



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	超高線量率放射線照射後の細胞生存率予測モデル
Author(s)	白石, 祐太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第15824号
Issue Date	2024-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15824
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91905
Type	doctoral thesis
File Information	Yuta_Shiraishi.pdf



学位論文

超高線量率放射線照射後の細胞生存率予測モデル

白石 祐太

北海道大学大学院保健科学院
保健科学専攻保健科学コース

2023年度

要旨

医療において放射線は診断、治療に有用であり、今日では臨床の現場で欠かせない役割を担っている。放射線治療の主な目的は腫瘍を根治することであり、高い線量が病変部へ照射されるため、周囲の正常な器官・組織にも有害な影響が誘導されることがある。したがって、放射線治療では放射線被ばくに伴う有害事象を抑制しつつ、腫瘍細胞に対して十分な殺傷効果を得ることが重要である。この目的の達成に向けて、近年、 ≥ 40 Gy/s の超高線量率 (ultra-high dose rate: UHDR) を用いる FLASH 放射線治療 (FLASH-radiotherapy: FLASH-RT) が注目されている。

UHDR を用いた細胞実験は 1950 年代後半、動物実験は 1970 年代から行われてきたが、臨床への応用はなかなか進まない状況が続いた。しかし、2014 年に Favaudon らが新たに「FLASH」を名称に用いた論文を発表すると状況は一転し、放射線治療における有用性と実現可能性が広く認められ、現在に至るまで種々の研究がなされてきた。FLASH 照射の重要な特徴の 1 つは、正常組織に適用した際に、従来 (conventional: CONV) の線量率と比較し、組織機能が温存され、また有害事象の発生が抑制されることである。もう 1 つは腫瘍組織で CONV 線量率と同等の制御効果が維持されることである。そのような背景から、将来的に FLASH-RT が一般的な治療法として普及することを見越し、治療計画装置に必要な生物効果予測モデルの開発が必要と考えられるが、モデル開発に必要な FLASH 効果が誘導されるメカニズムは依然として明らかになっていない。

放射線の生物学的効果 (細胞生存率) は放射線照射後に誘発される DNA 二本鎖切断 (double-strand break: DSB) の数が重要である。そこで、本研究では UHDR 照射後と CONV 照射後の初期 DSB 発生数の違いを基に、UHDR 照射後ならびに CONV 照射後の細胞生存率を予測可能な数学モデル *integrated microdosimetric-kinetic (IMK) model for UHDR-irradiation* の開発を行った。この開発で我々は照射後の DNA 損傷数の時間変化から細胞死を予測可能な *integrated microdosimetric-kinetic (IMK)* モデルを使用した。一般に、放射線による DNA 損傷の多くは修復されるが、その一部は修復されないか、あるいは誤修復により死に至る。これら生物過程を考慮するために、IMK モデルでは修復可能な損傷を *potentially lethal lesion (PLL)*、修復困難な致死的な損傷を *lethal lesion (LL)* と定義し、DSB の動態が考慮されている。従来、PLL の初期発生数は線量率に依存しないと仮定してきたが、UHDR 照射後では、活性種の酸化作用 (間接作用) の違いにより、CONV 照射と比較し初期の DSB 発生数が変化すると報告されている。これは、UHDR 照射では多数の活性種が時空間的に近接した状態で生成されるため、活性種が互いに打ち消され、間接作用による DNA 損傷が抑制されることに起因すると考えられている。そこで本研究では線量率の増加に伴い DSB 発生効率が低下する新たなモデリングを行い、既存の IMK モデルに組み込むことにより、UHDR 照射後の細胞生存率を予測可能な新たな *IMK model for UHDR-irradiation* の開発を試みた。

IMK model for UHDR-irradiation では、間接作用と DSB 生成率の関係性が数式で表現され

ている。本研究では DSB に関する文献が非常に少ないため、細胞への照射線量や細胞の種類などの実験条件を考慮せず、DSB データを取得した。取得データから求めた CONV 照射に対する UHDR 照射後の相対 DSB 数に対し Markov chain Monte Carlo (MCMC) シミュレーションを適用し、モデル内の線量率と DSB 数の関係を表した。また、MCMC シミュレーションを用いて、CONV 照射後の細胞生存率データから生存率推定に必要な細胞特有のモデルパラメータを決定し、*IMK model for UHDR-irradiation* を使用することで、UHDR に相当する任意の線量率に対する細胞生存率の予測を試みた。

開発した *IMK model for UHDR-irradiation* を使用することで、様々な種類の細胞 (HeLa, MRC-5, MDA-MB-231, LU-HMSCC4, MCF7, WiDr, DU145(有酸素/低酸素条件)) の生存率曲線の再現に成功した ($R^2 \geq 0.7$)。本モデルで得られる細胞生存率曲線を表す数式は、放射線治療において利用される従来の linear-quadratic (LQ) モデルの数式と同様の形で表現することができるため、放射線治療における生物学的効果の表現や分割照射の評価に用いられる生物学的効果比 (relative biological effectiveness: RBE) と生物学的等価線量 (biologically effective dose: BED) の導出にも成功した。RBE については、本モデルから得られる値と実測値から従来の LQ モデルを用いて得られる値を比較し、よく一致することが示された。BED については、不確かさが大きい一方で UHDR の平均値が CONV 線量率の平均値よりも小さくなることが示された。

本モデルは UHDR 照射後の細胞生存率を精度よく再現したが制約がある。まず先に述べたように、使用できる DSB 数に関するデータが不足していたため、細かい実験条件を考慮できない点が挙げられる。正常組織と腫瘍組織では FLASH 照射に対する反応が異なるが、現段階において本モデルでは考慮できていない。今後、実験データが蓄積されることで、本モデルをいずれのタイプの細胞にも適用できるようになると期待される。また、本研究で用いた複数の腫瘍細胞では UHDR 照射後に CONV 照射後と比較し細胞生存率が増加するが、*in vivo* 実験においては抗腫瘍効果が UHDR と CONV 線量率で変化せず矛盾する。本モデルは細胞実験のデータに対するモデルであるため、細胞実験の細胞生存率と組織の反応を関連付けることはできてきない。

本研究により、UHDR 照射と CONV 照射における DSB 数の違いを基に、CONV 照射後の細胞生存率データから UHDR 照射後の細胞生存率を予測可能な数学モデルの開発に成功した。さらに、モデル内で定義した、CONV 線量率に対する UHDR における相対 DSB 数を表すモデルパラメータは、実験条件のばらつきや DSB 数の不確かさが大きい一方で、フィッティングにより線量率の増大に伴い減少することが示された。したがって本モデルにより、UHDR 照射後の細胞生存率の増加に DSB 数の減少が関わることを示唆された。本成果は、UHDR を使用する FLASH-RT の生物効果の評価やメカニズム解明に貢献できる。また、将来的な治療計画用アルゴリズムの開発に応用されることも期待できる。

目次

第1章 諸言	1
1.1. 放射線の物理的特性.....	1
1.1.1. 放射線の種類	1
1.1.2. 励起と電離	4
1.1.3. 物理量	5
1.1.3.1. 放射線計測量.....	5
1.1.3.2. 相互作用係数および関連する物理量	5
1.1.3.3. 線量計測量.....	6
1.1.3.4. 確率的な物理量	6
1.1.4. マイクロドシメトリ	8
1.2. 放射線照射により生じる活性種	10
1.2.1. 放射線照射後の活性種の生成.....	10
1.2.2. 直接作用と間接作用	12
1.3. 生物学的過程.....	13
1.3.1. DNA 損傷応答.....	13
1.3.1.1. 細胞周期チェックポイントの活性化	15
1.3.1.2. DNA の修復	16
1.3.1.3. 細胞死.....	18
1.3.1.4. アポトーシス	19
1.3.2. 増殖死と細胞生存率	19
1.3.2.1. 細胞生存率.....	20
1.3.2.2. 線形二次曲線モデル	21
1.3.3. 細胞生存率曲線と組織反応	25
1.3.3.1. 腫瘍の局所制御	25
1.3.3.2. 分割照射における生物学的効果.....	25
1.3.4. 線量率の影響	28
1.3.4.1. 線量率効果.....	28
1.3.4.2. 逆線量率効果.....	28
1.3.5. 酸素効果.....	30
1.3.6. 細胞膜の損傷とフェロトーシス	31
1.3.7. 細胞死経路間のクロストーク	33
1.4. FLASH 放射線治療.....	33
1.4.1. 超高線量率照射の生物効果	34

1.4.2.	UHDR 照射後の物理過程－化学過程	39
1.4.2.1.	酸素枯渇	39
1.4.2.2.	活性種間の反応	40
1.4.3.	UHDR 照射後の DNA 損傷と細胞生存率	40
1.4.4.	脂質過酸化の影響	43
1.5.	FLASH 効果解明のためのシミュレーションモデル	43
1.5.1.	飛跡構造解析のためのモンテカルロシミュレーション	43
1.5.2.	モンテカルロシミュレーションを伴わない理論モデル	45
1.6.	本研究の目的	46
	参考文献	46
第 2 章	細胞応答予測モデルの概要	61
2.1.	DNA 損傷に関するレート方程式	61
2.2.	線量率に依存する DNA 損傷数のモデリング	64
	参考文献	65
第 3 章	IMK model for UHDR-irradiation を使用した生物効果予測	67
3.1.	方法	67
3.1.1.	入射放射線の線質を表すパラメータ γ の導出	67
3.1.2.	UHDR と CONV 間の DSB 数差を補正する係数のモデリング	71
3.1.3.	モデルパラメータの決定	72
3.1.4.	UHDR 照射後の細胞生存率の予測	73
3.1.5.	生物学的効果比と生物学的等価線量	73
3.2.	結果	74
3.2.1.	相対 DSB 収率と細胞固有のパラメータ	74
3.2.2.	DSB 収率を補正した UHDR 照射後の細胞生存率	74
3.2.3.	UHDR 照射における RBE ₁₀ と BED の推定	75
3.3.	考察	80
	参考文献	82
第 4 章	総括および今後の展望	85
4.1.	総括	85
4.2.	今後の展望	85
	参考文献	86
	謝辞	88
	業績リスト	89
付録 A	UHDR－CONV 間の DSB 数補正係数導出コード	90
付録 B	細胞生存率、RBE、BED 導出コード	94

略語一覽

7OH-C3CA	7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
alt-NHEJ	alternative-non-homologous end joining
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia related kinase
AUC	area under the curve
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX	Bcl-2 associated X
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BECN1	beclin-1
BED	biologically effective dose
CDK	cyclin-dependent kinase
CI	credible interval
c-NHEJ	canonical (conventional)-non-homologous end joining
CONV	conventional
CONV-RT	conventional-radiotherapy
CSC	cancer stem cell
DDR	DNA damage response
DSB	DNA double-strand break
EQD2	equivalent dose in 2 Gy fractions
FLASH-RT	FLASH-radiotherapy
GSH	glutathione
HDR	homology-directed repair
HDR	high dose rate
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HR	homologous recombination
HRS	hyper-radiosensitivity
ICCM	irradiated cell conditioned medium
ICRU	International Commission on Radiation Units and Measurements
IMK	integrated microdosimetric-kinetic
IRR	increased radioresistance
IRT	independent reaction time
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LDR	low dose rate

LET	linear energy transfer
LL	lethal lesion
LOX	lipoxygenase
LQ	linear-quadratic
LQ-L	linear-quadratic-linear
MCMC	Markov chain Monte Carlo
MD	molecular dynamics
MDA	malondialdehyde
MDR	medium dose rate
MK	microdosimetric-kinetic
MMEJ	microhomology-mediated end joining
NHEJ	non-homologous end joining
NUTS	No-U-Turn Sampler
OCR	off-center ratio
OER	oxygen enhancement ratio
PARP	poly (ADP-ribosylation)-polymerase
PDD	percentage depth dose
PHITS	Particle and Heavy Ion Transport code System
PLL	potentially lethal lesion
RBE	relative biological effectiveness
RCD	regulated cell death
ROS	reactive oxygen species
RSL3	RAS-selective lethal 3
SBS	step-by-step
SLC7A11	solute carrier family 7 member 11
SLD	sublethal damage
SOBP	spread-out Bragg peak
SSA	single-strand annealing
SSB	single-strand break
ssDNA	single-stranded DNA
seDSB	single-ended double-strand break
TCP	tumor control probability
TNF	tumor necrosis factor
TOD	transient oxygen depletion
TRAIL	TNF related apoptosis-inducing ligand
UHDR	ultra-high dose rate

第1章 諸言

放射線は適切に制御することで人々の生活を支えるインフラとして重要な役割を担っている[1]。放射線は人体への影響が懸念される一方で、人々の生命と健康を預かる医療において診断（体内の病変部の検出、評価、経過観察）とがんなどの治療に活用される。放射線治療はがんに対する効果的な治療法の1つである[2]。放射線治療では正常組織への線量を有害事象が発生しないレベル（耐容線量）以下となるよう抑制し、一方で腫瘍には制御に必要な線量を付与することが重要である[3]。

これらの要件を満たす新たな放射線治療法として、超高線量率 (ultra-high dose rate: UHDR) を使用する FLASH 放射線治療 (FLASH-RT) が注目されている。2014年に Favaudon らは、40 Gy/s 以上の UHDR でマウスの治療を行い、従来 (conventional: CONV) の線量率 (0.01–0.4 Gy/s) による治療 (CONV-RT) に対し正常組織の形態・機能が温存される一方で抗腫瘍効果が維持されることを報告した[4]。このような効果は FLASH 効果と呼ばれ、Favaudon らの報告を皮切りに種々の研究が展開されている[5–8]。しかしながら、FLASH 照射に関する生物実験データは不足しており、FLASH 効果のメカニズムを解明するために複数の仮説が立てられているが未だ詳細は明らかでない。

本研究では、放射線照射後の組織や器官の障害（生物学的効果）に関連付けられる細胞生存率[9,10]と、細胞生存率を決定づける重要な標的と考えられている DNA 二本鎖切断 (double-strand break: DSB) の関係 [11–17]に着目した。非常に反応性が高く DSB 誘発に大きく寄与すると考えられているヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) [18,19]の収率は線量率の上昇と共に低下することが実験により示唆されている[20,21]。したがって、FLASH 照射では DSB の生成が CONV 照射よりも抑制され、細胞生存率が増加する細胞応答シナリオが推察されているが、それらの直接的な関係性やメカニズムの解明に至っていない。そこで我々は、FLASH と CONV 間の DSB 生成数の差異が化学過程に起因しうることに着目し、FLASH 照射後の細胞生存率を予測するモデルを新たに開発することで、超高線量率照射下における細胞応答の解明、ならびに治療計画システムの開発を目指した。

1.1. 放射線の物理的特性

1.1.1. 放射線の種類

1895年に Röntgen は放射線の存在を見出し、未知の光線を意味する X 線と名付けた。その後、Rutherford により α 線と β 線、Villard により γ 線が発見された。これら以外にも種々の放射線が存在する (図 1.1)。光子線 (X 線と γ 線) は高いエネルギーを有する電磁波であり[22]、生成される二次電子により DNA などの生体標的分子に損傷を与えることがわかってきた。電磁波は変動する電場が磁場を、変動する磁場が電場を互いに生み出しながら空間を伝播する波であり、我々が色として認識している光もまた電磁波である (図 1.2) [22]。

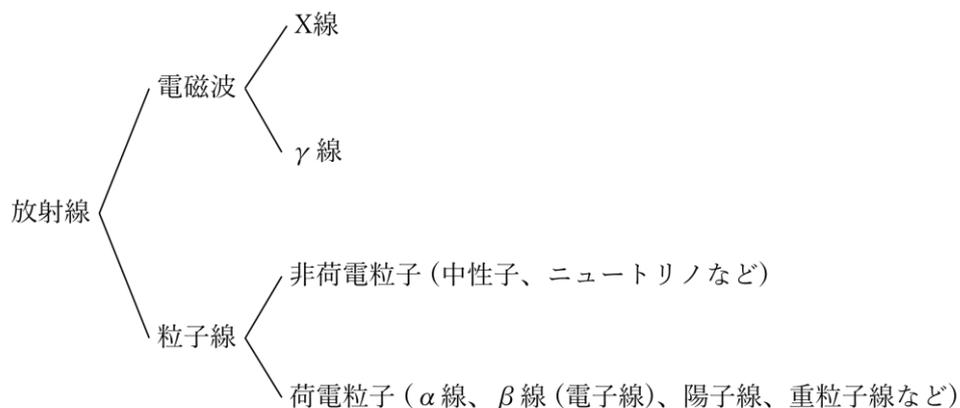


図 1.1 放射線の種類

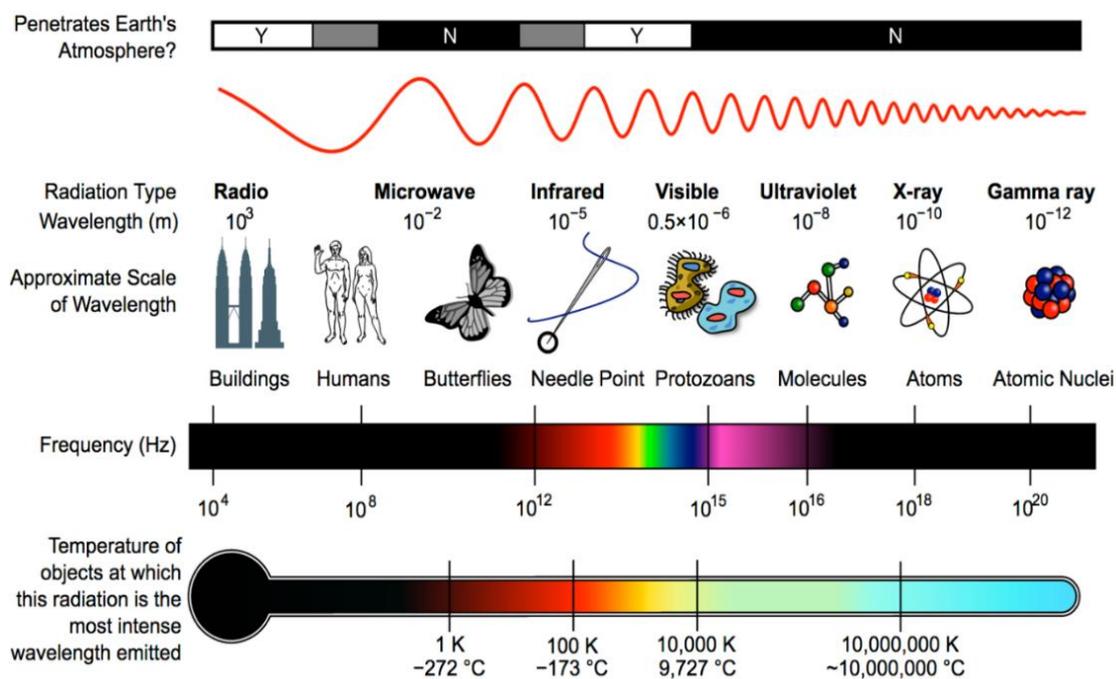


図 1.2 電磁波の種類 (Kumar V *et al.* 2023 [22] より引用)

粒子線は質量と大きさを有し、電荷を持つ粒子（荷電粒子）と電荷を持たない粒子（非荷電粒子）に分類される（図 1.1）。医療における診断領域では特に電磁波である X 線と γ 線が用いられる（表 1.1）。治療領域では粒子線を含む種々の放射線が利用され、各放射線固有の特性に鑑みた治療が行われている（表 1.2）。

表 1.1 診療に用いられる放射線

	診断	放射線
診断	一般撮影	X線
	マンモグラフィ	X線
	IVR	X線
	診断透視	X線
	CT	X線
	核医学検査	γ 線
放射線治療	外部照射	X線、 γ 線、電子線、陽子線、重粒子線、中性子線
	内部照射	α 線、 β 線、 γ 線、X線など

表 1.2 放射線治療で用いられる放射線の特徴

放射線	特徴
光子	高いエネルギーを有する電磁波。X線は原子核外、 γ 線は励起状態の原子核から放出されるが、両者の特性に違いはない。治療用放射線の中では最も基本的な放射線である。
電子	質量が非常に小さな負の電荷を有する荷電粒子。リニアックによる外部照射で用いられる電子は電子線、内部照射に利用される特定の放射性同位元素由来の電子は β 線と呼ばれる。
陽子	正の電荷を有し、電子と比較し1,836倍程度の質量を有する荷電粒子。陽子線治療ではブラッグ・ピークを活用し、X線や電子線と比較しがん組織に集中的に線量を投与できる。
α 粒子	ヘリウムの原子核であり、2つの陽子と2つの中性子から構成される。内部照射では β 線と比較し生体分子の損傷が大きくなり、なおかつがん組織の内部に留まりやすいため高い治療効果が得られる。
重粒子	炭素やネオンなどの正の電荷を有する重い荷電粒子。陽子線と同様にブラッグ・ピークを活用した治療が可能である。さらに、陽子線よりもがん組織に深刻なダメージを与えやすい。
中性子	質量が陽子程度の非荷電粒子。ホウ素中性子捕捉療法 (boron neutron capture therapy: BNCT) では中性子のがん組織に取り込ませたホウ素に衝突させがん組織を効率よく攻撃できる α 粒子とリチウム原子核を活用する。

1.1.2. 励起と電離

電離放射線から物質へエネルギーが付与されると励起または電離（イオン化）が生じる[3]（図 1.3）。原子または分子内の軌道電子のエネルギー準位が上がることを励起という。軌道電子に束縛エネルギーを超えるエネルギーが入射電離放射線や二次電子から付与された際に、電子が原子/分子外へ放出される現象を電離という。一般に「放射線」という言葉は電離する能力を有する電離放射線に対し用いられる。電離には直接電離と間接電離の 2 つのタイプがある[19]。前者では十分なエネルギーを有する荷電粒子が原子/分子近傍を通過することで、入射粒子そのものが原子/分子を電離させる。後者では直接的に電離を誘導することができない光子や中性子のような非荷電粒子が、エネルギーの一部または全てを用いて二次的に発生させた電子などの荷電粒子を介し間接的に電離を引き起こす。診療で用いられる光子線はエネルギーに依存し主に光電吸収やコンプトン効果により二次電子を放出し、二次電子が電離を引き起こす。治療用 X 線で主に生じるコンプトン効果では入射 X 線がエネルギーの一部を原子/分子の軌道電子に付与することで二次電子を発生させ、一方でエネルギーが減弱した X 線自身は入射方向とは異なる方向に放出（散乱）される。CT やマンモグラフィなどの診断用 X 線に含まれる低エネルギー X 線では、全てのエネルギーを軌道電子に付与することで電離を起こす光電効果が生じる確率が高い。

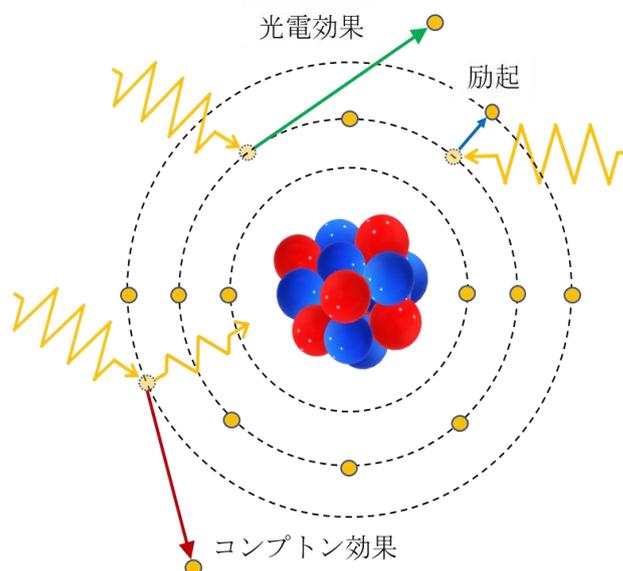


図 1.3 光子線による励起と電離。診療に用いられる光子線では主にコンプトン効果と光電効果により二次電子が生じる。励起では軌道電子の軌道がエネルギー準位の高い軌道へ遷移する。黄色の曲線は光子線、オレンジの円は電子、青と赤の複数の円の集合は原子核を表す。

1.1.3. 物理量

放射線を定量的に扱うにあたり利用される種々の物理量は、国際放射線単位測定委員会 (International Commission on Radiation Units and Measurements: ICRU) の Report 85 [23]に示されている。本項では ICRU Report 85 の内容に基づき、本研究に関する物理量の概要を列挙した。

1.1.3.1. 放射線計測量

ICRU Report 85 の第3章では種々の放射線が行き交う放射線場内の物理量を扱う放射線計測量について記されている。フルエンス Φ (cm^{-1}) は放射線場において対象領域に流入してくる粒子の空間的な密度を表す尺度であり、球形領域内に入射する粒子の数 dN を球の断面積 da で除した量である。

$$\Phi = \frac{dN}{da} \quad (1.1)$$

一方でフラックス \dot{N} (s^{-1}) は単位時間あたりに流入してくる粒子数を表す量であり、有限の測定領域に流入する粒子数の増分 dN を観測時間 dt で除した値である。

$$\dot{N} = \frac{dN}{dt} \quad (1.2)$$

フラックスはフルエンスのように流入数を断面積で除さないで密度を表す量ではない。フルエンスを測定時間で除した量はフルエンス率と呼ばれ、次式で表される。

$$\dot{\Phi} = \frac{d\Phi}{dt} \quad (1.3)$$

先に述べた関係からフルエンス率はフラックス密度とも呼ばれるが、一般には前者の呼称が用いられる。フルエンス (率) とフラックスは粒子の数を扱うが、エネルギーの流入を定量的に扱うためにエネルギーフルエンス (率) とエネルギーフラックスが定義されている。扱う量が数でなくエネルギーという点を除けばそれぞれフルエンス (率) およびフラックスと同様の計測量である。

1.1.3.2. 相互作用係数および関連する物理量

ICRU Report 85 第4章には相互作用係数と関連する物理量について述べられている。質量阻止能 S/ρ ($\text{J m}^2 \text{kg}^{-1}$) は荷電粒子が物質中を通過する際にどれほどのエネルギーを失うかを表す物理量であり、密度 ρ の物質内を荷電粒子が距離 dl を通過する間に失うエネルギー dE を ρdl で割った値である。

$$\frac{S}{\rho} = \frac{1}{\rho} \frac{dE}{dl} \quad (1.4)$$

質量阻止能は質量衝突阻止能 S_{col}/ρ 、質量放射阻止能 S_{rad}/ρ の和として表わされる。

$$\frac{S}{\rho} = \frac{S_{\text{col}}}{\rho} + \frac{S_{\text{rad}}}{\rho} = \frac{1}{\rho} \left(\frac{dE}{dl} \right)_{\text{col}} + \frac{1}{\rho} \left(\frac{dE}{dl} \right)_{\text{rad}} \quad (1.5)$$

阻止能は、荷電粒子と軌道電子の相互作用（電離または励起）によるエネルギー損失（衝突阻止能）と、原子核または軌道電子の電場内で生じる制動放射によるエネルギー損失（放射阻止能）の和で表される。また $S = dE/dl$ は全阻止能と呼ばれる。

線エネルギー付与（linear energy transfer: LET） L_{Δ} (keV/ μm) は荷電粒子の単位距離あたりのエネルギー損失を表現する物理量であり、次式で表される。

$$L_{\Delta} = \frac{dE_{\Delta}}{dl} \quad (1.6)$$

dE_{Δ} は荷電粒子が距離 dl を通過する際に電子との相互作用により失うエネルギーのうち、 Δ を超える初期運動エネルギーを有する二次電子が測定領域外へ持ち出す総エネルギーの加算平均を差し引いた値である。遠方へ持ち出されるエネルギーを除外することで局所的なエネルギー輸送を考慮している。 $\Delta \rightarrow \infty$ とした L_{∞} は先に示した標的電子との衝突阻止能に等しく、粒子線の LET をシミュレーションで求める際には L_{∞} が計算される[24]。放射線の種類により、高 LET 放射線（重荷電粒子線、中性子線）と低 LET 放射線（光子線、電子線、陽子線など）に大別される。

放射化学収率 $G(x)$ (mol J^{-1}) は放射線により特定の分子 x が生成、分解、変形のうちのいずれかの修飾をどれほど受けたかを表し、次式で与えられる。

$$G(x) = \frac{n(x)}{\bar{\epsilon}} \quad (1.7)$$

$n(x)$ は物質に平均的にエネルギー $\bar{\epsilon}$ が付与された際に修飾を受けた分子 x の数である。 $\bar{\epsilon} = 100 \text{ eV}$ のとき化学収率は G 値と呼ばれ、単位は mol (100 eV)^{-1} で表される。

1.1.3.3. 線量計測量

ICRU Report 85 第 5 章では放射線と物質の相互作用によるエネルギーの授受を扱う線量計測量が扱われている。吸収線量 D (J kg^{-1}) は次式で表される。

$$D = \frac{d\bar{\epsilon}}{dm} \quad (1.8)$$

$d\bar{\epsilon}$ は質量 dm の物質に付与された平均エネルギーである。特殊な単位として Gy が用いられる。また単位時間あたりの吸収線量の変化は線量率 (Gy/s) と呼ばれ、次式で表される。

$$\dot{D} = \frac{dD}{dt} \quad (1.9)$$

dD は観測時間 dt における D の増分である。

1.1.3.4. 確率的な物理量

ICRU Report 85 の 2.3 節では、物理量の定義にあたり放射線の量子的な揺らぎを考慮する

必要がある確率的な量と、揺らぎによらず固有の値が決まる非確率的な量を区別する必要があると述べられている。ICRU はエネルギーの授受に関する物理量について確率的・非確率的な枠組みを設けている。前項の吸収線量は式 (1.8) に表されるように測定領域内の付与エネルギーの平均値を表していたが、放射線の生物学的な影響を求めるには DNA などの生体分子のような微小な標的の損傷を考える必要がある。巨視的な媒質に着目すると均一に放射線が入射しているように見えるが、微視的なスケールでは入射粒子の時空間的な確率的揺らぎ (放射線が飛来する場所とタイミングのランダム性) が大きい。この揺らぎにより、例えば一度 DNA が放射線により損傷を受けその傷が修復された後に新たな放射線が飛来する場合または最初の損傷のみでその後粒子が飛来しない場合と、最初の損傷が修復される前に近傍で新たに損傷を受け修復が難しくなる場合が生じ、これらの経路の違いによりその後の細胞の生死の運命が変わってくる。放射線の挙動に着目すると、同一エネルギーであれば高原子番号の粒子ほど入射粒子飛跡近傍のエネルギー付与密度が高くなり、電離・励起密度が高くなることで DNA などの損傷が複雑化するため生物学的影響が大きくなる。また同一 LET であれば高原子番号の粒子ほど高いエネルギーを有することになり、二次電子に付与されるエネルギーも大きくなるため二次電子の飛程が長くなりエネルギーが遠方へ持ち出されやすくなる。結果として入射粒子飛跡を中心に広い範囲にエネルギーが付与されることとなり生物学的影響が低下する。確率的な物理量は上記のような微小スケールにおける放射線の挙動の揺らぎを考慮できる量であり、特に放射線生物学の分野では重要である。具体的な確率的物理量は ICRU Report 85 の 5.2 節に示されている。

Energy deposit (J) は 1 回のエネルギー付与事象 (イベント) i により微小計測領域内へ付与される確率的なエネルギーであり、以下のように表される。

$$\varepsilon_i = \varepsilon_{\text{in}} - \varepsilon_{\text{out}} + Q \quad (1.10)$$

ε_{in} は入射荷電粒子により 1 回の相互作用で付与された運動エネルギー、 ε_{out} は二次粒子が計測領域外へ持ち出す全運動エネルギー、 Q はイベントに関与する全ての粒子の静止エネルギーの変化である。計測領域内で複数回のイベントがあれば各相互作用による energy deposit ε_i の総和として energy imparted が下記の式で得られる。

$$\varepsilon = \sum_i \varepsilon_i \quad (1.11)$$

ε の平均値は、計測領域内に流入する全粒子の運動エネルギーの総和 R_{in} と領域外へ流出する全ての粒子の運動エネルギーの総和 R_{out} を用いて以下のように表される。

$$\bar{\varepsilon} = R_{\text{in}} - R_{\text{out}} + \sum Q \quad (1.12)$$

式 (1.12) の右辺第 3 項は Q の加算平均である。

線エネルギー y (keV/ μm) と比エネルギー z (Gy) は後述するマイクロシメトリ (1.1.4 項) で広く活用される確率的な物理量である。 y は計測領域を通過する粒子が領域内に 1 回の相互作用で付与するエネルギー ε_s を、計測領域の平均弦長 \bar{l} で割った値である。

$$y = \frac{\varepsilon_s}{\bar{l}} \quad (1.13)$$

計測領域が球形であれば \bar{l} は球形領域の直径の2/3に等しい。 z は質量が m の計測領域に単回または複数回のエネルギー付与により付与される総エネルギー ε を用いて以下のように表される。

$$z = \frac{\varepsilon}{m} \quad (1.14)$$

また1回のみイベントによる比エネルギーを z_1 とおくと、 $z_1 = \varepsilon_s/m$ であるので式(1.14)より次式の関係が得られる。

$$z_1 = \frac{\bar{l}}{m} y \quad (1.15)$$

1.1.4. マイクロドシメトリ

1.1.3.4目で述べたように、放射線の生物学的影響を見積もるには細胞やDNAレベルの微視的スケールでの放射線によるエネルギー付与分布の時空間的な揺らぎが重要である。巨視的な物理量である吸収線量は放射線に曝される環境の管理や医療における人体への照射線量の制御において重要な役割を果たすが、測定器内の微小スケールでのエネルギー付与の揺らぎを平均化した単一の物理量であるため、吸収線量のみでは生物学的影響の違いを表現できない。マイクロドシメトリは微小領域に付与されるエネルギーの時空間的な分布を定量化および測定するための概念、物理量、測定法を体系化する学問領域として発展してきた[25]。

マイクロドシメトリでは物理量として1.1.3.4目に示した y と z が主に用いられる。先に述べたように、 y と z は微小領域に対する付与エネルギーであり時空間的な揺らぎを有することから確率変数として表され、頻度分布(確率密度関数) f や相対的な吸収線量強度分布(線量密度関数) d が導出される(図1.4)[25,26]。 y の確率密度関数を $f(y)$ とおくと、区間 $[y, y + dy]$ に含まれる線エネルギーが得られる確率は $f(y)dy$ であり、 y の期待値 $\langle y \rangle$ は次式で表される。

$$\langle y \rangle = \int_0^{\infty} y f(y) dy \quad (1.16)$$

$\langle y \rangle$ は頻度平均線エネルギー(frequency-mean lineal energy)と呼ばれ、 y_F と表記される。また線エネルギーが y となるイベントによる線量の割合である $d(y)$ は

$$d(y) = \frac{y f(y)}{\langle y \rangle} = \frac{y f(y)}{y_F} \quad (1.17)$$

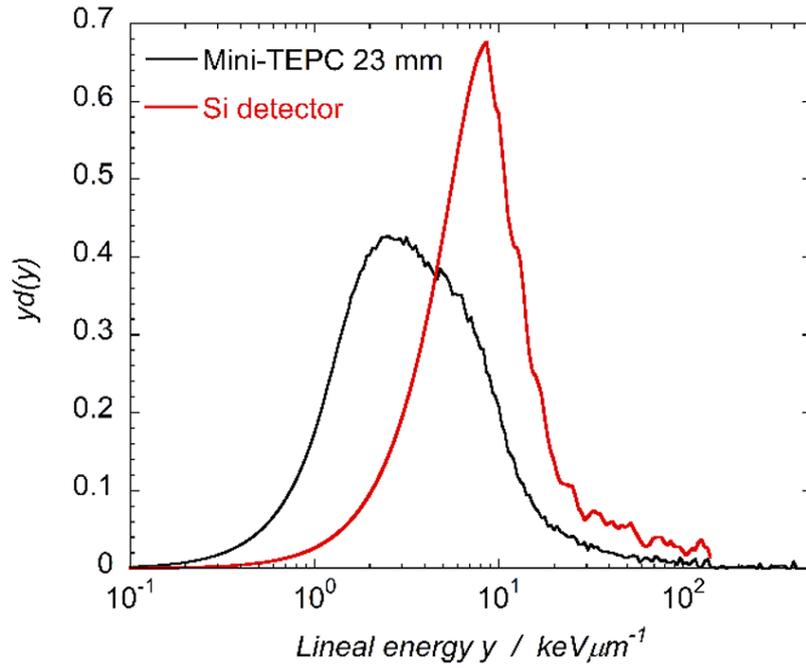


図 1.4 線エネルギーの分布 (Bianchi *et al.* 2020 [26]より引用)

により表される。頻度 $f(y)$ に対する y の期待値である y_F に対し、 $d(y)$ に対する期待値は線量平均線エネルギー (dose-mean lineal energy) と呼ばれ y_D と表記される[27]。式 (1.17) を用いると

$$y_D = \int_0^{\infty} y d(y) dy = \frac{1}{y_F} \int_0^{\infty} y^2 f(y) dy = \frac{\langle y^2 \rangle}{y_F} \quad (1.18)$$

が得られる。 $\langle y^2 \rangle$ は y の二次モーメントである。比エネルギーについても同様に頻度平均比エネルギー z_F と線量平均比エネルギー z_D が次式で得られる。

$$z_F = \langle z \rangle = \int_0^{\infty} z f(z) dz \quad (1.19)$$

$$z_D = \int_0^{\infty} z d(z) dz = \frac{1}{z_F} \int_0^{\infty} z^2 f(z) dz = \frac{\langle z^2 \rangle}{z_F} \quad (1.20)$$

本研究では Hawkins により開発された microdosimetric-kinetic (MK) モデル[28]の改良型である integrated MK (IMK) モデル[29]を基にモデリングしたが、 y と z はこれらのモデル内にパラメータの1つとして含まれる。

1.2. 放射線照射により生じる活性種

前項までに述べてきた放射線のエネルギー付与により電離・励起された分子を起点とし、媒質内の分子が連鎖的に分解され周囲の分子と反応する放射線分解が生じる(図 1.5) [30]。結果として種々の活性種が生成されるが、ここではラジカルと活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) を扱う。これらの活性種は DNA や細胞膜などの生体高分子に酸化的損傷を与える[19]。ラジカルはフリーラジカルとも呼ばれ、外殻に不対電子を有する原子/分子である。安定した原子/分子では外殻軌道電子は 2 個で 1 組のペアとなっているが、電離や酸化により対になっていた軌道電子のうち的一方が原子外へ放出されてしまうと残った電子は不対電子となり、他の原子や分子から電子や水素原子を奪う酸化力を有することになる。一方で ROS は酸素分子由来の反応性の高い分子であり、一部の ROS は不対電子を有するためラジカルにも分類される。例えば、放射線由来の活性種のうち最も生物学的影響に関与すると考えられているヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) は ROS とラジカルの双方に分類される。

1.2.1. 放射線照射後の活性種の生成

ここでは、実験的・理論的に多くの研究がなされてきた低 LET 放射線照射後の水中での放射線分解[30,31]について述べる。放射線が入射すると最初に 1.1.2 項で述べた励起と電離が入射後 $\leq 10^{-16}$ s 程度の間を生じる(物理学的過程)。この過程で生じた励起水分子 (H_2O^*)、陽イオン化された水分子 (H_2O^+)、電子は 10^{-16} – 10^{-12} s 程度の間種々の反応を経て新たな活性種を生成する(物理化学的過程)。 H_2O^* は残余エネルギーを熱エネルギーとして放出し基底状態に戻るが、高度に励起された H_2O^* は 1 つの電子を放出した後に水素原子 ($\text{H}\cdot$) と $\cdot\text{OH}$ に分解される。この経路とは別に、 H_2O^* は励起一重項酸素原子 ($\text{O}({}^1\text{D})$) と水素分子 (H_2) に分解されることがあり、まれに H_2O^* は 2 つの $\text{H}\cdot$ と活性の低い三重項酸素原子 ($\text{O}({}^3\text{P})$) に分解される。 $\text{O}({}^1\text{D})$ は反応性が高く水分子と反応し 2 つの $\cdot\text{OH}$ と 1 つの H_2 を生成する。物理学的過程で電離により生じた H_2O^+ は周囲の水分子と反応し $\cdot\text{OH}$ とヒドロニウムイオン (H_3O^+) を生成する。 H_2O^+ は電離電子と反応し H_2O^* となることもある。またこれらの過程で生じた電子は振動緩和などを介し基底状態となり、周囲の複数の水分子と結合し水和電子 (e_{aq}^-) となる。これらの活性種は入射粒子の飛跡に沿って生じた励起・電離点を中心に空間的に不均一に生成され、最初はスパーと呼ばれる小集団を形成している。やがて活性種は熱拡散し徐々に均一に分布するようになる(図 1.6) [32]。発生した活性種の空間分布の均一性の違いから、放射線入射後 10^{-12} – 10^{-6} s は不均一な化学的過程、 $> 10^{-6}$ s は均一な化学的過程に区分される。これらの化学過程では、活性種の熱拡散により異なるスパーで生じた活性種同士でも反応が起こり、新たな活性種が生成されるようになる。例えば、放射線分解で生成される活性種のうち特に反応性が高く DNA などの酸化損傷の主たる原因と考えられている $\cdot\text{OH}$ [19,33]は、別の $\cdot\text{OH}$ と反応することで過酸化水素 (H_2O_2)、 e_{aq}^- と反応することでヒドロキシイオン (OH^-) となる。また、放射線分解で生じた活性種同士の反応にとどまらず、 e_{aq}^- と $\text{H}\cdot$ は水中に溶解した酸素分子と反応し、それぞれスーパーオキシドアニオンラジ

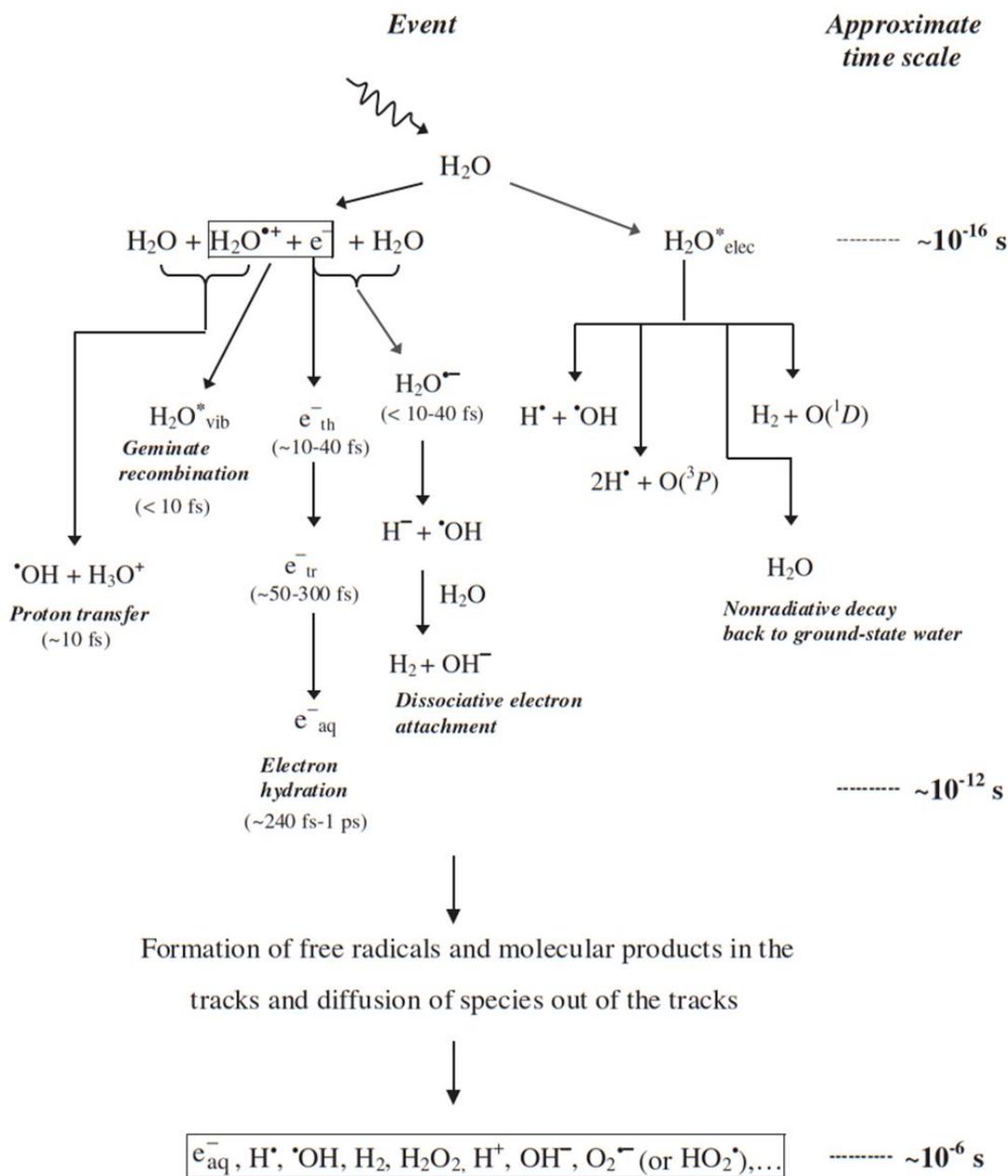


図 1.5 低 LET 放射線照射時の水の放射線分解 (Azzam *et al.* 2012 [30]より引用)

カル ($O_2^{\cdot-}$) とヒドロペルオキシラジカル (HO_2^{\cdot}) に変換される。 HO_2^{\cdot} は生理学的 pH 下では $O_2^{\cdot-}$ に分解される。

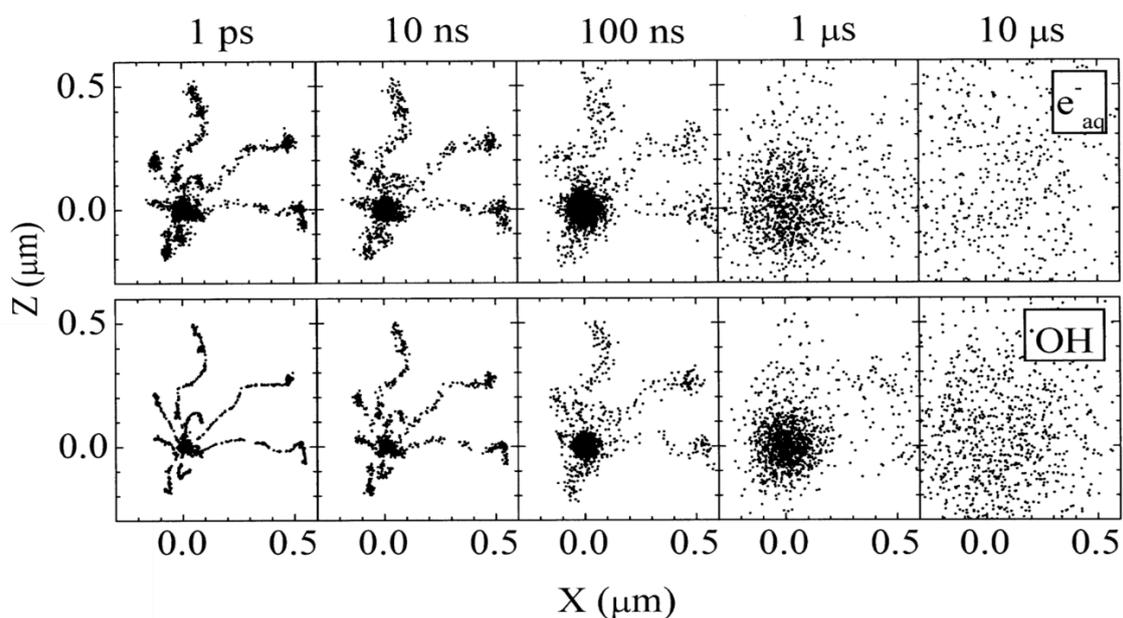


図 1.6 24 MeV $^4He^{2+}$ 照射後 1 ps - 10 μs までの e_{aq}^- と $\cdot OH$ の空間分布の変化 (Muroya *et al.* 2006 [32]より引用・一部改変)

1.2.2. 直接作用と間接作用

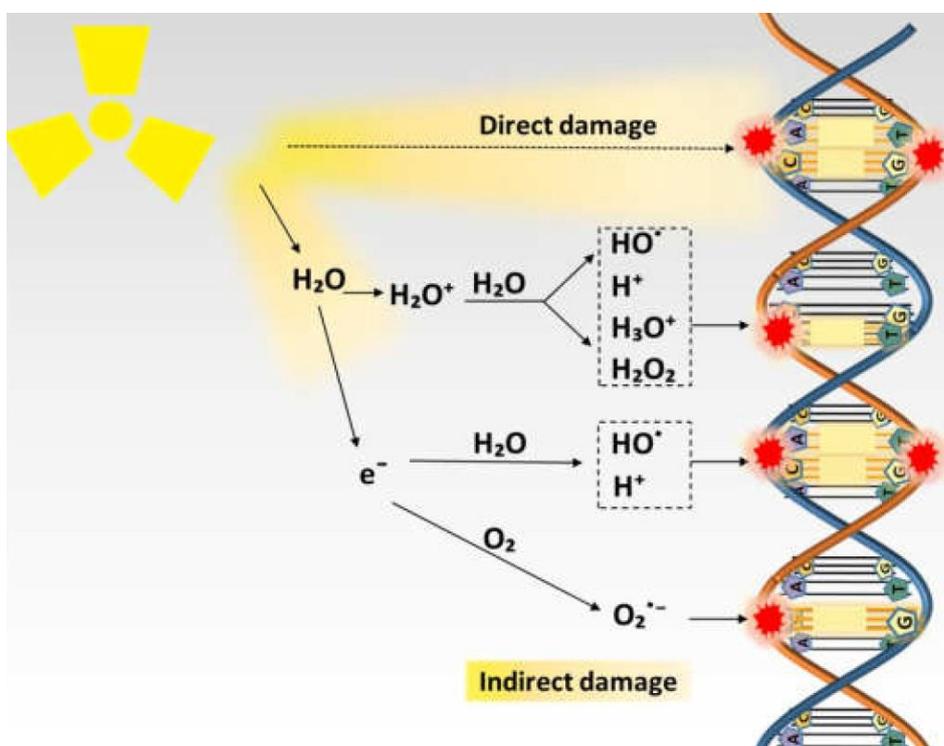


図 1.7 直接作用と間接作用 (Wang *et al.* 2019 [34]より引用)

DNA は放射線の生物学的効果に最も寄与すると考えられている標的である。放射線により DNA が損傷を受ける機序は直接作用と間接作用に大別される (図 1.7)。直接作用では、1.1.2–1.1.4 項で示したように入射粒子あるいは二次電子が引き起こす電離により DNA が直接的に損傷を受ける。間接作用では、1.2.1 項で述べた放射線入射後の物理化学–化学過程で生成される活性種により DNA が酸化的損傷を受ける。低 LET 放射線は直接作用よりも間接作用が生じやすい。高 LET 放射線は粒子自身が高密度に電離・励起を起こしやすく、一方でそれゆえに高密度に生成された活性種が DNA を酸化する前に互いに反応しやすくなることで間接作用が抑制されるため、直接作用の割合が高い。

1.3. 生物学的過程

放射線の生物学的効果には DNA 損傷が最も重要な役割を担うと考えられている[11,13]。DNA はタンパク質などの他の無数に存在する分子と比較し1つの細胞内に2つしかコピーがなく、また細胞の構造および機能の維持に関わる種々のタンパク質の設計図であることから、特に重要な分子とみなされている。放射線による DNA 損傷の形態には塩基損傷、一本鎖切断 (single-strand break: SSB)、DSB などがあるが、特に DSB は分裂期に染色体が分離する際に断絶を引き起こすことから細胞死に大きく関与すると考えられている[11,13]。DSB は放射線による直接作用および間接作用 (1.2.2 項) のみならず、他のタイプの DNA 損傷を介する複製障害により照射後数時間が経過してから二次的に引き起こされることもある。例えば DNA を複製する際に鋳型 DNA に SSB が存在する部位で複製が停止され、末端が1つの single-ended DSB (seDSB) が形成される[35]。一方で、生物は常に環境からの放射線に曝されており、持続的な被ばくによる DNA 損傷に対処し細胞の生死を決定づける DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR) システムが構築されてきた[11,36]。放射線による DNA 損傷の多くは損傷のタイプにより特定の修復機構により修復される[37,38]。本節では放射線による DNA 損傷後の生物過程や生物学的効果の定量化と臨床での応用、生物学的効果に影響を及ぼす因子について述べる。

1.3.1. DNA 損傷応答

DDR の機能は DNA 損傷の感知と細胞の運命を決定する応答である。最終的な応答には (a) 細胞周期内チェックポイント (図 1.8) による細胞周期の一時的または永続的停止、(b) DNA の修復、(c) 制御された細胞死 (regulated cell death: RCD) の3種がある[11]。各応答の発現には固有のセンサー、トランスデューサー、エフェクターの連鎖的な活性化が必要である。まず、センサーが DNA 損傷を検知しトランスデューサーを損傷部位へ誘導する。そこで活性化されたトランスデューサーがリン酸化やユビキチン化などによりエフェクターを活性化させる。そしてエフェクターが各応答固有の連鎖的なタンパク質活性経路の引き金を引く。

DNA 損傷の種類に依存し異なるセンサーが損傷部位に集積する。塩基損傷は特異的グリ

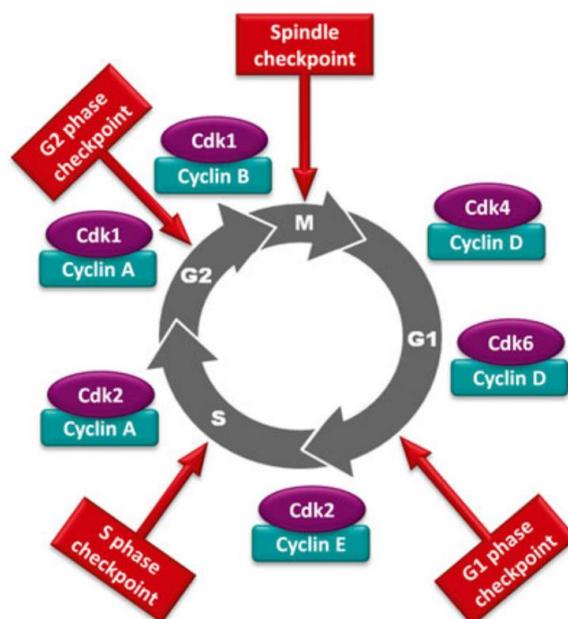


図 1.8 細胞周期とチェックポイント (Spoerri *et al.* 2014 [39]より引用)。M 期で分裂し G1 期を経て S 期で娘細胞に分配する姉妹染色分体を形成する。その後 G2 期を経て M 期に至ると分裂する。細胞周期内に存在する複数のチェックポイントでは DNA 損傷が検知された場合は修復のため細胞周期を遅延させる。

コシラーゼ、塩基欠損は poly (ADP-ribosylation)-polymerase (PARP)、DSB 修復中に生じる単鎖 DNA 領域は RPA 複合体に認識される。DSB は MRE11、RAD50、NBS1 から構成される MRN 複合体や Ku タンパク質 (Ku70 と Ku80) により認識される。毛細血管拡張性運動失調症変異 (ataxia telangiectasia mutated: ATM) はセンサーである MRN 複合体により DSB 部位に誘導される。毛細血管拡張性運動失調関連キナーゼ (ataxia telangiectasia related kinase: ATR) は、DSB 部位で ATM-MRN 複合体がプロセッシングにより伸長させた単鎖 DNA 領域に集積する。DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) は Ku タンパク質を介し DNA 損傷部位、特に DSB 部位に集積して Ku タンパク質と共に DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) を形成する。PARP1/2 はセンサーとして脱塩基、SSB、DSB などの放射線誘導性 DNA 損傷部位を認識し、種々のタンパク質を活性化させ炎症や代謝に関わるシグナル伝達経路を活性化させる。また、ATM、ATR、DNA-PK は DSB 近傍のヒストンタンパク質 H2AX をリン酸化し γ -H2AX を誘導する。 γ -H2AX が mediator of DNA damage checkpoint 1 (MDC1) を介し増加することで DNA 修復タンパク質の集積を促進させ、また増加し顕微鏡などで検出可能になった γ -H2AX は DSB のマーカーとして用いられる。MDC1 に遅れて γ -H2AX に誘導され集積する 53BP1 は DSB 修復に関与し、また γ -H2AX と同様に

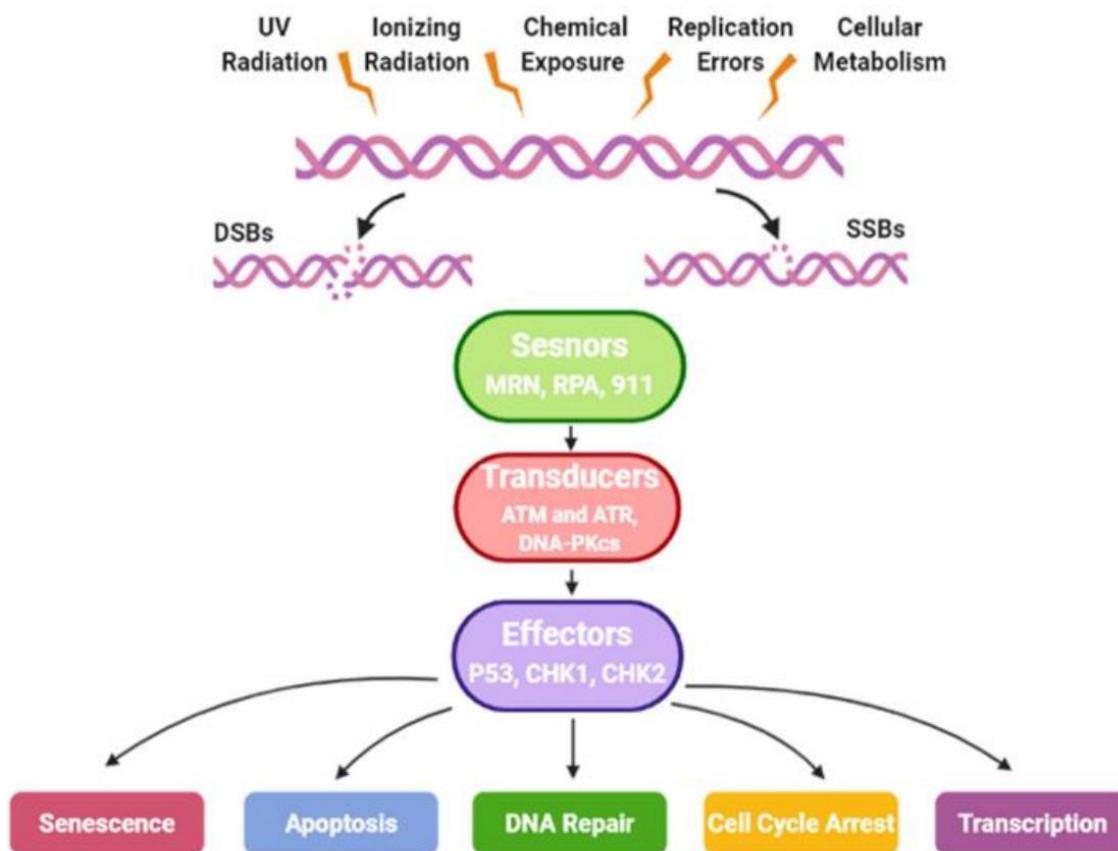


図 1.9 DDR におけるシグナル伝達経路 (Black & Mills. 2020 [40]より引用)

DSB マーカーとして利用される。

1.3.1.1. 細胞周期チェックポイントの活性化

DNA 損傷が生じると、細胞周期チェックポイントを活性化させることで細胞周期の次の相への移行を停止または遅延させる[11]。この間に DNA 損傷を修復し、突然変異や損傷の複雑化を抑制する。細胞周期の各相間の遷移はサイクリン/サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase: CDK) 複合体を介しているため (図 1.8)、これらのサイクリン/CDK 複合体を阻害することでチェックポイントが活性化され細胞周期の進行が阻害される。

G1 期に照射された場合、ATM はがん抑制遺伝子 p53 をリン酸化し活性化させ、p53 は p21 を誘導する。p21 は S 期進行に必要なサイクリン/CDK 複合体を阻害する。S 期で照射された細胞では、ATM と ATR が各々チェックポイントキナーゼ 2 (Chk2) と Chk1 をリン酸化により活性化させる。これらの Chk1/2 がサイクリン/CDK 複合体を活性化させる作用を有する cell division cycle (CDC) 25A/C をリン酸化により不活化させることで S 期の進行が遅

延する。G2 期に照射されると ATM-Chk2-CDC25A/C 経路を介し M 期への移行が阻害される。また G1 期または S 期で照射された細胞は、上記のそれぞれの相におけるチェックポイントで遅延が誘導されたとしても M 期に移行する前に G2 期で再度遅延が誘導されることがあり、ATR-Chk1-CDC25A/C 経路を介し細胞周期が G2 期に留められる。<0.5 Gy の照射では ATM が DSB を認識できず、G2 チェックポイントを活性化できず放射線感受性となる hyper-radiosensitivity (HRS) が観測されている[11,41]。また ATR を経由する G2 チェックポイントの阻害は他のチェックポイントの阻害と重複することで放射線感受性を高める[11]。

腫瘍細胞では上記の細胞周期チェックポイントのうち 1 つ以上が無効化されている。ほとんどのがん細胞では p53 などのがん抑制遺伝子の突然変異や喪失により G1/S 期チェックポイントが無効化されているが、細胞の放射線感受性に大きな影響がみられなかったことが報告されている[11,42]。

1.3.1.2. DNA の修復

DSB が ATM などに認識され細胞周期チェックポイントが活性化されると、細胞周期が遅延している間に DNA を修復する機構が活性化される[11]。DSB は後述するように細胞を死に至らしめる可能性がある一方で、下記の種々の経路で修復される余地がある。修復の結果次第で細胞の生死が決まることから、照射後初期の DSB は亜致死損傷 (sublethal damage: SLD) と呼ばれる。DSB が生じると主に非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) または相同組換え (homologous recombination: HR) による修復 (図 1.10) が試みられる[43-46]。NHEJ は DNA 鎖切断端を結合させる修復法であり、上記の DNA-PK は切断端の連結を仲介する。NHEJ は細胞周期のいずれの相でも活性化され、特に G1 期において主要な修復経路である。修復エラーが多く永続的な突然変異がもたらされることがある。NHEJ は Ku70/80 や DNA リガーゼ 4 などのたんぱく質に依存する[45,46]。HR では S 期で合成される未損傷の姉妹染色分体を鋳型とし正確な修復がなされる。姉妹染色分体が 1 つの細胞核内に存在する S 期後期から G2 期までの相に限り活性化される。HR は DSB 部位の 5'末端側が切除され 3'末端側に一本鎖 DNA (single-strand DNA: ssDNA) 領域が形成されることで開始される。また NHEJ と HR のうちどちらの処理が活性化されるかは細胞周期に加え、クロマチンの構造 (図 1.11) [47]が影響する[11]。DNA のうち約 90%は緩く折りたたまれた構造 (ユークロマチン) となっており、主に NHEJ により修復がなされる。残りの DNA は強固に折りたたまれた構造 (ヘテロクロマチン) となっており、姉妹染色分体が存在する S 期後期-G2 期にかけては HR、その他の相では NHEJ が誘導される。

最近では NHEJ とは異なる末端結合による修復方式であるマイクロホモロジー媒介末端結合 (microhomology-mediated end joining: MMEJ) も DSB の主要な修復経路として注目されている[45,46]。上記の Ku や DNA リガーゼ 4 を介する NHEJ は canonical (conventional)-NHEJ (c-NHEJ) と呼ばれ、これらのたんぱく質を介さない末端結合は alternative-NHEJ (alt-NHEJ)

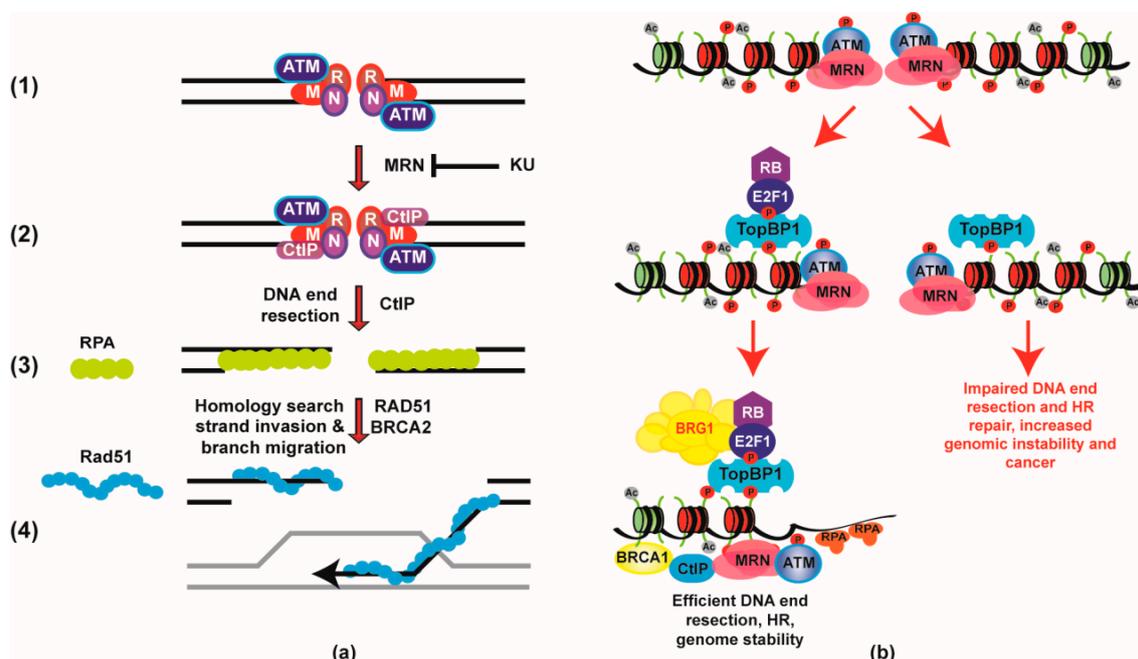


図 1.10 (a) 相同組み換え (HR) と (b) 非相同末端結合 (NHEJ) の修復経路 (Vélez-Cruz & Johnson 2017 [43]より引用)

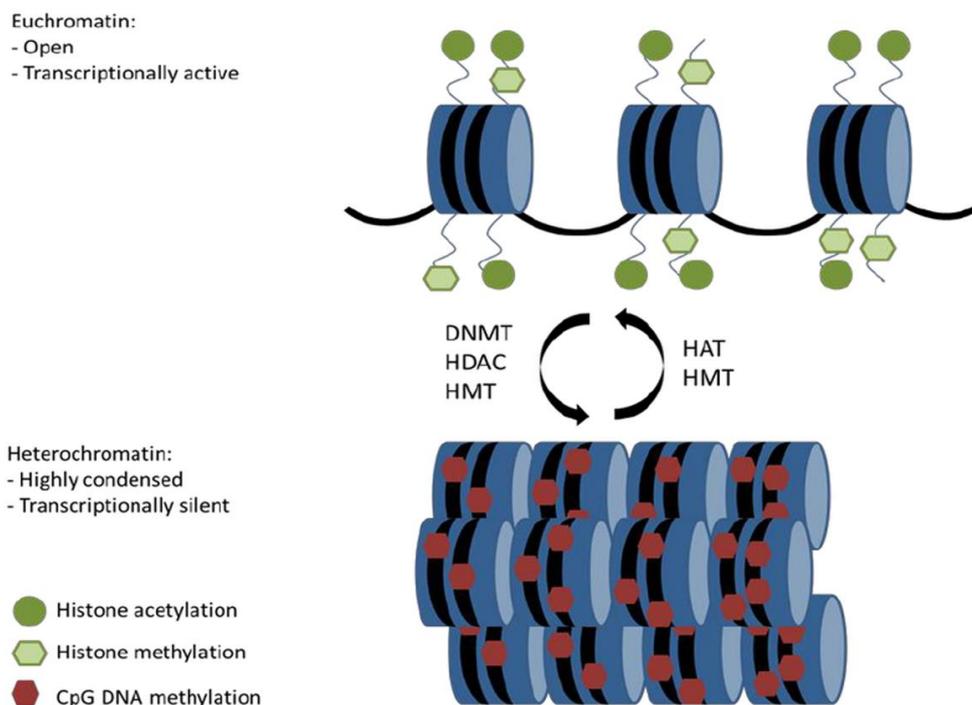


図 1.11 ユークロマチンとヘテロクロマチン (Soom *et al.* 2013 [47]より引用)

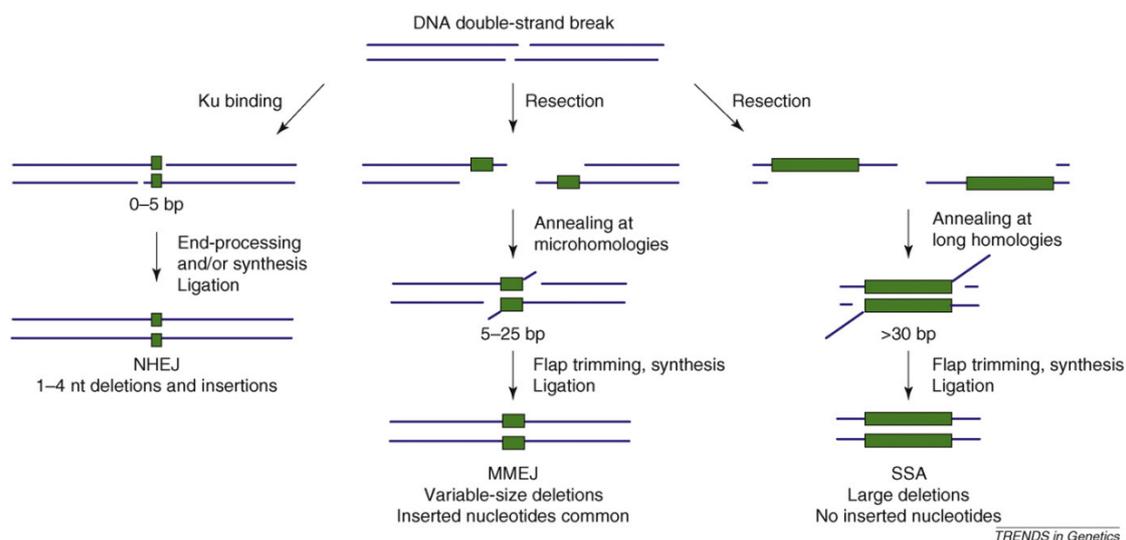


図 1.12 NHEJ、MMEJ、SSA の比較 (McVey *et al.* 2008 [44]より引用)

と呼ばれる[48,49]。MMEJは後者の1つとして認識されている。また、MMEJではHRと同様に3'末端側にssDNAの形成が必要であり、そこに含まれる短い相同配列（マイクロホモロジー）を基に修復がなされる（図 1.12）[44-46]。相同配列（ホモロジー）が長い場合には、頻度が低く重要な修復経路としてみなされていないが single-strand annealing (SSA) が生じる（図 1.12）。これらのホモロジー由来の修復は姉妹染色分体を利用せず変異原性であり、相同配列依存的修復 (homology-directed repair : HDR) という枠組みに含まれる。HRもHDRの1つに分類される。一方で、c-NHEJはホモロジーに依存しない修復形態であるためHDRに含まれない。

1.3.1.3. 細胞死

増殖能を有する多くの細胞は照射後1回ないし2回以上分裂したのちに死に至る[50]。上記のチェックポイントとDNA修復は細胞の生存を誘導する機序であるが、照射後時間が経過しチェックポイントの活性が解除され、DNA修復がほぼ終了した状態で細胞死が誘導される。この頃には照射後初期に生成されたDNA損傷はわずかに残っているのみで、細胞死は残存したDNA損傷に対するDDRを介し誘導されるのではなく、残存している損傷が保持された状態でM期に至ることで誘導される（分裂期崩壊）[50]。DNA損傷の多くはDDRを介し修復されるがNHEJによる修復はエラーが多く、また損傷の修復が進行しHRSのように損傷がチェックポイントで検知できないレベルになると、DDRが活性化されず未修復の状態でもM期に移行すると考えられる。分裂期崩壊は2つの事象を包含している。1つはDNAが適切に修復されていない細胞の分裂中に誘導される細胞死（分裂死）である。もう1つは

DNA 損傷が残存した細胞がチェックポイントを通過し分裂時に染色体を等分配できず多核巨細胞や小核を伴う細胞を形成する事象であり、これらの異常な細胞はやがて細胞老化（代謝能を保持し生存しているが分裂能を喪失した状態）や細胞死（アポトーシスやネクローシス）に至る[51]。

一方で、放射線感受性が高いリンパ球、精原細胞、胸腺細胞などの細胞では、照射後数分以内に DDR が活性化し、早期に p53 の活性化を介しアポトーシスが誘導される。また、血管内皮細胞では DNA でなく細胞膜の損傷を介し早期にアポトーシスが活性化される[52]。これらの細胞は分裂を伴わず死に至る（間期死）。また間期死では他の RCD も誘導される。

1.3.1.4. アポトーシス

アポトーシスは 1972 年に Kerr らにより見出された RCD である[53]。Kerr らのこの報告が発表される以前は病理学的に観察されていた細胞死である炎症（ネクローシス）の特殊なタイプと考えられていたが、この報告を契機にネクローシスとは独立した、正常な組織機能を維持するための細胞分裂と対になる機構として考えられるようになった。現在では種々の連鎖的なシグナル伝達経路により制御されることが明らかになっている[11,54]。アポトーシスは外因性経路または内因性経路のいずれかを経て誘導される。外因性経路は細胞外リガンド（tumor necrosis factor: TNF）、TNF related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)、FAS が各々のリガンドに対応する細胞膜上の受容体に結合することで開始される。放射線照射ではこの経路はほぼ誘導されない。内因性経路にはミトコンドリアが大きく関わるということが知られている。ミトコンドリアの膜間腔から細胞質へサイトクロム C などが放出されるとアポトソームと呼ばれる複合体が形成され、内因性経路を開始するカスパーゼ 9 が活性化される。放射線照射はサイトクロム C の放出を促進し、アポトーシスが生じやすくなる（図 1.13）[55]。ATM により活性化される p53 は G1/S チェックポイントの活性化のみならず、アポトーシス誘導たんぱく質の 1 つである Bcl-2 associated X (BAX) の発現を増強し、ミトコンドリア外膜の透過性を亢進させ膜間腔内のサイトクロム C を細胞質中へ放出させる。p53 はほぼすべての細胞で活性化されるが、線維芽細胞などの特定の細胞では BCL2 ファミリーのようなアポトーシス阻害たんぱく質の発現量が多いためアポトーシスが生じにくい場合がある。腫瘍細胞ではアポトーシスを制御する種々の遺伝子が変位しているため、アポトーシスの感受性は細胞の種類に大きく依存する。また 1.3.1.1 目で述べたように、腫瘍細胞では p53 の機能が欠損している場合が多いため、内因性経路が正常細胞と比較し活性化されにくい。

1.3.2. 増殖死と細胞生存率

正常組織においては組織の形態や機能の維持に幹細胞が不可欠である[12]。幹細胞は自己複製しその数を維持しつつ、各種機能を担う細胞に分化する能力を有する。腫瘍組織では放射線治療後の再増殖による再発・再燃あるいは転移にがん幹細胞 (cancer stem cell: CSC)

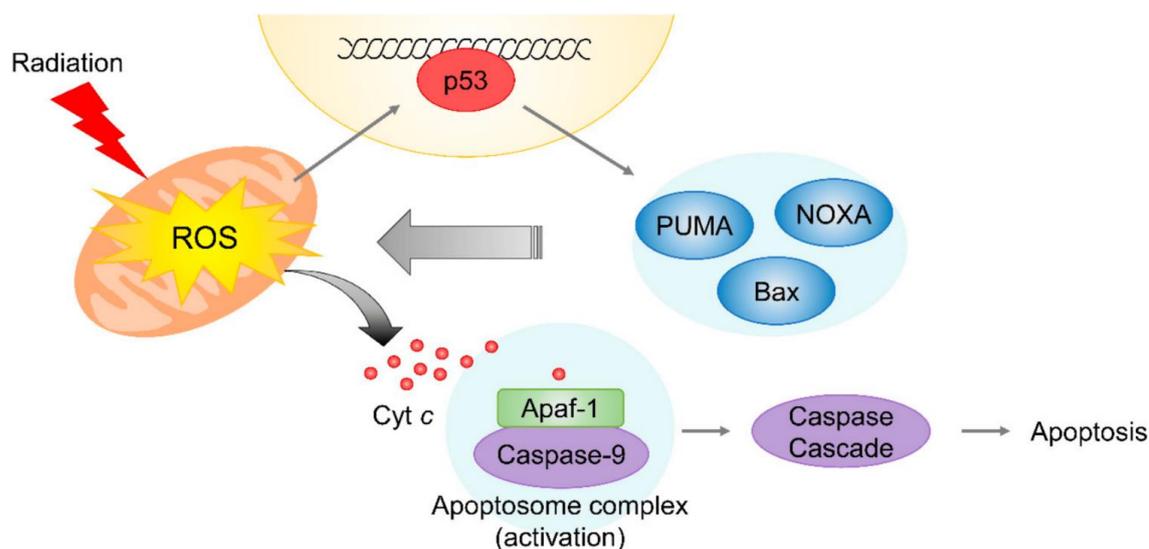


図 1.13 照射後に活性化されるアポトーシス内因性経路 (Kim *et al.* 2019 [55]より引用)

が重要な役割を果たすと考えられている。したがって、放射線照射後の正常組織の温存と抗腫瘍効果の評価には幹細胞の増殖能を定量化することが重要である[12]。増殖能を喪失した細胞に対し増殖死という用語が用いられる[50]。「死」という言葉を用いて表現されるが、増殖死の枠組みにはアポトーシスなどを経て実際に死に至った細胞に加え、増殖能を喪失しながらも生存している老化細胞なども含まれる。また、神経細胞や筋細胞などの高度に分化し増殖能を喪失した細胞には増殖能でなく細胞機能の喪失などを細胞死として扱うべきとの見解もあるが、放射線生物学においては細胞死の定義として増殖死が広く適用されている[50]。

1.3.2.1. 細胞生存率

細胞生存率は細胞の無限増殖能を測定するクローン原性アッセイ[56]により得られる(図 1.14) [12,54]。クローン原性は、一般に分裂能を維持した1つの細胞が50個以上に増殖し細胞集団(コロニー)を形成する能力である。線量 D に対する細胞生存率 $S(D)$ は次式で求められる。

$$S(D) = \frac{n(D)/N_D}{n_c/N_c} \quad (1.21)$$

$n(D)$ は線量 D を照射した後のコロニー形成数、 N_D は線量 D を照射する前の細胞数、 n_c は $n(D)$ と同じタイミングで計数された非照射細胞株内で形成されたコロニー数、 N_c は非照射細胞株における初期の細胞数である。例えば図 1.14 内の 9 Gy 照射時の生存率 0.005 は、 $S(9 \text{ Gy}) = (44/10,000)/(90/100)$ により得られる。

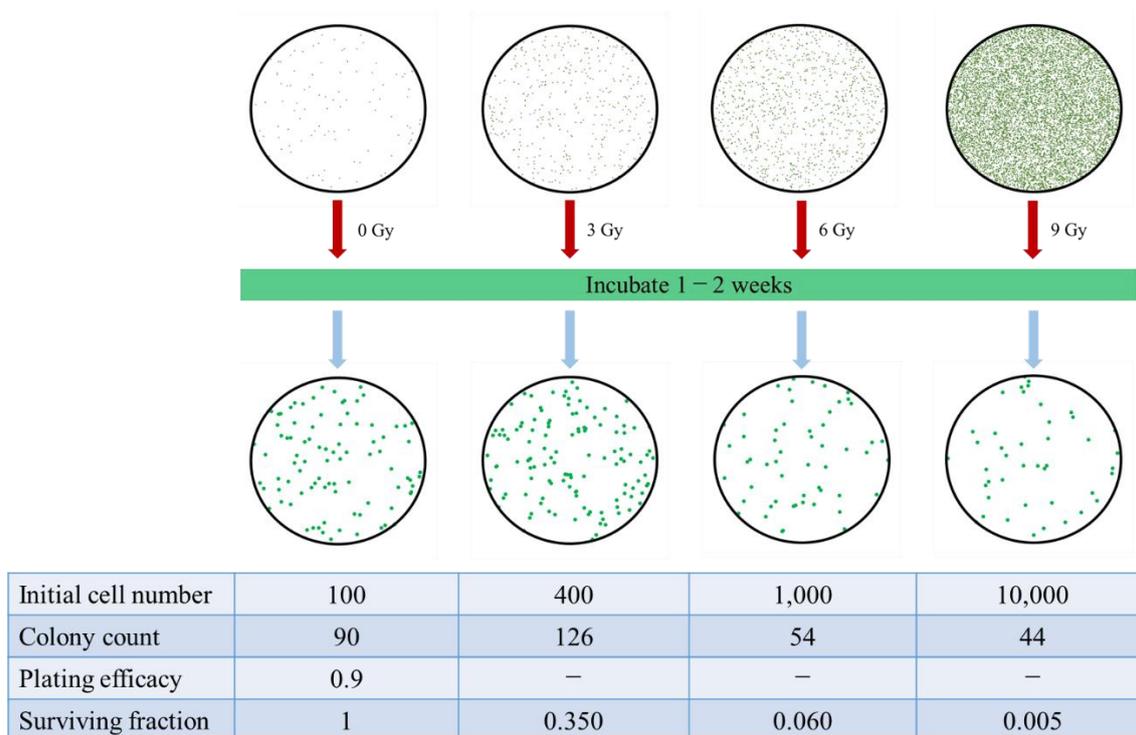


図 1.14 クローン原性アッセイによる細胞生存率の導出

1.3.2.2. 線形二次曲線モデル

吸収線量と細胞生存率の関係を表す曲線は生存率曲線と呼ばれる。線形二次曲線（linear-quadratic: LQ）モデルは最もシンプルに線量と生存率の関係を数学的に近似でき、放射線生物学や放射線治療の分野で広く活用される。吸収線量 D に対する生存率 $S(D)$ は次式で表される。

$$S(D) = e^{-(\alpha D + \beta D^2)} \quad (1.22)$$

α (Gy^{-1}) と β (Gy^{-2}) はモデルパラメータである。LQ モデルには放射線生物学的な機序も関連付けられてきた。例えば、致死的な二動原体染色体や環状染色体のような不安定型染色体異常は隣接する二本の染色体が切断されることで形成されるが、 αD では単一の放射線がこれらの切断を誘引する飛跡内事象、 βD^2 では異なる放射線が誘導する飛跡間事象が想定された[12,13]。特に後述する線量率効果を考えると、このような放射線生物学的な関連付けの妥当性が垣間見える。線量率が低下すると単位時間あたりに入射する放射線量が減少するため、最初の粒子により染色体が切断されても近接する染色体が新たに切断される前に修復される可能性が高くなる。一方で、線量率が高ければ最初の切断が修復される前に近接する染色体を別の粒子が切断し不安定型染色体異常が形成される可能性が高くなることで生

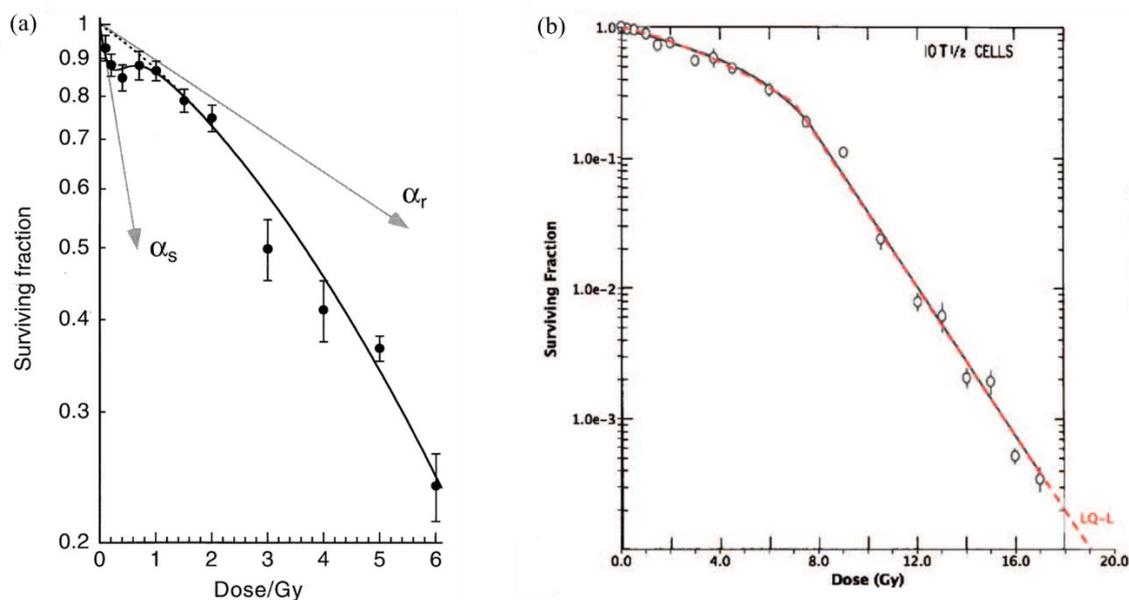


図 1.15 (a): Induced repair (IR) モデルにより再現された hyper radiosensitivity (HRS) (< 0.2 Gy) と increased radioresistance (IRR) (0.2–0.8 Gy) がみられる生存率曲線 (Joiner *et al.* 2001 [57]より引用) (b): linear-quadratic-linear (LQ-L) モデルにより高線量領域の直線部が再現された生存率曲線 (Astrahan 2008 [58]より引用)

存率が低下する (線量率効果)。また過去には DNA の二重らせんの対になる鎖に 1 つまたは 2 つの放射線が損傷を与え DSB が形成されることも想定されたが、DSB を生じさせるほどの近接した位置に 2 つの飛跡が重複する可能性が非常に小さいことが知られている[12]。また、 $\alpha D = \beta D^2$ より得られる $D = \alpha/\beta$ (Gy) は α/β 比と呼ばれ、曲線の屈曲の程度を表す。

LQ モデルを用いて適切に実験値を再現できる線量の範囲は 1–6 Gy 程度と考えられている[12]。< 1 Gy の線量域では hyper-radiosensitivity (HRS) と increased radioresistance (IRR) と呼ばれる領域が形成される (図 1.15(a))。線量が < 0.1 Gy の場合には、細胞周期チェックポイント活性化に参与する ATM をリン酸化するほどの十分な DSB が生じず、> 1 Gy 照射時の実験値から LQ モデルで予測される生存率よりも低い生存率が観測されることがある (HRS)。0.1 Gy を超えると ATM が活性化されるようになり、DNA の修復頻度が増加し抵抗性となり (IRR) [57,59,60]、LQ モデルで表現できるようになる。これらの過程を考慮し改良された LQ モデル (induced repair (IR) モデル) により < 1 Gy 領域の生存率が再現されている (図 1.15(a)) [57]。また、> 6 Gy の線量域では二次曲線ではなく直線的に生存率が低下することが知られている[12,58]。このような高線量域の直線的な変化も LQ モデルでは再現できないため、linear-quadratic-linear (LQ-L) モデル[58]などの新たなモデルが考案されている (図 1.15(b))。

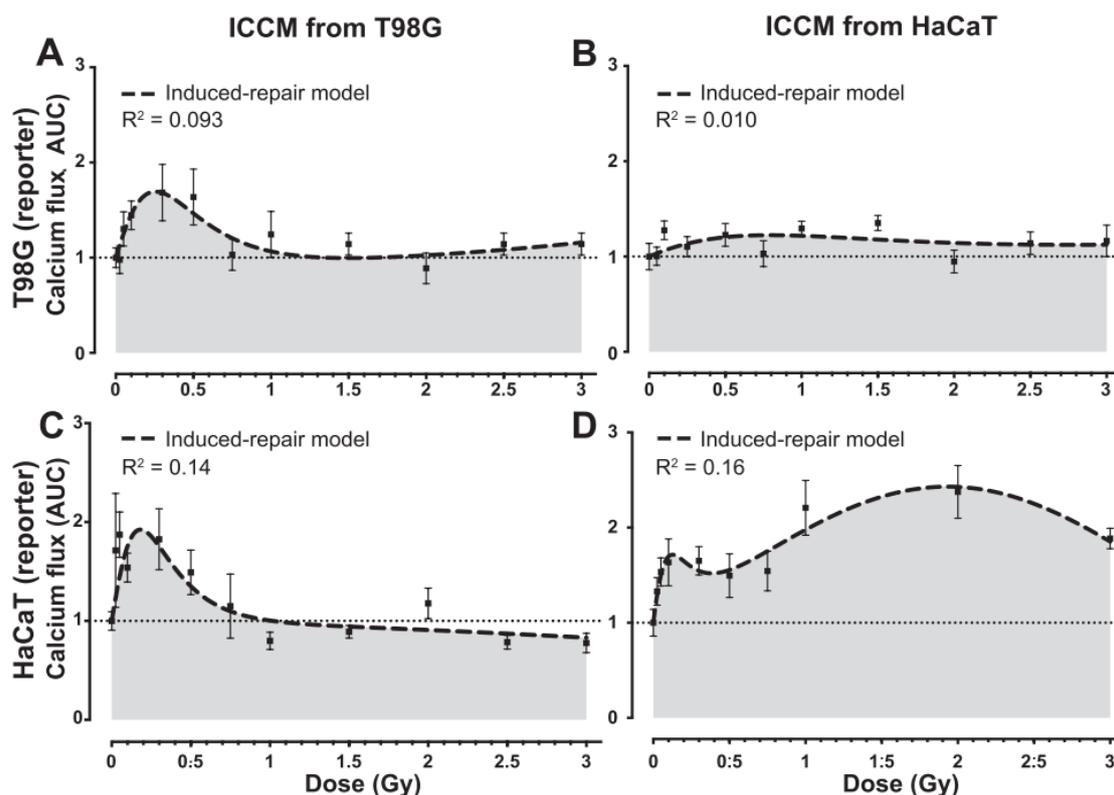


図 1.16 レポーター細胞を T98G 細胞または HaCaT 細胞由来の ICCM に曝露させたときの細胞内へのカルシウムの流入 (Fernandez-Palomo *et al.* 2016 [61]より引用)

また、細胞の種類によってはバイスタンダー効果が HRS に関与することを示唆する報告がある。バイスタンダー効果は細胞内へカルシウムが流入することで開始されると考えられており、放射線が照射されていない細胞にも細胞死が誘導される現象である。バイスタンダー効果は 2 つの経路で誘導されることが知られている[61–63]。1 つは照射されていない細胞が隣接する照射された細胞と物理的にギャップジャンクションにより接続されている場合であり、非照射細胞に DSB が形成され p53 の発現が亢進する[63]。詳細は不明であるが、長時間にわたるラジカル濃度の高止まりが原因の 1 つとして考えられている。もう 1 つは、照射細胞から信号となる分子が細胞間質や媒質に放出され、非照射細胞がその分子を感知し細胞死が誘導される場合である。照射細胞 (ドナー細胞) が培養されていた培養液 (irradiated cell conditioned medium: ICCM) に非照射細胞 (レポーター細胞) を曝露させることで観測されている。例えば Fernandez-Palomo らは、照射後のクローン原性アッセイで HRS が誘導される線量域でヒト神経膠腫由来細胞 T98G をドナー細胞とし生成された ICCM にレポーター細胞 (T98G 細胞とヒト表皮角化細胞 HaCaT) を曝露させると、バイスタンダーシグナルの増幅 (図 1.16 A, C の HRS 線量域にみられるカルシウム流入量の増加) が誘導さ

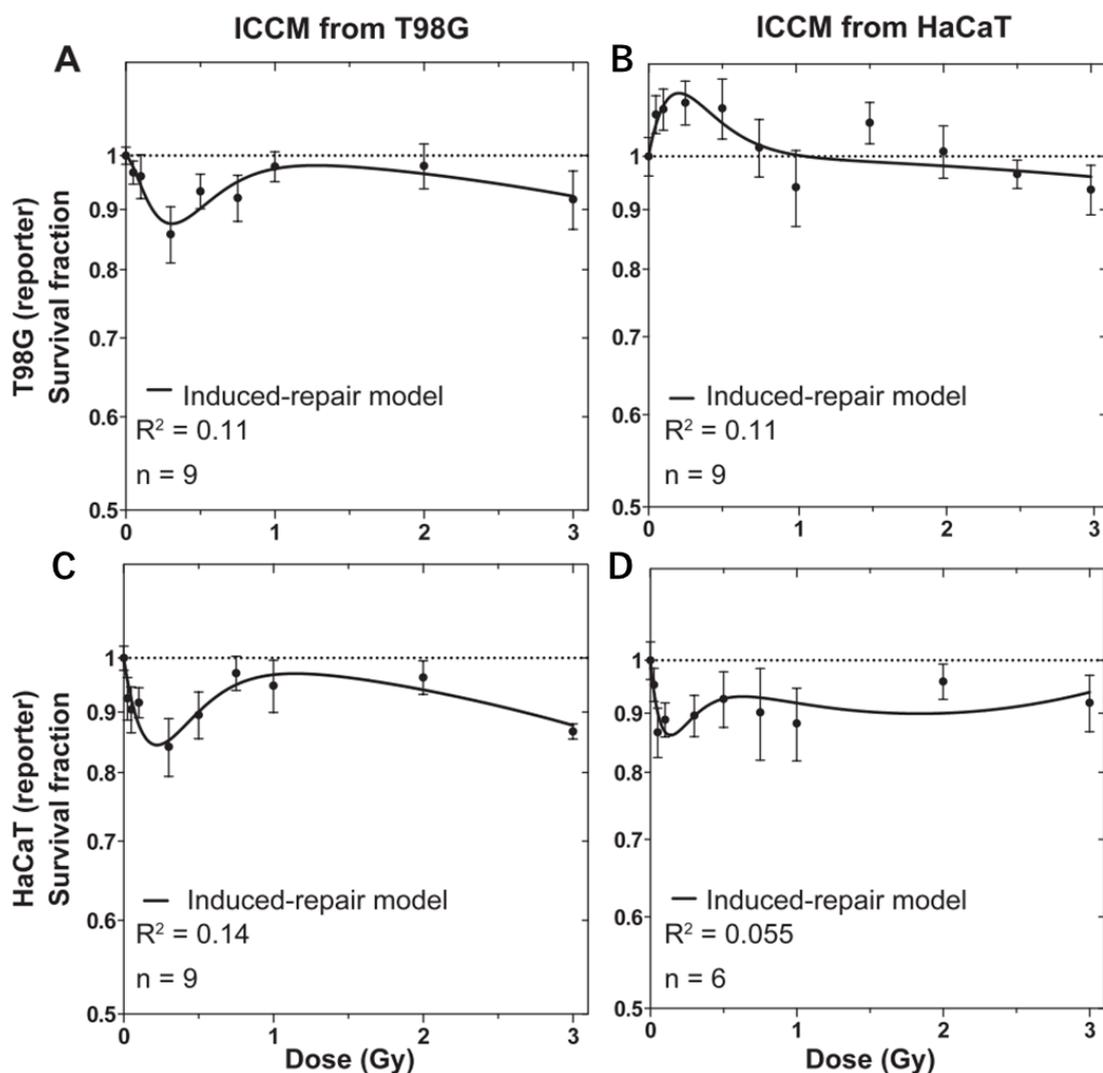


図 1.17 レポーター細胞を T98G 細胞または HaCaT 細胞由来の ICCM に曝露させたときの細胞生存率 (Fernandez-Palomo *et al.* 2016 [61]より引用)

れ、対応する線領域で細胞生存率が低下することを報告している (図 1.17A,C) [61]。しかしながら HaCaT 細胞は照射後 HRS を呈さず、この細胞をドナー細胞とした場合にレポーター細胞が T98G の場合はシグナルが発生せず (図 1.16 B)、HaCaT の場合は発生する (図 1.16 D)。また、HaCaT がレポーター細胞であればシグナルの増幅により生存率が低下するが (図 1.16 D、図 1.17D)、T98G 細胞がレポーター細胞の場合はシグナルが誘発されず (図 1.16 B)、生存率が他の細胞と異なり増加することが示されている (図 1.17B)。これらの結果は細胞の種類によりバイスタンダー効果と HRS の関係が異なることを示唆している[61]。

1.3.3. 細胞生存率曲線と組織反応

LQ モデルは 1980 年頃から分割照射の生物学的効果を考えるにあたり導入されるようになり、細胞生存率曲線と組織における生物学的効果を関連付けてきた[64]。

1.3.3.1. 腫瘍の局所制御

放射線治療における抗腫瘍効果は局所制御、増殖遅延、腫瘍縮小などで評価され、局所制御は根治的治療において重要である。局所制御の向上で患者の生存日数が延長されることが知られている[65]。局所制御は CSC が全て増殖死の状態に移行することで達成され、腫瘍局所制御率 (tumor control probability: TCP) は放射線照射後のクローン原性細胞数に依存する[66]。照射後に残存するクローン原性細胞数 n はポアソン分布で近似することができる。

$$p(n) = \frac{\lambda^n e^{-\lambda}}{n!} \quad (1.23)$$

λ は腫瘍内に残存するクローン原性細胞数の平均値である。TCP は $n = 0$ となる確率であるから、式(1.23)より次式の関係が得られる。

$$TCP = p(0) = e^{-\lambda} \quad (1.24)$$

LQ モデルで表現される細胞生存率を用いて TCP は次式のように表すことができる[66]。

$$TCP = e^{-N_0 \exp(-\alpha D - \beta D^2)} \quad (1.25)$$

N_0 は照射前の腫瘍細胞数である。図 1.18 は式(1.22)と式(1.25)を用いて生存率曲線と TCP を求めたものである。

1.3.3.2. 分割照射における生物学的効果

放射線治療では分割照射により腫瘍の局所制御向上や正常組織の副反応抑制が図られる[9]。照射後の腫瘍細胞と晩発障害に関わる正常細胞の回復の差を利用している。これらの生物学的効果は総線量、分割線量、総治療期間などの分割照射パラメータにより調整され、LQ モデルを用いて関連付けられてきた。 α/β 比は分割照射スケジュールに対する生物学的効果 (腫瘍の局所制御や正常組織の反応) の感受性を表し、動物実験や臨床データを基に数値が得られている[9,64,67]。治療期間終了後に数か月～数年の潜伏期を経て発症する晩発障害は α/β 比が低く、多くの腫瘍と治療期間中または治療期間直後から生じる早期障害は α/β 比が高い。高 α/β 比の組織反応と比較し、低 α/β 比の組織反応は分割線量が低いほど同等の反応を生じさせるために必要な総線量が顕著に高くなる。高 α/β 比細胞に対し低 α/β 比細胞の生存率の低下が低線量領域で緩慢であることに矛盾しない。分割照射法にはいくつかの方式がある[68]。臨床で最も高い頻度で用いられる通常分割照射では、分割線量を 1.8–2 Gy とし、1 日 1 回週 5 日の照射で設定した総線量を照射し終えるまで継続する。過分割照射 (hyperfractionation) では分割線量を < 1.8 Gy 程度とし 1 日に 2–3 回 (基本的に 2 回) 照射し、通常分割照射に対し総治療期間を同等、総線量を高くすることで重篤な晩発障害の発症リスクを増大させず、一方でより高い腫瘍局所制御を目的とする。照射間隔を 6

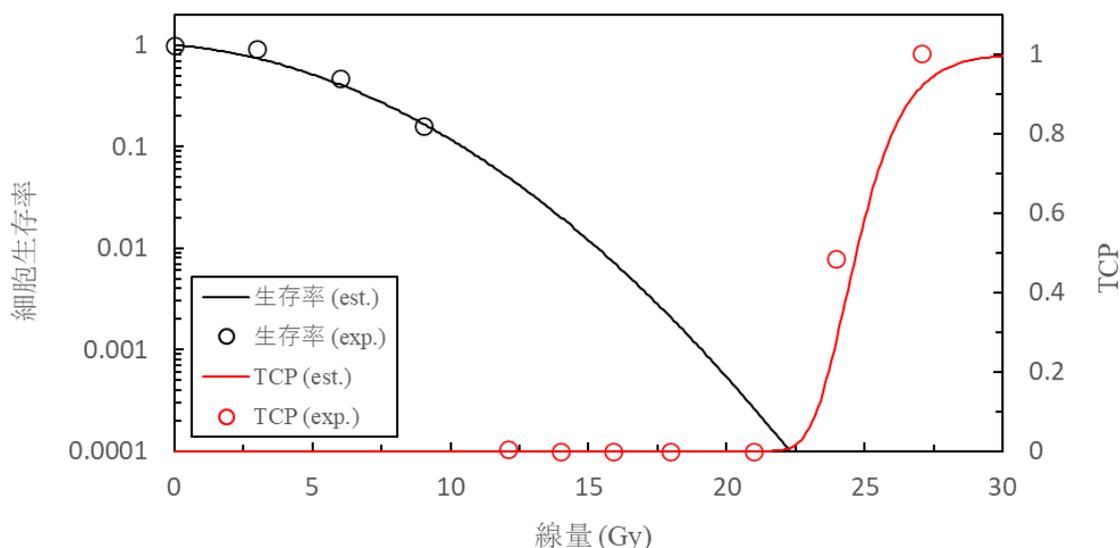


図 1.18 式(1.22)を用いて生存率の実験値（黒丸）をフィッティングし得られたパラメータ α 、 β を用いて描出した生存率曲線（黒の実線）と、 α 、 β を式(1.25)に代入し得られた TCP（赤の実線）。赤丸は TCP の実験値を表す。 N_0 は 5×10^4 が与えられていた。実験値は Kappler *et al.* 2007 より引用。

時間以上として十分な正常細胞の SLD 回復（SLD repair: SLDR）を図る。寡分割照射（hypofractionation）では 1 回線量を >2 Gy とし、通常分割照射に対し総線量を小さく、総治療期間を短くし、疼痛緩和などの緩和的照射に主に利用される。また、 ≤ 3.5 Gy の寡分割照射は根治的照射にも用いられる。晩発障害抑制のため総線量がわずかに小さく設定されるため、高 α/β 比の腫瘍では局所制御率が低下する可能性がある。一方で、治療期間が短縮されるため加速再増殖が阻害され局所制御率が増加する可能性もある。また、低 α/β 比の前立腺癌などでは局所制御率が通常分割照射に対し維持されるか向上することが報告されている。

LQ モデルは任意の分割照射パラメータ（分割線量、分割回数）から決定されるスケジュールにおける生物学的効果を、基準となる分割線量による治療から一定期間後の効果と同等になるよう調整する際に用いられる[69]。分割線量を d とおくと、1 回照射した後の細胞生存率は

$$S_d = e^{-(\alpha d + \beta d^2)} \quad (1.26)$$

となり、分割回数を n とし分割照射した後の生存率は次式のようなになる。

$$S = [e^{-(\alpha d + \beta d^2)}]^n = e^{-(\alpha D + \beta d D)} \quad (1.27)$$

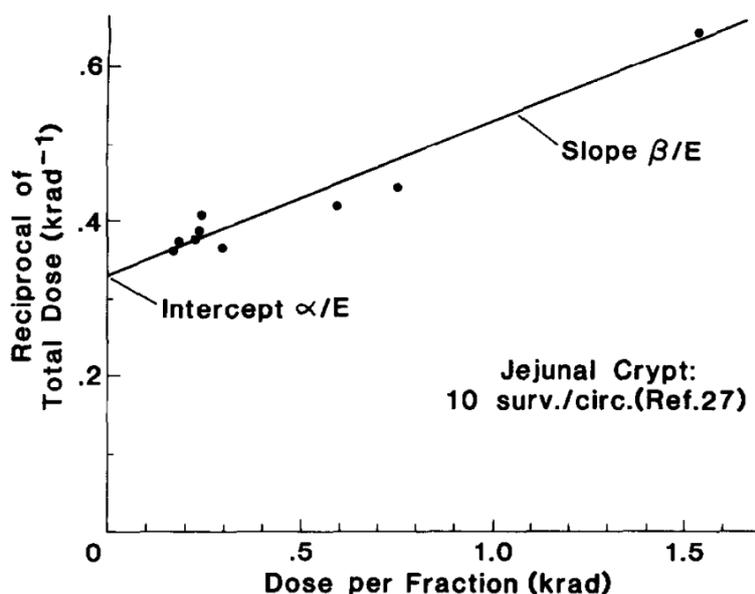


図 1.19 等価な生物学的効果が達成されるときに分割線量と総線量の逆数の関係 (Thames *et al.* 1982 [67]より引用) (1 rad = 0.01 Gy = 1 cGy)

D は総線量であり $D = nd$ で表される。分割照射で得られる生物学的効果 E は細胞生存率の負の自然対数で表現できると仮定され[9,67]、式 (1.27) を用いて次式で表される。

$$E = \alpha D + \beta d D \quad (1.28)$$

この LQ モデルに基づく関係を基にいくつかの手法で実験的な生物効果と分割法の関係が得られている。式 (1.28) を変形すると次式が得られる[67]。

$$\frac{1}{D} = \frac{\alpha}{E} + \frac{\beta}{E} d \quad (1.29)$$

異なる分割スケジュール間の E が同等になる際の式 (1.28) の左辺と右辺の関係が図 1.19 のように得られており、このモデルにより実験データを再現できることが示された[67]。なお、この直線と横軸の交点が $-\alpha/\beta$ となる。また、式 (1.28) は次式のようにも変形でき、 E/α は生物学的等価線量 (biologically effective dose: BED) と呼ばれる。

$$BED = \frac{E}{\alpha} = D \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right) \quad (1.30)$$

分割線量を変更する場合に新たな分割スケジュールにおける総線量は、基準となる分割照射における総線量に換算した際に抗腫瘍効果が得られるか、あるいは組織反応を抑制可能か確認する必要がある[70]。新規の分割照射と基準の分割照射の BED を等価と仮定し、各照射スケジュールにおける総線量をそれぞれ D と D_{ref} 、分割線量を d 、 d_{ref} とおくと、新規スケジュールにおける総線量が次式で得られる[9,70]。

$$\frac{D}{D_{\text{ref}}} = \frac{\alpha/\beta + d_{\text{ref}}}{\alpha/\beta + d} \quad (1.31)$$

特に 2 Gy の通常分割照射における生物学的効果と関連付けて総線量を評価する場合は次式で表される equivalent dose in 2 Gy fractions (EQD2) が用いられる。

$$\text{EQD2} = D \frac{\alpha/\beta + d}{\alpha/\beta + 2} \quad (1.32)$$

なお、全治療期間延長による加速再増殖や小線源治療による低線量率連続照射などによる治療効果の低下は補正する必要がある[9,64]。

1.3.4. 線量率の影響

線量率は 1.1.3.3 目で示した通り単位時間あたりの吸収線量であり、同じエネルギーかつ同種の放射線を照射したとしても、線量率により生物学的効果に変化する(図 1.20) [71-74]。

1.3.4.1. 線量率効果

低線量率 (low dose-rate: LDR) 照射と比較し高線量率 (high dose-rate: HDR) 照射で生物学的効果が増強される現象は線量率効果と呼ばれる。特定の線量を照射する際の線量率の増加は、総照射時間内に入射してくる粒子の空間的な密度は同等である一方で、時間的な密度が高くなることに相当する。HDR 照射では SLDR が完了する前に SLD を受けた染色体の近傍で SLD が生じ、これらの SLD が相互作用により致命的損傷 (二動原体染色体や環状染色体) を生み出す確率が増大する。LDR 照射では最初の SLD が回復した後に新たに SLD が生じる確率が HDR 照射と比較し高くなるため、SLD 間の相互作用による致命的損傷の形成が阻害されやすくなる。外部照射による放射線治療ではおよそ $1-5 \text{ Gy min}^{-1}$ の線量率が用いられ、SLD は照射時間内に十分に回復しないため (図 1.21)、線量率効果が表れる[71]。小線源治療ではさらに低い線量率が用いられ、ICRU report 38 によると小線源治療の枠組みでは $0.4-2.0 \text{ Gy h}^{-1}$ ($0.7-3.3 \text{ cGy min}^{-1}$) であれば LDR、 $2.0-12.0 \text{ Gy h}^{-1}$ ($3.3-20.0 \text{ cGy min}^{-1}$) であれば medium dose rate (MDR)、 $> 12.0 \text{ Gy h}^{-1}$ ($> 20.0 \text{ cGy min}^{-1}$) であれば HDR に分類される[75,76]。 10 cGy min^{-1} を下回る線量率ではさらなる線量率の減少により、SLDR のみならず細胞周期の再分布や再増殖の影響も表れる (図 1.21) [77]。

1.3.4.2. 逆線量率効果

線量率効果がみられる線量率よりもさらに低い線量率で照射すると、線量率が高い場合よりも生物学的効果が高くなる現象 (逆線量率効果) が表れることがある (図 1.20(b)) [72-74,78]。リニアックなどによる外部照射で用いられる線量率 ($1-5 \text{ Gy min}^{-1}$) で生じることはないが、外部照射と比較し非常に低い線量率を用いる小線源治療ではしばしば観測されている。例えば、子宮頸がんや前立腺がんに対する LDR 線源の永久刺入による小線源治療では逆線量率効果が確認されている[73,78]。逆線量率効果は 1.3.2.2 目で示した HRS に起因す

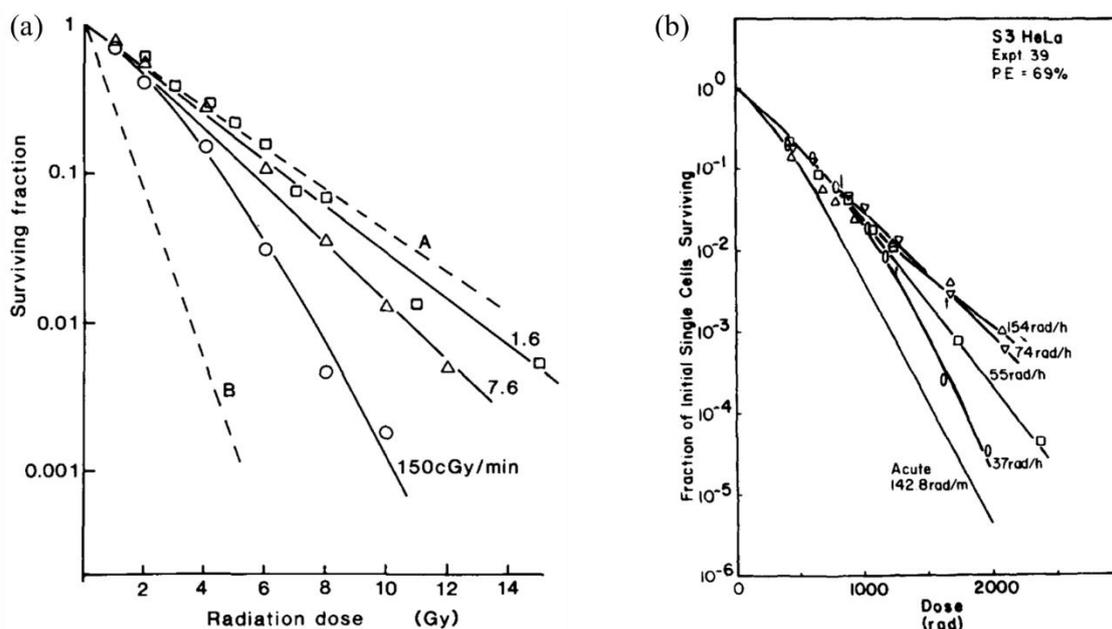


図 1.20 線量率に依存した細胞生存率曲線の変化。(a) ヒトメラノーマ細胞 HX118 に 1.5, 0.076, 0.016 Gy/min で照射したときの線量率効果がみられる生存率曲線 (Steel *et al.* 1987 より引用)。図内の A の曲線は完全な SLR 回復、B の曲線は一切の修復がない場合の生存率曲線を表す。(b) ヒト子宮頸がん細胞 HeLa を 1.54, 0.74, 0.55, 0.37 Gy/h で照射したときの逆線量率効果がみられる生存率曲線 (Hall and Brenner 1991 [72]より引用)

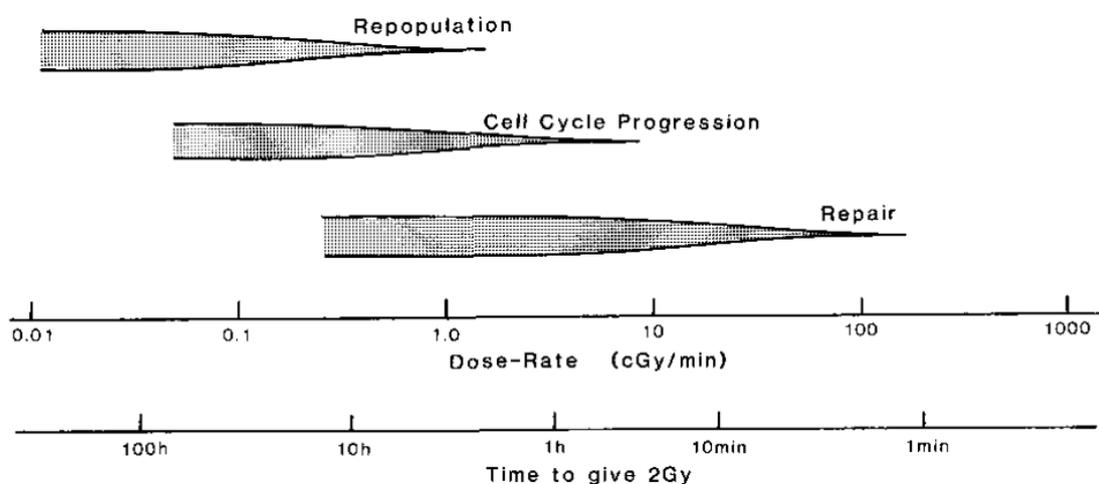


図 1.21 線量率 (照射時間) に依存し変化する細胞応答に大きく関与する因子 (Steel *et al.* 1986 [77]より引用)

と考えられている[73,78]。線量率が低すぎると ATM の活性化が阻害されるため G2/M チェックポイントが適切に作動せず、DNA に損傷を残した状態で M 期へ移行し分裂期崩壊に至ると考えられている。

1.3.5. 酸素効果

放射線の生物学的効果は細胞や組織が曝されている酸素濃度に依存する (図 1.22) [79]。酸素濃度に放射線感受性が依存することを酸素効果と呼び、照射中の酸素濃度が高いと放射線感受性は高くなる。酸素効果は照射中から照射後数ミリ秒以内の酸素濃度に依存することが知られている[80,81]。放射線治療においては抗腫瘍効果に関わる重要な因子である[82,83]。酸素濃度と放射線感受性の関係を表す尺度として酸素効果比 (oxygen enhancement ratio: OER) が用いられる。図 1.22 の OER は細胞生存率 10%をエンドポイントとして次式により定義されている。

$$OER(p_{O_2}) = \frac{D_{10}(p_{O_2})}{D_{10, Normox}} \quad (1.33)$$

$D_{10}(p_{O_2})$ は任意の酸素分圧 p_{O_2} 条件下で細胞生存率が 10%となる時の線量、 $D_{10, Normox}$ は通常酸素分圧 (大気中の酸素分圧 21%: normoxia) 条件下で細胞生存率が 10%となる時の線量である。高酸素分圧下における照射では低酸素分圧下と比較し低い線量で生存率が 10%となることから、常に $D_{10}(p_{O_2}) \geq D_{10, Normox}$ であるので $OER \geq 1$ である。OER は LET の増大に伴い低下し、酸素濃度が低い方が酸素効果は大きい (図 1.22) [79]。

酸素効果の原因として、長らく放射線照射後に生成されるペルオキシラジカル (ROO^{\bullet}) の影響が考えられてきた (図 1.23) [5,34,83–86]。DNA 分子内のデオキシリボースまたは塩基 (多くはピリミジン、特にチミン) (RH) は活性種の酸化作用により炭素中心ラジカル (R^{\bullet}) に変換される。 R^{\bullet} により DNA 複製阻害をもたらすアルキル化や DNA 鎖切断が誘発されることが知られている[87]。V79 細胞への照射における SSB や DSB の前駆体である R^{\bullet} の半減期は無酸素状態で < 5 ms であり、およそ 10–20 ms でほぼ修復されることが知られている[5,88,89]。 R^{\bullet} の一部は酸素濃度に依存し非常に短い時間ですぐさま酸素と反応し ROO^{\bullet} に変換される。 ROO^{\bullet} は R^{\bullet} よりも有害な損傷をもたらすことが知られている[87,90]。例えば、転位反応や不均化反応により多くの酸化損傷 (チミングリコールなど) を生成する[5,89]。また最近、塩基由来の ROO^{\bullet} が同一 DNA 鎖上にある近傍のヌクレオチド内の塩基またはデオキシリボース残基を酸化し、かつ反応の元となる塩基損傷が残存することで結果的に2つのヌクレオチドが近接して損傷された状態となる tandem lesion が注目されている[5,86]。多くの場合でピリミジン塩基 (特にチミン) の酸化で生成された ROO^{\bullet} (5,6-dihydropyrimidine peroxy radical) が 5'フランキング領域の塩基 (RH、特にグアニン) を酸化し、DNA 酸化損傷のマーカーとして利用される 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) が誘導される[5,86]。Tandem lesion はグリコシラーゼを介する塩基除去修復で除去しきれず、結果として DSB が蓄積する要因になると考えられている[5]。一方で、酸素濃度が低い場合には R^{\bullet} が酸素と反

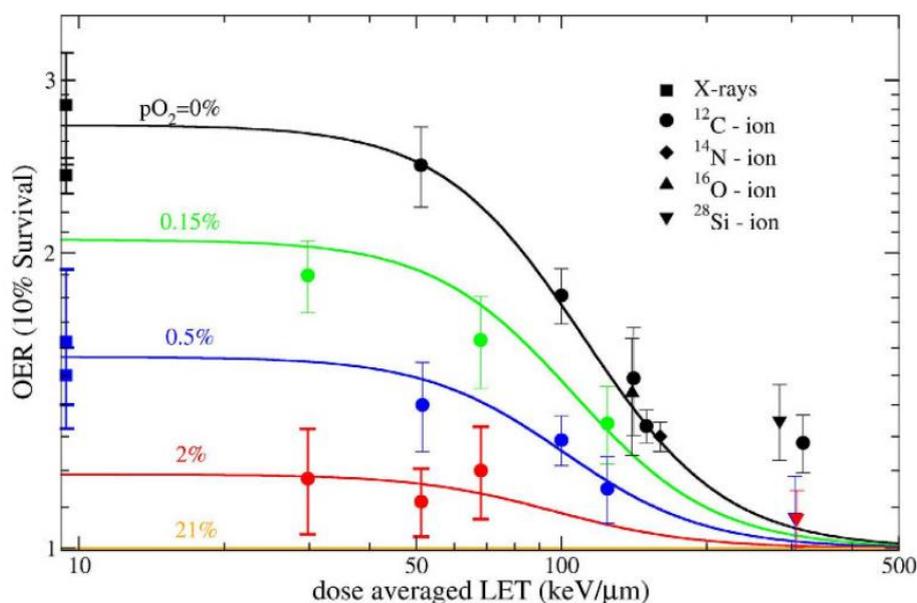


図 1.22 LET、酸素分圧、OER の関係 (Tinganelli *et al.* 2015 [79]より引用)

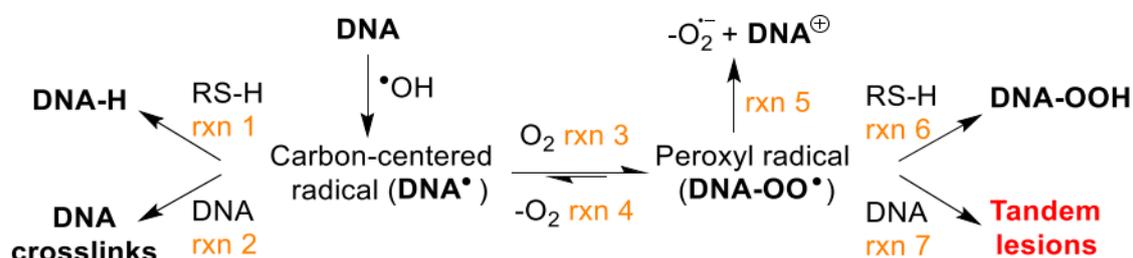


図 1.23 活性種による DNA 酸化経路 (Robert *et al.* 2023 [86]より引用)

応する前に抗酸化物質 (アスコルビン酸や α -トコフェロールのような水素供与体) により還元されることで正常な構造に戻る[5,34,83,85,86]。

1.3.6. 細胞膜の損傷とフェロトーシス

放射線照射時にはDNA損傷のみならず脂質やタンパク質などの種々の生体高分子が活性種による酸化損傷の対象となる。最近、鉄を介して連鎖的に細胞膜内のリン脂質に酸化損傷が誘導される、アポトーシスとは異なるRCDの1つであるフェロトーシス[91,92]が注目され、放射線による脂質過酸化にも焦点が当てられている[93]。細胞膜内のリン脂質 (RH; 本項では脂質をRで表記する) には酸化損傷の標的となる多価不飽和脂肪酸が含まれる。細

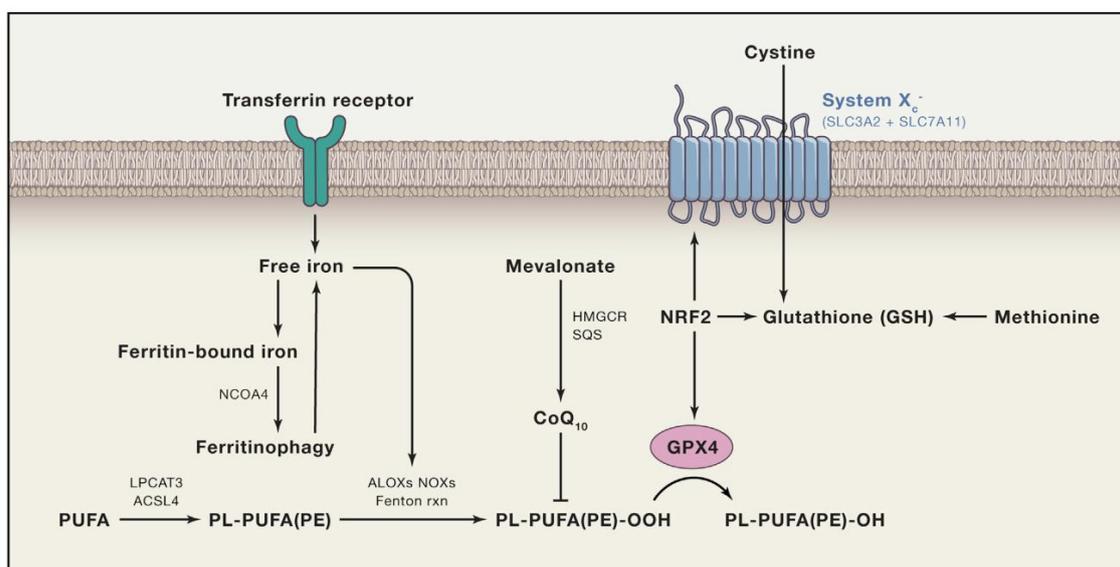


図 1.24 フェロトーシス制御経路 (Stockwell *et al.* 2017 [92]より引用)

胞内の鉄はリポキシゲナーゼ (LOX) の生成に用いられ、LOX は RH を酸化し炭素中心ラジカル (R^{\bullet}) を生成することで脂質過酸化を促進すると考えられている (図 1.24) [91–93]。 R^{\bullet} は周囲の O_2 と即座に反応し脂質ペルオキシラジカル (ROO^{\bullet}) に変換される。 ROO^{\bullet} は近接する RH から H を奪い新たな R^{\bullet} を生成し、自身は過酸化脂質 ($ROOH$) となる。生成された R^{\bullet} は同様に酸化され ROO^{\bullet} となり、さらに別の RH を酸化する。上記の連鎖的な酸化反応を経て細胞膜の損傷が蓄積し、フェロトーシスが誘導されると考えられている。このような連鎖的な脂質過酸化の伝播は放射線由来の活性種による R^{\bullet} の生成も関与すると考えられる。連鎖的な脂質過酸化の停止には還元型グルタチオン (GSH) などの還元剤が必要である。細胞内 GSH のレベルは細胞膜上のシスチン/グルタミン酸交換輸送体 (cystine-glutamate exchange transporter: system x_c^-) により調整される[91,92]。

放射線照射で誘導される脂質過酸化およびフェロトーシスに関する実験が種々のフェロトーシス阻害剤または誘発剤を用いてなされ、放射線の生物学的効果にフェロトーシスが部分的に関与していることが示されてきた[93]。例えば、脂質過酸化を介しフェロトーシスを誘導する RAS-selective lethal 3 (RSL3) を用いると、放射線照射によりヒト線維肉腫細胞 HT-1080 の生存率が RSL3 未使用細胞株に対し大きく低下することが示されている[94]。また脂質過酸化抑制を介したフェロトーシス阻害剤である ferrostatin-1 を用いると、HT-1080 [94]、ヒト大細胞肺癌細胞 H460、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549、ヒト非小細胞肺癌細胞 H1299 [95]において照射後の生存率が ferrostatin-1 未使用群に対し増加することが示されている。

1.3.7. 細胞死経路間のクロストーク

1.3.1 項では DDR の経路の 1 つとしてアポトーシス、1.3.6 項では脂質過酸化により誘発されるフェロトーシスについて述べたが、これらの異なる RCD は細胞死が誘導されるまでの経路を互いに部分的に共有する。例えば脂質過酸化はフェロトーシスのみならず二次的な DNA 損傷や先述のアポトーシスを誘発し、フェロトーシスは細胞膜の過酸化のみならず DNA 損傷の影響を受けることが示唆されている。まず前者については、上記の脂質過酸化の最終産物であり脂質過酸化マーカーとして利用されるヒドロキシノネナル (4-hydroxy-2-nonenal: HNE) が関与する。HNE の濃度が 10–60 μM であれば DNA 鎖切断や姉妹染色分体交換を誘導し[96]、 $>100 \mu\text{M}$ となると DNA とタンパク質の合成やミトコンドリアを介する細胞呼吸を阻害することが示されている[97]。また HNE は DNA と比較したたんぱく質と付加体を形成する確率が高いことが知られており、DNA 修復を担うたんぱく質が損傷を受けることで細胞毒性につながることを示唆されている[98,99]。さらに、HNE は抗アポトーシスタンパク質である B-cell lymphoma-extra large (Bcl-Xl) と myeloid cell leukemia 1 (Mcl-1) の発現を抑制し、一方でアポトーシスを誘導する Bcl-2 homologous antagonist/killer (Bak) の発現を促進することが示されている[100]。後者については、DDR においてアポトーシスの誘導に関わることが広く知られる p53 (1.1.3.1 目) が、system x_c^- を構成する solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) たんぱく質の発現を下方制御し、GSH の合成を抑制することでフェロトーシスを促進することが報告されている[101]。最近の研究では、DNA 損傷時に p53 を活性化させる ATM が SLC7A11 たんぱく質の発現を下方制御することも示されている[102,103]。なお ATM は p53 の発現とは独立してフェロトーシスを促進する[102]。さらに、オートファジーを誘導する beclin-1 (BECN1) はフェロトーシスを[104]、一方で上記のようにフェロトーシスやアポトーシスを誘導する HNE は c-Jun N-terminal kinase (JNK) を活性化することでオートファジーを誘導しうる[98]。細胞毒性を有するアルデヒドや細胞死に関わる特定のたんぱく質の影響は複数の形態の細胞死発現に及ぶ。Lang らの実験では、放射線により活性化された ATM が SLC7A11 の発現を抑制しフェロトーシスが誘導されることが示唆された[103]。放射線治療においては DNA 損傷が生物学的効果と関連付けられてきたが[11,13,105]、後述するように本研究の対象である FLASH 放射線治療 (FLASH-radiotherapy: FLASH-RT) では DNA 損傷のみで生物学的効果を説明できない可能性があり、脂質やたんぱく質の損傷の影響も示唆されている[8]。FLASH-RT のメカニズム解明には従来の DNA 損傷のみならず、他の細胞内構造の損傷に端を発するシグナル伝達経路の影響を考える必要があるように思われる。しかしながら、DNA を除く構造の影響の度合いは未知であるため、本研究では従来と同様に DNA 損傷に着目しモデリングを行っている。

1.4. FLASH 放射線治療

放射線治療では高エネルギーの荷電粒子または非荷電粒子を用いて腫瘍などの寛解を目指す根治照射と、腫瘍転移による疼痛などを和らげ患者の予後を良好にすることを目的と

した緩和照射がなされる[68,106]。本章の冒頭で述べたように、本研究では放射線治療のパラダイムシフトをもたらす可能性が示唆されている FLASH-RT に焦点を当てた。FLASH-RT では超高線量率 (ultra-high dose rate: UHDR (≥ 40 Gy/s)) を用いることで、従来線量率での治療 (CONV-RT) ($0.01-0.4$ Gy/s) と比較し正常組織の機能が温存され、一方で抗腫瘍効果が維持される可能性が示されている[5,6]。この効果は FLASH 効果と呼ばれ、Favaudon らの 2014 年の報告[4]を契機に現在に至るまでに種々の研究がなされてきた。UHDR を放射線治療に適用することの便益はつい最近になり見出されるようになったが、UHDR の研究は古いもので 1950 年代後半にまで遡って確認することができる[107,108]。本節では UHDR 照射について現在に至るまでに蓄積されてきた種々の知見について述べる。なお、UHDR を用いた実験は低 LET 放射線 (X 線、電子線、陽子線) を用いたものが大半を占めているため、断りがない場合は低 LET 放射線について述べていることに留意されたい。

1.4.1. 超高線量率照射の生物効果

世界初の UHDR を用いた実験は、1958 年に Kirby-Smith & Dolphin がムラサキツユクサの小孢子と花粉を低線量率 (≤ 0.01 Gy/s) から UHDR (4×10^6 Gy/s) にわたり複数の線量率で 15 MeV 電子線と X 線を照射した実験[107]といわれている[6]。この実験では、空気中で 0.1 Gy/s を上回る線量率で照射すると線量率の増大に伴い染色体異常が大きく抑制されることが示された。一方で無酸素状態では染色体異常数は線量率に依存せず、染色体異常数は空気中と比較し 32%程度減少することが確認された。これらの結果から Kirby-Smith & Dolphin は、空気中での照射でみられる染色体異常数の線量率に依存した変化について 2 つの仮説を立てた[107]。1 つは UHDR 照射後に二次的に生じる有機フリーラジカルの再結合、もう一つは急激な酸素消費により誘導される酸素枯渇であった。FLASH 照射による正常組織温存効果のメカニズムは現在も解明されていないが、これら 2 つの仮説は後述するように現在に至るまで温存効果のメカニズムに関する議論の中核を担ってきた。しかしながら、酸素枯渇仮説については最近否定的な見解が示されることが増えている[5,6,8,109,110]。翌年の 1959 年に Dewey & Boag は、低酸素濃度 (1%) 条件下でセラチア菌を UHDR ($5 \times 10^4 - 10^5$ Gy/s) 電子線で照射すると、無酸素状態で X 線を CONV 線量率 (0.17 Gy/s) で照射した場合と同等の細胞生存率が得られることを確認し、酸素枯渇が生存率上昇に関与することを提唱した[108]。その後 UHDR を用いた目立った報告がしばらく途絶えたが、1960 年代後半から 1970 年代後半にかけて主に哺乳類の細胞を用いた実験がなされた[111]。これらのうちのいくつかの報告では、10 Gy 程度までの線量では細胞生存率が線量率に依存せず、10 Gy を超えると UHDR を用いた場合に低線量率と比較し生存率が高くなるしきい線量がみられる hockey-stick 型の細胞生存率曲線を描くことが示された[112] (図 1.25)。一部の報告では通常酸素分圧条件 (normoxia) で hockey-stick 型生存率曲線が得られることが示されていたが[112,113]、異なる報告では normoxia では観測されず、むしろ酸素濃度が低くなるほど低線量で hockey-stick 型となるしきい線量を迎えることが示された[114-117]。また、hockey-

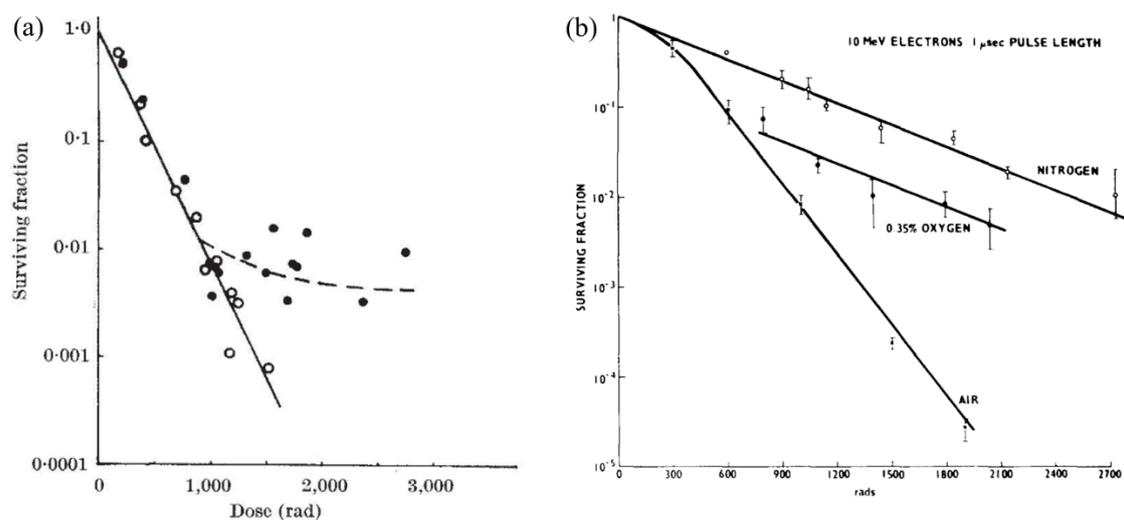


図 1.25 UHDR 照射による酸素枯渇に起因すると考えられる hockey-stick 型の生存率曲線。(a) 使用するパルス数の違いによる生存率の変化 (Town 1967 [112]より引用)。●と○はそれぞれパルス数が 1 と 2 の場合の細胞生存率を表す。1 パルスの平均線量率は 2 パルスの約 1929 倍である。(b) 酸素濃度の違いによる生存率の変化 (Nias *et al.* 1969 [114]より引用)。

stick 型生存率曲線ではある線量を超えると低酸素濃度 (hypoxia) における生存率曲線が無酸素状態 (anoxia) における曲線に平行になることから (図 1.25 (b))、極短時間で多数の放射線が入射する UHDR 照射では酸素が枯渇すると考えられた[114–119] (考えられるメカニズムは 1.4.2.1 目を参照)。また normoxia では 60–70 Gy がしきい線量になると見積もられており[108,119]、1990 年代になされた 2 つの実験では、normoxia と anoxia における照射では臨床に適用できる線量レベルでは UHDR と CONV の生存率に差がみられなかったことが報告されている[120,121]。最近の *in vitro* 実験では、normoxia と anoxia におけるヒト前立腺癌細胞 (DU145) の照射において UHDR と CONV 間で生存率に差が認められなかったが、hypoxia では酸素濃度が低いほど生存率の差が大きくなることが示された[122]。なお、この結果では ≥ 10 Gy であれば生存率の差に有意な差が見られるが、hockey-stick 型の生存率曲線は得られていない。一方で、ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 と MCF7、ヒト子宮頸がん細胞 HeLa への照射では、 < 10 Gy 照射でも生存率が有意に増加する結果が Adrian らにより報告されている[123]。1970–1980 年には、UHDR 照射は培養細胞を使用した *in vitro* 実験のみならず、マウスの皮膚障害に関する実験でも用いられていた[124–126]。UHDR を用いた最初の *in vivo* 実験は 1974 年の Field & Bewley によるラットを用いた実験といわれており[6,8]、CONV 照射で見られる皮膚における早期および晩期障害を誘発するために、UHDR 照射では CONV に対し 30–40% 高い線量が必要であったことが示されている[124]。そして、2014 年に Favaudon らによりマウスへの UHDR 照射が CONV 照射と比較し正常組織の有害事象

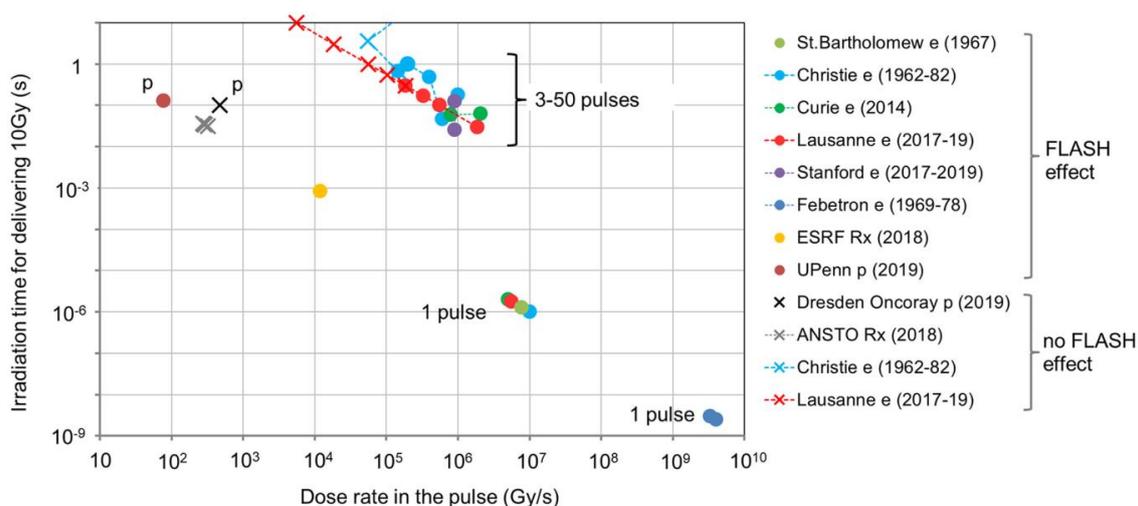


図 1.26 UHDR 照射において正常細胞/組織の温存がみられる条件。パルスあたりの線量率と 10 Gy 照射に要する時間を変数とし UHDR 温存効果が認められるおおよその条件が示されている (Montay-Gruel *et al.* 2021 [127]より引用)。

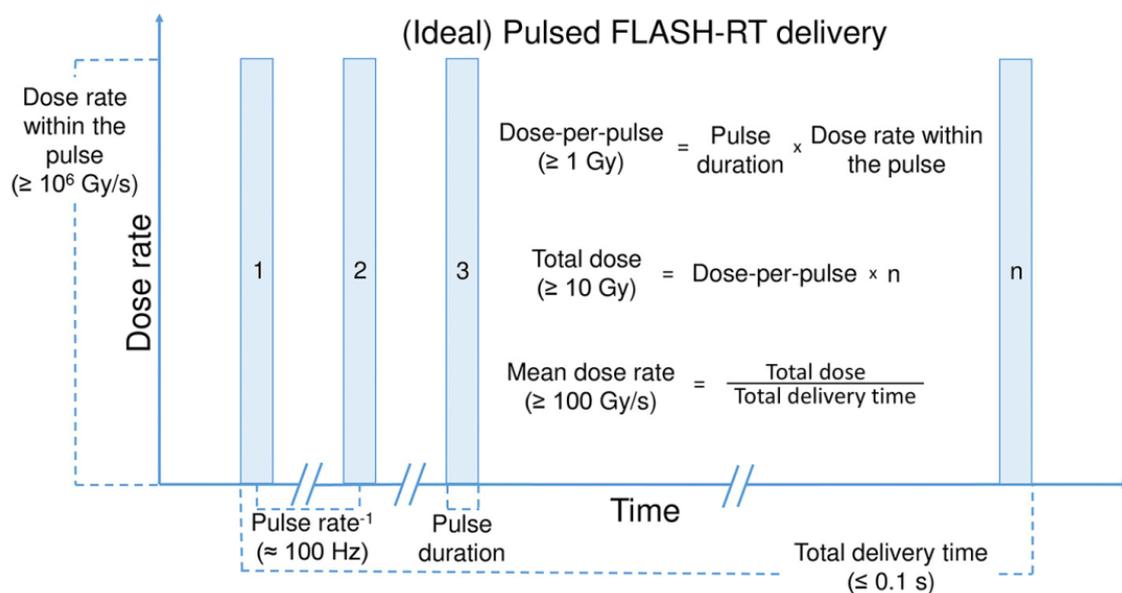


図 1.27 UHDR 照射における温存効果に関わる照射パルスのパラメータ (Wilson *et al.* 2020 [128]より引用)

の抑制および等価な抗腫瘍効果を示すことが報告され[4]、過去の UHDR 照射実験で見いだされなかった放射線治療への適用の可能性が注目され始めた[6,8]。Favaudon らは「FLASH」という言葉を用いて UHDR を表現し、現在も一般に FLASH により UHDR が表現される。FLASH 照射特有の正常組織と腫瘍組織に対する異なる効果 (FLASH 効果) について、種々の分野からのアプローチが継続されている。正常組織の温存効果については、例えばマウスの肺における線維症と皮膚障害の抑制[4]、ネコおよびブタへの照射における皮膚障害の低減[129]、消化器系障害の低減[130]、マウスの認知機能維持[127,131]などが報告されている。抗腫瘍効果については、肺がん同所性移植モデル[4]、扁平上皮癌[129]、転移性卵巣癌[130]、同所性線条体膠芽腫移植モデル[127]、ヒト咽頭がん異種移植モデル[132]、膝がん[133]などで、FLASH 照射と CONV 照射で同等の結果が得られることが示されている。また陽子線を用いた *in vivo* 実験では上記の結果[132,133]に対し、FLASH 照射で CONV 照射と比較し腫瘍の増殖が抑制されたことが報告されている[134,135]。

上記の種々の低 LET 放射線を用いた *in vitro*、*in vivo* 実験でみられる温存効果は ≥ 40 Gy/s の平均線量率のみならず、同時に高い 1 回線量 (≥ 10 Gy) を照射することが必要であることが示唆されている[8,118]。さらに、照射パルスのパラメータ (1 パルスあたりの線量率、1 回の照射が完了するまでの時間 (≤ 200 ms)) の重要性についても言及されている (図 1.26) [127,136,137]。パルス構造に関わるパラメータは図 1.27[128]に示すとおりである。FLASH 効果に必要な線量率として扱われている ≥ 40 Gy/s は使用する全てのパルスが繰り返されるまでの時間に対する、パルスが付与する全線量の比である平均線量率を表しているが、1 パルスあたりの線量率の重要性も上述のように示されている。

上記の *in vitro* 実験と *in vivo* 実験で蓄積されてきた結果には矛盾があることにも留意が必要である。*In vitro* では統計的に有意な差はないが平均値に着目すると正常細胞と腫瘍細胞の双方で少なくともわずかに UHDR 照射で CONV 照射と比較し生存率が増加することが示されている。一方で、*in vivo* 実験では先に述べたように正常組織と腫瘍組織で反応が異なる。正常細胞と正常組織間の反応については整合性が取れるが、腫瘍細胞と腫瘍組織の反応は矛盾している。1.3.2 項で述べたように放射線治療では *in vitro* と *in vivo* を関連付けて生物学的効果を定量化し活用する。現状で得られている結果からの判断ではあるが、従来のように *in vitro* 実験で得られる細胞生存率から治療効果を予測できない可能性がある。しかしながら、十分な実験データが蓄積されておらず統計的不確かさがかなり大きいため、より正確な傾向を解析するにはさらなる実験データの追加が必要である。

高 LET 放射線である炭素線を用いた *in vivo* 実験では、UHDR 照射後に CONV 照射後と比較し低 LET 放射線と同様の正常組織の温存が認められ、一方で骨肉腫の増殖と転移が抑制されることが示された[138]。一般に腫瘍組織への照射は図 1.28 (b)に示される拡大ブラッグ・ピーク (spread-out Bragg peak: SOBP) と呼ばれる、生物学的線量 (吸収線量に RBE を乗じた線量) が均一で高い領域が用いられる。SOBP は炭素線のエネルギーを変調しながら照射することで形成されるが、エネルギー変調に時間を要するため照射時間を FLASH 照射

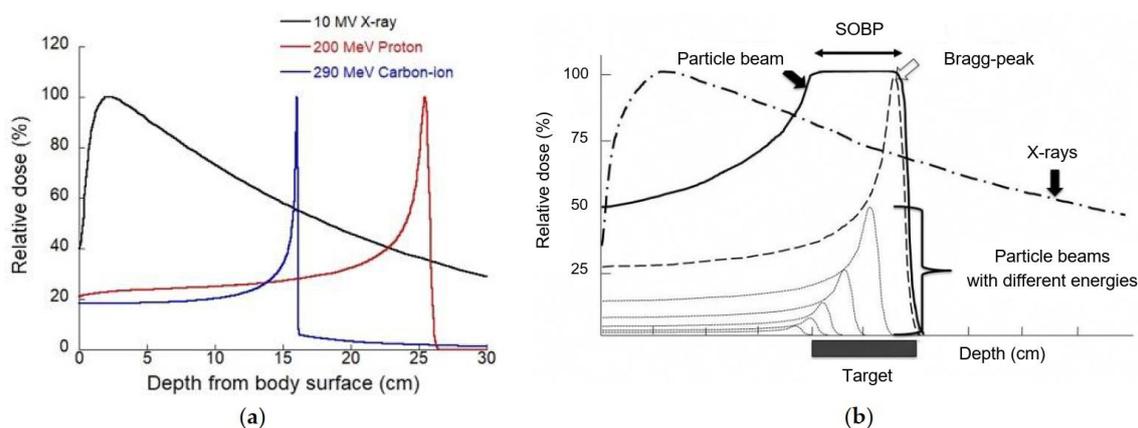


図 1.28 (a) 物質内の X 線、陽子線、炭素線の深部線量百分率。陽子線と炭素線ではエネルギーと粒子種に依存し特定の深さに顕著にエネルギーを付与する急峻なピーク（ブラッグ・ピーク）がみられる。(b) 腫瘍内の均一な線量分布を実現するための拡大ブラッグ・ピーク（spread-out Bragg peak: SOBP）（Matsumoto *et al.* 2021 [139]より引用）。

に対応させることが現段階ではできず、この実験を含め粒子線の FLASH 照射実験ではブラッグ・ピークに到達する前のプラトー領域が用いられている。

ヒトに FLASH-RT を施した例も報告されている。Bourhis らにより報告された皮膚リンパ腫患者への電子線を用いた FLASH-RT では、6 か月間の経過観察で CONV-RT に対し抗腫瘍効果が同等であり、正常組織の早期障害の程度が小さく治癒までの時間が短かったことが報告されている[140]。なお、この研究は 1 名の患者のみへの照射であるが、166 Gy/s の FLASH-RT（1 回線量 15 Gy の定位手術的照射）を施す以前に 0.08 Gy/s の CONV-RT（総線量 20 Gy を 10 回に分割した通常分割照射と総線量 21 Gy を 6 回に分割した寡分割照射）がなされており、これらの結果と比較されている。疼痛を伴う四肢への骨転移を有する患者に対する陽子線を用いた疼痛緩和を目的とした Mascia らによる第 I 相非無作為化試験では、中央値 4.8 か月の経過観察期間で正常組織温の存効果は認められず副作用は X 線を用いた CONV-RT と同等であり、疼痛緩和効果も CONV-RT と同等であることが示された[141]。

上記の従来からの報告では放射線照射後の早期障害に関する FLASH 効果の有無が確認されてきたが、晩期障害に関する報告もなされている。前述の Bourhis らのグループ（Gaide *et al.* 2022）[142] による同一患者に対する照射後 2 年間の経過観察では、急性障害と晩期障害の双方について FLASH-RT と CONV-RT の間で差がなく、腫瘍制御についても CONV-RT と同等の結果であることが報告された。また Vozenin らにより報告された前述のネコおよびブタへの照射実験[129]の照射後最大 18 か月までの経過観察では、同グループの Bley らにより FLASH-RT（30–31 Gy）で重篤な障害が認められたことが報告されている[143]。ネコへの照射については CONV-RT（総線量 48 Gy を 10 回に分割した寡分割照射）の結果も示され

ているが、FLASH-RT との BED の差が大きく比較はできない。多くの UHDR を用いた *in vivo* 実験では ≥ 17 Gy の高線量を 1 回で照射し早期障害に関する FLASH 効果を観測してきたが、Bley らにより晩発障害を考慮しより低い線量を用いた実験が必要であることが示された。FLASH-RT における CONV-RT に対する晩発障害に関する温存効果あるいは等価な効果と、等価な抗腫瘍効果が実現される適切な線量を見出すことが必要である。

1.4.2. UHDR 照射後の物理過程—化学過程

前項で示したように UHDR を用いると細胞や正常組織の機能が CONV 照射よりも保護されるが、詳細なメカニズムは明らかでない。本項では FLASH 効果のうち温存効果のメカニズムに関する仮説について述べる。UHDR 照射は 1.2.1 項で示した放射線分解の物理過程—化学過程における活性種の反応や拡散の動態を大きく変える可能性があり、温存効果に関する仮説は酸素や活性種の挙動に着目している。下記の酸素枯渇と活性種同士の反応に関する仮説は古くから提唱されてきたが[107]、いずれの仮説も根本的には UHDR 照射においてある時間内に生成される活性種の数に CONV 照射時と比較し過剰に増加することに帰着する。

1.4.2.1. 酸素枯渇

UHDR 照射で数百ミリ秒以下のごく短時間で多量の放射線が照射されることで放射線分解により多くの e_{aq}^- と H \cdot が生成され、酸素分子はこれらのラジカルと即座に反応することで消費される[5,20,108,144,145]。酸素濃度が低下することで OER (1.3.5 項) が小さくなると考えられた。*In vitro* 実験で示されてきた酸素濃度の変化に対する細胞生存率曲線の変化 (1.4.1 項) はこの仮説を裏付けると考えられていた[108,113,114,116,117,122]。しかしながら、最近では酸素枯渇を批判的に見る傾向が強い[5,6,8,109,110,119]。*In vivo* 実験では酸素が十分に供給される脳[127,131]や肺[4]で温存効果が認められている。通常酸素分圧 (normoxia) での *in vitro* 実験では、UHDR 照射後の生存率が CONV 照射後よりも上昇する腫瘍細胞が複数報告された[123]。複数の *in silico* モデルによるシミュレーションでは、酸素効果を低減させるほどの十分な酸素濃度の低下が予測されなかったと結論付けた報告が多い[89,146–152]。また、酸素濃度計を用いた計測もなされたが、水中[153]、*in vitro*[154]、*in vivo*[149,154]におけるいずれの測定実験においても十分な酸素分圧の低下が認められていない。*In vitro* 細胞株における酸素濃度計測では、UHDR よりも CONV 線量率の方がより大きく酸素濃度を低下させることが示された[154]。しかしながら、酸素濃度の計測実験については照射時間が ~ 74 ms であるのに対し検出器のサンプリング・レートが ~ 150 ms であることから、酸素濃度の変化を十分に捕捉できていない可能性がある点について留意が必要である[154]。

高 LET 放射線のブラッグ・ピークでは、UHDR 照射によりむしろ酸素濃度が増大することが想定されている[155,156]。このモデルでは高 LET 放射線の電離密度が非常に高いため水分子が多重電離され多価のカチオン水分子が生成されると仮定している[155]。特に二価

のカチオン水分子が形成され周囲の水分子と反応し ($\text{H}_2\text{O}^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_3\text{O}^+ + \text{O}(^3\text{P})$)、 $\text{O}(^3\text{P})$ の反応を介し酸素が形成されると考えられている (e.g., $2\text{O}(^3\text{P}) \rightarrow \text{O}_2$)。しかしながら、高 LET 放射線による UHDR 照射におけるブラッグ・ピークでの酸素分圧の測定や *in vitro/in vivo* 実験は未だなされていないので、今後 FLASH 線量率によるブラッグ・ピークの形成が可能となったら実測値との比較が必要である。

1.4.2.2. 活性種間の反応

UHDR 照射では時間的に高い密度で活性種が生成され、互いに反応することで有毒な活性種が弱毒化される。放射線照射後に二次的に生じる DNA などの生体高分子由来のラジカル ($\text{R}\cdot$ や $\text{ROO}\cdot$) が高い密度で生成されることで、これらのラジカル同士が反応し反応性の低い分子に置き換わることで新たな $\text{R}\cdot$ の生成が抑制され、結果的に染色体異常などが抑制されると考えられている。Labarbe らは均一な化学過程以降 ($\geq 1 \mu\text{s}$) の種々の活性種間の反応[144]、生体分子由来のラジカル間の反応、GSH などの抗酸化物質と活性種の反応など、種々の反応をシミュレーションモデルに組み込み、UHDR 照射では CONV 照射に対し $\text{ROO}\cdot$ の蓄積が抑制されることを予測した[89]。

生体高分子由来のラジカルのみならず、水分子由来の活性種の反応による弱毒化にも焦点が当てられている。水への UHDR 照射では CONV 照射よりも H_2O_2 [131,157,158] や $\cdot\text{OH}$ [20,21] の収率が低くなることが示されている。これらの UHDR 照射時の活性種の減少に飛跡間相互作用 (図 1.29) が関与すると考えられている[159–164]。UHDR 照射では照射開始から終了までの放射線の飛跡の空間的な分布は CONV の分布と同様であるが時間的な分布が密であり、物理化学過程では活性種がある時間内により高い密度で生成される。その後化学過程に移行し活性種が拡散し始めるが、UHDR 照射ではある飛跡から生成された活性種が近接する他の飛跡が生成した活性種と反応する確率が高くなると考えられる。結果的に、UHDR 照射ではより多くの活性種が DNA などに到達する前に消費され、間接作用 (1.2.2 項) が抑制される。

1.4.3. UHDR 照射後の DNA 損傷と細胞生存率

前項で述べたように UHDR 照射で活性種を介する間接作用が低減されることを踏まえれば、細胞生存率に大きく関わる DSB (1.3 節) の生成数も減少すると考えられる。ここでは種々の実験結果に基づいて正常細胞と腫瘍細胞における DSB 数や細胞生存率の違いについて述べる。

まず、正常細胞については報告間で実験結果のばらつきが大きく、また照射条件や計測までの時間のばらつきも大きい。現状では統一的な傾向を示すことは不可能と思われる。例えば、Fouillade らは正常ヒト肺線維芽細胞 (MRC-5 と IMR90) への 5.2 Gy の照射 (106 Gy/s) から 30 分後の DSB マーカー $\gamma\text{-H2AX}$ の数に差がなく、一方で別の DSB マーカー 53BP1 (1.3.1 項) が UHDR 照射で減少することを示した[165]。この結果に対し、Buonanno らは

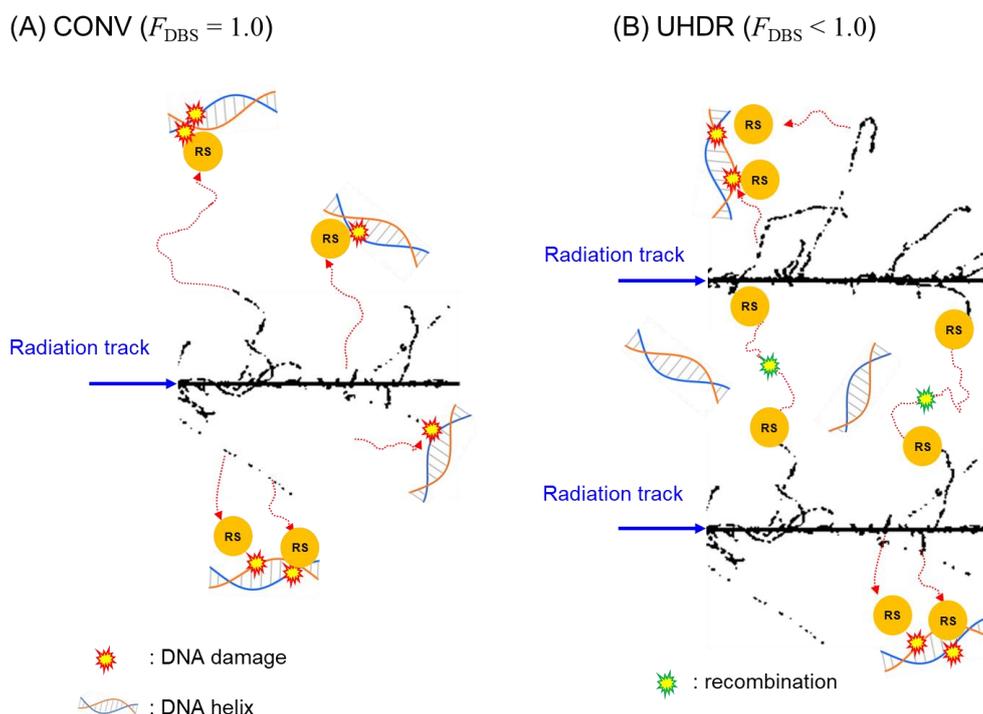


図 1.29 UHDR 照射による飛跡間相互作用の様子。(A)の CONV 照射と比較し(B)の UHDR 照射では非常に短い時間間隔で複数の入射粒子が通過することになるため、ある入射粒子由来の活性種が DNA などと反応する前に異なる飛跡から拡散してくる活性種と反応することで、間接作用が抑制される。

IMR90 を使用し、1,000 Gy/s で照射し 30 min 後の γ -H2AX 数を計測した場合に 0.05、100 Gy/s での照射と比較し、10 Gy 以下の照射でも γ -H2AX には線量率に依存する差がない一方で、20 Gy の照射では 1,000 Gy/s の場合のみ γ -H2AX の収率が大きく低下することを示した [166]。Fouillade らと Buonanno らの結果は、少なくとも分割線量を ≤ 5 Gy とすると IMR90 では温存効果が表れないことを示した。また、*in vivo* 実験では照射後長時間経過すると初期にみられた DSB 数の差が喪失する場合 [130] と維持される場合 [167] が報告されている。Levy らはマウスの空腸に移植した腸陰窩基底円柱 (crypt-based columnar: CBC) 細胞に 14 Gy を 216 Gy/s で照射すると、照射後 ~12 h までは γ -H2AX (1.3.1 項) が減少し、24 h 後にはいずれの線量率でも γ -H2AX 数がほぼ 0 となったことを報告している [130]。一方で、Dokic らは *in vivo* でマウスの脳へ 10 Gy を 120 Gy/s で照射すると照射後 1 h および 7 日時点で有意に γ -H2AX が UHDR 照射により減少することを示した [167]。線量率と DSB の関係のみに焦点を当てると、これらの結果からは CONV と比較し UHDR では DSB 数が減少する傾向があるといえる。また、Guo らは DSB 数に着目していないが、15 Gy を 100 Gy/s で IMR90 に照射

すると CONV (0.33 Gy/s) と比較し、照射後 4h ではアポトーシスが誘導されやすく、ネクローシスが誘導されにくいことを示した[168]。UHDR 照射で DSB 生成が抑制され RCD のための経路を利用する余地が残されているのかもしれない。一方で、24h 後にはアポトーシスに関連するサイトクロム C などのたんぱく質発現量が UHDR 照射後の方が高いものの、アポトーシスとネクローシスの差は消失している。

腫瘍細胞については UHDR と CONV 線量率の間の DSB 数の差を示す報告はなされていないようである。上記の Levy らと Fouillade らの正常細胞への照射と同じ条件で実験が行われたマウス卵巣癌細胞 ID8 (Levy *et al.* [130]) とヒト肺腺癌細胞 A549 (Fouillade *et al.* [165]) では γ -H2AX および 53BP1 の差は見られない。また Adrian らによるヒト扁平上皮癌細胞 LU-HNSCC4、ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231、ヒト子宮頸がん細胞 HeLa への 3 Gy の照射ではいずれの細胞でも 53BP1 数に差がない[123]。Adrian らの結果については、同種の細胞の生存率が求められているが、3 Gy では生存率に有意な差がないものの線量の増大に伴い差が大きくなることが示されていることから、さらに高い線量を用いることで DSB 数に差が表れるかもしれない。これらの報告で示された UHDR と CONV 間の DSB 数の維持は *in vivo* 実験でみられる抗腫瘍効果の温存に矛盾しないが、1.4.2 項に示した活性種の減少と細胞生存率の傾向とは矛盾する。腫瘍細胞と正常細胞の応答の違いについて、Spitz らは腫瘍細胞特有の細胞内環境が関係する可能性を指摘している[145]。腫瘍細胞は細胞内の活性種濃度が高く、一方で GSH などを用いた抗酸化システムを高度に発展させている[145,169–173]。詳細は不明であるが、これらの特徴で調整される細胞特有の酸化還元（レドックス）バランスにより間接作用の程度が調整され DSB 数に差がみられないのかもしれない。また、腫瘍細胞の活性種濃度上昇と抗酸化システム阻害に対する感受性が著しく高く、少し活性種濃度が上昇すると細胞死を発動させるしきい濃度に到達すると仮定すると[169–173]、組織レベルで見られる抗腫瘍効果の維持は UHDR 照射と CONV 照射がいずれも活性種濃度をしきい濃度にまで増加させることに起因するかもしれない。

上記のように実験条件や結果のばらつきが大きく、また *in vitro* と *in vivo* 双方において温存効果が表れると考えられる 10 Gy よりも高い線量に対する DSB マーカーのデータが不足しているため、現状では細胞レベルの DSB 数と組織レベルの FLASH 効果の関連付けは難しいと思われる。照射後長時間 (24h) 経過後に修復されず残存する residual DSB の数が細胞生存率に相関する[17]という報告もあることから、より厳密な関連付けには照射終了直後から計測までの時間などがある程度統一させる必要がある。また Adrian らは、*in vitro* 実験では実験手順の違いにより、同じ細胞を同じ照射条件で照射しても UHDR 照射による細胞生存率温存の有無が変わることを実験データから示しており、実験手順の統一化も必要である[119]。また、現状では先に述べたような限られた実験データのばらつきや傾向に基づき、FLASH 効果が DSB の生成や修復に依存しない可能性を視野に入れ、ミトコンドリアや細胞骨格を形成する脂質やたんぱく質など、DNA 以外の構造における損傷の重要性を提唱している論文もある[8]。FLASH 効果のメカニズム解明には従来のように DSB との関連付

けを図れるか実験データを蓄積し検証しながら、種々の総説論文で取り上げられているように細胞/組織レベルでの UHDR と CONV 線量率による影響の差を考える必要がある。

1.4.4. 脂質過酸化の影響

1.3.6 項で述べた膜脂質の過酸化は部分的に FLASH 効果に関わると認識されている[5,6,8,145,174,175]。Froidevaux らは細胞膜の代わりにフォスファチジルコリン含有リポソームとリノレン酸含有ミセルを照射し、UHDR 照射では脂質過酸化の最終産物の 1 つであるマロンジアルデヒド (malondialdehyde: MDA) の生成が抑制されることを示した[175]。

1.5. FLASH 効果解明のためのシミュレーションモデル

FLASH 効果のメカニズム解明のために様々なシミュレーションモデルが開発されてきた。放射線のランダムな挙動を解析するための代表的な手法はモンテカルロシミュレーションであり、治療計画装置や放射線生物学の研究など、様々な用途に応用されてきた。本節ではモンテカルロシミュレーションを取り入れた種々の枠組みと、モンテカルロシミュレーションを含まない理論モデルについて述べる。

1.5.1. 飛跡構造解析のためのモンテカルロシミュレーション

放射線に対するモンテカルロシミュレーションでは入射放射線や二次粒子、またこれらの粒子が引き起こす放射線分解により生じる活性種の飛跡を予測することができ(図 1.6)、FLASH 効果の解明に大きな役割を果たすと考えられる。特に活性種の挙動が大きく関わると考えられる UHDR 照射後の細胞や正常組織の温存効果を理解するため、種々のモンテカルロシミュレーションコード (PARTRACK [160]、TOPAS-nBio [161,163,164,176]、IONLYS-IRT [155,162]、gMicroMC [151]、NASIC [148,152]、Geant4-DNA [177,178]、TRAX-CHEM [150]) が用いられてきた。これらのモンテカルロシミュレーションコードでは、まず物理過程における電離・励起の情報を基に物理化学モデルを用いて物理化学過程終了時点における初期の活性種の G 値 (1.1.3.2 目) を計算する。化学過程ではこれらの活性種が拡散し他の活性種や酸素と反応し新たな分子が生み出されるが、このような活性種の挙動を模擬するために 2 つの手法が用いられる。1 つは step-by-step (SBS) 法と呼ばれ、各活性種の飛跡を細かく模擬するが長い時間を要する。もう一方は independent reaction time (IRT) 法と呼ばれ、活性種の飛跡を逐一模擬しないため計算時間を大幅に削減することができる。IRT 法を用いて照射開始から長い時間 (~10 ms) が経過するまでの化学過程のシミュレーションもなされているが[161]、温存効果において重要な役割を果たす活性種の挙動の詳細を追跡できないため、SBS 法の計算時間を短縮させ化学過程をより長い時間スケールでシミュレーションすることが必要である。また、分子動力学 (molecular dynamics: MD) シミュレーションを併用したモデルも構築されている[177,178]。

温存効果に関するモンテカルロシミュレーションでは TOD (1.4.2.1 目)[148,150–152,177]、

飛跡間相互作用[160–164]、炭素中心ラジカル $R\cdot$ の再結合[176]、複数の活性種が形成する低反応性複合体による DNA 分子の保護[177]、飛跡近傍の励起分子から活性種への熱エネルギー移行による活性種の拡散距離の増大[178]を仮定したシミュレーションがなされている。なお、TOD を想定したシミュレーションでは、1.4.2.1 目で述べたように酸素効果が低減されるほどの酸素濃度の低下は予測されず、TOD の温存効果への寄与は示したものは少ない。

飛跡間相互作用は 1.4.2.2 目で述べたように時間的・空間的に近接する飛跡から拡散してくる活性種同士が反応し弱毒化されることを仮定している。シミュレーションでは、 $\cdot OH$ や e_{aq}^- のような特に反応性の高い活性種が反応性の低い水分子や水素分子などに変換される反応の増加により温存効果が誘導されることを想定している。シミュレーションでは線量率の増加に伴い $\cdot OH$ の収率が実験[20,21]と同様に減少することが予測されている[160–164]。しかしながら、実験[131,157,158]において H_2O_2 の収率が線量率の増加に従い低下することが示されているのに対し、シミュレーションでは逆の傾向を示していることが多い[160,162,163]。従来のシミュレーションでは H_2O_2 が主に $\cdot OH$ 同士の反応 ($\cdot OH + \cdot OH \rightarrow H_2O_2$) で生成されることを想定していたが、Baikalov らは UHDR 照射では反応元の $\cdot OH$ を消費する別の反応 ($\cdot OH + e_{aq}^- \rightarrow OH^-$) が飛跡間相互作用により増強されることで H_2O_2 の収率が減少することを提唱した[164]。また、上記のシミュレーションを含め従来のシミュレーションは媒質を水とすることが基本であったが、Baikalov らは特定の活性種 ($\cdot OH, e_{aq}^-, H\cdot, H_2O_2$) に半減期を設けることで媒質は水であるが細胞内の粘性が高い (飛程が短縮される) 環境を模擬し、SBS 法を用いて飛跡間相互作用の影響をシミュレーションした[164]。酸素濃度 4% の水への UHDR 照射では線量率増大に伴う $\cdot OH$ と e_{aq}^- の収率の低下が予測されたが、細胞内模擬環境下でのシミュレーションでは臨床で到底使用できない 58 Gy を照射してもこれらの収率の差が表れていない。一方で Baikalov らは、MD シミュレーションで示された活性種への熱エネルギーの移行が生じれば活性種の飛程が延長され[178]、細胞内の粘性の高い空間内でも飛跡間相互作用が生じやすくなる可能性を指摘している[164]。

MD シミュレーションを用いると分子の幾何学構造や電気双極子モーメント、分子間のエネルギーのやり取りなどの分子の統計学的性質の解析を介し物理化学–化学過程における活性種を含む分子の挙動を予測できる。Abolfath らは、UHDR 照射では励起分子も高密に生成され、フォノン場を介し CONV 照射よりも多くの熱エネルギーが活性種へ移行すると仮定し、結果的に活性種の飛程が延長されることを示唆した[178]。活性種の飛程が延長されることで飛跡間相互作用が増強される。前述の細胞内の高粘性環境における飛跡間相互作用を肯定するモデルである[164]。また、Abolfath らは DNA 分子周囲における活性種の分子動力学的な挙動を分析し報告している[177]。この報告では、高い密度で生成された $\cdot OH$ などの活性種が DNA 分子周囲に極性引力、水素結合、磁気双極子–双極子相互作用を介し集積することで反応性の低い構造を構築し、DNA 分子の酸化が抑制されることが示唆された。これらのモデルが実際にどれほどの程度で活性種の挙動に影響をもたらすかは未知である。飛程に着目すれば全く逆の作用をもたらすが、いずれのモデルも間接作用を低減するよう

に作用する。FLASH 効果のメカニズム解明には上記のような分子の挙動を考慮することも必要である。

1.5.2. モンテカルロシミュレーションを伴わない理論モデル

理論モデルでは TOD、飛跡間相互作用、R^{*}間の再結合、循環リンパ細胞の温存を仮定したモデルが構築されている。これらのモデルは基本的に LET をパラメータとして含まず低 LET を前提として構築されているが、一部のモデルは LET をパラメータとして組み込んでいる[164,179]。

酸素枯渇 (TOD) については多くの理論モデルが構築されてきた[89,146,147,149,179–186]。しかしながら、ここまで述べてきたように *in vitro*、*in vivo* 実験、酸素濃度測定実験、モンテカルロシミュレーションではほぼ否定的な結果が導かれ、同様に理論モデルでも十分な酸素枯渇を予測しなかったものが多い[89,146,147,149,186]。一方で、Taylor らは組織内の不均一な酸素濃度分布[187]に着目し、TOD が FLASH 温存効果に寄与しうることを示唆した[183]。このモデルではランダムに配置された酸素を十分に含む毛細血管を中心とし、20 Gy を 50 Gy/s で照射した際の酸素の消費、拡散、代謝がシミュレーションされた。結果として、正常組織への照射を前提とした場合には FLASH 照射では CONV 照射と比較し局所的に低酸素または無酸素状態となる領域が顕著に増大することが推測されている。一方で、実測が可能なレベルの巨視的な範囲内の平均酸素分圧の減少は前述の通り酸素効果の低減には不十分であることが予測されている。UHDR 照射では局所的な低酸素・無酸素状態の領域が CONV 照射に対し広く分布することにより、より多くの幹細胞が生存し組織を温存しているのかもしれない[183]。一方で、腫瘍組織はすでに低酸素状態である領域が広く分布し、UHDR 照射後も正常組織のように低酸素・無酸素状態の局所領域が増加しないため、抗腫瘍効果が CONV 照射と同等になると考えられている[183]。

Labarbe らは均一な化学過程以降 ($\geq 1 \mu\text{s}$) の種々の反応に対する反応速度定数を基に活性種[144]、GSH などの抗酸化物質、R^{*}および ROO^{*}の動態を求め、ROO^{*}の動態が描く曲線の area under the curve (AUC) より、線量率の増大に伴い ROO^{*}の総生成量が減少することを示した[89]。また、酸素濃度の動態からは酸素の減少量が線量率によらずほぼ同等であることが示され、酸素効果の低減がもたらされるほどの酸素濃度の低下は予測されていない。

Baikalov らはモンテカルロシミュレーションコードの開発 (1.5.1 項) のみならず、飛跡間相互作用と細胞内環境を考慮した理論モデルを構築した[164]。活性種の収率に十分な影響を与えるために必要な線量について、生理学的酸素濃度 (4%) の水への照射では 0.5 μs のパルスあたり $> 13 \text{ Gy}$ の線量を推算した。一方で活性種に半減期を設け細胞内環境を模擬した場合には $> 90 \text{ Gy}$ の線量を予測した。後者は臨床には適用できないレベルの線量であるが、先に述べたように活性種の飛程が熱エネルギーの流入により延長されれば、細胞内でもより低い線量で飛跡間事象が誘導される可能性がある[164]。

1.6. 本研究の目的

CONV-RT と比較し、正常組織の機能を温存する一方で抗腫瘍効果が維持される FLASH-RT は、がん治療における革新的技術として期待されている。FLASH-RT の臨床試験では UHDR 照射のヒトへの適用について安全性が示され[141]、温存効果の有無に依らずいずれ新たな治療法として台頭する可能性を十分に秘めている。放射線治療を施す前には治療計画装置を用いたシミュレーションが必要であり、温存効果を見越した FLASH-RT に特化したアルゴリズムの開発が必要になると考えられる。

LQ モデルは実験データを基に細胞生存率曲線を再現することは可能であるが、線量率などの照射パラメータの変化に対する DNA 損傷の動態や細胞応答の変化などを理論的に考慮することができず、照射条件や細胞周囲の酸素濃度などに応じて実験データを基に細胞生存率を求めなければならない。一方で、Hawkins により開発された microdosimetric-kinetic (MK) モデルは照射中および照射後の DNA 損傷数の動態に着目した理論モデルである [28,188–190]。MK モデルを発展させた integrated MK (IMK) モデルでは、酸素による化学過程における DNA 酸化損傷の修飾をモデルに組み込むことで、酸素濃度の違いによる生存率の変化が再現された[191]。UHDR 照射では化学過程における飛跡間相互作用を介する活性種濃度の低下などによる DSB 数の減少が見込まれる。本研究では UHDR と CONV 線量率間の DSB 数の差が化学過程に起因すると仮定し、UHDR 照射後の細胞生存率を予測するモデルを開発することにより、FLASH 照射における細胞応答の解明および治療計画システムの開発を目指した。

参考文献

1. Jaksic A., Nikolov J., Palma A. Special issue: applications of radiation in science and technology. *Eur Phys J Spec Top.* 2023;232:1459–63.
2. Joiner M.C., van der Kogel A.J., Steel G. Introduction: The significance of radiobiology and radiotherapy for cancer treatment. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiotherapy.* 5th ed. New York: CRC press; 2018. p. 1–8.
3. Burmester J.W., Joiner M.C. Physics of radiation therapy for the radiobiologist. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiobiology.* 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 61–80.
4. Favaudon V., Caplier L., Monceau V., Pouzoulet F., Sayarath M., Fouillade C., et al. Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Sci Transl Med.* 2014;6:245ra93.
5. Favaudon V., Labarbe R., Limori C.L. Model studies of the role of oxygen in the FLASH effect. *Med Phys.* 2022;49:2068–81.
6. Friedl A.A., Prise K.M., Butterworth K.T., Montay-Gruel P., Favaudon V. Radiobiology of the FLASH effect. *Med Phys.* 2022;49:1993–2013.

7. Lin B., Huang D., Gao F., Yang Y., Wu D., Zhang Y., et al. Mechanisms of FLASH effect. *Front Oncol.* 2022;12:995612.
8. Limoli C.L., Vozenin M.-C. Reinventing Radiobiology in the Light of FLASH Radiotherapy. *Annu Rev Cancer Biol.* 2023;7:1–23.
9. Joiner M.C., Bentzen S.M. Fractionation: The linear-quadratic approach. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiotherapy*. 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 99–124.
10. Hall E.J., Giaccia A.J. Dose-Response Relationships for Model Normal Tissues. In: Hall E.J., Giaccia A.J., editors. *Radiobiology for the Radiologist*. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018. p. 327–50.
11. Vens C., Koritzinsky M., Wouters B.G. Irradiation-induced damage and the DNA damage response. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiobiology*. 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 9–20.
12. Joiner M.C. Quantifying cell kill and cell survival. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiobiology*. 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 32–43.
13. Hall E.J., Giaccia A.J. Molecular mechanisms of DNA and chromosome damage and repair. In: Hall E.J., Giaccia A.J., editors. *Radiobiology for the Radiologist*. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018. p. 11–34.
14. Oliver P L. The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res.* 1998;150 (Suppl.):S42–51.
15. Ballarini F, Altieri S, Bortolussi S, Carante M, Gieroletti E, Protti N. The BIANCA model/code of radiation-induced cell death: application to human cells exposed to different radiation types. *Radiat Environ Biophys.* 2014;53:525–33.
16. Carante M P, Altieri S, Bortolussi S, Postuma I, Protti N, Ballarini F. Modeling radiation-induced cell death: role of different levels of DNA damage clustering. *Radiat Environ Biophys.* 2015;54:305–16.
17. Matsuya Y., McMahon S.J., Butterworth K.T., Yachi Y., Saga R., Sato T., et al. Modelling oxygen effects on the in- and out-of-field radiosensitivity of cells exposed to intensity-modulated radiation fields. *Phys Med Biol.* 2023;68:095008.
18. Fulford J., Nikjoo H., Goodhead D.T., O'Neill P. Yields of SSB and DSB induced in DNA by Al K ultrasoft X-rays and α -particles: comparison of experimental and simulated yields. *Int J Radiat Biol.* 2009;77:1053–66.
19. Hall E.J., Giaccia A.J. Physics and Chemistry of Radiation Absorption. In: Hall E.J., Giaccia A.J., editors. *Radiobiology for the Radiologist*. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018. p. 1–10.
20. Kusumoto T., Kitamura H., Hojo S., Konishi T., Kodaira S. Significant changes in

- yields of 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid produced under FLASH radiotherapy conditions. *RSC Adv.* 2020;10:38709–14.
21. Kusumoto T., Inaniwa T., Mizushima K., Sato S., Hojo S., Kitamura H., et al. Radiation chemical yields of 7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid for proton- and carbon-ion beams at ultra-high dose rates: Potential roles in FLASH effects. *Radiat Res.* 2022;198:255–62.
 22. Kumar V., Dangi V. Electromagnetic spectrum and its impact on human life. *Int J All Res Educ Sci Methods.* 2023;4:67–72.
 23. INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS. Fundamental quantities and units for ionizing radiation (Revised). ICRU report 85. 2011.
 24. Guan F., Peeler C. Analysis of the track- and dose-averaged LET and LET spectra in proton therapy using the Geant4 Monte Carlo code. *Med Phys.* 2015;42:3264–6247.
 25. Rossi H.H., Zaider M. Introduction. In: Rossi H H, Zaider M, editors. *Microdosimetry and Its Applications.* Berlin, Heidelberg: Springer; 1996. p. 1–13.
 26. Bianchi A., Selva A., Colautti P., Bortot D., Mazzuccuoni D., Pola A., et al. Microdosimetry with a sealed mini-TEPC and a silicon telescope at a clinical proton SOBPs of CATANA. *Radiat Phys Chem.* 2020;171:108730.
 27. Baratto-Roldán A., Bertolet A., Baiocco G., Carabe A., Cortés-Giraldo M.A. Microdosimetry and dose-averaged LET calculations of protons in liquid water: a novel Geant4-DNA application. *Front Phys.* 2021;9:726787.
 28. Hawkins R.B. A statistical theory of cell killing by radiation of varying linear energy transfer. *Radiat Res.* 1994;140:366–74.
 29. Matsuya Y., McMahon S.J., Tsutsumi K., Sasaki K., Okuyama G., Yoshii Y., et al. Investigation of dose-rate effects and cell-cycle distribution under protracted exposure to ionizing radiation for various dose-rates. *Sci Rep.* 2018;8:8287.
 30. Azzam E.I., Jay-Gerin J.-P., Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* 2012;327:48–60.
 31. Caër S.L. Influence of oxide surfaces on H₂ production under ionizing radiation. *Water (Basel).* 2011;3:232–53.
 32. Muroya Y., Plante I., Azzam E.I., Meesungnoen J., Katsumura Y., Jay-Gerin J.-P. High-LET ion radiolysis of water: Visualization of the formation and evolution of ion tracks and relevance to the radiation-induced bystander effect. *Radiat Res.* 2006;165:485–91.
 33. Fulford J., Nikjoo H., Goodhead T., O'Neill P. Yields of SSB and DSB induced in DNA by AlK ultrasoft X-rays and α -particles: comparison of experimental and simulated yields.

Int J Radiat Biol. 2001;77:1053–66.

34. Wang H., Jiang H., Van de Gucht M., Ridder M.D. Hypoxic radioresistance: Can ROS be the key to overcome it? *Cancers (Basel)*. 2019;11:112.

35. Thompson L.H. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutat Res*. 2012;751:158–246.

36. Harper J.W., Elledge S.J. The DNA damage response: Ten years after. *Mol Cell*. 2007;28:739–45.

37. Bedford J.S., Dewey W.C. Historical and current highlights in radiation biology: has anything important been learned by irradiating cells? *Radiat Res*. 2002;158:251–91.

38. Valerie K., Povirk L.F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*. 2003;22:5792–812.

39. Spoerri L., Oo Z.Y., Larsen J.E., Haass N. Cell Cycle Checkpoint and DNA Damage Response Defects as Anticancer Targets: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. In: Wondrak G.T., editor. *Stress Response Pathways in Cancer: From Molecular Targets to Novel Therapeutics*. Dordrecht: Springer Science+Business Media; 2014. p. 29–49.

40. Black H.E., Mills K.T. The DNA damage repair response. *lin Oncol*. 2020;3:1–14.

41. Marples B., Wouters B.G., Collis S.J., Chalmers A.J., Joiner M.C. Low-dose hyper-radiosensitivity: A consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation-induced damage in G2-phase cells. *Radiat Res*. 2004;161:247–55.

42. Wouters B.G., Giaccia A.J., Denko N.C., Brown J.M. Loss of p21 Waf1/Cip1 sensitizes tumors to radiation by an apoptosis independent mechanism. *Cancer Res*. 1997;57:4703–6.

43. Vélez-Cruz R., Johnson D.G. The retinoblastoma (RB) tumor suppressor: Pushing back against genome instability on multiple fronts. *Mol Sci*. 2017;18:1776.

44. McVey M., Lee S.E. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet*. 2008;24:529–38.

45. Al-Zain A.M., Symington L.S. The dark side of homology-directed repair. *DNA Repair (Amst)*. 2021;106:103181.

46. Blasiak J. Single-strand annealing in cancer. *Mol Sci*. 2021;22:2167.

47. Soom A.V., Vandaele L., Goossens K., Heras S., Wydooghe E., Rahman M.B., et al. Epigenetics and the periconception environment in ruminants. *P Belg Roy Acad Med*. 2013;2:1–23.

48. Sharma S., Javadekar S.M., Pandey M., Srivastava M., Kumari R., Raghavan S.C. Homology and enzymatic requirements of microhomology-dependent alternative end

- joining. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1697.
49. Jiang Y. Contribution of microhomology to genome instability: Connection between DNA repair and replication stress. *Mol Sci.* 2022;23:12937.
50. Woulters B.G. Cell death after irradiation: How, when and why cells die. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiobiology*. 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 21–31.
51. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:385–92.
52. Garcia-Barros M., Paris F., Cordon-Cardo C., Lyden D., Rafii S., Haimovitz-Friedman A., et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* (1979). 2003;300:1155–9.
53. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239–57.
54. Hall E.J., Giaccia A.J. Cell survival curves. In: Hall E.J., Giaccia A.J., editors. *Radiobiology for the Radiologist*. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018. p. 35–53.
55. Kim W., Lee S., Seo D., Kim D., Kim K., Kim E., et al. Cellular stress responses in radiotherapy. *Cells.* 2019;8:1105.
56. Puck T.T., Marcus P.I. Action of X-rays on mammalian cells. *J Exp Med.* 1956;103:653–66.
57. Joiner M.C., Marples B., Lambin P., Short S.C., Turesson I. Low-dose hypersensitivity: Current status and possible mechanisms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;49:379–89.
58. Astrahan M. Some implications of linear-quadratic-linear radiation dose-response with regard to hypofractionation. *Med Phys.* 2008;35:4161–72.
59. Joiner M.C., Denekamp J., Maughan R.L. The use of “top-up” experiments to investigate the effect of very small doses per fraction in mouse skin. *Int J Radiat Biol.* 1986;49:565–80.
60. Marples B., Joiner M.C. The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses: Evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiat Res.* 1993;133:41–51.
61. Fernandez-Palomo C., Seymour C., Mothersill C. Inter-relationship between low-dose hyper-radiosensitivity and radiation-induced bystander effects in the human T98G glioma and the epithelial HaCaT cell line. *Radiat Res.* 2016;185:124–33.
62. Lyng F.M., Seymour C., Mothersill C. Initiation of apoptosis in cells exposed to medium from the progeny of irradiated cells: a possible mechanism for bystander-induced genomic instability? *Radiat Res.* 2002;157:365–70.

63. Hamada N., Matsumoto H., Takamitsu H., Kobayashi Y. Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects. *J Radiat Res.* 2007;48:87–95.
64. Bentzen S.M., Joiner M.C. The linear-quadratic approach in clinical practice. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiobiology*. 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 112–24.
65. Zips D. Tumor growth and response to radiation. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiobiology*. 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 81–98.
66. Bentzen S.M. Radiation dose-response relationships. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiobiology*. 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 44–53.
67. Thames H.D., Wither H.R., Peters L.J. Changes in early and late radiation responses with altered dose fractionation: implications for dose-survival relationships. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1982;8:219–26.
68. Baumann M., Krause M., Grégoire V. Modified fractionation. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiotherapy*. 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 125–35.
69. Bentzen S.M., Dörr W., Gahbauer R., Howell R.W., Joiner M.C., Jones B.J., et al. Bioeffect modeling and equieffective dose concepts in radiation oncology. *Radiother Oncol.* 2012;105:266–8.
70. Withers H.R., Thames Jr H.D., Peters L.J. A new isoeffect curve for change in dose per fraction. *Radiother Oncol.* 1983;1:187–91.
71. Steel G.G., Deacon J.M., Horwich A., Kelland L.R., Peacock J.H. The dose-rate effect in human tumor cells. *Radiother Oncol.* 1987;9:299–310.
72. Hall E.J., Brenner D.J. The dose-rate effect revisited: Radiobiology considerations of importance in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1991;21:1403–14.
73. van der Kogel A.J., Joiner M.C. The dose-rate effect. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiobiology*. 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 143–51.
74. Hall E.J., Giaccia A.J. Fractionated radiation and the dose-rate effect. In: Hall E.J., Giaccia A.J., editors. *Radiobiology for the Radiologist*. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018. p. 67–81.
75. INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS. Dose and Volume Specification for Reporting Intracavitary Therapy in Gynecology. ICRU report 38. Bethesda, USA; 1985.
76. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Design and Implementation Of A Radiotherapy Programme: Clinical, Medical Physics, Radiation Protection and Safety Aspects. IAEA-TECDOC-1257. Vienna, Austria; 2001.

77. Steel G.G., Down J.D., Peacock J.H., Stephens T.C. Dose-rate effects and the repair of radiation damage. *Radiother Oncol.* 1986;5:321–31.
78. Leonard B.E., Lucas A.C. LDR brachytherapy — can low dose rate hypersensitivity from the “inverse” dose rate effect cause excessive cell killing to peripheral connective tissues and organs? *BritJRadiol.* 2009;82:131–9.
79. Tinganelli W., Durante M., Hirayama R., Krämer M., Maier A., Kraft-Weyrather W., et al. Kill-painting of hypoxic tumours in charged particle therapy. *Sci Rep.* 2015;5:17016.
80. Watts M.E., Maughan R.L., Michael B.D. Fast kinetics of the oxygen effect in irradiated mammalian cells. *Int J Radiat Biol.* 1978;33:195–9.
81. Michael R., Horsman J., Brown M., Albert J., van der Kogel A.J., Wouters B.W., et al. The oxygen effect and therapeutic approaches to tumour hypoxia. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiotherapy*. 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 188–205.
82. Horsman M.H., Brown J.M., van der Kogel A.J., Wouters B.G., Overgaard J. The oxygen effect and therapeutic approaches to tumor hypoxia. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiobiology*. 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 188–205.
83. Hall E.J., Giaccia A.J. Oxygen effect and reoxygenation. In: Hall E.J., Giaccia A.J., editors. *Radiobiology for the Radiologist*. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018. p. 82–100.
84. von Sonntag C. Protection, sensitization and the oxygen effect. In: von Sonntag C., editor. *The chemical basis of radiation biology*. Oxford: Taylor & Francis; 1987. p. 295–352.
85. Brown J.W., Wilson W.R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer.* 2004;25:4066–74.
86. Robert G., Wagner R., Cadet J. Oxidatively generated tandem DNA modifications by pyrimidinyl and 2-deoxyreboysl peroxy radicals. *Free Radical Biol Med.* 2023;196:22–36.
87. Augusto O. Alkylation and cleavage of DNA by carbon-centered radical metabolites. *Free Radical Biol Med.* 1993;15:329–36.
88. Michael B.D., Davies S., Held K.D. Ultrafast chemical repair of DNA single and double strand break precursors in irradiated V79 cells. *Basic Life Sci.* 1986;38:89–100.
89. Labarbe R, Hotoiu L, Barbier J, Favaudon V. A physicochemical model of reaction kinetics supports peroxy radical recombination as the main determinant of the FLASH effect. *Radiother Oncol.* 2020;153:303–10.
90. Simic M.G., Bergtold D.S., Karam L.R. Generation of oxyradicals in biosystems.

Mutat Res. 1989;214:3–12.

91. Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., Skouta R., Zaitsev E.M., Gleason C.E., et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012;149:1060–72.
92. Stockwell B.R., Angeli J.P.F., Bayir H., Bush A.I., Conrad M., Dixon S.J., et al. Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell*. 2017;171:273–85.
93. Lei G., Mao C., Yan Y., Zhuang L., Gan B. Ferroptosis, radiotherapy, and combination therapeutic strategies. *Protein Cell*. 2021;12:836–57.
94. Ye L.F., Chaudhary K.R., Zandkarimi F., Harken A.D., Kinslow C.J., Upadhyayula P.S., et al. Radiation-induced lipid peroxidation triggers ferroptosis and synergizes with ferroptosis inducers. *ACA Chem Biol*. 2020;15:469–84.
95. Lei G., Zhang Y., Koppula P., Liu X., Zhang J., Lin S.H., et al. The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression. *Cell Res*. 2020;30:146–62.
96. Singh S.P., Chen T., Chen L., Mei N., McLain E., Samokyszyn V., et al. Mutagenic effects of 4-hydroxynonenal triacetate, a chemically protected form of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal, as assayed in L5178Y/Tk^{+/-} mouse lymphoma cells. *Pharmacol Exp Ther*. 2005;313:855–61.
97. Schaur R.J. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Asp Med*. 2003;24:149–59.
98. Csala M., Kardon T., Legeza B., Lizák B., Mandl J., Margittai É., et al. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2015;1852:826–38.
99. Feng Z., Hu W., Tang M.S. Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:8598–5602.
100. Bodur C., Kutuk O., Tezil T., Basaga H. Inactivation of Bcl-2 through IκB kinase (IKK)-dependent phosphorylation mediates apoptosis upon exposure to 4-hydroxynonenal (HNE). *J Cell Physiol*. 2012;227:3556–65.
101. Jiang L., Kon N., Li T., Wang S.-J., Su T., Hibshoosh H., et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*. 2015;520:57–62.
102. Chen P.-H., Wu J., Ding C.-K. C., Lin C.-C., Pan S., Bossa N., et al. Kinome screen of ferroptosis reveals a novel role of ATM in regulating iron metabolism. *Cell Death Differ*. 2019;27:1008–22.
103. Lang X., Green M.D., Wang W., Yu J., Choi J.E., Jiang L., et al. Radiotherapy and

- immunotherapy promote tumoral lipid oxidation and ferroptosis via synergistic repression of SLC7A11. *Cancer Discov.* 2019;9:1673–85.
104. Kang R., Zhu S., Zeh H.J., Klionsky D.J., Tang D. BECN1 is a new driver of ferroptosis. *Autophagy.* 2018;14:2173–5.
105. Munro T.R. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of the Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res.* 1970;42:451–70.
106. Burmeister J.W., Joiner M.C. Physics of radiation therapy for the radiobiologist. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiobiology.* 5th ed. New York: CRC Press; 2018. p. 61–80.
107. Kirby-Smith J.S., Dolphin G.W. Chromosome breakage at high radiation dose-rates. *Nature.* 1958;182:270–1.
108. Dewey D.L., Boag J.W. Modification of the oxygen effect when bacteria are given large pulses of radiation. *Nature.* 1959;183:1450–1.
109. Lin B, Huang D, Gao F, Yang Y, Wu D, Zhang Y, et al. Mechanisms of FLASH effect. *Front Oncol.* 2022;12:995612.
110. Bogaerts E, Macaeva E, Isebaert S, Haustermans K. Potential molecular mechanisms behind the ultra-high dose rate “FLASH” effect. *Int J Mol Sci.* 2022;23:12109.
111. Wilson P., Jones B., Yokoi T., Hill M., Vojnovic B. Revisiting the ultra-high dose rate effect: implications for charged particle radiotherapy using protons and light ions. *Brit J Radiol.* 2012;85:e933–9.
112. Town C D. Effect of high dose rates on survival of mammalian cells. *Nature.* 1967;215:847–8.
113. Berry R J, Hall E J, Forster D W, Storr T H, Goodman M J. Survival of mammalian cells exposed to X rays at ultra-high dose-rates. *Br J Radiol.* 1969;42:102–7.
114. Nias A H W, Swallow A J, Keene J P, Hodgson B W. Effects of pulses of radiation on the survival of mammalian cells. *Br J Radiol.* 1969;42:553.
115. Nias A.H.W. Survival of HeLa cells from 10 nanosecond pulses of electrons. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1970;17:595–8.
116. Berry R J, Stedeford J B H. Reproductive survival of mammalian cells after irradiation at ultra-high dose-rates: further observations and their importance for radiotherapy. *Br J Radiol.* 1972;445:171–7.
117. Epp E.R., Weiss H., Djordjevic B., Santomaso A. The radiosensitivity of cultured mammalian cells exposed to single high intensity pulses of electrons in various concentrations of oxygen. *Radiat Res.* 1972;52:324–32.
118. Vozenin M -C, Hendry J H, Limoli C L. Biological benefits of ultra-high dose rate

- FLASH radiotherapy: sleeping beauty awoken. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2019;31:407–15.
119. Adrian G, Ruan J-L, Paillas S, Cooper C R, Petersson K. In vitro assays for investigating the FLASH effect. *Expert Rev Mol Med*. 2022;24:e10.
120. Zackrisson B.U., Nyström U.H., Ostvergh P. Biological response In vitro to pulsed high dose rate electrons from a clinical accelerator. *Acta Oncol*. 1991;30:747–51.
121. Cygler J., Klassen N.V., Ross C.K., Bichay T.J., Raaphorst G.P. The survival of aerobic and anoxic human glioma and melanoma cells after irradiation at ultrahigh and clinical dose rates. *Radiat Res*. 1994;140:79–84.
122. Adrian G, Konradsson E, Lempart M, Bäck S, Ceberg C, Petersson K. The FLASH effect depends on oxygen concentration. *Br J Radiol*. 2019;93:20190702.
123. Adrian G, Konradsson E, Beyer S, Wittrup A, Butterworth K T, McMahon S J. Cancer cells can exhibit a sparing FLASH effect at low doses under normoxic in vitro conditions. *Front Oncol*. 2021;11:686142.
124. Field S.B., Bewley D.K. Effects of dose-rate on the radiation response of rat skin. *Int J Radiat Biol*. 1974;26:259–67.
125. Inada T., Nishio H., Amino S., Abe K., Saito K. High dose-rate dependence of early skin reaction in mouse. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1980;38:139–45.
126. Hendry J.H., Moore J.V., Hodgson B.W., Keene J.P. The constant low oxygen concentration in all the target cells for mouse tail radionecrosis. *Radiat Res*. 1982;92:172–81.
127. Montay-Gruel P, Acharya MM, Jorge PC, Petit B, Petridis IG, Fuchs P, et al. Hypofractionated FLASH-RT as an effective treatment against glioblastoma that reduces neurocognitive side effects in mice. *Clin Cancer Res*. 2021;27:775–84.
128. Wilson JD, Hammond EM, Higgins GS, Petersson K. Ultra-high dose rate (FLASH) radiotherapy: Silver bullet or fool's gold? *Front Oncol*. 2020;9:1563.
129. Vozenin MC, Fornel PD, Petersson K, Favaudon V, Jaccard M, Germond JF, et al. The Advantage of FLASH Radiotherapy Confirmed in Mini-pig and Cat-cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2019;25:35–42.
130. Levy K, Natarajan S, Wang J, Chow S, Eggold JT, Loo PE, et al. Abdominal FLASH irradiation reduces radiation-induced gastrointestinal toxicity for the treatment of ovarian cancer in mice. *Sci Rep*. 2020;10:21600.
131. Montay-Gruel P, Acharya MM, Petersson K, Alikhani L, Yakkala C, Allen BD, et al. Long-term neurocognitive benefits of FLASH radiotherapy driven by reduced reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;166:10943–51.
132. Zlobinskaya O, Siebenwirth C, Greubel C, Hable V, Hertenberger R, Humble N et

- al. The Effects of Ultra-High Dose Rate Proton Irradiation on Growth Delay in the Treatment of Human Tumor Xenografts in Nude Mice. *Radiat Res.* 2014;181:177–83.
133. Kim M M, Verginadis I I, Goia D, Haertter A, Shoniyozov K, Zou W et al. Comparison of FLASH proton entrance and the spread-out Bragg peak dose regions in the sparing of mouse intestinal crypts and in a pancreatic tumor model. *Cancers (Basel)*. 2021;13:4244.
134. Rama N, Saha T, Shukla S, Goda C, Milewski D, Mascia AE, et al. Improved tumor control through T-cell infiltration modulated by ultra-high dose rate proton FLASH using a clinical pencil beam scanning proton system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2019;105:S164–5.
135. Shukla S, Saha T, Rama N, Acharya A, Le T, Bian F et al. Ultra-high dose-rate proton FLASH improves tumor control. *Radiother Oncol.* 2023;186:109741.
136. Bourhis J, Montay-Gruel P, PG Jorge, Bailat C, Petit B, Ollivier J, et al. Clinical translation of FLASH radiotherapy: Why and how? *Radiother Oncol.* 2019;139:11–7.
137. Schulte R., Johnstone C., Boucher S., Esarey E., Geddes C.G.R., Kravchenko M., et al. Transformative technology for FLASH radiation therapy. *Appl Sci.* 2023;13:5021.
138. Tinganelli W, Weber U, Purspitasari A, Simoniello P, Abdollahi A, Oppermann J, et al. FLASH with carbon ions: Tumor control, normal tissue sparing, and distal metastasis in a mouse osteosarcoma model. *Radiother Oncol.* 2022;175:185–90.
139. Matsumoto Y., Fukumitsu N., Ishikawa H., Nakai K., Sakurai H. A critical review of radiation therapy: From particle beam therapy (proton, carbon, and BNCT) to beyond. *J Pers Med.* 2021;11:825.
140. Bourhis J., Sozzi W.J., Jorge P.G., Gaide O., Bailat C., Duclos F., et al. Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy. *Radiother Oncol.* 2019;139:18–22.
141. Mascia A E, Daugherty E C, Zhang Y, Lee E, Xiao Z, Sertorio M, et al. Proton FLASH radiotherapy for the treatment of symptomatic bone metastases. The FAST-01 Nonrandomized Trial. *JAMA Oncol.* 2023;9:1–8.
142. Gaide O, Herrera F, Sozzi W J, Jorge P G, Kinj R, Bailat C, et al. Comparison of ultra-high versus conventional dose rate radiotherapy in a patient with cutaneous lymphoma. *Radiother Oncol.* 2022;174:87–91.
143. Bley C R, Wolf F, Jorge P G, Grilj V, Petridis I, Petit B, et al. Dose and volume limiting late toxicity of FLASH radiotherapy in cats with squamous cell carcinoma of the nasal planum and in minipigs. *Clin Cancer Res.* 2022;28:3814–23.
144. Buxton GV, Greenstock CL, Helman WP, Ross AB. Critical Review of Rate Constants for Reactions of Hydrated Electrons, Hydrogen Atoms and Hydroxyl Radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}$) in Aqueous Solution. *J Phys Chem Ref Data.* 1988;17:513–886.

145. Spitz DR, Buettner GR, Petronek MS, St-Aubin JJ, Flynn RT, Waldron TJ, et al. An integrated physico-chemical approach for explaining the differential impact of FLASH versus conventional dose rate irradiation on cancer and normal tissue responses. *Radiother Oncol.* 2019;139:23–7.
146. Prax G, Kapp DS. A computational model of radiolytic oxygen depletion during FLASH irradiation and its effect on the oxygen enhancement ratio. *Phys Med Biol.* 2020;65:109501.
147. Petersson K, Adrian G, Butterworth K, McMahon SJ. A quantitative analysis of the role of oxygen tension in FLASH radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2020;107:539–47.
148. Hu A, Qiu R, Wu Z, Zhang H, Li J. CPU-GPU coupling independent reaction times method in NASIC and application in water radiolysis by FLASH irradiation. *Biomed Phys Eng Express.* 2022;8:025015.
149. Jia M, Cao X, Pogue B W, Peng H. A mechanistic consideration of oxygen enhancement ratio, oxygen transport and their relevancies for normal tissue sparing under FLASH irradiation. *Holistic Integrity Oncology.* 2022;1:13.
150. Boscolo D, Schfoni E, Durante M, Krämer M, Fuss MC. May oxygen depletion explain the FLASH effect? A chemical track structure analysis. *Radiother Oncol.* 2021;162:68–75.
151. Lai Y, Jia X, Chi Y. Modeling the effect of oxygen on the chemical on the chemical stage of water radiolysis using GPU-based microscopic Monte Carlo simulations, with an application in FLASH radiotherapy. *Phys Med Biol.* 2021;66:025004.
152. Zhu H, Li J, Deng X, Qiu R, Wu Z, Zhang H. Modeling of cellular response after FLASH irradiation: A quantitative analysis based on the radiolytic oxygen depletion hypothesis. *Phys Med Biol.* 2021;66:185009.
153. Jansen J, Knoll J, Beyreuther E, Pawelke J, Skuza R, Hanley R, et al. Does FLASH deplete oxygen? Experimental evaluation for photons, protons, and carbon ions. *Med Phys.* 2021;48:3982–90.
154. Cao X, Zhang R, Esipova TV, Allu SR, Ashraf R, Rahman M, et al. Quantification of oxygen depletion during FLASH irradiation in vitro and in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2021;111:240–8.
155. Zakaria A M, Colangelo N W, Meesunguen J, Azzam E, Plourde M-E, Jay-Gerin J-P. Ultra-high dose-rate, pulsed (FLASH) radiotherapy with carbon ions: Generation of early, transient, highly oxygenated conditions in the tumor environment. *Radiat Res.* 2020;194:578–93.
156. Weber U A, Scifoni E, Durante M. FLASH radiotherapy with carbon ion beams. *Med*

Phys. 2022;49:1974–92.

157. Kacem H, Psoroulas S, Boivin G, Folkerts M, Grilj V, Lomax T et al. Comparing radiolytic production of H₂O₂ and development of Zebrafish embryos after ultra high dose rate exposure with electron and transmission proton beams. *Radiother Oncol.* 2022;175:197–202.

158. Blain G, Vandenborre J, Villoing D, Fiegel V, Fois GR, Haddad F, et al. Proton irradiations at ultra-high dose Rate vs. Conventional Dose Rate: Strong Impact on Hydrogen Peroxide Yield. *Radiat Res.* 2022;198:318–24.

159. Anderson A.R., Hart E.J. Radiation chemistry of water with pulsed high intensity electron beams. *J Phys Chem.* 1962;66:70–5.

160. Kreipl MS, Friedland W, Paretzke HG. Interaction of ion tracks in spatial and temporal proximity. *Radiat Environ Biophys.* 2009;48:349–59.

161. Ramos-Méndez J, Domínguez-Kondo N, Schuemann J, McNamara A, Moreno-Barbosa E, Faddegon B. LET-dependent intertrack yields in proton irradiation at ultra-high dose rates relevant for FLASH therapy. *Radiat Res.* 2020;194:351–62.

162. Alanazi A, Meesungnoen J, Jay-Gerin JP. A computer modeling study of water radiolysis at high dose rates. relevance to flash radiotherapy. *Radiat Res.* 2021;195:149–62.

163. Derksen L, Flatten V, Engenhardt-Cabillic R, Zink K, Baumann K-S. A method to implement inter-track interactions in Monte Carlo simulations with TOPAS-nBio and their influence on simulated radical yields following water radiolysis. *Phys Med Biol.* 2023;68:135017.

164. Baikalov A, Abolfath R, Schüler E, Mohan R, Wilkens J J, Bartzsch S. Intertrack interaction at ultra-high dose rates and its role in the FLASH effect. *Front Phys.* 2023;11:1215422.

165. Fouillade C, Curras-Alonso S, Giuranno L, Quelennec E, Heinrich S, Bonnet-Boissinot S, et al. FLASH irradiation spares lung progenitor cells and limits the incidence of radio-induced senescence. *Clin Cancer Res.* 2020;26:1497–506.

166. Buonanno M, Grilj V, Brenner D J. Biological effects in normal cells exposed to FLASH dose rate protons. *Radiother Oncol.* 2019;139:51–5.

167. Dokic I, Meister S, Bokceviski J, Tessonnier T, Walsh D, Knoll M, et al. Neuroprotective effects of ultra-high dose rate FLASH Bragg peak proton irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2022;113:614–23.

168. Guo Z, Buonanno M, Harken A, Zhou G, Hei T K. Mitochondrial damage response and fate of normal cells exposed to FLASH irradiation with proton. *Radiat Res.* 2022;197:269–582.

169. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8:579–91.
170. Lennicke C, Rahn J, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B. Hydrogen peroxide - Production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal. Cell Commun Signal.* 2015;13:39.
171. Perillo B, Donato MD, Pezone A, Zazzo ED, Giovannelli P, Galasso G, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med.* 2020;52:192–203.
172. Salnikow K. Role of iron in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2021;76:189–94.
173. Cheung EC, Vousden KH. The role of ROS in tumour development and progression. *Nat Rev Cancer. Nat Res.* 2022;22:280–97.
174. Vilaplana-Lopera N, Abu-Halawa A, Walker E, Kim J, Moon EJ. Ferroptosis, a key to unravel the enigma of the FLASH effect? *Br J Radiol.* 2022;95:2022085.
175. Froidevaux P, Grilj V, Bailat C, Geyer WR, Bochud F, Vozenin MC. FLASH irradiation does not induce lipid peroxidation in lipids micelles and liposomes. *Radiat Phys Chem.* 2023;205:110733.
176. Espinosa-Rodriguez A, Sanchez-Parcerisa D, Ibáñez P, Vera-Sánchez J A, Mazal A, Fraile L M, et al. Radical production with pulsed beams: understanding the transition to FLASH. *Mol Sci.* 2022;23:13484.
177. Abolfath R, Grosshans D, Mohan R. Oxygen depletion in FLASH ultra-high-dose-rate radiotherapy: A molecular dynamics simulation. *Med Phys.* 2020;47:6551–61.
178. Abolfath R, Baikalov A, Bartzsch S, Afshordi N, Mohan R. The effect of non-ionizing excitations on the diffusion of ion species and inter-track correlations in FLASH ultra-high dose rate radiotherapy. *Phys Med Biol.* 2022;67:105005.
179. Song H, Kim Y, Sung W. Modeling of the FLASH effect for ion beam radiation therapy. *Phys Med.* 2023;108:102553.
180. Zhou S, Zheng D, Fan Q, Yan Y, Wang S, Lei Y, et al. Minimum dose rate estimation for pulsed FLASH radiotherapy: A dimensional analysis. *Med Phys.* 2020;47:3243–9.
181. Rothwell BC, Kirkby NF, Merchant MJ, Chadwick AL, Lowe M, Mackay RI, et al. Determining the parameter space for effective oxygen depletion for FLASH radiation therapy. *Phys Med Biol.* 2021;66:055020.
182. Cui S, Prax G. 3D computational model of oxygen depletion kinetics in brain vasculature during FLASH RT and its implications for in vivo oximetry experiments. *Med Phys.* 2021;49:3914–25.
183. Taylor E, Hill RP, Létourneau D. Modeling the impact of spatial oxygen heterogeneity on radiolytic oxygen depletion during FLASH radiotherapy. *Phys Med Biol.* 2022;67:115017.

184. Liew H, Mein S, Tessonnier T, Abdollahi A, Debus J, Dokic I, et al. Do we preserve tumor control probability (TCP) in FLASH radiotherapy? A model-based analysis. *Mol Sci.* 2023;24:5118.
185. Khan S, Bassenne M, Wang J, Manjappa R, Melemenidis S, Breitzkreutz D Y, et al. Multicellular spheroids as in vitro models of oxygen depletion during FLASH irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2021;110:833–44.
186. Hu A, Qiu R, Wu Z, Li WB, Li J. A computational model for oxygen depletion hypothesis in FLASH effect. *Radiat Res.* 2022;2022:135–83.
187. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: A review1. *Cancer Res.* 1989;49:6449–65.
188. Hawkins R B. A microdosimetric-kinetic theory of the dependence of the RBE for cell death on LET. *Med Phys.* 1998;25:1157–70.
189. Hawkins R B, Inaniwa T. A microdosimetric-kinetic model for cell killing by protracted continuous irradiation including dependence on LET I: repair in cultured mammalian cells. *Radiat Res.* 2013;180:584–94.
190. Hawkins R.B. Biophysical models, microdosimetry and the linear quadratic survival relation. *Ther Oncol.* 2017;1:1013.
191. Matsuya Y, Sato T, Nakamura R, Naijo S, Date H. A theoretical cell-killing model to evaluate oxygen enhancement ratios at DNA damage and cell survival endpoints in radiation therapy. *Phys Med Biol.* 2020;65:095006.

第2章 細胞応答予測モデルの概要

2.1. DNA 損傷に関するレート方程式

本研究では、細胞応答を予測可能な数学モデルである IMK モデル[1-3]に基づき、UHDR 照射時の細胞生存率を予測する新たなモデルを構築した。IMK モデルでは、細胞死のような後発の放射線影響を決定する重要な標的である DNA の損傷、特に DSB の動態が考慮されている。このモデルでは、細胞核を数百個の局所領域 (ドメイン) に分割し、放射線により付与されるエネルギーをドメイン毎に評価する。そして、付与エネルギーに依存して発生するドメイン毎の DSB 数の修復動体を基に、数学的に細胞生存率を表現する。本研究で利用した IMK モデルにおける仮定は、以下の通りである。

- (a) DNA が含まれる細胞核は数百のドメインに分割される。ドメインは経験的に全て直径 $0.5-1.0 \mu\text{m}$ の球形とする[3-8]。これらの各ドメインには $z(\text{Gy})$ のエネルギー (比エネルギー (1.1.3.4 目、1.1.4 項)) が付与される。
- (b) ドメイン内で発生する DNA 損傷には 2 つのタイプを仮定する。1 つは **potentially lethal lesion (PLL)** であり、放射線による直接作用または間接作用を介し生成される。PLL の収率 (単位線量あたりに生じる PLL 数) は、直接作用のみで生じる単位 DNA 量あたりの単位線量あたりの PLL 数 $k_0 (\text{kg}^{-1} \text{Gy}^{-1})$ 、ドメイン内の DNA 量 $g (\text{kg})$ 、間接作用の効果を補正する係数 φ を用いて $\varphi k_0 g$ で表される。なお、 φ は直接作用による PLL 収率に対する直接作用および間接作用による PLL 収率の比である[9]。もう 1 つの DNA 損傷は **lethal lesion (LL)** であり、核内に残存する LL 数に依存し、細胞生存率が決定される。PLL と LL は主に DSB に対応しており、照射後 24 h 時点での DSB (residual DSB) の数と細胞生存率の相関が示されている[3]。
- (c) 照射中または照射後の PLL は、以下の 3 つの過程 (図 2.1)により LL に変換されるか修復される: (A) 1 つの PLL が単独で転換定数 $a (\text{h}^{-1})$ に従い LL に変換される; (B) 2 つの PLL が転換定数 $b_d (\text{h}^{-2})$ に従い相互作用し LL に変換される; (C) PLL が転換定数 $c (\text{h}^{-1})$ に従い修復される [7]。

仮定 (a)~(c) を基に、急性照射後のドメイン当たりの PLL 数 $x_d(t)$ が LL への変換および修復により減少する動態を表すと次式のようなになる。

$$\begin{aligned} \frac{dx_d(t)}{dt} &= -(a+c)x_d(t) - 2b_d x_d(t)^2 \\ &\cong -(a+c)x_d(t). \\ &\because (a+c)x_d(t) \gg 2b_d x_d(t)^2 \end{aligned} \quad (2.1)$$

式 (2.1) を解くと次式が得られる。

$$\begin{aligned} x_d(t) &= x_d(0)e^{-(a+c)t} \\ &= \varphi k_0 z g e^{-(a+c)t}. \end{aligned} \quad (2.2)$$

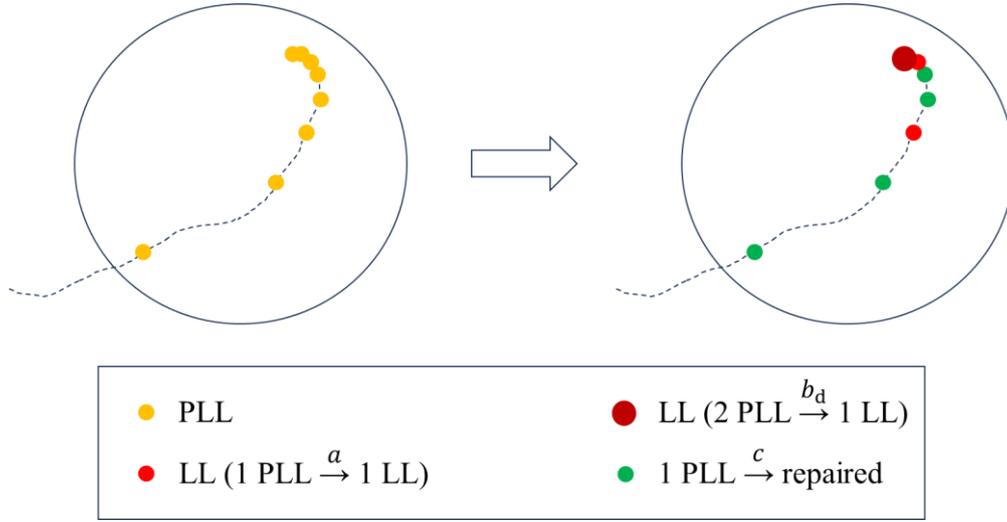


図 2.1 PLL の LL への変換と修復の経路。円はドメイン、点線は電子の飛跡を表す。1 つの PLL が速度定数 a (h^{-1}) に従い LL に変換されるか、2 つの PLL が速度定数 b_d (h^{-2}) に従い LL に変換される。多くの PLL は速度定数 c (h^{-1}) に従い修復される。

また LL の数 $w_d(t)$ は仮定 (c) に基づき次式で表される。

$$\frac{dw_d(t)}{dt} = ax_d(t) + b_dx_d(t)^2 \quad (2.3)$$

式(2.1)を式(2.2)に代入し解くと、ドメインで生成される LL 数が次式で与えられる。

$$w_d(t) = Az + Bz^2 \quad (2.4)$$

A と B は次式で表される。

$$A = \frac{a\phi k_0 g}{a + c}, \quad B = \frac{b_d(\phi k_0 g)^2}{2(a + c)}. \quad (2.5)$$

ドメインあたりに付与されるエネルギー z の平均値を $\langle z \rangle$ 、二次モーメントを $\langle z^2 \rangle$ とおくと、 z の分散は $\sigma_z^2 = \langle z^2 \rangle - \langle z \rangle^2$ となり、 $\gamma = \sigma_{z_d}^2 / \langle z_d \rangle$ とおくと $\langle z^2 \rangle = \langle z \rangle^2 + \gamma \langle z \rangle$ が得られる。また、 γ (Gy) は 1 回のイベントでドメインに付与される比エネルギー z_1 の線量平均値であり、式(1.19)と(1.20)より $\gamma = \langle z_1^2 \rangle / \langle z_1 \rangle$ と表すことができる。このことから、 γ は線量平均線エネルギー y_D を用いて次式のように表すことができる[1,9]。

$$\gamma = \frac{y_D}{\rho \pi r_d^2} \quad (2.6)$$

ρ と r_d はそれぞれドメインの密度と半径であり、ここでは仮定 (b) と前例[1,3]に基づき $\rho = 1.0 \text{ g cm}^{-3}$ 、 $r_d = 0.5 \text{ } \mu\text{m}$ とした。この関係を用いると、式(2.4)よりドメインあたりの平均 LL 数が次式で得られる。

$$\langle w_d \rangle = \left(A + \frac{y_D}{\rho \pi r_d^2} B \right) \langle z \rangle + B \langle z \rangle^2 \quad (2.7)$$

1つの細胞核あたりのドメイン数を p とし、またドメインまたは細胞核に付与される比エネルギーの期待値が吸収線量 D に等しいこと ($\langle z \rangle = D$) を考慮すると、細胞核あたりの LL 数は次式のようになる。

$$\begin{aligned} \langle w_n \rangle &= p \langle w_d \rangle = \left(pA + p \frac{y_D}{\rho \pi r_d^2} B \right) D + pBD^2 \\ &= (\alpha_0 + \gamma\beta)D + \beta D^2 \end{aligned} \quad (2.8)$$

α_0 と β は細胞核内の DNA の質量を $G = pg$ とし次式で与えられる。

$$\alpha_0 = pA = \frac{a\phi k_0 G}{a+c}, \quad \beta = pB = \frac{b_d(\phi k_0 G)^2}{2p(a+c)} \quad (2.9)$$

また、式(2.8)は $\alpha = \alpha_0 + \gamma\beta$ と置くことで次式のように表すことができる。

$$\langle w_n \rangle = \alpha D + \beta D^2 \quad (2.10)$$

細胞核あたりの LL 数 $\langle w_n \rangle$ がポアソン分布に従うと仮定すると、 $\langle w_n \rangle = m$ となる確率は

$$P(m) = \frac{\langle w_n \rangle^m e^{-\langle w_n \rangle}}{m!} \quad (2.11)$$

となり、細胞生存率 $S = P(0)$ と考えられることから

$$S = e^{-(\alpha_0 + \gamma\beta)D - \beta D^2} = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (2.12)$$

が得られる。またこの式は以下のように表すこともできる。

$$-\ln S = (\alpha_0 + \gamma\beta)D + \beta D^2 = \alpha D + \beta D^2 \quad (2.13)$$

α_0 と β は細胞の種類に依存するパラメータであり、CONV 照射における各細胞の生存率データにフィッティングし決定することができる。 γ は次項に述べる通り放射線の飛跡構造を計算可能なモンテカルロシミュレーションコードを用いて決定することが可能である。

IMK モデルでは DRE (1.3.4.1 目) の細胞生存率への影響を考慮することができる[1]。DRE は照射中の PLL の修復 (SLDR) によるものと考えられており、IMK モデルでは照射時間 T (h) の間にドメインに付与されるエネルギー z とドメインに含まれる DNA 質量 g 、DSB の修復速度定数 c が時間変化することを仮定している。しかしながら、本研究で用いた実験データは UHDR 照射が ≥ 600 Gy/s、CONV 照射が 14 Gy/min = 0.23 Gy/s で照射された細胞株から得られたものであり[10,11]、照射中の SLDR は無視できると考えられる。線量率を考慮した IMK モデルは次式で表される[1,9]。

$$-\ln S = (\alpha_0 + \gamma\beta)D + F\beta D^2 = \alpha D + F\beta D^2 \quad (2.14)$$

F は Lea-Catcheside time factor [12]である。 F により DRE および高線量領域における log スケールの細胞生存率の直線的な変化を表現することができ[1,9,13]、次式で表される。

$$F = \frac{2}{(a+c)^2 T^2} \left[(a+c)T + e^{-(a+c)T} - 1 \right] \quad (2.15)$$

T は線量 D と線量率 \dot{D} を用いて $T = D/\dot{D}$ と表現されることから、線量を変数とする関数

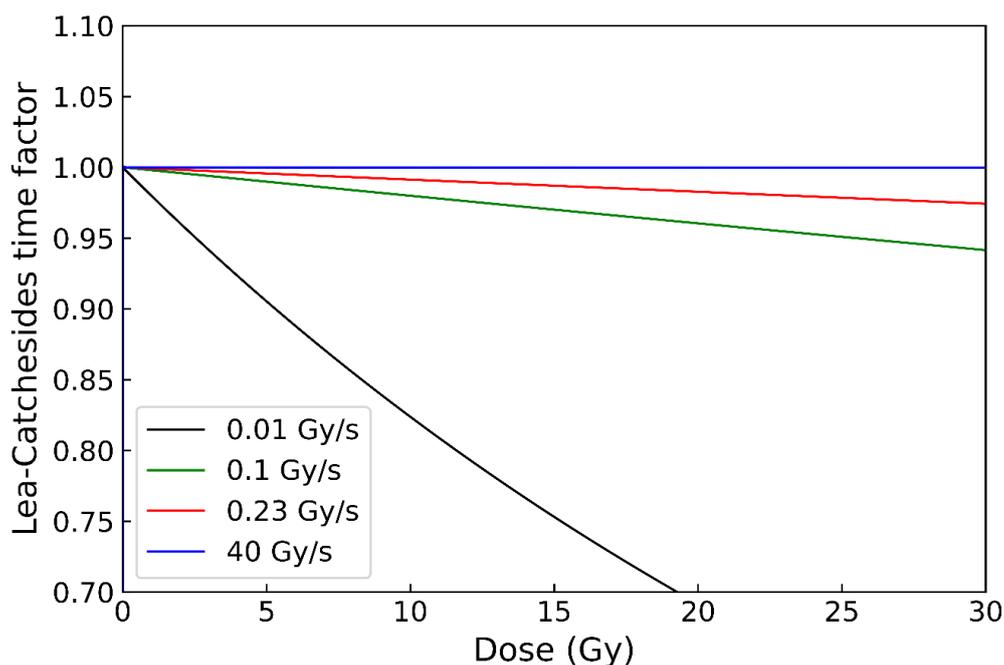


図 2.2 各線量率における線量と Lea-Catchesides time factor F の関係

である。式(2.15)中の細胞固有のパラメータである $(a + c)$ をヒト顎下腺癌細胞 HSG[14,15] に対し得られた値である $2.187 (\text{h}^{-1})$ とし F を求めると図 2.2 のようになった。線量率を 0.01、0.1、0.23、40 Gy/s とし求めた (図 2.2)。線量率が低い場合は線量が高くなるに従い F が小さくなる。先に述べたように本モデルで扱う線量率は極めて高く、図 2.2 より F の線量に対する変化が非常に小さいことから $F \rightarrow 1$ とし、照射中の SLDR を考慮せず式(2.13)を用いて実測値へのモデルフィッティングや UHDR での生存率予測を近似的に行うことが可能である。

2.2. 線量率に依存する DNA 損傷数のモデリング

UHDR 照射による DNA 損傷の抑制は、1.4.2.2 目および 1.5 節で述べたような化学的過程における飛跡間相互作用 (図 1.29) などによる活性種の収率が低下することに起因すると考えられている[16,17]。そこで、本研究では線量率 \dot{D} に増大に伴う DSB 数の減少を、 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ を用いて考慮し、UHDR 用の新たなモデリングを行った。 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ は CONV 線量率における DSB 収率に対する任意の線量率 \dot{D} における DSB 収率の比であり、次式で定義している。

$$F_{\text{DSB}}(\dot{D}) = \frac{Y_{\text{DSB}}(\dot{D})}{Y_{\text{DSB}(\text{conv})}} = \frac{\varphi(\dot{D})k_0G}{\varphi(\text{conv})k_0G}$$

$$= \frac{\alpha_0(\dot{D})}{\alpha_{0(\text{conv})}} = \frac{\beta(\dot{D})}{\beta_{(\text{conv})}} \quad (2.16)$$

$Y_{\text{DSB}}(\dot{D})$ と $Y_{\text{DSB}(\text{conv})}$ はそれぞれ任意線量率 \dot{D} および CONV 線量率における照射後初期の DSB 収率、 $\varphi(\dot{D})k_0G$ と $\varphi_{(\text{conv})}k_0G$ は PLL 数、 $(\alpha_0(\dot{D}), \beta(\dot{D}))$ 、 $(\alpha_{0(\text{conv})}, \beta_{(\text{conv})})$ はそれぞれ任意線量率 \dot{D} および CONV 線量率における細胞固有のパラメータである。式(2.16)に示されているように、 α_0 と β には DSB 収率を表す PLL 数が考慮されている。なお、DSB 収率と PLL の対応関係は過去のモデリングにより明らかになっている[2]。また、 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ は α_0 および $\sqrt{\beta}$ の比として表される。式(2.16)より $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ は線量率に依存する PLL 数の補正係数となっており、本モデルでは UHDR 照射時の生存率を、式(2.13)を基に次式で定義した。

$$\begin{aligned} -\ln S &= (\alpha_0 + \gamma\beta)D + \beta D^2 \\ &= \left(\alpha_{0(\text{conv})}F_{\text{DSB}}(\dot{D}) + \gamma\beta_{(\text{conv})}F_{\text{DSB}}(\dot{D})^2 \right) D + \beta_{(\text{conv})}F_{\text{DSB}}(\dot{D})^2 D^2 \end{aligned} \quad (2.17)$$

$(\alpha_{0(\text{conv})}, \beta_{(\text{conv})})$ は先に述べたように CONV 照射時の生存率データに式(2.13)をフィッティングすることにより取得可能である。また、 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ により UHDR 照射における PLL 数 (DSB 数) が考慮され、細胞生存率の増加を表現できる。開発した式 (2.17) を *integrated microdosimetric-kinetic (IMK) model for UHDR-irradiation* と呼び、本研究では、このモデルを使用し、任意の高線量率照射後の細胞生存率の予測を行った。

参考文献

1. Matsuya Y, McMahon S J, Tsutsumi K, Sasaki K, Okuyama G, Yoshii Y et al. Investigation of dose-rate effects and cell-cycle distribution under protracted exposure to ionizing radiation for various dose-rates. *Sci Rep*. 2018;8:8287.
2. Matsuya Y, Sato T, Nakamura R, Naijo S, Date H. A theoretical cell-killing model to evaluate oxygen enhancement ratios at DNA damage and cell survival endpoints in radiation therapy. *Phys Med Biol*. 2020;65:095006.
3. Matsuya Y., McMahon S.J., Butterworth K.T., Yachi Y., Saga R., Sato T., et al. Modelling oxygen effects on the in- and out-of-field radiosensitivity of cells exposed to intensity-modulated radiation fields. *Phys Med Biol*. 2023;68:095008.
4. Hawkins R B. A microdosimetric-kinetic model of cell death from exposure to ionizing radiation of any LET with experimental and clinical applications. *Int J Radiat Biol*. 1996;69:739–55.
5. Hawkins R B. A microdosimetric-kinetic model for the effect of non-Poisson distribution of lethal lesions on the variation of RBE with LET. *Radiat Res*. 2003;160:61–9.
6. Hawkins R B. The relationship between the sensitivity of cells to high energy photons and the RBE of particle radiation used in radiotherapy. *Radiat Res*. 2009;172:761–76.

7. Hawkins R B, Inaniwa T. A microdosimetric-kinetic model for cell killing by protracted continuous irradiation including dependence on LET I: repair in cultured mammalian cells. *Radiat Res.* 2013;180:584–94.
8. Hawkins R.B. Biophysical models, microdosimetry and the linear quadratic survival relation. *Ther Oncol.* 2017;1:1013.
9. Matsuya Y, Fukunaga H, Omura M, Date H. A model for estimating dose-rate effects on cell-killing of human melanoma after boron neutron capture therapy. *Cells.* 2020;9:1117.
10. Adrian G, Konradsson E, Lempart M, Bäck S, Ceberg C, Petersson K. The FLASH effect depends on oxygen concentration. *Br J Radiol.* 2019;93:20190702.
11. Adrian G, Konradsson E, Beyer S, Wittrup A, Butterworth K T, McMahon S J. Cancer cells can exhibit a sparing FLASH effect at low doses under normoxic in vitro-conditions. *Front Oncol.* 2021;11:686142.
12. Brenner D J. The linear-quadratic model is an appropriate methodology for determining isoeffective doses at large doses per fraction. *Semin Radiat Oncol.* 2008;18:234–9.
13. Matsuya Y, Tsutsumi K, Sasaki K, Date H. Evaluation of the cell survival curve under radiation exposure based on the kinetics of lesions in relation to dose-delivery time. *J Radiat Res.* 2015;56:90–9.
14. Inaniwa T, Suzuki M, Furukawa T, Kase Y, Kanematsu N, Shirai T et al. Effects of dose-delivery time structure biological effectiveness for therapeutic carbon-ion beams evaluated with microdosimetric kinetic model. *Radiat Res.* 2013;180:44–59.
15. Matsuya Y, Kimura T, Date H. Markov chain Monte Carlo analysis for the selection of a cell-killing model under high-dose-rate irradiation. *Med Phys.* 2017;44:5522–32.
16. Ohsawa D, Hiroyama Y, Kobayashi A, Kusumoto T, Kitamura H, Hojo S, et al. DNA strand break induction of aqueous plasmid DNA exposed to 30 MeV protons at ultra-high dose rate. *J Radiat Res.* 2022;63:255–60.
17. Konishi T, Kusumoto T, Hiroyama Y, Kobayashi A, Mamiya T, Kodaira S. Induction of DNA strand breaks and oxidative base damages in plasmid DNA by ultra-high dose rate proton irradiation. *Int J Radiat Biol.* 2023;13:1–8.

第3章 *IMK model for UHDR-irradiation* を使用した生物効果予測

3.1. 方法

UHDR 照射後の細胞生存率を CONV 照射後の細胞生存率から予測するため、*IMK model for UHDR-irradiation* と題する数学モデルを開発した。本モデルでは図 3.1 に示したフローチャートに従い、UHDR 照射後の細胞生存率を予測した。まずは細胞照射実験で用いられた 10 MeV 電子線の線質を表すパラメータである γ を、放射線の挙動を予測可能なモンテカルロシミュレーションを用いて決定した。線量と細胞生存率の関係を表す式(2.13)に γ を代入し、CONV 照射後の各細胞の生存率データにフィッティングさせることで、CONV に対する各細胞固有のパラメータ $\alpha_{0(\text{conv})}$ と $\beta_{(\text{conv})}$ を決定した。これらのパラメータは式(2.9)で表されるように PLL (DSB) の数に依存することから、UHDR 照射後と CONV 照射後の DSB 数の違いを考慮するための補正係数 F_{DSB} を定義した。 F_{DSB} は CONV 照射後に対する UHDR 照射後の DSB 数である。CONV 照射に対する $\alpha_{0(\text{conv})}$ と $\beta_{(\text{conv})}$ を、 F_{DSB} を用いてそれぞれ補正することで UHDR 照射後の細胞生存率に対応するパラメータの予測値とした。UHDR に対し予測されたパラメータを用いて、細胞生存率、RBE、BED を計算した。以下にこれらの手順の詳細をまとめる。

3.1.1. 入射放射線の線質を表すパラメータ γ の導出

式(2.13)に含まれるパラメータ γ を求めるため、 y_D をモンテカルロシミュレーションにより計算した。シミュレーションには Particle and Heavy Ion Transport code System (PHITS) ver. 3.24 [1]を用いた。 γ は細胞実験で使用される放射線の種類やエネルギー、照射場の構造に大きく影響を受けるため、まずは本研究で比較に使用する細胞生存率の実測値[2,3]の照射場の再現を行った。比較に使用した細胞生存率データが得られた照射実験では低 LET 放射線である 10 MeV 電子線[4]を使用しており、入射電子の初期の線質や各構造物の寸法を調整しながら図 3.2 に示した体系を PHITS で構築した。線質と各構造物の寸法の調整にあたり、図 3.2 に示されたビーム経路上の計 3 箇所: (1) ウェッジ、(2) マルチリーフコリメータ、(3) クロスヘアの位置で深部量百分率 (percentage depth dose: PDD) と軸外線量比 (off-center ratio: OCR) を計算し、実験値[4]と比較した。PDD と OCR の計算には、PHITS で空間的なエネルギー付与分布を計算するための[t-deposit] タリーを使用してサンプリングした。決定した照射条件を使用して計算した PDD と OCR はそれぞれ図 3.3 と図 3.4 の通りである。

上記のように決定されたシミュレーションにおける照射条件を基に、細胞へ照射される電子線の線エネルギー y の分布 $yd(y)$ (1.1.3.4 目) を計算した (図 3.5)。この計算にも PHITS を使用し、マイクロシメトリに関する解析的な機能を用いて微小領域に付与されるエネルギーの確率密度を求めるための[t-sed]タリー[5,6]を利用した。得られた y 分布を基に、式(1.16)–(1.18) を用いると $y_D = 1.624 \text{ (keV } \mu\text{m}^{-1})$ となった。第2章で述べたように、式(2.6)において $r_d = 0.5 \text{ } \mu\text{m}$ 、 $\rho = 1.0 \text{ g cm}^{-3}$ であり、 γ の値は 0.331 Gy となった。

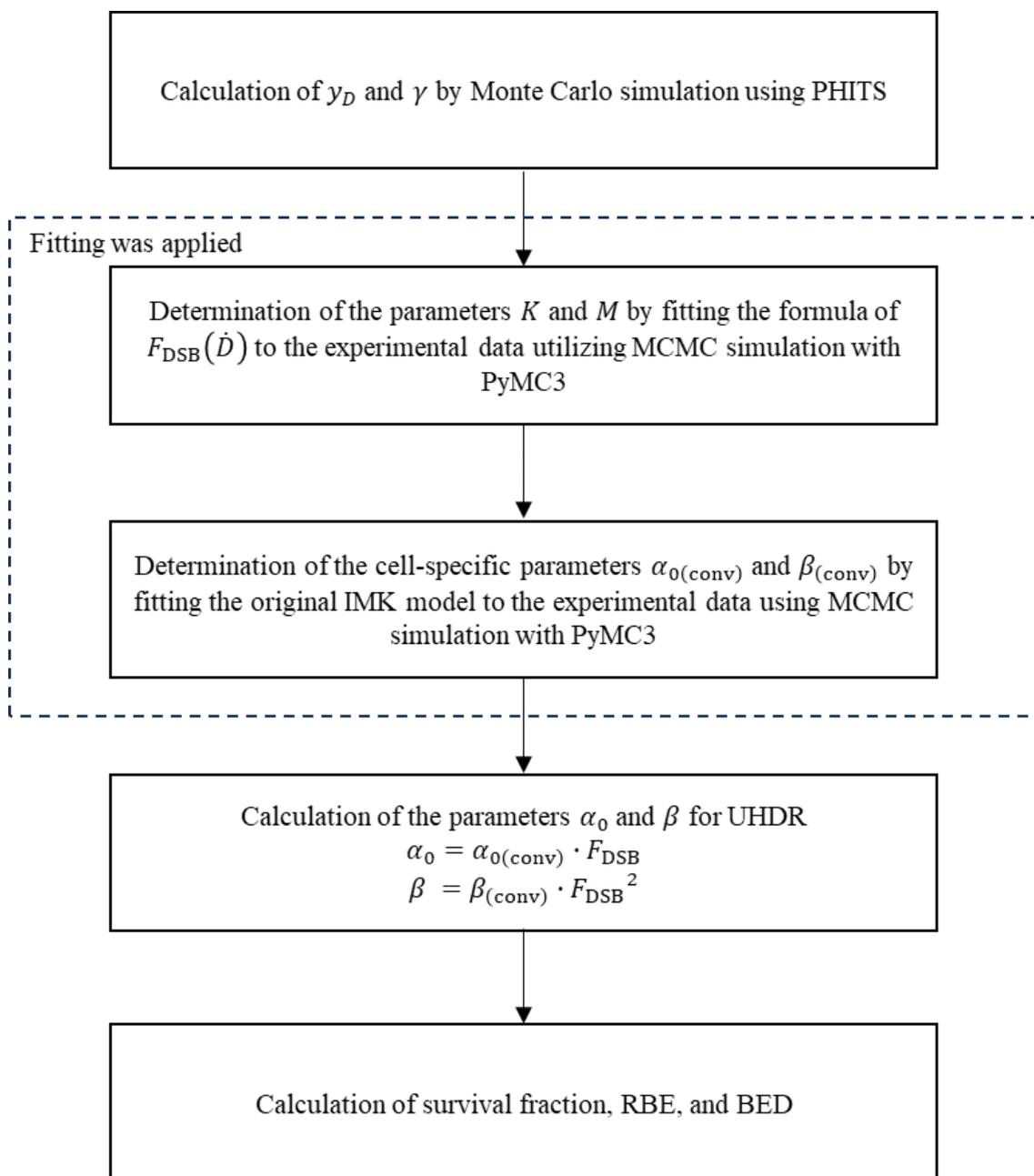


図 3.1 *IMK model for UHDR-irradiation* のフローチャート

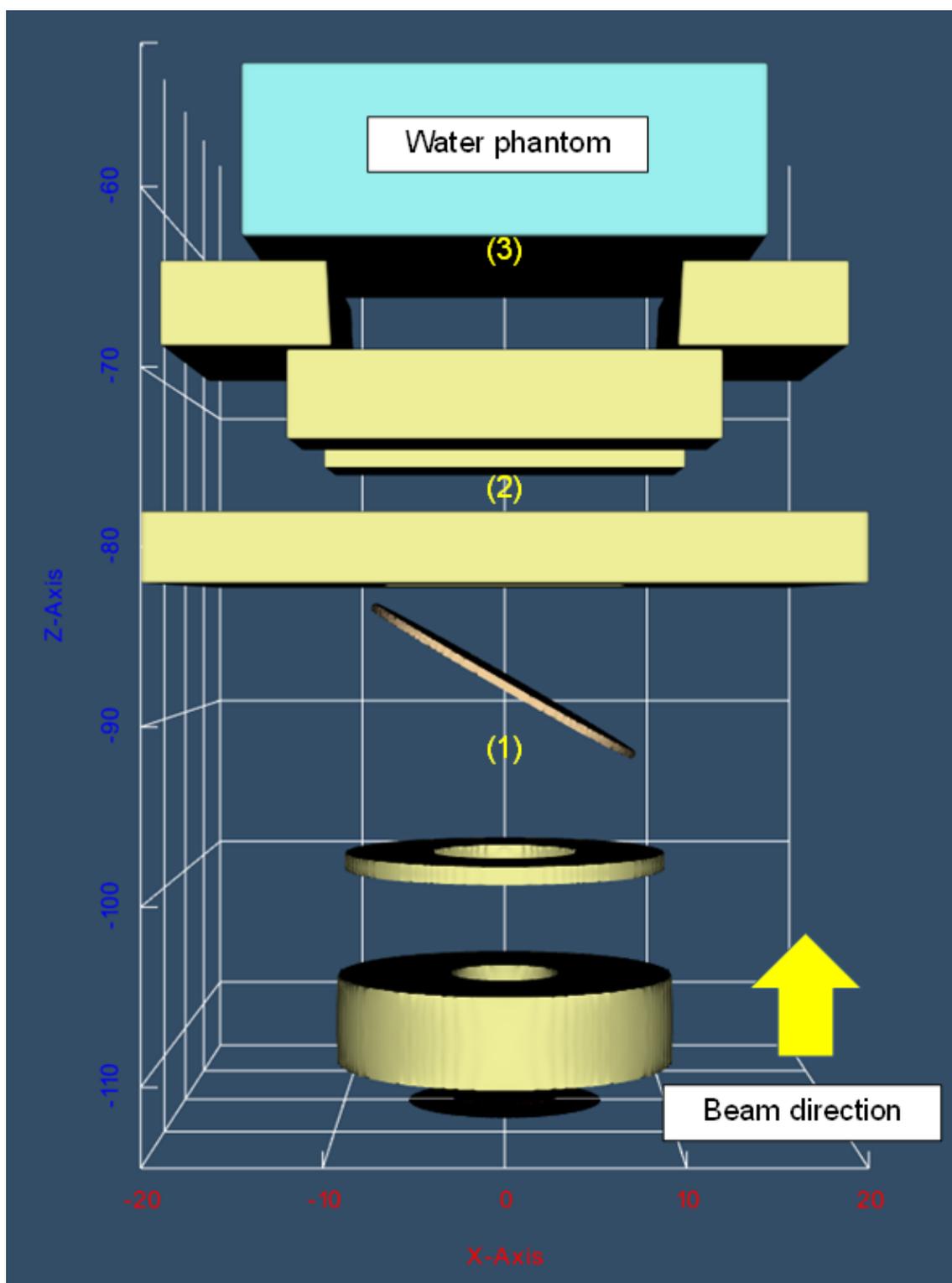


図 3.2 FLASH 照射後の細胞生存率取得に用いられた Lempart ら[4]が構築した UHDR 照射が可能なリニアックの内部[2,3]を PHITS で模擬した構造。(1) はウェッジ、(2) はマルチリーフコリメータ、(3) はクロスヘアの位置を表し、各領域に対し線量分布を導出し、実験値と比較しつつ各構造物の寸法などを調整した。

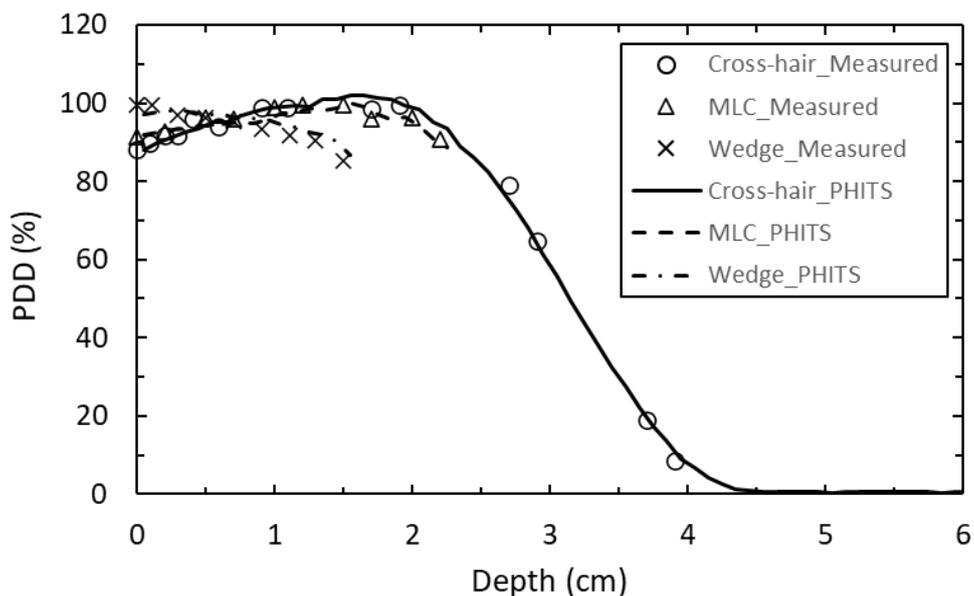


図 3.3 リニアック内の 3 地点における深部量百分率 (PDD)。○、△、×はそれぞれクロスヘア、マルチリーフコリメータ、ウェッジの位置における PDD の測定値、実線、破線、一点鎖線はそれぞれ上記 3 地点に対し PHITS で計算された PDD である。

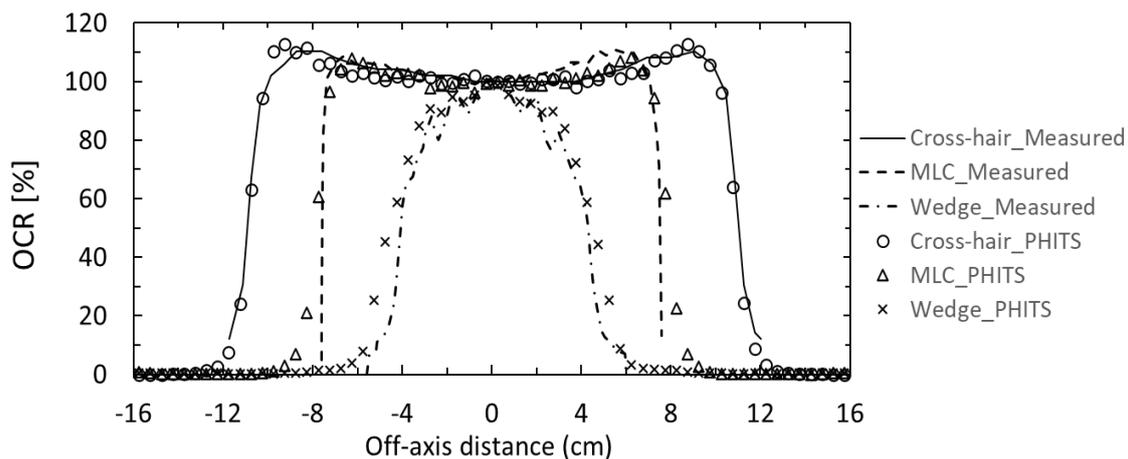


図 3.4 リニアック内の 3 地点における軸外線量比 (OCR)。実線、破線、一点鎖線はそれぞれクロスヘア、マルチリーフコリメータ、ウェッジの位置における OCR の測定値、○、△、×はそれぞれ上記 3 地点に対し PHITS で計算された OCR である。

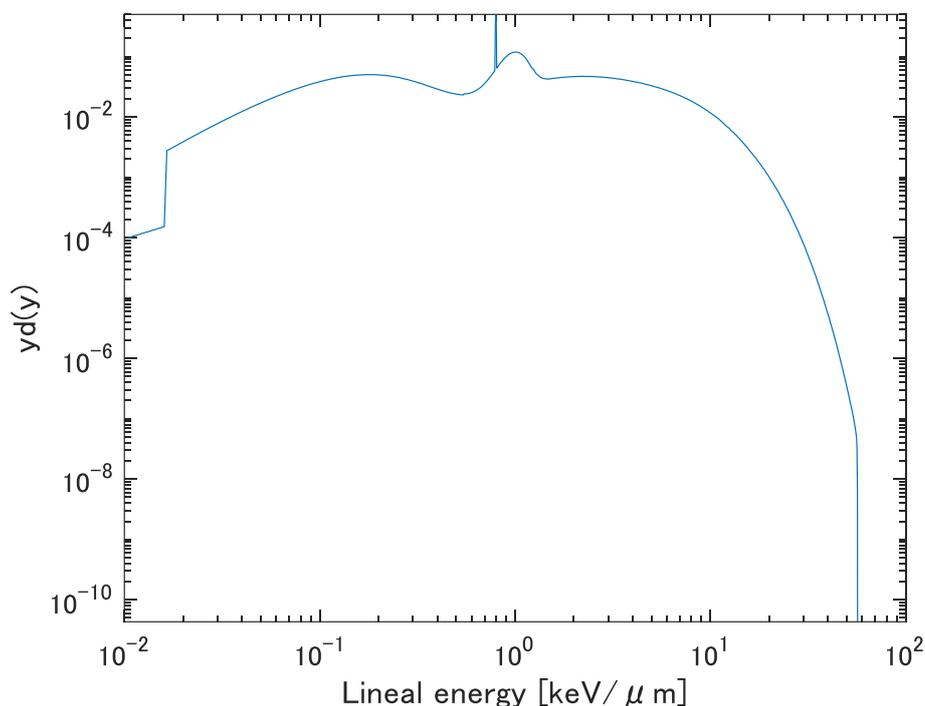


図 3.5 リニアック電子線に対する $yd(y)$ 分布

3.1.2. UHDR と CONV 間の DSB 数差を補正する係数のモデリング

本モデルでは、UHDR 照射後の細胞生存率を予測できるよう PLL 数 (DSB 収量) を補正する $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ を式(2.17)へ新たに考慮し、線量率の変化に伴う PLL 数の違いを考慮した。 \dot{D} と $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ の関係は、経験的な関数としてシグモイド曲線を表現する次式で定義した。

$$F_{\text{DSB}}(\dot{D}) = \frac{\dot{D} + K}{\dot{D} + MK} \cdot M \quad (3.1)$$

$F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ は最大値が 1 であるが、 $(\dot{D} + K)/(\dot{D} + MK)$ は最大値が $1/M$ であるため、式(3.1)のように $(\dot{D} + K)/(\dot{D} + MK)$ を $1/M$ で除す (= M を乗じる) ことで、 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ の最大値が 1 となるように定義した。また、 K (Gy/s) は $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ が最大値の 50% になるときの \dot{D} を意味する。フィッティングに用いる実験データは複数の文献[3,7-12]より取得した。UHDR 照射後の DSB 数を計測した報告は非常に少ないため、本モデルでは細胞の種類、照射後から DSB 数計測までの時間 (~4 h)、放射線の種類、線量、酸素分圧などの詳細な実験条件は考慮せずフィッティングに組み入れた。なお、各論文内に掲載されている線量率のうち最も小さい線量率の DSB 数が 1 となるよう、線量率ごとの DSB 数の相対値を算出した (表 3.1)。

表 3.1 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ 導出に使用した実験データ一覧

Cell type	Radiation	Marker of DNA damage	Dose rate (Gy/s)	Relative DSB yield	References	
IMR90 (normal human lung fibroblast)	4.5 MeV proton	γ H2AX	0.05	1	Buonanno et al. (2019)	
			100	0.971		
			1000	0.785		
MRC5 (normal human fibroblast)	4.5 MeV electron	γ H2AX 53BP1	106	0.969	Fouillade et al. (2019)	
			106	0.778		
IMR90 (normal human fibroblast)		γ H2AX	106	0.955		
A549 (human adenocarcinoma)		γ H2AX 53BP1	106	0.998		
			106	0.995		
CBC (crypt base columnar cell)	16 MeV electron	γ H2AX	0.079	1	Levy et al. (2020)	
			216	0.642		
			0.079	1		
LU-HNSCC4 (squamous cell carcinoma)	10 MeV electron	53BP1	0.233	1	Adrian et al. (2021)	
			1200	0.964		
MDA-MB-231 (human breast cancer cell)		53BP1	0.233	1		
			1200	1.03		
HeLa (high passage subclone)		53BP1	0.233	1		
			1200	1.05		
peripheral blood lymphoma cell	6 MeV electron	tailDNA	0.1	1	Cooper et al. (2022)	
			0.3	1		
			1	1.08		
			3	1.12		
			10	0.890		
			30	0.805		
			100	0.665		
			300	0.790		
			1000	0.760		
			2000	0.815		
Mouse Brain	144.6 MeV proton	γ H2AX	0.17	1	Dokic et al. (2022)	
HIEC-6 (human intestinal epithelial cell-6)	6 MV X-ray	53BP1 (30m)	0.03	1	Shi et al. (2022)	
			115	0.917		
			53BP1 (1.5h)	0.03		1
			115	0.949		
			53BP1 (3h)	0.03		1
			115	0.986		

3.1.3. モデルパラメータの決定

\dot{D} と $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ の関係を表す式(3.1)における M, K はモデルパラメータであり、PyMC3 ver. 3.8 [13]のベイズフレームワークにより推定した。ベイズフレームワークを用いることにより、観測データに矛盾しない妥当なモデルの予測における、パラメータの尤もらしい範囲である事後分布がマルコフ連鎖モンテカルロ (Markov chain Monte Carlo: MCMC) 法により導出される。ここでは PyMC3 に実装されている MCMC アルゴリズムのうち、No-U-Turn Sampler (NUTS) [14]を用いた。NUTS は複雑で多次元の事後分布の導出に適用できることから、幅広い分野でモデリングに用いられている[15–18]。また、CONV 照射後の各細胞のパラメータ $(\alpha_{0(\text{conv})}, \beta_{(\text{conv})})$ についても同様に、式(2.13)を細胞生存率データ[2,3]に NUTS を用いてフィッティングさせることで決定した。なお、式(2.13)中の線質パラメータ γ は 3.1.1 項の方法で得られた 0.331 Gy をあらかじめ代入した状態で NUTS を適用し、 $(\alpha_{0(\text{conv})}, \beta_{(\text{conv})})$ を推定した。

NUTS を用いたサンプリングでは、 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ と $-\ln S$ の尤度が正規分布に従うものと仮定した。また、モデルパラメータである $(M, K, \alpha_{0(\text{conv})}, \beta_{(\text{conv})})$ の事前情報はないため、ここではこれらのパラメータの事前分布を前例に倣い一様分布とした[19]。バーンイン期間は 10^3 、反復回数は 10^4 とした。

3.1.4. UHDR 照射後の細胞生存率の予測

前項の方法で得られた $(F_{\text{DSB}}(\dot{D}), \alpha_{0(\text{conv})}, \beta_{(\text{conv})}, \gamma, M, K)$ を式(2.17)に代入することで、各細胞の UHDR 照射後の細胞生存率を求め、実験値[2,3]と比較した。UHDR 照射は線量ごとに使用するパルス数が異なり、平均線量率も変化する (1.4.1 項)。3 Gy を $3.5 \mu\text{s}$ の 1 パルスで照射し、周波数が 200 Hz であるので、3, 6, 9, 12 Gy の線量に対する平均線量率はそれぞれ 0.86 MGy/s、1.2 kGy、900 Gy/s、800 Gy/s である[3]。図 3.6 より、 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ の実測値は $\geq 800 \text{ Gy/s}$ の線量率域では大きな変化が認められないことから、文献において細胞生存率データの取得に使用された全ての吸収線量に対して $F_{\text{DSB}}(800 \text{ Gy/s})$ の一定値を使用した。MCMC 法では各パラメータの事後分布から不確かさ (信用区間 (credible interval: CI)) が得られる利点があり、各パラメータの 68%CI を基に誤差伝播の関係から $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ および細胞生存率の 68% CI を求めることで、モデル予測値の CI 内に実測値が含まれるか比較し、一致度を確認した。なお、68%CI は標準偏差 (1σ) に相当する。

また、開発した *IMK model for UHDR-irradiation* による生存率の予測値と実測値の一致とは、次式で表される決定係数 R^2 を使用することで評価した。

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (S_{\text{exp},i} - S_{\text{est},i})^2}{\sum_{i=1}^n (S_{\text{exp},i} - \bar{S}_{\text{exp}})^2} \quad (3.2)$$

$S_{\text{exp},i}$ は条件 i で得られた細胞生存率、 $S_{\text{est},i}$ は本モデルで計算された条件 i における生存率、 \bar{S}_{exp} は $S_{\text{exp},i}$ の平均値である。

3.1.5. 生物学的効果比と生物学的等価線量

本モデルの式(2.17)を用いて推定された UHDR 照射後の生存率と、式(2.13)を用いたフィッティングで得られた CONV 照射後の生存率より生物学的効果比 (relative biological effectiveness: RBE) と BED を求めた。RBE と BED は臨床の治療計画や治療スケジュールの最適化に利用される[20–24]。ここでは、細胞生存率 10%をエンドポイントとした次式の RBE を求めた。

$$RBE_{10} = \frac{D_{10(\text{conv})}}{D_{10}(\dot{D})} \quad (3.3)$$

$D_{10(\text{conv})}$ と $D_{10}(\dot{D})$ はそれぞれ CONV 線量率と任意の線量率 \dot{D} による照射後に細胞生存率が 10%となる吸収線量である。また、式(2.13)および(2.17)より式(3.3)は次式のように表現できる。

$$RBE_{10} = \frac{\sqrt{\alpha_{(\text{conv})}^2 + 4S^*\beta_{(\text{conv})}} - \alpha_{(\text{conv})}}{2\beta_{(\text{conv})}} \cdot \left(\frac{\sqrt{\alpha(\dot{D})^2 + 4S^*\beta(\dot{D})} - \alpha(\dot{D})}{2\beta(\dot{D})} \right)^{-1} \quad (3.4)$$

S^* は log スケールの細胞生存率 10% ($= -\ln 0.1$)、 $\alpha(\dot{D}) = \alpha_0(\dot{D}) + \gamma\beta(\dot{D})$ 、 $\alpha_{(\text{conv})} = \alpha_{0(\text{conv})} + \gamma\beta_{(\text{conv})}$ である。本モデルで得られた RBE_{10} は、UHDR 照射後の実験データから LQ モデルによりフィッティングすることで得られる RBE_{10} と比較した。また BED は次式を用いて求めた。

$$BED = nd \left(1 + \frac{d}{\alpha(\dot{D})/\beta(\dot{D})} \right) = D \left(1 + \frac{d}{\alpha(\dot{D})/\beta(\dot{D})} \right) \quad (3.5)$$

n は分割数、 d は分割線量、 D は総線量であり、前例に倣い $D = 60$ (Gy) とした[25]。BED の計算結果により、放射線治療計画への応用の可能性と UHDR による生物効果のインパクトを評価した

3.2. 結果

3.2.1. 相対 DSB 収率と細胞固有のパラメータ

式(3.1)を表 3.1 に示された測定データにフィッティングし、PyMC3 の NUTS を用いた MCMC シミュレーションにより $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ 内の 2 つのパラメータを求めた。その結果、 $M = 0.860 \pm 0.029$ 、 $K = 43.6 \pm 26.6$ となり、図 3.6 のような関係が得られた。なお、モデルパラメータを取得する際のフィッティング時には、各文献で報告される実験データの平均値または中央値のみを使用した。

図 3.6 に示すように、 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ は < 10 Gy/s までの線量率では線量率に依存せず、 $10 - 600$ Gy/s までの線量率区間で 15%ほど低下し、 ≥ 600 Gy/s では 15%ほど低下したまま、ほぼ一定の値となっている。一般に FLASH 効果のしきい線量率として扱われる 40 Gy/s [26–30] は $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ が減少する $10 - 600$ Gy/s の範囲に含まれる。 ≥ 800 Gy/s 以上の線量率域においては、 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ は線量率の増加に依存せず一定値となるため、式(2.17)を用いた UHDR 照射後の細胞生存率は常に $F_{\text{DSB}}(800 \text{ Gy/s}) = 0.866 \pm 0.028$ として求めた。

3.2.2. DSB 収率を補正した UHDR 照射後の細胞生存率

IMK model for UHDR-irradiation におけるモデルパラメータ $[\alpha_{0(\text{conv})}, \beta_{(\text{conv})}]$ を表 3.2 に示す。 y_D はあらかじめモンテカルロシミュレーションにより求めて式(2.14)に代入し、CONV 照射後の細胞生存率測定データへのフィッティングにより $[\alpha_{0(\text{conv})}, \beta_{(\text{conv})}]$ を決定した。表 3.2 の各細胞のモデルパラメータには平均値と 68%CI が表示されている。これらのパラメータを用いると CONV 照射後の細胞生存率曲線は、図 3.7 の赤い実線のようになった。さらに、これらのパラメータと前節で示した $F_{\text{DSB}} = 0.866 \pm 0.028$ を式(2.17)に代入すると図 3.7 に示す青い実線が得られた。表 3.2 より決定係数 R^2 は全ての細胞タイプで > 0.7 であり、UHDR 照射時の細胞生存率の予測値は実測値とよく一致していることが確認され

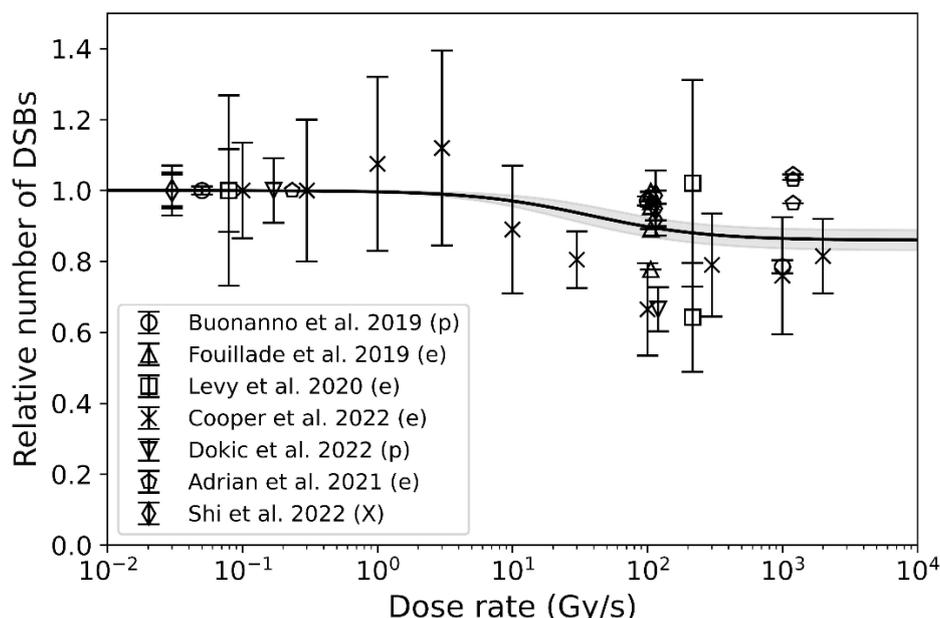


図 3.6 線量率と相対 DSB 収率 ($F_{\text{DSB}}(\dot{D})$) の関係。実線は平均値、灰色の領域は不確かさ (68%CI) である。凡例中の (p)、(e)、(X) はそれぞれ陽子線、電子線、X 線を表す。

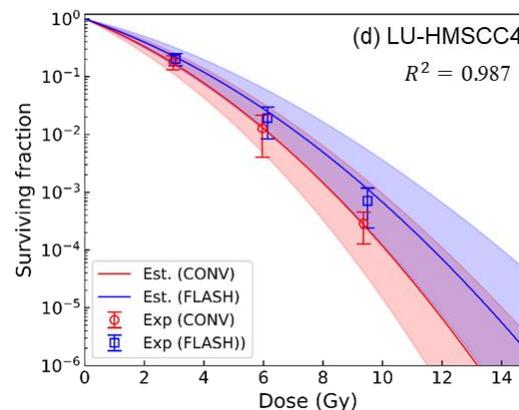
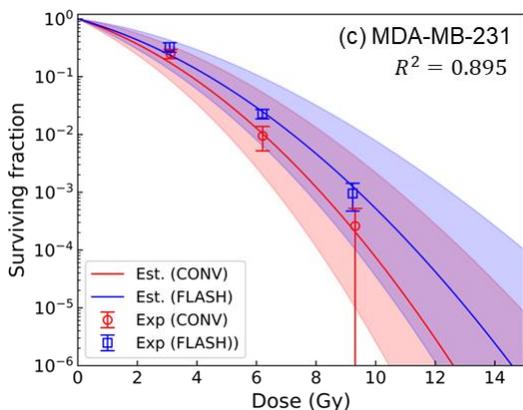
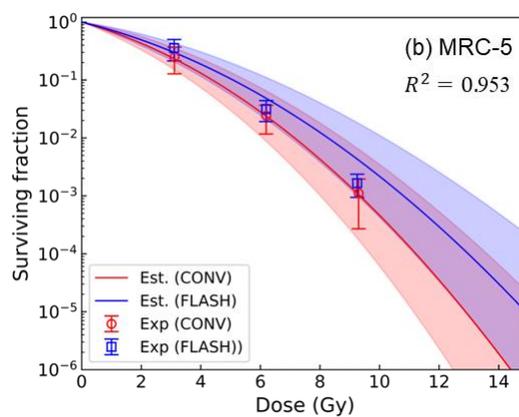
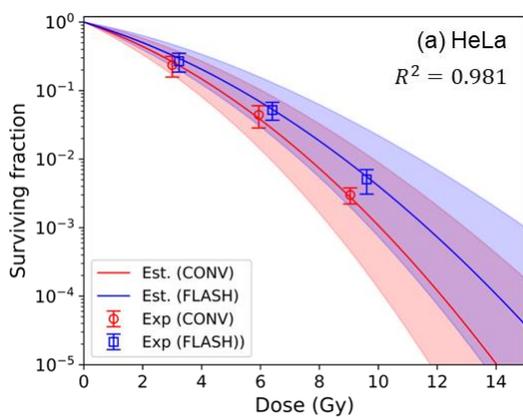
た。また、塗りつぶされた領域は 68%CI であり、全ての細胞について実験値がこれらの不確かさに含まれることも確認された。

3.2.3. UHDR 照射における RBE_{10} と BED の推定

IMK model for UHDR-irradiation では、細胞生存率を式 (2.13) と同様に LQ モデルの形で表現することができるため、RBE と BED の計算が容易に可能である。エンドポイントを細胞生存率 10%とした RBE_{10} は、式(3.4)、BED は式(1.30)を用いて計算した。図 3.8 の実線は本モデルで予測した細胞生存率曲線より求めた RBE_{10} である。(a)–(h)の各細胞の RBE_{10} の値は 0.864 ± 0.509 、 0.863 ± 0.390 、 0.895 ± 0.504 、 0.864 ± 0.444 、 0.862 ± 0.461 、 0.864 ± 0.515 、 0.865 ± 0.187 、 0.865 ± 0.321 であった。塗りつぶし領域は 68%CI である。図 3.8 中の□は、式(2.13)を用いて UHDR 照射後の細胞生存率を LQ モデルによりフィッティングして取得した値 (実測値に相当する値) であり、本モデルによる予測 (実線) とよく一致していることが確認された。図 3.9 においては、赤い実線が CONV 照射に対するフィッティングによる BED の計算値、青い実線は本モデルで予測した UHDR 照射後の BED である。塗りつぶし領域は 68%CI を表す。BED の不確かさは大きい、UHDR と CONV 線量率間の差と不確定性を本研究で初めて推定した。これらより、本研究で開発したモデルは、従来の LQ モデルのように治療計画の指標が容易に計算できる利点を有するとともに、DNA 損傷過程に基づいた原理的な予測も可能であることがわかった。

表 3.2 細胞ごとのパラメータと生存率曲線の決定係数

Cell type	Model parameters		R^2 value
	$\alpha_{0(\text{conv})}$ (Gy^{-1})	$\beta_{(\text{conv})}$ (Gy^{-2})	
HeLa	0.330 ± 0.134	0.034 ± 0.016	0.981
MRC-5	0.320 ± 0.130	0.043 ± 0.015	0.953
MDA-MB-231	0.366 ± 0.204	0.056 ± 0.025	0.895
LU-HNSCC4	0.443 ± 0.146	0.056 ± 0.025	0.987
MCF7	0.285 ± 0.243	0.079 ± 0.031	0.873
WiDr	0.243 ± 0.122	0.035 ± 0.017	0.714
DU145 (hypoxia)	0.187 ± 0.030	0.010 ± 0.002	0.988
DU145 (normoxia)	0.239 ± 0.069	0.018 ± 0.005	0.995



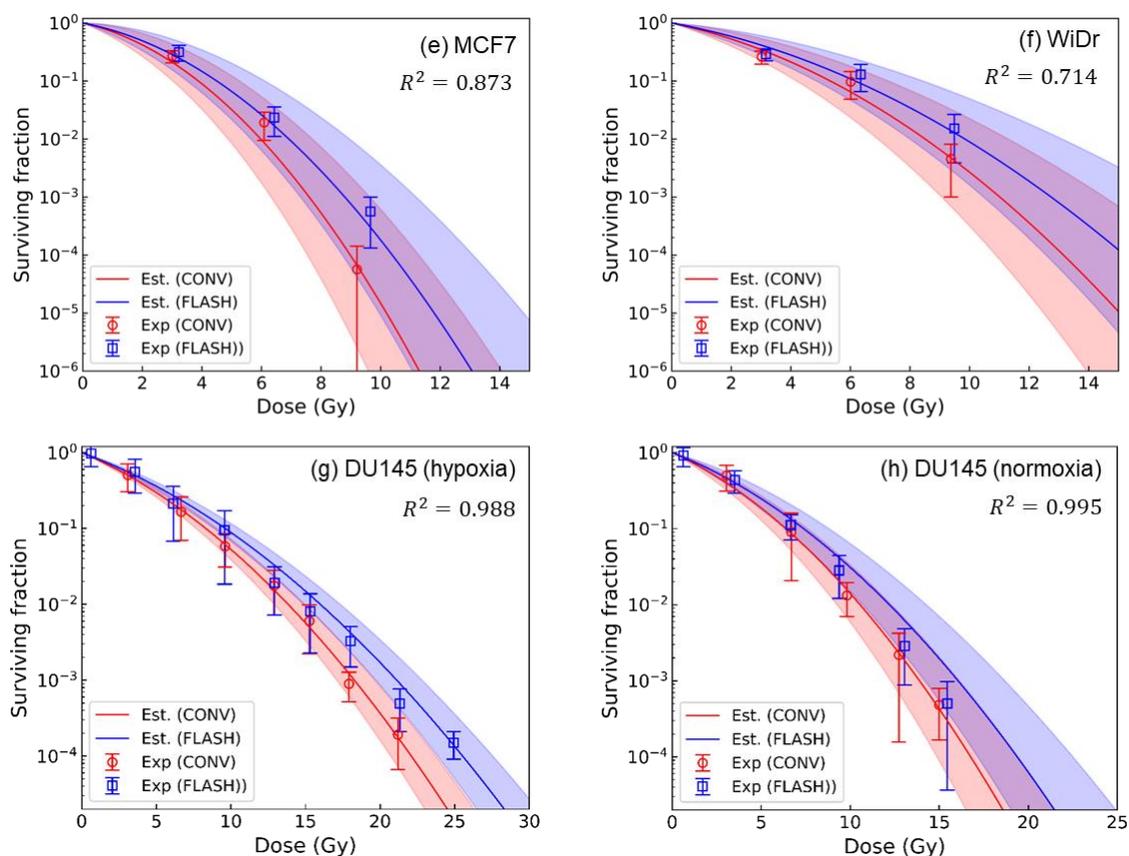
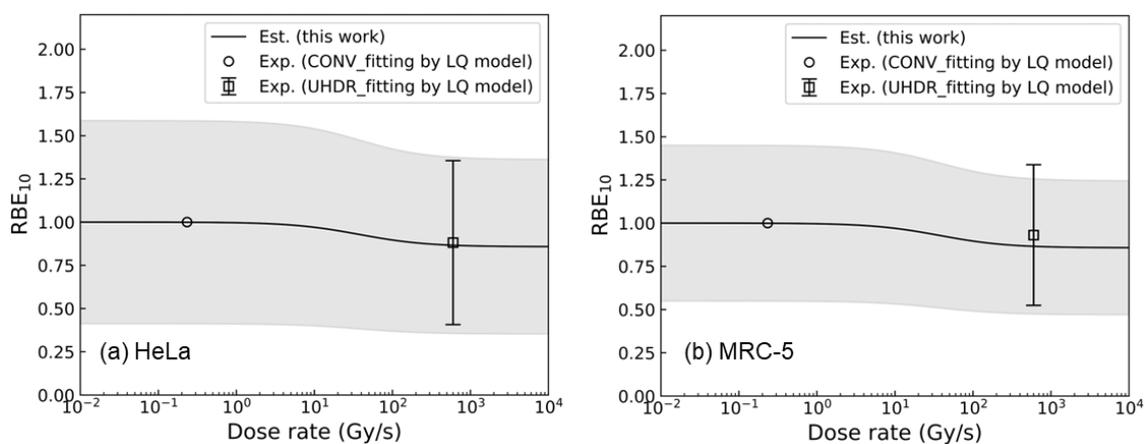


図 3.7 本モデルによる UHDR 照射後の細胞生存率曲線の予測。赤の実線は MCMC シミュレーションによりフィッティングされた CONV 照射後の生存率曲線を表す。青の実線は本モデルで予測された UHDR 照射後の生存率曲線を表す。塗りつぶされた領域は 68%CI である。



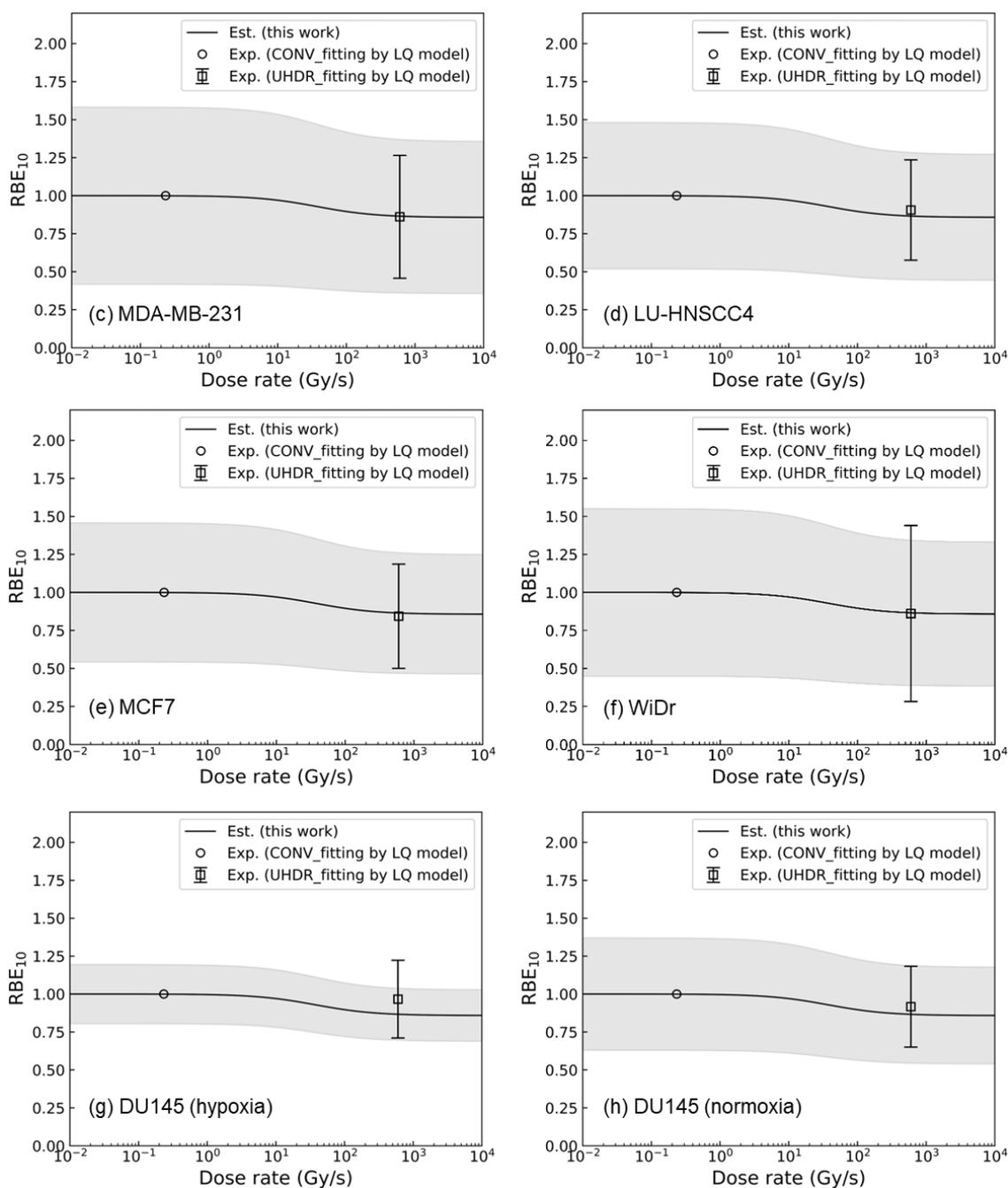


図 3.8 各細胞の生物学的等価線量 RBE 。細胞生存率 10%をエンドポイントとした RBE_{10} を求めた。実線は本モデルの予測値である。塗りつぶし領域は 68%CI である。□で表された点は UHDR 照射後の生存率データを直接フィッティングし得られた RBE_{10} である。

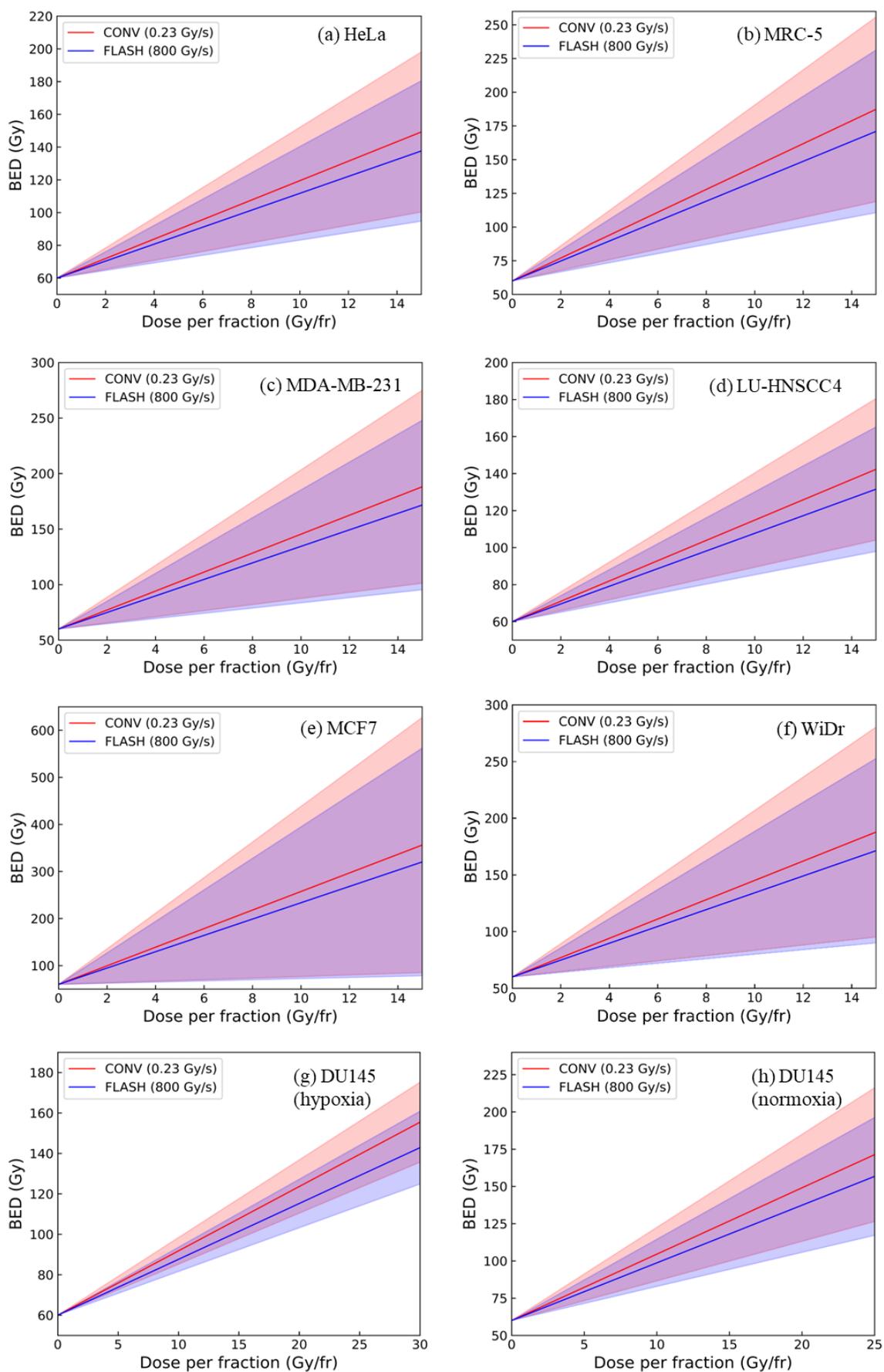


図 3.9 各細胞の BED。青の実線は本モデルで予測した UHDR 照射後の細胞生存率曲線のパラメータから算出した分布である。赤の実線は CONV 照射時の生存率データをフィッティングし得られたパラメータから求めた BED である。塗りつぶし領域は 68%CI である。

3.3. 考察

本研究で開発した *IMK model for UHDR-irradiation* を用いることで、 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ (図 3.6) を使用することで UHDR 照射後の DSB 収量を補正し、CONV 照射後の細胞生存率データから UHDR 照射後の細胞生存率曲線を予測できることがわかった。UHDR 照射後の細胞生存率の実測値がない細胞の種類についても、本モデルを使用することで CONV 照射後のデータから UHDR 照射後の生存率曲線を予測できる。すなわち、CONV 線量率照射の実測データがあれば UHDR 照射後の放射線感受性を表現でき、これは本モデルの大きな利点である。また、本モデルの線量と UHDR 照射後の細胞生存率曲線を表す式は、従来の生存率モデルである LQ モデルの細胞生存率を表す式と同様の関数に変形できることから、RBE (図 3.8) および BED (図 3.9) の予測が可能であることも示された。

本モデルで導出した UHDR 照射後の細胞生存率の平均値は多くの細胞で実験値を再現した。RBE₁₀ についても予測値は実験値を再現し、DSB 収量の相対値を $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ によりモデルに考慮することで UHDR 照射における温存効果の合理的な予測に成功した。従来より、細胞の生存率(細胞致死)は細胞内に発生する DSB が主要因であることが示唆されてきたが、本研究の結果も DSB が主要因であることを示唆している。一方で、MRC-5 と DU145 (normoxia) については平均値と実験値に乖離があったが、予測結果の不確かさ (68%信用区間) 内に実験値が含まれた (図 3.7)。細胞の種類によっては DNA 損傷が主たる細胞死の原因とならない場合もあり [31,32]、DSB 数のみからあらゆる細胞における生物効果を網羅的に予測することには限界があるのかもしれない。より正確な生物効果の予測には、さらなる実験データの蓄積とモデル開発が必要である。また、温存効果が生じるしきい線量に関する議論もあるが [33,34]、本研究で推定された不確かさは大きく、さらに照射パルス内の線量率や細胞の種類、酸素濃度などの種々の要素に依存することから [2,3,33-35]、しきい線量の試算については困難であり、将来的なモデリングの課題は多い。

線量率の増加に伴い $\cdot\text{OH}$ の収率が低下することが示唆されていることから [36,37]、DSB 収率 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ との関係についても評価した (図 3.10)。 $\cdot\text{OH}$ の収率は 7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid (7OH-C3CA) との反応から予測されている [36]。横軸は線量率 0.05、0.8、7.7、80、160 Gy/s に対する $\cdot\text{OH}$ 収率の予測値 [36]、縦軸はこれらの線量率に対応する $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ である。図 3.10 に示される $\cdot\text{OH}$ の収率は、scavenging capacity が $1.36 \times 10^8 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ であるときのデータである。この scavenging capacity は細胞内の $3 \times 10^8 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ に近く、DSB の収率が細胞内と同等レベルである。図 3.10 に示される関係の相関係数は 0.778 と高く、 $\cdot\text{OH}$ の減少が DSB

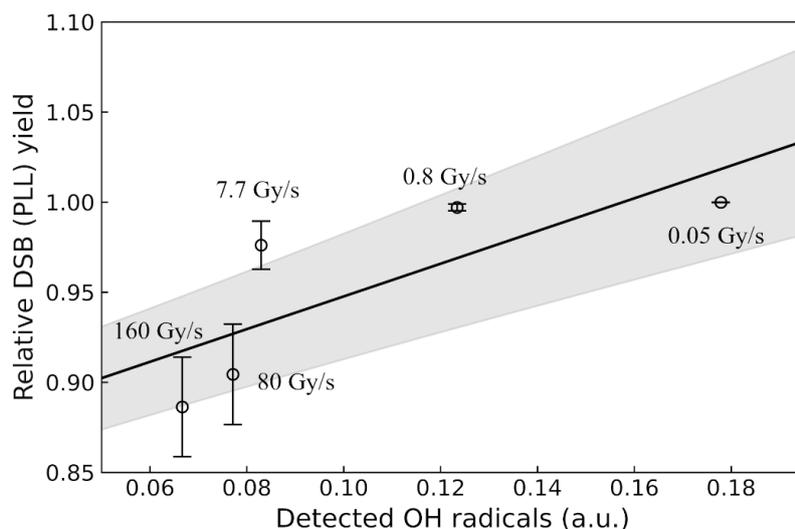


図 3.10 $\cdot\text{OH}$ と $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ の関係。実線は平均値、塗りつぶし領域は 68%CI である。直線の傾きと切片は MCMC シミュレーションにより求めた。 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ は式(3.1)より求めている。 $\cdot\text{OH}$ の収率は 7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid (7OH-C3CA) との反応から予測されている[36]。

の抑制に関わることが示唆される。しかしながら、 $F_{\text{DSB}}(\dot{D})$ の減少が 10–600 Gy/s の範囲で確認されるのに対し (図 3.6)、 $\cdot\text{OH}$ 収率の低下は線量率が 10 Gy/s 以上となるとほぼプラトーになり[36]、各々の減少がみられる線量率の範囲は一致しなかった。この不一致は放射線の種類が関係している可能性もあるが、解明には今後さらなるデータの蓄積が必要である。

上記の物理過程や化学過程のように照射後非常に早期に生じるメカニズムのみならず、FLASH 効果の理解や将来的な治療計画装置用アルゴリズムの開発には、細胞や組織内で化学過程の後に生じる生物学的な過程のモデリングも重要である。正常細胞と腫瘍細胞では UHDR 照射後の DSB 発生数の抑制の程度に違いがあることも示唆されている。本研究ではデータ数が少ないことから、細胞の種類によらずモデル開発を進めたが、今後実験データが蓄積され、正常細胞と腫瘍細胞の DSB 数の減少傾向に有意な差が認められた場合には開発モデルのアップデートが必要である。腫瘍細胞は正常細胞と比較し、細胞内の活性種レベルや $\cdot\text{OH}$ 生成に関わる Fe^{2+} のレベルが高く、一方で抗酸化システムを発達させている[38]。このような正常細胞と腫瘍細胞の根本的な生物学的性質の違いについても焦点を当てる必要がある。また、現在のモデルの対象としている細胞生存率データで予測された腫瘍細胞の温存効果と、動物実験における組織レベルでの抗腫瘍効果の維持は相反するため、現状のモデル予測の結果から後者について説明することが難しい。要因として種々の生物学的メカニズムの関与が予想され、それらのメカニズムをモデリングで考慮することが望ましいが、実験データの蓄積は乏しいため、今後のさらなる実験データの蓄積が望まれる。

参考文献

1. Sato T, Iwamoto Y, Hashimoto S, Ogawa T, Furuta T, Abe S, et al. Features of Particle and Heavy Ion Transport code System (PHITS) version 3.02. *J Nucl Sci Technol.* 2018;55:684–90.
2. Adrian G, Konradsson E, Lempart M, Bäck S, Ceberg C, Petersson K. The FLASH effect depends on oxygen concentration. *Br J Radiol.* 2020;93:20190702.
3. Adrian G, Konradsson E, Beyer S, Wittrup A, Butterworth K T, McMahon S J. Cancer cells can exhibit a sparing FLASH effect at low doses under normoxic in vitro-conditions. *Front Oncol.* 2021;11:686142.
4. Lempart M, Blad B, Adrian G, Bäck S, Knöös T, Petterson K. Modifying a clinical linear accelerator for delivery of ultra-high dose rate irradiation. *Radiother Oncol.* 2019;139:40–5.
5. Sato T, Watanabe R, Niita K. Development of a calculation method for estimating specific energy distribution in complex radiation field. *Radiat Prot Dosimetry.* 2006;122:41–5.
6. Sato T, Kase Y, Watanabe R, Niita K, Sihver L. Biological dose estimation for charged-particle therapy using an improved PHITS code coupled with a microdosimetric kinetic model. *Radiat Res.* 2009;171:107–17.
7. Buonanno M, Grilj V, Brenner D J. Biological effects in normal cells exposed to FLASH dose rate protons. *Radiother Oncol.* 2019;139:51–5.
8. Fouillade C, Curras-Alonso S, Giuranno L, Quelennec E, Heinrich S, Bonnet-Boissinot S, et al. FLASH irradiation spares lung progenitor cells and limits the incidence of radio-induced senescence. *Clin Cancer Res.* 2020;26:1497–506.
9. Levy K, Natarajan S, Wang J, Chow S, Eggold J T, Loo P E, et al. Abdominal FLASH irradiation reduces radiation-induced gastrointestinal toxicity for the treatment of ovarian cancer in mice. *Sci Rep.* 2020;10:21600.
10. Cooper C R, Jones D, Jones G D D, Petersson K. FLASH irradiation induces lower levels of DNA damage ex vivo, an effect modulated by oxygen tension, dose, and dose rate. *Br J Radiol.* 2021;95:20211150.
11. Dokic I, Meister S, Bokceviski J, Tessonnier T, Walsh D, Knoll M, et al. Neuroprotective effects of ultra-high dose rate FLASH Bragg peak proton irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2022;113:614–23.
12. Shi X, Yang Y, Zhang W, Wang J, Xiao D, Ren H, et al. FLASH X-ray spares intestinal crypts from pyroptosis initiated by cGAS-STING activation upon radioimmunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2022;119:e2208506119.
13. Salvatier J, Wiecki T V, Fonnesbeck C. Probabilistic programming in Python using

- PyMC3. *PeerJ Comput Sci.* 2016;2:e55.
14. Hoffman M D, Gelman A. The No-U-Turn sampler: Adaptively setting path lengths in Hamiltonian Monte Carlo. *J Mach Learn Res.* 2014;15:11593–623.
 15. Katona G, Garcia-Bonete M-J, Lundholm I V. Estimating the difference between structure-factor amplitudes using multivariate Bayesian inference. *Acta Cryst.* 2016;A72:406–11.
 16. Hashemi M, Vattikonda A N, Sip V, Diaz-Pier S, Peyser A, Wang H, et al. On the influence of prior information evaluating by fully Bayesian criteria in a personalized whole-brain model of epilepsy spread. *PLoS Comput Biol.* 2021;17:e1009129.
 17. Wang G. Bayesian regression models for ecological count data in PyMC3. *Ecol Inform.* 2021;63:101301.
 18. Zhang L, Wang M, Zhao H, Chang X. Uncertainty quantification for the mechanical behavior of fully grouted rockbolts subjected to pull-out tests. *Comput Geotech.* 2022;145:106445.
 19. Matsuya Y, Sato T, Nakamura R, Naijo S, Date H. A theoretical cell-killing model to evaluate oxygen enhancement ratios at DNA damage and cell survival endpoints in radiation therapy. *Phys Med Biol.* 2020;65:095006.
 20. Jäkel O, Krämer M, Scholz M, Kraft G. Treatment planning for light ions: how to take into account relative biological effectiveness (RBE). *Strahlenther Onkol.* 1999;175 Suppl. 2:12–4.
 21. Zhang G, Huang T-C, Feygelman V, Stevens C, Forster K. Generation of composite dose and biological effective dose (BED) over multiple treatment modalities and multistage planning using deformable image registration. *Med Dosim.* 2010;35:143–50.
 22. Millar W T, Hopewell J W, Paddick I, Lindquist C, Nordström H, Lidberg P, et al. The role of the concept of biologically effective dose (BED) in treatment planning in radiosurgery. *Phys Med.* 2015;31:627–33.
 23. Unkelbach J, Paganetti H. Robust proton treatment planning: Physical and biological optimization. *Semin Radiat Oncol.* 2018;28:88–96.
 24. Inaniwa T., Kanematsu N. Adaptation of stochastic microdosimetric kinetic model for charged-particle therapy treatment planning. *Phys Med Biol.* 2018;63:095011.
 25. Matsuya Y, Kimura T, Date H. Markov chain Monte Carlo analysis for the selection of a cell-killing model under high-dose-rate irradiation. *Med Phys.* 2017;44:5522–32.
 26. Favaudon V, Caplier L, Monceau V, Pouzoulet F, Sayarath M, Fouillade C, et al. Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Sci Transl Med.* 2014;6:245ra93.
 27. Vozenin M -C, Hendry J H, Limoli C L. Biological benefits of ultra-high dose rate

- FLASH radiotherapy: sleeping beauty awoken. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2019;31:407–15.
28. Favaudon V, Labarbe R, Limoli C L. Model studies of the role of oxygen in the FLASH effect. *Med Phys*. 2021;00:1–14.
29. Friedl A A, Prise K M, Butterworth K T, Montay-Gruel P, Favaudon V. Radiobiology of the FLASH effect. *Med Phys*. 2022;49:1993–2013.
30. Limoli C L, Vozenin M-C. Reinventing Radiobiology in the Light of FLASH Radiotherapy. *Annu Rev Cancer Biol*. 2023;7:1–23.
31. Garcia-Barros M., Paris F., Cordon-Cardo C., Lyden D., Rafii S., Haimovitz-Friedman A., et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science (1979)*. 2003;300:1155–9.
32. Wouters B.G. Cell death after irradiation: How, when and why cells die. In: Joiner M.C., van der Kogel A.J., editors. *Basic Clinical Radiobiology*. 5th ed. New York: CRC Press; 2018.
33. Petersson K., Adrian G., Butterworth K., McMahon S.J. A quantitative analysis of the role of oxygen tension in FLASH radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2020;107:539–47.
34. Rothwell B.C., Kirkby N.F., Merchant M.J., Chadwick A.L., Lowe M., Mackay R.I., et al. Determining the parameter space for effective oxygen depletion for FLASH radiation therapy. *Phys Med Biol*. 2021;66:055020.
35. Montay-Gruel P, Acharya M, Jorge P G, Petit B, Petridis I G, Fuchs P et al. Hypofractionated FLASH-RT as an effective treatment against glioblastoma that reduces neurocognitive side effects in mice. *Clin Cancer Res*. 2021;27:775–84.
36. Kusumoto T, Kitamura H, Hojo S, Konishi T, Kodaira S. Significant changes in yields of 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid produced under FLASH radiotherapy conditions. *RSC Adv*. 2020;10:38709–14.
37. Kusumoto T, Inaniwa T, Mizushima K, Sato S, Hojo S, Kitamura H, et al. Radiation chemical yields of 7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid for proton- and carbon-ion beams at ultra-high dose rates: Potential roles in FLASH effects. *Radiat Res*. 2022;198:255–62.
38. Spitz D R, Buettner G R, Petronek M S, St-Aubin J J, Flynn R T, Waldron T J, et al. An integrated physico-chemical approach for explaining the differential impact of FLASH versus conventional dose rate irradiation on cancer and normal tissue responses. *Radiother Oncol*. 2019;139:23–7.

第4章 総括および今後の展望

4.1. 総括

本研究では、CONV 照射後と比較し、UHDR 照射後において減少する初期 DSB 発生数を陽に考慮し、CONV 照射後および UHDR 照射後の細胞生存率を細胞の種類に大きく依存することなく予測可能な数学モデル *IMK model for UHDR-irradiation* を開発した。開発したモデルは、LQ モデルと同様の形に式を変形できることから、RBE や BED の計算が可能であることも示された (3.1.4、3.2.3 項)。In vivo における FLASH 効果の詳細なメカニズムの解明には至らなかったが、放射線の飛跡間相互作用を介した活性種同士の反応 (化学過程) が要因となり減少する DSB 数 (1.4.2 項、1.5 節) を、補正係数 F_{DSB} (式(2.16)) を導入することにより *in vitro* における細胞死の再現に成功した。しかしながら、UHDR 照射後の DSB 数のデータ数は乏しく、線量、酸素濃度、DSB 数の計測タイミングなどの実験条件のばらつきや得られたデータの不確かさが大きいことから、CONV 照射後と比較し UHDR 照射後に DSB 数が真に減少する傾向にあるかは更なる研究が必要である (1.4.3 項)。UHDR 照射において、従来知見と同様に、DSB 数が支配的に細胞生存率に関与するか否かを明らかにするには DSB や細胞死に関する実験データの蓄積は不可欠である。本研究では、実験データ取得時の実験条件 (細胞の種類や放射線の線質) の違いを考慮せず、これまでに報告されてきた複数のデータから線量率と DSB 数の関係 ($F_{\text{DSB}}(\dot{D})$) を求め (図 3.6)、CONV 線量率と比較し、UHDR において DSB 数が減少する傾向を得た。得られた DSB 数の減少傾向を基に本モデルを用いて解析することにより様々な種類の細胞株の UHDR 照射後の生存率の再現に成功したことから、UHDR 照射後の生物効果の増加が主に化学過程における DSB 数の減少に起因することが示唆された。

4.2. 今後の展望

FLASH 効果のメカニズムは実験的に明らかでないが、理論モデルやモンテカルロシミュレーションに基づく予測により、酸素枯渇、飛跡間相互作用、生体分子由来ラジカル同士の再結合などの仮説が関与しうることを示唆する結果が報告されてきた (1.5 節)。本研究では、水中での UHDR 照射と CONV 照射の間で生じる活性種の挙動の違いを示した実験結果 [1,2] とシミュレーションによる予測結果 [3-5] を基に、主に化学過程における DNA の酸化損傷に着目し、細胞死を予測可能な数学モデルの開発を行った。正常細胞と腫瘍細胞間の DSB 生成数の線量率に対する傾向の違いには正常細胞と腫瘍細胞間のレドックス状態の違い (1.4.3 項) が関与していることも考えられる。したがって、化学過程における細胞内での放射線由来の活性種の量や挙動の違いが表れることが想定される。入射粒子や二次的な活性種の挙動を細やかに模擬できるモンテカルロシミュレーションは多くの実験データが蓄積された水への照射を前提とするものが一般的であるが、Baikalov ら [6] がシミュレーションモデルを考案し提唱したように、細胞の活性種を掃気する能力を考慮したシミュレ

ションが、正常細胞と腫瘍細胞の反応の違いをより正確に理解するにあたり将来必要である。UHDR 照射に対するモンテカルロシミュレーションコードの開発は 2020 年頃から活発になったばかりであり、モンテカルロシミュレーションに加え理論的なモデルの開発も、細胞間のレドックス状態の違いによる影響を理解するにあたり必要と考えられる。

また、データ数が少なく不確かさは大きいですが、UHDR 照射と CONV 照射間の DSB 数と細胞生存率の違いに一貫性がない可能性も指摘されている[7]。DSB 数のみならず、他の要因を考慮することも必要である。例えば、UHDR 照射は CONV 照射と比較し脂質過酸化を抑制しやすいことが示されているが (1.4.2.2 目)、脂質過酸化の最終産物である HNE はアポトーシスに関わる BAX や Bcl-xL の発現を制御することで DNA 損傷に依存せずアポトーシスを誘導することが示されている (1.3.6、1.3.7 項)。DSB を介する経路と介さない経路がどの程度細胞死に関与するかは不明であるが、それら生物学的影響因子をパラメータ化し、モデリングすることで新たな発見が期待できると考える。

さらに、活性種の挙動に基づく上記の化学過程に対する仮説は、全てのシミュレーションモデルで肯定されているわけではない (1.5 節)。細胞実験と動物実験の結果に一貫性がないことも示唆されている。少なくとも、本研究の比較検討で使用された腫瘍細胞の生存率データは、組織レベルでみられる抗腫瘍効果の維持に矛盾する。したがって、上記の化学過程までの UHDR 照射と CONV 照射の違いに留まらず、その後の生物学的過程における細胞ならびに組織内の反応の違いにも焦点を当てる必要があると考えられる。

FLASH 効果の理解には上記のように種々の観点から *in silico* モデルを構築することが必要である。同時に実験データをさらに蓄積させ、FLASH 効果に大きく関わる因子を見出すことも必要である。多様な *in silico* モデルの創出には理論的なモデリングの妥当性を裏付けるための実験データの蓄積が急務である。一方で、*in silico* モデルから予測される新たな仮説や既存の仮説に対する理論的背景の研究開発も、また新たな実験モデル創出の契機となりうる。*In silico* モデルと実験モデルが相互に作用し、FLASH 効果に関して実験的に裏付けが可能な理論体系が構築されることで、将来の FLASH-RT 用治療計画装置における生物学的効果が考慮された線量計算アルゴリズムの開発が期待できる。

参考文献

1. Kusumoto T., Kitamura H., Hojo S., Konishi T., Kodaira S. Significant changes in yields of 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid produced under FLASH radiotherapy conditions. RSC Adv. 2020;10:38709–14.
2. Kusumoto T., Inaniwa T., Mizushima K., Sato S., Hojo S., Kitamura H., et al. Radiation chemical yields of 7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid for proton- and carbon-ion beams at ultra-high dose rates: Potential roles in FLASH effects. Radiat Res. 2022;198:255–62.
3. Kreipl MS, Friedland W, Paretzke HG. Interaction of ion tracks in spatial and

- temporal proximity. *Radiat Environ Biophys.* 2009;48:349–59.
4. Ramos-Méndez J, Domínguez-Kondo N, Schuemann J, McNamara A, Moreno-Barbosa E, Faddegon B. LET-dependent intertrack yields in proton irradiation at ultra-high dose rates relevant for FLASH therapy. *Radiat Res.* 2020;194:351–62.
 5. Alanazi A, Meesungnoen J, Jay-Gerin JP. A computer modeling study of water radiolysis at high dose rates. relevance to flash radiotherapy. *Radiat Res.* 2021;195:149–62.
 6. Baikalov A, Abolfath R, Schüler E, Mohan R, Wilkens J J, Bartzsch S. Intertrack interaction at ultra-high dose rates and its role in the FLASH effect. *Front Phys.* 2023;11:1215422.
 7. Limoli C L, Vozenin M-C. Reinventing Radiobiology in the Light of FLASH Radiotherapy. *Annu Rev Cancer Biol.* 2023;7:1–23.

謝辞

本論文の執筆にあたり、ご指導、ご協力をいただいた多くの方々に感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、常日頃より熱心なご指導と激励を賜り、また様々なお取り計らいをいただきました福永久典准教授に、心より感謝申し上げます。本論文をご精読いただき、ご助言を賜りました神島保教授、石川正純教授に深く御礼申し上げます。松谷悠佑講師には、モデルの構築などについて様々のご助言をいただき、大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

量子科学技術研究開発機構の楠本多聞氏には、化学的な観点からラジカルの挙動について貴重なご意見をいただき、論文執筆にご協力いただきました。深く感謝いたします。

日本医療大学保健医療学部診療放射線学科の教員の皆様には、社会人学生として研究が遂行できるよう様々な面で支えていただきました。厚く感謝いたします。

そして、社会人大学院生として研究することに理解を示し、協力してくれた家族に心から感謝します。

最後に、筆者が学部生の頃から修士課程を経て博士後期課程に至るまで、温かく多くのご指導とご鞭撻を賜りました伊達広行先生に、心より御礼申し上げます。

業績リスト

学術論文

1. Shiraishi Y, Matsuya Y, Kusumoto T, Fukunaga H. Modeling for predicting survival fraction of cells after ultra-high dose rate irradiation. *Phys. Med. Biol.* 2024, 69, 015017.
2. Shiraishi Y, Matsuya Y, Fukunaga H. Possible mechanisms and simulation modeling of FLASH radiotherapy. *Radiol. Phys. Technol.* Published online: 06 January 2024.

学会発表

1. Shiraishi Y, Date H. Acquisition of physical quantities of electrons for modeling the FLASH effect. The 5th symposium of Faculty of Health Sciences (FHS) 2021. 9. 17–18., Sapporo (online) (Poster).
2. Shiraishi Y, Matsuya Y, Fukunaga H, Date H. A model for estimating FLASH effect on cell surviving fraction based on ROS concentration. The Radiation Research Society's 68th Annual Meeting 2022. 10. 15–19, Waikoloa Village (Poster).
3. 白石 祐太, 松谷 悠佑, 楠本 多聞, 福永 久典. FLASH 放射線治療における DNA 損傷応答に基づく生存率曲線予測モデル. 第 60 回日本放射線腫瘍学会 生物部会学術大会 2023. 6. 23, 京都 (口頭発表).
4. Shiraishi Y, Matsuya Y, Kusumoto T, Fukunaga H. A predictive model of survival curve in ultra-high dose-rate irradiation based on DNA damage response. The 6th symposium of Faculty of Health Sciences (FHS) 2023. 10. 20., Sapporo (Poster).

付録 A UHDR-CONV 間の DSB 数補正係数導出コード

```
#####
# Integrated microdosimetric-kinetic (IMK) model for UHDR-irradiation
# Estimation of the relation between dose rate and Fdsb
#####
# Graduate school of Health Sciences Hokkaido University
# Created by Shiraishi Y.
#####

import math as mt
import numpy as np
import sympy as sym
import pymc3 as pm
import arviz as az
import pandas as pd
import seaborn as sns
import itertools
import statistics as st
import matplotlib.pyplot as plt
import matplotlib.font_manager as fm
import statsmodels.api as sm
import warnings
import matplotlib.ticker as ptick

warnings.simplefilter('ignore', FutureWarning)
from scipy.stats.mstats import mquantiles

# Input parameters
IN = 10000          # number of sample
chains = 1         # number of chain
tune = 1000       # number of burn in
cores = 3         # number of core
xlim_min = 0.01   # minimum value of relative OH yield for depicting graph
xlim_max = 10**4  # maximum value of relative OH yield for depicting graph
ylim_min = 0.     # minimum value of Fdsb for depicting graph
ylim_max = 1.5    # maximum value of Fdsb yield for depicting graph

# Input preparation
data = pd.read_csv('DR-DSB.csv')
data1 = pd.read_csv('DR-DSB1.csv')
data2 = pd.read_csv('DR-DSB2.csv')
data3 = pd.read_csv('DR-DSB3.csv')
#data4 = pd.read_csv('DR-DSB4.csv')
data5 = pd.read_csv('DR-DSB5.csv')
data6 = pd.read_csv('DR-DSB6.csv')
data7 = pd.read_csv('DR-DSB7.csv')
data8 = pd.read_csv('DR-DSB8.csv')
data9 = pd.read_csv('DR-DSB9.csv')
data10 = pd.read_csv('DR-DSB10.csv')
data11 = pd.read_csv('Dose rate-OH.csv')
D0 = data['DR']
D01 = data1['DR']
D02 = data2['DR']
D03 = data3['DR']
#D04 = data4['DR']
D05 = data5['DR']
D06 = data6['DR']
D07 = data7['DR']
D08 = data8['DR']
D09 = data9['DR']
D10 = data10['DR']
SF0 = data['DSB']
SF01 = data1['DSB']
```

```

SF02 = data2['DSB']
SF03 = data3['DSB']
#SF04 = data4['DSB']
SF05 = data5['DSB']
SF06 = data6['DSB']
SF07 = data7['DSB']
SF08 = data8['DSB']
SF09 = data9['DSB']
SF10 = data10['DSB']
sigma = data['SD']
sigma1 = data1['SD']
sigma2 = data2['SD']
sigma3 = data3['SD']
#sigma4 = data4['SD']
sigma5 = data5['SD']
sigma6 = data6['SD']
sigma7 = data7['SD']
sigma8 = data8['SD']
sigma9 = data9['SD']
sigma10 = data10['SD']
drOH = data11['DR']
cOH = data11['G value rel']
sdOH = data11['SD']

D = []
SF = []

size1 = 1
for i in range(len(D0)):
    D.append(np.random.normal(loc=D0[i], scale=0., size=size1))
    SF.append(np.random.normal(loc=SF0[i], scale=0., size=size1))

SF = np.array(SF)
for i in range(len(SF)):
    for j in range(size1):
        if SF[i, j] < 0:
            k = 0
            while k < 10000:
                np.random.seed(seed=k)
                SF[i, j] = np.random.normal(loc=SF0[i], scale=0, size=1)
                if SF[i, j] >= 0.:
                    break

D = list(itertools.chain.from_iterable(D))
SF = list(itertools.chain.from_iterable(SF))
D = pd.DataFrame(D, columns = ['D'])
SF = pd.DataFrame(SF, columns = ['SF'])

# Model preparation and parameter estimation by NUTS
with pm.Model() as model:
    a = pm.Uniform('a', upper=100., lower=0.)
    b = pm.Uniform('b', upper=100., lower=0.)
    eps = pm.Uniform('eps', upper=10., lower=0.)

    # likelihood
    mu = pm.Deterministic('mu', b*(a+D)/(a*b+D))
    SF_lik = pm.Normal('lik', mu=mu, sigma=eps, observed=SF)

    # MCMC simulation (NUTS)
    trace = pm.sample(IN, chains=chains, tune=tune,
                      cores=cores, random_seed=rs,
                      target_accept=0.95)

```

```

ppc = pm.sample_posterior_predictive(trace, var_names = ¥
                                   ["a", "b", "eps", "lik"])

print(az.waic(trace, scale='deviance'))

# Output

fig, az = plt.subplots(constrained_layout=True)
fig, ax = plt.subplots(constrained_layout=True)
ax.set_xlim(xlim_min, xlim_max)
ax.set_ylim(ylim_min, ylim_max)
plt.xticks(fontsize=12)
plt.yticks(fontsize=12)
plt.rcParams['xtick.direction']='in'
plt.rcParams['ytick.direction']='in'
plt.errorbar(D01, SF01, yerr=sigma1, capsize=5, label='Buonanno et al. 2019 (p)',
             fmt='o', ms=7, ecolor='k', mec='k', mew=1, lw=1, mfc='None')
plt.errorbar(D02, SF02, yerr=sigma2, capsize=5, label='Fouillade et al. 2019 (e)',
             fmt='^', ms=7, ecolor='k', mec='k', mew=1, lw=1, mfc='None')
plt.errorbar(D03, SF03, yerr=sigma3, capsize=5, label='Levy et al. 2020 (e)',
             fmt='s', ms=7, ecolor='k', mec='k', mew=1, lw=1, mfc='None')
plt.errorbar(D05, SF05, yerr=sigma5, capsize=5, label='Cooper et al. 2022 (e)',
             fmt='x', ms=7, ecolor='k', mec='k', mew=1, lw=1, mfc='None')
plt.errorbar(D06, SF06, yerr=sigma6, capsize=5, label='Dokic et al. 2022 (p)',
             fmt='v', ms=7, ecolor='k', mec='k', mew=1, lw=1, mfc='None')
plt.errorbar(D10, SF10, yerr=sigma10, capsize=5, label='Adrian et al. 2021 (e)',
             fmt='p', ms=7, ecolor='k', mec='k', mew=1, lw=1, mfc='None')
plt.errorbar(D07, SF07, yerr=sigma7, capsize=5, label='Shi et al. 2022 (X)',
             fmt='d', ms=7, ecolor='k', mec='k', mew=1, lw=1, mfc='None')

Dx = np.linspace(0.01, 10000, 100000)
a_mean = st.mean(ppc['a'])
b_mean = st.mean(ppc['b'])
a_sd = st.stdev(ppc['a'])
b_sd = st.stdev(ppc['b'])
al = a_mean-a_sd
ah = a_mean+a_sd
bl = b_mean-b_sd
bh = b_mean+b_sd
print('-----')
print('mean', 'a:', a_mean, ' b:', b_mean)
print('-----')
print('sd ', 'a:', a_sd, ' b:', b_sd)
print('-----')
print('1σ HDI of a:', al, '-', ah)
print('-----')
print('1σ HDI of b:', bl, '-', bh)
print('-----')
ab_mean = a_mean*b_mean
mu_pp = b_mean*(a_mean+Dx)/(ab_mean+Dx)
da = b_mean*((ab_mean+Dx)-b_mean*(a_mean+Dx))/((ab_mean+Dx)**2)
db = ((a_mean+Dx)*(ab_mean+Dx)-ab_mean*(a_mean+Dx))/((ab_mean+Dx)**2)
SF_sd = np.sqrt((da*a_sd)**2+(db*b_sd)**2)
DR = 800
mu_800 = b_mean*(a_mean+DR)/(ab_mean+DR)
da800 = b_mean*((ab_mean+DR)-b_mean*(a_mean+DR))/((ab_mean+DR)**2)
db800 = ((a_mean+DR)*(ab_mean+DR)-ab_mean*(a_mean+DR))/((ab_mean+DR)**2)
sd800 = np.sqrt((da800*a_sd)**2+(db800*b_sd)**2)
print('wFC =', mu_800, ' ± ', sd800)

SF_for_Chi2_R2 = b_mean*(a_mean+D0)/(ab_mean+D0)
prochi2 = (SF0-SF_for_Chi2_R2)/sigma
Chi2 = np.dot(prochi2,prochi2)/len(prochi2)

```

```

proR2_1 = SF0-SF_for_Chi2_R2
proR2_2 = SF0-np.mean(SF0)
R2 = 1 - np.dot(proR2_1, proR2_1)/np.dot(proR2_2, proR2_2)
print(' X ^2 = ', Chi2)
print(' R2 = ', R2)

plt.xscale('log')
ax.set_xlabel('Dose rate (Gy/s)', fontsize=14)
ax.set_ylabel('Relative number of DSBs', fontsize=14)

ax.legend(fontsize=10, loc=3)
ax.plot(Dx, mu_pp, color='k')
low = mu_pp - SF_sd
high = mu_pp + SF_sd
ax.fill_between(Dx, low, high, color='gray', alpha=0.2)
plt.savefig("Dose rate vs. Ndsb_Alper.tiff", format="tiff", dpi=1000)

```

付録 B 細胞生存率、RBE、BED 導出コード

```
#####
# Integrated microdosimetric-kinetic (IMK) model for UHDR-irradiation
# 1. Fitting of IMK model to experimental data of CONV dose rate
# 2. Estimation of cell survival curve, RBE, and BED with Fdsb
#####
# Graduate school of Health Sciences Hokkaido University
# Created by Shiraishi Y.
#####

import math as mt
import numpy as np
import pymc3 as pm
import arviz as az
import pandas as pd
import itertools
import statistics as st
import matplotlib.pyplot as plt
import warnings
warnings.simplefilter('ignore', FutureWarning)
from scipy.stats.mstats import mquantiles

#=====
# Input parameters (cell specific)
#=====
xlim_min = 0.          # minimum value of dose for depicting graph
xlim_max = 15.         # maximum value of dose for depicting graph
ylim_min = 0.00001    # minimum value of SF for depicting graph
ylim_max = 1.2         # maximum value of SF for depicting graph
BED_max = 220         # maximum value of BED for depicting graph
wr = 0.866             # Fdsb
wr_sd = 0.028          # sd of Fdsb
yd = 1.6241           # dose averaged lineal energy [keV/ $\mu$ m]
yd_sd = .0067         # uncertainty of yd ( $1\sigma$ )
nd = 60               # total dose for calculating BED
rd = .5               # radius of domain [ $\mu$ m]
rho = 1.              # density of domain [g/cm3]
e = 1.602*10**-19    # elementary charge
IN = 10000            # number of sample
chains = 1            # number of chain
tune = 1000           # number of burn in
cores = 3             # number of core
rs = 0                # random seed

#=====
# Gamma
#=====
gamma = yd*1000*e/(10**-15*mt.pi*rd**2)
gamma_sd = 1000*e/(10**-15*mt.pi*rd**2)*yd_sd
print('  $\gamma$  = ', gamma, '  $\pm$  ', gamma_sd)

#=====
# File reading & Set variables of readings
#=====

dataC = pd.read_csv('Ave_' + CellName + '_CONV.csv')
dataF = pd.read_csv('Ave_' + CellName + '_FLASH.csv')

DoseC0 = dataC['Dose']
sdDoseC = st.stdev(DoseC0)
```

```

SFC0 = dataC['SF']
sigmaC = dataC['sigma']
DoseF0 = dataF['Dose']
sdDoseC = st.stdev(DoseF0)
SFF0 = dataF['SF']
sigmaF = dataF['sigma']
logSFC0 = -np.log(SFC0)
logSFF0 = -np.log(SFF0)
logSFCsd = -np.log(sigmaC)
logSFFsd = -np.log(sigmaF)

#####
# Model preparation and parameter estimation by NUTS
#####

with pm.Model() as modelC:
    # Prior distribution
    a0C = pm.Uniform('a0C', upper=1., lower=0.)
    bC = pm.Uniform('bC', upper=1., lower=0.)
    epsC = pm.HalfNormal('epsC', sigma=st.stdev(logSFC0))

    # likelihood
    muC = pm.Deterministic('muC', (a0C+gamma*bC)*DoseC0+bC*DoseC0**2)
    likC = pm.Normal('likC', mu=muC, sd=epsC, observed=logSFC0)

    # MCMC simulation (NUTS)
    traceC = pm.sample(IN, chains=chains, tune=tune,
                       cores=cores, random_seed=rs,
                       target_accept=0.95)

    # Generate random variables from posterior distribution
    ppcC = pm.sample_posterior_predictive(traceC, var_names = ¥
                                         ["a0C", "bC", "epsC", "likC"])

with pm.Model() as modelF:
    # Prior distribution
    a0F = pm.Uniform('a0F', upper=1., lower=0.)
    bF = pm.Uniform('bF', upper=1., lower=0.)
    epsF = pm.HalfNormal('epsF', sigma=st.stdev(logSFF0))

    # likelihood
    muF = pm.Deterministic('muF', (a0F+gamma*bF)*DoseF0+bF*DoseF0**2)
    likF = pm.Normal('likF', mu=muF, sd=epsF, observed=logSFF0)

    # MCMC simulation (NUTS)
    traceF = pm.sample(IN, chains=chains, tune=tune,
                       cores=cores, random_seed=rs,
                       target_accept=0.95)

    # Generate random variables from posterior distribution
    ppcF = pm.sample_posterior_predictive(traceF, var_names = ¥
                                         ["a0F", "bF", "epsF", "likF"])

#####
# Output
#####

print('WAIC for CONV')
print(az.waic(traceC, scale='deviance'))
print('WAIC for FLASH')
print(az.waic(traceF, scale='deviance'))

fig, az = plt.subplots(constrained_layout=True)

```

```

fig, ax = plt.subplots(constrained_layout=True)
ax.set_xlim(xlim_min, xlim_max)
ax.set_ylim(ylim_min, ylim_max)
plt.xticks(fontsize=12)
plt.yticks(fontsize=12)
plt.rcParams['xtick.direction']='in'
plt.rcParams['ytick.direction']='in'
fig.set_size_inches(5.1, 4)
ax.errorbar(DoseC0, SFC0, yerr=sigmaC, capsize=5, label='Exp (CONV)',
            fmt='o', ms=6, ecolor='r', mec='r', mew=1, lw=1, mfc='None')
ax.errorbar(DoseF0, SFF0, yerr=sigmaF, capsize=5, label='Exp (FLASH)',
            fmt='s', ms=6, ecolor='b', mec='b', mew=1, lw=1, mfc='None')

dosex = np.linspace(0, xlim_max, 1000)
a0C = ppcC["a0C"]
bC = ppcC["bC"]
aC = a0C+gamma*bC
a0F = ppcF["a0F"]
bF = ppcF["bF"]
aF = a0F+gamma*bF
aM = wr*a0C+gamma*wr**2*bC
bM = wr**2*bC
a0C_mean = st.mean(a0C)
bC_mean = st.mean(bC)
aC_mean = a0C_mean+gamma*bC_mean
a0F_mean = st.mean(a0F)
bF_mean = st.mean(bF)
aF_mean = a0F_mean+gamma*bF_mean
aM_mean = wr*a0C_mean+gamma*wr**2*bC_mean
bM_mean = wr**2*bC_mean
a0C_sd = st.stdev(a0C)
bC_sd = st.stdev(bC)
aC_sd = np.sqrt(a0C_sd**2+(gamma*bC_sd)**2+(bC_mean*gamma_sd)**2)
a0F_sd = st.stdev(a0F)
bF_sd = st.stdev(bF)
aF_sd = np.sqrt(a0F_sd**2+(gamma*bF_sd)**2+(bF_mean*gamma_sd)**2)
aM_sd = np.sqrt((wr*a0C_sd)**2+(gamma*wr**2*bC_sd)**2 +
                (2*gamma*wr*bC_mean*wr_sd)**2+(wr**2*bC_mean*gamma_sd)**2)
bM_sd = np.sqrt((wr**2*bC_sd)**2+(2*wr*bC_mean*wr_sd)**2)

print('-----')
print(' a0C = ', a0C_mean, ' ± ', a0C_sd)
print(' aC = ', aC_mean, ' ± ', aC_sd)
print(' bC = ', bC_mean, ' ± ', bC_sd)
print('-----')
print(' a0F = ', a0F_mean, ' ± ', a0F_sd)
print(' aF = ', aF_mean, ' ± ', aF_sd)
print(' bF = ', bF_mean, ' ± ', bF_sd)
print('-----')
print(' aM = ', aM_mean, ' ± ', aM_sd)
print(' bM = ', bM_mean, ' ± ', bM_sd)

SF_for_Chi2_R2 = np.exp(-aM_mean*DoseF0-bM_mean*DoseF0**2)
prochi2 = (SFF0-SF_for_Chi2_R2)
Chi2 = np.dot(prochi2, prochi2)/len(prochi2)
proR2_1 = SFF0-SF_for_Chi2_R2
proR2_2 = SFF0-np.mean(SFF0)
R2 = 1 - np.dot(proR2_1, proR2_1)/np.dot(proR2_2, proR2_2)
print('-----')
print(' X^2 = ', Chi2)
print(' R^2 = ', R2)

plt.yscale('log')
mu_C = -aC_mean*dosex-bC_mean*dosex**2

```

```

mu_F = -aF_mean*dosex-bF_mean*dosex**2
mu_M = -aM_mean*dosex-bM_mean*dosex**2
sd_C = np.sqrt((aC_sd*dosex)**2+(dosex**2*bC_sd)**2)
sd_F = np.sqrt((aF_sd*dosex)**2+(dosex**2*bF_sd)**2)
sd_M = np.sqrt((aM_sd*dosex)**2+(dosex**2*bM_sd)**2)
low_C = np.exp(mu_C-sd_C)
high_C = np.exp(mu_C+sd_C)
low_F = np.exp(mu_F-sd_F)
high_F = np.exp(mu_F+sd_F)
low_M = np.exp(mu_M-sd_M)
high_M = np.exp(mu_M+sd_M)
mu_C = np.exp(mu_C)
mu_F = np.exp(mu_F)
mu_M = np.exp(mu_M)
ax.plot(dosex,mu_C, color='r', label='Est. (CONV)', lw=1.)
ax.plot(dosex,mu_M, color='b', label='Est. (FLASH)', lw=1.)
ax.fill_between(dosex, low_C, high_C, color='r', alpha=0.2)
ax.fill_between(dosex, low_M, high_M, color='b', alpha=0.2)
ax.set_xlabel('Dose (Gy)', fontsize=14)
ax.set_ylabel('Surviving fraction', fontsize=14)
ax.legend(fontsize=11, loc='lower left')
plt.savefig('Surv_' + CellName + '.tiff', format="tiff", dpi=1000)

#=====  

# Relative Biological Effectiveness  

#=====

A_mean = 43.5851
B_mean = .8597
AB_mean = A_mean*B_mean
A_sd = 26.5656
B_sd = .0291
DR = np.linspace(.01, 10**4, 100000)
wr_mean = B_mean*(A_mean+DR)/(AB_mean+DR)
Eawr = B_mean*((AB_mean+DR)-B_mean*(A_mean+DR))/((AB_mean+DR)**2)*A_sd
Ebwr = ((A_mean+DR)*(AB_mean+DR)-AB_mean*(A_mean+DR))/((AB_mean+DR)**2)*B_sd
wr_sd = np.sqrt(Eawr**2+Ebwr**2)
aw_mean = a0C_mean+gamma*wr_mean*bC_mean
aw_sd = np.sqrt(a0C_sd**2+gamma**2*((wr_mean*bC_sd)**2+(bC_mean*wr_sd)**2))

ln = np.log(.1)
sqC = np.sqrt(aC_mean**2-4*bC_mean*ln)
sqF = np.sqrt(aF_mean**2-4*bF_mean*ln)
sqM = np.sqrt(aw_mean**2-4*bC_mean*ln)
sqC_sd = np.sqrt((aC_mean/sqC*aC_sd)**2+(-2*ln/sqC*bC_sd)**2)
sqF_sd = np.sqrt((aF_mean/sqF*aF_sd)**2+(-2*ln/sqF*bF_sd)**2)
sqM_sd = np.sqrt((aw_mean/sqM*aw_sd)**2+(-2*ln/sqM*bC_sd)**2)
nume = sqC-aC_mean
deno = sqM-aw_mean
nume_sd = np.sqrt(((aC_mean/np.sqrt(aC_mean**2-4*ln*bC_mean)-1) *  

aC_sd)**2+(-2*ln/np.sqrt(aC_mean**2-4*ln*bC_mean)*bC_sd)**2)
deno_sd = np.sqrt(((aw_mean/np.sqrt(aw_mean**2-4*ln*bC_mean)-1) *  

aw_sd)**2+(-2*ln/np.sqrt(aw_mean**2-4*ln*bC_mean)*bC_sd)**2)
RBEM = nume/deno*wr_mean
RBEM_sd = np.sqrt((-nume/deno**2*wr_mean*deno_sd)**2 *  

+ (wr_mean/deno*nume_sd)**2+ (nume/deno*wr_sd)**2)

D10C = (sqC-aC_mean)/2/bC_mean
D10F = (sqF-aF_mean)/2/bF_mean
D10M = (sqM-aM_mean)/2/bM_mean
D10C_sd = np.sqrt(((aC_mean/sqC-1)/2/bC_mean*aC_sd)**2 *  

+ ((-sqC*(2*ln*bC_mean+1)-aC_mean)/(2*bC_mean**2)*bC_sd)**2)
D10F_sd = np.sqrt(((aF_mean/sqF-1)/2/bF_mean*aF_sd)**2 *  


```

```

+ (- (sqF*(2*ln*bF_mean+1)-aF_mean)/(2*bF_mean**2)*bF_sd)**2)
D10M_sd = np.sqrt(((aM_mean/sqM-1)/2/bM_mean*aM_sd)**2 ¥
+ (- (sqM*(2*ln*bM_mean+1)-aM_mean)/(2*bM_mean**2)*bM_sd)**2)
RBEF = D10C/D10F
RBEF_sd = np.sqrt((1/D10F*D10C_sd)**2+ (-D10C/D10F**2*D10F_sd)**2)
low = RBEM - RBEM_sd
high = RBEM + RBEM_sd

fig, ay = plt.subplots(constrained_layout=True)
ay.plot(DR, RBEM, color='k', label='Est. (this work)', lw=1)
ay.fill_between(DR, low, high, color='gray', alpha=0.2)
ay.set_xlim(0.01, 10**4)
ay.set_ylim(0., 2.2)
plt.xticks(fontsize=11)
plt.yticks(fontsize=11)
plt.rcParams['xtick.direction']='in'
plt.rcParams['ytick.direction']='in'
plt.xscale('log')
ay.set_xlabel('Dose rate (Gy/s)', fontsize=14)
ay.set_ylabel('RBE$_{10}$', fontsize=14)
fig.set_size_inches(5.1, 4)
plt.plot(0.2333, 1., 'ko', ms=6, label= ¥
'Exp. (CONV_fitting by LQ model)', mec='k', mew=1, lw=1, mfc='None')
plt.errorbar(600, RBEF, yerr=RBEF_sd, capsize=5, fmt='s', ¥
ms=6, label='Exp. (UHDR_fitting by LQ model)',
ecolor='k', mec='k', mew=1, lw=1, mfc='None')
ay.legend(fontsize=11)
plt.savefig('RBE_' + CellName + '.tiff', format="tiff", dpi=1000)

DR = 800
wr_mean = B_mean*(A_mean+DR)/(AB_mean+DR)
Eawr = B_mean*((AB_mean+DR)-B_mean*(A_mean+DR))/((AB_mean+DR)**2)*A_sd
Ebwr = ((A_mean+DR)*(AB_mean+DR)-AB_mean*(A_mean+DR))/((AB_mean+DR)**2)*B_sd
wr_sd = np.sqrt(Eawr**2+Ebwr**2)
aw_mean = a0C_mean+gamma*wr_mean*bC_mean
aw_sd = np.sqrt(a0C_sd**2+gamma**2*((wr_mean*bC_sd)**2+(bC_mean*wr_sd)**2))
ln = np.log(.1)
sqC = np.sqrt(aC_mean**2-4*bC_mean*ln)
sqF = np.sqrt(aF_mean**2-4*bF_mean*ln)
sqM = np.sqrt(aw_mean**2-4*bC_mean*ln)
sqC_sd = np.sqrt((aC_mean/sqC*aC_sd)**2+(-2*ln/sqC*bC_sd)**2)
sqF_sd = np.sqrt((aF_mean/sqF*aF_sd)**2+(-2*ln/sqF*bF_sd)**2)
sqM_sd = np.sqrt((aw_mean/sqM*aw_sd)**2+(-2*ln/sqM*bC_sd)**2)
nume = sqC-aC_mean
deno = sqM-aw_mean
nume_sd = np.sqrt(((aC_mean/np.sqrt(aC_mean**2-4*ln*bC_mean)-1)*aC_sd)**2 ¥
+(-2*ln/np.sqrt(aC_mean**2-4*ln*bC_mean)*bC_sd)**2)
deno_sd = np.sqrt(((aw_mean/np.sqrt(aw_mean**2-4*ln*bC_mean)-1)*aw_sd)**2 ¥
+(-2*ln/np.sqrt(aw_mean**2-4*ln*bC_mean)*bC_sd)**2)
RBEM = nume/deno*wr_mean
RBEM_sd = np.sqrt((-nume/deno**2*wr_mean*deno_sd)**2 ¥
+ (wr_mean/deno*nume_sd)**2+ (nume/deno*wr_sd)**2)
ErrRBE = (RBEM-RBEF)/RBEF*100
print(' SF(800 Gy/s) =', RBEM, ' ±', RBEM_sd)
print(' Error of RBE =', ErrRBE, '%')

#=====
# Biologically effective dose
#=====

abC = aC_mean/bC_mean
abC_sd = np.sqrt((1/bC_mean*aC_sd)**2+ (-aC_mean/bC_mean**2*bC_sd)**2)
abM = aM_mean/bM_mean

```

```

abM_sd = np.sqrt((1/bM_mean*aM_sd)**2+(-aM_mean/bM_mean**2*bM_sd)**2)
abF = aF_mean/bF_mean
abF_sd = np.sqrt((1/bF_mean*aF_sd)**2+(-aF_mean/bF_mean**2*bF_sd)**2)
print('α/β (CONV, IMKM) = ', abC, '±', abC_sd)
print('α/β (FLASH, IMKM) = ', abF, '±', abF_sd)
print('α/β (FLASH, IMKMF) = ', abM, '±', abM_sd)

DPF = np.linspace(0., 50, 1000) # dose per fraction
bedC = nd*(1+DPF/abC)
bedC_sd = np.sqrt((-nd*DPF*bC_mean/aC_mean**2*aC_sd)**2+(nd*DPF/aC_mean*bC_sd)**2)
bedM = nd*(1+DPF/abM)
bedM_sd = np.sqrt((-nd*DPF*bM_mean/aM_mean**2*aM_sd)**2+(nd*DPF/aM_mean*bM_sd)**2)

fig, av = plt.subplots(constrained_layout=True)
av.set_xlim(0., xlim_max)
av.set_ylim(50., BED_max)
plt.xticks(fontsize=11)
plt.yticks(fontsize=11)
plt.rcParams['xtick.direction']='in'
plt.rcParams['ytick.direction']='in'
av.set_xlabel('Dose per fraction (Gy/fr)', fontsize=14)
av.set_ylabel('BED (Gy)', fontsize=14)
fig.set_size_inches(5.1, 4)
av.plot(DPF, bedC, color='r', lw=1, label='CONV (0.23 Gy/s)')
low = bedC - bedC_sd
high = bedC + bedC_sd
av.fill_between(DPF, low, high, color='r', alpha=0.2)
av.plot(DPF, bedM, color='b', lw=1, label='FLASH (800 Gy/s)')
low = bedM - bedM_sd
high = bedM + bedM_sd
av.fill_between(DPF, low, high, color='b', alpha=0.2)
av.legend(fontsize=11, loc='upper left')
plt.savefig('BED_' + CellName + '.tiff', format="tiff", dpi=1000)

```