

## 子宮腺癌, 扁平上皮癌細胞スフェロイドの放射線 線量生存率関係の相違について

東京慈恵会医科大学産婦人科学教室

佐々木 寛 北村 隆 豊泉 長  
岩田 正晴 蜂屋 祥一

### Radiation-induced Differential Response Uterine Adeno and Squamous Cell Carcinoma Spheroids in Dose-survival Relationships

Hiroshi SASAKI, Takashi KITAMURA, Takeshi TOYOIZUMI,  
Masaharu IWATA and Shoichi HACHIYA

*Department of Obstetrics and Gynecology, Jikei University School of Medicine, Tokyo*

**概要** ヒト子宮腺癌, 扁平上皮癌 Spheroid の特徴を線量生存率関係から, 単層培養細胞と比較して検討を行った。

HEC-59, SKG-3a 細胞を使用。Spheroid は Yuhas の方法に基づいて作製された。

単層培養状態では,  $D_0$ ,  $D_q$ ,  $n$  値は, HEC-59 ( $D_0=1.6\text{Gy}$ ,  $D_q=0.6\text{Gy}$ ,  $n=1.5$ ), SKG-3a ( $D_0=1.3\text{Gy}$ ,  $D_q=0.4\text{Gy}$ ,  $n=1.4$ ) であった。

Spheroid 状態では, 生存率曲線は SKG-3a で 2 相性となった。Spheroid の直径が  $300\mu\text{m}$  では, HEC-59 で 2 相目が殆ど認められないが, SKG-3a では  $6\text{Gy}$  の線量をこえた時点から明らかな 2 相性となった。また, 低線量域では単層培養に比べ, 生存率曲線上の肩が大きくなり, この現象は両細胞に見られた。

以上の点から, Spheroid は単層培養状態では見られない, 固形腫瘍の特徴を備えており放射線効果を検討するうえで有用な手段と示唆された。

**Synopsis** Radiation-induced dose-survival relationships of human uterine adeno and squamous carcinoma cells grown as spheroid were studied, comparing them with monolayer cells.

HEC-59 and SKG-3a cell lines were used. The spheroids were produced by Yuhas's method.

In monolayer culture,  $D_0$ ,  $D_q$  and  $n$  values in the Hit-theory were as follows: HEC-59 ( $D_0=1.6\text{Gy}$ ,  $D_q=0.6\text{Gy}$ ,  $n=1.5$ ) and SKG-3a ( $D_0=1.3\text{Gy}$ ,  $D_q=0.4\text{Gy}$ ,  $n=1.4$ ).

Survival curves of both cell lines as spheroids demonstrated biphasic curves after acute irradiation. HEC-59 cells grown as spheroids  $300\mu\text{m}$  in diameter did not have a great second component. SKG-3a cell, however, did apparently have a large amount of the second component when a  $6\text{Gy}$  dose was exceeded. The shoulder in the dose-survival curves of both cells grown as spheroids became greater than monolayer cells up to  $3\text{Gy}$  dose.

It was therefore proven that spheroids possess similar characteristics to solid tumors. This suggests that spheroids are useful in studying radiation-induced effects in solid tumors.

**Key words:** Uterine cancer • Radioresistance • Spheroid

### 緒 言

固形腫瘍を構成する腫瘍細胞は総べて均一の細胞の集まりではなく, 栄養, 酸素濃度の違い, 細胞周期の変化など様々な相違を持ち集団を成している。Sutherland et al. (1971年) はスピナーカルチャーを用いて V-79細胞が, 多細胞球状体 (Multicellular tumor spheroid) を構成する事を

報告した<sup>9)</sup>。その後, 諸家の研究により, この Spheroid が腫瘍性腫瘍コード構造における細胞増殖動態や生理学的特徴を備えており, in vitro における固形腫瘍モデルとして有用であることが認められてきた<sup>7)10)12)</sup>。さらにまた, Spheroid の応用として, ヒト腫瘍細胞の Spheroid を用い, 臨床上の放射線治療や化学療法での腫瘍細胞の生物学

が検討されてきている<sup>5)8)13)</sup>。

そこで、子宮腺癌と扁平上皮癌のヒト培養株を用い、放射線に対する、単層培養及び、Spheroidでの照射効果の比較を行うことにより、子宮腺癌、扁平上皮癌 Spheroid が固形腫瘍のどのような特徴を備えているか、また腺癌扁平上皮癌で差を示すかについて検討を行うものである。

## 方 法

### (a) 培養細胞

ヒト子宮頸部扁平上皮癌細胞株 (SKG-3a, 慶応大学・野沢志朗先生御供与)<sup>1)</sup>及びヒト子宮体部腺癌細胞株 (HEC-59, 北里大学・蔵本博行先生御供与) を使用した。

両細胞とも、MEM eagle 培養液 (日水製, 7% NaHCO<sub>3</sub>, 5% Glutamine 加) 加10% Fetal Calf Serum (Flow 製) 中で培養。培養液交換は週1回行い、5% CO<sub>2</sub> incubator 中で維持した。

### (b) Multicellular Tumor Spheroid 作製法

Yuhas の方法に基づき<sup>11)</sup>, 1% agarose で表面をコーティングした10cm 径 dish 中に、ガラスビーズで culture flasko からはがし、得た細胞浮遊液を適量まき、CO<sub>2</sub> incubator 中で培養。3日後、この細胞浮遊液を2ml ずつ10ml 新鮮培養液中にまき培養。培養液は5ml ずつ週2回交換。Spheroid の大きさが直径300 $\mu$ m に達した時点で実験に使用した。

### (c) 増殖曲線測定法

単層培養細胞：対数増殖期の細胞をトリプシン処理 (0.25%トリプシン1ml, 37°C) し、単細胞浮遊液を得る。この時、SKG-3a ではトリプシン処理時間は6分間、HEC-59では4分間行い。処理後、直ちに新鮮培養液10ml を加え、pipetting を行い単細胞浮遊液とする。位相差顕微鏡下で単細胞を確認した後、10<sup>5</sup>個を6cm 径 culture dish 中の8ml 新鮮培養液中にまく。その後 CO<sub>2</sub> incubator 中で培養し、24時間ごとに dish を2枚ずつ取りだしトリプシン処理し単細胞浮遊液とした後、クールターカウンター (クールター製) で細胞数を測定する。これにより増殖曲線を求めた。

Spheroid: Spheroid の直径が300 $\mu$ m に達した時点で、stock dish からパスツールピペットを用

いてひろい、10cm 径 Agarose coated plate 中の10ml 新鮮培養液中に移す。約半日~1日間培養後、24well Plate (corster 製) の各 well 中に一つずつ Spheroid を移す。各 well には1ml の培養液があり3日ごとに0.5ml ずつ培地交換を行う。

暗視野実体顕微鏡を用い、接眼レンズ(10倍率)下のマイクロメーターにより、40倍対物レンズ下で24well 中の各々の Spheroid の直径を測定する。直径の1unit は25 $\mu$ m を表わす。この直径の測定から Spheroid の増殖曲線を求めた。

### (d) 線量生存率関係の測定法

単層培養細胞：対数増殖期細胞をトリプシン処理により単細胞浮遊液とし、culture flasko (Falcon 製) に適当数の細胞をまく。12時間後、放射線照射を行い、CO<sub>2</sub> incubator 中で培養。培地交換は、10日ごとに行い。SKG-3a は3週間、HEC-59 は2週間の培養後、1%メチレンブルーで染色し、コロニー数を算出し、コロニー形成分析を行い、線量生存率曲線を求めた。

Spheroid: 300 $\mu$ m 径の Spheroid を1群50個ずつ放射線照射し、直ちにトリプシン処理後、pipetting を行い単細胞浮遊液を得る。その後、適当数の細胞を6cm 径 culture dish (8ml 培養液) 中にまき、CO<sub>2</sub> incubator 中で培養し、コロニー形成率を測定して、線量生存率曲線を求めた。

### (e) 放射線照射法

4 Mev Liniac により、200rad/min. FSD 100cm Field 20 $\times$ 20cm, 室温中でX線照射。

単層培養細胞は37°C, 5ml 培養液の入った密栓された culture flasko 中で1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8Gray の線量を照射。

Spheroid では、agarose coated culture tube (tube はプラスチック製10ml 用スピッツ Lux 製) 内37°C, 3ml 培養液中に Spheroid を各20~50個入れ、密栓し室温中でX線照射。照射線量は2, 4, 6, 8, 10, 12, 14Gray であった。

## 成 績

図1は単層培養状態の HEC-59, SKG-3a 細胞の増殖曲線である。増殖速度は、対数増殖期ではほぼ同じであり、doubling time は HEC-59 で24 hr., SKG-3a で26hr. である。プラトー相では

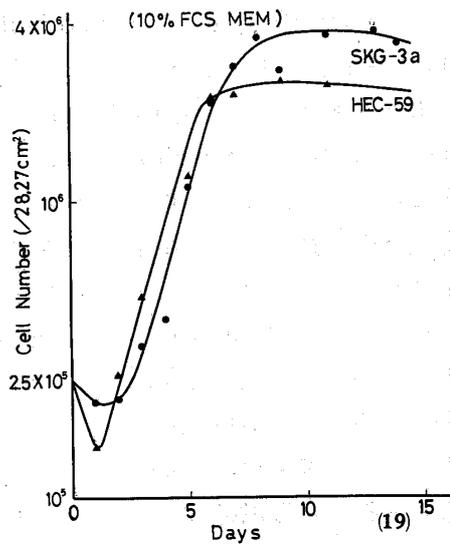


図1 Growth curves of monolayer cells

SKG-3aはHEC-59細胞より多くの細胞数でとまる。この両細胞に対数増殖期で放射線の単回急性照射を行い、線量-生存率関係を求める。図2に示す如く、hit theoryに基づいて、 $D_0$ 、 $Dq$ 、 $n$ 値を求めると、HEC-59では $D_0=1.6\text{Gy}$ 、 $Dq=0.6\text{Gy}$ 、 $n=1.5$ 、SKG-3aでは $D_0=1.3\text{Gy}$ 、 $Dq=0.4\text{Gy}$ 、 $n=1.4$ であった。両細胞間には $D_0$ 、 $Dq$ 値ともMonolayerの状態では差が認められた。これら両細胞をSpheroidにし、増殖を測定すると両細胞とも直径 $600\mu\text{m}$ 位まではほぼ一定の増殖速度で大きくなる(図4)。図3は直径 $500\mu\text{m}$ 前後の両細胞のSpheroidの断面組織像である。Spheroidの構造は中心にNecrosisの部、その外層に生細胞の層が存在するが、SKG-3a(扁平上皮癌)では生細胞層の厚さは $130\mu\text{m}$ 、HEC-59(腺癌)では $165\mu\text{m}$ であり、生細胞の厚さがHEC-59では厚く、壊死部が

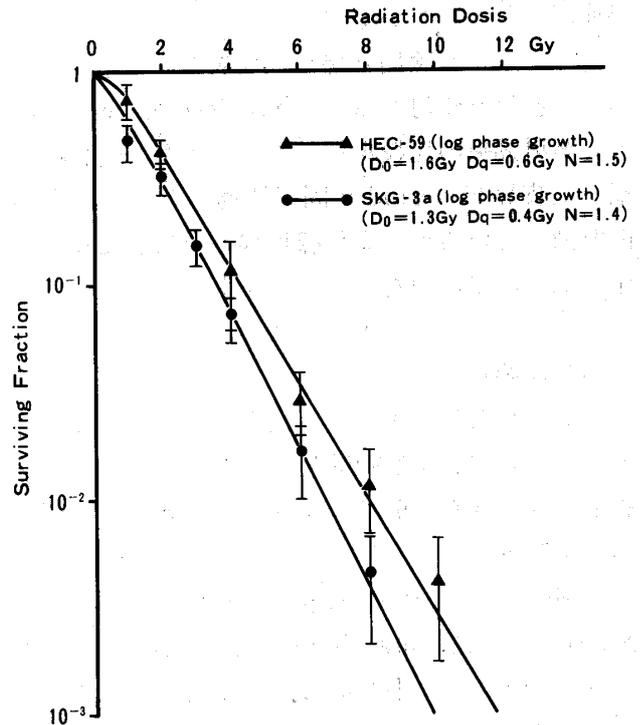


図2 Dose response curves of monolayer cultured SKG-3a and HEC-59 cells

少ない。直径 $300\mu\text{m}$ のHEC-59、SKG-3a Spheroidに放射線を急性照射し生存率曲線を求める。図5は点線がmonolayerの生存率曲線、実線がSpheroidのものである。低線量域ではSpheroidの生存率曲線上の肩はmonolayerの肩より両細胞とも大きい。6Gyを超える時点よりSKG-3a Spheroidは、HEC-59 Spheroidより生存率の低下が少なくなり、2相性の生存率曲線を示した。一方、HEC-59ではmonolayerの $D_0$ とほぼ同じ $D_0$ で生存率が低下した。このため6Gy以上の線量では $300\mu\text{m}$ の細胞は扁平上皮癌SKG-3a細胞が腺

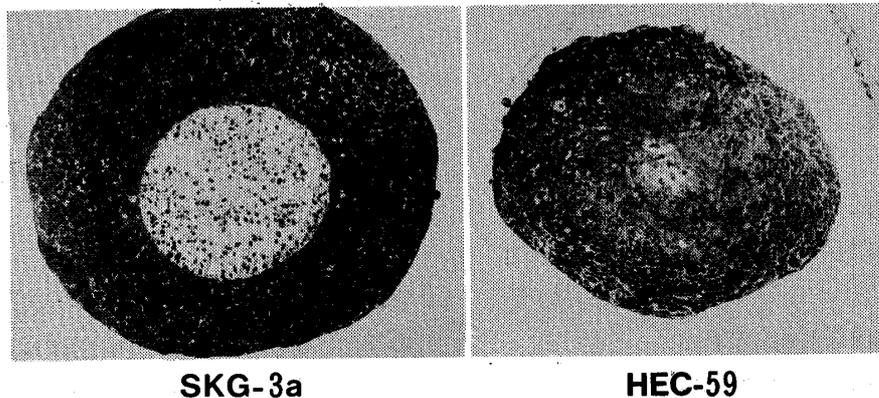


図3

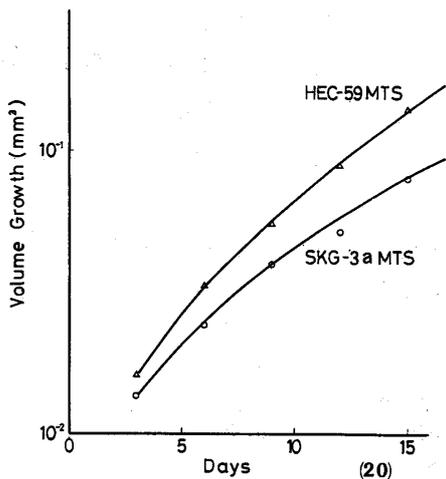


図4 Growth curves of spheroids

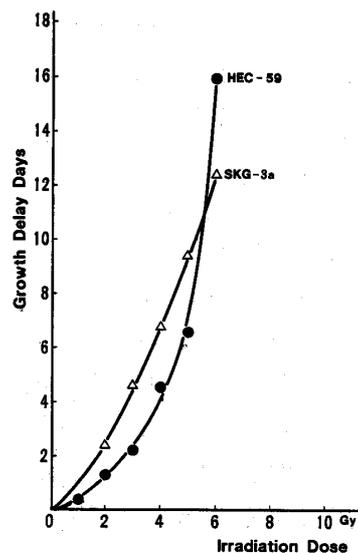


図6 Growth delay days of spheroids after single dose irradiation

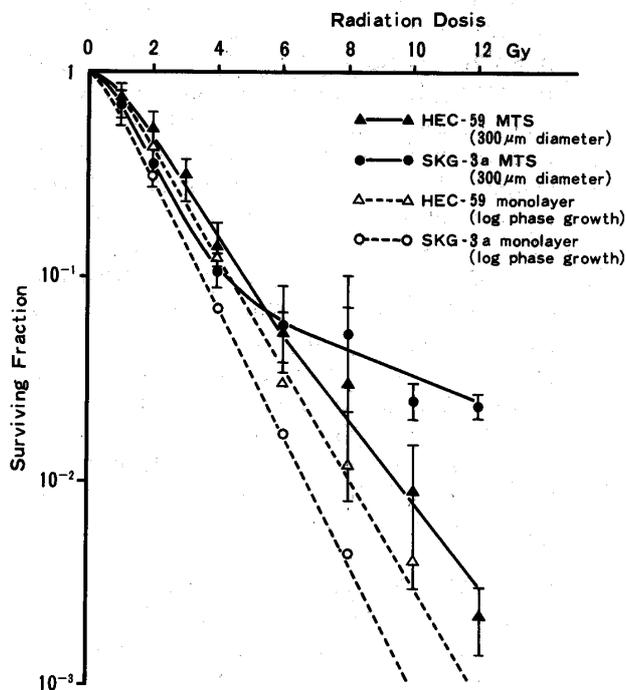


図5 Dose response curves of SKG-3a and HEC-59 in spheroid and monolayer culture

癌 HEC-59細胞より放射線抵抗性を示した。Growth delay の検討では、放射線線量が6Gyに達する時点では腺癌で Growth delay が小さく放射線抵抗性であったが、6Gy の時点で扁平上皮癌と同じ増殖遅延度であり、以後線量の増加に伴い扁平上皮癌でむしろ増殖遅延が少なくなり、放射線抵抗性が逆転した。

考 察

Spheroid の構造は、中心に壊死部、外層になるにしたがい非増殖群、増殖群細胞により構成され

ている。<sup>3</sup>HTdR の Autoradiography で増殖層を検討した報告<sup>3)</sup>では、細胞の種類によりかなり異なることが認められている。本研究で用いた HEC-59, SKG-3a 細胞も、やはり差が見られ、外層から壊死部までの生細胞の厚さは、SKG-3a で 130 $\mu$ m, HEC-59で165 $\mu$ mであった。このことは、SKG-3a 扁平上皮癌で、酸素、栄養の浸透度が浅いことが示唆され、130 $\mu$ m の半径を持つた Spheroid ですでに、十分な hypoxic fraction が存在するものと考えられる。一方、腺癌(HEC-59) Spheroid では最外層から165 $\mu$ m で壊死が出現することから半径165 $\mu$ m の Spheroid では hypoxic fraction が充分存在しないものと考えられる。事実、両細胞の300 $\mu$ m の直径をもつた Spheroid では扁平上皮癌 (SKG-3a) の生存率曲線は 2 相性を示したが、腺癌 (HEC-59) の生存率曲線は 1 相性であった。2 相性の原因としては、酸素効果での oxygen enhancement ratio (以下 OER と略) が約 3 倍であることから、扁平上皮癌 Spheroid でみられる 2 相性は hypoxic element によるものと考えられ、約 20% 前後の hypoxic fraction が 300 $\mu$ m の直径をもつた SKG-3a Spheroid で存在するものと認められた。一方、腺癌 Spheroid は 300 $\mu$ m の直径では殆ど hypoxic fraction は存在しないことが示唆された。そこで、この条件で growth delay を検討するとやはり 6Gy すなわち生存率曲

線上 hypoxic element が生存率曲線の主体を成してくる放射線量を超えた時点から, Spheroid の増殖遅延が扁平上皮癌で小さくなり, むしろ腺癌の方が遅延が長くなり扁平上皮癌 Spheroid が放射線抵抗性となつた。この現象は hypoxic fraction の量により放射線抵抗性が変化することを示している。このように, Spheroid を用いることにより hypoxic element の検討を比較的正確に且つ簡単にできる。次に, 増殖期細胞について考えてみる。両細胞も, 単層培養状態では対数増殖期にはほぼ似た増殖速度をとるが, Spheroid になると異なつた増殖速度を示し, SKG-3a が HEC-59 に比べ遅い成長速度となる。この理由として, 細胞同士の3次元結合に伴う物質・酸素の要求量, 消費量の違いが関与するものと考えられる。すなわち, Spheroid の断面図から明らかに SKG-3a では necrosis が大きく存在し, 生細胞の厚さが薄い点から, 酸素, 栄養物質が中に入り難いことが容易に推測される。したがって, 同じ大きさの Spheroid でも, HEC-59 と SKG-3a の成長速度が異なる原因としては, 増殖層の厚さに差があるためと考えられる。このことは, Spheroid の3次元構造に基づくものであり, 単層培養細胞では得られない特徴の一つである。この3次元細胞間の結合がもたらす効果は, 単に生存率曲線上の hypoxic fraction の出現だけではない。放射線量が2Gy 前後での生存率曲線の変化に注目してみると図5に見られるように肩が大きくなり, 放射線抵抗性となつている。この現象は, SKG-3a, HEC-59とも存在している。Hypoxic element 20% で OER=3として SKG-3a での Spheroid の理論曲線を単層培養細胞の曲線から求めてみると, 明らかに実測の Spheroid の生存率曲線と異なり, 2Gy 前後の肩の大きさが単に hypoxic element の影響に基づくものでないことがわかる。この現象は Durand et al.<sup>4)6)</sup>により contact effect として報告されているが, 細胞の種類によつて出現するものとしなないものがあるといわれている。本研究に用いた HEC-59, SKG-3a 細胞ともこの contact effect は存在し, 細胞間の結合性から生じる特異な現象を検討する上で両細胞の Spheroid

は, 非常に有用なモデルと考えられた。

以上の如く, HEC-59, SKG-3a 細胞の Spheroid を用いることは, 放射線抵抗性因子を解析する上で有用な手段であると示唆された。

### 結 語

HEC-59, SKG-3a, Spheroid は子宮腺癌の放射線抵抗性を検討するための良いモデルである。

### 文 献

1. 秋葉琢磨: ヒト子宮頸部扁平上皮癌細胞株 (SKG-3a) の樹立とその性状. 慶応医学, 60: 1, 1983.
2. 森沢孝行, 蔵本博行, 加藤良樹, 浜野美恵子, 素宏樹, 下田隆夫, 新井正夫: 新しい子宮体癌 HEC-59 株の樹立とホルモン応答能. 日産婦, 関東連合地方部会会報, 34: 110, 1981.
3. 佐々木寛, 大村峰夫, 坪井透, 土田正祐, 豊泉長, 岩田正晴: 人癌細胞 spheroid の放射線感受性. 日産婦東京会誌, 32: 175, 1983.
4. Durand, R.E. and Sutherland, R.E.: Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. Experimental Cell Research, 71: 75, 1972.
5. Durand, R.E.: Repair during multifraction exposures: Spheroids versus monolayers. Br. J. Cancer, 49(Suppl.): 203, 1984.
6. Hill, R.P.: The effect of intercellular contact on the radiation sensitivity of KHT sarcoma cells. Radiation Res., 77: 182, 1972.
7. Sasaki, T. and Sakka, M.: Implications of thymidine labelling index in the growth kinetics of human solid tumors. Gann, 72: 181, 1981.
8. Sasaki, T., Yamamoto, M. and Kuwahara, K.: Lethal effect of bleomycin and peplomycin on HeLa cells in multicell tumor spheroids. Cancer Res., 44: 1374, 1984.
9. Sutherland, R.M., McCredie, J.A. and Inch, W.R.: Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. J. Nat. Cancer Res., 37: 3639, 1977.
10. Sutherland, R.M. and Durand, R.E.: Radiation response of multicell spheroids. An in vitro tumor model. Curr. Top. Radiat. Res., 11: 87, 1976.
11. Yuhas, J.M., Li, M.P., Martinez, A.O. and Ladman, A.U.: A simplified method for productin and growth of multicellular tumor spheroids. Cancer Res., 37: 3639, 1977.
12. Yuhas, J.M. and Li, A.P.: Growth fraction as the major determinant of multicellular tumor spheroid growth rates. Cancer Res., 38: 1528, 1978.
13. Withers, H.R.: The four R's of radiotherapy. Adv. Radiat. Biol., 5: 241, 1975.

(No. 5785 昭60・7・10受付)