

Title	炭素粒子線のヒト培養細胞に対する細胞致死効果
Author(s)	柯, 偉傑; 伊東, 久夫; 茂松, 直之 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1996, 56(9), p. 669-673
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17024
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

炭素粒子線のヒト培養細胞に対する細胞致死効果

柯 偉傑¹⁾ 伊東 久夫¹⁾ 茂松 直之¹⁾ 山下 昌次¹⁾
久保 敦司¹⁾ 金井 達明²⁾

1) 慶応義塾大学医学部放射線科学教室 2) 放射線医学総合研究所医用重粒子物理・工学研究部

Biological Effect of Carbon Beams on Cultured Human Cells

Wei-Jei Ka¹⁾, Hisao Ito¹⁾,
Naoyuki Shigematsu¹⁾, Shoji Yamashita¹⁾,
Atushi Kubo¹⁾ and Tatsuaki Kanai²⁾

This study was performed to determine the biological effect of carbon beams on 13 human tumor cells, in comparison with 200 KVp X-rays. Carbon beams were generated by the Riken Ring Cyclotron. The RBE (relative biological effectiveness) values were distributed from 1.46 to 2.20 for LET of 20 keV/ μ m, and 2.29-3.54 for 80 keV/ μ m. The RBEs were increased in all cell lines as the LET of carbon beams was increased from 20 to 80 keV/ μ m. There was no significant difference in radiosensitivity between cells from adenocarcinoma and those from squamous cell carcinoma. The relationship between the radiosensitivity of cells to X-rays and RBE was analyzed, but no significant correlation was suggested. Several survival curves of 20-40 keV/ μ m carbon beam irradiation showed the initial shoulders and the recovery ratios between two split doses were determined. Recovery was observed for LET of 20 keV/ μ m but not for that of 40 keV/ μ m. Furthermore, recovery ratios were 1.0-1.8, smaller than those for X-rays (1.5-2.4).

Research Code No. : 402.2

Key words : Carbon beam, Relative biological effectiveness,
Linear energy transfer, Human tumor cells

Received Jun. 19, 1995; revision accepted Dec. 19, 1995

1) Department of Radiology, Keio University School of Medicine
2) Division of Accelerator Research, National Institute of Radiological Science

はじめに

癌治療において放射線療法は手術療法、化学療法とともに重要な治療法の1つであるが、腫瘍によっては従来のX線による放射線治療では効果が期待しにくいものもある。最近の研究では同一臓器に発生した同一組織型の腫瘍でも、腫瘍毎にX線に対する放射線感受性が異なることが報告され¹⁾、放射線感受性の低い腫瘍では治療法に窮することもある。放射線増感剤や化学療法剤の併用による、腫瘍の放射線治療効果改善の試みが行われる²⁾とともに、X線以外の放射線による治療も試みられるようになってきた。これまでに利用された放射線には、中性子線³⁾、陽子線⁴⁾、パイ中間子線⁵⁾がある。中性子線は生物学的作用がX線と異なり、RBEが大きく酸素効果の影響を受けにくい。陽子線は生物学的効果はX線と同様であるが、線量分布に特徴があり、腫瘍に局限して照射できる。昨年より放医研で中性子線と類似した生物学的効果を持ち、陽子線と類似した線量分布を示す重粒子線治療も可能となり、臨床試行が行われている。今回、理化学研究所のリングサイクロトロンにより加速された重粒子線の1種、炭素粒子線をヒト由来の細胞に照射し、生物学的効果を検討する機会に恵まれ、若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

1. 培養細胞

本実験には、13種類のヒト由来培養細胞を用いた⁶⁾。扁平上皮癌由来細胞としては、A43.1, TE2, TE5, TE1, NA, SKG III b2の6種類、腺癌由来細胞として、RMG I, RMG II, HEC, RTSG, SNG II, SNGM, HeLaの7種類である。継代培養、実験に用いた細胞のいずれも、37°C、5%炭酸ガス培養器の中で静置培養した。細胞には10%牛胎児血清(Gibco)添加F-10培地(Gibco)を用いた。コロニーの形成には、Coster 組織培養用シャーレ(3060)を使用した。

2. 生存曲線

生存曲線の作成は10⁶個の細胞をnunc培養瓶(52094)に播種し、2日間培養後対数増殖期にある細胞を用いた。1回照

射の場合は照射後約1時間0°Cに保ち(理化学研究所より移送し処理するまでに要する), トリプシン処理により単離細胞浮遊液を作成し, シャーレあたりのコロニー数が50-100になるように適当数をシャーレに移した. 7-9日間37°C, 5%炭酸ガス培養器で静置培養後, 0.5%クリスタルバイオレットにより染色し, 細胞数50個以上のコロニーを算定した.

分割照射の場合は, 1回照射に用いた線量と同一線量を均等2分割し, 3-3.5時間の間隔で照射した. 最終照射終了後約1時間0°Cに保ち, トリプシン処理により単離細胞浮遊液を作成し, 上記の方法に従って生存率を求め生存曲線を作成した. 一回照射, 分割照射に対する生存曲線からDo値, n値, RBE(relative biological effectiveness)を算出して指標とした. RBEはX線と炭素粒子線照射によって1%生存率を得る線量を生存曲線上求め, X線の線量を炭素粒子線線量で割って求めた. 分割照射時の回復係数は, 生存率1%における1回照射と, 分割照射の線量の比較から算出した.

各実験点の算出には4-5枚のシャーレを使用し, 実験は2回以上繰り返した.

3. 放射線照射

照射にはX線あるいは炭素粒子線を用いた. X線照射は200KVp, 20mAのX線(島津製信愛号, 1.5mm Al filter)を線量率0.8Gy/minで用いた. 粒子線としては理化学研究所のリングサイクロトロンで加速された135MeV/n炭素粒子線を用いた. リングサイクロトロンで加速された粒子線は, 水中表面から40mmの深さの範囲で20-100keV/μmのLETを与えることができる. 炭素粒子線の線量測定は, プラスチックシンチレータによるフルエンス測定と, 電離箱のモニターによるBraggピーク測定で行った⁷⁾. 粒子線照射装置および細胞照射装置は, 大原・金井により作製されたものを用いた^{7), 8)}. すなわち, 本検討では総て単一LET炭素粒子線を用いたが, 各種の厚みのルサイト板を通過させ, 吸収体の厚み

を変えることにより目的とするLETの粒子線を得た. 照射装置は培養瓶を垂直に立て, 横に6本並べた. 細胞面は照射口側に向け, 目的のLETの粒子線が照射されるようになっている. 1回の照射で培養瓶1本を照射し, 照射が終わった培養瓶は自動的に照射野から横にずれて, 次の瓶が照射されるようになっている.

いずれの場合も照射は室温で行った.

結 果

1. 各種LETにおける生存曲線

リングサイクロトロンによる135MeV/n炭素粒子線は, 各種の厚みを持つルサイト板を通過させ, 吸収体の厚みを変えると, 各種LETの粒子線を得ることができる⁷⁾. TE5とA43.1細胞を20, 40, 80keV/μm炭素粒子線で照射した場合の生存曲線を, 200KVp X線照射時の生存曲線とともにFig.1に示した. 何れの細胞も炭素粒子線を照射すると生存曲線が左方に移動し, 曲線の傾きが急峻になった. TE5細胞は炭素粒子線で照射すると, 比較的低いLETの20keV/μmでも生存曲線の肩が消失していた. 一方, A43.1細胞は炭素粒子線照射により生存曲線の左方移動は認められたが, 20-80keV/μmの何れのLETにおいても生存曲線に肩が見られた. 高LET炭素粒子線に対する反応は全ての細胞に一律ではなく, 細胞により多少効果が異った.

13種のヒト培養細胞に対して, X線と20keV/μm, 80keV/μmの炭素粒子線を照射した場合の生存曲線をFig.2に示した. 200KVp X線の照射では, 放射線感受性が一番低いA43.1細胞と感受性が高いHEC細胞は, Do値がそれぞれ2.43Gyと0.95Gyになった. 20keV/μm炭素粒子線を照射した場合, 最も感受性が低い細胞はA43.1, 高い細胞はSNGMであった. しかし, それぞれのDo値は1.37Gyと0.60Gyとなり, X線照射に比べて両者の差が小さくなった. さらに,

80keV/μmの炭素粒子線では, 最も感受性の低い細胞はA43.1, 高い細胞はHECとなり, X線や20keV/μm炭素粒子線とは異なる感受性の順位となった. この時の感受性が最小と最大の細胞のDo値は0.78Gyと0.40Gyで, 両者の差は20keV/μm炭素粒子線の時より, さらに小さくなった. Fig.2で実線は扁平上皮癌由来の細胞, 点線は腺癌由来の細胞を示しているが, Do値, n値, 炭素粒子線に対する感受性で, 両者の間に明らかな差は見られなかった.

生存曲線の肩を見ると, X線では全ての細胞に肩が認められるが, 20keV/μm炭素粒子線では5

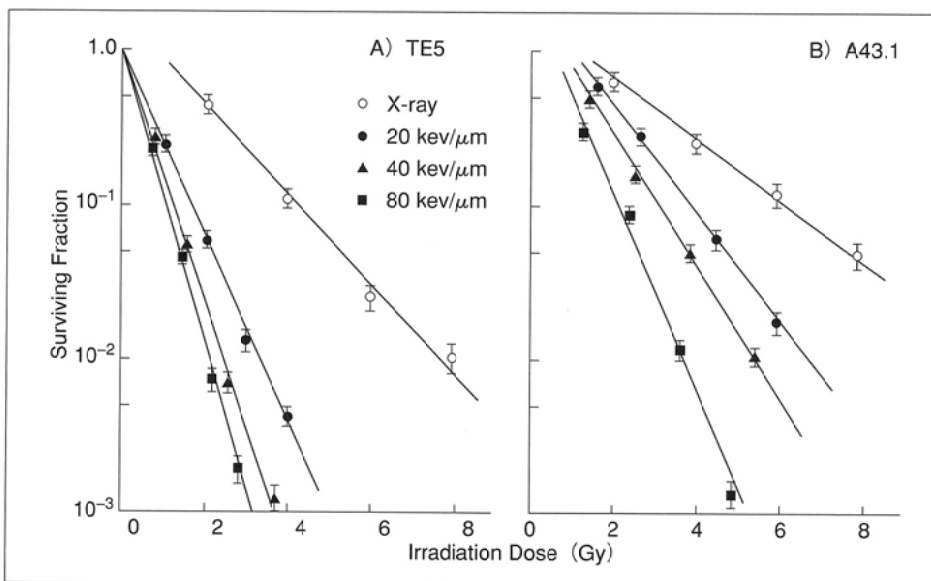


Fig.1 Survival curves of TE5 and A43.1 cells on the proliferative phase irradiated in air with 200KVp X-ray (○), 20keV/μm (●), 40keV/μm (▲) or 80keV/μm (■) carbon beams.

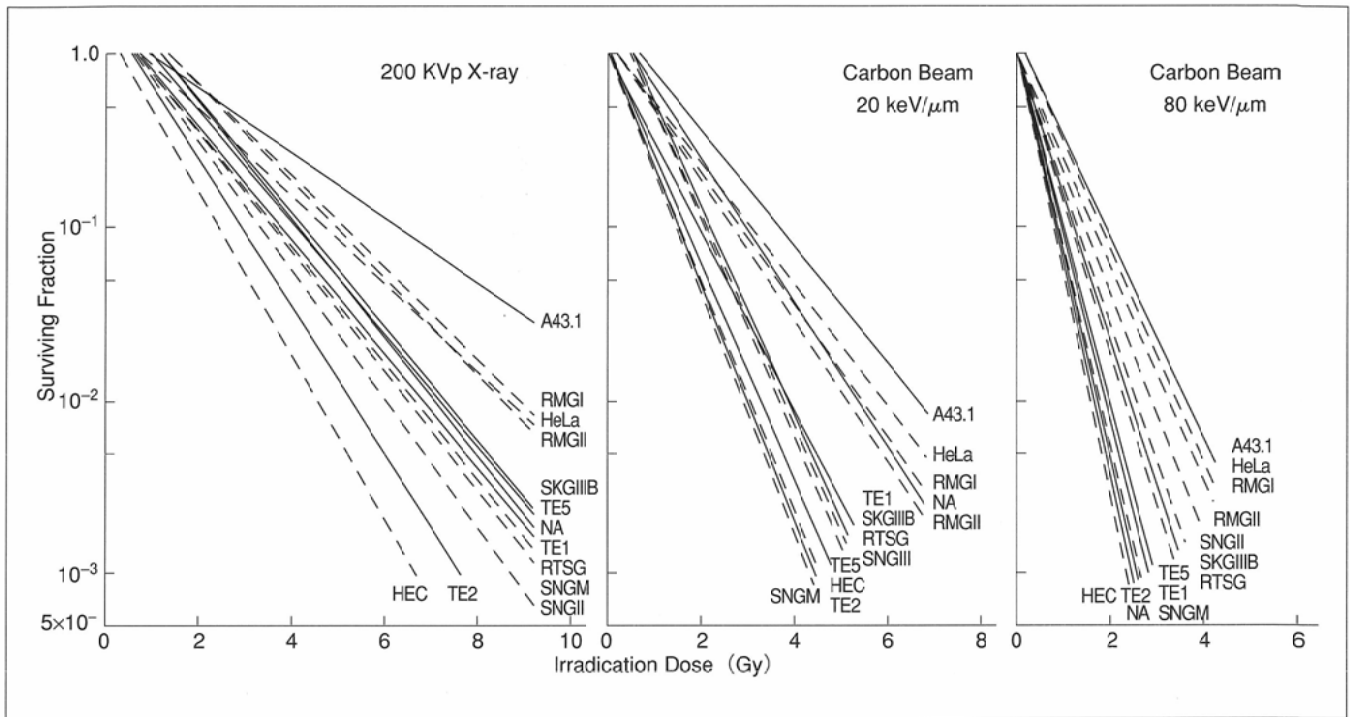


Fig.2 Survival curves of 13 human cell lines those were irradiated with 200KVp X-rays, 20keV/μm, and 80keV/μm carbon beams. Solid lines: cells from squamous cell carcinoma; dashed lines : those from adenocarcinoma.

種類の細胞に肩が見られなくなった。80keV/μmではHeLaとA43.1細胞にまだ肩がみられたが、それ以外の細胞では肩が消失した。

2. ヒト培養細胞のRBE

それぞれの細胞に炭素粒子線を照射した時のRBE値をTable 1に示した。本実験に用いた細胞は何れもn値が小さく肩が小さいため、生存率1%になるX線の線量と炭素粒子線の線量を比較してRBEを算出した。20keV/μmではRBEはTE 5細胞が最大で2.20となった。一方、感受性の高いHEC細胞がRBE最小で1.48となった。80keV/μmの場合はTE 5細胞が最大のRBE3.54を示し、最小はSNG II細胞の2.35であった。LETが大きくなるとRBEも上昇したが、ヒト培養細胞は細胞株毎にかなりの差異が見られ、炭素粒子線に対する反応を一概に論じることはできなかった。また、腺癌と扁平上皮癌由来細胞で比較すると、両者間に明らかな差異は見られなかった。

Fig.3はX線照射で得られた生存曲線から求めたDo値、およびn値とRBEの関係を示している。X線照射による細胞の放射線感受性とRBE値の間には何らの関連も見られず、X線に対する放射線感受性から炭素粒子線に対する感受性を予測することは困難であった。

3. 分割照射時の回復

20keV/μm炭素粒子線照射で得ら

れた生存曲線には肩が見られたため、均等2分割照射による回復を検討した。分割照射時の間隔は各種時間で検討し、最大の回復を求めるのが基本であるが、サイクロトロンマシン時間との兼ね合いで、3-3.5時間間隔でしか検討することができなかった。したがって、X線照射の場合の回復の検討も、炭素粒子線照射と同様に3-3.5時間で行った。各細胞における回復係数をTable 2に示した。X線2分割照射による回復係数は、SNG II細胞の1.5から A43.1細胞の2.4の間に分布した。20keV/μm炭素粒子による分割照射の場合、HEC細胞のみ回復を示さなかったが、その他の細胞は多少の回復を示し、最大はA43.1細胞の係数1.4であった。

Table 1 Do, n Values and RBE of Each Cell Line

Cells	200KVp X-ray		RBE		
	Do (Gy)	n	20keV/μm	40keV/μm	80keV/μm
HEC	0.95	1.35	1.48	1.90	2.42
SNGII	1.23	1.80	1.65	-	2.35
RTSG	1.33	1.70	1.75	-	2.75
SNGM	1.33	1.60	2.07	-	3.44
HeLa	1.87	1.35	1.46	1.80	2.29
RMGI	1.63	2.50	1.55	2.10	2.55
RMGII	1.75	2.15	1.73	-	2.94
TE2	1.03	2.00	1.71	-	3.17
TE1	1.40	1.40	1.80	-	3.42
TE5	1.38	1.70	2.20	-	3.54
SKGIII B	1.37	2.60	1.88	-	2.93
A431	2.43	1.45	1.75	2.24	3.12
NA	1.53	1.90	1.60	-	3.30

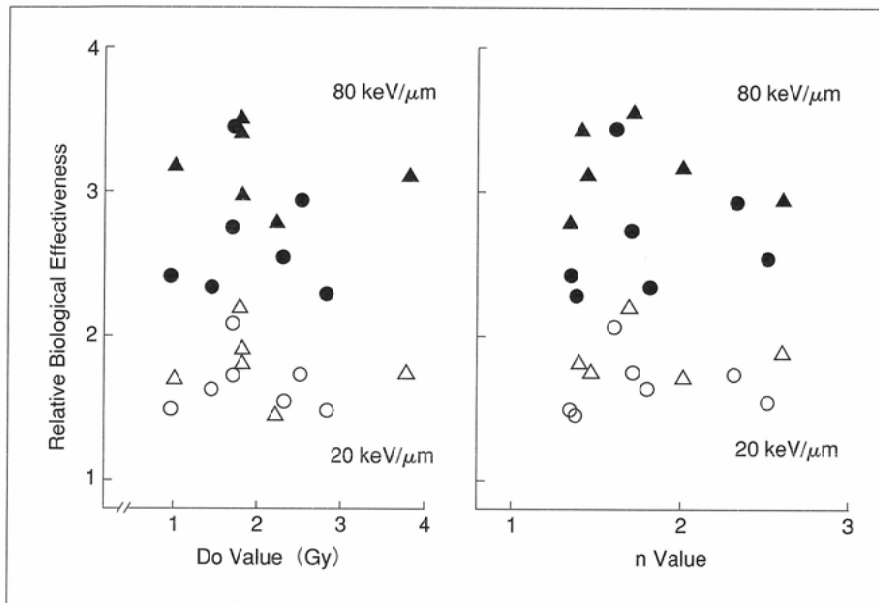


Fig.3 Relationship between relative biological effect (RBE), and Do value (left panel) and n value (right panel). Open symbols: irradiated with 20 KeV/μm carbon beams; closed symbols: 80keV/μm; (○●): cells from adenocarcinoma; (□■): cells from squamous cell carcinoma.

40keV/μm炭素粒子線を用いて同様の実験を行ったが、この場合は何れの細胞でも回復が見られず、回復係数は1となった。すなわち、炭素粒子線でもLETの低いところでは回復が見られたが、40keV/μm以上では分割照射時の回復を認めなかった。

考 察

放射線治療はX線の生物学的作用の解明により照射分割法が改善され⁹⁾、またCTの導入後は腫瘍の局在診断が正確に行われ、適切な線量分布が得られるようになり¹⁰⁾著しく進歩してきた。しかし、X線の腫瘍や正常組織に対する作用機序や感受性が明確になるにつれ、X線を治療に用いた場合は克服できない問題も明らかになってきた。腫瘍に存在する低酸素細胞へのX線の効果、分割照射時の回復、腫瘍固有の放射線感受性等の因子である¹¹⁾。

従来のX線治療では十分な成果が期待できない腫瘍には、X線と異なる生物学作用を持つ中性子線による治療が行われ

たが、治療結果は特定の部位の腫瘍を除いて必ずしも十分満足できるものではなかった¹²⁾。その原因として中性子治療施設が放射線治療専用施設として、十分な治療を行えるように設計されていなかったことや、中性子治療がX線より優れていると考えられる患者の選択が十分でなかったと考えられている¹³⁾。陽子線は放射線の生物学的作用はX線とほぼ同様だが、線量分布に特徴がある。腫瘍に局限して高線量を照射できるという特長を生かし、良好な腫瘍制御効果が報告されている³⁾。現在放医研で臨床試験が進められている重粒子線治療は、中性子線の持っていた低い酸素効果および高いRBEと、陽子線の持つ線量分布を兼ね備えていると考えられ、まだ症例数は少ないが予想以上の治療効果とされている¹⁴⁾。

本研究では、理化学研究所のリングサイクロトロンにより加速された重粒子線(炭素粒子線)を用いて、ヒト培養細胞に対する効果を検討した。135MeV/nの炭素粒子線を細胞に照射すると、本実験で用いたLET20-80keV/μmの間ではLETの上昇とともにRBEが増加し、LETとRBEの関係は従来報告されている結果と同様になった¹⁵⁾。一方、本検討は13種類のヒト培養細胞の検討でしかないが、本実験に用いた細胞のX線感受性とRBEの間には、明らかな関係は認められず、細胞のX線感受性から炭素粒子線に対する感受性を予測することはできなかった。さらに、腺癌細胞と扁平上皮癌細胞の間にもRBEに差異はなく、腺癌細胞に対して炭素粒子線が有用であるとの結果も得られなかった。しかしX線照射の場合、培養細胞では腺癌細胞と扁平上皮癌細胞の間に放射線感受性の差異が無くても、臨床的には腺癌の放射線感受性が低い。したがって、実際の腫瘍を炭素粒子線で照射した場合、固形腫瘍では感受性に差異が生じるかもしれない。

炭素粒子線でもLETが20keV/μmのように低い領域では生存曲線上肩を示し、分割照射を行うとHEC細胞以外は回復が見られた。ただ、この回復率はX線の場合より小さくなった。RMGI細胞とHeLa細胞を用いて、X線照射時の回復を分割照射の間隔で検討すると、何れの細胞でも回復は3時間以内にほとんど最大値に達していた⁸⁾。炭素粒子線では3-3.5時間間隔でしか実験できなかったが、X線と同様な機序で回復していると考えれば、ほぼ最大の回復を示していると思われる。

炭素粒子線治療を行う場合、ブラ

Table 2 Recovery Ratio of Each Cell Line

Cells	Do (Gy) 200Kvp X-ray	n	Recovery ratio		
			200Kvp X-ray	20keV/μm	40keV/μm
HEC	0.95	1.35	1.8	1.0	1.0
SNGII	1.23	1.80	1.5	1.1	-
RTSG	1.33	1.70	1.8	1.2	-
RMGI	1.60	1.30	2.0	1.3	1.0
HeLa	1.87	1.35	2.4	1.2	1.0
TE2	1.03	2.00	1.6	1.3	-
SKGIIIB	1.37	2.60	1.6	1.2	-
A431	2.43	1.45	2.4	1.8	1.0

ックピークを拡大して腫瘍を十分含めるようにすると、標的容積内の平均LETはブラックピークより低くなる。炭素粒子線を使用する場合、LETが40keV/μm以上であれば分割照射による回復が起こらないため、分割照射による腫瘍での回復を無視できる。一方、照射容積に含まれる正常組織・臓器は、線量分布の特徴から、照射線量とともにLETも標的組織より、低くなると考えられ、分割照射時に回復が起こる可能性が高い。さらに一回線量を小さくした方がRBEは大きくなることが指摘されており¹⁶⁾、粒子線照射でも分割照射の方が治療効果が良くなる可能性がある。本実験に用いた細胞はすべてヒト固形癌由来であり、正常組織由来の細胞では回復がどの程度起こるか不明である。マウスの皮膚をネオン線のSOBP(spread-out Bragg peak)で照射した場合、24時間間隔での回復は1.1程度とされている¹⁷⁾。したがって、重粒子線治療は陽子線と同様に、標的容積に局限した治療が可能であるが、陽子線治療と異なり照射容積での障害は、分割照射により軽減される可能性がある。粒子線治療は照射野の先端における線量消滅が優れている点を考慮して、標的容積が体内深部の場合、放射線抵抗性の高い正常組織・臓器側より照射することが提唱されている¹⁸⁾。重粒子線治療ではさらに分割照射時の回復も加味して、照射方向を決定する必要があると考えられる。

ま と め

ヒト固形癌由来培養細胞に200KVp X線と理研リングサイクロトロンにより加速された炭素粒子線を照射し、生存曲線からRBEとLETの関係を検討した。LET20-80keV/μmの間ではLETの増加とともに、いずれの細胞でもRBE(生存率1%)は増大し、LET20keV/μmでは1.46-2.20、80keV/μmでは2.29-3.54となった。腺癌と扁平上皮癌由来細胞の間に明らかなRBEの差異は見られなかった。X線に対する放射線感受性から炭素粒子線に対する感受性を予測するため、X線に対する感受性とRBEの関係を検討したが、明らかな関係はみられなかった。20-40keV/μmでは生存曲線上肩が認められたため、3-3.5時間間隔の均等2分割照射による回復を検討した。分割照射時の回復係数はX線では1.5-2.4であったが、20keV/μm炭素粒子線は1.0-1.8で、X線照射時より小さな値となり、40keV/μm以上では明らかな回復は見られなかった。

本研究の一部は文部省科学研究費、資生会研究助成金および伊藤テルミー研究助成金によったことを記して謝意を表します。

文 献

- 1) Wasserman TW, Siemann D, Workman P (eds): The seventh international conference on chemical modifiers of cancer treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22(2,3), 1992
- 2) Griffin TW, Wambersie A, Laramore G, et al: High LET: Heavy particle trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14: 583-592, 1988
- 3) Castro JR, Quivey JM, Lyman JT, et al: Current status of clinical particle radiotherapy at Lawrence Berkeley Laboratory. *Cancer* 46: 633-641, 1980
- 4) Suit HD (ed): NCI proton workshop: Potential clinical gains by use of superior radiation dose distribution. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22(2), 1992
- 5) Smith PA, Raciotti MA, Richman C: Treatment planning for negative pimeson radiation therapy: UNM-LASL experience. *Int Radiat Oncol Biol Phys* 3: 307-314, 1977
- 6) 鈴木利光, 関口守正, 野沢志朗 著編: ヒトがん細胞株とその特性. 中外医学社, 全編, 1992
- 7) Ohara H, Kanai T, Ando K, et al: Studies on physics and biology of carbon beams of Riken and NIRS. *Proceedings of the NIRS International Workshop on Heavy Charged Particle Therapy and Related Subjects*. July 4-5, 1991, Chiba Japan, p.13-22
- 8) 竹政和彦, 伊東久夫, 西口 郁, 他: 単層培養細胞の増殖速度が分割照射後の細胞生存におよぼす影響. *日癌治* 27: 1750-1757, 1992
- 9) Fowler JF: What do we need to know to predict the effectiveness of fractionated radiotherapy schedules? (In) Paliwal BR, Fowler JF, Herbert DE, Kinsella TJ and Orton CG (eds): Prediction of response in radiation therapy. p.1-24, 1989, American Institute of Physics, New York
- 10) Hellman S: Principles of radiation therapy. (In) Devita VT, Hellman S and Rosenberg SA (eds): *Cancer Principles and Practice of Oncology* (3rd ed). p.247-253, 1989, Lippincott company, New York
- 11) Bewley DK: Particle Therapy: Physics and biology (In) Bleehen NM (ed): *Radiobiology in Radiotherapy*. p.129-135, 1988, Springer-Verlag, London
- 12) Fowler JF: Heavy particle in radiotherapy. (In) Steel GG, Adams GE, Horwich A (eds): *The Biological Basis of Radiotherapy* (2nd ed). p.249-266, 1989, Elsevier, Amsterdam
- 13) Maor MH: Fast neutron therapy: Problems and promise. (In) Withers HR and Peters LJ (eds): *Innovations in Radiation Oncology*. 279-287, 1988, Springer-Verlag, Berlin
- 14) 辻井博彦: 私信
- 15) Hall EJ: LET and RBE. (In) *Radiobiology for the radiologist* (3rd ed.). Lippincott company, London, 1988, p.161-178
- 16) Chapman JD, Blakely EA, Smith KC, et al: Radiation biophysical studies with mammalian cells and a modulated carbon ion beam. *Radiat Res* 74: 101-111, 1978
- 17) Leith JT, Woodruff KH, Howard J, et al: Early and late effects of accelerated charged particles on normal tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 3: 103-108, 1977
- 18) Brahme A, Kallman P and Lind B: Optimization of the probability of achieving complication free tumor control using a 3D beam scanning technique for proton and heavy ions. *Proceedings of the NIRS International Workshop on Heavy Charged Particle Therapy and Related Subjects*. July 4-5, 1991, Chiba, Japan, p.125-141.