OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	200kVp X-線, 60Coγ-線, 137Csγ-線並びに22MeV X-線のRBEに関する研究（組織培養による人の正常並びに腫瘍組織細胞の増殖能におよぼす影響を指標として
Author(s)	吉村, 彰介; 小塚, 隆弘; 吉井, 義一 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1963, 23(9), p. 1073-1079
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20773
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

200kVp X-線, ^{60}Co γ-線, ^{137}Cs γ-線並びに 22MeV X-線の RBE に関する研究
(組織培養による人の正常並びに腫瘍組織細胞の増殖能におよぼす影響を指標として)

大阪大学医学部放射線医学教室
吉村彰介　小塚隆弘
吉井義一　立入弘

(昭和38年10月21日受付)

The Relative Biological Effectiveness of 200 kVp X-rays, ^{137}Cs γ-rays, ^{60}Co γ-ray and 22 MeV X-rays on the three types of tissue cultured human cells.

By
Shosuke Yoshimura, Takahiro Kozuka, Giichi Yoshii and Hiromu Tachiiri

RBE of 200 kVp X-rays, ^{137}Cs γ-rays, ^{60}Co γ-ray and 22 MeV X-rays were studied on the growth inhibition of three types of tissue cultured human cells. In order to identify radiation sensitivity between normal human tissue cells and tumor cell, some experiments have been also studied.

Liver cells and reticular cells derived from bone marrow formed the material for the normal cell experiment and HeLa cell for the tumor cell experiment.

The technique employed in tissue culture were essentially the same as that described in text book. Cells were exposed to graded doses of irradiations 200, 400, and 600 rads in the acrylite phantom.

The determination of RBE was taken for mitotic rate measured by cell population on the 8th day following irradiation (Fig. 1～3).

Results revealed that cells given at the same dose were more sensitive for 200 kVp X-ray than the other three types of irradiations.

Relative to X-rays, RBE value of ^{137}Cs γ-rays, ^{60}Co γ-ray and 22 MeV X-rays indicated 0.99～0.90 at the dose of 200～600 rads, which were found to be proportional to LET (Table 2).

As for γ-rays, RBE decreased with increasing dose in the range of graded doses 200

to 600 rads (Table 1). A dose rate dependence of RBE was not found for γ-ray and X-ray irradiation from 18 rads/min to 90 rads/min (Table 1).

The radiation sensitivity of the cells derived from normal human tissues was a slightly higher than that of HeLa cells (Fig. 4)

緒言

各種放射線の生物学的作用の差，即ち生物学的効果比（RBE）ついては近年多数の報告がなされているが，特に Storer 等（1957）[1] による mammalian system におけるRBEの研究は広範で体系的なものである．これまでの報告により放射線のRBEは物理的因子の他に生物学的因子（照射対象や測定対象）によつて異つた値を示すことが知られている．著者等の一人である小塚はすでに1960年に鶏胎を用いて 200 kVp X-線，^{60}Co γ-線並びに ^{137}Cs γ-線のRBEを報告しているが[2]，今回はさらに大阪大学理学部に設置されている22MeV Betatron を使用して22 MeV X線のRBEをもあわせて研究した．なお従来報告されている mammalian system に関するRBEの研究は，その殆んどが *in vivo* の実験であり，*in vitro* における細胞を用いての実験報告はきわめて少く，著者等の知る範囲では Lansnitzki および Lea[3]，Bonte[4] 等のものが見られるのみである．in vivo のREBの研究で問題となるものとしては放射線の種類による空間的線量分布，線量の時間的分布などの細胞以外の身体的影響因子の介入などが当然考えられる．そこで著者等はこれらの物理的因子をできるだけ均等なものとし，細胞自体に与えられる放射線の効果の比較を検討するため，RBEの研究に組織培養の導入を試みた．即ち組織培養された人の正常組織細胞および癌細胞の増殖能におよぼす影響を指標とするRBEと同時に，これら細胞の種類による放射線感受性の差をもあわせて比較検討した．

実験材料および方法

1） 実験材料

a) HeLa 細胞[5]（大阪大学医学部附属癌研究所より贈与されたもの）

Lactalbumine 水溶液を Earle の塩溶液* に0.5%の割合に混和し，それに牛血清を全体の20%になるように加えた培養液中で37°C恒温装置内で培養したもの．

b) Chang の肝細胞[6]（国立予防衛生研究所より贈与されたもの）

HeLa 細胞と同様の培養液と条件で培養したもの．

c) 細網細胞**（国立予防衛生研究所より贈与されたもの）

199溶液[7]*** に牛血清を全体の20%になるように加え，前二者と同条件で培養したもの．

2） 放射線の種類

a） 200kVp X-線（半価戸 1.9mm Cu）

b） ^{60}Co γ-線

c） ^{137}Cs γ-線

d） 22 MeV X-線

3） 放射線々量測定方法

200kVp X-線，^{60}Co γ-線，^{137}Cs γ-線の線量測定には4cm平方アクリライト・ファントーム内に Victoreen 100r Condenser Chamber を挿入して，また22 MeV X-線の線量測定には NBS-55に従い，11.5cm平方のアクリアイト・ファントーム内に挿入した．（200kVp X-線には No. 131を，^{60}Co γ-線，^{137}Cs γ-線および22 MeV X-線には No. 621を使用した，）なおrとradとの換算は吉永の報告[8]に従つた．

4） 試料照射方法

He La 細胞，肝細胞はそれぞれ細胞数が 2×10^5/cc程度のLE（Lactalbumine と Earle の塩溶液）浮游液とし，細網細胞は 2×10^5/cc 程度の 199溶液浮游液として，これらを遠沈用の直径 1.6cmのポリエチレン・チューブに入れて密栓し，これを上記の線量測定の場合に Chamber を入れた位置に挿入して室温で照射した．線量は 200r，400r，600r および 800r をそれぞれ与え，また線量率は50r/min を標準とし，大きい偏差はなかつた．

5) 照射後の処理

照射後各細胞浮游液をそれぞれ細胞数がほぼ2×10^4/cc となるように稀釈し****，この際牛血清を全体の20%になるように加えた．この細胞浮游液を 1.5ccづゝ短試験管に分注し，1群で16本づつを作り，37℃恒温装置で培養した．

6) 結果の判定法

分注直後，1,3,5 および8日後に細胞核数をかぞえた．その方法は各群16本の短試験管の中からそれぞれ1回に3本づつを抜きとり（8日後のみ4本），培養された細胞を2%クエン酸を含むクリスタリヴァイオレット液で核染色を行い，血球計算板で1ccあたりの細胞核数をかぞえ，3本（8日目の分は4本）の平均値を求め，それぞれの細胞群の増殖曲線を描いた．RBEは 200 kVp X-線を標準として，8日後の細胞核数の対数の比であらわした．この方法は各細胞群の核分裂頻度の比較を意味する．

結果

1) まず対照の実験として，各細胞の対照群，即ち非照射細胞群の増殖を見たが，HeLa，肝，細網の各細胞いずれも分注後指数函数的に増加し，半対数グラフ上ではほゞ直線状の増殖曲線を示した（Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3）

2) ^{137}Cs γ-線200，400，600および 800r 照射群では，各細胞共に照射線量の増加とともに増殖は抑制され，（Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3）照射後8日目の効果曲線は指数函数的に減少する(Fig. 4), Fig. 4 から明らかなように肝細胞がもつともつよく抑制され，以下細網細胞，HeLa 細胞の順になる．この実験の結果から組織培養による細胞の増殖能抑制を指標とすることはRBEの検討に適したものと考えられる．

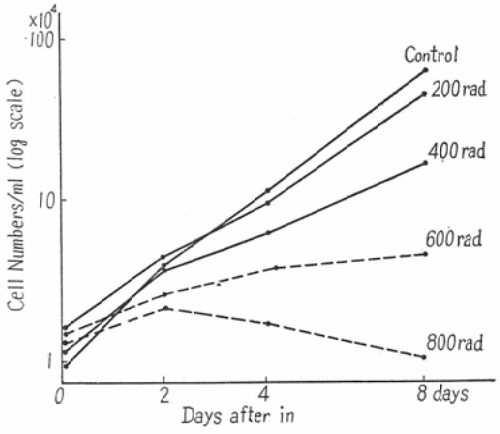

Fig. 1 The Effect of ^{137}Cs γ-irradiation on the growth of HeLa Cell

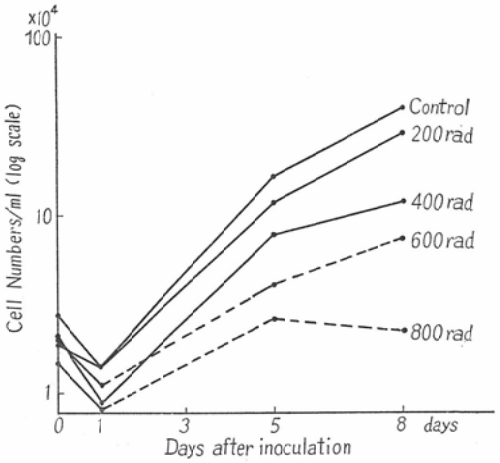

Fig. 2 The Effect of ^{137}Cs γ-irradiation on the growth of Liver Cell

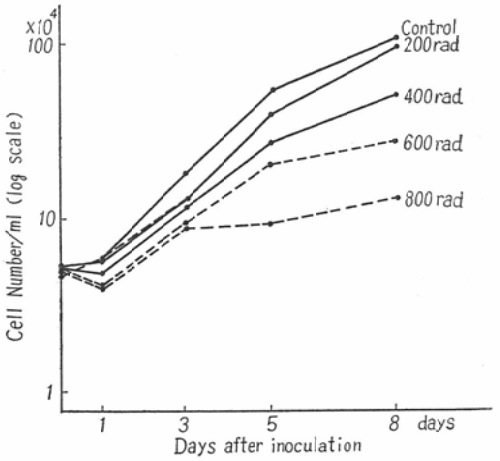

Fig. 3 The effect of ^{137}Cs γ-irradiation on the growth of Bone Mrrrow Cell

3) つぎに HeLa 細胞の各細胞群にほぼ同一線量率50r/min で200kVp X-線，^{137}Cs γ-線および ^{60}Co γ-線の照射をそれぞれ200，400，600rad で与えた，なおRBEの線量率依存性をも検討するため，上記の実験よりも低線量率（18～20r/min）

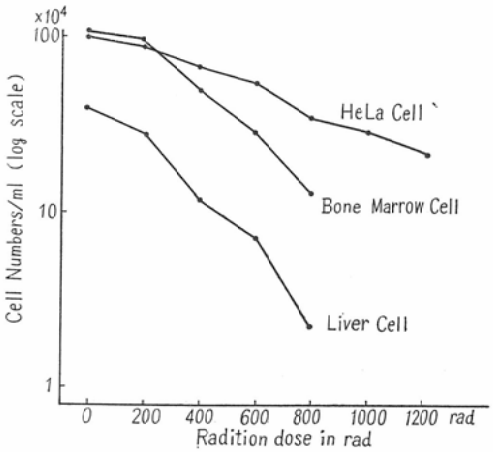

Fig. 4 Dose-response curves of three types of Tissue cultured cells

Table 1. The RBE of ^{137}Cs γ-rays and ^{60}Co γ-rays on the growth inhibition of HeLa Cells.

Radiation	Dose rate rad/min	Dose		
		200rad	400rad	600rad
200kVpX-ray	20.0	1.00	1.00	1.00
^{137}Cs γ-ray	18.1	0.99	0.94	0.91
^{60}Co γ-ray	18.0	0.99	0.94	0.94
200kVp-X-ray	47.7	1.00	1.00	1.00
^{137}Cs γ-ray	50.8	0.95	0.93	0.90
200kVp-X-ray	95.3	1.00	1.00	1.00
^{137}Cs γ-ray	89.7	0.98	0.96	0.96

および高線量率（90～95r/min）での照射実験を行い，比較検討した．これらの結果がTable 1である．この Table 1の示すように，この実験に用いた程度の線量率の変化ではＲＢＥに影響するところは少い，したがつて以下の実験では48～51 r/min の線量率を用いた．また22 MeV X-線のＲＢＥを求めたが，この際には装置の都合上，約200r/min のかなり高い線量率であるので標準とした 200kVp X-線もこれとほゞ同一線量率で照射した．以下同様な条件で肝細胞および細網細胞に対する照射実験を行い，得られたRBEをTable 2にまとめた．この表で見られるに，ＲＢＥには ^{137}Cs γ-線および ^{60}Co γ-線照射に対して線量依存性の傾向がみとめられる．^{60}Co γ-線と ^{137}Cs γ-線のＲＢＥは同一線量では，どの細胞群においても有意の差を認めず，またこれらと22 MeV X-線の間にも有意の差を認めなかつた．

Table 2. The RBE of ^{137}Cs γ-rays, ^{60}Co γ-rays and 22 MeV X-rays on the growth inhibition of Three Types of Tissue cultured Cells.

Cell Type.	Radiation	Dose		
		200rad	400rad	600rad
HeLa Cell	200kVpX-ray	1.00	1.00	1.00
	^{137}Cs γ-ray	0.95	0.93	0.90
	22MeV X-ray		0.90	
Reticulum Cell	200kVp X-ray	1.00	1.00	1.00
	^{137}Cs γ-ray	0.99	0.93	0.91
	^{60}Co γ-ray	0.98	0.93	0.93
	22MeV X-ray		0.93	
Liver Cell	200kVp X-ray	1.00	1.00	1.00
	^{137}Cs γ-ray	0.99	0.99	0.95
	^{60}Co γ-ray	0.99	0.95	

考按

1） 以上のような実験結果を得たが，この場合問題となるものはこれらの細胞群の増殖曲線において培養後即ち照射後１日目の細胞数の減少がかなり目立つ場合が見られることである．これは放射線の細胞に与える急性効果，即ち細胞と急性死や細胞の接着性の消失[9]，照射移植の際の不適当な条件が細胞に与える影響等によることの他に移植時の細胞数が少いための数のバラツキの影響も無視し得ないものと考えられる．いずれにせよ各実験群においてそれぞれの細胞群は同一条件におかれており，その後の増殖曲線は半対数グラフ上でほぼ直線状をなすことよりＲＢＥの研究に支障を来すものではない．

2） 実験結果に見られた各種放射線のＲＢＥを総括的に眺めると 200 kVp X-線を標準とした ^{60}Co 線のＲＢＥは0.93～0.99, ^{137}Cs γ-線のそれは0.90～ 0.99, 22 MeV X-線のそれは0.90～0.93となつており，いずれもしより小さく，また ^{60}Co γ-線と ^{137}Cs γ-線の間には有意の差は認められず，小塚が報告した鶏胎の実験結果と矛盾しない，γ-線と22 MeV X-線とを比較した場合も著者等の実験範囲ではほとんど有意の差を認めがたい（Table 2）．

3) これらの結果について文献的考察を加えて検討してみると，γ-線のRBEについては多数の報告があり，標準 X-線との間に有意の差を認めないという Paterson[10]，Crabtree[11] 等の一部の例外をのぞいては大多数は標準 X-線の方が効果が大であるとしている[1)3)12)~24)]．一方超高圧 X-線についても近年多数の報告がなされているが，中でも興味があるのは22 MeV X-線と ^{60}Co γ-線の 200 kVp X-線に対するRBEについての Sinclair 等の一連の報告である．即ち saccharomyces cerviciae の LD_{50}[17]，mouse および rat の急性致死効果[21)22)] rat の ^{49}Fe-uptake[23]，鶏胎の LD_{50}[24] 等を指標としたRBEについて，いずれも200 kVp X-線に比して22 MeV X-線および ^{60}Co γ-線の効果は小さく，また22 MeV X-線と ^{60}Co γ-線はほぼ等しい効果をあらわすと報告しており，同時に諸家の報告例も多数検討してその妥当性を示している．たゞ saccharomyces cerviciae の LD_{50} について 180 kVp X-線と22.5 MeV X-線はほゞ等しい効果を示すという Gunter[25] の報告があるが Sinclair はその矛盾についても説明している[17]．著者等の実験結果も Sinclair の報告とほゞ一致した傾向を示している．

4) これらのRBEを放射線のLETとの関連性において考察するとStorer[1] によればRBEはLETが 3～10KeV/μ 間では増加し，45～4000 KeV/μ の間では逆に減少すると述べている．本実験では 200 KeV X-線，^{137}Cs γ-線，^{60}Co γ-線並びに 22 MeV X-線の LET は夫々 1.8, 0.4, 0.27, 0.2KeV/μ であり2以下であるが，LETに比例してRBEの値が小さくなつているのは，LETの考えからは合理的である．

5) 次にRBEの線量および線量率依存性については ICRP の報告[26] にもあるように，一般に線量の増加および線量率の増加につれてRBEは小さくなつている．本実験においても γ 線，22MeV X-線ともに 200～ 600rads の線量範囲で線量増加とともにRBEは小さくなりICRP の報告と一致する．なお Locken[20] は受精鶏卵の生存能力を指標とした 220 kVp X-線と ^{60}Co γ-線のRBEを調べ 330～1030rads の範囲ではRBEに有意の差を認めていない，線量率依存性に関しては本実験に用いた線量率の差即ち18～90r/min の範囲ではRBEに明確な差と云えるほどのものを認めなかつた．Lea[27] は鶏胎におよぼす 160 kVp X-線の効果を調べ，10r/min 以上の線量率では LD_{50} はこれに無関係であるとしている．一方では Boland[28] は同じく鶏胎で36r/min から 151r/min に線量率を増した場合，その効果に9％の増加を見たと報告している．また Stearner[29] は鶏雛を用いて200 kVp X-線を線量率 4.3r/min と 6r/min で照射し前者の方が LD_{50} が低いことを認めている．γ 線に関しては Vogel[30] 等は12～22r/min の線量率の差では鶏雛の生存曲線に変化を認めなかつたが，6r/min で照射した場合に前の場合とその効果にかなりの差を認めた．即ち線量率6r/min の場合には12～22r/min の場合より約36％の LD_{50} の増加を見たと報告している．この差について Vogel は長時間にわたる照射期間中の恢復機転によつて説明しているが著者等の実験においてもさらに低い線量率で照射した場合RBEに何らかの変化を認めるであろうことは考えられる．

6) 本実験で見られた各種培養細胞の放射線感受性では正常組織より移植培養された細胞の方がむしろ癌細胞である HeLa 細胞より増殖抑制率が高いという結果が得られた．これは放射線治療の上から見た常識とは一見相反するが，Puck[31] (1957) によれば長期培養された人の正常上皮組織細胞と HeLa 細胞の放射線感受性はほぼ等しいとしており，著者等の経験によつても *in vitro* で長期培養された場合には，腫瘍細胞の方が感受性が大であるとはいえない結果となつた．また同種の細胞であつても放射線感受性は照射時の生理的状態にも左右されるようである．なおこれらの正常組織細胞と腫瘍細胞の比較に関しても問題点が見られる．即ち Leighton[32] 等は長期間 *in vitro* で培養された細胞株はそれらのもとの組織との関連性をほとんど失い，もとの組織が正常，腫瘍の如何にかかわらず，一様に未分化細胞の像を呈するにいたるという．Coriell[33]，Foley[34] 等も両者の類似性を認めており，さらに

Coriell[35], Fough[36] 等は HeLa 細胞等の 2,3 の癌細胞および人や動物の正常組織より採取された数種の培養細胞の，一定の前処置をほどこされた rat 体内での腫瘤形成能について調べ，癌細胞はつねに腫瘤を形成するに対して正常組織細胞は培養期間の浅いうちはほとんど腫瘤を形成しないが，長期間の継代培養の間には，これらの細胞もその性状を変え腫瘤形成能を有するようになり，この点でも HeLa 細胞等の腫瘍細胞と類似した態度をとるという．しかしその程度にはなお両者の間に差がみられることを彼等も認めており，特に Foley[34] は正常ハムスターの口腔粘膜内での両者の腫瘤形成能において明らかな差を認めている．したがつて長期間組織培養された細胞では，癌細胞はそのまゝ悪性を維持している一方正常組織細胞はその性格を変え，少くとも見かけの上では悪性像を呈するにいたるということで，それゆえこれらの胞細の放射線感受性の差をもつて *in vivo* での感受性の比較をあらわすわけにはいかない．

今後の研究方針としては，培養初期の正常組織細胞と種瘍細胞の放射線感受性を比較することも一つの方法である．

総括および結論

著者らは組織培養された HeLa 細胞，肝細胞並びに細網細胞の増殖能におよぼす影響を指標として 200 kVp X-線，^{60}Co γ-線，^{137}Cs γ-線並びに22 MeV X-線のＲＢＥを検討すると同時に，これらの細胞間の放射線感受性の比較を検討し，次のような結果を得た．

1) 同一線量を細胞に照射した場合，細胞の増殖能におよぼす影響は 200 kVp X-線がもつとも大きく，これに比して他のいずれも小さい．

2) ^{60}Co γ-線，^{137}Cs γ-線ならびに22 MeV X-線のＲＢＥはＬＥＴに関係する．しかしＲＢＥは 0.90～0.99の範囲に含まれる．

3) 200～ 600rads の線量範囲では，γ-線に関してはＲＢＥは線量に依存し，線量の増加に対して減少する．

4) 18～90r/min の線量率の差ではＲＢＥに線量率依存性を認めがたい．

5) 三種類の組織培養細胞の ^{137}Cs γ-線に対する放射線感受性は HeLa 細胞よりも正常肝細胞および細網細胞の方が大である．

* Earle の塩溶液：NaCl, KCl. $CaCl_2$, $MgSO_4$, NaH_2PO_4, α-Globulin 等を含む．

** 細網細胞：原典には“Human bone marrow H946”と命名されている，正常人骨髄より採取培養されたもの．

*** 199溶液：細胞培養液の一種，非常に多種類の栄養物質が配合されている．

****：各実験において細胞数に 1.5～ 5.0×10/^{4}cc の変動があつた．

（本研究は文部省科学研究助成金に負うところが多い，こゝに謝意を表する．）

参考文献

1) Storer, J.B., Harris, P.S., Furchner, J.E and Langhlin, W.H.: Rad. Res., 6: 188, 1957. — 2) 小塚隆弘：日医放誌，20：806，1960. — 3) Lansnitzki, I. and Lea, D.E.: Brit. J. Radiol., 13: 149, 1940. — 4) Bonte, F.J and Krohmer, J.S.: Radiology, 71：753, 1958. — 5) Gey, G.O., Coffman, W.D. and Kuhicek, M.T.: Cancer Res., 12: 264, 1952. — 6) Chang, R.S.: Proc. Soc. Expt. Biol & Med., 87：440, 1954. — 7) Morgan, J.F., Morton, H.J. and Parker,R.C.: Proc. Soc. Expt. Biol. d. Med., 73：1, 1950. — 8) 吉永春馬，安徳重徳：文部省科学研究班“高エネルギー放射線のＲＢＥに関する研究”レポート，36—2—吉 1，1961. — 9) 田口光雄，矢谷隆一，武田進：日本医学放射線学会総会発表（大阪，4月，1963). — 10) Paterson, E.: Brit. J. Radiol., 12：39, 1939. — 11) Crabtree, H.G. and Gray, L.H.: Brit. J. Radiol., 1. — 12) Mattram, J.C.: Brit. J. Radiol., 13：31, 1940. — 13) Upton, A.C., Conte, F.P., Hurst, G.S. and Mills, W.A.: Rad. Res., 3：355, 1955. — 14) Upton, A.C., Conte, F.P., Hurst, G.S and Mills, W.A.: Rad. Res., 4:117, 1956. — 15) 石山金蔵：日医放誌，16：806，1956. — 16) Patetta-Queirolo, M.A., Randolph, M.L. and Sproul J.A. Acta Radiol., 49：393, 1958. — 17) Sinclair, W.K., Gunter, S.E and Cole, A.: Rad. Res., 10：418, 1959. — 18) 渡辺哲敏：日医放誌，19：461, 1959. — 19) Hall, E.J.: Brit. J. Radiol., 34：5, 1961. — 20) Loken, M.K., Beisang, A.A., Joonson, E.A. and Mosser, D.G.: Rad. Res., 12：202, 1960. — 21) Sinclair, W.K. and Blackwell, L.H.: In Radiation Biology and Cancer: P. 103, Univ. of Texas, 1959 cited by Sinclair, W.K. (1962). — 22) Sinclair, W.K

and Blackwell, L.E.: Rad. Res., 16 : 352, 1962. — 23) Sinclair, W.K., Blackwell, L.H. and Humphrey, R.M.: Rad. Res., 16 : 363, 1962. — 24) Humphrey, R.M. and Sinclair, W.K.: Rad. Res. 16 : 384, 1962. — 25) Gunter, S.E. and Kohn, H.I.: Rad. Res., 4 : 326, 1956. — 26) Report of the International Commission on Radiological Protection, Report of Committe on RBE: p. 20, 1962. — 27) Lea, D.E.: Am. J. Roentgenol and Radium Therapy 45 : 65, 1941. — 28) Boland, J.: Brit. J. Radiol., 27 : 680, 1954. — 29) Stearner, S.P.: Am. J. Roentgenol. and Radium Therapy 65 : 265, 1951. — 30) Vogel, H.H. and Stearner, S.P.: Rad. Res., 2 : 513, 1955. — 31) Puck, T.T., Morkovin, D., Marcus, P.I. and Cieciura, S.J.: J. Expt. Med., 106 : 485, 1957. — 32) Leighton, J.: Cancer Research, 17 : 6, 1957. — 33) Coriell, L.L., Tall, M. and Gakill, H.: Science, 128 : 198, 1958. — 34) Foley, G.E. and Handler, A.H.: Proc. Soc. Expt. Biol. & Med., 99 : 661, 1957. — 35) Coriell, L.L., Mc Allister, R.M., Wagner, B.M., Wilson, S.R. and Dwight, S.: Cancer, 11 : 1236, 1958. — 36) Fough, J. and Hok, K.A.: Cancer Research, 18 : 692, 1958.