

Title	エックス線耐性の研究(第1報)吉田肉腫累代照射株の放射線感受性
Author(s)	金田, 浩一
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1959, 19(4), p. 685-691
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/20672">https://hdl.handle.net/11094/20672</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## エックス線耐性の研究 (第1報)

### 吉田肉腫累代照射株の放射線感受性

札幌医科大学放射線医学教室 (主任 牟田信義教授)

金 田 浩 一

(昭和34年3月16日受付)

悪性腫瘍の放射線療法を続けていくと、次第に治療効果が減っていくことがしばしば経験される。この原因として考えられることは次のことであろう。即ち、①宿主である生体自身が照射によって障害を受け、癌に対する防衛力が低下する。② tumor bed の線維化、血管の荒廃によつて治療効果が減少する。③腫瘍細胞自身に放射線耐性が出る。または放射線に対して抵抗力の強い細胞が残つて、これのみ増殖する。

私達は第3の現象があるかどうかを吉田肉腫を用いて追求した。既に報告された実験的研究を見ると、吉田肉腫では、耐性を認めなかつたものに宮川・田坂<sup>1)</sup>、長瀬<sup>2)</sup>、耐性を認めたものに中井・岡崎<sup>3)</sup>、草住<sup>4)</sup>があり、エールリツヒ癌を用いて耐性を認めなかつたものに Conger and Luipold<sup>5)</sup> (腹腔に接種)、耐性を認めたものに Schubert et al.<sup>6)7)</sup> (筋肉内に接種)があつて一致しない。

しかし、腫瘍細胞の化学療法剤<sup>8)9)10)</sup>に対する耐性は報告され、細菌の放射線耐性<sup>11)</sup>も報告されている。私達は今迄報告された照射量よりもつと大量を用いれば、腫瘍細胞に耐性が生ずるであろうと目標を定めて1955年より吉田肉腫で実験を行つてきた。こゝに報告するのは累代照射の総線量 87,480 r の腫瘍株より皮下腫瘍をつくつて、このエックス線感受性を対照と比較したものである。

#### 実験方法

##### 1. 累代照射の方法 吉田肉腫は北大第一病理

学教室で累代移植を続けてきた腫瘍株より分株を受けたものである。ラツテは東京系(私達は埼玉雑系とよんできた)を用いた。凡そ  $5 \times 10^6$  個の腫瘍細胞をラツテの腹腔に移植し、3~4日で純培養の状態になつたとき、1,000~2,000 r (185 kV, 半価層 0.76mmCu, 焦点腹腔中心距離 23cm, 線量率 85.4r/m) の全身一時照射を行い、照射終了後1時間で他のラツテに移植した。はじめの31代までは1,000 r 宛、その後は2,000 r 宛を照射した。このような大線量を照射すると移植陰性のものも多く、5~15匹に移植した。そして陽性のものに次の照射を行つた。全部のラツテが移植陰性となることも少くないので、照射前に他のラツテに移植しておいて、種の切れることを防いだ。照射後、次の代が純培養の状態になるのには7~18日を要した。この潜伏期は総線量が累加していくのと特に関係はなかつた。腹水の中に腫瘍細胞が少数でも認められてから純培養の状態になる期間はせいだい2~3日であつた。累代照射は1957年11月で94代、87,480 r となり、これで一応打ち切り、その後は移植のみを続けて獲得した特性が保存されるかどうか、今回報告する性質の外になお無処理の吉田肉腫と異つた点があるかどうか観察中である。

##### 2. 皮下腫瘍の作成

はじめ累代照射群と無処理の対照群の腹水を白血球数算定用のメラングジュールを用いて、 $1 \text{ mm}^3$  中の腫瘍細胞数を数え、同数の細胞数をラツテの左右の肩部にそれぞれ皮下移植した。そして、両群の発育率をみたが、対

Fig. 1. Growth Rate

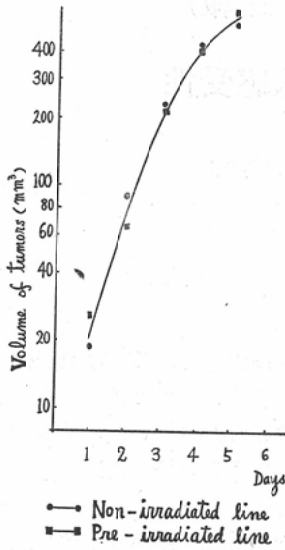


Table 1. Growth Rate of Subcutaneously Implanted Tumors (in mm<sup>3</sup>)

A: Non-irradiated line\*

First estimation of volume (mm <sup>3</sup> )	Days following first estimation					
	1	2	3	4	5	6
15 ( 7 days) ***	112	264	408	544	890	1146
18 ( 7 " )	72	254	693	504	525	367
18 ( 5 " )	72	254	512	612	720	810
18 ( 6 " )	36	70	157	283	378	720
32 ( 6 " )	108	256	365	550	840	
14 ( 6 " )	144	294	384	558		
Mean 19	91	232	420	525		

B: Pre-irradiated line\*\*

First estimation of volume (mm <sup>3</sup> )	Days following first estimation					
	1	2	3	4	5	6
21 ( 4 days) ***	60	188	270	486	683	780
21 ( 6 " )	88	300	490	560	252	216
27 ( 7 " )	60	130	227	410	525	748
36 ( 4 " )	102	252	432	748	1394	1617
27 ( 6 " )	77	198	572	770	540	825
Mean 26	65	214	398	595	679	837

\* 8.8 × 10<sup>5</sup> tumor cells were implanted

\*\* 39.6 × 10<sup>5</sup> tumor cells were implanted

\*\*\* Days after implantation in parentheses

照射の方が早く大きくなり累代照射群の腫瘍が未だ小さいうちにラツテが死亡して、発育率の検査が出来なかつた。原因ははつきりいえないが、腫瘍細胞数を数えるときに炎症性細胞を誤まつて数えたためか、累代照射群の腫瘍細胞が移植されても、分裂しないで死滅する細胞が多いためかも知れない。それで止むを得ず、ラツテの右肩にのみ移植して、一定の大きさ(測定可能な大きさ)になるのを待つて、このときからの発育率を比較した。腫瘍の大きさの測定はノギスを用い、主軸を測り楕円体の体積として計算した。

3. 皮下腫瘍の照射(耐性の判定). 皮下腫瘍の大きさが直径凡そ 0.6cm になつたとき、1,000 r の一時照射を行い、その後毎日腫瘍の体積を計測した。照射野は直径 4 cm で腫瘍以外の部は 3 mm 厚さの鉛板で防護し、照射による全身の障害を小さくするようにした。照射野が大きいのは、ラツテの固定に注意しても照射中に動くので、確実に腫瘍全部が照射されるようにしたためである。照射条件は 185kV, 半価層 0.76mmCu, 焦点腫瘍間距離 13cm, 線量率 232r/m であつた。

実験結果

1. 発育率 第1図, 第1表にまとめた。腹水を生理的食塩水で稀釈し凝固を防いでラツテの右肩皮下に移植した。第1表に示したように対照群は  $8.8 \times 10^5$  個の腫瘍細胞, 累代照射群は  $39.6 \times 10^5$  個の腫瘍細胞を移植した。これは前述のように、予備実験で同一の細胞数の移植では対照群が早く大きくなつたので、なるべく移植後等しい日数で等しい腫瘍の大きさになるように、移植細胞数の比を変えて上記の注入量を決めた。移植後毎日腫瘍の大きさを計測し、一定の大きさになつたとき発育率の測定の日とした。第1表で分るように同一実験群でも、同じ数の腫瘍細胞を移植したのに、一定の大きさになるのに 2~3 日のずれがあつた。しかし、移植後の日数にずれがあつても、その後の毎日の大きさの平均をとつてみると、大体同一のカーブに乗るようである。推計学的に検定する方法を知らないので省略した。また、その後の皮下移植の腫瘍細胞は対照群: 累代

Fig. 2. Changes in Volume of Subcutaneous Tumors following Irradiation with 1000r (Experiment 1).

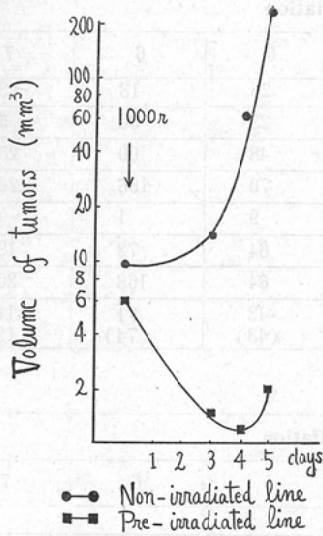
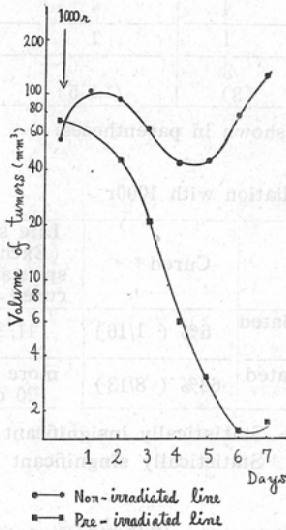


Fig. 3. Changes in Volume of Subcutaneous Tumors following Irradiation with 1000r (Experiment 2).



照射群を1:3にして実験した。

2. 皮下腫瘍の照射(耐性の判定) 2回実験した。第1回は1957年11月で、累代照射が87,480 r となつて間もない時期である。結果は第2図、

Table 2. Volume of Subcutaneous Tumors after Irradiation with 1000r (Experiment 1).

A: Non-irradiated line

Volume (mm <sup>3</sup> ) at the time of irradiation	Days following irradiation				
	1	2	3	4	5
18			23	36	198
4			0.5	1	4
32			18	36	108
13.5			6	6	27
4			0.5	0.5	4
1			8	150	800
0.5			1	6	125
1			36	188	480
12			36	125	343
Mean 9.6			14	61	232

B: Pre-irradiated line

Volume (mm <sup>3</sup> ) at the time of irradiation	Days following irradiation					
	1	2	3	4	5	6
4			1.7	0.5	0	0
10			2	2	2	2.5
10			1.3	1.3	1.3	1.5
4			0.5	0.5	0.5	0.5
4			1.7	0.8	1.5	8
4			1.7	1.7	1.7	4
Mean 6			1.5	1.1	2	2.6

第2表にまとめた。第2回の実験は累代照射を中止して4ヶ月間(20代)たゞ移植のみを続けてきたものを用い、1958年3月に行つた。結果は第3図、第3表にまとめた。いずれも累代照射群の方が対照に較べて腫瘍の縮小が著明であつた。第3表をみると、対照群では照射翌日全例が照射前より大きくなつているのに反し、累代照射群では大きくなつているものが7例中1例、不明が1例、あとの5例は既に縮小しているか、または同じ大きさであつた。

3. 皮下腫瘍の自然治癒と1,000 r 照射後の治癒皮下腫瘍の発育率を調べた実験において、自然治癒と生存期間を併せて調べた。腫瘍が大きくなつて後、壊死に陥り自然に癒るものがあつた。第4表に自然治癒率を示した。これは5%の危険率



Table 3. Volume of Subcutaneous Tumors after Irradiations with 1000r (Experiment 2).

## A: Non-irradiated line

Volume (mm <sup>3</sup> ) at the time of irradiation	Days following irradiation						
	1	2	3	4	5	6	7
63	81	42	27	18	26	13	30
45	80	26	42	23	23	30	56
234 *	400	234	180	125	48	60	252
54	100	88	60	54	70	156	260
30	120	120	110	12	9	1	0
54	135	150	64	64	64	72	190
96	125	125	80	80	64	168	200
Mean 82 (57)	135 (107)	112 (92)	80 (64)	54 (42)	43 (43)	71 (74)	141 (123)

## B: Pre-irradiated line

Volume (mm <sup>3</sup> ) at the time of irradiation	Days following irradiation						
	1	2	3	4	5	6	7
96 *	60	72	13	13	1		
100	—	48	48	12	12	4	2
60	45	45	10	5	1	0	0
130	100	8	2	1	1	0	0
24	24	24	2	0	0	0	0
162	200	105	48	12	4	4	8
60	60	36	18	2	1	1	0
Mean 76 (73)		48 (45)	20 (21)	7 (6)	3 (3)	(1.5)	(1.7)

\* If the data of (\*) were excluded, the means were shown in parentheses.

Table 4. Cure Rate and Life Span of Subcutaneously Implanted Rats.

## A: No irradiation

	Spontaneously cured *	Life span (Excluding Spontaneously cured animals)
Non-irradiated line	17% ( 1/6 )	15.2 days
Pre-irradiated line	57% ( 4/7 )	more than 19days

## B: Irradiation with 1000r

	Cured **	Life span (Excluding spontaneously cured animals)
Non-irradiated line	6% ( 1/16)	11.2 days
Pre-irradiated line	62% ( 8/13)	more than 20 days

\* Statistically insignificant

\*\* Statistically significant

で有意とはいえない。しかし、1,000 r 照射した  
ものでは累代照射の方が治癒が大で有意の差が認  
められた。このことは、累代照射群の方がやはり  
感受性が大といえよう。

皮下に移植した場合の生存期間（自然治癒は除  
く）は、第4表に見るように、非照射の場合、対

照射群では平均15.3日、累代照射群では平均19日以  
上（死亡の日を確認出来なかつた例があつたの  
で、確認した最後の日まで生存とした）であつ  
た。これに対して1,000 r 照射群では、対照が  
11.2日で、照射しない場合より生存期間が短縮し  
た。累代照射群では20日以上であつて、照射しな

い場合とほぼ同じであつた。

### 考察

1) エックス線照射によつて腫瘍細胞にエックス線耐性が出来るとすれば、これは一般に考えられているように、最初種々の感受性をもつた腫瘍細胞の集りから、照射によつて感受性の高い細胞が淘汰されるか、または突然変異と淘汰によつて感受性の低い細胞が残つて増殖するかのどちらかであろう。2,000 r の全身一時照射後、移植したとき純培養の状態となるのに7~18日を要した。これは佐藤<sup>12)</sup>による1粒移植の純培養となるのに要する時間と余り変らない。それならば2,000 r の照射後、凡そ $5 \times 10^6$ 個移植したとしても、1個又は極めて僅かしか増殖に与らないといえよう。照射後かなり多数の細胞が生き残つたと仮定すれば、この生き残つた細胞の増殖の開始が、照射の影響を受けて非常に遅れると考えなければならない。牟田<sup>13)</sup>によれば1,000 r 照射すれば9時間は核分裂が抑えられているが、12時間目から回復しはじめ、24時間目にはもとに戻る。2,000 r 照射については実験がないが、核分裂の抑えられている時間は1,000 r の場合よりなお延びるであろう。このことは今回の移植成績の示す4日から2週間近い遅延の一部の原因にはなるかも知れないが、すべてを説明するには不十分と思われる。

照射後、移植陰性であつたものも少くなかつたが、これは分裂可能な細胞が0であつたといえる。このような照射、移植を数十回繰返したのであるから、もし、吉田肉腫の放射線感受性がまぢまぢであるならば、当然、エックス線の淘汰作用によつて感受性の低い細胞が残されて、耐性という結果が出てよさそうである。本実験の結果、淘汰作用の認められなかつたことは、吉田肉腫は牧野<sup>14)</sup>のいう stem cell が増殖にあずかり、この stem cell の放射線感受性はどの細胞も殆んど同じであつたと考えることが出来よう。

また、エックス線照射によつて腫瘍細胞に多数の突然変異の起ることは考えられる。そして累代照射によつて、いろいろの突然変異のうちの一つが現在の腫瘍細胞株、即ち新たな stem cell と

なり、その性格が前の stem cell と較べてエックス線感受性がより大であつたと考えることが出来よう。

2) 累代照射中止の1957年11月の第1回の実験も、それから4ヶ月間無処理のまま植えついだときの第2回の実験も、ともにエックス線感受性が高かつたことは、遺伝的特性をもつていてともよいと思う。

3) これまで報告された放射線耐性の実験のうちで Schubert らのエールリツヒ癌を用いての実験<sup>6)7)</sup>が最も多量の線量を用いている。本実験ではこれより遥かに多量の線量を用いた。それでも耐性株を見出し得なかつたことから、一つは1)で述べたように、用いた吉田肉腫が放射線感受性の点から純粋であること、一つは悪性腫瘍細胞——少くとも吉田肉腫——は細胞自身の性質として、そう簡単に放射線耐性にならないということがいえるであろう。

4) 本実験の結果を臨床的に考えてみると、癌の放射線治療を行つているうちに、癌の感受性が低下しても、直ちに癌細胞が耐性を獲得したと考えることは困難で、他の因子——緒言で述べた宿主側の因子①、②の点を追求する必要があると思う。それと共に、なお広く種々の癌で累代照射によつて耐性が出来ないものかどうか実験を推し進める必要がある。

### 結論

1) 吉田肉腫に対し94代、計 87,480 r の累代照射をしたが、エックス線耐性は出来なかつた。

2) エックス線感受性を無処理の吉田肉腫と比較すると、累代照射株の方が感受性が大であつた。

3) この性質は4カ月間(20代)たつても同じであつた。

4) 皮下移植して、皮下腫瘍の発育率を見ると対照と同じであつた。

5) 皮下腫瘍に1,000 r の一時照射をして治癒率を見ると、累代照射株の方が大であつた。

6) 累代照射によつて得られた腫瘍株は、恐らく突然変異によつて生じた新たな stem cell と

考えられ、この腫瘍細胞の性質の一つが前より大きいエツクス線感受性をもつものであると考察した。

謝辞. 北海道科学研究費の補助を受けたことを感謝します。

#### 文 献

- 1) 宮川, 田坂: 日医放誌, 10, 61, 1950. — 2) 長瀬: 日医放誌, 16, 846—865, 1956. — 3) 中井, 岡崎: 日医放誌, 13, 423—424, 1953. — 4) 草住: 日医放誌, 13, 574—583, 1953. — 5) Conger, A.D. and Luippold, H.J.: *Cancer Resea-*

- rch*, 17, 897—903, 1957. — 6) Schubert, G.: *Zeitschrift für Krebsforschung*, 60, 216—233, 1954. — 7) Dittrich, W., Höhne, G. and Schubert, G.: *Progress in Radiobiology*, 381—385, 1955. — 8) 広野: *The NAGOYA Journal of Medical Science*, 17, 102—110, 1954. — 9) 石原, 吉田: 第14回日本癌学会総会抄録, 54, 1954. 及び *Annual Report of the National Institute of Genetics (Japan)*, 24—25, 1955. — 10) 長瀬: 日医放誌, 16, 846—865, 1956. — 11) 河村, 板垣: 日医放誌, 18, 766, 1958. — 12) 佐藤: *Gann*, 43, 1—16, 1952. — 13) 牟田: 日医放誌, 10, 30—35, 1950. — 14) 牧野: *Intern. Rev. Cytol.*, 6, 26—84, 1957.

### A Study on Radio-resistance (1 st Report) Sensitivity of pre-irradiated Yoshida Sarcoma

By

Koichi Kaneta

Department of Radiology, Sapporo Medical College, Sapporo, Japan.

(Director: Prof. Nobuyoshi Muta)

Experimental studies were conducted using Yoshida ascites tumor bearing rats in order to determine the presence or absence of development of radio-resistance in tumor cells when exposed for 27 months to frequently repeated heavy irradiations.

Radio-sensitivity was compared between the non-irradiated original line and the pre-irradiated line.

The Yoshida ascites tumor bearing rats were exposed to whole body irradiation. The dosages were 1000r each for the tumor bearing rats of the 1 st to 31 st generation, and 2000r each for those of the 32 nd to 94 th generation. The factors were 185 kV, 6 mA, focus-peritoneal cavity distance 23 cm, HVL 0.76 mm Cu. In every case the tumor cells were transplanted into the peritoneal cavity 1 hour after the irradiation. Whole body irradiation was administered when proliferation of the tumor cells occurred in the peritoneal cavity. X-ray irradiation with 2000r appears to be the almost lethal dosage for the tumor cells. Transplantations were frequently negative. When positive, 7—18 days were required for tumor cells to proliferate in the peritoneal cavity after the transplantation, while 3—5 days were required in the case of the non-irradiated line. It was assumed that only a few tumor cells could proliferate in the peritoneal cavity following the transplantation.

Tumor cells of either the pre-irradiated line or the non-irradiated line were transplanted subcutaneously in the rats right shoulder in order to measure the tumor regressions of both lines following local irradiation with 1000r (185 kV, 6 mA, focus-tumor distance 13 cm, HVL 0.76 mm Cu, radiation field 4 cm  $\phi$ ).



Now if the same number of tumor cells are transplanted the date of possible measurement of the 2 groups are not the same. Hence, in order to remedy or otherwise uniformize the growth, 3 times as many tumor cells of the pre-irradiated line were transplanted subcutaneously as compared with the non-irradiated line.

As to the rate of growth measured as ellipsoids, the pre-irradiated line did not differ too much from the non-irradiated line (Fig. 1, Table 1). But the former showed more regression than the latter following local irradiation with 1000r (Fig. 2, Table 2). This characteristic remained unchanged when the study was repeated 4 months later after the pre-irradiated line had been transplanted intraperitoneally without being exposed to irradiation (Fig. 3, Table 3).

The cure rate of the subcutaneously transplanted tumors of the pre-irradiated line following irradiation was higher than that of the non-irradiated line (Table 4).

From these data it may be concluded that the pre-irradiated line is not radio-resistant, but more radio-sensitive. It may be explained that some tumor stem cells possibly may have undergone some mutational changes during the repeated heavy irradiations with X-rays, and these mutant cells proliferate as altered stem cells. And one of the biological characteristics of the latter is that the new stem cells are more radio-sensitive than the original stem cells.