

단일조사와 분할조사시 마우스 공장 소낭선세포의 방사선효과에 관한 실험적 연구

한양대학교 의과대학 방사선과학교실

高 秉 熙 · 咸 蒼 谷 · 金 禎 鎮

서울대학교 의과대학 치료방사선과학교실

朴 一 贊

= Abstract =

Radiation Effect on Mouse Jejunal Crypt Cells by Single and Split Irradiation

Byung Hee Koh, M.D., Changg Kok Hahm, M.D., Jung Jin Kim M.D.

Department of Radiology, College of Medicine, Han Yang University

Chan Il Park, M.D.

Department of Therapeutic Radiology, College of Medicine, Seoul National University

To determine the dose-survival and repair characteristics of the jejunal crypt cells, experimental study was carried out using total 70 mice.

Single or split irradiations of 1,100 to 2,200 rad were delivered to whole bodies of C₅₇ BL mice, using a cesium 137 animal irradiator and those mice were sacrificed after 90 hours.

The number of regenerating crypts per jejunal circumference was counted by a jejunal crypt cell assay technique and dose-response curve was measured.

The results were as follows:

1. The average number of jejunal crypts per circumference in control group was 140.

In a single irradiation group, the number of regenerated jejunal crypts was, 125, 56, 2 in each subgroup of 1,100 rad, 1,400 rad and 1,800 rad respectively.

In split irradiation group, it was 105, 44, 2 in each subgroup of 1,400rad 1,800rad and 2,200 rad respectively.

2. Mean lethal dose of mouse jejunal crypt cell was 167 and 169 rad respectively in a single and split irradiation.

3. Repair dose of sublethal damage was 280 rad.

4. Sublethal damage was completely repaired within 4 hours between the split dose of irradiation.

서 론

방사선 조사방법에는 단일조사(Single irradiation)와 분할조사(Split irradiation)가 있다.

단일조사와 분할조사시 방사선 생물학적 효과에 큰 차이가 있다는 점에 대하여 Regaud¹⁾가 1922년 이론적인 근거를 제시한 후 1934년 분할조사에 대한 Coutard²⁾의 임상적용이 보고되면서부터 분할조사는 방사선치료의 주 방법으로 이용되어 왔다.

분할조사시 방사선 생물학적 잇점은 분할조사간격내에 일어나는 조직세포 증치사손상(sublethal damage)의 회복(repair)이 정상조직에서 더 현저하다는 점과, 세포분열 과정에서의 재분포(redistribution), 재군집화(repopulation)와 중앙조직에서 일어나는 재산소화(reoxygenation)가 방사선 효과를 높여준다는 점이다³⁾.

이와같은 분할조사의 잇점을 연구하기 위하여서는 생체실험을 통하여 선량반응곡선(dose response curve)을 작성하여야 하며, 이 선량반응곡선을 작성하기 위

Table 1. Experimental Design

Group	Radiation Dose(rad)	No. of Mice
Control	—	5
Single Dose	1,100	5
	1,200	5
	1,300	5
	1,400	5
	1,500	5
	1,600	5
	1,700	5
Split Dose (4hrs interval)	700 ~ 700	5
	800 ~ 800	5
	900 ~ 900	5
	1,000~1,000	5
	1,100~1,100	5

한 방법에는 비장 집락 측정법⁴⁾(spleen colony assay system), 마우스 피부 상피측정법⁵⁾(survival curve for mouse skin cells), 마우스 공장소낭선 측정법(survival curve for crypt cells of the mouse jejunum)등이 있다. 이중 마우스 공장소낭선 측정법은 1970년 Withers와 Elkind⁶⁾에 의해 고안된 후 분할조사, 조사선량을 (radiation dose rate), 분할조사간격에 따른 감수성의 비교 및 방사선의 종류에 따른 방사선의 생물학적 효과의 측정 등에 널리 이용되어 왔다⁷⁻¹²⁾.

저자는 마우스 공장소낭선 측정법을 이용하여 마우스 공장소낭선 세포의 선량반응곡선을 작성하여 마우스 공장소낭선 세포의 방사선 감수성과, 단일조사와 분할조사시의 방사선 감수성의 비교 및 준치사손상의 회복선량(quasithreshold dose, Dq)을 측정하여 임상에 응용하고자 본 실험을 시행하였다.

실험재료 및 방법

1. 재 료

생후 8~12주된 체중 18~22 gm의 C₅₇BL 순종마우스 암컷 70마리를 사용하였으며, 모두 배합사료로 사육되었다.

70마리의 마우스를 대조군 5마리, 단일조사군 40마리, 분할조사군 25마리로 구분하였고, 단일조사군은 조사한 방사선량에 따라 1,100 rad 부터 100 rad 씩 증

Table 2. Regenerating Crypts per Circumference in a Single Irradiation Group

Radiation(rad)	Crypts per Circumference
1,100	125±12*
1,200	79±13
1,300	77±14
1,400	56±70
1,500	38±9
1,600	31±7
1,700	13±3
1,800	2±1

* One Standard Deviation

가시켜 1,800 rad 까지 5마리씩 8소군으로 구분하였고, 분할조사군은 1,400 rad 부터 200rad 씩 증가시켜 2,200 rad 까지 역시 5마리씩 5소군으로 나누었다(Table 1).

2. 방 법

방사선조사는 동물실험용 세시움 방사선조사기(美 J.L Shepherd & Asso. 제품)를 사용하였으며, 선원의 방사능은 7,800 Ci 였고, 열형광선량계(Thermoluminescent dosimeter)로 측정된 루싸이트통(Lucite box)내의 분당 선량을(dose rate/min)은 920 rad 였다.

방사선조사방법은 마우스를 세시움조사기내의 회전 루싸이트통내에 넣고, 행동이 제한되지 않은 상태에서 조사를 실시하였고, 조사시 루싸이트통이 선원을 축으로 회전하여 마우스 전신에 균일하게 방사선이 조사되었다(Fig. 1).

단일조사군에서는 정해진 조사량을 한번에 조사하였고, 분할조사군에서는 총 조사량을 두번으로 나누어 포유동물 정상조직에서 방사선조사 후 준치사손상 회복이 이루어지는 4시간을 기준으로 2회 분할조사하였다.

대조군은 방사선조사없이 실험군은 방사선조사후 90 시간이 경과한 후 경부탈구(cervical dislocation)로 도살 개복하여 유문부에서 6 cm 이하 부위에서 2cm 길이의 공장을 절단 적출하였다. 적출된 공장을 24시간 동안 포르말린에 고정된 후, 공장의 횡단면상을 현미경으로 관찰하기 위하여 1 cm 간격으로 횡절단하여 마우스당 2개의 조직블록을 만들고 H-E 염색하여 조직표본을 제작하였다.

소낭선세포 측정법은 Withers와 Elkind의 방법에 의하였다. 먼저 대조군의 조직표본(Fig. 2)에서 측정 한 환상면당(per circumference) 소낭선의 수는 140±10



Fig. 1. Irradiation Setup with Cesium-137 Animal Irradiator



Fig. 2. Transverse section of mouse jejunum;
Unirradiated control showing the density of crypts at the base of the villi. There was an average of 140 crypts per entire circumference.

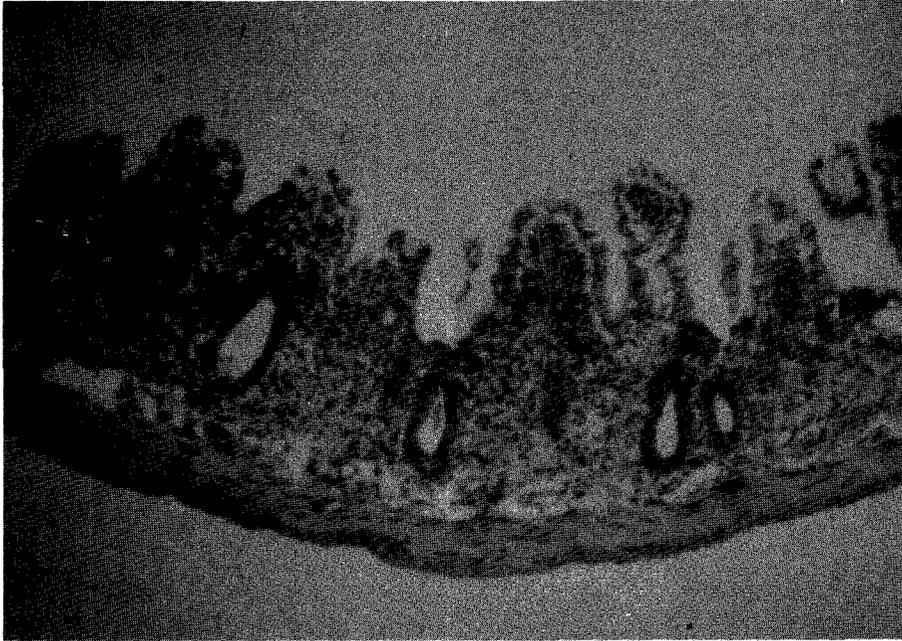


Fig. 3. Transverse section of mouse jejunum, 90 hours after 1500 rad irradiation;
About 38 regenerating crypts per circumference were seen. On the basis of Poisson statistics, it was expected that 38 residual crypts represented the survival of about 44 cells.

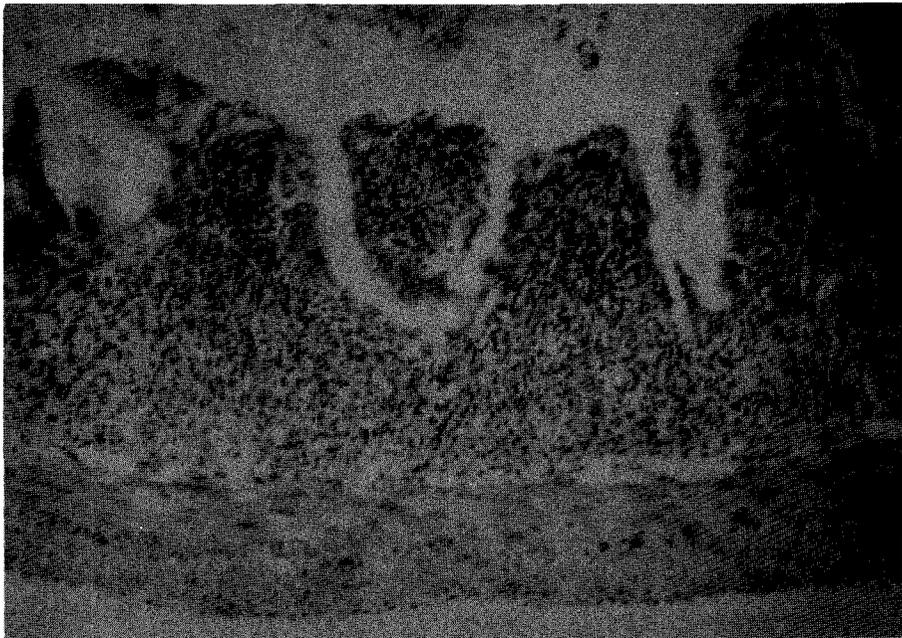


Fig. 4. Transverse section 90 hours after 1800 rad irradiation:
No demonstrable regenerating crypt was seen.

Table 3. Regenerating Crypts per Circumference in Split Irradiation Group

Radiation(rad)	Crypts per Circumference
700, 700*	105±10**
800, 800	97± 7
900, 900	44± 6
1,000, 1,000	9± 2
1,100, 1,100	2± 0.5

* Split Irradiation for 4 hours interval

** One Standard Deviation

이었다. 방사선조사군에서의 소낭선재생의 판별기준은 소낭선이 최소 10개이상의 세포로 구성되어야 하고, 이때 각 세포의 세포질은 거의 없고, 뚜렷한 핵으로만 구성된 세포가 밀집되어 있는 경우를 기준으로 하였다. 각기 조사한 소군별로 재생소낭선의 수(x)를 측정하였고, 대조 관측된 소낭선의 평균치는 140이었으므로 파괴된 소낭선의 비율(f)은 $140-x/140$ 이 된다. 소낭선당 생존하는 세포의 수는 Poisson의 분포에 따르며 $-\log_e f$ 로 예측할 수 있고, 환상면당 생존하는 소낭선 세포의 수는 $-140 \log_e f$ 또는 $-140 \log_e f^{140-x/140}$ 으로 계산하여 반대수 눈금지(semilogarithmic paper)상 X축에는 방사선량, Y축에는 환상면당 생존소낭선세포수를 표시한 후 선형회귀분석을 통하여 세포생존곡선(cell survival curve)을 작성하였다.

위의 곡선을 이용하여 평균치사선량(mean lethal dose)과 준치사손상의 회복선량을 구하였다.

실 험 결 과

단일조사군인 1,100 rad 부터 1,800 rad 까지의 소군에서 조사후 90시간에서의 조직표본에서 환상면당재생된 소낭선의 관측치는 조사선량에 따라 현저히 감소되었다(Table 2).

1,100 rad 조사군에서는 공장소낭선의 수가 평균 125개로 대조군에 비하여 약 10%의 감소를 보였으나, 1,300 rad 조사군에서는 평균 77개로 약 반수의 소낭선이 파괴되었으며, 1,500 rad 조사군에서는(Fig. 3) 소낭선의 수가 평균 39개로 약 1/4로 현저히 감소하였고 1,800 rad 를 조사한 경우에는 거의 공장소낭선을 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

반면 분할조사군에서는 1,400 rad 조사군에서 평균 105개의 소낭선이 관찰되었고, 1,800 rad 조사군에서는 평균 44개로 약 1/3로 감소하였으며, 2,200 rad 조사군

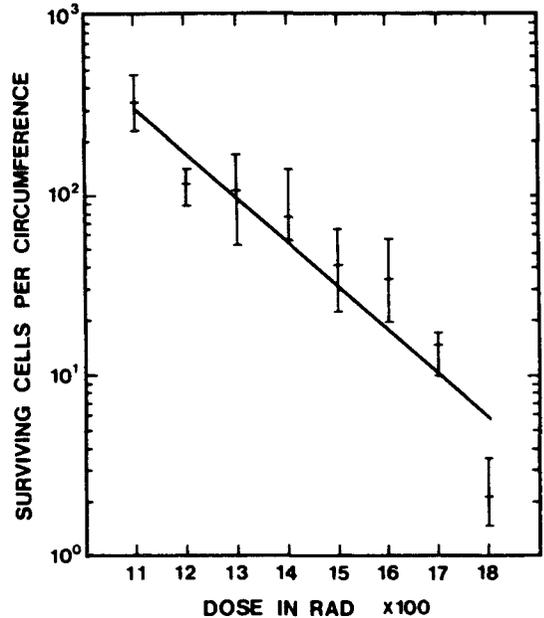


Fig. 5. Dose-survival curve for jejunal crypt cells. Exposed to single dose of r-ray. Mean±SD shown for each point. The least squares regression line was calculated. The value for D_0 was 167 rad.

에서는 거의 소낭선을 관찰할 수 없었다(Table 3).

소낭선의 관측치(x)와 대조군의 관측치 140을 이용하여, $140(-\log_e 140 - x/140)$ 의 식에 적용하여 얻어진 생존하는 소낭선세포의 수를 반대수 눈금지의 Y축에 조사한 방사선량을 X축에 표시한 후 최소자승법(least square sregression)에 의하여 환상면당 세포생존곡선을 구하였다(Fig. 5). 이때 상관계수(r)는 0.937이었고, 표준편차는 0.216이었다.

단일조사군에서의 평균치사선량(D_0)은 167 rad 였다.

분할조사군에서도 같은 방법으로 환상면당 세포생존곡선을 구하였다(Fig. 6).

이때의 세포생존곡선의 상관계수는 0.957이었고 표준편차는 0.196이었다.

단일조사군과 분할조사군의 세포생존곡선의 경사도는 유사하였고, 분할조사군의 평균치사선량은 169 rad 로써 단일조사군과 비교시 통계학적 차이는 없었다.

두 세포생존곡선간의 X축상의 간격, 즉 준치사손상의 회복선량(D_q)은 280 rad 였다(Fig. 7).

단일조사시와 분할조사시의 세포생존곡선의 경사도는 통계학적인 차이가 없었고, 평균치사선량이 유의한

고 안

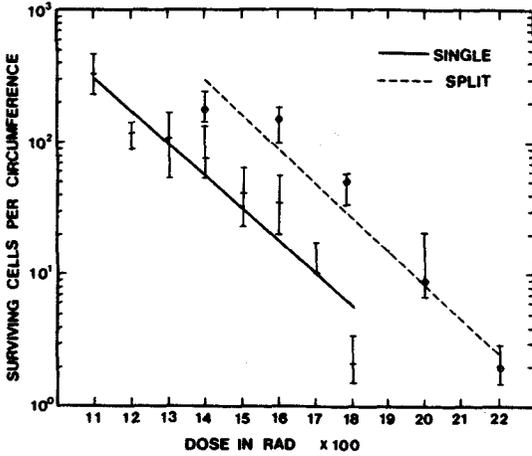


Fig. 6. Dose-survival curve for jejunal crypt cells. Exposed to single & split doses of r-ray. Mean \pm SD shown for each point. The value for D_0 of split irradiation was 169 rad. The value for D_q was 280 rad.

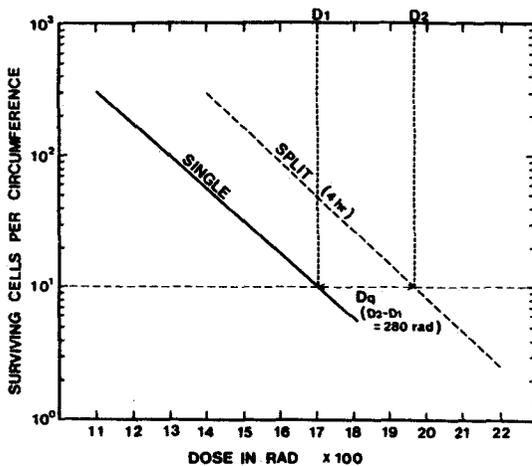


Fig. 7. Illustration of how the quantity D_q (or $D_2 - D_1$) may be obtained for biologic systems in which it is possible to match single and split doses which produce equivalent biological damage. This quantity is the dose "lost" or "wasted" as a result of fractionation.

차이가 없었으므로 분할조사군에서 준치사 손상이 모두 회복되었음을 나타내었고, 이에 필요한 시간이 4시간 이내임이 증명되었다.

방사선치료에 있어서 단일조사와 분할조사에 의한 생물학적 효과의 차이에 대한 주된 기전은 분할조사시 조사간격내에 준치사손상조직이 회복되고, 방사선 감수성이 상이한 세포주기가 조사전 상태로 재분포되며, 조사기간중 조직의 재군집화가 일어나는데 있다고 널리 알려져 있다.

이러한 변화는 종양세포에서도 일어나며 특히 준치사손상의 회복은 종양조직에 비하여 정상조직에서 월등히 잘 일어나는데 그 이유에 대하여 Elkind 등^{13,14)}은 정상조직에서 항상성 조절(homeostatic control) 능력이 있기 때문이라고 하였다.

또한 분할횟수 및 조사기간이 증가할 수록 정상조직의 회복력이 현저한 반면, 종양조직의 방사선에 의한 손상회복력은 경미하여 치료효율을 높인다.

그러나 방사선조사후 정상조직 및 종양조직의 준치사손상의 회복력은 조직에 따라 또는 종양조직의 조직학적조건에 따라 상이하므로 인체 각 정상조직 및 각종 종양에서의 준치사손상 회복력에 관한 실험적 연구는 방사선치료의 치료율 향상에 지대한 공헌을 가져올 것이다.

따라서 방사선조사에 의한 정상세포와 종양세포의 준치사손상 회복력에 관한 자료를 얻기 위하여는 실험에 의하여 선량에 따른 반응곡선을 그리는 것이 필요하다

1956년 Puck¹⁵⁾가 세포생존곡선실험을 최초로 체외 실험을 통해 시도하였으나, 임상에 이용되지 못하였고 임상적용을 위하여 생체실험이 여러가지로 시도되었다. 이들 중 비장 집락 측정법¹⁶⁾, 마우스 피부상피 측정법¹⁷⁾, 마우스 공장소낭선 측정법¹⁸⁾ 등에 의한 생체실험들이 가장 보편화되고 방사선 생물학적 이론에 뒷받침이 된 실험적 연구들이었다.

소장은 위장관중 방사선에 대한 감수성이 가장 높은 장기로서 대개 1,000 rad 이상의 방사선 조사후 공장소낭선이 일시적으로 퇴화되었다가 3~4일후에 재생되며 환상면당 재생되는 소낭선의 수는 방사선 조사량과 지수함수적 관계를 갖는다. 따라서 공장소낭선 측정법은 분할조사에 의한 준치사손상의 회복력, 선량에 의한 효과, 선질에 따른 생물학적 효과 및 항암제와 방사선 조사 병용시 상호작용기전을 측정하는데 유효한 방법으로 이용되고 있다^{7~12)}.

분할조사시 가장 중요한 준치사손상의 회복을 실험적으로 증명하기 위하여는 단일조사와 분할조사 후 각

각의 선량반응곡선을 작성하여서 두 조사방법간에 따른 동일한 생물학적 효과를 보이는 선량간의 차이를 측정하여야 한다¹⁶⁾. 즉 Fig. 7에서와 같이 환상면당 생존하는 소낭선세포의 수가 10개인 선량은 단일조사시 1,700 rad, 분할조사시 1,980 rad였으므로 준치사손상의 회복선량은 280 rad이며 동일한 조사효과를 얻기 위하여서는 분할조사시 단일조사에 비하여 280 rad 만큼 더 조사하여야 한다. 이 차이가 “소모된 조사(wasted radiation)”이며 이는 분할조사간격내에 준치사손상의 회복이 이루어 졌음을 입증하고 있다.

각종 장기 또는 중앙조직의 준치사손상의 회복선량은 마우스 골수세포 100 rad, 마우스 피부세포 350 rad, 마우스 유방암 230 rad, 마우스 흑색종 280 rad, 마우스 소장 380~450 rad 로 보고되고 있으며¹⁷⁾, 이와같이 방사선조사후 준치사손상의 회복은 세포의 종류 또는 중앙조직에 따라 다르다. 특히 골수세포나 고환세포는 준치사손상의 회복이 거의 안되는 것으로 알려져 있고, 이것은 백혈병이나 임파종이 방사선에 감수성이 높은 이유중의 일부로 설명되고 있다.

이외에도 준치사손상의 회복선량은 방사선의 종류 및 선량율에 따라서 차이가 있어 즉 중성자선의 경우 마우스 공장세포의 준치사손상의 회복선량은 200 rad 로 보고되고 있어¹⁸⁾ 7선에 의한 450 rad 에 비해 현저한 차이가 있다.

또한 세포의 산소화 정도에 따라 준치사손상의 회복력의 차이가 있음이 이미 입증된 바 저산소세포군을 함유한 중앙조직의 회복력이 정상조직에 비하여 현저히 저하되는 것으로 알려져 있어, 이는 분할조사에 의한 치료효과를 상승시키는 한 요인이 된다.

마우스 공장세포 및 대부분의 인체장기에서 방사선조사후 4시간이내에 준치사손상의 회복이 일어나는 것은 이미 실험적으로 증명된 바 있어^{19~21)}, 본 실험에서도 이에 근거하여 분할조사간격을 4시간으로 하였고, 단일조사와 분할조사시 평균치사선량이 167 rad 와 169 rad 로써 유의한 차이가 없는 것으로 분할조사간격내에 준치사손상의 회복이 완전히 일어난 것이 입증되었다.

마우스 공장세포의 평균치사선량은 저자들에 따라서 100~140 rad 로 보고하고 있으며^{6,7,22)}, 저자의 실험결과인 167 rad 와 다소 차이가 있는 것은 실험재료로 사용된 마우스의 계종(species)간의 차이에 의한 것으로 사료되는 바이다.

본 연구의 결과를 토대로 각종 장기의 준치사손상의 회복 및 각종 중앙조직의 준치사손상의 회복력의 연

구는 향후 방사선치료의 치료율을 향상시킬 수 있는 필수적인 분야로 지속적인 연구가 필요하다고 하겠다.

결 론

단일조사와 분할조사시의 방사선 조사효과와 준치사손상의 회복력을 연구하기 위하여 70마리의 마우스를 대상으로 동물실험용 세시움 방사선조사기를 사용하여 1,100 rad 부터 1,800 rad 까지를 100 rad 단위로 단일조사와, 1,400 rad 부터 2,200 rad 까지를 200 rad 의 선량차이를 두어 4시간 간격으로 2회 분할조사 하였다.

방사선조사후 90시간이 경과한 후 마우스공장을 횡절단한 조직표본에서 환상면당 공장소낭선의 수를 측정 한 다음 공장소낭선 세포측정법을 이용하여 선량반응곡선을 작성하였다.

선량반응곡선에 의거한 단일조사와 분할조사시의 평균치사선량과 준치사손상의 회복선량을 구하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대조군의 환상면당 공장소낭선의 수는 평균 140 개였으며, 방사선조사군의 재생소낭선 수는 1,400rad 조사시 단일조사군에서는 56개, 분할조사군에서는 105 개였으며 1,800 rad 조사군에서는 단일조사시 2개, 분할조사시 4개로 현저한 차이를 보였고, 1,800 rad 단일조사군과 2,200 rad 분할조사군에서는 각각 2개의 공장소낭선을 관찰할 수 있어 분할조사시의 재생이 입증되었다.
2. 단일조사군과 분할조사군의 평균치사선량은 각각 167 rad, 169 rad 로써 유의한 차이가 없었다.
3. 분할조사시 준치사손상의 회복선량은 280 rad 였다.
4. 준치사손상의 회복은 분할조사후 4시간이내에 이루어짐이 관찰되었다.

REFERENCES

1. Regaud C: *The influence of the duration on the changes produced in the testis by radium.* *Compt Rend Soc Biol* 86:787~789, 1922, *Translated by Archambeau Jo, Del Regato JA, Int J Rad Oncol Biol Phys* 2:565~570, 1977.
2. Coutard H: *Cited by Koh KH, Park CI, Kim CW: Early response of the mouse skin to super-fractionated irradiation. The Journal of the Korean Radiological Society* 18:10~16, 1982

3. Suit HD: *Consideration of fractionation schedules for Radiation dose. Radiology 105:151~156, 1972.*
4. Berry RJ Andrews JR: *Quantitative relationships between radiation dose and the reproductive capacity of tumor cells in a mammalian system in vivo. Radiology 77:824~830, 1961.*
5. Withers HR: *The dose-survival relationship for irradiation cells of mouse skin. Br J Radiol 40:187~194, 1967.*
6. Withers HR, Elkind MM: *Microclony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. Int J Radiat Biol 17:261~267, 1970.*
7. Withers HR, Mason K, Reid BO, et al: *Response of mouse intestine to neutrons and gamma rays in relation to dose fractionation and division cycle. Cancer 34:39~47, 1974.*
8. Withers HR, Thames HD, Peters LJ: *Biological bases for high RBE values for late effects of neutron irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 8:2071~2075, 1982.*
9. Withers HR, Thames Jr HD, Peters LJ: *A new isoeffect curve for change in dose per fraction. Radiother Oncol 1:187~191, 1983.*
10. Withers HR, Brennan JT, Elkind MM: *The response of stem cells of intestinal mucosa to irradiation with 14 Mev neutrons. Br J Radiol 43:795~801, 1970.*
11. Phillips TL, Fu KK: *The interaction of drug and radiation effects on normal tissues. Int J Radiat Oncol Biol Phys 4:59~64, 1978.*
12. Phillips TL, Ross GY, Goldstein LS: *The interaction of radiation and cyclophosphamide in intestinal crypt cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys 5:1441~1444, 1979.*
13. Elkind MM, Swain RW, Alescio T, et al: cited by Elkind MM: *Radiobiology in radiotherapy. Int J Rad Oncol Biol Phys 10:1143~1148, 1984.*
14. Elkind MM, Whitmore GF: cited by Elkind MM: *Radiobiology in radiotherapy. Int J Rad Oncol Biol Phys 10:1143~1148, 1984.*
15. Puck TT, Marcus PI: *Action of x-rays on mammalian cells. J Exptl Med 103:653~666, 1956.*
16. Withers HR: *Recovery and Repopulation in vivo by mouse skin epithelial cells during fractionated irradiation. Radiat Res 32:227~239, 1967.*
17. Bond VP, Fliedner TM, Archambeau Jo: *Mammalian Radiation Lethality. Academic Press, New York 1965.*
18. Dene KJ, Emery EW, Field SB: *Response of mouse epidermal cells to single and divided doses of fast neutrons. Radiat Res 45:80~84, 1971.*
19. Elkind MM: *Cellular aspects of tumor therapy. Radiology 74:529~541, 1960.*
20. Elkind MM, Sutton HA: *X-ray damage and recovery in mammalian cells in culture. Nature 184:1293~1295, 1959.*
21. Elkind MM, Sutton HA: *Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. Radiat Res 13:556~593, 1990.*
22. Elkind MM, Sutton GH, Mosses WB, et al: *Radiation response of mammalian cells in culture. V. temperature dependence of the repair of x-ray damage in surviving cells(aerobic and hypoxic). Radiat Res 25:359~476, 1965.*