原 著

マイクロカプセル封入の多細胞スフェロイドモデルによる 制がん効果評価法

中 村 伸

東京医科歯科大学大学院歯学研究科歯科臨床学系歯科放射線学講座（主任・指導：佐々木武仁教授）

（1998年3月17日 受付）

Assay System for Tumor Control Effect Using Encapsulated Multicellular Spheroid Models

Shin Nakamura

Department of Dental Radiology and Radiation Research, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Chief and Director : Prof. Takehito Sasaki)

Most advanced head and neck cancers are inoperable, hence they are treated by either radiotherapy or combined chemoradiotherapy. More effective methods of combined chemoradiotherapy are certainly required for improving the curability of these cancers. Numerous factors involved in modifying the effectiveness have to be quantitatively analyzed for improvement ; this has been a limiting factor preventing therapeutic progress.

The purpose of the present study was to establish an experimental technique for assessing the *in vivo* effect of radiotherapy or chemoradiotherapy on multicellular tumor spheroids encapsulated in a semitransparent microcapsule. Mouse squamous carcinoma cells suspended in sodium alginate solution were transferred to a syringe connected to an air jet apparatus. Droplets containing cells were dropped into a calcium chloride solution, which caused them to gel, and then treated with poly L-lysine solution. The encapsulated cells were cultured *in vitro* for three weeks to form multicellular spheroids with central necrosis. The spheroids were either X-irradiated *in vitro* or *in vivo* by grafting in a nude mouse. The dose-cell survival curve *in vivo* was biphasic with a radioresistant component which was not observed *in vitro*. This method was considered to be applicable to human tumor cells and useful for determining the effectiveness of therapeutic agent as human solid tumor models *in vivo*.

I. 緒 言

腫瘍の放射線感受性は、多くの因子によって影響を受けることが経験的および病理学的に知られているが、それを決定する生物学的要因は、i) 腫瘍細胞本来の放射線感受性と回復能、ii) 腫瘍再構築可能な腫瘍細胞（腫瘍幹細胞）の数、iii) 細胞の放射線感受性や回復能の腫瘍微小環境による修飾、に大別される。腫瘍の放射線感受性に、これらの因子がそれぞれどの程度関与しているかを定量的に分析することは、合理的な放射線治療法の開発にとって重要であるが、実験動物腫瘍においてもこれらの分析は現段階ではきわめて困難である¹⁾。

一方、悪性腫瘍の放射線治療成績は早期がんではかなり向上しているものの、進行がんでは満足すべき成績が得られていない。進行がんは多くの場合、手術不能であ

るため、これら悪性腫瘍の治療で最も広く用いられているのは放射線療法と化学療法の併用であるが、個々の症例に対する至適併用方法はほとんど解明されていない。併用療法では薬剤の選択、併用順序、治療回数、併用間隔、1回投与量、放射線量の時間的配分方法等の重要な因子の組み合わせは膨大な数で、これらをテストすることは実験動物腫瘍でも実際には不可能である。単層培養のヒト腫瘍細胞を用いた併用療法に対する腫瘍の反応予測の試み²⁻⁵⁾も腫瘍組織構造を反映しないこと、薬剤動態が生体と異なる等のためあまり効果を上げていない⁶⁾。このような背景を考えると、より効果的な放射線化学療法の開発のための研究には、固型悪性腫瘍の組織構造と生理学的特徴を保持し、しかも培養細胞と同じように細胞数などを定量的に扱えるアッセイ系が必要で、薬剤動態などを考慮すると *in vivo* の系が望まれる。

図1 マイクロカプセル作成装置

1) コンプレッサー, 2) 減圧弁, 3) マイクロミストセパレーター, 4) デジタル圧力計, 5) デジタル流量計, 6) ガラス試料管, 7) 試料注入キャップ, 8) 細胞サスペンション, 9) クロマト針, 10) ステンレス製ノズル, 11) 反応槽, 12) マグネチックスターラ

本研究では、i) 腫瘍細胞を用いて球状の半透膜カプセルに封入された、腫瘍コード構造と中心壊死部を持つスフェロイドを構築する技術確立を、ii) 多数の同じ大きさのカプセル封入スフェロイドをマウスに移植して放射線や種々の化学療法剤の効果を生体内で検討する方法を開発する、ことを目的とする。

II. 材料および研究方法

1. 細胞とマウス

本研究では WHT/Ht マウスに自然発生し、同系マウスに継代移植され維持されている扁平上皮がん Ht tumor から樹立した培養細胞株 Murine Squamous Cell Carcinoma Cell (MSCC) を用いた。この細胞はマウスに移植すると病理組織学的に扁平上皮がんを形成することが確かめられている^{7,8)}。細胞は Eagle-minimum essential medium, Earle's base (大日本製薬, 大阪) に 100 units/ml のペニシリン, 100 μ g/ml のストレプトマイシン, 1 mM のピルビン酸ナトリウム, 10% の牛胎児血清 (大日本製薬, 大阪) を加えた培地を用いて培養した。培養は炭酸ガス培養器 (Forma Scientific 社, Marietta) を用い、5% CO₂-95% 空気の気相下で 37℃ で行った。in vivo 生体内への移植実験では 8~10 週齢の KSN ヌー

ドマウス (日本エスエルシー, 浜松) を用いた。

2. マイクロカプセル作成装置

マイクロカプセルは Lim と Sun らによって、ランゲルハンス島の移植に用いられた方法に若干の改良を加えて作成した⁹⁻¹¹⁾。今回の実験に使用する半透膜カプセル (マイクロカプセル) を作成するための装置を図 1 に示す。この装置はガラス試料管部に注入した細胞サスペンションを管上部からの空気流入の圧力でクロマト針に送り、針先で滴状になったものをステンレス製ノズル内に流入してくる空気で振り落とすしくみになっている。作成されるマイクロカプセルの大きさは、クロマト針内径、ガラス管上部からの空気圧力、ステンレス製ノズル内の空気圧力および流量、細胞サスペンションの粘稠度の影響を受ける。今回の実験は、クロマト針内径 0.3 mm, 管上部からの空気圧力 40 kg/cm², ノズル内空気圧 0.03 kg/cm², 空気流量 6.5 l/min で行った。

3. マイクロカプセルの作成

培養 2 日目の対数増殖期の細胞を 0.25% トリプシン+0.1% ベルセンを用いて細胞分散し、エリスロシン B に対する非染色性の生細胞数を算定した。5.5×10⁶ 個の生細胞を 0.3 ml の培地に懸濁し、これに 3 ml の 2.7% アルギン酸ナトリウム (スノーアルギン SH, 富士化学工業, 和歌山) 0.9% 塩化ナトリウム溶液を加え、均一になるように混合して試料とした。試料中の気泡を抜いて、上記装置のガラス試料管に注入した。試料の滴下に関する条件は上記にあるように設定した。滴下されたアルギン酸ナトリウム滴はマグネチックスターラで攪拌されている 1.5% 塩化カルシウム溶液内で球状にゲル化する。ゲル化した球状体を 0.55% 塩化カルシウム溶液で、続いて 0.28% 塩化カルシウム溶液で洗浄し、0.1% の 2-[N-cyclohexylamino]ethanesulfonic acid (CHES) (Sigma 社, St. Louis) 0.9% 塩化ナトリウム溶液で 3 分間処理し、1.1% 塩化カルシウム溶液で洗浄後、0.05% poly-(L-lysine) hydrobromide (Sigma 社, St. Louis, MW 21,400) 処理を 6 分間行った。再度、0.1% CHES 溶液で 3 分間処理し、1.1% 塩化カルシウム溶液、0.9% 塩化ナトリウム溶液で洗浄後、0.15% アルギン酸ナトリウム溶液で 4 分間処理し、0.9% 塩化ナトリウム溶液で洗浄した。次に 55 mM クエン酸ナトリウム溶液で 5 分間処理し内部を可溶化し、0.9% 塩化ナトリウム溶液および培地で洗浄した後、37℃, 5% CO₂-95% 空気の条件下で培養した。培養は径 100 mm 組織培養用ペトリ皿を用い培地は毎日交換した。

4. マイクロカプセル封入スフェロイドの実験方法

マイクロカプセルを 26 G の注射針を用いて顕微鏡下で破壊し、内部のスフェロイドを遠沈管に移し、ベルセン含有トリプシンで単離細胞サスペンションを作成し

た。特に断らない限り、これら細胞はエリスロシン B で非染色性生細胞数を算定し、軟寒天培養法によりコロニー形成能を推定した。

1) *in vitro* 実験

マイクロカプセル内の細胞数はマイクロカプセル作成直後でカプセル当たり約 200 個弱程度である。培養開始からさまざまな時間経過後に、適当数のカプセルを破壊し得られた細胞を分散単離し、これらを軟寒天培地上にプレートして得られる 1 カプセル当たりのコロニー数を算定した。コロニーは培養 2 週間後に径 200 μm 以上のものとした。マイクロカプセル封入スフェロイドに対する X 線照射による線量・細胞生存率関係は以下のように推定した。培養開始から 3 週間経過したマイクロカプセル封入スフェロイドに、深部治療用 X 線装置 Stabilipan II (Siemens 社, Erlangen, Germany) を用い、管電圧 250 kV, 管電流 15 mA, フィルター 1 mmCu, 線量率 0.83 Gy/min の条件で段階的な X 線線量を照射した。照射には、マイクロカプセル封入スフェロイドを 5 ml の培地とともに 25 cm^2 フラスコに移し密栓した後、37°C 温浴槽内で照射した。照射直後および炭酸ガス培養器内で 24 時間培養後に、カプセルを破壊し、細胞を回収し、軟寒天培養法によって、2 週間培養後にコロニー数を算定した。

2) *in vivo* 実験

8~10 週齢の KSN ノードマウスに X 線 6 Gy の全身照射を行い、免疫系細胞を不活化させた。X 線照射 2 日後に培養約 3 週間目のマイクロカプセル封入スフェロイド約 50 個をナイロンメッシュ製の小袋に入れ、この袋ごとマウス腹腔に移植した。移植後腹膜筋層を外科用接着剤アロンアルファ A「三共」(三共, 東京) で接着し、皮膚を AUTO CLIPS® 9 mm でふさいだ。移植後 2 日目にマウスに 0~10 Gy の段階的な線量の X 線の全身照射を行い、照射後速やかにマウスよりカプセルを回収し、洗浄により付着しているマウス細胞を除去した。カプセル破壊後、スフェロイドを単離浮遊細胞の状態にして生細胞数を算定し、軟寒天培養法により、培養 2 週間後にコロニー数を算定した。*in vitro* と同様に照射 24 時間後にも、マウスよりマイクロカプセルを回収し、同様にコロニー数を算定して細胞生存率曲線を推定した。また低酸素状態の細胞の割合を推定するためマウスを屠殺してから 5 分後に X 線照射し、同様に細胞生存率曲線を推定した。マウスの X 線照射はすべて無麻酔下で、ケージ内を自由に動き回れる状況下で行った。

3) X 線線量・細胞生存率曲線

X 線の線量 (D) と細胞生存率 (S) との関係は、直線・二次 (Linear Quadratic; LQ) モデルにより、 α , β をそれぞれ 1 ヒットおよび 2 ヒットによる致死効果のパラメーターとして分析した¹²⁾。

図 2 作成直後のマイクロカプセル内部には単離浮遊細胞が認められる。写真中のバーは 100 μm を示す。

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

大線量部での曲線の解析は多標的単一ヒットモデルを用い、 D_0 , n をパラメーターとして分析した。この方法では片対数方眼紙上で最終勾配 $1/D_0$ を持つ直線を示し、直線部分の線量ゼロへの外挿値は n である¹²⁾。

$$S = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^n$$

4) マイクロカプセル封入スフェロイドの組織切片の作成

培養 3 週間目のマイクロカプセル封入スフェロイドを、10% の中性緩衝ホルマリン液で固定し、脱水、脱脂、透徹後、通法に従いパラフィンに包埋し、厚さ 5 μm の切片を作成した。

5. 単層培養細胞の実験方法

対数増殖期の細胞を 1×10^5 個/ml の細胞サスペンションとしてプラスチックチューブに 2 ml ずつ移し、段階的な X 線線量を照射した。使用した X 線装置は HF 100 (Pantak 社, Berkshir, UK) で、管電圧 100 kV, 管電流 30 mA, フィルター 0.115 mm Cu + 0.502 mm Al, 線量率 0.63 Gy/min の条件を用いた。照射後細胞は速やかに軟寒天培養で培養し、2 週間後に径 200 μm 以上のコロニーを算定した。プレートした非染色性生細胞数に対するコロニー形成細胞数を細胞生存率とした。コロニー形成率 (Plating Efficiency; PE) は約 70% であった。

III. 結 果

1. マイクロカプセルの作成

作成直後のマイクロカプセルを図 2 に示す。マイクロカプセル膜の厚さは約 5 μm で、その内面に約 10 μm の透明層が存在する。内部に単離浮遊した腫瘍細胞がみられる。図 3 にその大きさの分布を示す。379 個の直径の平均と標準偏差は $626.5 \pm 44.1 \mu\text{m}$ であった。この値からマイクロカプセル内容積分布を推定すると、 $0.113 \pm$

0.026 mm³に相当し、coefficient variation(CV)は23%であった。試料の細胞密度は、 $1.67 \times 10^6/\text{ml}$ なので、作成直後のカプセル内の細胞数の平均および標準偏差は 188.2 ± 43.1 に相当する。

2. マイクロカプセル内細胞の増殖とスフェロイド形成

カプセル内細胞は増殖し細胞塊を形成し、それらはやがて融合しスフェロイドを形成する。図4にカプセル内細胞塊とスフェロイドの位相差顕微鏡写真、および組織切片の顕微鏡像を示す。組織像から明らかなようにカプセル封入スフェロイドは中心壊死部を持ち、外層には細

図3 マイクロカプセルの直径の分布

379個のマイクロカプセルの直径を測定した。平均±標準偏差= $626.5 \pm 44.1 \mu\text{m}$

胞分裂像がみられ、いわゆる腫瘍コード構造を呈している。図5にカプセル内コロニー形成細胞の増殖曲線を示す。この増殖曲線では、コロニー形成細胞は約3日後から対数的に増加し、約14日目頃から定常状態になる。定常期のコロニー形成細胞数は約1,500個で、対数的な増加を示す期間の倍加時間は約3日である。この細胞の単層培養における増殖曲線では、対数増殖期の単層培養細胞の倍加時間は12時間と推定される(図6)。

3. 単層培養細胞および *in vitro* マイクロカプセル封入スフェロイドにおける細胞生存率曲線

単層培養細胞の線量・細胞生存率関係(細胞生存率曲線)と *in vitro* マイクロカプセル封入スフェロイドにおける細胞生存率曲線を図7に示す。単層培養細胞の α 、 β 値はそれぞれ 0.2646 Gy^{-1} 、 0.0485 Gy^{-2} で、 D_0 と n はそれぞれ1.25 Gy, 5.0であった。同様にマイクロカプセル封入スフェロイドにおける α 、 β 値はそれぞれ 0.3182 Gy^{-1} 、 0.0030 Gy^{-2} で、 D_0 と n それぞれ2.55 Gy, 1.5であった。マイクロカプセル封入スフェロイドは対数増殖期の単層培養細胞より明らかな放射線抵抗性を示した。PEは単層培養細胞では約70%、マイクロカプセル封入スフェロイドでは約20%であった。

4. 潜在的致死損傷 Potentially Lethal Damage (PLD) からの回復

単層培養細胞およびマイクロカプセル封入スフェロイドにおける *in vitro* での放射線照射後のPLD回復を、

図4 マイクロカプセル内のスフェロイド形成および組織像

マイクロカプセルの位相差顕微鏡像を、培養3日後(a)、8日後(b)、18日後(c)の順に示す。カプセル内の細胞は細胞塊を形成し、それらが融合し、スフェロイドを形成している。

マイクロカプセル内部スフェロイドの組織像(d)、(e)では中心壊死部(N)および分裂細胞(M)が認められる。(e)は(d)の拡大像(HE染色)写真中のバーは100 μm を示す。

図5 マイクロカプセル内細胞のコロニー形成細胞増殖曲線
培養開始3日目から対数的に増殖し、その間の倍加時間は約3日間である。

図6 単層培養細胞の生細胞増殖曲線
培養開始24時間目から対数的に増殖し、その間の倍加時間は12時間である。

図7 単層培養細胞と *in vitro* 培養マイクロカプセル封入スフェロイドにおける線量・細胞生存率曲線
各曲線は直線・二次モデルでフィットした。点およびバーは3回の実験の平均値と標準偏差を示す。

図8 単層培養細胞と *in vitro* 培養マイクロカプセル封入スフェロイドにおけるX線照射後経過時間と細胞生存率の関係
用いた線量は単層培養細胞とスフェロイドに対して、おのおの4.5 Gyおよび6 Gy

図9 *in vitro* 培養マイクロカプセル封入スフェロイドにおけるX線照射直後と24時間後の線量・細胞生存率曲線
曲線は直線・二次モデルでフィットした。

照射後のさまざまな時間経過後に細胞分散を行って調べた結果を図8に示す。線量はともに10%細胞生存率を示す線量 (D_{10}) 相当の線量である4.5 Gyを単層培養細胞に、6 Gyをマイクロカプセル封入スフェロイドに用いた。単層培養細胞、マイクロカプセル封入スフェロイド、ともに照射直後から24時間までに細胞生存率の増加は認められず、明らかなPLD回復は認められなかった。また *in vitro* 培養のマイクロカプセル封入スフェロイドを用いて、照射24時間後に細胞分散を行って得た細胞生存率曲線を図9に示す。この生存率曲線の α , β 値はおの

の 0.3287 Gy^{-1} および 0.0015 Gy^{-2} で、照射直後の細胞分散による曲線と変わらなかった。

5. *in vivo* のマイクロカプセル封入スフェロイドにおける細胞生存率曲線

マウスより回収されたカプセル周囲にはマウス由来の細胞が存在するが、PBS で数回洗浄することでこれらはすべて除かれた (図 10)。得られた細胞生存率曲線 (図 11) に示されるように、*in vivo* マイクロカプセル内のスフェロイドにおいては二相性の曲線を示し、6 Gy 付近から X 線に対して明らかに放射線抵抗性を示す成分が存在した。このような二相性の曲線は *in vitro* 培養のマイク

図 10 マウスより回収したマイクロカプセル封入スフェロイド

- (a) 回収直後。種々の細胞が周囲に存在する。
 (b) PBS による洗浄後。洗浄前に認められた周囲の細胞は除かれている。
 形態は移植前と同様に良好に保たれている。バーは $100 \mu\text{m}$ を示す。

図 11 マウス腹腔移植マイクロカプセル封入スフェロイドにおける線量・細胞生存率曲線

- : X 線照射直後の細胞分散
 ○ : X 線照射 24 時間後の細胞分散
 破線は、*in vitro* 培養のマイクロカプセル封入スフェロイド (図 7 から)
 点線は、単層培養細胞 (図 7 から)

ロカプセル封入スフェロイドにおいては認められない。

in vivo での実験においても、*in vitro* と同様に照射 24 時間後にマウスからカプセルを回収し細胞分散を行って細胞生存率曲線を推定した。その結果、照射直後に細胞分散したものと 24 時間後に細胞分散したものは同様の細胞生存率曲線を示した。また、屠殺して無酸素状態で X 線照射してから回収したマイクロカプセル内のスフェロイドにおける細胞生存率曲線は、すべての線量域で空気呼吸下のマウスを照射したときと比べて放射線抵抗性を示すが、二相性を示さない (図 12)。

移植 2 日前に X 線照射をあらかじめ受けたマウスを用いる *in vivo* での実験における PE は、4.5~7.7% の範囲であった。また、移植前に X 線全身照射を行っていないマウスから回収したマイクロカプセル封入スフェロイドにおける PE は、1.3~3.4% の範囲であった。移植前に X 線全身照射を行ったマウスでの PE は、照射を行わなかったマウスと比べて、平均で 2.5 倍高かった。4 回の各実験ごとに χ^2 検定により検定すると、すべて有意水準 0.2% 以下で X 線全身照射マウスの PE は照射していないマウスより有意に高かった。

図 12 マウスを屠殺後 X 線照射し、照射後マウス腹腔から回収したマイクロカプセル封入スフェロイドの線量・細胞生存率曲線

- : 屠殺後に X 線照射し、照射直後にマウスから回収したマイクロカプセル封入スフェロイド

- : 空気呼吸下のマウスに X 線照射し、照射直後に回収したマイクロカプセル封入スフェロイド

2 つの曲線の最終勾配を同じものと仮定してフィットした。破線は、*in vitro* 培養のマイクロカプセル封入スフェロイド (図 7 から)

IV. 考 察

1. マイクロカプセル形成

本研究でスフェロイドを封入するのに用いたマイクロカプセルはアルギン酸ナトリウムと poly-L-lysine とによって形成された半透膜によるものである⁹⁻¹¹⁾。作成されたマイクロカプセルの膜の厚みは 4～5 μm を示し、ほかの報告と一致している¹⁰⁾。マイクロカプセルの大きさは作成の際の空気流量および圧力によって変動するが空気流量が多いとカプセルは小さくなり、大きさのばらつきが大きくなる。逆に空気流量が少ないとカプセルは大きくなる。アルギン酸ナトリウムの粘稠度が高いと大きくなるが作成されたカプセルは完全な球状ではなく涙滴状になりやすい。この実験では腫瘍コード構造を再現できる径 600 μm 程度の大きさになるように物理的条件を設定した。この条件下で作成されたマイクロカプセルの形状は、ほぼ完全な球形で涙滴状のものはほとんど認められない。大きさに関しては正規分布を示し、直径の分布での coefficient variation (CV) は 7%, 容積分布は CV は 23% で、カプセル内細胞数変動は、ほぼ容認できる範囲で均一と考えられた。マイクロカプセル直径のばらつきをさらに小さくすることは、コンプレッサーの供給する空気流量の変動を小さくする必要があり、実際にはかなり困難である。再現性に関しては、過去 6 回の同一条件での実験の測定値の平均直径は 620～650 μm の範囲にあり、ほぼ満足できると考えられる。

ほかの報告にあるように¹³⁻¹⁵⁾、今回われわれが作成したマイクロカプセルにおいて、膜の安定性は *in vitro* ではきわめて高く、マウス腹腔から回収した後もカプセルは破壊されることなく安定した状態であった。また膜の透過性に関しても、カプセル内の細胞の生存、増殖に必要な酸素や栄養物の細胞への到達は、細胞増殖能が維持されていることから、十分と思われる。しかしカプセル内でのコロニー形成細胞の増殖速度は単層培養細胞より遅く、plating efficiency も低下した。このことは、固形腫瘍が腫瘍細胞の細胞分裂による細胞産生と、分化壊死などによる細胞消失とのバランスで成長するのと同様の機構が、このスフェロイドにおいても働いていることを示唆している。カプセル膜の透過性は、アルギン酸ナトリウム濃度やポリリジン分子量等を変えることによって調節可能であるが、本実験で用いたポリリジン (MW 21,400) で形成されたマイクロカプセルでは、高分子デキストラン (MW 480,000) の透過性はきわめて低いが、中分子デキストラン (MW 40,000) の透過性は高いことが報告されている¹⁴⁾。このため、比較的分子量の小さい IgG (MW 160,000) などは膜を透過している可能性がある。実際にカプセルの移植前にマウスに X 線照射を

行った場合の PE が、X 線照射を行わなかった場合と比較して、有意に大きな値を示したことから、カプセル内での免疫反応等の関与が考えられる。

2. スフェロイドの生物学的特性

固型悪性腫瘍の基本的組織構造は、腫瘍実質細胞とその増殖発育を支持する間質組織である血管系からなる。栄養や酸素供給はすべて血管を介して行われ、代謝産物の排出も血管を介して行われる。この結果、血管近傍の腫瘍細胞は増殖が活発であるが、血管から離れるにしたがい増殖能力は低下し、ヒト肺がんによる計測では約 160 μm 以上離れた腫瘍細胞では壊死に陥り、いわゆる腫瘍コード構造を呈すると考えられている¹⁶⁾。このような構造を持つ固型腫瘍では、一般に単層培養細胞と比較して、i) 壊死部の存在、ii) 腫瘍コードにおける酸素やグルコースなどの濃度勾配の存在、iii) 腫瘍細胞間接着が密である、iv) 放射線抵抗性低酸素細胞の存在、v) 細胞増殖の不均一性といった特徴を持つ。Sutherland らによって初めて開発されたチャイニーズハムスター線維芽細胞 (V79) を用いたスフェロイドはこれらの固型腫瘍の特徴を備えており^{17,18)}、しかも培養細胞としての実験的有用性があることから、*in vitro* における培養固型腫瘍モデルとして用いられている^{11,17-21)}。

単層培養された細胞は、必要な酸素および栄養物を周囲微小環境より容易に得ることができ、それによって生存、増殖するが、多細胞集団であるスフェロイドでは、必要な栄養物や酸素は、スフェロイド表層で培養液中からのみ供給されるので、中心付近の細胞ではこれら物質の拡散、および拡散途中にある細胞による消費で枯渇する。また代謝産物の排出もスフェロイド表層から拡散によって培地中に排出されるが、これも中心付近では十分に起こらず代謝産物の蓄積が起こる。結果としてスフェロイド中心部の細胞は壊死に陥り、その周辺の細胞増殖率は低下する。また壊死部周辺には壊死に至らずに生存している低酸素下の細胞が存在すると考えられる。このようにスフェロイドには単層培養細胞と異なり、*in vivo* 固型腫瘍における腫瘍コード構造と類似した状態にある不均等な細胞集団が含まれることになる。多くのスフェロイドにおける実験から、先に述べた固型悪性腫瘍の特徴と類似した性質を示すことが明らかにされている。それは壊死部の存在^{11,17-21)}、増殖分率 (growth fraction) の低下¹⁸⁾、酸素やグルコースの濃度勾配²²⁻²⁵⁾ および放射線抵抗性を示す低酸素性細胞の存在²⁶⁾、細胞間接触効果 (cell contact effect) の存在^{21,27-34)}、などである。しかし、その後の多くのスフェロイドに関する研究から新たな技術的な問題も明らかにされている。たとえば、培養法の違い (静置培養と回転培養) で、酸素供給状態の相違が生じ、ひいては放射線感受性に影響が生じたり

すること³⁵⁾などである。また *in vivo* 生体内と *in vitro* との相違点で実験的に制御が困難な要因として、種々の増殖因子の存在、腫瘍細胞の細胞微小環境への適応、抗原抗体反応の存在、未知の環境因子への応答等が明らかにされてきた^{36,37)}。現段階ではこれらの *in vivo* の状況を *in vitro* で再現するのは困難である。

スフェロイドを使用した *in vivo* の実験としては、回転培養によって形成されたスフェロイドを直接マウス腹腔内へ移植すると、スフェロイド内への宿主マクロファージの侵入が認められることを、Lord らが報告しているが^{38,39)}、本研究における半透膜構造を持つマイクロカプセル封入スフェロイドでは、宿主由来細胞はマイクロカプセル膜を通過できず、カプセル表面に付着した細胞の分離は容易である。また EMT 6/Ro 細胞を用いて従来のスピナーカルチャー法で作成したスフェロイド⁴⁰⁾や HeLa 細胞を用いたスフェロイド²¹⁾では表層の分裂細胞が剥離するという現象が報告されているが、われわれのマイクロカプセル封入スフェロイドは細胞数に関しては閉鎖系であり定量的把握が正確に行える。そのため生体内への移植と完全な回収が可能であり、*in vitro* の実験では再現できない生体内環境での放射線および薬剤に対する感受性や回復能の研究が可能である。

3. *in vitro* 培養および *in vivo* 培養のスフェロイドの比較

本研究では固型腫瘍モデルとしてマイクロカプセル封入スフェロイドを用い、X 線に対する細胞生存率曲線を *in vitro* とマウス腹腔内への移植による *in vivo* の両者で推定した。両者の細胞生存率曲線を比較すると *in vitro* では認められなかった二相性の細胞生存率曲線が *in vivo* では認められ、*in vivo* では明らかな X 線抵抗性成分の存在を示した。*in vitro* のマイクロカプセル封入スフェロイドにおいても単層培養細胞に比べて著しく放射線抵抗性を示し、最終 D_0 比で約 2 倍の相違が認められる。このことから *in vitro* マイクロカプセルでは部分的低酸素状態の細胞が存在し、酸素濃度の異なる多くの細胞集団の混在が考えられる^{17,20)}。*in vitro* で認められない低酸素性細胞による二相性成分が *in vivo* で認められ、しかもこの細胞生存率曲線はマウスを屠殺して無酸素状態にして X 線照射したときの曲線と最終勾配がほぼ同じであることから、かなり多くの細胞が、無酸素下に近い状態で生存できる環境が *in vivo* で存在する可能性を示唆しているものと考えられる。実験動物腫瘍においては、低酸素性細胞分画の大きさ (%) は腫瘍によって異なり、約 0~90% と広い分布を示す^{41,42)}。このことは腫瘍細胞が低酸素環境下で生存できるかどうかは細胞遺伝学的に制御されている可能性があることを示唆しており、このような遺伝学的形質は *in vitro* 状況下では十分に発現しているかどうか疑問がある。屠殺したマウスに X 線

照射した実験でのマイクロカプセル封入スフェロイドにおける細胞生存率曲線を多標的単一ヒットモデルで解析すると、 D_0 および n はそれぞれ 4.0 Gy, 1.7 となった。一方、照射時空気呼吸マウスから回収したスフェロイドの細胞生存率曲線の抵抗性部分である高線量部 (4~10 Gy) での D_0 および n は 5.78 Gy, 0.54 となった。この 2 つの曲線の D_0 を共通の値 (平均値 4.89 Gy) と仮定し、フィットし直す (図 12) と、照射時空気呼吸マウスで得られた細胞生存率曲線の抵抗性成分の外挿値は 0.64 で、屠殺したマウスの照射から得られた細胞生存率曲線の外挿値は 1.3 となる。これらの比から低酸素状態の細胞の割合は 49% と推定された。空気呼吸マウスでの実験で得られた細胞生存率曲線の、二相性の多標的単一ヒットモデルによる解析では、最終 D_0 は 5.78 Gy で、外挿値 n を無酸素下の照射による細胞生存率曲線から推定された値 (1.7) と同じとすると、感受性成分の D_0 は 1.43 Gy と推定された。酸素増感比 (Oxygen Enhancement Ratio) を、 D_0 比から推定すると約 4.0 となり、通常考えられている値 約 3 よりも大きい誤差範囲を考えるとほぼ同じかもしれない。しかし、抵抗性成分は低酸素状態による影響だけでなく、*in vivo* 環境における何らかの因子によって、特定の細胞周期、たとえば G1 期への集積など、が起こっている可能性は否定できない。

また本来致死性である損傷がその後の細胞の置かれた環境によって回復する現象 (PLD 回復) が認められる場合がある。Hetzel らは、V79 細胞スフェロイドを用いて行った実験で、17 Gy の γ 線照射後、8 時間経過すると、細胞生存率は照射直後の細胞生存率と比較して 5 倍に増加したと報告している⁴³⁾。こうした場合は、照射直後に細胞分散を行って得たデータは、照射後に *in vivo* にそのまま存在する腫瘍細胞の挙動を必ずしも反映しない。よって照射直後のデータに加えて、回復が飽和に達する照射後 24 時間の回復時間を経た後のデータも重要である。今回の実験では PLD 回復に関しても調べたが、これは単層培養細胞、*in vitro* 培養のマイクロカプセル封入スフェロイド、*in vivo* 培養のマイクロカプセル封入スフェロイド、いずれの場合においても明らかに検出されなかった。

本実験で、*in vitro* の環境下でのスフェロイドでは認められない放射線抵抗性の細胞集団が、*in vivo* で認められた意義は大きく、この抵抗性細胞の克服法についての研究は、がんの放射線治療に重要と考えられる。またこのことがほかの腫瘍細胞、特にヒト腫瘍細胞でもみられる一般的な現象かどうかを、この実験系を用いてさらに検討することが今後残された課題である。

V. 結 論

今回開発したマウス腹腔に移植したマイクロカプセル封入スフェロイドを用いる *in vivo* の実験系では, *in vitro* のマイクロカプセル封入スフェロイドでは認められなかった二相性の線量・細胞生存率曲線を示し, 細胞微小環境の違いによる腫瘍細胞の放射線に対する反応の相違が確認された。この方法はヒト腫瘍細胞を用いる実験にも応用可能なため, がんの治療に用いられるあらゆる作用原のヒトがん細胞に対する有効性を *in vivo* 環境下で検討する技術に道を開くものである。化学療法と放射線療法との併用方法などの研究に有用な方法と考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 懇篤なるご指導, ご校閲を賜りました, 本学歯学部歯科放射線学講座 佐々木武仁教授に深甚なる感謝の意を表します。また終始, 懇切なるご指導を賜りました土門正治助教授, ならびに三浦雅彦博士に心より感謝いたします。さらに本研究を遂行するにあたり, 惜しみないご協力とご助言, 温かいご支援を賜りました本学歯学部歯科放射線学講座の諸先生方に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 佐々木武仁: 放射線治療における腫瘍の放射線感受性予測. 癌の臨床 35: 1487-1493, 1989.
- 2) Douple, E. B. and Richmond, R. C.: Platinum complexes as radiosensitizers of hypoxic mammalian cell. Br. J. Cancer 37 (suppl. III): 98-102, 1978.
- 3) Carde, P. and Laval, F.: Effect of cis-dichlorodiammine platinum II and X rays on mammalian cell survival. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 7: 929-933, 1981.
- 4) Chibber, R., Stratford, I. J., O'neal, P., Sheldon, P. W., Ahmed, I. and Lee, B.: The interaction between radiation and complexes of cis-pt (II) and Rh (II): studies at molecular and cellular level. Int. J. Radiat. Biol. 48: 513-524, 1985.
- 5) Begg, A. C., Van der kolk, P. J., Dewit, L. and Bartelink, H.: Radiosensitization by cisplatin of RIF 1 tumor cells in vitro. Int. J. Radiat. Biol. 50: 871-884, 1986.
- 6) 佐々木武仁, 三浦雅彦: 化学療法併用放射線治療に対する期待. 癌の臨床 36: 2234-2243, 1990.
- 7) Hewitt, H. B., Chan, D. P-S. and Blake, E. R.: Survival curves for clonogenic cells of a murine keratinizing squamous carcinoma irradiated in vivo or under hypoxic conditions. Int. J. Radiat. Biol. 12: 535-549, 1967.
- 8) Miura, M. and Sasaki, T.: Relationship between radiosensitivity and metallothionein content in clones from a mouse squamous cell carcinoma. Radiat. Res. 123: 171-175, 1990.
- 9) Lim, F. and Sun, A. M.: Microencapsulated islet as bioartificial endocrine pancreas. Science 210: 908-910, 1980.
- 10) Sun, A. M.: Microencapsulation of pancreatic islet cell: A bioartificial endocrine pancreas. Methods in Enzymology. 137: 575-580, 1988.
- 11) 佐々木武仁: 人口魚卵様球状体に封入したヒト癌組織モデルによる生体内制癌効果予測法の実用開発. 平成3年度科学研究費補助金, 研究成果報告書, 1993.
- 12) Hall, E. J.: Radiobiology for the radiologist. 4th ed., Philadelphia, 1994, J. B. Lippincott Company, 29-43.
- 13) Darquy, S. and Sun, A. M.: Microencapsulation of parathyroid cells as a bioartificial parathyroid. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs. 33: 356-359, 1987.
- 14) 青柳和美, 阿部泰久, 広田則彦, 小川吉司, 宮沢 正: アルギネート-ポリリジンマイクロカプセルを用いたハイブリッド型人口膵 高分子膜特性について. 人工臓器 17: 204-207, 1988.
- 15) Fu, X. W. and Sun, A. M.: Microencapsulated parathyroid cells as a bioartificial parathyroid. Transplantation 47: 432-435, 1989.
- 16) Thomlinson, R. H. and Gray, L. H.: The histological structure of some human lung cancers and possible implications for radiotherapy. Brit. J. Cancer 9: 539-549, 1955.
- 17) Sutherland, R. M., Inch, W. R. and McCredie, J. A.: A multicomponent radiation survival curve using an in vitro tumour model. Int. J. Radiat. Biol. 18: 491-495, 1970.
- 18) Sutherland, R. M.: Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model. Science 240: 177-184, 1988.
- 19) 佐々木武仁: 培養固型腫瘍モデルスフェロイドの腫瘍生物学的研究における利用. 放射線生物研究 19: 195-208, 1984.
- 20) Sutherland, R. M. and Durand, R. E.: Hypoxic cells in in vitro tumour model. Int. J. Radiat. Biol. 23: 235-246, 1973.
- 21) Sasaki, T., Yamamoto, M., Yamaguchi, T. and Sugiyama, S.: Development of multicellular spheroids of Hela cells cocultured with fibroblasts and their response to X-irradiation. Cancer Res. 44: 345-351, 1984.
- 22) Mueller-Klieser, W. F. and Sutherland, R. M.: Oxygen tension in multicell spheroids of two cell lines. Brit. J. Cancer 45: 256-264, 1982.
- 23) Mueller-Klieser, W., Freyer, J. P. and Sutherland, R. M.: Evidence for a major role of glucose in controlling development of necrosis in EMT 6/RO multicell tumor spheroids. Adv. Exp. Med. Biol. 159: 487-496, 1983.
- 24) Sutherland, R., Freyer, J., Mueller-Klieser, W., Wilson, R., Heacock, C., Sciandra, J. and Sordat, B.: Cellular growth and metabolic adaptations to nutrient stress environments in tumor microregions. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 12: 611-615, 1986.
- 25) Tannock, I. F. and Kopelyan, I.: Influence of glucose concentration on growth and formation of necrosis in spheroids derived from a human bladder cancer cell line. Cancer Res. 46: 3105-3110, 1986.
- 26) Woods, M. L., Koch, C. J. and Lord, E. M.: Detection of individual hypoxic cells in multicellular spheroids by flow cytometry using the 2-nitroimidazole, EF 5, and monoclonal antibodies. Int. J. Radiat. Oncol. Biol.

- Phys. 34 : 93-101, 1995.
- 27) Durand, R. E. and Sutherland, R. M. : Effects of inter-cellular contact on repair of radiation damage. *Exp. Cell Res.* 71 : 75-80, 1972.
 - 28) Sutherland, R. M., Eddy, H. A., Bareham, B., Reich, K. and Vanantwerp, D. : Resistance to adriamycin in multicellular spheroids. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 5 : 1225-1230, 1979.
 - 29) Sacks, P. G., Miller, M. W. and Sutherland, R. M. : Influences of growth conditions and cell-cell contact on responses of tumor cells to ultrasound. *Radiat. Res.* 87 : 175-186, 1981.
 - 30) Dertinger, H. and Hulser, D. : Increased radioresistance of cells in cultured multicell spheroids. I. Dependence on cellular interaction. *Radiat. Environ. Biophys.* 19 : 101-107, 1981.
 - 31) Guichard, M., Dertinger, H. and Malaise, E. P. : Radiosensitivity of four human tumor xenografts. Influence of hypoxia and cell-cell contact. *Radiat. Res.* 95 : 602-609, 1983.
 - 32) Hinz, G. and Dertinger, H. : Increased radioresistance of cells in cultured multicell spheroids. II. Kinetic and cytogenic studies. *Radiat. Environ. Biophys.* 21 : 255-264, 1983.
 - 33) Wigle, J. C. and Sutherland, R. M. : Increased thermoresistance developed during growth of small multicellular spheroids. *J. Cell Physiol.* 122 : 281-289, 1985.
 - 34) Gordon, D. J., Milner, A. E., Beaney, R. P., Grdina, D. J. and Vaughan, T. M. : The increase in radioresistance of Chinese hamster cells cultured as spheroids is correlated to change morphology. *Radiat. Res.* 121 : 175-179, 1990.
 - 35) Mueller-Klieser, W. F. and Sutherland, R. M. : Influence of convection in the growth medium on oxygen tensions in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 42 : 237-242, 1982.
 - 36) Soh, E. Y., Duh, Q. Y., Sobhi, S. A., Young, D. M., Epstein, H. D., Wong, M. G., Garcia, Y. K., Min, Y. D., Grossman, R. F., Siperstein, A. E. and Clark, O. H. : Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 : 3741-3747, 1997.
 - 37) Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H., Ishibashi, T., Suzuki, H. and Kuwano, M. : Involvement of interleukin-8, endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 17 : 4015-4023, 1997.
 - 38) Lord, E. M. and Nardella, G. : The multicellular tumor spheroid model. *Transplantation* 29 : 119-124, 1980.
 - 39) Lord, E. M. and Burkhardt, G. : Assessment of in situ host immunity to syngeneic tumors utilizing the multicellular spheroid model. *Cellular Immunology* 85 : 340-350, 1984.
 - 40) Landry, J., Freyer, J. P. and Sutherland, R. M. : Shedding of mitotic cells from the surface of multicell spheroids during growth. *J. Cell. Physiol.* 106 : 23-32, 1981.
 - 41) Moulder, J. E. : Hypoxic fractions of solid tumors : experimental techniques, methods of analysis, and a survey of existing data. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 10 : 695-712, 1984.
 - 42) Rockwell, S. and Moulder, J. E. : Hypoxic fractions of human tumors xenografted into mice : a review. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 19 : 197-202, 1990.
 - 43) Hetzel, F. W., Kruuv, J. and Frey, H. E. : Repair of potentially lethal damage in X-ray V 79 cells. *Radiat. Res.* 68 : 308-319, 1976.