

## バイヨウサイボウノテイアツ(40Torr)カデノアル ファリュウシシヨウシャ

長, 哲二  
九州大学医療技術短期大学部診療放射線技術学科

<https://doi.org/10.15017/151>

---

出版情報：九州大学医療技術短期大学部紀要. 13, pp.1-5, 1986-02-28. 九州大学医療技術短期大学部  
バージョン：  
権利関係：



# 培養細胞の低圧 (40 Torr) 下での アルファ粒子照射

長 哲 二 \*

Alpha-particle Irradiation on Cultured Cells  
under 40 Torr Atmospheric Pressure

Cho Tetsuji

## 緒 言

悪性腫瘍の治療法のひとつに高 LET (linear energy transfer) 粒子を利用した放射線治療がある。高 LET 粒子は、従来放射線治療に利用されている高エネルギー電子線, X線やコバルトガンマ線と比較して, 生物学的効果比 (RBE) が大きく酸素効果 (OER) が小さい。<sup>3,5,16)</sup> さらに物理的な線量分布が従来利用されてきた放射線のそれと比較すると, 数段優れている。<sup>9,17)</sup> 以上の理由から高 LET 粒子線による放射線治療は悪性腫瘍の有望な治療法とされている。

治療の基礎となる高 LET 粒子の生物学的な作用の実験は高エネルギー領域では行なわれているが,<sup>4,6,10)</sup> 作用の大きな低エネルギー領域での報告は X線,  $\gamma$ 線を利用した実験の報告と比較するとその数は少ない。そのひとつの理由にその照射方法に問題がある。

高 LET 粒子を培養細胞に照射する方法としては, 加速器からの高エネルギーの粒子を利用する方法,<sup>1,7,18)</sup> アルファ崩壊する放射性同位体から放出される  $\alpha$  粒子を利用する方法,<sup>2,8,12)</sup> このふたつの方法が現在までに行なわれている。加速器を利用する方法では高エネルギーの粒子が得られるので, 培地あるいはシャーレを通しての照射が可能である。しかしながら照射野中のビーム強度とその均一性に問題がある。また加速器はそれ自体が非常に大がかりな装置であり手軽に照射実験を行うことは困難である。

他方放射性同位体からの  $\alpha$  粒子を利用すれば照射装置自体は小さなものですむ。ただ放出される  $\alpha$  粒子のエネルギーが低い ( $^{241}\text{Am}$  からの  $\alpha$  粒子で 5.49 MeV) ことから細胞と線源との距離が大きくとれないし, 通常細胞培養のシャーレではシャーレの底の厚さが  $\alpha$  粒子の飛程よりも大きく, この照射方法はとれない。それで培地を除去し, 細胞側から照射を行なわねばならない;<sup>15)</sup> これでは細胞表面に残っている培地の層の厚さを常に一定にすることが不可能であり, この層および空気による  $\alpha$  粒子のエネルギー損失が問題となる。また照射時間が長くなると細胞の乾燥による影響も無視できなくなる。このように放射性同位体から放出される  $\alpha$  粒子を大気中で培養細胞に照射することは多くの問題を含んでいる。これを解決するために線源と細胞間距離を十分に離し, 培地を入れた状態で照射が可能な低圧下での照射方法を開発した。

新しい方法は大気圧下で培養された細胞を低圧下 (40 Torr) で照射を行うので, その減圧の影響の有無を確かめる必要がある。それを X線照射における生残率曲線および細胞の世代時間について検討したので報告する。

## 材料および方法

### 1. 細胞および $\alpha$ 粒子照射用シャーレ

実験には HeLaS<sub>3</sub> 細胞を用いた。細胞は 15% FCS を含む Eagle MEM 培地で培養した。コロニー法による生残率曲線を求める実験には内径 40mm のパイレックスガラス円筒の一端に 1.84

\*九州大学医療技術短期大学部  
診療放射線技術学科

培養細胞の低圧 (40 Torr) 下でのアルファ粒子照射

mg/cm<sup>2</sup> のマイラー膜を接着したものを培養シャーレとして用いた。α 粒子照射後は 5% 炭酸ガス培養器中で 14 日間培養後染色し、細胞数が 50 個以上のコロニーを計数して同一期間中培養したコントロール群のコロニー数との比から生残率を算出した。コントロール群の plating efficiency は 70 ~ 85 % であった。

16mm 映画法による α 粒子照射細胞の早期死の実験を行うためにガラスシャーレの中央部に直径 20mm の穴をあけ、その部分に 1.52 mg/cm<sup>2</sup> のマイカの膜を接着したシャーレを用いた。マイラー膜でなくマイカ膜を使用したのは映像をより鮮明にするためである。16mm 映画の撮影方法は佐々木の方法<sup>14)</sup>を用いた。撮影されたフィルムで細胞分裂の駒数を計数することにより、大気圧下での細胞の世代時間、減圧した世代の世代時間の測定を行った。

2. 照射方法

前述のシャーレに培養した細胞を培地を除去することなく 40 Torr の低気圧の下で α 粒子照射を行った。照射容器は真空用デシケーターを使用した。デシケータの中に線源 (<sup>241</sup>Am) とシャーレの底面間の距離が一定になるようにアルミアングルを組立て、線源—細胞間距離の再現性を良くした。照射容器の減圧はロータリーポンプで行ったが、ポンプの油蒸気の逆流による照射容器への流入を防止するため途中にフィルターを挿入した。照射後容器を大気圧にもどすための空気吸入口には綿栓を施し、細胞の汚染を防止した。照射容器中の真空度はマンメータで監視し、照射中は容器中の真空度を 40Torr に保つようバルブ操作を行った。<sup>241</sup>Am線源とシャーレ底面の距離は 88 mm でシャーレのマイラー膜、マイカ膜透過後の α 粒子のエネルギー (これが細胞に照射されるエネルギーになる) と粒子フルエンス率は表面障壁型の Si 半導体検出器によって測定した。線源とシャーレ間にはシャッターをもうけ、その開閉は容器外から磁石によって行った。

X 線の照射は 250KVp (0.3Cu + 0.5Al フィル

タ付) の X 線を使用し、室温でこれを容器外部から細胞に照射した。容器中の空気圧の変化 (大気圧 → 40 Torr) による X 線線質の変化は無視できる。また培地は二次電平衡を満すに充分の厚さになる量をシャーレに入れた。シャーレの底面の後には散乱体として 5mm のアクリライト板を置いた。

結 果

X 線照射による生残率曲線、細胞の世代時間および増殖曲線について、以下のような実験結果を得た。

1. X 線照射の生残率曲線

40Torr と大気圧下で X 線照射された細胞の生残率曲線から各線量での生残率の比を求めた。

dose (Gy)	1.0	2.0	3.0	6.0
SF <sub>40</sub> /SF <sub>760</sub>	0.96	1.17	1.15	1.06

表 1 : 大気圧下と 40 Torr 低圧下で X 線照射された HeLa 細胞の各線量における生残率の比

その結果を表 1 に示すが、各線量での比は一定 (≒ 1) であり、40 Torr と大気圧下でもその生残率曲線は同じになるといえる。なお照射時間の差の影響がないように各線量における照射時間は、線量率を変化させることにより、一定 (20 分) とした。

2. 細胞の世代時間

培養 HeLa 細胞の 16mm 映画を 2 分間隔で撮影して、細胞の分裂系図をつくり、分裂系図から 40 Torr に減圧する前の世代時間 (T<sub>-1</sub>)、40 Torr の低圧下に 20 分置いた世代の世代時間 (T<sub>0</sub>)、その後大気圧にもどした世代時間 (T<sub>+1</sub>) を求めた。それぞれの世代時間を表 2 に示す。減圧は照射容量にシャーレを移して行ったが、それ以外の時間は 5% CO<sub>2</sub> ガスを流しながら

撮影を行った。表2の結果では減圧された世代とその前後の世代の細胞の世代時間に差は認められなかった。

generation number	T <sub>-1</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>+1</sub>
generation time (hr)	25.6 ± 1.5	24.1 ± 2.2	24.5 ± 2.8

表2：減圧前後の世代と減圧された世代の世代時間

### 3. 増殖曲線

log phase の HeLa 細胞を 2 分間隔で撮影し、撮影中に 20 分間 40 Torr に減圧した。16 mm フィルの画面中の細胞数を計数することによって細胞の増殖曲線を得た。増殖曲線を図1に示すが、これにも減圧の影響は認められなかった。

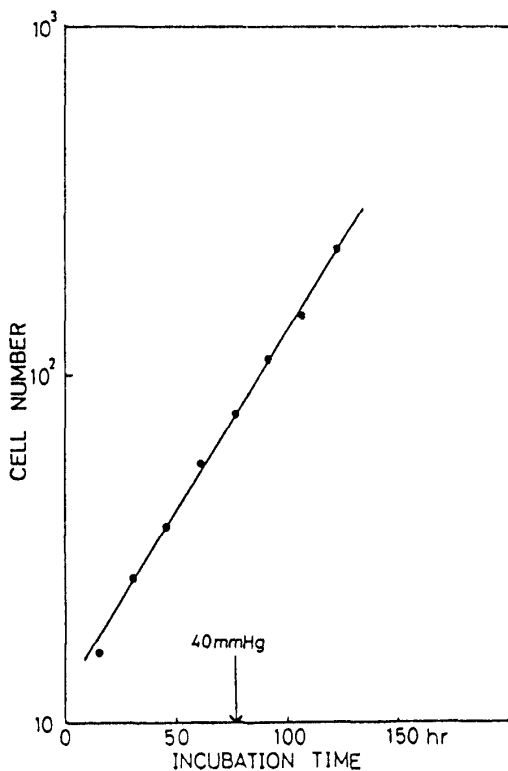


図1：16 mm 映画法による HeLa 細胞の増殖曲線  
図中の矢印のところで 20 分間 40 Torr に減圧

### 4. α 粒子のエネルギー

生残率曲線測定用シャーレおよび映画撮影用

シャーレの膜を透過した α 粒子のエネルギースペクトルを図2に示す。スペクトルからマイラー膜透過後の α 粒子のエネルギーを求めると、マイラー膜透過後は 3.3MeV、マイカ膜透過後は 3.7MeV となった。また膜面に X 射する α 粒子のエネルギーは 4.9MeV であった。3.3 MeV および 3.7MeV の α 粒子の水中の飛程はそれぞれ 1.9mg/cm<sup>2</sup>, 2.2mg/cm<sup>2</sup> となった。<sup>(10)</sup>

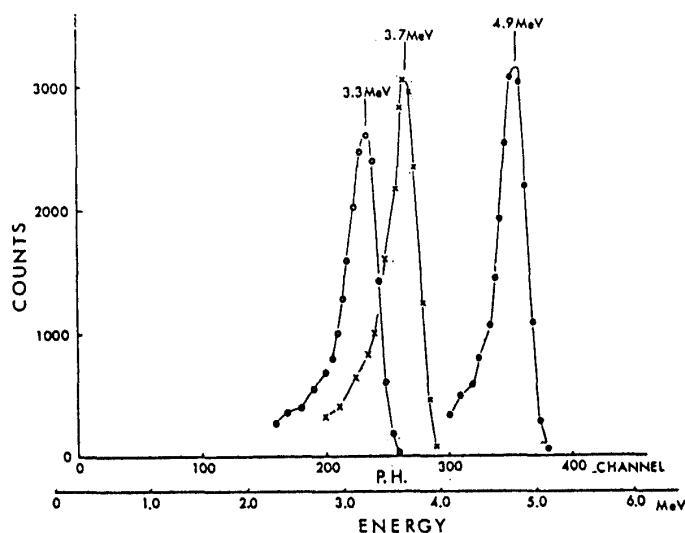


図2：アルファ粒子のエネルギースペクトル

- ：シャーレ底面への入射 α 粒子
- ×：マイカ膜透過後の α 粒子
- ：マイラー膜透過後の α 粒子

### 考 察

低 LET 放射線のひとつである X 線照射による細胞実験では一般に酸素効果が大きい (OER = 2 ~ 3) といわれている。前述のように大気圧下と 40 Torr の低圧下で X 線照射された HeLa 細胞の生残率曲線が同じになることは、少なくとも 20 分間 40 Torr に減圧しても酸素効果を生じるほどには溶存酸素の量的変化は無いといえる。このことは 40 Torr の低圧下での生残率曲線測定の実験が可能であることを示すものである。40 Torr の低圧下での照射が可能であれば、細胞と α 線源との距離を充分にとれるので α 線源を点線源とみなすことが可能となる。それで線源を出て細胞に到達するまでの α 粒子の飛距離が一定となりシャーレ面内の粒子フル

エンス率も均一になる。また距離と照射容器内の気圧を一定にしておけば常に同一のエネルギーでの照射が可能である。もし大気圧下での $\alpha$ 粒子照射を行うと、 $\alpha$ 粒子の飛程が短いため、線源を点線源とみなせるほど距離をとることは不可能である。このことは $\alpha$ 粒子の空気中での飛距離の差による作用 $\alpha$ 粒子のエネルギーに変化を生じ、一定エネルギーの $\alpha$ 粒子による細胞照射を不可能にする。一定エネルギーの $\alpha$ 粒子の照射が不可能であることは $\alpha$ 粒子が高 LET 放射線であることから細胞の吸収エネルギー決定に不確実な要素を導入する結果になる。それで大気圧下でシャーレ面内の細胞を一様に $\alpha$ 粒子で照射することはできない。勿論 Raju 等<sup>13)</sup>が行ったような放射能密度が均一な大面積の線源と、細胞内の標的の大きさに対して無視できるほどの厚さの隔壁をもったコリメータを利用すれば可能であろうが、今回ここに報告した低圧下での照射方法がより手軽であり $\alpha$ 粒子のエネルギーコントロールも自由にできるので、LET の僅かなちがいによる生物学的な効果のちがいを実験することができる。

細胞の世代時間、増殖曲線にも減圧の影響がないことから映画法による $\alpha$ 粒子照射された細胞の動態解析の実験にもこの $\alpha$ 粒子照射装置が利用できる。

以上述べたように、この新しい $\alpha$ 粒子照射の方法は、 $\alpha$ 粒子のエネルギーを正確に測定できること、シャーレ面内の粒子フルエンス率を均一にできることから細胞への作用エネルギー(吸収エネルギー)を精度よく算出することが可能となり、高 LET 粒子の細胞に対する生物学的効果を研究するのに有用な装置だといえる。この装置を利用した $\alpha$ 粒子照射の生残率曲線の

一例を図 3 に示す。この生残率曲線は高 LET 放射線に特有な、肩のない直線的なものになっている。生残率曲線が低生残率まで直線的であることは、照射した $\alpha$ 粒子の全てが細胞を透過していることを示している。このことからこの方法が $\alpha$ 粒子照射法として有用であるといえる。

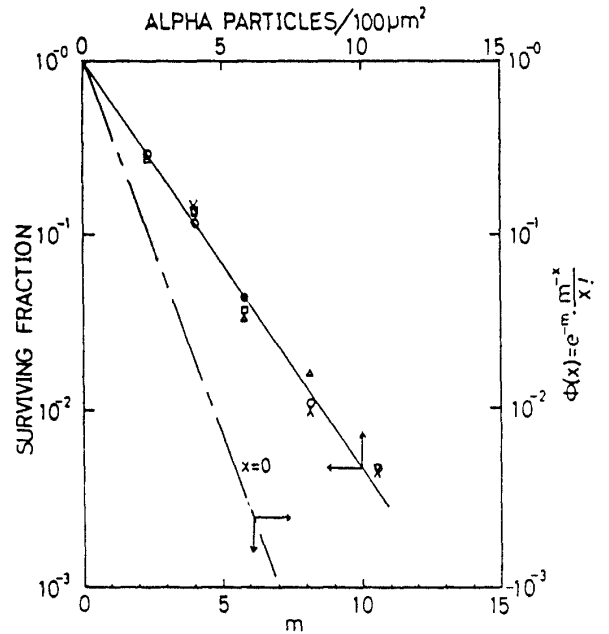


図 3 :  $^{241}\text{Am}$  からの $\alpha$ 粒子によって照射された HeLa 細胞の生残率曲線：  
実線：実験値，鎖線：Poisson 分布式

### 要 約

培養細胞を 40 Torr の低圧下で $\alpha$ 粒子照射するにあたり、減圧の細胞に与える影響を次の三つのことに関して検討した。

- ① HeLa 細胞の X 線照射における生残率曲線
- ② HeLa 細胞の世代時間
- ③ HeLa 細胞の増殖曲線

実験の結果はいづれにも減圧の影響は認められず、この低圧下での照射方法が十分に細胞の $\alpha$ 粒子照射の実験に利用できることがわかった。さらにこの方法を利用した $\alpha$ 粒子照射の一例として示した生残率曲線からもこのことがいえる。

### 文 献

- 1) Barendsen, G. W. and Walter, H. M. D.

- :Effects of different ionizing radiations on human cell in tissue cultuer. experiments with cyclotron-accelerated alpha-particle and deuterons. Radiat. Res. 18:106-119, 1963
- 2) Barendsen, G. W. :Impairment of the poliferative capacity of human cells in culture by  $\alpha$ -particles with differing linear-energy transfer. Int. J. Rad Biol. 8:453-466, 1964
  - 3) Bewley, D. K. :A comparison of the response of mammalian cells to fast neutrons and charged particle beams
  - 4) Blakely, E.A., Tobias, C.A., Yang, T.C H, Smith, K.C. and Lyman, J.T.:Inactivation of human kidney cells by high-energy monoenergetic heavy-ion beams. Radiat. Res. 80:122-160, 1979
  - 5) Conger, A.D., Randolph, M.L., Sheppard, C.W. and Luippold, H.J. :Quontitative relation of RBE in tradescantia and average LET of gamma-rays, X-rays, and 1.3-, 2.5- and 14. lMev fast neutrons. Radiat. Res., 9:525-547, 1958
  - 6) Hall, E.J. :Radiobiology of heavy particle radiation therapy; cellular studies. Radiology, 108:119-129, 1973
  - 7) Howard, J. and Lyman, J.T. :Relative biologic effectiveness and oxygen enhancement ratio at various depth of a 910-MeV helium ion beam. Acta Radiologica Therapy Physics Biology 10:353-357, 1971
  - 8) Munro, T.R. :The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of chines hamster fibroblasts. Radiat. Res. 42:451-470, 1970
  - 9) Neufeld, J.Snyder, W.S., Turner, J.E. and Wright, H. :Calculation of radiation dose from protons and neutrons to 400 MeV. Health Phys. 12:227-237, 1965
  - 10) Northcliffe, L.C. and Schilling, R.F. :Range and stoppingpower tables for heavy ions. Nuclear Data Tables A7:233-257, 1970
  - 11) Raju, M.R., Gnanapurani, M., Stackler, B. et al. :Induction of heteroallelic reversions and lethality in saccharomyces cerevisia exposed to radiations of various LET(Co $\gamma$  rays, heavy ions, and  $\pi$  mesons) in air and nitrogen atomosheres. Radiat. Res. 47:635-643, 1971
  - 12) Raju, M.R. and Jett, J.H. :RBE and OER variations of mixtures of plutonium alpha particles and X-rays for damage to human kidney cells(T-1). Radiat. Res. 60:473-481, 1974
  - 13) Raju, M.R., Tobey, R.A., Jett, J.H. and Walters, R.A. :Age response for line CHO chinese hamster cells exposed to X-irradiation and alpha particles from plutonium. Radiat. Res. 63:422-433, 1975
  - 14) Sasaki, H. :Time-lapse photographic studies of pedigrees of X-irradiated HeLa cells. J. Radiat. Res. 14:248-257, 1973
  - 15) Sasaki, H. :Cell kiling and division delay in asynchronous and synchronized HeLa cells irradiated with alpha particles or X rays. Radiat. Res. 99:311-323, 1984
  - 16) Skarsgard, L.D., Kihlman, B.A., Parker, Pujara, C.M. and Richardson, s. :Survival chromosome abnormalities and recovery in heavy ion- and X-irradiated mammalian cells. Radiat. Res. 7:208-221, 1967
  - 17) Tobias, C.A. :Pretherapeutic investigations with accelerated heavy ions. Radiology 108:145-158, 1973
  - 18) Todd, A. :Heavy-ion irradiation of cultured human cells. Radiat. Res. 7:196-207, 1967