放射線治療における細胞生物学の役割, (I)

低 LET 放射線による細胞の損傷と回復

(放射線医学総合研究所) 坪 井 篤

細胞生物学は放射線によるガン治療を行う場合の基礎として重要な役割を果たしている。本稿では、細胞の放射線致死効果、細胞の放射線感受性、酸素効果、細胞の放射線損傷とその回復および細胞の高温処理効果、特に低 LET 放射線による効果等について述べる。

I. はじめに

悪性腫瘍(ガン)疾病に対する放射線治療技術は近年著しい進歩を遂げている。それは放射線の物理学的研究の進展を初めとし、放射線発生器や加速器の開発研究に負うところが大きいと考えられているが、放射線生物学の進歩に依存していることも忘れてはならないであろう。もちろん、放射線生物学の研究はガン治療のみを目的としてなされているのではない。それは放射線と生命現象のかかわりあいを研究する学問であり、その成果は医学だけでなく遺伝学や農学等の進展に寄与していることはその歴史が証明している。

本稿においては、放射線治療に重要な、しかも放射線生物学にとっても重要なテーマである、細胞の放射線致死に関する線量効果関係を中心に、細胞の放射線感受性、感受性の修飾因子である酸素効果、細胞の放射線損傷とその回復および細胞の高温処理効果について順を追って解説する。なお、ここで述べる放射線とは低LET(Linear Energy Transfer)*放射線であるX線や γ 線を意味する。それは放射線による生物効果の基準がX線や γ 線の効果に依存していることによる。また、放射線生物学で取り扱う細胞はファージを含むバクテリアから高等生物の細胞まで含むけれども、放射線による細胞と腫瘍治療との関連性について述べるため、ここでいう細胞は人間または実験動物(マウス、ラット、ハムスター等)の正常および腫瘍組織由来の培養細胞に限定した。

II. Single Cell の培養

動物の体内における組織や細胞は複雑な統御機構のもとで生活している。そのような抑制から組織や細胞を離して生活させようとする試みは前世紀の終り頃から始められた。今世紀に入って、ガラスビンの中で細胞を増殖させる実験系が開発された。しかし、1950年

頃までは主に組織片を用いて、その培養が行われて来た。この時期に、細胞培養の基本的条件は確立された。組織片からトリプシン等の蛋白分解酵素により、1個1個の細胞に分離して培養する、いわゆる single cell の培養は1950年以降に開発された。このような細胞培養法はいまや医学生物学のあらゆる分野に利用されている⁽¹⁾。例えば HeLa(ヒーラ)細胞はアメリカの黒人の子宮ガン組織から分離された1個の細胞を増殖させたものであり、現在、20年以上の歴史を持ってその細胞は世界各国の研究室で維持され増殖されている。HeLa のように無限増殖能を獲得した細胞は株細胞と呼ばれている。株細胞はシャーレの中で増殖力が強く、少数の細胞を培養してもよく増殖してコロニーをつくる(写真1(a))。そのコロニー形成率は植えた細胞数の60~80%である。これに対して生体から分離したばかりの細胞はそのコロニー形成率が5%以下である。株細胞のコロニー形成法の確立は、細胞の分裂能を定量的に調べることを可能にした点で極めて重要である。

III. 放射線による細胞の致死効果

放射線照射による細胞死は2通りある。1つは大線量(10 kR 以上)を照射された場合であり、分裂せずに細胞が死ぬことで、これは“間期死”と呼ばれている。もう1つは比較的低い線量の照射を受けた場合に生ずるもので、照射後1回以上細胞分裂を行なった後に細胞が死ぬことで、これは“分裂死”と呼ばれている。

写真1(b)は照射した細胞のコロニーを示したが、非常に小さなコロニーが認められる。これは照射後1~

Role of Cell Biology for Radiotherapy, (I), Damage and its recovery of mammalian cells by low LET radiation, Atsushi TSUBOI.

(1981年 8月6日 受理)

* 放射線の飛跡の単位長さあたりに付与されるエネルギー。通常 keV/ μ m で表わす。

(a) 非照射細胞のコロニー

(b) 800 rad 照射した細胞のコロニー

写真 1 HeLa 細胞のコロニー

2 回しか分裂しない細胞で、このようなコロニーは照射により分裂死した細胞であり生残率には入れない。細胞のコロニー形成率と放射線の線量効果関係を最初に示したのはコロラド大学の Puck らである。彼らは HeLa 細胞の single cell 培養法をいち早く確立し、細胞の生残率と放射線との関係を求めて 1956 年に発表した⁴⁾。細胞の生残率はシャーレに植えた細胞数と、その細胞を照射後そこに生き残った細胞のコロニー数との比を算出し、その値を非照射細胞のコロニー形成率で補正することにより求める。各線量ごとにその生残率を片対数のグラフにプロットすると第 1 図のような曲線が得られる。この曲線は高線量域で直線性を示す点の特徴である。図に示したが、細胞の平均致死線量

がこの直線部分から求められる。平均致死線量は一般に D_0 と呼ばれている。そして、それは直線部の傾斜を表わしている。曲線部分、つまり肩の大きさを表わす線量は D_q と呼ばれ、直線部分を外挿して横軸と交叉した線量である。肩の大きさは後で述べる細胞の放射線損傷の回復能を表わすといわれている。直線部分の外挿が縦軸と交叉した値を n 値と呼び、培養細胞では大半が 1 以上である。いま、細胞の放射線死に関するターゲットがあると仮定すると、 n 値が 1 以上ということは、少なくとも one bit 以上放射線がターゲットに当たらないと細胞の放射線死はあり得ないという考え方が成り立つ。

このように細胞の線量効果関係が得られたことは哺乳類細胞の放射線死の平均致死線量の算出を可能にし、さらに、細胞死の機構を知る手がかりを提供している点で重要な意味を持っている。さらに、株細胞のような無限増殖細胞系の線量効果関係は、ガン細胞という生体内で無限に増殖する細胞の放射線治療に無関係でありえない。

IV. 細胞の放射線感受性の変動

同じ量の放射線を照射された細胞であっても、細胞の状態や種類によって、その生物学的効果が異なって現われる。これは細胞の放射線感受性が異なることによって生ずるものと考えられている。いま、培養細胞の放射線死に関する感受性を調べてみると、それらの細胞がガン組織に由来しようが、正常組織に由来しようが、その平均致死線量は 80~250 rad の範囲に入ってしまう。バクテリアの感受性に比べれば、その変動は非常に小さい。感受性の変動の大きさは小さくと

第 1 図 HeLa 細胞の線量効果曲線
(Puck の報告⁴⁾より)

も、細胞の分裂期と次の分裂期との間に、放射線感受性の違い(細胞放射線感受性の細胞周期依存性, age-response)があることが見出されている⁽⁵⁾。

細胞の分裂期から次の分裂期までの時間を“世代時間”と呼び、細胞の種類によって異なるが約10~30hである。この間を“間期”と呼び、DNAが2倍になった(S期と呼ぶ)後に細胞は2つに分裂する。分裂期とS期の間にはDNAを合成する準備期間があり、これはG₁期と呼ばれる。S期の後に分裂期(M期と呼ぶ)が来るが、このS期とM期の間をG₂期と呼ぶ。このM期、G₁期、S期、G₂期の各時期において細胞の生残率は2~4倍の変動を示す(第2図)。

第2図 HeLa細胞の細胞周期における放射線感受性の変化(寺島の報告⁽⁵⁾より)

さて、ガン細胞の放射線感受性は生体内でもシャーレの中でも同じなのだろうか。この疑問は照射されたガン組織から細胞を取り出してコロニーをつくらせれば、簡単に解決するわけであるが、現実には、すでに述べたように、生体から取り出したばかりの細胞はコロニー形成率が低く、生体にあるガン細胞の放射線感受性を求めることは極めて難しい。それでも、実験腫瘍の中にはコロニー形成率の高い腫瘍細胞がいくつか分離されている。著者もネズミの腹水腫瘍からコロニー形成率の高い細胞の分離に成功し⁽⁴⁾、次のような実験を行なった。すなわち、この細胞をネズミに移植して増殖させた後ネズミを照射し、照射後ただちに細胞を取り出してコロニー形成能を検定し、その線量効果関係を求めた(第3図)⁽⁶⁾。カーブAは細胞移植後4日目のもので、そのD₀は310radであった。カーブBは細胞移植後10~12日目のもので、そのD₀は510radである。この結果はガン細胞の放射線感受性が生体内において放射線抵抗性になること、およびガン細胞の増殖期により変動することを証明している。この事実は固形腫瘍(EMT-6細胞)でも観察されている⁽⁶⁾。

(A): 細胞移植後4日目, (B): 細胞移植後10~12日目

第3図 TMT-2腹水ガン細胞の線量効果曲線

ガン細胞が生体内でなぜ放射線抵抗性となるか。一般的に考察されていることは酸素供給の不足による低酸素性ガン細胞の出現によるものと考えられている。特に、固形腫瘍の内部には血管が十分に届かない部分の存在が知られている。酸素効果だけで生体内のガン細胞の放射線抵抗性を論じてよいかはどうか別にして、生体内における低酸素性ガン細胞の存在は明らかであり、その細胞が放射線抵抗性になることも事実である。

V. 酸素効果

酸素濃度が低下すると細胞の放射線感受性が低下するという現象、つまり酸素効果は比較的古くから知られていた。紙数の関係から、その機構は省き、ここではX線による細胞の致死効果と酸素効果との関係について述べる。

細胞は一般に空気95%と炭酸ガス5%の条件下で増殖している。この条件下における細胞の線量効果関係と、チッ素95%と炭酸ガス5%の条件下における線量効果関係を比較すると第4図のようになる。好気的条件(空気95%)におけるD₀は120radで、嫌気的条件下におけるD₀は360radである。好気的条件下のD₀に対する嫌気的条件下のD₀の比率は酸素効果比(OER, Oxygen Enhancement Ratio)と呼ばれているが、この場合のOERは3である。細胞のX線に関するOERは細胞の種類に関係なく試験管内では2.5~3である。OERがこの範囲の値をとる時、細胞環境の酸素分圧は30mmHg以下である⁽⁷⁾。酸素分圧が3mmHg(濃度0.5%)になると、放射線感受性は無酸素と酸素が充分存在する状態との中間を示す。酸素効果は細胞の照射中に有効であり、照射前および後の嫌気条件では酸素効果が見られない。

第4図 好気的および嫌気的条件下における線量効果曲線(Hallの報告より)

Ⅳ. 細胞の放射線損傷とその回復

現在、細胞の放射線損傷(Radiation damage, 放射線障害ともいう)は次の3つに想定されている。

- (1) 致死損傷(Lethal damage)とは、細胞がこの損傷を受けると必ず死に至るもの。
- (2) 亜致死損傷(Sublethal damage)とは、ある時間が経過すると回復可能な傷であり、この損傷が蓄積され続けるとその細胞は致死となると考えられている。
- (3) 潜在的致死損傷(Potentially lethal damage)と呼ばれているものは、細胞の環境が悪くなると回復すると考えられている。

致死損傷については特に解説する必要がないので、ここでは亜致死損傷とその回復について述べる。この現象は2分割照射法によって初めて培養細胞で観察された⁹⁾。すなわち、Elkindらはチャイニーズハムスターの培養細胞の線量効果曲線から992 radの生残率が0.00186であることを求めた(第5図)。この992 radの線量を第1回目487 radと第2回目505 radに分割照射して、細胞の生残率が求められた。分割間隔は1~24 hまでとられた。第5図に示すように、分割間隔が3 hまで細胞の生残率は増加し続ける。この増加は第1回照射の487 radによる損傷が回復されることにより生じたものと解釈された。その後、生残率はやや減少し、分割時間が12 h以上になると一定となり、その値は487 rad照射の生残率と505 radの生残率の積に等しくなっている。このことは放射線による亜致死損傷の回復が12 h以上かかるものと考えられた。これと同様の現象がその後、他の動物細胞を初めガン細胞のX線

第5図 放射線による亜致死損傷からの回復(Elkindの報告⁹⁾より)

照射時にも観察されている。

潜在的損傷とその回復は、蛋白合成阻害剤を加えて放射線を照射すると細胞の生残率が上昇することから提唱された¹⁰⁾。その後、培養細胞の増殖後期やガン細胞にもこの現象が観察されている¹¹⁾。潜在的放射線損傷の回復は、1回の放射線照射後の細胞の生残率の増加によって調べることができる。このようにX線等の照射後に細胞が回復能を現わすことは、ガン治療上配慮しなければならないことである。

Ⅶ. 高温処理効果

放射線損傷やその回復の修飾因子の一つであり、ガン治療にも応用されつつある細胞の高温処理効果(ハイパーサーミア, hyperthermia)に関する知見について簡単に紹介したい。ハイパーサーミアとは37°C以上の温度処理を細胞に行うことであり、一般には39°Cから46°C程度までの温度が用いられる。43°C以上の温度になると、温度そのものでも強力な殺細胞効果を示すことが知られている。

培養細胞でハイパーサーミアの仕事が始められたのは最近のことである¹²⁾。1972年、Ben-Hurらは41°Cの条件下で細胞にX線を照射すると細胞の放射線死が増強されること、42°Cでは放射線による亜致死損傷の回復が抑制されることを発表して以来、この種の研究が盛んに行われるようになった。『本誌』においてもすでに恒元が嫌気的条件下にある細胞の温度感受性が高いことを紹介している¹³⁾が、その理由が最近 Overgaard

ら⁽¹³⁾により明らかにされた。すなわち、嫌気的条件下で細胞が生活すると、培地中に乳酸が貯留してpHが低下する。そのpHの低下が細胞の温度感受性を高める原因であることを明らかにした(第6図)。つまり、好気的条件下でもpHが低下すれば、細胞の温度感受性は急速に高まる。

第6図 細胞の温度感受性に及ぼすpHの影響(Overgaardの報告⁽¹³⁾より)

ハイパーサーミアにおいて重要なことは熱耐性の出現の問題である。熱耐性はヒートトレランスと呼ばれ、例えば、41°Cで1h細胞を前処理すると43°Cの高温処理における細胞の致死率が低下する現象をいう。これは43°Cの分割処理によっても生ずる。しかし、最近逆処理(ステップダウン)をすると、熱によって効

率よく細胞が殺されることが報告されている。すなわち、43°Cで細胞を処理した後40°Cで処理する方式は、殺細胞効果が高いということである。

Ⅷ. おわりに

われわれが常に実験室で維持している培養細胞の放射線致死効果の基本を簡単に述べたが、ガン治療に関連させるために、記述範囲を温度効果まで拡大させたので、各項目について説明不足の感はまぬがれない。ただ、細胞を用いての実験がガンの放射線治療の基礎としての重要であることを理解して頂ければ幸いである。

—参考文献—

- (1) 中井準之助, 他: “組織培養”, (1976), 朝倉書店。
- (2) PUCK, T. T., et al.: *J. Exper. Med.*, **103**, 653 (1956)。
- (3) 寺島東洋三: “遺伝情報”, 生物物理学講座(I), (1965), 吉岡書店。
- (4) TSUBOI, A., et al.: *In Vitro*, **16**, 600 (1980)。
- (5) OKAMOTO, M., et al.: *Radiat. Res.*, **85**, 597 (1981)。
- (6) ROCKWELL, S., et al.: *ibid.*, **53**, 281 (1973)。
- (7) HALL, E. J.: “*Radiobiology for the Radiobiologist*”, (2nd ed.), (1978), Harber & Row, London。
- (8) ELKIND, M. M., et al.: *Radiat. Res.*, **13**, 556 (1960)。
- (9) PHILIPS, R. A., et al.: *ibid.*, **29**, 413 (1966)。
- (10) LITTLE, J. B., et al.: *Radiology*, **106**, 689 (1978)。
- (11) BEN-HUR, E., et al.: *Radiat. Res.*, **58**, 38 (1974)。
- (12) 恒元 博: 原子力誌, **21**(11), 833 (1979)。
- (13) OVERGAARD, J., et al.: *Radiology*, **123**, 511 (1977)。

第9回 放医研・環境セミナー

環境と人体におけるトリチウム研究の諸問題

主催 放医研, 共催 保健物理学会

とき 12月3日(木), 4日(金)

ところ 放医研講堂(千葉市穴川4-9-1)

12月3日(木)

- トリチウムの発生源 座長(日本分析センター)石原豊秀
 - トリチウムの環境への放出 (放医研)岩倉哲男
 - 重水炉におけるトリチウムの挙動 (動燃)若林 格
 - 再処理におけるトリチウムの挙動 (動燃)北原義久
- トリチウムの環境における挙動 座長(公衆衛生院)山県 登
 - 地球上の水循環と水収支 (筑波大)榎根 勇
 - トリチウム降下量と日本近海のトリチウム (気象研)葛城幸雄
- 大気中の水蒸気トリチウム濃度 座長(茨城県公害セ)小池亮治
 - 雨水・河川水のトリチウム濃度 (動燃)篠原邦彦
 - 日本の地表水のトリチウム濃度 (愛知衛研)茶谷邦男
 - 地下水の動き (放医研)田中霧子
- トリチウムのモニタリングとハンドリング 座長(農業土木試験場)木村重彦
 - 一般環境の低レベル試料の測定 (放医研)櫻田義彦
 - 作業環境モニタリング用機器 (放医研)井上義和
 - トリチウムの安全取扱い技術 (アロカ)佐藤博夫

特別講演

トリチウムの生物学的影響研究の現状と将来

座長(放医研)市川龍資

(茨城大)秋田康一

12月4日(金)

Ⅳ. 環境生態系におけるトリチウムの挙動

座長(放医研)佐伯誠道

- 水生生物系におけるトリチウムの挙動 (東北大)小松賢志
- 陸生生物系におけるトリチウムの挙動 (東北大)猪股つや子
- 植物への取り込みと挙動 (放医研)新井清彦

Ⅴ. 生体への取り込みと体内挙動

座長(九大)高島良正

- トリチウム水の取り込みと生体分布 (京大)上野陽里
- トリチウム代謝の年齢依存性 座長(放医研)河村正一
- トリチウム水から生体構成分子への取り込み (放医研)稲葉次郎
- 有機結合形トリチウムから生体構成分子への取り込み (茨城大)一政祐輔

(放医研)武田 洋

Ⅵ. 線量評価

座長(放医研)伊沢正実

- 一般環境における被曝線量評価 (原研)山口勇吉
- 作業環境における被曝線量評価 (原研)矢部 明
- トリチウムのDosimetryに関する問題点 (放医研)川島勝弘

総合討論

座長(放医研)市川龍資

指定発言者 (日本分析セ)石原豊秀, (茨城県公害セ)小池亮治, (九大)高島良正, (公衆衛生院)山県 登

連絡先 (〒260)千葉市穴川4-9-1

放医研 管理部企画課 (Tel. 0472-51-2111, 内線 210)