

氏 名	かく 郭 国 禎
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1674 号
学位授与の日付	平 成 11 年 1 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Simultaneous evaluation of radiation-induced apoptosis and micronuclei in five cell lines

(放射線照射後のアポトーシスと微小核頻度の同時評価による細胞生存率の予測法に関する研究)

(主査)

論文調査委員 教授 丹羽太貴 教授 西川伸一 教授 平岡真寛

論 文 内 容 の 要 旨

目的：放射線治療において腫瘍細胞の放射線感受性予測法の開発は、放射線治療の結果予測ばかりでなく、放射線治療方法選択の理論的根拠を与えることができるため盛んに行われて来た。この結果、多くの方法が提案されているが、いまだ十分な方法は開発されていない。微小核形成試験は簡便性および迅速性が高く頻用される方法の一つであり、放射線照射後の微小核の形成頻度と細胞生存率の間には密接な関連が報告されている。しかし、一方では例外も多く報告されている。微小核の形成は DNA の障害の指標であるが、放射線照射後には必ずしも DNA の障害による分裂死ばかりでなく、アポトーシスによる細胞死が存在する。本研究は、放射線照射後の微小核形成頻度とアポトーシスの関連、およびこれらと細胞生存率の関連を検討し、より正確な細胞の放射線感受性予測方法を開発することを目的とする。

方法：使用した細胞は3種類のヒト由来腫瘍細胞（DU-145細胞，C0LO320DM細胞，SHIN-3細胞）および齧歯類由来の細胞2種類（CHO-k1細胞，F9細胞）である。いずれの細胞も、in vitroで単層を形成し増殖する。放射線照射は対数増殖期の細胞に対して行った。微小核形成試験法は、放射線照射後サイトカラシンBを細胞培養液に添加し（0.51 μ g/ml）37℃で培養を続ける。この濃度のサイトカラシンBは、細胞核の分裂は阻害しないが細胞質の分裂は阻害するので、分裂期を通過した細胞を簡単に鑑別できる。一定時間後に、細胞をメタノール酢酸液で固定し、PI染色後蛍光顕微鏡下に2核（1回分裂期を通過した）細胞における微小核の頻度を測定した。アポトーシスは、細胞を照射一定時間後に固定後、TUNEL法にて検出した。全付着細胞数にたいするTUNEL法陽性付着細胞をアポトーシス細胞の頻度とした。細胞生存率は通常のコロニー法で求めた。

結果：コロニー法で求めた5種類の細胞の放射線感受性にはわずかな差異を認めるのみであった。微小核の形成頻度は3種類の細胞（SHIN-3，DU-145，CHO-k1細胞）では放射線線量に依存して増加した。この3種類の細胞では、細胞の種類を問わず微小核形成頻度と細胞生存率の間に強い相関関係を認めた（ $r^2=0.88$ ）。他の2種類の細胞では先の3種類の細胞より微小核形成頻度が有意に少なく、また細胞生存率との関係も大きく異なっていた。放射線照射後のアポトーシスは微小核の形成が少なかった2種類の細胞で著明に認められ、その頻度も放射線照射線量に依存して増加した。一方微小核形成頻度の高い細胞では、アポトーシスと細胞生存率に有意な関連を見いだせなかった。

考察：本研究により、放射線照射後の微小核形成頻度は細胞の種類に依存し、アポトーシスを引き起こしやすい細胞では微小核の形成頻度が低いことが明らかにされた。微小核は細胞分裂時に形成されるため、アポトーシスにより細胞分裂以前に細胞死が起これば微小核形成頻度が低くなることが示唆される。またアポトーシスの頻度のみでも細胞生存率は予測困難であることが示された。従って、微小核形成試験単独あるいはアポトーシスの測定単独では、細胞の放射線感受性予測法としては不十分で両者を適切に組み合わせて利用することが重要と考えられた。

結論：ヒト腫瘍の放射線感受性を予測する方法としては、微小核形成試験は全ての細胞には有用でなく、アポトーシスの測

定を同時に併用すべきと結論された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、放射線照射後の微小核形成頻度とアポトーシスの関連、およびこれらと細胞生存率の関連を検討し、より正確な細胞の放射線感受性予測を開発することを目的として行われた。

3種類のヒト由来腫瘍細胞および2種類の齧歯類由来細胞を使用し、放射線照射後の細胞生存率、微小核形成頻度およびアポトーシス頻度を測定し以下の結果を得た。

1. 微小核形成頻度は3種類の細胞で放射線線量に依存して増加し、この細胞では微小核形成頻度と細胞生存率の間に強い相関関係を認めたが、他の細胞ではこの関係が明らかではなかった。
2. 放射線照射後のアポトーシスは微小核の形成が少なかった2種類の細胞で著明に認められた。従って、微小核形成頻度単独、あるいはアポトーシス頻度単独では、細胞の放射線感受性予測法としては不十分であり、両者を適切に組み合わせて利用することが重要と考えられた。その方法として、両因子の単純加算より重回帰分析の手法を用いるとより正確に求められることが明らかになった。

以上の研究は放射線照射後の細胞死の形式の解明に貢献し、放射線照射後の細胞生存率予測方法の確立に寄与するところが多い。

したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年12月18日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。