

氏名(本籍)	もり たけ たかし 盛 武 敬 (茨城県)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 3437 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	<b>ESR spin trapping of hydroxyl radicals in aqueous solution irradiated with high-LET carbon-ion beams</b> (高 LET 炭素イオン線照射によって水溶液中に生成されるヒドロキシルラジカルの ESR スピントラッピング法による解析)
主 査	筑波大学教授 博士(医学) 秋 根 康 之
副 査	筑波大学教授 博士(薬学) 熊 谷 嘉 人
副 査	筑波大学助教授 医学博士 永 瀬 宗 重
副 査	筑波大学講師 医学博士 新 津 守

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

予後不良な悪性脳腫瘍に対する粒子線を用いた放射線療法が、現在多くの注目を集めている。粒子線の中では陽子線が最も広く用いられているが、放射線医学総合研究所などにおいては、陽子線よりも質量の大きい重イオン線による臨床研究も試みられている。これらの粒子線の最も大きな特徴は、生体を透過する際に、ある決まった飛程間隙で非常に高いエネルギーを周囲に付与しながら完全に停止することである。また、粒子線が単位距離あたりに付与するエネルギーは、線エネルギー付与 (linear energy transfer : LET) [keV/ $\mu$ m] で表記されるが、重イオン線のひとつである炭素イオン線では、LET が 80 ~ 100keV/ $\mu$ m の領域での生物学的効果比 (RBE) が最も高くなることが知られている。この現象は、主に炭素イオンが DNA などの生体側のターゲットを直接電離することによる「直接作用」に因るところが大きいと考えられ、ターゲット周辺の水分子が放射線分解されて生成したラジカル種、特にヒドロキシルラジカル ( $\cdot$ OH) による「間接作用」は注目されなかった。

そこで本研究では、生体に対する炭素イオン線照射において、間接作用がどの程度生じているかを明らかにして、粒子通過部分における、ラジカルの生成、拡散、再結合などからなる、細胞に対する重イオン線の放射線化学的效果を解明することを目的とした。特に、炭素イオン線の水溶液に照射した際に、水溶液中に生成される  $\cdot$ OH を 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) で捕捉し、生成された安定化ラジカルである DMPO-OH を、直接電子スピン共鳴法 (electron spin resonance: ESR) で解析し、 $\cdot$ OH 生成量と LET との関係を明らかにすることを目標とした。

### (対象と方法)

#### 1. サンプル調整

DMPO を終濃度 200mM で 10% FCS, 100U/ml ペニシリン, 100mg/ml ストレプトマイシン添加 Eagle's

minimum essential medium (MEM) に溶解した。 $\cdot\text{OH}$  の同定のために、DMPO を重水 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) に 200mM 溶解した溶液、MEM にエタノールを混合 (0.5M と 2M) したものに DMPO を 200mM 溶解した溶液を準備した。これらのサンプルを専用の容器(厚さ 1.0mm のスリット状)に 2.0ml 移して炭素イオン線照射を行った。炭素イオン線との比較のために 2.0ml のサンプルをシャーレ (直径 4.0cm) に移して X 線照射を行った。照射はいずれの場合も室温 (約 26°C) 大気圧条件下で行った。

## 2. 照射条件

$^{12}\text{C}$  (290MeV/u) イオンを用い、吸収線量 0 ~ 20Gy で照射した。LET は 20 ~ 90keV/ $\mu\text{m}$  に設定し、この時の線量率はそれぞれ 9.8 ~ 32.0Gy/min であった。X 線は管電圧 200kV 管電流 20mA に設定し、0.5mm のアルミニウムと 0.5mm の銅のフィルターを装着した。線量率は 5.1Gy/min、吸収線量は 0 ~ 20Gy で照射した。

## 3. ESR 測定

照射されたサンプルは、直ちに石英扁平セルに毛細管現象を利用して移し (約 200 $\mu\text{l}$ )、照射終了から 10 分後に X - band ESR (JES - RFR30, 日本電子) でシグナル解析を行った。得られるシグナルのうち、最も低磁場側にある第 1 シグナル強度と、外部標準試料であるマンガンのシグナル強度の比を  $\cdot\text{OH}$  生成量とした。

### (結果)

#### 1. ESR スペクトルの同定

X 線、炭素イオン線いずれの照射においても、MEM 中に生じた  $\cdot\text{OH}$  が DMPO に捕捉されて生じた DMPO - OH のシグナルが観察された。サンプルの MEM を重水に変えた実験でも DMPO - OD と DMPO - D の 2 つのシグナルが観察された。また、異なる濃度にエタノールを溶解したサンプル溶液の照射においては、DMPO - OH と DMPO - H, DMPO - CH (OH)  $\text{CH}_3$  の 3 つのシグナルが観察され、エタノール濃度を 0.5M から 2.0M に上げると、DMPO - OH のシグナル強度が減少する一方、DMPO - CH (OH)  $\text{CH}_3$  のシグナル強度が増加した。

#### 2. $\cdot\text{OH}$ と吸収線量、LET との関係

炭素イオン線照射において、DMPO - OH シグナル強度は吸収線量に比例して増加した。いっぽう X 線照射を行った場合は、線量率が炭素イオン線より低いため直線的な増加はみせず、緩やかなカーブを持って飽和に近づいた。両者を比較するため、X 線を 5Gy 照射した際のシグナル強度から、20Gy 照射した際の強度を外挿して見積もった。これら X 線および炭素イオン線の 20Gy 照射したときのシグナル強度を、LET 値の対数を横軸にとってプロットすると直線状に減少した。LET 値が 20, 40, 60, 80, 90keV/ $\mu\text{m}$  のときに生成する  $\cdot\text{OH}$  は、X 線照射した際の  $\cdot\text{OH}$  と比較して、それぞれ 64, 58, 52, 49, 50% となった。

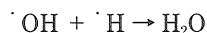
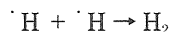
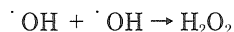
### (考察)

#### 1. $\cdot\text{OH}$ の DMPO による捕捉

DMPO 溶液に X 線や炭素イオン線を照射して得られる ESR シグナルの超微細結合定数 (hyperfine coupling constant) は、いずれも文献値と一致しており、 $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \cdot\text{H} + \cdot\text{OH}$  という放射線分解によって生じた  $\cdot\text{OH}$  と  $\cdot\text{H}$  が、DMPO により捕捉されたと考えられた。しかし、スーパーオキシド ( $\cdot\text{O}_2$ ) が DMPO に捕捉されて DMPO - OH となる経路もあるため、 $\text{H}_2\text{O}$  を  $\text{D}_2\text{O}$  に置換して同様の照射をしたところ、得られたスペクトルから  $\text{D}_2\text{O}$  は  $\cdot\text{O}$  と  $\cdot\text{OD}$  に解裂し、それぞれが DMPO に捕捉されることが示された。また、異なる濃度のエタノール ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) 溶液を照射した実験では、DMPO に対してエタノールラジカル ( $\text{CH}_3\cdot\text{CHOH}$ ) と  $\cdot\text{OH}$  の競争反応を示唆する結果となった。これらの結果から  $\text{H}_2\text{O}$  が解裂して生じたフリーな  $\cdot\text{OH}$  が DMPO に捕捉され、生じた DMPO - OH の ESR シグナルが観察されていることが証明された。

## 2. $\cdot\text{OH}$ 生成に及ぼす LET の影響

これまでに、LET 値が数百～数千  $\text{keV}/\mu\text{m}$  といった非常に高い領域では、ラジカルの生成がほとんど見られなくなると報告されているが、それは、



に示すような、近傍のラジカル同士の再結合に起因すると考えられている。

著者らが用いた DMPO の濃度は、照射によって生成するラジカル濃度に比して極めて高いため、X線照射により均質に生成されるラジカル同士は、再結合することなく DMPO に捕捉されていると考えられる。しかし、炭素イオン線は飛程終末に近づくにつれて高密度に電離を起こすため、ラジカルの分布は不均一となり、結果として近接するラジカル同士の再結合も無視できなくなる。そのため同じ吸収線量の照射でも高 LET 領域では、再結合を逃れて DMPO に捕捉されるラジカルの量が減少すると推察される。その結果、炭素イオン線を用いた本実験において DMPO に捕捉され得る  $\cdot\text{OH}$  の量は、20～90 $\text{keV}/\mu\text{m}$  の範囲では LET 値に対して対数関数的に減少したと考えられる。

### (結論)

$^{12}\text{C}$  (290 $\text{MeV}/\text{u}$ ) イオン線が水を分解して生じる  $\cdot\text{OH}$  は、LET 値に対して対数関数的に減少することが明らかになった。炭素イオン線の入射領域では、X線の 60%以上の  $\cdot\text{OH}$  が生成されることが示され、「間接作用」による生物学的効果が依然として高いことが明らかになった。

## 審査の結果の要旨

水酸化ラジカルの生成は放射線が生物に障害を与える際の重要な現象の一つである。本研究は、炭素イオン線照射の際のこの機構について検討し、それが線量に依存して増加し、また LET の増加に伴い減少することを明確に示した。難治癌に対して有効である事が期待される炭素イオン線治療の臨床研究に対して、本研究およびそれから発展する研究の成果が寄与することが期待される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。