

令和 3 年度  
共用施設(PASTA&SPICE、NASBEE、X/ $\gamma$ 線照射装置)  
成果報告書

**2021 Annual Report of the Research Project with  
NIRS Electrostatic Accelerators**

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構  
量子医科学研究所



# 令和3年度共用施設(PASTA&SPICE、NASBEE、X/γ線照射装置)

## 成果報告書

### 目次

#### PIXE 関連課題

課題番号	課題代表者 (所内対応者)	課題名	報告書ページ
19PJ02	武田 志乃	ウラン体内動態に関する検討	3
20PJ03	下川 卓志	重粒子線生物影響研究への元素分布解析の有効性検討	7
19PJ06	沼子 千弥 (武田 志乃)	環境から生体硬組織に蓄積されるウランおよび重金属の動態解析	9
20PJ09	田中 泉	ウラン細胞内動態に関する研究	13
19PJ05	上原 章寛	マイクロ PIXE を用いた体液中のアクチニドの簡易定量法の検討	17
19PH01	及川 将一	静電加速器棟 PASTA&SPICE の高度化技術開発	21
19PJ08	丸山 敦	江戸時代の古書籍に漉き込まれた毛髪のパIXEL分析	25
21PJ13	小川 寛之	マイクロ PIXE による神経組織中生命金属分布解析	31
21PJ12	鈴木 道生	無脊椎動物の内の垂鉛およびカドミウム濃集部位の解析	35
19PJ07	高橋 美智子	Ni 過剰耐性シロイヌナズナの元素分布解析	39
20PJ10	藤代 瞳 (武田 志乃)	腎臓内元素動態に関する研究	41

#### SPICE 関連課題

課題番号	課題代表者 (所内対応者)	課題名	報告書ページ
19SJ04	大澤 大輔	DNA 損傷複雑性に対する DNA 二本鎖切断損傷・修復タンパク質の応答に関する研究	47
21SJ05	小林 亜利紗	COX2 を指標とした放射線誘発バースタンダー細胞応答に関する研究	51
19SJ01	小西 輝昭	マイクロビーム細胞照射装置 SPICE のリサーチ&デベロップメント(R&D)	57
20SJ02	小西 輝昭	細胞核内局所線量付与誘発クロモソリプシス生成の研究	61



# PIXE 関連課題



## ウラン体内動態に関する検討: 腸管組織元素分布解析

課題番号(19PJ02)

○薬丸 晴子<sup>a</sup>、田中 泉<sup>a</sup>、阿山 香子<sup>a</sup>、田中 美香<sup>a</sup>、横地 和子<sup>a</sup>、上原 章寛<sup>a</sup>、  
及川 将一<sup>b</sup>、石原 弘<sup>a</sup>、武田 志乃<sup>a</sup>

a: 量研機構 放射線医学研究所 b: 量研機構 量子医科学研究所

プロトンや放射光などの微小ビーム、いわゆるマイクロビームを利用すると、非破壊分析が可能であり、組織微細構造を保持したまま元素イメージングが得られる。我々は SR-XRF(シンクロトロン放射光蛍光 X 線分析: 元素分布、局所定量)や XAFS(X 線微細構造法: 化学状態分析)、マイクロ PIXE(荷電粒子励起 X 線分析: 元素分布、局所定量)によりウランの体内動態研究を進めている[1-6]。これまでのウランばく露ラットの急性腎毒性モデルの解析では、腎臓の特定の尿細管領域(下流部位近位尿細管(S3 尿細管))において投与量の 500 倍以上に匹敵するレベルのウラン濃集部が散在すること[2, 3]や、そのウラン酸化状態が生体内で変化し排泄しにくい形態を呈するものがあることが明らかとなった[4, 5]。またマイクロ PIXE によりウラン濃集部の元素組成から生体ミネラルイゼーション様の現象が生じていることも示された[6]。

本年度は、腸管組織のウラン動態解析のための基礎検討を中心に行った。腸管は経口摂取した食物等に含まれる様々な成分を吸収する器官であり、領域毎に吸収特性が異なる。例えば上部空腸では金属や脂質が、中・下空腸では糖質やアミノ酸が吸収される。栄養成分の吸収の機序については研究が進んでおり、生体必須金属である亜鉛や鉄などの腸管吸収についても明らかにされてきている。特に鉄については還元酵素により腸管内で 3 価から 2 価に還元され、腸管上皮細胞膜の輸送体により細胞内へ取り込まれたのち体内に移行することが報告されており[7]、腸管で金属の化学状態変化が起きていることは興味深い。しかしながら、ウランの腸管からの体内移行の機序については未だ不明な点が多い。

今回はまず、腸管組織の元素分布についての基礎的情報を得るために、無処置のラット(10 週齢)の腸管の空腸から回腸にかけての 6 領域を採取し、分析試料とした。腸管の長軸方向に薄切した凍結切片(10  $\mu\text{m}$  厚)をポリプロピレンフィルムに付着させ、PIXE 測定用ホルダーに設置した。腸管の腸管壁から絨毛部を含む 1 mm  $\times$  1 mm 毎のイメージングを行い、さらに詳細イメージングを数箇所行った。ビーム径は 1  $\mu\text{m}$   $\times$  1  $\mu\text{m}$ 、積算電流は 0.2  $\mu\text{C}$  とした。

## 課題番号: 19PJ02

空腸領域の PIXE 分析では、リン、イオウ、カリウムは組織の形状とよく一致した分布であった。中空腸には斑点状にカリウムが局在している部分が確認された。

元素の局在位置を明確にするためには PIXE 分析試料の正確な構造の把握が必要である。そこで、実試料の自家蛍光による観察を検討したところ、絨毛や陰窩等の腸管の微細構造の確認ができ、構造把握に有用性が示唆された。細胞レベルでの識別に向けて、隣接切片の一般金属染色などを導入し、さらなる検討を進めた。

また腸管組織でのウランばく露コールド実験検討として、セシウムを皮下投与 (塩化セシウム、0.5mg/kg) したマウスの腸管の PIXE 分析を行った[8]。セシウム薄切分析標準によると、検出下限は約 110 ppm であった。低用量セシウム投与モデルでは、腸管のセシウム濃度は 1-3 ppm であり、110 ppm を超えるようなセシウム濃集部は検出されなかった。

今後はウランを経口投与した動物モデルを作製し、腸管ウラン分布を明らかにしたい。

## 謝辞

PIXE 測定では、磯浩之氏、松田拓也氏、樋口有一氏に技術的サポートをいただいた。本研究成果の一部は JSPS 科研費 16H02971 の補助を受けた。

## 参考文献

- [1] S. Homma-Takeda *et al.*, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 279: 627-631, 2009.
- [2] S. Homma-Takeda *et al.*, *J. Appl. Toxicol.* 33: 685-694, 2013.
- [3] S. Homma-Takeda *et al.*, *J. Appl. Toxicol.* 35: 1594-1600, 2015.
- [4] K. Kitahara *et al.*, *J. Synchrotron Rad.* 24: 456-462, 2017.
- [5] S. Homma-Takeda *et al.*, *Radiat. Phys. Chem.* 175: 108147, 2020.
- [6] S. Homma-Takeda *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* 20: 4677-4687, 2019.
- [7] A.T.McKie *et al.*, *Science* 291: 1755-1759, 2001.
- [8] 薬丸晴子ほか、X線分析の進歩, 53, 195-202, 2022



## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:19PJ02

課題名:ウラン体内動態に関する検討

課題代表者:武田 志乃

### 原著論文

1. 薬丸 晴子,田中 泉,田中 美香,横地 和子,阿山 香子,及川 将一,上原 章寛,石原 弘,武田 志乃. マイクロPIXEによる腸管の元素分布解析. X線分析の進歩. 2022, 53, p195-202.

### Proceedings

1. 薬丸 晴子,田中 泉,及川 将一,上原 章寛,石原 弘,武田 志乃. 腸管組織の元素分布解析のための試料調製法の検討. Fundamental of Toxicological Sciences, 2021, Suppl 8, p117.
2. 武田 志乃,阿山 香子,田中 泉,薬丸 晴子,及川 将一,上原 章寛,石原 弘. 骨組織のバイオ・ケミカルイメージングに向けた検討. Fundamental of Toxicological Sciences, 2021, Suppl 8, p123.

### 学会発表(口頭発表、ポスター発表、講演等)

1. Takeda Shino, Yakumaru Haruko, Ayama Kyoko, Uehara Akihiro, Tanaka Izumi, Ishihara Hiroshi  
Bioconcentration of uranium and tissue alteration in kidney of rats exposed to uranyl acetate during tubular development  
第64回放射線影響学会, 2021/09/22
2. 武田 志乃,阿山 香子,田中 泉,薬丸 晴子,及川 将一,上原 章寛,石原 弘  
骨組織のバイオ・ケミカルイメージングに向けた検討  
メタルバイオサイエンス研究会 2021, 2021/10/27
3. 薬丸 晴子,田中 泉,及川 将一,上原 章寛,石原 弘,武田 志乃  
腸管組織の元素分布解析のための試料調製法の検討

メタルバイオサイエンス研究会 2021, 2021/10/27

4. 薬丸 晴子, 田中 泉, 及川 将一, 上原 章寛, 石原 弘, 武田 志乃  
腸管の PIXE による元素分布解析  
第 57 回 X 線分析討論会, 2021/11/05
  
5. 武田 志乃  
マイクロ PIXE による生命金属分布解析  
第 33 回タンデム加速器及びその周辺技術の研究会, 2021/06/25

## 重粒子線生物影響研究への元素分布解析の有効性検討

### 課題番号(20PJ03)

○下川 卓志 a、富永 晃好 b、坂本 裕一 c、加川 雄介 d

a: 量研機構 量子医科学研究所 物理工学部

b: 静岡大学 農学部 地域フィールド科学教育研究センター

c: 岩手生物工学研究センター 生物資源研究部

d: 東レ株式会社先端融合研究所

### 報告書本文

本課題は、HIMAC 共同利用で実施中のイオンビームを利用した生物影響研究、特に育種研究・変異誘導研究における樹立した新品種(株)の新しい評価内容の確立と、その評価方法を利用した研究課題の推進を目的としている。

現在、HIMAC 共同利用研究では、複数の課題において変異誘導研究が実施されている。これらの課題では、すでに幾つかの変異体を得ることに成功し、その表現型や遺伝子変異の解析が進行中である。一方で、目的とする表現系や性状変化、例えば花の色や細胞の抗酸化能には、それぞれ特有の元素の関与が知られているが、その解析は一般的には非常に困難である。しかし、量研機構千葉地区の有する SPICE による PIXE 解析技術は、元素濃度を 2D マッピングで解析することが可能であり、さらに細胞レベルで解析できる分解能など、その解析能力はとても高い。HIMAC での重イオンビーム照射による変異誘導と PIXE による元素マッピング解析を組み合わせることにより、現在進められている変異誘導研究のより詳細な分析が可能になるだけでなく、新しい解析指標の追加による育種研究の多様化をすすめることが可能である。

そこで、本課題では、HIMAC 共同利用での育種課題である J501 課題で現在対象となっている植物・微生物、及び今後照射を検討している候補サンプルを中心に元素分布解析の検討を進めている。昨年度までは根菜類(ゴボウ、ナガイモ、ショウガ、ダイコン)や野菜類(ゴーヤ、ナス)、菌類(きのこ)など育種研究対象となる園芸作物を主に用いてきた。

21年度は前期3回、後期3回のMTを配分していただき、菌根、菌類(きのこ)、細菌類を用いて解析を行った。

## 課題番号:20PJ03

菌根の解析は、一昨年に行った根粒菌に比べ、サンプルサイズが小さいため、昨年度に至適な解析条件の検討を行っている。今年度はその条件を用いて解析を行い、菌根の種類や部位によって取り込まれる金属元素が異なること、また Fe や Zn のように元素毎で異なる局在を示すことが明らかになった。さらに 21 年度は高集積部位の拡大解析も行い、各元素の局在の詳細な比較も行う事ができた。

HIMAC J501 課題で複数の変異株取得に成功しているシイタケは、変異株と野生株とで、条件を変えて培養した際の金属元素等の取り込みを検討した。21 年度は解析数が限られていたが、培養条件による取り込み量の変化、及び株毎の違いを示唆する結果を得ることができた。

21 年度の新しい試みとして、浮遊培養をおこなっている細菌類の解析条件の検討を進めた。このような実験では、株間の比較が目的となるため、同一解析視野内で複数の株の解析を行えることを目標とした。今回、4 株の同一視野内での解析には成功したが、サンプルの剥離などの問題点も明らかとなった。

これまでの成果は、J501 課題で進める育種研究の解析手段の一つとして PIXE の有効性を示すものである。20 年度に引き続き 21 年度も、コロナ渦における活動と移動の制限の影響が大きく、広報活動もできなかったこともあり、HIMAC 共同利用における育種研究および PIXE での育種サンプルの解析が少なかった。特に、新規参加での照射依頼は 1 件のみ、または解析依頼は新規参加は 0 であった。しかし、コロナ終息後を見据え、解析依頼の相談がすでに数件入っている。

今後も引き続き育種対象植物などの解析を進め、イオンビームにより樹立した変異体を用いた、元素を起点とする機能解析の可能性を検討していく予定である。

## 環境から生体硬組織に蓄積されるウランおよび重金属元素の動態解析: 肋骨組織による検討

課題番号(19PJ06)

○沼子 千弥<sup>a</sup>、葉丸 晴子<sup>b</sup>、武田 志乃<sup>b</sup>、及川 将一<sup>c</sup>

a: 千葉大学大学院理学研究院, b: 量研機構放射線医学研究所

c: 量研機構量子医科学研究所

生物は開かれた系の存在であり、常に外界から物質やエネルギーを取り込んでいるために、普遍的にウランを含む物質が遍在する環境から、ウランを体内に取り込む可能性がある。武田はこれまで、ウラン投与ラットの腎臓組織におけるウランの2次元分布を測定し、ウランにより発現される腎障害の機序について研究を進めている。その中で、投与後ウランははじめ腎臓に移行し、脱離した後に、硬組織である骨に蓄積がみられるがみられることがわかった。一方、沼子は、ヒザラガイの歯舌やマストドンの象牙の化石などの生体硬組織に、ウランや希土類元素などの重元素が高濃度に蓄積する現象をみいだしており、武田のウラン投与ラットの骨の系は、この生体鉱物化現象におけるウランの蓄積機序を解明するのに重要であると考えた。

そこで2018年度から、ラットの大腿骨試料を対象にマイクロPIXEやマイクロ-SR XRFによる2次元元素マッピングを行い、ウランの蓄積の有無と他の重元素との相関を調べるための研究を開始した。2018～2019年度は、マイクロPIXE・マイクロ-SR XRFでの微小部2次元元素マッピングに適した大腿骨の試料調製法について検討した。これに引き続き、2020～2021年度は、さらに試料調製を工夫し、軟骨から骨化組織までを含む肋骨を対象として、組織内の硬組織主要成分であるリン、カルシウムの分布解析を行った。

今年度も引き続き肋骨についての測定を行った。測定には10週齢のラットの肋骨を使用した。肋骨は胸骨との接合部および椎骨接合部付近で切断し、凍結組織切片用包埋剤に包埋した。試料の薄切は軟骨部分から硬骨部分まで全体の断面が観察出来るように、長軸方向に沿って行った。凍結切片の作製は川本法[1]で行った。すなわち、粘着性のあるフィルム(Cryofilm)を包埋ブロックの表面に付着させた状態で薄切した。組織はフィルムに付着した状態で薄切され、これを測定用金属ホルダーに設置しPIXE分析用の試料とした。

肋骨のPIXE分析は、 $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ のビームを用い、 $1000\ \mu\text{m} \times 1000\ \mu\text{m} \sim 250\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m}$ の領域

## 課題番号:19PJ06

を積算電流 0.2  $\mu\text{C}$  でスキャンした。2次元元素マッピングは隣接切片のヘマトキシリン-エオシン (HE)染色と対応させた。

PIXE 分析の結果よりイオウ、カリウムの分布は軟骨部分の形状と良い一致を示した。硬骨部分にもイオウ、カリウムの分布が見られたが、軟骨部分よりも少なかった。

軟骨・硬骨の接合部分は大腿骨の成長板とよく似た構造を示していた。隣接切片の HE 染色により確認できる組織構造とリン・カルシウムのマッピングの対比から、肥大軟骨細胞の消失した軟骨の先端付近からリン・カルシウムの濃集が開始していることが示された。

軟骨の中心部では HE 染色により紫色に濃染される部分がみられた。PIXE 分析で、この濃染部にはリン・カルシウムが局在し石灰化様状態が生じていると考えられた。リン・カルシウムのマッピングと組織像の重ね合わせから、軟骨内部では丸く大きくなった軟骨細胞の周囲にリン・カルシウムは局在しており、細胞痕が丸い穴になったスポンジ様の形状を呈していた。

軟骨・硬骨の接合部分と軟骨の内部のリン・カルシウムの局在の様相に違いが見られたことから、両者の化学形等の違いについての検討を行っていきたい。

## 参考文献

[1]川本忠史、病理技術 72 巻 2 号 p.76-83, 2009

## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:19PJ06

課題名:環境から生体硬組織に蓄積されるウランおよび重金属の動態解析

課題代表者:沼子 千弥

### 原著論文

1. Akihiro Uehara, Daisuke Akiyama, Atsushi Ikeda-Ohno, Chiya Numako, Yasuko Terada, Kiyofumi Nitta, Toshiaki Ina, Shino Takeda-Homma, Akira Kirishima, Nobuaki Sato. Speciation on the reaction of uranium and zirconium oxides treated under oxidizing and reducing atmospheres. *Journal of Nuclear Materials*. 2022-02, 559.





## ウラン細胞内動態に関する研究: 腎尿細管領域由来細胞における元素分布解析

課題番号(20PJ09)

○田中 泉<sup>1</sup>、藤代 瞳<sup>2</sup>、葉丸 晴子<sup>1</sup>、田口 央基<sup>2</sup>、田中 美香<sup>1</sup>、横地 和子<sup>1</sup>、  
阿山 香子<sup>1</sup>、上原 章寛<sup>1</sup>、石原 弘<sup>1</sup>、及川 将一<sup>3</sup>、姫野 誠一郎<sup>2,4</sup>、武田 志乃<sup>1</sup>

<sup>1</sup>量研機構放射線医学研究所 <sup>2</sup>徳島文理大学 <sup>3</sup>量研機構量子医科学研究所

<sup>4</sup>昭和大学薬学部

ウラン動物実験の先行研究では、腎臓の近位尿細管下流領域において高濃度ウラン濃集部を形成し残存することが示されている[1, 2]。また一部のウラン濃集部はリン、カリウムと共存していることがマイクロ PIXE により明らかとなっている[3]。ウラン濃集部の残存による将来的な晩発影響が懸念されることから、内部被ばく低減化に向けウラン生体濃集機序を明らかにし、その仕組みに基づいた体外排出が重要となる。近年、マウスより樹立した近位尿細管領域由来培養細胞を用い、腎臓尿細管の領域特異的な物質輸送機序や有害重金属に対する毒性研究が行われている[4-6]。これらの細胞を用いて細胞内ウラン分布解析を進めている。

これまでにウラン標的部位である下流領域の近位尿細管(S3 尿細管)に対応する近位尿細管領域由来培養細胞(S3 細胞)を用い、マイクロ PIXE による一細胞イメージングによる細胞内分布解析手法を確立した[7]。今年度はウランばく露による内因性のリン、カリウム分布の経時変化を調べた。

直径 6 cm の培養ディッシュにポリプロピレン膜(3 cm × 3 cm, 6 μm 厚)を接着し、これに  $3 \times 10^5$  の尿細管領域由来 S3 細胞を播種した。24 時間後に 10 倍等量の重炭酸ナトリウムを含む 100 μM 酢酸ウラニル入り培地に交換し、さらに 1, 4, および 24 時間培養した。PBS で洗浄後冷メタノールで固定し、付着細胞タイプの PIXE 測定試料とした。対照群となる S3 細胞はウランを含まない培地で培養した。マイクロ PIXE 分析には 1 ミクロン四方のビームを用い、50 ミクロン四方～3000 ミクロン四方の領域に対し元素イメージングを取得した(積算電流:0.2 μC)。直径 6 cm の培養ディッシュに同様に各群 3 連で S3 細胞を播種し、ICP-MS によりウラン細胞取り込みバルク量を求めた。

対照 S3 細胞の付着細胞タイプの PIXE イメージングによると、リン、カリウムは細胞の中央部中心に分布し、顕著な局在は認められなかった。ウランばく露後初期(1-4 時間)においては、リン、カリウムは対照細胞と同様に細胞内に大きな偏りは無く一様分布していたが、24 時間後においてはリン、カリウムの濃集部が生じた。ICP-MS によるウラン細胞取り込みバルク量から算出するとばく露後初期(1

## 課題番号:20PJ09

ー4 時間)の一細胞当たりのウラン取り込み量は数〜数十 fg であるのに対し、24 時間後では数百fg 以上に達した。細胞内ウラン量とリン、カリウム濃集部形成との関係を調べるため、現在薄切分析標準 [8]を用いてリン、カリウム濃集部形成細胞のウラン量の解析を進めている。尿細管領域由来培養細胞は in vivo で観察される尿細管でのウラン、リン、カリウム分布と類似の様態を呈するため、ウラン生体濃集機序を調べる実験系として適しているものと考えられた。また、PP 膜への細胞付着安定化についても PP 表面処理等の検討を加えた。

## 謝辞

PIXE 測定において技術的なサポートをいただきました、磯浩之氏、松田拓也氏、樋口有一氏に感謝いたします。本研究成果の一部は JSPS 科研費 19H05775 の補助を受けた。

## 参考文献

- [1] S. Homma-Takeda *et al.*, *J. Appl. Toxicol.* 33: 685-694, 2013.
- [2] S. Homma-Takeda *et al.*, *J. Appl. Toxicol.* 35: 1594-1600, 2015.
- [3] S. Homma-Takeda *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* 20: 4677-4687, 2019.
- [4] H. Fujishiro *et al.*, *Fund. Toxicol. Sci.* 6: 117-123, 2019.
- [5] H. Fujishiro *et al.*, *J. Toxicol. Sci.* 44, 611-619, 2019.
- [6] H. Fujishiro *et al.*, *Toxics.* 8, 24, 2020.
- [7] S. Homma-Takeda *et al.*, *Minerals* 11: 191, 2021.
- [8] S. Homma-Takeda *et al.*, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 279, 627-631, 2009.

## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:20PJ09

課題名:ウラン細胞内動態に関する研究

課題代表者:田中 泉

### Proceedings

1. Takeda Shino, Fujishiro Hitomi, Tanaka Izumi, Yakumaru Haruko, Ayama Kyoko, Uehara Akihiro, Oikawa Masakazu, Sekizawa Oki, Nitta kiyofumi, Himeno Seiichiro, Ishihara Hiroshi. Intracellular dynamics of uranium distribution in cultured renal tubular cells. The Journal of Toxicological Sciences, 2021, Suppl 8, S91.

### 学会発表(口頭発表、ポスター発表、講演等)

1. 武田 志乃  
量子ビームを利用した生命金属動態解析  
金属創薬に関するシンポジウム, 2021/12/21
2. Takeda Shino, Fujishiro Hitomi, Tanaka Izumi, Yakumaru Haruko, Ayama Kyoko, Uehara Akihiro, Oikawa Masakazu, Sekizawa Oki, Nitta kiyofumi, Himeno Seiichiro, Ishihara Hiroshi  
Intracellular dynamics of uranium distribution in cultured renal tubular cells  
第48回日本毒性学会学術年会, 2021/07/07



## マイクロ PIXE を用いた血清中のアクチニドの簡易定量法の検討

### 課題番号(19PJ05)

○上原 章寛<sup>a</sup>、及川 将一<sup>b</sup>、田中 泉<sup>a</sup>、石原 弘<sup>a</sup>、武田 志乃<sup>a</sup>

a: 量子科学技術研究開発機構 放射線医学研究所

b: 量子科学技術研究開発機構 量子医科学研究所

#### 【はじめに】

原子力発電所における廃炉作業での放射性核種による内部被ばくを想定したとき、体内の被ばく線量をモニタリングするとともに、核種の体外排出に向けた迅速な治療が求められる。我々は尿をバイオロジカルモニタリング対象試料として、マイクロ PIXE を用いた尿中のウランの迅速定量法を開発してきた[1]。1  $\mu\text{L}$  の尿中のウランをフッ素加工したポリプロピレンフィルムに滴下することで乾燥液滴の均一性を確認し、ウランの特性 X 線強度より尿中ウランを定量した[2]。一方、ウランの急性内部被ばくを想定したとき、血液中のウランを定量できれば、より迅速な内部被ばくスクリーニングとして役に立つ。本研究では、血清を用いて滴下試料に対するウラン定量手法を検討した。

#### 【結果と考察】

PIXE 測定のための滴下試料は薄膜フィルムの支持体に滴下試料が均質に付着するとともに真空下において乾燥した試料ははがれないことが必要になる。まず、滴下試料を作製するための支持体について検討した。尿滴下試料のときと同じくフッ素加工した 6  $\mu\text{m}$  厚ポリプロピレンフィルムを用いたところ、乾燥した血清滴下試料は支持体との親和性が低いため、フィルムから脱落した。フッ素加工をしていないポリプロピレンフィルム上に滴下したところ、フッ素加工したフィルムに比べてはがれにくいものの、試料の持ち運びなどで生じる衝撃によって乾燥した滴が脱落することがあった。そこでポリプロピレンフィルムの代わりに粘着剤付きのカプトンテープを用いた。シリコン系粘着剤で 35  $\mu\text{m}$  厚のカプトンテープ(カプトンフィルムの厚み 12  $\mu\text{m}$ 、粘着部の厚み 23  $\mu\text{m}$ )に血清を滴下し乾燥したところ、均質性の高い円形の試料が得られた(図 1)。血清由来の特性 X 線より、P、S、Cl、K、Ca、Fe、Cu、Br の存在が確認された。また、カプトンテープの材料由来のピークとして Si K $\alpha$ (1.74 keV)のみで、ウランの特性 X 線領域(13–18 keV)における元素は観察されないのみならず、低エネルギーの生体試料中の元素の検出にも使用可能であることが分かった。一方、実験上の取り扱いの容易な 50  $\mu\text{m}$  厚のカプトンテープ(カプトンフィルムの厚み 25  $\mu\text{m}$ 、粘着部の厚み 25  $\mu\text{m}$ )を用いた時、カプトンフィルムの導電性が低いためチャージアップが生じバックグラウンドが高くなり、試料の測定には不向きであることが分

かった(図2)。本実験では 35  $\mu\text{m}$  厚のカプトンが測定に最も適していると考えられた。

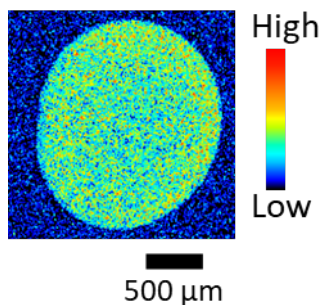


図 1. 血清滴下試料の X 線イメージ (Ca-K $\alpha$  線)

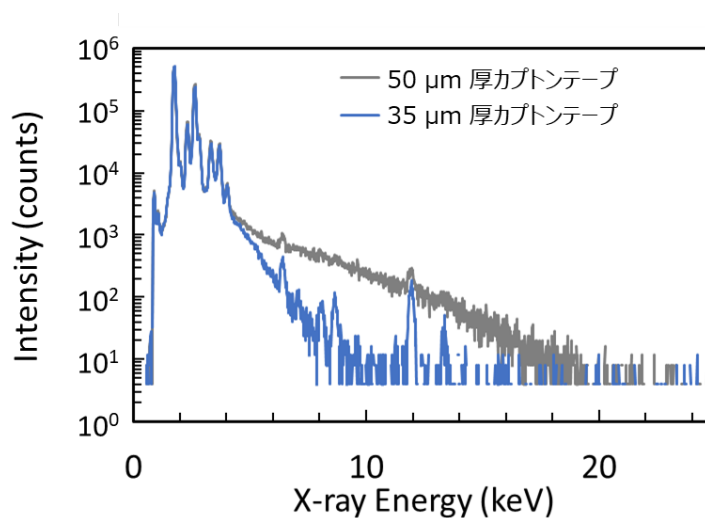


図 2. カプトンテープを支持体とした血清滴下試料の PIXE スペクトル (35, 50  $\mu\text{m}$  厚)

### 謝辞

本研究成果の一部は JSPS 科研費 19H05775 の補助を受けた。PIXE 測定では、磯浩之氏、松田拓也氏、樋口有一氏に技術的支援を受けた。

### 参考文献

- [1] A. Uehara, M. Oikawa, I. Tanaka, H. Ishihara, S. Homma-Takeda, Quantitative Analyses of Urinary Uranium by  $\mu$ -PIXE, *Minerals*, 11(2), 2021, 147.
- [2] 上原章寛、及川将一、田中泉、石原弘、武田志乃、マイクロ PIXE を用いた生体液中の元素定量のための迅速・簡便な試料作製法の検討、*X線分析の進歩*, 51 (2020) 81-90.

## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:19PJ05

課題名:マイクロPIXEを用いた体液中のアクチニドの簡易定量法の検討

課題代表者:上原 章寛

学会発表(口頭発表、ポスター発表、講演等)

1. 上原 章寛、及川 将一、田中 泉、石原 弘、武田 志乃

μ-PIXEを用いた溶液滴下試料中の微量元素検出のための基礎検討

第33回タンデム加速器及びその周辺技術の研究会, 2021/06/24-25





## 静電加速器棟(PASTA &amp; SPICE)の高度化技術開発

## 課題番号(19PH01)

○及川将一<sup>a</sup>,石川剛弘<sup>a</sup>,磯浩之<sup>b</sup>,樋口有一<sup>b</sup>,松田拓也<sup>b</sup>

a:量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 量子医科学研究所

物理工学部 静電加速器運転室

b:(株)巧

## &lt;はじめに&gt;

量子科学技術研究開発機構量子生命・医学部門量子医科学研究所(QST 量医研)の静電加速器棟には、最大ターミナル電圧 1.7 MV の High Voltage Engineering Europe B. V. (HVEE)製の Model4117MC+タンデトロン加速器が設置されており、3 MeV 程度の陽子線を利用した PIXE(Particle Induced X-ray Emission)分析やマイクロビーム細胞照射などの実験に広く利用されている<sup>1)</sup>。

本研究課題では、マイクロビーム細胞照射装置 SPICE(Single Particle Irradiation system for Cells)において、5.1 MeV の  ${}^4\text{He}^{2+}$ イオン( $\alpha$ 粒子)の照射を実現する「SPICE- $\alpha$ 」に関する技術開発を進めている。昨今 SPICEにおいては、現状のプロトンより高 LET 粒子を用いた細胞間の照射応答に対する線質効果の検討が研究テーマとして掲げられており、SPICE への  ${}^4\text{He}^{2+}$ イオンの導入が期待されている。しかし当施設では、直近 10 年以上  ${}^4\text{He}^{2+}$ イオンを利用したことがなく、イオン源からターゲット位置までのビーム輸送パラメーターを構築と最適化が急務となっている。そこで我々は、SPICE への  ${}^4\text{He}^{2+}$ イオンの導入実現を目指し、イオン源・加速器・ビームラインにおける各種ビーム輸送パラメーターの最適化を進め、マイクロビーム形成実験を行っている。本報告では、SPICE への  ${}^4\text{He}^{2+}$ イオンのビーム輸送実験の進捗状況について報告する。

<SPICE- $\alpha$ の開発状況>

2019 年度に、デュオプラスマトロン型イオン源(Model 358, HVEE 製)及び荷電変換用リチウムオープンのクリーニング・整備を重点的に行った上で、イオン源パラメーターの最適化を実施した。その後、加速器や各種ビーム輸送要素の最適化実験を進め、SPICE 導入直前の位置で 16 nA 程度のビーム電流を確保するに至り、SPICE へのビーム輸送実験を行った。2020 年度は、イオン源の荷電変換効率を精査し、現状で確保できる最大ビーム電流(SPICE 導入直前で $\sim$ 60 nA)にてマイクロビーム形成実験を行った。その結果、大気取り出し後の細胞照射位置に設置したシンチレータ(CaF<sub>2</sub>(Eu))上で直

## 課題番号: 19PH01

径 10  $\mu\text{m}$  以下のマイクロビーム形成に成功した。しかし、荷電変換用リチウムオープンに熱損失の問題があり、ビーム電流の増強が課題として残っていた。2021 年度は、当年 7 月に量子医科学研究所で主催した「第 33 回タンデム加速器及びその周辺技術の研究会」において、荷電変換用リチウムオープンに充填する金属リチウムを細粒化することにより熱伝導性が向上する(=熱損失が低減)との助言を受けたことから、その手法を採用した上でイオン源部の  ${}^4\text{He}$  ビーム電流を確認する実験を行った。

次年度以降も、更なる  ${}^4\text{He}^{2+}$  ビーム電流の向上を目指し、イオン源部における He 負イオンの生成効率について調査を進め、荷電変換用リチウムオープンの調整及び最適化を実施する予定である。

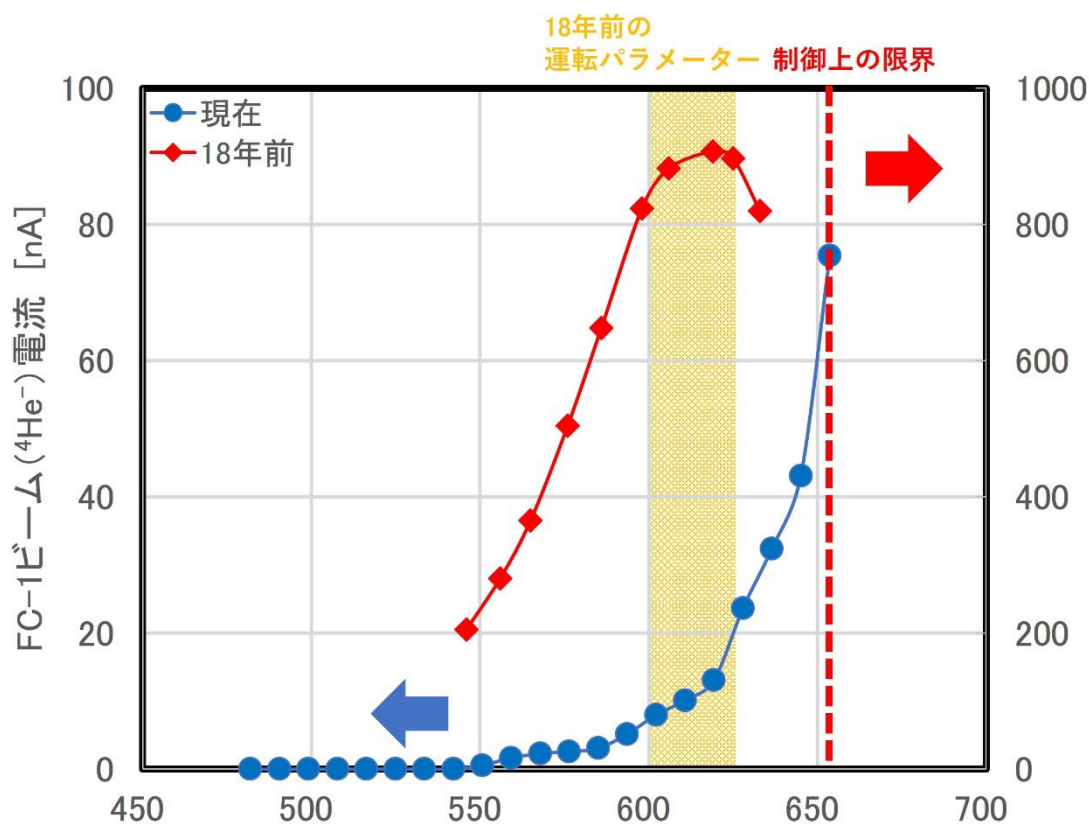


図. 荷電変換用リチウムオープン温度と  ${}^4\text{He}$  ビーム電流の過去データとの比較  
新旧パラメーターを比較すると、ビーム電流の立ち上がる温度が「現在(青丸)」の方が高温側にシフトしており、リチウム蒸気が効率的に発生できない状況(熱損失)が明らかである。

### 【参考文献】

- 1) M. Oikawa, N. Suya, T. Konishi, T. Ishikawa, T. Hamano, S. Takeda, *Int. J. PIXE* **25** (2015) 215-223.

## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:19PH01

課題名:静電加速器棟 PASTA&SPICE の高度化技術開発

課題代表者:及川 将一

Proceedings

1. 及川 将一,石川 剛弘,磯 浩之,樋口 有一,松田 拓也. QST 量医研静電加速器施設(PASTA&SPICE)の現状 2021. 第33回タンデム加速器及びその周辺技術の研究会報告集, 2022-04.

学会発表(口頭発表、ポスター発表、講演等)

1. 及川 将一,石川 剛弘,磯 浩之,樋口 有一,松田 拓也  
QST 量医研静電加速器施設(PASTA&SPICE)の現状 2021  
第33回タンデム加速器及びその周辺技術の研究会, 量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 量子医科学研究所, 2021/06/24-25.



## 江戸時代の古書籍に漉き込まれた毛髪のパIXE 分析

## 課題番号(19PJ08)

○丸山敦<sup>a</sup>、及川将一<sup>b</sup>、二ツ川章二<sup>c</sup>、神松幸弘<sup>d</sup>、入口敦志<sup>e</sup>

a: 龍谷大学、b: 量子医科学研究所、c: アルファ・タウ・メディカル、

d: 立命館大学、e: 国文学研究資料館

## 要旨

ユネスコ無形文化遺産「和食」は、日本の風土と社会で発達してきた料理と定義されるが、実は西洋化の中で成立した側面もある。西洋化前、すなわち近世(江戸時代)以前の食生活は、特に庶民のものとなると、まだまだ不明な点が多い。古文書や伝承に残された記述を読み解く従来の歴史研究では、近世の庶民がコメ、野菜、魚介類を主な食物としていた一方で、多彩な献立や珍味が開発されていたことが示されているが[1]、量的な評価には不向きで、科学的な検証が待たれる。

2018年8月、私たちの研究チームは、古書籍から抜き出した毛髪科学分析から食生活を復元する手法を提案した[2]。古書籍から抜き出した毛髪は、表紙に使われた再生厚紙に漉き込まれているという事実から、古書籍が刊行された都市・年代に生活していた庶民のものと推定されており[3]、年代と場所の記録されたヒトの生物試料として扱いうるからある。その研究では、毛髪安定同位体分析の結果から、当時の食生活がコメと海産物にほぼ純粋に依存していたことに加えて、江戸時代中期から後期にかけて海産物への依存が高まったことや、江戸と上方での炭素源の違いなども示唆された。

これに続く本課題では、2019年度後期以降、PIXE分析を用いて書籍に漉き込まれた毛髪に含まれる複数の元素の量を推定し、より網羅的に近世庶民の食環境を推定することに挑戦している。書籍に漉き込まれた毛髪に対してPIXE分析が適用可能であることを確認した上で、都市間の違いや経年変化を検証することで、近世庶民の生活をより詳細に推定することを試みている。

古本市で買い求めた古書籍と、龍谷大学が大宮図書館西翼地下1階に所蔵する約7万冊の古書籍から、刊行都市、刊行年号が明記され、かつ漉き込まれた毛髪が目視できるbook-set(定義:同題のシリーズ本で、同時に印刷・販売される分冊の集合)を選出した。選出された書籍405book-setの再生厚紙から、最長で20cm相当分の毛髪を、書籍を傷つけないように抜き取った。書籍の刊行年と印刷年のズレや、刊行都市の信憑性は、書誌学的な鑑定によって推定し、試料を厳選した(現在までのPIXE分析では、印刷が刊行年から10年以内と推定される書籍のみを対象を限定している)。一方で、比較対象となる現代人の毛髪も、近世の出版が盛んであった京都・大阪・東京の三都市から収集した。

収集にあたっては、倫理審査を通過した方法で匿名の協力者を募り、老若男女の偏りが生じないように計画した。書籍由来および現代の毛髪を量子医科学研究所での PIXE 分析に供し、先行研究[4][5]の手法に倣って 15 元素の含有量を測定した。当報告執筆時点では、京都刊行の 25 book-set 分、大坂刊行の 26 book-set 分、江戸刊行の 23 book-set 分、三都以外で刊行(田舎版)の 10 book-set 分の毛髪について、分析が終了している。また、京都在住 12 名、大阪在住 13 名、東京在住の 12 名、多地域在住 1 名の現代人の毛髪分析も完了している。

書籍由来の毛髪と協力者の毛髪と比較からは、近世と現代の間で、庶民が摂取したものに変化があったことを示した。暫定的な解析として、Welch の t 検定で 13 微量元素量比較したところ、Na, Mg, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Pb は近世の毛髪に多く含まれ、S, Zn は現代の毛髪に多く含まれていた。その他の元素は有意差が見られなかった。Pb と Br については、定量分析上の不確かさを懸念し、暫定解析からは除外した。

書籍由来の毛髪に含有される 15 微量元素量を応答変数に、推定年代、推定都市を説明変数にした線形モデル解析で暫定的に検討したところ(AIC 最小のモデルのみを暫定採用)、近世 200 年間の庶民の食環境にはさまざまな要因で変異があったことが見えてきた。例えば、Na と Cu は、京都と大坂で高い傾向が見られた。Cl では、都市部に微減が、田舎では微増が見られた。K では、すべての地域で減少傾向が見られた。Hg は京都で高い傾向が見られたが、分析上の懸念が払拭できていない。Pb は、初期の大阪において低い値を示した。

このような解析から、PIXE 分析を用いて近世庶民の毛髪を分析することで、近世庶民の食生活をする推定することが可能であることは十分に示唆された。予定された分析の一部が未完了であることから最終的な統計解析は行っておらず、断定的な考察は敢えて慎みつつ、いくつかの傾向とその解釈を挙げるができる。例えば、水の硬度の指標であるマグネシウムとカルシウムは、現代人の含有量の平均値に対して、近世庶民の平均値の方が有意に高い値を示した。このことは、井戸から汲み上げた湧き水が飲料水として摂取される割合は、近世の京都、大坂においては現代よりも高かったことと関係するかもしれない。また、体内になくはならない常量・微量必須元素のほとんどは現代の方が減少傾向にあった。これは、近年、食品の精製が進んだ結果として、調理過程における損耗による食品中微量元素含有量が低下し、摂取不足に至っていると見る知見と一致している。あるいは、施肥を繰り返してきた日本の圃場において、近代以降、微量元素が減少した可能性も考え得る。今後は、分析数を増やすなかで都市間の変異や経年変化の検証が可能となり、歴史的イベント(飢饉、開国など)の影響を検証できるようになると期待される。

参考文献

- [1] 原田信男 (2014)江戸の食文化 和食の発展とその背景.小学館
- [2] Maruyama A, Takemura J, Sawada H, Kaneko T, Kohmatsu Y, Iriguchi A (2018) Hairs in old books isotopically reconstruct the eating habits of early modern Japan. Scientific reports 8:12152
- [3] 橋口候之助(2005)和本入門.誠心堂書店
- [4] 世良耕一郎, 寺崎一典, 佐々木敏秋 (2006-2007) 微小ヒゲ試料・長い毛髪試料分析による体内元素濃度変化の測定. NMCC 共同利用研究成果報告文集 14 242-255
- [5] 伊藤じゅん, ニツ川章二, 斉藤義弘, 世良耕一郎, 石井慶造 (2006-2007) PIXE 研究支援のためのデータベースの構築. NMCC 共同利用研究成果報告文集 14 122-135





## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:19PJ08

課題名:江戸時代の古書籍に漉き込まれた毛髪のパIXE分析

課題代表者:丸山 敦

学会発表(口頭発表、ポスター発表、講演等)

1. 入口 敦志,丸山 敦,眞田 裕生,木村 俊太郎,桑木 捷汰,神松 幸弘,及川 将一,二ツ川 章二  
— 版本の表紙裏に漉き込まれた毛髪のパIXE分析からわかること—安定同位体分析とPIXE分析—  
日本近世文学会 2021 秋季大会, 2021/11
2. 丸山 敦,及川 将一,二ツ川 章二,神松 幸弘,入口 敦志,眞田 裕生  
江戸時代の古書籍に漉き込まれた毛髪のパIXE分析  
放射線医学総合研究所サイクロトロン・静電加速器共用施設利用成果報告会, 2021/08
3. 丸山 敦,眞田 裕生,木村 俊太郎,及川 将一,神松 幸弘,入口 敦志,二ツ川 章二  
近世の和装本に漉き込まれた毛髪のパIXE分析で当時の食環境を推し測る  
第33回タンデム加速器及びその周辺技術の研究会, 2021/06



## マイクロPIXEによる神経組織中生命金属分布解析

## 課題番号(21PJ13)

○小川 覚之<sup>a</sup>、及川 将一<sup>b</sup>、上原 章寛<sup>c</sup>、武田 志乃<sup>c</sup>

a:獨協医科大学 先端医科学研究センター b:量研機構 量子医科学研究所

c:量研機構 放射線医学研究所

アルツハイマー型認知症やレビー小体型認知症、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患では、アミロイドβやタウ、α-シヌクレインなどのタンパク質の凝集・蓄積という現象が病理の中心にあるとされている。しかしこの凝集・蓄積を惹起する環境因子には不明な点が多く、患者脳組織内のタンパク質分子をとりまく環境の質的变化の鍵となる要素として特に金属元素の関与があると考えられている。そこで本研究は神経変性疾患特有の脳組織環境を明らかにすることを目的とし、アルツハイマー型認知症・レビー小体型認知症・ALS・比較健常群の患者死後脳検体における金属原子群の組織局在の解析を行っている。

2021年度はコロナウイルス感染症により脳検体提供が遅滞したこともあり、ブタ脳・脊髄を試料とし、ヒト脳検体と同条件で試料調整し切片から測定までの条件を検証した。ドライアイスパウダー法により凍結した脳から大脳皮質側頭様を切り出し、10μm厚凍結切片を作製し、ポリプロピレン膜に付着、専用ホルダに固定した。隣接部位はHEなど組織学染色を行った。初めのPIXE測定はブタ脊髄を試料とした。脊髄の横断切片・左側分全体(4mm x 6mm)について、2000μm x 2000μm x 6面の測定を行い、さらに前角部分周辺にフォーカス(1000μm x 1000μm および 500μm x 500μm)して測定を実施した。解析には OMDAQ2007 ソフトウェアを用いた。広い領域を測定できた為、白質・灰白質の領域構造とリンやカリウムの分布が良く対応する様子が明瞭に観察された。この測定には2日間のマシンタイムを要し、今後より大きいヒト検体の測定の場合には、測定エリアを狭い領域にフォーカスするなど、測定上の制約があることが分かった。測定の高速度化・昼夜連続測定などによる効率化は今後の課題であろう。ブタ脳試料を使い試料調整から測定・解析まで一連の条件が整ったため、ヒト脳検体を用いた解析を開始した。アルツハイマー型認知症と比較健常群の大脳皮質側頭回の薄切片に対し、2000μm x 2000μm x 4面、1000μm x 1000μm および 500μm x 500μm、50μm x 50μmと段階的にフォーカスして測定した。引き続き2022年度の測定により、金属イメージングデータの取得を進めてゆく。

多施設間共同研究倫理承認:主任機関 獨協医科大学 倫理 2021-004 研究代表者小川覚之、放射線

## 課題番号:21PJ13

医学研究所 倫理 21-013 武田志乃

謝辞:PIXE測定では、磯浩之氏、松田拓也氏、樋口有一氏に技術的サポートをいただいた。

本研究成果の一部はJSPS 科研費 20K07222(小川)、20H05499(小川)の補助を受けた。

## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:21PJ13

課題名:マイクロPIXEによる神経組織中生命金属分布解析

課題代表者:小川 寛之

学会発表(口頭発表、ポスター発表、講演等)

1. 小川 寛之

疾患脳から迫る疾患特異的金属蛋白質の分子構造病態解析

蛋白質科学会, 2021/06/16

2. 小川 寛之

疾患脳における金属タンパク質の疾患特異的分子病態解明へ

新学術領域研究「生命金属科学」領域会議, 2021/07/03

3. 小川 寛之

神経変性疾患死後脳の生命金属分析科学

新学術領域研究「生命金属科学」領域会議夏合宿, 2021/09/05

4. 小川 寛之

Integrated Omics: ヒト疾患脳から分子病態へ

第1回 生体分子ナノ解析・イメージング研究会, 2022/03/25



## アオイソメ下顎における金属濃集の分布解析

## 課題番号(21PJ12)

○鈴木 道生<sup>a</sup>、柏原 亘<sup>a</sup>、加藤 由悟<sup>a</sup>、飯島 まゆみ<sup>a</sup>、武田 志乃<sup>b</sup>

a: 東京大学大学院農学生命科学研究科 b: 量研機構 放射線医学研究所

アオイソメ(*Nereis aibuhitensis*)は、環形動物門・多毛綱・サンバゴカイ目に分類されている。磯や干潟、砂浜、そして寒い海から温かい海、また浅い海から深海まで、さまざまな場所に生息しており、種類も個体数も多いことで知られている。体長は5-8 cmほどで、体の厚みは5 mm-1 cmである。アオイソメと同じサンバゴカイ目・チロリ亜目・チロリ科に属する *Glycera dibranchiata* の下顎には、銅が濃集していることが知られている。銅は緑塩銅鉱  $[Cu_2(OH)_2Cl]$  として下顎の先端部の外側に多く存在しており、緑塩銅鉱が分布している下顎先端部は高い耐摩耗性を有している[1]。*G. dibranchiata* の下顎は体積割合にして金属を約4%程度しか含んでいないにもかかわらず、人間の歯の象牙質以上エナメル質未満の硬さを有している。また、下顎において緑塩銅鉱の体積割合が増加するほど硬度と弾性率が上昇することが示されている。また、サンバゴカイ目・ゴカイ亜目・ゴカイ科に属する *Nereis limbata* については、下顎には亜鉛とハロゲンが含まれており、亜鉛だけでなく塩素濃度も下顎の硬度を決める要因となると報告されている[2]。*N. limbata* の下顎中の亜鉛の化学形態について、亜鉛と塩素がタンパク質に直接配位しているという大まかな仮説は提示されている[3]が決定的なエビデンスは示されていない。また、亜鉛の濃集に関連する具体的なタンパク質の役割は未だ明確になっていないため、本研究では、アオイソメの下顎における亜鉛やその他の金属の局在を解析し、下顎における金属濃集機構を明らかにすることを目的としている。

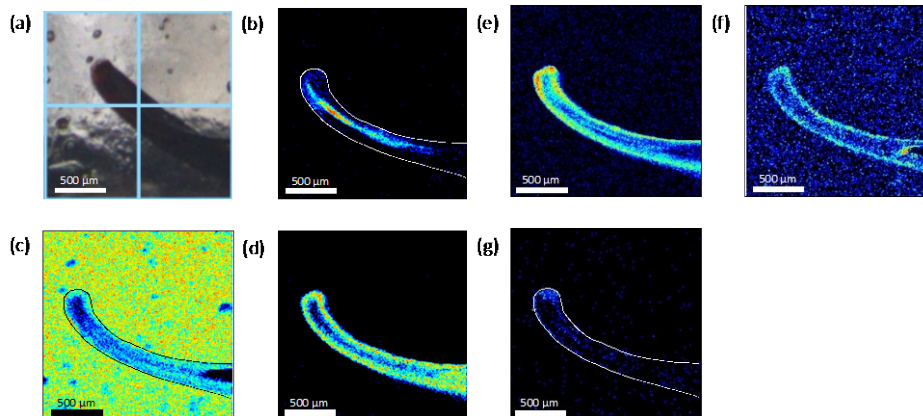
PIXEによる元素マッピングの結果を図に示した。ここでは(a)実体顕微鏡像、(b)亜鉛の分布、(c)塩素の分布、(d)臭素の分布、(e)ヨウ素の分布、(f)カルシウムの分布、(g)鉄の分布を示している。(b)亜鉛の分布より、亜鉛は下顎の中心部分に多く存在しており、中でも先端から約500 μm付近で最も濃度が高くなっていることがわかる。一方で、(c)塩素の分布(d)臭素の分布(e)ヨウ素の分布より、ハロゲンは、亜鉛と互いに補完しあうように下顎の外側に集中していることが分かった。(c)塩素は先端から根元まで満遍なく分布していたが、(d)臭素はやや先端部に多く、(e)ヨウ素ははっきりと根元に少なく、先端部に多いという局在を見て取ることができた。

またこれまで着目していなかったが、生体硬組織に多く使われる元素である(f)カルシウム、(g)鉄については、カルシウムが満遍なく分布している中でも、内側の弧の部分にやや多く分布していることと、

## 課題番号:21PJ12

鉄が最先端部に集中して存在していることが分かった。

図 (a):実体顕微鏡の像, (b):亜鉛の分布, (c):塩素の分布, (d):臭素の分布,  
(e):ヨウ素の分布, (f):カルシウム分布, (g):鉄の分布



以上の結果から、亜鉛は先端に多く、塩素は概ね一様で、臭素は根元に多く存在しており、また亜鉛が下顎の中心近くに集中していたのに対し、ハロゲン（ヨウ素）は外側に集中していたことが分かった。これについて先行研究では、*N. limbata* において下顎内の亜鉛の質量割合が高まると塩素の質量割合が高まる、つまり先端にいくほど塩素の含有量が高まるという結果が報告されており[3]、本研究の結果と異なることが分かった。これに対して考えられる可能性は二つある。一つ目は同じ *Nereis* 科の中でも下顎における元素の局在が異なっておりそれにより異なる元素の局在データが出た、というものである。二つ目は下顎における元素の局在の特徴は共通しているものの、局在の調査をする際に先行研究では本研究の実験とは異なり点分析のデータを積算する形で局在の特徴を求めていたため、元素分析を行った点が意図せず偏ってしまった結果、事実とは異なる結論に辿り着いた、というものである。本研究では高分解の元素マッピングを行うことができたため、より正確に元素の局在を明らかにできた可能性がある。

## 謝辞

PIXE 測定では、磯浩之氏、松田拓也氏、樋口有一氏に技術的サポートをいただいた。本研究成果の一部は JSPS 科研費 19H05771 の補助を受けた。

## 参考文献

- [1] H.C. Lichtenegger *et al.*, *Science* 298: 389-392, 2002.
- [2] H. Birkedal *et al.*, *ChemBioChem* 7: 1392-1399, 2006.
- [3] H.C. Lichtenegger *et al.*, *PNAS* 100: 9144-9149, 2003.



## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:21PJ12

課題名:無脊椎動物の内の鉄、亜鉛およびカドミウム濃集部位の解析

課題代表者:鈴木 道生

学会発表(口頭発表、ポスター発表、講演等)

1. 柏原 亘, 飯島 まゆみ, 加藤 由悟, 根岸 瑠美, 前川 優, 佐々木 猛智, 武田 志乃, 保倉 明子,  
永田 晋治, 鈴木 道生

「アオイソメとフタホシコオロギの下顎における亜鉛濃集について」

『日本農芸化学会 2022 年度(令和4年度)大会』2022/03/15-18

学位論文

1. 柏原 亘

無脊椎動物の下顎に局在する Zn の濃集に関する研究

東京大学(2021 年度 修士論文)



## Ni 過剰耐性シロイヌナズナの元素分布解析

課題番号(19PJ07)

○高橋美智子<sup>a</sup>、下川卓志<sup>b</sup>、及川将一<sup>b</sup>

a:宇都宮大学

b:量子科学技術研究開発機構

ニッケル(Ni)は植物の必須元素であるが、過剰に投与すると根の伸長阻害やクロロシスを呈す。これまで、植物の Ni 過剰耐性機構については金属元素を高濃度に蓄積する超集積植物を中心に報告されている。一方、本研究では HIMAC の共同利用実験において、Ni 過剰ストレス条件下のシロイヌナズナ実生に Ne イオンビームを照射し多数の変異体群を作出してきた。これらの変異体群を Ni 過剰培地で選抜することにより、Ni 過剰耐性を示す変異体を複数系統得ることに成功している。HIMAC の重イオンビーム照射によって得られた、これまでにない Ni 過剰耐性植物の耐性機構を明らかにすることは、新たな Ni 過剰耐性機構の解明につながると考えられる。また、明らかになった新規の Ni 過剰耐性機構は、分子生物学的手法によりシロイヌナズナと同じアブラナ科の作物や他の作物に適用することで有用な作物の作出につながると考えられる。さらに、現在行っている HIMAC による変異体の作出方法の有用性が科学的にも裏付けられる。そこで本研究は  $\mu$ PIXE 解析により植物組織の元素分布を明らかにすることで、HIMAC の重イオンビーム照射によって作出した Ni 過剰耐性変異体の耐性機構を解明することを目的とする。

2021 年度の本研究課題(19PJ07)では、2種の Ni 過剰耐性系統(Ne60Gy-1、Ne60Gy-2)について解析を行った。この解析により、変異体 60Gy-1が Ni 過剰により傷害を受けやすい根に Ni を蓄積しにくいことが明らかになった。一方、60Gy-2はより多く Ni を根に蓄積することが明らかになった。



## 腎臓内元素動態に関する研究: カドミウムばく露マウス腎臓における生命金属分布

課題番号(20PJ10)

○藤代 瞳<sup>a</sup>、田中 泉<sup>b</sup>、阿山 香子<sup>b</sup>、田口 央基<sup>a</sup>、上原 章寛<sup>b</sup>、  
石原 弘<sup>b</sup>、及川 将一<sup>c</sup>、姫野 誠一郎<sup>ad</sup>、武田 志乃<sup>b</sup>

a:徳島文理大学薬学部 b:量研機構放射線医学研究所 c:量研機構量子医科学研究所

d:昭和大学薬学部

腎臓は体内で代謝された生命金属の再吸収・排泄を担う器官であり、しばしば毒性標的となる。尿からの物質再吸収の要となる近位尿細管は上流から S1、S2、S3 の 3 領域に分かれており、領域特有の物質輸送システムを有し、元素によって標的とする領域が異なる。この尿細管での物質輸送機序の理解は、内部被ばくにおける核種の体内残存推定や再吸収阻害による被ばく低減化に重要である。我々の先行研究では、カドミウムの場合、再吸収領域は近位尿細管上流領域であり、低分子量のタンパクに結合し S1、S2 領域においてエンドサイトーシスで取り込まれる。その後排泄され、再び下流の S3 領域で亜鉛トランスポーターを介して取り込まれることが示されている[1]。シスプラチンやウランの場合は、近位尿細管下流の S3 領域への部位特異的な侵襲が報告されている[2, 3]。しかしながら、尿細管元素動態は十分に理解されていない。

そこで本研究では、マイクロ PIXE により腎臓内の生命金属分布動態を調べることを計画した。尿細管 S1、S2 領域侵襲性のカドミウムおよびウランと同じ S3 領域侵襲性のシスプラチン等をばく露した動物モデルを対象とし、カドミウム及びプラチナの腎臓内分布および近位尿細管局在性、内因性生命金属分布の変動を解析し、腎臓内動態の元素特異性の解明を進めている。

本年度は、カドミウムの急性腎毒性モデルのマウス腎臓について検討を行った。10  $\mu\text{m}$  厚の凍結切片をポリプロピレン膜に付着させ、PIXE 測定試料とした。隣接切片を PAS 染色し、尿細管 S1・S2、S3 を判別した。腎臓の外側から中心部にかけての皮質・髄質外辺部に対応する領域についてビーム径 1  $\mu\text{m}$   $\times$  1  $\mu\text{m}$ 、積算電流 200  $\mu\text{C}$  の条件で、まず 500  $\mu\text{m}$   $\times$  500  $\mu\text{m}$  の広領域でのスキャンを行った。さらに同領域に対し 250  $\mu\text{m}$   $\times$  250  $\mu\text{m}$  の詳細なスキャンを行った。

カドミウムばく露後 18 時間では、カドミウム侵襲領域である皮質に分布する S1、S2 近位尿細管の上皮や刷子縁の脱落が認められたが、S3 近位尿細管構造は保持されていた。マイクロ PIXE イメージ

## 課題番号:20PJ10

ングによると、皮質中央から S3 尿細管が分布する髄質外辺部にかけて、リン、カリウムの濃集部の形成が観察された。一方、鉄や亜鉛の著しい局在は観察されなかった。ウラン急性腎毒性モデルのばく露後初期(1-3 日)に皮質中央から髄質外辺部にかけて観察されるリン、カリウム濃集 [4]、と類似した分布様態であった。引き続き、ばく露量やばく露後の短時間観察を含め検討を加える予定である。

### 謝辞

磯浩之氏、松田拓也氏、樋口有一氏には PIXE 測定での技術的なサポートに感謝いたします。本研究成果の一部は JSPS 科研費 19H05770 の補助を受けた。

### 参考文献

- [1] Fujishiro et al., Metallomics 4: 700-708, 2012.
- [2] Zhang et al., Toxicol. Pathol. 37: 629-643, 2009.
- [3] Homma-Takeda et al., J. Appl. Toxicol. 33: 685-694, 2013.
- [4] Homma-Takeda et al., Int. J. Mol. Sci. 20: 4677, 2019.

## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:20PJ10

課題名:腎臓内元素動態に関する研究

課題代表者:藤代 瞳

学会発表(口頭発表、ポスター発表、講演等)

1. 武田 志乃

「生命金属動態解析に向けた量子ナノビームによるバイオ・ケミカルイメージング:シングルセルイメージングとナノ計測の展開」

『新学術研究「生命金属科学」領域会議第4回地方巡業』2021/07/04

2. 武田 志乃

「生命金属動態の量子ビーム戦略の連携研究」

『新学術研究「生命金属科学」夏の領域会議』2021/09/05





# SPICE 関連課題



## SPICE マイクロビームを用いた DNA 損傷複雑性の時空間制御による DNA 二本鎖切断修復タンパク質の応答解析

課題番号(18SJ04)

○大澤大輔<sup>a</sup>、小林亜利紗<sup>a,b</sup>、及川将一<sup>b</sup>、小西輝昭<sup>a</sup>

a: 量研機構 量子生命科学研究所 シングルセル応答解析グループ

b: 量研機構 量子医科学研究所 理工学部 静電加速器運転室

粒子線がん治療はブラッグピークの線量集中性を活かし、有効ながん治療法としての地位を確立している。しかしながら、粒子線飛跡に沿った微視的線量分布(トラック構造)と細胞致死の主因である DNA 二本鎖切断や複雑な DNA 損傷、細胞応答との相関には未だ不明な点が多い。マイクロビーム細胞照射装置 SPICE は、1.7 MV タンデトロン加速器(HVEE 社製)より加速した 3.4 MeV 陽子線を直径約 2  $\mu\text{m}$  の極小領域に集束させることで、単一細胞レベルで細胞核内局所線量分布を自在に変えて高速照射が可能である。この優位性を生かし、本研究では、細胞核内への陽子線の(複数)照射箇所と照射粒子数を時空間的に制御することで、DNA 損傷の複雑性を多様に生起させ、その際の DNA 二本鎖切断修復タンパク質( $\gamma$ -H2AX, 53BP1, p-ATM, Rad51, Mdc1 等)の動態を免疫蛍光染色法により経時的に追跡することで、損傷認識・修復応答機構の解明を目指す。

これまでに、細胞蛍光画像内の蛍光スポット強度・面積を高速自動定量する細胞蛍光画像解析 ImageJ マクロを開発し、優れた空間分解能と検出感度について大きなダイナミックレンジを有する蛍光飛跡検出器(FNTD)を用いたビームサイズの高精度評価法、並びに、アモルファストラック構造モデルを用いた細胞核内局所線量分布の計算手法を確立した。得られた局所線量分布は、ビーム中心部でのコア由来のシャープな高線量ピーク群とビーム周辺部でのペナンプラ由来の低線量ブロード凸型分布の 2 成分から成っており、また、照射粒子数の増加に伴い(特にビーム中心部で)増大し、照射粒子数を制御することで、異なる線質を模擬しうることを示した。さらに、照射細胞核内の $\gamma$ -H2AX 蛍光スポット強度・面積の 1 箇所当たりの照射粒子数依存性を調べたところ、強度については、低粒子数では粒子数の増加に伴いほぼ線形に増大するものの、高粒子数( $\geq 300$  個/1 箇所)では飽和し始め、細胞核内の残存リン酸化部位の消失を示唆した。一方、面積については、高粒子数( $\geq 100$  個/1 箇所)になるにつれてビームサイズを超えて広がり、細胞核内局所線量分布との比較から、コアのみならずペナンプラ線量が DNA 二本鎖切断損傷誘発に有意に寄与することが分かった。今年度は特に照射細胞核内の $\gamma$ -H2AX 蛍光スポット強度・面積の 1 箇所当たりの照射粒子数依存性の再現性の確認し、並びに、複数照射箇所と蛍光スポット強度・面積の照射後時間依存性を調べた。

本研究の一部は日本学術振興会 科学研究費補助金 基盤研究(B) (20H03634)の助成を受けて実施された。



## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:18SJ04

課題名:SPICE マイクロビームを用いた DNA 損傷複雑性の時空間制御による DNA 二本鎖切断修復タンパク

課題代表者:大澤 大輔

学会発表(口頭発表、ポスター発表、講演等)

1. Ohsawa Daisuke, Konishi Teruaki, Oikawa Masakazu  
Spatial distribution of DNA double strand breaks in microbeam targeted human cells  
日本マイクロビーム生物研究会 2021 年度シンポジウム, 日本マイクロビーム生物研究会,  
2021/12/14
2. 大澤 大輔, 小林 亜利紗, 及川 将一, 小西 輝昭  
SPICE マイクロビームを用いた DNA 損傷複雑性の時空間制御による DNA 二本鎖切断 修復タンパク  
第 33 回タンデム加速器及びその周辺技術の研究会, 量研・量子医科学研究所, 2021/06/25



## COX-2を指標とした放射線誘発バイスタンダー細胞応答に関する研究

課題番号(21SJ05)

小林亜利紗<sup>1</sup>, 廣山陽太<sup>2,4</sup>, 大澤大輔<sup>3</sup>, 小西輝昭<sup>2</sup>

Alisa Kobayashi<sup>1</sup>, Yota Hiroyama<sup>2,3</sup>, Daisuke Ohsawa<sup>3</sup>, Teruaki Konishi<sup>2</sup>

1. 量子医科学研究所 物理工学部粒子線照射研究グループ
2. 量子生命科学研究所 シングルセル応答解析チーム
3. 量子医科学研究所 物理工学部静電加速器運転室
4. 弘前大学 大学院保健学研究科 放射線技術科学領域

### 1. 研究目的と背景

本研究は放射線誘発バイスタンダー効果による非照射がん細胞の放射線抵抗性獲得機序を明らかにすることを目的とした。照射細胞の周囲にいた非照射細胞にあたかも放射線に照射されたかのような影響が現れる現象“放射線誘発バイスタンダー効果”は、照射された細胞の周囲にいた非照射細胞に対して細胞死や染色体異常を与える一方で、放射線適応応答やDNA損傷修復の促進等の放射線抵抗性をもたらすことが懸念されている。バイスタンダー効果は細胞同士の直接の結合であるギャップジャンクション経路と液を介した培地介在性経路という2つの経路を介して伝播することが知られており、我々は昨年度までの研究で、ギャップジャンクションがバイスタンダー効果によるがん細胞の放射線抵抗性獲得に関与することを示した [1-2]。

がん細胞の抵抗性に関与するとされるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の代謝産物プロスタグランジン E2 (PGE2) は、ギャップ

ジャンクションを構成するコネクシンヘミチャネルを通過・活性化することが報告されている [3]。このことから、コネクシンヘミチャネルを介してバイスタンダーがん細胞の COX-2 高発現および放射線抵抗性獲得が促されると考え、本研究では、バイスタンダーがん細胞の放射線感受性に対する COX-2 およびヘミチャネルの寄与を明らかにすることとした。

### 2. 方法

本研究では、A549 ヒト肺がん細胞 (ATCC, CCL-185) に pBOS-H2BGFP vector (BD Pharmingen) をトランスフェクションし、安定的に細胞核が GFP 蛍光を示す A549-GFP 細胞を使用した。細胞濃度  $4 \times 10^5$  cells/dish で培養した細胞へ照射 30 分前にコネクシンヘミチャネル阻害剤 (Lantern) を 50  $\mu$ M 添加し、皿内の細胞集団の 1%未満 (0%, 0.28%, 0.07%) に SPICE-NIRS 陽子マイクロビーム (3.4 MeV/n, LET:  $\sim 11$  keV/ $\mu$ m) [4] を照射し、バイスタンダー効果を誘導した。24 時間後、タンパ

ク質を回収、COX-2 タンパク質および内在性コントロールとして GAPDH タンパク質をウェスタンブロット法で検出した。また、放射線感受性の変化を生存率から測定するため、SPICE 照射 24 時間後、細胞に 4.4 Gy (D<sub>10</sub>) の X 線を照射した。その後すぐに細胞を回収、調製、播種し 14 日間培養後、クリスタルバイオレットでコロニーを染色、50 個以上のコロニー数から、生存率を取得した。

### 3. 結果

#### 1. ) コネキシンヘミチャネル阻害剤によるバイスタンダー細胞 COX-2 タンパク質発現の変化

SPICE 照射をしたコネキシンヘミチャネル阻害剤無添加のバイスタンダー細胞は COX-2 タンパク質発現が非照射コントロールと比較して有意に増加した (Fig2. 白棒)。一方、コネキシンヘミチャネル阻害剤添加条件は SPICE 照射バイスタンダー細胞とコントロール条件間に有意差は見られなかった (Fig2. 黒棒)。

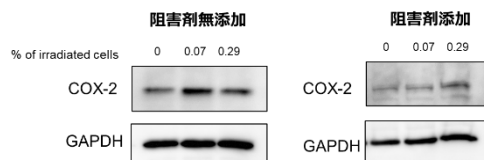


Fig1. A549 細胞の COX-2 発現

(図左: ヘミチャネル阻害剤無添加条件, 図右: ヘミチャネル阻害剤添加条件)

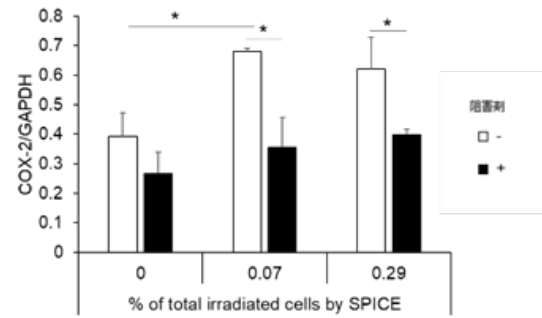


Fig2. A549 細胞の COX-2 発現

(白棒: ヘミチャネル阻害剤無添加条件, 黒棒: ヘミチャネル阻害剤添加条件)

#### 2. ) コネキシンヘミチャネル阻害剤によるバイスタンダー細胞生存率の変化

SPICE 照射をしたコネキシンヘミチャネル阻害剤無添加のバイスタンダー細胞は、SPICE 非照射条件と比べ、エックス線照射に対して生存率が有意に増加した (Fig3. 白棒)。一方、コネキシンヘミチャネル阻害剤添加条件のバイスタンダー細胞のエックス線照射に対する生存率は、SPICE 非照射条件間と有意な差は見られなかった (Fig3. 黒棒)。

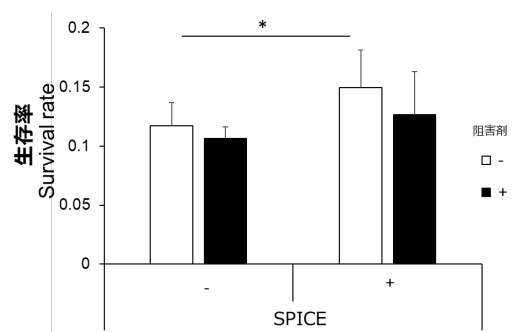


Fig3. A549 細胞の X 線生存率

(白棒: ヘミチャネル阻害剤無添加条件, 黒棒: ヘミチャネル阻害剤添加条件)



#### 4. まとめ

SPICE 照射した細胞では、がんの抵抗性に関与する COX-2 タンパク質発現が増加した。しかしヘミチャネル阻害剤を添加すると、SPICE 照射による COX-2 タンパク質の高発現は検出されなかった。このことから、ヘミチャネルを介した COX-2 バイスタンダー応答が細胞の放射線感受性を制御していると考え、ヘミチャネル阻害剤添加・非添加条件で SPICE 照射をした細胞の放射線感受性を X 線生存率から評価した。その結果、ヘミチャネル阻害剤無添加条件では、SPICE 照射細胞の X 線に対する生存率が SPICE 非照射細胞と比べて増加した。しかし、ヘミチャネル阻害剤を添加すると、この現象は見えなくなった。つまり本研究結果は照射細胞とバイスタンダー細胞とのヘミチャネルを介して伝播したバイスタンダー効果が COX-2 の発現を調節することで、バイスタンダーがん細胞の放射線抵抗性獲得を促すことを示した。

#### 5. 謝辞

本研究の実施にあたり、静電加速器運転室長 及川将一氏をはじめ、スタッフの方々のご支援を賜りましたことに感謝申し上げます。本研究の一部は科研費 若手研究 (20K16744) および基盤研究 B (17H04268) の助成を受けて実施した。

#### 6. 参考文献

- [1] Desai. S, et al., Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation, *Mutat Res*, 763-764, 39-44 (2014)
- [2] Kobayashi. A, et al., Bystander Wi-38 Cells Modulate DNA Double-Strand Break Repair in Microbeam-Targeted A549 Cells through Gap Junction Intercellular Communication, *Radiat Prot Dosimetry*, 1-2, 142-146 (2019)
- [3] Cheng. B, et al., PGE2 Is Essential for Gap Junction-Mediated Intercellular Communication between Osteocyte-Like MLO-Y4 Cells in Response to Mechanical Strain, *Endocrinology*, Volume 142, Issue 8, 3464-3473 (2001)
- [4] Konishi. T, et al., SPICE-NIRS microbeam: a focused vertical system for proton irradiation of a single cell for radiobiological research. *J Radiat Res*. 54 (4), 736-747 (2013)



## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:21SJ05

課題名:COX-2 を指標とした放射線誘発バystander応答に関する研究

課題代表者:小林 亜利紗

学会発表(口頭発表、ポスター発表、講演等)

1. 小林 亜利紗、廣山 陽太、小西 輝昭  
SPICE 陽子線マイクロビーム照射装置を用いた 非照射がん細胞の放射線抵抗性獲得経路の解明  
第 33 回タンデム加速器及びその周辺技術の研究会, 2021/06/24
2. 小林 亜利紗、廣山 陽太、小西 輝昭、大澤 大輔、及川 将一  
放射線誘発バystander効果による抵抗性獲得機序に関する研究  
第 1 回 日本量子医科学会 学術大会, 2021/12/10-11
3. 小林 亜利紗、廣山 陽太、小西 輝昭  
COX-2 を指標とした放射線誘発バystander応答に対する線質依存性の解析  
第 58 回アイソトープ・放射線研究発表会, 2021/07/07-09
4. 小林 亜利紗、廣山 陽太、小西 輝昭、大澤 大輔、及川 将一  
Radiation induced bystander effect modulates the radio-sensitivity of non-small-cell lung cancer A549 cells via cell-to-cell contact  
日本放射線影響学会 第 64 回大会, 2021/09/22-24



## マイクロビーム細胞照射装置 SPICE のリサーチ&amp;デベロプメント(R&amp;D)

課題番号(19SJ01)

小西輝昭<sup>a</sup>、大澤 大輔<sup>a</sup>、小林 亜利紗<sup>a,b</sup>、及川将一<sup>a,b</sup>

- a. 量研 量子生命科学研究所シングルセル応答解析グループ
- b. 量研 量子医科学研究所物理工学部静電加速器運転室

## 1. 目的

マイクロビームは、特に放射線医科学分野並びに低線量放射線影響研究において重要なツールであり、マイクロビームなくして得ることができない科学的知見は少なくない。特に、放医研SPICEは国内唯一の陽子線マイクロビーム細胞照射装置である。また、ビームサイズ $2\mu\text{m}$ を安定的に提供できていることから、細胞核のみならず細胞質への照射も可能である。このような性能を有するまたは、共用施設として運営しているマイクロビーム施設は、世界的に見ても稀である。コロナ禍ということもあり、課題数は減少しているものの、コロナ収束とともに国内外の研究課題の以前の数に戻るだけでなく、増加が期待できることからその重要性は顕著である。そのため、本装置の高度化および保守・維持管理(メンテナンス)は必須である。

今年度下半期は、静電加速器棟に近接して量子生命科学拠点棟(新棟)の建設工事が実施された。この工事による振動等が SPICE に付随するさまざまな精密機器に故障や不具合を生じたと考えられ、修理を実施するとともに、被害が拡大されないように適宜点検等の措置を行うことを目的とした。また、SPICE オフライン顕微鏡システムの改造を実施することで、多様化する課題に対応する。また、新規ユーザー獲得を目指し、デモンストレーションや見学の対応を積極に行う。

## 2. メンテナンス・故障・修理

SPICEオフライン顕微鏡システムのVCMステージの故障:

VCMステージは、SPICEオフライン顕微鏡システムの試料用ステージであり、大面積を高分解能(高倍率)に撮像するために必須である。一般的な蛍光顕微鏡の性能に比べて約10倍程度効率的に細胞画像が取得可能となっている。例えば、 $5\text{mm}\times 5\text{mm}$ の面積を60倍対物レンズで625箇所( $25\times 25$ )撮像した場合、5分以内で完了することができる。本装置は、細胞核・細胞質へのマイクロビーム照射後の免疫蛍光染色による蛍光画像や、多くの細胞数の撮像を必要とするバイスタンダー効果計測のための細胞蛍光画像の取得に用いられている。

このステージは、2020年12月10日頃に故障した。故障部位は、ステージエンコーダーの受光機およびガラス製リニアスケールが破損であった。破損部位は、人為的な操作ミスによって破損する部位ではなく、また、他のステージ部品とは非接触な設計となっている。令和4年度1月に修理を完了した。

その後、バイスタンダー効果研究や微小核形成率評価など大量の細胞数を必要と

するシングルセル応答解析を実現するために、大面積(10mm×10 mm)に高速に撮像可能な多点オートフォーカス機能を開発した。60倍対物レンズ相当の高分解能画像を50×50枚=2500枚を15分程度で自動撮像が可能となった。今後、本機能に、多蛍光色撮像も可能とするハードウェア・ソフトウェアの両方を進めていく。

3)その他: ビーム出口・ステージ・顕微鏡・高感度カメラのすべての再アライメントを実施した。静電加速器本体、真空ポンプ等については、定期メンテナンス時に点検等を行った。

4)振動計の設置:

6月4日の新棟のくい打ち工事初日に間に合わせるべく、振動計を静電加速器棟に設置した。以降、振動のモニタリングを継続している。

### 3. 見学対応・共用利用

施設見学および新規課題予定者へのビームタイムデモの実施:

SPICEは最先端放射線照射技術であり、新規に課題申請を検討している所内・外の研究者ならびに、見学を含めた事前説明を行った。また、人材育成事業等の施設見学にも対応した。具体的には、放医研人材育成事業の施設見学を2回(研修生20名程度/回)、名古屋大学より見学者1名に対応した。例年に比べて、見学者ならびに新規課題数が減少した。これは、コロナ感染拡大防止のため緊急事態宣言が発令されたことによる。

見学対応: 立教大学 理学部 8名/千葉大学 理学部 15名

### 4. SPICE- $\alpha$ 開発

陽子線に加えて、Heイオン( $\alpha$ 線)ビームの導入を検討した。5.1MeVの $\alpha$ 線はこれまでの3.4MeV陽子線の線エネルギー付与に比べて非常に高く、およそ100keV/ $\mu$ m程度であり、その生物効果が非常に高いと予想される。昨年度に引き続き、 $\alpha$ 線照射実験を実現させるために、4He<sup>2+</sup>イオンの加速・ビーム輸送実験を実施し、SPICEビームライン末端部までのビーム輸送に再現性の向上に努めた。ビームサイズ直径10 $\mu$ m程度の $\alpha$ マイクロビーム形成に成功した。今後は、イオン源におけるヘリウム負イオンの生成効率を向上させるために、荷電変換部等の整備を継続して行う。

### 5. 今後の課題

来年度より本格的に量子生命科学拠点棟(仮称)の建設が開始する。工事による振動等の影響を見つつ、可能な限り研究を推進していく。また、世界トップクラスの性能の維持し、先端的な放射線医科学・影響研究を継続的に実施するためには、高度化を進めつつ、メンテナンスを十分に実施していく必要がある。制御用システムの更新が必須と考えている。また、SPICEにヘリウムイオンを導入した $\alpha$ 線マイクロビーム(SPICE- $\alpha$ )の実現に向けたトライアルを実施する。

## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:19SJ01

課題名:マイクロビーム細胞照射装置 SPICE のリサーチ&デベロップメント(R&D)

課題代表者:小西 輝昭

### 原著論文

1. Narongchai Autsavapromporn, Alisa Kobayashi, Cuihua Liu, Churdsak Jaikang, Tengku Ahbrizal Tengku Ahmad, Masakazu Oikawa, Teruaki Konishi. Hypoxia and Proton microbeams: Role of Gap Junction Intercellular Communication in Inducing Bystander Responses on Human Lung Cancer Cells and Normal Cells. Radiation Research 197(2), p122-130. Jan-22.

### Proceedings

1. 石井 聡, 小西 輝昭, 濱野 毅. カーボンナノチューブ薄膜トランジスタの陽子線照射に対する大気中での電気応答. NEWDIAMOND, 37(2), p09-13, 2021-04.

### 学会発表(口頭発表、ポスター発表、講演等)

1. Narongchai Autsavapromporn, Alisa Kobayashi, Daisuke Ohsawa, Cuihua Liu, Churdsak Jaikang, Tengku Ahbrizal Tengku Ahamad, Masakazu Oikawa, Teruaki Konishi  
Hypoxia and Gap Junction Communication-Induced Bystander Effect  
日本マイクロビーム生物研究会 2021 年度シンポジウム, 日本マイクロビーム生物研究会, 2021/12/14
2. 小西 輝昭  
ギャップ結合を介した放射線誘発バイスタンダー効果  
第67回日本不整脈心電学会学術大会, 一般社団法人 日本不整脈心電学会, 2021/07/02





## 細胞核内局所線量付与誘発クロモソリプシス生成の研究

課題番号(20SJ02)

小西輝昭<sup>a</sup>、小林 亜利紗<sup>a,b</sup>、大澤 大輔<sup>a</sup>、劉 翠華<sup>a,c</sup>、平山亮一<sup>d</sup>、及川将一<sup>a,b</sup>

- a. 量研 量子生命科学研究所 シングルセル応答解析 Gr
- b. 量研 量子医科学研究所 物理工学部 静電加速器運転室
- c. 量研 量子医科学研究所 重粒子線治療研究部 粒子線基礎医学研究 Gr
- d. 量研 量子医科学研究所 重粒子線治療研究部 放射線がん生物学研究 Gr

## 1. 背景・目的

本研究課題は、細胞がん化プロセスの一つである染色体粉砕と再編成過程（クロモソリプシス）に対する細胞質損傷を起因とする防御的な細胞応答の寄与を明らかにすることを目的としている。放射線に対する細胞致死の第一のターゲットは細胞核内 DNA である。一方で細胞質も同程度の確率で放射線にヒットするが、細胞質損傷と細胞致死のメカニズムについては不明点が多い。これまでに、細胞質のみにマイクロビーム照射し、酸化ストレス応答経路の一つである Keap1-NRF2 経路の活性化ならびに、DNA 二本鎖切断（DSB）修復遺伝子 XRCC4 と Rad51 の発現誘導を報告した。つまり、細胞質は第一のターゲットである細胞核を防御するための細胞内システムの活性化を誘導する第二のターゲットとしての役割を担っており、これは、放射線に対する細胞の生存戦略の一つと考えられる。細胞質損傷応答に関するこれまでの知見から、細胞質損傷が細胞がん化プロセスに関与している可能性が高いと考えた。そこで、本研究は「細胞質損傷を起因とする防御的な細胞応答の誘導によって、細胞核自体の防御応答機構を正しく誘導し、クロモソリプシスを抑制する」という仮説の実験的証明である。

## 方法・実験計画

2-1) 微小核形成率の測定： HT1080 細胞の細胞核のみに陽子線を 10 個、20 個、50 個、70 個、100 個、200 個の照射量 6 点で行った。また細胞質照射では最大 2000 個の陽子線照射を行った。照射直後にサイトカラシン B 含有培地に交換し、52 時間後にメタノール固定を行った。その後、細胞核と細胞質のそれぞれをヘキスト 33342 と Cell tracker orange で染色し、SPICE オフライン蛍光顕微鏡にて、照射領域にいるすべての細胞の蛍光画像を取得した。二核化した細胞 (Bi-nuclei) あたりの微小核 (Micronuclei) 数を計数した。

2-2) 染色体構造解析： マルチカラー FISH (Multicolor-fluorescent in situ hybridization (m-FISH)) 法による染色体構造解析を行う。これは、24 の異なる種類のヒト染色体を蛍光プローブでラベルし、5 つの蛍光色の組み合わせで個々の染色体を検出する方法である。細胞核のみに照射し、凍結保存してある生存細胞のクローンを試料とした。生存細胞のクローンを 10 cm シャーレに  $5 \times 10^5$  細胞となるように播種し、コルセミド(最終濃度  $0.05 \mu\text{g/ml}$ ) を添加後 6 時間培養することで M 期の細胞集団を得た。これらの細胞を

回収後、固定しスライドガラス試料を作成した。次に、Metasystems 社製 FISH 用蛍光プローブ (24XCyte, Human Multicolor FISH probe, Metasystem) による標識の後、蛍光顕微鏡による画像取得を行った。

### 3. 結果・結論

3-1) 微小核形成率: 昨年度に続き、HT-1080 細胞の細胞核のみへの照射について、粒子数 300 個以下について重点的にデータの取得を行い、また細胞質照射については、粒子数 2000 個までの照射を行った。図 1 に粒子数に対する微小核形成率の結果を示した。細胞核へ照射では、粒子数 300 個まで急激な線形的な増加を示すことが分かった。また、細胞質照射においても、微小核形成を誘発することを確認した。その増加は、細胞核照射の微小核誘発効果は、細胞核照射の約 1/18 程度であった。生存細胞のクローンを取得し、凍結保存した。今後は、これらクローンの染色体構造解析を進める。細胞致死効果の測定についても継続して進めていく必要がある。

3-2) マルチカラー FISH 法による染色体構造解析: 細胞核当たり 500 個を照射して得られた生存細胞のクローンを用いて、m-FISH のための試料作製条件等の検討を行った。図 2 に一例を示した。FISH 蛍光プローブによるハイブリダイゼーション後、すべての染色体を DAPI 染色した。蛍光顕微鏡にて、DAPI 用フィルター、FITC 用フィルター、TexasRed 用フィルターの 3 種類蛍光フィルターで蛍光画像の取得を行った。

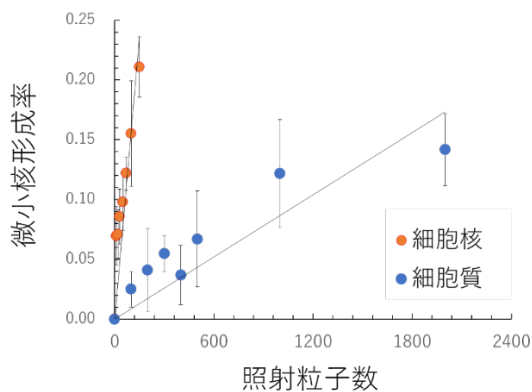


図1 細胞核・細胞質へのマイクロビーム照射による微小核形成率。

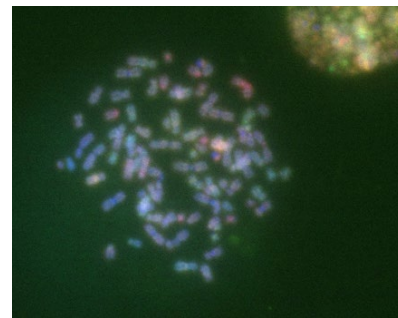


図2 m-FISHによる染色体構造解析の一例。細胞核当たり粒子数 500 個を照射した HT1080 細胞の生存クローンを使用した。

### 4. まとめ

昨年度において、照射粒子数 500 個以上の照射において、生存率曲線は指数関数的な減少を示さず、非常に高い細胞生存率を示し、一方で、微小核形成率は減少を示したことを報告した。これは、SPICEで導入される陽子線マイクロビームが細胞核の極一部のみの直径数  $\mu\text{m}$  の領域にしか集中的に DNA 損傷を誘発しないことが理由として考えられた。今年

度は、より少ない照射粒子数の範囲で再度検討した結果、微小核形成率は、照射粒子数 150 個までは直線的な増加を示すことを確認した。また、細胞質のみへの照射でも微小核形成率の増加を確認した。これは、細胞核内DNAへ直接的に損傷を与えなくとも、細胞質損傷を起因として間接的に染色体異常のトリガーとなりえることを確認した。今後の課題において、細胞質照射による微小核形成のメカニズムの解明が重要な要素となる。次に、この細胞核と細胞質の両方照射についても解析が必要である。今年度は、染色体構造解析に着手した。しかし、染色ムラ、蛍光強度が非常に弱いなど、マルチ FISH 法のプロトコールの最適化にいたっていない。さらに、顕微鏡システムの蛍光フィルター・励起光源強度、解像度などマルチ FISH 法のさらなる条件検討が必要と考えている。クロモスリプシス生成では、染色体上の狭い領域に比較的小さい Deletion が密に起きていると考えられるが、マルチ FISH 法では検出が難しい可能性がある。そのため、併行して、10 kbp 以上の Deletion 部位の検出することが可能な Array comparative genomic hybridization (Array CGH)法についても検討する必要がある。



## 令和3年度研究成果一覧

課題番号:20SJ02

課題名:細胞核内局所線量付与誘発クロモスリプシス生成の研究

課題代表者:小西 輝昭

学会発表(口頭発表、ポスター発表、講演等)

1. 小西 輝昭, 小林 亜利紗, 大澤 大輔, 及川 将一  
Current status of proton microbeam system, SPICE-QST microbeam  
日本マイクロビーム生物研究会 2021 年度シンポジウム, 日本マイクロビーム生物研究会,  
2021/12/14
2. Teruaki Konishi, Jun Wang, Alisa Kobayashi, Daisuke Ohsawa, Masakazu Oikawa  
Analysis of defensive cellular response triggered by microbeam induced cytoplasmic damage  
日本マイクロビーム生物研究会 2021 年度シンポジウム, 日本マイクロビーム生物研究会,  
2021/12/14
3. Teruaki Konishi, Alisa Kobayashi, Daisuke Ohsawa, Masakazu Oikawa, Jun Wang  
Microbeam irradiation and analysis on cytoplasm damage induced defensive cellular response  
第 59 回日本生物物理学会年会, 日本生物物理学会, 2021/11/25
4. 小西 輝昭, 小林 亜利紗, 大澤 大輔, 及川 将一  
陽子線マイクロビーム細胞照射装置 SPICE で実現する放射線誘発単一細胞応答解析  
第 33 回タンデム加速器及びその周辺技術の研究会, 量研・量子医科学研究所, 2021/06/25
5. Teruaki Konishi, Jun Wang, Alisa Kobayashi, Daisuke Ohsawa, Masakazu Oikawa  
Cytoplasmic damage triggers defensive cellular response through NRF2-Keap1 oxidative stress  
response pathway  
日本放射線影響学会第 64 回大会, 日本放射線影響学会, 2021/09/22

課題番号:20SJ02

6. 小西 輝昭

マイクロビーム照射法による放射線生物学・医科学の新展開

弘前大学生体応答科学研究セミナー, 弘前大学, 2021/12/01







《令和3年度 共用施設(PASTA&SPICE、NASBEE、X/γ線照射装置)成果報告書 編集事務局》

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 量子医科学研究所

物理工学部 静電加速器運転室

須田 充、三浦 厚

事務局連絡先 e-mail: [infopixe@qst.go.jp](mailto:infopixe@qst.go.jp)

ホームページ <http://www.nirs.qst.go.jp>

《編集発行》

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 量子医科学研究所

物理工学部 静電加速器運転室

〒263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川4-9-1

TEL: 043-206-3031 FAX: 043-255-3192

---

令和3年度 共用施設(PASTA&SPICE、NASBEE、X/γ線照射装置)

成果報告書

2024年 1月発行

---

印刷 (株) エイ・エフ・エイ

©2023 国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構

Printed in Japan

QST-M-45

