

特 集



粒子ビームサイエンスの進歩と展望—HIMAC の成果を中心に—

8章 【放射線生物】放射線生物における HIMAC の役割

8.2.1 炭素イオン線による水相における活性酸素種の生成

松本謙一郎[†], 乳井美奈子, 上野恵美, 小川幸大, 中西郁夫量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所
放射線障害治療研究部障害分子機構解析研究チーム

263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川4-9-1

[†]matsumoto.kenichiro@qst.go.jp

炭素線によって水溶液中に生じるヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$), 過酸化水素 (H_2O_2), 及び酸化反応の量を, 電子常磁性共鳴をベースとする方法により測定し, X線のそれと比較した。 $\cdot\text{OH}$ の生成は炭素線の軌跡上に局在しているものと思われ, ミリモラーあるいはモラーレベルの異なる生成密度があることが示唆された。ミリモラーレベルの $\cdot\text{OH}$ 生成, 過酸化水素生成, 及び酸化反応の量はLETが高くなるにつれて減少した。放射線による活性酸素種 (ROS) の生成は分子レベルのミクロな環境では一様ではなく, またその量はLETに依存して変化することがわかった。このようなROS生成の違いによって炭素線とX線との線質の違いを生み出している可能性が明らかになりつつある。

Key Words: HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba), reactive oxygen species, carbon-ion beam, electron paramagnetic resonance, electron spin resonance, free radical, redox, oxidative stress, indirect action

1. はじめに

生体に放射線を照射すると照射部位や照射線量により様々な生体影響が生じる。放射線の生物に対する作用には直接作用と間接作用がある。直接作用は放射線が, あるいは2次電子が, ターゲット分子を直接電離あるいは励起することに起因して起こるものである。一方, 間接作用では, 先ず生体内に多量に存在する水分子を放射線が電離あるいは励起する。水分子の分解で非常に反応性の高い活性種を生じ, 続いてそれら同士のあるいはそれらと溶解酸素の反応で少しだけ安定な, とはいえ比較的反応性の高い分子種が生じて周囲の有機物へと反応が広がっていく。そもそも放射線は相互作用する相手を選び好みせず, たまたまぶつかったあるいは近くを通った電子や原子核と相互作用を起こ

す。そのため放射線にしる2次電子にしる, 生体内に豊富に存在する水分子と相互作用を起こす確率が高く, 標的分子と直接相互作用を起こす確率はそれほど高くない。その割合は, 水の存在するボリュームに依存すると考えられ, 直接作用が20~30%くらい, 間接作用が70~80%くらいと言われている¹⁻³⁾。確率的に生じる直接作用は避けることができないが, 間接作用の場合は反応の過程のどこかで, 生成物を消去することができれば影響を軽減することが可能と考えられる。

放射線自体は相互作用する相手を選び好みするわけではないが, 間接作用が生じていることにより放射線の生体に対する影響には選り好みが見られる。例えば, 組織の酸素濃度の違いによって放射線の生物影響が変化する。酸素濃度の高い組織では酸素濃度の低い組織よりも放射

線の影響を受けやすく、これは放射線の酸素効果として良く知られている¹⁻⁵⁾。また、放射線照射前に抗酸化物質と呼ばれているある種の化合物を投与しておくこと放射線の生物影響を抑制あるいは促進させることができる^{1,3)}。これは放射線による水の分解で生じた活性種から始まる化学反応が、酸素や抗酸化物質によって促進あるいは抑制される結果である。

放射線は生体内の水を分解し、いわゆる活性酸素種やあるいはその他のフリーラジカル種を生成する。生体内で生じた活性酸素種やフリーラジカル種は、細胞内の機能性分子を酸化的に障害し、すなわち細胞に酸化ストレスを与え、細胞を死に至らしめる。その細胞殺傷効果を利用して放射線によるがんの治療が行われている。

2. 活性酸素種・フリーラジカル種

「活性酸素」(Reactive Oxygen Species: ROS)という言葉と、「フリーラジカル」という言葉について軽くおさらいをしておくと、まず活性酸素というのは、生体内に取り込まれた分子状態酸素 (O_2) から生じるいくつかの活性分子種の総称で、狭義にはスーパーオキサイド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$)、一重項酸素 (1O_2) の4種を示す^{6,7)}。一方、フリーラジカルとは不対電子あるいは不対電子を持つ分子を指す⁷⁾。通常、一つの電子軌道には二つの電子が取り電子対を作って安定に存在するが、一つの電子軌道に電子が一つだけ存在する状況があり、この電子対を成していない単独の電子を不対電子と言う。不対電子は不安定な状態であることが多いので、一般的にフリーラジカル種は速い化学反応を起こす。上に示した4種の活性酸素種の中では、 O_2^- と $\cdot OH$ はフリーラジカル種であるが、 H_2O_2 と 1O_2 はフリーラジカル種には分類されない。本来、それぞれの活性酸素種及びフリーラジカル種の反応性も物性も、分子種によって全く異なるので、分子種毎に区別してその影響を考えた上

で、それらの総合的な生体影響に結び付けていかなければならない。

好気性生物の細胞内では O_2 を利用した効率的なエネルギー産生が行われている。その中で O_2 は、ミトコンドリアの電子伝達系で電子の受け取り役として使われる。通常は O_2 が電子を4つ受け取って、すなわち四電子還元されて水 (H_2O) に戻されるが、 O_2 が何らかのエラーで一電子還元されてしまうと O_2^- が生成する。臓器によって異なるが、ミトコンドリアで使われる酸素の数%の O_2^- が常に生成していると考えられている⁸⁻¹⁰⁾。 O_2^- は水中でヒドロペルオキシラジカル (HO_2) と平衡して存在し、 pK_a は4.8程度と報告されている^{6,11)}。 O_2^- は電子が O_2 より1つ多い状態であり、余分な電子を他の分子に渡して安定な酸素へ戻りたがっており、おおむね還元的に働く。一方、 HO_2 は H_2O_2 よりも $\cdot H$ (電子が1つ) 不足している状態であるので、他の分子から電子を奪って安定になろうとしている強力な酸化剤である。 O_2^- と HO_2 のポピュレーションの比は式(1)に従ってpHに依存するので^{6,11)},

$$\begin{aligned} pH &= pK_a + \log\left(\frac{[base]}{[acid]}\right) \\ &= 4.8 + \log\left(\frac{[O_2^-]}{[HO_2]}\right) \end{aligned} \quad (1)$$

pH 7.8 で1000:1, pH 6.8 で100:1程度で、pHの低い条件では HO_2 が増加して酸化的障害も増加すると考えられる。

我々の体には活性酸素に対抗するための抗酸化機能が備わっている。生体内で生じた O_2^- はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) によって分解される。SODは2分子の O_2^- を分解して、1分子の H_2O_2 と1分子の O_2 を生じる。 H_2O_2 の反応性は比較的弱いですが、生体内に存在する Fe^{2+} や Cu^+ などの遷移金属イオンによって還元されて活性酸素種の中でも一番酸化反応性の高い $\cdot OH$ を生じる。これを防ぐため、 H_2O_2 はカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) によって水へ戻される。GSH-Pxが過酸化水素を分解する際に還元型グ

グルタチオン (GSH) からの水素が使われ酸化型グルタチオン (GSSG) が生成する。GSSG はグルタチオン還元酵素によって NADPH からの水素を受け取り, もとの GSH に戻る。このようにして連鎖的に酸化還元反応が進んでいき, その過程で何らかの遺伝子を発現させるようなイベントがおり, それによって生体があるいは細胞が何らかの応答を示すことをレドックスシグナリングと呼んでいる。しかしながら今のところ, 活性酸素種の発生からそれに基づくとされる遺伝子応答などを介して最終的な病態へ結びつく反応の道筋は明らかになっていない事のほうが多い。同様に, 放射線による初期の化学反応から生体影響へと到達する機構もあまり明らかになっていない。

活性酸素の生成量とそれを消すための抗酸化能力が釣り合って維持されている状態が健康な状態と考えられ, 放射線は活性酸素種の生成を増加して, このバランスを崩し生体に影響を与えるとと言える。放射線の生体影響を考える上で重要な活性酸素種は, $\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot$, 及び H_2O_2 の3種と言える。 $\cdot\text{OH}$ は, 活性酸素種の中で一番酸化反応性が高く, それに次いで酸化反応性の高いのが $\text{HO}_2\cdot$ と言える。 H_2O_2 は, それ自体の反応性はそれほど高くないが, $\cdot\text{OH}$ や $\text{HO}_2\cdot$ の原料となる。また反応性が弱いゆえに, 遠くまで移動することができる。またそれゆえに, ある程度の濃縮または蓄積が可能にもなる。そのため, これらの3種の活性酸素種を定量的に測定することを試みてきた。

3. ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の生成量と生成密度

まず X 線が水中で生成する $\cdot\text{OH}$ の測定を行った。DMPO の水溶液に X 線を照射すると, 生じた $\cdot\text{OH}$ を DMPO がトラップして DMPO-OH が生じ, これを EPR で測定することができる^{12, 13)}。 $\cdot\text{OH}$ のディテクターである DMPO の濃度の異なる水溶液試料に放射線を照射した時, すなわち試料中の $\cdot\text{OH}$ ディテクターの

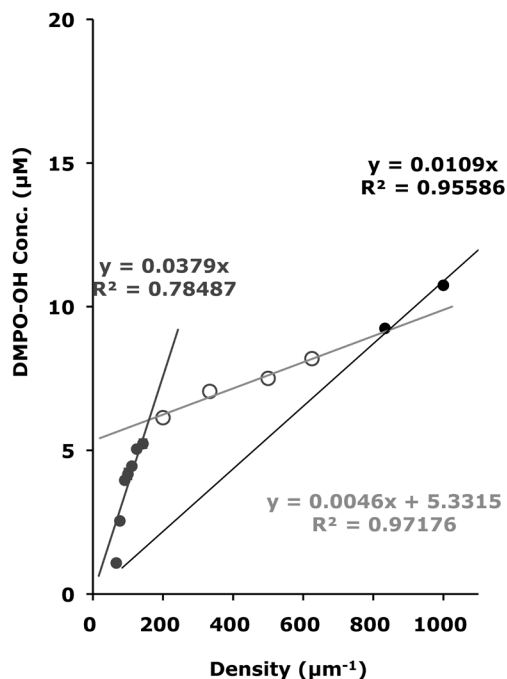


Fig. 1 A typical profile of a plot of DMPO-OH concentration versus DMPO density obtained for a series of DMPO solutions after X-ray irradiation.

数を段階的に増やしていくと, DMPO の濃度が $\cdot\text{OH}$ の生成濃度を上回った場合に DMPO-OH の生成量が飽和すると考えた。そこで, DMPO の濃度と DMPO-OH の生成量の関係を調べた。DMPO の密度に対して DMPO-OH の生成量をプロットした結果, Fig. 1 のような3相を示す曲線が得られた。ここで DMPO 密度 (Density) は DMPO 分子間距離 (Distance) の逆数で, 言い換えると, $1\mu\text{m}$ の距離にディテクターである DMPO がいくつ存在するかをしめす値である。濃度と分子間距離と密度の関係を Table 1 に示した。Fig. 1 の曲線の1相目と3相目は, 原点を通る直線的な増加を示しており, これは, ある密度で生成している $\cdot\text{OH}$ を検出するためのディテクターが不足していることを示している。ディテクターの数が充分であれば, 検出される $\cdot\text{OH}$ 量はプラトーに達し, 1相目と2相目に見られるような変曲点が生じる。Fig. 1 の曲線の1相目と2相目の交点を見ると,

Table 1 Relation of concentration, molecular distance, and linear density of the spin trapping agent

Concentration (mM)	Distance (nm)	Density (μm^{-1})
0.49	15.0	66.7
0.76	13.0	76.9
1.25	11.0	90.9
1.66	10.0	100.0
2.28	9.0	111.1
3.24	8.0	125.0
4.84	7.0	142.9
13.3	5.0	200.0
61.5	3.0	333.3
207.6	2.0	500.0
405.4	1.6	625.0
961.0	1.2	833.3
1660.6	1.0	1000.0

$160\mu\text{m}^{-1}$ 付近から、すなわち DMPO の濃度が 6.8mM 程度から DMPO-OH の生成量はプラトーに達しており、それ以上の濃度ではあまり DMPO-OH の生成量が変わらなくなった。つまり、 6.8mM 程度の濃度の $\cdot\text{OH}$ 生成が起きていることが予想された。しかし更に DMPO の濃度が高くなると 3 相目として再び原点を通る直線的な増加が観察され、この結果から、 1.7M を超える極めて密な $\cdot\text{OH}$ 生成も予想された。

6.8mM 程度の比較的疎な $\cdot\text{OH}$ 生成が予想されたが、Fig. 1 の曲線の 1 相目と 2 相目の交点から読み取れる DMPO-OH の生成濃度は $6.1\mu\text{M}$ 程度であった。これは予測された $\cdot\text{OH}$ 生成濃度の約 $1/1000$ の濃度である。 6.8mM 程度の濃度の DMPO による $\cdot\text{OH}$ の補足効率が十分に高いとはいえないが、DMPO 濃度で約 960mM 程度まで 2 相目のプラトーが続いており、 32Gy 照射時の DMPO-OH 生成濃度はプラトーレベルで $6\sim 8\mu\text{M}$ 程度を示している。 $\cdot\text{OH}$ が水中で移動できるとされる距離は 2nm 程度とされているが、 960mM の DMPO の分子間距離は約 1.2nm であり、それよりも十分に短く $\cdot\text{OH}$ の補足効率は充分高いと予想できる。また 3 相目の最大値から 1.7M 以上の極めて密な $\cdot\text{OH}$ 生成が予想されたが、この時の DMPO-OH

生成濃度は約 $11\mu\text{M}$ であった。これらの結果から、 $\cdot\text{OH}$ の生成が局在しているだろうことが示唆された。 6.8mM の濃度では分子が約 6.3nm 間隔で存在するので、おそらく水中を X 線に由来する電離や励起が進む過程で、 6.3nm 程度の間隔で $\cdot\text{OH}$ が生成しているのだろうと思われる。このような疎な $\cdot\text{OH}$ の生成環境では $\cdot\text{OH}$ 同士の反応はおそらくできず、また $\cdot\text{OH}$ の周囲に何か反応できるものがなければ、同時に生じた $\cdot\text{H}$ と再結合して直ちに水に戻ってしまうことになる。しかし 1.7M を超える極めて密な $\cdot\text{OH}$ 生成は、 1nm よりも短い分子間距離で $\cdot\text{OH}$ が生成していることになる。このような密な $\cdot\text{OH}$ 生成の生じる環境では、 $\cdot\text{OH}$ 同士の反応による H_2O_2 の生成や、更に H_2O_2 と $\cdot\text{OH}$ の反応による $\text{HO}_2\cdot$ の生成を可能にすると予想できる。

純水への photon 照射による $\cdot\text{OH}$ 生成の G 値は 2.8 と報告¹⁴⁾があるので、これに基づいて 32Gy 照射時の $\cdot\text{OH}$ 生成濃度を計算すると $9.4\mu\text{M}$ となり、実験で得られた DMPO-OH のプラトーレベルでの生成濃度に近い。2015 年の報告¹³⁾では、DMPO-OH の測定値として約 3 倍高い値を報告していたが、その後の測定技術の改善等により定量性が向上したため、現在の値がより正確なものと思われる。また 1 相目と 2 相目の交点についても、実験者の直感や経験による判断を避け数値に基づいた解析を行ったところ、比較的疎な $\cdot\text{OH}$ の局所生成密度についても 2015 年の報告¹³⁾より若干高い値が得られている。LET に対する $\cdot\text{OH}$ 生成の傾向については変わらない。

X 線による $\cdot\text{OH}$ 生成のイメージを Fig. 2 に示す。 $\cdot\text{OH}$ とともに $\cdot\text{H}$ が生じており、周囲に反応できるものが何もないとすればそれらは再結合して直ちに水に戻ってしまう。また、 $\cdot\text{OH}$ は極めて短寿命 ($<10^{-8}\text{sec}$) であり、直ちに周囲の分子と反応して消失してしまうが、 $\cdot\text{H}$ の水中での寿命 ($\approx 10^{-4}\text{sec}$) はそれに比べて充分長いので、そこに O_2 があると $\cdot\text{H}$ との反応 (式(2))

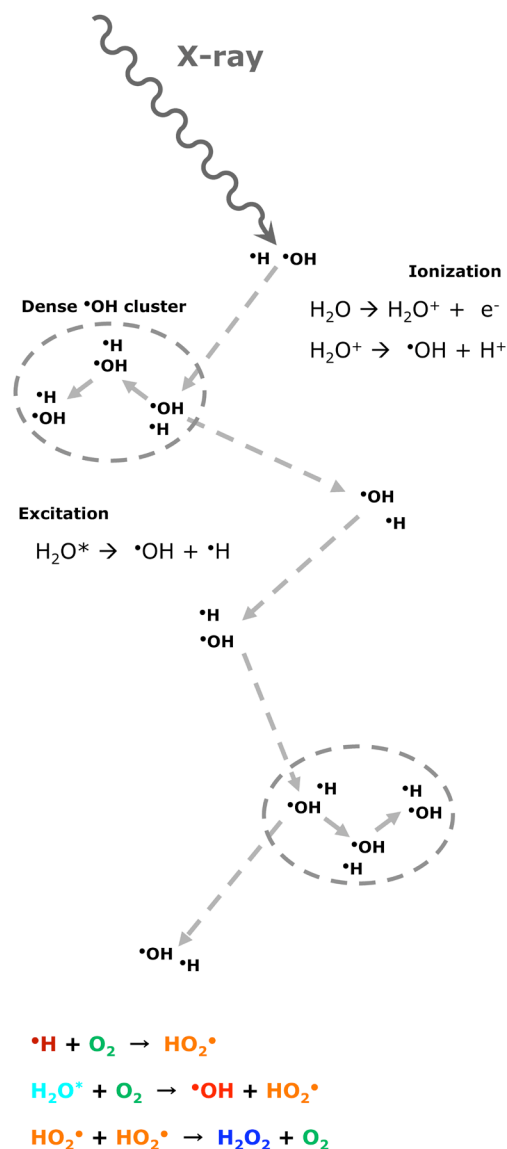


Fig. 2 Image of the molecular geometry of $\cdot\text{OH}$ generation caused by low LET radiation. Sparse $\cdot\text{OH}$ may be generated every 7 nm. Dense $\cdot\text{OH}$ may be generated every 1 nm or closer. Such dense $\cdot\text{OH}$ clusters may be scattered about the range of the irradiation rays (Color online).

により、二次活性種として $\text{HO}_2\cdot$ が生じる。あるいは励起された水と O_2 の反応 (式(3)) でも $\text{HO}_2\cdot$ が生じる。 $\text{HO}_2\cdot$ は $\cdot\text{OH}$ に比べると移動距離も長く、比較的遠くの分子と反応することができるようになる。すると $\text{HO}_2\cdot$ 同士の反応が

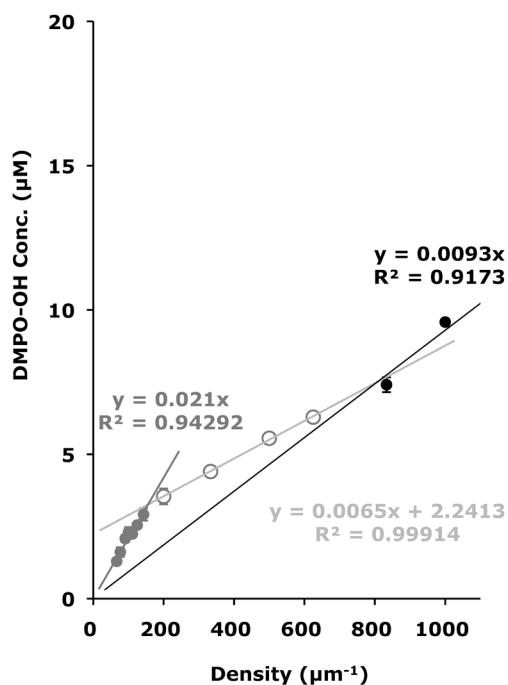
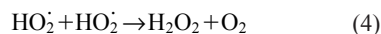
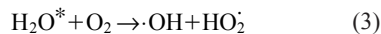


Fig. 3 A typical profile of a plot of DMPO-OH concentration versus DMPO density obtained for a series of DMPO solutions after 80 keV/ μm carbon-ion beam irradiation.

可能になり $\text{HO}_2\cdot$ 同士の反応で H_2O_2 を生成することができる (式(4))。 H_2O_2 は安定なため更に遠くへ移動することができる。



すなわちこの比較的疎な水の電離あるいは励起こそが、X線での比較的大きな酸素効果を生んでいると考えられる (Fig. 2)。

炭素線についても、反応溶液中の DMPO 密度に対してその中で生成する DMPO-OH 濃度をプロットしたところ、X線と同様に3相の曲線が得られ局在する2つの異なる密度で $\cdot\text{OH}$ を生成していることが予想できた。Fig. 3に LET=80 keV/ μm の炭素線によって得られた結果を示す。X線に比べて1相目と2相目が成す

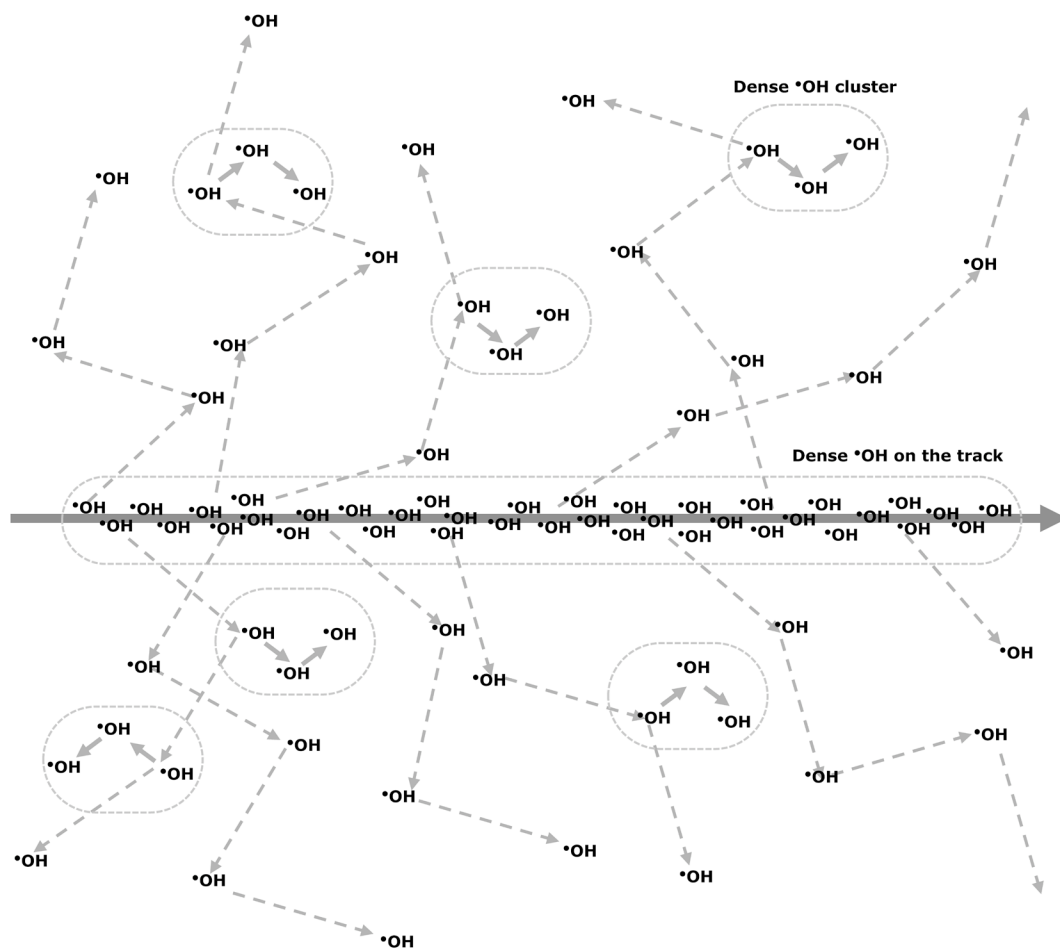


Fig. 4 Image of the molecular geometry of $\cdot\text{OH}$ generation caused by high LET particle radiation. The thick center arrow indicates the track of the particle beam. Dense $\cdot\text{OH}$ may be generated in the track core. Sparse and dense $\cdot\text{OH}$ generation such as low LET radiation may occur in the penumbra region.

肩の高さが低くなっており、3相目の直線部分が視覚的に分かりやすくなっている。その分布をイメージすると (Fig. 4), 粒子線の軌跡すなわちコアに密な $\cdot\text{OH}$ 生成があり、その周囲すなわちペナンプラに X 線様の $\cdot\text{OH}$ 生成が起これらと思われる。また、コアにおける密でかつ豊富な $\cdot\text{OH}$ 生成は、 $\cdot\text{OH}$ 同士の反応、更に反応生成物同士の連鎖的な反応を可能にするため、酸素消費を伴わない、むしろ酸素を与えるような過酸化水素の生成を可能にしていると考えられる。これらのことから、 $\cdot\text{OH}$ の生成密度と分布の違いが、X 線や炭素線の線質を決めていると予想した。

4. 過酸化水素 (H_2O_2) の生成量と生成密度

TEMPOL の水溶液に比較的高線量の X 線を照射した際に TEMPOL の常磁性の消失が観察された¹⁵⁾。この反応はカタラーゼの添加によって一部が抑制されたことから、 H_2O_2 が関与する反応であることが示唆された。そこでこの TEMPOL の還元について、 H_2O_2 が関与する反応の量として評価した。この反応は、X 線よりも低 LET 領域 (20keV/um) の炭素線で多く生じており、炭素線の LET を変えた場合には LET が大きくなるに従って減少した。しかし、TEMPOL と濃度の異なる H_2O_2 を含む反応

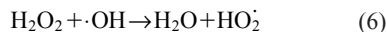
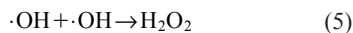
溶液に UV 照射を行った際に生じる TEMPOL の EPR シグナルの消失は, H_2O_2 濃度が高濃度 (9.8mM 以上) のときのみ見られた。また TEMPOL と濃度の異なる H_2O_2 を含む反応溶液に 3 価の鉄イオンを添加した際にも同様に, H_2O_2 濃度が 98mM 以上のときのみ TEMPOL の EPR シグナル消失が観察された。これらのことから本反応は, 比較的高密度に生じている H_2O_2 の存在を示しているものと考えられ, 極めて高密度の $\cdot\text{OH}$ の生成が, そのような高密度の H_2O_2 の生成を可能にしていると予想された。TEMPOL 法は, 高密度の H_2O_2 が関与する反応を検出していることがわかったが, H_2O_2 の生成量を評価しているものではなかった。

そこで改めて, 実際の H_2O_2 の生成量を把握するため, フェントン反応と EPR スピントラッピング法を組み合わせる方法で試料水中の H_2O_2 の定量を行った¹⁷⁾。水に放射線を照射した後, DMPO を添加し, 更に測定直前に FeSO_4 を反応開始剤として添加した。試料水中に存在する H_2O_2 と 2 価鉄との反応で $\cdot\text{OH}$ が生じるので, これが DMPO でトラップされて生じる DMPO-OH を EPR で測定し, その生成量に基づいて試料水中における H_2O_2 の生成を評価した。あらかじめ既知の濃度の H_2O_2 水溶液を同様にして測定し, 得られた検量線に基づいて定量を行った。その結果, H_2O_2 の検出量は, X 線を照射した場合に $0.26\mu\text{mol/l/Gy}$ で, 炭素線では LET が $20\text{keV}/\mu\text{m}$ のときに $0.20\mu\text{mol/l/Gy}$, LET 高くなるほど H_2O_2 の生成が減少し, LET が $100\text{keV}/\mu\text{m}$ 以上のときに $0.17\mu\text{mol/l/Gy}$ であった。

更に, ペルオキシダーゼの存在下で過酸化水素とフェノールと 4-アミノアンチピリンの反応で生じる赤色素の 505nm の吸光度に基づいて, 試料水中の H_2O_2 の定量を行った¹⁷⁾。吸光度法では, 若干低い値 ($0.10\text{-}0.17\mu\text{mol/l/Gy}$) が得られたものの, LET に対する H_2O_2 生成の傾向はスピントラッピング法で測定した場合と同様であった。

ただし, ここで注意したいのは, スピントラッピング法あるいは吸光度法による H_2O_2 の測定は, 照射数分~数十分後に反応溶液中に残留する H_2O_2 を測定しているため, 水の放射線分解の初期反応過程を通して生成する正味の H_2O_2 の量とは傾向が異なるものと思われる。つまりここで測定したのは水の放射線分解の初期反応過程が終了した後の H_2O_2 の量で, 言い換えると, 生成の場を離れて周囲の環境へ拡散可能となった H_2O_2 の量と考えることができる。そのような状態に至る H_2O_2 の量は, LET が高くなるほど減少するものと思われた。これは以下で述べる酸素を介する H_2O_2 の生成と酸素を介さない H_2O_2 の生成の兼ね合いによる結果と考えており, 酸素のない環境では更に傾向が変わる可能性がある。

式(2)-(4)に示すように, 酸素を介した H_2O_2 生成があり, これは比較的疎な $\cdot\text{OH}$ 生成に伴って生じている $\cdot\text{H}$ に起因していると考えられるので, LET が大きくなると減少するものと考えられる。重粒子線の LET の増加に伴う H_2O_2 の生成量の低下は, 酸素を介する H_2O_2 の生成量の低下に伴っていると思われる。一方, 式(5), (6)及び式(4)によって, 酸素を介さない H_2O_2 の生成が予想される。



式(5)の $\cdot\text{OH}$ 同士の反応のためには極めて密な $\cdot\text{OH}$ の生成が必要で, そのような局所での極めて密な $\cdot\text{OH}$ の生成数が十分に多ければ, 式(5)で生じた H_2O_2 と更に別の $\cdot\text{OH}$ が反応することができる(式(6))。重粒子線が水中で生成する $\cdot\text{OH}$ の総量は LET にあまり影響されずに一定であると思われ, また LET が大きくなるほど極めて密な $\cdot\text{OH}$ 生成の割合が増えると予想されているので, 極めて密に $\cdot\text{OH}$ の生成がされている中では, 酸素を介さない H_2O_2 生成(式(5), (6)及び式(4))の量は LET とは無関係に一定であるか, 割合としては LET が大き

くなるほど増加すると思われる。そのため局所での極めて密な $\cdot\text{OH}$ の中で式(4)によって生じる O_2 、すなわち oxygen in the track¹⁶⁾は、LETが大きくなるに従って増加すると思われる。とはいえ、上述の結果から $\cdot\text{OH}$ 生成の総量が $0.35\ \mu\text{mol/L/Gy}$ 程度で有るならば、それらが全て効率よく反応したとしても、ここで生じる O_2 の量は $60\ \text{nmol/L/Gy}$ 程度にすぎず、以下にも述べる生体内の酸素濃度に比較すると十分に少ないため、その影響が見える形で現れるか否かについては疑問が残る。

5. $\cdot\text{OH}$ 及び HO_2 による酸化反応量

グルタチオン存在下で生じる TEMPOL の還元反応に基づいて、炭素線によって生じる酸化反応量を定量した¹⁸⁾。TEMPOL は $\cdot\text{OH}$ や HO_2 によって一電子酸化されて、オキソアンモニウムカチオン体になる。ここに還元型グルタチオンが共存していると、オキソアンモニウムカチオンとグルタチオンが反応して複合体を形成し、TEMPOL の常磁性が失われる。この反応は、少なくとも試験管内では不可逆的に生じる。その結果、酸化反応量は X 線を照射した場合に $2.7\ \mu\text{mol/l/Gy}$ と多く、炭素線では LET が $20\ \text{keV}/\mu\text{m}$ のときに $1.2\ \mu\text{mol/l/Gy}$ 、LET が高くなるほど酸化反応量が減少し、LET が $100\ \text{keV}/\mu\text{m}$ 以上のときに $0.34\ \mu\text{mol/l/Gy}$ であった。この反応系では $\cdot\text{OH}$ と HO_2 を区別できないのでトータルでの酸化反応量として評価を行ったが、将来的に反応を制御しようとするならば、それぞれの化学種がどの程度酸化反応に寄与しているかを知る必要がある。

そこで、 $\cdot\text{OH}$ と HO_2 の関与を区別して測定することが可能か否かを検討するため、低酸素状態での酸化反応量の測定を試みた¹⁷⁾。反応溶液を窒素で十分にバブリングし、その後、窒素で置換したグローブボックス内に反応溶液を移して、反応溶液をビニールの袋に密封した。これを、酸素吸収剤及び酸素検出剤と共に更にビニール袋に密封した状態で、ビニール袋内の

酸素濃度が検出限界以下であることを確認しつつ放射線を照射した。低酸素状態での酸素酸化反応量についても同じく、LETが大きくなるにつれて減少した。ただし低酸素条件では、LETが低い条件では大気中と比べて酸化反応量が減少したが、LETが150を超える高い条件では大気下とほぼ同じ値を示した。低酸素条件での酸化反応は、おそらく $\cdot\text{OH}$ によるもので、大気条件下との差分は HO_2 による酸化であろうと予想された。

6. 細胞内分子と活性酸素種との反応の可能性

糖や蛋白など比較的高い分子は少なからず $\cdot\text{OH}$ 消去能を持つ¹⁹⁾。言い換えると、 $\cdot\text{OH}$ は極めて反応性が高いため、無差別的にほとんどの物質を酸化する。そのため $1.7\ \text{M}$ の濃度に相当するような高密度の $\cdot\text{OH}$ 生成の場合があるならば、その場の充分近くにたまたま存在していた分子は、必ず何らかの形で化学的な修飾を受けると考えられる。つまり、重粒子線の軌跡上に存在した分子は、周囲に水があれば、高濃度の $\cdot\text{OH}$ によって高密度でかつ部位特異性のない酸化障害を被るであろうし、水がなくても直接電離されて、やはり部位特異性のない酸化障害を被るだろう。このような状況においては直接効果と間接効果を区別することすらもほぼ不可能と思われる。生体内で $1.7\ \text{M}$ の濃度に相当するような $\cdot\text{OH}$ が生成したとしても、外部からこれに見合う濃度の抗酸化薬剤などを投与することはほぼ不可能であると言える。しかし、この極めて高密度の $\cdot\text{OH}$ 生成に伴って生じた H_2O_2 や HO_2 あるいは $\cdot\text{H}$ は、そこから拡散していく過程で、抗酸化薬剤などによる消去の対象になりえるだろう。一方、数 mM の濃度に相当する密度で生成する $\cdot\text{OH}$ であれば、抗酸化薬剤などによる消去も全く不可能というわけではなくなるので、一部を消去して影響を抑制することが可能になると思われる。

マウス筋組織及び脂肪組織の細胞外液中の酸素分圧は約 $40\ \text{mmHg}$ あるいは $20\ \text{mmHg}$ と

報告があり²⁰⁾, これらは37°Cにおける血漿への酸素の溶解度を考慮して0.054mMあるいは0.027mMに換算することができる²¹⁾。細胞内はこれよりも更に酸素濃度が低下しており, 筋組織でも細胞内酸素分圧は10mmHg程度と予想でき²²⁾, 同様に濃度に換算すると0.014mM程度である。これらの濃度のO₂分子間の距離は, およそ30nmから50nmと計算できる。細胞内で酸素効果が生じるとするならば, 放射線の生体影響を修飾するには, この程度の酸素濃度で充分であるということになる。酸素効果の本質が, 式(2)及び(3)の反応で生じるHO₂の生成と考えるならば, その生成濃度は酸素濃度に依存するので, これを制御するのに必要な抗酸化薬剤の濃度は数十μMと言える。この程度の濃度であれば外部から抗酸化薬剤などを投与して制御することが十分に可能であろう。

極めて高密度に生成する・OHはもちろん不可能であるが, 疎な・OH生成であっても局所濃度は6.8mM程度と比較的高いため, 生体に投与可能な濃度の抗酸化化合物等で制御するのは容易ではないことがわかる。すなわち抗酸化化合物に基づく放射線防護を行うには, H₂O₂やO₂⁻あるいはHO₂といった二次活性種をターゲットにする方が効率的と思える。

7. 生物分野での放射線化学の展開

放射線治療に従来から汎用されているフォトン放射線と重粒子線とでは生物効果に違いがある。その違いを数値化し説明するため, 放射線荷重係数 (radiation weighting factor) や, 生物学的効果比 (Relative Biological Efficiency: RBE), 酸素増感比 (Oxygen Enhancement Ratio: OER) といった指標が用いられ, それらのパラメーターの違いを線質として表現してきた。しかし線質の違いに基づいた生物影響の違いを説明するためには, 放射線が生じる化学反応の詳細な解析が必要不可欠である。放射線による物質の電離や励起を引き金とする化学反応を研究する, いわゆる放射線化学の研究は, 高分子材料

科学の分野では比較的盛んに行われてきた。しかしながら放射線生物影響学の分野では, 放射線が生体内で生じる化学反応に関する知見の蓄積が十分に多いとは言えない。特に重粒子線に関しては, 既になん治療に使用されているにもかかわらず, 初期化学反応については不明な点が多く残っていた。そのような背景から, 山下らは, HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba) を使って高LETビームによるpH中性条件下での水の放射線分解で生じる活性種の分析を開始した。彼らは水和電子, ・OH, H₂O₂の3種を重要な水分解生成物としてそれらのプライマリ収量を測定し, その収量とLETあるいは $(Z_{\text{eff}}/\beta)^2$ との関係を明らかにした^{23, 24)}。LETプロットでは $(Z_{\text{eff}}/\beta)^2$ に比べ, 粒子種依存性が強く示されるため, LETのような1次元的なエネルギー付与密度を表す単位では3次元的なラジカル生成を正確にとらえることが難しいことが示されていた。つまり, 我々が・OH生成密度に注目したよりも前に, 彼らも研究を展開する中で生成活性種の3次元的な分布の変化を考慮することが重要であることを既に示していた。このようにがん治療領域におけるHIMACの利用が, 生物分野での放射線化学の展開に大きく寄与している。

8. 今後の展望

このようにX線や重粒子線による活性酸素種の生成の様子が解ってきたので, 重粒子線に対する認識も変わりつつある。従来は重粒子線の生物効果は活性酸素を介さない直接効果がほとんどであると考えられてきたが, 最近では, 重粒子線でも活性酸素生成が起り間接作用の寄与があることが認識され始めている。

放射線の間接作用の割合は, 放射線が電離及び励起を生じる場所によって異なることは容易に予想できる。細胞内に複雑に広がる脂質膜構造は疎水的な環境を作りだしている。また, 細胞核内でコンパクトに折りたたまれたDNAの周辺には水和の水以外に余分な水が存在できる

隙間がないのではないとも言われている。そのような細胞内のミクロな環境を考えると、必ずしも一定の割合で水が存在するとは考えにくい。また水分子から生じる活性酸素種を主とする活性種以外に、脂質膜中では脂質分子の電離・励起によって生じる有機ラジカル種がむしろ問題となるだろうことも予想できる。最近、脂質中で生じるフリーラジカル反応が、X線を照射した場合と炭素線を照射した場合は異なる挙動を示すことが報告されている²⁵⁾。更に、分子状酸素の脂溶性の高さを考えれば、今後は、脂質膜内における酸素効果というものが憂慮される。

文 献

- 1) 馬場茂雄編, 薬学生の放射化学・第4版, 廣川書店, 東京 (1999)
- 2) 西臺武弘, 放射線治療物理学・第2班, 文光堂, 東京 (2004)
- 3) 小澤俊彦, 安西和紀, 松本謙一郎, 放射線の科学・生体影響および防御と除去, 東京化学同人, 東京 (2012)
- 4) 佐治英郎, 前田 稔, 小島周二編, 新放射化学・放射線医薬品学, 南江堂, 東京 (2003)
- 5) 笹井啓資, 組織内低酸素細胞分画測定と放射線感受性, 癌の放射線治療, 田中敬正, 平岡真寛, 赤木 清, 笹井啓資編著, pp. 145-153, 金芳堂, 京都 (1998)
- 6) 八木國夫, 中野 稔・監修, 二木鋭雄, 島崎弘幸編, 活性酸素, 医歯薬出版, 東京 (1987)
- 7) 吉川敏一, フリーラジカルの科学, 講談社サイエンティフィク, 東京 (1997)
- 8) 今田伊助, 佐藤英介, 井上正康, 生体における活性酸素・フリーラジカルの産生と消去, 化学と生物, **37**, 411-419 (1999)
- 9) 康 東天, 体細胞ミトコンドリア DNA の維持・ミトコンドリアにおける酸化ストレスと DNA 高次構造, 蛋白質核酸酵素, **50**, 31-321 (2005)
- 10) 井上正康, 多細胞生物の設計原理とエネルギー代謝, 活性酸素と運動・しなやかな健康と長寿を求めて, 井上正康編著, pp. 1-7, 共立出版, 東京 (1999)
- 11) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., Free Radicals in Biology & Medicine, Oxford University Press, Oxford, UK (2015)
- 12) Moritake, T., Tsuboi, K., Anzai, K., Ozawa, T., et al., ESR spin trapping of hydroxyl radicals in aqueous solution irradiated with high-LET carbon-ion beams, *Radiat. Res.*, **159**, 670-675 (2003)
- 13) Matsumoto, K., Ueno, M., Nakanishi, I. and Anzai, K., Density of hydroxyl radicals generated in an aqueous solution by irradiating carbon-ion beam, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **63**, 1-5 (2015)
- 14) 勝村庸介, 放射線化学事始め2. X線と α 線照射による水の分解: 線質効果の発見, *Isotope News*, **746**, 48-49 (2016)
- 15) Matsumoto, K., Aoki, I., Nakanishi, I., Matsumoto, A., et al., Distribution of hydrogen peroxide-dependent reaction in a gelatin sample irradiated by carbon ion beam, *Magn. Reson. Med. Sci.*, **9**, 131-140 (2010)
- 16) Burns, W. G. and Baverstock, K. F., Oxygen as a product of water radiolysis in high-LET tracks. I. The origin of the hydroperoxyl radical in water radiolysis, *Radiat. Res.*, **86**, 1-19 (1981)
- 17) Matsumoto, K., Nyui, M., Ueno, M., Ogawa, Y., et al., A quantitative analysis of carbon-ion beam-induced reactive oxygen species and redox reactions, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, in press
- 18) Matsumoto, K., Nagata, K., Yamamoto, H., Endo, K., et al., Visualization of free radical reactions in an aqueous sample irradiated by 290 MeV carbon beam, *Magn. Reson. Med.*, **61**, 1033-1039 (2009)
- 19) Ueno, M., Nakanishi, I. and Matsumoto, K., Method for assessing X-ray-induced hydroxyl radical-scavenging activity of biological compounds/materials, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **52**, 95-100 (2013)
- 20) Matsumoto, A., Matsumoto, S., Sowers, A. L., Koscielniak, J. W., et al., Absolute oxygen tension (pO₂) in murine fatty and muscle tissue as determined by EPR, *Magn. Reson. Med.*, **54**, 1530-1535 (2005)
- 21) Ueno, M., Nyui, M., Nakanishi, I., Anzai, K., et al., Scavenging of reactive oxygen species induced by hyperthermia in biological fluid, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **54**, 75-80 (2014)
- 22) Matsumoto, A., Matsumoto, K., Matsumoto, S., Hyodo, F., et al., Intracellular hypoxia of tumor tissue estimated by noninvasive electron paramagnetic resonance oximetry technique using paramagnetic probes, *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 142-145 (2011)
- 23) Yamashita, S., Katsumura, Y., Lin, M., Muroya, Y., et al., Water radiolysis with heavy ions of energies up to 28 GeV. I. Measurements of primary g values as track segment yields, *Radiat. Phys. Chem.*, **77**, 439-446 (2008)

- 24) Yamashita, S., Katsumura, Y., Lin, M., Muroya, Y., et al., Water radiolysis with heavy ions of energies up to 28 GeV—2: Extension of primary yield measurements of very high LET values, *Radiat. Phys. Chem.*, **77**, 1224–1229 (2008)
- 25) Nakanishi, I., Yamashita, S., Shimokawa, T., Kamibayashi, M., et al., Analysis of redox states of protic and aprotic solutions irradiated by low linear energy transfer carbon-ion beams using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, *Org. Biomol. Chem.*, **16**, 1272–1276 (2018)

Abstract

**Applications of Charged Particle Accelerators
—Impact of the NIRS-HIMAC Facility—
Section 8 【Radiation Biology】 Contribution of
HIMAC for Radiation Biology
8.2.1 Generation of Reactive Oxygen Species in
Aqueous Phase by Carbon-Ion Beam**

Ken-ichiro MATSUMOTO[†], Minako NYUI, Megumi UENO,
Yukihiro OGAWA and Ikuo NAKANISHI: Quantitative RedOx

Sensing Team (QRST), Department of Basic Medical Sciences for Radiation Damages, National Institute of Radiological Sciences, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology, 4–9–1 Anagawa, Inage-ku, Chiba, Chiba 263–8555, Japan, [†]matsumoto.kenichiro@qst.go.jp

Hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) generation, hydrogen peroxide (H_2O_2) generation, and the total amount of oxidation reactions caused by X-ray or carbon-ion beam irradiation to aqueous samples were measured by electron paramagnetic resonance-based methods. The $\cdot\text{OH}$ generation was expected to be localized on the track/range of the carbon-ion beam/X-ray, and millimolar- and molar-levels of $\cdot\text{OH}$ generation were expected. The millimolar-level $\cdot\text{OH}$ generation, H_2O_2 generation, and total oxidation reaction were suppressed with increasing linear energy transfer (LET). The generation of reactive oxygen species (ROS) was not uniform at the molecular level and was LET dependent. It can be expected that differences in ROS generation and the molecular distribution could make a difference in the quality of radiation therapy.