

Title	200kVp X-線, 60Co γ -線, 137Cs 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)
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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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 acrylic 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) については近年多数の報告がなされているが、特に Storer 等 (1957) 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 22 MeV 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 Lea³⁾、Bonte⁴⁾ 等のものが見られるのみである。*in vivo* の RBE 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) 200 kVp X-線 (半価厚 1.9 mm 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

200 kVp X-線、 ^{60}Co γ -線、 ^{137}Cs γ -線の線量測定には 4 cm 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、11.5 cm 平方のアクリライト・ファントーム内に挿入した。(200 kVp 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

HeLa 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 1.6 cm 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

照射後各細胞浮遊液をそれぞれ細胞数がほぼ $2 \times 10^4/cc$ 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. この細胞浮遊液を 1.5ccづつ短試験管に分注し, 1群で16本づつを作り, 37°C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%クエン酸を含むグリスタリウェ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ぼ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

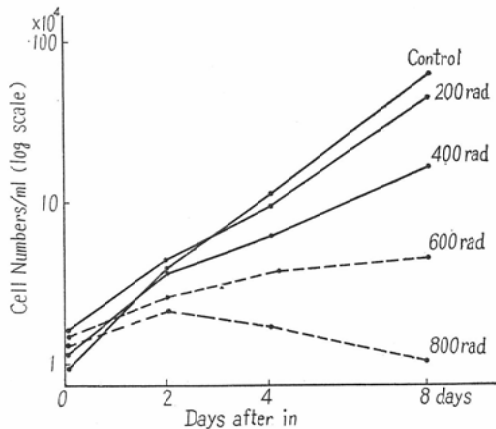


Fig. 1 The Effect of ^{137}Cs γ -irradiation on the growth of HeLa Cell

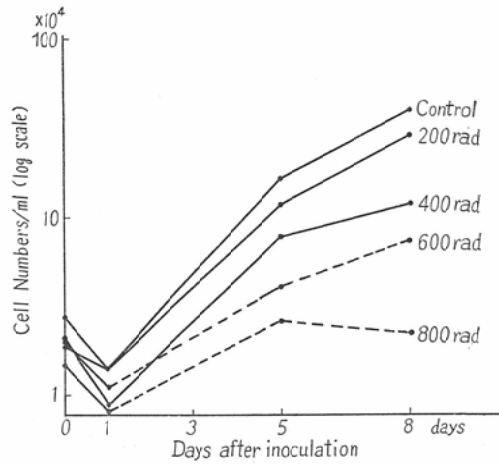


Fig. 2 The Effect of ^{137}Cs γ -irradiation on the growth of Liver Cell

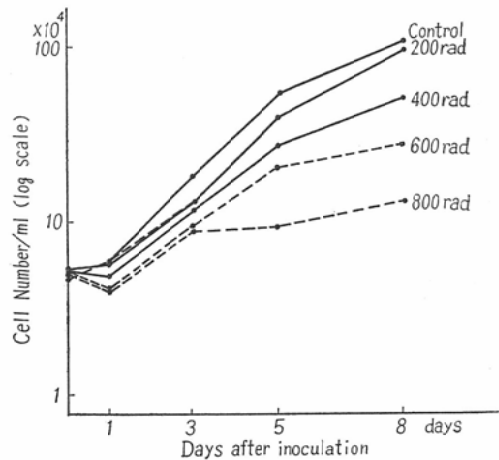


Fig. 3 The effect of ^{137}Cs γ -irradiation on the growth of Bone Marrow Cell

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.

3) つぎに HeLa 細胞の各細胞群にはほぼ同一線量率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)

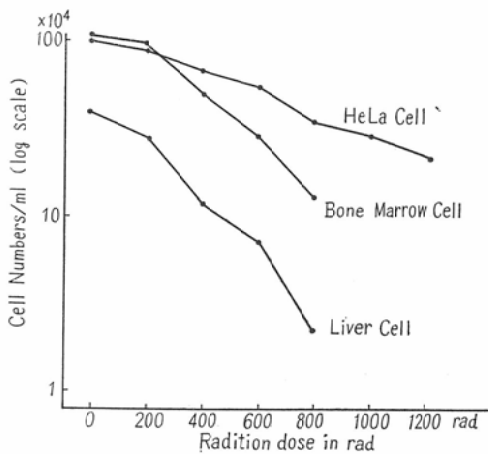


Fig. 4 Dose-response curves of three types of Tissue cultured cells

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ない、したがって以下の実験では 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-線もこれとほぼ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

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
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	

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った。

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當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 となっており、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 Paterson¹⁰⁾, Crabtree¹¹⁾ 等の一部の例外をのぞいては大多数は標準X-線の方が効果が大きいとしている^{1)3)12)~24)}。一方超高压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⁶⁰Co 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LD₅₀¹⁷⁾, mouse および rat の急性致死効果²¹⁾²²⁾ rat の⁴⁹Fe-uptake²³⁾, 鶏胎のLD₅₀²⁴⁾ 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⁶⁰Co γ -線の効果は小さく、また22 MeV X-線と⁶⁰Co 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LD₅₀ について180 kVp X-線と22.5 MeV X-線はほぼ等しい効果を示すという Guntner²⁵⁾ 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 の報告とほぼ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 Storer¹⁾ 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、¹³⁷Cs γ -線、⁶⁰Co 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の値が小さくなっているのは、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は小さくなっている。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 Locken²⁰⁾ は受精鶏卵の生存能力を指標とした220 kVp X-線と⁶⁰Co 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。Lea²⁷⁾ 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LD₅₀はこれに無関係であるとしている。一方では Boland²⁸⁾ は同じく鶏胎で36r/minから15r/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 Stearner²⁹⁾ 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LD₅₀が低いことを認めている。 γ 線に関しては Vogel³⁰⁾ 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LD₅₀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回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、Puck³¹⁾ (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态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ついても問題点が見られる。即ち Leighton³²⁾ 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。Coriell³³⁾, Foley³⁴⁾ 等も両者の類似性を認めており、さらに

Coriell³⁵⁾, Fough³⁶⁾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体内での腫瘍形成能について調べ、癌細胞はつねに腫瘍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瘍を形成しないが、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瘍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ふ。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Foley³⁴⁾は正常ハムスターの口腔粘膜内での両者の腫瘍形成能において明らかな差を認めている。したがっ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、少なくとも見かけの上では悪性像を呈するにいたるといふことで、それゆえこれらの細胞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腫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、⁶⁰Co γ 線、¹³⁷Cs 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) ⁶⁰Co γ 線、¹³⁷Cs 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 線に關しては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¹³⁷Cs 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, CaCl₂, MgSO₄, NaH₂PO₄, 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、正常人骨髓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1.5~5.0×10⁴/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く、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, 安德重徳：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, 36-2-1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: 1, 1940. — 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) 石山金藏：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., Beising, 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 Committee 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 Ciciura, 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.
-