

第2章 脳腫瘍に対する重イオン線照射の効果

2-1 はじめに

序論で述べたごとく、悪性脳腫瘍に対する重イオン線の細胞障害性、特に *in vitro* で重イオン線が脳腫瘍細胞に及ぼす影響に関しては未だに不明な点が多い。p53 は放射線照射後のアポトーシスの誘導に重要な役割を担っており (Lowe et al., 1993)、p53 変異株は p53 野性株に比べ放射線抵抗性を示すとされている (Haas-Kogan et al., 1999)。しかし、これらの結果は低 LET 放射線を用いた研究からの仮説であり、高 LET 放射線ではこの点も不明である。

腫瘍細胞に対する放射線感受性の評価法としては、従来コロニー形成法が用いられたきたが、これは放射線照射後の細胞の分裂能の喪失を意味するのであって、直接的な細胞死を評価するものではない (Puck and Marcus, 1956)。しかし、臨床的な放射線治療の効果は一般的に腫瘍の大きさの変化により判断される。すなわち、治療が有効と判断されるためには、腫瘍サイズの減少あるいは消失が必須条件であり、これは腫瘍細胞の消失を意味する。そこで本研究では、p53 status の異なった2種類の神経膠芽腫細胞株、すなわち p53 野性株である A172 と p53 変異株である TK1 に対する重イオン線の効果を、コロニー形成法のみならず色素排除法、LDH release assay を用いて多角的に評価した。更に、重イオン線照射が果たして神経膠芽腫細胞に対しアポトーシスを誘導するかどうかの評価を、核の形態学的観察により確認した。

2-2 材料及び方法

2-2-1 培養細胞及び培養条件

ヒト悪性神経膠芽腫細胞株 A172 (p53 野性株) と TK1 (p53 変異株) を用いた。A172 は American Type Culture Collection より購入した。TK1 は筑波大学脳神経外科で神経膠芽腫患者より確立された細胞株である (Tsuboi et al. 1996)。これらの細胞はいずれも 10% 牛胎児血清、ストレプトマイシン、ペニシリンをそれぞれ

れ 100 $\mu\text{g/ml}$ 、100 U/ml 含む Eagle's minimal essential medium で 37°C、5%炭酸ガス培養器の中で静置培養した。対数増殖期を保つため、3~4 日間隔で継代培養を行った

2-2-2 放射線照射

重イオン線照射は放射線医学総合研究所の Heavy Ion Medical Accelerator (HIMAC)によって加速された 290 MeV/u の炭素線を用いて行った。本研究で使用した LET は 20, 40 および 80 keV/ μm である。HIMAC 生物照射室における線量および LET 測定の詳細に関してはすでに報告されているとおりである (Kanai T, et al. 1997)。比較実験としてのガンマ線照射 (線量率 1.2Gy/min) は、本学医学 RI 棟ガンマセル(^{137}Cs)を用いて行った。色素排除法と LDH release assay による細胞死の評価は、炭素線、ガンマ線とも線量 10 Gy、一回照射の後に行った。放射線照射はすべて室温で行った。

2-2-3 コロニー形成法、色素排除法及び LDH release assay による細胞死の検出

コロニー形成法はすでに報告されている標準的な方法を用いた (Tsuboi et al., 1998)。すなわち、0, 1, 2, 4, 6, 8 Gy の放射線照射直後にトリプシン処理により細胞を 25 cm^2 培養フラスコより剥がし、細胞数計数後適当数を 60mm 培養皿に播種し 2 週間培養した。2 週間後コロニーを 75%メタノールに溶解した 0.5%メチレンブルーにて固定染色し、コロニー計数後生存曲線を作成した。細胞数 50 個以上のものを生存したコロニーと判定した。得られた生存曲線は、市販の software (DeltaGraph Pro Ver. 4.0, DeltaPoint, Inc., Monterey CA) を用い linear-quadratic model (LQ model)によりカーブフィットを行った。

色素排除法は大山らの方法に準じて行った (大山ら, 1997a)。放射線照射後 1, 4, 7 日目にトリプシン処理にてフラスコに付着している細胞を剥がし培地内の浮遊細胞とともに集め、erythrosin B にて染色後血球計算板を用い総細胞数および染色された細胞数をカウントし、以下の式により Cell Death Index (CDI)を求めた。

$$\text{CDI} (\%) = \text{染色された細胞数} / \text{総細胞数} \times 100$$

LDH release assay は、極東製薬社製の LDH assay kit を用いて行った。放射線照射後 1, 4, 7 日目に培養上清を 50 μ l ずつ 96-well microplate に移し、LDH assay reagent と反応させその後 microplate reader にて 540 nm における吸光度を測定し、おのこの検体の LDH 活性を算出し非照射群の LDH 活性に対する比率を求め、"relative LDH activity"としてグラフ化した。

2-2-4 アポトーシスの検出及び定量化

アポトーシス検出は大山らの方法に準じ、核の形態学的変化から判定した。ヘキスト 33342 は濃度が 1 mM となるように PBS にて溶解し、使用まで -20℃ にて保存した。放射線照射後 1, 4, 7 日目に付着細胞をトリプシン処理し培養液中の浮遊細胞とともに遠心し集め、PBS にて 2 回洗浄後 2% グルタルアルデヒドにて一晩以上固定し、固定後最終濃度が 0.2 mM となるようにヘキスト 33342 を加え、核の形態学的変化を蛍光顕微鏡にて観察した。蛍光顕微鏡下で数視野の総細胞数及びアポトーシスを起こした細胞数を数え、以下の式により Apoptotic Index (AI: %) を算出、グラフ化した。

$$\text{AI} (\%) = \text{アポトーシス細胞数} / \text{総細胞数} \times 100$$

2-2-5 統計学的検定

統計学的検定はスチューデントの t 検定を用いて行った。各種放射線照射後の生存曲線の評価は、2 Gy 照射時における生存率 (surviving fraction at 2 Gy : SF2) で行った。CDI、relative LDH activity、AI は、主にガンマ線照射と各 LET の炭素線照射との有意差検定を行った。

2-3 結果

コロニー形成法により算出した生存曲線を図 1 に、10 % 生存率におけるガンマ線に対する relative biological effectiveness (RBE) の平均値を表 1 に示した。A172、TK1 とともに LET 依存性に生存率の低下が認められたが、この傾向は特に TK1 に

において顕著に認められた。SF2 で見てみると、A172 は LET 20 と 40 以外、TK1 ではすべての間で生存率に有意差が認められた。RBE も、TK1 の方が大きく、LET 80 では A172 と TK1 との間で統計学的有意差が認められた。

色素排除法により算出した CDI の結果を図 2 に示した。両細胞株において経時的な CDI の増加が認められたが、これも LET 依存性であった。更に、ガンマ線に対しより感受性を示す A172 ほど、ガンマ線抵抗株である TK1 よりも大きな CDI を示し、これはコロニー形成法の結果と一致した。

LDH release assay の結果を図 3 に示した。両細胞株において経時的な LDH 活性の上昇が認められたが、先のコロニー形成法あるいは色素排除法において認められた LET 依存性は LDH release assay でははっきり認められなかった。

図 4 に AI 結果を示した。ガンマ線照射群では照射後 7 日目まで観察してもアポトーシス細胞はほとんど認められなかった。また、炭素線照射後 1 日目ではアポトーシスはほとんど認められず、4 日あるいは 7 日目にアポトーシス細胞の増加が認められた。両細胞株において AI は LET 80 keV/ μ m 照射 7 日後に最高値を示し、その値は A172 では 8 %、TK1 では 4.5 %であった。

2-4 考察

佐々木らの報告によると、高 LET 放射線は Chinese hamster ovary 細胞に対し、より高い率で間期死を誘導するとされている(Sasaki et al., 1997)。間期死は従来のコロニー形成法だけでは評価できず、放射線、特に重イオン線の細胞障害性を評価するのに、コロニー形成法のみならず他の方法を用いる事は重要であり、また、より正確に放射線治療の臨床的効果を反映するものと考えられる。

本研究における結果は、2 種類の細胞株に対し炭素線はガンマ線よりも効果的に細胞死を誘発することを示した。RBE, CDI は本研究で用いた 80 keV/ μ m までは LET 依存性に増加したが、これらはコロニー形成法を用いた諸家らの報告と一致している(Tobias et al., 1982; Barendsen, 1997; Stenerl w et al., 1995)。100 keV/ μ m を越えると over killing が生じ RBE はむしろ低下するとの報告もある

(Tobias et al., 1982)。色素排除法において、A172はTK1よりも高いCDIを示し、LDH release assayにおいても同様の結果を示した。

現在では、細胞死には2つの形態、つまり、アポトーシスとネクローシスがあると考えられている。今回用いたコロニー形成法、色素排除法、LDH release assayが細胞死のどの部分をみているのか、あるいはこれらの方法でアポトーシスとネクローシスの区別が可能であろうか？LDH活性値は、照射された細胞数及び個々の細胞に内在するLDH量に影響される(Sasaki et al., 1992)。色素排除法は細胞死に伴う細胞膜の透過性亢進を示し、主に間期死の指標と考えられる。LDH release assayは細胞膜破壊によるLDHの培養液中への流出を検出するが、これは間期死、増殖死ともに反映すると考えられる。さらにLDHの細胞外への流出は細胞が死に至る過程の遅い時期に認められるとの報告もあり、色素排除法の方が早期の細胞死を判定しうることが推測される。。いずれにしても、これらの方法ではアポトーシスとネクローシスの区別は不可能であるが、これらは細胞死を違った観点から検出する方法であり(Bhuyan et al. 1976, Leonessa et al. 1986)、これらの方法を用いて多角的に細胞死を判定することにより、より正確に放射線の細胞障害性を評価できると考えられる。

放射線誘発アポトーシスは、胸腺細胞などの血液系細胞においては、照射後数時間以内に生じることが知られている(Yamada and Ohyama, 1988)。しかし、神経膠芽腫細胞における放射線誘発アポトーシスに関する研究、特に高LET放射線照射との関連に関する研究は非常に限られている(Takahashi et al., 1998, Tsuboi et al., 1998)。14種類の神経膠腫細胞を用いたStapperらの報告では、ガンマ線照射後30時間以内には、アポトーシスは全く認められなかったとされている(Stapper et al., 1995)。本研究では、放射線照射後7日まで観察した結果、アポトーシス細胞を検出することができたが、AIの最高値はA172で8%、TK1で4.5%

(いずれもLET 80 keV/μm照射後7日目)とCDIに比し非常に低く、全細胞死にしめるアポトーシスの関与は高LET放射線照射でも非常に低いものと考えられた。ただし、蛍光染色による核の形態学的観察だけでは、アポトーシス細胞

を過小評価している可能性がある。また、色素排除法だけではアポトーシス細胞とネクローシス細胞の判別は不可能であり、より正確なアポトーシス細胞の判定には TUNEL 法などの併用が必要であると考えられた。

p53 は、放射線照射などによる DNA 損傷後に誘発されるアポトーシスにおいて重要な役割を担っている(Levine, 1997; Lowe et al., 1995)。本研究でも、炭素線照射後 p53 変異株である TK1 よりも p53 野生株である A172 の方が AI が高かったが、この傾向は低 LET 放射線照射後に誘発されるアポトーシス(Levine, 1997; Lowe et al., 1995)と同様であった。更に本研究により高 LET 放射線は、p53 変異株である TK1 にも数は非常に少ないがアポトーシスを誘発しうることが示された。近年 p53 非依存性のアポトーシスの存在が報告されているが(Haas-Kogan et al. 1996, Strasser et al. 1994)、重イオン線照射によるアポトーシスの誘発にも p53 非依存性の経路が関与している可能性がある。ただ、この点に関しては更に多くの細胞株を用いて検討する必要がある。