

「ヒト悪性黒色腫由来皮膚がん培養細胞に対する X 線と陽子線照射効果の比較研究」
Comparison of Proton Particle and X-ray Irradiation Effects for Cultivated Melanoma Cells

三好憲雄^{*1}、福永幸裕^{*1}、鍵谷豪^{*2,*3}、福田茂一^{*2}、久米恭^{*2}、山本和高^{*2}
Norio MIYOSHI, Yukihiro FUKUNAGA, Gou KAGIYA, Shigekazu FUKUDA, Kyo KUME, and
Kazutaka YAMAMOTO

Abstract

In order to apply of the proton particle irradiation for clinical cancer treatment, the cultivated melanoma cells (HMF) were irradiated in dose-dependently by the proton particles in WERC. The treatment effects of the cells were compared with those cell damages by X-ray irradiation using a flow cell analysis. In the results, the percentage of the necrotic cell damage by the proton particles irradiation were larger about 2 times than that by the X-ray irradiation in dose-dependently. It was expected that the treatment by the proton particle irradiation would be more effective for the cancer treatment comparing the X-ray treatment.

要約

陽子線照射を臨床のがん治療に応用するために、ヒト悪性黒色腫由来培養細胞(HMF)を使用して若狭湾エネルギー研究センターにて陽子線を照射量を变化させて照射した。その照射効果は X-線照射の細胞損傷に対してフローサイトメーター(細胞自動分析)により比較した。また、放医研の重粒子治療センターの炭素線照射の効果とも、同じ細胞を使用して比較した。その結果、陽子線照射による壊死的細胞損傷の割合が X-線照射による損傷に比較して2倍であった。この成果から陽子線照射治療法 X-線照射よりもがん治療にはより効果的であることが期待される。

I. 緒言

従来より、重粒子線治療のメリットとしては、その組織透過度においてより優れた治療ができ、大きな腫瘍に対しても優位性を発揮すると報告されている。また、他の正常臓器へ与える副作用も X 線照射に比較して軽減されていると言われている。

今回の研究では腫瘍組織への深達性の優位性やサイド効果の軽減以外のメリットを見つけるために、ヒト白血病由来培養細胞を使用して、陽子線照射治療に対する治療効果、特に照射後の壊死によるがん細胞死の割合を検出することにより、X 線治療効果と比較検討することにした。その治療効果から陽子線照射治療のメカニズムにおいて、X 線治療と比較した優位性の有無を明らかにした。

II. 方法

1. 福井大学医学部でヒト悪性黒色腫由来培養細胞(HMF)の培養細胞のメンテナンスを行い、その浮遊細胞溶液を若狭湾エネルギー研究センターに移動し、そのサンプルに対して、高エネルギー生物照射装置で陽子線を照射(1-20Gy)した。その陽子線治療のメカニズムにおいて X 線照射治療と比べた優位性を明らかにする。
2. X 線照射装置は、福井大学・医学部附属の放射性同位元素実験部門のエクス線照射装置(Misono 社、

^{*1}福井大学・医学部・病因病態医学講座・腫瘍病理学領域、^{*2}粒子線医療研究室（*3：現所属：Radiation Biology Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health）

2.0mm のアルミニウム板使用、180 kVp, 16.5-23.5mA, 1.0 Gy/min; 線量計:RAMTEC 社、1500B 型)にて 1-20 Gy を照射した。

3. X線照射治療に対する陽子線治療効果の優位性を比較するために、照射したサンプルは内部放射能が減衰した段階で福井大学に持ち帰り、陽子線照射に対する治療効果を福井大学・医学部に設置のフローサイトメーター(細胞自動分析器:Coulter EPICS-XL: Beckman Coulter: System-II; 蛍光2重生体染色:MBL 社、MEBCYTO-Apoptosis Kit. Code, 4700: AnnexinV-FITC と Propidium Iodide の二重染色)による細胞死の分析結果から X線治療効果と比較検討した。

4. 照射により損傷した細胞の形態学的観測は、福井大学・医学部に設置のレーザー顕微鏡(Leica 社、DMIRE2 型の倒立顕微鏡)と蛍光顕微鏡(Olympus 社、IX-70 型、倒立顕微鏡、DP70 デジタルカメラ;浜松ホトニクス社、C7418 Peripheral Controller, C4742-95 Camera Controller; Soft ware : DP Controller)を使用した。

III. 結果

1. フローサイトメーターによる細胞損傷度の比較:

図 - 1の上段のフローチャートは損傷を受けた細胞と受けない細胞がフローサイトメーターによる散乱光で分離したものである。青色で表示のドット群は、まだ損傷を受けていない細胞群であり、赤色枠のドット群は損傷を受けた細胞群である。

未照射(A)群は損傷が少ないことが分かる。X線(B)と陽子線(C)照射群は共に細胞損傷があることが分かる。

そこで、その細胞死のタイプを判別するために、PI 赤色と FITC 緑色2色の二次元チャートで表示すると、下段のように、細胞死のタイプが4つの領域で判別できた。右上の赤色で表示の壊死領域と右下の黄緑色の表示部分はプログラミングされた(アポトーシス)細胞死である。

このような細胞死には X線と陽子線照射により、細胞死のタイプの割合の変化があるように思われたので、統計処理をした。

その結果、各々の細胞死の割合を図 - 2に提示したように算出することができた。

2. 細胞死の割合変化

図 - 2のグラフのように、炭素線(濃青色)による照射は放医研の重粒子線治療センターにて行ったものであるが、同じヒト悪性黒色腫由来の培養細胞(HMF)に対する炭素線照射治療効率はX線や陽子線の治療効率に比して約2倍であった。

しかし、同じ治療効率であっても、X線と陽子線では細胞壊死に至る割合が異なることが明らかになった。すなわち、陽子線の方がX線照射に比べて、照射量の多い条件下では、約2倍の壊死効率になっていることである。

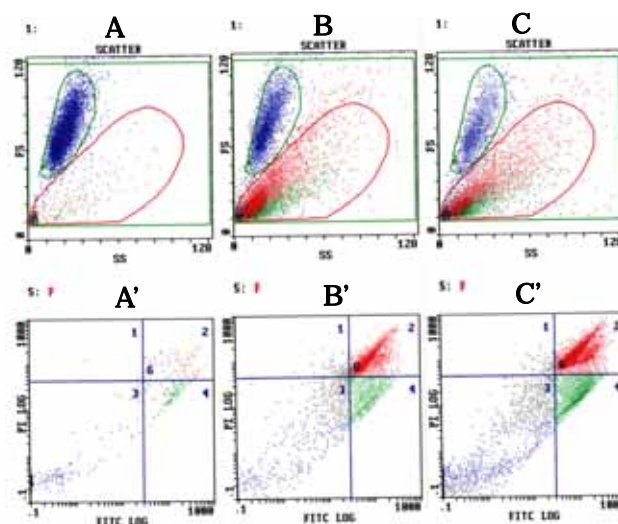


図 1 フローサイトメーターの2次元フローチャート:上段2次元チャート:縦軸=前方散乱強度、横軸=側方散乱強度(両対数)。下段2次元チャート:損傷を受けた上段赤色枠細胞の2重染色、縦軸のPI 赤色蛍光強度と横軸の FITC 黄緑色蛍光強度(両対数)。A,A =未照射細胞、B,B =X線(10Gy)照射細胞、C,C =陽子線(10Gy)照射細胞

3. レーザー顕微鏡による細胞損傷の観測結果

未照射群、X線と陽子線照射群(10Gy)の細胞を2重蛍光染色して、フローサイトメーターにて計測後、残った各々群の細胞をレーザー顕微鏡にて観測した。各々群の典型的蛍光細胞像を図 3に提示した。

未照射群[A]では、細胞核に極くわずかのPI 赤色蛍光が観測され、細胞膜表面にも極くわずかではあるが薄く染色されていることから、膜表面に Annexin-V タンパクが存在していることが分かる。また、X線照射[B]により細胞膜の損傷によるPI 色素分子が細胞核に良く染色されている。

更に陽子線照射群[C]では、上記の黄緑色と赤色蛍光のどちらとも濃染した細胞壊死が亢進した細胞像として評価できた。

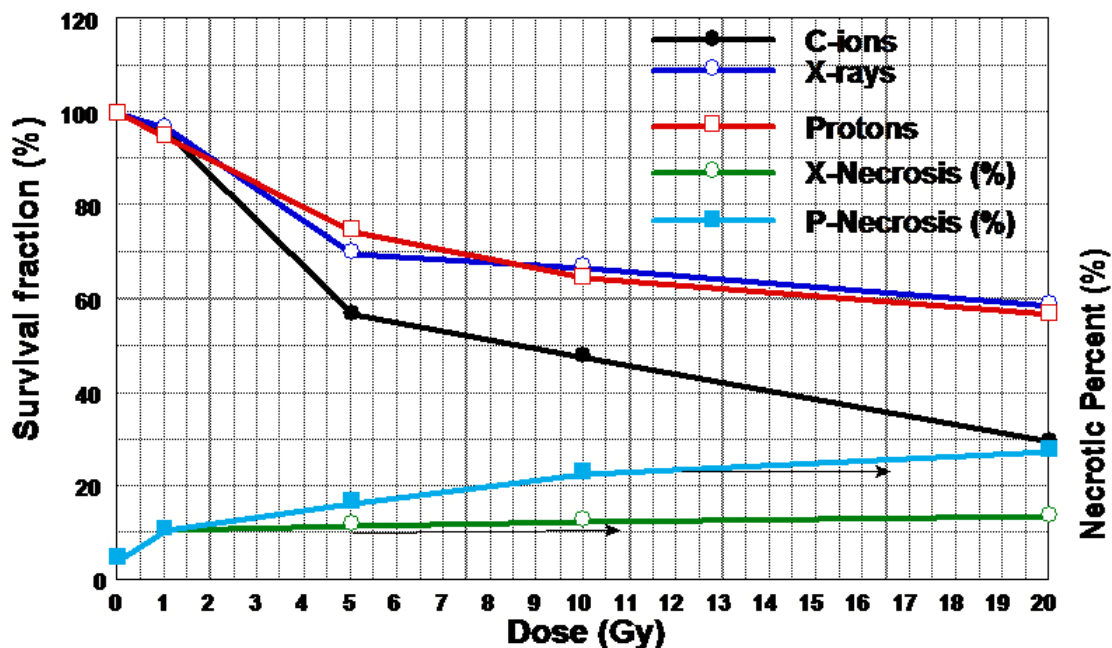


図 2 ヒト悪性黒色腫由来培養細胞の X 線と陽子線及び炭素線の照射量変化による生存率と細胞壊死率の変化:生存率:黒色=炭素線、青色=X 線、赤色=陽子線;細胞壊死率:緑色=X 線、水色=陽子線

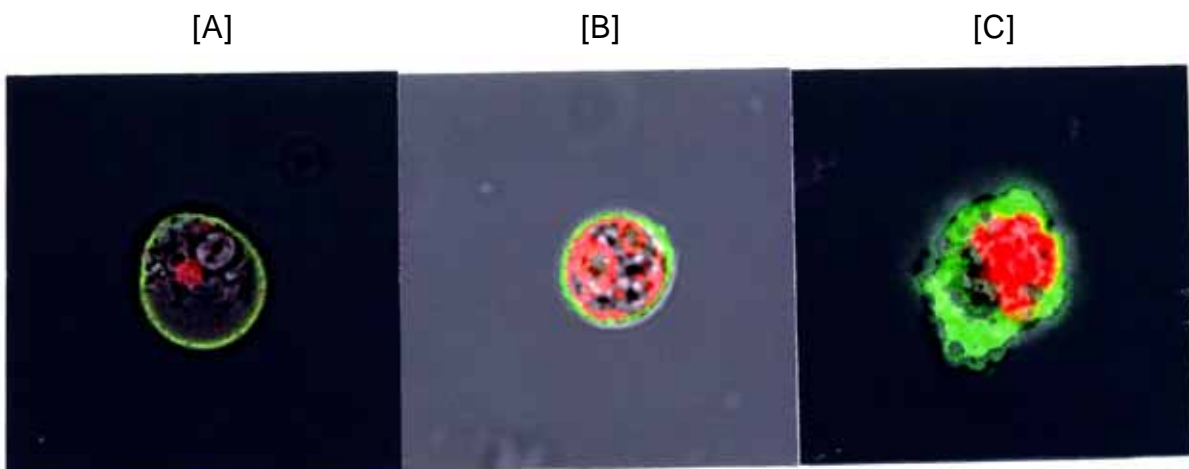


図 - 3 ヒト悪性黒色腫由来培養細胞(HMF)に対する未照射[A]、X線照射(10Gy)[B]、陽子線照射(10Gy)[C]群の典型的レーザー顕微鏡写真像(X600)

IV. 考察

以上の結果から、陽子線によるヒトがん細胞由来の培養細胞に対する照射効果は、従来のX線治療効果とあまり大きな差異を認めなかったが、細胞死に至るタイプの割合に変化が現れた。そのタイプとしては2種類あり、プログラミングされた細胞死(アポトーシス死)と壊死であり、臨床でのがんの根治には壊死のタイプが大きく関係していると言われている。

従って、陽子線照射治療の方が、従来のX線照射治療に比してよりがんの根治に大きく貢献することが期待される。それは、レーザー顕微鏡による形態学的観測からも、フローサイトメーターの分析結果をはっきりと裏付ける結果となった。

V. 結語

今後、臨床でがん治療に陽子線照射を適用するに当たり、治療メカニズムとしては恐らく壊死が主なプロセスになるのではないかと示唆が得られたものと理解している。また、陽子線照射治療の増感剤を検索するにあたり、壊死に陥りやすいものを併用することも、今後の治療効果を更新できる指標になるのではないかと考えている。

VI. 謝辞

実際の陽子線治療の臨床サイドから、貴重なアドバイスや消耗品費の援助を頂いた県立病院・泌尿器科医長の平田昭夫先生に、厚く御礼申し上げます。また、この共同研究は、若狭湾エネルギー研究センターの協力研究員として行われたものであり、この研究の遂行にあたり深謝する。更には、本研究において武田薬品工業株式会社・福井営業所から奨学寄附金を受けているので、感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 三好憲雄:朝日新聞、平成18年2月9日、29頁 福井版 (2006).
- 2) 福井新聞、平成18年2月9日、3頁 県内経済 (2006).
- 3) 鍵谷豪、三好憲雄:県民福井。平成18年2月9日、(2006).
- 4) 三好憲雄、平成17年度若狭湾エネルギー研究センターにおける共同研究報告書、(2006).