



Title	炭素線による造血系障害のRBEに関する研究
Author(s)	坪井, 篤; 小島, 栄一; 田中, 薫 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1995, 55(4), p. 247-252
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/20033">https://hdl.handle.net/11094/20033</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# 炭素線による造血系障害の RBE に関する研究

坪井 篤<sup>1)</sup> 小島 栄一<sup>1)</sup> 田中 薫<sup>1)</sup> 金井 達明<sup>2)</sup>

1) 放射線医学総合研究所障害基礎研究部 2) 同研究所重粒子治療センター医用重粒子物理・工学研究部

## RBE of Carbon Beam on Hematopoietic Injury

Atsushi Tsuboi<sup>1)</sup>, Eiichi Kojima<sup>1)</sup>,  
Kaoru Tanaka<sup>1)</sup> and Tatsuaki Kanai<sup>2)</sup>

The inactivation of hematopoiesis and survival of mice have been used in determining the relative biological effectiveness (RBE) of heavy charged particles of carbon 12 generated by Riken ring-cyclotron. Whole bodies of anesthetized mice were exposed to accelerator-generated carbon 12 of 135 MeV/u or X-rays of 200 kVp in graded doses. At about 5 hours after exposure, exogenous spleen colonies (CFU-S), granulocyte-macrophage progenitor cells (GM-CFC) and megakaryocyte progenitor cells (Meg-CFC) were assayed to determine dose relationships, and then  $D_0$  doses were determined. The inactivation of blood cells and lethality of mice (LD50/30) were also monitored for 30 days after irradiation. The RBE values of the 135 MeV/u carbon beam in terms of CFU-S were 1.68 for marrow and 1.41 for spleen, for GM-CFC they were 1.56 for marrow and 3.29 for spleen, for Meg-CFC they were 1.25 for marrow and 3.73 for spleen, while they were about 1.0 for erythrocytes, leukocytes and thrombocytes in mice irradiated with 2 Gy. However, the RBE values of the carbon beam were 1.32 for LD50/30.

Research Code No. : 403. 1

**Key words** : Carbon beam, Relative biological effectiveness (RBE), Hematopoietic system, Survival, Mouse

Received Nov. 15, 1993 ; revision accepted Apr. 27, 1994

1) Division of Radiation Hazards, National Institute of Radiological Sciences / 2) Division of Accelerator Physics and Engineering, National Institute of Radiological Sciences

## はじめに

重粒子線による細胞生物学的効果に関する研究から、重粒子線は細胞障害の回復、細胞周期内の放射線感受性の変動および酸素効果の抑制が大きいと強調されている<sup>1),2)</sup>。これらの細胞に対する効果が重粒子線による癌治療の有用性に一つの根拠を与えている<sup>3),4)</sup>。重粒子線の物質作用の研究は重粒子線が物質内でそのエネルギーを消耗する間に、その LET が変化することを示した<sup>5)</sup>。リッジフィルターによる重粒子線の拡大ブラッグピーク内で、その LET が  $100\text{keV}/\mu\text{m}$  以内であれば、LET の増加とともに RBE/LET 値が上昇し、 $200\text{keV}/\mu\text{m}$  以上では、LET の増加とともに RBE が減少すると報告されている<sup>6)</sup>。また、重粒子線の種類、エネルギーによって RBE が変わることも明らかであり<sup>7)-9)</sup>、重粒子線をより有効に癌治療に利用するためには、発生させた重粒子線による詳細な生物効果に関する情報が必要である。そのために多くの研究者は重粒子線による細胞の致死効果に関する研究を重ねてきているが、正常組織障害、なかでも造血系障害の研究は少ない。

本研究は 1993 年度内に放医研で開始される予定の重粒子線による癌治療のための基礎的資料を得るために、癌の放射線治療、特に脊髄、胸部、大腿骨などに発生する癌の放射線治療において、limiting factor の一つとなる造血系障害を対象とし、理研のリングサイクロトロンで発生させた  $135\text{MeV}/\text{u}$  の炭素線による造血系障害について、X 線効果のデータをもとにその relative biological effectiveness (RBE) 値を求めた。放射線による造血系障害の end point としては、骨髄および脾臓由来の外因性 spleen colony-forming units (CFU-S)、progenitor cells の granulocyte-macrophage colony-forming cells (GM-CFC)、megakaryocyte colony-forming cells (Meg-CFC) のほか、末梢血中の赤血球数、白血球数、血小板数およびマウスの照射後 30 日間に 50% 生存する線量 (LD 50/30) などを検定した。

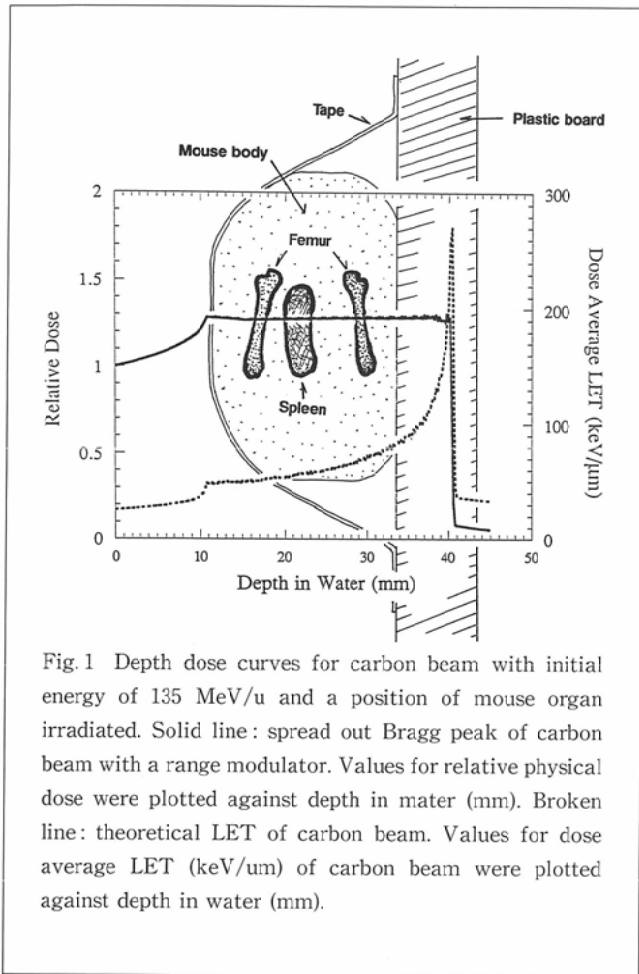


Fig.1 Depth dose curves for carbon beam with initial energy of 135 MeV/u and a position of mouse organ irradiated. Solid line: spread out Bragg peak of carbon beam with a range modulator. Values for relative physical dose were plotted against depth in mater (mm). Broken line: theoretical LET of carbon beam. Values for dose average LET (keV/um) of carbon beam were plotted against depth in water (mm).

### 材料および方法

**動物：**用いたマウスは雄の ddY-SLC 系（8～10 週齢）であった。マウスは実験に供する前 2 週間、conventional な環境において自由に飼料および塩酸水を与えて飼育した。

**放射線照射：**炭素線の照射は理研のリングサイクロトロンで発生させた 135MeV/u のエネルギーをもつ炭素イオンビームを用いた。その線量率は 3～5Gy/分であった。135MeV/u の炭素線は金井によって考案されたレンジモジュレーターにより、炭素線のブラッグピークの線量を平坦になるように 3cm 幅に拡大した spread out Bragg peak (SOBP) を用いた。照射野の直径は約 10cm であった。その深部線量分布は Fig. 1 に示した。照射方法はマウスをネンブタール (0.05mg/g 体重) で全身麻酔し、照射野からずれないようにアクリル板に固定し、照射台に固定された。SOBP におけるマウスの照射深度は Fig. 1 に示した。マウスを通過する炭素線の LET は 50～80keV/μm である。対照としての X 線照射も同様にマウスをネンブタールで麻酔した後、島津製 X 線装置を用いて、200kVp, 20mA, 0.5mmCu+0.5mmAl フィルター、HVL≒1.16mm (Cu), 線量率 0.7Gy/分の条件で全身照射を行った。

**CFU-S, GM-CFC, Meg-CFC の検定：**炭素線あるいは X 線で全身照射したマウスを照射後屠殺し、大腿骨および脾臓を取り出し、イスコフ培地に 4℃ で保存した。照射約 5 時間後、骨髄および脾臓から細胞浮遊液を作成し、CFU-S, GM-CFC および Meg-CFC の検定に供された。CFU-S は Till と McCulloch の方法に従い<sup>10)</sup>、7.6Gy を全身照射した recipient マウスに異なった線量で照射された donor マウスの骨髄細胞および脾臓細胞を尾静脈に注入し、9 日後に生ずる脾コロニーを算定することによって検定した。GM-CFC は WEHI conditioned medium を含む IMDM-メチルセルロース培地に炭素線または X 線で照射したマウスから取り出した  $5 \times 10^4$  cells/ml の骨髄細胞または  $1 \times 10^5$  cells/ml 脾臓細胞をプラスチックシャーレに加え 37℃ 7 日間培養後に生ずるコロニーを計算することによって検定した。Meg-CFC は spleen conditioned medium を含むプラズマクロットに炭素線または X 線で照射したマウスから取り出した骨髄細胞  $5 \times 10^5$  cells/ml または脾臓細胞を  $1 \times 10^6$  cells/ml の濃度で培養し、培養 4 日後にアセチルコリンエステラーゼ陽性のコロニーを計測することによって検定された<sup>11)</sup>。得られたすべての生残率曲線は多標的 1 ヒットモデルの  $S = 1 - (1 - \exp^{-D/D_0})^n$  式に適合させ、 $D_0$  および  $n$  値を求めた。

**血液細胞数およびマウス生存率の検定：**末梢血中の白血球、赤血球、血小板の動態はネンブタール麻酔後、炭素線あるいは X 線を 2Gy 全身照射して経時的にマウス外腸骨動脈から採血した血液を EDTA-2K 入りの採血管に取り、30 分後 Sysmex K-1000 を使って調べられた。また、白血球および血小板について線量効果関係が調べられた。LD50/30 の検定は同様に麻酔したマウスを、炭素線あるいは X 線照射して、30 日間に生存したマウスの生存率の計測によって行われた。なお、LD50/30 の検定に用いたマウスの数は 1 群 20 匹である。

### 結 果

炭素線および X 線を全身照射したマウスの骨髄の CFU-S に対する X 線および炭素線に関する線量-生存率曲線は Fig. 2 に示した。骨髄由来の CFU-S に対する炭素線に関する線量効果関係 (◆のマーク) および X 線に関する線量効果関係 (△のマーク) はいずれも直線性を示した。炭素線による骨髄由来の CFU-S の  $D_0$  線量は 0.75Gy であり、X 線によるその  $D_0$  線量は 1.26Gy であった。この  $D_0$  線量比から骨髄由来の CFU-S に関する炭素線の RBE を求めると、1.68 となった。脾臓由来の CFU-S に対する炭素線に関する線量-生存率曲線 (●マーク) および X 線に関する線量-生存率曲線 (□マーク) は Fig. 3 に示した。これらの線量効果はいずれも 1～2Gy 付近で変曲点をもつ二相性を示した。したがって、その  $D_0$  線量は 2～4Gy の線量域で求められた。炭素線による脾臓由来の CFU-S に関する  $D_0$  線量は 0.82Gy で、X 線によるその  $D_0$  線量は

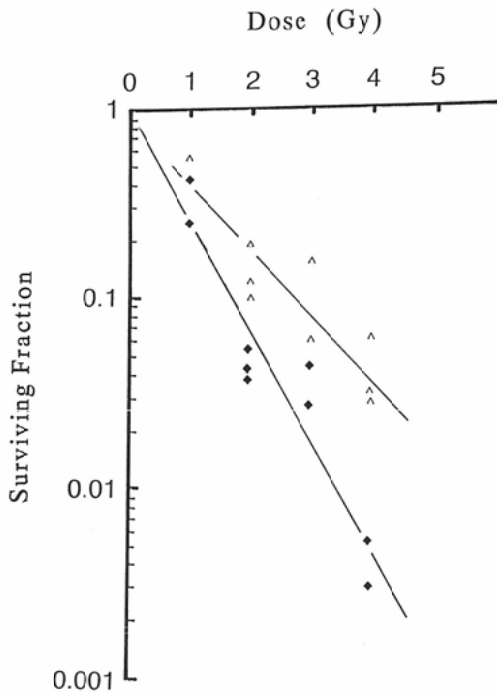


Fig. 2 Survival curves for CFU-S of marrow cells from mice irradiated with carbon beam or X-rays.  $\blacklozenge$ , carbon beam;  $\triangle$ , X-rays. Different points denote surviving fractions of CFU-S from separate experiments. Each point represents the mean of 10 recipient mice. In each experiment, 3 - 8 donor mice were used.

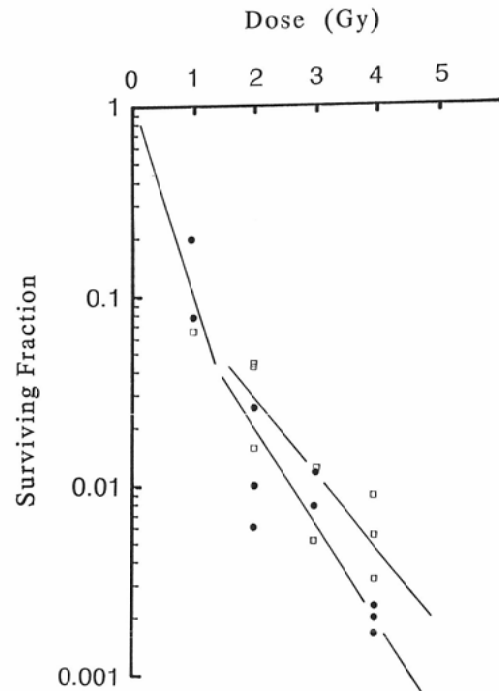


Fig. 3 Survival curves for CFU-S of spleen cells from mice irradiated with carbon beam or X-rays.  $\bullet$ , carbon beam;  $\square$ , X-rays. Different points denote surviving fractions of CFU-S from separate experiments. The points given are the same as described in the caption to Fig. 2.

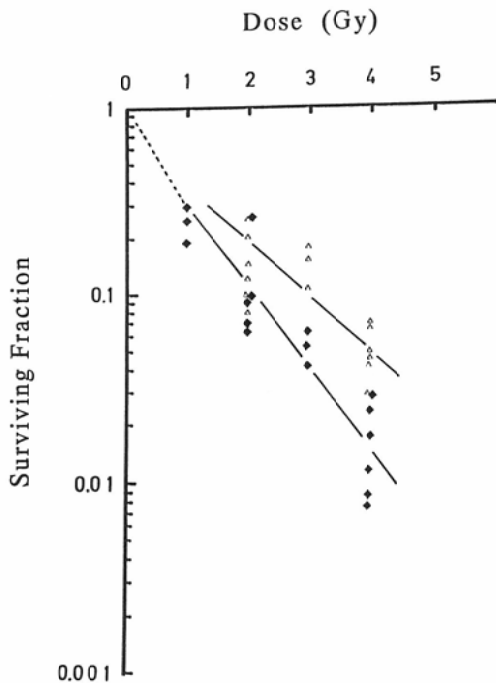


Fig. 4 Survival curves for GM-CFC of marrow cells from mice irradiated with carbon beam or X-rays.  $\blacklozenge$ , carbon beam;  $\triangle$ , X-rays. Different points denote surviving fractions of GM-CFC from separate dishes plated with cells and are pooled for 2 to 3 experiments. In each experiment, 3 - 8 mice were used.

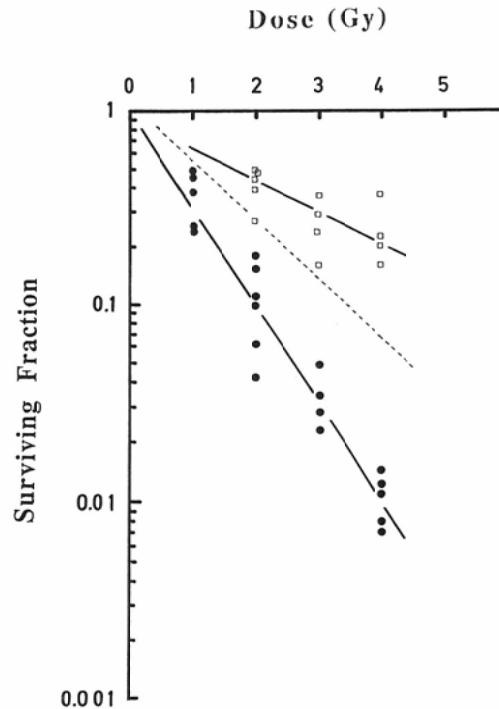


Fig. 5 Survival curves for GM-CFC of spleen cells from mice irradiated with carbon beam or X-rays.  $\bullet$ , carbon beam;  $\square$ , X-rays. The points given are the same as described in the caption to Fig. 4. Broken line, X-rays without anesthetization, fitting surviving fractions of GM-CFC from three dishes per dose.

1.16Gy を示し、脾臓由来の CFU-S に関する RBE は 1.41 となった。同様に、前駆細胞である GM-CFC と Meg-CFC に関する X 線と炭素線の線量効果関係を検索した。炭素線を全身照射したマウスの骨髄中の GM-CFC の線量-生存率曲線および X 線を全身照射したマウスのそれぞれの線量-生存率曲線は Fig. 4 に示した。Fig. 4 の◆マークに示すように、骨髄由来の GM-CFC に関する炭素線の  $D_0$  線量は 1.02 Gy であり、X 線の  $D_0$  線量は 1.59Gy であった。そして、骨髄由来の GM-CFC に関する炭素線の RBE は 1.56 となった。これに対し、脾臓由来の GM-CFC の炭素線および X 線の線量-生存率曲線は Fig. 5 に示したように、特に□マークで示す X 線に対する線量効果関係がゆるい傾斜の曲線を示し、 $D_0$  線量が増加する結果となった。脾臓由来の GM-CFC の  $D_0$  線量は炭素線では 0.86Gy であり、X 線では 2.83Gy であった。その炭素線に関する RBE は 3.29 という高い値となった。Fig. 5 の中に点線で示した曲線は無麻酔下で X 線照射したマウスの照射 5 時間後に検定したときの脾臓由来 GM-CFC の生存率曲線である。その  $D_0$  線量は 1.40Gy を示し、麻酔マウスと比較して、約 1/2 であった。次に、炭素線で全身照射したマウスの骨髄由来の Meg-CFC の線量-生存率曲線は Fig. 6 に◆マークで示し、X 線による全身照射マウスの骨髄由来のそれは同図に△マークで示した。Meg-CFC の  $D_0$  線量は炭素線で 0.8Gy、X 線で 1.0Gy となった。こ

れらの値から、骨髄由来の Meg-CFC に関する炭素線の RBE は 1.25 となった。同様に、脾臓由来の Meg-CFC の線量-生存率曲線は Fig. 7 に示した。ここでも、X 線による脾臓由来の Meg-CFC の線量-生存率曲線は□マークで示すように、ゆるい傾斜を示し、高い  $D_0$  線量を示した。それらの  $D_0$  線量は●マークで示した炭素線では 1.1Gy であり、X 線では 4.1Gy であった。ここでも、X 線による線量効果関係は放射線抵抗性となった。そして、その炭素線に関する RBE は 3.73 となった。

これらの造血幹細胞に対する炭素線の線量効果が末梢血中の各血液細胞数にどのように反映されるかを知るために、炭素線あるいは X 線を 2Gy 全身照射したマウスにおける赤血球数、白血球数および血小板数の照射後の動態を調べた (Fig. 8)。2Gy の炭素線を照射したマウスの血中の各細胞数は実線で示し、2Gy の X 線を照射したマウスのそれらは点線で示した。この結果が示すように、いずれの血液細胞においても両者はほとんど同じ変化のパターンを示した。血液細胞数の消長が認められる白血球および血小板について、照射後最小値をとる時期における照射線量 (1~4Gy) 効果関係について見ると (図は示されていない)、白血球 (照射後 1 日目) は炭素線と X 線との間に差異が認められなかったが、照射後 9 日目の血小板の効果関係は高線量 (4Gy) で曲線を左 (下) 方向へシフトして、炭素線の効果が認められた。炭素線では  $19.3 \pm 3.8$  (×

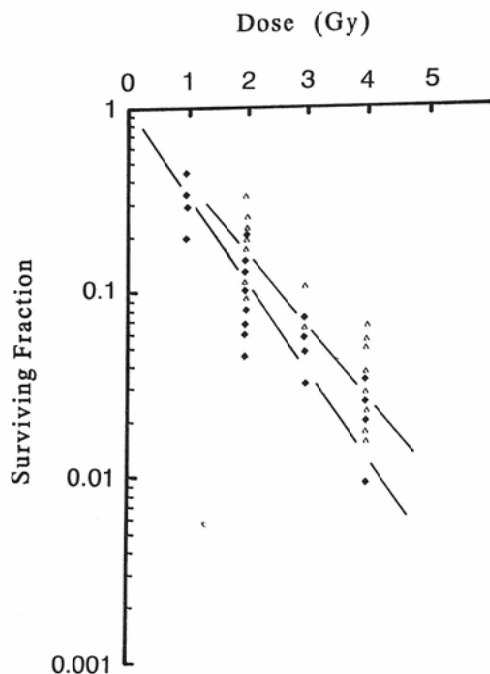


Fig. 6 Survival curves for Meg-CFC of marrow cells from mice irradiated with carbon beam or X-rays. ◆, carbon beam; △, X-rays. The points given are the same as described in the caption to Fig. 4.

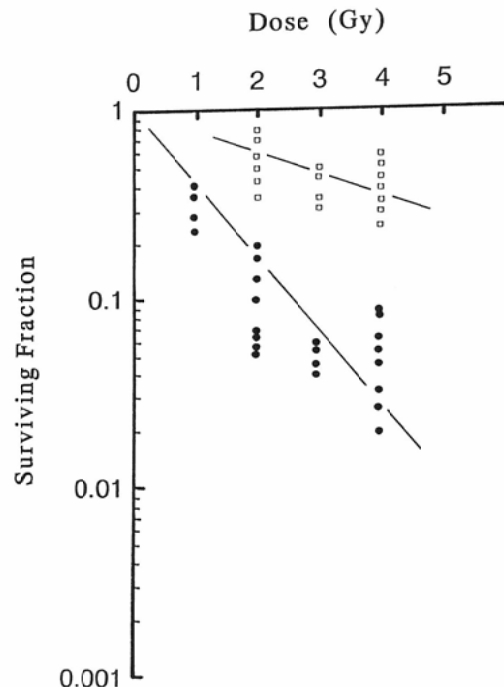


Fig. 7 Survival curves for Meg-CFC of spleen cells from mice irradiated with carbon beam or X-rays. ●, carbon beam; □, X-rays. The points given are the same as described in the caption to Fig. 4.

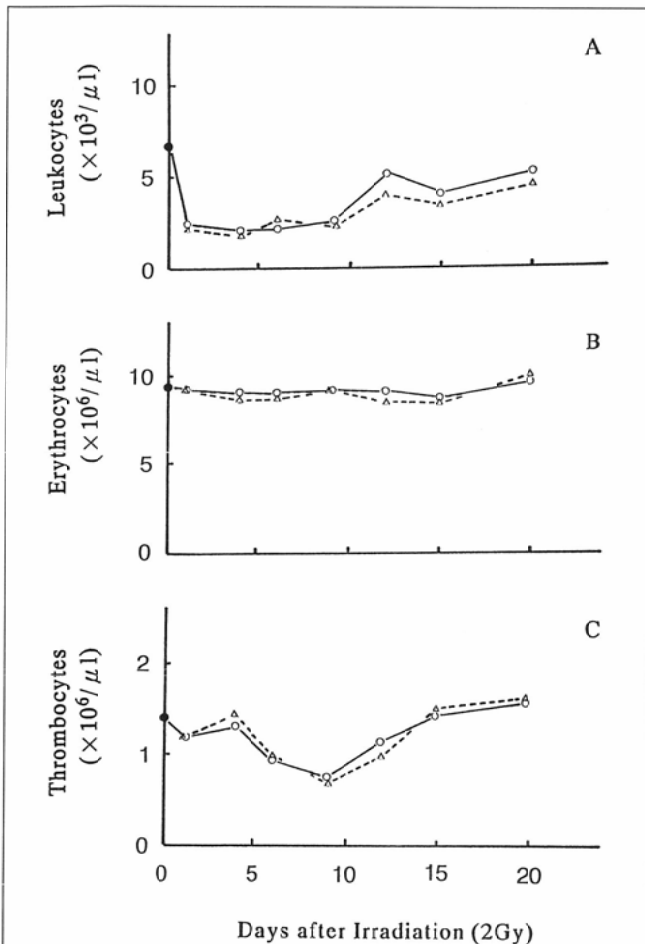


Fig. 8 Kinetics of leukocytes (A), erythrocytes (B) and thrombocytes (C) in the circulating blood following a single wholebody exposure to carbon beam or X-rays with a dose of 2 Gy.  $\circ$ , carbon beam;  $\Delta$ , X-rays. Day 0, unirradiated control mice ( $n=23$ ). Points on all the other days represent the mean of 5 - 10 mice. Control values (mean  $\pm$  SE); leukocytes  $68.4 \pm 3.1$  ( $\times 10^3$ ), erythrocytes  $932.8 \pm 10.0$  ( $\times 10^4$ ), thrombocytes  $139.9 \pm 4.2$  ( $\times 10^4$ ).

$10^4$ ), X線では  $55.1 \pm 4.9$  ( $\times 10^4$ ) の値 (mean  $\pm$  SE) を示した。

これら造血系の障害を起因として生ずるマウスの致死効果に関する RBE について LD50/30 値を用いて調べた (Fig. 9)。炭素線全身照射によるマウスの 30 日生存率は  $\circ$  マークで表し、線量の増加とともに、減少する。一方、X 線の全身照射によるマウスの 30 日生存率は  $\Delta$  マークで表したが、炭素線のそれとほぼ平行線を示した。これらの線量効果関係から炭素線と X 線の LD50/30 線量は、それぞれ 6.05Gy, 8.00Gy となり、その RBE は 1.32 を示した。Fig. 9 の点線で示した曲線は無麻酔のマウスに X 線を全身照射したときの 30 日生存率を示したものである。その曲線は麻酔したマウスに X 線を全身照射したときのマウスの生存率曲線 ( $\Delta$  マーク) に比して、その傾斜が鋭かった。

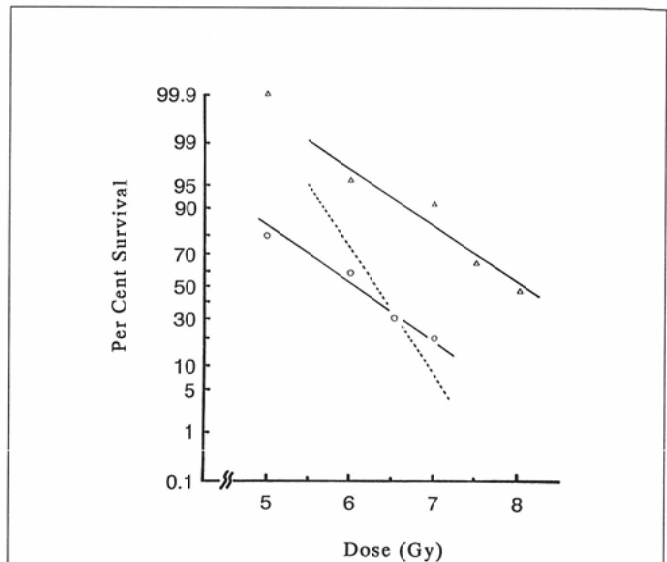


Fig. 9 Dose-response curves for the 30-day survival of mice following a single whole-body carbon beam or X-rays exposure.  $\circ$ , carbon beam;  $\Delta$ , X-rays; broken line, X-rays without anesthetization. Each point represents the per cent survival of mice on day 30 and is plotted on a probit scale. 20 mice per point were used. Curves were fitted by eye.

## 考 察

Ainsworth ら (1983) は 400MeV/u の炭素線やネオン線を全身照射したマウスの骨髄中の CFU-S に関する RBE を報告した<sup>12)</sup>。その値は 1.5~1.6 であった。この場合の炭素線の LET は  $80\text{keV}/\mu\text{m}$  であった。そして、最高の RBE を示す LET は  $100\text{keV}/\mu\text{m}$  と報告している。本報告では炭素線によるマウス骨髄中の CFU-S の RBE 値は 1.7 であり、その値は若干高い値を示した。用いた炭素線の LET は  $50\sim 80\text{keV}/\mu\text{m}$  であり、この点を考えると、CFU-S の RBE はもう少し低い値となるべきであろう。また、骨髄中の GM-CFC および Meg-CFC の RBE 値はそれぞれ 1.56 と 1.25 であった。これらの値に関する報告がなく、他の研究者のデータとの比較はできないが、これらの値は Ainsworth らが報告した CFU-S の RBE 値に比較的近い値を示した。しかしながら、この 2 つの報告においてはマウスの系統、麻酔の有無、炭素線のエネルギー、SOBP の幅などの実験条件に大きな相違があり、容易に比較することができない。特に我々のデータは麻酔したマウスを全身照射した場合のものである。麻酔をしたマウスの X 線に対する反応で最も顕著に見られたのは脾臓由来の GM-CFC と Meg-CFC であり、無麻酔下のマウスの GM-CFC の  $D_0$  線量に比して、麻酔下のマウスの  $D_0$  線量は約 2 倍に増加している (Fig. 5)。Keizer によれば<sup>13)</sup>、マウスを麻酔すると、一部の臓器が hypoxic になると報告されており、X 線による脾臓中の GM-CFC や

Meg-CFC の  $D_0$ 線量の上昇は麻酔によって脾臓が hypoxic になったことによるものであろう。このことが脾臓中の GM-CFC, Meg-CFC の炭素線の RBE を大きくしている要因になっていると考えられる。しかし、炭素線による無麻酔下での脾臓中の GM-CFC や Meg-CFC の線量効果関係が測定できないため、正確な議論はできない。一方、骨髓由来の GM-CFC および Meg-CFC の炭素線の RBE が 1.3~1.6 を示した理由は、X 線による GM-CFC および Meg-CFC の線量効果 ( $D_0$ 線量) から推察して、骨髓中のそれらの前駆細胞が X 線で照射された場合、脾臓に比して麻酔の効果を受けにくい造血環境であったのかもしれない。SOBP を用いた重粒子線による生物効果を調べた報告では、ピークの位置で LET が変わるため、RBE の値を表す場合、RBE/LET として示されている<sup>6)</sup>。本報告では、Fig. 1 に示したように、マウスの照射位置は約 1cm 移動できるが、固定装置の不備から実験が不可能であり、今後の課題として新発生装置のもとで検討されなければならない。

2Gy の炭素線を全身照射したマウスの末梢血中の赤血球数、白血球数、および血小板数の減少に関する RBE はほぼ 1 であった。そこで、採用した 2Gy が血球数の変化の差を検討するには少し低線量であったのではないかという疑問を解くために、白血球および血小板の照射後最小値をとる時期における線量効果関係を調べたが、その結果もまた、血小板の炭素線の 4Gy に対する反応を除いて、造血幹細胞および前駆細胞への不活化効果が末梢血中血液細胞数に反映されていないことを示した。なぜ、末梢血中の血液細胞数では炭素線と X 線との間に差異がなかったかについては、いまのところ不明である。造血系以外の正常組織である精巣や腸管の炭素線による障害に関する RBE は 1.4 以下の値が示されている<sup>6)</sup>。したがって、炭素線による正常組織障害の RBE は 2 以上になるような大きな値にはならないと考えられる。ここに示した脾臓由来の GM-CFC や Meg-CFC の炭素線に関する RBE は特殊な条件で得られたものと理解されるが、今後解明されなければならない問題である。

造血系障害に起因して生ずるマウスの致死効果の指標である LD50/30 を用いて、炭素線の RBE を求めた結果は 1.32 となり、骨髓由来の CFU-S, GM-CFC, Meg-CFC および脾臓由来の CFU-S の RBE 値 (1.3~1.7) にほぼ近い値を示した。したがって、骨髓中の造血幹細胞の障害がマウスの LD50/30 に主な役割を果たしていると考えられる。また、Fig. 9 に示したように、無麻酔下の条件での X 線による LD50/30 線量 (Fig. 9 点線) と麻酔下の条件での X 線による LD50/30 線量 (Fig. 9 実線,  $\Delta$ マーク) との間には約 1.5Gy の差があり、今後の問題点として放射線感受性に変化を与えない麻酔剤の検討が必要であら

う。

本論文の要旨は第 35 回 (平成 4 年 10 月) および第 36 回 (平成 5 年 10 月) 日本放射線影響学会大会において報告した。

#### 文 献

- 1) Goldstein L S, Phillips T L, Fu K K, et al: Biological effects of accelerated heavy ions: Single doses in normal tissue, tumor and cell in vitro *Radiat Res* 86, 529-541 (1981)
- 2) Raju MR, Bain E, Carpentier SG, et al: Effect of argon ions on synchronized chinese hamster cells. *Radiat Res* 84, 152 (1980)
- 3) Tobias C A: The future of heavy ion science in biology and medicine. *Radiat Res* 103, 1-33 (1985)
- 4) Leith J T, Ainsworth E J and Alpen E L: Heavy-Ion radiobiology: Normal tissue studies. *Advance in Radiat Biol* 10, 192-233 (1983)
- 5) Kiefer J: Cell and subcellular effects of very heavy ions *Int J Radiat Biol* 48, 873-892 (1985)
- 6) Rodrigues A, Alpen E L and Powers-Risius P: The RBE-LET relationship of rodent intestinal Crypt cell survival, testes weight loss, and multicellular Spheroid cell survival after Heavy-Ion irradiations. *Radiat Res* 132, 184-192 (1992)
- 7) Tenforde T S, Tenforde S D, Crabtree K E, et al: RBE values for radiation induced growth delay in rat rhabdomyo-sarcoma tumors exposed to plateau and peak carbon, neon and argon ions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7, 217-222 (1981)
- 8) Curtis S B, Schilling W A, Tenforde T S, et al: Survival of oxygenated and hypoxic tumor cells in the extended-peak regions of heavy charged-particle beams. *Radiat Res* 90, 292-309 (1982)
- 9) Goldstein L S, Phillips T L and Poss G Y: Biological effect of accelerated heavy ions, II Fractionated irradiation of intestinal crypt cells. *Radiat Res* 86, 542-558 (1981)
- 10) Till J. E. and McCulloch A: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222 (1961)
- 11) Tsuboi A and Tanaka K: Changes in radiosensitivity of various cellular stages of megakaryopoiesis in mouse bone marrow culture. *Asian Australasian J Animal Sciences* 2, 509-901 (1989)
- 12) Ainsworth E J, Kelly L S, Mahlmann L J, et al: Response of colony-forming unit-spleen to heavy charged particle *Radiat Res* 96, 180-197 (1983)
- 13) Keizer H J and Van Potten I M: The Radioprotective actions on bone marrow CFU during immobilization of mice. *Radiat Res* 66, 326-338 (1976)