

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月13日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591607

研究課題名（和文）若年者脳腫瘍の放射線治療に由来する母性行動の異常の解析と予防法の開発

研究課題名（英文）Basic study of heavy-ion irradiated to the normal brain tissue -Effects of carbon particles exposure to mouse's brain on the maternal behavior-

研究代表者

宇野 隆（UNO TAKASHI）

千葉大学・大学院医学研究院・放射線医学・准教授

研究者番号：30302540

研究成果の概要（和文）：マウスの母性行動を指標として脳に対する放射線障害を推定する方法を考案した。線量分布の優れた重粒子線（HIMAC：炭素線）を使用することにより、雌マウス脳への照射を大脳皮質部および海馬から視床下部を含めた5ミリ立方の部位に炭素線を照射した。母性行動は、巣を重量として数値化が可能な「営巣行動」と新生仔を巣に持ち帰る行動（時間）をスコア化した「リトリービング行動」を観察して中枢神経に対する照射の影響を検討した。結果は、照射1カ月後のマウス頭頂部脱毛や性周期の発現から下垂体には照射されていないと推測された。照射3カ月後では15Gyおよび30Gy照射マウスで母性行動に変化がみられなかった。45Gy照射マウスでは「営巣行動」はみられるが「リトリービング行動」では達成不可な個体が認められた。照射6月後の15Gy照射では母性行動に大きな影響は認められず、30Gy照射では6匹中1匹のマウスに障害が認められた。さらに45Gy照射では半数が全く母性行動を示さず、新生仔の食殺行動を示す個体も確認され、炭素線の45Gy照射は、高次中枢に対して行動レベルでの不可逆的な障害を与えると推測された。

研究成果の概要（英文）：Radiation therapy is applied to several brain tumors. This experiment was planned to investigate influence on maternal behavior after the irradiation exposure to brain. The present study was designed to determine whether irradiation (carbon particles 290 MeV/nucleon, Mono Peak 15-45Gy, irradiation field 5mm cube) to cerebrum modifies the maternal behavior of mice. The maternal behavior items were recorded: nest-building (nest weights) and retrieving behavior (Scoring: the time when a mouse takes children back to the nest) of female mice. The 15-30Gy irradiation groups, the maternal behavior was no changed in comparison with non-irradiated (Control) female mice after 3 month following irradiation. However, maternal behavior activity of 45Gy irradiation group decreased. Particularly, the 45Gy irradiation group was suppressed for the retrieving behavior in 3 and 6 months after irradiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学薬学

科研費の分科：内科系臨床医学、 細目：放射線医学

キーワード：放射線治療生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) がん放射線治療の高精度化により、脳腫瘍に対する照射における正常脳組織の被ばく線量が低減可能となった。強度変調放射線治療のような最新の照射技術では、高線量域が腫瘍に集中するため、正常組織の高線量被ばく容積が縮小する。しかし、その代償として低線量を被ばくする領域が従来の照射法よりも外側まで拡大する。中枢神経組織の晩期障害を規定する耐容線量より遙かに低い線量であっても、脳幹部あるいは神経幹細胞の存在領域の広範な被ばくが、意識や行動レベルに及ぼす長期的な影響については未だ十分に解明されていない。

(2) 脳や脊髄の放射線被ばくは実験動物を用いて機能障害(反射・歩行異常)や、形態異常(小頭症・細胞構築異常)などを指標に多くの研究がなされている。しかし、これらは高線量照射での報告であり、病理組織学的な変化を指標としている。中枢神経系に壊死等の決定的損傷が発生する前の段階で、照射による高次中枢の障害が、意識や行動レベルの変化として発現する可能性が考えられる。照射による障害を行動レベルから測定することは、脳組織の機能的な側面の検討を意味する。実験動物を用いて実施するには、供試動物自体が習性的に持つ「強く」「再現性」のある行動であり、十分な基礎的研究がなされていなければ明確な結果が得られない。そこでマウスの母性行動を指標として、脳に対する放射線障害を推定する方法を考案した。

2. 研究の目的

(1) 母性行動とは母動物にみられる就巢、保育、外界からの危害に対する哺育子の

保護などの行動を意味している。広義には雌に限らず、雌雄いずれにもみられる類似の行動も、母性行動と考えられている。成熟雌雄にみられる一般的な母性行動として営巣(nest-building: 巣を作る行動)、リトリービン(retrieving: 子をくわえて自分の側に寄せ集める行動)、リッキング(liking: 子の性器を舐めて排尿、排便を促す行動)、および授乳動作(lactation-position: 子を寄せて授乳させる行動)などが認められている。

(2) 本研究では、これらの母性行動より巣作り行動を、巣重量として数値化が可能な「営巣行動」と、行動をスコア化して判定し得る「リトリーピング行動」を採用し、中枢神経に対する放射線の影響について検討した。

(3) 脳組織に対する小動物を用いた放射線障害の基礎実験は、X線や γ 線による高線量の照射で、脳組織以外の軟部組織(咽頭、喉頭)などが照射野に入り、食餌の摂取障害などが誘発された。本研究では線量分布の優れた重粒子線(HIMAC)を使用することにより、脳の局所照射が可能となった。特に炭素線(290MeV/nucleon, mono peak)を用いて脳を照射し、炭素12が炭素11に移行するときに発生する放射線をイメージングプレートに捉え、照射部位の画像化により照射位置の正確な確認が可能である。本研究では重粒子線による15~45Gyの脳照射を実施し、母性行動の発現について経時的に検討した。

3. 研究の方法

(1) 本研究は過去および予備実験で得られた結果をもとに、マウスの全脳照射と母性

行動について検討した。母性行動は前述のごとく雌のみならず雄にも認められるが、本研究では母性行動がより活発に示される雌マウスのみを使用した。

(2) 重粒子線は、放射線医学総合研究所のHAIMACを用い、コリメータにより照射野を5mmに絞り込み、炭素線(290MeV/nucleon、mono peak)を使用して照射を実施した。

(3) 予備実験：雌マウス脳への重粒子(炭素線)照射を大脳皮質部および海馬から視床下部を含めた部位に確実に実施し、照射後の飼料摂取量および体重の測定を実施して障害との関連を検討した。予備実験により得られたマウス母性行動(営巣・リトリービング)について検討を加えると共に行動がより明確される系統を検索した。

(4) 営巣行動はLiskらの方法を採用して実験を行った。すなわち、通常のアクリル製の飼育ケージにマウスを1匹入れ、営巣材料の材料(木毛：50~60g)を自由に採取できる状態を作り、1日(24時間)後に巣作りに使用した木毛の量を測定すると雌マウス(4-CS系)では5~7g/匹/日の重量であった。さらにマウスの系統、新生仔との同居による営巣状況を検討した。

(5) リトリービング(retrieving)行動は通常のケージ内に雌マウス1匹と5匹の新生仔を対角線上に置き、この新生仔をすべて自分の巣に連れ戻すまでの所要時間を計測した。観察時間は60分と定め、所要時間が5分以内(4点)、6-10分(3点)、11-20分(2点)、21-60分(1点)および60分以内に仔5匹すべて戻すことが出来ない、または新生仔への傷害および食殺がみられた個体は(0点)とリトリービングスコアを作成して行動を判定した。予備実験では、正常な4-C系雌マウスの平均は3.28点であり、他のマウスの系統より成績が良好であった。

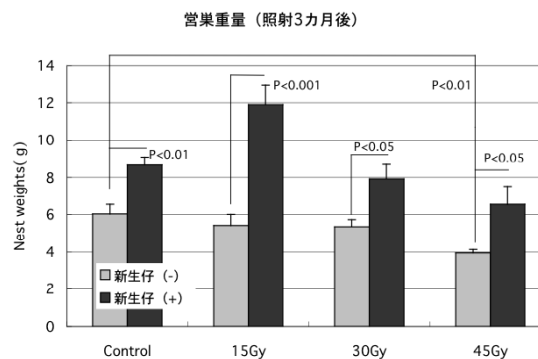
(5) これらの予備実験より、母性行動の研究には4-CS系雌マウスを用い、重粒子線(炭

素線)による脳照射を実施した。照射後にマウスの母性行動を経時的に測定した。

4. 研究成果

(1) 照射位置の確認：照射後数週間で照射マウスの頭頂部に半米粒大の脱毛が確認され、脱毛の位置より中心部に対する照射が確認された。また、4-CSマウスの4日周期の発情を示す性周期が確認され、下垂体に照射されていないことが推測された。

(2) 営巣行動：非照射正常対照群の営巣行動は新生仔なしの巣の重量は $6.04 \pm 0.51\text{g}$ であり、新生仔を同居することにより $8.67 \pm 0.4\text{g}$ と1.43倍($P < 0.01$)の増加が認められた。新生仔同居による巣の重量増加傾向は15~45Gy照射各群においても認められ、特に15Gy照射群では2.19倍の増加がみられた。

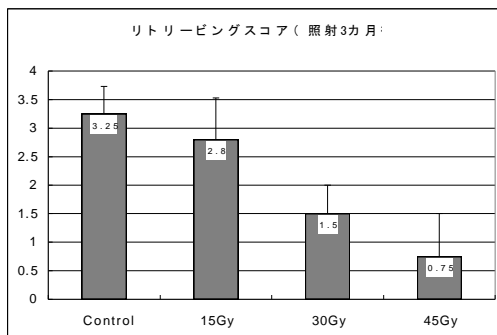


また、新生仔を同居させない巣重量では対照群が最も多く営巣しており、15Gy、30Gyと巣重量の低下傾向がみられ、45Gy照射群では $3.93 \pm 0.19\text{g}$ と対照群に対して有意な低下($P < 0.01$)が認められた。巣の形状も対照群15Gy、30Gy照射群では新生仔同居マウスで完全な営巣がみられるが、45Gy照射群では不完全な営巣を行なう個体が認められた。

照射6カ月後の営巣行動は、対照群で新生仔の同居なしの巣の重量が 10.3g ~ 26.8g 、平均値 $17.47 \pm 2.32\text{g}$ 、新生仔の同居ありで $18.53 \pm 2.08\text{g}$ と照射3カ月後の営巣行動より活発であった。この傾向は15~

45Gy 照射群においても同様であった。しかし、新生仔同居の巣重量は「同居なし」と比較して増加傾向がみられるが、有意差を伴うことはなかった。また、巣の形状は 30Gy 照射群で 6 匹中 1 匹、45Gy 照射群では 6 匹中 3 匹で不完全であった。

(3) リトリービング行動：新生仔 5 匹を巣に連れ戻す行動は、照射 3 カ月後の対照群では仔をすべて連れ戻すに必要な時間（所要時間）は平均で 8.0 ± 2.9 分であり、スコアは 3.25 ± 0.48 であった。15Gy 照射群のスコアは 2.8 ± 0.73 であり、5 匹中 4 匹で所要時間は 4~8 分と良好な成績であったが、残りの 1 匹が 60 分を過ぎてても行動が完成されなかった。30Gy 照射群では 5 匹すべてリトリービング行動がみられたが、3 匹で所用時間を 30 分以上超える成績となった。



45Gy 照射群では、5 匹中 3 匹にリトリービング行動が認められなかった。

照射 6 カ月後のリトリービング行動スコアは、対照群で 3.5 ± 0.22 、15Gy 照射群で 2.8 ± 0.48 、30Gy 照射群で 2.67 ± 0.72 および 45Gy 照射群で 0.67 ± 0.75 であった。照射 3 カ月後と比較して照射 6 カ月後のスコアでは、対照群と 15Gy 照射群では大きな変化がみられず、30Gy 照射群でリトリービング行動の改善が示され、45Gy 照射群では 6 匹中 3 匹でリトリービング行動を全く示さない結果となった。また、30Gy および 45Gy 照射各群で 6 匹中 1 匹に仔の食殺行動が認め

られた。この食殺行動は再実験によっても同一のマウスにのみ認められた。

(4) 以上の結果より、マウス正常脳に対する 5 ミリ立方の重粒子炭素線照射は、脳の大きな容積を照射野入れるにも関わらず、15Gy 照射線量では、ほぼ正常な母性行動を示すと考えられる。30Gy 照射線量は母性行動に影響を与えるが経時的（6 カ月後）に回復する可能性を示す成績が得られた。一方、45Gy の照射線量では脳に対する傷害が著しく、経時的に傷害が拡大する可能性が示唆された。これらの結果は、若年者の脳腫瘍治療時における中枢神経照射の晩期障害の 1 つとして「意識や行動レベルにおよぼす影響」の解明に有用と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (査読有り、8 件中 8 件)

1. Sudo K, Yamaguchi T, Ishihara T, Nakamura K, Hara T, Denda T, Tawada K, Imagumbai T, Araki H, Sakai M, Hatano K, Kawakami H, Uno T, Ito H, Yokosuka O. Phase II study of oral S-1 and concurrent radiotherapy in patients with unresectable locally advanced pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80:119-125, 2011.
2. Toita T, Ohno T, Kaneyasu Y, Kato T, Uno T, Hatano K, Norihisa Y, Kasamatsu T, Kodaira T, Yoshimura R, Ishikura S, Hiraoka M; JCOG Radiation Therapy Study Group. A consensus-based guideline defining clinical target volume for primary disease in external beam radiotherapy for intact uterine cervical cancer. *Jpn J Clin Oncol* 41:1119-1126, 2011.
3. Inoue, K., Kawata, T., Saito, M., Liu, C., Uno, T., Isobe, K., Ito, H. (2010) Effect of an ATM kinase inhibitor on thermo- and/or

- radio-sensitization in non-proliferating normal human fibroblasts and osteosarcoma cells. *Thermal. Med.* 26, 97-107.
4. Mitsuhashi, A., **Uno, T.**, Usui, H., Tate, S., Hirashiki, K., Kato, K., Kiyohara, H., Kato, S., Ito, H., Shozu, M. (2010) Postoperative concurrent daily low-dose cisplatin-based chemoradiation improves the prognosis of patients with pathologic T2b or N1 cervical cancer. *Anticancer Res.* 30, 2341-2346.
5. **Uno, T.**, Isobe, K., Ueno, N., Fukuda, A., Sudo, S., Shirotori, H., Kitahara, I., Fukushima, T., Ito, H. (2010) Fractionated stereotactic radiotherapy as a boost treatment for tumors in the head and neck region. *J. Radiat. Res.* 51, 449-454.
6. Kobayashi, H., **Uno, T.**, Isobe, K., Ueno, N., Watanabe, M., Harada, R., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Ito, H. (2010) Radiation pneumonitis following twice-daily radiotherapy with concurrent carboplatin and paclitaxel in patients with stage III non-small-cell lung cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 40, 464-469.
7. Liu, C., Kawata, T., Shigematsu, N., Cucinotta, F., George, K., Saito, M., **Uno, T.**, Isobe, K., Ito, H. (2010) A comparison of chromosome repair kinetics in G(0) and G(1) reveals that enhanced repair fidelity under noncycling conditions accounts for increased potentially lethal damage repair. *Radiat. Res.* 174, 566-573.
8. Japan Clinical Oncology Group, Toita, T., Ohno, T., Kaneyasu, Y., **Uno, T.**, Yoshimura, R., Kodaira, T., Furutani, K., Kasuya, G., Ishikura, S., Kamura, T., Hiraoka, M. (2010) A consensus-based guideline defining the clinical target volume for pelvic lymph nodes in external beam radiotherapy for uterine cervical cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 40, 456-463.

[学会発表] (計 1 件)

1. Takashi Uno et al. Failure pattern in patients with intermediate to high risk cervical cancer treated with postoperative chemoradiation using CT-based target delineation. The European Society of Gynaecological Oncology. 2011年9月10日 ミラノ市、イタリア

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇野 隆 (UNO TAKASHI)

千葉大学・大学院医学研究院・放射線医学・准教授

研究者番号：30302540

(2)研究分担者

井上 幸平 (INOUE KOUHEI)

千葉大学・医学部附属病院・放射線科・助教

研究者番号：40312053

(3)連携研究者

磯部 公一 (ISOBE KOUICHI)

千葉大学・医学部附属病院・放射線科・講師

研究者番号：80334184