

HeLa 細胞に及ぼす Co^{60} 照射の影響, 殊に分割照射の意義について

Effects of Co^{60} Irradiation upon the HeLa Cells with Special Significance in the Partition Irradiation method

九州大学医学部産科婦人科学教室 (主任 古賀康八郎教授)
大学院学生 玉 木 金 夫 Kaneo TAMAKI

緒 言

X線や Radium など放射線の悪性腫瘍に対する治療的応用は 1907年 Abbe¹⁾ が少数の悪性腫瘍患者に試用したことにはじまり、以来、今日迄幾多の好成績をうみ、悪性腫瘍の治療に不可欠のものとなるに至った。1942年Fermiによる原子炉建設以来、数多くの人工放射性同位元素がつくりだされ、その医学的応用は年々拡まりつゝあり、特に産婦人科領域において Co^{60} による治療は誠に注目すべきものがある。悪性腫瘍に対する放射線療法の根本は如何にして健全組織に副作用少なく病巣部に照射効果を強く発現させるかにあり、この点に関しては線質、照射方法、放射線線量の配分などの問題があるが、その基礎的生物学的作用については、なお幾多の問題点が残されているように思われる。

組織培養の応用による放射線の生物学的作用に関する研究は、遠く1911年 Wedd 及び Raus²⁾ にはじまり、榊原³⁾、京極⁴⁾ 等の報告があるが、最近組織培養法の進歩発達により、従来放射線生物学の盲点であつた諸問題の解明に一段と注目せられるに至った。著者は人子宮頸癌の培養によつて確立された HeLa 細胞に対する Co^{60} の作用を、形態学的並びに増殖経過の追求により、その生物学的作用の一端を検索し、あわせて C^{60} γ 線とX線の生物学的作用を比較し、殊に日常実際の治療に適用されている分割照射の意義を検討し、今後の放射線治療の一指針にしたいと思う。

第1編 実験材料及び実験方法

第1章 実験材料

1. HeLa 細胞：九大第一内科組織培養室より譲りうけたもので、わが教室で大型角瓶に十数代にわたつて継

代されたものを用いた。

2. 培養液：下記LY 3：2培地に $\frac{1}{3}$ の割合で牛血清を加え、Penicillin 100unit/cc, Streptomycin 100 γ /cc を添加したものをを用いて培養し、細胞洗滌には下記B S液を使用した。

1) LY 3：2培地：

I 液	4.0cc
II 液	2.0cc
III 液	4.0cc
Lactalbumin hydralysate	500mg
Yeast extract	100mg
Glutamine 液	3.0cc
Glutamic acid 液	2.0cc
0.4% Phenol red 液	0.63cc
Distilled water	90cc

2) B S S液：

I 液	4.0cc
II 液	2.0cc
III 液	4.0cc
0.4% Phenol red 液	0.63cc
Distilled water	90cc

以上、1)2)は 1.5気圧20分で高压滅菌して4℃冷蔵庫に保存し、使用に当つて同様に高压滅菌したGlucose 2.0cc, NaHCO_3 1.5cc を加えてpH 7.4に調整して使用した。

但しI 液：

NaCl	40 g
KCl	2.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
Distilled water	200cc

Ⅱ液:

CaCl₂ 0.7 g

Distilled water 100 g

Ⅲ液:

NaHPO₄·2H₂O 0.3 gKH₂PO₄ 0.3 g

Distilled water 200cc

Glutamin 液: 292mg/50cc

Glutamic acid 液: 292mg/50cc

Glucose: 5 g/50cc

Na HCO₃: 大塚製薬製メイロン

3. トリプシン液: トリプシン「モチダ」10,000 単位を B S S 液 5 cc にとかし原液として 4℃で保管し, 使用に当って B S S 液で 10% 又は 20% にうすめて使用した。

4. 細胞核染色液:

Critic acid 21 g

Crystal violet 0.5 g

Formalin 10gtt.

Distilled water 1000cc

5. 牛血清: 屠殺場で屠殺直後の牛からとった牛血を 5000rpm で 30分遠沈し, 上澄液を Seitz 濾過器にかけて濾過し, 4℃の冷蔵庫に保管した。なお牛血清の組成は常に同一のものの使用が実際問題として不可能であった。

第2章 実験方法

1. 培養術式: 大型角瓶で 37℃ 孵卵器に 1 週間静置培養したものに, 培養液除去後 200unit/cc のトリプシン液 8 cc を加え, 37℃ で 30分静置して細胞を瓶壁面からはがし, ピペットで攪拌後 1000rpm で 10分遠沈し, 沈渣を B S S 液で 1 度洗滌後遠沈し, その沈渣を培養液に浮游稀釈し, 培養試験管に 5 ~ 8 万/0.8cc の割合で均等に分注し, 37℃ 孵卵器に約 5° 傾けて静置培養した。なお一部にはカバーガラスをタンザク型に切つて入れ, その上面に細胞を増殖させた。

2. Co^{60} 照射方法: 本実験使用の Co^{60} 装置はわが教室装備の島津製 ST-2000 型遠隔照射装置で, 線源強度 200Curie, 半価層 1.03 ~ 1.07cmPb, 線源標本間距離 50 cm, 線量率 15r/min. であった。まず角瓶より試験管に植継ぎして 48 時間または 72 時間培養したものに, 液深約 4 mm になるようにして照射し, その直後培養液を捨て新培養液 1 cc を添加し, 以後は隔日に旧培養液 0.5cc を除去し, 新培養液 0.5cc 添加し 37℃ 孵卵器内に静置培養した。

3. 細胞数の算定: 各試験管の培養液を除去した後, 400unit/cc トリプシン液を各 1 cc あて入れ 37℃ 孵卵器に 2 時間静置して細胞を壁面から剥離し, ピペットで攪拌後クリスタル紫液 1 cc を入れて生細胞核の染色をし, Fuchs-Rosenthal 血球計算板で 1 試験管当りの核数を算定, 試験管 3 本の平均値をもつて決定した。

4. タンザク標本: タンザク培養したものは培養液除去後一度 B S S 液で洗滌し, エーテル・アルコールで固定した後, 特に細胞の核の変化を明瞭に染色する目的でパパニコロ染色をほどこし, 形態学的変化の推移を観察した。

第2編 HeLa 細胞に及ぼす Co^{60} 一時照射の影響

第1章 実験成績

第1項 細胞増殖に及ぼす影響

試験管に培養後第 2 日目の HeLa 細胞に Co^{60} を 300 r, 500r, 1000r, 2000r, 3000r 照射した後の細胞数の推移を第 1 表に示した。すなわち 300r では対照に比し増殖抑制をうけているが, なお細胞は増殖の経過をたどっている。これが 500r となると増殖抑制作用は更に強く現われ, 照射後第 6 日頃迄はやや増殖をみるが, 第 8 日目は減少をみ, 増殖曲線はほぼ水平位を保っている。しかるに 1000r となると明らかに水平位以下となり細胞数は減少の一途をたどるが, 2000r ~ 3000r と線量増加につれてこの傾向は一層顕著である。

第1表 Co^{60} 照射後の細胞数の経日的推移

照射後 日数	細胞数 (1000単位)					
	対照	300γ	500γ	1000γ	2000γ	3000γ
— 2 日	59.1					
0	64.6					
2	139.9	118.5	107.9	64.2	51.8	44.7
4	268.4	175.4	83.5	54.2	35.0	25.1
6	315.1	213.8	105.8	38.5	22.7	17.2
8	367.1	223.5	44.6	30.3	11.8	8.0

第2項 形態学的変化

Co^{60} 照射により, まず核, 核小体及び胞体の腫脹, 膨化を来した巨細胞の出現をみ, 核濃縮, 核膜肥厚を認め, ついて核及び胞体の空胞形成, 3 極 4 極分裂, 染色体の凝集 ~ 散乱, 染色体橋形成等の異常分体像を認める。照射後第 5 日目頃巨細胞の出現はほぼ最高値に達し, 多核分葉核細胞を多数認め, 胞体に粗大顆粒が出現

第2表 形態学的変化

照射線量	細胞変化	核腫脹	核小体腫脹	核濃縮	核分裂減少	胞体粗大顆粒	胞体空胞形成	核空胞形成	多核分葉核	核崩壊	細胞崩壊	胞体エンオヂン濃染	矮小細胞
	照射後日数												
300γ	4日	+	+	±	±	—	±	—	—	—	—	—	—
	6	+	+	++	+	+	++	—	++	±	—	+	—
	8	+	+	+	±	—	—	—	±	—	—	—	—
3000γ	4日	++	++	++	+	+	+	+	+++	+	+	+	+
	6	++	+	+	+	+	+	++	+++	++	++	+	++
	8	+	+	+	+	+	+	++	+	+++	+++	++	++

し、エオヂン濃染を来たし、ついで核崩壊細胞崩壊像を認めるに至る。これを低線量と高線量を比較する目的で、300r と3000r 照射群について比較検討してみると、第2表の如くである。すなわち、照射後第4日目とともに膨化した細胞をみるも、300r ではごく少数で膨化の程度も小で原細胞の4～5倍大程度であるが、3000r では膨化細胞を多数認め、原細胞の7～8倍大以上のものが大多数であり、核濃縮は300r では殆んどなく、3000r では早くも多数出現している。300r で胞体に空胞を認めるが、3000r では胞体のほかに核にも認められ、また多核分葉核も著明に存在する。核崩壊細胞崩壊の像は3000r ではやみられるが、300r ではこれを認めずなお相当数の正常細胞が存在する。

照射後第6日目となると、300r においても相当の変化を来たし、巨細胞及び核濃縮、多核分葉核を相当数認めるに至り、核崩壊像も軽度出現してくる。3000r では細胞の崩壊像は更に増加し、矮小細胞も多数認められ、細胞の崩壊が相当の速度で進行している事がうかがわれる。

第8日目となると、300r では巨細胞はなお相当数認めるが、むしろ正常細胞が多数認められ核濃縮も少なくなり、多核分葉核は極く少なくなり、細胞崩壊像は殆んど認めず、細胞の回復が行なわれている事が明らかである。一方3000r では原形質突起形成、紡錘細胞、Tadpole型細胞等の奇怪細胞の出現が顕著で、矮小細胞多核細胞及び細胞崩壊の像を多数みとめ、細胞破壊はなお進行している事を示している。

次に巨細胞出現の推移は第3表の如くで、1500r 5日目まで最も多数認められ、かつ各照射群とも照射後第5日目頃最大値を示している。

分体像は異常分体像として3極4極、無糸分体像をみるが、高線量群では特に染色体の凝集～散乱した像を多数認め、これは後述の短縮分裂を思わせるものがある。

第3表 巨細胞出現率

照射後日数	照射線量		
	1000γ	1500γ	2580γ
3日	16.7%	28.7	10.7
5	52.8	55.0	35.2
7	46.6	20.3	27.2

第2章 小括及び考按

HeLa 細胞の増殖については今迄幾多の研究がみられるが、わが国では高野及び山田⁹⁾による詳細な報告がみられ、lag-log-stationary phase を迎るとされているが、著者の実験においてもほぼ同様の結果を得ている。一般に移植細胞濃度が高い場合は低い場合に比べて増殖率が小となる。しかし細胞濃度が低すぎると細胞数の減少傾向をみ、管壁に増殖している細胞を鏡見すると、細胞は円みをおびて収縮し退行変性の傾向がみられ、適量移植の際、細胞が比較的大きく石垣状に配列している像と対照的であり、これは in vivo における腫瘍細胞移植の場合、細胞数が少ない時不成功に終る事とあわせて興味深い。細胞数と培養液の相対的比率が重要な意義をもっている事について Miller⁶⁾の報告がみられる。

Co⁶⁰ 500r 照射において細胞増殖曲線はほぼ水平位を保つが、これは細胞の崩壊と回復再生のバランスにより増殖も減少も起らないという経過となつて現われたものと思われ、300r 照射では形態学的変化追求の結果からも、細胞の回復増殖が活潑に行なわれる事が考えられる。1000r 以上では細胞は減少の一途をたどるが、これら細胞群の最終的運命の追求はなお観察期間の延長を要し、植継ぎという条件が加わるので本実験では実施しなかった。

HeLa 細胞の Co⁶⁰ 照射により、核及び胞体に一連の定型的な変化を認めたがこの経過は各線量群ともほぼ

写真 1 (Co^{60} 300 γ 照射後第 4 日目) 核濃縮
像, 膨化細胞

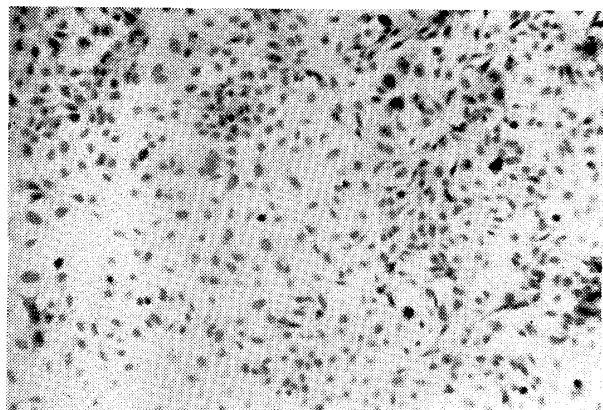


写真 2 (Co^{60} 3000 γ 照射後第 4 日目) 核濃縮
膨化細胞

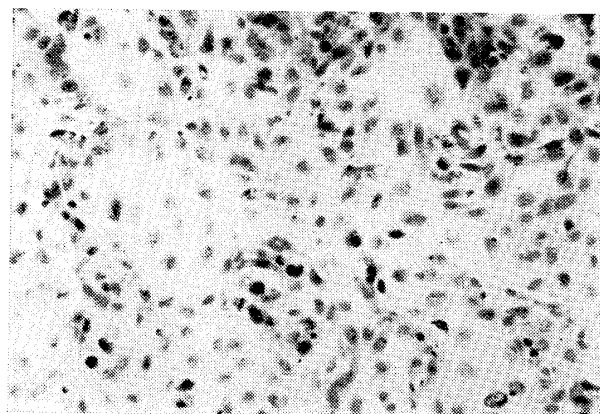


写真 3 (Co^{60} 300 γ 照射後第 6 日目) 胞体空
胞形成, 巨細胞

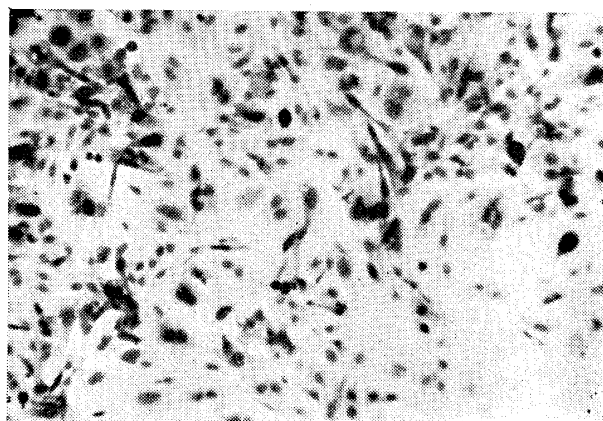


写真 4 (Co^{60} 3000 γ 照射後第 6 日目) 核濃縮
多核細胞, 細胞崩壊像

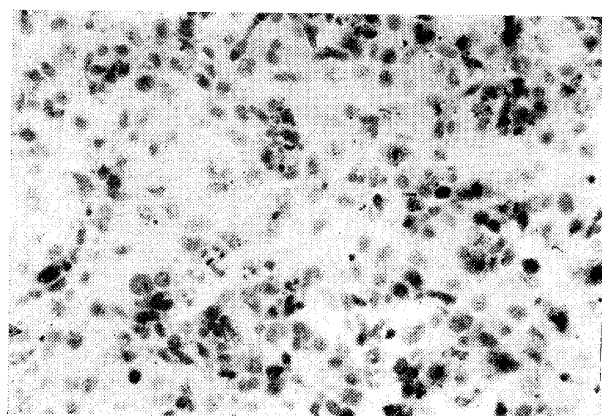


写真 5 (Co^{60} 3000 γ 照射後第 8 日目) 奇怪細
胞, 多核細胞

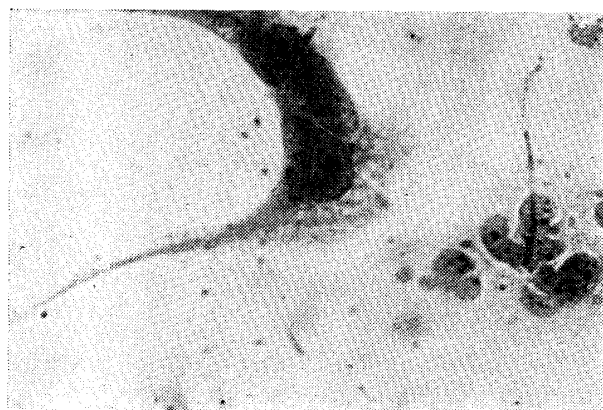
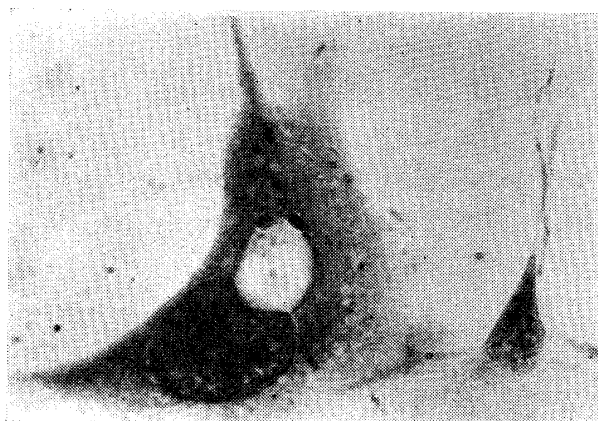


写真 6 (Co^{60} 3000 γ 照射後第 8 日目) 胞体に
巨大空胞形成



昭和36年10月1日

玉 木

1167—23

同一順序で起り、低線量群より高線量群ではこの経過が早く、殊に3000r では照射後第4日目に早くも多数の細胞崩壊像を認めた。

著者は Co^{60} 照射により第5日目頃を頂点として、多数の巨細胞の出現を認めたが、Puck⁷⁾ によるとX線照射下の巨細胞は、全く増殖能力を失っているが、これに反し無処置の場合の巨細胞は3～6%が分裂終期像に至るという。

放射線の細胞に対する作用点は核に存在する。しかも主攻撃時は核分裂前期であろうといわれるが^{8)~11)}、これは著者の実験における分裂細胞数の減少からも肯定せられる。しかし一方多核細胞成立はいかなる機序によるものであろうか。武田¹²⁾は Ehrlich 癌にコルヒチンを作作用させると多数の多核細胞出現をみるが、これは細胞分裂中期前で分裂の中絶を起し染色体が凝集～分散し、ついで核膜を形成して小核をもった細胞を形成し、つぎにこれらの小核が融合して数個の核をもった多核巨細胞の形成をみる。放射線照射の場合もおそらく同様の機転によるだろうと述べている。著者の Co^{60} 照射の場合も染色体が凝集～散乱したいわゆる分裂中絶細胞と考えられる細胞を相当数認め、多核細胞形成に関する前述の“短縮分裂”の機転を思わせるものがある。

第3編 Co^{60} γ 線とX線のHeLa細胞増殖に及ぼす影響の比較

第1章 実験成績

培養後第2日目のHeLa細胞に Co^{60} を前述と同様の方法で500r及び1000r照射した場合とX線を500r、1000r照射した場合の同線量の細胞増殖に及ぼす効果を比較した。なおX線装置は島津製信愛号で、200KV、濾過板は1.5mm Cu+0.5mm Alを使用し、焦点標本間距離は40cmで線量率54.1r/min.である。500r照射の場合の細胞数の推移を第4表に示した。すなわち Co^{60} 500rの場合、照射後一時は軽度細胞増加の傾向をみるが、ほぼ水平位の経過をたどり、第8日目には照射直前の細胞数より軽度の減少を認める。X線500rの場合は、第2日目に Co^{60} の場合より細胞増加はやや強いが、その後の減少の度合いは Co^{60} よりやや強い。しかし両者の差は僅少で有意差はない程度であつた。

つぎに1000r照射の場合は、第4表の如くともに最初から減少の経過をたどるが、照射後第2日目では Co^{60} 照射の方に細胞の減少はやや強く、その後は Co^{60} とX線

第4表 Co^{60} γ 線及びX線照射後の細胞数の経日的推移

照射後 日 数	細胞数 (1000単位)					
	対照	Co^{60} 500 γ	X-ray 500 γ	対照	Co^{60} 1000 γ	X-ray 1000 γ
—4日				109.4		
—2	53.1			54.0		
0	28.1			121.3		
2	111.3	46.9	53.8	168.1	81.9	88.8
4	190.0	36.3	34.4	261.3	68.8	65.6
6	223.8	46.0	34.0	375.0	67.8	65.5
8	256.3	19.4	20.0			

照射群ともほぼ一致した経過をたどり HeLa 細胞増殖に対する影響の差は殆んどないものと思われる。

第2章 小括及び考按

線質の異つた Co^{60} γ 線とX線の生物学的効果比率(relative biological effectiveness, RBE)の検定は厳密な意味においては非常に困難な問題であり、著者の行なつた実験だけでその判定を下す事は出来ないであろう。しかし HeLa 細胞のような in vivo での増殖細胞による方法は、諸種条件が比較的均一化されるので、増殖曲線を比較する事によつてその一傾向をみる事は意義あるものと考えられる。

Upton¹³⁾等はマウスのLD50/30daysを検討し、 Co^{60} γ 線と250KV X線の比は1:1.4、岩井¹⁴⁾は蚕卵致死率の検討から0.9:1の結果を得、Sinclair¹⁵⁾のマウスLD50/30daysからの Co^{60} と200KV X線の比は0.86:1の成績を得、いずれも γ 線の方がX線より放射効果が小となつている。一方 Wood and Boag, Glasser等¹⁶⁾は口腔癌の種々の型について検討した結果、185KV X線とRa γ 線の間にRBEの差はないという。さらに、入江等¹⁷⁾は各種系統について検討し、多くのものは γ 線のRBEは1より大であるが、Ehrlich 腹水癌、吉田肉腫細胞では1より大で血球ではその種類により異なるという結果を得ている。

著者の HeLa 細胞に関する500r、1000rにおける実験では、500rにおいて照射後第6日目にはX線の方が細胞数やや少なく、1000rにおいても照射後第6日目X線の方が細胞数が少なくなつているが、その細胞増殖の経過を比較するとき両者の間の差は殆んどないと思ひなしてよい程度で、 Co^{60} とX線の HeLa 細胞に対する生物学的効果の差はないとしてよいと思われる。

第4編 Co^{60} 一時照射と分割照射 の HeLa 細胞増殖に及ぼす 影響の比較

第1章 実験成績

試験管静置法により培養後第2日目の HeLa 細胞に、 Co^{60} 300r, 1000r, 1500r, 2580r, 3000r を一時照射と24時間毎の3回分割照射をして、1日毎に培地の交換をして細胞数の推移を追求した。なお照射後は直ちに培地を交換し、細胞に Co^{60} 照射中は対照群も孵卵器外に静置し、条件を出来るだけ均一にするようにした。その細胞数の経日的変化を第5表に示す。

300r 照射においては、一時照射、分割照射ともになお細胞の増殖はあるが、増殖抑制の傾向がみとめられ、100r ずつ3回分割照射に比べ、300r 一時照射においてははるかに抑制作用が強く現われている。

1000r 照射においても、一時照射、分割照射ともに細胞の著明な増殖抑制をみるが、333r ずつ3回分割照射より1000r 一時照射において明らかに抑制作用が強く現われている。しかし300r の時ほど両者の差は著明でない。

1500r 照射においては、500r ずつ3回分割照射と1500r 一時照射との間に抑制作用の差は殆んど見出す事が出来ず、ほぼ一致した抑制曲線を形成する。

2580r 照射においては、860r ずつ3回分割照射において照射後3日目に一時照射より抑制作用がやや弱い、その後は抑制作用が強い経過をたどっている。

3000r 照射においても、はじめ一時照射の方に抑制作用がやや強く出るが、時日とともに1000r ずつ3回分割照射群の方に抑制作用がやや強く現われる経過を示した。

すなわち、総線量1500r を境界として、これより低線量の時は一時照射の方が細胞増殖抑制作用が強く現われ、高線量になると逆に分割照射の方に抑制作用がやや強く現われ、その強弱が逆転している。そこで1500r を300r ずつ5回に分割したものと1500r を一時照射したものを比較してみると、増殖抑制曲線は同一経過をたどらないで、一時照射の方が5回分割照射より抑制作用が強く現われている。すなわち、総線量1500r に意義があるのではなくて、分割量500r に意義がある事が明らかである。

第2章 小括及び考按

Regaud¹⁸⁾ の家兎睾丸についての時間因子に関する実

験的研究を基にして、Coutard¹⁹⁾ がいわゆる“分割遷延照射法”による悪性腫瘍の治療法を発表し、時間因子の放射線生物学上における意義がはじめて一般の注意を喚起するに至り、子宮癌の放射線療法にも応用される様になった。この時間因子とは、分割、遷延並びに間隔の3者であつて、放射対照となる組織とこれら3因子の程度により、ある場合は放射線作用増強し、ある場合は変化なく、ある場合は減弱する。分割遷延照射においては、遷延は第2義的なもので、分割因子が第1義的なものとみなされている^{20) 21) 22)}。放射線作用が時間因子により増強する場合には時間因子は「1」より大、変化のない時「1」に等しく、減弱する場合は「1」より小であるとすると、皮膚に関する実験ではすべて「1」より小という成績であり^{23) 24) 25)}、また脾臓、血液等においてもそれぞれ「1」より小という成績が得られている²⁶⁾。この時間因子が悪性腫瘍組織については放射線治療上重要な意義を有するものであつて、この際有利なのは時間因子が、ある場合において「1」より大となり得る事である。すなわち Nather and Schinz²⁷⁾ は移植マウス癌腫において、Juul²⁸⁾ は同じく移植癌腫並びに肉腫において、Samssonow はマウス肉腫において、いずれも分割因子により放射線作用が増強する事実を認めた。

宇田^{29) 30)} はマウスの肝機能及び組織学的研究から、分割照射の方が1回全量与えたより作用が強く現われ、これは第1回照射の影響が細胞内にまだ残っている期間に第2回の照射が行われた事、すなわち第1回照射後細胞の恢復現象が起つて分裂旺盛な時期において第2回照射が加わる結果で、Tribondeau Bergonie の放射線感受性に関する法則により放射効果が強力に現われたとし、佐藤³¹⁾、木村³²⁾ はX線照射により細胞は機能の減退をみるが、一定期間後にこれが恢復する時、細胞内のケトエノール顆粒が正常より著しく多数現われ、浜崎³³⁾ はこれを過再生と称し、この時期に照射が行なわれると効果が増強するという。

HeLa 細胞においては分割照射により、ある場合は時間因子が「1」より大であり、ある場合は「1」より小であり、これは分割線量による事が著者の実験から明らかになり、時間因子は単純に「1」より大、あるいは小といえるものではなく、この際、分割線量が重要な意味をもっている様に思える。HeLa 細胞の500r 照射で増殖曲線はほぼ水平位をたどり、分割線量が500r 以下の場合、第1回照射により細胞は障害されるが、軽度であるため増殖力は衰えながらも次回照射迄に恢

昭和36年10月1日

玉 木

1169—25

第5表 Co^{60} 一時照射と分割照射後の細胞数の経日的推移

照射後 日 数	細 胞 数 (1000 単位)								
	対 照	300 $\gamma \times 1$	100 $\gamma \times 3$	対 照	1000 $\gamma \times 1$	333 $\gamma \times 3$	対 照	1500 $\gamma \times 1$	500 $\gamma \times 3$
— 3日									
— 2	29.5			113.0			65.5		
— 1									
0	42.5	照 射	照 射	107.1	照 射	照 射	83.1	照 射	照 射
1			照 射			照 射			照 射
2	95.6		照 射	223.8		照 射			照 射
3				440.0	96.9	156.3	142.5	48.1	53.8
4	232.5	116.9	136.3						
5				513.8	72.5	109.4	265.0	46.9	44.3
6	338.1	142.5	203.1						
7				557.5	47.8	80.0	376.9	36.0	26.3
8	414.0	148.0	210.8						
9				584.4	46.9	53.1			
10							413.8	28.1	36.0
11	530.6	158.8	222.5						
12									
13									

照射後 日 数	細 胞 数 (1000 単位)								
	対 照	2580 $\gamma \times 1$	860 $\gamma \times 3$	対 照	3000 $\gamma \times 1$	1000 $\gamma \times 3$	対 照	1500 $\gamma \times 1$	300 $\gamma \times 5$
— 3日				92.3					
— 2	131.6						88.9		
— 1									
0	153.1	照 射	照 射	173.8	照 射	照 射	49.4	照 射	照 射
1			照 射			照 射			照 射
2	165.0		照 射	201.3		照 射	120.6		照 射
3		60.0	66.6						照 射
4				303.1	64.5	79.4	352.5		照 射
5	297.2	64.7	49.7						
6				420.0	63.8	48.1	401.9	18.8	56.9
7	313.8	51.9	43.1						
8				516.3	45.6	42.5	513.1	18.1	34.4
9									
10	338.8	35.6	26.3	575.3	36.3	26.9	570.0	8.9	20.0
11									
12									
13							583.1	5.0	19.4

復して増殖を続ける。これに第2回、第3回照射をうけても同様の経過をとる。これが1時照射となると細胞破壊作用は3倍の強さのために恢復、増殖が相当困難になる程の障害をうける。この為に一時照射の方に抑制作

用が強く現われると考えられる。また、分割線量が小である程、放射性感受性の低い細胞を破壊し得ないで、細胞の抵抗性が大になる³⁴⁾³⁵⁾という事も一部関与すると思われる。

分割線量が 500r より多い場合は、第 1 回照射で細胞はすでに強い障害を受け、増殖曲線は水平位以下となり減少の経過をたどり、次回照射までに回復は完了しない。しかもなお軽度ながら回復のための分裂を行なう。これに第 2 回目の照射が行なわれ、分裂細胞には特に細胞障害が強く、しかも障害程度は細胞増殖を許さない程強い。これにさらに第 3 回目の照射が同様に作用し、抑制作用が更に強まる。これが一時照射においては、細胞の破壊作用は強力に行なわれるが、細胞の回復機転への放射線作用というものはない。こうして分割照射の方が一時照射より抑制作用が強く現われる結果になるのではないかと考えられる。

近時、Elkind³⁶⁾³⁷⁾、Lajtha et al³⁸⁾ 等も組織培養を応用して分割照射に関する実験を行ない、1 回の線量を多くすれば、分割回数が少なく総線量が少なくとも、1 回の線量を少なくして総線量を多くした場合よりも大きい最終的效果が得られる事を報告している。

なお、著者の実験で牛血清は常に同一のものを使用する事が不可能であつたので、各対照群が一致した経過をとらなかつたが、分割照射と一時照射の効果比較の場合、同一実験群では牛血清は同一のものを使用したので培養条件は全く同一であり、両者の効果比較に何らの差しつかえないものと考えられる。

第 5 編 全編の総括並びに考按

HeLa 細胞は、1951年 Gey, G.O³⁹⁾、が子宮頸癌患者で急速な致死転帰をとつた患者材料の細片を廻転培養法で培養して確立した純粋細胞株であるが、今日なお悪性を保持している事が確められている⁴⁰⁾。

培養細胞に対する放射線の作用については近時多くの研究をみる^{41)~49)}。そのうち Puck and Marcus⁷⁾ の single cell culture 集落形成を対象とする研究において、X線96r で 1 個の細胞の形成する集落の細胞数は 37% に減少し、100r~200r では生細胞の発育の遷延をみ、600r では増殖器官に影響し数代は植えつがれるが、結局巨細胞を形成するとのべている。

放射線を照射した培養細胞の観察は、実験条件を単純化し、生きた細胞を経日的に観察出来る便はあるが、これはあくまでも細胞に対する放射線の直接作用についての観察であり、生体照射の場合は種々複雑な因子が介入する。Lasnitzki⁵⁰⁾ は放射線の該細胞への直接作用と間接作用の効果をマウス癌について、組織培養と生体内で比較検討を行なつた結果、in vivo での腫瘍細胞の発育に及ぼす放射線の最終的效果の $\frac{1}{3}$ が腫瘍細胞に対

する直接効果で、残りの $\frac{2}{3}$ が個体全体及び腫瘍をとりまく周囲組織に対する作用であると報告している。

著者の HeLa 細胞に対する Co^{60} 照射において、初めに細胞の膨化、巨細胞の出現、胞体及び核において 1~数個の空胞形成をみ、多数の多核細胞が出現し、胞体、核は不整形となり、線維細胞型、Tadpole 型等の奇怪細胞の出現、3 極 4 極分裂、染色体の凝集~散乱等種々の異常分体像の出現をみ、遂に細胞崩壊に至っている。Graham⁵¹⁾⁵⁰⁾⁵³⁾ はこの様な radiation change を目標として、子宮癌患者の放射線照射後、正常粘膜上皮細胞の 70% 以上が radiation change を起している時は予後が良好、60% 以下の時は予後が不良と報告している。

放射線の線質の相違による生物学的効果の比較は、普通 RBE をもつて表わされるが、これは 200KV X 線の効果を基準とする事になっている。電磁線である X 線と γ 線の質の相違は波長の相違にあり、 Co^{60} γ 線は大体 3000KV の X 線に相当するといわれる。一般に電磁線では波長が短くなると RBE は 1 より小となる。すなわち生物学的効果が弱まるといわれている。また RBE は線質のみでなくさらに被照射物によつても異つてくるものである。一般に RBE は障害曲線から求める事が多く、LD₅₀ 及び mean killing time によつて求められているが⁵⁴⁾⁵⁵⁾⁵⁶⁾、著者は HeLa 細胞の増殖曲線の経過を比較する事により、 Co^{60} γ 線と 200KV X 線の生物学的作用を比較検討した。その結果は、500r、1000r においてほぼ同一の生物学的効果を得た。

Coutard のいう遷延分割照射の時間因子により、皮膚血管結合組織の放射線耐性が著しく上昇し、一門全量照射に比し 5~10 倍の大量を経皮的に照射でき、かつまた分割により悪性腫瘍には照射効果の促進が認められるといひ (Nather, Schinz, Samssonow), これが分割照射法の大きな利点とされている⁵⁷⁾。しかしながら、分割因子が「1」より大きいとみなされる悪性細胞でも、分割方法によつて成績が異なるものである事が著者の実験で明らかになつた。すなわち、HeLa 細胞に対する Co^{60} 照射において、分割量が 500r より少ない時は分割因子が「1」より小であり、500r より多い時は「1」より大である。皮膚の分割照射の際、分割線量が小さい程、皮膚耐性の面では有利である⁵⁸⁾⁵⁹⁾。しかし分割線量が一定線量以下になると腫瘍細胞に対する照射効果は相当減弱する事を著者の成績は意味しており、この分割線量が一定値より多い時は照射効果の増大は軽度であり、この意味で皮膚耐性の面と腫瘍に対する照射効果からみた適当な一定分割線量が存在するものと考えられ、著者は

HeLa 細胞において、この一定分割線量が 500r であることを明らかにした。

結 語

1) 塩類緩衝溶液 (BSS液) に Lactalbumin hydrolysate を 0.5%, Yeast extract を 0.1%, Glutamin, Glutamin 酸を添加し、牛血清を $\frac{1}{3}$ の割合で加えた培養液で静置培養した HeLa 細胞に、 Co^{60} 遠隔照射を行ない、隔日に培養液を交換する事により、細胞増殖と形態学的変化の経日的経過を観察した。

2) Co^{60} 300r, 500r, 1000r, 1500r, 2000r, 3000r を照射し、細胞の増殖抑制作用を追求した結果、線量増加につれて著明な抑制効果を認め、500r において抑制曲線はほぼ水平位をたどった。

3) 形態学的変化を経日的に追求した結果、核、核小体の膨大、胞体、核に多数の空胞形成、多核分葉核細胞、異常分裂細胞、奇怪細胞の出現をみ、遂に核崩壊細胞崩壊を起す一連の経過を観察し得た。

4) Co^{60} γ 線と 200KV X線 の生物学的効果の比較を、500r と 1000r において細胞増殖抑制曲線について検討した結果、両者の間に差を殆んど認めなかった。

5) Co^{60} 300r, 1000r, 1500r, 2860r, 3000r の一時照射と分割照射の細胞増殖抑制効果の比較検討をした結果、分割線量が 500r の時は一時照射と分割照射の間の差は認められず、500r より少ない時は一時照射の方が照射効果が著明に大であり、500r より多い時は分割照射の方が照射効果がやや大であつた。すなわち、癌組織分割照射の際、分割線量が一定線量以上の時は、分割照射効果は一時照射効果がやや優るが、分割線量が該線量以下になると、照射効果が一時照射より相当減弱する事が推定される。

文 献

- 1) Abbe, R.: Strahlentherapie, 4: 27, 1914. —
- 2) Wedd & Rauss: The Journ. of path. & Bacteriol., Vol. 3. —
- 3) 榎原賢三: 日産婦誌, 27: 3144, 3399, 3413, 1932. —
- 4) 京極佐市: 日産婦誌, 31: 1912, 2121, 2156, 1936. —
- 5) 高野宏一, 山田正篤: Jap. J. Med. Sc. Biol., 9: 17, 27, 41, 243, 1956. 10: 35, 1957. —
- 6) Miller: Am. J. Obst. & Gynec., 76: 1071, 1958. —
- 7) Puck, T. T. and Marcus, P.L.: J. Exp. Med., 103: 653, 1956. —
- 8) Strageway & Oakley: Proc. Roy. Soc. B., 95: 373, 1924. —
- 9) 泉将: 日放誌, 15: 1132, 1956. —
- 10) Juul & Kemp: Strahlentherapie, 48: 457, 1933. —
- 11) 貴家貞而: 日放誌, 12: 8, 1952. —
- 12) 武田進: 腫瘍細胞 (永井書店), 94, 1956. —
- 13) Upton, A.C., Conte, F.P., Hurst,

- G.S., and Mills, W.A.: Radiation Research, 4: 117, 1956. —
- 14) 岩井正二: 日産婦誌, 10: 619, 1956. —
- 15) Sinclair, Ph. D., and Blackwell, B.S.: Radiation Biology and Cancer, 103, 1958. —
- 16) Glasser, O., Quimby, E.H., Tayler, L.S. and Watherwax, J.L.: Physical Foundation of Radiology. —
- 17) 入江英雄: 日本医事新報, No. 1835, 8, 1959. —
- 18) Regaud, G.L.: Gaz. des hôp. civ. et Milit., 98: 459, 1926. —
- 19) Coutard, H.: Compt. rend. soc. Biol., 86: 1140, 1922. —
- 20) Tschendorf: Klin. Wchnschr., 33: 34, 1933. —
- 21) Zwerg, H.G.: Strahlentherapie, 43: 201, 1932. —
- 22) Pape, R.: Strahlentherapie, 45: 476, 1932. —
- 23) Krönig, B. and Friedrich, W.: Physikalische und biologische Grundlagen der Strahlentherapie. Berlin. 1918. —
- 24) Pape, R.: Strahlentherapie, 45: 461, 1932. —
- 25) Liechti, A.: Radiol. Rundschau, 7: 127, 1938. —
- 26) Gloor, W. and Zuppinger, A.: Strahlentherapie, 40: 438, 1931. —
- 27) Nather, K. and Schinz, H.R.: Mitt. Grenzgeb. Med. u. Chir., 36: 620, 1923. —
- 28) Juul, J.: Acta Radiol., 11: 226, 1930. —
- 29) 宇田豊: 日放誌, 12(11): 52, 1953. —
- 30) 宇田豊: 日放誌, 13(2): 57, 246, 1953. —
- 31) 佐藤次郎: 岡山医誌, 62: 275, 1950. —
- 32) 木村修治: 日放誌, 11(3, 4): 21(5): 14, (6): 28, 1951. —
- 33) 浜崎幸雄: 細胞核の生理と病理 (永井書店), 1954. —
- 34) Mischer, G.: Acta Radiol., 16: 25, 1935. —
- 35) 山本弘毅: 日放誌, 19: 1382, 1959. —
- 36) Elkind, M. M.: Radiology, 74: 529, 1960. —
- 37) Elkind, M. M. & Sutton, H.: Nature, 184: 1293, 1959. —
- 38) Lajtha, L.G., Oliver, R. & Ellis, F.: Brit. J. Radiol., 33: 634, 1960. —
- 39) Gey, G.O., W.D. Coffman & M.T. Kubicek: Cancer Research, 12: 264, 1952. —
- 40) Southam, C.M., Moor, A. E. & Rhoads, C.P.: Science, 125: 158, 1957. —
- 41) Reid, T.R. & Gifford, M.R.: J. Nat. Cancer Inst., 13: 431, 1952. —
- 42) Paterson, E.: Brit. J. Radiol., 15: 257, 1942. —
- 43) Pomerat, C.M., Logie, L.C. Ph. D., and Nakanishi, Y.H. Ph. D.: Irradiation of cells in tissue culture, Radiation Biology and Cancer, 121, 1958. —
- 44) Sanford, K., Earle, W.R., Evans, V., Waltz, H. and Shannon, J.: J. Nat. Cancer Inst., 11: 773, 1951. —
- 45) Pomerat, C.M., Kent, S.P. and Logie, L.C.: Z. Zellforsch., 47: 158, 1957. —
- 46) Pomerat, C. M., Hayflick, L., Fernandes, M.V. and Kent, S. P.: Z. Zellforsch., 47: 245, 1958. —
- 47) 菅本一三: 産婦人科の進歩, 12: 365, 1960. —
- 48) 野嶽幸雄外: 産婦人科の実際, 8: 55, 1959. —
- 49) 渡辺信一: 産婦人科の実際, 9: 182, 1960. —
- 50) Lasnitzki, I.: Brit. J. Radiol., 18: 214, 1945. —
- 51) Graham, R.M. and Graham, J.B.: Cancer, 6: 215, 1953. —
- 52) Graham, R.M. and Goldie, K.R.: Cancer, 8: 71, 1965. —
- 53) Graham, R. M. and Graham, J.B.: Cancer, 8: 59, 1955. —
- 54) Kohn, H.I. & Gunter, S.E.: Radiation Res., 5: 674, 1956. —
- 55) Kohn, H.I. & Kallman, R. F.: Radiation Res., 5: 693, 1956. —
- 56) Litchfield, J.R. & Wilcoxon, F.: J. Pharmacol. Exper. Ther., 96: 99, 1949. —
- 57) 橋上正: 日放誌, 18: 1269, 1958. —
- 58) Halbelstaedter, L. & Simons, A.: Strahlentherapie, 15: 65, 1923. —
- 59) Holfelder: The Biologic Fundamentals of Radiation Therapy, 279, 1941.

(No. 1423 昭36・7・7 受付)