



Title	X線および重粒子線照射による遺伝子突然変異-培養細胞における検討-
Author(s)	戸矢, 和仁; 茂松, 直之; 伊東, 久夫 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1996, 56(11), p. 736-740
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18285
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

X線および重粒子線照射による遺伝子突然変異 —培養細胞における検討—

戸矢 和仁¹⁾

茂松 直之¹⁾

伊東 久夫¹⁾

山下 昌次¹⁾

久保 敦司¹⁾

金井 達明²⁾

1)慶應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・工学研究室

Mutation Induction by Heavy Ion Beams and X-rays: Analysis with cultured cell line

Kazuhito Toya¹⁾, Naoyuki Shigematsu¹⁾, Hisao Ito¹⁾, Shoji Yamashita¹⁾, Atsushi Kubo¹⁾ and Tatsuaki Kanai²⁾

This study was performed to determine the biological effects of heavy ion beams on cultured cells. V79 cells were irradiated with carbon or neon beams or X-rays, and cell survivals were calculated by the colony assay method. The D₀ values for 150 kVp X-rays, 20 keV/ μ m and 80 keV/ μ m carbon beams, and 80 keV/ μ m neon beams were 2.2Gy, 1.8Gy, 1.0Gy and 1.4Gy, respectively. After 7-10 day expression periods, the mutation frequencies at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (hprt) locus were analyzed from the numbers of colonies formed in media supplemented with 6-thioguanine. An extremely higher frequency of mutation was observed with heavy ion beams compared with X-rays. Both cell killing effect and the mutation induction were enhanced when the LET of carbon beams was increased from 20 to 80keV/ μ m. These results mean that carbon beams had a stronger cell-killing effect than X-rays, but also carried a high risk of mutation induction. On the other hand, neon beams yielded cell survival curves similar to those of carbon beams, but they had a smaller mutation induction effect than carbon beams. The effect of fractionated irradiation (3 hr interval) on cell survival and mutation frequency were also examined. When cells were irradiated with X-rays, cell survival was increased by fractionation, but the mutation frequency was not modified. Irradiating cells with fractionated carbon beams, survival curves were not affected, but mutation frequency was reduced.

Research Code No. : 402.2

Key words : Heavy particles, Relative biological effectiveness, Cultured cells, Mutation

Received Aug. 29, 1995; revision accepted Feb. 20, 1996

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治療の役割は拡大してきているが、放射線治療の最大の欠点は、正常組織にも障害が発生するため照射線量に限界があることで、従来のX線による放射線外照射治療だけでは腫瘍の消失が期待できない場合が多い。腫瘍に高線量の放射線を照射する試みとして、腔内照射や組織内照射があるが、適応できる疾患は限られている。多分割照射法は晚期放射線障害を増大させることなく、総照射線量を増やすことが可能であるが、これでも照射線量に限界がある。放射線生物学的に細胞に対する殺細胞効果が大きく(RBEが大)、しかも腫瘍部位のみに高線量の放射線照射が期待できる線量分布を示す治療法として、重粒子線治療が放射線医学総合研究所で開始され、これまで放射線治療で根治が困難であった悪性腫瘍の治療成績改善が期待されている。しかし、中性子線をはじめRBEの大きな放射線照射では、遺伝子突然変異の発生が増大することが報告されており¹⁾⁻⁶⁾、治療に対する抵抗性の獲得や治療後の二次発癌発生が増加する可能性が示唆されている^{5),7),8)}。今回われわれは、理化学研究所のリングサイクロotronより発生した炭素粒子線(20keV/ μ m および 80keV/ μ m)とネオニン粒子線(80keV/ μ m)を、チャイニーズハムスター由來の培養細胞に照射し、重粒子線の生物学的作用をX線と比較して若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

1. 培養細胞

本実験にはチャイニーズハムスター由來のV79細胞を用いた。37°C, 5%炭酸ガス存在下、10%牛胎児血清(Gibco)を添加したF-10培地(Gibco)で、5-6回の継代培養を行い、細胞の対数増殖が安定した後に実験を行った。生存曲線の作成は以下のとく行った。照射終了後細胞を氷冷にて約1時間0°Cに保った後に(理化学研究所よりの移送時間)、トリプシン処理により単一細胞浮遊液を作成した。細胞浮遊液を希釈し、最終的に1枚のシャーレあたり50-100個のコロニーが形成される細胞数を播種した。7-10日間の培養後、

0.5%クリスタル・バイオレットにより染色し、細胞数50個以上のコロニー数を算定した。細胞生存率は播種細胞数と形成されたコロニー数より計算したが、非照射群より求めたPE(plating efficiency)により補正を行った。

2. 放射線照射

X線照射はMBR-1520R(Hitachi)より発生する150 kVp, 20mAのX線(Al 2mm filter)を線量率1 Gy/minで用いた。重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炭素およびネオン粒子線を用いた。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/ μ mのLETを与えることが出来る。炭素およびネオン粒子線の線量測定は、プラスチックシンチレーターによるフルエンス測定と、電離箱のモニターによるBraggピーク測定を行った⁹⁾。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⁹⁾⁻¹¹⁾。すなわち、本検討では総て単一LETの炭素粒子線(20および80keV/ μ m)とネオン粒子線(80keV/ μ m)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か、目的のLETの粒子線が照射される様になっている。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。いずれの場合も照射は室温で行った。分割照射の場合は、1回照射に用いた線量を均等2分割し、3-3.5時間間隔で照射した。

3. 突然変異発生頻度

照射後单一細胞浮遊液を作成し細胞数を算定した。10⁶個の生存細胞が存在するとと思われる細胞数(事前の実験で得られた生存率をsとすると10⁶/s個の細胞数)を、37°C, 5%炭酸ガス存在の条件下でさらに7-10日間培養した。照射7-10日後に生存している細胞をトリプシン処理により单一細胞浮遊液とし、1枚のシャーレあたり10⁵個の細胞を播種した。10 μ g/mlの2-amino-6-mercaptopurine(6-tioguanine(6-TG))を添加したF-10培地(含10%牛胎児血清)でさらに10日間培養した後、固定染色により50個以上の細胞数からなるコロニー数を算定した。形成コロニー数から10⁶個の細胞あたりの6-TG耐性細胞数を計算し、これをhprt部位の突然変異発生頻度とした^{12),13)}。突然変異発生頻度率の算出では、各照射線量別にPEで補正を行い、また非照射群より求めたバックグラウンドの自然発生変異頻度を差し引いた。

結 果

1. 炭素粒子線とX線の1回照射時の変異出現頻度

V79細胞にX線と炭素粒子線を1回照射した場合の生存曲線をFig.1上段に示した。150kVpX線に比べ炭

素粒子線照射は、同一線量を照射した時の殺細胞効果は強く、LETが20keV/ μ mから80keV/ μ mに上昇するとさらに増大した。D₀値は150kVpX線、20keV/ μ m、80keV/ μ m炭素粒子線でそれぞれ、2.2Gy, 1.8Gy, 1.0Gyとなった。生存曲線の肩はX線照射に比べて、重粒子線では小さくなつたが、LET80keV/ μ mでも消失には至っていない。

同時にX線照射時の突然変異発生頻度をFig.1下段に示した。X線照射時の10⁶個細胞あたりの突然変異の発生率は、線量の増加とともに徐々に上昇したが、12Gy照射時でも420であった。これに比べて炭素粒子線では同一線量のX線照射に比べて突然変異の出現率が著明に増加した。炭素粒子線でLET 20keV/ μ mの場合、6.5Gy照射した時の突然変異出現率は1200であり、X線照射に比べて約7倍の変異

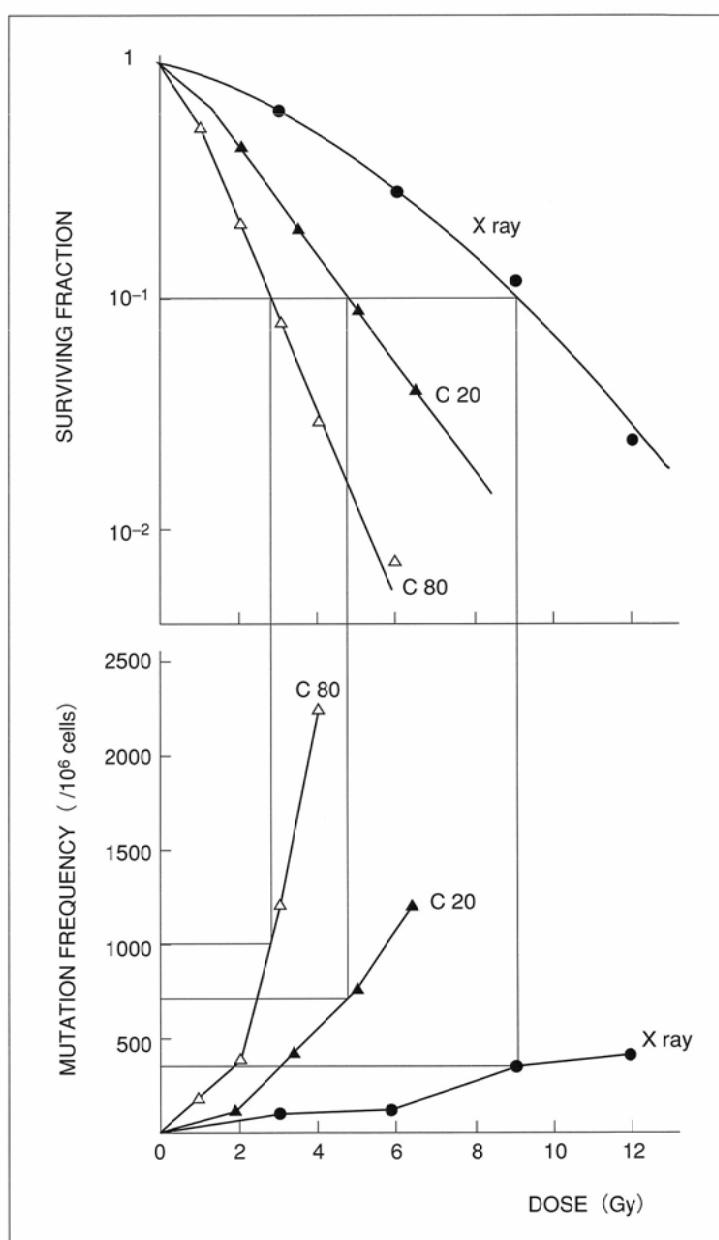


Fig.1 Survival curves (upper part) and mutation frequencies (lower part) for X-rays (●) and carbon beams: 20keV/ μ m (▲) and 80keV/ μ m (△). The bars of standard deviation are not indicated because they are very small.

出現頻度となった。LET 80keV/ μm では4Gyで2260とX線の約24倍であった。炭素粒子線では変異の出現頻度が2相性になり、照射線量2Gy程度では変異の出現が比較的少ないが、それ以上の照射線量になると著明に増加した。X線と重粒子線では同一線量の照射でも生存率に差異があった。同一の殺細胞効果が得られる線量における突然変異の出現頻度を比較するため、生存曲線(Fig.1上段)より10%の生存が得られる照射線量を求め、その線量における 10^6 個細胞あたりのhppt部位の突然変異発生頻度を推定した(Fig.1下段)。150kVp X線、20keV/ μm 、80keV/ μm 炭素粒子線で10%の生存率となる線量での突然変異発生頻度は、それぞれ370、710、1000と推測された。すなわち、炭素粒子線ではX線よりも同じ線量で殺細胞効果が大きく上昇すると同時に、同じ

殺細胞効果が得られる線量を照射した場合にも突然変異の出現頻度が増加した。さらにその効果は、LETが高くなると増大する可能性が示唆された。

2. 分割照射時の変異出現頻度

150 kVp X線と80keV/ μm 炭素粒子線の1回照射と、3-3.5時間の間隔をおいて均等2分割照射した場合の生存曲線をFig.2上段、同時に行ったhppt部位における突然変異発生頻度をFig.2下段に示した。X線の分割照射は1回照射に比べて殺細胞効果がやや減弱し、同一の生存率を得るために分割照射は1回照射より多くの線量を必要とした。突然変異の出現頻度は同一線量では1回照射と分割照射の間に差異がみられなかった。したがって、1回照射と分割照射で同一の生存率を得た場合、X線では分割照射では突然変異の出

現頻度が増加することになった。炭素粒子線では1回照射と分割照射の生存曲線に差異を認めず、両照射法は線量が同一なら生存率も同一であった。突然変異の出現頻度を炭素粒子線の1回照射と分割照射で比較すると、4Gy1回照射では変異発生頻度が2260となったが、分割照射では1480であり、分割照射によって突然変異発生頻度が減少する可能性が示唆された。すなわち、LET 80keV/ μm の炭素粒子線は分割照射の方が治療法として有利であると考えられた。

3. 炭素粒子線とネオン粒子線の比較

炭素粒子線は入射部のLETが20keV/ μm 程度、ブラックピークのピーク近傍でのLETは80keV/ μm であったが、ネオン粒子線では入射部のLETが80keV/ μm 程度となった。したがって、炭素粒子線とネオン粒子線の効果を同一LETで比較するため、LET80keV/ μm の炭素粒子線とネオン粒子線を照射し、生存曲線をFig.3上段に、同時に行ったhppt部位における突然変異発生頻度をFig.3下段に示した。ネオン粒子線の生存曲線は炭素より多少勾配が緩やかで、炭素およびネオン粒子線の D_0 値は1.0Gyと1.2Gyとなった。両粒子線照射時のhppt部位における突然変異発生頻度を比較すると、2Gy照射では変異出現頻度に大きな差異は認めなかった。4Gy照射すると炭素粒子線では2260となったが、ネオンは690で炭素粒子線に比べて約1/3の頻度であった。さらに、ネオン粒子線は6Gy照射でも4Gyと変異の発生頻度に大きな差異はなく、4Gyでほぼ最大の出現頻度に達していた。同一生存率(10%)を与える線量で、X線、80keV/ μm 炭素、ネオン粒子線の突然変異出現を比較すると、X線は370、ネオン550、炭素1000となり、ネオンはX線より突然変異出現頻度が高くなつたが、炭素粒子線の半分であった。

考 察

放射線医学総合研究所において重粒子線による癌治療の臨床応用が開始されたが、重粒子線はX線に比べて、物理学的線量分布が良好で、生物学的には高い

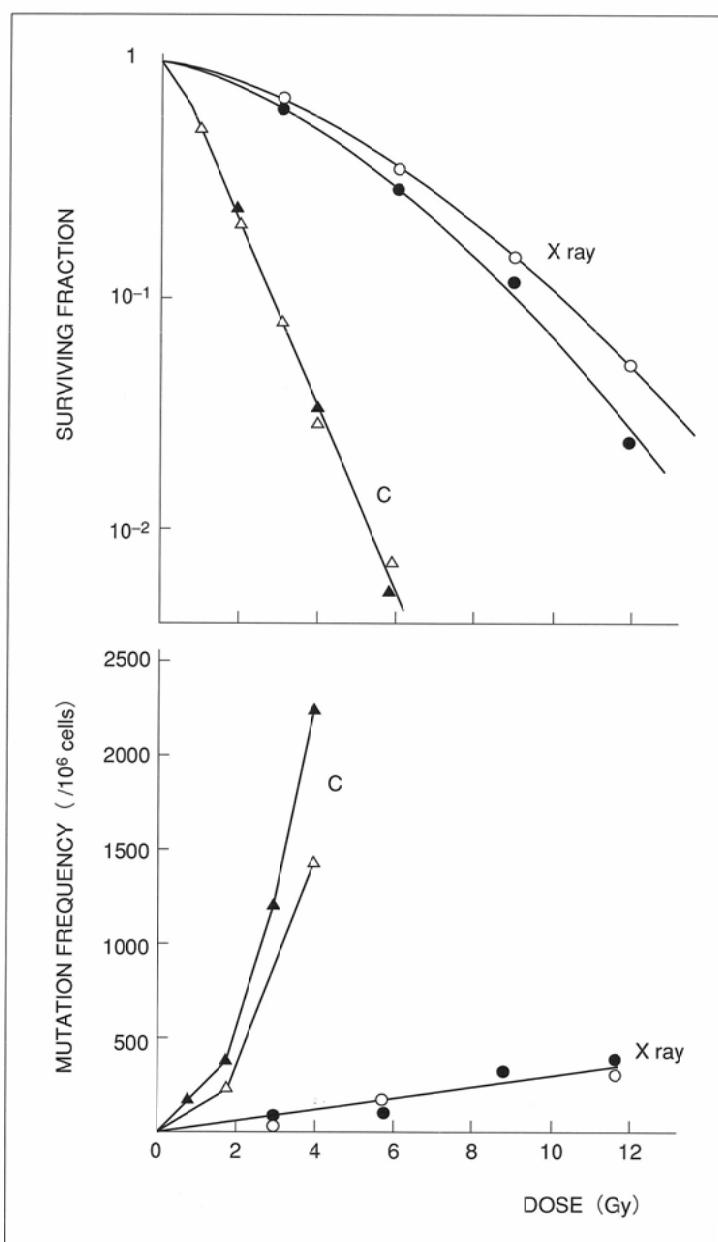


Fig.2 Survival curves (upper part) and mutation frequencies (lower part) for X-rays single (●), fractionated (○) and carbon (80 keV/ μm) single (▲), fractionated (△) irradiation.

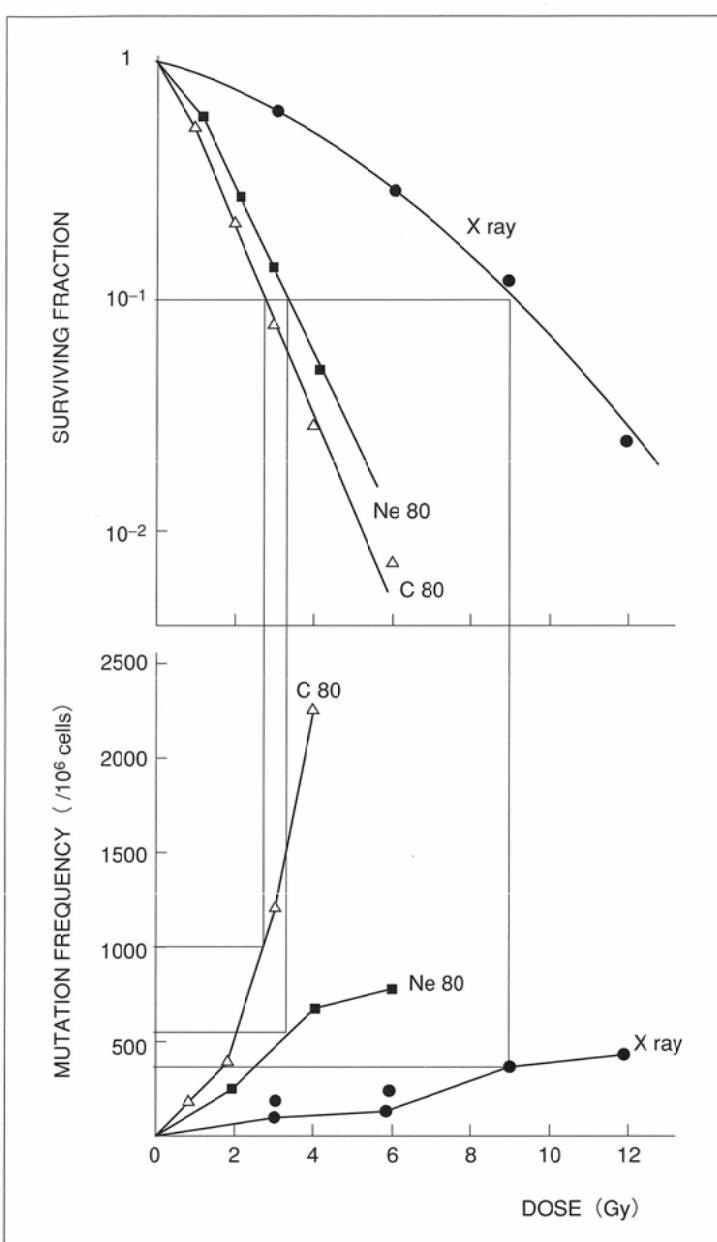


Fig.3 Survival curves (upper part) and mutation frequencies (lower part) for X-rays (●) and heavy ion beams: 80keV/ μ m carbon (\triangle) and neon (\blacksquare).

RBEと低酸素細胞に対する高い効果が得られ、X線では難治の癌に対して有用性が期待されている^{14),15)}。本検討では重粒子線のうち炭素粒子線とネオン粒子線を使用し、生物学的効果をX線と比較した。これらの粒子線は臨床治療で主に用いられる放射線で、その生物学的特徴を解明しておくことは、臨床の治療効果を考える上で極めて重要である。

異なる種類の放射線の生物学的効果を比較する場合、一般には250 kVpX線照射で得られる生存率を比べて、同一生存率を与える照射線量の比率から、RBE(relative biological effectiveness)を算出して指標とするが、本稿では150kVpX線での生存率と比較した。生存曲線より求めた D_0 値は150kVpX線、20 keV/ μ m、80keV/ μ m炭素粒子線、80keV/ μ mネオン粒子線でそれぞれ、2.2Gy、1.8Gy、1.0Gy、1.2Gyとなった。従来の報告と同様、重粒子線はX線に比べて強力

な殺細胞効果を示し¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、LETが大きくなるとこの効果はさらに強まり、癌治療における有用性が示唆された。同一LETにおけるRBEを炭素とネオン粒子線で比較すると、ネオンの方が D_0 値が僅かに大きくなつた。この傾向は各種の培養細胞に照射した場合も認められた(未発表データ)。実際に臨床で患者に照射する場合はSOBP(spread out Bragg peak)を用いるため臨床応用の粒子線のLETは明確でない。本検討ではLET 80keV/ μ mを主体にした。

放射線照射は遺伝子のさまざまな部位で、多くの異なった変異を起こしていると推測され、その全容を把握することは実験的にも不可能である。遺伝子突然変異の発生頻度を比較的簡便に評価できる一つの方法が、本検討で用いた6-TG耐性細胞数より求めたhppt部位の突然変異の定量である^{12),13)}。放射線照射による遺伝子の他の部位の突然変異が、hppt部位と同様に発生しているという保証は無い。しかし、突然変異がランダムに発生しているという仮定に立てば、hppt部位の突然変異を定量することにより、遺伝子全体の突然変異をある程度評価できると思われる。この方法を用いて、これまで評価の不可能であった放射線照射後に生じる放射線抵抗性の獲得や、二次発癌、等の"遺伝子突然変異によって生じる"とされる現象の評価ができる可能性がある。

本実験結果では、生存率が10%となる線量において、150kVpX線、20keV/ μ m、80keV/ μ m炭素粒子線、および80keV/ μ mネオン粒子線のhppt部位の突然変異発生頻度は、それぞれ370、710、1000、550となり、放射線の線質により突然変異の出現頻度に差異がみられた。炭素粒子線でLET20 keV/ μ mと80keV/ μ mを比較すると、LETが低いと変異の出現頻度が少なかった。一方、80keV/ μ mネオン粒子線は80keV/ μ m炭素粒子線と同様に、強力な殺細胞効果を示したが、hppt部位の変異の出現頻度は比較的少なく、線量を6 Gyまで増加しても突然変異数の増加は見られなかつた。これは繰り返し遂行した実験で確かめ、また、渡辺らも同様の結果を得ている¹⁹⁾。高LET放射線で同一LETの放射線を照射した場合、炭素粒子線とネオン粒子線は殺細胞効果がほぼ同様であるにもかかわらず、遺伝子に起る変化は異なっていることが推測される。その理由は不明であるが、炭素粒子とネオン粒子では原子のサイズが異なり、炭素粒子は遺伝子を構成する主たる原子とほぼ同様の大きさであるのに対して、ネオン粒子はやや大きいため反応に差異が存在することが考えられるが今後の大きな検討課題である。

JANUS原子炉より発生する中性子(平均エネルギー0.85MeV)を照射した場合の突然変異発生頻度は、2 Gyで200-300であり^{6),20)}、80keV/ μ mネオン粒子線とほぼ同様であった。高LET放射線を被曝した後生存した細胞に、突然変異出現頻度が高いことは、重粒子線に限定される現象ではな

く、高LET放射線の持つ共通の現象と考えられる^{17),18)}。さらにLETが上昇すると致死的な障害を受ける細胞の割合が増大するため突然変異の発生が頭打ちとなることが期待される¹⁸⁾。よってさらに重い粒子線の実験も望まれるが、加速がどこまで可能かという物理的な限界もある。今回の実験では、ネオン粒子線は炭素粒子線と比較すると、殺細胞効果(抗腫瘍効果)がほぼ同様で、遺伝子突然変異発現(二次発癌)は少ないことが予測され、実際に臨床で用いる粒子線として好ましい可能性が示唆された。

従来臨床で行われてきたX線による放射線治療(外照射)は、1回2Gy前後の線量による分割照射である。分割照射は正常組織の障害回復能力を期待し、正常組織の放射線障害を減少させる上で重要な照射方法であった。これに対して重粒子線のような高LET放射線では、回復現象はあまり見られないとされている。本実験でもX線を分割して照射した場合は、1回照射の場合に比べて生存率の上昇が見られたが、炭素粒子線ではその変化は見られなかった(Fig.2上段)。正常組織の殺細胞効果に起因する急性の放射線障害に関しては、重粒子線では分割照射を行ってもその軽減はあまり期待できないことが予測される。一方、hppt部位における

突然変異発生頻度をみると(Fig.2下段)、X線では分割照射と1回照射の間に突然変異発生頻度の差異がみられず、突然変異発生はX線の線量率の影響を受けないという報告と一致する²¹⁾が、今回の実験で炭素粒子線では照射の分割によって突然変異発生頻度が減少する可能性が示唆された。放射線照射による遺伝子突然変異に起因すると考えられる二次発癌、等の慢性の放射線障害は、分割照射によって軽減できる可能性が示唆された。

まとめ

重粒子線とX線の生物学的効果を検討するため、両者の殺細胞効果および遺伝子突然変異発現効果を比較した。重粒子線照射はX線照射に比べて殺細胞効果が高くRBEが大きくなるが、高率の遺伝子突然変異発現が認められた。ネオン粒子線と炭素粒子線を比較すると、殺細胞効果はほぼ同様であったが、前者は遺伝子突然変異発現効果が少なかった。また、重粒子線では分割照射を行うことにより、殺細胞効果を変化させることなく突然変異発生効果を軽減できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Barendsen GW, Walter HMD: Effect of different ionizing radiations on human cells in tissue culture. IV. Modification of radiation damage. Radiat Res 21: 314-329, 1964
- 2) Han A, Hill CK, Elkind MM: Neoplastic transformation of 10T1/2 cells by ⁶⁰Co γ -rays: evidence of repair of damage at reduced dose rate. Int J Radiat Biol 37: 585-589, 1980
- 3) Hill CK, Carnes BA, Han A, et al: Neoplastic transformation is enhanced by multiple low doses of fission-spectrum neutrons. Radiat Res 102: 404-410, 1985
- 4) Han A, Elkind MM: Transformation of mouse C3H/10T1/2 cells by single and fractionated doses of X-rays and fission-spectrum neutrons. Cancer Res 39: 123-130, 1979
- 5) Grdina DJ, Nagy B, Sigdestad CP: Radioprotectors in treatment therapy to reduce risk in secondary tumor induction. Pharmacol Ther 39: 21-25, 1988
- 6) Grdina DJ, Sigdestad CP: Radiation protectors: the unexpected benefits. Drug Metabolism Rev 20(1): 13-42, 1989
- 7) Holm LE: Cancer occurring after radiotherapy and chemotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 19: 1303-1308, 1990
- 8) Hawkins MM: Second primary tumors following radiotherapy for childhood cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 19: 1297-1301, 1990
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 柯 偉傑, 伊東久夫, 茂松直之, 他: 炭素粒子線のヒト培養細胞に対する細胞致死効果. 日本医放会誌 56: 669-673, 1996
- 12) Li AP, Carver JH, Choy WN, et al: A guide for the performance of the Chinese hamster ovary cell/hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene mutation assay. Mutation Res 189: 135-141, 1987
- 13) Hsie AW, Casciano DA, Couch DB, et al: The use of Chinese hamster ovary cells to quantify specific locus mutation and to determine mutagenicity of chemicals. Mutation Res 86: 193-214, 1981
- 14) Griffin TW, Wambersie A, Laramore G, et al: High LET: Heavy particle trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys 14: 583-592, 1988
- 15) Castro JR, Quivey JM, Lyman JT, et al: Current status of clinical particle radiotherapy at Lawrence Berkeley Laboratory. Cancer 46: 633-641, 1980
- 16) Deering RA, Rice R: Heavy ion irradiation of HeLa cells. Radiat Res 17: 774-786, 1962
- 17) Cox R, Masson WK: Mutation and inactivation of cultured mammalian cells exposed to beams of accelerated heavy ions: III human diploid fibroblasts. Int J Radiat Biol 36: 149-160, 1979
- 18) Kiefer J: Biological radiation effects. 1990, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- 19) 渡邊正己: 私信
- 20) Grdina DJ, Sigdestad CP, Carnes BA: Protection by WR1065 and WR151326 against fission-neutron-induced mutations at the HGPRT locus in V79 cells. Radiat Res 117: 500-510, 1989
- 21) Konig and J Kiefer: Lack of dose-rate effect for mutation induction by γ -rays in human TK6 cells. Int J Radiat Biol 54: 891-897, 1988