

Title	マウスEMT6肉腫における1回15Gy照射後の再酸素化現象
Author(s)	芝本, 雄太; 西村, 恭昌; 西台, 武弘 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1986, 46(11), p. 1319-1323
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19747
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

マウス EMT6肉腫における 1 回15Gy 照射後の再酸素化現象

京都大学医学部放射線医学教室 (主任：阿部光幸教授)

芝本 雄太 西村 恭昌 西台 武弘

高橋 正治 阿部 光幸

(昭和61年 5 月 2 日受付)

(昭和61年 6 月23日最終原稿受付)

Reoxygenation After a Single Dose of 15 Gy in the EMT6/KU Sarcoma

Yuta Shibamoto, Yasumasa Nishimura, Takehiro Nishidai, Masaji Takahashi
and Mitsuyuki Abe

Department of Radiology, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. M. Abe)

Research Code No. : 407.1

Key Words : *Reoxygenation, EMT6 tumor, Recovery from
sublethal damage, In vivo-in vitro assay*

Reoxygenation after X-irradiation in the 1 cm-diameter EMT6/KU sarcoma implanted subcutaneously in the hind legs of Balb/c mice was investigated. The hypoxic fraction of the control tumors was estimated to be 15% using the paired survival curve technique. For the reoxygenation study, tumor-bearing mice were irradiated whole-body with a priming dose of 15 Gy without anesthesia or physical restraint, and examined at various intervals (5 min—72 hr). After irradiation, the hypoxic fraction of the tumors at 5 min, 1 hr, 6 hr, 24 hr, and 72 hr was 100%, 100%, 71%, 31%, and 17%, respectively. Thus, no reoxygenation was seen within 1 hr after irradiation, but it was apparent at 24 hr and 72 hr. In this experiment, recovery from sublethal damage was observed within 6 hr.

はじめに

人間の腫瘍には放射線抵抗性の低酸素細胞が存在し、これが放射線治療による局所制御の失敗の一因であると考えられてきた。しかし低酸素細胞の存在が放射線治療による局所制御に大きな影響を及ぼすか否かについては、否定的な考えもある¹⁾。人間の腫瘍に低酸素細胞が存在するとすれば、それが通常行なわれている分割照射において重要であるか否かは、その低酸素細胞が分割の間にいかに再酸素化 (reoxygenation) されるかに依存している、すなわち分割の間に reoxygenation が効率よく起これば、低酸素細胞の存在はそれほど重要な問題ではないと考えられる。

この reoxygenation という現象を人間の腫瘍

について測定することは現在のところ不可能であり、実験腫瘍のデータからその程度を類推しうるのみである。今までにいくつかの実験腫瘍における reoxygenation が報告されているが、そのパターンは報告によってさまざまであり、まだこの現象を理解するには不十分である。また以前に行なわれたほとんどの実験では、腫瘍を局所照射するためにマウスの麻酔やテープ等による固定が行なわれているが、これらは腫瘍の hypoxic fraction を人工的に増加させる可能性があることが知られるようになった²⁾³⁾。我々の実験系においても、麻酔や腫瘍を移植した後肢の固定が hypoxic fraction を増加させることが確認されている (未発表データ)。したがって以前の実験においては、

マウスの麻酔や固定の影響が実験データに加味されていた可能性がある。

そこで我々はマウスの麻酔や固定の影響を排除して、新たに EMT6 腫瘍における reoxygenation の測定を行なった。この腫瘍系では *in vivo* の照射効果を *in vitro* のコロニー法にて判定することが可能であり、高いコロニー形成率と安定した細胞生存率データが得られるので⁴⁾、従来多く用いられた 50% tumor control dose (TCD₅₀) 法や endpoint dilution 法よりも優れた定量性が期待できる。

材料および方法

1. 腫瘍系および assay 法

実験に用いた EMT6/KU 腫瘍は Balb/c マウスの KHJJ 乳腺腫瘍由来の肉腫である⁵⁾。この細胞は *in vitro* と *in vivo* (Balb/c マウス) で交互に継代した。In vitro では 12.5% ウン胎児血清を含むイーグル MEM 培地で培養した。

In vivo の固型腫瘍をつくるためには、単層培養より集めた約 10⁵ 個の細胞を、10 週齢の Balb/c CrSlc 雌マウス (静岡実験動物協同組合より購入) の両側大腿部皮下に移植した。移植後約 13 日で腫瘍の大きさが直径 1cm となった時点で実験を行なった。1 点には 4 個の腫瘍を用いた。

照射効果の評価には *in vivo-in vitro* assay を用いたが、詳しくは以前に記載した⁴⁾ので簡単に述べる。腫瘍を照射直後にマウス体内より摘出し、ハサミで細切してから 0.1% 中性プロテアーゼ IX 型を含む MEM 溶液中で 20 分間攪拌し、単細胞浮遊液を得てコロニー法にて細胞生存率を算定した。無処置群の腫瘍のコロニー形成率は 57 ± 5% (平均 ± 標準偏差) で、生存率はすべてこの値で補正した。

2. 照射

線量率 5.6 Gy/分のライナック 10MV X 線により全身照射を行なった。前述のごとくこの実験では、いっさいマウスの麻酔や固定を行なわず、15 × 15 × 4cm のアクリル箱の中でマウスが自由に動ける状態で照射を行なった。ただし低酸素状態の腫瘍細胞の生存率曲線を得るためには、マウスを照射 4 分前に殺してから照射した。

3. Reoxygenation の評価

まず未処置対照群の腫瘍の hypoxic fraction を求めるため、マウスを 2 群に分け 1 群は生存させたまま、他の 1 群は殺してから照射して両群の腫瘍細胞の生存率を算定した。それらに対し統計的に最もよく合致する平行線を引き、その平行線間の差より hypoxic fraction を求めた (Moulder と Rockwell の方法⁶⁾の変法)。この際に用いた線量は、線量-生存曲線の肩の領域を避けるために 15Gy 以上とした。

次に 15Gy 照射後、5 分、1、6、24、72 時間後の各時点における reoxygenation、すなわち hypoxic fraction の変動を測定した。この 15Gy の線量は、ほとんどすべての正酸素細胞を死滅させる線量として用いた。15Gy の全身照射後マウスを上記の各時間生存せしめ、その後前述の方法にて hypoxic fraction を算定した。

また reoxygenation と腫瘍体積の関係をみるために、初回の 15Gy 照射前と照射 24 および 72 時間後の腫瘍径を 3 方向測定し、腫瘍体積の変化を調べた。なおこの実験においては、分割照射の効果が観察されるのでその結果も示す。

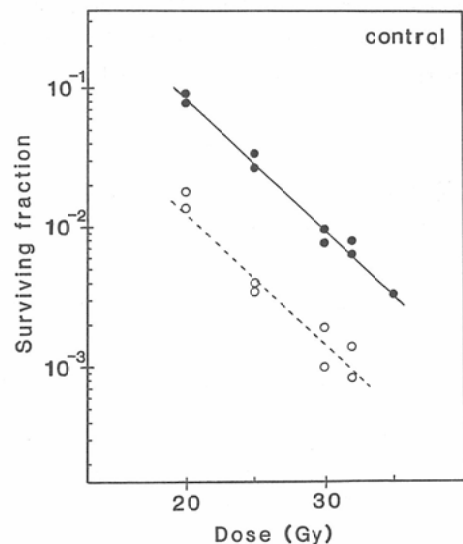


Fig. 1 Radiation dose-survival curves for EMT6/KU tumor cells in air-breathing (○---○) and dead (●—●) Balb/c mice. The lines are the best parallel ones for the two sets of survival data.

結 果

1. 対照群の hypoxic fraction

対照群の腫瘍細胞の線量-生存率曲線を Fig. 1に示す。この腫瘍は1cm の大きさで、14%前後の hypoxic fraction を含んでいると報告してきたが⁴⁷⁾、今回の対照群の結果も同様であり、Fig. 1の平行線間の差より hypoxic fraction は15%と算定された。

2. 15Gy 照射後の reoxygenation

15Gy 照射後、5分、1、6、24、72時間目の腫瘍細胞の生存率曲線を Fig. 2に示す。15Gy 照射終了後5分或いは1時間の時点では、2回目の照射を生存マウスで行なった場合 (○---○) も死亡マウスで行なった場合 (●---●) も生存率曲線に有意の差はなかった。したがってこれらの時点で生き残っているのはほぼ100%低酸素細胞であり reoxygenation がないと考えられる。6時間後の時点では、わずかではあるが生存マウス中の腫瘍の生存率曲線の方が死亡マウス中の腫瘍のそれよりも下方に位置し、両曲線間の差より hypoxic fraction は71%と計算された。

これらに対して15Gy 照射24および72時間後では reoxygenation が明らかにみられ、hypoxic fraction はそれぞれ31%および17%であった。すなわち72時間後には hypoxic fraction はほぼもとのレベルに戻っている。

これらの hypoxic fraction の変動と初回の15Gy 照射後の腫瘍体積の変化を Table 1にまとめて示す。照射24時間後では腫瘍の大きさに変化がなく、72時間後では縮小がみられた。

3. 分割照射の効果

この実験では、15Gy 照射後一定時間において2回目の照射を行なっているので、分割照射の効果が認められる。すなわち Fig. 2では、照射間隔の延長とともに腫瘍細胞の線量-生存率曲線は、2回目の照射を死亡マウスで行なった群 (●) では上昇し、一方生存マウスで行なった群 (○) では上昇した後、低下している。そこで Fig. 3に2回目に15Gy および17Gy 照射したときの生存率の照射間隔に対する変化を示した。0hr の生存率は生存マウスにおいて連続して30または32Gy 照

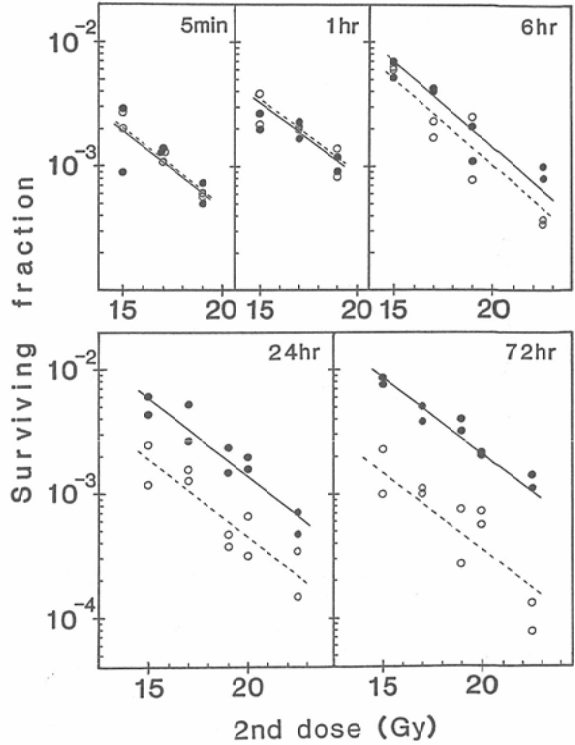


Fig. 2 Survival curves for EMT6/KU tumor cells in Balb/c mice at various times after a priming dose of 15 Gy. ○---○, the second irradiation in air-breathing mice. ●---●, the second irradiation in dead mice.

Table 1 Changes in the hypoxic fraction and tumor volume

Time	Hypoxic fraction (%)	Relative tumor volume
(Control)	15(11-20) ^a	(Before treatment) 1
5 min	100(68-100)	—
1 hr	100(80-100)	—
6 hr	71(49-100)	—
24 hr	31(22-44)	1.00±0.08 ^b
72 hr	17(11-25)	0.75±0.08

^a95% confidence intervals

^bSD

射した場合の生存率 (Fig. 1の30および32Gy の○印) である。この図から明らかのように、2回目の照射を死亡マウスで行なった群 (●) では、照射間隔が6時間までは生存率が上昇しその後プラトーに達したのに対して、2回目の照射を生存マ

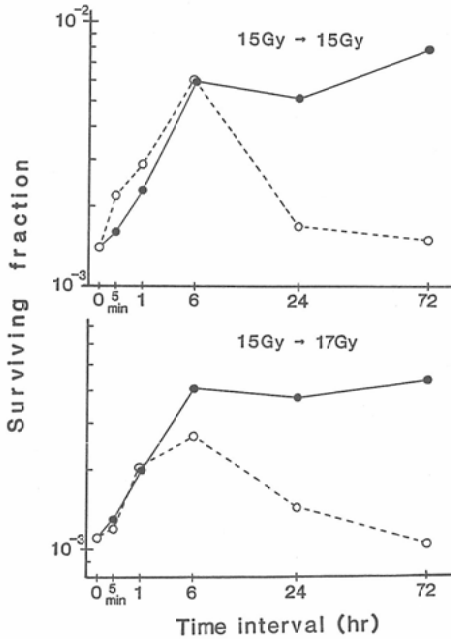


Fig. 3 Changes in the surviving fraction as a function of the interval between the first and second doses. ○, irradiation in air-breathing mice. ●, the second irradiation in dead mice. Each point represents the mean of the two experiments shown in Fig. 1 (0hr) or Fig. 2 (5min-72hr).

ウスで行なった群 (○) では、照射間隔が6時間までは同様に生存率が上昇するが、それ以降は低下した。

考 案

今までに報告されてきたマウス腫瘍系における reoxygenation は、van Putten⁹⁾の報告した osteosarcoma で非常に遅いほかは速やかに起こるものが多い。たとえば Kallman⁹⁾によれば、KHT および KHJJ 肉腫 (hypoxic fraction はそれぞれ 16%、18~21%) においては、10Gy 照射1時間後の hypoxic fraction はそれぞれ 24%、34% であり、1時間以内にも著明な reoxygenation が起きたことが示されている。また Dorie ら¹⁰⁾によれば、RIF-1 肉腫 (hypoxic fraction 1.1%) においては、15Gy 照射直後の hypoxic fraction は 100% であるが、1時間後には 50% に低下している。TCD₅₀法を用いて照射24時間後の reoxygenation をみた実験によれば、C3H 乳癌 (Fowler ら¹¹⁾) や SSK

線維肉腫 (Kummermehr ら¹²⁾) においては、15Gy または 13Gy 照射24時間後の hypoxic fraction は、照射前の値と同程度かそれ以下に低下していると考えられる。これらに比較して我々の EMT6 腫瘍では、1時間では全く reoxygenation が起きないことが特徴的であり、また24時間後の hypoxic fraction (31%) は明らかに照射前の値 (15%) より高値であるので、reoxygenation が比較的遅い腫瘍系といえる。しかし72時間後の hypoxic fraction は 17% と照射前の値と同程度まで低下しているため、この時点では reoxygenation が著明に起きていていると考えられる。このようにマウス腫瘍系では照射後明らかに reoxygenation が起きていることを示す実験結果が多い。仮にこのような reoxygenation が人間の腫瘍でも起こるとすれば、分割放射線治療においては低酸素細胞の重要性は少ないと考えられる。ただしこれらの結果は比較的大線量一回照射後のものであり、小線量分割照射後のデータはまだ不足している。したがって低酸素細胞の重要性をさらに検討するために、分割放射線治療に即した基礎実験を今後計画する予定である。

Reoxygenation の機序としては、(1) 照射をうけた細胞の酸素消費量の減少、(2) 血流状態の改善、(3) 死滅した細胞が除去されて低酸素細胞が血管に近くなること (shrinkage)、(4) 低酸素細胞の位置移動 (migration) などが提唱されている⁹⁾。この実験では、15Gy 照射24時間後の腫瘍の大きさは照射前と比較して変化していないので、この時期にみられた reoxygenation の機序として (3) の shrinkage を考えることは困難である。また24時間という短時間から (4) の migration も考え難い。したがって (1) あるいは (2) の機序が重要と考えられる。72時間後においては腫瘍が縮小し reoxygenation もさらに進行しているので、この時点では (1)、(2) の機序に加えて shrinkage も reoxygenation の一因と考えられる。

Fig. 3 に分割照射の効果を示したが、この生存率の変化には種々の因子の関与が考えられる。分割照射によって生存率が上昇する理由としては、

潜在性致死障害からの回復¹³⁾, 亜致死障害からの回復¹⁴⁾が考えられ, 生存率の低下は reoxygenation によるものと考えられる. その他に repopulation, redistribution の影響も考えられるが¹⁵⁾, これらがどのように生存率の変化に関与しているかは明らかでない. ところでこの腫瘍系における潜在性致死障害からの回復については以前に報告したが⁴⁾, 15Gy ではわずかに認められただけであった. したがって生存率の上昇の理由は主として亜致死障害からの回復と考えられ, これが6時間以内に完了することを Fig. 3 は示している.

まとめ

マウス EMT6 腫瘍 (大腿皮下 1cm, hypoxic fraction 15%) における 15Gy 照射後の reoxygenation について検討した. 以前のほとんどの実験では, 照射の際にマウスの麻酔やテープによる固定が行なわれているが, これらは hypoxic fraction を人工的に増加させる可能性があるもので, 本実験ではそれらを行わず, マウスが自由に動ける状態で照射した. 照射 5 分, 1, 6, 24, 72 時間後の hypoxic fraction はそれぞれ, 100, 100, 71, 31, 17% であった. 照射 1 時間以内に reoxygenation がみられないことが特徴的であったが, 24 および 72 時間後においては明らかな reoxygenation が観察された. このような reoxygenation が人間の腫瘍でもおこるとすれば, 分割放射線治療における低酸素細胞の重要性は低いと考えられるが, この問題をさらに検討するために分割放射線治療に即した実験を今後計画する.

稿を終えるにあたり鈴鹿守氏の技術的協力を深謝します. なお本研究の一部は文部省科学研究費がん特別研究 I (60010065) によって行われた.

文 献

- 1) Denekamp, J.: Does physiological hypoxia matter in cancer therapy? (In) Steel, G.G., Adams, G.E., Peckham, M.J., eds.: *The Biological Basis of Radiotherapy*, 139-155, 1983, Elsevier, Science Publishers, B.V., Amsterdam
- 2) Cullen, B.M. and Walker, H.C.: The effect of several different anaesthetics on the blood pressure and heart rate of the mouse and on the radiation response of the mouse sarcoma RIF1. *Int. J. Radiat. Biol.*, 48: 761-771, 1985
- 3) Ando, K., Koike, S., Fukuda, N. and Kanehira, C.: Independent effect of a mixed-beam regimen of fast neutrons and gamma rays on a murine fibrosarcoma. *Radiat. Res.*, 98: 96-106, 1984
- 4) Shibamoto, Y., Takahashi, M., Ono, K., Komuro, C. and Abe, M.: Recovery from potentially lethal damage after X-irradiation in three experimental tumors in mice. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 76: 278-283, 1985
- 5) Rockwell, S.C., Kallman, R.F. and Fajardo, L. F.: Characteristics of a serially transplanted mouse mammary tumor and its tissue culture-adapted derivative. *J. Natl. Cancer Inst.*, 46: 735-749, 1972
- 6) Moulder, J.E. and Rockwell, S.: Hypoxic fractions of solid tumors: Experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 10: 695-712, 1984
- 7) 芝本雄太, 高橋正治, 阿部光幸: 実験腫瘍の hypoxic fraction について一腫瘍の種類, 大きさの違いによる差異一. *日本医報会誌*, 45: 1184, 1985 (抄録)
- 8) van Putten, L.M.: Tumor reoxygenation during fractionated radiotherapy: Studies with a transplantable mouse osteosarcoma. *Eur. J. Cancer*, 4: 173-182, 1968
- 9) Kallman, R.F.: The phenomenon of reoxygenation and its implications for fractionated radiotherapy. *Radiology*, 105: 135-142, 1972
- 10) Dorie, M.J. and Kallman, R.F.: Reoxygenation in the RIF-1 tumor. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 10: 687-693, 1984
- 11) Fowler, J.F., Sheldon, P.W., Begg, A.C., Hill, S. A. and Smith, A.M.: Biological properties and response to X-rays of first generation transplants of spontaneous mammary carcinoma in C3H mice. *Int. J. Radiat. Biol.*, 27: 463-480, 1975
- 12) Kummermehr, J., Fink, R., Preuss-Bayer, G. and Trott, K.R.: Reoxygenierung in einem transplantablen Fibrosarkom der Maus. *Strahlentherapie*, 157: 272-276, 1981
- 13) Phillips, R.A. and Tolmach, L.J.: Repair of potentially lethal damage in X-irradiated HeLa cells. *Radiat. Res.*, 29: 413-432, 1966
- 14) Elkind, M.M. and Sutton, H.: Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving chinese hamster cells. *Radiat. Res.*, 13: 556-593, 1960
- 15) Hall, E.J. (浦野宗保訳): 放射線科医のための放射線生物学. 257-271, 1980, 篠原出版 (東京)