

放射光由来 X 線微小平板ビーム治療(MRT)の基礎研究：血液脳関門 (BBB) を中心とした、ラット正常組織における MRT 影響解析

Basic Study of Microplanar Beam Radiation Therapy: Analysis of Effects on the Blood-Brain Barrier in Rats

東北大学加齢医学研究所大学院博士課程 1 回生 栗原 愛

<背景と目的>血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) とは、脳毛細血管と脳細胞の間に存在し、高分子や水溶性分子の通過を制限することにより脳内への毒性物質の侵入を防御し、また脳細胞周囲の細胞環境を維持する働きをしている。BBBは、脳毛細血管内皮細胞、グリア細胞、基底膜から構成されるが、中でも血管内皮細胞は放射線感受性があり、被ばく障害の標的となりうる。そのため、放射光照射によるBBB透過性の変化が考えられる。あらたな組織観察対象として、BBBに注目し、従来の放射線治療法とMRTが与える影響の違いを解析したいと考える。

<方法>

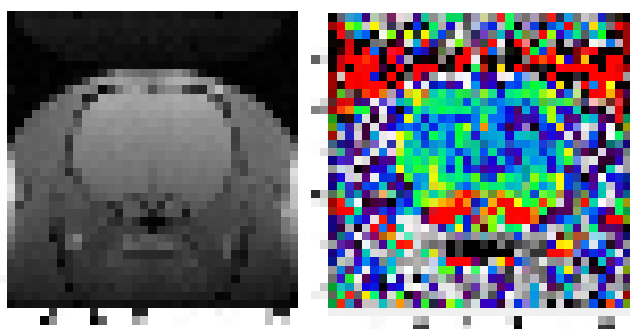
- 1) 白色 X 線放射光照射法について、BL28B2 の第 2 光学ハッチに、線量計測用イオンチェンバー、マイクロスリットとこれの位置合わせ機構、ハッチ据付のメインコリメータをこの順で設置し、その下流に実験動物、画像検出器を配置した。ハッチ据付の PC で照射時間を制御し、microbeam および、broadbeam を正常ラット脳に対してそれぞれ照射した。照射 1, 3 時間後、1 日後、1 週間後、1 ヶ月後にそれぞれ屠殺し、その組織を保存した。
- 2) BBB に及ぼす影響について、エバンスブルー (Evans blue : EB) 法を用いて検討を行った。エバンスブルーは静脈内に投与されると速やかに血清アルブミンと結合する。血清アルブミンは正常な BBB を通過しないため、血管外の脳内に EB が存在している場合、異常と判定される。そこで正常脳ラットに対し、2%エバンスブルー液 0.5mL の尾静脈内投与を行った後、microbeam および、broadbeam の照射を行い、脳組織中への漏出を指標に、脳血管透過性をそれぞれ評価した。

- 3) 動物が生きた状態での BBB 破綻による脳浮腫の出現を確認するため、照射直後のラットを空輸して、秋田県立脳血管センターにて動物用 MRI を持ちて、脳の断面を画像化した。また、Arterial Spin Labeling という手法を用いて、トレーサーを用いずに脳血流変化について測定を試みた。
- 4) 実際の照射前の腫瘍内および辺縁正常脳内の毛細血管の血流を組織で可視化するために C6 ラットグリオーマ細胞を脳内移植したものを、移植後 14 日で深麻酔下にて断頭し、毛細血管内にトラップされた赤血球を DAB にて染色した。
- 5) ラットの脳血管内皮基底膜に特異的で BBB が保たれている状態でのみ発言される、endothelial barrier antigen (EBA) にて同様に C6 ラットグリオーマ移植脳を灌流固定の後、免疫染色した。
- 6) 血管内皮の透過性を亢進させ脳浮腫の発現に重要な働きを果たしている VEGF が microbeam 照射後にいかに発現されているかを、組織の免疫染色および組織の ELISA 解析により定量した。

<結果>

1) 正常脳に対するmicrobeam照射後のMRI画像の変化と脳血流変化

下図に示すように、microbeamを照射された大脳半球(右側)はT2強調画像にて特記すべき脳浮腫(BBBの破綻)や脳損傷を示さなかった。一方、arterial spin labeling による血流測定では、照射側の軽度の血流低下を示した(下図の青の部分が相対的な血流低下を示す)。



2) 担脳腫瘍動物の脳内での血管分布

毛細血管内にトラップされた赤血球は正常脳組織では均等に分布し、脳表面からの皮質動脈により血行支配されていることがよく観察できた。一方、C6

グリオーマ細胞を移植された脳では、周辺脳が腫瘍による圧迫のため赤血球の分布が減少しており、さらに腫瘍内部ではほとんど赤血球に乏しい、乏血状態であることがわかった。このことは、腫瘍が恒常的に低酸素状態に置かれていることを示していると思われた。

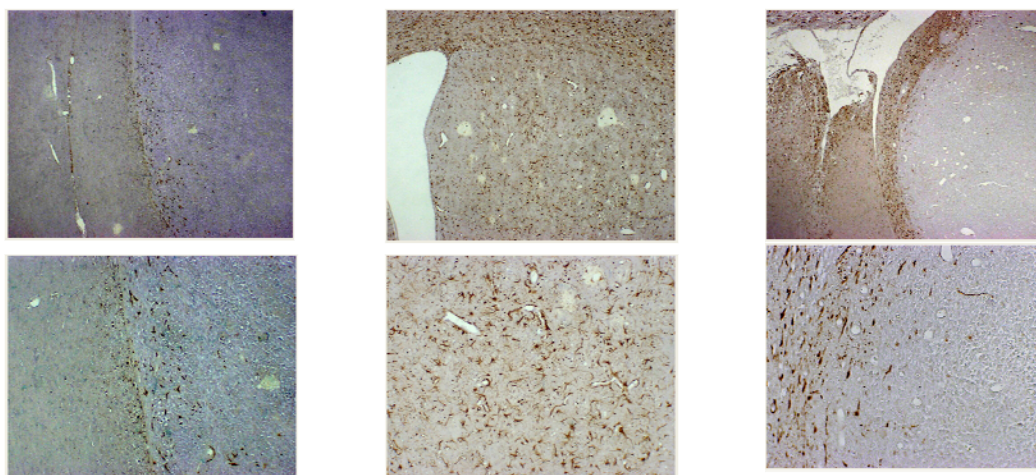
3) EBA免疫染色

EBAによる免疫染色では、正常脳のみを評価した。非照射では良好に脳内毛細血管すべてが陽性に染色されたが、microbeamによる格子状照射あるいはbroad照射では同等に染色性が欠け、部分的にBBBが破綻していることが示唆された。

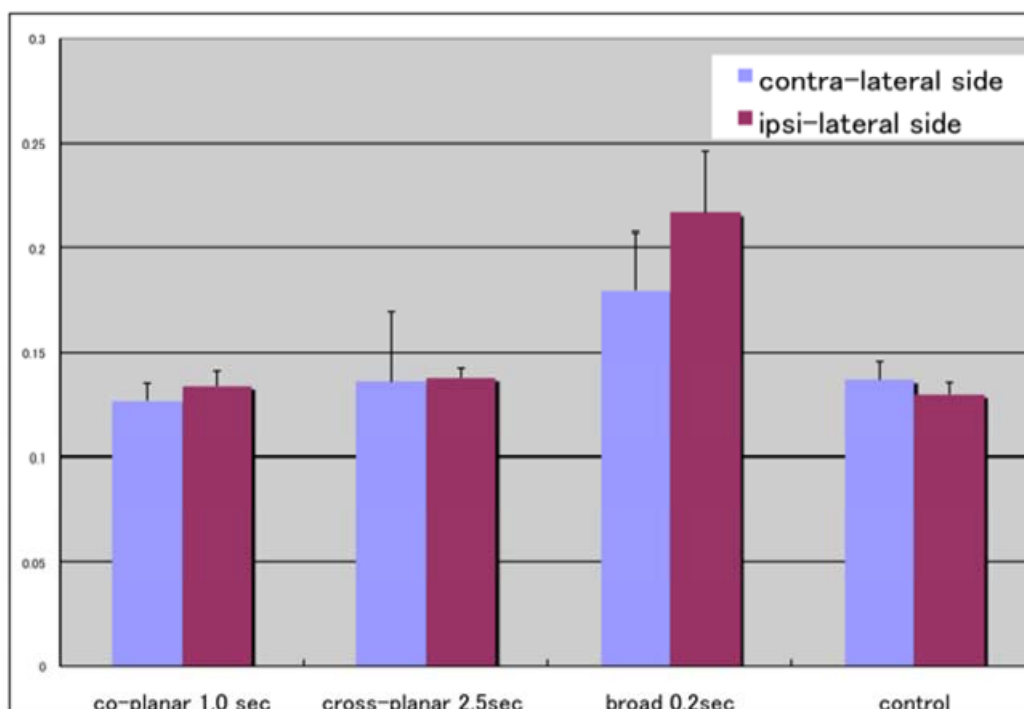
4) VEGFの発現

C6グリオーマを移植された脳では腫瘍辺縁部にわずかにVEGFの強発現を組織学的に認めた。一方、正常脳に照射を行うと、皮質大脳基底核広範囲にわたりVEGFの発現を認めた。興味あることに、C6グリオーマを移植された脳に照射をおこなっても、腫瘍ではVEGFの発現は認められず、従って照射に対する血管系の反応は正常脳で活発であり腫瘍内では非常に乏しいことが示された。

C6 glioma (no treat) Normal brain (cross-planar) C6 glioma (cross-planar)



また、正常脳に対する照射後組織のELISAによる定量評価では、broad照射によるものが最も発現が強く、microbeam（格子状あるいはすだれ状）ではコントロール（非照射）と変わらない程度の発現であった。



<考察>

我々は2007年から続く一連の照射実験で、正常組織におけるMRTの影響を検証してきた。これまでの実験より、microbeam照射を行った正常ラット脳と、従来の放射線療法で用いられるbroad beam照射ラット脳とを比較し、浮腫やグリア細胞の反応が、microbeam radiation照射の方がより軽微であることを、病理組織学的解析手法で明らかにしてきた。本研究によりさらに、ラットの脳微小血管系におけるMRTの短期および長期影響の特性が明らかになり、血液脳関門透過性変化の機序を調べることができた。

現時点で、我々が現在考えている空間的分割照射の抗腫瘍効果の機序は、以下のようなものである。

- 1) 腫瘍組織内の腫瘍新生血管がマイクロビーム X 線照射で分断されると微小出血や微小循環不全が生じる。
- 2) もともと低酸素状態で必要最低限の酸素供給しか受け取っていなかった腫瘍組織はわずかな代謝の低下で広範囲に壊死に陥る。
- 3) 正常組織内の正常血管は、マイクロビームで分断されても血管内皮の傷害は最小限にとどまり周囲組織へ悪影響を及ぼさない。また、慢性期になっても反応性の血管内皮増殖は無視でき、閉塞性機転を示すこともない。

腫瘍血管と正常脳内血管の関係は、現時点ではC6グリオーマでしか比較検討していない。今後、異なる腫瘍細胞間での比較により、本研究で示された結果が、多くの腫瘍に共通の現象であるかC6グリオーマに特有の現象であるかを今後検証する予定である。

<参考文献>

- 1: Gu YT, Zhang H, Xue YX. Dexamethasone enhances adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel expression in the blood-brain tumor barrier in a rat brain tumor model. *Brain Res.* 2007, 1162:1-8.
- 2: Coderre JA, Morris GM, Micca PL, Hopewell JW, Verhagen I, Kleiboer BJ, van der Kogel AJ. Late effects of radiation on the central nervous system: role of vascular endothelial damage and glial stem cell survival. *Radiat Res.* 2006, 166:495-503.

- 3: Liu Y, Xiao S, Liu J, Zhou H, Liu Z, Xin Y, Suo WZ. An experimental study of acute radiation-induced cognitive dysfunction in a young rat model. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010, 31:383-7.
- 4: Adam JF, Biston MC, Joubert A, Charvet AM, Le Bas JF, Estève F, Elleaume H. Enhanced delivery of iodine for synchrotron stereotactic radiotherapy by means of intracarotid injection and blood-brain barrier disruption: quantitative iodine biodistribution studies and associated dosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005, 61:1173-82.
- 5: Argandoña EG, Bengoetxea H, Lafuente JV. Lack of experience-mediated differences in the immunohistochemical expression of blood-brain barrier markers (EBA and GluT-1) during the postnatal development of the rat visual cortex. *Brain Res Dev Brain Res.* 2005, 156:158-66.