



Title	同調された哺乳動物細胞L5のX線および中性子線に対する反応
Author(s)	増田, 康治; 荒巻, 亮二; 長, 哲二
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1983, 43(12), p. 1407-1414
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20075
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

同調された哺乳動物細胞 L5 の X 線および中性子線に対する反応

九州大学医学部放射線基礎医学教室

増田 康治*1 荒巻 亮二 長 哲二*2

(昭和58年3月3日受付)

(昭和58年4月25日最終原稿受付)

The Cyclic Response to D-T Neutrons of Synchronous Mouse Fibroblast L5 Cells

Kouji Masuda*, Ryoji Aramaki and Tetsuji Cho**

Department of Experimental Radiology, Faculty of Medicine, Kyushu University 60

*Present address is Department of Radiology, Faculty of Medicine, Kyushu University

**Present address is Department of Radiological Technology, School of Health Sciences, Kyushu University

Research Code No.: 402.3

Key Words: Neutron, Cell cycle dependency, Cultured cells, Cell killing

Age response of mouse fibroblast L5 cells synchronized by mitotic selection was studied for D-T neutrons and 180 kVp X-rays, using reproductive capacity as an end point.

The survival variation for 3.9 Gy of D-T neutrons was 0.7 of that for 8.02 Gy of X-rays. The response variation for D-T neutron irradiation determined using D_0 value of the dose response curve was also smaller than that for X-rays.

The survival of synchronous L5 cells to a given dose of D-T neutrons varied with progression of cell cycle in parallel with the change of D_0 values of the dose response curves determined under the identical experimental conditions.

No cyclic change of the extrapolation number n of the dose response curves was observed.

はじめに

悪性腫瘍は、多少にかかわらず、放射線ことに X 線や γ 線に対して比較的抵抗性になる、低酸素圧状態の細胞を正常組織に比べて多くふくんでおり、それが腫瘍の抵抗性の一因であるといわれている。これを凌駕するための一つの方法として、細胞の放射線感受性が酸素分圧の多少に影響されにくい、LET の高い放射線の使用が考えられる。今日比較的安価にとり出せ、また適当な深部線量率曲線がえられる高 LET 放射線として、中性子線がとりあげられ、すでに臨床にひろく用いられている^{1)~7)}。外部照射にとどまらず腔内や組織内

照射用の線源も工夫されている⁸⁾。

しかし一方で、臨床応用のための裏付けとなるべき、中性子線の生物作用に関する研究には、まだ残された問題が多い。すでに中性子線照射における OER^{9)~15)}、RBE^{13)15)~17)}、線量率依存性¹³⁾、温度依存性¹³⁾、BUdR の増感作用¹⁸⁾、亜致死の損傷からの回復^{10)13)19)~21)}、PLD からの回復^{21)~23)}、照射後の細胞濃度の生存率におよぼす影響について²⁴⁾、in vitro 培養細胞を用いて検討されてきた。しかし、分割照射すると照射と照射との間で細胞にみられる repair, redistribution, repopulation, regeneration のいわゆる 4R²⁵⁾に関連する現象に関する研究は、残された課題の一つである。その一つである中性子線に対する反応の細胞周期依存

*1: 現 九大医附属病院放射線部

*2: 現 九大医療短期大学部

性については、すでに CHO²⁶⁾, HeLa²⁷⁾, L5²⁸⁾, Chinese hamster cells¹²⁾を用いて検討されている。

しかし、これらは一定線量に対する反応の細胞周期依存性か、線量効果関係としても、限られた時期の細胞を用いたものである。ここでは、同調された細胞の放射線感受性を、線量効果関係の係数を用いて詳細に検討したので報告する。

材料と方法

細胞：マウス線維芽細胞由来 L 細胞から分離した L5 をこの実験のすべてに用いた。

培養：Eagle MEM に 20% 仔牛血清を添加した培地を用い、密封した角ビン中で 37°C に保ち、静置して継代培養した。細胞のコロニー形成能の判定のための培養には、Eagle MEM に 20% の牛胎児血清を添加した培地を用い、その 5ml を直径 5cm のプラスチックシャーレに入れ、ほぼ飽和に近い水蒸気圧に保たれた 37°C のまた 5% CO₂ をふくむ空気の室中で静置培養した。

同調：震盪法で分裂期にある細胞を室温であつめ、1000回転 1 分間で遠心分離した。これらの分裂期にある細胞を、必要な数だけシャーレに移植し、必要な時間、炭酸ガス培養器中で培養した。

照射：シャーレに移植された細胞を室温で照射した。あらかじめ実験したところ、この細胞はシャーレ当りの 10⁴ 以上移植すると、線量は一定であっても生存コロニー数は減少する²⁴⁾ので、移植細胞数は 10⁴ 以下とした。照射中シャーレは空中におき、炭酸ガス分圧の調整はしなかった。

中性子線照射には、D-T 反応でえられる 14MeV 中性子線を用いた。線量率は約 0.3Gy/分であった。線量測定には、加速管中に設置された α モニターで α 粒子の数を数え、その値からシャーレに達する中性子の数を算定し、細胞の吸収線量とした。中性子数—吸収線量換算係数は計算法によって幾分のちがいはあるが²⁹⁾、ここでは 6.7×10^{-9} rad/n/cm² ³⁰⁾を用いた。

X 線照射は、180kVp X 線で、0.3mmCu+1mmAl のフィルターを用い、線量率 1.0Gy/分でおこなった。線量測定には鉄化学線量計を用いた。

判定：照射された細胞は、そのままの状態で炭

酸ガス培養器中で静置培養した。培養 12 日目に固定染色して生存細胞由来コロニー数³¹⁾を計数した。

結果

1. 同調された細胞の同調率

同調された細胞の同調の程度を求めるために、分離された分裂期の細胞をシャーレに移植し、ウインドウ法を用いて細胞の増殖曲線をえた。実験は数回くりかえした。各実験とも同調後、初めて観察した時に視野内に見えた全細胞数に対して経時的に全細胞数が何倍になったかを求めて、分裂後の細胞数とした。顕微鏡下で細胞数を計数中、シャーレは室温にあった。この間、(約 10 分以内)、細胞の増殖は抑制されたかもしれないが、無視して増殖曲線を求めた。培養 18 時間で分裂増殖する細胞があらわれ始め、28 時間で約 1.8 倍にまで増殖し平衡に達した (Fig. 1)。分裂すべき細胞の半数が分裂する時間は 22 時間であった。

2. 非同調細胞の線量効果関係

Fig. 2 は対数増殖期にある細胞をトリプシン処理し、シャーレに移植したのち、室温で X 線および中性子線照射した時の線量効果関係である。いずれも初め肩があるが、線量が増すにつれて次第に直線に近づく曲線であると仮定して、目で線量効果曲線をひいた。線量効果関係の外挿値 n と直接部分の傾斜 D_0 とは、X 線照射でそれぞれ 2.0, 1.6Gy、中性子線照射では 1.4, 0.8Gy であった。中性子線の RBE は D_0 値を用いて計算すると 2.0, 10% 生存率線量では、2.3 であり生存率のより高いところを指標にして計算するほど、RBE 値は大きくなった。

3. 同調された細胞の放射線感受性の細胞周期依存性

生存率がより低く、かつ判定のためにシャーレ当たり 10⁴ 以上の細胞を移植しなくても十分な数の生存細胞由来コロニーが観察されうる線量として、中性子線 3.9Gy をえらび分裂期に同調された細胞を経時的に照射した (Fig. 3)。X 線の場合は 8.02Gy 照射した。分裂期をすぎると、生存率は上昇したが 10 時間目前後で生存率は低下し、さらに時間を経ると生存率は上昇した。X 線照射の場合

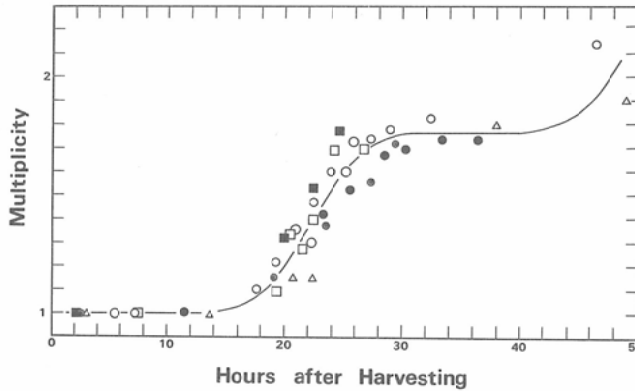


Fig. 1 The growth curve of the synchronized L5 cells determined by the window method. The number of cells per window was normalized to the original number. Each symbol represents different experiment.

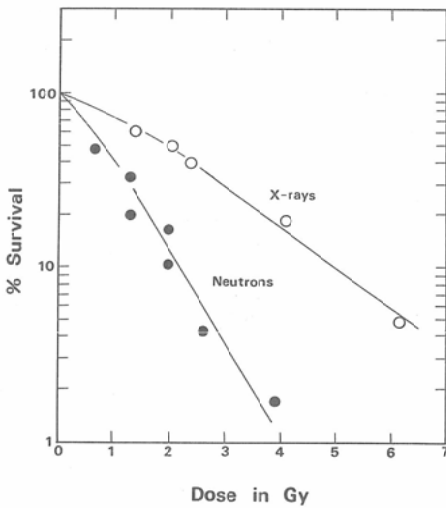


Fig. 2 The dose response curves of asynchronous L5 cells exposed to 180 kVp X-rays and D-T neutrons at room temperature in air. The parameters, n and D_0 , of the dose response curves of X-ray irradiation were 2.0 and 1.6Gy, respectively: 1.4 and 0.8 Gy of D-T neutron irradiation. The survival curves in this and other figures were drawn by eye.

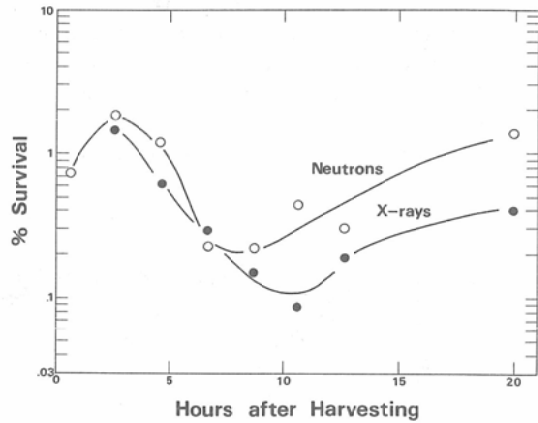


Fig. 3 The survival of L5 cells exposed to D-T neutrons (3.9Gy) and 180 kVp (8.02Gy) as a function of time after synchronization.

も同様であった。数回同様の実験をくりかえしたが、常に同様の結果がえられた。細胞の生存率の経時的变化の割合を、生存率の最高値と最低値との比として求めると、中性子線照射の場合は9.5倍であり、またX線照射の場合はこれよりも大きく14倍であった。

この生存率の経時的变化が細胞の線量効果関係

の n , D_0 のいずれの変化に由来するものか、あるいは双方の変化に由来するものであるのかを明らかにするために、分裂期に同調された細胞を3時間目および9時間目に照射して、線量効果関係を求めた (Fig. 4)。生存率は実験毎にひろく分散した。線量効果関係は初め肩があるが、次第に直線に近づく曲線であると仮定して、目で曲線をひいた。実験した範囲内では、3時間目の生存率と7時間目の生存率とはよく分離し、同調後3時間目の細胞の生存率が7時間目の細胞のそれよりも高かった。線量効果関係の係数 n , D_0 は、3時間目でそれぞれ2.8, 0.82 Gy, 7時間目で2.2, 0.70 Gy

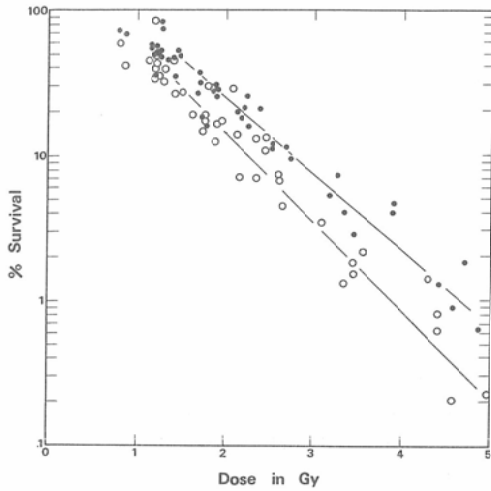


Fig. 4 The dose response curves for L5 cells exposed to D-T neutrons 3 hours (●) and 7 hours (○) after synchronization. The parameters, n and D_0 of the dose response curves for cells irradiated 3 hours after synchronization were 2.8 and 0.82 Gy, respectively; 2.2 and 0.7Gy, respectively for cells irradiated 7 hours after synchronization.

であった。同調後の他の時間についても同調された細胞が分裂をし始める時間、20時間まで線量効果関係を求め (Fig. 5, 6), 傾斜 D_0 と同調後の経過時間との関係を求めた (Fig. 7), 外挿値 n も経時的に変化したが傾向は一定せず, Fig. 3 にみられた生存率の変化を説明するには不十分であった。傾斜 D_0 は同調後次第に大きくなり, 次いで小さくなり, 15~16時間経過すると再度大きくなった。えられた実験点から, 目で曲線をひき, D_0 値の最大値と最小値との比を求めると, 1.2であった。

考 察

1. 線量効果関係

14MeV 中性子線の X 線に対する RBE は D_0 で計算して 2.0, 10% 生存率で計算して 2.3 であった。これは同じ細胞を 37°C, 酸素飽和状態で照射した時の RBE 値 (10% 生存率で 1.72)¹⁶⁾ よりも大であった。このちがいは二つの照射条件下での主

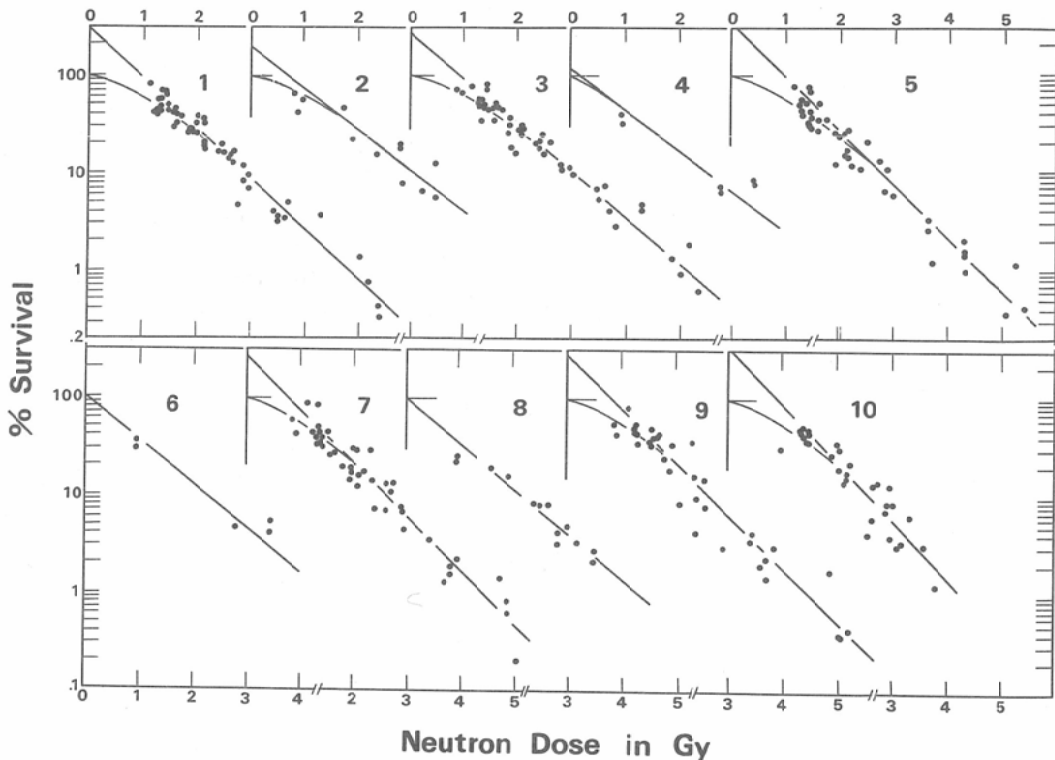


Fig. 5 The dose response curves for L5 cells exposed to D-T neutrons 1 to 10 hours after synchronization. Each point corresponds to each dish. The numbers in this and next figure represent the time after synchronization.

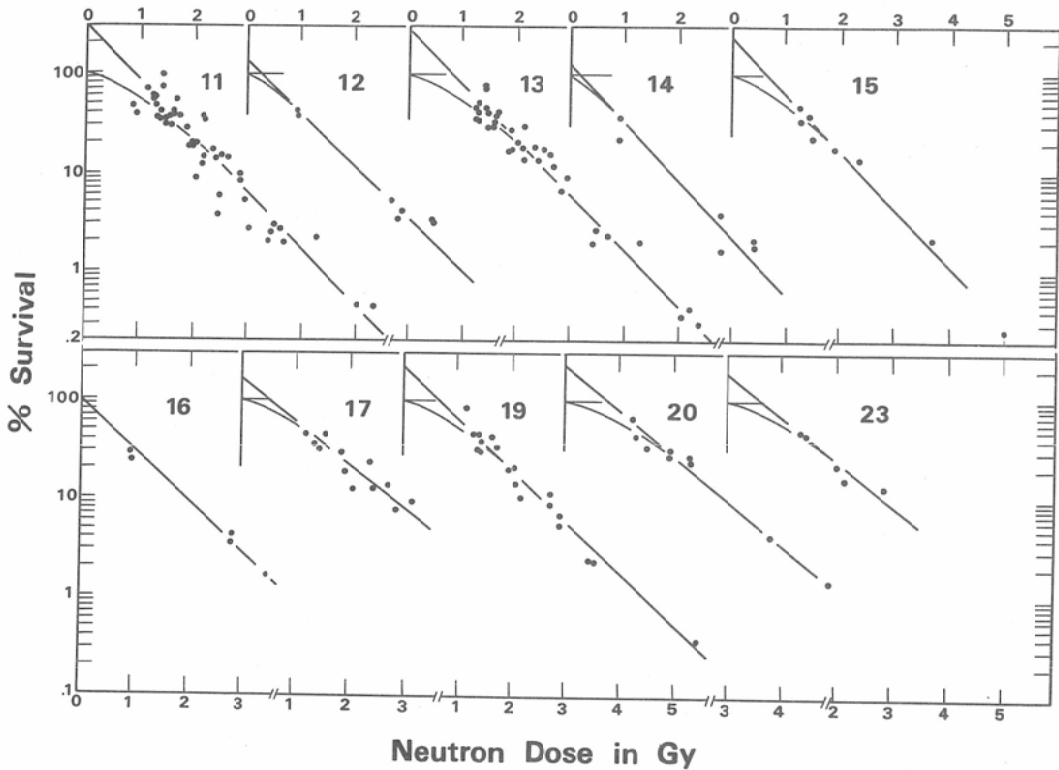


Fig. 6 The dose response curves for L5 cells exposed to D-T neutrons 11 to 23 hours after synchronization.

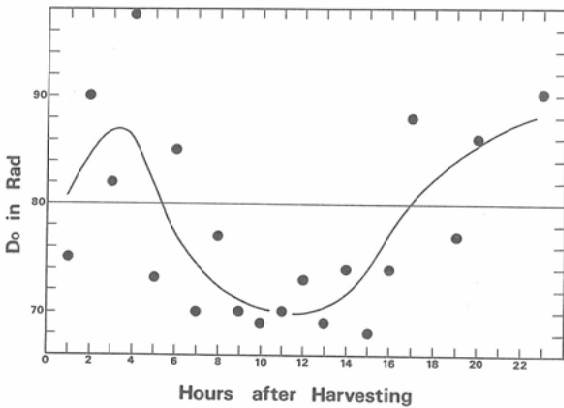


Fig. 7 The D_0 values of the dose response curves for L5 cells exposed to D-T neutrons versus the time after synchronization. The D_0 value for asynchronous cells was 80 rads.

としてX線照射における線量効果関係のちがいに由来した。

2. 細胞周期依存性

D-T反応でえられる中性子線で細胞を照射する時、 γ 線も同時に細胞にあたるが、その量は5%以下であるので⁴²⁾⁴³⁾、ここで観察された現象は主として中性子線によるものであるといえる。

実験毎に生存率の絶対値および線量効果関係の係数は分散したが、細胞の一定線量に対する生存率は、同調後の時間の経過とともに上昇、下降、次いで再度上昇する傾向にあった。放射線感受性の細胞周期依存性が線量効果関係の係数の何の変化と関係があるのかは、これまでの報告では必ずしも一致した結論には達していない^{32)~34)}。経時的に線量効果関係を求めると外挿値nも変化したが傾向は一定せず、一定線量照射されたときの生存率の変化をこれで説明することは困難であった。線量効果関係の傾斜 D_0 値の経時変化は、生存率の変化とよく一致し、生存率の変化は主として D_0 値の変化に由来するものであることが示唆された。これはHeLa細胞の中性子線照射した他

の報告²⁷⁾とよく一致している。放射線の種類によって、主として働く因子 (D_0 あるいは n) がちがってくる可能性もある。これは、放射線の細胞致死作用機構に関連して、非常に興味ある問題であるが、現在未解決である。

一定線量照射された細胞の生存率の細胞周期依存性の程度を、実験した範囲内での最高生存率と最低生存率との比 (以下変化率とよぶ) として求め、さらに中性子線照射での値と X 線照射での値との比を計算すると 0.7 であった。この値は生存率を 1~0.1% 程度にする線量範囲でえられたものである。これは生存率を約 10% にするのに必要な線量を用いた他の *in vivo*³⁵⁾ あるいは *in vitro*¹²⁾ の報告ともよく一致し、X 線での変化率と、中性子線よりもさらに LET の高い放射線での変化率³²⁾³⁶⁾ との中間に位置する値であった。細胞周期依存性の程度を D_0 値を用いて計算すると 1.2 倍であり、この値は X 線照射における D_0 値の変異³⁴⁾ に比較して小さかった。このことは X 線に対する中性子線の RBE 値は、CHO 細胞についてもみられたように²⁶⁾ 細胞周期に依存して変化することを意味している。

細胞の放射線に対する感受性に何故、細胞周期依存性がみられるのかは、まだ明らかではない。亜致死損傷からの回復はどの位置にある細胞にもみられる³⁷⁾³⁸⁾ ので、細胞の障害の受けやすさの点で細胞周期依存性が生じていることが考えられる。非蛋白 SH の量の細胞周期依存性が、細胞死の細胞周期依存性とよく一致していること³⁹⁾、N-ethylmale imide は late-S 期の細胞を最もよく増感すること⁴⁰⁾、あるいは線量効果関係の係数 D_0 が変化し、 n の変化はあまりはっきりしないということは、これまでになされてきた D_0 、 n 値の意味づけと考えあわせ、この仮説と矛盾しない。

放射線の種類によって細胞致死作用のちがいがあるのは、物質との相互作用のあらわれ方など放射線の物理的諸性質の差すべてに由来するものであるのか、あるいは、単にそのうちの LET のちがいで説明できるのかは、放射線の細胞致死作用機構解明のうえからも非常に興味ある問題である。中性子線の LET は、X 線や γ 線の LET と α

線の LET 値との中間に位し、RBE、線量率依存性、OER あるいは、放射線感受性の細胞周期依存性など生存率修飾因子の修飾係数もまた、X 線や γ 線照射での値と α 線照射での値との中間に、中性子線照射での値が位する³²⁾⁴¹⁾。今回の実験結果は、放射線の細胞致死作用を修飾する因子の修飾係数は、LET の順にならぶという従来の結論を補強している。

文 献

- 1) 恒元 博: 速中性子線治療の臨床評価. 日本医放会誌, 42: 823—847, 1982
- 2) Kaul, R., Cohen, L., Hendrickson, F., Awshalom, M., Hrejsa, A.F. and Rosenberg, I.: Pancreatic carcinoma: Results with fast neutron therapy. *Int. J. Radiat. Oncology, Biol. Phys.*, 7: 173—178, 1981
- 3) Battermann, J.J. and Breur, K.: Fast neutron therapy for locally advanced sarcomas. *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.*, 7: 1051—1053, 1981
- 4) Battermann, J.J. and Breur, K.: Fast neutron irradiation for advanced tumors in the pelvis. *Int. J. Radiat. Oncology Biol.*, 7: 1039—1043, 1981
- 5) Battermann, J.J. and Breur, K.: Results of fast neutron teletherapy for locally advanced head and neck tumors. *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.*, 7: 1045—1050, 1981
- 6) Maor, M.H., Hussey, D.H., Barkley, H.T. Jr., Jesse, R.H. and Fletcher, G.H.: Further follow-up on the M.D. Anderson trial on fast neutron therapy for head and neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.*, 7: 1212—1213, 1981 (Abstract)
- 7) Catterall, M.: The assessment of the results of neutron therapy. *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.*, 8: 1573—1580, 1982
- 8) Permar, P.H.: ²⁵²Cf neutron sources for interstitial afterloading. *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.*, 1: 1003—1009, 1976
- 9) Hall, E.J., Zaider, M., Bird, R., Astor, M. and Roberts, W.: Radiobiological studies with therapeutic neutron beams generated by $P^+ \rightarrow Be$ or $d^+ \rightarrow Be$. *Brit. J. Radiol.*, 55: 640—644, 1982
- 10) Hall, E.J., Roizin-Towle, L. and Attix, F.H.: Radiobiological studies with cyclotron-produced neutrons currently used for radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.*, 1: 33—40, 1975

- 11) Guichard, M., Gueulette, J., Laublin, G., Wambersie, A. and Malaise, E.P.: The comparative response of human fibroblast EMT6 and V 79 cells to 50 MeV neutrons. *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.*, 4: 621—627, 1978
- 12) Hall, E.L.: Radiobiological measurements with 14 MeV neutrons. *Brit. J. Radiol.*, 42: 805—813, 1969
- 13) Masuda, K.: Effects of 14 MeV neutrons on the reproductive capacity of HeLa S3 cells. *J. Radiat. Res.*, 9: 116—128, 1968
- 14) Hall, E.J., Kellerer, A.M. and Friede, H.: Dependence on neutron energy of the OER and RBE. *Int. J. Radiat. Oncology, Biol. Phys.*, 8: 1567—1572, 1982
- 15) Gragg, R.L., Humphrey, R.M. and Meyn, R.E.: The response of Chinese hamster ovary cells to fast neutron radiotherapy beams. I. Relative biological effectiveness and oxygen enhancement ratio. *Radiat. Res.*, 65: 71—82, 1976
- 16) Masuda, K.: Effects of 14 MeV neutrons and X-rays, singly or combined on the reproductive capacity of L cells. *J. Radiat. Res.*, 11: 107—112, 1970
- 17) Field, S.B.: The relative biological effectiveness of fast neutrons for mammalian tissues. *Radiology*, 93: 915—920, 1969
- 18) 増田康治, 脇坂信一郎, 長 哲二, 吉永春馬: D-T 中性子線の細胞致死作用における酸素およびプロクスウリジンの影響. *日本医放会誌*, 43: 940—946, 1983
- 19) Schneider, D.O. and Whitmore, G.F.: Comparative effects of neutrons and X-rays on mammalian cells. *Radiat. Res.*, 18: 286—306, 1963
- 20) Vogel, H.H.: Early radiation recovery: A comparison between Co^{60} γ ray and fission neutrons. *Radiat. Res.*, 25: 249, 1965
- 21) Gragg, R.L., Humphrey, R.M. and Meyn, R.E.: The response of Chinese hamster ovary cells to fast-neutron radiotherapy beams. II. Sublethal an potentially lethal damage recovery capabilities. *Radiat. Res.*, 71: 461—470, 1977
- 22) Rasey, J.S., Nelson, N.J. and Carpenter, R.E.: Recovery from potentially lethal damage following irradiation with X-rays or cyclotron neutrons. I. Response of EMT-6 cells in vitro. *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.*, 4: 1023—1027, 1978
- 23) Hall, E.J. and Kraljevic, U.: Repair of potentially lethal radiation damage: Comparison of neutron and X-ray RBE and implications for radiation therapy. *Radiology*, 121: 731—735, 1976
- 24) Masuda, K. and Yoshinaga, H.: Effects of cell concentrations plated post-irradiation on survivals of cultured mammalian cells. *J. Radiat. Res.*, 21: 248—256, 1980
- 25) Withers, H.R.: The four R's of radiotherapy. (In *Advances in Radiation Biology*. Vol. 5 ed., by Lett, J.T. & Adler, H. pp. 241—271, Academic Press, New York, San Francisco, London 1975
- 26) Gragg, R.L., Humphrey, R.M., Thames, H.D. Jr. and Meyn, R.E.: The response of Chinese hamster ovary cells to fast neutron radiotherapy beams. III. Variation in relative biological effectiveness with position in the cell cycle. *Radiat. Res.*, 76: 283—291, 1978
- 27) Sapozink, M.D. and Djordjevic, B.: Effect of hypoxia on synchronous HeLa cells irradiated with fast neutrons. *Radiology*, 110: 691—698, 1974
- 28) Masuda, K.: Survival of synchronized L cells irradiated with 14 MeV neutrons. *Int. J. Radiat. Biol.*, 20: 85—86, 1971
- 29) 長 哲二, 上原周三, 吉永春馬: 14.1MeV 中性子照射における反跳原子核の生物学的効果への寄与. *九州大学医療技術短期大学紀要*, 2号, 35—41, 昭和50年
- 30) Yamamoto, O., Sawada, S. and Yoshinaga, H.: Fast neutron absorption dose estimated from elemental constitution of bone marrow of small animals. *Nipp. Acta Radiol.*, 23: 141—145, 1963
- 31) 増田康治: X線照射された HeLa S3 細胞のコロニーの解析. *日本医放会誌*, 28: 1396—1403, 1969
- 32) Bird, R.P. and Burki, H.J.: Survival of synchronized Chinese hamster cells exposed to radiation of different linear energy transfer. *Int. J. Radiat. Biol.*, 27: 105—120, 1975
- 33) Sinclair, W.K. and Morton, R.A.: X-ray and U-V sensitivity of synchronized Chinese hamster cells at various stage of the cell cycle. *Biophys. J.*, 5: 1—25, 1965
- 34) Terasima, T., Fujiwara, Y., Yasukawa, M. and Tanaka, S.: X-ray survival response of the mouse L cells. *J. Radiat. Res.*, 12: 61—72, 1971
- 35) Withers, H.R., Mason, K., Reid, B.O., Dubravsky, N., Barkley H.T. Jr., Brown, B.W. and Smathers, J.B.: Response of mouse intestine to neutrons and gamma rays in relation to dose fractionation and division cycle. *Cancer*, 34: 39—47, 1974
- 36) Hall, E.J., Gross, W., Dvorak, R.F., Kellerer, A.

- M. and Rossi, H.H.: Survival curves and age response functions for Chinese hamster cells exposed to X-rays or high LET alpha particles. *Radiat. Res.*, 52: 88—98, 1972
- 37) Sinclair, W.K. and Morton, R.A.: Recovery following X-irradiation of synchronized Chinese hamster cells. *Nature*, 203: 247—250, 1964
- 38) Winans, L.F., Dewey, W.C. and Dettor, C.M.: Repair of sublethal and potentially lethal X-ray damage in synchronous Chinese hamster cells. *Radiat. Res.*, 52: 333—351, 1972
- 39) Ohara, H. and Terasima, T.: Variations of cellular sulfhydryl content during cell cycle of HeLa cells and its correlation to cyclic change of X-ray sensitivity. *Exptl. Cell Res.*, 58: 182—185, 1969
- 40) Sinclair, W.K.: N-ethylmaleimide and the cyclic response to X-rays of synchronous Chinese hamster cells. *Radiat. Res.*, 55: 41—57, 1973
- 41) Raju, M.R., Tobey, R.A., Jett, J.H. and Walters, R.A.: Age response for line CHO Chinese hamster cells exposed to x-irradiation and alpha particles from plutonium. *Radiat. Res.*, 63: 422—433, 1975
- 42) Čerček, L., Ebert M., Frost, P. and Greene, D.: RBE of 14 MeV neutrons in barley. *Int. J. Radiat. Biol.*, 12: 405—413, 1967
- 43) Darden, E.B., Cosgrove, G.E., Upton, A.C., Christenberry, K.W., Conklin, J.W. and Davies, M.L.: Late somatic effects in female RF/Un mice irradiated with single doses of 14 MeV fast neutrons. *Int. J. Radiat. Biol.*, 12: 435—452, 1967
-