The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	試験管内及び生体内における Ehrlich 腹水腫瘍細胞の放射線感受性に関する比較的研究
Author(s)	加納, 永一
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1965, 25(8), p. 1007-1012
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18875
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

試験管内及び生体内における Ehrlich 腹水腫瘍細胞の放射線感受性に関する比較的研究*

京都大学医学部放射能基礎医学教室
加　納　永　一

(昭和40年7月17日受付)

Comparative Investigation on Radiobiological Responses of Murine Ehrlich Ascites Tumor Cells *in Vitro* and *in Vivo*

By

Eiichi Kano

Department of Experimental Radiology, Faculty of Medicine, Kyoto University

Radiation responses of murine Ehrlich ascites tumor cells were compared between *in vitro* and *in vivo*. A diffusion chamber method was adopted for the cell culture *in vivo*, while an usual tissue culture method *in vitro*,

In order to make it possible to compare the radiation responses in these two culture systems, the cells were prepared from the same *in vitro* culture, the inoculation period was established not so long as to reduce the selection pressure, if any, among the cells within the diffusion chamber and the conditions of these two culture systems were arranged to give similar growth rates.

Different dose–effect relationships were observed between these two culture systems. Extrapolation number, n, *in vivo* appeared to be larger than that *in vitro*, whereas D_0 values were approximated to each other in these two culture systems where the control groups have closely similar growth rates.

The difference in radiation responses between *in vitro* and *in vivo*, the characteristics of the diffusion chamber method as an *in vivo* culture technique and the relationship between the numbers by colony formation method and those by cell count method as the criteria in the studies of the survival fraction from X-irradiation were discussed.

序　論

哺乳動物細胞水準に於いて，何らかの指標で表現された Reproductive Integrity でもつて，線量効果関係を解析する研究は試験管内では1956年 Puck 等 (1) (2)によつて，Hela 細胞株を用い，Colony Formation を指標にした線量効果関係が報告されたのが最初であり，又，生体内では1959年 Hewitt 等 (3)によつて，CBA系マウスに自然発生したリムパ性白血病細胞を同系移植し，その白血病発生のTD50を指標にした線量効果関係が報告されたのが最初である．

それ以来，多くの報告で試験管内及び生体内に於ける線量効果関係が述べられて来た．これらによると，線量効果曲線は Target Theory に合致

*Contribution number 25 from Department of experimental radiology, Faculty of medicine, Kyoto University, Kyoto.

し外挿数n値は，試験管内では2前後にあるとする報告が多く，生体内では2前後から10前後に及ぶ種々の値が報告されている（4）．一方D_0値は，試験管内及び生体内ともに70R前後から200R前後の値が報告されている．（5）（6）．試験管内及び生体内の線量効果関係を比較した報告に於いては，この両者間に差異がみられるとするものとみられないとするものがあり，又，みられるとするものでもそのどちらが，より感受性であるかについては，一致していない（7）（8）．

一方，生体内で腫瘍移植系等を用いる種々の実験で，宿主対腫瘍相互間に何らかの相互作用がある事が，免疫生物学的知見或いは主病巣を摘出した後の転移巣の自然治癒の症例の如き臨床的知見から推測されて来た（9）（10）．

そこで，試験管内及び生体内に於ける種々の生物学的条件を出来得る限り相互に近似したものにして，両者の線量効果関係を比較し，その差異を解析する事によつて，悪性腫瘍の放射線治療に資する事を期待した．

材料と方法

すべての実験は，37℃で静置培養によつて継代されたマウス Ehrlich 腹水腫瘍細胞，ＪＴＣ－11株（11）（以下E細胞と呼ぶ）を用いて行なわれた．継代及び試験管内実験のための培養液は20％牛血清加ＹＬＨ液が用いられた．ＹＬＨ液は酵母エキス 0.1％，及びラクトアルブミン水解物 0.5％を含む Hanks 液（12）である．生体内実験には，Algire 等（13）によつて開発された Diffusion Chamber法により，約80日令前後の dd 系雄性マウスの腹腔内に，静置培養で準備されたE細胞を培養した．

Diffusion Chamber は液体性成分の通過は許すが細胞等一定限度以上に大きな粒子の通過は許さないような膜面を持つた小室である．この中に一定数のE細胞が浮遊液として注入され，宿主体内に留置された．この膜面は Millipore Filter（Millipore Filter Corporation, Bedford Massachusetts-U.S.A.）と呼ばれる微量濾過用精密標準フイルター である．この報告で用いられた Diffusion Chamber は図1に示された模式図の如く，この膜を円筒型アクリライトプラスチックの両底面に，1％アクリライトアセトン糊液を用いてはりつけたものである．このプラスチック円筒には注射針を通す小孔があらかじめあけられている．準備した Diffusion Chamber をオートクレーブで滅菌した後，注射器で細胞浮遊液を注入し，その小孔をパラフインで埋めた．

実験群は，対照増殖実験群及び線量効果実験群に大別して行つた．

対照増殖実験群

① 試験管内培養系

培養開始時E細胞数を，3，6及び12×10^4 Cells/1.5ml Medium/Tube とし，培養ガラス容器は，

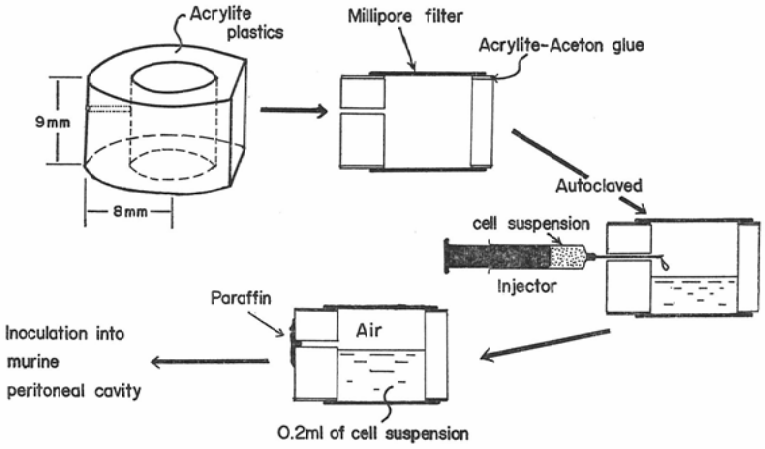

Fig. 1. Schema and preparation of the cell-including diffusion chamber.

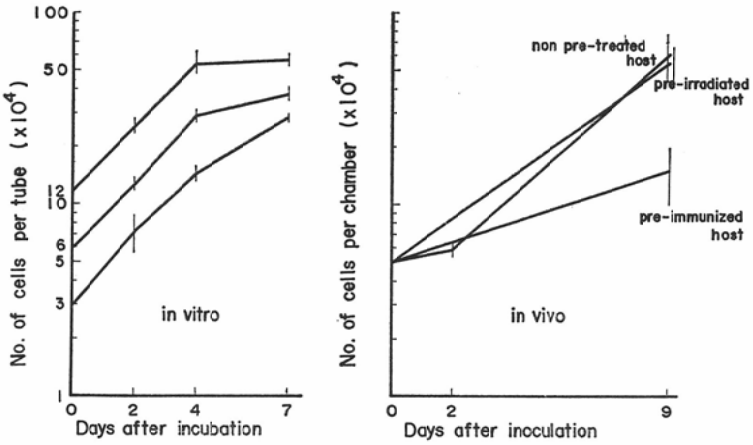

Fig. 2. Control growth curves.

円形短試を用い，静置培養2，4及び7日後に，その細胞数を算定した．細胞数の算定は，各試験管に染色液としてクリスタルヴアイオレツト酢酸溶液3 ml づつを添加し，30分間37°Cで振とうした後，3.000r.p.m. で10分間遠沈し，その上澄3.5ml を捨て，残り1 ml を充分ピペッティングして血球計算板上で算定した．

② 非前処置宿主内培養系

培養開始時E細胞数を5×10⁴ Cells/0.2ml YL-H/Diffusion Chamber とし，2及び9日後の細胞数を算定した．宿主として，約80日令前後の dd 系雄性マウスを用いた．Millipore Filter はその Pore Size (0.22±0.02) μ のGS型を用いた．準備され，細胞浮遊液を封入された Diffusion Chamber は，観血的に宿主腹腔内に留置された．宿生マウスの麻酔は，ペントバルビタールナトリウム 20mg/Kg Weight の皮下注で行なわれた．細胞数の算定は，宿主を頸椎脱臼によつてと殺した直後に開腹して Diffusion Chamber をとり出し，その外壁に附着した大網等を充分ぬぐい去り，5 ml の染色液とともに37°Cに30分間静置し，次いでその染色液中で Millipore Filter を充分破り，Diffusion Chamber 内壁等に附着していると考えられる細胞も充分浮遊するまでピペッティングした後，血球計算板上で算定した．もし，万一，宿主細胞が Diffusion Chamber の外壁になお附着していたとしても，培養細胞に比較して，宿主細胞

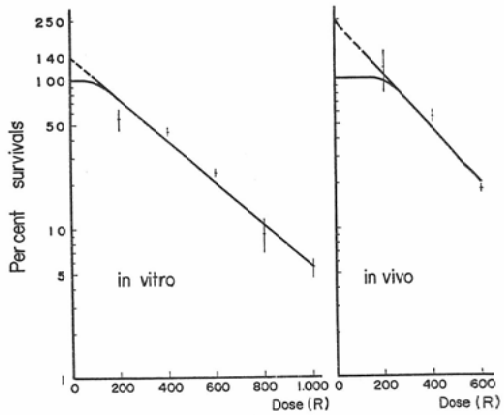

Fig. 3. Dose survival curves.

は著しく小型であるので容易に判別出来る．むしろ，万一，培養細胞が腹水中に迷出している場合があれば，これを除外しなければならないので，腹水を検鏡して確めた．この報告で用いられた Diffusion Chamber では，その内外への細胞の迷入迷出は観られなかつた．

③ 前照射宿主内培養系

非前処置宿主内培養系と同条件であるが，宿主のみは，200Rを培養開始直前に照射されている．

④ 前感作宿主内培養系

静置培養で準備したE細胞 300×10⁴ 個に3.000Rを照射し，1 ml の Complete Adjuvant と混合し宿主に用いようとするマウスの皮下に注射して，約10日を経たものを前感作宿主マウスと

する．宿主マウスに前感作する以外はすべて非前処置宿主内培養系と同様にした．

線量効果実験群

⑤　試験管内培養系

培養開始時E細胞数を 3×10^4 Cells/ 1.5ml Medium/Tube とし，試験管に分注された状態で0，200，400，600，800，又は1.000Rを各々照射して，対照増殖実験群の試験管内系と同様に算定し，特に7日後の細胞数については，線量効果曲線を描いた．

⑥　非前処置宿主内培養系

培養開始2日後に，0，200，400，又は600Rを Diffusion Chamber が留置された宿主マウスの全身に照射し，培養9日後の細胞数を算定して，線量効果曲線を描いた．実験条件は，対照増殖実験群非前処置宿主内培養系と同様に行なった．

以上の如き実験系について，照射はすべて，東芝 KXC-18-2A 型深部治療用X線発生装置を用い，190KVP, 24mA，1.0Cu + 0.5Al，60cm，36R/Min.（空間線量率）の条件で行つた．測定装置は，Victoreen の Radocon, Model 575及び Chamber, Model 601を用いた．

結　果

対照増殖実験群では，図2に示す如く，培養開始時細胞数 3×10^4 Cells/Tube の試験管内培養系で7日間に約10倍，非前処置宿主内培養系で9日間に約12倍，培養開始直後の2日間を除く7日間に約11倍，前照射宿主内培養系で約11培及び前感作宿主内培養系で約3倍の増殖率が各々観られた．

培養開始時細胞数6及び 12×10^4 Cells/Tube の試験管内培養系では，培養開始後4日間は，3×10^4 Cells/Tube のそれと同様の増殖率がみられたが，最後の3日間で増殖率が著しく低下した．

最初の2つの培養系①及び②に於いては，増殖率は近似しており，宿主のみに200R前照射しても増殖率に影響はみられず，前感作宿主を用いた系では，増殖率に著しい低下が観られた．

線量効果実験群では，図3に示す如く，培養開始時細胞数 3×10^4 Cells/Tube の試験管内培養系では，線量効果曲線の D_0 値は約300R，n 値は約1.4であり，非前処置宿主内2日間前培養後照射系では，各々約250R及び約2.5であつた．

すなわち，D_0 値に関しては，この両系で比較的近似しており，n 値に関しては，生体内に培養された系で大きかつた．

考　　按

Ⓐ　E細胞及びその他の哺乳動物細胞に於ける試験管内及び生体内での放射線感受性の差異について

この報告で得られた結果によれば，試験管内と生体内での線量効果曲線上の差異は，統計的には有意とは言い切れないが，200R照射で最も著しく400R，600Rでは，200Rにおける程には差異がみられなかつた事から考えて，主にn値における差異であろうと推定出来よう．

同一細胞集団について，線量効果曲線上で D_0 値，n 値或いはその両方が実験系の設定のしかたによつて変化した場合に，これを比較する事によつて放射線感受性の生物学的意義を解析しようとする報告は多くみられる．B. Miletićs等（14）は試験管内のL細胞（15）にDNAを与えた場合に，その線量効果曲線は，対照のそれとくらべて，D_0 値に差異がなく，n 値が上昇したと報告している．いわゆる Protection 或いは Sensitization の研究（16）からは D_0 値が変化し，n 値が変化しないと言う成績が報告され，又 Sinclair（17）によれば，試験管内 Colony Forming System で照射された Chinese Hamster 肺細胞が形成した Colony には，その Colony あたりの細胞数の多いものと少ないものとがあり，この各々の Colony を構成している細胞で再び線量効果実験を試みた結果，両者間にn値に差異がなく，D_0 値は大きい Colony を作つた細胞の方で大きかつたと報告している．

Elkind等（18）によれば，細胞はその増殖周期相によつて D_0 値やn値が異なり，集団における増殖周期相の分布が同一でない2系間に於いては，その由来が同一な細胞集団でも，D_0 値やn値が異ると報告している．

試験管内と生体内で線量効果曲線を比較して，その差異を解析しようとする報告も数例ある．これらの報告における試験管内と生体内の環境の差異は，照射時のそれであり，その後の培養はいずれも生体内で行なつているが，用いた細胞の性質上これは止むを得ない事である．Hewitt 等 (3) は序論で述べた如き系に於いて，線量効果曲線上に，両環境間の差異を認めなかつたと報告している．Tolmach 等は鶏胚細胞において，卵内の方が試験管内より抵抗性であつたと述べており，MacCulloch 等 (7)は 1.000R照射宿主に移植された同系骨髄細胞が脾藏に作る Colony 数によつて線量効果曲線を描き，両系間で D_0 値は変らず，n 値は生体内の系で小さかつたと報告している．

この報告で用いられたE細胞は，試験管内生体内を問わずに培養出来，従つて，照射時及び培養期間を問わず，環境は試験管内或いは生体内に一定している．このような場合には，培養期間中に，Selection 等によつて，細胞集団に差異が生じなかつたかどうかが問題となるが，用いた細胞の準備のしかた，培養期間，D_0値，増殖率等から，細胞集団には，両系間で著しい差異はなかつたと推定出来よう．この両系間で，D_0 値は差異なく，n 値には差異あり，生体内で n 値が大きくなつたと推定しきれるものならば，その原因は，宿主に由来していると考えられる．その機構を解明すべき実験を計画中である．

Ⓑ Diffusion Chamber 法による生体内培養の特殊性について

この方法によつて培養されている細胞は，宿主細胞と直接々触しないで，体液性成分のみが交流する．故に培養細胞は生体内にあるにもかかわらず，試験管内と変らぬ程度にその全数を把握出来る．しかし同時に，このような環境は，一般的生体内環境と異り，特に細胞性免疫等を考慮すれば，生体内培養系としては，極めて特殊なものであると言わざるを得ない．

Ⓒ 放射線障害から生き残つた細胞分画を算定する指標について

細胞水準で結果を判定する為に用いる指標については，Colony Formation 法と Cell Count 法があり，この報告には，後者が用いられた．この両者の関係については次のように考えられる．前者は照射直後に対照細胞とほぼ同様な Reproductive Integrity をなお持ちつづけている被照射細胞数を算定し，又後者は，照射後適当な任意の時点に於いて対照細胞とほぼ同様な形態学的所見を呈する被照射細胞数を算定し，各々をその対照と比較する事によつて，感受性を表現しようとするものである．前者では増殖率に無関係に生存率が解るが，その事は，同時に照射後の Division Delay を考慮しなくても結果が出る事になる．後者では，対照群と照射群で Generation Time が同じであると仮定しなければ，正確な意味での生存率が解らない事になる．前者では，Colony あたりの細胞数が，一定の値に達しなかつた場合に，これを Abortive Colony として除外するが，Abortive Colony には，数回の分裂の後もはや分裂し得なくなつた細胞から構成されているものもあるが，一方被照射後の Division Delay が長期にわたつたので，その時点では Abortive Colony とみなさざるを得ないにもかかわらず，その後の Reproductive Integrity は充分豊かであるような細胞から構成されているものもあると考えられる．この事は先に引用した Sinclair (17) の報告とも一致している．すなわち，Colony Formation 法によつても，結局は，細胞数及び Generation Time による支配から抜け出る事が出来ないと考えられる．又，Cell Count 法によつては，形態学的には対照細胞と変らないのに，Reproducibility は対照よりも低い細胞があつても，個々の細胞についてこれを區別することは出来ない．一方 Population としての Reproducibility の判定は，前者では二段階に分けられるに過ぎないが，後者は，形態学的所見によつて判定するに過ぎないとは言え，生存増殖細胞数で対照のそれと比較するのであるから，より詳細であるとも言えるであろう．前者では，被照射直後に Reproductive Capacity を維持している細胞数については，かなりの程度に解析し得るが，悪性腫瘍の放射線治療の

ためには，今，その Colony 中に Reproductive Integrity に富んだ細胞が何個あるかという事が，重要であろう．又，P. Eker 等（19）は両者の方法を比較討議しているが，放射線障害とその回復には細胞相互間の Interplay が影響する事を指摘し，後者の方法がより真実に放射線感受性を示すと述べている．結局，現在の知見では，悪性腫瘍の放射線治療に関する限りは，両者の方法の一方を採る事は妥当でないと考えられる．今後両者の方法を併用して研究を進めるべきであろう．ただし，この報告における線量効果実験群の⑤試験管内培養系と⑥非前処置宿主内培養系を比較する事に関しては，Cell Count 法のみで可能である．

要　約

① Diffusion Chamber 法と言う特殊な生体内培養法を用いて，担癌個体に直接照射する系に関する腫瘍細胞水準に於ける線量効果関係を求め，これを試験管内のそれと比較した．E細胞について出来得る限り比較の可能な条件で試験管内と生体内の線量効果関係を比較解析した．

② 線量効果関係には生体内と試験管内で差異がみられ，生体内系で外挿数が比較的大きく，D_0 値に関しては，生体内と試験管内で対照増殖率の近似する系の間では，近似していた．

③ 試験管内及び主体内に於ける放射線感受性の差異，Diffusion Chamber 法による生体内培養法の特殊性及び放射線照射から生き残つた細胞分画を算定する指標の三項目について議論した．

謝　辞

この報告を完成するにあたり御親切な御指導を戴いた菅原努教授，E細胞を分与して戴いた岡山大学医学部癌源研究所の佐藤二郎助教授，当教室の上野陽里助教授堀川正克博士，土井田幸郎博士，及び実験を遂行するにあたつて技術的援助を戴いた当教室文部技官田中富蔵氏等全教室員の方々に深く感謝する．

文　献

1) T.T. Puck and P.I. Marcus: Action of X-ray on single mammalian cells. J. Exp. Med. **103**: 653—666, 1956.
2) T.T. Puck, D. Morkovin, P.I. Marcus and S.J. Ciecira: Action of X-rays on mammalian cells. J. Exp. Med. **106**: 485—500, 1957.
3) H.B. Hewitt and C.W. Wilson: A survival curve for mammalian leukaemia cells irradiated *in vivo*. (Implications for the treatment of mouse leukaemia by whole-body irradiation.) Brit. J. Cancer. **13**: 69—75, 1959.
4) E.H. Portor: Extrapolation numbers. Brit. J. Radiol. **36**: 372—377, 1963.
5) L.G. Lajtha: (1965) Response of bone marrow stem cell to ionizing radiations. M. Ebert and A. Howard (editor) "Current Topics in Radiation Research, **1**: 139—163. North-Holland Publishing Co. Amsterdam.
6) 宮川正及び松平寛通：癌の放射線療法 "診断と治療" **49**: 14—29, 1961.
7) E.A. MacCulloch and J.E. Till: The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow to Gamma radiation *in vitro* and *in vivo*. Rad. Res. **16**: 822—832, 1962.
8) H.B. Hewitt and C.W. Wilson: Survival curve for tumor cells irradiated *in vivo*. Ann. N.Y. Acad. Sci. **95**: 818—827, 1961.
9) P.R.J. Burch: Carcinogenesis and cancer prevention. Nature. **197**: 1145—1151, 1963.
10) Sir MacFarlane Burnet: (1959) "The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity". The University Press, Cambridge.
11) Japanese Tissue Culture Association (edited) "Tissue Culture Studies in Japan: The Annual Bibliography, 1961" 45—53.
12) 遠藤浩良，山田正篤，及び奥村秀夫（1964）塩類溶液と培養液，中井準之助他分担執筆，組織培養一基礎と応用—23—48朝倉書店．
13) G.H. Algire, J.M. Weaver and R.T. Prehn: Growth of cells *in vivo* in diffusion chambers: 1) Survival of homograft in immunized mice. J. Nat. Cancer Inst. **15**: 493—508, 1954.
14) B. Miletic, D. Petrovic, A. Han and L. Sasel: Restoration of viability of X-irradiated L-strain cells by isologous and heterologous highly polymerized deoxyribonucleic acid. Rad. Res. **23**: 94—103, 1964.
15) W.R. Earle: Production of malignancy *in vitro*. VI) The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. J. Nat. Cancer Inst. **4**: 165—212, 1943.
16) K.F. Nakken: (1965) Radical scavengers and radioprotection. M. Ebert and A. Howard (editor) "Current Topics in Radiation Research, **1**: 49—92. North-Holland Publishing Co. Amsterdam.
17) W.K. Sinclair: X-ray induced heritable damage (small colony formation) in cultured mammalian cells. Rad. Res. **21**: 584—611, 1964.
18) M.M. Elkind and W.K. Sinclair: (1965) Recovery in X-irradiated mammalian cells. M. Ebert and A. Howard (editor) "Current Topics in Radiation Research, **1**: 165—220. North-Holland Publishing Co. Amsterdam.
19) P. Eker and A. Pihl: Studies on the growth-inhibiting and radioprotective effect of Cystamine, Cysteamine and EAT on mammalian cells in tissue culture. Rad. Res. **21**: 165—179, 1964.