

NIRS-M-280

**平成 25 年度放射線医学総合研究所
第 4 回共用施設(PASTA&SPICE、NASBEE)
共同成果報告会・報告書**

**2013 Annual Report of the Research Project
with NIRS Electrostatic Accelerators**

国立研究開発法人 放射線医学総合研究所

はじめに

放射線医学総合研究所の静電加速器施設は、平成 18 年度に PASTA が、平成 22 年に NASBEE 生物照射室が共用施設に指定され、研究所外の利用者が本格的に利用できる環境が整いました。

また平成 18 年度以降、研究所内外の委員による課題採択を行っていましたが、平成 22 年度からは全て外部委員による課題採択部会（任期 2 年）を立ち上げてから 4 年を経過しました。

共同利用を開始した最初期は PASTA と NASBEE を合わせて 5 課題程度でしたが、近年は課題数が大幅に増加し、平成 25 年度には 18 の課題が実施されました。特に半分以上の 10 課題は放射線医学総合研究所外の機関との共同研究契約に基づいて実施されました。このことは放射線医学総合研究所の PASTA と NASBEE の存在と、その実験ツールとしての有用性を外部の方々にも段々と認知して頂けるようになってきたためと考えております。

今後はこれまでと同様、技術開発とその成果の提供だけでなく、広報活動に力を入れ、更なるユーザーへの周知を広げていく所存です。

平成 26 年 3 月
研究基盤センター
研究基盤技術部長
白川芳幸

第4回共同施設（PASTA&SPICE）共同研究成果報告会

プログラム

平成26年3月20日（木） 放射線医学総合研究所 研修棟2階 講義室2 13：15～

（口頭発表は12分、質疑応答3分）

開会の挨拶	13:15～13:25	研究基盤技術部長 白川 芳幸	
セッション1 （座長： 小西輝昭 （0-5のみ及川 将一）	13:25～13:40	0-1	プロトンマイクロビーム細胞核限定的照射に対する生物効果のバイスタンダー効果解析【S12-MS01】 鈴木雅雄 ¹ 、小西輝昭 ² 、及川将一 ² 、小林亜利紗 ³ 、石川剛弘 ² 、村上健 ¹ 1放医研・重粒子医科学センター国際重粒子医科学研究プログラム、2放医研・研究基盤センター研究基盤技術部、3放医研・研究基盤センター先端研究基盤共用推進室
	13:40～13:55	0-2	放射線抵抗性がん細胞株におけるヘテロクロマチン領域でのDNA修復に関する研究【S13-KS01】 佐藤克俊 ¹ 、今井高志 ¹ 、下川卓志 ¹ 、小西輝昭 ² 、小林亜利紗 ² 、及川将一 ² 1放医研・重粒子医科学センター、2放医研・研究基盤センター
	13:55～14:10	0-3	マイクロビーム照射法による放射線誘発神経活性化と信号伝播の可視化【S13-H001】 岡野ジェイムス洋尚 ¹ 、原央子 ¹ 、長谷川実奈美 ¹ 、小西輝昭 ² 、及川将一 ² 、小林亜利紗 ² 、野島久美恵 ³ 1東京慈恵会医科大学・再生医学研究部、2放医研・研究基盤センター、3放医研・分子イメージング研究センター
	14:10～14:25	0-4	Chromothripsisの生成機構の解明【S13-JI01】 数藤由美子 ¹ 、穂山美穂 ¹ 、平井百樹 ¹ 、小西輝昭 ² 、稲澤譲治 ³ 、小崎健一 ³ 、村松智輝 ³ 、森下真紀 ³ 1放医研・緊急被ばく医療研究センター生物線量評価研究チーム、2放医研・研究基盤センター研究基盤技術部、3東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子細胞遺伝学
	14:25～14:40	0-5	マイクロビーム細胞照射装置SPICEの開発【S12-R&D01】 小西輝昭 ¹² 、及川将一 ¹ 、小林亜利紗 ¹² 、酢屋徳啓 ¹ 、前田武 ¹ 、内堀幸夫 ¹² 、白川芳幸 ¹ 1放医研・研究基盤センター、2放医研・国際オープンラボトリー
セッション2 （座長： 今岡達彦）	14:40～14:55	0-6	Ptch1遺伝子ヘテロ欠損マウスにおける中性子線誘発脳腫瘍の研究【12SP0006】 鶴岡千鶴、尚 奕、甘崎佳子、坂入しのぶ、上西睦美、柿沼志津子、島田義也 放医研・放射線防護研究センター
	14:55～15:10	0-7	低線量影響実験棟におけるマウス50%致死線量（LD50/30）を指標とした中性子線のRBE【10SP0004】 柿沼志津子 ² 、上野涉 ¹ 、鶴岡千鶴 ² 、尚奕 ² 、谷修祐 ² 、萩原拓也 ¹ 、須田充 ¹ 、酢屋徳啓 ¹ 、小久保年章 ¹ 、島田義也 ² 1放医研・研究基盤センター、2放医研・放射線防護研究センター
15:10～15:50 ポスターセッション（コーヒーブレイク）			
セッション3 （座長： 長谷川純崇）	15:50～16:05	0-8	放医研PIXE分析装置の現状【P12-R&D01】 及川将一、酢屋徳啓、石川剛弘、小西輝昭、磯浩之、樋口有一、松田拓也、白川芳幸 放医研・研究基盤センター
	16:05～16:20	0-9	毛髪試料を使用した有害元素への曝露様態の基礎検討【P12-MC01】 千葉百子 ¹ 、武田志乃 ² 、松川岳久 ¹ 、及川将一 ³ 、石川剛弘 ³ 、篠原厚子 ¹⁴ 、横山和仁 ¹ 1順天堂大学・医学部衛生学、2放医研・放射線防護研究センター、3放医研・研究基盤センター、4清泉女子大学
	16:20～16:35	0-10	Sr, Cs, Iおよび重金属元素の海洋生物硬組織中への濃集に関する研究【P12-CN01】 沼子千弥 ¹ 、北原圭祐 ¹ 、宮寄世里加 ¹ 、久保優子 ² 、及川将一 ³ 、武田志乃 ⁴ 1千葉大学院・理学研究科、2東京理科大学・理学部、3放医研・研究基盤センター、4放医研・放射線防護研究センター
	16:35～16:50	0-11	マイクロPIXEによる組織中ウランの局所定量に関する研究～腎臓近位尿管におけるウラン局在解析～【P12-ST01】 北原圭祐 ¹ 、武田志乃 ² 、沼子千弥 ¹ 、石川剛弘 ³ 、及川将一 ³ 、島田義也 ² 1千葉大学院・理学研究科、2放医研・放射線防護研究センター、3放医研・研究基盤センター
閉会の挨拶	16:50～17:00	静電加速器施設課題採択部会 部会長 神谷富裕	

第4回共同施設（PASTA&SPICE）共同研究成果報告会

ポスターセッション 15:10 ~ 15:50 研修棟 講義室2

	課題番号	演題	発表者
P-1	13CV0016	ポリマーゲル線量計を用いた中性子線量測定	川村拓 ¹ 、佐藤齊 ¹ 、濱野毅 ² 、須田充 ³ 、吉井裕 ² 1茨城県立医療大学、2放医研・緊急被ばく医療研究センター、3放医研・研究基盤センター
P-2	10CV0010	中性子照射した歯牙のインビポEPR信号の測定	山口一郎 ¹ 、佐藤 齊 ² 、川村拓 ² 、濱野毅 ³ 、須田充 ⁴ 、吉井裕 ³ 1国立保健医療科学院、2茨城県立医療大学、3放医研・緊急被ばく医療研究センター、4放医研・研究基盤センター
P-3	S13-SC01	Roles of DNA repair and MAPK pathway in the bystander responses induced by organelle target irradiatio	Chunlin Shao ¹ , Chen Dong ¹ , Wenzhi Tu ¹ , Teruaki Konishi ² , Alisa Kobayashi ² , Yukio Uchihori ² , Tom K Hei ³ 1Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai, China. ,2 Research, Development and Support Center, NIRS, Chiba, Japan.,3Columbia University, USA.
P-4	S13-WJ01	Activation of NRF2 In Normal Human Lung Fibroblast WI38 By Targeted Irradiation With Proton Microbeam In NIRS	Jun WANG ¹ , Teruaki KONISHI ^{2,3} , Alisa KOBAYASHI ^{2,3} , Masakazu OIKAWA ³ , Tom HEI ^{3,4} , Yukio UCHIHORI ^{2,3} 1Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Chinese Academy Of Science, PR China, 2Space Radiation Research Unit, International Open Laboratory, NIRS, Japan, 3Research, Development and Support Center, NIRS, 4 Columbia University
P-5	S12-PY01	Studies of non-targeted radiation effects through microbeam irradiated embryos of Danio rerio.	Candy Yuen Ping Ng ¹ , Viann Wing Yan Choi ¹ , Eva Yi Kong ¹ , Alisa Kobayashi ^{2,3} , Teruaki Konishi ^{2,3} , Masakazu Oikawa ² , and Peter Kwan Ngok Yu ^{1,4} 1Department of Physics and Materials Science, City University of Hong Kong, Hong Kong, 2Research Development and Support Center, NIRS, Japan, 3 Space Radiation Research Unit, International Open Laboratory, NIRS, Japan, 4 State Key Laboratory in Marine Pollution, City University of Hong Kong, Hong Kong
P-6	S13-GY01	Differences in bystander effect between Aldefluor positive and negative cells of fibrosarcoma using microbeam irradiation	Liu Yu ^{1,2} , Gen Yang ^{1,2} , Teruaki Konishi ^{2,3} , Alisa Kobayashi ^{2,3} , Masakazu Oikawa ³ , Takeshi Maeda ³ , Yukio Uchihori ^{2,3} , Tom K Hei ^{2,4} , Yugang Wang ¹ 1 Department Physics, Peking University 2 Space Radiation Research Unit, International Open Laboratory, NIRS 3 Research Development and Support Center, NIRS, 4 Columbia University
P-7	S13-PB01	Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation.	Sejal DESAI ¹ , Alisa KOBAYASHI ² , Teruaki KONISHI ² , Masakazu OIKAWA ² , and Badri N. PANDEY ¹ 1 Bhabha Atomic Research Centre, Mumbai 400 085, India, 2 National Institute of Radiological Sciences, Chiba, 263-8555, Japan

平成25年度 第4回共同施設(PASTA&SPICE)共同研究成果報告会報告集 目次

PIXE関連課題

課題番号	代表者	題名	発表形式	発表番号	報告書ページ
P12-CN01	沼子千弥	Sr, Cs, Iおよび重金属元素の海洋生物硬組織中への濃集に関する研究	口頭	O-10	3
P12-MC01	千葉百子	毛髪試料を使用した有害元素への曝露様態の基礎検討	口頭	O-9	5
P12-R&D01	及川将一	放医研PIXE分析装置の現状	口頭	O-8	7
P12-ST01	武田志乃	マイクロPIXEによる組織中ウランの局所定量に関する研究～腎臓近位尿管におけるウラン局在解析～	口頭	O-11	9

SPICE関連課題

課題番号	代表者	題名	発表形式	発表番号	報告書ページ
S12-MS01	鈴木雅雄	プロトンマイクロビーム細胞核限定的照射に対する生物効果のバイスタンダー効果解析	口頭	O-1	13
S12-R&D01	小西輝昭	マイクロビーム細胞照射装置SPICEの開発	口頭	O-5	15
S12-PY01	Peter Kwan Ngok Yu	Studies of non-targeted radiation effects through microbeam irradiated embryos of Danio rerio.	ポスター	P-5	17
S13-GY01	Gen Yang	Differences in bystander effect between Aldefluor positive and negative cells of fibrosarcoma using microbeam irradiation	ポスター	P-6	19
S13-HO01	岡野ジェイムス洋尚	マイクロビーム照射法による放射線誘発神経活性化と信号伝播の可視化	口頭	O-3	21
S13-JI01	数藤由美子	Chromothripsisの生成機構の解明	口頭	O-4	23
S13-KS01	佐藤克俊	放射線抵抗性がん細胞株におけるヘテロクロマチン領域でのDNA修復に関する研究	口頭	O-2	25
S13-PB01	Badri N. PANDEY	Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation.	ポスター	P-7	27
S13-SC01	Chunlin Shao	Roles of DNA repair and MAPK pathway in the bystander responses induced by organelle target irradiation	ポスター	P-3	29
S13-WJ01	Jun WANG	Activation of NRF2 In Normal Human Lung Fibroblast WI38 By Targeted Irradiation With Proton Microbeam In NIRS	ポスター	P-4	31

NASBEE関連課題

課題番号	代表者	題名	発表形式	発表番号	報告書ページ
10CV0010	山口一郎	中性子照射した歯牙のインビボEPR信号の測定	ポスター	P-2	35
10SP0004	柿沼志津子	低線量影響実験棟におけるマウス50%致死線量(LD50/30)を指標とした中性子線のRBE	口頭	O-7	37
12SP0006	鶴岡千鶴	Ptch1遺伝子ヘテロ欠損マウスにおける中性子線誘発脳腫瘍の研究	口頭	O-6	39
13CV0016	川村拓	ポリマーゲル線量計を用いた中性子線量測定	ポスター	P-1	41

PIXE 関連課題

Sr, Cs, I の海洋生物硬組織中への濃集に関する研究

沼子千弥, 北原圭祐 (千葉大学 理学研究科)

武田 志乃, 及川 将一 (放射線医学総合研究所 研究基盤センター)

【緒言】貝殻や耳石などには年輪のような成長縞がみられ、それらが生まれてから現在に至るまでの履歴情報を読み取ることができる。さらにこれらの硬組織に含まれる元素はその縞が形成されるときに環境に存在する元素の濃淡を反映することから、それらの元素分布を成長縞と対応させて求めることで、その生物の生息環境の時系列での環境変化を知ることが可能である。

本研究ではこれまで、炭酸カルシウムやリン酸カルシウムを主成分とする貝殻・耳石・歯・結石などの試料に対して EPMA を用いた 2 次元元素分析を行ってきた。しかし、EPMA では%以下の微量成分の分析が困難であること、電子線が試料内部で拡散してしまうことなどから、試料の形態と 1 : 1 対応したイメージングを行うことに限界があり、環境履歴を解読する程の分解能をもった分析を行うことができなかった。そこで本研究では、空間分解能と定量性に優れるマイクロ PIXE により、微細な成長縞構造に対応した Sr, Cs, I など、福島原発事故以降問題になっている元素や、その他 Mn, Zn, Fe, Cd などの重金属元素の局所定量手法の確立を行い、このような海洋生物の硬組織がその生息環境のモニタリングに活用可能かどうかの検討を行った。

【実験・結果】

- 1) ヒザラガイ類は、磁鉄鉱 (Fe_3O_4) とリン酸カルシウムを主成分として、摂餌器官である歯舌をの歯形成することで知られており、環境に存在する親鉄元素と親石元素がそれぞれ化学的親和性により蓄積することが期待された。そこで、宮城県石巻市、徳島県鳴門市で採集されたヒザラガイの歯舌を樹脂包埋・薄片研磨し、マイクロ PIXE により含有微量元素の定性分析とそれらの 2 次元分布について比較を行った。また、種による濃集元素の差を調べるために、沖縄県石垣島で 4 種類のヒザラガイ類を採集し、同様に歯舌薄片試料に対してマイクロ PIXE 分析を行った。
- 2) ワスレガイは、肝臓と呼ばれる代謝器官に、リン酸カルシウムをマトリクスとした細胞外顆粒を形成し、ここにマンガンや亜鉛などの重金属を蓄積し無毒化を行っている。この顆粒の薄片に対してマイクロ PIXE による定性分析と 2 次元元素マッピングを行ったところ、主成分である Ca や Mg と置換する形で Mn, Zn, Fe, Sr が蓄積されていることがわかった。また、 MnCl_2 や NdCl_3 を添加した海水でワスレガイを飼育し、これらの元素の貝殻や顆粒への取り込みについても検討を行った。
- 3) カニの甲羅や胃歯は、キチンのフレームワークに炭酸カルシウムの微結晶が蓄積された硬組織である。カニは生息域が限定されており、また環境汚染に耐性のある種類も多いことから、環境モニタリングの用いることができることが期待された。そこで、非汚染地域として千葉県富津港、汚染の可能性のある地域として千葉県稲毛海岸と平井大橋周辺を選択し、汚染に耐性があることが知られているケフサイソガニを採集し、甲羅や胃歯に蓄積した元素の定性分析と 2 次元元素マッピングを行った。さらに、鉛

～報告書（課題番号：P12-CN01）～

やマンガンなどの重金属を添加した人工海水を用いてケフサイソガニの飼育実験を行い、飼育期間の長さによる生存率の比較と硬組織への重金属の蓄積量・分布について調べた。

発表会ではこれらの研究について、それぞれ背景と実験、結果をまとめて報告する。

毛髪試料を使用した有害元素への曝露様態の基礎検討 Investigation of the invading manner of toxic substances using hair samples

千葉百子¹⁾ 武田志乃²⁾ 松川岳久¹⁾ 及川将一²⁾ 石川剛弘²⁾ 篠原厚子^{1,3)}
横山和仁¹⁾

¹⁾ 順天堂大・医・衛生学 ²⁾ 放医研 ³⁾ 清泉女子大

Momoko Chiba¹⁾ Shino Homma-Takeda²⁾ Takehisa Matsukawa¹⁾ Masakazu Oikawa²⁾ Takahiro
Ishikawa²⁾ Atsuko Shinohara^{1,3)} Kazuhito Yokoyama¹⁾

1) Juntendo Univ 2) National Institute of Radiological Sciences

2) 3) Seisen Univ

[はじめに]

頭部毛髪は覚醒剤・麻薬、金属元素等の曝露レベルの指標として使用される。一般に、このような分析は経口・経皮等の曝露様態により吸収された薬毒物が毛髪に分布することが前提となっている。今回、毛髪から検出された金属元素が、経口摂取されたものが毛髪中に分布したものか（内部汚染）、毛髪に直接付着したものか（外部汚染）を鑑別する必要性が生じた。そのため micro-PIXE を用いて毛髪断面における元素分布解析の基礎検討を行った。

2011年、タリウム(Tl)中毒事件が発生した。同一の職場の15名のうち、7名が健康障害を訴えた。この15名の毛髪を頭皮側から3～10mmのフラクションに分け、各フラクションにおけるTl濃度をICP-MSにより測定し、濃度推移を解析した。健康被害を訴えた7名のうちの6名はTlの毛髪中濃度推移は類似しており、Tl濃度と身体症状に対応がみられ、曝露時期の推定が可能であった。一方、健康障害を訴えた残りの1名の毛髪中Tl濃度のピークは過去方向にずれていて、Tl濃度は高かったが、本人の身体症状の訴えはTlピーク時期ではなく、他の6名と同時期であった。そのため、この1名について毛髪から検出されたTlの曝露様態について検討する必要性が生じた。micro-PIXEを検出手段として、毛髪断面の元素分布を解析することにより曝露様態を明らかにすることを目的とし、基礎検討を開始した。

[実験と結果]

Tl外部汚染モデルとする毛髪は8歳、31歳および72歳の女性から得た。毛髪浸漬の*in vitro* 実験用タリウム溶液は酢酸タリウムの100ppmまたは1000ppm水溶液を使用した。浸漬時間は1.5h、6h、24hとした。毛髪のタリウムの総Tl濃度はICP-MSで測定し、断面観察をmicro-PIXEで行った。Tlは毛髪表面のみならず内部へ浸透すること、この浸透は浸漬時間に応じて進むことが明らかになった。1000ppmに浸漬した毛髪の1 μm^2 当りのカウント数は30歳代および70歳代では差はなく、8歳の毛髪では少なかった。Tl以外に水銀(Hg)、鉛(Pb)、ストロンチウム(Sr)についても*in vitro* 実験を行った。これらの元素は毛髪表面にみられ、内部への浸透はしにくいことが示唆された。これらの結果から元素により毛髪内への浸透に差があることが明らかとなった。また年齢に差があることも示唆された。

[今後の課題]

更なる検討が不可欠であるが、性別と年齢差も含めて、毛髪断面の微量元素量をマッピングできることにより、セシウム、ウラン等元素の曝露様態の鑑別にも応用できる可能性が示唆された。

放医研 PIXE 分析装置の現状

○及川将一、酢屋徳啓、石川剛弘、小西輝昭、磯 浩之、樋口有一、松田拓也、
白川芳幸

(独)放射線医学総合研究所 研究基盤センター 研究基盤技術部

【コンベンショナル PIXE 分析装置】

PIXE 分析法は、多元素同時分析法として非常に有効なツールであり、国内外の研究機関において生体試料や環境試料などの分析に盛んに応用されている。しかし、ナトリウムよりも軽い元素の分析は、PIXE 分析法において一般的に使用する半導体検出器の窓材料(主にベリリウム)の制約によりあまり行われておらず、陽子線照射によって生じる即発 γ 線を検出して元素分析を行う、PIGE 分析法が適用されているケースが多い。近年、放医研 PIXE 分析装置に対し、様々な研究者からホウ素やフッ素等の軽元素分析への期待が寄せられており、当該装置における軽元素分析技術の構築が新たな課題となっている。そこで我々は、コンベンショナル PIXE 分析装置において、新規 HP-Ge 検出器(CANBERRA 製 GUL0110)を用いた PIXE 法の軽元素分析への適用可能性について検討を進めている。この新規 HP-Ge 検出器の検出部は、厚さ 10.2 mm、有感面積 100 mm² の検出素子で構成され、重元素の分析に十分な検出感度を有する一方、窓材料が 0.4 μ m 厚の高分子フィルムであることから、軽元素の低エネルギー領域にも優れた検出感度を有している。本研究課題では、当該検出器について各種標準試料の PIXE 分析を行い、軽元素領域の特性評価を実施した。

【マイクロ PIXE 分析装置】

マイクロ PIXE 分析装置では、重金属元素の生体毒性に関する研究において、ウランやタリウム等の L-X 線で 10 keV 以上を対象とする重元素分析への要望が多く寄せられていた。我々は 4 年前より、CdTe ダイオード検出器(Amptek 製 XR-100T-CdTe)を大立体角配置した重元素高効率検出システムの構築を開始し、現在では実用化される段階にまで至っている。平成 24 年度には、施設内の放射線管理区域が核燃料物質取扱施設(令 41 条非該当施設)に指定されたことにより、平成 24 年 9 月からは天然ウラン含有試料のマイクロ PIXE 分析に利用されている。

【タンデトロン加速器の老朽化対策】

平成 23 年 3 月の東北地方太平洋沖地震以降、直接的な原因は不明であるが、タンデトロン加速器の高エネルギー側加速管に微量の真空漏洩が観測されていた。平成 25 年度より、当該静電加速器施設を含む放射線発生装置群が「先端研究基盤共用・プラットフォーム形成事業」に採択されたこともあり、高品質なビーム提供及び安定的なマシンタイム提供が今まで以上に求められることから、加速管の更新作業を行うことを決断した。加速管更新作業は、平成 26 年 3 月中に完了(予定)し、その後は一時的な電子負荷の増大や SF₆ の乾燥度に留意しながら、エイジング作業及び調整運転を慎重に重ね、5 月中旬にはマシンタイム提供を再開する予定である。



図. タンデトロン加速器本体タンクより加速管カラムを引き抜いて作業を行っている様子

○おいかわ まさかず、すや のりよし、いしかわ たかひろ、こにし てるあき、いそ ひろゆき、ひぐち ゆういち、まつだ たくや、しらかわ よしゆき

マイクロ PIXE による組織中ウランの局所定量に関する研究 ～腎臓近位尿細管におけるウランの局在解析～

北原圭祐¹ 武田志乃² 沼子千弥¹ 石川剛弘³ 及川将一³ 島田義也²

¹ 千葉大学大学院理学研究科

² 放射線医学総合研究所 放射線防護研究センター ³ 研究基盤センター

【はじめに】

ウランは腎臓に高濃度に蓄積し、腎障害を引き起こすことが知られている。ウランは重金属としての化学毒性と α 線核種としての放射線毒性を合わせ持つ核種であり、一般に化学毒性が優勢であると考えられているが、詳細な化学毒性発現機序はよく理解されていない。腎臓中のウランは近位尿細管の下流領域(S3 セグメント)に選択的に濃集していることが確認されているが、その部位選択性の機序も明らかになっていない。この腎臓へのウランの蓄積とそれに続き発生する腎障害のメカニズムを明らかにするためには、腎臓の局在量とその化学形を知ることが重要である。本研究では、マイクロ PIXE 分析により腎臓近位尿細管におけるウラン局在解析を試みた。ウラン局在部位における化学状態分析についてもシンクロトロン放射光を用いた X 線吸収微細構造(XAFS)法により検討したので併せて報告する。

【実験】

幼若(3 週齢)および成熟(10 週齢)の Wistar 系雄性ラットに対し、0.5 mg/kg、または 2 mg/kg の酢酸ウラニルを背部皮下に投与した。投与後 1 日目、3 日目、8 日目、および 15 日目にこれらのラットを解剖し腎臓を摘出した。摘出した腎臓は 10 μ m 厚の凍結薄切切片にし、マイクロ PIXE 測定による元素分布測定と局所定量の為のスポット測定を行なった。また、PIXE 測定と同一のサンプルを用いて、放射光施設 SPring-8 にて放射光を用いた蛍光 X 線分析(SR-XRF)による元素分布解析と XAFS 測定による化学状態解析を行なった。

【結果・考察】

2 mg/kg 投与後 1 - 3 日後の成熟ラット腎臓の近位尿細管領域に対してマイクロ PIXE 測定を行なった結果、リンの局在部位が検出された。リン酸とウランは親和性が高いことが知られていることから、リン局在部位周辺のウラン分布を調べたところ、リンの局在部位にウランの分布が集中している様子が見られた。次に、近位尿細管上皮上の任意のリン局在部位および非局在部位を 3 - 4 点抽出し、PIXE のスポット測定を行ない、各部位のウラン濃度を定量した。その結果、リン局在部位におけるウラン濃度は腎臓平均ウラン濃度の 3.8 - 14.3 倍であった。一方、リン非局在部位においてもウラン濃度がリン局在部位と同等のウラン局在部位が認められた。次に、PIXE 測定を行なった領域に対して SR-XRF 測定を行ない、より広域なウラン分布を得た。リン局在部位においてウランの分布が確認されたが、その形状は一致しなかった。また、ウランはリン局在部位以外にも高濃度で存在することが明らかになった。これらの近位尿細管上皮におけるリンおよびウラン局在部位に対して X 線を照射しマイクロ XAFS 測定を行なった。リンの局在部位を含め、ウラン局在部位の多くは 6 価のウラニルイオン(UO_2^{2+})と同様のスペクトルであったが、一部のウラン局在部位で 4 価のウランと類似したスペクトルが観察された。これらの結果より、生体内でウランの還元が行われていることが示唆された。4 価のウランと類似したスペクトルは成熟ラットのみから検出されたため、ウランの還元機構には年齢依存性がある可能性も考えられた。

SPICE 関連課題

プロトンマイクロビーム細胞核限定的照射に対する生物効果の バイスタンダー効果解析

講演者：鈴木雅雄¹⁾

共同発表者：小西輝昭²⁾、及川将一²⁾、小林亜利紗³⁾、石川剛弘²⁾、村上健¹⁾

1) 重粒子医科学センター・国際重粒子医科学研究プログラム

2) 研究基盤センター・研究基盤技術部

3) 研究基盤センター・先端研究基盤共用推進室

低線量（率）放射線生物影響誘導メカニズムの鍵を握るバイスタンダー効果は、プルトニウムから放出されるアルファ線や高LET粒子放射線であるヘリウムイオンマイクロビームを用いた研究が先行する一方で、低LET放射線を利用した研究は、マイクロビーム照射法の開発を含めた実験法確立の困難さから非常に限られた研究しか行われていないのが現状である。本研究は、比較的低LETなプロトンマイクロビーム細胞照射システムを駆使して、細胞内部位（細胞核または細胞質）に対して限定的に照射し、細胞レベルの生物効果のバイスタンダー効果誘導の解析、誘導メカニズムの解明を目的として計画した。実験に用いた細胞は、公的な細胞バンクより供給されたヒト胎児皮膚由来正常線維芽細胞を用いた。隣り合った細胞同士が情報伝達可能な密度（600-700細胞/直径1.0-1.5 μm ）に培養した細胞の核をヘキストで染色し、コンピューター制御されたシステムにより一つ一つの細胞核の座標を抽出・記憶させ、100%の細胞核とランダムに選択した10%の細胞核にそれぞれ10 μm x 10 μm に絞った領域に20個のプロトンを照射した。細胞致死効果はコロニー形成法による細胞の増殖死を検出した。現段階ではプレリミナリーな結果ではあるが、得られた結果は100%細胞核照射での生存率が49%、10%照射の場合が47%となった。ここでバイスタンダー効果を仮定せず細胞核にマイクロビームを照射された細胞のみに致死効果が誘導されると仮定すると、100%照射の生存率実験値より10%照射の細胞集団で期待される生存率は95%と計算される。しかしながら、実際に得られた10%照射の生存率はこの計算値を下回った。また、ギャップジャンクション特異的阻害剤を併用して10%照射を行った場合は、生存率は86%となった。以上の結果から、10%照射の細胞集団で直接マイクロビームを照射された細胞以外の非照射細胞にも間接的なメカニズムで細胞致死が誘導され、それはギャップジャンクションを介した細胞間情報伝達機構が関与したバイスタンダー効果の結果であると考えられる。

Research and development of the focused proton microbeam irradiation system, SPICE for radio-biological studies.

(S12-R&D-01)

Teruaki KONISHI^{1,2,*}, Masakazu OIKAWA¹, Alisa KOBAYASHI^{1,2},
Noriyoshi SUYA¹, Takeshi MAEDA¹, Yukio UCHIHORI^{1,2} and Yoshiyuki SHIRAKAWA¹

Abstract:

There is continuing interest for the use of microbeam irradiation systems designed to deliver a defined number of charged particles on a single cell with a resolution of a few micrometers. Moreover, microbeams are particularly useful for the field of radiation-induced non-targeted effects, so-called bystander effects that are considered to be one of the major effects in the low-dose region. Thus, microbeam technique is one of the powerful tools for investigating studies related to radiation effect and risk of low dose in space radiation for astronauts and cosmonauts.

Our microbeam irradiation system, the Single-Particle Irradiation system to Cell (SPICE) provides a 3.4 MeV proton microbeam focused with a quadrupole magnetic lens on an upward vertical beam line.[1] SPICE was severely damaged by the Tohoku Earthquake on 11 March 2011, and was out of operation for about a year and a half. We have successfully reconstructed the facility, and it is now operational with system refinements. At present, SPICE is the only proton microbeam facility in Japan at which a single-ion single-cell irradiation can be performed on mammalian cells with stability and high throughput using an upward vertical beam of below 2 μm diameter, focused with a magnetic quadrupole triplet lens. A variety of irradiation modes have been established for radiation-induced bystander effects, cytoplasm irradiation, and multi-position targeting mode. [2] Most of all, SPICE has been administrated as a ‘Joint-use facility for Collaborative Research’, and thus researchers outside NIRS can apply for beam time

of SPICE after their research proposals are approved. In the past two years, other than 4 internal applications (2 from Charged Particle Therapy Center, 1 from Radiation Emergency Center, 1 from Research and Development Support center), total of 8 external applications from 3 domestic and 5 foreign Universities and Institutions were performed.

(Domestic: The Jikei University School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo Metropolitan University)

(Foreign: City University of Hong Kong, China, Peking University, China, Chinese Academy of Science, China; Bhabha Atomic Research Center, India; Colorado State University, US)

Developments and achievements during FY 2012 – to present:

1. Beam size

Approximately two micrometer beam size is now routinely produced. Figure 1, shows an example of targeted WI-38, human normal fibroblast cells that were irradiated with 500 protons per position. From this image it is clearly identified that the beam size is below 2 micron.

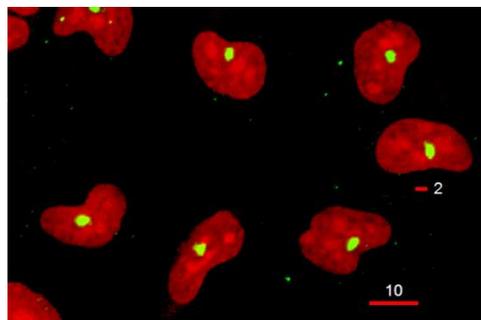


Fig1. Targeted WI-38 cells were fixed and immunostained against γ -H2AX, which is an indicator of DNA double strand breaks. Number above the bar is shown in micrometers.

2. Optional modes for cell targeting.

Not only the number of research proposals, but also the demands for different irradiation modes for varieties of biological aims have increased.

A) Bystander effect mode: Generally with the default setting of SPICE, all the cells in the captured images are set to be targeted. However for studies of bystander effects, not all the cells but only small fraction of cells are targeted to analyze the bystander responses in the non-targeted cells. Therefore, with usage of bystander effect mode, the percentage of targeted cells within the cell population can be set to a desired value. This mode is now operational and results are presented elsewhere.[3, 4]

B) Fig 2A shows the schematic diagram of the multi-position targeting mode. Solid circle indicates the center position of the nucleus, which the X-Y coordinates of the positions are the automatically calculated. The open circles are off-center positions at a distance of d μm , which can be up to 30 μm . With this mode, dose distribution, or DNA damage distribution within the cell nucleus can be optimized according to the chosen pattern. This mode maybe useful for mechanistic studies of radiation induced DNA damage repair. This mode was applied for studies on low dose radiation induced cell cycle arrest and DNA double strand breaks and was reported elsewhere. [5]

C) Fig 2B shows the cytoplasm targeting mode. The center positions of the nuclei are calculated and the targeting positions are calculated and targeting position was off-set toward the longer axis of ellipse. Only one or two positions in cytoplasm, and with or without nucleus are selectable. Cytoplasmic irradiation was performed for studies on radiation induced oxidative stress response, demonstrating the translocation of NRF2 transcription factor from cytoplasm to nucleus.

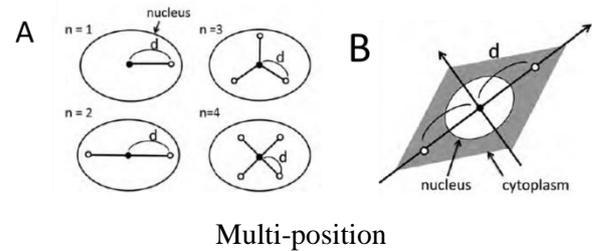


Fig 2. Panel A: Multi-position targeting mode, Panel B: Cytoplasm targeting mode.

Future Plans

“Faster” not only in system integration, such as irradiation speed, image capturing and analysis algorithm, but shortening the hours of daily process for beam focusing and beam parameterization, which would extend beam times hours for sample irradiation. Developments for “faster” system are required for acceleration in studies of microbeam applied radio-biology.

Reference:

- [1] Konishi, T. et al., Biological studies using mammalian cell lines and the current status of the microbeam irradiation system, SPICE. Nucl. Instr. Meth. B **2009**, 267, 2171–2175.
- [2] Konishi T, et al. SPICE-NIRS microbeam: a focused vertical system for proton irradiation of a single cell for radiobiological research. J Radiat Res **2013**;54:736–47.
- [3] Desai S, Kobayashi A, Konishi T, Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation, Mut. Res., (*accepted*)
- [4] 小林亜利紗：ヒトがん及び正常細胞間におけるバイスタンダー応答の解析：日本放射線影響学会第 56 大会、2013
- [5] 小西輝昭：マイクロビーム細胞照射によるヒト HCT116 細胞を用いた低線量領域における細胞周期停止の解析。日本放射線影響学会第 56 大会、2013

1 Research Development and Support Center, NIRS, Japan

2 Space Radiation Research Unit, International Open Laboratory, NIRS, Japan

Studies of non-targeted radiation effects through microbeam irradiated embryos of *Danio rerio*.
(S12-PY01)

Candy Yuen Ping Ng¹, Viann Wing Yan Choi¹, Eva Yi Kong¹, Alisa Kobayashi^{2,3}, Teruaki Konishi^{2,3}, Masakazu Oikawa², and Peter Kwan Ngok Yu^{1,4}

Abstract:

Linear no-threshold (LNT) hypothesis, which assumes that the risk from an ionizing-radiation exposure is linearly proportional to the dose normalized by the radiation weighting factor, is commonly adopted for radiation protection considerations. Data in the low-dose regime are relatively scarce, so the detrimental effect from exposure to low-dose radiation is commonly extrapolated from data obtained in the high-dose regime by using the LNT model. There is a considerable amount of evidence showing that organisms may exhibit different responses to a low-dose exposure from that to a high-dose exposure. As such, the present project was focusing on the study of non-targeted radiation effects, including the radiation induced radioadaptive response (RAR) and hormetic effect through the use of proton microbeam. The dose response at low-dose exposure was also studied. A better understanding of these non-targeted radiation effects can give a better estimation on the radiation risk which forms the main purpose of the research. The microbeam irradiation system (Single-Particle Irradiation System to Cell, acronym as SPICE) at the National Institute of Radiological Sciences (NIRS), Japan, was originally designed for radiobiological studies. In our studies, we made use of the SPICE to irradiate the zebrafish (*Danio rerio*) embryos with a control of the irradiation spots. Protons with an initial energy of 3.4 MeV would first travel through a Si₃N₄ exit window with a thickness of 100 nm, and then through a 2.5 μm Mylar film with less than 50 μm air gap between the exit window and Mylar film before the protons finally reached the target [1].

Achievements:

1. *Triphasic low-dose response in zebrafish embryos irradiated by microbeam protons*

SPICE was employed to irradiate dechorionated zebrafish embryos at the 2-cell stage, which was at 0.75 h post fertilization (hpf), by microbeam protons. Either one or both of the cells of the embryos were irradiated with 10, 20, 40, 50, 80, 100, 160, 200, 300 and 2000 protons each with energy of 3.37 MeV. The levels of apoptosis in zebrafish embryos at 25 hpf were quantified through terminal dUTP transferase-mediated nick end-labeling (TUNEL) assay. The results revealed a triphasic dose-response for zebrafish embryos with only one cell or both cells irradiated at the 2-cell stage, namely, (1) sub-hormetic zone, (2) hormetic zone, and (3) toxic zone [2].

2. *Studying the adaptive response in zebrafish embryos*

In this study, microbeam protons were used to provide the priming dose to induce an in vivo radioadaptive response (RAR) in the zebrafish embryos against subsequent challenging doses provided by x-ray photons.

(A) *The threshold number of protons to induce an adaptive response in zebrafish embryos*

For each embryo, one irradiation point was chosen, to which 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 and 500 protons each with an energy of 3.4 MeV were delivered at 5hpf. The challenging dose, which was achieved using 2 Gy of x-ray irradiation, was delivered to the embryos at 10 hpf. The results revealed that at least 200 protons would be required to induce RAR in the zebrafish embryos in vivo [3].

(B) Investigation of the gene expression involved in radioadaptive response (RAR)

The present experiments examined the expression of related genes in the apoptotic pathway, including the pro-apoptotic related genes (e.g., p53, Bax, Puma, Caspase-9 and Caspase-3) and the anti-apoptotic related genes (e.g., Bcl-2 and Mdm2). HSP 70 was also examined in the present study to identify the role of HSP in proton-induced RAR. Moreover, it was suggested that RAR induced by microbeam protons on the zebrafish embryos developed through radiation-induced bystander effect (RIBE), therefore the present experiment also examined the expression of genes that were suggested to be involved in RIBE, i.e., IL-1 β and iNOS, to elucidate the role of RIBE in RAR.

Four sets of experiments were conducted by delivering 5, 30 or 200 protons at 10 positions each to the embryos at the developmental stage of 5 hpf. The results suggested that the increase in apoptotic signals shown in the sub-hormetic zone in the triphasic dose response curve was mediated through an extrinsic apoptosis pathway which was not involved in the change in tp53 expression. On the other hand, the decrease in apoptosis at the hormetic zone was resulted from the up-regulation of Bcl-2 only.

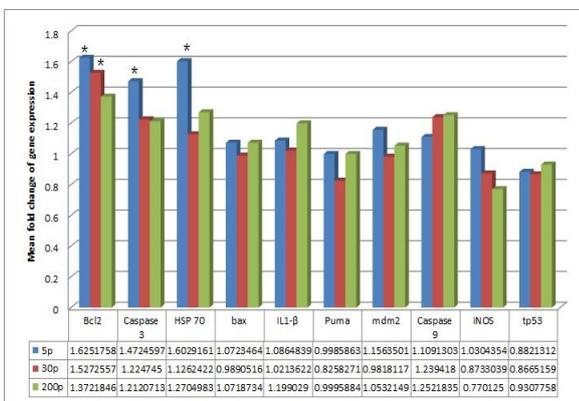


Fig1. Mean fold-changes of gene expression level of the selected genes in zebrafish embryos at 24 hpf. An asterisk represents a statistically significant difference given by the student t-test ($p < 0.05$).

For comparing the gene expressions between X-ray and proton irradiations, the above experimental set up was repeated by replacing the proton irradiation with X-ray irradiation with doses of 0.1 Gy and 4 Gy. The results showed that the increase in apoptotic signals in the embryos after being exposed to 4 Gy of X-ray was mediated by an intrinsic apoptosis pathway.

A total of 13 SPICE beam times were requested for the current project. In the first half of the FY 2013, 8 beam times were allocated. The gene expression induced by proton microbeam and X-ray in zebrafish embryos were successfully examined and compared (presented in the previous section). The rest 5 beam times were allocated in the second half of the FY 2013 on March 2014. Follow up studies, which include 1) the investigation of the gene expression involved in RAR developed by proton microbeam irradiation and 2) the investigation of the cell-cell rescue effect under different proton dose distribution, were carried out. Data were still under investigation.

Reference:

- [1] Choi, V.W.Y., et al. Adaptive response in zebrafish embryos induced using microbeam protons as priming dose and x-ray photons as challenging dose. *Journal of Radiation Research* **2010**, 51, 657-664.
- [2] Choi, V.W.Y., et al. Triphasic low-dose response in zebrafish embryos irradiated by microbeam protons. *Journal of Radiation Research* **2012**, 53, 475-481.
- [3] Choi, V.W.Y., et al. Threshold number of protons for inducing adaptive response in zebrafish embryos. *Journal of Radiological Protection* **2013**, 33, 91-100.

1 Department of Physics and Materials Science, City University of Hong Kong, Hong Kong

2 Research Development and Support Center, NIRS, Japan

3 Space Radiation Research Unit, International Open Laboratory, NIRS, Japan

4 State Key Laboratory in Marine Pollution, City University of Hong Kong, Hong Kong

Differences in bystander effect between Aldefluor positive and negative cells of fibrosarcoma using microbeam irradiation
(S13-GY01)

Liu Yu^{1,2}, Gen Yang^{1,2}, Teruaki Konishi^{2,3}, Alisa Kobayashi^{2,3}, Masakazu Oikawa³, Takeshi Maeda³, Yukio Uchihori^{2,3}, Tom K Hei^{2,4}, Yugang Wang¹

Abstract:

Recently, the properties of cancer stem-like cells (CSCs) have been widely investigated, especially due to resistance against radiation exposure that becomes one of major concerns in radio-cancer therapy. However, information is rare about their performance in indirect irradiation. Here, we sorted the Aldefluor-positive cells which have a CSC property in HT1080 cell line and proved the existence of radiation-induced bystander effect in these stem-like cells and their counterpart Aldefluor-negative cells. We found that the negative ones seemed to generate a more harmful bystander effect signal and were more vulnerable to such signals in terms of the DNA double strand break (DSB) foci number measured by 53BP1. In addition, the NO scavenger c-PTIO can effectively release the bystander effect in Aldefluor-negative cells but not in positive ones. Our results first shed light on the difference between CSCs and non stem-like cancer cells (NSCCs) in radiation-induced bystander effect (RIBE), and might contribute a further understanding of the property of CSCs in radiotherapy, especially in low dose and out-of-field effect assessment.

Materials and methods

Cell line and cell culture: HT1080 53BP1-GFP cells were constructed by transfecting pDC3.1Hyg-F2GFP-53BP1 (12.24 kbp) (gift from Dr. Burong Hu of Chinese Academy of Science). This 53BP1 is widely recognized as a marker of DNA double strand break, and is a significant mediator in cell cycle checkpoint. The sorted Aldefluor-negative sub-population was cultured in

DMEM supplemented with 10% of fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100mg/ml streptomycin. Aldefluor-positive subpopulation was cultured on low adhesion plate coated with 1% geltrex to keep its stem-like property and cultured in DMEM/F12 supplemented with B27, N2, 10mg/mL bFGF and 20mg/mL EGF.

FCM sorting of HT1080-53BP1-GFP: Aldefluor kits (Stem cell technologies Inc.) were used to sort two subtypes of cells, the Aldefluor-positive cells and negative cells. The whole process was strictly performed according to the product protocol. For all experiments, samples were sorted on a BD FACS Aria and analyzed on a BD LSR II flow cytometer using BD FACS Diva Software

Microbeam irradiation: SPICE cell dishes were prepared one day before irradiation as described [1]. The sorted Aldefluor-positive and -negative cells were detached at a confluence of 70% with trypsin, then 8000 cells were seeded on the center of the irradiation dish at a density of 2×10^5 cells/mL. In bystander effects experiments, the proportion of irradiated cells is 15% and the rest 85% served as bystanders non-targeted cells. All the irradiation was performed using SPICE-NIRS. Nucleus of these cells were irradiated by 200 protons (LET: 11.7 keV/ μ m in water), which dose was equivalent to 1 Gy in its nucleus. After the irradiation, at desired time points, images were taken on a SPICE off-line microscope system. The relative fluorescence units (RFU) and number of 53BP1 foci were calculated using the Image J software.

Results

Co-localization of 53BP1 in CSC and NSCC:

Aldefluor-positive population of HT1080 is more capable in sphere formation and it is known that high ALDH1 enzymatic activities are the general characteristics with the cells with stem cell properties. By usage of cell sorter, we sorted Aldefluor-positive and Aldefluor-negative cells, according to its ALDH1 enzymatic activity, which identified by its fluorescence. We demonstrated that the Aldefluor-positive cells have the higher ability of sphere formation compare to the negative ones with 3 days anchor-independent culture. Therefore, we defined Aldefluor-positive and negative cells as Cancer stem-like cells (CSC) and Non Stem Cancer Cells (NSCC). As shown in Figure 1, the cells irradiated with protons ranging from 20 to 200, the RFUs per foci were significantly higher in CSC than the NSCC. As foci RFU is an index for the co-localization magnitude of 53BP1, thus we concluded that the NSCC recruit more 53BP1 compared with the CSC; moreover, NSCC were more sensitive in the response of the increase of doses. [1]

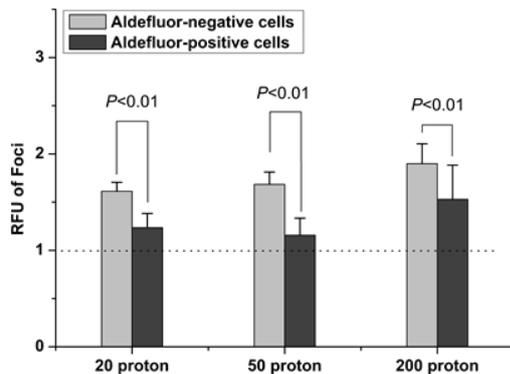


Figure 1. Relative fluorescence unit (RFU) of 53BP1 foci in both targeted Aldefluor positive and negative cells. Average RFU per 53BP1 foci in irradiated cells at 1h post irradiated.

Whether radiation induced bystander effects exist or not in these two kinds of cells in our system?

As for two types of cells, we co-cultured the cell in four combinations that each type of the cell can

be co-cultured with itself or the other type when regarded as irradiated cells or bystander cells. CSC or NSCC were irradiated by 200 protons in one specific position of nucleus, accounting for 15% of all the cells on the dish. The number of 53BP1 foci was counted in those non-targeted cells. As shown in Figure 2, we demonstrated that radiation induced bystander effects do exist in both CSC (Aldefluor positive cells) and NSCC (Aldefluor negative cells) of HT1080-53BP1-GFP cell line.

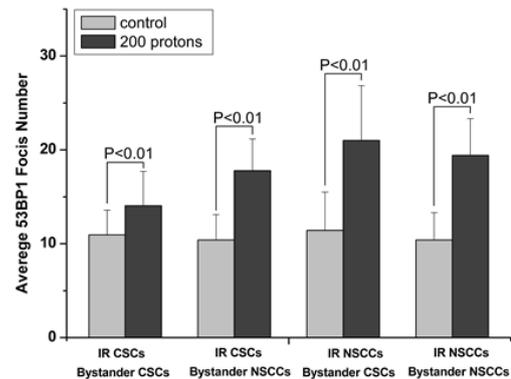


Figure 2. The average 53BP1 foci number of bystander cells at 6h post irradiation.

Further investigation was performed to clarify the difference in the production of bystander effects signals from the targeted cells and magnitude of bystander response in the non-targeted cells with CSC and NSCCs and will be presented in the poster.

Reference:

- [1] G. Yang, et al., Aggregation of 53BP1 and XRCC1 in cancer stem cells and non-stem cancer cells post-targeted proton irradiation. *J Radiat Res* **2014**; 55: i91
- [2] Konishi T, et al. SPICE-NIRS microbeam: a focused vertical system for proton irradiation of a single cell for radiobiological research. *J Radiat Res* **2013**;54:736–47.

1 Department Physics, Peking University

2 Space Radiation Research Unit, International Open Laboratory, NIRS

3 Research Development and Support Center, NIRS

4 Columbia University

マイクロビーム照射法による放射線誘発神経活性化と信号伝播の可視化

岡野ジェイムス洋尚^a、原央子^a、長谷川実奈美^a、
小林亜利紗^b、及川将一^b、野島久美恵^c、小西輝昭^b

要旨

宇宙環境は地上よりも、高線エネルギー付与（linear energy transfer; LET）な荷電粒子線をはじめとして、多様な線質の宇宙放射線が低線量率で国際宇宙ステーション内まで貫いて入ってくる。そして、人体への放射線影響として、宇宙飛行士の血中リンパ球の染色体異常発生、中枢神経影響、白内障などが報告されている。その中でも、ライトフラッシュという現象は、多くの宇宙飛行士は目の中に白い火花が飛び散るような経験を示し、これは、宇宙放射線が眼球や視神経を貫いたときおき、これは、荷電粒子線の生物効果として、神経細胞の初期応答の一つと考えられる。神経細胞間の伝達を司るシナプスは、神経細胞同士の液性因子等の授受や周辺アストロサイトから神経細胞への接触刺激などにより、安定して信号伝達ができるよう成熟していくことが知られている。

神経細胞は成熟したシナプスを介して樹状突起で他の神経細胞からの信号を受け取ることができるようになり、細胞体において入力信号を処理し、軸索から他の神経細胞へと信号を出力している。信号を受け取った神経細胞は同じようにして、別の神経細胞へ信号を出力する。ある神経細胞が信号を出力すると、次々と信号が伝播していく。神経の伝達機構はこのように単純な法則で説明でき、情報処理モデルとして考案できるような機械的な信号の入出力が行われていることが知られている。そして、この神経回路への入力、電気信号やニューロトランスミッターから行われると考えられている。このような現象は、一般的なブロードビーム照射では、複数の細胞が同時に照射されることにより、これらシグナルの

やり取りが複合的に発生、または交差することから、単一細胞レベルでの放射線に対する初期応答を時系列で解析することは原理的に不可能である。また、このようなシグナル伝達は、一般的なストレスに対する応答では、数秒後に開始され、その後数十秒後に最大を示すことが知られている。そのため、照射後、数秒後からの観察が可能な照射・観察システムが必要となる。このように、単一細胞レベルへの照射、追跡が可能であり、照射細胞および非照射細胞を区別して追跡が可能なマイクロビーム細胞照射装置による照射実験と画像取得・解析が必須である。

本研究では神経回路への入力と伝播について、単一細胞レベルでの放射線応答の詳細を調べることで、放射線に対する神経回路全体の応答パラダイムの理解に貢献できると考えている。

本年度から SPICE 共同利用を開始し、マイクロビーム照射に用いることのできる薄膜の中から神経細胞培養に最適な膜の検討を行い安定的に培養可能な条件を得ることができた。そのシステムを用いて、マイクロビーム照射により照射神経細胞の活性化と周辺神経細胞の活動低下との2つの現象がカルシウムイメージングにより示唆されたことを報告する。単一神経細胞へのマイクロビーム照射が与える影響の広がりについても解析をしているところであり、今後も詳細に調べていく。

a 東京慈恵会医科大学再生医学研究部

b 放医研研究基盤センター放射線発生装置技術開発課

c 放医研分子イメージング研究センター

Chromothripsis の生成機構の解明

○数藤由美子、穂山美穂、平井百樹（緊急被ばく医療研究センター 生物線量評価研究チーム）、小西輝昭（研究基盤センター 研究基盤技術部）、稲澤譲治、小崎健一、村松智輝、森下真紀（東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子細胞遺伝学）

【研究の概要】

がんの全ゲノムシーケンス解析により、新たなゲノム構造異常として chromothripsis（染色体粉砕）が発見された（Campbell et al., 2011）。一度のイベントで染色体局所領域に数十から数百ものゲノム再配列が起きる現象で、がんの予後不良と相関するが、生成機構は不明である。その生成には、DNA 二重鎖切断を起こす局所的ストレスの関与、例えば電離放射線の曝露による局所的 DNA 傷害と小核の形成が否定できない。本研究では、3 年間の共同研究によって、chromothripsis 生成機構における「DNA 二重鎖切断 → 小核出現 → chromothripsis 生成」axis 成立の可能性を明らかにすることを旨とする。

平成 25 年度は、遺伝的同一性をもちながらゲノム不安定性に差異を認めるがん細胞株単一コロニー由来のペア細胞（親株・亜株）に電離放射線を局所照射して DNA 二重鎖切断によるゲノム不安定性を誘発した。それぞれの株につき、SPICE を用いた陽子線照射（3.4 MeV、100 粒子/cell）によって約 6000 細胞の照射に成功し、20 コロニーをピックアップしてクローニングを行い、現在、増殖中である。平成 26 年度以降、細胞遺伝学的解析とゲノム解析を行う。

放射線抵抗性癌細胞株におけるヘテロクロマチン及び ユークロマチン領域での DNA 修復に関する研究

佐藤 克俊¹、小西 輝昭²、小林 亜利紗²、及川 将一²、今井 高志¹、下川 卓志¹

1 放医研・重粒子医科学センター国際重粒子医科学研究プログラム

2 放医研・研究基盤センター

1. 研究の目的

本研究では、ヘテロクロマチン領域における DNA 修復について着目し、我々が樹立した放射線抵抗性がん細胞株の DNA 修復能の亢進の原因を明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 実験方法と材料

マウス扁平上皮がん細胞株 NRS1 及び NRS1 細胞を元に樹立した X 線及び炭素イオン線抵抗性がん細胞株 NRS1-X60A3 (A3) を用いた。培養液として 10 % FBS 含有 DMEM を用いた。照射 1 日前、SPICE 照射用の細胞培養ディッシュ（直径 30mm、マイヤーフィルム厚 2.5 μm ）に 5.0×10^4 個の細胞を播種した。照射 1 時間前に 1 μM の Hoechst 33342 を培養細胞に投与し、核を染色した。照射直前、細胞培養ディッシュから培地を除去し、培養細胞の乾燥防止のためその上に厚さ 2.5 μm のマイヤーフィルムを被せて照射を行った。

照射には核子あたり 3.4 MeV の陽子線を用いた。Hoechst 33342 により染色された細胞核を指標として照射部位を設定した。照射部位は細胞核内とし、1 箇所あたり 50 カウントの陽子を 3 μm 間隔で 5 箇所に対し照射を行った。

照射終了直後、30 分後、2 時間後に細胞を 4 %パラホルムアルデヒドで固定し、その後 γ -H2AX 及びヘテロクロマチン構成タンパク質である HP1 β に対する抗体を用いた免疫蛍光染色を行って DNA 二本鎖切断 (DSB) 部位及びヘテロクロマチン領域を可視化した。

3. 結果

図.1 に NRS1 及び A3 細胞における γ -H2AX 及び HP1 β フォーカスを示す。HP1 β と γ -H2AX フォーカスの明確な共局在は確認できなかった (図. 1A)。しかし、照射直後、30 分後、2 時間後ともに γ -H2AX フォーカスの周辺に存在する HP1 β フォーカスが両者において検出された (図. 1B)。また、両者における γ -H2AX フォーカスの大きさを測定したが、違いはなかった (図. 1C)。

4. 考察

本研究では HP1 β と γ -H2AX フォーカスの共局在は検出することができなかった。その

原因としてヘテロクロマチンにおける DNA 損傷の修復方法にある可能性が考えられる。ヘテロクロマチン領域に起きた DSB 部位は照射約 3 分から約 40 分後までにヘテロクロマチンの周辺に移動し、その後 Rad51 が関与する相同組換えにより修復されることが報告されている (Chiolo I., et al., Cell, Vol. 144, 732-744, 2011.)。本研究ではこの過程全体は確認できなかったが、HP1 β と γ -H2AX フォーカスの隣接は検出できた。これはヘテロクロマチン領域における DNA 修復を評価するためには、さらに照射後早期の解析を行う必要があることを示唆している。今後、観察方法や実験条件を最適化しなければならない。

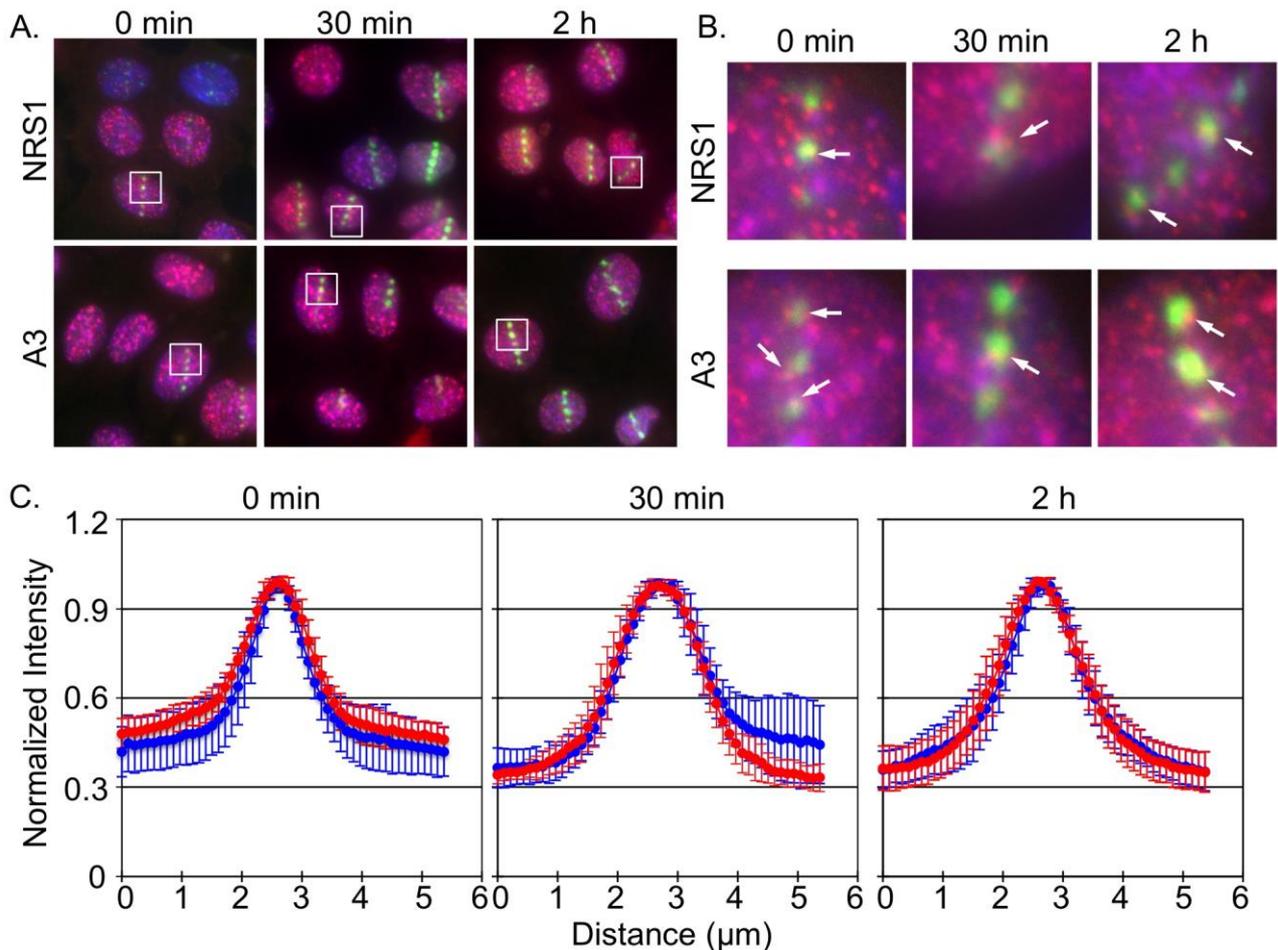


図. 1 陽子線照射後の HP1 β 及び γ -H2AX の局在を (A) に示す。HP1 β 、 γ -H2AX 及び細胞核をそれぞれ赤、緑、及び青で示す。(A) の四角の領域を拡大した図を (B) に示す。(B) の白矢印は γ -H2AX フォーカスの周辺に HP1 β フォーカスが存在する部位を示す。照射後の γ -H2AX フォーカスの大きさの分布を (C) に示す。蛍光強度は各フォーカスにおける最大強度により正規化した。NRS1 及び A3 細胞における蛍光強度をそれぞれ青及び赤線で示す。

Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation. (S13-PB01)

Sejal DESAI¹, Alisa KOBAYASHI², Teruaki KONISHI², Masakazu OIKAWA², and Badri N. PANDEY¹

Abstract:

We reports on radiation induced bystander effect with relevance to cancer radiotherapy especially investigating the bidirectional and criss-cross bystander communications between cancer and normal cells are limited. In this study employing co-culture approach, we have investigated the bystander cross-talk between A549 lung cancer and WI38 normal cells after proton-microbeam irradiation using γ -H2AX foci fluorescence as a measure of DNA double-strand breaks (DSBs). We observed that in A549-A549 co-cultures, irradiated A549 cells exert damaging effects in bystander A549 cells, which were found to be mediated through gap junctional intercellular communication (GJIC). However, in A549-WI38 co-cultures irradiated A549 did not affect bystander WI38 cells. Rather, bystander WI38 cells induced inverse protective signaling (rescue effect) in irradiated A549 cells, which was independent of GJIC. On the other hand, in response to irradiated WI38 cells neither of the bystander cells (A549 or WI38) showed significant increase in γ -H2AX foci. The observed bystander signaling between tumor and normal cells may have potential implications in therapeutic outcome of cancer radiotherapy.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture:

A549 (human lung adenocarcinoma cells) and WI38 (human lung normal fibroblasts) were obtained from ATCC, and cultured in D-MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and antibiotics (100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin) at 37°C in 5% CO₂/95% air. A day before irradiation, cells were labelled with 4 μ M cell tracker orange and mixed with unlabelled A549/WI38 cells in a 1:1 ratio. A total of 1 \times 10⁵ cells were seeded and were at

confluent phase at the time of the irradiation.

Proton microbeam-irradiation:

Thirty min before irradiation, all the cells (CTO labelled/unlabelled) in a dish were stained with 1 μ M Hoechst 33342. The nuclei of the CTO labelled cells were selectively irradiated (500 protons/nucleus) with proton microbeam at room temperature (RT) using SPICE-NIRS microbeam as described previously [1]. In some cases, prior to irradiation, the cells were incubated for 2h with a non-toxic concentration of 0.1 mM lindane to inhibit GJIC. In all the experiments, the sham-irradiated control cells were processed similar to the test cells, except microbeam irradiation.

γ -H2AX immunofluorescence staining:

At different post-irradiation time points, the cell monolayers in the culture dishes were fixed in 4% paraformaldehyde and immunostained against γ -H2AX with the anti-phospho-Histone H2AX (Ser139) clone JBW301 antibody and Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) secondary antibody. Cells were washed with PBS, and images were acquired.

Calculation of fluorescence intensity and statistical analysis:

The intensity of γ -H2AX foci fluorescence per nucleus of irradiated and bystander cells were calculated using MacBiophotonic ImageJ software. On an average, 500 cells were scored for each group and the data are presented as mean \pm SD.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Bystander communication between irradiated A549 cells and their bystander A549 or WI38 cells:

A549 cells were irradiated whereas A549 or WI38 cells were kept bystander cells. Our results showed that the γ -H2AX foci fluorescence intensity per nucleus of irradiated A549 cells co-cultured with A549 cells increased significantly with time,

reaching maximum at 3h post-irradiation, which decreased subsequently at later time point. Interestingly, in case of A549 cells co-cultured with bystander WI38 cells, γ -H2AX foci intensity per irradiated A549 nucleus was found to be significantly lower in magnitude. These results suggest that bystander WI38 cells attenuated the proton-induced DNA damage in A549 cells, which is in agreement with a few recent reports describing rescue/protective bystander effects.

Further, A549 and WI38 cells, which were bystander to microbeam irradiated A549 cells were analyzed for γ -H2AX foci formation. Interestingly, we found that irradiated A549 cells induced significant γ -H2AX foci formation in bystander A549 cells (particularly at 3h post irradiation) but not in WI38 cells, exhibiting damaging communication from irradiated cancer cells to bystander cancer cells but not to bystander normal fibroblast cells. This observation may have significant implications in clinical situations wherein it may be possible to get enhanced tumor regression even if only a region of tumor is irradiated, owing to propagation of damaging signals among the bystander cancer cells.

Bystander communication between irradiated WI38 cells and their bystander WI38/A549 cells:

We performed another set of experiments by targeting WI38 cells, keeping WI38 or A549 cells as bystander cells. Moreover, the γ -H2AX foci intensity per irradiated WI38 nucleus at any given time point did not show significant difference as to whether the targeted cells were co-cultured with WI38 or A549 cells, suggesting absence of inverse signaling from bystander A549 cells to irradiated WI38 cells. Also, unirradiated WI38 and A549 cells that were bystander to irradiated WI38 did not show significant γ -H2AX foci formation, which suggests an inability of irradiated WI38 cells to induce harmful bystander response in WI38 or A549 cells under given set of experimental conditions. The observed poor/insignificant damaging effect exerted by proton microbeam irradiated normal fibroblasts

on bystander fibroblasts could be of clinical significance during cancer radiotherapy as any inevitable irradiation to normal fibroblasts would not result in additional significant side effects owing to bystander cross talk.

To understand the mechanism(s) underlying the observed differential bystander signalling from irradiated A549 to bystander A549 cells (damaging) and from bystander WI38 to irradiated A549 cells (protective), we studied the role of GJIC in this phenomenon by using lindane to block GJIC.

CONCLUSIONS:

In this study, using a co-culture and proton microbeam irradiation approach, we demonstrated a bidirectional RIBE between lung cancer and counterpart normal fibroblasts. Irradiated A549 cells exerted adverse response in bystander A549 cells through GJIC, whereas bystander WI38 cells induced protective inverse-bystander response in irradiated A549 cells independent of GJIC. These results improve our current understanding about radiation induced bystander cross-talks in cancer radiotherapy scenario.

ACKNOWLEDGEMENTS:

SD would like to acknowledge DAE Graduate Fellowship Scheme, Department of Atomic Energy, Government of India, Homi Bhabha National Institute, Mumbai and Centre for International Co-operation in Science (CICS), Chennai and for financial support. BNP would like to acknowledge UICC-ICCET fellowship for financial support. This work was also supported by JSPS KAKENHI Grant Number 25861137.

Reference:

- [1] Konishi T, et al. J Radiat Res **2013**;54: 736–47.
- [2] Desai S, et al, Mut. Res., (*under revision*)

1 Bhabha Atomic Research Centre, Mumbai 400 085, India

2 National Institute of Radiological Sciences, Chiba, 263-8555, Japan

Roles of DNA repair and MAPK pathway in the bystander responses induced by organelle target irradiation (S13-SC01)

Chen Dong¹, Wenzhi Tu¹, Teruaki Konishi², Alisa Kobayashi², Yukio Uchihori², Tom K Hei³, Chunlin Shao^{1*}

Abstract

Proton irradiation is one of the most important concerns in the cancer risks of space flight. Applying the advantage of microbeam irradiation, this study investigated the characteristics of nuclear irradiation and cytoplasmic irradiation induced bystander effects (RIBE) on lung cells MRC-5, especially the roles of MAPK and DNA repair. It was found that both nuclear IR and cytoplasmic IR could induce bystander DNA damage together with the generation of intracellular ROS. These RIBEs and ROS induction were eliminated by either filipin or JNK siRNA. On the other side, the role of DNA repair capacity in RIBE was also explored by co-culturing the particle irradiated CHO cells with nonirradiated population of CHO, EM-C11 (SSB repair deficient), or XR-C1 (DSB repair deficient). For both nuclear IR and cytoplasmic IR, the extra MN formation were only observed in EM-C11 and XR-C1 cells but not CHO cells. Our results disclose that cytoplasm plays a role as important as nucleus in RIBE where MAPK and DNA repair are involved.

Background

Proton is the most abundant species and hence is an important irradiation source in space. It has been estimated that on the Russian Space Station, a single lymphocyte in an astronaut can be traversed by one proton every 12 days. Under this irradiation condition, 'non-targeted' effects such as the bystander response may have increased significance in cancer risk evaluation. It has been known that bystander signaling can lead to a series of cellular responses including cell death, chromosomal damage, genomic instability, mutations, gene expressions, and carcinogenesis. Our previous studies have shown that both nuclear irradiation and cytoplasmic irradiation can induce bystander responses, however so far, the characteristics of nuclear irradiation and cytoplasmic irradiation are still not clear. Accordingly, this work focuses on the novel mechanism of microbeam radiation induced bystander effects, especially, the roles of DNA repair and MAPK in it.

Results

The bystander effect induced by nuclear or cytoplasmic irradiation

Within a population of 10000 MRC-5 cells, 1, 10, and 100 cells were targeted with the precise number (25, 50, 100) of protons, which dose equivalent is 5.7 mGy/cell/proton. Figure 1 illustrates that the yield of MN of MRC-5 cells was increased after both nuclear and cytoplasmic traversals. Differentially, the MN yield increased with both numbers of delivered protons and targeted cells when the cell nucleus was

irradiated. But for cytoplasmic irradiation, the bystander MN was almost independent on the radiation dose as well as the number of irradiated cells. In both irradiation situation, 10 cells with 50 proton hits each was effective in the induction of bystander responses, and hence they were chosen for the following mechanism study.

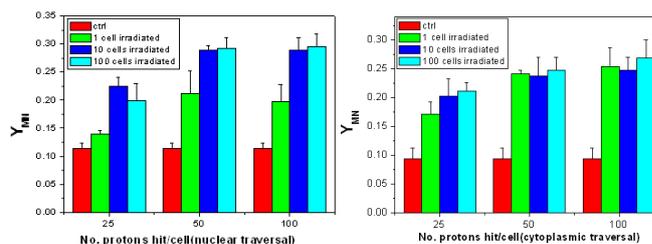


Fig. 1. MN formation in MRC-5 population partially irradiated with precise number of protons through cell nucleus or cytoplasm.

The function of cell membrane in RIBE

To verify the function of cell membrane protein in the RIBE, the cells were treated with filipin, a disturber of membrane rafts, 2 h before irradiation. It was found that, after this filipin treatment, the MN formation was significantly reduced in both nuclear and cytoplasmic irradiation, indicating the important role of cell membrane in the bystander effect.

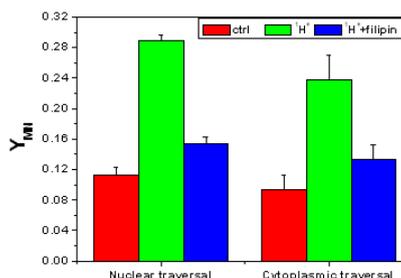


Fig. 2. Nuclear or cytoplasmic traversal-induced MN formation in the MRC-5 population with or without filipin treatment.

The function of MAPK pathway in RIBE

To know whether MAPK pathway contributes to the bystander effects induced by nuclear or cytoplasmic irradiation, MRC-5 cells were interfered with three kinds of siRNA, namely ERK, JNK and p38 siRNA, respectively. Figure 3 shows that, with respect to nuclear irradiation, the formation of bystander MN was obviously decreased by JNK siRNA and slightly reduced by p38 siRNA but was not influenced by ERK siRNA. With respect to the cytoplasmic irradiation, the RIBE was not significantly influenced

by these three siRNA, indicating the cytoplasmic irradiation induced bystander effect was independent of MAPK.

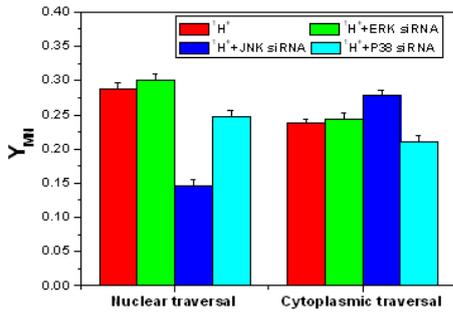


Fig. 3. Nuclear or cytoplasmic traversal-induced MN production in the MRC-5 cells transferred with a MAPK siRNA.

ROS were involved in the RIBE

Figure 3A illustrates that ROS level was induced immediately after nuclear irradiation and its yield increased rapidly to a maximum level at 2 h after irradiation and then decreased gradually to the control level after 6 h post-irradiation. When the cells were treated with filipin, the ROS level was measured again 2 h after irradiation. It could be seen that for both nuclear and cytoplasmic irradiations the ROS levels were effectively eliminated (Fig. 3B). Moreover, in the siRNA transferred cells, the ROS level in the population with nuclear irradiated cells was reduced by JNK siRNA but not by others (Fig. 3C). In addition, the ROS level after cytoplasmic irradiation was not altered by these siRNA treatments.

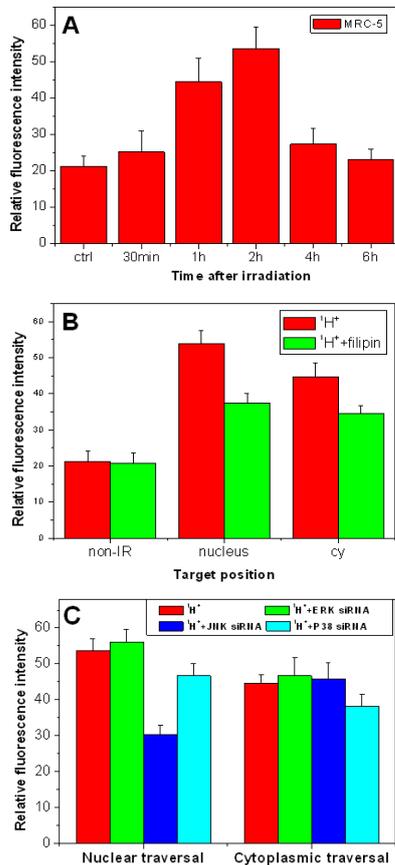


Fig. 4. (A) Time-response of ROS generation after nuclear irradiation. (B, C) The influence of filipin or MAPK siRNA in ROS generation after nuclear and cytoplasmic irradiation.

The influence of DNA repair on RIBE

Three kinds of CHO cells were applied for this investigation. 10 or 100 CHO-9 cells in a population with 10000 cells were traversed individually through either nucleus or cytoplasm with 100 protons each cell. Then nonirradiated CHO-9, EM-C11 (SSB repair deficient), or XR-C1 (DSB repair deficient) cells were co-cultured with the irradiated CHO-9 cells. Figure 5 sees that the yield of MN was increased in the bystander cells of EM-C11 and XR-C1. No bystander effect was observed in CHO-9 itself. Consistent with MRC-5 cells, the extent of bystander responses in DNA repair deficient cells were also similar no matter of nuclear and cytoplasmic irradiation.

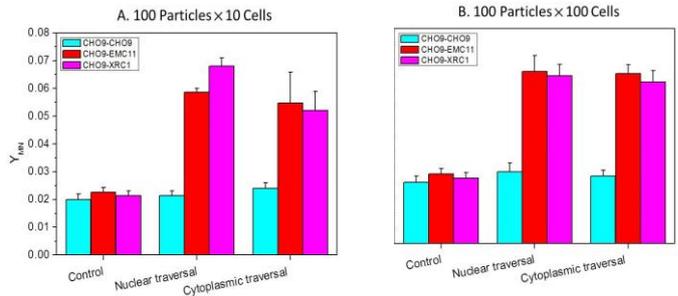


Fig. 5 Nuclear or cytoplasmic traversal-induced MN production in the bystander cells

Conclusions

Nuclear irradiation and cytoplasmic irradiation could induce similar bystander responses, which may have relationship with DNA repair capacity. Radiation-induced ROS generation in a JNK-dependent manner was involved in the RIBE.

¹Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai, China.

²Department of Technical Support and Development, Fundamental Technology Center, NIRS, Chiba, Japan.

³Columbia University, USA.

*Corresponding to: clshao@shmu.edu.cn

Activation of NRF2 In Normal Human Lung Fibroblast WI38 By Targeted Irradiation With Proton Microbeam In NIRS

(S13-WJ01)

Jun WANG^{1,2}, Teruaki KONISHI^{2,3}, Alisa KOBAYASHI^{2,3}, Masakazu OIKAWA³,

Tom HEI^{3,4}, Yukio UCHIHORI^{2,3}

Abstract:

Production of reactive oxygen or nitrogen species (ROS, RNS) are the key event involved in ionization radiation induced DNA damage in directly irradiated and non-irradiated, bystander mammalian cells. It has also been reported that extra-nuclear irradiation resembles biological effects of nuclear-traversed irradiation and ROS is a key mediator of the process. Targeted cytoplasm irradiation also led to micronuclei formation in bystander cells and scavenger of nitric oxide fully eliminated radiation induced Bystander effects.

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is an important regulator of cellular oxidative status. Upon exposure to an increase in oxidative stress in vivo, Nrf2 translocates into nucleus and transcriptionally controls the expression of genes containing antioxidant responsive element (ARE) upstream of their promoter to reduce cellular oxidative stress. The targets of Nrf2 include GST, heme oxygenase 1 (HO-1), thioredoxin, GPx and so on. In some circumstances, activation of NRF2 and its targets will confer resistance of cells to DNA damage inducers. As a pivotal regulator of antioxidant response, it remains unknown whether the Nrf2 will be activated in cells exposed to cytoplasm or nucleus targeted irradiation. Furthermore, if NRF2 is activated, what are its roles? Based on the points mentioned above, the present research was performed to detect whether Nrf2 will be activated in cytoplasm/nucleus of microbeam targeted cells. The following is a brief summary of the experiments completed in NIRS of FY2013.

Materials and Main Experimental Steps

1) *Cell line and cell culture*: the cell line used in this work is normal human lung fibroblast WI38 which was

purchased from ATCC. WI38 was cultured in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS plus 100mg/mL streptomycin and 100U/mL penicillin under a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C.

2) *Experimental Steps*:

We have followed the standard protocol of SPICE dish preparation and irradiation procedure mentioned previously by Konishi T et al.[1] Briefly, the dishes were treated with 1µg/ml fibronectin dissolved in PBS for 30mins at 37°C. 1ml WI38 suspension was plated into the dish (the WI38 density was about 15000cells/ml) and was then cultured for 48hours.

3) *Immuno-fluorescence detection of NRF2*:

Cells were fixed with -20°C methanol and blocked with 0.1% BSA in PBST (PBS-0.1% Triton X-100) at room temperature for 2 hours. Then Anti-NRF2 (Abcam ab31163, 1:200) primary antibody, diluted in block buffer, was added to dish and the samples were incubated in 4 centigrade overnight. After that, samples were washed with PBST. Alexa Fluor 488 conjugated secondary antibody (Invitrogen) diluted in block buffer was added and were incubated for 2 hours at room temperature. The cell images were captured under the offline microbeam fluorescence microscope. The fluorescence intensity if nucleus was analyzed with Image J software.

Results

Both cytoplasm targeted and nucleus targeted proton irradiation promoted the nuclear transfer of NRF2

Firstly, the cytoplasm and nucleus of WI38 were targeted with 500 protons respectively. 24 hours later, the nuclear transfer of NRF2 was analyzed by IF staining (Fig1) and image analysis. Fluorescence intensity analysis showed that compared to the non-irradiated WI38, the nuclear fraction of NRF2 in both the

cytoplasm targeted and the nucleus targeted cells increased, indicating the nuclear transfer of NRF2 took place. The fluorescence intensity of cytoplasm targeted cells and nucleus targeted cells are 1.27 folds and 1.19 folds to that of the non-irradiated cells.

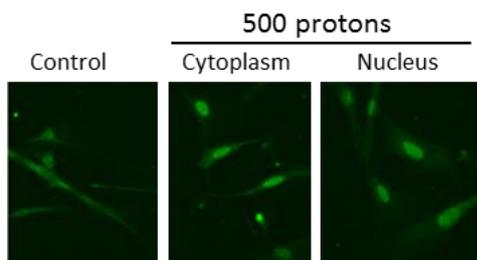


Figure 1. Cytoplasm or Nuclues of WI38 were targeted with 500 protons. 24h later, NRF2 was detected by IF.

Post radiation time on the nuclear accumulation of NRF2 with Cytoplasm and Nucleus targeted cells.

To determine the post radiation time on the nuclear transfer of NRF2, WI38 were cytoplasm targeted and nucleus targeted with 500 protons respectively and then incubated. At 0, 3, 6, 12 and 24 hour time points, samples were fixed and kept for IF staining. The most significant accumulation of NRF2 in nuclear area was observed at 24h time point for cytoplasm targeted radiation and 12h time point for nucleus targeted radiation. We then calculated the ratio of nuclear NRF2 fluorescence to whole cell NRF2 fluorescence to reflect its nuclear accumulation at different time points. As to cytoplasm targeted with 500 protons, the ratio of nuclear NRF2 to total NRF2 increased with post radiation time extension within 24 hours, from 20% at 0h to 52% at the 24h point. At 3h time point, no significant nuclear accumulation of NRF2 was observed. For nucleus targeted cells, a slight but significant increase in nuclear accumulation of NRF2 was observed. And the accumulation continued to increase to 12h time point. The ratio of nuclear NRF2 to total NRF2 increased from 18% at 0h time point to 49% at 12h time point. But different from that observed in cytoplasm targeted cells, at 24h time point, this ratio decreased to a level similar to that observed at 6h time point.

Dose dependency of the NRF2 nuclear transfer with cytoplasm and nucleus targeted cells

WI38 were cytoplasm targeted and nucleus targeted with 0, 5, 100, 500 and 1000 protons respectively and then incubated. Nucleus targeted samples were collected 12 hours, and cytoplasm targeted samples were collected 24 hours after radiation for analyzing the dose response of NRF2 nuclear transfer. At our tested doses, as to cytoplasm targeted radiation, 100, 500 and 1000 protons stimulated the nuclear transfer of NRF2. And the rate rose with the increase of the amount of proton. For nucleus targeted irradiation, 100 and 500 protons stimulated the nuclear transfer of NRF2. When the proton dose increased to 1000, the level of nuclear NRF2 was lower than that of non-irradiated cells. A shared feature for both cytoplasm targeted and nucleus targeted groups was that 5 protons led to unstable results.

NRF2 was significantly activated by 50 uM tBHQ

tBHQ is a type of chemical activator of NRF2. By immuno-fluorescence staining, we confirmed that pre-incubation of WI38 with 50 uM tBHQ 16hours before irradiation resulted in significant activation of NRF2. The tBHQ treatment condition is useful for next experiment to indirectly study the cytoprotective role of NRF2 in WI38 with cytoplasm targeted by protons.

Future Plans

Further investigation on the roles of NRF2 will be investigation on the following terms. HO-1 level, 2) effect of ERK 1/2 inhibitor U0126 on the induction of NRF2 and HO-1, 3) activation of NRF2 by tBHQ, which is an activator for NRF2 will alleviate cytoplasm and nucleus targeted radiation induced cell death.

Reference:

[1] Konishi T, et al., J Radiat Res, **2013**;54:736–47.

*1*Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Chinese Academy Of Science, PR China, *2*Space Radiation Research Unit, International Open Laboratory, NIRS, Japan, *3*Research, Development and Support Center, NIRS, *4* Columbia University

NASBEE 関連課題

中性子照射した歯牙のインビボ EPR 信号の測定

山口一郎（国立保健医療科学院），佐藤 齊（茨城県立医療大学），
川村 拓（茨城県立医療大学），濱野毅（放医研），須田充（放医研），吉井裕（放医研）

1. 研究目的

放射線災害や原子力事故時のトリアージを行う際の一手段として、放射線照射で歯牙に生成される安定なフリーラジカル(CO³⁻)をEPR (electron paramagnetic resonance) により測定し、被曝量を推定する手法が検討されている。本研究では、非破壊的に行う L band 測定法の可能性を検討する。L band EPR 法では、これまでγ線について応答特性が評価されてきているが、実際のトリアージでは中性子被ばく線量についても検討が求められる。また、価値のある試料を調べる際には非破壊的な検査が望まれる。そこで、本研究では、歯牙のインビボ EPR 測定の中性子応答特性を調べることを目標とする。

2. 研究内容：(1)放医研のNASBEE中性子照射場にて、約100μmのAl₂O₃:C粒子に⁶LiFを25μm程度コーティングした素材を用い⁶Li(n,α)³Hにより中性子を検出するチップをナノドットのフォルダにはめ込んだ中性子用OSL (Optically Stimulated Luminescence) 線量計と通常のOSL線量計を用いポリエチレンの表面からの深さごとの、熱中性子線量とガンマ線量を測定した。(2)歯牙試料に中性子を照射しL bandでEPR信号を計測した。

3. 研究結果：(1)ポリエチレン内の熱中性子とγ線の計測結果を図1に示す。ピーク位置は3-4cmで、入射面に比べると空気吸収線量の大きさは約7倍程度であった。ピーク位置においてγ線の線量は中性子のその約6%であった。(2)中性子を照射した歯牙のEPR信号の測定結果を図2に示す。線量に依存し信号が増加していたが150kV (Al:0.5mm, Cu:0.1mm)で発生させたX線に比べると応答は約6分の1程度であった。中性子照射歯牙でのEPR信号の由来として混合しているγ線の影響は無視できないが、γ線の寄与のみでは説明は困難であった。

4. 今後の研究予定

(1) 歯牙のEPR信号の大きさから関心領域の組織吸収線量の質のよい推計法の確立を目指し、来期は中性子のスペクトル評価を計画している。(2)歯牙のEPR信号は測定部位のエナメル質の量にも依存することが今年度の検討で確認され、シミュレーション計算の結果が裏付けられている。測定の質を向上させるためにEPR信号に影響を与える因子の解明に取り組む。また、歯牙以外の試料の活用の可能性について探索を進める。

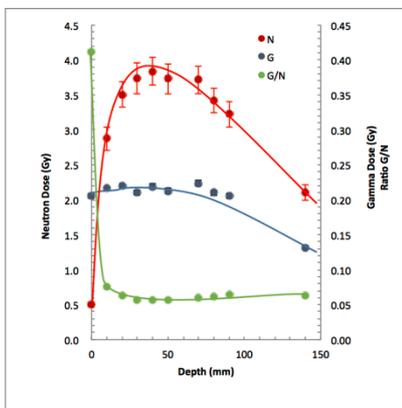


図1. ポリエチレン内の中性子とγ線の線量

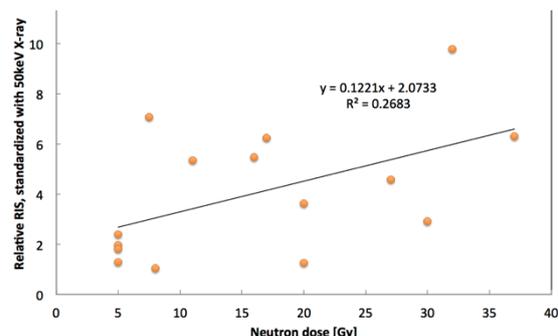


図2. 歯牙に照射した中性子の線量とEPR信号の関係

**低線量影響実験棟におけるマウス 50%致死線量（LD50/30）を
指標とした中性子線の RBE
（課題名：狭心症治療薬(SNP)の被ばく時緊急救急処置薬への実証研究）**

柿沼志津子^A、上野渉^B、鶴岡千鶴^A、尚奕^A、谷修祐^A 萩原拓也^{CB}、須田充^B、酢屋徳啓^B 小久保年章^B、島田義也^A

A: 放射線防護研究センター発達期被ばく影響研究プログラム

B: 研究基盤センター研究基盤技術部

C: 株ネオス・テック

背景・目的 発達期プログラムでは、低線量影響実験棟のガンマ線および NASBEE をもちいてガンマ線、中性子線によるマウスの被ばく時年齢依存性について解析した。これまでに、放射線照射後の寿命短縮率を指標にした研究結果から、子ども期の被ばくは成体期に比べてリスクが大きいことが明らかになってきた。一方、動物実験の生体影響の指標のひとつとして半致死量 [Lethal Dose, 50% (LD₅₀)] がある。特に中性子線は、発生装置によってエネルギー等の物理学的なファクターが異なるため、NASBEE における半致死線量を提示することが、放射線による生体影響の実験を行うための目安として有用である。また、半致死線量は、放射線の線質や動物の種類だけでなく、被ばく時年齢や飼育環境によっても異なることが予想される。そこで、低線量影響実験棟における中性子線及びガンマ線での 1 週齢及び 7 週齢マウスの 50%致死線量 (LD50/30) を算出し、各週齢のガンマ線に対する中性子線の生物学的効果比 (RBE: Relative Biological Effectiveness) を求めた。本研究は、中性子線発生装置技術開発課、生物研究推進課及び発達期プログラムで協力して行った。

実験方法 日本チャールス・リバー(株)より購入した B6C3F1/Crlj(7 週齢♂) 192 匹 (1 群 12 匹の 16 群)、妊娠マウスから得られた同系統の新生仔 (1 週齢♂♀) 833 匹 (1 群 16~9 匹の 64 群) に、中性子線 (1.7Gy-3.8Gy) 及びガンマ線 (6.0Gy-8.5Gy) の予想される半致死線量を全身照射後、30 日間飼育観察し半致死線量を決定した。

実験結果 1 週齢の LD50/30 を示す線量は、ガンマ線、中性子線共に雌雄差は認められなかった。また、1 週齢はどちらの放射線においても 7 週齢に比べて放射線感受性を示した。さらに、中性子線の RBE は、7 週齢に比べて 1 週齢で大きい値となり、1 週齢が中性子線により感受性であることが示された。この様に、放射線発がん・化学発がん研究でよく用いられている B6C3F1 マウスにおける被ばく時年齢による違いを明らかにした。また、LD50/30 を指標とした RBE は、寿命短縮を指標とした RBE より、小さい値になることがわかった。詳細は、発表にて報告する。

Ptch1 遺伝子ヘテロ欠損マウスにおける中性子線誘発脳腫瘍の研究

鶴岡千鶴、尚 奕、甘崎佳子、坂入しのぶ、上西睦美、柿沼志津子、島田義也
 発達期被ばく影響研究プログラム

近年、放射線治療や検査の普及により、小児が医療の場において被ばくをする機会が増えている。放射線治療においては、強度変調放射線治療（IMRT）、陽子線治療、重粒子線治療が盛んに行われるようになった。そこで、問題となっているのが腫瘍周辺部正常組織への低線量放射線（中性子線）や陽子線・重粒子線による影響である。中性子線は電磁波放射線に比べ生物効果が高く、放射線治療を受けた後に生じる二次がんが問題となっている。しかし、これら中性子線による小児期における被ばく影響に関する基礎データは不十分である。そこで本研究では、生物学的効果比の高い中性子線における小児の発がん影響を明らかにするため、放射線感受性の脳腫瘍発生モデルである *Ptch1* 遺伝子ヘテロ欠損マウスを用い、中性子線誘発脳腫瘍の被ばく時年齢依存性及び γ 線に対する生物学的効果比を算出することを目的とした。

平成 23 年度後期から平成 25 年前期の 2 年間、マシンタイム計 40 日間を受け、表 1 に示す被ばく時年齢に中性子線の照射を行った。また、比較対象として γ 線の照射においても実施した。現在、照射が終了したマウスの終生飼育を行い、健康状態の悪化を認めたマウスより解剖及び病理診断を行っている。本報告では、中性子線及び γ 線照射後に発生した脳腫瘍の発生頻度について報告する。

表：被ばく時年齢と線量

被ばく時年齢	中性子線 線量 (Gy)				γ 線 線量 (Gy)			
			0.1	0.5			0.1	0.5
胎齢 14 日								
胎齢 17 日			0.1	0.5			0.1	0.5
生後 1 日齢	0.025	0.05	0.1	0.5	0.05	0.1	0.2	0.5
生後 4 日齢		0.05	0.1	0.5			0.1	0.5
生後 10 日齢			0.1	0.5				0.5

ポリマーゲル線量計を用いた中性子線量測定

川村拓¹⁾、濱野毅²⁾、佐藤斉¹⁾、須田充²⁾、吉井裕²⁾

1) 茨城県立医療大学

2) 放射線医学総合研究所

ポリマーゲル線量計(ゲル線量計)はゼラチンやアクリル酸などを配合した化学線量計であり、大部分が水で構成されているため、人体組織等価型の線量計として、様々な線量測定に応用が期待されている。作製時に任意の容器に入れることにより、様々な形状の線量計が作製可能である特徴を有し、3次元線量計として放射線治療分野をはじめ多分野への応用が期待されている。

従来、放射線治療はX線や電子線を用いた治療が行われてきたが、最近では陽子線治療や炭素線治療が先進医療として行われており、加えて中性子を用いたホウ素熱中性子捕捉療法もありつくば国際戦略総合特区の一つのプロジェクトの一つとして現在臨床研究等が行われている。

本研究では、ホウ素中性子捕捉療法への応用を念頭に置いて、ゲル線量計を用いた中性子分布の線量評価法について基礎的検討を行うことを目的とする。現状においてゲル線量計における中性子線量測定は初期的な検討がされているのみであり、今後十分な検討が必要であると考え。中性子の線量測定法は中性子サーベイメーターや固体飛跡検出器を用いた手法により行われており、簡易的に分布を測定できるには至っていない。本研究課題の成果報告により、ゲル線量計を用いてより簡便にかつ効率的に中性子線量測定が可能となれば、中性子線量の把握がより効率的に可能となるものと考え。

今回は①ゲル線量計の中性子線量応答性の検討、②ゲル線量計を用いた中性子深部線量測定についての検討を行った。本研究方法として、ゲル線量計作製および中性子照射、ゲル線量計線量評価の手順で実施した。ゲル線量計にはMGS社のBANG kitを使用し、キッ



図1. 中性子照射実験配置図

(①中性子線量応答性に関する検討 天板上にゲル線量計を配置し、周囲にファントムを配置した図)

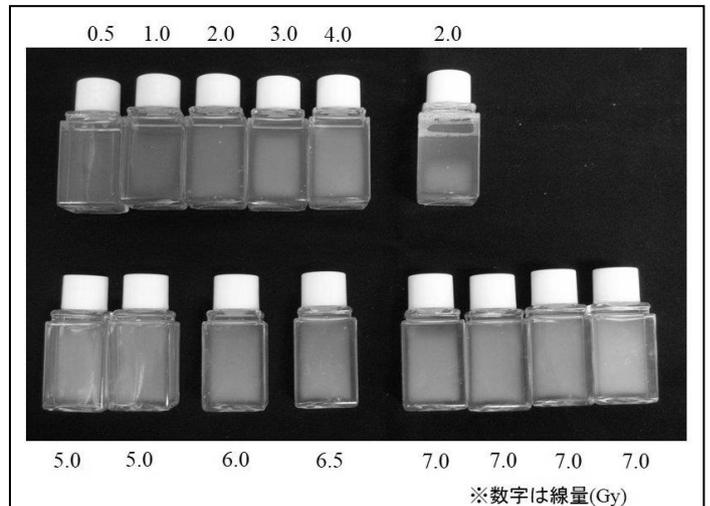


図2. 中性子照射後のゲル線量計の視覚的变化

(ゲル線量計に中性子照射することで重合反応を起こし、白濁が認められる。さらに線量増加とともに白濁が強くなっている様子が確認できる)

トを加熱し、必要な試薬を配合し、PET 容器に入れ、冷却固化することによりゲル線量計作製を行った。

中性子照射には NASBEE の 4MeV 中性子線をゲル線量計に対して照射した。照射配置の様子を図 1 に示す。①中性子線量応答性の検討では、照射は各ゲル線量計に対して、0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 6.5 7.0Gy の照射を行った。②深部線量測定についての検討では各ゲル線量計に対して、2.0 3.0 5.0 8.0Gy の照射を実施した。照射数日後、MRI 装置にてゲル線量計のスピンスピン緩和速度 (R_2 , 1/s) を測定した。

結果について以下に示す。①ゲル線量計の中性子線量応答性については中性子照射により、ゲル線量計は重合反応を生じ、視覚的に白濁変化を示した(図 2)。中性子照射による照射線量とゲル線量計の R_2 との間には直線の応答性が見られ(図 3)、ゲル線量計による中性子線量測定は可能である事を示した。

さらに②中性子深部線量測定についての検討での結果を図 4 に示す。各照射線量とともに 2~3cm 深さまでビルドアップを示し、その後深度が大きくなると R_2 は減少する傾向が見られた。

本研究では、ゲル線量計の中性子線量応答性を行い、線量計と中性子線量応答の間に直線関係を確認することができた。また、深部中性子線量測定を実施し、深さ方向の測定を行うことができた。

今後、現状の結果を詳細に検討するとともにさらなる基礎検討を実施する予定である。

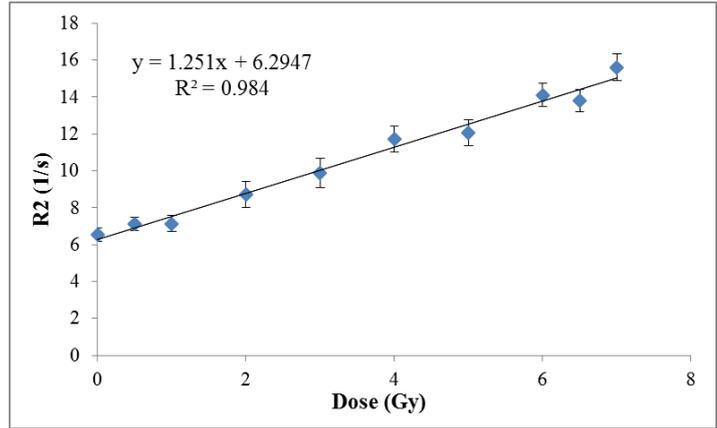


図 3. 中性子線量応答性の結果(横軸に中性子照射線量、縦軸にゲル線量計の評価値である R_2 の線量応答)

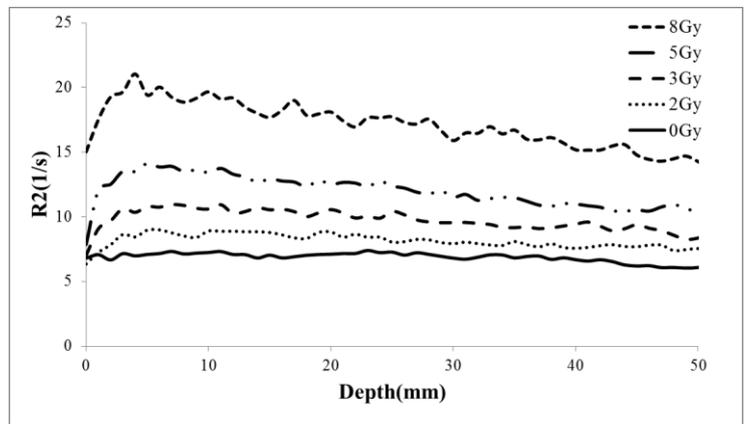


図 4. 深部中性子線量測定の結果(横軸に中性子深さ、縦軸にゲル線量計の評価値である R_2 の応答関係)

《平成 25 年度 第 4 回共用施設 (PASTA&SPICE、NASBEE) 共同成果報告会・報告書 編集事務局》

国立研究開発法人 放射線医学総合研究所

研究基盤センター研究基盤技術部

放射線発生装置技術開発課

石川 剛弘

事務局連絡先 e-mail: infopixe@nirs.go.jp

ホームページ <http://www.nirs.go.jp>

《編集発行》

国立研究開発法人 放射線医学総合研究所

研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課

〒263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1

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

平成 25 年度 放射線医学総合研究所
第 4 回共用施設(PASTA&SPICE、NASBEE)共同成果報告会・報告書
2015 年 10 月発行

印刷 (株) エイ・エフ・エイ

©2015 国立研究開発法人 放射線医学総合研究所

Printed in Japan

NIRS-M-280

