

마우스모델을 이용한 고속중성자선의 성장지연 및 산소증강비의 측정

엄근용*, 우홍균***, 박혜진**, 권은경**, 예성준**, 이동환[§]

*서울대학교 의과대학 방사선종양학교실, †서울대학교 의학연구원 방사선의학연구소

‡서울대학교 의과대학 암연구소, §원자력의학원 방사선종양학과

2007년 11월 14일 접수 / 2007년 11월 30일 채택

중성자선은 고 LET (linear energy transfer) 방사선으로 X선이나 감마선 등의 저 LET 방사선보다 세포에 더욱 큰 손상을 입힌다. 중성자에 의한 손상은 일반적으로 세포에 있어서 치명적이며, 중성자선은 X선이나 감마선에 비하여 직접작용을 통하여 세포사를 일으키는 경향이 있다. 본 연구에서는 고속중성자선의 성장지연비 및 산소증강비를 동물실험을 통하여 측정하고자 하였다. BALB-c 마우스의 우측 하지에 EMT-6 세포주를 이식한 후 종양의 평균용적이 200-300mm³ 가 되었을 때 X선 및 고속중성자선을 조사하였다. 정상산소환경 및 저산소환경의 종양에 대하여 X선은 0, 11, 15.4 Gy를 조사하였고 고속중성자선은 0, 5, 7, Gy를 조사하였다. 방사선조사 후에는 종양의 용적을 주 3회 측정하였다. 정상산소환경 실험군의 경우 저산소환경 실험군에 비하여 X선 11 Gy를 조사하였을 때 성장지연비가 1.34였고, 15.4 Gy를 조사하였을 때 1.33였다. 고속중성자선을 조사한 경우 정상산소환경 실험군이 저산소환경 실험군에 비하여 고속중성자선 5 Gy를 조사하였을 때 성장지연비는 0.94였고, 고속중성자선 7 Gy를 조사하였을 때 0.98였다. 고속중성자선의 산소증강비는 0.97이었다. 고속중성자선은 X선에 비하여 저산소환경에 있는 종양의 성장억제에 있어서 보다 효과적이었다.

중심어 : 싸이클로트론, 마우스, 고속중성자선, 산소증강비, 방사선치료

1. 서론

저산소상태의 종양은 전체 종양의 1-15%를 차지하며[1], X선에 내성을 나타내어 방사선을 이용한 종양의 치료에 있어서 과거로부터 문제가 되고 있다. 특히 자궁경부암의 경우는 저산소상태의 종양이 방사선 치료 후 국소제어율의 감소, 원격전이 증가 또는 생존율과 연관되어있음이 이미 임상데이터 [2,3]를 통하여 입증되어있다.

근래에는 저산소상태의 종양에 대한 방사선 치료효율을 높이는 하나의 방편으로서 높은 LET (linear energy transfer)를 가지는 방사선치료에 대한 관심이 높아지고 있다. 고속중성자선(fast neutron)은 높은 LET를 가지는 방사선으로 1930년대부터 암의 치료에 이용되어왔다. 고속중성자선에 의한 DNA 손상은 X선에 의한 DNA 손상보다 복구가 어렵고[4,5] 세포주기의 영향을 덜 받는 방사선생물학적 특성을 보이며, 임상적으로도 이미 몇몇 암에 있어서 그 효과가 입증되었다[6,7,8].

국내에서 중성자선은 1960년 이래로 방사선생물학, 방사선치료 및 재료시험연구 등에 이용되었으며, 1986년부터는 원자력병원에서 싸이클로트론에서 발생하는 고속중성자선

을 이용하여 연구 및 치료가 시행되었다[9,10,11]. 원자력병원의 저자들에 의하면 질제불가능하거나 국소재발한 직장암 환자를 대상으로 고속중성자치료를 하였을 때, 중증합병증 발생률 및 합병증으로 인한 사망률이 일반 방사선치료에 비하여 높았다[12]. 일반적으로 중성자치료 시 이러한 합병증에 대한 고위험성 및 최근에는 하드웨어적인 문제로 인하여 국내에서는 중성자치료는 시행하지 않고 있으며, 현재는 주로 동위원소 생산 및 재료물성 연구를 위한 용도로 국한되어 이용되고 있다[13].

그러나 1990년 대 후반부터 독일과 미국 등지에서 고속중성자선을 이용하여 육종을 치료한 고무적인 결과[14,15]가 발표되고 있으며 점점 고속중성자선 치료에 대한 관심이 다시 커져가고 있다. 또한 중성자 치료를 중단하였던 NIU (Northern Illinois University)에서는 2004년부터 고속중성자치료를 재개하고 있다.

따라서 고속중성자선의 의학적 이용을 위한 기반확충의 한 가지로 원자력의학원 MC50 싸이클로트론에서 발생하는 최대 에너지 35 MeV의 고속중성자선(fast neutron)에 대한 생물학적 특성을 파악하고자 연구를 계획하였다.

저자들의 앞선 연구에서는 EMT-6 세포주를 이용한 시험관 실험을 통하여 MC50 싸이클로트론의 선량 및 물리적 특성을 파악하여 보고하였는데, MC50 싸이클로트론에 의한 세포

책임저자 : 우홍균, wuhg@snu.ac.kr, 서울대학교 의과대학 방사선종양학교실

의 생존곡선은 일반적인 중성자선에 의한 세포의 생존분획 곡선보다 완만한 어깨영역(shoulder)를 가지고 있었고, 생존곡선이 선형이차함수 모델에 잘 들어맞았다[13]. 이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 마우스모델을 이용한 동물실험으로 통하여 고속중성자선의 성장지연비(growth delay ratio) 및 산소증강비(oxygen enhancement ratio)를 측정하고자 하였다.

2. 재료와 방법

2.1 마우스모델

생후 5주령의 수컷 BALB-c 마우스(체중 20-25 gm)를 이용하였다. 실험 전 일주일 간의 적응 기간을 거친 후 총 36마리의 마우스를 한 케이지 당 네 마리 혹은 다섯 마리로 나누어 사육하였으며, 물과 사료는 마음대로 먹도록 하였고 12시간 간격으로 밤낮을 조절하였다. EMT-6 세포주를 fluocytometer를 이용하여 약 2×10^6 개의 암세포와 배지와 함께 혼합하여 50 μ 로 만들고, 미세주사기(insulin syringe)로 마우스의 우측 하지(hind thigh)에 근육내 주사(intramuscular injection)하였다. 5-7일 후 이식한 종양의 크기가 200-300 mm³ 도달하였을 때 각각의 종양의 크기를 측정하여 다음의 계산식으로 종양의 용적을 계산하였다.

$V = 0.5 \times D1 \times D2$ (V = 종양의 용적, D1 = 종양의 장경, D2 = 종양의 단경)

2.2 실험군

고속중성자선 0 Gy, 5 Gy, 7 Gy 총 3단계의 선량에 대하여 정상산소환경 및 저산소환경으로 구분하여 총 6개의 실험군을 설정하고, 각각의 실험군은 종양의 용적의 합이 비슷하도록 마우스 6마리를 배정하였다. 마우스를 고정하기 위하여 tiletamine/zolazepam (Zoletil)을 10배 희석한 용액 0.2 ml 또는 ketamine 100mgkg⁻¹를 복강 내 주입하여 마취하였다. 저산소환경이 필요한 실험군의 경우 고속중성자선 또는 X선 조사 전에 마취된 마우스의 우측 하지 근위부를 고무밴드를 이용하여 10분 간 결찰하고 틀에 고정하였다. 총 결찰시간은 70분으로 유지하였다.

2.3 고속중성자선의 조사

MC50 싸이클로트론에서 생성된 35 MeV 에너지의 양성자(proton)를 15 mm 두께의 베릴리움(Beryllium) 표적에 부딪쳐서 생성되는 고속중성자를 이용하였다.

종양에서부터 1cm 이상의 거리를 완전히 덮을 수 있는 두께 2cm의 bolus를 얹었으며, 종양에서부터 최소한 1cm 이상의 거리를 포함하도록 여유를 두고 방사선 조사야(field)를 설정하였다. 이때 방사선 조사야의 크기는 27x17 cm였고, 선원에서 표면까지 거리(SSD)는 150cm였다. 정상산소환경 및 저산소환경 실험군에 각각 0, 5, 7 Gy를 조사하였다.

방사선조사 후 실험 다음날부터 월요일, 수요일, 금요일

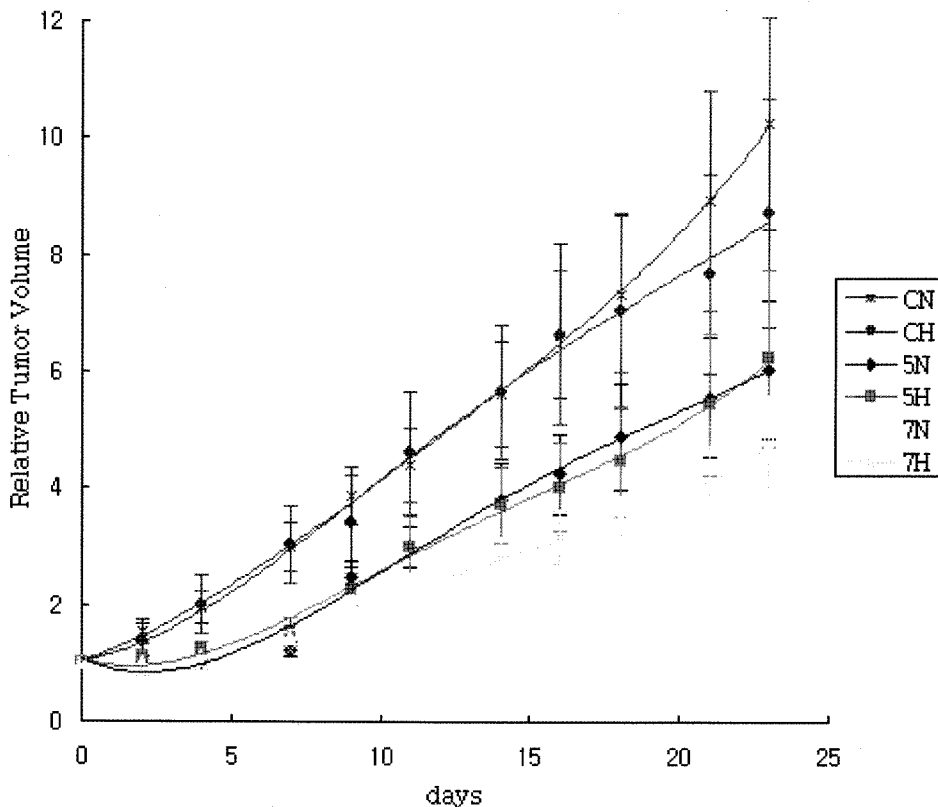


Fig. 1. Growth pattern of EMT-6 tumors after exposure to 0, 5, 7 Gy of fast neutron beam revealed dose-response relationship. No difference was found in the growth pattern of tumors between normoxic and hypoxic group. The data represent the mean and SE for three independent experiments. 5N = 5 Gy of fast neutron with normoxia, 5H = 5 Gy of fast neutron with hypoxia, 7N = 7 Gy of fast neutron with normoxia, 7H = 7 Gy of fast neutron with hypoxia, CN = control group with normoxia, CH = control group with hypoxia.

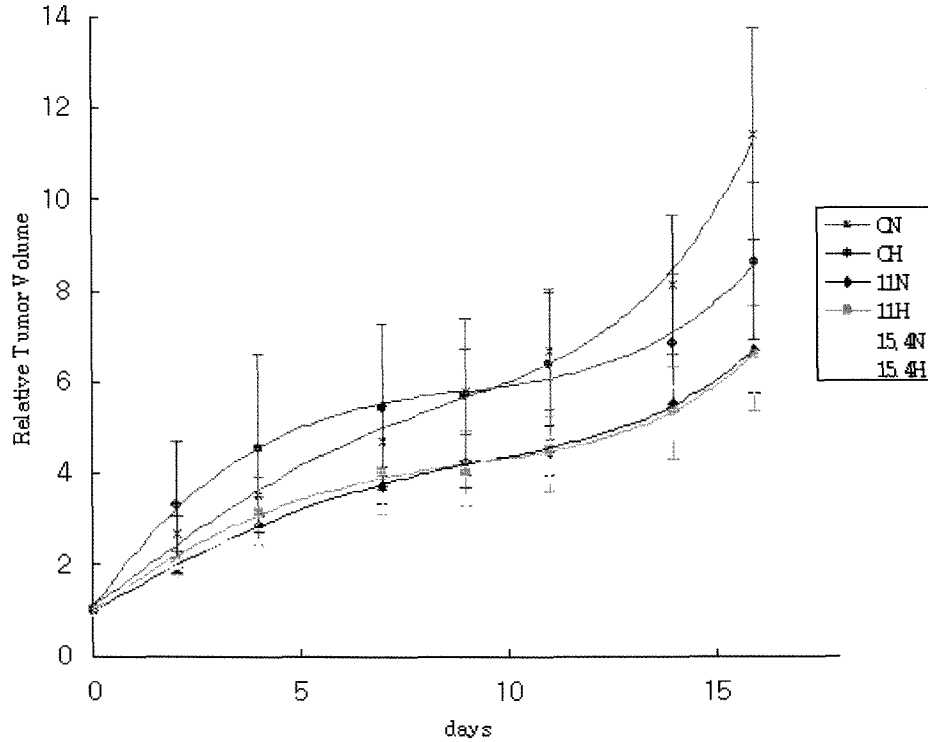


Fig. 2. Growth pattern of EMT-6 tumors after exposure to 0, 11, 15.4 Gy of X-ray. The data represent the mean and SE for three independent experiments. 11N = 11 Gy of X-ray with normoxia, 11H = 11 Gy of X-ray with hypoxia, 15.4N = 15.4 Gy of X-ray with normoxia, 15.4H = 15.4 Gy of X-ray with hypoxia, CN = control group with normoxia, CH = control group with hypoxia.

같은 시간에 전자버니어 캘리퍼(Vernier caliper)를 이용하여 10² mm 단위까지 두 명의 연구자가 각각 종양의 장경 및 단경을 측정하였으며 측정기간은 총 3주였다.

2.4 X선 조사

X선 실험은 고속중성자실험과 같은 과정을 거쳐서 총 6개의 실험군에 대하여 종양의 이식부터 마취 및 결찰을 수행하였다. 각각의 실험군에는 마우스를 6마리씩 배정하였다.

X선 발생장치로는 4MV 선형가속기를 이용하였다. Bolus 및 방사선 조사야의 설정 등은 고속중성자 실험과 동일하였으나, 선원부터 표면까지 거리(SSD)는 100 cm였다. X선 조사량은 대조군, 실험 1군 및 2군에 각각 0, 11.0, 15.4 Gy를 조사하였으며 총 3주 간 종양의 용적을 측정하였다.

2.5 분석방법

마우스모델 동물실험에서는 종양의 반응은 성장지연을 관찰함으로써 평가하였다. 방사선 조사 전의 종양의 초기용적을 기준으로 용적이 4배가 되는데 필요한 시간을 성장지연으로 정의하였다. 또한 성장지연비(relative growth delay ratio)는 성장지연을 대조군의 성장지연으로 나누어 구하였다.

성장지연비 = 실험군의 성장지연 / 대조군의 성장지연

종양의 초기용적의 차이에 따른 종양의 상대적 부피증가를 보정하고자 상대적 종양용적을 이용하였다. 상대적 종양용적은 측정된 종양의 용적을 초기용적으로 나눈 값으로 정의하였다. 또한 방사선 조사일로부터 16일 째 되는 날의 종양

의 상대적 종양용적 및 대조군의 상대적 종양용적을 이용하여 다음과 같은 공식으로 상대적 종양용적비를 구하였다.

$$\text{종양용적비} = \frac{\text{실험군의 상대적 종양용적}}{\text{대조군의 상대적 종양용적}}$$

산소증강비는 동일한 상대적 종양용적비를 얻기 위한 저산소환경실험군의 방사선량을 정상산소환경실험군의 방사선량으로 나누어서 구하였다.

3. 결과

X선 및 고속중성자선을 조사한 후 측정된 종양의 전반적인 성장패턴은 그림 1 및 2와 같았다. 종양의 성장지연을 평가하였을 때 결과는 표1 및 표2와 같았다. X선 11Gy와 15.4Gy를 조사한 실험군 모두에서 저산소환경 실험군이 정상산소환경 실험군보다 성장지연이 짧았으며, 이는 성장지연비에서 더욱 잘 나타났다. 정상산소환경 실험군의 경우 저산소환경 실험군에 비하여 X선 11 Gy를 조사하였을 때 성장지연비가 1.34였고, 15.4 Gy를 조사하였을 때 1.33였다. 고속중성자를 조사한 실험군의 경우 저산소환경 실험군과 정상산소환경 실험군 간에 성장지연 및 성장지연비 모두 큰 차이가 없었다. 정상산소환경 실험군이 저산소환경 실험군에 비하여 고속중성자 5 Gy를 조사하였을 때 성장지연비는 0.94였고, 고속중성자 7 Gy를 조사하였을 때 0.98였다. 상대적 종양용적비를 고속중성자선의 총흡수선량에 따라서 도시하였을 때, 결과는 그림 3과 같았다. 고속중성자선을 조사하였을 때 정상

Table 1. Tumor Growth Delay and Relative Growth Delay Ratio of Tumors with X-ray

Dose (Gy)	Growth Delay (day)*		Relative Growth Delay Ratio	
	Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia
0.0	5.31 ± 1.22	6.43 ± 2.02	1.00	1.00
11.0	6.54 ± 1.60	5.77 ± 2.59	1.23	0.90
15.4	9.41 ± 0.77	8.55 ± 2.53	1.77	1.33

* mean ± SE

Table 2. Tumor Growth Delay and Relative Growth Delay Ratio of Tumors with Fast Neutron Beam

Dose (Gy)	Growth Delay (day)*		Relative Growth Delay Ratio	
	Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia
0.0	10.76 ± 2.29	10.97 ± 2.29	1.00	1.00
5.0	17.43 ± 1.27	19.35 ± 1.88	1.62	1.76
7.0	21.62 ± 2.05	22.63 ± 2.39	2.01	2.06

* mean ± SE

산소환경 실험군과 저산소환경 실험군 간의 상대적 종양용적비의 차이가 미미하였다. 방사선량과 상대적 종양용적비의 직선관계를 가정하고 그래프를 이용하여 계산한 고속중성자선의 산소증강비는 0.97이었다.

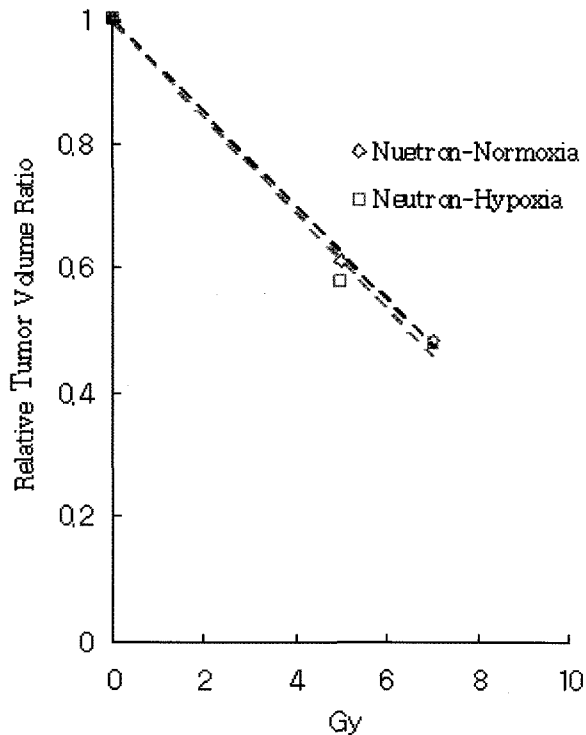


Fig. 3. Relative tumor volume ratio measured at the time of 16th day after neutron beam irradiation. The oxygen enhancement ratio (OER) of fast neutron beam was 0.97.

4. 고찰 및 결론

성장지연은 동물실험에서 흔히 쓰이는 지표로서 비교적 간단하게 측정이 가능하지만 그 종료점(end point)의 정의에 따라 달라질 수 있는 값이다. 본 실험에서는 종료점을 초기 종양용적의 4배가 되는 시점을 기준으로 하여 정의하였는데 이미 발표된 다른 논문들[16,17,18,19]을 참고할 때 적절한 값이라 할 수 있다. 이를 기준으로 하여 비교한 종양의 성장지연값은 X선을 조사했을 경우 정상산소환경에서 저산소환경보다 크게 나타나서 저산소상태에 있을 때 종양이 X선에 더욱 저항성이 있음을 나타내고 있다. 또한 성장지연비(relative growth delay ratio)를 구해보았을 때도 마찬가지로 결과를 나타냈다. 그러나 고속중성자선을 조사하였을 경우에는 성장지연 및 성장지연비 두 지표 모두 산소상태에 따른 차이가 없었다.

동물실험에서 사용한 X선의 방사선량은 이전 실험[13]에서 밝힌 고속중성자선의 EMT-6세포주에 대한 생물학적효과를 참조하여 결정하였다. 고속중성자선의 상대적생물학적효과(relative biologic effectiveness)를 2.2로 적용하여 0, 5, 7 Gy의 고속중성자선에 대응하도록 하여 X선의 방사선량은 0, 11, 15.4 Gy로 결정하였다.

마우스의 다리를 결찰하여 종양의 저산소상태를 유도하는 시간은 여러 논문[19,20,21]마다 다른 기준으로 하고 있다. 본 연구에서는 총 결찰시간을 70분으로 하였는데 이러한 이유는 고속중성자선의 선량률(dose rate)이 낮기 때문이었다. 7 Gy의 중성자선을 조사하는데 걸리는 시간은 대략 60분 정도였으며 방사선 조사 전 10분 결찰을 더하여 총 70분을 결찰 시간으로 정하였다.

본실험에서 상대적 종양용적비를 이용하여 계산한 고속중성자선의 산소증강비는 0.97로 X선의 일반적인 산소증강

비가 2.0-3.0 입22,23을 감안할 때, 고속중성자선이 저산소상태에 있는 종양에 대하여 X선보다 효과적으로 작용한다는 것을 알 수 있었다. 또한 이는 다른 이들의 연구결과(23,24)와도 잘 일치한다.

결론적으로 동물실험을 통하여 측정된 고속중성자선의 성장지연비 및 산소증강비는 1에 근접한 값을 가졌고 산소환경의 영향을 적게 받는 것을 나타냈다. 따라서 고속중성자선은 X선에 저항성을 나타내는 저산소환경의 종양의 성장억제에 있어서 X선보다 효과적이라 할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 과학기술부 원자력연구기반확충사업 연구비 2005-04752 및 2005년도 과학기술부 원자력연구기반확충사업 연구비 2006-00946의 지원으로 이루어진 것임.

참고문헌

1. van Putten LM. Tumour reoxygenation during fractionated radiotherapy; studies with a transplantable mouse osteosarcoma. *Eur J Cancer*. 1968;4:172-82.
2. Hockel M, Knoop C, Schlenger K, Vormdran B, Baussmann E, Mitze M, Knapstein PG, Vaupel P. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother Oncol*. 1993;26:45-50.
3. Fyles AW, Milosevic M, Wong R, Kavanagh MC, Pintilie M, Sun A, Chapman W, Levin W, Manchul L, Keane TJ, Hill RP. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiother Oncol*. 1998;48:149-56.
4. Furono I, Yada T, Matsudaira H, Maruyama T. Induction and repair of DNA strand breaks in cultured mammalian cells following fast neutron irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Std Phys Chem med* 1979;36:639-48.
5. Peak MJ, Wang L, Hill CK and Peak JG. Comparison of repair of DNA double-strand breaks caused by neutron or gamma radiation in cultured human cells. *Int J Radiat Biol* 1991;60:891-8.
6. Chapman JD. Biophysical models of mammalian cell inactivation by radiation. In: Meyn RE and Withers HR, *Radiation Biology in Cancer Research*. New York: Raven Press. 1980:21-32.
7. Schmitt G and Wambersie A. Review of the clinical results of fast neutron therapy. *Radiother Oncol* 1990;17:47-56.
8. Wambersie A. Fast neutron therapy at the end of 1988-a survey of the clinical data. *Strahlenther Onkol*. 1990;166:52-60.
9. Chai JS, An DH, Chang HS, Hong BH, Hong S, Jung IS, Kang J, Kim JH, Kim Y, Lee MY, Suk J, Shim HH, Park CS, Yang TK. Operation Experience of MC50 cyclotron, KIRAMS. *Proceedings of APAC 2004*, Gyeongju, Korea, 67-9.
10. Yoo SY, Noh SW, Chung HW, Cho CK, Koh KH, Bak JS, Eenmaa J. Dosimetric characteristics of the KCCH

- neutron therapy facility. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 1988;6:85-91.
11. Yoo SY, Koh KH, Cho CK, Park WY, Yun HG, Shim JW. Neutron Therapy of Unresectable and Recurrent Rectal Cancer. *J Korean Soc Ther Radiol*. 1993 Jun;11:127-32.
12. Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE. Tumor measurement in the nude mouse. *J Surg Oncol*. 1986;31:229-34.
13. Eom KY, Wu HG, Park HJ, Huh SN, Ye SJ, Lee DH, Park SW. Evaluation of Biological Characteristics of Neutron Beam Generated from MC50 Cyclotron. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol*. 2006;24:280-4.
14. Schwartz DL, Einck J, Bellon J, Laramore GE. Fast neutron radiotherapy for soft tissue and cartilaginous sarcomas at high risk for local recurrence. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;50:449-56.
15. Prott FJ, Micke O, Haverkamp U, Potter R, Willich N. Treatment results of fast neutron irradiation in soft tissue sarcomas. *Strahlenther Onkol*. 1999;175 Suppl 2:76-8.
16. Kim IH. Effect of tumor hypoxia on efficacy of Tirapazamine combined with fractionated irradiation in mouse tumors. *J Korean Soc Ther Radiol* 2000;18:120-6.
17. Duchesne GM, Peacock JH. Radiation cell survival and growth delay studies in multicellular spheroids of small-cell lung carcinoma. *Int J Radiat Biol* 1987;51:365-75.
18. Ishii T, Ando K, Koike S. Biological effectiveness of fast neutrons on a murine osteosarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989 Mar;16(3):693-9.
19. Ando K, Koike S, Ohira C, Chen YJ, Nojima K, Ando S, Ohbuchi T, Kobayashi N, Shimizu W, Urano M. Accelerated reoxygenation of a murine fibrosarcoma after carbon-ion radiation. *Int J Radiat Biol* 1999;75:505-12.
20. Baumann M, Appold S, Zimmer J, Scharf M, Beuthien-Baumann B, Dubben HH, Enghardt W, Schreiber A, Eicheler W, Petersen C. Radiobiological hypoxia, oxygen tension, interstitial fluid pressure and relative viable tumour area in two human squamous cell carcinomas in nude mice during fractionated radiotherapy. *Acta Oncol*. 2001;40:519-28.
21. Ferrario A, von Tiehl KF, Rucker N, Schwarz MA, Gill PS, Gomer CJ. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res*. 2000;60:4066-9.
22. Palcic B, Skarsgard LD. Reduced oxygen enhancement ratio at low doses of ionizing radiation. *Radiat Res*. 1984;100:328-39.
23. Broerse JJ, Barendsen GW, van Kersen GR. Survival of cultured human cells after irradiation with fast neutrons of different energies in hypoxic and oxygenated conditions. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1968;13:559-72.
24. Gragg RL, Humphrey RM, Meyn RE. The response of Chinese hamster ovary cells to fast neutron radiotherapy beams. I. Relative biological effectiveness and oxygen enhancement ratio. *Radiat Res*. 1976;65:71-82.

Measurement of Growth Delay and the Oxygen Enhancement Ratio of Fast Neutron Beam Using Mouse Model System.

Keun-Yong Eom, M.D.¹, Hong-Gyun Wu, M.D.,Ph.D.^{1,2,3}, Hye Jin Park⁴, Eun-Kyung Kwon⁴, Sung-Joon Ye, Ph.D.^{1,2} and Dong Han Lee, Ph.D.⁵

¹Department of Radiation Oncology, Seoul National University College of Medicine

²Institute of Radiation Medicine, Medical Research Center, Seoul National University

³Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine

⁴Department of Radiation Oncology, the Korea Institute of Radiological and Medical Sciences

Abstract - Neutrons are high LET (linear energy transfer) radiation and cause more damage to the target cells than x-rays or gamma rays. The damage from neutrons is generally considered fatal to a cell and neutrons have a greater tendency to cause cell death through direct interaction on DNA. We performed experiments to measure growth delay ratio and oxygen enhancement ratio (OER) in mouse model system. We inoculated EMT-6 cells to the right hind leg of BALB-c mouse and X-rays and neutron beams were given when the average volume of tumors reached 200-300 mm³. We irradiated 0, 11, 15.4 Gy of X-ray and 0, 5, 7 Gy of fast neutron beam at normoxic and hypoxic condition. The volume of tumors was measured 3 times per week. In x-ray experiment, growth delay ratio was 1.34 with 11 Gy and 1.33 with 15.4 Gy in normoxic condition compared to in hypoxic condition, respectively. In neutron experiment, growth delay ratio was 0.94 with 5 Gy and 0.98 with 7 Gy, respectively. The OER of neutron beam was 0.97. The neutron beam was more effective than X-ray in the control of hypoxic tumors.

Keywords : Cyclotron, Mouse, Neutron, OER, Radiation therapy