超高線量率照射効果のメカニズム解明に向けた取り組み

The radiotherapy performed at ultra-high dose rate over 40 Gy/s, so called FLASH radiotherapy, has attracted great interests due to its therapeutic advantage. The killing effect to tumors is maintained while the damage to surrounding normal tissues is minimized as compared to the conventional dose rate of < 0.1 Gy/s. The specific point is that the ultra high dose rate irradiation spares healthy tissues. The FLASH effect has been actively investigated in radiobiological studies with electrons, protons and heavy ions. One of key points for the mechanism is in the chemical reactions occurred in tissues. The sparing effect is related to yields of water radiolysis products, which contributes to the indirect action onto the DNA strand break. In this review, we introduce our experimental verification of ultra high dose rate irradiation effect in water by proton and carbon ion irradiation.

Keywords: FLASH, dose rate effect, radiolysis, radical

1 はじめに

超高線量率放射線治療(FLASH)は周囲の正常組織 へのダメージを抑えつつがん治療を行うことを目的 とした,新たな放射線治療法として近年注目を浴び ている.瞬間的に高線量を照射する様子から"フラッ シュ"と呼ばれており,その線量率は40 Gy/s 程度以 上とされている^{1,2}).高線量率照射によって細胞への ダメージが軽減される効果(以後,スペア効果)につ いては,1960年代に既に報告されており³),特に放射 線感受性は酸素濃度に依存して変化することが知ら

Experimental verification of ultra high dose rate irradiation effect

Satoshi Kodaira^{*} and Tamon Kusumoto (*National Institutes for Quantum Science and Technology*),

〒263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1

TEL: 043-206-3479, E-mail: kodaira.satoshi@qst.go.jp

放射線化学 第114号(2022)

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 小平 聡*, 楠本 多聞

れていた^{4,5)}.近年の加速器技術の発達が主な要因と 思われるが、線量率効果に関する研究は、2014年の Favaudon 等の in vivo 研究²⁾ に端を発して再注目を浴 び,急速に世界中で研究が進められるようになった. 特に 2018 年頃より FLASH に関する論文数が急増し ている。これまでの報告は主に電子線によるものが 主であったが⁶⁾,最近は陽子線や重粒子線に関する研 究⁷⁻¹⁰⁾ が増加している. FLASH 照射によるスペア効 果で放射線誘発毒性が低減される一方で、腫瘍への殺 傷効果は維持されるとの理解がなされている11). これ が本当だとすれば放射線治療にともなう副作用が軽 減され生活の質を更に高めるものと期待される。細胞 やマウスを用いた生物実験でスペア効果が確認され ている一方で^{1,8)},認められない生物実験データもあ り^{12,13)}, FLASH 照射によるスペア効果の真偽につい てはまさに議論が進行中である.幾つか解説論文が出 版されているので, FLASH 談義は文献¹⁴⁻¹⁶⁾を参照さ れたい.

原理的な部分を明らかにするための理論モデルや シミュレーション研究^{17,18)}も着実に進められている. Pratx 等が行った拡散の計算では線量率上昇に伴い酸 素濃度が低下すると試算されている¹⁹⁾. Abolfath 等が 行った Geant4-DNA による計算ではトラック間で生成 される活性酸素種の生成量の低下(それにともなう 非活性酸素種の増加)や他の分解生成物の反応によ る低酸素化がスペア効果に関係していると指摘して いる²⁰⁾. 放射線照射によって生成する水の放射線分 解生成物と周囲の酸素との二次反応によって消費さ れ, DNA 損傷固定に必要な酸素が不足したことがス ペア効果をもたらしたと解釈される。また、多岐にわ たる細胞実験条件から,照射環境の酸素濃度がスペア 効果に大きな影響を及ぼしていることが示唆されて いる¹⁴⁾、特に粒子線の細胞致死効果を考えた場合、ブ ラッグピーク近傍では直接作用が支配的であり、 プラ トー領域での間接作用に線量率効果が有意に働いてい るとすれば、より優れた治療効果(がん殺傷効果と副 作用の比)が期待される.



Figure 1. A schematic view of forming 7OH-C3CA due to the reaction of C3CA with hydroxyl radicals²⁴⁾. There are two pathways for the stabilization: Pathway A is via disproportionation and Pathway B is via elimination depending on the surrounding oxygen.

このようなことから,間接作用と密接に関係する水 の放射線分解生成物の放射線化学的収率の線量率依存 性を実験的に調べることは FLASH 照射効果のメカニ ズムを紐解くうえで重要であると考え,我々は水溶液 中のラジカル反応を利用した放射線化学実験を進めて いる.本トピックでは,まず手始めに実施したクマリ ン-3-カルボン酸(C3CA)を用いた実験結果について 紹介する.

2 実験体系

2.1 C3CA 蛍光プローブ

OH ラジカルを捕捉して蛍光を呈するクマリン-3-カルボン酸(coumarin-3-carboxylic acid: C3CA, 純度 >98 % 富士フィルム和光純薬)を用いた. C3CA を pH6.8 の 66 mM リン酸緩衝液(富士フィルム和光純 薬)に溶解させ水溶液とした. C3CA は反応率約 5 % で OH ラジカルと反応し, 蛍光性の7 ヒドロキシクマリ ン-3-カルボン酸(7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid:

7OH-C3CA)を生成する^{21,22)}. C3CAとOHラジカル の反応経路を Fig. 1 に示す²³⁾. OH ラジカル捕捉後の 不均化反応で 7OH-C3CA を生成する経路 A と、周囲 に存在する酸素が介在して 70H-C3CA を生成する経 路 B の二通りがある.両者の比は概ね 1:1 である²³⁾. また、C3CAの反応速度定数は $k = 6.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ で あることから,水の放射線分解生成物と酸素との二次 反応 $(H^{\bullet} + O_2 \rightarrow HO_2^{\bullet}, e_{aq}^- + O_2 \rightarrow O_2^{\bullet-}$ 等) 後の状態 を観察することになる. 経路 A は周囲の酸素状態には 依存しない.もし FLASH 照射による低酸素下があれ ば,経路Bが遮断されるので,結果として70H-C3CA 収率は酸素濃度に依存して変化すると考えられる.ま た、水溶液濃度を調整することによって、ラジカルの 捕捉時間を調節することができる。本研究では20mM から 0.2 mM の試料を用意した. これは捕捉時間 7 ns から1µsに相当するので、トラック内反応が終了す る 100 ns 付近までの反応状態を調べることができる. いわゆる酸素モニターでのバルクな酸素濃度測定と は時空間のスケールが異なり、トラック近傍で起きた

100 ns 付近の時間スケールでの二次反応から,低酸素 化状態を調べることができると考えられる.

7OH-C3CA を 370 nm で励起すると 410 nm の蛍光 を呈するが, C3CA の自家蛍光や異性体からの蛍光が バックグラウンドになるため, 高速液体クロマトグラ フィ (Prominence-I/島津製作所, カラム Hypersil GOLD C18/Thermofisher) により 7OH-C3CA を分離してから 蛍光検出器 (RF-20A/島津製作所) で蛍光強度を定量 分析した.

2.2 照射実験

(国研)量子科学技術研究開発機構のサイクロト ロン AVF-930 からの陽子線と重粒子線がん治療装置 HIMAC からの炭素線を用いた.陽子線のエネルギー は 30 MeV, 60 MeV の 2 種類,炭素線は 140 MeV/n とした.照射線量率は 0.02 Gy/s (CONV 条件)から 150 Gy/s (FLASH 条件)まで変化させ,照射線量は 10 Gy から 80 Gy までの範囲とした.照射線量はマー カス電離箱を用いて定量化し,並行平板電離箱ビーム モニタで照射制御を行った.

各濃度の C3CA 溶液を入れた 200 µL PCR チューブ を照射対象とし,(1) 大気条件と(2) 低酸素条件の二 通りの雰囲気で照射を行った.低酸素条件(酸素濃度 5 µM)は,試料中の溶存酸素をアルゴンガスにより 置換することによって作成した.アルゴンガス置換時 間に対する水溶液内の溶存酸素量の変化の実測から, 10 分以上のバブリングで低酸素条件が達成された.

3 結果と考察

Figure 2 は陽子線 30 MeV 照射による照射線量と 7OH-C3CA 濃度(1.4 mM C3CA 水溶液)の関係を線量 率毎に表したものである. 照射線量に対する線形性が 確認できるが,線量率に対してその傾きが緩やかにな る傾向となった. これは炭素線でも同様の傾向であっ た. これは線量率上昇にともなって 7OH-C3CA の生 成量が低下していることを表しており,それは線量率 を横軸にとると明確になる.

Figure 3 は線量率に対する 7OH-C3CA (20 mM C3CA 水溶液)の放射線化学的収率 (G 値)の変化を各ビーム に対して得たものである.陽子線・炭素線共に,線量 率の増加にともなって,G 値は単調に減少し,10 Gy/s 以上で横ばいとなった.これは Figure 1 で示した経路 B の遮断割合が線量率増加にともなって上昇したこと を表しており,水溶液中で低酸素化が起きたことを示 唆するものである²⁴⁾.なお,陽子線に比べて炭素線の



Figure 2. Irradiated dose dependency of molar concentration of 7OH-C3CA produced in C3CA solution (1.4 mM) due to proton 30 MeV irradiation²⁴).



Figure 3. Changes in *G* values of 7OH-C3CA as a function of the dose rate of 30 and 60 MeV protons and 140 MeV/u C ions²⁵⁾.

収率が小さいのはトラックに沿った電離密度が高いた めの再結合効果によるものである.この系の確からし さを確認するため,アルゴンガス置換した C3CA 水溶 液(20 mM)に陽子線 30 MeV を CONV 線量率で照射 した場合との比較を行った.

Figure 4 は大気条件と低酸素条件での照射線量に対 する 7OH-C3CA 濃度の比較を示しており,低酸素条件



Figure 4. Comparison of molar concentration of 7OH-C3CA produced in C3CA solution (20 mM) under the oxygenated condition with those under the de-oxygenated condition irradiated by 30 MeV protons²⁵⁾.



Figure 5. Relative *G* values of 7OH-C3CA as a function of the dose rate. The ratio of the *G* value under the oxygenated condition to the deoxygenated condition is also shown in the right side²⁵.

下での 7OH-C3CA 生成量は大気条件に比べて低下した. さらに, 7OH-C3CA 相対収率の線量率依存性と低酸素・大気条件の比を比較したものを Figure 5 に示す.

CONV 条件での収率で規格化しており,その相対収率は線量率上昇とともに低下し,10 Gy/s 以上の高線量率で横ばいとなった。収率の最大低下率は65%程度であった。Fig.5の別枠に示した低酸素条件/大気条

件の比からその低下率は 35 % 程度であり,トラック 近傍で周囲の酸素が消費されたことによる低酸素化は 54 % 程度の寄与と推定される.したがって,高線量率 照射によって水溶液中の酸素濃度が低下したというこ とだけでは説明できない.他の寄与の可能性として, 近接するトラック間でのラジカル同士の再結合(特に $^{\circ}$ OH + $^{\circ}$ OH \rightarrow H₂O₂)による効果が示唆される.本結 果の詳細は²⁵⁾を参照されたい.

4 まとめと今後の展望

照射線量率を 40 Gy/s 以上の極端に高く照射する超 高線量率放射線治療の照射効果について,分子レベル での解明を目指して,陽子線・炭素線照射による水の 放射線分解生成物の収率と線量率の関係を定量評価 した.C3CA 蛍光プローブの OH ラジカル捕捉による 7OH-C3CA の収率は,線量率増加に伴い連続的に減少 し,10 Gy/s 以上で 65 % 程度の低下率で横ばいとな り,水溶液中で低酸素化が起きていることが示唆され た.低酸素条件での実験では,35 % 程度の収率減少に とどまった.低酸素化の寄与はある程度認められたも のの,ラジカル同士の再結合による寄与を検討する必 要がある.今後,電子線も含めた治療で使われる放射 線を用いた系統的な測定を進めるとともに,酸素消費 に深く関連する水和電子や再結合効果の指標となる過 酸化水素の収率測定を進める予定である.

〈謝 辞〉

サイクロトロン・HIMAC 実験にあたりオペレータ・ 関係者,また共同研究者の皆様に感謝を申し上げます. 本研究の一部は,科研費・基盤研究(B)(H21H02874), 日仏二国間交流事業(120223212),京都大学化学研究 所国際共同利用・共同研究のサポートをいただいてお ります.

〈参考文献〉

- I. Lohse, S. Lang, J. Hrbacek, S. Scheidegger, S. Bodis, N. S. Macedo, J. Feng, U. M. Lütolf, K. Zaugg, Radiother. Oncol., 101 (2011) 226.
- V. Favaudon, L. Caplier, V. Monceau, F. Pouzoulet, M. Sayarath, C. Fouillade, M.-F. Poupon, I. Brito, P. Hupé, J. Bourhis, J. Hall, J.-J, Fontaine, M.-C. Vozenin, Sci. Transl. Med., 6 (2014) 245ra93.
- 3) D. L. Dewey, J. W. Boag, Nature, 183 (1959) 1450.
- 4) S. Hornsey, T. Alper, Nature, 210 (1966) 212.

- C. C. Ling, H. B. Michaels, E. R. Epp, E. C. Peterson, Radiat. Res., 76 (1978) 522.
- M. Durante, E. Brauer-Krisch, M. Hill, Br. J. Radiol., 91 (2018) 20170628.
- M. Buonanno, V. Grilj, D. J. Brenner, Radiother. Oncol., 139 (2019) 51.
- A. Patriarca, C. Fouillade, M. Auger, F. Martin, F. Pouzoulet, C. Nauraye, S. Heinrich, V. Facaudon, S. Meyroneinc, R. Dendale, A. Mazal, P. Poortmans, P. Verrelle, L. De Marzi, Int. J. Radiat. Oncol., 102 (2018) 619.
- 9) T. Tessonnier, S. Mein, D.W.M. Walsh, N. Schuhmacher, H. Liew, R. Cee, M. Galonska, S. Scheloske, C. Schomers, U. Weber, S. Brons, J. Debus, T. Haberer, A. Abdollahi, A. Mairani, I. Dokic, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 111 (2021) 1011.
- U. A. Weber, E. Scifoni, M. Durante, Med. Phys., 49 (2022) 1974.
- P. Montay-Gruel, A. Bouchet, M. Jaccard, D. Patin, R. Serduc, W. Aim, K. Petersson, B. Petit, C. Bailat, J. Bourhis, E. Bräuer-Krisch, M.-C. Vozenin, Radiother. Oncol., 129 (2018), 582.
- 12) S. Auer, V. Hable, C. Greubel, G.A. Drexler, T. E. Schmid, C. Belka, G. Dollinger, A. A. Friedl, Radiat. Oncol., 6 (2011) 139.
- M. Tashiro, Y. Yoshida, T. Oike, M. Nakao, K. Yusa, Y. Hirota, T. Ohno, Anticancer Res., 42 (2022) 2469.
- 14) M.-C. Vozenin, J.H. Hendry, C.L. Limoli, Clin. Oncol., 31 (2019) 407.
- 15) J. D. Wilson, E. M. Hammond, G. S. Higgins, K. Petersson, Front. Oncol., 9 (2020) 1563.
- 16) B. Lin, F. Gao, Y. Yang, D. Wu, Y. Zhang, G. Feng, T. Dai, X. Du, Front. Oncol., 11 (2021) 644400.
- J. Ramon-Méndez, N. Domínguez-Kondo, J. Schuemann, A. McNamara, E. Moreno-Barbosa, B. Faddegon, Radiat. Res., 194 (2020) 351.
- D. Boscolo, M. Krämer, M. C. Fuss, M. Durante, E. Scifoni, Int. J. Mol. Sci., 21 (2020) 424.
- 19) G. Pratx, D. S. Kapp, Phys. Med. Biol., 64 (2019) 185005.
- 20) R. Abolfath, D. Grosshans, R. Mohan, Med. Phys., 47 (2020) 6551.
- S. Yamashita, Y. Katsumura, M. Lin, Y. Muroya, T. Miyazaki, T. Murakami, Radiat. Phys. Chem. 77 (2008) 439.

- 22) G. Baldacchino, T. Maeyama, S. Yamashita , M. Taguchi, A. Kimura, T. Katsumura, T. Murakami, Chem. Phys. Lett., 468 (2009) 275.
- 23) S. Yamashita, G. Baldacchino, T. Maeyama, M. Taguchi, Y. Muroya, M. Lin, A. Kimura, T. Murakami, Y. Katsumura, Free Radical Res., 46 (2012) 861.
- 24) T. Kusumoto, H. Kitamura, S. Hojo, T. Konishi, S. Kodaira, RSC Adv., 10 (2020) 38709.
- 25) T. Kusumoto, T. Inaniwa, K. Mizushima, S. Sato, S. Hojo, H. Kitamura, T. Konishi, S. Kodaira, Radiat. Res., 198 (2022) 255.

〈著者略歴〉

小平 聡: (国研) 量子科学技術研究開発機構 放射線医 学研究所 計測・線量評価部 放射線計測グループリー ダー. 2003 年早稲田大学理工学部応用物理学科卒. 2007 年同大大学院理工学研究科物理学及応用物理学 専攻修了. 博士(理学). 2006 年より早稲田大学理工 学研究所助手,放射線医学総合研究所博士研究員,日 本学術振興会特別研究員(PD),放射線医学総合研究 所研究員・主任研究員,量子科学技術研究開発機構主 幹研究員・可究統括を経て,2021 年より現職. 専門は 放射線物理学で,放射線計測技術を駆使し,治療から 宇宙にわたるさまざまな応用・融合研究(物理×化学 ×生物)を進めている. 最近の趣味は失われた体力増 強のための街角散歩(月平均歩行距離 300 km).

楠本 多聞: (国研)量子科学技術研究開発機構 放射 線医学研究所 計測・線量評価部 放射線計測グループ 主任研究員.2017年ストラスブール大学,2018年神 戸大学を博士共同指導システム(コチュテル)で修了 し,博士号を得る(工学・物理化学).2018年より量 子科学技術研究開発機構博士研究員,研究員を経て現 職.放射線化学・物理が専門で,固体中の潜在飛跡生 成メカニズムや超高線量率放射線がん治療のメカニズ ムの解明に向けて実験とシミュレーションの両輪で研 究を進めつつ,標的アイソトープ治療に資する線量計 測・評価技術の開発,最近は in vitro 実験にも取り組 んでおり,放射線研究領域の制覇を目論んでいる.趣 味はテコンドーで,2024年パリ五輪出場を目指してい る.最近は新型コロナウイルスの終息を願う毎日を過 ごしている.