

氏 名 (本籍) おか だ しん いち ろう
岡 田 信 一 郎

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 9 4 0 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 6 0 年 9 月 1 1 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
(博 士 課 程) 外 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 ヒト培養肺癌細胞の in vitro における放射線感受
性及び放射線と制癌剤との併用効果に関する研究

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 仲 田 祐 教 授 松 沢 大 樹

教 授 坂 本 澄 彦

論文内容要旨

肺癌の集学的治療の確立とその臨床応用を旨とし、当研究所外科で継代培養しているヒト肺癌細胞11例及び他組織癌細胞2例を用いて *in vitro* における放射線感受性、制癌剤感受性及び放射線と制癌剤との併用効果に関する検討を試みた。

〔実験材料及び方法〕

腫瘍細胞と培養方法：当研究所外科部門で長期間継代しているヒト肺癌細胞11例（腺癌3例，腺扁平上皮癌1例，小細胞癌7例），黒色腫細胞1例，奇型癌細胞1例，計13例を用いた。培地は，RPMI 1640に10%の割合で牛胎児血清を加え，CB-PC 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，SM 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加したものをを用い，7% CO_2 ，37°Cにて培養した。

放射線感受性試験：Plate法及びSoft agar法によった。底面付着増殖型を示す非小細胞肺癌4例，小細胞癌2例，黒色腫，奇型癌各1例，計8例はPlate法で，また，主に浮遊増殖型を示す小細胞癌6例，比較対照としての腺癌，黒色腫各1例，計8例はSoft agar法で感受性を検討した。Plate法—継代5～7日後，ほぼ底面に密生した対数増殖期の細胞を0.25%トリプシン溶液にて単細胞状態にし， $5 \times 10^4/\text{ml}$ の細胞浮遊液を作製した。これらの細胞浮遊液をFalcon社製F3046プレートの各Wellに2 ml ($1 \times 10^5/\text{well}$) ずつ分注し，48時間培養後細胞が底面に付着増殖しはじめたところで，各プレートに100 radsから1000 radsまで100～200 rads間隔で ^{60}Co による γ 線照射を行なった。照射後，37°C，7% CO_2 incubatorで10日間培養し，ついでプレートの各WellをPBSにて1回ゆるやかに洗浄して細胞残渣や浮遊死細胞を取り除いた後，付着生細胞数をHemocytometerにて算定した。Soft agar法—F3046プレートの各Wellに，支持層として1% Bacto agar培地を2.5 ml ずつ分注，室温にてgel化させた後，細胞接種層として $1 \times 10^4/\text{ml} \sim 1 \times 10^5/\text{ml}$ 細胞濃度の0.33% Bacto agar培地を1 ml ずつ分注した。agar培地は，通常の培地と同じくRPMI 1640に10%の割合で牛胎児血清を加えたものをを用いた。ついでプレートに γ 線を照射し，2週間から3週間培養した後，位相差顕微鏡下に細胞数50個以上のコロニー数を算定した。

制癌剤感受性試験：放射線感受性試験と同様のPlate法で行なった。 $1 \times 10^5/\text{ml}$ の細胞をF3046プレートの各Wellにうえ込み，48時間培養後，各薬剤希釈濃度培地液を37°Cにて1時間接触させ，PBSにて3回ゆっくりと洗浄し薬剤を取り除いた。その後，培地を2 ml 加えて1週間培養し，上記と同様に底面付着増殖した細胞をHemocytometerにて算定して生存率を求めた。実験に使用した腫瘍細胞は，肺腺癌2例と黒色腫1例，計3例で，薬剤はDoxorubicin (Adri-

amycin, ADR) と 5-Fluorouracil (5-FU) の 2 剤で、薬剤濃度は、ADR では、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ に、5-FU では、 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ に設定した。

放射線と制癌剤との併用効果：上記の Plate 法と同様に、 $1 \times 10^5/\text{well}$ の腫瘍細胞を F 3046 プレートの各 Well に入込み、48 時間培養後より実験を開始した。用いた腫瘍細胞は肺腺癌 2 例であり、制癌剤の濃度は、ADR $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、5-FU $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ に設定して、1 時間接触とし、 ^{60}Co γ 線照射は 300 rads に設定した。上記感受性試験と同様な操作のもとに、両者を一定間隔を置いて併用投与してその併用効果を検討した。制癌剤と ^{60}Co 照射の投与方法は、制癌剤投与後 ^{60}Co 照射及び ^{60}Co 照射後制癌剤投与の 2 方法で行ない、両者の投与間隔は、直後、24 時間後、48 時間後、72 時間後に設定した。実験開始日より 10 日後に細胞数を算定し、生存率を求めた。上記いずれの実験も各々 3 回施行し、その平均値をもって値とした。

〔 成 績 〕

(1) 肺小細胞癌の大多数は、非小細胞肺癌に比較して明らかに強い放射線感受性を示した。また、非小細胞肺癌（腺癌 3 例、腺扁平上皮癌 1 例）のうちにも、放射線感受性に比較的明らかな相違がみられた。

(2) 肺小細胞癌 6 例中、2 例は特に強い放射線感受性を示し、3 例は中等度の感受性を示したが、1 例は非小細胞肺癌や他組織癌細胞と同程度の強い放射線抵抗性を示した。

(3) 肺腺癌 2 例中、1 例は 5-FU に、1 例は ADR に比較的強い感受性を示したが、黒色腫細胞は、いずれの制癌剤にも強い抵抗性を示した。

(4) ^{60}Co 照射前制癌剤 (ADR, 5-FU) 投与に比べ、 ^{60}Co 照射後制癌剤投与した場合に、より強い併用効果がみられ、約 2 倍の殺細胞効果を示した。

(5) 制癌剤投与後 ^{60}Co 照射群においては、5-FU では、制癌剤投与 48 時間後に ^{60}Co 照射した場合に最も強い感受性を示す傾向がみられたが、ADR では、投与間隔によって明らかな差は認められなかった。また、 ^{60}Co 照射後制癌剤投与群においては、ADR では 24 時間後に、5-FU では 48 時間後に最大感受性を示す傾向がみられた。

審 査 結 果 の 要 旨

肺癌の治療成績を向上させる為には、現在行なわれている治療法の利点を最大限に引き出し、最適な組み合わせのもとに治療を行なうことが肝要である。しかし、このような集学的治療法の確立を目指したヒト培養癌細胞を用いての基礎的な研究は殆んど行なわれていない。

特に、多数のヒト培養肺癌細胞を用いての放射線感受性及び放射線と制癌剤との併用効果の詳細な検討ははまだ見られていない。

著者はこの点を解決すべく11例の株化ヒト肺癌細胞（小細胞癌7例，腺癌3例，腺扁平上皮癌1例）と2例の他組織癌細胞を用いて *in vitro* における放射線感受性及び放射線と制癌剤との種々の投与間隔における併用効果をSoft agar法とPlate法の異なった方法を用いて検討を行なった。

その結果、ヒト肺癌細胞のうちにも、組織型によって大きな放射線感受性の相違がみられ、また肺小細胞癌という同一組織型内でも極めて強い radiosensitivity のみられるものと、一方、他癌細胞と同程度の radioresistant な細胞があることを見出した。従来動物癌細胞を用いた放射線感受性結果では細胞間に殆んど差が見られなかったという多くの報告に反し、ヒト癌細胞自体に本質的な放射線感受性の相違があることを示したものである。

さらに、放射線と制癌剤との併用効果ではADR、5-FUいずれの薬剤でも放射線照射後制癌剤投与した場合に、より強い併用効果がみられたが、その最大の併用感受性効果を示す投与間隔は、ADRでは24時間後、5-FUでは48時間後にあり、薬剤の相違により放射線と制癌剤との最大併用効果を示す投与間隔が異なっていることを見出した。これは、使用細胞による差がみられなかったことより、制癌剤の作用機序の相違によるものとみなすことができ、このデータを直接肺癌の集学的治療に導入し得るものと考えられる。

著者の論文は、充分学位論文に値するものと考ええる。