

Title	放射線と加温によるマウス移植腫瘍細胞の形態学的変化
Author(s)	徐, 志堅; 高橋, 正治; 平岡, 真寛 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1986, 46(3), p. 492-499
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18661
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

放射線と加温によるマウス移植腫瘍細胞の形態学的変化

京都大学医学部放射線医学教室（主任：阿部光幸教授）

*国立京都病院・病理

徐 志堅 高橋 正治 平岡 真寛
芥田 敬三 阿部 光幸 古田 睦広*

（昭和60年8月12日受付）

（昭和60年10月17日最終原稿受付）

Morphological Study on the Effects of Heat and Radiation on Mouse Mammary Carcinoma

Shiken Jo, Masaji Takahashi, Masahiro Hiraoka, Keizo Akuta,
Mitsuyuki Abe and Mutsuhiro Furuta*

Department of Radiology, Faculty of Medicine, Kyoto University

(Director: Prof. Mitsuyuki Abe)

*Department of Pathology, Kyoto National Hospital

Research Code No. : 407.1

Key Words : *Hyperthermia, Radiation, Morphological study,
Tumor cell degeneration*

There exist a large number of literatures on hyperthermia, but little work has been done to study early morphological changes in tumor cells after heat exposure. In this study, morphological changes in transplanted mammary carcinoma in syngeneic C3H/He mice were examined using a photomicroscope until 12 hours after local exposure to radiation (30 Gy), heat (44°C, 45 min) and radiation plus heat.

Immediately, 3 and 12 hours after the treatments, tumors were excised, fixed and sectioned at 4 μ m. The sections were stained with hematoxylin and eosin. For the quantitative estimation of morphological changes, 500 cells were examined at random through the solid part of the tumor with respect to cell degenerations. Degenerated cells were classified into 8 categories, viz., 1) hypertrophy of cell, 2) vacuolar degeneration of cytoplasm, 3) irregularity of nucleus, 4) vacuolar degeneration of nucleus, 5) pyknosis, 6) karyolysis, 7) karyorrhexis and 8) disappearance of nucleus. The number of cells which demonstrated respective degenerations stated above was expressed as percent of 500 cells examined at random.

The morphological changes of tumor cells were essentially different between groups of radiation and heat. Degeneration of tumor cells was observed earlier in a heat group than in a radiation group. It seemed likely that the early appearance of pyknosis and karyolysis observed after heating resulted in the direct effect of heat on tumor cells.

The combined effect of heat and radiation appeared to be additive when the effect was estimated on the basis of percent cells with all types of degenerations, while synergetic when estimated by a percent cells with a disappearance of nucleus which directly leads cell death.

I. はじめに

近年、加温療法は新しい癌治療法として急速に発展してきた。とくに基礎研究の領域では多数の研究成果が発表されているが、そのうちで放射線との関連が深いものをみると、

1. 41.5~46.5℃の加温によって、細胞の生存率は低下し、とくに42.5℃以上の加温で著明である¹⁾。

2. 腫瘍の細胞周期に対する感受性は、放射線と加温では異なっている²⁾。

3. 加温は放射線による細胞の損傷(亜致死障害および潜在致死障害)の回復を阻害する³⁾。

4. 低 pH, 低栄養状態にある低酸素細胞は正酸素または高酸素細胞よりも熱感受性が高い⁴⁾。

以上のように、加温は放射線の弱点を補う形で放射線効果を増強するものと考えられている。これらの結果は *in vitro* の研究によって得られたものであるが、*in vivo*^{5)~8)}あるいは臨床研究^{9)~14)}においても、加温の放射線増強効果について報告されてきた。一方、*in vivo*においては細胞、組織学的変化についても検討されているが、その多くは加温単独処理後の形態学的変化を電子顕微鏡下に検討したものであり¹⁵⁾¹⁶⁾、また処理後早期の光学顕微鏡下の変化については不明点が多い。われわれは加温併用放射線照射後の細胞形態学的変化について、加温と放射線それぞれの効果と比較しながら経時的に、また定量的に検討することを試みた。今回は処置後12時間までの変化を光学顕微鏡下に検討した結果を報告する。

II. 材料、方法

1. 動物、腫瘍

動物は8週齢の C3H/He 雄マウスを用いた。腫瘍は冷凍保存した同系マウス自然発生乳癌の第2世代腫瘍を急速解凍し、マウス背部の皮下に移植して増殖させた。その第3世代腫瘍を摘出して細切し、5%仔牛血清を含む Hanks 氏液と混合して30分間静置したのち、上澄を Swinny filter にて濾過し、室温で1,500rpm にて細胞を遠心分離した。生じた沈査を Hanks 氏液で希釈し、単離腫瘍細胞濃度を約 2×10^6 個/ $5\mu\text{l}$ としたのち、この $5\mu\text{l}$ をマウスの左大腿筋肉内に移植した。腫瘍径が約

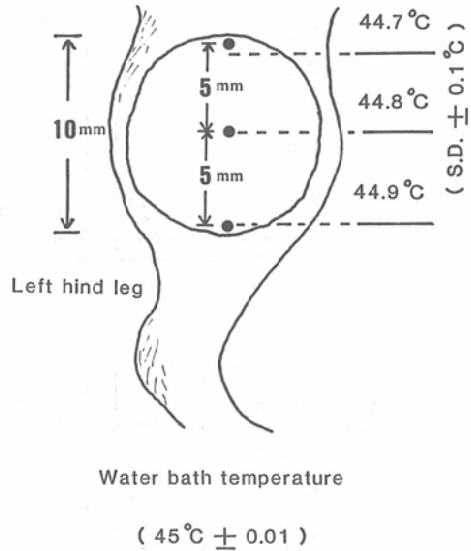


Fig. 1 Distributions of intratumor temperature when a tumor-bearing leg was immersed for 5min. in the water bath maintained at 45°C.

10mm に達したとき実験に用いた。

2. 処置方法、条件

以下のすべての処置はマウスを麻酔せずに行った。

1) 照射条件

ライナック10MV X線(線量率4Gy/min)を用いてマウスの下肢に局所照射した。ビルドアップ補償には2.5cmのアクリル板を用いた。この腫瘍の TCD_{50} は約76.7Gy²⁹⁾であるが、本研究では30Gyを照射した。

2) 加温条件

腫瘍移植した下肢を44℃の恒温槽に浸し、45分間の加温を行なった。Fig. 1は腫瘍の直径に沿った温度を温度センサー(Bailey社製MT-29/5)を用いて測定した結果であるが、腫瘍内はほぼ均一に加温されている。

3) 処置群

マウスを以下の3群にわけ、各群15匹とした。

① 放射線単独群 : 30Gy

② 加温単独群 : 44℃45分間

③ 両者併用群 : 30Gy+44℃45分間

両者併用群については照射直後に加温を併用した。

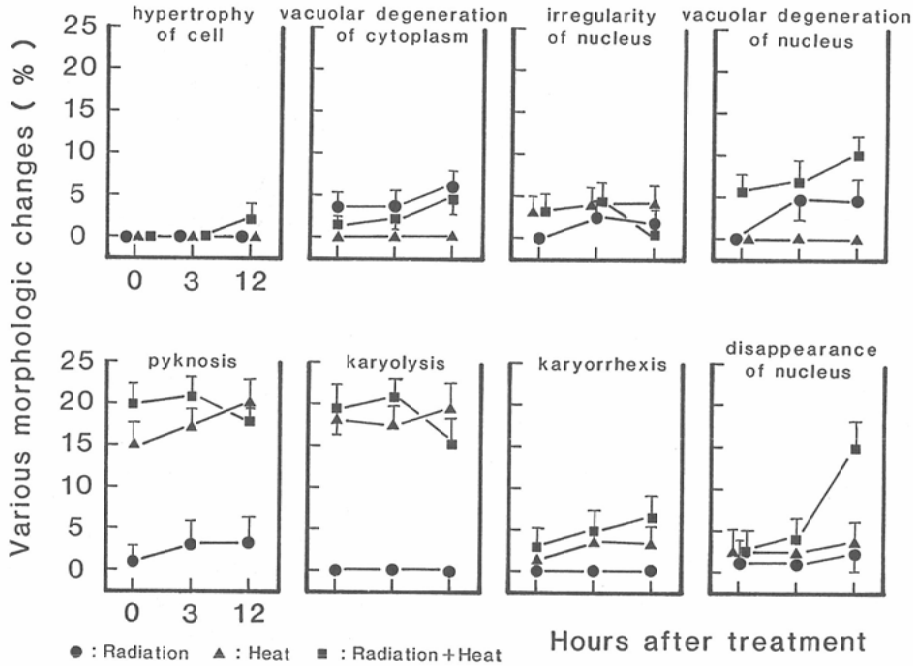


Fig. 2 Changes in the incidence of cell degenerations immediately through the 12th hour after radiation (●), heat (▲) and radiation plus heat (■). Cell degenerations were classified into 8 different categories. Fifteen to 20% of tumor cells treated by heat alone and also by radiation plus heat showed pyknosis and karyolysis immediately after the treatments. In the combined treatment group, the disappearance of nucleus was observed in 15% of tumor cells at the 12th hour after the treatment, while in less than 4% in each group of radiation and heat alone. This suggests that, as for the disappearance of nucleus, the combined effect of radiation and heat is synergetic.

3. 組織標本の作成

各処置の直後、3時間、12時間に腫瘍を摘出して10%ホルマリン固定し、アルコールおよびキシリンにて脱水したのち、4 μ m厚の切片をつくり、ヘマトキシリン・エオジン (H・E) にて染色した。

4. 細胞変性の検討

腫瘍細胞の形態学的変化を定量的に検討するために以下のような方法を用いた。すなわち、腫瘍内充実部 (主として中心部およびその附近) を10カ所にわけ、光学顕微鏡1,000倍拡大で細胞のいろいろな形態学的変化を、後述のごとく8種類の変性において観察した。さらに、上記の10カ所のそれぞれに存在する細胞約500個を数え、その中に含まれる8種類の変性細胞について、それぞれの全細胞数に対する割合 (%) を求めた。

III. 結果

処置による腫瘍細胞の形態学的変化を、(i) 細胞腫大、(ii) 細胞質空胞化、(iii) 核形不整、(iv) 核空胞化、(v) 核濃縮、(vi) 核融解、(vii) 核崩壊、(viii) 核消失の8種類の変性に分類して検討した。その結果を Fig. 2 に示す。細胞腫大、細胞質空胞化および核形不整などの変性は、各処置群ともわずかな変化しか認められず、変性細胞の割合はいずれも5~6%以下であった。また核空胞化は細胞質空胞化と同じように放射線を加えたときのみ認められ、加温単独では認められなかった。一方、核濃縮および核融解は、放射線単独ではほとんど認められず、加温処置群のみ認められた。これらの変性細胞は加温処置直後から出現し、その割合は両者とも15~20%を占めていた。また核

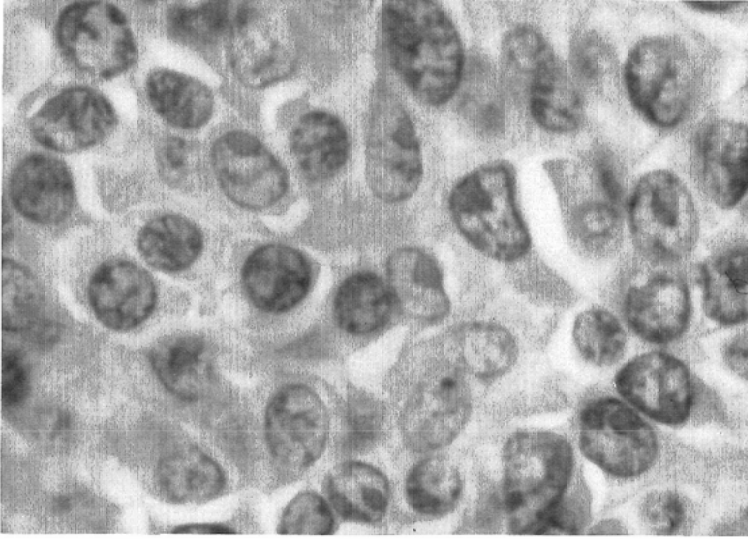


Fig. 3 Untreated C3H mammary adenocarcinoma (H.E., $\times 500$).

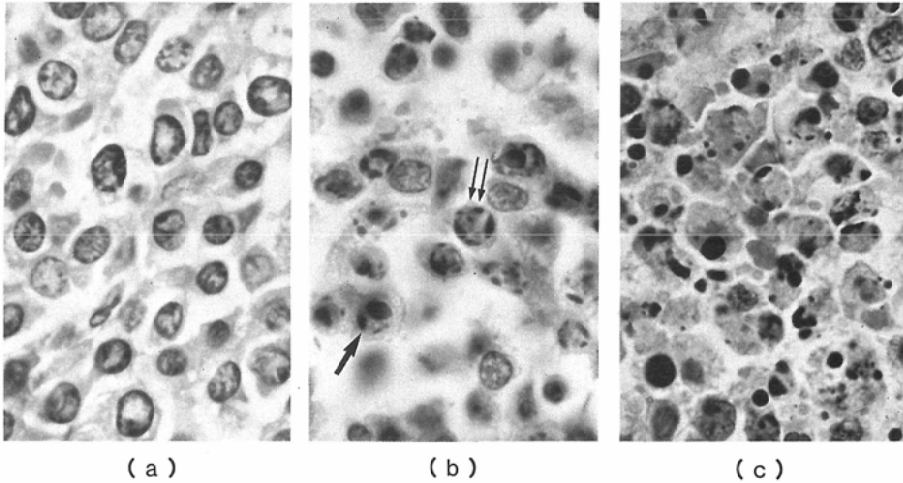


Fig. 4 Morphological changes in tumor cells immediately after the treatments are shown. Tumor cells treated by radiation alone (a) did not show any degenerative change except minimal vacuolation of cytoplasm. Remarkable degenerations of the nuclei including pyknosis (\uparrow) and karyolysis ($\uparrow\uparrow$) were revealed in tumor cells treated by heat alone (b) or radiation plus heat (c). Furthermore, degenerations of nuclei were more prominent in tumors treated by radiation plus heat than alone (H.E., $\times 500$).

崩壊も放射線単独では認められなかったが、加温処置後にのみ、時間の経過とともにわずかながらその割合が増加した。さらに核消失は放射線、加温各単独ではほとんど認められなかったが、両者を併用した場合、とくに処置後6時間から12時間

にかけて急に出現し、その頻度が相乗的に増加するのが特徴的であった。

本実験に用いたマウス自然発生乳癌は腺構造の不鮮明な腺癌であり、その組織細胞像を Fig. 3 に示し、また Fig. 4 は処置直後の組織像を示してい

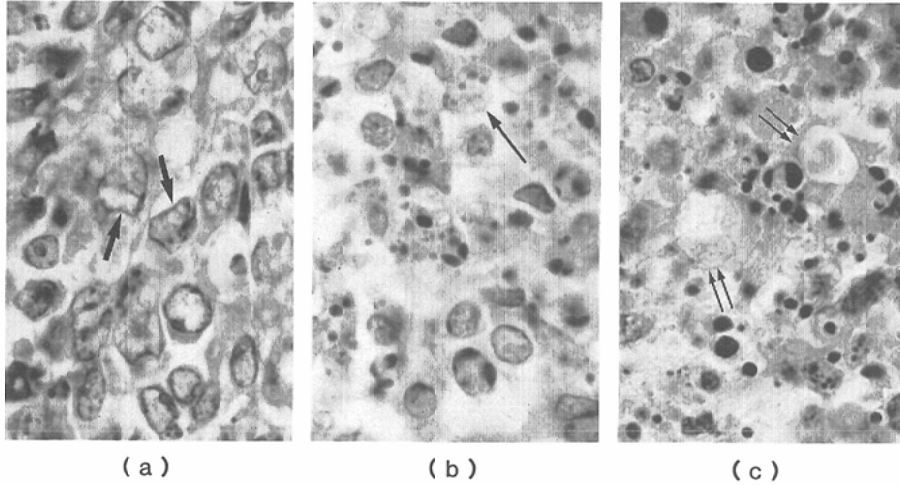


Fig. 5 Morphological changes in the tumor cells 12 hours after the treatments are shown. Vacuolation of nuclei (↑) were seen in tumor cells treated by radiation alone (a). In the heat alone (b), not only remarkable pyknosis and karyolysis but also karyorrhexis (↑↑) were noticed. In the radiation plus heat (c), the degree of degenerations increased strongly and the disappearance of nuclei (↑↑) was observed (H.E., ×500).

る。放射線単独 (a) ではわずかに細胞質の空胞変性を認めるのみであったが、加温単独 (b) では核を中心とする変性が著明に出現し、核濃縮 (↑)、核融解 (↑↑) の変性が多数認められた。放射線と加温併用の像 (c) は加温単独と同じように核の変化が主体であるが、核空胞化、核濃縮、核崩壊などの変性の程度は加温単独よりも著明であった。処置後12時間の組織像を Fig. 5 に示す。放射線単独 (a) では核空胞変性 (↑)、細胞腫大などの変性細胞数の増加がわずかに認められた。一方、加温単独 (b) では処置直後の像と同じように核濃縮、核融解などの変性が著しく、また核崩壊 (↑) も認められるようになった。さらに放射線と加温併用 (c) では、細胞変性はこれらの単独処置群よりもさらに強く認められた。とくに核濃縮、核融解および核崩壊の程度が著しく増強しており、また核消失 (↑↑) が多数出現した。

以上の結果をまとめると、放射線単独では処置後12時間までは細胞変性の出現頻度はあまり高くなく、その変性は空胞化を主体とするものであった。一方、加温単独では核濃縮、核融解を中心とする変化が処置直後から高い頻度で認められた。

さらに放射線と加温併用では、加温単独と同様に核濃縮、核融解が中心であり、また、放射線、加温の単独処置では12時間後でも2~3%にすぎなかった核消失の頻度が、両者を併用することによって15%以上に増加した。

Fig. 6 はこれらのいろいろな種類の変性を一括し、各処置群における変性細胞の出現頻度を経時的にヒストグラムにしたものである。この腫瘍では無処置群でも約5%のなんらかの変性細胞が認められた。処置直後の変性細胞の割合は、放射線単独群では無処置群とほぼ等しく約6%であったが、加温処置群では直後から変性細胞の出現は著しく、加温単独および放射線併用群ではそれぞれ約40%、54%であった。さらに処置後の時間とともに各群の変性細胞の割合は増加し、処置後3時間では放射線、加温各単独および両者併用群はそれぞれ約15%、44%および63%であった。また、処置後12時間を経過すると、放射線単独では約17%、加温単独約50%、放射線と加温併用では約70%に増加した。すなわち変性細胞の出現頻度を照射と加温の処置後12時間までの経過でみると、照射単独群では17%まで増加するものの、そ

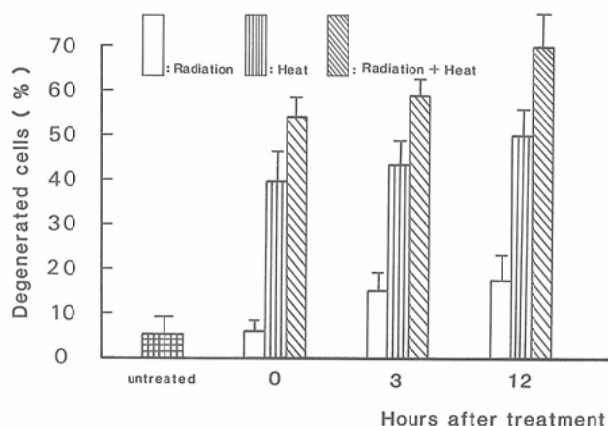


Fig. 6 Percentages for all of degenerated tumor cells are illustrated according to the treatment modalities and the time courses after the treatments. Degenerative changes appeared earlier in tumor cells treated by heat alone or radiation plus heat than radiation alone. The combination effect of radiation and heat was likely to be additive because the sum of percentages for degenerated cells treated by radiation and heat alone was almost equal to that for the combined treatment group.

の程度は低く、一方、加温処置群（単独および放射線併用）では直後から著明に出現するのが特徴である。また、このヒストグラムが示すように、放射線と加温併用効果は、すべての細胞変性を含めて指標とし、処置後12時間までの経過をみた場合、相乗効果ではなく、相加効果として示された。

IV. 考 案

放射線による細胞死は主としてDNAを標的とする分裂死であり、また形態学的には細胞質および核の膨化、空胞変性に始まり、次いで核濃縮、融解、壊死にいたる過程はすでに成書にみられるところである^{17)~19)}。

一方、加温による細胞死にいたる作用機点として、核タンパク²⁰⁾、DNA²¹⁾、細胞膜²²⁾などの損傷やlysozymeの活性化²³⁾などが考えられているが、まだ不明な点が多い。細胞形態学的にみた場合、細胞死にいたる主な変化は細胞質、細胞膜などの変性であり、細胞核の変性ではないとの報告が多くみられている¹⁵⁾¹⁶⁾²⁴⁾。

本研究では加温処置および放射線との併用による細胞の形態学的変化の特徴を知る目的で、細胞変性を8種類に分類し、その出現頻度を求め、これを放射線単独と比較しながら検討した。その結

果、放射線単独では照射直後の細胞変性はほとんど認められず、12時間を経て細胞質、核の空胞変化が出現するものの(Fig. 2)、その変性細胞の占める割合は低く17%程度にすぎなかった(Fig. 6)。これは照射線量が30Gy、すなわちこの腫瘍のTCD₅₀ 76.7Gy²⁹⁾の約39%という比較的低線量に起因していると考えられるが、放射線に対する細胞の反応のうち核の変性が照射後12時間以内は発現し難いという本質的な点にあるものと思われる。

一方、加温単独処置では核濃縮や核融解などの変性が処置直後から著明に現われるのが特徴的であった(Fig. 2, 4)。これは核の変化が腫瘍細胞に対する熱処理の直接的な効果を示すものとする報告¹⁶⁾と、一方では核の変化は二次的な反応とする報告もある²⁴⁾。いずれにしても、加温直後からみられる強い核の変性は細胞の致死につながるものであり、加温後24時間という比較的早い時期でも腫瘍内に著明な壊死巣を生じる¹⁶⁾、その初期過程であろう。このように細胞形態からみた場合、加温直後から細胞死に直接つながるような核の変性は、熱処理に対する腫瘍細胞の早期に発現する反応の一つとして特徴的であるといえる。

加温と放射線の併用処理直後の変化は核濃縮、融解 (Fig. 2) などの変性が著明であり、この点は加温単独処置による細胞反応と類似しているが、放射線単独処置の変化とは明らかに異なっている。いいかえると、放射線と加温とは細胞を致死へ導く作用機点が異なっている²⁵⁾ことをうかがわせるものである。

放射線と加温が相乗的に作用することは、*in vivo*においてもすでに皮膚反応や腫瘍の TCD₅₀, growth delay などの assay 法で定量的に証明されている⁵⁾⁻⁸⁾²⁶⁾²⁷⁾が、本研究では細胞の形態学的変化を定量的に評価することを試みて、放射線と加温の併用効果を検討した。その結果、すべての細胞変性を一括して評価した場合には相加効果として示された (Fig. 6)。しかし、細胞死をもっとも直接に表現する核消失の頻度を指標とした場合には相乗効果として示され (Fig. 2)、細胞形態学的にみても、加温が放射線効果を増強することは明らかであった。

細胞に対する加温の作用機点については、まだ不明点が多く残されている。すなわち、細胞形態学的にみた場合の加温の target として細胞膜、細胞核、細胞内小器官の膜などがあげられている²⁸⁾が、いずれも決定的な結論にはいたっていない。しかし本研究において、加温直後からみられた核を中心とする強い変性は、加温の作用機点が核膜あるいは核そのものである可能性を強く示唆しているものと考えられる。

V. まとめ

マウス乳癌細胞における放射線と加温による細胞の形態学的変化について処置直後から12時間まで検討した。得られた結果をまとめると、

1. 腫瘍細胞の形態学的変化は放射線と加温処置では本質的に異なっていた。また、放射線と加温併用では加温単独処置によるものと類似していた。

2. 腫瘍細胞の変性は放射線よりも加温の方が早く出現した。

3. 加温直後から出現した核濃縮、核融解などの変化は細胞に対する加温の直接的な効果と考えられる。

4. 放射線と加温の併用効果はあらゆる種類の変性細胞を含めて指標とした場合には相加的效果として示されたが、細胞死を直接に表現している核消失の頻度を指標とした場合は相乗効果として示された。

本研究は文部省科学研究費がん特別研究 I (58010032加納班) および厚生省がん研究助成金 (59-5 松田班) の援助を受けた。また本研究の要旨は第44回日本医学放射線学会総会において発表した。

文 献

- 1) Dewey, W.C., Hopwood, L.E., Sapareto, S.A. and Gerweck, L.E.: Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. *Radiology*, 123: 463-474, 1977
- 2) Westra, A. and Dewey, W.C.: Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of chinese hamster cells *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.*, 19: 467-477, 1971
- 3) Li, G.C., Evans, R. and Hahn, G.H.: Modification and inhibition of repair of potentially lethal x-ray damage by hyperthermia. *Radiat. Res.*, 67: 491-501, 1976
- 4) Gerweck, L.E., Gillette, E.L., Dewey, W.C.: Killing of chinese hamster cells *in vitro* by heating under hypoxic or aerobic conditions. *Eur. J. Cancer*, 10: 691-693, 1974
- 5) Suit, H.D.: Hyperthermic effects on animal tissues. *Radiology*, 123: 483-487, 1977
- 6) Field, S.B., Hume, S.P., Law, M.P. and Myers, R.: The response of tissues to combined hyperthermia and x-rays. *British J. Radiology*, 50: 129-134, 1977
- 7) Miller, R.C., Connor, W.G., Heusinkveld, R.S. and Boone, M.L.M.: Prospects for hyperthermia in human cancer therapy. part I: Hyperthermic effects in man and spontaneous animal tumors. *Radiology*, 123: 489-495, 1977
- 8) Connor, W.G., Gerner, E.W., Millwr, R.C. and Boone, M.L.M.: prospects for hyperthermia in human cancer therapy. Part II: Implications of biological and physical data for applications of hyperthermia to man. *Radiology*, 123: 497-503, 1977
- 9) U, R., Noell, K.T., Woodward, K.T., Worde, B. T., Fishburn, R.I. and Miller, L.S.: Microwave-induced local hyperthermia in combination with radiotherapy of human malignant tumors. *Cancer*, 45: 638-646, 1980
- 10) Marmor, J.B. and Hahn, G.M.: Combined radiation and hyperthermia in superficial

- human tumors. *Cancer*, 46: 1986—1991, 1980
- 11) Perez, C.A., Nussbaum, G., Emami, B. and von Gerichten, D.: Clinical results of irradiation vombined with local hyperthermia. *Cancer*, 52: 1597—1603, 1983
 - 12) Abe, M., Hiraoka, M. and Takahashi, M.: Clinical experimence with hyperthermia combined with radiation in treatment of cancer. *Cancer Treatment Symposia*, 1: 95—101, 1983
 - 13) 高橋正治, 平岡真寛, 徐 志堅, 百々義広, 小野公二, 西台武弘, 阿部光幸: 放射線とRE誘電加温併用療法の臨床的研究. *日癌治*, 19: 2103—2112, 1984
 - 14) Hiraoka, M., Jo, S., Dodo, Y., Ono, K., Takahashi, M., Nishida, H. and Abe, M.: Clinical results of FR hyperthermia combined with radiation in the treatment of radioresistant cancers. *Cancer*, 54: 2989—2904, 1984
 - 15) Overgaard, J.: Ultrastructure of a murine mammary carcinoma exposed to hyperthermia in vivo. *Cancer Res.*, 36: 983—995, 1976
 - 16) Fajardo, L.F., Egbert, B., Marmor, J. and Hahn, G.H.: Effects of hyperthermia in a malignant tumor. *Cancer*, 45: 613—623, 1980
 - 17) 菅原 努, 上野陽里: 細胞に対する放射線の作用. *放射線基礎医学*, 12: 137—147, 金芳堂, 1966
 - 18) 大星章一, 下里幸雄, 板倉克明, 梅垣洋一郎: 癌放射線療法の病理 (その1). *医学のあゆみ*, 61(10): 618—625, 1967
 - 19) 大星章一, 下里幸雄, 板倉克明, 梅垣洋一郎: 癌放射線療法の病理 (その2). *医学のあゆみ*, 61(11): 665—671, 1967
 - 20) Lysko, K.A., Carson, R., Taverna, R., Snow, J. and Brandts, J.F.: Protein involvement in structural transitions of erythrocyte gho sts. Use of thermal gel analysis to detect protein aggregation. *Biochemistry*, 20: 5570—5576, 1981
 - 21) Walters, R.L. and Henje, K.J.: DNA degradation in heated CHO cells. *Cancer Res.*, 42: 4427—4432, 1982
 - 22) Lepock, J.R.: Involvement of membranes in cellular responses to hyperthermia. *Radiat. Res.*, 92: 433—438, 1982
 - 23) Barratt, G.M. and Wills, E.D.: The effect of hyperthermia and radiation on lysosomal enzyme activity of mouse mammary tumours. *Eur. J. Cancer*, 15: 243—250, 1979
 - 24) Overgaard, K. and Overgaard, J.: Hyperthermic tumourcell devitalization in vivo *Acta Radiologica*, 16: 1—16, 1977
 - 25) Overgaard, K. and Overgaard, J.: Investigations on the possibility of a thermic tumour therapy-II: Action of combined heat-roentgen treatment on a transplanted mouse mammary carcinoma. *Europ. J. Cancer*, 8: 573—575, 1972
 - 26) Thrall, E.D., Gillette, E.L. and Deway, W.C.: Effect of heat and ionizing radiation on normal and neoplastic tissue of the C3H mouse. *Radiat. Res.*, 63: 363—377, 1975
 - 27) Hill, S.A. and Denekamp, J.: The response of six mouse tumours to combined heat and X-rays: Implications for therapy. *Br. J. Radiol.*, 52: 209—218, 1979
 - 28) Hahn, G.M.: Mechanisms of heat action. In "Hyperthermia and Cancer", 87—119, 1982, Plenum Press, New York
 - 29) Nishidai, T., Abe, M. and Révész, L.: Time dependence of response of transplanted mouse mammary tumors to single or split radiation doses. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 9(9): 1351—1356, 1983