培養グリオーマモデル(スフェロイド)におけるX線照射と5-Fuの併用効果

桑原 健次・片倉 隆一・森 照明**・鈴木 二郎・佐々木武仁*

Effect of Combined Treatment with X-irradiation and 5-fluorouracil in Multicellular Spheroids of Rat Glioma

Kenji KUWAHARA, Ryuichi KATAKURA, Teruaki MORI**, Jiro SUZUKI and Takehito SASAKI*

*Division of Neurosurgery, Institute of Brain Diseases, and *Department of Radiation Research, Tohoku University, Sendai; **Department of Neurosurgery, Medical College of Oita, Oita*

Abstract

The effect of combined treatment with X-irradiation and 5-fluorouracil (5-Fu) on the spheroids of rat glioma clone-6 cells was compared with that on exponentially grown monolayer cells. Isobolographic analysis showed the effect of the combined treatment to be supra-additive in both multicellular spheroids and monolayer cells when irradiation followed 24 hours of treatment with 5-Fu.

X-irradiation prior to 5-Fu treatment showed an additive effect. The effect of X-irradiation on spheroids was enhanced after 3 hours of 5-Fu treatment, whereas its effect on monolayer cells was augmented only when prior 5-Fu treatment exceeded 12 hours. Potentiation of the effect of X-irradiation on spheroids by prior treatment with 5-Fu is thought to be due to reoxygenation of previously hypoxic cells and partial synchronization of proliferating cells. These results suggest that when X-irradiation is applied shortly after 5-Fu treatment the effect on solid tumors is selectively enhanced, while the effect on actively proliferating normal tissues is reduced.

Key words: multicellular spheroids, radiation therapy, 5-fluorouracil, chemotherapy, rat glioma

I はじめに

近年、悪性グリオーマの治療は各種治療法の進歩により成績の向上が認められ、当教室でも放射線、ACNU、N₁-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (Tegafur)およびカワラタケ由来蛋白多糖体 PS-K を併用した RAFT 療法を施行し、比較的良好な成績を上げてきた^{12,18,19)}。このなかで ACNU は特異な殺細胞効果を示し、放射線や Tegafur との併用も有効なことが明らかにされた^{14,15,32,33)}が、比較的高い副作用のために投与量、投与回数は限定せざるをえないのが現状である。したがって連続的に行われる Tegafur

と放射線の併用療法が占める比重は相対的に大きい。このような背景から、本論文では Tegafur が主に肝臓で代謝⁹⁾されてできる活性物質 5-fluorouracil (5-Fu) と X 線の併用効果を、グリオーマ細胞を用いて作製した多細胞スフェロイド³⁰⁾と対数増殖期の単層培養細胞と比較し、両者の至適併用方法に関する基礎的検討を行った。

II 材料および実験方法

1. 材料

実験には N-nitrosomethylurea によって誘発されたラットグリオーマ clone-6 細胞²¹⁾を用いた。培養は、Eagle's

東北大学脳研脳神経外科 *同放射線基礎医学 **大分医科大学脳神経外科

Address reprint requests to: K. Kuwahara, M.D., Division of Neurosurgery, Institute of Brain Diseases, Tohoku University, 1-1 Seiryō-cho, Sendai 980.

受稿 1986年5月29日 受理 1987年3月16日

minimum essential medium (非不可欠アミノ酸, 1 mM ビルビン酸含有)に10%牛胎児血清(fetal bovine serum: FBS)とペニシリン, ストレプトマイシンを加えた培養液にて37°C, 5% CO₂の条件下で行った。なお, 実験に用いた単層培養細胞とスフェロイドは以下のように作製した。

単層培養細胞: 対数増殖期にある細胞を0.1%トリプシン液で洗滌し, 0.1%トリプシン+0.025% EDTA 液を約10分間作用後, 等量の培養液を加えて20回ピペッティングして単離浮遊細胞とし, 60 mm ペトリ皿(Nunc 社製)に 5×10^5 個プレATINGして24時間後に実験を行った。

スフェロイド: 90 mm ペトリ皿に10% FBS 加寒天層を作り, この上で 10^6 個の細胞を24時間培養して, できた細胞塊を200 ml/容量のスピナーフラスコ(Techne 社製)に移し, 37°C, 5% CO₂の条件下でマグネチックスターラー(Techne 社製)で50回転/分の速度で回転させ, 2日ごとに培養液を交換し, 10日間培養して得た直径500~600 μ m の中心部に壊死層を持つスフェロイドを用いた^{34,39)}。

2. 実験方法

(1) 5-Fu 処理および X 線照射

5-Fu 処理: 5-Fu は溶解直後に使用し, 単層培養細胞は5-Fu 加培養液中で, スフェロイドは0.5%寒天上の5-Fu 加培養液中で原則として24時間培養後, 培養液で2回洗滌し, トリプシン処理して単離浮遊細胞とした。

X 線照射: X 線装置は島津深部治療用 X 線装置(SHT 250M-3)を用い, 250 kV, 20 mA で, フィルターは0.3 mm Cu+1 mm Al を用い, 焦点表面間距離は50 cm, 1.04 Gy/分の条件とした。単層培養細胞は培養器から出した直後に照射し, スフェロイドは10 mM Hepes 緩衝液加培養液 5 ml に数個のスフェロイドを入れたものを20 ml 密封性プラスチックバイアル(底面積7.0 cm²)に入れ, 保温槽で37°Cに保温しながら照射し, いずれも照射直後にトリプシン処理して単離浮遊細胞とした。なお, 5-Fu 処理後 X 線照射は5-Fu 加培養液のまま照射し, X 線照射後5-Fu 処理は照射直前に5-Fu を添加した。

(2) 5-Fu と X 線の併用効果の検討

①一定濃度の5-Fu と併用した X 線による線量-生存曲線, ②一定線量の X 線と併用した5-Fu による濃度-生存曲線, ③一定線量の X 線と併用した一定濃度の5-Fu による処理時間-生存曲線を求めた。なお, 以上はすべて単層培養細胞, スフェロイドの両者において, 5-Fu 処理後 X 線照射, X 線照射後5-Fu 処理の併用方法について検討した。

(3) 細胞生存率の推定と結果の解析

細胞生存率の推定: 単離細胞をエリスロシン B 液²⁵⁾で染色し, 非染色性の生細胞数を血球算定盤で算定した。次

に細胞浮遊液を適当な細胞数に希釈してプレーティングし, 5-Fu 処理群は成長遅延が認められるため, 生存率が plateau に達する14日間(未発表データ), その他は11日間培養後, 固定染色して50個以上の細胞より成るコロニー数を算定し, 無処理対照群のコロニー形成率を100%として細胞生存率を推定した。なお, 無処理対照群のコロニー形成率は単層培養細胞では75~93%, スフェロイドでは67~82%であった。

実験結果の解析: 単層培養細胞, スフェロイドの X 線による線量-生存曲線および単層培養細胞の5-Fu による濃度-生存曲線の解析には, 多標的 1 ヒットモデル⁸⁾を用いた。すなわち, 線量(dose: D)または濃度(concentration: C)における生存率(surviving fraction: SF)は, $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0 \text{ or } -C/C_0})^n$ で表される。片対数方眼紙上で高線量・高濃度領域では生存率と線量, 濃度との関係は直線性を示す。これを縦軸に外挿した値を n, 直線部の生存率を 1/e にする線量を D₀, 濃度を C₀ と表した。また, 低線量・低濃度領域の曲線部分(肩)の大きさは, 最終直線部分を外挿 C, 生存率 1.0 と交わる見かけ上の閾値として D_q, C_q と表した。一方, スフェロイドの5-Fu による濃度-生存曲線では二相性の単純指数関数モデルを用いた。すなわち, $SF = (1-f)e^{-C_1/C_0} + fe^{-C_2/C_0}$ で表される。片対数方眼紙上で生存率と濃度の関係は二相性の曲線を示す。この第2相で縦軸に外挿した値を f, 第1・2相の生存率を 1/e にする濃度を ₁C₀, ₂C₀ と表した。なお, これらのパラメータの計算は最小 2 乗法によって行った。

III 結 果

1. X 線による線量-生存曲線

(1) 5-Fu 処理後 X 線照射(Fig. 1, Table 1)

単層培養細胞: X 線単独では D_q=2.3 Gy と肩を持ち, その後 D₀=1.7 Gy と指数関数的に減少する生存曲線を示した。5-Fu を併用すると D_q の減少が著明で, D_q は 25 μ g/ml の 5-Fu 併用で20%に減少し, 相加以上の効果を認めた。なお, 計算はすべて5-Fu 単独の生存率を1.0として行い, 以後の実験でも同様の方法で生存曲線パラメータを推定した。

スフェロイド: X 線単独では10 Gy 付近に変曲点を持つ二相性の生存曲線を示した。第2相の D₀=4.2 Gy で, 単層培養細胞の D₀ (1.7 Gy) との比は2.5であり, 一般に報告されている酸素効果比の値¹⁰⁾に一致し, さらに低酸素性細胞増感剤 misonidazole (2 mM) の存在下で照射すると第2相が認められないこと(未発表データ)から, スフェロイドの二相性曲線は低酸素性細胞の存在を示すと考えられた。第2相の縦軸への外挿値を便宜上, hypoxic fraction (HF)

Table 1 Survival parameters for various X-ray doses

	Monolayer cells		Spheroids	
	Do (Gy)	Dq (Gy)	Terminal Do (Gy)	Hypoxic fraction
X-ray alone	1.7 (1.0)	2.3 (1.0)	4.2 (1.0)	0.44 (1.0)
5-Fu (5 $\mu\text{g/ml}$) + X-ray	1.6 (0.94)	1.0 (0.43)	4.3 (1.0)	0.19 (0.43)
5-Fu (25 $\mu\text{g/ml}$) + X-ray	1.1 (0.65)	0.46 (0.20)*	3.7 (0.88)	0.054 (0.12)*
X-ray alone	1.7 (1.0)	2.2 (1.0)	4.3 (1.0)	0.42 (1.0)
X-ray + 24 hrs#	1.8 (1.1)	2.1 (0.95)	4.5 (1.0)	0.36 (0.86)
X-ray + 5-Fu (5 $\mu\text{g/ml}$)	1.8 (1.1)	1.9 (0.86)	NT	NT
X-ray - 5-Fu (25 $\mu\text{g/ml}$)	1.4 (0.82)	2.5 (1.1)	5.2 (1.2)	0.34 (0.81)

Numbers in parentheses indicate values relative to X-ray alone (* $p=0.05$). #Trypsinization was done after 24-hour culture. Do is the dose of X-ray that reduces the surviving fraction to e^{-1} in the terminal exponential portion of the survival curve and Dq is the width of the shoulder of the curve. 5-Fu indicates 5-fluorouracil; NT, not tested.

Fig. 1 Survival of monolayer cells (A) and multicellular spheroids (B) X-irradiated after treatment with 5-fluorouracil (5-Fu). A: The Dq was decreased by the combined treatment and the Do was essentially unchanged. Do is the dose of X-ray that reduces the surviving fraction to e^{-1} in the terminal exponential portion of the survival curve and Dq is the width of the shoulder of the curve. B: The fraction of cells resistant to X-irradiation was decreased by this treatment, while the Do in the resistant phase was unchanged. Bars in this and following figures represent standard errors.

HFは5 $\mu\text{g/ml}$ の5-Fu併用で43%に、25 $\mu\text{g/ml}$ の5-Fu併用で12%に減少し、相加以上の効果を認めた。

(2) X線照射後5-Fu処理 (Fig. 2, Table 1)

単層培養細胞: X線単独で照射直後にトリプシン処理したものは、 $Dq=2.2$ Gyと肩を持ち、その後 $Do=1.7$ Gyと指数関数的に減少する生存曲線を示した。また、X線照射後24時間培養後トリプシン処理したものは前記曲線に一致し、X線による潜在的致死的損傷(potentially lethal damage: PLD)からの回復²⁶⁾は認められなかった。5-Fuを併用すると、 Dq , Do ともに変わらず、相加以上の効果を認めなかった。

スフェロイド: X線単独で照射直後にトリプシン処理したものは、12.5 Gyに変曲点を持つ二相性の生存曲線を示し、第2相から $Do=4.3$ Gy, HF=0.42と推定された。また、X線照射後24時間培養後トリプシン処理した場合もPLD回復は認められなかった。5-Fuを併用しても相加以上の効果を認めなかった。

2. 5-Fuによる濃度—生存曲線

(1) 5-Fu処理後X線照射 (Fig. 3, Table 2)

単層培養細胞: 5-Fu単独では $Cq=2.1$ $\mu\text{g/ml}$ と肩を持ち、その後 $Co=13.5$ $\mu\text{g/ml}$ と指数関数的に減少する生存曲線を示した。X線を併用すると、 Cq , Co ともに減少し、相加以上の効果を認めた。

スフェロイド: 5-Fu単独では緩やかに指数関数的に減少する生存曲線を示し、 $Co=59.6$ $\mu\text{g/ml}$ で単層培養細胞の Co (13.5 $\mu\text{g/ml}$)との比は4.4であり、スフェロイドは単層培養細胞に比べ、5-Fuに抵抗性を示した。なお、この実験では一相性であったが、Fig. 4Bのように、他の実験では明らかな二相性の生存曲線を示すことが多かった¹⁴⁾。グリオーマスフェロイドにおける5-Fuの浸透速度は早

の相対尺度として用いると²⁰⁾, HF=0.44で、スフェロイド構成細胞の約40%が低酸素性細胞と考えられた。5-Fuを併用すると、 Do はほとんど変わらないのに対し、

Fig. 2 Survival of monolayer cells (A) and multicellular spheroids (B) X-irradiated before treatment with 5-Fu. A: Neither the D_0 nor the D_q was altered by this treatment combination. B: Neither the fraction of cells resistant to X-ray nor the D_0 in the resistant phase was changed by this treatment. #Trypsinization was done after 24-hour culture.

く、15分ですでに均一に分布することが知られており²³⁾、このことから第2相は5-Fu抵抗性細胞の生存率を示すと考えられ、5-Fu抵抗性細胞を resistant fraction (RF)と表すと、 $RF=0.84\sim 1.1$ で、スフェロイド構成細胞の84～

Fig. 3 Survival of monolayer cells (A) and multicellular spheroids (B) treated with 5-Fu before X-irradiation. A: Both the C_q and C_0 were decreased by this treatment sequence. C_0 is the concentration of 5-Fu that reduces the surviving fraction to e^{-1} in the terminal exponential portion of the survival curve and C_q is the width of the shoulder of the curve. B: The C_0 of the sensitive and resistant phases and the fraction of cells resistant to 5-Fu were decreased by the combination treatment.

100%が5-Fu抵抗性細胞であると考えられた。X線を併用すると、 ${}_1C_0$ 、 ${}_2C_0$ 、RF三者とも減少し、相加以上の効果を認めた。

(2) X線照射後5-Fu処理 (Fig. 4, Table 2)

単層培養細胞：5-Fu単独ではFig. 3Aとほぼ同様の生存曲線を示し、X線を併用しても相加以上の効果を認めなかった。

Table 2 Survival parameters for various concentrations of 5-Fu

	Monolayer cells		Spheroids		
	C_q ($\mu\text{g/ml}$)	C_0 ($\mu\text{g/ml}$)	${}_1C_0$ ($\mu\text{g/ml}$)	${}_2C_0$ ($\mu\text{g/ml}$)	Resistant fraction
5-Fu alone	2.1 (1.0)	13.5 (1.0)	—	59.6 (1.0)	0.84–1.1 (1.0)
5-Fu + X-ray (2.5 Gy)	0.86 (0.41)	8.0 (0.59)**	NT	NT	NT
5-Fu + X-ray (5 Gy)	0.02 (0.01)	4.8 (0.36)**	7.4	28.1 (0.47)*	0.72 (0.72)
5-Fu + X-ray (10 Gy)	NT	NT	3.1	32.8 (0.55)*	0.37 (0.37)
5-Fu alone	4.9 (1.0)	14.9 (1.0)	8.3 (1.0)	56.9 (1.0)	0.84 (1.0)
X-ray (2.5 Gy) + 5-Fu	3.7 (0.76)	12.0 (0.81)	NT	NT	NT
X-ray (5 Gy) + 5-Fu	4.6 (0.94)	9.9 (0.66)	8.4 (1.0)	45.1 (0.79)	0.90 (1.1)
X-ray (10 Gy) + 5-Fu	NT	NT	8.8 (1.1)	55.9 (0.98)	0.97 (1.2)

Numbers in parentheses represent values relative to 5-Fu alone (* $p=0.05$, ** $p=0.01$). C_0 is the concentration of 5-Fu that reduces the surviving fraction to e^{-1} in the terminal exponential portion of the survival curve and C_q is the width of the shoulder of the curve. ${}_1C_0$ and ${}_2C_0$ are the concentrations that reduce the surviving fraction to e^{-1} in each sensitive and resistant cell fraction.

Fig. 4 Survival of monolayer cells (A) and multicellular spheroids (B) treated with 5-Fu after X-irradiation. A: Both the Cq and Co were unchanged by this treatment sequence. B: The Co of sensitive and resistant phases and the fraction of cells resistant to 5-Fu were unchanged by this treatment sequence.

Fig. 5 Surviving fraction of monolayer cells (A) and multicellular spheroids (B) as a function of the duration of 5-Fu treatment before X-irradiation. A: When the cells were treated with 5-Fu for longer than 12 hours, the effect was greater than the combined effect of both treatments alone. B: The effect of the combined treatment was more than additive at 3 hours and peaked at about 8 hours. The broken line represents the surviving fraction normalized to 1.0 by irradiation alone.

スフェロイド：5-Fu 単独では10 µg/mlに変曲点を持つ二相性の生存曲線を示し、X線を併用しても相加以上の効果を認めなかった。

3. 5-Fu による時間一生存曲線

(1) 5-Fu 処理後 X 線照射 (Fig. 5)

単層培養細胞：25 µg/ml の 5-Fu 単独では、12時間処理から生存率の低下を示した。5 Gy の X 線を併用すると、5-Fu 12時間処理後の X 線併用から 5-Fu 単独に比べて急な生存率の低下を示し、以後しだいに効果が増強し、相加以上の効果を認めた。

スフェロイド：25 µg/ml の 5-Fu 単独では、16時間処理からわずかに生存率の低下を示した。8 Gy の X 線を併用すると、5-Fu 3時間処理後の X 線併用ですでに生存率の低下を示し、相加以上の効果を認めたが、この効果は 5-Fu 8時間処理後の X 線併用で最大となり、以後それ以上の増強を認めなかった。

(2) X 線照射後 5-Fu 処理 (Fig. 6)

単層培養細胞：5 Gy の X 線を併用すると、25 µg/ml の 5-Fu 48時間処理でも相加以上の効果を認めなかった。

スフェロイド：8 Gy の X 線を併用すると、25 µg/ml の 5-Fu 10時間処理から生存率の低下を示したが、この効果は12時間処理で最大となり、以後それ以上の増強を認めず、相加以上の効果を認めなかった。

なお、Fig. 5B, 6B は同時に行った実験で、5-Fu 単独の時間一生存曲線は同一のものである。

Fig. 6 Surviving fraction of monolayer cells (A) and multicellular spheroids (B) as a function of the duration of 5-Fu treatment after X-irradiation. A: The curves were parallel. B: The curves were almost parallel.

IV 考 察

5-Fu と X 線の併用の実験結果から、単層培養細胞、スフェロイドともに、5-Fu 処理後の X 線照射で両者がそれぞれ独立に作用した場合の相加効果以上の効果が得られ

た。この結論は、両者が相加的相互作用を持った場合とそれぞれ独立に作用した場合の曲線に囲まれた相加範囲“envelope of additivity”という Steel³¹⁾の提唱する概念を用いても変わらず、相加上(supra-additivity)の範囲に入ることが明らかであった(Fig. 7)。すなわち、図の isobologram では両者併用時の等効果(生存率0.1と0.01)を生じるのに必要なX線線量および5-Fu濃度は相加範囲より明らかに少ない。しかし、単層培養細胞とスフェロイドにおけるX線と5-Fuの併用効果の増強を比較すると、両者に違いがみられた。すなわち、X線による線量—生存曲線においては、5-Fuの併用により単層培養細胞ではDqの減少、スフェロイドではX線に対する抵抗性細胞の減少という形で、また5-Fuによる濃度—生存曲線においては、X線の併用により単層培養細胞ではCq, Coの減少、スフェロイドでは5-Fuに対する抵抗性細胞の減少という形で併用効果が認められた。また、5-Fuによる時間—生存曲線においては、単層培養細胞では5-Fu 12時間処理後のX線併用で初めて相加上の効果が認められ、以後しだいに効果の増強を認めたのに対し、スフェロイドでは5-Fu 3時間処理後のX線併用ですでに相加上の効果が認められ、しかも効果の増強は5-Fu 8時間処理後のX線併用で飽和に達した。このように単層培養細胞とスフェロイドではX線と5-Fuの併用効果の出現機序が異なることが示唆されたので、これに対する考察を行った。

Fig. 7 Isobolograms for X-irradiation at 24 hours after 5-Fu treatment, constructed from Figs. 1 and 3 showing isoeffect levels of surviving fraction at 10^{-2} and 10^{-1} . Envelopes of additivity are exposed by the areas surrounded by curves of independent action and of additive interaction of the two agents. Combined treatment data from Fig. 1 are denoted by triangles and those from Fig. 3 by circles. A: monolayer cells, B: multicellular spheroids.

まず、単層培養細胞では5-Fuを併用したX線による線量—生存曲線でDqの減少が認められた。これは5-Fu処理により細胞の亜致死損傷(sublethal damage: SLD)⁷⁾の蓄積容量が減少したと解釈されるが、その原因としては二つのことが考えられる。まず第1に、X線による損傷と5-Fuによる損傷の相互作用の可能性である。しかし、X線照射後の5-Fu処理ではDqの減少が認められないこと、さらに5-Fu単独による濃度—生存曲線ではCqはわずかに認められるが、 $Cq = (1/n) \times Co$ で外挿値nは実質的に1.0で、5-FuによるSLDはほとんど存在しないと考えられることより、第1の可能性は少ないと考えられる²⁷⁾。次に考えられるのは、長時間の5-Fu処理による細胞周期上の同調の可能性である。5-FuによるG₁/S境界部への細胞の部分同調はヒト癌細胞を用いた実験で報告されており³⁸⁾、一方細胞周期上で放射線感受性の高い細胞はこのG₁/S境界部とG₂およびM期の細胞である³⁵⁾。今回の実験でも5-Fu 12時間処理後のX線併用で初めて相加上の効果が認められており、5-Fu処理により細胞周期上のG₁/S境界部に細胞が部分同調されることがX線と5-Fuの併用効果の出現機序としてもっとも可能性が高いと考えられた。一方、スフェロイドでは5-Fuを併用したX線による線量—生存曲線の高線量域でX線に対する抵抗性細胞の減少が認められ、スフェロイド深層に存在すると考えられる低酸素性細胞²¹⁾が再酸素化されたことが示唆された。種々の実験結果^{4,17,28,32)}より、5-Fuが作用するのはスフェロイド表層の活発に増殖する細胞に限局している¹⁴⁾と考えられる。この状況下でスフェロイド深層の低酸素性細胞の再酸素化が起こる機序として、5-Fu処理により活発に増殖するスフェロイド表層の細胞の単位体積当りの酸素消費量が減少し、そのために深層の細胞にまで酸素が到達する可能性が考えられる。事実、rotenone, antimycin Aなどの細胞の呼吸抑制をきたす数種の薬剤が報告され^{6,13)}、しかも酸素消費量の減少は2～15分ですでに認められている。さらに低酸素領域ではわずかな酸素分圧の上昇が細胞の放射線感受性を著しく高める事実¹⁰⁾も、この推測を裏付けている。

次に、5-Fuによる濃度—生存曲線においては、単層培養細胞ではX線の併用によりCq, Coの減少が認められたが、これも先に述べた5-Fuによる細胞周期上の同調と考えると理解できる。一方、スフェロイドでは第1・2相のCoと5-Fu抵抗性細胞成分の減少が観察された。5-Fuの同調効果はスフェロイド表層の増殖している細胞に限られ、第1相のCoの減少がこれを反映していると考えられる。一方、5-Fu抵抗性細胞成分は84%以上と大きく、そのなかには低酸素性細胞が含まれていると考えられる。先

に述べた再酸素化のことを考慮すると、5-Fu 抵抗性細胞成分に含まれる低酸素性細胞の一部が再酸素化されて新たに放射線感受性を獲得したために、見かけ上 5-Fu 抵抗性細胞成分が減少したと考えられた。

今回の実験では、X 線照射後一定時間を経て 5-Fu を作用させた併用方法については検討していない。しかし、X 線照射後に PLD 回復があるような腫瘍型では、このような併用方法は一般に効果の低減をもたらす。我々の実験系では X 線照射後の PLD 回復は単層培養細胞でもスフェロイドでも認められないので、生存細胞の再増殖の起こらない時間内に 5-Fu 処理を始めれば効果の低下は起こらないと考えられる。一方、X 線照射による細胞周期上の同調は活発に増殖している腫瘍細胞にのみ起こる現象で、一般に腫瘍やスフェロイドにおける 1 回照射後の生存細胞は大部分低酸素性細胞であるので、このような同調は起こりにくく、それによる 5-Fu の効果増強も期待できないと考えられる。

さて、X 線と 5-Fu の併用効果に関して、いくつかの研究結果が報告されている。Nakajima ら²²⁾はマウス L-5 細胞を用いた実験で、5-Fu 処理後 X 線照射、X 線照射後 5-Fu 処理ともに Dq の減少による相乗効果を認め、前者は SLD 蓄積容量の減少により、後者は相互作用によるとしている。しかし一方では、Do は減少するが Dq は減少しないという報告が HeLa 細胞などのヒト癌細胞を用いた実験^{3,5)}で、しかも X 線照射直後に 5-Fu 処理した場合にだけみられている。また動物実験では、リンパ腫細胞を用いて 5-Fu 投与後 14~24 時間で X 線を照射するか、X 線照射後 8 時間以内に 5-Fu を投与した場合に相乗効果が得られたが、後者のほうがより効果が大きかったという報告³⁷⁾や、5-Fu 投与 12 時間前あるいは 12 時間後に X 線を照射して相乗効果が得られたという報告¹⁶⁾がある。このような実験結果の相違は実験系の違いによるものが多いと思われるが、今回の実験のように、もっとも基本的な対数増殖期の単層培養細胞とスフェロイドを対比させて統一的に理解しようという試みは、いまだなされていない。佐々木²⁹⁾は、骨髄、消化管などの活発に増殖する正常組織の放射線に対する標的モデルとして細胞増殖動態や微小環境が似ている増殖の活発な単層培養細胞を、固型腫瘍モデルとして中心部に壊死層を持つスフェロイドを用い、併用療法における放射線の効果増強の程度を比較することによって、正常組織への影響を上回る損傷を腫瘍に与える併用方法を推測する実験方法を提言している。今回の実験では、5-Fu による時間-生存曲線において、単層培養細胞では 5-Fu 12 時間処理後の X 線照射で相加以上の効果が出現し、以後効果は増強しつづけたが、スフェロイドでは 5-

Fu 3 時間処理後の X 線照射ですでに相加以上の効果を認め、効果の増強は 5-Fu 8 時間処理後の X 線照射で飽和に達した。このことは、5-Fu 投与数時間後に X 線照射することにより最大の抗腫瘍効果が期待される一方、正常組織の急性障害¹¹⁾を最小に抑えうる可能性を示唆している。さて、近年、Tegafur の生体内・腫瘍内動態が解明されつつあり、Tegafur は腫瘍細胞中でも 5-Fu に変換されるが、腫瘍細胞中では 5-Fu 分解活性が低いために 5-Fu が蓄積^{24,36)}、正常組織に比べ腫瘍組織に高濃度に 5-Fu が存在する¹⁾ことが明らかになっており、この点からも X 線と 5-Fu の併用は有益な併用療法であると考えられた。

V 結 論

ラットグリオーマ細胞を用い、対数増殖期の単層培養細胞と中心部に壊死層を持つスフェロイドを作製し、この両者を用いて X 線と 5-Fu の併用効果を検討し、以下の結論を得た。

1. 単層培養細胞、スフェロイドともに 5-Fu 処理後の X 線照射で相加以上の効果を、X 線照射後の 5-Fu 処理で相加効果を認めた。
2. 単層培養細胞では 5-Fu 12 時間処理後の X 線照射で相加以上の効果を認め、以後効果の増強を認めたのに対し、スフェロイドでは 5-Fu 3 時間処理後の X 線照射ですでに相加以上の効果を認めたものの、その効果は 5-Fu 8 時間処理後の X 線照射で飽和に達した。

文 献

- 1) 有馬純孝, 木村 守, 志村秀彦: N_1 -(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (FT-207) の直腸内投与による血中臓器内濃度について. 癌の臨 24: 613-617, 1978
- 2) Benda P, Someda K, Messer J, Sweet WH: Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg* 34: 310-323, 1971
- 3) Berry RJ: Effect of metabolic inhibitors on X-ray dose response curve for the survival of mammalian cells in vitro, and on early recovery between fractionated X-ray doses. *Brit J Radiol* 39: 458-463, 1966
- 4) Bruce WR, Meeker BE: Comparison of the sensitivity of hematopoietic colony-forming cells in different proliferative states to 5-fluorouracil. *J Nat Cancer Inst* 38: 401-405, 1967
- 5) Byfield JE, Calabro-Jones P, Klisak I, Kulhanian F: Pharmacologic requirements for obtaining sensitization of human tumor cells in vitro to combined 5-fluorouracil or futraful and X-rays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8: 1923-1933, 1982
- 6) Durand RE, Biaglow JE: Radiosensitization of hypoxic cells of an in vitro tumor model by respiratory inhibitors. *Radiat Res* 69: 359-366, 1977
- 7) Elkind MM, Sutton H: Radiation response of mammalian cells

- grow in culture. 1. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. *Radiat Res* 13: 556-593, 1960
- 8) Elkind MM, Whitmore GF: *The Radiology of Cultured Mammalian Cells*. New York, Gordon and Breach, 1967, pp 7-84
 - 9) 藤田 浩, 小川カツイ, 沢部孝昭, 木村禧代二: N_1 -(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (FT 207) の代謝. 癌の臨 18: 917-922, 1972
 - 10) Gray LH: Oxygenation in radiotherapy. 1. Radiological considerations. *Brit J Radiol* 30: 403-406, 1957
 - 11) Hall T: Acute and chronic toxicity studies with 5-fluorouracil in man. *Proceedings of American Association of Cancer Research*, vol 2. 1958, p 305
 - 12) 片倉隆一, 北原正和, 森 照明, 鈴木二郎: 悪性脳腫瘍の RAFT 療法 radiation, ACNU, FT 207, PS K 併用療法. 第 3 回脳腫瘍懇話会記録集. 1982, pp 41-45
 - 13) Kaufman N, Bicher HI, Hetzel FW, Brown M: A system for determining the pharmacology of indirect radiation sensitizer drugs on multicellular spheroids. *Cancer Clin Trials* 4: 199-204, 1981
 - 14) 北原正和, 片倉隆一, 森 照明, 鈴木二郎, 佐々木武仁: グリオーマに対する ACNU と 5-Fu の併用効果—単層培養細胞と多細胞スフェロイドにおける比較—. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 24: 747-757, 1984
 - 15) 北原正和, 桑原健次, 片倉隆一, 鈴木二郎, 森 照明, 佐々木武仁: 培養グリオーマモデル(スフェロイド)における ACNU と 5-FU の併用効果—作用機序と至適投与法の検討—. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 23 [Suppl I]: 24, 1983
 - 16) Kovacs CJ, Hopkins HA, Evans MJ, Looney WB: Changes in cellularity induced by radiation in a solid tumor. *Int J Radiat Biol* 30: 101-113, 1976
 - 17) Madoc-Jones H, Bruce WR: Sensitivity of L cells in exponential and stationary phase to 5-fluorouracil. *Nature (London)* 215: 302-303, 1967
 - 18) 森 照明, 峯浦一喜, 片倉隆一: Nitrosourea 系抗癌剤 ACNU による悪性脳腫瘍の治療. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 19: 1157-1171, 1979
 - 19) 森 照明, 鈴木二郎: 悪性脳腫瘍の手術と化学療法. 手術 34: 1375-1386, 1980
 - 20) Moulder JE, Rockwell S: 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
 - 21) Mueller-Klieser WF, Sutherland RM: Oxygen tensions in multicell spheroid of two cell lines. *Br J Cancer* 45: 256-264, 1982
 - 22) Nakajima Y, Miyamoto T, Tanabe M, Watanabe I, Terashima T: Enhancement of mammalian cell killing by 5-fluorouracil in combination with X-rays. *Cancer Res* 39: 3763-3767, 1979
 - 23) Nederman T, Calson J, Malmgqvist M: Penetration of substances into tumor tissue. A methodological study on cellular spheroids. *In Vitro* 17: 290-298, 1981
 - 24) 小川輝明, 米田俊之, 作田正義: ヒト上顎癌培養細胞 (OKK) 内における FT-207 から 5-Fu への活性化. 日本癌学会 43 回総会記事. 1984, p 289
 - 25) Phillips HJ: Dye exclusion tests for cell viability, in Kruse PF Jr, Patterson MK Jr (eds): *Tissue Culture — Methods and Applications*. New York, Academic, 1973, pp 406-408
 - 26) Phillips RA, Tolmach LJ: Repair of potentially lethal damage in X-irradiated Hela cells. *Radiat Res* 29: 413-432, 1966
 - 27) 坂本彦彦: 癌の放射線生物学. 東京, 中外医学社, 1978, pp 115-118
 - 28) 佐々木武仁: 放射線治療における癌細胞動態の意義. 癌の臨 27: 1507-1511, 1981
 - 29) 佐々木武仁: 放射線と化学療法の併用における therapeutic ratio—放射線生物学的考察—. 癌の臨 29: 1584-1593, 1983
 - 30) 佐々木武仁: 培養型腫瘍モデル(スフェロイド)の腫瘍生物学研究における利用. 放線生物研 19: 195-208, 1984
 - 31) Steel GG, Pehkam MJ: Exploitable mechanism in combined radiotherapy-chemotherapy: The concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5: 85-91, 1979
 - 32) 杉山 聡, 森 照明, 鈴木二郎, 佐々木武仁: グリオーマ細胞に対する X 線および ACNU の細胞致死効果—単層培養細胞とスフェロイドにおける比較—. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 24: 758-766, 1984
 - 33) 杉山 聡, 森 照明, 鈴木二郎, 佐々木武仁: グリオーマ細胞に対する X 線と ACNU の併用効果—単層培養細胞と多細胞スフェロイドにおける解析—. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 25: 707-714, 1985
 - 34) Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR: Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 46: 113-120, 1971
 - 35) Terashima T, Tolmach LJ: Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature (London)* 190: 1210-1211, 1961
 - 36) 戸田英輝, 采見憲男, 川口安郎, 多比良和基: FT 207 の作用機序に関する研究. *Chemotherapy* 25: 385-391, 1977
 - 37) Vietti T, Eggarding F, Valeriote F: Combined effect of X-radiation and 5-fluorouracil on survival of transplanted leukemic cells. *J Natl Cancer Inst* 47: 865-870, 1971
 - 38) Wheeler GP, Bowdon BJ, Adamson DJ, Vail MH: Comparison of the effect of survival inhibitors of the synthesis of nucleic acids upon the viability and progression through the cell cycle of cultured H. Ep. No. Z cells. *Cancer Res* 32: 2661-2669, 1972
 - 39) Yuhas JM, Li AP, Martinetz AO, Ladman AJ: A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 37: 3639-3643, 1977

[別刷請求先: 〒980 仙台市星陵町1-1, 東北大学脳研脳神経外科, 桑原健次]