

微小ビーム放射線治療の基礎研究：放射光による組織変化の解析

東北大学医学系研究科 博士課程1年 栗原 愛

<課題番号>

2008A1750

<ビームライン>

BL28B2

<研究の背景>

がんに対する放射線治療の目的は、正常組織の損傷を最小限に抑制しつつがん組織を完全に破壊することにある。微小平板ビーム放射線療法（MRT：microplanar beam radiation therapy）は新しい放射線治療法として検討されているものの一つである。MRTは、スリット状コリメーターを通して、すだれ状のX線ビームを腫瘍組織に照射する放射線治療法であり、従来の放射線療法とは全く異なり、がん細胞だけが死滅するが、周囲の正常組織は損傷を受けないと報告されている。

<研究の目的>

放射線照射による正常組織への影響を最小限にして悪性脳腫瘍治療効果を最大にする方法を開発する事が最終的な目標である。本研究では、動物実験（in vivo）における悪性腫瘍の治療法としてmicrobeamが従来の放射線療法（broadbeam radiation）よりも有効であるのかを評価することや、最も効果的な応用法を明らかにするための基礎的な生物学的な知見を積み上げることを目的とする。そこでMRTの効果を評価する第一段階として、正常組織に対する影響を検討した。ラット正常脳に対し、スリット照射とブロード照射を行い、経時的に屠殺し、組織学的に解析した。

さらに本研究では、ラット脳正常組織に対してより悪影響の少ないMicrobeamの至適照射条件を探るために、抗炎症剤の投与等の処置を行った際の、microbeam照射によるアストログリアの応答を経時的に観察した。

<実験方法>

7週齢オスのWistarラットを麻酔下で固定し、右脳の縦12mm横4mmの範囲に、前後一方向にSPring-8の共用ビームラインから取り出した放射光X線を照射した。スタレ状照射ではスリット幅25 μ m、ピーク・ピーク間隔200 μ mのコリメータを用いて、ピーク線量110 Gy/secのマイクロビームを創出し、10秒間の照射（ピーク線量1,100 Gy）を行った。ブロード照射は140 Gy/secで2秒（280 Gy）の条件で行った。照射1日、1週間、1ヶ月後にネブタール麻酔にて安楽死させ、10%ホルマリンで灌流固定した後、組織切片を作製した。通常のhematoxylin eosin (HE)染色およびKluver-Barrera (KB)染色を行った。血管と中枢神経細胞の間に位置し、ニューロンの支持と保護を司るastrocyteに陽性であるglial fibrillary acidic protein (GFAP)と、活性化あるいは未分化astrocyteに陽性であるvimentinの免疫組織化学を用いて詳細な組織変化も観察した。

また、ステロイド系抗炎症剤であるサクシゾン[®]は、脳血管門を通過することが知られており、脳へのX線照射によって引き起こされる炎症反応を抑える効果が期待される。そこで、同条件のラットに対し30 mg相当のサクシゾンを経口投与して1時間経過した後、正常ラットと同様に照射実験を行い、その違いを考察した。通常のhematoxylin eosin (HE)染色およびKluver-Barrera (KB)染色を行った。血管と中枢神経細胞の間に位置し、ニューロンの支持と保護を司るastrocyteに陽性であるglial fibrillary acidic protein (GFAP)と、活性化あるいは未分化astrocyteに陽性であるvimentinの免疫組織化学を用いて詳細な組織変化も観察した。

<実験結果>

サクシゾン非投与ラットについて、スリット照射群が、照射1ヶ月後も全匹が生存していたのに対し、ブロード照射群は、照射2週間後にはすべて死亡した。開頭した際の肉眼所見では、ブロード照射群では照射野に一致して充血が明らかであったがスリット照射群では明確ではなかった。各種染色法によって観察された結果を、以下の表に示す。

照射後	スリット照射群	ブロード照射群
1日	<ul style="list-style-type: none"> 照射ピークに一致して、神経細胞の脱失と脱髄。 右脳（照射側）・左脳（非照射側）両側で大脳皮質の深層から帯状束に活性化astrocytes。 	<ul style="list-style-type: none"> 照射部位に一致して顕著な浮腫。 照射部位の大部分において、神経細胞の脱失と脱髄。 照射・非照射両側で大脳皮質の深層から帯状束に活性化astrocytes。
1週	<ul style="list-style-type: none"> 照射範囲にスリット状に活性化グリア細胞。その数がピークに達する。 照射・非照射両側の大脳皮質深層から帯状束に、活性化astrocytesが分布。 	<ul style="list-style-type: none"> 照射部位全体に、陽性細胞を認めたが、大部分は生存しておらず。 右脳、左脳両側の大脳皮質深層から帯状束においても、活性化astrocytesが分布。
1月	<ul style="list-style-type: none"> スリット状に観察されたastrocytes数が大幅に減少するも、消失はせず。 両側の大脳皮質深層から帯状束における強陽性グリアも消失せず。 	<ul style="list-style-type: none"> 全個体は照射10日後までに死亡。

これらの結果から、照射法に関わらず、照射野に一致して脳組織の変性は起こるが浮腫やグリア細胞の反応はスリット照射の方が軽微であることは明確であった。

免疫組織化学的にGFAPとvimentinの陽性細胞が一致しているか否かが明確でなかったため、この点を検討する目的で、GFAPとvimentinの二重染色を行った。その結果、GFAP陽性astrocyteの数と分布はほぼ不変であったのに対し、vimentin陽性細胞は、スリット照射群では照射ピークに一致して増加し、1月後には減少した。しかし、スタレ状の染色性が保たれていることから、照射前後でグリア細胞が移動しないことが明らかとなった。スリット照射とブロード照射に拘わらず、大脳皮質の深層から帯状束にvimentin強陽性astrocyteが分布しており、それが照射されていない対側においても同様に観察されたことは、グリア同士のネットワーク形成によるバイスタンダー効果があることを示唆している。

サクシゾン投与ラット群においても、スリット照射では、1ヶ月後も生存していたのに対し、ブロード照射群は、照射2週間後にはすべて死亡する結果となった。一方で、サクシゾン非投与群ではスリット・ブロードに関わらず、照射

後麻酔覚醒時に、痙攣が起こるラットがしばしば存在したが、サクシゾン投与スリット照射ラット群では、このような症状が表れたラットが一匹も存在しなかった。また、活性化あるいは未分化 astrocyte に陽性である vimentin 抗体を用い、免疫化学組織染色を行ったところ、サクシゾン非投与群ラットと比較し、投与群のスリット照射ラットでは、照射範囲の対側において、その陽性細胞数が少なく、反応性がより軽微であることが観察された。これらの結果から、スリット照射前のサクシゾン投与が、放射線照射による生体への負担を抑える方法として有効であることが示唆された。

<結論>

スダレ状スリット照射が腫瘍細胞に対して傷害が大きければ、正常細胞に対してブロード照射よりも悪影響の少ない放射線照射法として有効であると考えられる。また、ステロイド系抗炎症剤サクシゾンを予め投与することにより、ラット脳正常組織に対してより悪影響の少ない効果を得られることが、明らかとなった。

今後 vimentin 陽性グリア細胞が正常脳に対して保護的な役割を演じているのか、却って攻撃的な作用を及ぼしているのかについて明らかにする必要がある。また、臓器レベルでの複雑なバイスタンダー効果の存在が考えられ、この点についても正常脳に対して有害なのか否かを明らかにする必要がある。