

令和 2 年度
共用施設(PASTA&SPICE、NASBEE、X/ γ 線照射装置)
成果報告書

**2020 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 2 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	5
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元素の動態解析	7
20PJ09	田中 泉	ウラン細胞内動態に関する研究	11
20PJ04	吉富 友恭 (武田 志乃)	PIXE 分析法による通し回遊魚の体内元素分布・局在の解析	13
19PJ05	上原 章寛	マイクロ PIXE による生体内元素の簡易測定法の検討	15
19PH01	及川 将一	静電加速器棟(PASTA&SPICE)の高度化技術開発	19
19PJ08	丸山 敦 (及川 将一)	江戸時代の古書籍に漉き込まれた毛髪の PIXE 分析	23
20PJ10	藤代 瞳 (武田 志乃)	腎臓内元素動態に関する研究	27

SPICE 関連課題

			報告書ページ
19SJ01	小西 輝昭	マイクロビーム細胞照射装置 SPICE のリサーチ&デベロプメント (R&D)	31
20SJ02	小西 輝昭	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	35
18SJ04	大澤 大輔	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	39
18SJ05	小林 亜利紗	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	41

PIXE 関連課題

ウラン体内動態に関する検討： 尿細管損傷回復期の腎臓内元素分布解析

課題番号(19PJ02)

○武田 志乃^a、薬丸 晴子^a、上原 章寛^a、

田中 泉^a、及川 将一^b、石原 弘^a

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

腎臓は体内で代謝された内部被ばく核種の再吸収・排泄を担う器官であり、しばしば毒性標的ともなるため、内部被ばく線量評価における重要器官の一つである。ウランを高濃度に含む地下水を飲用した症例では腎毒性が生じること[1, 2]から、量子ビームを利用した腎臓ウラン動態解析を進めている。

これまでの酢酸ウラニルを投与したラットの急性腎毒性モデルの解析では、放射光マイクロビームによる蛍光 X 線分析(マイクロ SR-XRF)により、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[3, 4]や、ウラン濃集部の X 線微細構造法(XAFS)による化学形解析によりウランの酸化状態の変化が示されている [5, 6]。またマイクロ PIXE によりウラン濃集部の元素組成は、ウラン単独に近いタイプとリン・カリウム共存タイプがあり、ウラン濃集部形成は一様ではないことが示された[7]。

本年度は、ウラン標的的部位である S3 尿細管の新生が盛んな新生期ばく露後の急性腎障害回復期を中心に、腎臓ウラン蓄積領域のリン・カリウム等の内因性元素の分布解析を行った。

酢酸ウランを 0.5 - 4 mg/kg の割合で新生ラット(1 週齢)に背部皮下に投与し、経日的に解剖して腎臓サンプルを得た。腎臓横断面の凍結切片(10 μm 厚)をポリプロピレン膜に付着させ、専用ホルダーに設置、測定試料とした。隣接切片は PAS 染色を行い、尿細管構造の把握および S3 尿細管を特定した。髄質から皮質外辺部までの領域についてまず 500 μm \times 500 μm 毎のイメージングを行い、さらに 250 μm \times 250 μm の詳細イメージングを行った。ビーム径は 1 μm \times 1 μm 、積算電流は 0.2 μC とした。

これまでの我々のラットでの検討では、新生期ウランばく露による急性尿細管損傷は成体に比べ軽度であるが、SR-XRF によるウラン分布解析によると、ウラン投与後 2 週間以降の尿細管損

傷回復期においても、成体の場合と同様に S3 尿細管の分布する腎臓髄質外辺部領域でウラン濃集部が残存していた。このようなウラン残存領域と PIXE イメージングを対応させると、高用量群においてカルシウムや鉄などの局在が観察された。成体ラットではこのような元素局在部にウランが高濃度に共存していたことから、新生期ウランばく露症例についても今後ウラン含量を調べる予定である。また、自家蛍光等を利用して、元素局在部周辺の組織変化についても検討を行っている。

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 16H02971 の補助を受けた。

参考文献

- [1] P. Kurttio *et al.*, *Environ. Health Perspect.* 110: 337-342, 2002.
- [2] H. S. Magdo *et al.*, *Environ. Health Perspect.* 115: 1237-1241, 2007.
- [3] S. Homma-Takeda *et al.*, *J. Appl. Toxicol.* 33: 685-694, 2013.
- [4] S. Homma-Takeda *et al.*, *J. Appl. Toxicol.* 35: 1594-1600, 2015.
- [5] K. Kitahara *et al.*, *J. Synchrotron Rad.* 24: 456-462, 2017.
- [6] S. Homma-Takeda *et al.*, *Radiat. Phys. Chem.* 175: 108147, 2020.
- [7] S. Homma-Takeda *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* 20: 4677-4687, 2019.

イオンビーム育種研究への元素分析の有効性の検討

課題番号(20PJ03)

○下川卓志^a、黒澤ふき^{a,b}、富永晃好^c、坂本裕一^d

a:量研機構 量子医科学研究所 物理工学部

b: 東邦大学大学院 理学研究科 生物分子科学専攻

c:静岡大学 農学部 地域フィールド科学教育研究センター

d: 岩手生物工学研究センター 生物資源研究部

報告書本文

本課題は、解析指標の多様化による重粒子線(重イオンビーム)育種研究の推進を目的として、HIMAC 共同利用で進められている育種と変異誘導研究における変異株の評価手法としての検証を行っている。HIMAC 共同利用研究では開始初期より育種研究が行われており、現在は 3 課題においてイオンビーム育種研究が実施されている。これまでに花色変異を含む幾つかの変異体を得られており、その表現型や遺伝子変異の解析が徐々にではあるが進んでいる。

花の色や細胞の抗酸化能など、植物や微生物の生命現象においても多様な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。放医研の有する PIXE による解析技術は、元素濃度を 2D マッピング可能であり、分解能や検出感度といった解析能力はとても高い。重イオンビームを用いた変異誘導と 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において、新たな視点での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方向性の多様化を進めることが可能となると考えられる。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)、菌類など育種研究対象となる園芸作物を主に用いてきた。

今年度は前期 2 回、後期 4 回の解析 MT を配分していただいたが、残念ながらそのうち 2 回は諸々の理由によりキャンセルとなった。残り 4 回の MT を利用して、主に菌類などの元素マッピングを行った。

菌類の対象とした実験では、実験条件毎に測定するサンプルが出来るため、1 実験での測定サンプル数が多くなった。1MT あたりの解析枚数が6 スキャン前後のため、今年度の解析では、それぞれの解析対象に対して複数回の MT を用いて 1 実験分の解析を実施した。

昨年度 HIMAC J501 課題で獲得された変異株を解析した根粒菌に引き続き、今後の照射対象となっている菌根の解析を行った。根粒菌に比べ、サンプルサイズが小さいため、至適な条件の検討に数回 MT を利用したが、最終的には菌根の内外における取り込まれた金属元素が元素毎で異なる局在を示すことが明らかになった。

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。各元素の分布に違いは認められなかったが、培養条件による取り込み量の変化、及び株毎の違いを明らかにすることが出来た

今年度の解析では、菌類に限った解析となったが、PIXE の持つ元素分布の高い分解能と定量性により変異株の特性や、金属の集積している特異的部位の同定に成功することができた。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。2020 年度は、コロナ渦における活動と移動が制限されていることもあり、HIMAC 共同利用および PIXE での育種サンプルの解析が少なかった。しかし、コロナ終息後を見据え、解析依頼や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

課題番号(19PJ06)

○沼子 千弥^a、薬丸 晴子^b、武田 志乃^b、及川 将一^c

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

環境には普遍的にウランを含む物質が遍在しており、生物は常にこれらの物質を取り込む可能性がある。ウランが環境から生体内に取り込まれると、腎障害を起こすことが知られており、武田は長年、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、ウランの腎障害の機序について研究を進めている。この中で、ウラン投与ラットにおいて、腎臓について硬組織である骨にウランの蓄積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も見いだしており、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に対してマイクロ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に関する研究をはじめた。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。

測定には幼齢期ラットの肋骨の4、5、6番目の肋骨の胸骨接合部から5 mm～10 mmの部分を用いた。肋骨の横断面の凍結切片(10 μm厚)を作製した。凍結切片の作製は川本法[1]により行った。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て薄切した。組織はフィルムに付着しており、これを測定用金属ホルダーに付けてPIXE分析用の試料とした。肋骨のPIXE測定は吉田らのラット大腿骨測定条件[2]を参考に行った。すなわち、1 μm × 1 μmのビームを用い、1000 μm × 1000 μm～100 μm × 100 μmの領域を積算電流0.2 μCでスキヤニングした。元素イメージングは隣接切片のヘマトキシリン-エオシン染色と対応させた。

カルシウム、リンは共に肋骨横断面の中心部周辺で多く、中心部と周辺部にはほとんどなかった。中心部のカルシウム、リンの不在領域は生後 22 日より生後 36 日の方が拡大しており、成長とともに分布状態が変化していることが分かった。カルシウムとリンの分布は $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ の詳細イメージングでもよく一致しており、その化学形や結晶性についても現在検討を行っている。

参考文献

- [1] 川本忠史、病理技術 72 巻 2 号リン.76-83, 2009
- [2] 吉田峻規ら、X 線分析の進歩 50, 313-319, 2019.

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きました。どうもありがとうございました。

令和 2 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元素の動態解析

課題代表者: 沼子 千弥

学位論文

1. 飯田 徹

Ni-Zn 層状水酸化物塩のリン酸吸着能に関する研究

千葉大学 大学院 (修士論文)

ウラン細胞内動態に関する研究:PIXE シングルセルイメージング

課題番号(20PJ09)

○田中 泉¹、藤代 瞳²、葉丸 晴子¹、田中 美香¹、横地 和子¹、阿山 香子¹、
上原 章寛¹、石原 弘¹、及川 将一¹、武田 志乃¹

¹量研機構 放射線医学研究所 ²徳島文理大学

内部被ばく低減化のため、放射性核種の効果的排出が重要となる。ウランの場合は、ばく露後速やかに尿中へ排泄されるものの、腎臓尿細管にて再吸収され尿細管において高濃度ウラン濃集部を形成し残存することがこれまでの先行研究で明らかとなっている[1, 2]。しかしながら、ウランの細胞への取り込み・排泄機構は十分に理解されていない。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[3-5]。これらの細胞を用いて細胞内ウラン分布を把握することで、ウラン尿細管動態特性の解明につながるのではないかと考えた。

そこで本研究では、近位尿細管領域由来培養細胞を用い、ウランの尿細管動態特性の解明に取り組む。今年度は、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の確立を行った。

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 3×10⁵ 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 24 時間培養した。PBS で洗浄後冷メタノールで固定し、PIXE 測定試料とした(付着タイプ試料)。ポリプロピレン膜を接着しないディッシュで同様にウランばく露細胞を調製、細胞を回収し一部を ICP-MS によりウラン濃度を測定し、残りの一部から凍結切片を作製した(薄切タイプ試料)。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~20 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)。細胞内ウラン量は薄切分析標準[6]を用いて算出した。

対照 S3 細胞の付着タイプ試料のイメージングによると、塩素は細胞全体に、硫黄、リン、カリウムは中央部中心に分布した。ウランをばく露した細胞では、核近傍でリン、カリウムの局在部が生じ、ウランも共存していた。付着タイプ試料では、ビームの照射位置により細胞構造の構成が

異なる。例えば中央部では、ビームは細胞膜から細胞質と核を通過後再び細胞質と細胞膜を通過することになり、細胞中央部で蓄積が観察されても、核なのか細胞質なのか、あるいは細胞表面なのかは厳密には区別出来ない。そこで、細胞内への取り込みを調べるため薄切タイプ試料について細胞断面の元素イメージングを行った。細胞写真と対応させたところリンは核に対応した中央部に分布した。ウランはリン分布の外辺部に集中して検出され、細胞内に侵入したウランが核近傍に蓄積したことが示唆された。薄切分析標準から算出した薄切タイプ試料の細胞内ウラン量は細胞あたり数百 fg であり、ICP-MS によるバルク的なウラン濃度測定結果はこれをよく支持していた。

今後は細胞内の経時的な分布動態を調べ、別種の尿細管領域由来 S1、S2 細胞と比較しウラン尿細管動態特性を明らかにしていきたい。

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] H. Fujishiro *et al.*, *Fund. Toxicol. Sci.* 6: 117-123, 2019.
- [4] H. Fujishiro *et al.*, *J. Toxicol. Sci.* 44, 611-619, 2019.
- [5] H. Fujishiro *et al.*, *Toxics.* 8, 24, 2020.
- [6] S. Homma-Takeda *et al.*, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 279, 627-631, 2009.

PIXE 分析法による通し回遊魚の体内元素分布・局在の解析 —荒川水系黒目川におけるアユの回遊履歴の推定—

課題番号(20PJ04)

○鈴木 享子^a、吉富 友恭^a、及川 将一^b、武田 志乃^b

a:東京学芸大学、b:量研機構 量子生命・医学部門

アユ *Plecoglossus altivelis* は、川と海を行き来する通し回遊魚であり、古くから日本人にとって馴染みの深い魚である。漁業や遊漁の対象として内水面の重要種となってきたが、近年全国的に漁獲量が減少しており、資源管理のための生息状況の把握や産卵場の保全が求められている。本研究では、資源管理に資する基礎知見の蓄積を目指し、荒川水系黒目川において捕獲されたアユの回遊履歴を耳石微量元素分析により推定した。

ストロンチウム(Sr)は淡水より海水の方が 100 倍以上多く含まれており、耳石 Sr 濃度の変化を分析することで生活史を通じた生息場所を推定することができる。本研究では、PIXE を用いて、耳石の中心から縁辺までの Sr 濃度変化をライン分析するとともに、耳石全体の面分析を行い、黒目川アユの回遊履歴を推定した。分析の結果、①耳石中心部付近の Sr:Ca 比が高い領域($6\sim 12\times 10^{-3}$)から低い領域($3\sim 6\times 10^{-3}$)へと変化するパターンと②中心から縁辺まで Sr:Ca 比が大きく変動せず $4\sim 6\times 10^{-3}$ で推移するパターンがみられた。これらのことから、荒川のアユには孵化後河川を流下して降海し海洋で生息した後荒川へと遡上する両側回遊型の個体がいる一方で、海域に流下せずに汽水域を主な生息場所とする個体が存在することが明らかになった。熊野川や四万十川では、海域に移動することなく河口域に残留するアユ仔稚魚が報告されている。アユ仔稚魚が汽水域に残留、生存できる要因には、河口域の地形や河川流量、水温、餌料環境など多くの要素が複合的に関連している可能性が考えられた。

本研究において扱ったサンプル数はごく少数であるため、今後継続してデータを積み重ねる必要がある。また、日齢査定と耳石の微量元素分析を組み合わせることにより、孵化時期や遡上時期などより詳細な生態特性を明らかにすることが望まれる。

謝辞

耳石のサンプル作製と分析には、大山拓朗氏、玉置諒平氏(研究当時の所属:東京学芸大学教育学部)にご協力いただいた。また、静電加速器の運転及び PIXE 分析においては、(株)巧の磯浩之氏、松田拓也氏、樋口有一氏に技術支援をいただいた。ここに記して、感謝申し上げます。

PIXEによる尿中アクチニドの簡易測定法の検討

課題番号(19PJ05)

○上原章寛^a、及川将一^b、田中泉^a、石原弘^a、武田志乃^a

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

福島第一原子力発電所の廃炉作業においてウランをはじめとするアクチニドや核分裂生成物などによる内部被ばくが懸念され、被ばく線量低減化及びモニタリングに関する検討が要求されている。体内のウランは血液を經由して、腎臓から急速に排泄されるため、尿はウランのバイオリジカルモニタリング対象として最適な体液のひとつである。適切な前処理を行うことによって質量分析法による高感度な分析が可能になった。一方、粒子線励起 X 線(PIXE)分析は、河川水中の微量元素分析法として用いられてきた。近年、PIXE にマイクロビームスキャンと組み合わせ、薄片標準サンプルの局所量定量化がマイクロメートルスケールの空間分解能で実行された(μ -PIXE)[1]。これまで申請者らは、模擬アクチニドとしてイットリウムを尿に添加し、元素濃度を Y-K α 線のカウントに基づいて測定した[2]。 μ -PIXE 分析を尿中のウランの定量に適用すれば、試料中のウランの均一性評価、微量ウラン検出につながる。本研究では、 μ -PIXE を用いて体液中のウランを簡便かつ迅速に定量するために、尿滴下試料の特性を評価した[3]。

滴下試料溶液は、尿、硝酸、およびウラン標準液を使用して作成した。ここで、尿と濃硝酸を 1:4 の割合で混合した。厚さ 6 μ m のポリプロピレンフィルム(RIGAKU Co. Ltd. Japan)にテトラフルオロエチレンパーフルオロアルキルビニルエーテル共重合体(PFA, FC-115、ファインケミカルジャパン株式会社、日本)コーティングを施し、ウラン試料 1 μ L を滴下した。尿に硝酸を加えること、PFA コートを行うことで滴の均質性及び粒子サイズの縮小化が可能になった。X 線スペクトル、 μ -PIXE イメージングおよび目的元素の総数の計算は、OMDAQ データ収集システム(Oxford Microbeams Ltd., UK)を使用して行った。元素画像は、Cd-Te 検出器による U-L α 線(12.88 – 14.21 keV)、U-L β 1 線(16.83 – 17.77 keV)の強度データを使用した。陽子エネルギー、積分電流、空間分解能、はそれぞれ 3.0 MeV、0.2 μ C、1 μ m \times 1 μ m である。イメージングの結果から、ウランは元素分布に極端な偏りがなく、ほぼ均一に分布していた。ウランの特性 X 線における最強線は U-L α 線であるが、尿中に存在する Br の K β 線と重なるため、ウランの定量では不向きである

と判断した。ウラン濃度に及ぼす U-Lβ1 線のカウンターの依存性を調べた結果、1 から 50 μg/g の濃度範囲で定量可能であることを示した。また、滴下量に及ぼすカウンターの依存性について調査した結果を図 1 に示す。1、2、5 μL の滴下サンプルをそれぞれ作成し、U-Lβ1 線のイメージング及びカウンティングをプロットした。1 μL ではカウンターの小さいサンプルでも滴下量を増やすことによって検出感度が向上することを示す結果を得た。

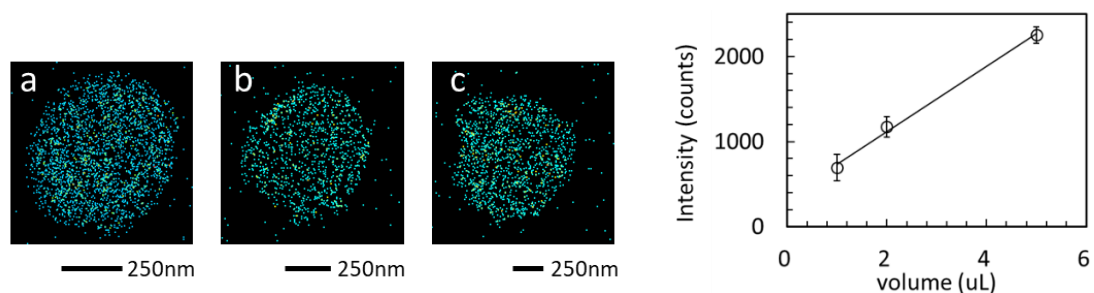


図 1. 50 μg/g U を含む尿滴下試料の U-Lβ1 線イメージング及びカウンティング(a, b, c はそれぞれ 1, 2, 5 μL)。

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] S. Homma-Takeda, et al., Two-dimensional μXAFS for uranium accumulated in kidney of rats exposed to uranyl acetate, *Radiat. Phys. Chem.*, 175 (2020) 108147.
- [2] A. Uehara, et al., Sample Preparation for the Elemental Analysis in Biological Fluids by Micro-PIXE, *Adv. X-Ray. Chem. Anal.*, 51 (2020) 81.
- [3] A. Uehara, et al., Quantitative Analyses of Urinary Uranium by μ-PIXE, *Minerals*, 11 (2021) 147.

令和 2 年度研究成果一覧

課題番号:18PJ05

課題名:マイクロ PIXE による生体内元素の簡易測定法の検討

課題代表者:上原 章寛

原著論文

1. A. Uehara, M. Oikawa, I. Tanaka, H. Ishihara, S. Takeda-Homma, Quantitative Analyses of Urinary Uranium by μ -PIXE, *Minerals*, 11 (2021) 147.

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, 2021-06-25

静電加速器棟(PASTA & SPICE)の高度化技術開発

課題番号(19PH01)

○及川将一^a, 石川剛弘^a, 磯浩之^b, 樋口有一^b, 松田拓也^b

a:量研機構 量子医科学研究所 物理工学部

b:(株)巧

<はじめに>

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[1]。

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(α 粒子)の照射を実現する「SPICE- α 」に関する技術開発を進めている。SPICEにおいては、放射線がん治療における細胞環境や照射条件等を *in vitro* で可能な限り模擬した上で、被照射がん細胞と非照射正常細胞間の放射線誘発バースタンダー効果を明らかにすることを目的とした研究テーマが進められている。当該研究テーマの中で、現状のプロトンより高 LET 粒子を用いた線質効果に関する検討が含まれており、SPICE への $^4\text{He}^{2+}$ イオンの導入が要求されている。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すること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- α の開発状況>

2019 年度に、デュオプラズ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[2]。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~60 nA)にてマイクロビーム形成実験を行った。図に、SPICE ビーム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ー(CaF₂(Eu))上で観察された、5.1 MeV ⁴He²⁺ビームの発光の顕微鏡画像を示す。⁴He²⁺ビームはシンチレーターに入射するまでに、大気取り出し窓(Si₃N₄, t=100 nm)や空気層を透過するため発散を免れないが、そのような状況下にも関わらず図に示す通り直径 10 μm 以下のマイクロビーム形成に成功した。この際の粒子数は 10000 cps 程度であり、概ね細胞照射実験が可能なレベルにまで到達したと考えられる。

次年度以降は、更なる ⁴He²⁺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。

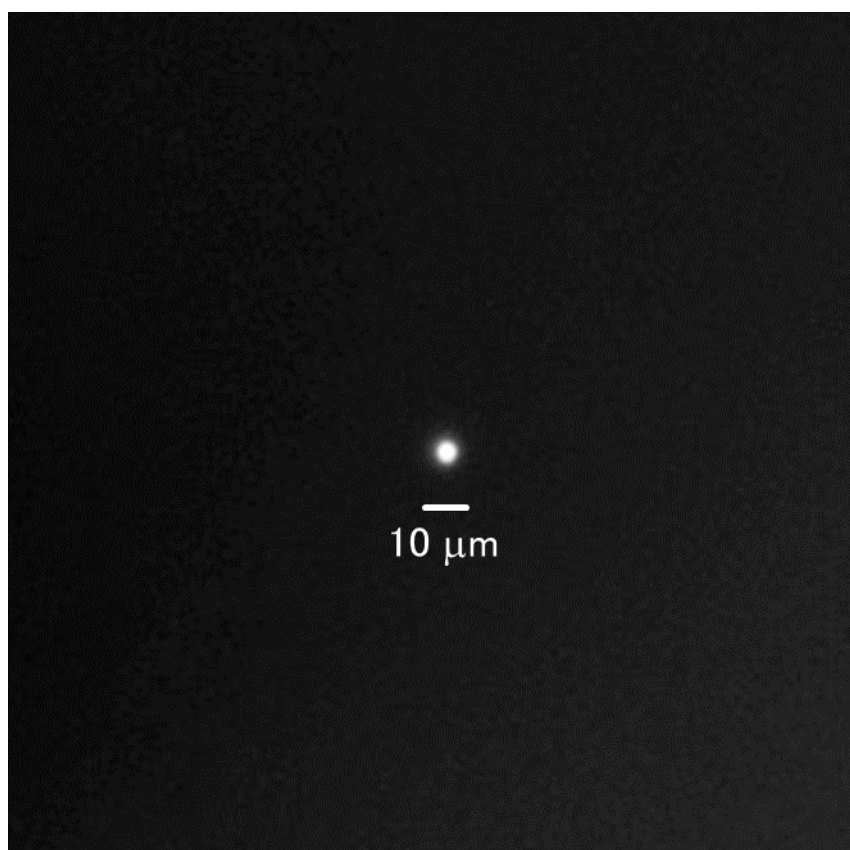


図. ビーム大気取り出し後の細胞照射位置に設置したシンチレーター(CaF₂(Eu))上での 5.1 MeV ⁴He²⁺ビームの発光

参考文献

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

[2] 及川将一, 酢屋徳啓, 石川剛弘, 磯浩之, 樋口有一, 松田拓也, 令和元年度共用施設 (PASTA&SPICE、NASBEE、X/γ 線照射装置) 成果報告書, 5-7, 2021-02.

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^a、及川 将一^b、二ツ川 章二^c、神松 幸弘^d、入口 敦志^e、眞田 裕生^a

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っ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のパIXE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である。その研究では、毛髪のパ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、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に対象を限定した。)。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。執筆段階では、京都刊行の 10 book-set 分、大阪刊行の 10 book-set 分、江戸刊行の 17 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 2 名の現代人の毛髪の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变化があったことを示した。Welch の t 検定で暫定的に 12 微量元素量比較したところ、Na、Mg、K、Ca、Mn、Fe、Cu、Br 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。

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、京都と大阪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、大阪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、体内になくってはならない常量・微量必須元素のほとんどは現代人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

腎臓内元素動態に関する研究： 腎臓内カドミウム分布解析

課題番号(20PJ10)

○藤代瞳^a、田中 泉^b、上原章寛^b、
石原 弘^b、及川 将一^c、武田志乃^b

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

腎臓における核種動態は、内部被ばく核種の体内残存に大きく寄与することから、腎臓の元素の取り込み・排泄機序を明らかにしていく必要がある。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。申請者らの先行研究では、カドミウムの場合、低分子量のタンパクに結合し、近位尿細管 S1、S2 領域においてエンドサイトーシスで取り込まれた後、排泄され、再び 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]。一方シスプラチンやウランの場合は、近位尿細管 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。近位尿細管における元素輸送の元素特異性を明らかにすることは、重金属毒性研究のみならず、内部被ばく核種の体内残存の推定や体外排泄促進による被ばく低減化研究に重要である。

そこで本研究では、動物に尿細管 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、マイクロ PIXE により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を調べることを計画した。また、ウランばく露において内因性のリン・カリウムの濃集部の形成が観察されたことから、リン・カリウム等の軽元素を含む腎臓内内因性微量元素分布の変動を解析し、腎臓内動態の元素特異性を検討する。

本年度は、カドミウム飲水ばく露モデルのマウス腎臓について検討を行った。10 μm 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 μm × 1 μm、積算電流 200 μC の条件で、まず 500 μm × 500 μm の広領域での

スキャンを行った。さらに同領域に対し 250 μm \times 250 μm の詳細なスキャンを行った。薄切分析標準(0 – 500 $\mu\text{g/g}$)[4]による定量分析を行い、カドミウムの検出感度を調べた。

腎臓の平均カドミウム濃度は 32 $\mu\text{g/g}$ であったが、S1、S2 近位尿細管が分布する皮質領域でもカドミウム局在を検出できなかった。薄切分析標準によると同条件下でのカドミウム検出下限は 170 $\mu\text{g/g}$ であり、分析領域においてウランのように 2000 $\mu\text{g/g}$ を超えるような高濃度濃集部の形成[5]が生じていないことも考えられた。腎臓内カドミウム局在を詳細に調べるためには、測定条件の改良や高投与モデルの検討が必要と考えられた。一方、皮質から髄質外辺部にかけてのリン、カリウム分布は尿細管に対応した均質的な分布となっており、リン・カリウム濃集部は確認されなかった。引き続き、ばく露量やばく露後の経時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.*, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 279, 627-631, 2009.
- [5] Homma-Takeda *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* 20: 4677, 2019.

SPICE 関連課題

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)

課題番号(19SJ01)

小西輝昭^a、小林 亜利紗^{a,b}、大澤 大輔^a、及川将一^{a,b}

a:量研 量子生命科学領域シングルセル応答解析グループ

b:量研 放射線医学総合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 μm 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。過去数年を見ても所内、国内のみならず海外研究機関の利用が多数みられることから、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。

さらに、今年度下半期は、静電加速器棟に近接して千葉市道路拡張工事や量子生命科学拠点棟(仮称)の建設のために旧水生舎の解体・撤去工事が開始した。これら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ないように適宜点検調整を行った。

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 mm \times 5 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、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、通常人が触れるところではなく、また、他のステージ部品とは非接触な設計となっている。現在(令和3年度5月末日)、使用不可であり、早急な修理を検討している。

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。

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。

4. SPICE- α 開発

陽子線に加えて、ヘリウムイオン(α 線)ビームの導入を検討した。5.1 MeVの α 線はこれまでの3.4 MeV陽子線の線エネルギー付与に比べて非常に高く、およそ90 keV/ μm 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、 α 線照射実験を実現させるために、 $^4\text{He}^{2+}$ 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。また、ビーム電流が低く、本格的なマイクロビーム形成を行うまでには至っていない。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、荷電変換部棟の整備を継続する。

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 α 線マイクロビーム(SPICE- α)の実現に向けたトライアルを実施する。

令和 2 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

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, 劉 翠華, 廣山 陽太, 及川 将一
先端量子科学技術マイクロビームを活用したシングルセルバイオロジー
量子生命科学会 第 2 回大会, 2020-12-24
2. 小西 輝昭
陽子線マイクロビーム細胞照射装置 SPICE の現状
日本マイクロビーム生物研究会第 11 回連絡会議, 2020-10-14
3. Teruaki Konishi
Advances in microbeam technology for single cell radio-biology
Second International School of Radiation Research (ISRR-2020), 2020-09-13

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

課題番号(20SJ02)

小西輝昭^a、小林 亜利紗^{a,b}、大澤 大輔^a、劉 翠華^{a,c}、及川将一^{a,b}

a:量研 量子生命科学領域シングルセル応答解析 Gr

b:量研 放射線医学総合研究所物理工学部静電加速器運転室

c:量研 放射線医学総合研究所放射線障害治療研究部粒子線基礎医学研究 Gr

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碎と再編成過程(クロモスリプシス)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、クロモスリプシスを抑制する」という仮説の実験的証明である。

まず、今年度は1)細胞致死効果測定のための試料作製法の確立を行った。マイクロビーム照射は、ステージの駆動範囲5mm×5mm内の細胞のみに制限される。そのため、専用細胞皿の中央部分の直径5mm以内の領域のみに細胞を播種し細胞皿中のすべての細胞に照射する必要があった。そこで、細胞が接着しないポリプロピレン膜の中央3~5mmφのみにフィブロネクチンコートすることで、細胞接着領域を制限することで、実現した(図1)。この手法により、HT1080細胞の細胞核のみに照射を行い、2)細胞致死効果を評価するにあたり、細胞核への粒子数に対する生存率測定を行った。また、染色体異常・DNA損傷の指標である3)微小核形成率(MN)測定を行った。

図2Aに生存率曲線を示した。照射粒子数500個までは、指数関数的な減少を示した。生存率を S 、照射粒子数を N として、 $S = \exp(-\alpha \times N)$ でフィッティングを行った結果、平均一致死(生存率37%)に必要な N は218個であった。また、3.4 MeVの陽子線(LET=12 keV/ μm)が平均面積200 μm^2 の細胞核に照射されたとすれば、平均一致死に必要な吸収線量は約2 Gyであった。一方で、1000個の陽子線照射での生存率は $9.3 \pm 0.4\%$ となり、陽子線500個までに見られた生存率の指数関数的な減少に比べて高い生存率を示した。次に、図2Bに照射粒子数に対するMN率の変化を示した。MN形成率は細胞核当たり300個の陽子線照射で極大を示した。

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、MN形成率は減少を示した。これは、陽子線マイクロビームが細胞核内の極一部に限定された領域にのみ線量付与されることから、より修復困難なDNA損傷が誘発され、細胞の二核化率が減少するとともに、その過程で生成されるMN形成率も減少したと考えられる。しかし、致死のターゲットとなる部位への線量付与とならず細胞が生存したとも推測される。つまり、クロモスリプシス生成が微小核とは独立したプロセスをたどる可能性を示唆したと言える。今後、照射された細胞が生存するためのプロセスについて、さらにタイムラプス観察等の手法によって詳細に解析する必要がある。そして、得られたクローンを m-FISH 法による染色体構造解析およびゲノム解析を行い、生存率および MN 形成率とクロモスリプシス形成率との関係性を評価することで、細胞の生存過程の理解が深まると考えている。

【謝辞】本研究課題は、科研費 挑戦的研究(開拓)(20K20636)の助成によって実施されました。

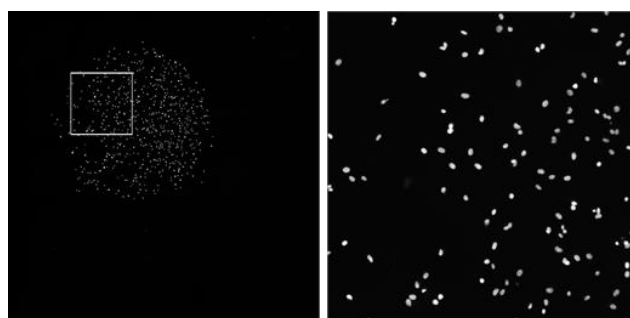


図1 マイクロビーム照射用細胞試料の細胞核蛍光画像。左図は、細胞皿の中央約4 mm×4 mm領域に円状に播種した細胞集団画像。左図は、右図の白枠で示した領域の拡大画像。細胞核はヘキスト33342によって蛍光染色されており、画像中では白色の楕円としてその蛍光が確認できた。

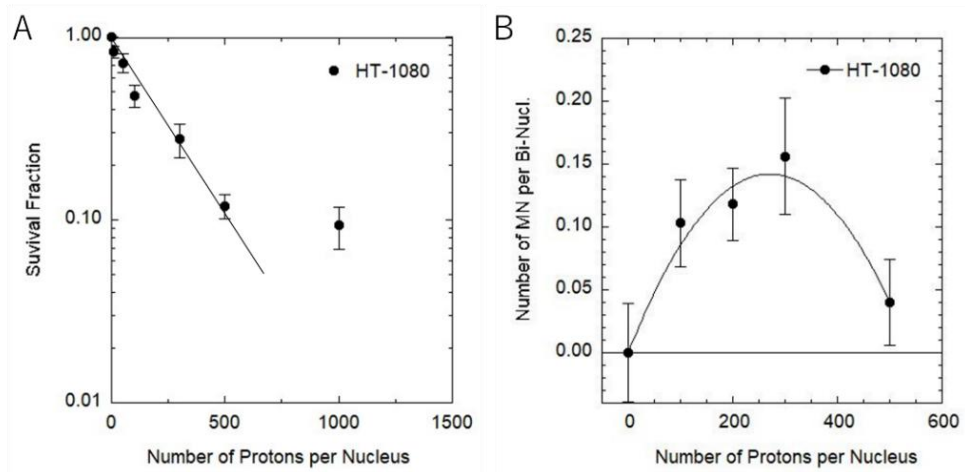


図2 HT1080 細胞の細胞核のみにマイクロビーム照射し、得られた生存率曲線(A)および MN 形成率(B)。

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^a、小林亜利紗^{a,b}、及川将一^b、小西輝昭^a

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 物理工学部 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 mm 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(g-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ブ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 g-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(≥ 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(≥ 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。今後は、複数照射箇所と1カ所当たりの粒子数を変えて蛍光スポット強度・面積の照射後時間依存性を調べる予定である。

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。

Analysis of radiation induced bystander response by COX-2 induction in A549 human lung carcinoma cells

(18SJ05)

○Alisa Kobayashi¹, Yota Hiroyama¹, Daisuke Ohsawa¹, Narongchai Autosavapromporn² Tengku Ahbrizal Tengku Ahmad³, Teruaki Konishi¹

1. QST 2. Chiang Mai University 3. Malaysian Nuclear Agency

Background

It is known that radiation-induced bystander effect (RIBE) regulates radio-sensitivity in vivo and in vitro [1, 2]. COX-2 (cyclooxygenase-2) which is well known as a bystander mediator [3] plays a role in modulating the radio-sensitivity of cancer cells [4]. Also, the radiation-induced bystander effect is known to be induced by two pathways: media mediated inter cellular communication (MMIC), and direct cell-to-cell communication through the gap-junction inter cellular communication (GJIC). However, there are still unclear about the responsible pathway in correlation to radio-sensitivity caused by the bystander effect. Thus, in this study we evaluate the induction pathway and COX-2 involvement in bystander effect which contribute to radio-sensitivity in bystander cells using SPICE proton microbeam irradiation.

Method

We used SPICE proton microbeam to irradiate small fraction (less than 1% of the population) of cells in the cell dish to induce the bystander effect. Cell dishes

were prepared in 4×10^5 cells/dish and 4×10^4 cells/dish, were categorized as high density (HDC) and low-density conditions (LDC). HDC samples were densely plated so that the cells have cell-to-cell contact. On the other hand, LDC samples were sparsely distributed not to have cell to cell contact so that direct cell-to-cell communication through GJIC would be negligible. Twenty-four hours after SPICE irradiation, some samples were used for colony formation, micronucleus assay, and COX-2 detection. The other samples were irradiated with 4.4 Gy (D_{10} : dose for 10% survival) of X-rays for evaluated modulation of radio-sensitivity by colony formation and micronucleus assay.

Colony formation assay: Irradiated and control cells were harvested and plated in triplicate to obtain ~200 surviving cells per dish. After 12 days, cells were fixed and stained with methylene blue. Colonies that contained >50 cells were counted as survivors.

Micronucleus assay: Irradiated and control cells were harvested and seeded with cytochalasin B in triplicate to obtain ~1000 bi-nucleus per chamber. After 60-66 hours, cells were fixed and stained with Hoechst

33342 and acridine-orange prior viewing under a fluorescence microscope.

Western blot analysis: After 24 hours SPICE irradiation, protein lysates were collected with SDS sample buffer. Proteins were then separated by electrophoresis and blotted onto PVDF membrane. Membrane was incubated with primary (COX-2 and GAPDH) and secondary antibody (HRP). Protein bands were visualized using a chemi-luminescence sub-strate.

Result

Colony formation assay:

At HDC, no significant difference was observed in survival rate between 0.07% SPICE irradiated cells and non-irradiated cells (Fig1, white bar). However, the 0.28% SPICE irradiated cells showed significantly lower survival rate than non-irradiated cells. At LDC, 0.07% SPICE irradiated cell showed no significant difference compared to non-irradiated cells. However, the 0.7% SPICE irradiated cells showed significantly lower survival rate than non-irradiated cells (Fig2, white bar).

Subsequently, above SPICE-irradiated cells were irradiated with 4.4 Gy X-rays after 24 hours post SPICE irradiation, and any changes in radiosensitivity due to bystander effect were examined from survival rate analysis. As a result, there was significant increase in 0.28% SPICE irradiated cells compared to non-irradiated cells in confluent condition. On the other hand, at LDC, there was no significant difference between 0.7% SPICE irradiated

cells and non-irradiated cells in the HDC. (Fig1, & Fig2 black bar).

Micronucleus assay:

At HDC, SPICE irradiated cells micronucleation rate is proportional to percentage of irradiated cells in the population, where 0.7% SPICE irradiated cells showed higher micronucleation rate than 0.07% SPICE irradiated cells (Fig3 white bar). However, when above SPICE-irradiated cells were irradiated with 4.4 Gy X-rays 24 hours later, micronucleation rate was significantly decreased in 0.28% SPICE irradiated cells compared to non-irradiated cells (Fig3 black bar). At LDC, only 0.7% SPICE irradiated cells showed an increase of micronucleation percentage compared non-irradiated cells (Fig4 white bar). However, when above SPICE-irradiated cells were irradiated with 4.4 Gy X-rays 24 hours later, no significant difference of micronucleation rate was observed between SPICE irradiated cells and non-irradiated cells (Fig4 black bar).

Western blot analysis:

At HDC, COX-2 expression levels in SPICE-irradiated cells were significantly increased compared to non-irradiated cells (Fig5). However, at LDC there was no significant difference of COX-2 expression levels was observed between irradiated and non-irradiated cells (Fig6).

Figures

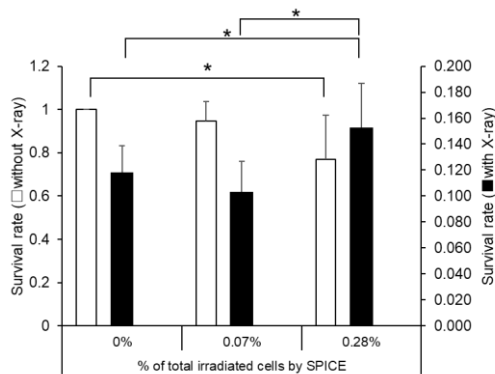


Fig1. Survival rate of SPICE- and X-irradiated cells (HDC) t-test; $P < 0.05$.

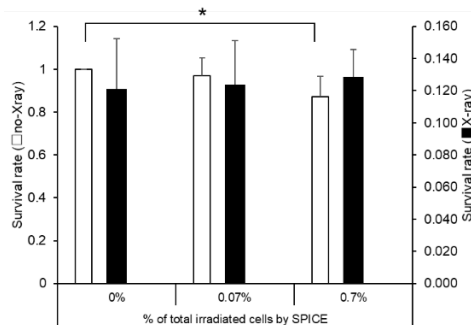


Fig2. Survival rate of SPICE- and X-irradiated cells (LDC) t-test; $P < 0.05$.

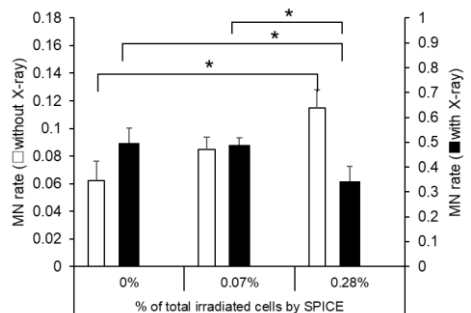


Fig3. Micronucleus rate of SPICE- and X-irradiated cells (HDC) t-test; $P < 0.05$.

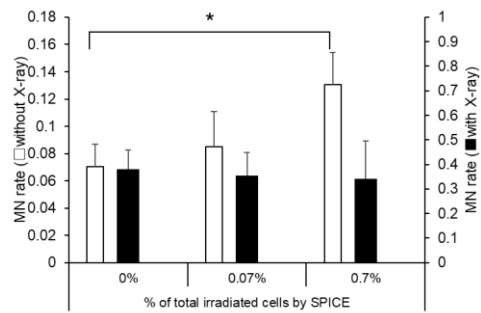


Fig4. Micronucleus rate of SPICE- and X-irradiated cells (LDC) t-test; $P < 0.05$.

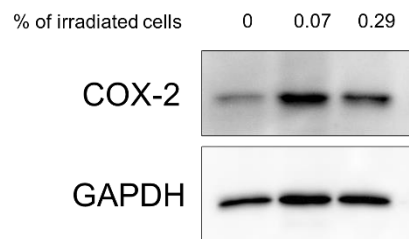


Fig5. COX-2 expression of SPICE irradiated cells (HDC)

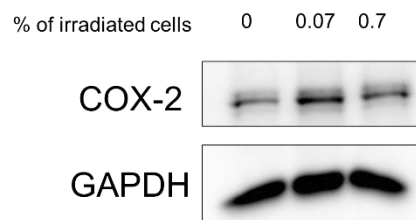


Fig6. COX-2 expression of SPICE irradiated cells (LDC)

Summary

As a result, the sample with only microbeam irradiation, the survival rate decreased and the micronucleation rate increased according to the fraction of cells irradiated with the microbeam in both HDC and LDC. However, COX-2 expression was only seen in HDC. After X-ray irradiation of the LDC, there was no observable difference between those cells

which were exposed to microbeam irradiation and those which were not. However, under HDC, after being irradiated with X-rays, the micronucleation rate decreased and the survival rate increased in the microbeam-irradiated cells. COX-2 has been reported to be involved in cancer cell resistance. From this result, the study showed that the bystander response induces radio-resistance in non-irradiated cancer cells through cell-to-cell contact, and that COX-2 may be involved in the process. However, further studies need to be conducted to clarify this situation.

Acknowledgements

This study was supported in part by a Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) KAKENHI Grant-in-Aid for Young Scientist (20K16744). Operation of Tandem accelerator is carried out by Mr. Masakazu Oikawa and the staff in Electrostatic accelerator facility of NIRS

References

- [1] Matsumoto. H, et al., Biol. Sci. Space **18**, 247-254 (2004)
- [2] Chen. S, et al., Mutat Res **706**, 59-64 (2011)
- [3] Chai et al., Br J Cancer **108**, 91-98 (2013)
- [4] Milas.L, et al.,J Natl Cancer Inst **91**, 1501-1504 (1999)

《令和2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

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2年度 共用施設(PASTA&SPICE、NASBEE、X/γ線照射装置)

成果報告書

2022年7月発行

印刷 (株)エイ・エフ・エイ

©2022 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-36

