ヌードマウス可移植性腎細胞癌による治療実験の研究

第3報：放射線治療実験

	大	西	哲	郎
	増	田	富	士
	仲	田	浄	治
東京慈恵会医科大学泌尿器科学教室	鈴	木	正	泰
	飯	塚	典	男
	町	田	豊	平
東京慈恵会医科大学放射線学教室	望	月	幸	夫

TREATMENT IN ESTABLISHED HUMAN RENAL CELL CARCINOMA HETEROTRANSPLANTED IN NUDE MICE

3. Experimental Treatment with Irradiation

Tetsuro Onishi, Fujio Masuda, Jojiro Nakada, Masayasu Suzuki,

Norio Iizuka and Toyohei Machida

Department of Urology, The Jikei University School of Medicine

(Director: Prof. T. Machida)

Sachio Mochizuki

Department of Radiology, The Jikei University School of Medicine

A study was conducted to evaluate the effects of irradiation against a human renal cell carcinoma serially transplanted to nude mice. (JRC1 and JRC11). Three irradiated doses were given: 10Gy, 20Gy, and 30Gy, delivered from an 8 MeV X-ray linear accelerator.

Histopathological changes of irradiated mice bearing renal cell carcinoma were estimated by the degree of histological degeneration, proposed at National Cancer Research Institute (Shmosato's classification). Histological criteria for evaluation of irradiated effects were classified from grade I to grade IV.

Significant effects were obtained in all irradiated groups except at the dose of 10Gy against JRC1 strains.

On the basis of histopathological evaluation, significant effects (more than grade III degeneration) were obtained only in one strain (at 30Gy against JRC11). The other strains which showed statistically significant effects disclosed hardly any histopathological changes.

The results suggest that there is no correlation between the results obtained in statistical evaluation and histopathological evaluation. The strain of JRC11, which showed more malignancy than the strain of JRC1, had a higher radiosensitivity. This difference of radiosensitivity may be due to the difference in histopathological malignancy (a grade of growth fraction) between JRC1 and JRC11.

Uncertainty still exists at the present time about the place of irradiation in the clinical treatment of renal cell carcinoma. The aim of this study was to discover direct radiosensitivity of renal cell carcinoma serially transplanted to nude mice. There was some radiosensitivity against the groups of renal cell carcinoma which showed high malignancy histopathologically. These results suggest that we should treat renal cell carcinoma with irradiation as an adjuvant to surgical methods or other chemotherapeutic methods.

要旨：ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌株（JRC 1およびJRC 11株）を用いて、実験的に放射線（8 MeV の電子線）の直接的照射効果を推計学上および病理組織学的に検討した。照射線量は、10Gy, 20Gy, 30Gy で、右大腿部皮下に移植された腫瘍に1回局所照射した。

腫瘍増殖曲線より推計学上、放射線の効果をみると、JRC 1株への10Gy 照射群以外すべての治療群で有効であった。しかし、病理組織学的に効果をみると、JRC 11株に対する30Gy 照射群以外、組織学的変性が下里の分類で、grade II 以下の変化しか得られなかった。

従って、推計学上の治療効果と、病理組織学上の治療効果間に差があることが示された。また、JRC 11株の方が、JRC 1株より放射線感受性が高い結果であった。この組織学的差異による放射線感受性の差は、組織学的悪性度のより高い、growth fraction がより大きいことによるものと考えられた。

今回の検討より、腎細胞癌に対する放射線治療も、その適応と方法によって補助療法としての有効性が示唆された。

結 言

腎細胞癌は、早期発見が困難で、診断時すでに遠隔転移を伴う例も多く、かつ手術療法以外、いまだ有効な治療法が確立されていない。現在まで、その治療成績を高めるべく補助療法として、化学療法、放射線療法、その他免疫療法などが行われてきているが、それらの治療効果に関して、さまざまな臨床的検討があるものの、一定の評価が得られるまでに至っていない。

我々は、腎細胞癌に対する補助療法としての放射線治療効果について、臨床成績をすでに報告したが¹⁾、今回は、ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌2株（組織像が異なるJRC 1およびJRC 11株）を用いて、実験的に放射線の直接的照射効果を推計学上および病理組織学的に検討した。

実験材料および方法

実験材料および方法については、第1報²⁾および第2報³⁾に報告したので、今回の実験に直接関係する方法について述べる。

放射線治療実験に用いて腫瘍は、ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌2株（JRC 1およびJRC 11株）で、継代11～12代の確立株である。この腫瘍移植継代生着率は、ほぼ100%である。腫瘍は2mm 角に細切したものを、ヌードマウス右側大腿外側部皮下に移植し、各代とも腫瘍増殖が最も著しい時期、すなわち、移植腫瘍が推測重量100～300mg に達した時点で、放射線照射を行った⁴⁾。放射線照射装置は、本学放射線科治療室の8MeV の電子線を用い、ヌードマウスは5匹を1群として、対照群を含め4群とした。それぞれの群に、10Gy, 20Gy, 30Gy を1回照射した。照射法としては、腫瘍に対し直上からの1方向より局所照射とした。

治療効果判定には、放射線照射後の腫瘍体積変動から、腫瘍増殖曲線を作成し、それと対照群の腫瘍増殖

曲線を基本に比較検討した。また、腫瘍縮少率は、換

算腫瘍重量の比 ($\text{TRW}/\text{CRW} = \frac{\text{Tn}}{\text{To}} / \frac{\text{Cn}}{\text{Co}}$: T ; 治療群,

C ; 対照群, day o と day n) (%) を算出し、測定期間中の最大効果により判定した。そして TRW/CRW 比が42%以下の場合を治療有効(+), 43%以上の場合を無効(-)と判定した⁵⁾。

一方、治療効果の組織学的判定は、第2報³⁾同様、国立がんセンター分類（下里の分類）⁶⁾に準じて、grade I から grade IV に分類し、対照群腫瘍組織に比較して、照射群の組織変性が grade II 以下の軽い障害のものを感受性(-)とし、grade III 以上の強い障害のものを感受性(+)とした。

なお、今回の実験腫瘍移植部位は、放射線のヌードマウスへの障害を最少限にするため、片側大腿部皮下に移植した。そのため、すでに第2報³⁾で報告した側腹部皮下移植法と、今回の大腿部皮下移植法との増殖率の差を知るため、両者の移植部位での増殖率の差もあわせて比較検討した。

結 果

I：腫瘍移植部位の差による増殖曲線の比較

両側腹部皮下移植法と、大腿部皮下移植法での移植部位の差による増殖率の差を検討したが、JRC 1—11株（11代継代株）も、JRC 11—12株（12代継代株）も、それぞれの移植法での増殖率に差はみられなかった（Fig. 1, 2）。この結果から、照射開始時期は、JRC 1株では、腫瘍増殖が著しくなる腫瘍移植後第42日目（第6週後）とし、JRC 11株では、腫瘍移植後第28日目（第4週後）とした。

II：腫瘍増殖曲線よりみた照射効果

JRC 1—11株への10Gy 照射群では、照射後第1週目より対照群に比較して、腫瘍増殖抑制傾向がみられた

Fig. 1 JRC 1-11株の移植部位の差による増殖曲線の比較

Fig. 2 JRC 11-12株の移植部位の差による増殖曲線の比較

Fig. 4 JRC 11-12株に対する放射線治療 (10Gy)

Fig. 3 JRC 1-11株に対する放射線治療 (10Gy)

Fig. 5 JRC 1-11株に対する放射線治療 (20Gy)

が、照射後第3週目の差を除き、対照群に比較して有意差は認められなかった。またその TRW/CRW 比は 45.7%であった (Fig. 3)。

JRC 11-12株への10Gy 照射群では、JRC 1-11株同様、照射後第1週目より対照群に比較して、腫瘍増殖は抑制傾向であるが、照射後第4週目より再増殖傾向がみられた。しかし、照射群は、対照群に比較して、照射後第1週目より実験終了時まで有意に腫瘍増殖抑

制効果がみられ ($p < 0.05$)、TRW/CRW 比は39.6%であった (Fig. 4)。

JRC 1-11株に対する20Gy 照射群では、照射後第2週目以後、実験終了時まで対照群に比較して有意に腫瘍増殖抑制傾向がみられ ($p < 0.05$)、その TRW/CRW 比は15.4%であった (Fig. 5)。

同様に、JRC 11-12株に対する20Gy 照射群では、10Gy 照射群同様、照射後第2週目以後、実験終了時

Fig. 6 JRC 11-12株に対する放射線治療 (20Gy)

Fig. 7 JRC 1-11株に対する放射線治療 (30Gy)

Fig. 8 JRC 11-12株に対する放射線治療 (30Gy)

Table 1 照射線量別抗腫瘍効果
(grade 分類は国立がんセンター分類)

株	照射線量(Gy)	TRW/CRW 比 (%)	組織学的変性 (grade)
JRC 1-11	10	45.7	I
JRC 1-11	20	15.4	II a
JRC 1-11	30	2.3	II a
JRC11-12	10	39.6	I
JRC11-12	20	4.4	II a
JRC11-12	30	2.7	IV a

Fig. 9 JRC 1-11株の対照群の病理組織像 (H-E 染色, ×100)

で対照群に比較して有意に腫瘍増殖抑制傾向がみられ ($p<0.05$), さらに, 実験終了時まで再増殖傾向は認められなかった. また, その TRW/CRW 比は4.4%であった (Fig. 6).

JRC 1-11株に対する30Gy 照射群では, 照射後第3週目以後著明に腫瘍増殖抑制傾向がみられ, 対照群に比較して有意差がみられ ($p<0.05$), その TRW/CRW 比は2.3%であった. 同時に実験終了時には, 腫瘍のほとんど消退が認められた (Fig. 7).

同様に, JRC 11-12株に対する30Gy 照射群では, 10Gy および20Gy 照射群同様, 照射後第2週目以後有意に腫瘍増殖抑制傾向がみられ ($p<0.05$), 実験終了時には, 腫瘍の消退効果がみられ, その TRW/CRW 比は2.7%であった (Fig. 8).

以上の結果, 推計学上 JRC 1 株は放射線照射による腫瘍増殖抑制傾向がみられ, 特に20Gy 以上の照射線量で効果が認められた. また, JRC 11株は, 10Gy 照射で再増殖がみられたものの, 20Gy 以上の照射線量では, 著明な効果がみられた.

III : 病理組織学的所見よりみた治療効果および推

計学上の治療効果との比較

照射実験終了時の腫瘍組織像について, 下里の分類⁶⁾に従って, 同時期の対照群と比較検討し, Fig. 9 ~16), 同時に TRW/CRW 比との比較分析も行った (Table 1). なお, JRC 1と JRC 11株は, 組織像に差があるので各株ごとに所見を記載する.

JRC 1 株の10Gy 照射群の病理組織学的変性は, 対照群の組織像に比較して, 核および胞体の大きな giant cell を認める以外, ほとんど変化なく, grade I

Fig. 10 JRC 1-11株に対する10Gy 照射群の病理組織像 (H-E 染色, $\times 100$)

Fig. 11 JRC 1-11株に対する20Gy 照射群の病理組織像 (H-E 染色, $\times 100$)

Fig. 12 JRC 1-11株に対する30Gy 照射群の病理組織像 (H-E 染色, $\times 100$)

Fig. 13 JRC 11-12株の対照群の病理組織像 (H-E 染色, $\times 100$)

の変化とした (Fig. 9, 10).

20Gy 照射群での病理組織学的変性は、核異型のやや強い giant cell がやや目だつたかに、一部組織の変性を認め、grade IIa とした (Fig. 9, 11).

30Gy 照射群の病理組織学的変性は、20Gy 照射とほぼ同様で、grade IIa とした (Fig. 9, 12).

以上の結果、JRC 1 株に関しては、病理組織学的変性の程度からみれば、10Gy 照射群では、対照群に比較して変性は認められず、20Gy および30Gy 照射群も一部変性はみられるものの、対照群に比較してむしろ異型度の強い細胞が散見される結果であった。一方、推計学上 (TRW/Crw 比) の検討では20Gy 以上の照射群では、すべて42%以下で、治療効果がみられる結果であり、病理組織学上の効果との間に差がみられる結果であった。

JRC 11株では、10Gy 照射群の病理組織学的変化は、対照群の組織像とほとんど変化なく、grade I と判定し

た (Fig. 13, 14).

20Gy 照射群の病理組織学的変化は、一部腫瘍組織構築の破壊は認められるものの、viable な腫瘍細胞も散見され、grade IIa とした (Fig. 13, 15).

30Gy 照射群での病理組織学的変性は、腫瘍組織構築の破壊が強く、viable な腫瘍細胞はまったく認められず、すべて凝固壊死の像を呈しており、grade IV とした (Fig. 13, 16).

以上の結果、JRC 11株に関して、病理組織学的変性の程度からみれば、30Gy 照射群でのみ治療効果が強くみられたが、20Gy 照射群にもかなりの効果がみられはじめていた。一方、推計学上 (TRW/Crw) の検討では、各照射群でそれぞれ42%以下の抗腫瘍効果が認められた結果であり、病理組織学上と推計学上の相関がみられたのは30Gy 照射群のみであった。

病理組織像の異なるこれら2株の放射治療効果を比

Fig. 14 JRC 11-12株に対する10Gy 照射群の病理組織像 (H-E 染色, $\times 100$)

Fig. 15 JRC 11-12株に対する20Gy 照射群の病理組織像 (H-E 染色, $\times 100$)

較すると、肉腫様変性を伴うより悪性度の高い JRC 11 株が JRC 1 株に比較して放射線治療効果が推計学上も、病理組織上も強い結果であった。

また、放射線の副作用をみる上で、すべての実験期間中にヌードマウスの体重変動を観察したが、照射に伴う体重変動はほとんどみられなかった。

考 案

腎細胞癌の手術療法は、他臓器の腫瘍同様か、それ以上に効果的であり、従ってすべての腎細胞癌の第一義的治療として施行されている。しかし、診断時すでに30~40%の症例は遠隔転移を認め⁷⁾、そのため、すべてに手術療法のみで治療することは不可能に近い。従って、手術療法以外に局所療法である放射線療法や、全身療法である化学療法、あるいは免疫療法が施行されている。

腎細胞癌に対する放射線の治療効果については、臨

Fig. 16 JRC 11-12株に対する30Gy 照射群の病理組織像 (H-E 染色, $\times 100$)

床的にはこれまでも論議されてきたが、必ずしも十分な結論は得られていない。むしろ、放射線抵抗性でその効果を否定する意見が多い。この点の検索を深める目的で、実験腫瘍での研究を試みた。

今回の研究を行うに当たっては、すでに継代確立したヒト腎細胞癌2株 (JRC 1, JRC 11株) を用いた。これら2株の特性 (第1報)²⁾、および各種抗癌剤を用いての治療効果 (第2報)³⁾については、すでに報告した如くである。

まず、推計学上の治療効果は、JRC 1株の10Gy 照射群を除くすべての実験系で有効の結果であった。しかし、病理組織学上の抗腫瘍効果をみると、grade III 以上の有効と考えられた例は、JRC 11株に対する30Gy 照射群のみで、その他の例はすべて無効であった。すなわち、この結果は、第2報³⁾の化学療法での結果と同様、推計学上 (腫瘍重量) の治療効果と、病理組織学上の治療効果との差があることが示されたことになる。

この差は、kal ra⁹⁾のいう細胞周期の block と関係あるものと考えられる。つまり、放射線は、DNA 合成期 (S-phase) 後半に感受性が低く、G₁~S 初期および G₂~M 期の腫瘍細胞に感受性があり、すべての腫瘍細胞がこの感受性のある時期に照射を行えば、non repairable で致死傷害となり、推計学上の重量 (容積上) も、病理組織学上の変化も一致した治療効果が得られることになると考えられる。しかし、放射線非感受性の S 期後半の細胞周期の腫瘍細胞も移植腫瘍塊には当然含れ、この期の腫瘍細胞は viable な腫瘍として照射後も残存することが予測され (S recruitment)⁹⁾、このため、推計学上 (容積上) と病理組織学上の治療効果間に相

異を生じたものと考えられる。

このことは、癌に対する局所療法である放射線治療の臨床上の限界を示すことでもある。大部分の癌細胞は感受性があり、急速に消失するとしても、腫瘍塊の一部の癌細胞が抵抗性で残存すれば、たとえ全体として腫瘍の縮小が得られたとしても、再発することが考えられる。

今回の検討で、JRC 11株に対する10Gy照射群では照射後一時下降した増殖曲線の再上昇という現象がみられること (Fig. 4)、同株に対する20Gy照射群で、病理組織に viable な腫瘍細胞が残存していること (Fig. 15) などより、これも観察期間がのびれば、再増殖となることが想像される。このことは、潜在性致死障害修復 (PLD-repair)¹⁰⁾との関係もあり、前述した細胞周期とも関連して、腎細胞癌治療の上で重要となることが示唆された。従って治療のためには、再増殖を完全に阻止する方法が考慮されなければならない。

また、今回の検討で、実験腫瘍株による放射線の感受性に差異が認められたが、これは、病理組織像の差によって放射線感受性に差があることを示すものである。

JRC 1株は slow growth で、組織学的悪性度は grade III、それに対し、JRC 11株は JRC 1株に比較して rapid growth で、しかも組織学的悪性度は grade IV であった。従って、組織学的悪性度が高いものがより放射線感受性が高い結果であった。このような効果の選択性は、放射線生物学と関係がある。つまり、腫瘍の増殖速度は、(1) 細胞世代時間、(2) growth fraction (分裂期にある細胞の割合)、(3) cell loss factor (死ぬ細胞の割合) に大きく左右されるが、細胞の世代時間はほぼ一定であるとされ、growth fraction と cell loss factor が放射線感受性に問題となる。JRC 1株と JRC 11株を比較すると、JRC 1株に比較して、JRC 11株は growth fraction が大きい、cell loss factor が小さい、あるいは、その両者のかねあいで増殖速度に差が生じていると考えられる。cell loss factor を測定していないので、この面からは分析できないが、mitotic activity が JRC 11株に高いことからみると、growth fraction がより大きいことで放射線感受性に差がみられたものと考えられる¹⁰⁾¹¹⁾。

腎細胞癌は、それ自体多彩な病理組織像を示す特性を有しており⁷⁾、一様に論ずることは不適切であるが、一般的に臨床で、腎細胞癌が放射線抵抗性を示す腫瘍であることは認識する必要がある。この抵抗性は、

さらに放射線障害による癌細胞の致死と修復という問題¹²⁾、および細胞周期とも関連して、今後の放射線治療に当って解明されるべき問題と思われる。

今後は、放射線治療の照射効果を高めるためのピリミジン拮抗物質などの化学療法剤や、増感剤の検討も必要となるのであろう¹³⁾¹⁴⁾。さらに、放射線抵抗性の S 期に効果を示す、温熱療法との併用も注目されてきており¹⁵⁾、この方面での基礎的研究も重要と考えられる。

以上、腎細胞癌に対する放射線治療は、その効果に限度が残されているとはいえ、実験的には明らかな照射効果が示されており、今後は、その適応と方法の改善によって、より効果的に採用されるべき治療法の 1 つと考えられる。

結 語

1. ヌードマウス可移植性腎細胞癌 2 株 (JRC 1, および JRC 11株) を用いて放射線治療実験を行った。
2. JRC 1 株の10Gy照射群以外、2 株とも10Gy, 20 Gy, 30Gy照射群それぞれに、腫瘍重量の推計から治療効果が認められた。しかし、これら効果がみられた例のうち、病理組織学的治療効果がみられたのは、JRC 11株に対する30Gy照射群のみであり、腫瘍重量と組織学的変化による効果判定結果の間に差がみられた。
3. 今回使用した実験腫瘍 2 株のうち、組織学的により悪性度の高い JRC 11株が、JRC 1 株に比較して放射線治療効果が高いという、組織学的差異による放射線感受性に差が認められた。
4. 以上の結果、放射線治療も、その適応と方法によっては腎細胞癌の補助療法として有効であることが示唆された。

本論文の要旨は、第22回日本癌治療学会総会で発表した。

文 献

- 1) 大西哲郎, 増田富士男, 仲田浄治郎, 鈴木正泰, 飯塚典男, 町田豊平: 腎細胞癌の放射線治療効果。日泌尿会誌投稿中。
- 2) 大西哲郎, 増田富士男: ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌による治療実験の研究, 第 1 報: ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌株の特性。日泌尿会誌, 75, 1903—1910, 1984。
- 3) 大西哲郎, 増田富士男: ヌードマウス可移植性腎細胞癌による治療実験の研究, 第 2 報: 抗癌剤の感受性試験。日泌尿会誌, 75, 1911—1920, 1984。
- 4) 永井完治, 滝沢延彦, 両宮隆太: 治療, 人癌とヌードマウス, 第 1 版, 186—192, 医歯薬出版, 東京, 1982。
- 5) 井上雄弘: 化学療法, 人癌とヌードマウス, 第 1 版, 280—286, 医歯薬出版, 東京, 1982。

- 6) Simosato, Y., Obosi, S. and Baba, K.: Histological evaluation of effects of radiotherapy and chemotherapy for carcinomas. *Jap. J. Clin.*, 1, 19—35, 1971.
- 7) 大西哲郎, 増田富士男, 町田豊平: 腎細胞癌の病理組織学的検討, 第1報: 細胞型, 組織構築, 悪性度について. *日泌尿会誌*, 74, 967—976, 1983.
- 8) Kal, H.B., Hatfield, M. and Hahn, G.M.: Cell cycle progression of murine sarcoma cells after X-irradiated or heat shock. *Radiology*, 117, 213—217, 1975.
- 9) 石引久弥: ヌードマウス可移植性ヒト癌株を用いた化学, 免疫, 内分泌, 放射線療法およびこれらの併用療法に関する基礎的研究. *がん治療のあゆみ*, 3, 11—18, *がん集学的治療研究財団*, 東京, 1984.
- 10) 松本恵一: 放射線療法概論, *新臨床泌尿器科全書*, 第7巻A, 69—82, 金原出版, 東京, 1983.
- 11) Ikeuchi, S., Simosato, Y., Kameya, T., Watanabe, S., Kamegaya, T. and Abe, O.: Cell kinetic study of human cancers transplanted to nude mice. *Expel. Cell Biol.*, 48, 218—228, 1980.
- 12) Phillips, R.A. and Tolmack, L.J.: Repair of potentially lethal damage in X-irradiated HeLa cells. *Radiat. Res.*, 29, 413—432, 1966.
- 13) 中野 男, 宮本忠昭, 田辺政裕, 渡部郁雄, 寺島東洋三: マウス L 細胞における X 線と 5-Fluorouracil の相乗致死効果, *癌の臨床*, 24, 883—888, 1978.
- 14) 福田 寛, 横山久美子, 伊藤正敏, 洪 誠秀, 奥山 信一, 松沢大樹: 放射線とプレオマイシンの併用, 基礎と臨床, *癌の臨床*, 24, 889—893, 1978.
- 15) Dietzel.: Tumor therapy with hyperthermia, Basic principles in hyperthermic tumor therapy. *Recent Results in Cancer Research*, 86, 176-190, Springer-Verlag Berlin, Heiderberg.

(1985年1月22日受付)