直後 2mm 立方程度に細切し, Fig. 1 に示す如き方法で 1~2 時間の短時間培養を行い, 然る後組織標本を作成し, autoradiogram にて 2~4 週間曝射を行い検鏡を行った。

検鏡に際して, Fig. 2 に示す如く, ラベルの見える表層部<sup>41)49)50)</sup>の細胞についての平均の labeling index を求めた。実際問題としては, labeling index は典型的な組織像を示す標本上の数カ所を選択し, 各部位の labeling index を求めて之を平均して算出した。

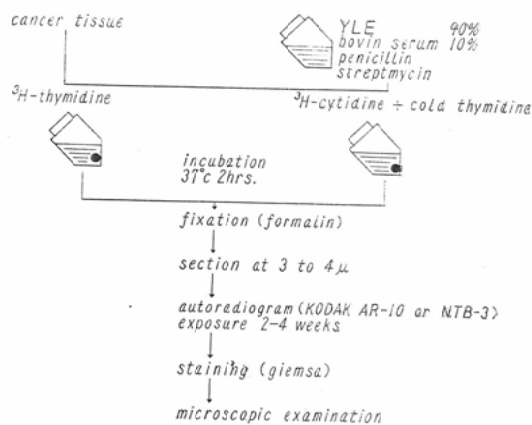


Fig. 1. Method of in vitro labeling

2) 放射線照射例についても, 上述と同様に labeling index と照射線量の関係を求め, 核酸合成阻止率を検討した。

照射条件及び装置は Table 4 の如くである。

## 研究結果

## 1) 非照射例

## a) 扁平上皮癌

Table 4. Apparatus and conditions of irradiation

Apparatus	Conditions				
	Voltage	Current	Filter	H.V.L.	Tumordosis /day
X-Ray Therapy Unit. (Shimazu)	180KVP	3 mA	0.5mmCu 0.5mmAl.	0.8mm/Cu.	200~ 500r.
<sup>60</sup> Co-Tele-Therapy Unit (Toshiba)	Source				Tumordosis /day
	600 Curies				200~ 700r

<sup>3</sup>H-Thymidine 及び <sup>3</sup>H-Cytidine による DNA 及び RNA の labeling index は Table 5 に示す如く、3~25% (DNA), 50~90% (RNA), 平均 12.5% (DNA), 78.0% (RNA) ではあるが DNA 合成に於いては比較的ばらつきが多く、RNA 合成はこれに比し、平均値に近い値を示している。又一方組織学的には、未分化の部分に比較的高い <sup>3</sup>H-Thymidine の uptake が見られ、(Fig. 4, Fig. 5) 典型的な真珠腫形成部に於いては全く uptake が見られなかつた (Fig. 3)

%であつた。

腺癌の組織学的観点より観察を加えて見ると乳嚢状に発育した部分にやゝ高い labeling index をみとめ (Fig. 6), Broder に於ける腫瘍分類に於いても III~IV 度の場合には比較的高い labeling index を認める傾向にあり、この点に関しては今後更に検討を加えたい。

2) 照射例

a) 扁平上皮癌

Table 6 DNA and RNA labeling indices of non-irradiated cases.

	Tissue	cases.	DNA L.I. (%)	RNA L.I. (%)
non-irradiated	Sq. cell ca.	19	3~25	50~90
	Adeno ca.	21	3~18	20~80

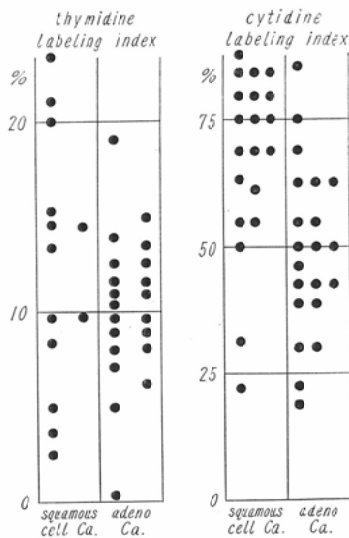


Table 5. DNA and RNA labeling index. Non-irradiated cases of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma

b) 腺癌

Table 5, 6 に示す如く、腺癌に於いては扁平上皮癌に比し、labeling index はやゝ低値を示し、DNA については 3~18%, RNA に於いては 20~80% で、それぞれの平均値は 9.3%, 49.6

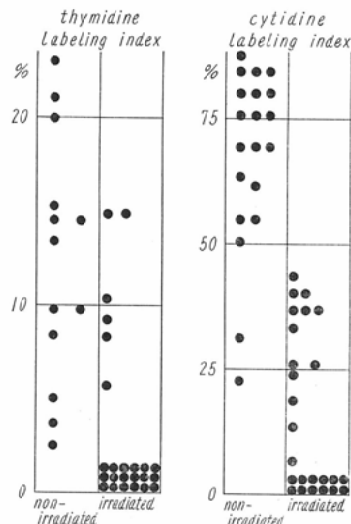


Table 7. DNA and RNA labeling index in non-irradiated and irradiated squamous cell carcinoma.

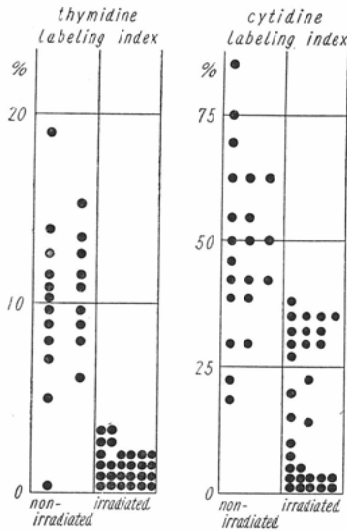


Table 8. DNA and RNA labeling index in non-irradiated and irradiated adenocarcinoma.

照射線量の増加と共に、DNA及びRNA labeling index は共に強く減少し (Table 7), それぞれ 0~10%, 0~20%と非常に低値を示し, grain count も激減した。(Fig. 8, 9)

b) 腺癌

腺癌に於いてもDNA, RNA代謝抑制は線量との関係をもとめるが非常に低値を示し, DNAの labeling index は0~3%, RNAの場合は0~30%といづれも照射前の半分以下の値に下っている (Table 8) .

Table 9. DNA and RNA labeling indices of irradiated cases.

	Tissue Diagnosis	Cases	DNA L.I. (%)	RNA L.I. (%)
irradiated	Sq. cell Ca.	29	0~10	0~20
	AdenoCa	30	0~3	0~30

次に autoradiogram 所見とH. E. 染色による普通病理組織標本所見との比較について検討してみた。いわゆる短期大量照射, 例えば1950r/3日と云う場合について観察すると Fig. 10に見る如く <sup>3</sup>H-Thymidine の tumor cell への uptake は全く見られず, 組織学的にも核の濃染や fragmentation, chromatolysis 等が見られ又間質部に於いては修復

性の乏しい浮腫や線維化が観察された。(Fig.11). 又2000r/30日の長期間にわたる比較的少量照射に於いては, 多少のラベル (0.3%) を認めた (Fig. 12).

組織学的には核の崩壊, chromatolysis, cytoplasm に於いては小顆粒の出現 (granulation) や空胞変性 (vacuolation) 及び間質の線維化が著明に観察された (Fig. 13) .

すべての照射例は照射後1~7日以内に切除又は手術を行ったものである。腺癌の1例では1回300γ照射で24時間後非常に強い組織障害を受けて, DNA及びRNA labeling index は共に0%となつている例があり, 又一方1回500γ照射, 数日後手術例に於いては, <sup>3</sup>H-nucleoside の uptakeが見られ, 回復に対する時間的因子の影響が現われている。上記の様に小線量照射例に於いて著しい障害程度の差異をみとめる事は, labeling index が照射後線量に応じて低下し, 次いで短時間に回復する傾向を示すため, 大線量照射例に於いては回復が極めて遅延するために, 採取時間による labeling index の動揺が少くなるものと考えられる<sup>4)</sup>.

3) Labeling index と線量との関係

すでに前記の如く, いずれの場合に於いても, 照射線量の上昇と共にDNA及びRNA labeling index の低下がみとめられる。照射線量期間と照射効果とを, DNA及びRNA合成block (labeling index 0.5%以下) を示標として求め, 各点をプロットして見た。

以上の結果から扁平上皮癌並びに腺癌に於ける大約の single equivalent dose はDNA合成阻止を指標とした場合では夫々500γ, 800γ, RNA合成阻止を指標とすると夫々600γ, 870γで著差は無く, 稍々前者に於いて低値を示しているが, 例数が少いので結論は出せない。

考 按

squamous cell carcinoma の場合 adenocarcinoma に比して, 一般にDNA labeling に高値を示すことは, もしS期が同一であると仮定すれば, 前者に於いて稍々 generation time が短いことを示し, 之は従来の放射線治療経験と一致す

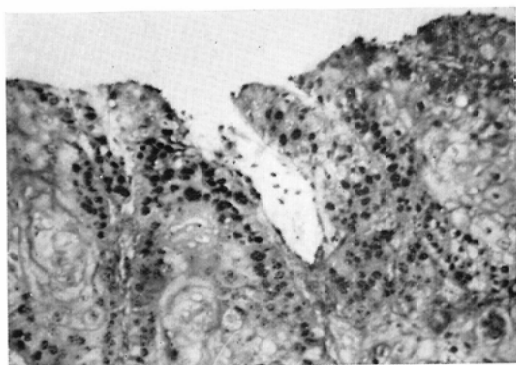


Fig. 2. Radioautograph of squamous cell carcinoma from the skin, RNA labeling. Note grains are limited to the peripheral zone about  $100\mu$  depth. (X150)

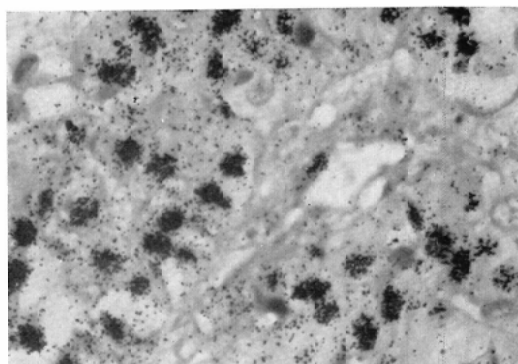


Fig. 5. Radioautograph of squamous cell carcinoma from the same patient as Fig. 4., RNA labeling. Note high percentage of labeled cell. Labeling index is 80%, mitotic index is 1%. (X600)

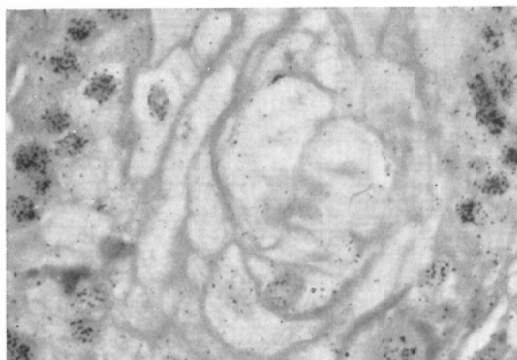


Fig. 3. Radioautograph of squamous cell carcinoma from the skin, RNA labeling. Note no labeled cell in the pearl formation. (X600)

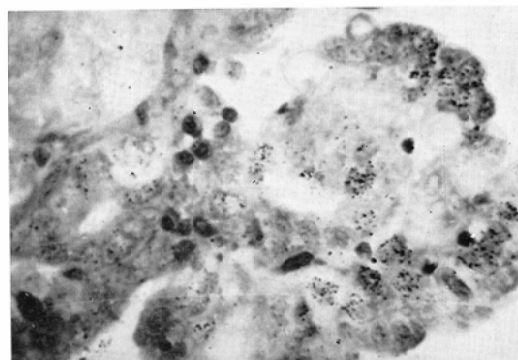


Fig. 6. Radioautograph of adenocarcinoma from the stomach, DNA labeling. Labeling index is 20%, and mitotic index is 0.1%. (X600)

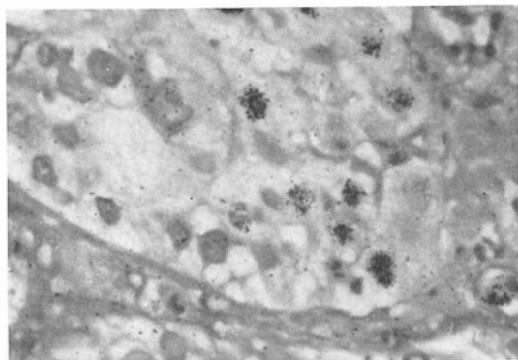


Fig. 4. Radioautograph of squamous cell carcinoma from the uterus, DNA labeling. Labeling index is 15% and mitotic index is 1%. (X600)

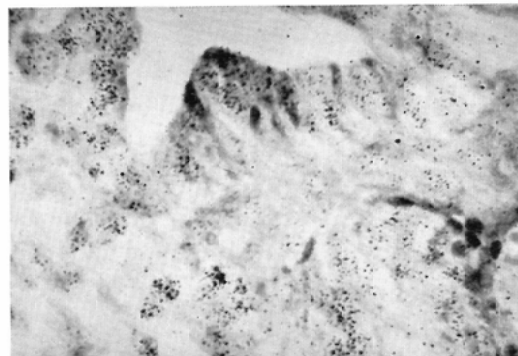


Fig. 7. Autoradiograph of adenocarcinoma from the stomach, RNA labeling. Labeling index is 80% and mitotic index is 0.15%. (X600)

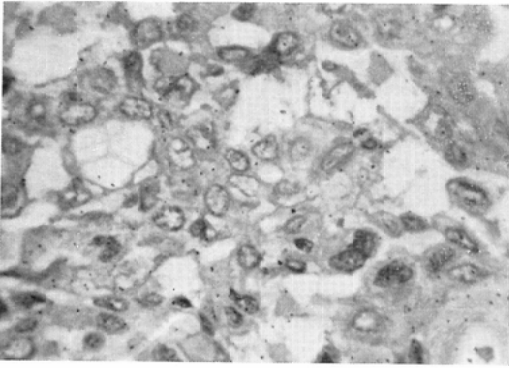


Fig. 8. Radioautograph of irradiated squamous cell carcinoma (1500r/5d.) from the uterus, DNA labeling. Note vacuous change with no labeled cell. (X600)

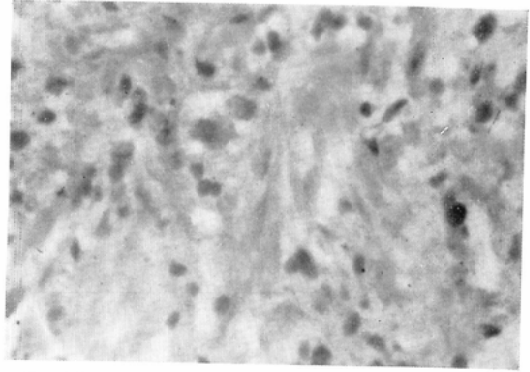


Fig. 11. Routine section from the same specimen as in Fig. 9. Note strongly increasing fibrous change and degenerative cancer cells. The specimen was removed 5 days after irradiation. (X600)

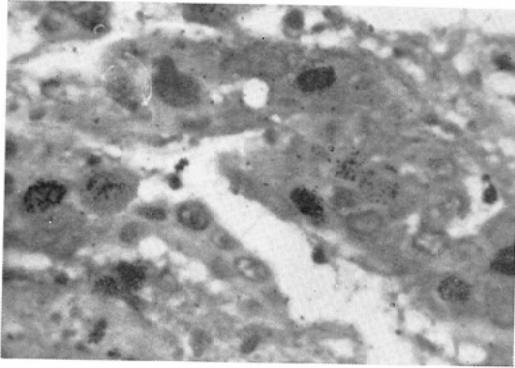


Fig. 9. Radioautograph of irradiated squamous cell carcinoma (900r/5d.) from the uterus, RNA labeling. Note several labeled cells and a few vacuolation and chromatolysis. (X600)

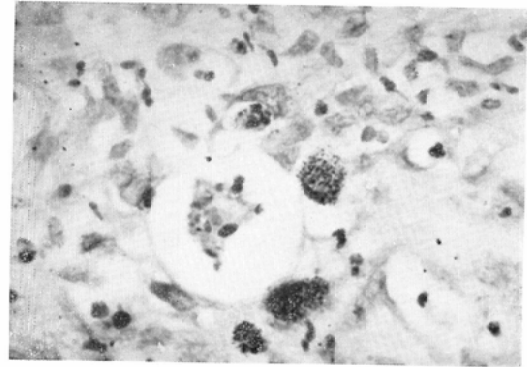


Fig. 12. Radioautograph of irradiated adenocarcinoma from the stomach (2000r/30d.). Note several labeled cells were found among degenerative cancer cells. (X600)

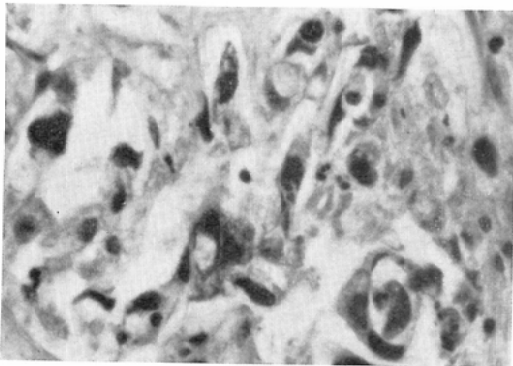


Fig. 10. Radioautograph of irradiated adenocarcinoma from the stomach (1950r/3d.). Note no labeled cell with chromatolysis and fragmentation in nucleus. (X600)

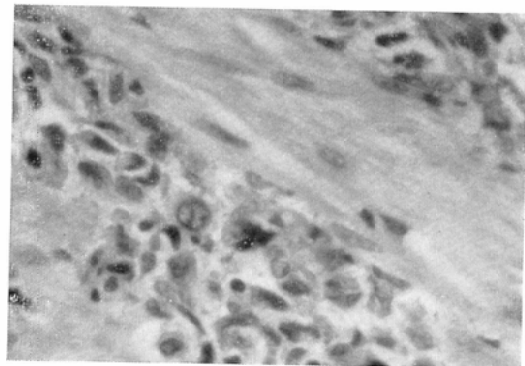


Fig. 13. Routine section from the specimen in Fig. 12. Note increasing fibrous parts, chromatolysis in nucleus, and granulation or vacuolation in cytoplasm. (X600)



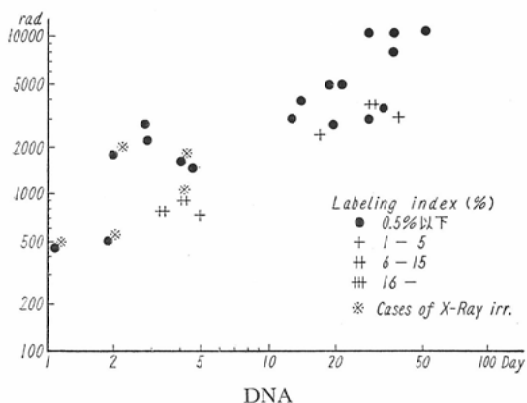
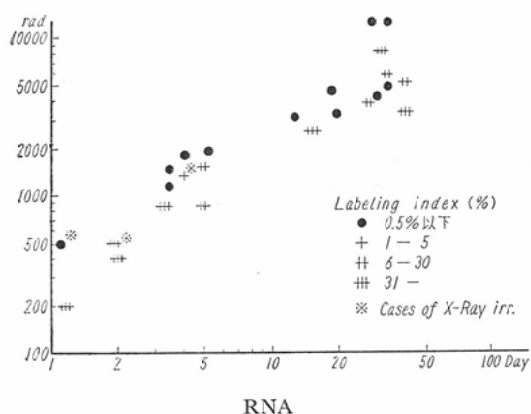


Table 10 Relationship between labeling index and time dose factor in squamous cell carcinoma



る。

いずれの場合に於いてもRNAの標識率がDNA標識率より高い事は、細胞の増殖サイクル<sup>30)40)54)</sup>に於ける合成期間の長短に由来すのもので、Veenema<sup>49)50)</sup>も本研究同様<sup>3H-Cytidine</sup>によるRNA標識率の高い事を指摘している。

本研究に於けるDNA標識率は扁平上皮癌に於いては平均12.5%であり、Oehlert<sup>35)</sup>等の研究は7%、Titus<sup>41)</sup>等は肺の扁平上皮癌に於いては17%で、著者の研究に於ける値とほぼ等しい値を示している。一方腺癌に於いてはJohnson<sup>27)</sup>は乳癌0.44%、Rubini<sup>37)</sup>等は結腸癌に於いて0.1%と非常に低値を示しているのに反し、Titus<sup>41)</sup>は肺癌のadenocarcinomaに於いて15%と本研究と同様の値を得ている。(Table12).

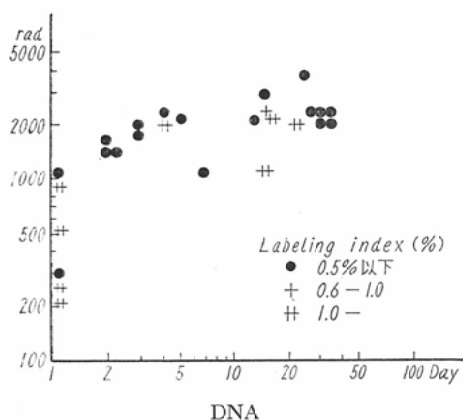
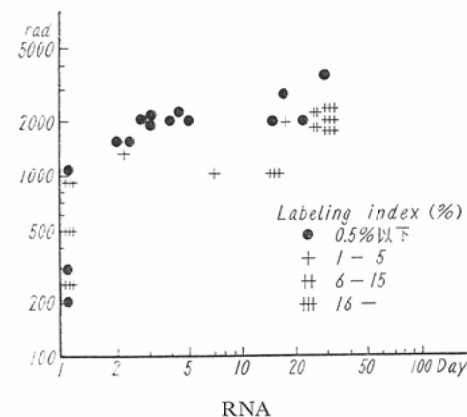


Table 11. Relationship between labeling index and time dose factor in adenocarcinoma.



放射線による labeling index の低下の機序としては、放射線照射による核酸合成阻止作用<sup>28)52)</sup>、核酸構成の異常や<sup>18)19)31)</sup>、更にその代謝異常<sup>2)32)</sup>、或いはS期の相対的減少<sup>42)</sup>等が考えられよう。之に関しては in vivo 法による研究が大いに役立つているが、こゝでは一切之については省略する。

本法によつて人体材料について、治療効果を半定量的に組織化学的に評価し得る事が示されたが、Veenema<sup>49)50)</sup>も labeling index のみならず grain counting を併用する事によつて、膀胱癌の grading の決定、放射線効果の判定、化学療法剤の効果判定に有益である事を報告している。この際 in vitro 法に於いては、同一標識条件が保証されず、検体相互間の標識比較が困難視されているが、著者及び Veenema の報告が示す様に著し

Table 12. Summary of results in each authors.

		Histology	DNA L.I. (%)	RNA L.I. (%)
Johnson <sup>27)</sup> (1961)		Fibroadenoma	1.7	
		Breast cancer	0.44	
		normal mammalian gland.	0.65	
Rubini <sup>37)</sup> (1961)		Tonsil	8.3	
		Melano sarcoma	0.6	
		Adeno-carcinoma (colon)	0.1	
Veenema <sup>49)</sup> (1963)		Bladder cancer (50 cases)	over 6 (18 cases) 3-6 (16 cases) 1-2 (5 cases)	over 40 over 10 less 10
Choné <sup>63)</sup> (1963)		Pleuritis and Peritonitis carci. normal endothelial cell	1-15.3 0.18-1.45	
Oehlert <sup>35)</sup> (1964)		Sq. cell ca.	7	
Titus <sup>41)</sup> (1965)		Sq. cell ca. (Lung)	17	
		Adeno ca. (Lung)	15	
		(Breast)	1.0~1.6	
Iwashita <sup>45)</sup> (1965)		normal skin	7-15 about 40	almost 100%
Matsui (1965)	non-irrad.	Sq. cell ca. (Skin Uterus) Adeno ca. (Stomach Breast)	mean 3-25 (12.5) 3-18 (9.3)	mean 50-90 (78.0) 20-80 (49.6)
	irrad	Sq. cell ca. (Skin Uterus) Adeno ca. (Stomach Breast)	0~10 0-3	0-20 0-30

Table 13. Summary of in vitro culture conditions and autoradiographic methods.

	medium and incubation time	<sup>3</sup> H-Compound	Exposure time	Staining
Rubini <sup>37)</sup> (1961)	PVP, 3.5% 5 ml 25°C 1 h.	<sup>3</sup> H-Thymidine 4 μc	NTB-3 3 Weeks	Harris Hematoxylin  Giemsa, May-Grieward Giemsa.
	Hanks 8ml 37°C 1.5 hs.	<sup>3</sup> H-Thymidine 2.5 μc	AR-10 10 weeks	
	Ringer 7 ml Serum 2 ml Penicillin 10,000U Streptomycin 50mg 37°C 1.5hs.	<sup>3</sup> H-Thymidine 16 μc	NTB-3 2 weeks	
Veenema <sup>49)56)</sup> (1963)	Same as above oxygenated at 37°C, 3~6 hs.	<sup>3</sup> H-Thymidine <sup>3</sup> H-Cytidine	1 week.	
Titus <sup>41)</sup> (1965)	washed by Hanks Eagle Calf serum 10% 37°C 1~2 hs.	<sup>3</sup> H-Thymidine 10 μc	Kodak AR-10 2-6 weeks	Hematoxylin and eosin.
Tsuya <sup>47)</sup> Tanaka Matsui (1963~1965)	YLE. 90% Ox serum 10% Streptomycin Penicillin 37°C 1~2 hs.	<sup>3</sup> H-Thymidine <sup>3</sup> H-Cytidine 2 μc	AR-10 3~4 weeks NTB-3 2-3 weeks	Giemsa Hematoxylin and eosin
Fukuyama <sup>17)</sup> (1965)	YLE 95% O <sub>2</sub> 5% CO <sub>2</sub> 37°C 1~2 hs.	<sup>3</sup> H-Thymidine 2 μc	AR-10	methylene blue.

い効果を判定する場合にはその影響は無視し得ると考えられる。

放射線照射による autogram 活性度 (即ち標識率及び平均 grain count) の著しい低下を指標として (標識率 0.5%以下) 求められた time dose relationship が従来臨床的に求められた time dose relationship<sup>7)10)12)15)43)53)</sup> と似た傾向を認めた事は興味がある。治療の経過中に於いて、その効果を病理組織学的のみならず更に組織化学的に確認し得ること、又組織像に著差をみとめない場合でも著しい差を認めた事は、本法がより鋭敏な示標になり得る事を示唆している。Veenema も膀胱癌についてこの点を強調した。旧来の mitotic index は極めて鋭敏ではあるが、その数が少い事が最も不利であり、従来臨床に於いての関心が極めて低かつたことは当然であつて、本法はこの点に於いて優れている。

小線量照射について結果がまちまちである事は、之は照射後標本採取までの時間如何による回復因子が大きく関係して来るので、この点大いに考慮しなければならぬ事を示している。

又 autoradiogram 上に示された標識細胞の組織構造による不均等分布は Rubini<sup>37)</sup> 等が既に指摘した様に本法の一つの缺点であつて正確な generation time の決定を不可能ならしめるものであろう。

次に in vitro 法に関して技術的問題点について少しく考察を行つて見よう。

in vitro 法は大別すると次の3種類に分けられる。

- 1) 体液の場合 (血液、骨髓、胸腹水等)
- 2) 培養細胞の場合
- 3) 組織切片の場合

in vitro 標識法では前記の如く人体への放射線障害は全く無視し得、又少量の標識化合物ですむ等の利点があるが、本質的に普通の病理組織検査の場合と同様組織の極めて一部しか検査し得ない缺点がある。生体内に於ける核酸代謝が全く in vitro に於いても、与えられた条件下で更に同様に行われ得るか否かは、同一試料により、in vitro 法と in vivo 法とで比較 check する事により良否を判定し得る。津屋、Bond、Fliedner<sup>44)</sup> はマウ

ス骨髄に於いて略一致を見、又 Rubini<sup>37)</sup> はマウス肉腫の一種についてもこの事を確めている。培養液の check も之を目標として行われるべきである。

#### a) 組織切片の大きさ

次の缺点是組織片の均等標識の問題である。

in vitro 標識法に於ける組織切片の大きさは高々2~3mm立方であるが、粗な組織以外に於いては、その周辺部 100 $\mu$  (場所によつては 150 $\mu$ ) 位の深さまでしか標識されるに過ぎないので (Fig. 2), 病理組織所見と対比してその取捨を決定する場合もしばしば存在する。

標識される厚さは標識化合物の組織内への拡散能によつて決定され、Veenema<sup>49)</sup> 等は酸素ガスを培養中に通ずる事により深部への標識率を上げているが、又その反対の意見も存在している<sup>9)</sup>。一方胎盤等粗な組織では、比較的深部まで標識されており<sup>26)</sup>、又人体皮膚角化層の場合では、2mm立方の大きさまでは均等に標識されると服山<sup>17)</sup>等は報告している。又組織切片の大きさが2×2×2~2×2×10mm程度に異つていても labeling index 及び grain counting に大差は見られない。

#### b) <sup>3</sup>H-標識化合物の使用量

培養液 1 ml 当りの使用濃度について、Ruhimi<sup>37)</sup> 等は 1  $\mu$ c/ml で過剰であると云つているが、本実験当初に於いて標識率を正確に知る意味に於いて、5  $\mu$ c/ml の <sup>3</sup>H-nucleoside を使用し、露出時間を短縮する事により臨床的応用の可能性を見出さんと試みたが、最近に於いては 2  $\mu$ c/ml にて充分臨床的に応用し得る事を確めている。然しその実験系に於いて細胞に障害を来たさない程度の Tritium の濃度を用いなければならない。山田<sup>54)</sup> は Hela 細胞のコロニー増殖に対する培養液中の <sup>3</sup>H-Thymidine の濃度の影響を観察している。後述の如く著者の場合は本方法を flash labeling のみの目的で使用しているので、その濃度については考慮しなくても良い。但しこの際 specific activity の高い <sup>3</sup>H-nucleoside を使用する事、及びこの nucleoside と競合する物質を含有しない培養液の使用を推奨したい。

## c) 培養時間

in vivo 法に於いては  $^3\text{H}$ -Thymidine は極めて短時間(1~2分)でDNA合成期にある細胞に取り込まれる事が知られているが<sup>51)</sup>, in vitro に於いても数分以内に完了する事が知られ, Taylor<sup>40)</sup>は組織培養に於いて  $^3\text{H}$ -nucleoside 液内にわずか10分間投入するのみであり, 又 Rubini<sup>37)</sup>は20分を effective labeling period と云っている. 更に Bender<sup>1)</sup>は人の Leukocytes の in vitro labeling で25分間 incubate している. 従つて培養時間は30分~1時間以内で充分と考えられる.

## d) 培養液

第13表に示す如く, 種々のものが用いられるが, 生理的食塩水<sup>3)</sup>, Hanks, Eagle<sup>39)</sup>. 等いずれも使用可能である. 著者は YLE+子牛血清添加による培養液を使用して来たが, Eagle の培養液のみにて, より以上の結果を得ているので<sup>39)</sup>, これについては今後の研究課題としたい.

## e) Film の問題

従来 Kodak AR-10 のストリッピングフィルムを使用して来たが, 曝射時間が3~4週と比較的長く, 又染色はフィルムベースまで染色されるため, 検鏡に際し見づらい等の欠点が存在するが, フィルムの厚さに関しては一定で dipping 法に比し安定している. 使用の簡便さからはは NTB-3 による dipping 法が最もすぐれ, 且つ曝射時間も前者に比し短かく, 1~2週間で良く, 臨床的応用にはなほ都合である. 国産感光乳剤に関しては平田<sup>23)24)</sup>の研究があるが本研究に於いては曝射時間の短縮は期待出来なかつた.

以上培養液, 標本標識技術の向上, 使用同位元素, 特に高い specific activity のものの使用, 更に高感度フィルム等の使用により, 短期間(例へば3~4日以内)での判定が可能となれば, 従来の病理組織学の所見と相俟つて, その臨床的応用は更に発展するものと期待される.

## 結 語

1) 人悪性腫瘍につき扁平上皮癌(皮膚癌10例, 子定癌19例, 口腔内癌16例, 肺癌1例, 計46例)及び腺癌(胃癌29例, 乳癌24例, 直腸癌1例, 計54例)について, in vitro 標識法によりD

NA, 及びRNA labeling index を求めた.

2) 扁平上皮癌の labeling index はDNA合成で3~25%, 平均12.5%, RNA合成で50~90%, 平均78%であつた.

腺癌の labeling index は, DNA合成で3~18%, 平均9.3%, RNA合成では20~80%, 平均49.6%であつた.

3) 扁平上皮癌の場合は, DNA, RNAのいずれの合成に於いても腺癌に比し高い labeling index を示しているが, 之は臨床的に見られる放射線感受性の相違を示唆するものと考えられる.

4) 放射線照射により扁平上皮癌, 腺癌共にDNA, RNA labeling の低下を認めたが, 扁平上皮癌の方が腺癌に比し更に著しい変化を認めた.

更にDNA, RNA合成の著しい阻止(labeling index 0.5%以下)を指標として, いわゆる time dose relationship をプロットすると共に, 治療効果の判定に役立つ事を強調した. 然し本法による time dose relationship の正確な分析は今後に残された問題であろう.

5) 最後に本法の技術的事項について紹介すると共に, 之に若干の考察を加えた.

稿を終るに当り, 常に懇切な指導と御校閲を賜つた伊東教授並びに前教授癌放射線科部長津屋旭先生, 本学田中講師に深く感謝の意を表すると共に, 御援助をいただいた外科山岸教授, 和田教授に深く感謝致します.

## 文 献

- 1) Bender, M.A. and D.M. Perscott: DNA Synthesis and Mitosis in Cultures of Human Peripheral Leukocytes. Exptl. Cell Res., 27: 221-229, 1962.
- 2) Billen, D.: Effect of X-ray on Initiation of DNA Replication In Vivo. Cellular Radiation Biology, The Williams and Wilkins Co., 397-403, 1965.
- 3) Bond, V.P., Flidner, T.M. and E.P. Cronkite: DNA synthesis in irradiated bone marrow and peripheral blood cell studied in vitro incorporation of  $^3\text{H}$ -Thymidine. Rad. Res., 9: 93-94, 1958.
- 4) Brookhaven National Laboratory: Annual Reports, 1962.
- 5) Büchner, F.: 再生増殖および癌化, 現代病理学に於ける構造代謝機能, 医歯薬出版, 1963.

- 6) Choné, B. et al.: In Vivo-Untersuchungen mit  $^3\text{H}$ -Thymidin zum Studium der Tumorzellkinetik in Punktaten. Strahlenforschung und Strahlenbehandlung. 4 Band; 156—165, 1963.
- 7) Cohen, L., M.B., B. Ch., D.M.R.T.: Radiotherapy in Breast Cancer. The Dose-Time Relationship. Brit. J. Rad., 25: 636—642, 1952.
- 8) Cronkite, E.P. et al.: Tritium-Labeled Thymidine: Its Somatic Toxicity and Use in Study of Growth Rates and Potentials in Normal and Malignant Tissue of Man and Animals, in Tritium in Physical and Biological Sciences. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2: 189—207, 1962.
- 9) Drew, R.M. et al.: Oxygen Inhibition of Nucleic Acid Synthesis in HeLa-S3 Cells. Exptl. Cell. Res., 36: 297—309, 1964.
- 10) DuSault, L.A.: Time Dose Relationship. Amer. J. Roent., 75: 597—606, 1956.
- 11) Edwards, J.L. et al.: Some Characteristics of DNA Synthesis and the Mitotic Cycle in Ehrlich Ascites Tumor Cell. J. Bioph. Bioch. Cyt., 7: 2: 273—282, 1960.
- 12) Eichhorn, H.J.: Über eine Schwerpunktverlagerung in der Dosisverteilung bei der Röntgenbestrahlung des Mammakarzinoms und die Höle der Herddosen in biologischen Mass. Strahlentherapie, 89: 517—532, 1953.
- 13) Feinendegen, L.E. et al.: RNA and DNA Metabolism in Human Tissue Culture Cells Studies with Tritiated Cytidine. Exptl. Cell Res., 19: 443—459, 1960.
- 14) Fogh, J. and R.O. Lund: Continuous Cultivation of Epithelial Cell Strain (FL) from Human Amniotic Membrane. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 94: 537, 1957.
- 15) Friedman, M. et al.: Time-Dose Relationship in Irradiation of Recurrent Cancer of the Breast. Amer. J. Roent., 73: 6: 986—998, 1955.
- 16) 藤田哲也, 三宅清雄: オートラジオグラフィによる細胞増殖と分化の分析, 細胞化学シンポジウム, 14, 丸善, 276—290, 1964.
- 17) Fukuyama, K. et al.: DNA Synthesis in Human Skin Studied in Vitro by Autoradiography. J. Invest. Derma., 44; 1: 29—32, 1965.
- 18) Hagen, U. und R. Wind: Untersuchung über die Strahlenempfindlichkeit der Deoxyribonukleinsäure. I. Die Empfindlichkeit der Wasserstoffbrücken. Strahlentherapie, 124: 275—283, 1964.
- 19) Hagen, U.: Untersuchungen über die Strahlenempfindlichkeit der Deoxyribonukleinsäure. II. Die Länge der Nukleotidketten nach Bestrahlung in vitro. Strahlentherapie, 124: 428—437, 1964.
- 20) Heller, C.G. et al.: Rate of Spermatogenesis in Man Determined by Incorporating Tritiated Thymidine into Testes. Effect of Ionizing Radiation on the Reproductive Organ, 263—267, 1963.
- 21) Heller, C.G. and Y. Clermant: Spermatogenesis in Man: An Estimate of Its Duration. Science. 140: 184—185, 1963.
- 22) Hughes, W.L. et al.: Cellular Proliferation in the Mouse as Revealed by Autoradiography with Tritiated Thymidine. Proc. Nat. Acad. S., 44: 476—483, 1958.
- 23) 平田明: ミクロオートラジオグラフィ—乳剤NR-M1, NR-M2, NR-H1の特性とその医学への応用, 第24回日医放総会, 1965.
- 24) 平田明: 同上, サクラXレイ写真研究, 16; 2: 20, 1965.
- 25) 岩下健二他: 皮膚科領域への $^3\text{H}$ -Compound Microautographyの応用, 核医学, 2: 1: 33, 1965.
- 26) 岩崎, 香西:  $^3\text{H}$ -Thymidineの胎盤への吸収, 第16回日本産婦人科学会総会, 1965.
- 27) Johnson, H.A. et al.: A method of labeling tissues with tritiated thymidine in vitro and its use in comparing rates of cell proliferation in duct epithelium, fibroadenoma, and carcinoma of human breast. Cancer, 14; 3: 639—643, 1961.
- 28) Lajtha, L.G.: On the Mechanism of Radiation Effect on DNA Synthesis. Rad. Res., 8: 1, 1958.
- 29) Lajtha, L.G. et al.: The application of Autoradiography in the Study of Nucleic Acid Metabolism. Lab. Invest., 8; 1: 214—224, 1959.
- 30) Lamerton, L.F. and R.J.M. Fry: Cell Proliferation. Blackwell Sci. Publ. Oxford, 1963.
- 31) Lee, H.H. and T.T. Puck: The Action of Ultraviolet Radiation on Mammalian Cell as Studied by Single Cell Techniques. Rad. Res. 12: 340—348, 1960.
- 32) Marie, S.H., Dickson and J. Paul: Some effects of X-irradiation on the Metabolism of Deoxyribonucleic Acid in Mammalian Cells. Grown in Culture. Int. J. Rad. Biol., 3: 4: 419—429, 1961.
- 33) Mendelsohn, M.L.: The Kinetics of Tumor Cell Proliferation. Cellular Radiation Biology, The Williams and Wilkins Co., 498—513, 1965.

- 34) 中井準之助他：組織培養，基礎と応用，朝倉書店，45，1964.
- 35) Oehlert, W. et al.: Autoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese im überlebenden Tumorgewebe. Beitr. Path. Anat., 128: 468—480, 1964.
- 36) Parker, R.C.: Methods of Tissue Culture. 3. Ed. Hoeber Inc. N.Y., 113, 1961.
- 37) Rubini, J.R. et al.: In Vitro Labeling of Proliferating Tissues and Tumors with Tritiated Thymidine. J. Nucl. Med., 2: 223—230, 1961.
- 38) 妹尾他：オートラジオグラフィによる細胞の増殖と分化の分析，新細胞学，朝倉書店，605—637，1965.
- 39) 田中，伊東，松井：<sup>3</sup>H-Thymidine, <sup>3</sup>H-Cytidine の In Vitro Labeling 臨床の応用 (第4報)，第6回核医学会発表，昭40.
- 40) Taylor, J.H.: Nucleic Acid Synthesis in Relation to the Cell Division Cycle. Ann. N.Y. Acad. Scien., 90: 409—421, 1960.
- 41) Titus, J.L. et al.: Labeling of Human Tumors with Tritiated Thymidine. Arch. of Path., 79: 3: 324—328, 1965.
- 42) Tolmach, L.J., Terashima, T. and R.A. Phillips: X-ray Sensitivity Changes During the Division Cycle of HeLa S-3 Cells and Anomalous Survival Kinetics of Developing Microcolonies. Cellular Radiation Biology, The Williams Wilkins Co., 376—385, 1965.
- 43) 塚本他：乳癌の放射線治療成績，日医放誌，15: 153, 1955.
- 44) Tsuya, A. et al.: Cellularity and DNA Synthesis in Erythrocytic Bone Marrow Cells Following Total and Partial Body Irradiation. Rad. Res., 14: 618—632, 1961.
- 45) 津屋旭他：Tritium (<sup>3</sup>H) の Radioautograph. 最新医学，15: 4: 22—32, 1960.
- 46) 津屋旭他：Tritium (<sup>3</sup>H) の Radioautography の理論と実際，日本臨床，19: 8: 1475—1484, 1961.
- 47) 津屋旭：In Vivo 及び In Vitro Autoradiography. 総合臨床，14: 1: 62—68, 1965.
- 48) 津屋旭：Autoradiograph の臨床病理学的応用，臨床病理，13: 1: 34—42, 1965.
- 49) Veenema et al.: Histochemistry: A Possible guide to therapy of bladder tumor. J. Urol., 90: 736—746, 1963.
- 50) Veenema et al.: Experimental Studies on the Biological Potential of Bladder Tumors. J. Urol., 93: 202—211, 1965.
- 51) Watts, J.W. and H. Harris: Turnover of Nucleic Acids in a Non-Multiplying Animal Cell. Biochem. Jour., 72: 147—153, 1959.
- 52) Whitmore, G.F., Gulyas, S. and J. Botond: Radiation Sensitivity Throughout the Cell Cycle and Its Relationship to Recovery. Cellular Radiation Biology, The Williams and Wilkins Co., 423—441, 1965.
- 53) 山下久雄：皮膚癌及び乳癌の放射線治療成績，特に手術後予防照射について，日医放誌，14: 367, 1954.
- 54) 山田正篤：ガン細胞の増殖サイクル，蛋白質，核酸酵素，9: 13: 1153—1161, 1964.