The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	2MeV 速中性子線によるマウス悪性黒色腫の治療
Author(s)	小池, 幸子; 浦野, 宗保; 安藤, 興一 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1975, 35(9), p. 803-808
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20600
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

2 MeV 速中性子線によるマウス悪性黒色腫の治療

放射線医学総合研究所臨床研究部
小池　幸子　　浦野　宗保　　安藤　興一
根住　直史　　恒元　博

（昭和50年3月18日受付）
（昭和50年5月13日　最終原稿受付）

Fast Neutron Radiotherapy of a Mouse Malignant Melanoma

S. Koike, M. Urano, K. Ando, N. Nesumi and H. Tsunemoto
Division of Clinical Research, National Institute of Radiological Sciences

Research Code No.: *407*
Key Words: *Neutron therapy, Malignant melanoma, RBE*

Relative biological effectiveness (RBE) of 2 MeV fast neutrons was studied in C57BL6 mouse B16 melanotic melanoma. RBE was denoted as a ratio of TCD_{50} by X-rays to TCD_{50} by neutrons, where TCD_{50} is a radiation dose to yield 50% local tumor control. Similar values of RBE were obtained for tumors irradiated under oxic condition at 2 days after transplantation of 10^4 or 10^5 tumor cells and the value was approximately 4.0. This result is a contrast to the finding that RBE decreases with the decrease of the cell survival. Then, a theoretical analysis was made for RBE values of tumors containing different number of tumor cells, on an assumption that these tumor cells exhibit a multi-component dose-cell survival curve. This suggest that RBE might not be proportional to the tumor size and that it might be in relation to the size of hypoxic cell population.

緒　言

高ＬＥＴ放射線の生物学的効果は，Ｘ線等の低ＬＥＴ放射線のそれと比較すると，少なくとも３つの特長を持つといわれている[1)5)9)]．即ちＲＢＥ (Relative biological effectiveness) が大きいこと，ＯＥＲ (Oxygen enhancement ratio) が小さいこと，そして第３に，細胞の Sublethal damage からの回復能力が高ＬＥＴ放射線照射を受けた時には著しく小さいことである．このような諸特徴は高ＬＥＴ放射線による悪性腫瘍の放射線治療に際して大きな利点と考えられ，特に hypoxic な細胞を多く含むため，あるいは回復能力の大きい等のために放射線抵抗性である腫瘍に対してその効果が期待されている．しかしながら，上に述べられている諸特徴は培養細胞による実験結果に基づいており，そのまま腫瘍組織に適応できるか否か疑問である．なぜならば腫瘍の治癒は細胞の放射線感受性のみでは解釈しがたいことが知られているからである．そこでわれわれは，放射線抵抗性腫瘍の一つとして知られ，またそれ故に高ＬＥＴ放射線治療の適応症の一つと考えられている悪性黒色腫を用い，速中性子線による腫瘍治癒について検討したのでここに報告する．

実験材料および方法

実験動物—腫瘍系としては，当研究所にて自家繁殖されている C57BL/6 マウスと，当研究所生

理病理研究部より譲られた同系マウス悪性黒色腫を用いた．この腫瘍は自然発生したものを継代移植されているもので，B16 melanotic melanoma として知られている．またマウスは8～10週齢にて実験に供したが，当研究所の恒温に保たれた小動物舎にて，市販の固型飼料と塩素添加水とを自由に与え飼育した．

腫瘍細胞の移植には次の如く単細胞浮遊液を作製してこれを用いた．充分に発育した腫瘍を摘出し壊死部を取り除いた後，Cooper にて細かく刻み，これを約20倍量の0.25%のトリプシン(Diffco 1：250）を含む Hanks 氏液（Ca, Mg を含まない）中に移し，37℃で約30分間撹拌した．ついで試験管に移し，砕氷中で約15分間静置した後，その上清を注射器に取り，これを Swinny filter で濾過した．この濾液を 1,600rpm で5分間遠沈した後，沈渣を5%仔牛血清を含む Hanks 氏液で希釈し，これを単細胞浮遊液とした．尚細胞数はトリパンブルー染色を施した後，血球計算盤上で非染色細胞のみを計数した．移植はマウス右大腿部皮下に，必要な細胞数を含む単細胞浮遊液5～10μl を注射することにより行なつた．

X線および速中性子線による照射方法はいずれもすでに報告している[14]ので詳細は省略するが，大略下記の如く行なつた．

腫瘍に対するX線照射は，200KVp, 20mA の条件で半価層 0.8mmCu, 線量率 660rad/min で，同時に2匹のマウスの腫瘍部のみにコリメートして行なつた．速中性子線は Van de Graaff generator にて 2.8MeV の deuteron を beryllium target に当てることにより平均エネルギー2MeV の速中性子線を発生せしめた．焦点—腫瘍間距離25cmで，同時に12匹のマウスの腫瘍部のみを均一に照射した．尚遮蔽は polyethylene と水とからなるコリメーターにて行なつた．線量率は各照射毎に硫黄にて測定した[7]が7～8 rad/min であつた．以上の照射にてはマウスの全身被曝がさけがたく，腫瘍照射線量の15%の線量がマウス全身に照射されていた．しかしながら実験の性質上多数のマウスを同日に照射する必要等のため，止むなく上記条件を実験に用いた．いずれの腫瘍照射にてもマウスは照射前に 60mg/kgのネンブタールにて麻酔した．

マウスの酸素吸入下照射は，マウスをマウス用のプラスチック製チェンバーに入れ，常圧下で95% O_2＋5% CO_2 混合ガスを照射5分前より照射中を通じマウス1匹について1 l/min で流しつつ行なつた．また腫瘍局所を hypoxic にするためには，照射2分前より締金で腫瘍頭側にて血流を断つた．

またX線によるマウス全身照射は，腫瘍照射と同様の半価層 0.8mmCu のX線を，焦点—マウス中心間距離50cmで用い，線量率65rad/min で1度に12匹のマウスを照射した．

実験方法は次の2つを用いた[13)14)]．

第1は TD_{50} 法，即ち半数の被移植マウスに腫瘍を増殖せしめるに要する細胞数を決定する方法で，単細胞浮遊液を作製後，これを倍数希釈法にて希釈し，それらをあらかじめ乱数化にてグループに分けたマウスに移植した．その後週1度づつ腫瘍増殖の有無を移植後80日間にわたり観察し，各群毎の移植率に基づいて logit 分析法にて TD_{50} を計算した．

第2の方法は TCD_{50} (50% tumor control dose) の決定法で，一定細胞数を移植した後，一定時間を経て各線量群毎に種々線量を腫瘍部に照射した．照射後は TD_{50} 法と同様に腫瘍再発の有無を検討し，一定期間後の各線量群毎の再発率に基づき TCD_{50} を logit 分析法にて求めた．

尚一つの TD_{50} あるいは TCD_{50} を求めるには雌雄ほぼ半数づつ，合計約50匹のマウスを使用した．また，これら実験方法の詳細は文献（13, 14）に記述した．

実験結果

速中性子線による腫瘍照射がマウスの全身被曝を避けられないため，マウス全身照射の腫瘍移植におよぼす影響を調べた．同時に，致死量照射された所謂 Lethally irradiated（LR）の腫瘍細胞を生きた細胞と混入移植した時の Rèvész effect についても検討した．結果は表1に示す如くで全

Table 1. The effect of pretransplantation irradiation on TD_{50} values and the Rèvész effect (the reduction of TD_{50} by LR tumor cells) in C57BL/6 mouse B16 melanotic melanoma.

Whole body irradiation (rads)	Viable : LR cells	TD_{50} (95% C.L.)
—	1 : 0	4.1 (2.1 —7.9) $\times 10^2$
—	1 : 10^3	3.3 (1.8 —6.3) $\times 10^2$
400	1 : 0	2.0 (1.1 —3.6) $\times 10^1$
400	1 : 10^3	2.8 (1.5 —5.2) $\times 10^1$

身照射の有無に拘らず，ＬＲ細胞の混入移植はTD_{50}値に影響しなかつた．一方，X線による400 rad の全身照射を受けたマウスにその24時間後に腫瘍細胞を移植したところ，TD_{50}値は非照射群に比べ有意に低く，その10分の１よりも低かつた．したがつて速中性子線照射に伴なう全身被曝がTCD_{50}値に影響すると考えられたため，X線にて腫瘍照射を行なつたマウスに対し，中性子線による被曝線量に一致する全身照射を行なつた．即ちX線照射直後に，腫瘍線量の15%の線量をX線にて全身照射した．この時腫瘍への照射を避けるため３mmPb にて同部を遮蔽した．

Van de Graaff generator による速中性子線の線量率が低いため，すべての実験には TCD_{50} を求めるに際し，小さい腫瘍，即ち腫瘍細胞数の少ない腫瘍を用いることにした．そして10^4ケあるいは10^5ケの生きた細胞を移植後，それが microcolony を形成したと考えられる移植後２日目に95

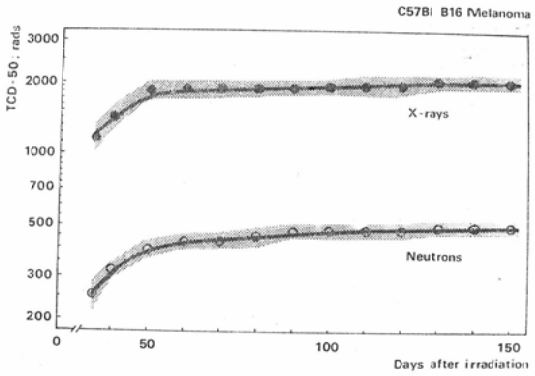

Fig. 1. TCD_{50} of 2-day-old C57BL/6 B16 melanotic melanomas irradiated with a single dose of neutrons (open circles) or x-rays (solid circles), as a function of time after irradiation. Tumors were irradiated when animals were breathing 95 % oxygen and 5% carbon dioxide. Shaded area represents 95% confidence limit.

% O_2＋５% CO_2 の混合ガスを流しつつ種々線量を照射し TCD_{50} を求めた．結果は表２，図１に示す如くで，速中性子線による TCD_{50} 値ははるかに低く，10^4，10^5ケの細胞移植後のX線による TCD_{50} は 1,270，2,050rad であつたのに対し速中性子線によるそれは 325，500rad であつた．ＲＢＥを TCD_{50} 値の比として求めると移植細胞数の如何に拘らず，3.9，4.1で有意差はなかつた．

図１に10^5ケ細胞移植後２日目に照射した時のTCD_{50}値の経時的変動を示すが，X線照射，速中性子線照射のいずれに拘らず，照射後50日までにTCD_{50} 値が上昇し，その以後の変動は少ない．

Table 2. TCD_{50} of C57BL/6 mouse B16 melanotic melanomas irradiated at 2 days after transplantation. Irradiations were given under local hypoxia or when animals were breathing 95% oxygen＋5% carbon dioxide.

Number of tumor cells transplanted	Radiation source	Condition at iradiation	TCD_{50} (95% C.L.) (rads)	RBE	OER
10^4	X-ray	95% O_2＋5% CO_2	1270 (1170—1380)	3.9	—
10^4	Neutron	95% O_2＋5% CO_2	325 (260— 400)		
10^5	X-ray	95% O_2＋5% CO_2	2050 (1920—2190)	4.1	—
10^5	Neutron	95% O_2＋5% CO_2	500 (475— 530)		
10^4	X-ray	95% O_2＋5% CO_2	1140 (945—1375)	—	1.9
10^4	X-ray	Hypoxia	2130 (1940—2340)		

このことは速中性子線照射後もX線照射後と同様に，照射後50日目までに大部分の再発が起こることを示している．経時的にRBEをみるに照射後40日で4.3（3.8～4.8),50日で4.6（4.3～4.9)，110日で3.9（3.6～4.2）と変動するがそれらの間に有意差はなかつた．また10^4ケ移植後の経時的変動も同様で，照射後50日，120日でのRBEはいずれも4.0であつた．

X線照射，速中性子線照射によるOERを求めるために hypoxic な状態での照射をなすべきであつたが，この為には速中性子線照射は1時間以上血流を断ち続けねばならないため，これを断念し，短時間照射で行なえるX線照射のみでこれをみた．10^4ケの細胞を移植後2日目に95% O_2＋5% CO_2 吸入下および hypoxic な状態で照射した時の TCD_{50} はそれぞれ 1,140と 2,130rad で，X線によるOERは 1.9（1.7～2.1）で通常のOERよりやや小さな数値であつた．

討　論

腫瘍の放射線感受性を考える時，その腫瘍の中に hypoxic な細胞がどの程度含まれているかが重要である．10^4ケの腫瘍細胞を移植後2日目の腫瘍で TCD_{50} 値より求めたOERは 1.9であり通常哺乳動物細胞に認められる数値よりも小さい．このことは10^4ケの細胞移植後2日目にすでに幾許かの細胞が hypoxic な細胞集団に移行していることを示している．このようにわずかながらでも hypoxic な細胞集団の存在する時，そのRBEの決定は単純な線量—生存率曲線の比較では不可能であり，所謂二相性のそれによらねばならない．

単純な線量—生存率曲線の比較によりRBEを求めた時，一定の生存率に減少せしめるに要する線量の比として求めると，生存率が低くなるにしたがつてRBEは小さくなる．一方腫瘍に速中性子線あるいはX線を照射し，一定の増殖遅延をきたす線量の比より求めたRBEは増殖遅延の長い程大きくなるといわれている[12]．かかる相反する結果に関し，幾つかの説明がなされているが[2)4)]，いまだ明確ではない．ところが，われわれの実験結果によると，10^4，10^5ケの細胞移植後2日目の腫瘍の TCD_{50} より求めたRBEはほぼ同じであつた．そこでこのような矛盾する実験結果を明らかにするために TCD_{50} 値の比としてのRBEを腫瘍モデルを用いて算出した．かかる計算にはこの研究に用いた腫瘍細胞の放射線感受性によるのが理想的であるが，残念ながら計算に十分なデーターが不足している[3)10)]．そこでデーターが十分にそろつている C_3H/He マウス乳癌細胞のそれに[14)]よつて計算した．また現在のところ明らかな実験結果よりみるとB16メラノーマ細胞の放射線感受性は C_3H マウス乳癌細胞に比べ外挿値が大きい以外に大差ないようである．

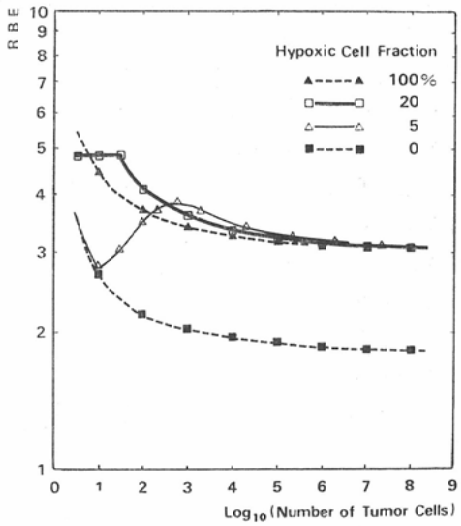

Fig. 2. RBE, which is expressed as a ratio of TCD_{50} (x-rays) to TCD_{50} (neutrons), as a function of tumor cells contained in the tumor. Parameters employed were m=5.0 (5.0) and D_0=135(390) rad for cells irradiated with x-rays, and m=1.0 (1.0) and D_0=80 (140) rad for cells irradiated with neutrons under oxic or hypoxic conditions. The figures in parentheses are for hypoxic condition. Four different lines indicate 4 different hypoxic cell fractions.

この計算結果は図2に示す如くで，もし腫瘍が aerobic な細胞のみからか，あるいは hypoxic な細胞のみから成り立つているとするならば，単純な線量—生存率曲線より推定される如く，大きな腫瘍になればなる程RBEは小さくなる．ところ

が幾許かの hypoxic な細胞を含み，その線量—生存率曲線が二相性となる腫瘍では，ある大きさ以上の時にはその大きさに逆比例してＲＢＥは小さくなるが，それ以下の小さな腫瘍では，そこに含まれる hypoxic な腫瘍細胞が全体に占める比率にしたがつて，ＲＢＥと腫瘍細胞数との関係は複雑な型をとつている．図には hypoxic な細胞が全体の５％あるいは20％含まれる時の関係が描かれているが，20％の時にはプラトーがあつた後，細胞数の増加につれてＲＢＥは減少する．しかし５％の時には，細胞数の増加につれて一度小さくなつた後，増大し，今一つのピークを持つてくる．Hypoxic な細胞集団が５～20％の間にある場合にはこの２つの曲線の間にあり，また20％より多いか，５％より少ない時にはそれぞれの曲線の上か下かに偏在してくる．かかる不定型の曲線が出現するのは，腫瘍細胞が二相性の線量—生存率曲線を持ち，比較する二つの線質のＯＥＲ等の違いのために，その二相性曲線の屈曲点での生存率が異なるためである．そして５％の時の今一つのピークあるいは20％の時のプラトーからの落下点は，中性子線照射による二相性の線量—生存率曲線の屈曲点に一致する．

われわれの実験は，種々な物理的制約のために10^4ケおよび10^5ケの細胞移植後２日目に行なつた．ここで，約 100ケの細胞が生き残つていても腫瘍治癒がえられること[14]，移植後２日間に幾許かの増殖のあること，そして95％ O_2＋５％ CO_2 混合ガス吸入下で行なつたことを考えると，図２における５％の hypoxic な細胞を含む10^3ケの腫瘍細胞前後のＲＢＥをとると考えられる[6)8)14)]．そこでは丁度ＲＢＥ値がピーク値にあり，ほとんど変化のない数値をとつている．

腫瘍に含まれる hypoxic な細胞の比率は通常20～30％前後と考えられるが，かかる腫瘍においてＲＢＥ値にプラトー領域のあることは臨床的にも意味がふかい．図２で腫瘍細胞数の10^1，10^2…等は生存率 0.1，0.01…等とほぼ一致することを考えると，このプラトーの存在は，20％の hypoxic な細胞を含む腫瘍では生存率を 0.3～0.03の間に減少せしめる線量の照射ならば，ＲＢＥはほとんど変らないことを示している．そして，hypoxic な細胞の全体に占める比率によりＲＢＥ値が大きく変動することは，この比率が速中性子線治療においては，特に Reoxygenation[11)] を考える時低ＬＥＴ放射線治療以上に大きな意義を持つていることを示唆するものと思われる．

結　語

腫瘍治癒に対する速中性子線照射の効果を C57 BL/6 マウス B16 melanotic melanoma を用いて検討した．照射は Van de Graaff generator による２MeV 速中性子線と，対照として 200kVp X 線とによつた．腫瘍細胞を10^4および10^5ケ移植後２日目に移植部位を照射し，TCD_{50} を求めた．その結果ＲＢＥはいずれの腫瘍でも 4.0で差がなかつた．かかる結果に関して，二相性の線量—生存率曲線を持つ腫瘍の TCD_{50} の比としてＲＢＥを考え，これと腫瘍に含まれる細胞数との関係を求めた．その結果腫瘍に含まれる hypoxic な細胞の比率がＲＢＥの決定に重要であることがわかつた．

この研究のために，C57BL/6 B16 melanotic melanoma を心よくご提供下さつた，当研究所生理病理研究部病理第１研究室春日孟室長に深く感謝いたします．

References

1) Barendsen, G.W.: Europ. J. Cancer 2 (1966), 333.
2) Barendsen, G.W. and Broerse, J.J.: Europ. J. Cancer 5 (1969), 373.
3) Barranco, S.C., Romsdahl, M.M. and Humphrey, R.M.: Cancer Res. 31 (1971), 23.
4) Fowler, J.F., Denekamp, P.J., Page, A.L. and Begg, A.C.: Br. J. Radiol. 45 (1972), 237.
5) Fry, R.J.M., Gregg, E.C., Painter, R.B. and Roesch, W.C.: Radiology 103 (1972), 215.
6) Hewitt, H.B. and Sakamoto, K.: Br. J. Radiol. 44 (1971), 457.
7) 稲田哲雄，平岡武，羽部孝，松沢秀夫：日医放誌，29 (1969)，520.
8) Suit, H.D. and Maeda, M.: J. Natl. Cancer Inst. 39 (1967), 639.
9) Skarsgard, L.D., Kihlman, B.A., Parker, L., Pujara, C.M. and Richardson, S.: Radiat. Res. Suppl. 7 (1967), 208.

10) Takahashi, I., Furuse, T., Kubo, E., Kasuga, T. and Inada, T.: Natl. Inst. Radiol. Sci. Ann. Rept. 10 (1971), 23.
11) Thomlinson, R.H.: In "Time and Dose Relationship in Radiation Biology as Applied to Radiotherapy" ed. Bond, V.P., Suit, H.D. Marcial, V., Brookhaven Natl. Lab., 1970, p. 242.
12) Tsunemoto, H., Umegaki, Y., Urano, M., Kutsutani, Y., Inada, T. and Hiraoka, T.: In "Fraction Size in Radiobiology and Radiotherapy" ed. Sugahara, T., Revesz, L. and Scott, O., Igaku Shoin LTD., Tokyo, 1972.
13) Urano, M., Fukuda, N. and Koike, S.: Cancer Res. 33 (1973), 2849.
14) Urano, M., Fukuda, N., Ando, K., Koike, S. and Tanaka, N.: J. Natl. Cancer Inst. 53 (1974), 517.