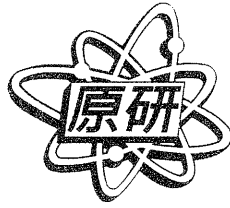


JAERI-Conf
2005-012



JP0550602



第4回イオンビーム生物応用研究ワークショップ論文集
2005年6月22日、高崎研究所

2005年9月

(編) 小林 泰彦・舟山 知夫・和田 成一・浜田 信行

日本原子力研究所
Japan Atomic Energy Research Institute

本レポートは、日本原子力研究所が不定期に公刊している研究報告書です。
入手の問合わせは、日本原子力研究所研究情報部研究情報課（〒319-1195 茨城県那珂郡東海村）あて、
お申し越してください。なお、このほかに財団法人原子力弘済会資料センター（〒319-1195 茨城県那珂郡
東海村日本原子力研究所内）で複写による実費頒布をおこなっております。

This report is issued irregularly.
Inquiries about availability of the reports should be addressed to Research Information Division,
Department of Intellectual Resources, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai-mura, Naka-
gun, Ibaraki-ken 319-1195, Japan.

第4回イオンビーム生物応用研究ワークショップ論文集

2005年6月22日、高崎研究所

日本原子力研究所高崎研究所イオンビーム生物応用研究部

(編) 小林 泰彦・舟山 知夫・和田 成一^{※1}・浜田 信行^{※2}

(2005年7月25日受理)

日本原子力研究所高崎研究所（原研・高崎研）では、イオン照射研究施設（TIARA）のイオンビームを利用したバイオ分野の研究をより一層発展させるため、「イオンビーム生物応用研究ワークショップ」を平成14年度より開催している。本年は、「マイクロビームを用いた生物学研究の新展開 -マイクロサージャリの応用と細胞の放射線応答-」と題して、マイクロビームを用いた細胞の放射線応答の研究及び生物機能解析プローブとしてのラジオマイクロサージャリへの応用について最新の研究成果を報告し、生命科学・バイオ技術分野さらには医学・医療分野へのマイクロビーム応用の将来展望について討議することを目的として、イオンビーム育種研究会、日本放射線影響学会、日本宇宙生物科学会、（社）日本原子力学会関東・甲越支部、（社）日本アイソトープ協会の協賛を得て、第4回イオンビーム生物応用研究ワークショップを主催した。

本ワークショップは、平成17年6月22日、原研・高崎研ベンチャー棟大会議室で開催され、原研、大学、公的研究機関・医療機関、民間会社などから104名の参加があった。原研におけるイオンビーム生物応用研究の概要、国内外のマイクロビーム照射実験施設の現状、マイクロビームを用いた昆虫の生体修復機構の解析研究やバイスタンダー効果の研究などについて最新の成果が報告され、マイクロビームが生物学研究における新しい解析ツールとして非常に有効であるとともに、低線量放射線生物影響の研究や放射線医学応用研究にも極めて重要であることが指摘された。今後、これらの分野におけるマイクロビーム利用研究の一層の進展が期待される。

高崎研究所：〒370-1292 群馬県高崎市綿貫町1233

※1 博士研究員

※2 協力研究員

Proceedings of the 4th Workshop on Ion-beam-applied Biology:

- June 22, 2005, JAERI, Takasaki -

(Eds.) Yasuhiko KOBAYASHI, Tomoo FUNAYAMA, Seiichi WADA^{*1} and Nobuyuki HAMADA^{*2}

Department of Ion-beam-applied Biology
Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment
Japan Atomic Energy Research Institute
Watanuki-machi, Takasaki-shi, Gunma-ken

(Received July 25, 2005)

In order to promote research on biological application using ion beam at TIARA, we have annually hold the Workshop on Ion-beam-applied Biology at JAERI Takasaki since 2002. The 4th workshop entitled "New Frontiers of Biological Research using microbeam - Application to Radio-microsurgery and Cellular Response to Radiations -" was held on June 22nd, 2005, aimed to overview the recent progress in microbeam-applied researches, and discuss the future direction of application of microbeam not to researches in life science and biotechnology, but also to clinical medicine. This workshop was hosted by JAERI Takasaki, with the cooperation of The Ion Beam Breeding Society, The Japan Radiation Research Society, The Japanese Society for Biological Sciences in Space, The Kanto-Kohetsu Branch of The Atomic Energy Society of Japan, and The Japan Radioisotope Association. There were 104 participants including clinicians attended from universities, public research institutions, and private companies.

The papers presented in the workshop were about the ion-beam-applied biological researches at JAERI, the present status of microbeam facilities in Japan and foreign countries, and the microbeam-based analyses of damage repair machinery in insects and radiation-induced bystander effects. It was realized again that microbeam is quite useful for functional analyses by targeted disruption of specific tissues in bio-organisms, and is of critical importance in investigating biological influences of low-dose radiations as well as in its radiological application. These researches using microbeam are expected to further march on.

Keywords: Ion-beam, Microbeam, Radio-microsurgery, Bystander Effects

※ 1 Post-Doctoral Fellow

※ 2 Research Collaborator

目次

1. はじめに	1
2. 講演論文	3
2.1 イオンビームによる生物応用研究の進展	3
2.1.1 イオンビームによる生物機能解析 - ポジトロンイメージング法による 植物機能解析研究の展開 - (松橋信平)	5
2.1.2 イオンビーム育種技術の開発と遺伝子変異の特徴 (田中 淳)	7
2.1.3 原研高崎研の重イオンマイクロビーム利用研究の概要 (小林泰彦)	9
2.2 マイクロビーム照射装置の開発とマイクロサージャリへの応用	11
2.2.1 国内外の生物用マイクロビーム照射実験施設の現状 (今関 等)	13
2.2.2 TIARA の生物用マイクロビームの現状と今後の計画 (舟山知夫)	15
2.2.3 マイクロビームを用いた昆虫の生体修復機構の解析 (深本花菜)	17
2.2.4 線虫神経回路への局部照射と連合学習機能の解析 (坂下哲哉 他)	19
2.3 マイクロビームを用いた細胞の放射線応答研究	21
2.3.1 軽イオンマイクロビーム照射のバイスタンダー効果 (鈴木雅雄)	23
2.3.2 重イオンマイクロビーム照射のバイスタンダー効果 (古澤佳也)	25
2.3.3 細胞膜への局所損傷付与によるアポトーシスの誘導 (和田成一 他)	27
2.3.4 放射光 X 線マイクロビームによる細胞照射効果 (宇佐美徳子 他)	29
2.3.5 植物単細胞への重イオンマイクロビーム照射効果 (横田裕一郎 他)	31
2.3.6 新規 DNA 鎖切断認識蛋白による細胞内 DNA 損傷の検出 (佐藤勝也 他)	33
3. まとめ	35
付録 1. プログラム	37
付録 2. 質疑応答	41

1. はじめに

日本原子力研究所（原研）は、材料・バイオ研究のためのイオン照射研究施設を設置し、その一つとして、約 10 年にわたり、イオン照射研究施設（TIARA）のイオンビームを利用したバイオ技術への放射線利用の研究、植物資源創成の研究、イオンビームによる生物機能解析の研究を進めている。その一環として、AVF サイクロトロンで 10~20 MeV/amu に加速した種々の重イオンビームを直径最小数 μm のマイクロアパーチャーを通して大気中に取り出して顕微鏡観察下の生物試料を狙って局部照射できる重イオンマイクロビーム細胞局部照射装置を開発し、様々な生物学研究への利用を試みてきた。それらは、体外からのマイクロビーム照射で体内器官や細胞を局所的に不活性化できることを利用したマイクロサージャリ技術の応用研究と、マイクロビームで特定の細胞を狙って任意の個数の重イオンを確定的に照射することに注目した放射線影響研究とに大別され、現在、合わせて 17 件の研究テーマが TIARA で進行中である。また、最近、原研以外でも、放射線医学総合研究所（放医研）の軽イオンマイクロビームや高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設（KEK-PF）の放射光 X 線マイクロビームなどが利用可能になり、線質や LET が異なる相補的なマイクロビーム照射実験が日本国内で可能になりつつある。

これらの研究をより一層発展させるため、関連する研究分野の研究者が一同に会し、各施設での状況や研究計画及び最新の成果に関する情報交換を行なうとともに、生命科学・バイオ技術分野さらには医学・医療分野へのマイクロビーム応用の将来展望について討議することを目的として、第 4 回イオンビーム生物応用研究ワークショップを開催した。本ワークショップは、平成 17 年 6 月 22 日、日本原子力研究所高崎研究所（原研高崎研）ベンチャー棟大会議室に於いて、原研高崎研が主催し、イオンビーム育種研究会、日本放射線影響学会、日本宇宙生物科学会、(社)日本原子力学会関東・甲越支部、(社)日本アイソトープ協会の協賛を得て行われ、原研、大学、公的研究機関・医療機関、民間会社などから 104 名の参加があった。まず、原研におけるイオンビーム生物応用研究の概要として、「ポジトロンイメージング法による植物機能解析研究」、「イオンビーム育種技術の開発と遺伝子資源創成研究」、「原研高崎研の重イオンマイクロビーム利用研究の概要」の 3 件の発表があった。続いて、マイクロビーム照射装置の開発とマイクロサージャリへの応用として、「国内外の生物用マイクロビーム照射実験施設の現状」、「TIARA の生物用マイクロビームの現状と今後の計画」、「マイクロビームを用いた昆虫の生体修復機構の解析」、「線虫神経回路への局部照射と連合学習機能の解析」の 4 件の発表があった。最後に、マイクロビームを用いた細胞の放射線応答研究として、「軽イオンマイクロビーム照射のバイスタンダー効果」、「重イオンマイクロビーム照射のバイスタンダー効果」、「細胞膜への局所的損傷付与によるアポトーシスの誘発」、「放射光 X 線マイクロビームによる細胞照射効果」、「植物単細胞への重イオンマイクロビーム照射効果」、「新規 DNA 鎖切断認識蛋白による細胞内 DNA 損傷の検出」の 6 件の発表が行なわれた。

This is a blank page.

2. 講演論文

2.1 イオンビームによる生物応用研究の進展

This is a blank page.



2.1.1 イオンビームによる生物機能解析

- ポジトロンイメージング法による植物機能解析研究の展開 -

生物機能研究グループ 松橋信平

【はじめに】

植物ポジトロンイメージング法は、植物の機能解析研究を進めるために原研が開発した、世界に類を見ないユニークな研究手法である。植物ポジトロンイメージング装置 (PETIS) を用いた計測では、生きた植物内での栄養成分や環境汚染物の動態のリアルタイムでのモニタリングが可能であり、得られた画像データの定量的な解析から、植物内でのものの動きを伴う機能の解析が現実のものとなりつつある。この研究手法を用いて、環境の変化に応答した植物の栄養獲得に関する研究や環境汚染物の植物による吸収動態に関する研究を進めている。

【植物ポジトロンイメージング計測技術の現状】

生体機能を解析するための新しい計測手法として、原研では 1992 年に植物用ポジトロンイメージング装置を試作し、 ^{18}F 水溶液の植物による吸収の画像化試験を開始した。現在は計測視野が $W5\text{ cm} \times H15\text{ cm}$ と $W14\text{ cm} \times H21\text{ cm}$ の 2 台のポジトロンイメージング装置を製作し、植物に重要な環境要因である光、温度、湿度を制御できる育成庫の中での計測を実現している。また、C-11 で標識した炭酸ガス ($^{11}\text{CO}_2$) を植物試料の特定の葉に供給する $^{11}\text{CO}_2$ ガス供給システムの開発し、植物に固有の代謝機能である光合成による産物の動態計測を可能にした。

植物ポジトロンイメージング計測用のトレーサとして、これまでに $^{11}\text{CO}_2$ 、 ^{11}C -メチオニン、 $^{13}\text{NO}_3^-$ 、 $^{13}\text{NH}_4^+$ 、 ^{18}F 、 ^{18}F -グルコース、 $^{48}\text{H}_2\text{VO}_4^-$ 、 $^{52}\text{Mn}^{2+}$ 、 $^{62}\text{Zn}^{2+}$ 、 $^{62}\text{Zn}^{2+}$ 、などの標識化合物の製造技術を開発してきた。また、環境汚染物として注目されているカドミウムのポジトロン放出核種である $^{107}\text{Cd}^{2+}$ の製造技術も開発し、植物実験用に安定した製造が可能となり、生きた植物中でのカドミウムの動態の可視化に成功した。さらに、植物内を移行するタンパク質などの生体分子の機能を明らかにするために、1本の篩管からハロゲン元素核種 ^{76}Br で標識した生体分子を導入し、ポジトロンイメージング計測する研究も進めている。

ポジトロンイメージング計測で得られたデータを元に、植物の栄養獲得機構をより深く理解するためには、ポジトロンイメージング計測データを論理的に解析し、植物の生理的機能の定量的な評価が不可欠である。数理的な解析手法の開発に関する研究を進め、茎中での詳細な栄養成分輸送速度のマッピングへの応用や、輸送経路の組織体積の影響を取り除くための計測・解析技術の開発といった新たな解析を実現しつつある。これらの計測・データ解析手法をさらに発展させることにより、植物の機能に着目したファンクショナル・イメージングが実現できると考えられる。

【炭素・窒素栄養分の輸送・分配の定量的な解析に関する研究】

炭素・窒素は植物の主要栄養素であり、通常炭素は大気中の炭酸ガス (CO_2) を光合成により葉から、窒素は土壌中の硝酸イオンやアンモニウムイオンを窒素同化により根から、それぞれ獲得している。大気中の CO_2 濃度変化への応答研究として、高濃度 CO_2 処理が光合成産物の消費・貯蔵組織への輸送に与える影響の解析をポジトロンイメージング計測とデータの数理的処理により行った。同一植物個体を用いて

光合成を行う葉の CO_2 濃度を変えたところ、高濃度 CO_2 処理が茎中での光合成産物の輸送速度を上昇させる効果を持つことを明らかにした。また、塩ストレスへの応答に関しては、茎径の収縮や光合成速度の低下といった応答に先駆けて、光合成産物の転流阻害応答が最も早く現れることを明らかにした。窒素栄養吸収とのバランスに関しては、光合成産物は硝酸同化のためのエネルギー源あるいは炭素骨格として、硝酸同化作用の高い組織へ優先的に分配されることを示唆するデータが得られている。植物による炭素と窒素の獲得、同化産物の輸送・分配に関して、環境への応答や、同化の制御機構など従来の方法では得られなかった知見の獲得が進んでおり、植物個体中での炭素・窒素栄養の同化・輸送・分配機構の解明への展開が期待される。

【微量金属の養分輸送経路の解明】

鉄、マンガン、亜鉛といった金属元素は、植物が正常な生育、代謝機能を維持するために不可欠であり、これらの金属が不足した場合には栄養障害が起こる。金属元素の吸収機構の解明は、食糧資源確保のために重要である。植物による金属元素の吸収量は、炭素や窒素に比べて少なく、またその移行も遅い。このため、生きた植物中での金属元素の挙動についてはこれまでほとんど知見が得られていない。 ^{52}Fe を用いたポジトロンイメージング計測を行った結果、根で吸収された ^{52}Fe を吸収直後に導管から篩管に積み替え、展開葉を経由せずに直接新しい葉へと送る輸送経路が存在することを明らかにした。この他にも、異なる金属元素間に共通の吸収機構が存在するかといった知見も得られつつある。

【有害汚染物カドミウムの吸収動態計測】

これまで、カドミウムの植物体内における移行を動態として捉えた例は無く、植物による吸収・蓄積の機構も解明されていない。食品中の国際的な濃度基準（コーデックス）が適用されることもあり、汚染されていない安全な食糧を生産する技術や植物により有害物を吸収除去する技術の開発が急務となっている。カドミウムのポジトロン放出核種 ^{107}Cd （半減期 6.5 時間）を用いて、コメの汚染が問題となるイネによるカドミウムの吸収移行のポジトロンイメージング計測を行い、これまでに、穂のついたイネへのカドミウムの移行の画像化に成功している。さらに、植物内での輸送・分配特性の解析を、イネおよびアブラナを用いて進めている。

【植物ポジトロンイメージングを利用した研究の連携】

ポジトロンイメージング計測法を用いて、植物による栄養獲得や環境応答に関する研究を効果的に進めるために、外部研究機関との共同研究を行っている。産学官が連携して研究を進める連携重点研究として、劣化環境に応答した植物の栄養獲得機構に関する研究を、4 大学、1 民間企業、原研の 6 研究グループにより実施している。これ以外に 4 件の共同研究を実施している。

【おわりに】

ポジトロンイメージング技術を用いることにより、従来の研究手法では知ることができなかった植物に関する新しい知見が得られるようになってきた。安全な食糧の効率的な生産や植物による環境浄化技術の実現を目指した研究の展開を図りたい。



2.1.2 イオンビーム育種技術の開発と遺伝子変異の特徴

原研高崎研イオンビーム生物応用研究部
植物資源利用研究グループ

田中 淳

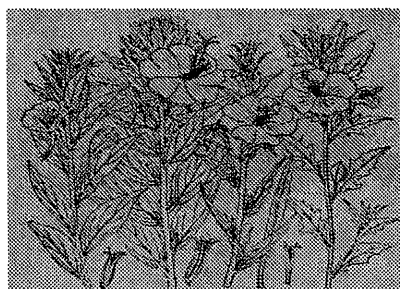
突然変異は遺伝子DNAの誕生に遅れることわずかにして、現在まで絶えず起こってきた生命現象と考えられる。突然変異の誘発原として、放射線や紫外線、化学物質などがよく例として挙げられるが、転移因子や活性酸素なども重要な変異原である。イオンビームは現在の地上にはほとんど到達しないものの、宇宙空間には軽視できない数の高エネルギー粒子が存在している。特に重イオンはそのエネルギー付与がガンマ線などの数十倍～数千倍もあり、致死やDNA損傷などといった生物効果は動物細胞などを用いて古くから調べられてきた。ところがDNAの変異、とくに世代間で継承される遺伝的な突然変異については、イオンビームの影響がガンマ線などと異なるのかどうかについてはほとんど知見が得られていない。

メンデルがエンドウマメの実験で遺伝の法則を発見し、またド・フリースがオオマツヨイグサで突然変異の説を初めて唱えたように、植物は親から子へと遺伝される突然変異を個体や集団で観察することが可能である。私たちは、イオンビームの突然変異誘発への効果を植物を用いて解析することにした。

モデル植物としてゲノム解析が進められていたシロイヌナズナを用いて、分子レベルの解析を行った。炭素イオンビームを照射した場合、誘発突然変異率はガンマ線などに比べて平均17倍高く、誘発される変異は欠失や逆位、転座などの大きな構造変化が生じやすいという特徴が見出された。また、キクやカーネーションなどへの照射では、ガンマ線では得られなかったような新しい花色や花型の変異が高頻度で誘発され、イオンビームはガンマ線などによる変異スペクトルと異なるとともに、変異スペクトルが広いことがわかった。これらの結果として、シロイヌナズナでは植物で初めてとなる紫外線耐性突然変異体の作出を初めとして、紫外線感受性突然変異体や色素蓄積変異体、花びら形態形成変異体など、従来では得られなかった新しい突然変異体を獲得することに成功し、遺伝子の機能解明を進めている。また、イネ、ムギ、タバコなどでは、それぞれ白葉枯・いもち病、縞萎縮病、黄斑えそ病に対する抵抗性品種が作出できており、重要な作物の育種目標の達成にイオンビームが有効であることも明らかとなった。さらに、蔬菜の品種改良や環境耐性・浄化に向けた樹木の品種改良にもイオンビームの利用が開始され、大学や公的研究機関、また民間との共同研究による実用的な品種育成も積極的に進められている。

今後の課題は、より詳細に変異誘発の特徴を解明し、現在までに見出されたイオンビーム育種の特徴と合わせて役立つ技術として進展させることである。最近見出されつつある特徴として、比較的低線量で高頻度に多種類の突然変異体が作出されるということがある。イオンビームによるDNAの変化は大きいものの、変

異箇所は非常に少ないと考えられ、特定の変異形質のみが誘発される、いわゆるワンポイント育種が可能らしいというものである。事実、これを証明するかのような結果がキクで見出されつつある。一方、培養系への照射では、照射当代であたかも劣性ホモのような形質が見られている。そのメカニズムは、体細胞分裂時における相同組換えが誘起されるためか、あるいはメチル化などエピジェネティックな現象によるものかは明らかではないが、学問的に非常に興味深いとともに、育種的にも役立つものである。また、イオンビームによる変異誘発は染色体レベルの大きなDNA構造変化を伴うというものであれば、遺伝子一個の変異ではなく、ゲノムレベルの変異誘発という新たな可能性も拓けて行くかもしれない。疑問や興味は尽きなく、今後の進展が待たれるばかりである。





2.1.3 原研高崎研の重イオンマイクロビーム利用研究の概要

原研高崎研イオンビーム生物応用研究部

バイオ技術研究グループ

小林 泰彦

はじめに

重イオンビーム（重粒子線）は、加速器を用いて発生させる電離放射線であるが、①物体中での直進性が高く、マイクロビーム化することによって微小領域に限定した局部照射が可能、②ブラッグピークとして現れる特徴的な深度線量分布を示し、照射深度の厳密な制御が可能、③X線や γ 線のようないわゆる低LET放射線とは異なる生物効果を示す、などの特徴を有する。そこで原研高崎研では、TIARAのAVFサイクロトロンで10~20 MeV/amuに加速した種々の重イオンビームを直径最小数 μm のマイクロアパーチャーを通して大気中に取り出して顕微鏡観察下の生物試料を狙って局部照射できる重イオンマイクロビーム細胞局部照射装置を開発し、様々な生物学研究への利用を開始した(1, 2)。これらの研究は、体外からのマイクロビーム照射で体内器官や細胞を局所的に不活性化できることを利用したマイクロサージャリ技術の応用研究と、マイクロビームで特定の細胞を狙って任意の個数の重イオンを確定的に照射できることに注目した放射線影響研究とに大別される。

マイクロサージャリの応用

マイクロビームは、生物体内の特定の細胞や組織を体外からの照射で破壊してその機能を調べるとともに、細胞間の情報伝達や相互作用、個体レベルでの生体調節機構を解析するなど、従来の外科的な処置に代わる新しい生体機能解析プローブとなりうる。この目的ではかつて紫外線レーザーなどが用いられてきたが、蛋白質や細胞膜を含む生体成分を変化させてしまう影響が大きく、生体機能の解析法としては必ずしも適当ではなかった。これに対して重イオンマイクロビームでは、細胞構造や生体成分には影響を与えることなく局所的にDNA損傷を導入することによって、細胞分裂の阻害や遺伝子発現の誘導などの操作を行なうことも可能である。

これまでに信州大学との共同研究としてカイコの初期発生卵や幼虫への重イオン局部照射実験が行なわれ、細胞性胞胚期卵における発生予定原基分布図（発生運命予定地図）の作成や、照射によって機能破壊された造血器官における再生現象の発見などの成果をあげた(3, 本要旨集 2-3)。シロイヌナズナの根端組織にマイクロビームを局部照射して根の重力屈性（向地性）への影響を調べ、重力を感知する細胞の周囲にその情報を根の伸長細胞へ伝達する役割を担う細胞が存在することを明らかにした(4)。

最近では、線虫 *C. elegans* の神経回路（ニューロンネットワーク）への局部照射によって学習や記憶などの高次の情報処理機能に対する放射線影響を解明する試み（本要旨集 2-4）や、マイクロビームを用いてマウスの骨格筋細胞膜損傷の修復過程を明らかにすることによって筋ジストロフィーの発症機序の解明と予防法の開発を目指す研究（群馬大学との共同研究）、シロイヌナズナの根の水分刺激応答に関わる細胞を同定する研究（東北大学との共同研究）、ヒラナスの生長点細胞への局部照射による細胞分化や形態形成への影響の解析（京都府立大学との共同研究）などが始まっている。

マイクロビームを用いた放射線影響研究

重イオンビームは、ある LET 値の範囲では、 γ 線やX線よりも細胞致死効果や変異誘発効果が高い。その理由として、イオン飛跡周辺の極めて局所的な高密度エネルギー付与によって、正常な修復が行なわれ難いような複雑な DNA 損傷（クラスター損傷）が生成することが考えられているが、その実体は明らかでない。また、同一の LET 値を持つようにエネルギーを調整した異なる種類の重イオンビームでは、トラック構造の違いのために、細胞致死効果だけでなく DNA 損傷の生成量と細胞内分布が異なる (5) ことが示されたが、その過程の詳細な解析はこれからである。

一方、低線量域放射線の生物影響を理解するためには、細胞集団における放射線応答動態の解析、すなわち、照射細胞における放射線障害だけでなく、照射細胞と非照射細胞が互いに影響を及ぼし合う状況を定量的に解析することが不可欠であるが、照射細胞からの何らかの信号伝達によって非照射細胞においても放射線応答が引き起こされるバイスタンダー効果の機序や、その LET 依存性は、明らかでない。

これらを解明するためには、試料中のどの細胞の、どの部分が、いつ、何個のイオンでヒットされたかを明らかにして細胞の放射線応答を解析することが可能な、マイクロビームによる個別細胞への照準照射が極めて有効であり、マイクロビームを用いることによって従来のランダムな照射方法では余儀なくされていた「平均値としての照射効果」の解析からの脱却が期待できる (6)。現在、TIARA の重イオンマイクロビーム照射装置を用いた放射線影響研究が相次いで始まっており、本ワークショップでもその成果の一部が紹介される（本要旨集 3-2, 3-3, 3-5, 3-6）。

参考文献

- 1) 渡辺 宏, 他, 放射線, **23**(1), 63-72, 1997.
- 2) Kobayashi Y, *et al.*, *Biological Sciences in Space*, **18**(4), 235-240, 2004.
- 3) Kiguchi K, *et al.*, *Nucl. Instr. and Meth.* **B210**, 312-315, 2003.
- 4) Tanaka A, *et al.*, *J. Experimental Botany*, **53**(369), 683-687, 2002.
- 5) Wada S, *et al.*, *TIARA Annual Report 2003*, 91-92, 2004.
- 6) Funayama T, *et al.*, *Radiation Research*, **163**(2), 241-246, 2005.

2.2 マイクロビーム照射装置の開発とマイクロサージャリへの応用

This is a blank page.



2.2.1 国内外の生物用マイクロビーム照射実験施設の現状

今関 等

放射線医学総合研究所 研究基盤部 技術支援・開発室

1 はじめに

加速器で作られた粒子イオンを用いてミクロンサイズのビームを形成し、生物試料の特定微小領域を正確に狙い照射する方法は、放射線によって生体内に引き起こされる機能変化を解析するための最新の手法である。イオンのマイクロビームにより、通常のランダムな照射実験では不可能であった、重要な放射線生物学的諸過程の定量的解析が可能になると期待されている。とりわけ 1990 年代以降は、国内外の様々な研究機関で、生物用マイクロビーム照射実験装置が開発され、研究成果が報告されている。放医研でも 2000 年にマシンタイムの提供を始めたマイクロビームスキニング PIXE 装置における成果（ビームサイズ等）をもとに、マイクロビーム細胞照射装置（SPICE）の仕様設計が具体的に進められ、2003 年に装置を導入し、2004 年 12 月に最初の細胞照射を行った。現在、最終目標であるビーム照射位置精度 2_μm 以下を目指し、調整を進めている。

一般にマイクロビーム照射実験施設といっても、研究の目的により、目標（エンドポイント）が異なるのは当然である。従って、粒子やエネルギー、ビームサイズ等の装置の仕様のみで比較することは、正しく理解したことにはならないであろうし、本報告の目的ではない。とはいえ、どのような施設があるかをまとめて見ることは、マイクロビーム照射装置を生物影響研究の有効な手段の一つとして検討されている研究者の方々に対し有用な情報の一つとなると思われるので、参考になれば幸いである。

2 概要

公開された資料をもとに整理したものを表 1 に示す。現状といっても最新の状況とは多少異なる可能性があることをお断りしておく。また稼働中であるか計画段階であるかを区別していない。表中、空欄の部分は、調査不足等の理由で不明な部分である。訂正情報等、お寄せ頂ければありがたい。

この表を見る限り、国外においては、軽イオン（低 LET）を用いた施設が多いようである。また国内に限って言えば、日本原子力研究所高崎研究所（TIARA）の高 LET 重イオン、高エネルギー加速器研究機構の放射光、そして放射線医学総合研究所（SPICE）の低 LET 軽イオン等々存在し、海外の生物研究と比較できる施設・研究環境が一国で整っているのは、日本だけであるということがいえるかも知れない。

表 1 世界の生物用マイクロビーム照射実験施設

研究所	線種	加速器	フォーカス	サイズ
日本原子力研究所高崎研究所	重イオン	Cyclotron	コリメータ 収束	<5 m <1 m
放射線医学総合研究所	軽イオン	静電加速器 (1.7MV Tandem)	収束	<2 m
高エネルギー加速器研究機構	放射光	Synchrotron	コリメータ ミラー	5 m
長崎大学	蛍光X線	X線管 (Ti)	ゾーンプレー ト	
若狭湾エネルギー研究センター	軽イオン	静電加速器 (5MV Tandem)	コリメータ	
京都大学	重イオン	静電加速器 (8MV Tandem)	コリメータ	5 m
グレイ癌研究所 (英)	軽イオン	静電加速器 (4MV VdG)	コリメータ	1 m
	蛍光X線	X線管 (C,Ti,Al…)	ゾーンプレー ト	2 m
コロンビア大学 (米)	軽イオン	静電加速器 (4MV VdG)	収束, コリメータ	0.3 m
マサチューセッツ工科大学 (米)	軽イオン	静電加速器 (1.5MV single end)	コリメータ	?
ローレンスバークレー国立研究所 (米)	軽・重イ オン	静電加速器	収束	5 m
	放射 光 (ALS)	Synchrotron	ミラー	2 m
ミュンヘン工科大学 (独)	軽イオン	静電加速器 (15MV Tandem)	収束	<1 m
重イオン科学研究所 (GSI) (独)	重イオン	LINAC	収束	0.5 m
パンデサンシュタルト物理工学研 究所 (PTB) (独)	軽イオン	静電加速器 (3.75MV VdG), Cyclotron	収束 コリメータ	<1 m
ライプツヒ大学 (独)	軽イオン	静電加速器 (3.5MV single end)	収束	40 nm
ボルドー核研究センター (仏)	軽イオン	静電加速器 (4MV VdG)	コリメータ	10 m
国立核物理研究所レグナロ研 (伊)	軽イオン	静電加速器 (7MV VdG)	コリメータ	2 m
プラズマ物理学研究所 (中国)	軽イオン	静電加速器 (VdG)	コリメータ	1 m

3 参考文献

- 1) 5th International Workshop: Microbeam Probe of Cellular Radiation Response 2001 要旨集
- 2) 6th International Workshop: Microbeam Probe of Cellular Radiation Response 2003 要旨集
- 3) 第17回 タンデム加速器及びその周辺技術の研究会 要旨集 (2004年)
- 4) 第24回 応用物理学会スクール 「放射光技術と応用」 テキスト (1999年)



2.2.2 TIARA の生物用マイクロビームの現状と今後の計画

舟山知夫¹, 和田成一¹, 浜田信行^{1,2}, 坂下哲哉¹, 柿崎竹彦^{1,3}, 横田裕一郎¹, 小林泰彦^{1,2} (¹原研・高崎研, ²群馬大院医 COE, ³北里大学・獣医畜産学部)

原研高崎研 TIARA の生物用マイクロビーム照射システム

原研高崎研 TIARA の生物照射用マイクロビームシステムは、TIARA の AVF サイクロトロン内の HZ1 垂直ポートに設置されており、重イオンビームを大気中で生物試料に照射することができる。

マイクロビームの形成は、ビームの大気取りだし口にマイクロメートルスケールのコリメーター(マイクロアパチャー)を設置し、ビームをコリメートすることでおこなっている。マイクロアパチャーは交換可能なので、径の異なるマイクロアパチャーに交換することで、5~250 μm のサイズでビームサイズを任意に変更できる。現在のシステムで照射可能なイオン種とそのビームサイズを表 1 に示す。

表 1. TIARA 生物用マイクロビーム装置で利用可能なイオン種とそのビームサイズ

イオン種	エネルギー (MeV/u)	ビーム径 (μm)	水中飛程 (mm)	LET* (keV/ μm)
$^4\text{He}^{2+}$	12.5	40~250	1.8	14~50
$^{12}\text{C}^{5+}$	18.3	20~250	1.2	100~300
$^{20}\text{Ne}^{8+}$	17.5	20~250	0.7	300~700
$^{20}\text{Ne}^{7+}$	13.0	5~250	0.4	400~600
$^{40}\text{Ar}^{13+}$	11.5	5~250	0.24	1200~2500

*試料表面における LET 値

これらのビームのうち、5 μm ϕ の Ar、Ne イオン、および、20 μm ϕ の C イオンのビームで主に一つ一つの細胞を狙った標的照射実験を、180 μm ϕ のビームでカイコの卵や一齢幼虫などを狙ったラジオサージェリーの実験がおこなわれている。

試料へ照射されたイオンは、試料に照射されたイオンを試料直下に設置したシンチレーター・光電子増倍管アセンブリでリアルタイムに検出、パルスカウンタで計数される。このパルスカウンタからのシグナルをもちいて、イオン源とサイクロトロン間に設置された P-チョッパーを制御し、高速ビームシャッターとして動作させることで高速かつ正確な照射イオン数の制御を実現している。

照準照射システムは、複数台の生物用顕微鏡によって構成されている。

これらの顕微鏡群は、オフライン顕微鏡とオンライン顕微鏡の大きく二種類に分けられる。オフライン顕微鏡は、準備室に設置された顕微鏡で、これらは照射する生物試料の正確な位置を照射に先立って位置データベースに登録するために利用される。一方、オンライン顕微鏡は、照射室のビーム大気取りだし口直下に設置され、オフライン顕微

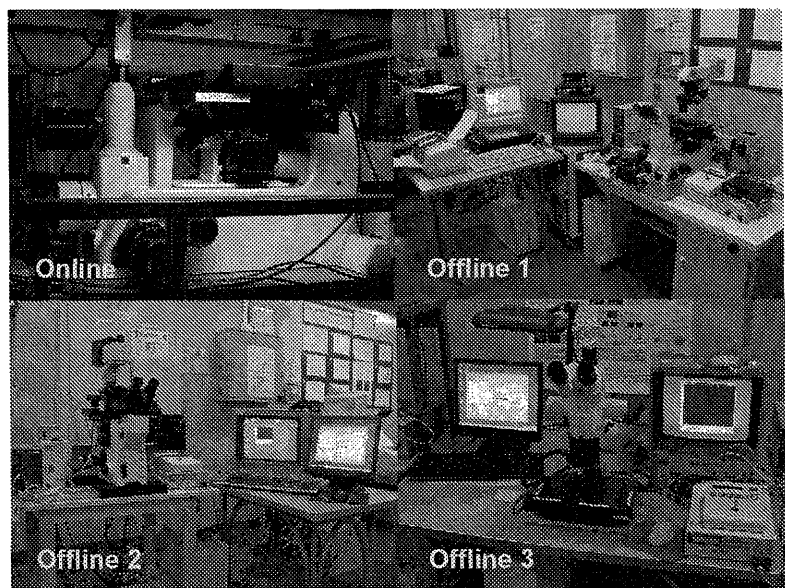


図1 照準照射システムの顕微鏡群

鏡をもちいて作成された位置データベースに従い、試料を自動照射するために利用される。またオフライン顕微鏡は、位置データベースに登録された試料位置を随時呼び出すことが可能なため、照射後の試料の経時的な追跡観察に利用できる。

すべての顕微鏡には高精度オートステージが取り付けられており、制御 PC 上のソフトウェアから任意の位置の試料を自動で呼び出すことが可能になっている。オートステージは、光学リニアスケールをもちいたフィードバック制御方式のステージを採用している。このステージをもちいた同一試料の位置再現精度は、全照射プロセスを通して、同一ステージ内、および別顕微鏡に設置された同一タイプのオートステージ間で共に $\pm 1 \mu\text{m}$ 程度であり、直径 $10 \mu\text{m}$ 程度の細胞核の照準照射に十分な精度を有している。

現在、オフライン顕微鏡として Offline 1~3 の 3 台の顕微鏡が設置されている。それらのうち 2 台は倒立型生物顕微鏡でおもに培養細胞の照射の際にもちいられる。Offline 1 顕微鏡は、Nikon TMD-300 型をベースに、Offline 2 は、Olympus IX81 型をベースにしており、両者とも、落射蛍光光源による細胞の蛍光観察が可能になっている。細胞の位置の検出は、細胞質を蛍光染色する CellTracker Orange を利用した自動位置検出法を採用しているほか、任意の細胞を顕微鏡で観察しながら選択するマニュアル位置登録も可能となっている。

残る 1 台の Offline3 顕微鏡は、Leica MZ5 型実体顕微鏡をベースに、高精度オートステージを同様に取付けた顕微鏡システムで、Offline 1 や Offline 2 の倒立型顕微鏡では照射位置の決定が難しい、植物体などの厚みのある試料の照射位置データベースの作成に利用されている。この顕微鏡システムは、主にラジオサージェリーによる生体機構解明実験などに利用されている。

オンライン顕微鏡は、Nikon TMD-300 をベースとしたシステムで、顕微鏡のすべての稼働部分を遠隔操作で準備室から制御できるようになっている。試料の照射時には、この顕微鏡のステージ上に照射位置データベースを作成した試料を載せ、データベースに登録された照射位置を自動で照射していくことで、効率の良い生物試料照射を実現している。

今後の装置開発計画

現在、TIARA では、AVF サイクロトロン HX1 垂直ポートに磁気レンズフォーカス型マイクロビーム装置を建設しており、マイクロビーム形成パラメータの調整をおこなっている。磁気レンズによるフォーカス式マイクロビーム形成をおこなうことで、これまでのコリメート式マイクロビームでは不可避だったコリメーターエッジにおける散乱イオンの生成を抑制し、より精度の良いビームをもちいた生物試料の照準照射が可能になることが期待され、最終的には $1 \mu\text{m}$ 径の重イオンマイクロビーム形成を目指している。また、このフォーカス式マイクロビーム装置では、スキャナによるビームスキャンを利用して、高速かつ連続的な生物試料照射を実現することも目標としている。ビーム形成実験は、Ne イオンをもちいたフォーカスビーム形成実験が現在進行中で、平成 17 年度末からこの装置をもちいた細胞照射予備実験の開始を予定している。今後、このビームライン用の細胞照準用顕微鏡システムの構築を進めていくことで、数年後の高精度かつ高速な細胞照射実験を実現するシステムの完成を目指している。

2.2.3 マイクロビームを用いた昆虫の生体修復機構の解析

信州大学繊維学部 深本花菜

はじめに

カイコは養蚕業を背景として多くの研究の蓄積があり、飼育も容易であることから、重イオン照射の影響解析に適した生物種といえる。信州大学木口研究室では日本原子力研究所高崎研究所の「重イオンマイクロビーム細胞局部照射装置」を利用する機会に恵まれ、カイコ *Bombyx mori* の様々な发育ステージに重イオン照射を行い、ラジオマイクロサージャリ技術として生体損傷修復機構や生体機能解析研究に利用してきた。カイコへの重イオン照射の研究は大きく二つに分けることができる。一つは受精から細胞性胞胚期までの発生初期卵を用いた研究、もう一つは孵化後の幼虫を用いた研究である。本ワークショップでは、現在まで得られた研究成果と今後の課題について簡単に紹介したい。

初期発生卵への重イオン照射とその影響

カイコ卵は表割と呼ばれる卵割形式をとる。受精した核は分裂を繰り返し、産卵後約 12 時間で卵表層の周辺細胞質へ到達し、やがて分裂核の間に隔壁が生じて細胞化する。卵黄内核分裂期の核に重イオンを局部照射すると、照射領域の核は分裂を停止し肥大化する (図 1)。様々な発生時期の色々な部位に、ビーム径や線量を変えて局部照射すると、その後の後胚発生過程において欠失・重複・融合などの形態異常が誘導されることが分かった。これらの現象を利用して細胞性胞胚期卵の発生運命予定地図を作成するとともに、重イオン損傷核及び周囲の核の挙動や卵黄内核移動のメカニズム等を解析中である。

カイコ幼虫への重イオン照射とその影響

完全変態昆虫であるカイコの幼虫期には、翅原基や触角原基等の未分化な組織が存在する。これ

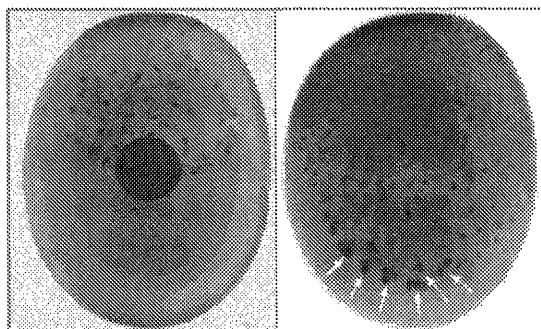


図 1 卵中央への局部照射後の核の形態変化 (左: 照射時, 右: 照射 2 時間後) 矢印は肥大化した核

らの存在領域に重イオンビームを局部照射すると、成虫期にはその組織を欠失する個体が現れた (図 2, 3)。さらに、血球を造成する造血器官に局部照射をした場合、一旦器官内の血球前駆細胞がアポトーシスを起こして死滅するが、一定期間後に再生することが判明した。

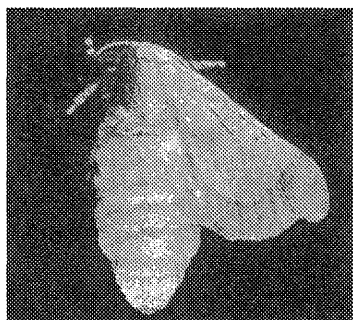


図 2 翅原基に局部照射した場合に誘導された翅の欠失



図 3 頭部に局部照射した場合に誘導された触角・複眼の形態異常 (左：対照区, 右：照射区)

一方、4 齢幼虫の真皮細胞に照射した場合には、5 齢脱皮後、体表面に認められる斑紋が消失した。同様の方法で、斑紋部位が瘤状に突出する突然変異体であるコブ (K) に照射すると、線量に依存して瘤が消失することを認めた (図 4)。さらにこれらの個体が成虫になると、照射領域の鱗毛が欠失することが分かった (図 5)。

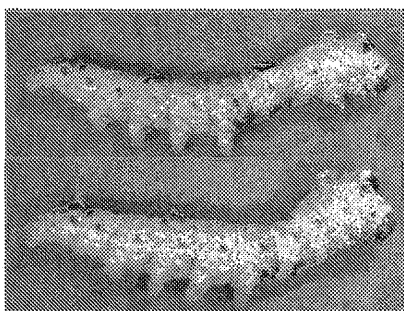


図 4 照射によって斑紋部位のコブが消失した個体 (上：対照区, 下：照射)



図 5 照射によって鱗毛が欠失した個体 (矢頭は欠失部位)

まとめ

以上のように、卵、幼虫期など様々なステージのカイコの様々な部位に重イオンビームを局部照射すると、時期特異的・部位特異的に欠失等の異常形態を誘導することが可能である。このような重イオンビームをラジオマイクロサージャリ技術として用いることにより、昆虫の発生制御機構、生体機能、損傷修復機構等を解析することが出来る。現在、重イオンを照射して機能破壊した造血器官の再生メカニズム、真皮細胞の増殖異常が原因と考えられる瘤形質の発現機構、真皮細胞から生鱗細胞・鱗毛への分化制御機構等の解析研究に取り組んでいる。今後は、重イオンビーム照射によるゲノム DNA に対する傷害とその修復過程を解析したり、創傷の治癒過程と重イオンによる傷害の修復過程を対比したりすることを含め、これまで得られた結果との関連性について追究したいと考えている。



2.2.4 線虫神経回路への局部照射と連合学習機能の解析

原研高崎：坂下哲哉、和田成一、横田裕一郎、舟山知夫、小林泰彦

群大医：浜田信行、東大：池田大祐

【はじめに】

動物は、一般に環境からの刺激を絶えず処理し適切な行動へと変換している。この過程は、神経回路（ニューロンネットワーク）を介して行われており、線虫（*C. elegans*）のような302個の神経細胞（ニューロン）でそれを成し遂げる生物から、ヒトのように何百億のニューロンにより処理している生物まで様々である。また、線虫のニューロンは全細胞の約30%を占めており、生きていくための情報処理戦略がいかに重要であるかを物語っている。

神経回路の高次機能（学習・記憶等）に放射線照射が与える影響に関する研究は、今から半世紀前の1950年代より始まった。現在までに多くの報告がなされているが、それらの報告の多くは、マウスの迷路学習の実験を用いた学習への放射線照射の影響評価であり、現象としては、マウスの学習能力が放射線照射により低下することで一致している。この学習能力の低下の要因については、脳科学の進展とともに推移し、脳全体から記憶をつかさどる海馬へ、現在ではその海馬における新生ニューロン（newborn neuron）の生成の抑制が放射線照射による学習・記憶の障害の主要因であると考えられている[1]。しかし、放射線照射の影響をニューロンネットワーク内での応答として解析した報告はない。

そこで、我々は、新生ニューロンを考慮する必要がない成虫段階の線虫を用いてニューロンネットワークに対する放射線照射の影響を明らかにすることを目的とした。また、影響評価の対象として、NaClの化学走性（NaClに誘引される性質）に観られる連合学習[2]を選んだ。線虫には、本来、NaClに誘引される性質がある。しかし、この性質は、餌（大腸菌）がない状態とNaClとを同時に経験すると、化学走性が低下するように変化する。この現象を連合学習と呼んでいる。化学走性は、線虫の集団アッセイから得られるChemotaxis Index (C. I.) 指標により評価できる。C. I.は、あらかじめNaClの濃度勾配をつけたプレートに線虫を移した後15分間の間に、NaClの高濃度スポットに誘引された線虫の数から、反対側の対照スポットに誘引された線虫の数を引き、それをプレート全体の線虫の数で割った値である。すべての線虫がNaClスポットに誘引された時C. I. = 1となる。通常、餌がある状態で飼育された線虫のC. I.は0.8前後の値をとり、food-/NaCl+プレート上で線虫を2時間這わせることによる条件付け（連合学習）でC. I.値は0.3から0.4程度の値まで低下する。我々は、まずこのC. I.値が放射線照射によりどのように変化するかについて検討した。

さらに、線虫の神経回路を局部的に重イオンマイクロビームにより照射し、ニューロンネットワークの放射線に対する局所的な応答あるいは機能不全を解析することも目指している。本ワークショップでは、現在までに行ったブロードビーム照射の予備実験結果とマイクロビーム照射実験系の進捗について報告する。

【実験方法】

すべての実験に、よく餌付けされた成虫段階の線虫を用いた。重イオンビームの照射には、日本原子力研究所高崎研究所 TIARA 施設の AVF サイクロトロンから得られる $^{12}\text{C}^{5+}$ (220 MeV : 水中飛程が約 1.2 mm) を用いた。

ブロードビーム照射：連合学習の応答を調べる実験では、線虫を照射の1時間前に条件付け

用に用意した food-/NaCl+プレートに移し、重イオンビーム照射を行った後、さらに条件付けを続け、条件付けが2時間となったところで集団化学走性アッセイ試験を実施した。また、化学走性自身への影響を調べるために food-/NaCl-プレートを用いて同様の実験を行った。

マイクロビーム照射：線虫への重イオンマイクロビーム照射を行うために、照射試料の底面をマイクロカバーガラス（厚さ 150 μm）とし、その上にスライドシール（厚さ 250 μm）を貼り付けた照射用プレートを準備した。このプレートのスライドシール内の矩形域に、線虫を20から30個体のせて、5 mM アジ化ナトリウムで麻酔固定し、上部をプラスチックシートで密閉した（図1）。オフライン顕微鏡で線虫のおおよその位置をデータベース化し、重イオンマイクロビーム照射室にあるオンライン顕微鏡にて神経中枢領域を判別しながらあらかじめ決めたイオン個数にて重イオンマイクロビームを照射した。使用したマイクロパーチャー径は 20 μm である。

【結果および考察】

ブロードビーム照射：図2に C イオンビーム照射時の連合学習の線量応答を示す。実験回数が少なくまだ予備的な結果ではあるが、100 Gy 以上の線量域で、C イオンビーム照射により学習能が亢進する傾向が観られた。一方、food-/NaCl-プレートを用いた実験からは、線虫の化学走性に対する顕著な照射効果が認められなかった。この C イオンビーム照射による学習の亢進効果について、今後マイクロビームや変異体を用いた実験によりメカニズムの解析を進める予定である。

マイクロビーム照射：図1のプレートを用いて、麻酔による固定（10~15分）→位置取り込み（10~15分）→重イオンマイクロビーム照射（15~20分）→麻酔からの回復（10分）を約1時間で行っている。現在データを蓄積しつつあるが、1サンプル数百個体を扱えるブロードビーム照射と異なり個体数が限られるため、データの解釈方法や実験方法の改善が必要である。

【参考文献】

- [1] Raber J, et al., *Radiat. Res.*, 162, 39-47 (2004).
- [2] Saeki, et al., *J. Exp. Biol.*, 204, 1757-1764 (2001).

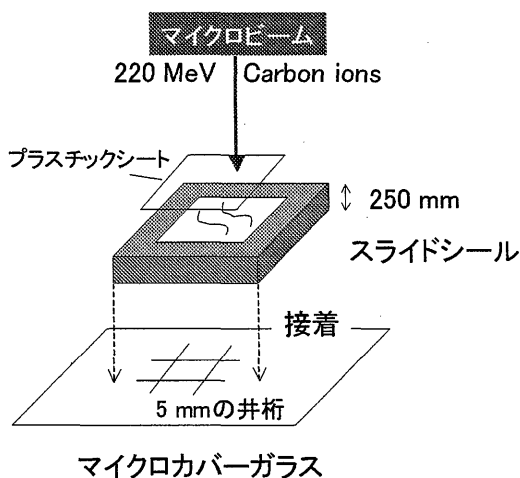


図1 線虫重イオンマイクロビーム照射用プレート

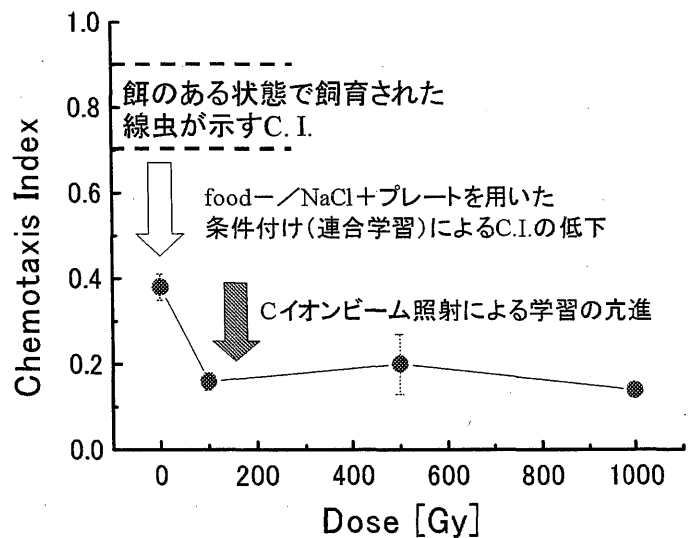


図2 連合学習の線量応答 (Cイオンビーム) : 3回の平均値とSEM

2.3 マイクロビームを用いた細胞の放射線応答研究

This is a blank page.



2.3.1 軽イオンマイクロビーム照射のバイスタンダー効果

放射線医学総合研究所 放射線安全研究センター
鈴木雅雄

【はじめに】

原子力エネルギー利用や放射性廃棄物を源とする放射線に対する人体への影響、より現実化する人類の宇宙空間への進出にともなう問題となる宇宙放射線に対する宇宙環境や高高度飛行における宇宙船・航空機内での人体影響、さらには粒子放射線によるがん治療に対する生物影響は、地球及び宇宙環境科学あるいは医学の分野において大きな関心事の一つである。このような放射線源に対する放射線影響研究で特に問題となってくる粒子放射線の生物影響は、イオンビームの低密度照射に対する生物影響に他ならない。

近年、粒子放射線が照射される局所での低密度・不均一照射の粒子線照射場においては、直接粒子線のヒットを受けた細胞がそのストレスに対して“一次的”な応答をした結果、その近傍にある直接ヒットを受けていない細胞に“二次的”な応答が生じ、細胞集団として放射線生物作用を修飾する、すなわち直接ヒットを受けていない細胞に対するヒットを受けた細胞の間接的影響が現れる、という“バイスタンダー効果”が粒子線マイクロビームを用いた研究から報告されている。この現象は、放射線照射された細胞とされていない細胞との混合細胞集団を一つの被曝集団として解析し、もたらされる生物影響は照射された細胞に起因するものであり、直接照射されていない細胞は現れた生物影響に寄与しないものであるとする大前提のもとに解釈されてきたこれまでの放射線生物学の考え方には合致しないものである。このような放射線照射に対してより正確な放射線影響を把握するためには、粒子放射線低密度照射に対して、

- ① 直接照射された細胞への直接的な生物効果
- ② 照射された細胞の近傍に存在する照射されていない細胞の間接的な生物効果
- ③ さらに照射された細胞とされていない細胞との相互作用機序の解明

が、必要不可欠である。このような研究課題を明らかにするための照射実験を可能にするもっとも有力な実験方法が粒子線マイクロビームを用いるものである。

本報告は、米国コロンビア大学にある加速器施設で行ったヒト由来の正常細胞に対するクロマチン切断誘発を指標にして、

- ① クロマチン損傷においてバイスタンダー効果が観察されるのか否か？
- ② 観察されたクロマチン切断誘発のバイスタンダー効果の誘発メカニズム
- ③ 誘発されたバイスタンダークロマチン切断がどのような種類の損傷か？

を明らかにするために、マイクロビーム及びブロードビームヘリウムイオンを用いて行った実験結果である。

【材料および方法】

He イオン照射実験は、コロンビア大学加速器施設（4.2 MV バンデグラーフ加速器）で行った。マイクロビームは、シングルイオンビーム照射装置を用いて細胞位置での stopping power が $90\text{keV}/\mu\text{m}$ （核子あたり 1.3MeV）の He イオン、ブロードビームは細胞位置での stopping power が $150\text{keV}/\mu\text{m}$ （核子あたり 0.6MeV）の He イオンをそれぞれ用いた。細胞は、ヒト気管支由来の正常上皮性細胞を用いた。

クロマチン損傷は、カリキュリンAによって誘導されたG₂期の凝縮クロマチンを光学顕微鏡下で観察し、chromatid fragments (chromatid breaks, isochromatid deletions, acentric fragments)として検出した。

【結果および考察】

He イオンマイクロビーム照射によるクロマチン切断誘発のバイスタンダー効果

1個の He イオンを 100%の細胞の細胞核に照射した場合、細胞当たり 4 個のクロマチン切断数をもった細胞数が約 35%で、3、5、6、7 個の切断数を持つものと合わせて全体の約 85%を占めた。一方、1個の He イオンを 10%の細胞核に照射した場合は、100%の細胞核に照射した時に見られた 3、4、5、6、7 個の切断数の分布に占める割合が約 15%で、1、2 個の切断数を持った細胞数は約 35%であった。また、1個の He イオンを 10%の細胞核に照射し、同時に細胞間の情報伝達を薬剤で遮断した条件下では、3、4、5、6、7 個の分布に占める割合は、細胞間の情報伝達を阻害しない場合と約 15%であったが、1、2 個の分布に占める割合が非照射の時と同様で、結果として非照射の場合の切断を持たない細胞数のうちの約 15%が 3、4、5、6、7 個の切断数を持つ分布へとシフトした形になった。一方、1個の He イオンを 10%の細胞核に照射し、同時に放射線誘発のラディカルスキャベンジャーである DMSO を添加した条件下では、1個の He イオンを 10%の細胞核に照射した場合のクロマチン切断誘発分布と差がなかった。

以上の結果は、1個の He イオンを 10%の細胞核に照射した場合には、He イオンが直接ヒットしてクロマチン切断が生成された場合（細胞当たり 3、4、5、6、7 個の切断数）と直接ヒット以外の原因で比較的少ない切断数を生じた場合（細胞当たり 1、2 個の切断数）の 2通りが混在していることを示唆している。このことは、クロマチン切断誘発においてもバイスタンダー効果が存在することを示すものであると考える。さらにその誘導メカニズムの一つとして、本実験の様な接触細胞においては、gap junction を介した情報伝達が重要な役割を演じていること、DMSO で消去されるような放射線誘発のラディカルは関与していないこと、が示唆される。

バイスタンダー効果で誘導されるクロマチン切断はどのようなものか？

厚さの薄いマイラフィルムを張ったリングに別の厚いマイラフィルムを帯状に張ったリングを重ね合わせ、エネルギーの低い He イオンブロードビームを照射して、薄いマイラフィルム上に培養した細胞には He イオンが直接ヒットするが、厚いマイラフィルム上の細胞には He イオンの残存飛程が届かないような照射条件で、バイスタンダー細胞となる厚いマイラフィルム上の細胞のクロマチン切断を観察し、バイスタンダー誘発クロマチン切断の実体を調べた。直接ヒットを受けた薄いマイラフィルム上の細胞には、通常観察される chromatid-type の損傷に加えて高 LET 放射線で特異的に生成される isochromatid deletion が観察された。また、クロマチン間の exchange も観察された。一方、直接ヒットを受けない厚いマイラフィルム上のバイスタンダー細胞には、chromatid-type の損傷のうち chromatid break と acentric fragment しか観察されなかった。

以上の結果から、バイスタンダー細胞に誘発されたクロマチン損傷は、X線やガンマ線で高頻度に観察される比較的低 LET 放射線タイプの損傷しか生じていないことがわかった。

2.3.2 重イオンマイクロビーム照射のバイスタンダー効果

放射線医学総合研究所
粒子線治療生物研究グループ
古澤 佳也

【はじめに】

今回のワークショップではイオンビームを大別して、陽子やヘリウム(α 線)を軽イオン、炭素やネオン・アルゴンなどを重イオンと定義する事にする(脚注)。軽イオンを用いたマイクロビームは初期より諸外国で多く用いられている(今関の発表)。これは静電加速器のビームが安定であるので、残す比較的低エネルギーであっても大気中に出した後細胞照射に十分な飛程をもつイオンが用いられたものと推測できる。一方、日本では原研で重イオンマイクロビームの生物研究への応用が成果を上げていて、諸外国に於いてもその重要性が認識され重イオンへの挑戦が伺われる。

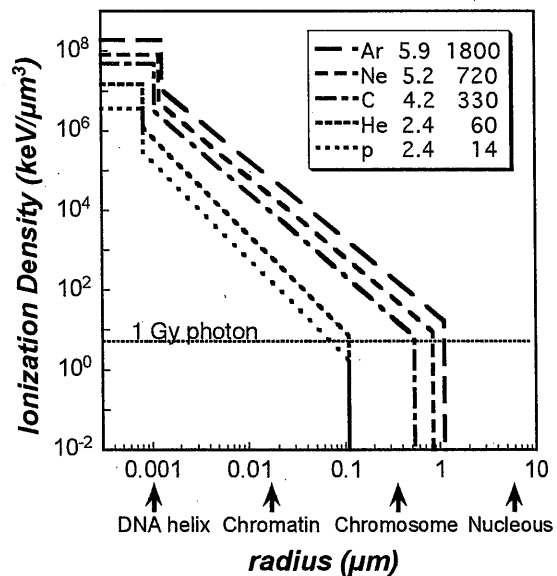
【重イオンビームの特徴】

軽重イオンビームによる違いは、そのトラック構造の違いが大きな要素であろう。図はトラック構造モデル(A. Chatterjee, 1976)から計算した1粒子のイオンによる電離構造で、各イオンビームがどれも約 $100\mu\text{m}$ の残飛程を持つときのものである。イオン種とその運動エネルギー(MeV/u)およびLET ($\text{keV}/\mu\text{m}$)を図中に示し、参考に1Gyの光子線によるイオン化密度と染色体などの大きさも示した。陽子とヘリウムで特徴的なのはその電離密度が4倍(Z^2)異なるだけでトラック構造は全く同じ事である。重イオンに関しては核子あたりのエネルギーを合わせれば半径方向の構造は同じであるが、粒子線の進行方向の構造(飛程)が異なる。

微小体積に起こる電離密度を見ると、ナノメートルオーダーのコアの部分では、この極微小領域にX線のメガグレイオーダーの電離密度を示し、重イオンと軽イオンではその密度に100倍の開きがある。一方分布の裾野では1GyのX線と同等の電離密度の領域は、軽イオンでは染色体の拡がりよりも狭く重イオンでは数倍広い。この構造の違いによる生物効果の違いは調べられていない。

【バイスタンダー効果】

バイスタンダー効果は細胞間接合間隙(GJIC)を経由して信号が伝達するものと、培地を介した液性の信号伝達経路によるものに大別できる。我々は原研高崎TIARAのマイクロビームと放医研HIMACを利用してGJICを経由して重イオンビームによるバイスタンダー効果が見られること、また培地を経由して伝わる媒質の一つがNO誘導体であることを初めて示すなどの成果を挙げてきた。ここでは前者のGJICを経由したバイスタンダー効果を紹介する。



ここで我々はヒト正常繊維芽細胞であるAG01522細胞を用い、微小核形成を染色体損傷の主な指標とし、GJICのチャンネルを広げる作用の有る薬剤：8-Br-cAMP、閉じる作用のある薬剤：Lindane や PMA (pentahydroxytygliadien myristate acetate) を添加することによってバースタンダー効果の増減を調べた。これらの薬剤を添加することによって、Lucifer Yellowの細胞間移行が抑制/増強される事からGJICチャンネルの変化を捉えることが出来た。こういった条件下で、接触増殖抑制状態にある細胞（約70万細胞/30mm容器）のうち中心15x15mmに設定した網目上の各位置(1, 2x2, ~7x7)にある細胞に1~4粒子のネオンビーム(13MeV/u、~430keV/ μ m)またはアルゴンビーム(11.5MeV/u、~1260 keV/ μ m)、あるいは平均ヒット数が0.1~0.9粒子/細胞核となるようなカーボンビーム (@HIMAC、~100keV/ μ m) の照射を行い、15時間培養後に再播種すると共に、サイトカラシンで細胞分裂抑制を行ってさらに48時間培養し、二核化した細胞の内微小核を発現した細胞を係数してその形成頻度を調べた。全二核細胞のうち約3%の細胞に自然誘発が見られたが、無添加の場合に比べ8-Br-cAMPの添加では平均0.1ヒット照射の場合約2倍に増強され、Lindane添加では完全に抑制された。また同時に、細胞周期のG1停止もそれぞれの薬剤で増強/抑制が見られた。マイクロビームの1粒子照射による線量依存性は被照射細胞の数に依存して急激に増加し約50細胞以上の照射でバースタンダー効果は飽和するように見える。これもPMAの添加によって同様の抑制が観察された。容器中の49箇所の細胞をターゲットとして各位置に1~4粒子を照射した場合、各1粒子の照射で十分なバースタンダー効果が見られ、粒子数を増やしても効果の増強は見られなかった。この事は400keV/ μ m以上の高LETで見られたが、比較的低LETカーボンビームを用いた予備実験からは、粒子数依存性が見られるようである。

【展望】

バースタンダー効果のLET 依存性などは解っていない。マイクロビームは確定的に細胞を照射できることから、平均値として観察されていたイオンビームの効果が確定値として検出でき、細胞の放射線応答に関して新しいデータが期待できる。マイクロビームで成果の上がっている国外の施設はグレイ研究所とコロンビア大学であり、粒子種も限られている。国内では関東圏にTIARAの重イオンマイクロビーム、SPICEの軽イオンマイクロビーム、KEK-PFに軟X線のビームがあり、これらの線質の異なったマイクロビームを相互に用いることで、国外にない研究（線量効果、線量率効果、LET 効果など）の進展が期待される。

【参考文献】

1. Chatterjee A, Schaefer HJ, *Radiat Environm Biophys* 13, 215-227 (1976).
2. Shao CL, Furusawa Y, *et al.*, *J Radiat Res* 42: 305-316 (2001).
3. Shao CL, Furusawa Y, *et al.*, *Int J Radiat Biol* 78: 837-844 (2002).
4. Shao CL, Furusawa Y, *et al.*, *Nitric Oxide: Biol Chem* 8: 83-88 (2003)
5. Shao CL, Furusawa Y, *et al.*, *FASEB J* 17: 1422-1437 (2003).
6. Shao CL, Furusawa Y, *et al.*, *Radiat Res* 160: 318-323 (2003).
7. Shao CL, Furusawa Y, *et al.*, *Radat Environm Biophys* 42: 183-187 (2003).
8. Shao CL, Furusawa Y, *et al.*, *J Radiat Res* 45: 97-103 (2004).
9. Kobayashi Y, Funayama T, *et al.*, *Biol Sci Space* 18: 235-240 (2005).

(注) 重イオンの定義について：重イオンは電子より重い原子核で構成されるイオンを全て含むイオンとする事が一般的である。放射線医学総合研究所では重粒子線治療を陽子線治療と区別するため、陽子よりも大きいイオン種を重イオンとしている。また、ここでは陽子線・ α 線を軽イオン、炭素などより重いものを重イオンとしている。



2.3.3 細胞膜への局所損傷付与によるアポトーシスの誘導

和田成一¹、坂下哲哉¹、舟山知夫¹、浜田信行²、柿崎竹彦³、横田裕一郎¹、
長谷純宏¹、小林泰彦^{1,2} (原研・高崎¹、群馬大・院医 COE²、北里大³)

1. はじめに

放射線による細胞死の重要な要因は DNA 損傷であり、放射線誘発アポトーシスの機構として、DNA 損傷自体が誘発シグナルとなることが広く知られている。また、細胞膜も放射線に対する重要なターゲット分子と考えられ、細胞膜損傷からもアポトーシスが誘発されると報告されている。

細胞膜損傷によるアポトーシス誘発機構は、放射線による細胞膜損傷によってスフィンゴミエリナーゼ (SMase) が活性化されることにより細胞膜からセラミドが生成され、セラミドがセカンドメッセンジャーとなってアポトーシスが誘発されると考えられている。一方では、放射線による DNA 損傷によってセラミド合成酵素が誘導されることによりセラミドが生成され、アポトーシスが誘導されるとも考えられている。このように細胞膜損傷からのセラミド生成機構、細胞膜損傷由来のセラミドのアポトーシス誘発シグナル伝達機構の詳細は明らかにされていない。

細胞膜損傷が発端となるアポトーシス誘発のメカニズムを解明するためには、細胞膜にのみ特異的に損傷を付与できる実験系が極めて有効である。原研・高崎の TIARA に設置された重イオンマイクロビーム細胞照射装置では狙った領域に正確な個数のイオンを照射でき[1]、深度制御細胞照射装置では 1 μm 単位で生物試料への打ち込み深度を制御できるので[2]、細胞膜/細胞質に限定して放射線損傷を付与することによる放射線応答を直接的に解析できる。そこで、細胞核に損傷を与えない選択的照射を行うことによって細胞膜損傷からのアポトーシス誘発を調べた。

2. 方法

深度制御細胞照射はタンデム静電加速器によって加速された 1.5 MeV/u C イオンを用いた。ビーム取り出し口から照射サンプルまでの距離を制御することによって照射試料への打ち込み深度を制御し、フルエンスはイオン飛跡検出器 CR-39 を用いて確認した。照射細胞はチャイニーズハムスター由来の CHO-K1 細胞を用いた。細胞核へのイオンビームによる DNA 損傷を確認するため、個々の細胞における DNA 損傷を検出できるコメットアッセイを用いた。アポトーシスの誘導を検出するため、照射 72 時間後に TUNEL 法によってアポトーシスの出現頻度を観察した。

重イオンマイクロビーム照射は AVF サイクロトロンによって加速された 18.3

MeV/u C イオンを用いた。細胞を CR-39 の上に接着させ、細胞質の領域を狙って照射を行った。照射後に CR-39 上の細胞面と反対面にアルカリエッチング処理を行いイオン飛跡を可視化し、細胞位置とイオン飛跡を同時に観察することによって細胞へのイオンのヒット位置を確認した。また、アポトーシス細胞の検出には TUNEL 法を用いた。

細胞核の損傷シグナルを介さないシグナル伝達機構を解析するため、深度制御細胞照射装置を用いて細胞表面のみの照射を行い、SMase 活性を経時的に測定した。

3. 結果および考察

深度制御細胞照射装置を用いてビーム取り出し口からサンプルまでの距離によるフルエンスの変化を CR-39 で確認したとき、17mm の距離ではイオン飛跡は観察され、17mm の位置から 1mm 遠ざけるとイオン飛跡は観察されなかった。DNA 損傷をコメットアッセイで検出したとき、17mm の位置では DNA 損傷が検出されなかったが、17mm より近づけると DNA 損傷が観察された。つまり、17mm の位置では細胞核に損傷を与えず細胞表面のみ照射ができることが確認された。さらに、細胞表面のみの照射によるアポトーシスの出現頻度を調べたところ、非照射細胞のアポトーシス出現頻度よりも高くなることが観察された。

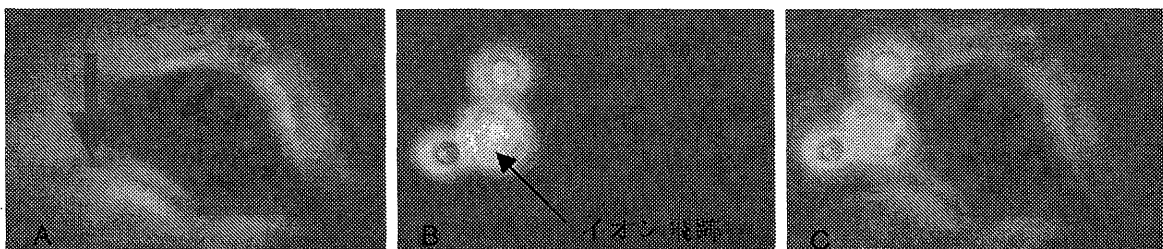
マイクロビーム照射装置を用いて CR-39 の上にはりつけた細胞の細胞質領域を狙って照射し(図 1. A)、照射後 CR-39 の細胞面とは反対側をエッチング処理することによって貫通したイオンをイオン飛跡として可視化した(図 1. B)。これらの画像を重ね合わせることによって、細胞質領域のみイオンがヒットしたことが確認され(図 1. C)、細胞質のみに放射線損傷を付与することができた。細胞質領域への選択的な照射によるアポトーシスの出現頻度は、非照射細胞のアポトーシス出現頻度よりも高くなることが観察された。

深度制御細胞照射装置を用いて細胞表面のみの照射による SMase 活性を測定したとき、照射 5 分後には SMase の活性化が観察された。このことから DNA 損傷を介さずに SMase が活性化され、セラミドが生成されることが推察された。

これらの結果は、DNA 損傷によるアポトーシス誘発シグナル伝達機構以外のアポトーシス誘発シグナル伝達機構の存在を示唆している。

Reference

- [1] Y. Kobayashi, et. al., Nucl. Intr. and Meth., B 210 (2003) 308-311
- [2] A. Tanaka, et. al., Nucl. Intr. and Meth., B 129 (1997) 42-48





2.3.4 放射光X線マイクロビームによる細胞照射効果

宇佐美 徳子 (KEK-PF)

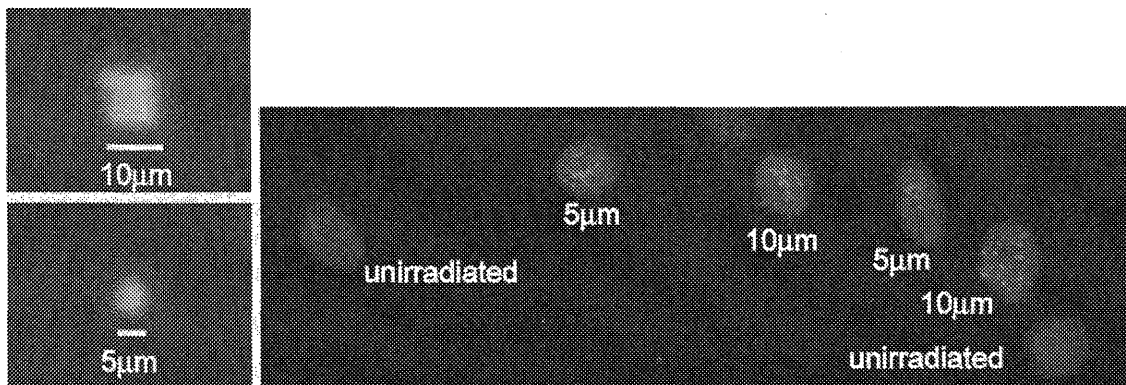
共同研究者：江口-笠井 清美 (放医研), 前澤 博 (徳島大), 小林 克己 (KEK-PF)

放射線の生物作用機構を研究するうえで、個々の細胞に個別に放射線をあて、その効果を個別に追跡する研究手法が重要であることが認識されるようになり、それを可能にするマイクロビーム細胞照射装置を用いた研究が世界中で行われるようになってきた。多くのマイクロビーム照射装置は粒子放射線を用いるものであり、X線や γ 線といった光子放射線を光源として用いたものは少ない。高エネルギー加速器研究機構(KEK)・物質構造科学研究所・放射光科学研究施設(フォトンファクトリー, PF)では、放射光を光源として用いたものとしては世界で初めてのX線マイクロビーム細胞照射装置を開発した。放射光は指向性が高い光源であるので、マイクロビームを容易に得ることができる。この装置では、Kirkpatrick-Baez方式と呼ばれる縦横別々に集光するミラーを用いる方法と、高精度の四象限スリットでビームを切り取る方法の2つの方法でマイクロビームを得ている。ミラー集光方式では強度が高くより小さいビームが得られるが、最適な集光条件を得るには精度の高い調整が必要である。スリット方式では集光ビームに比べて強度は低く、ビームサイズも最小5ミクロンが限度であるが、調整が簡単であり、ビームサイズを任意に変えられるという利点がある。放射光X線はシリコン結晶を用いて上方にはね上げ、底面が薄膜でできた特殊なディッシュで培養された細胞に照射される。このディッシュは落射型蛍光顕微鏡の精密ステージ上に置かれており、細胞の画像を観察しながら位置決めができるようになっている。X線をはね上げるのにシリコン結晶による回折を利用しているため、X線のエネルギーは5.35keVに限定されている。5keV程度の光電子の水中における飛程は1ミクロン以下であり、二次電子によりビーム領域外にエネルギー付与が起こることはない。線量率は、非集光時で毎秒 1.4×10^4 photons/(10 μ m)²であり、これは毎秒0.4 Gyと同等のフルエンスに相当する。

装置開発にあたって、狙った細胞に正しくX線ビームが当たっているかどうか、さまざまな処理を行った後においても標的細胞を正確に追跡できるかどうか、といった基本性能が実現できていることを確認するために適した実験として、

マイクロビーム照射によって細胞核内に生じた DNA 損傷の可視化およびその観察を試みた。DNA 損傷の可視化には、リン酸化ヒストン H2AX(γ -H2AX)を指標とした。スリット方式で得られる最小の5ミクロン角のマイクロビームはヒト繊維芽細胞の細胞核より十分に小さいので、細胞核の一部にX線が照射された場合に、DNA 損傷が局在するかどうかを調べた。また、ビームサイズを変えた場合の損傷の分布についても観察を行った。

5 μ m 角と 10 μ m 角の2種類のビームサイズのマイクロビームをヒト繊維芽細胞(NB1-RGB)に照射し、37°Cの CO₂ インキュベータ内で 15 分保持した後、メタノールおよびアセトンで固定し、抗 γ -H2AX 抗体により免疫染色を行った。染色後のディッシュをマイクロビーム照射装置に再度セットし、照射細胞を観測したところ、照射した細胞には、非照射細胞と明らかに区別できる γ -H2AX のフォーカスが多数観測された。また、このフォーカスは、細胞核内の照射した領域にほぼ限定して生じていることが観測された。このことより、DNA 損傷の大部分はX線のエネルギーを直接付与された場所に生じることが示唆される。また、照射した線量に応じて、 γ -H2AX の誘発量も増加することが観測された。



マイクロビーム照射されたヒト繊維芽細胞。細胞核全体はヨウ化プロピジウム (PI)で赤色に染色されている。DNA 損傷の指標である γ -H2AX は、二次抗体である FITC の緑の蛍光として観測される。左の写真はシンチレータで観測した 10 μ m 角、5 μ m 角のマイクロビーム (スケールは細胞の写真と同じ)。



2.3.5 植物単細胞への重イオンマイクロビーム照射効果

横田裕一郎¹、山田真也²、井上雅好²、舟山知夫¹、小林泰彦^{1,3}、坂下哲哉¹、
和田成一¹、柿崎竹彦¹、浜田信行^{1,3}、長谷純宏¹、鹿園直哉¹、田中淳¹
¹原研高崎、²京都府大院農、³群大院医 COE

<はじめに> 大きなエネルギーを局所的に付与する高 LET 重イオンビームはガンマ線などの低 LET 放射線とは異なる生物効果を有し、イオンビームを変異原とする植物突然変異育種により従来得られなかったタイプの変異を高効率に誘発できることが明らかになりつつある。イオンビーム育種技術を高度化するため、植物のイオンビーム照射に対する感受性や応答を個体レベルだけでなく細胞レベルで知る必要がある。これまでに、モデル細胞として用いたタバコ BY-2 単細胞は哺乳動物と比較して細胞あたり DNA 量が約 2 倍多いにも関わらず、イオンビームやガンマ線に 5~10 倍程度耐性であること、タバコ BY-2 細胞では哺乳動物細胞や酵母など他の真核細胞生物と比べて放射線誘発 DNA 2 本鎖切断が少ないことを明らかにしてきた^{1),2)}。しかし従来のイオンビーム照射(ブロード照射)では、イオンは細胞をランダムに照射するため、一定線量を照射した細胞集団内には異なる個数のイオンを様々な部位に照射された細胞が混在し、細胞応答は集団の平均値として評価されてきた。このことは、大きなエネルギーがイオン飛跡に沿った局所領域に付与される重イオンビームにおいて特に問題となる。原研高崎で開発された重イオンマイクロビーム照射システム^{3),4)}は、この問題を解決できる最も優れた方法である。これまでに我々は、重イオンマイクロビーム照射システムを用いた植物単細胞照射系を開発した⁵⁾。本システムは非接着性細胞用のマイクロビーム照射システムとしては世界で初めてのものである。今回のワークショップでは本システムの概要について紹介し、これまでに得られた植物単細胞への重イオンマイクロビーム照射効果を報告する。

<実験方法> CR-39 イオン飛跡検出プラスチックを底部に持つ照射容器を作成した(Fig. 1)。タバコ BY-2 単細胞(直径は 50 μm 程度)とアガロース培地との混合液を照射容器上に滴下し、その上からカバーガラスあるいはカバースリップを被せた。細胞層の厚みは平均 100 μm であった。CR-39 にあらかじめ記しておいた 2 点(第一・第二原点)を基準として、照射予定細胞の位置座標を、倒立顕微鏡上にマウントしたコンピュータ制御三次元自動位置認識ステージ(オートステージ)を用いてデータベース化した。照射および照射後観察時に、オートステージ上で第一・第二原点を再指定し、データベースを呼び出すことで細胞位置を再追跡した。それぞれ 17.5 および 18.3 MeV/amu に加速されたネオンおよびカーボンイオンは 20 $\mu\text{m}\phi$ の開口部を持つマイクロアパーチャーでコリメートされ、大気中に取り出された。イオンマイクロビームはオートステージシステムによりアパーチャー真下に移動された細胞および照射容器を貫通した後、エネルギースペクトル分析および個数カウント用のシンチレータ・光電子倍增管アセンブリ(PMT)に到達した。予定個数のイオン照射を確認すると、高速ビームシャッターを用いて直ちに照射を終了した。照射後、CR-39 のアルカリエッチングによりイオン飛跡をピットとして可視化し、イオンマイクロビームの細胞命中率(細胞に命中したイオン個数/PMT でカウントした照射イオン個数)を確認した。照射後 1 ヶ月間培養した細胞のコロニー形成率を指標として、照射細胞の生存割合(照射細胞のコロニー形成率/非照射細胞のコロニー形成率)を評価した。

<結果> オートステージシステムによる細胞位置再追跡の精度を高めることによって、イオンマイクロビームの細胞命中率が向上した(Fig. 2)。現時点でのカーボンおよびネオンイオンマイクロビームの平均細胞命中率は、それぞれ 75.8 および 76.4% である。また、タバコ単細胞はカーボンイオンマイクロビーム(LET = 119 keV/μm)が 10 発まで命中しても生存できることが分かった。これまで、イオンマイクロビームの細胞命中率が低かったため、CR-39 のエッチングにより細胞毎にイオン命中数を確かめていたが、この方法ではフルエンスが増加するとピットが重なり合うため命中数の正確な評価ができなくなる。しかし、ここで行ったシステムの改良により細胞命中率が向上したため、CR-39 による確認ができない高フルエンスでのイオンマイクロビーム照射効果の評価が可能となった。今後、イオンマイクロビームを用いてタバコ単細胞の正確な生存曲線を求め、ブロード照射で得られた結果と比較する。

<参考文献>

- 1) Yokota et al. (2003) *Int. J. Radiat. Biol.* **79**, 681-685.
- 2) Yokota et al. (2005) *Radiat. Res.* **163**, 520-525.
- 3) Kobayashi et al. (2004) *Biol. Sci. Space* **18**, 235-240.
- 4) Funayama et al. (2005) *Radiat. Res.* **163**, 241-246.
- 5) Yokota et al. (2003) *Biol. Sci. Space* **17**, 298-301.

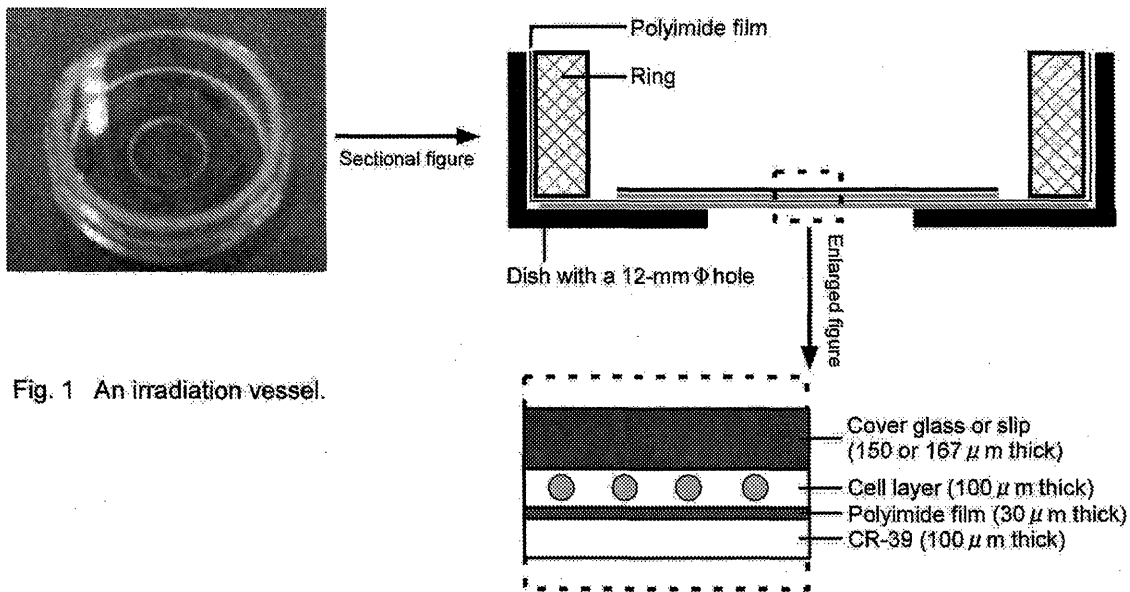


Fig. 1 An irradiation vessel.

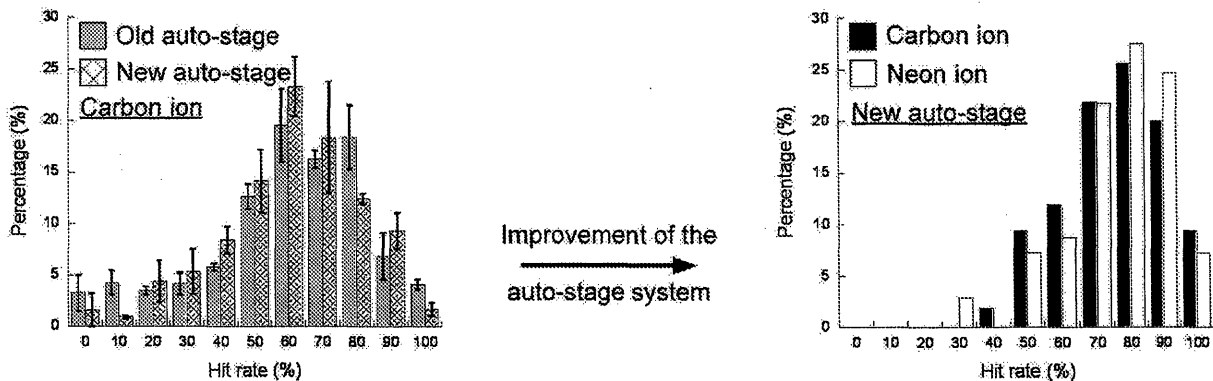


Fig. 2 Hit rate of ion microbeam to tobacco cells.



2.3.6 新規 DNA 鎖切断認識蛋白による細胞内 DNA 損傷の検出

佐藤勝也^{1,2}、和田成一¹、菊地正博¹、舟山知夫¹、鳴海一成¹、小林泰彦^{1,2}

¹原研高崎・バイオ、²群大医 COE

【はじめに】 遺伝情報の担い手である DNA を安定に保持し後代に伝えていくことは、生物にとって種を存続させるために必須である。しかしながら、生物は常に DNA に損傷を被る環境に曝されている。DNA 損傷は塩基損傷と DNA 鎖切断の2つに大別されるが、特に DNA 鎖切断は致死効果が高く、生物にとって最も重篤な損傷である。DNA 鎖切断を引き起こす放射線に対する感受性は、生物種によって大きく異なる。放射線に比較的感受性である哺乳動物細胞の細胞応答機構及び DNA 修復機構を明らかにするためには、致死的な DNA 鎖切断の細胞内分や生成頻度を正しく評価することが重要である。したがって、DNA 鎖切断の分布や修復過程を直接的に測定することが、高等生物における DNA 修復機構解明研究の進展に重要である。現在までに哺乳動物細胞において、DNA 修復関連タンパク質 (γ -H2A、XRad51、Brca1 あるいは Nbs1 など) 及びこれに特異的な抗体を用いた DNA 鎖切断検出法が知られている。しかしながら、これら内在性タンパク質を用いる検出法は、タンパク質のリン酸化及び DNA 鎖切断への結合に一定の時間が必要であり、DNA 初期損傷を検出することが困難である欠点が存在していた。この欠点を克服するために、DNA 初期損傷検出に外因性タンパク質を利用する方法が考えられる。

【方法】 放射線抵抗性細菌 *Deinococcus radiodurans* は、他の生物が致死あるいは変異を引き起こす線量の電離放射線、紫外線あるいは薬剤に対して非常に抵抗性である。この高い抵抗性は当該菌が効率的な DNA 修復能力を有することに起因している。特筆すべきは、当該菌が放射線に誘起された DNA 二本鎖切断を効率的に修復する能力を有していることである。放射線高度感受性変異株の解析から、当該菌が新規放射線誘導性の DNA 修復タンパク質 (PprA) をコードしていることを明らかにした [1]。PprA タンパク質が DNA 鎖切断を有する二本鎖 DNA に結合し、DNA 消化酵素の活性を阻害すること、DNA リガーゼによる DNA 鎖切断末端再結合活性を促進することを明らかにした [1,2]。一方、PprA タンパク質

は、無傷の二本鎖 DNA と一本鎖 DNA には結合しない (図 1)。そこで、本研究では、哺乳動物細胞における DNA 損傷応答機構を評価するために、PprA タンパク質を利用した免疫蛍光法を用いて、放射線照射で誘起される哺乳動物細胞の DNA 鎖切断の検出法について検討した。

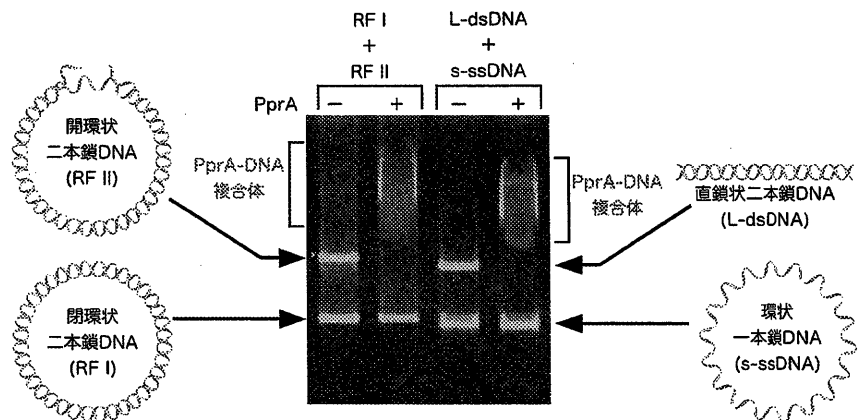


図1. PprAタンパク質のDNA結合能。

【結果及び考察】 DNA 鎖切断の検出は、 γ 線照射後直ちに細胞を固定化し細胞膜の脆弱化処理後、PprA タンパク質にて処理した。その後、蛍光標識した PprA タンパク質に特異的な抗体で処理することで行った (図 2)。内在性タンパク質を用いた方法では放射線照射直後の初期損傷の検出が困難であったのに対して、開発した検出法は、外因性タンパク質を用いることで放射線照射直後の CHO-K1 細胞核内の DNA 鎖切断を効果的に検出することを可能にした。さらに、本検出法は、CHO-K1 細胞核内 DNA 鎖切断量の γ 線量依存性が確認できた (図 3)。

アポトーシスは、生体防御機構として高度に制御された細胞死であり、ミトコンドリアが介在するアポトーシスは DNA 損傷によって誘導される。本検出法は、核内 DNA 鎖切断検出の際よりも細胞膜脆弱化を穏和な条件下で行うことで、放射線照射に誘起された CHO-K1 細胞ミトコンドリア内の DNA 鎖切断も検出することができた。核内 DNA 鎖切断と同様に、ミトコンドリア内 DNA 鎖切断量の γ 線量依存性が確認できた (図 4)。本検出法は、ミトコンドリアに制御されるアポトーシスの研究にも非常に有用なツールとなる。

生物は、電離放射線、紫外線あるいは食物や環境中の変異原などの外的要因、また呼吸や代謝の過程で生じる活性酸素や DNA 複製時の誤りなどの内的要因によって、DNA に損傷を被る。特に細胞内において、ミトコンドリアは活性酸素産生の主要な器官である。本検出法は、非照射の CHO-K1 細胞の核及びミトコンドリア内においても DNA 鎖切断を検出することができおり、細胞内では常に活性酸素や複製によって DNA 鎖切断が引き起こされていることが示唆された。しかし、これら非照射細胞において検出された DNA 鎖切断は、細胞の生存にはほとんど影響しない程度の損傷、あるいは DNA 修復機構によって容易に修復される損傷なのかもしれない。

本研究において開発した検出法は、哺乳動物細胞の DNA 損傷応答機構の評価に非常に有用であり、さらに環境や医薬分野における遺伝毒性試験への応用も期待できる [3]。

【参考文献】

1. I. Narumi *et al.* : Molecular Microbiology, 54, 278-285 (2004).
2. 鳴海一成, 佐藤勝也, 崔素珍, 北山滋, 渡辺宏 : 特開 2003-52376 号.
3. 佐藤勝也, 和田成一, 鳴海一成, 菊地正博, 舟山知夫, 小林泰彦 : 特開 2004-239639 号.

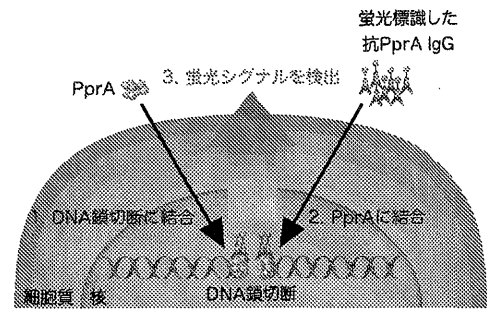


図2. PprAタンパク質を用いた哺乳動物細胞内 DNA鎖切断の検出.

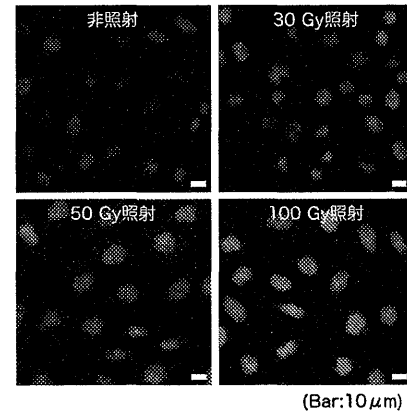


図3. γ 線照射による哺乳動物細胞核内 DNA鎖切断の増加.

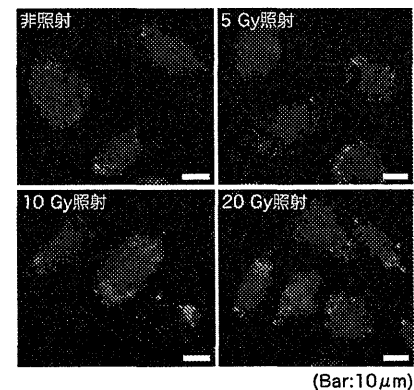


図4. γ 線照射による哺乳動物細胞ミトコンドリア内DNA鎖切断の増加.

3. まとめ

本ワークショップは、原研の他、群馬大学、放医研、信州大学、東北大学、理学化学研究所、KEK-PF、電力中央研究所、国立循環器病センター、麒麟ビール（株）、ラジエ工業（株）などから計 104 名の参加を得て成功裡に終了した。

世界に先駆けて重イオンマイクロビームを用いた細胞へのシングルイオン照射実験や、カイコ初期発生卵や植物体へのマイクロサージャリ実験で成果を出してきた原研高崎研 TIARA の他、国内外のマイクロビーム照射実験施設の現状が報告され、マイクロビームを用いた昆虫の生体修復機構の解析研究や培養細胞におけるバイスタンダー効果などについて突っ込んだ議論が交わされた。また、マイクロビームが生物学研究における新しい解析ツールとして非常に有効であるとともに低線量放射線生物影響の研究や放射線医学応用研究にも極めて重要であることが指摘された。

今後は TIARA の生物用重イオンマイクロビームに加えて、放医研の軽イオンマイクロビームや KEK-PF の放射光 X 線マイクロビームなど、線質や LET が異なる相補的なマイクロビーム照射実験が日本国内で可能になる予定である。各施設での状況に関する情報交換を行い、研究計画やその成果に関しても研究者間でのコミュニケーションを密にし、相互の連携協力を一層強化することにより、マイクロビームを用いた放射線生物学の研究及び生体機能解析プローブとしてのマイクロサージャリの応用など、イオンビーム生物応用研究のさらなる展開が期待される。

This is a blank page.

付録 1.

プログラム

This is a blank page.

プログラム

開会挨拶（高崎研 久米民和） 10:30～10:35

1. イオンビームによる生物応用研究の進展 10:35～11:35

【座長 京都府立大 井上雅好】

- 1) ポジトロンイメージング法による植物機能解析研究 [高崎研 松橋信平]
- 2) イオンビーム育種技術の開発と遺伝子資源創成研究 [高崎研 田中 淳]
- 3) 原研高崎研の重イオンマイクロビーム利用研究の概要 [高崎研 小林泰彦]

昼食（国際交流会館） 11:45～13:15

2. マイクロビーム照射装置の開発とマイクロサージャリへの応用 . . . 13:20～14:40

【座長 信州大 木口憲爾】

- 1) 国内外の生物用マイクロビーム照射実験施設の現状 [放医研 今関 等]
- 2) TIARA の生物用マイクロビームの現状と今後の計画 [高崎研 舟山知夫]
- 3) マイクロビームを用いた昆虫の生体修復機構の解析 [信州大 深本花菜]
- 4) 線虫神経回路への局部照射と連合学習機能の解析 [高崎研 坂下哲哉]

3. マイクロビームを用いた細胞の放射線応答研究 14:40～17:00

【座長 高エネ機構 小李克己】

- 1) 軽イオンマイクロビーム照射のバイスタンダー効果 [放医研 鈴木雅雄]
- 2) 重イオンマイクロビーム照射のバイスタンダー効果 [放医研 古澤佳也]
- 3) 細胞膜への局所的損傷付与によるアポトーシスの誘発 [高崎研 和田成一]

..... 休憩 (20分)

【座長 放医研 古澤佳也】

- 4) 放射光 X線マイクロビームによる細胞照射効果 [高エネ機構 宇佐美徳子]
 - 5) 植物単細胞への重イオンマイクロビーム照射効果 [高崎研 横田裕一郎]
 - 6) 新規 DNA 鎖切断認識蛋白による細胞内 DNA 損傷の検出 [高崎研 佐藤勝也]
4. 総合討論 (マイクロビーム生物応用研究の将来展望) 17:00~17:45

【座長 高崎研 久米民和】

話題提供者

電中研	低線量放射線研究センター	酒井一夫
群馬大	医学部	中野隆史
原研	高崎研	小林泰彦

閉会挨拶 (高崎研 久米民和) 17:45~17:50

懇親会 (国際交流会館) 18:00~19:30

付録 2.

質疑応答

This is a blank page.

ポジトロンイメージング法による植物機能解析研究

松橋信平 (原研高崎)

- Q. 動態計測のディテクターはどのようなものか?
- A. 2次元PETによって入射するシグナルを検知している。
- Q. 検知するスライス時間はどの程度で行っているか? ミニマムは?
- A. 現実的には、5-10秒/画像が最短、金属のような移行に時間の懸かるものはスライス時間を長くした方がよい。¹¹Cでは20秒くらいが単位、金属元素では分の単位のスライスを行なっている。
- Q. フラールレンはどのようにして投与しているのか? フラールレンの均一投与法と投与したフラールレンの検出法はどうしているか?
- A. フラールレンに水酸基を修飾して親水性をもたせる。しかし、まだ動物への投与実験は行っていない。
- Q. フラールレン化合物が骨に対して親和性があるようだが、何故、骨組織に集積するのか?
- A. 選択的に骨に付くことが実験的に知られている。メカニズムは未説明。

イオンビーム育種技術の開発と遺伝子資源創成研究

田中 淳 (原研高崎)

- Q. 突然変異誘発にはDNA損傷修復が深く関与しているようだが、DNA損傷修復遺伝子のmutantでは、突然変異体を得にくいのか?
- A. 哺乳動物細胞のDNA損傷修復遺伝子mutantでは、突然変異体を得られにくい傾向があるので、植物でも同様に変異体を得にくいと考えられる。また、酵母から得られる突然変異体では欠失体は得られず、point mutationが得られる。このことから、生物側の修復機構が突然変異体誘発に強く関与していると考えられる。
- C. 数baseの反復配列はイオンビーム照射では見られず、電子線などの低LET放射線で見られる特徴的な変化である。
- Q. イオンビームでは局所的に変異を誘発するようであるが、イオンビーム照射による変異の大きさが電子線に比べてさまざまなサイズがある。これは、イオンビームの方がランダムに変異を誘発すると解釈してよいのか?
- A. イオンビームでは遺伝子ごとに大きな構造変化を誘発するのに対し、電子線では遺伝子内のわずかな変化を誘発するので、イオンビームの方が局所的に変異を誘発すると解釈する。
- Q. 植物のマイクロビームの場合、グレイ、フルエンス、total energy depositionのどれを使っていくのがよいのか。基本線量の基軸の揃え方はどうしているか?
- A. 難しい。トータル線量で考えるのは無理がある。ただ、植物は哺乳動物細胞よりも放射線に強いのでまだトータル線量で考えられる範疇かもしれない。でも、1遺伝子で考えた場合は、基本的にはシングルイベント単位で考えないといけない。

- Q. スプール数、トラック数をグレイで比較するアイデアが必要になるのではないかと気がする。
- A. 2000 スプールと 4 トラックは 1 Gy のとき。でも、あたって変異を起こす場合、 γ 線はほとんど修復。イオンビームはあたら間違いなく変異を起こしているのではないか。
- C. イオンビームは局所的にエネルギーを付与するので、イオンビームによる突然変異誘発を含め、イオンビーム照射による生物効果は吸収線量で評価するよりも粒子数で評価するべきだと考えられる。また、植物では γ 線などの低 LET 放射線の損傷はほとんど修復してしまうが、高 LET のイオンビームによる損傷は修復が難しいため DNA 上に大きな構造変化を誘発し、これゆえ変異スペクトルが広いと考えられる。
- Q. イオンビーム照射による突然変異誘発はやはり DNA 損傷およびその修復が重要なのか？
- A. まず、DNA 損傷およびその修復が突然変異誘発に非常に重要である。しかし、最近では修復後のメチル化などのエピジェネティックな現象も突然変異誘発に関与することが示唆されてきている。
- Q. イオンビーム照射で変化しているもの=大きな変化、と考えていいのか？
- A. 必ずしもそうではない

原研高崎研の重イオンマイクロビーム利用研究の概要

小林泰彦 (原研高崎)

- Q. フォーカス式のマイクロビームの計画が進んでいるが、現在設置されているマイクロビーム装置はコリメート式である。フォーカ式とコリメート式の切り替えが簡単にできるのか？
- A. 同じマイクロビーム装置でコリメート式とフォーカス式を切り替えて使うのではなく、フォーカス式は別のポートに設置してこれまでのコリメート式も利用し続ける。同時には使えないが、ブロードビーム、アパチャー式マイクロビームに続く、第三のビームラインとなる。
- Q. 厚みのある細胞（細胞核）などを照射するとき、イオンが細胞を貫通したときに 3 次元解析ができるか？
- A. すぐには考えていない。現状では二次元フラットなモデルをベースに考えている。いったんセットした細胞に対してフォーカスを変えながら照射するのは難しいので、3 次元解析は将来の課題である。

ここまでの総合討論：イオンビームによる生物応用研究の進展

- C. フォーカスビームの話ですが、大強度で利用する場合はともかく、シングルイオ

ンヒットでは、深さ方向での問題はあまり出ないはず。ビーム開発の方では、現在、細胞にシングルイオンを正確に照射することを目的としているため、3次元解析は今後の課題である。

- Q. 植物では同じ細胞に何十発と照射したい場合が出てくると思う。そのへんは、通過するイオンだけでいけばいいのだが、細胞膜だけとかそういう打ち込みの仕分けをやりたい時にはどうなるか？
- A. 当面は、イオンが全部通過する条件、トラックセグメント照射実験による素線量影響解析を行なう。
- Q. 生物機能グループの解析による植物の機能的な変化と植物資源グループの解析による遺伝子の変化を対応させて研究することによって新たな知見が得られると思うが、実際、連携して研究をおこなっているか？
- A. 生物機能グループのポジトロンイメージング解析などを植物の遺伝情報と組み合わせて連携で解析することは可能であり、実際、行っている。また、植物の機能的な解析を行った後、さらにその植物の形態変化解析など行うため、RIを投与後の植物を野外に持ち出すことも検討している。実際、実験動物ではPET 4核種投与後の野外への持ち出しの認可が下りたので、植物体においても今後、持ち出しが可能になり、植物体における研究が進むと考えられる。

国内外の生物用マイクロビーム照射実験施設の現状

今関 等 (放医研)

- C. 原研のフォーカス式マイクロビームは、目標は $\phi 1 \mu\text{m}$ 以下、現状で $\phi 2 \mu\text{m}$ 以下を確認済。また、スキャナーによってビームの位置を変えるシステムで、現在、600個/分、今後の目標としては1000個/分を目指している。
- Q. ところで、リストの一覧の中で、シングルイオンヒットを目指しているのは世界でいくつあるのか？
- A. 多分皆が目指していると思う。
- Q. イオンのヒット位置をリアルタイムで検出できるところ (施設) はあるか？
- A. イオンのヒット位置をリアルタイムで検出することは難しい。現在のところビーム位置と照射するイオン数が保証され、その位置に細胞を移動させて照射するシステムが多い。

TIARAの生物用マイクロビームの現状と今後の計画

舟山知夫 (原研高崎)

- Q. 細胞増殖を個々の細胞において60時間まで観察しているが、照射後8世代くらいまで観察する系を作り、遅延で出てくる影響を観察できるようになれば興味深い結果が得られるのではないか？

- A. 遅延性の障害に関しては、genetic instability の実験やバイスタンダー効果の解析も行っている。
- Q. Genetic instability をみるならば、CHO 細胞ではなく寺島先生が使っていた HeLa 細胞がいいのではないか。細胞の選択も重要だと思う。
- A. 細胞に関しては、human の AG05112 細胞を立上げてこれから移行していこうと考えている。
- Q. 正常細胞だとあまり動かないから細胞密度がさがらないので観察できなくなるなど影響があるのでは？
- A. 細胞照射容器内にシングルセルを置いてそれだけを狙い撃って継続観察することもできるので大丈夫。現実的に細胞密度を下げることで可能だと思う。
- Q. HeLa だとアポトーシスの影響がないので遅発性分裂遅延現象がはっきりでる。
- A. 細胞を持って来ていただければすぐに出来ますので、是非持って来てください。
- C. 放医研の寺島先生の細胞をお薦めします。

マイクロビームを用いた昆虫の生体修復機構の解析

深本花菜 (信州大)

- Q. カイコの受精卵の特定の領域に 250Gy 照射し、その後の胚発生過程において特定の形態異常を観察することによって運命予定図を作成されているが、その特定の形態異常はいつも観察されるのか、つまり、特定の形態異常の出現頻度はどの程度か？
- A. 検出される形態異常の出現頻度はほぼ 100%である。
- Q. 冒頭で次世代影響解析における蚕の利点に触れていました。照射によるカイコの遺伝的影響について、受精卵に照射して形態的な異常を観察しているが、この形態異常を起こした個体から得られる次世代の個体へも形態的な異常が現れるのか？
- A. 少し前に受精卵に照射した時の次世代影響の実験をしたときには、明確な結果が得られなかったが、この件については今後も実験を継続していく。

線虫神経回路への局部照射と連合学習機能の解析

坂下哲哉 (原研高崎)

- Q. 連合学習のための 4 時間の条件づけでは、イオンビーム照射によって化学走性に変化がないように見えるが、放射線によって連合学習への影響がないと解釈していいのか？
- A. γ 線照射では連合学習の亢進が観察されている。一方イオンビームでは影響が明確には認められていないが、これが放射線の種類の違いか、その他の要因なのか、現在、検討中である。

- Q. 連合学習の因子として今回は食物と NaCl に着目しているが、ガス濃度や温度など他にも連合学習に重要な因子があるのでは？
- A. 確かに他にも連合学習に重要な因子はある。神経ネットワークでは化学物質、温度、ガスなどを感知するセンサーが複雑に伝達しており、たとえば、温度変化が化学物質に対する応答を変化させることがある。そこで、温度センサーに変異のある mutant を用いることによって、より明確に化学物質に対する影響を解析することができる。
- Q. マイクロビーム照射においてカイコでは生物影響を見出すためにアパチャーのサイズが大きいものを使用している。線虫のマイクロビーム照射でもアパチャーサイズを検討してはいかがか？
- A. 線虫のマイクロビーム照射には $\phi 20 \mu\text{m}$ のアパチャーを使用している。確かに、まず、大きなサイズのアパチャーを用いて生物効果を見出して、そこからアパチャーサイズを小さくして実験を進めることも必要かもしれない。

軽イオンマイクロビーム照射のバイスタンダー効果

鈴木雅雄 (放医研)

- Q. バイスタンダー効果によるクロマチン切断は、何故 1ヶ所でしか起こらないのか。
- A. 何が起きているのかは不明。バイスタンダー効果で誘発されるメカニズムでは、クロマチン切断を作る能力が低いから、だから出来てもたかだか 1 個になる。切れている場所はランダムだと思う。トータルとして解析しているのでそう見える。
- Q. 短冊状のマイラフィルムを重ねて bystander 効果を検出する実験で、マイラフィルムを照射後 30 分間共培養しているが、この培養時間を長くすると bystander 効果に変化が出るか？
- A. 調べていない。現在は 30 分で分けている。
- Q. ギャップジャンクションは関与するのか。
- A. 共培養しているときは gap junction が関与しているので、培養時間を長くすると変化が出ると考えられる。
- Q. 短冊での辺縁部しか関与していないのでは？
- A. そうだと思う。
- Q. Lindane を入れたらどうなる？
- A. やってないのでわからない。
- Q. 共培養の段階で medium を介する bystander 効果の関与はないのか？
- A. 共培養の段階では medium を介する bystander 効果もあると考えられ、gap junction の作用と両方が作用していると考えられる。
- Q. ランダムな場所にクロマチン切断誘発因子が作用するようだが、特にクロマチン切断を誘発しやすい場所などはあるのか？
- A. 現在の段階ではそこまで解析を行っていない。

重イオンマイクロビーム照射のバイスタンダー効果

古澤佳也 (放医研)

- Q. 微小核形成、G1 アレスト、細胞条件は？ 何故、G1 アレストが起きていると分かるのか？
- A. 照射時は confluent、その後、15 時間後に蒔き直して増殖フェーズ。実験にもちいた細胞は confluent の状態であるので、ほぼ G1 期の状態である。したがって、増殖が開始されなければ G1 アレストと考えられる。
- Q. DMSO の効き方が鈴木先生のデータと異なるように見える。今回の実験で観察された bystander 効果は DMSO 処置で抑制効果が観察されるか？
- A. 確かに少し効いているのかな？ NO ラジカルの培地経由因子あたりとの関係もあるかもしれない。何か DMSO がクエンチするラジカルも bystander 効果に寄与しているのかもしれない？ あと、粒子の違いによるラジカル種の生成のしやすさの可能性。もしかしたらこれが重粒子と軽粒子の違いかもしれない。
- Q. G1 アレストについて、bystander 効果でアレストシグナルが来るのか、それとも bystander 効果でダメージ形成が起きてその結果アレストが起こるのか？
- A. Micronuclei 頻度に比べて G1 アレストの方が頻度が高いけど…、わからない。
- Q. Gap junction だとヒットした場所からの距離がイメージされてヒットした細胞の数に応じて bystander 細胞が増えるイメージがあるが、その割には増えてないような気がするのだが？
- A. 培地経由の bystander に見えるよね。現在高崎の実験で、距離効果を調べ中だけど頻度が低くてきちんと解析できていない。現在、系を変えて解析を進行させているところ。可能性として、あまった細胞が bystander シグナルを出すだけか、bystander 細胞がまた bystander シグナルを出す chain reaction を起こすかを想定して実験しているのだけどまだ話せる段階ではない。
- C. Bystander の場合、距離依存性がありそうな気がするのに、まだ見えていないので期待しています。

細胞膜への局所的損傷付与によるアポトーシスの誘発

和田成一 (原研高崎)

- Q. 細胞質照射≒細胞膜照射という理解でいいですか？
- A. この場合、本質的には細胞膜の損傷と考えている。
- Q. DNA 損傷がないことは確認しているが、DNA 損傷由来アポトーシス系が不活性であることの確認はしていますか？
- A. 今後調べていきます。あと、DNA 損傷由来系と膜損傷由来系がどこまでどう共通の経路が絡んでいるのかを見ていきたい。
- Q. 膜シグナル由来だと caspase8 が活性化されると言われているが、そのへんを調べたら？

- A. それは今後押さえていきたい。
- Q. CHO ではなく細胞質が広がっていて狙いやすい細胞を使ったらどうか(twenty half など)
- A. そのとおり。でも今回の結果はすべての細胞について細胞質だけへのヒットだけであることを確認してある。確かに CHO はデータ収集的には効率が悪いが…。
- Q. もうすこし長時間インキュベートすると見えてくると思われる、FITC デキストランのゴルジ集積像は見た?
- A. 見た。コントロールでも長時間インキュベートすると核の周囲に集積しているのが観察された。ただし、5 分では照射細胞でしか取込みは見えず、照射したものでは小胞のようになって観察されてきている。
- Q. 細胞表面からの照射のとき、深さ方向が 3 mm の空気層の差だと水で 3 μm くらいだと思うのだが、その距離に核が入っていないか?
- A. 試してはいるがまだ押さえきれていない。でも損傷は検出されていないので、まずダメージはない。
- Q. 細胞を接着させている膜の厚さなど不定要因がありますよね。
- A. あります。だから、実験ごとに毎回 CR-39 でトラックエンドをチェックしているので、そこは問題ないと考えています。

放射光 X 線マイクロビームによる細胞照射効果

宇佐美德子 (KEK-PF)

- C. 最後のスライドにあった 3 つのマイクロビームは、これが日本のメリットで、他の外国ではこういう実験系は絶対できませんから、こここのところで追い抜いてやろうと思っています。実際に使ってみたところ、ビームの位置が動かないので、そこに細胞を持っていけば必ず当たる、非常に使いやすいビームです。
- A. やっと使えるようになったのですが、今 PF リングが大改造中で停まっております。次に使えるのが今年の 10 月からになっています。利用希望の方は 7 月中に連絡をしてください。
- Q. コンフルエントの細胞を格子点に照射する時のステージの移動のスピードは?
- A. ほとんど考えなくていいほど速い。多分 1 秒以下。
- Q. 粒子線ではトラック構造という電離密度分布構造を持っており、トラックのペナンプラの領域は低 LET 放射線と同様な電離密度構造である。このペナンプラ領域を評価するためには X 線を用いたマイクロビームは有用である。そこで、照射する X 線の線量がどのくらいまで下げることができるか?
- A. シャッタースピードを調整すれば線量を下げることができ、最低は 0.1 秒である。現在のマシンの状況では 1 秒間に 0.4Gy 照射できるので、シャッタースピードを 0.1 秒にすると 0.04Gy の照射が可能である。また、ビームラインにフィルターを挿入することによってさらに線量を下げることができる。

植物単細胞への重イオンマイクロビーム照射効果

横田裕一郎 (原研高崎)

- Q. 最後のマイクロビームとブロードビームのカーブが随分違いますが、これは同じようにアガロースに包埋して照射したものですか? 他の条件が全く同じでもこんなに違うのですか?
- A. そうです。まあ LET は若干違うのですが。
- Q. マイクロビームを用いて細胞へのイオンのヒット数を命中率から算出しているが、その命中率は細胞全体に対する命中率なのか、それとも細胞核に対する命中率か?
- A. マイクロビームでは細胞の核を狙って照射をしているが、今回示した細胞へのヒット数は、細胞全体に対するものを命中率から算出した。
- Q. ブロードビームとマイクロビームの生存曲線に差が見られるが、細胞核に対する命中率からヒット数を判定すると、生存曲線の差は認められなくなりそうだが?
- A. 確かに核に対する命中率からヒット数を算出し生存曲線を作成すると、ブロードビームとマイクロビームの生存曲線が一致する傾向にある。再度、解析を行いたい。
- Q. このマイクロビームの実験では細胞核に近いところを狙っているのですよね。そうすると、全体をランダムに照射するのとはちょっと違ってくるかと思います。
- A. もうすこし小さいアパチャーを利用して細胞核を狙えるようになるともっといい結果になると思います。
- Q. アパチャー径と細胞面積の比率を具体的な換算に利用するのも一つの方法ではないか?
- A. まさにそうだと考えている。
- Q. Mammalian との比較で dsb 生成量の数が違うのが興味深いですが、もしタバコの細胞から DNA を精製してきて照射した場合は、生成量は変わらないのではないのでしょうか?
- A. おそらく、差はなくなると思います。確認しないといけないと思っています。
- Q. では、タバコの細胞の中にスカベンジャーとかがあると…
- A. そう思っていますが、それはまだ調べていなくて、調べていきたいと思っています。
- Q. 初期の損傷生成だけを見ているんですよね。修復のない条件で。
- A. そうです。

新規 DNA 鎖切断認識蛋白による細胞内 DNA 損傷の検出

佐藤勝也 (原研高崎)

- Q. 例えば、複製に入っている細胞では、複製フォークは染まりますか? あと、レプリケーションしている細胞内ミトコンドリアはどうでしょうか? その数は?

- A. 細胞は同調処理を行っておらず、コントロールでも染色を行うとシグナルが検出されるので、複製フォークも検出していると考えている。でもそれを区別できないのが現在の問題点。
- Q. 外から蛋白質を取り込ませているようだけど自然に膜の中に入っていくの？ ミトコンドリアの傷を検出しているが、このときはミトコンドリア膜を壊して、核膜は壊れていないのか？
- A. 界面活性剤処理や蛋白分解酵素処理を変えることによって、ミトコンドリア膜と核膜の壊れ具合を調節できると考えられる。もしくは、PprA は 6 量体で比較的大きな分子なので、ミトコンドリア膜と核膜の透過の程度を調節できると考えられる。
- Q. 分子量は？
- A. モノマーで 31 kDa。ただし DNA について働く時は何量体かわからないけど多量体。
- Q. 重イオンビームでは 1 発でかなりの量の損傷が生成されるが、この蛋白質を用いてイオンビームのヒット判定に用いることはできるか？
- A. 実際にイオンビームを照射した細胞の染色を行ったが、十分にヒット細胞にシグナルが検出されず、まだ検討が必要である。
- Q. PprA が何を検出しているのかについてですが、ゲルシフトの結果からすると、SSB も見えているのですか？
- A. ニックも見えます。
- Q. SSB と DSB の両方を検出するなら、通常の細胞に用いるとバックグラウンドが高くなりすぎないか？
- A. 実際にバックグラウンドは高い。そこで、現在 SSB と DSB を区別して認識するような変異 pprA 蛋白質を得るため、いろんな mutant を作成している。
- Q. この蛋白は DNA 断端に結合するようだが、その結合に DNA 断端の構造の依存性はあるのか。たとえば、5' -P に結合するとか、3' -OH に結合するとか？ あるいは末端形状との関連…。一本鎖につかないのかなどなど。
- A. DNA 切断端の構造の依存性については実際実験を行っていないので、今後、解析してみたいと思う。

総合討論

話題提供 1. 「放射線生物学の基本概念を変えるバイスタンダー効果」

酒井一夫 (電中研)

概要:

- ◆ バイスタンダー効果は放射線生物学の古典的パラダイム (ヒットされた細胞のみが影響を受ける→ 標的理論[標的=DNA]) への挑戦
 - ・ 「影響」を受けるのは照射された細胞とは限らない
- ◆ バイスタンダー効果は線量率効果の概念も変える
- ◆ バイスタンダー効果の波及効果
 - ・ 放射線防護: リスクを上げるのか下げるのか?
 - バイスタンダー効果は低線量域で「標的」のサイズを大きくする
 - ・ 放射線治療: すべての細胞を標的にする必要はない?
 - 腫瘍を構成する細胞のすべてを殺し尽くさなくても治癒する
- ◆ 治療における低線量: 照射野の辺縁部におけるバイスタンダー効果
- ◆ バイスタンダー効果と放射線治療: For or Against?
 - ・ より効果的に腫瘍細胞を殺す?
 - ・ 正常細胞に抵抗性を与える?
 - ・ 2次的ながんを誘起する?

話題提供 2. 「超高精度重イオンマイクロサージェリー治療技術の開発」

中野隆史 (群大医)

概要:

- ◆ 微小疾患への臨床応用: 脳下垂体腫瘍 (5mm~20mm φ)、脳動脈瘤 (2~3mm φ)
- ◆ 葡萄膜悪性黒色腫の重粒子線治療
- ◆ 重粒子線治療の改良点
 - ・ 半影が十分に小さくない
 - ・ 線量分布をもっとシャープにできる
 - ・ 照射の位置精度: 10cm 深部で 2-3cm の誤差が存在する→1mm 以下にしたい
- ◆ 開発項目
 - ・ マイクロビーム 3次元照準・走査法の開発
(マイクロビーム照射ポート、3次元スポットスキャニング制御技術)
 - ・ マイクロイオンビーム照射治療計画と線量評価法の開発
(線量分布計測方法、治療計画システム)
 - ・ 各種疾患に対するマイクロビーム高精度治療法の開発
(脳と頭頸部疾患、眼底領域の疾患)
- ◆ 加齢性黄斑変性症: 黄斑の加齢に伴い脈絡膜から発生する異常な新生血管により失明。50歳以上に発生し約40万人が罹患。光凝固治療では網膜が損傷、視力を失う。→超高精度重イオンマイクロビームで微小病巣を0.1~1mm単位で治療する
- ◆ 蛍光物質励起法による超高精度重イオン照射位置照準システム

- ◆ フリッケ線量計を応用した Fe-MRI 線量計の開発
- ◆ 群馬大学重粒子線治療センター

話題提供 3. 「マイクロビームを用いた細胞の放射線応答解析」

小林泰彦 (原研高崎)

概要：

- ◆ 低線量域放射線の生物影響の解明には細胞集団における放射線応答動態の解析が不可欠
 - ・ 個体レベル：生体応答が顕在化 (放射線適応応答、放射線ホルミシス)
 - ・ 細胞・組織レベル：非照射細胞の存在 (バイスタンダー効果)
 - ・ 分子レベル：放射線物理的過程に始まる全過程の分子機構の解明へ (放射線応答のトリガー分子は何か？ 線質効果の指標：LET からトラック構造へ)
- ◆ DNA 生成量と密度が細胞致死効果を決める
 - ・ LET 値が等しい異なる重イオンの照射効果を比較解析
 - ・ トラック構造が DNA 鎖切断効率と細胞致死効果に及ぼす影響
 - ・ イオン飛跡を中心とする DNA 鎖切断の局在

質疑応答：

- Q. バイスタンダー効果について臨床サイドから聞きたい。メカニズム的に生物学的興味があるのだが、治療面で使ってきた Elkind の recovery 曲線の中に入っていたものの一部が bystander 効果として出てきたと考えている。でも、治療のレベルでは Elkind をマクロで見て使っているのだから、それでいいのでは？ それとも、なにか bystander のメカニズムが治療において関与してくることがあるのか？
- A. バイスタンダーの概念は 92 年ぐらいから分かり始めてきた現象である。治療やリスク評価というマクロな視点ではすでに折り込み済みだったと考える。だから、これらにおいては従来の知見に軸足を置いていいと考える。治療方針への変更はない。ただ、bystander の仕組みの応用の可能性があり、特に低線量になる、たとえば照射野の辺縁部などで何が起きているのか、それを治療に使う方法はないかがこれから重要になると思う。
- Q. バイスタンダー効果に生物種による違いはあるのか、バクテリアなどではどうか？ もし哺乳類だけならば、ヒトへの応用にもつながっていくのではないだろうか。
- A. 治療でのフラクシオンサイズとの関連において重粒子は古い放射線治療とは逆。バイスタンダー効果はこれに関係するのかもしれないと思っている。実際に骨肉腫の患者さんで、重粒子で扁平上皮癌と同じくらいの線量で治ったり、そういう現象がバイスタンダー効果的現象で説明できるのかもしれないなど思っている。
- C. 佐々木弘先生のデータでは、 α 線照射したとき、コロニー形成法で見ると、分割照射では細胞が却って良く死ぬようになる。X線では逆。だからこういう現象は細胞レベルでも起こる。参考までに。

This is a blank page.

国際単位系 (SI) と換算表

表1 SI基本単位および補助単位

量	名称	記号
長さ	メートル	m
質量	キログラム	kg
時間	秒	s
電流	アンペア	A
熱力学温度	ケルビン	K
物質質量	モル	mol
光度	カンデラ	cd
平面角	ラジアン	rad
立体角	ステラジアン	sr

表3 固有の名称をもつSI組立単位

量	名称	記号	他のSI単位による表現
周波数	ヘルツ	Hz	s ⁻¹
力	ニュートン	N	m·kg/s ²
圧力, 応力	パスカル	Pa	N/m ²
エネルギー, 仕事, 熱量	ジュール	J	N·m
工率, 放射束	ワット	W	J/s
電気量, 電荷	クーロン	C	A·s
電位, 電圧, 起電力	ボルト	V	W/A
静電容量	ファラド	F	C/V
電気抵抗	オーム	Ω	V/A
コンダクタンス	ジーメンズ	S	A/V
磁束	ウェーバ	Wb	V·s
磁束密度	テスラ	T	Wb/m ²
インダクタンス	ヘンリー	H	Wb/A
セルシウス温度	セルシウス度	°C	
光度	ルーメン	lm	cd·sr
照射度	ルクス	lx	lm/m ²
放射能	ベクレル	Bq	s ⁻¹
吸収線量	グレイ	Gy	J/kg
線量当量	シーベルト	Sv	J/kg

表2 SIと併用される単位

名称	記号
分, 時, 日	min, h, d
度, 分, 秒	°, ', "
リットル	l, L
トン	t
電子ボルト	eV
原子質量単位	u

1 eV = 1.60218 × 10⁻¹⁹ J
1 u = 1.66054 × 10⁻²⁷ kg

表4 SIと共に暫定的に維持される単位

名称	記号
オングストローム	Å
バーン	b
バリ	bar
ガロン	Gal
キュリー	Ci
レントゲン	R
ラド	rad
レム	rem

1 Å = 0.1 nm = 10⁻¹⁰ m
1 b = 100 fm² = 10⁻²⁸ m²
1 bar = 0.1 MPa = 10⁵ Pa
1 Gal = 1 cm/s² = 10⁻² m/s²
1 Ci = 3.7 × 10¹⁰ Bq
1 R = 2.58 × 10⁻⁴ C/kg
1 rad = 1 cGy = 10⁻² Gy
1 rem = 1 cSv = 10⁻² Sv

表5 SI接頭語

倍数	接頭語	記号
10 ¹⁸	エクサ	E
10 ¹⁵	ペタ	P
10 ¹²	テラ	T
10 ⁹	ギガ	G
10 ⁶	メガ	M
10 ³	キロ	k
10 ²	ヘクト	h
10 ¹	デカ	da
10 ⁻¹	デシ	d
10 ⁻²	センチ	c
10 ⁻³	ミリ	m
10 ⁻⁶	マイクロ	μ
10 ⁻⁹	ナノ	n
10 ⁻¹²	ピコ	p
10 ⁻¹⁵	フェムト	f
10 ⁻¹⁸	アト	a

(注)

- 表1-5は「国際単位系」第5版, 国際度量衡局 1985年刊行による。ただし, 1 eV および 1 uの値は CODATA の1986年推奨値によった。
- 表4には海里, ノット, アール, ヘクタールも含まれているが日常の単位なのでここでは省略した。
- bar は, JISでは流体の圧力を表す場合に限り表2のカテゴリーに分類されている。
- EC閣僚理事会指令では bar, barn および「血圧の単位」mmHgを表2のカテゴリーに入れている。

換算表

力	N(=10 ⁵ dyn)	kgf	lbf
	1	0.101972	0.224809
	9.80665	1	2.20462
	4.44822	0.453592	1

粘度 1 Pa·s(N·s/m²) = 10 P(ポアズ)(g/(cm·s))
動粘度 1 m²/s = 10⁴ St(ストークス)(cm²/s)

圧	MPa(=10 bar)	kgf/cm ²	atm	mmHg(Torr)	lbf/in ² (psi)
	1	10.1972	9.86923	7.50062 × 10 ³	145.038
力	0.0980665	1	0.967841	735.559	14.2233
	0.101325	1.03323	1	760	14.6959
	1.33322 × 10 ⁻⁴	1.35951 × 10 ⁻³	1.31579 × 10 ⁻³	1	1.93368 × 10 ⁻²
	6.89476 × 10 ⁻³	7.03070 × 10 ⁻²	6.80460 × 10 ⁻²	51.7149	1

エネルギー・仕事・熱量	J(=10 ⁷ erg)	kgf·m	kW·h	cal(計量法)	Btu	ft·lbf	eV
	1	0.101972	2.77778 × 10 ⁻⁷	0.238889	9.47813 × 10 ⁻⁴	0.737562	6.24150 × 10 ¹⁸
	9.80665	1	2.72407 × 10 ⁻⁶	2.34270	9.29487 × 10 ⁻³	7.23301	6.12082 × 10 ¹⁹
	3.6 × 10 ⁶	3.67098 × 10 ⁵	1	8.59999 × 10 ⁵	3412.13	2.65522 × 10 ⁶	2.24694 × 10 ²⁵
	4.18605	0.426858	1.16279 × 10 ⁻⁶	1	3.96759 × 10 ⁻³	3.08747	2.61272 × 10 ¹⁹
	1055.06	107.586	2.93072 × 10 ⁻⁴	252.042	1	778.172	6.58515 × 10 ²¹
	1.35582	0.138255	3.76616 × 10 ⁻⁷	0.323890	1.28506 × 10 ⁻³	1	8.46233 × 10 ¹⁸
	1.60218 × 10 ⁻¹⁹	1.63377 × 10 ⁻²⁰	4.45050 × 10 ⁻²⁶	3.82743 × 10 ⁻²⁰	1.51857 × 10 ⁻²²	1.18171 × 10 ⁻¹⁹	1

1 cal = 4.18605 J(計量法)
= 4.184 J (熱化学)
= 4.1855 J (15 °C)
= 4.1868 J(国際蒸気表)
仕事率 1 PS(仏馬力)
= 75 kgf·m/s
= 735.499 W

放射能	Bq	Ci
	1	2.70270 × 10 ⁻¹¹
	3.7 × 10 ¹⁰	1

吸収線量	Gy	rad
	1	100
	0.01	1

照射線量	C/kg	R
	1	3876
	2.58 × 10 ⁻⁴	1

線量当量	Sv	rem
	1	100
	0.01	1

第4回イオンビーム生物応用研究ワークショップ論文集2005年6月22日、高崎研究所



古紙配合率100%
白色度70%の再生紙を使用しています