

マイクロビーム放射線照射法を利用した低線量（率）・低フルエンス照射に対するヒト正常細胞の細胞応答の線質依存性

放医研 鈴木雅雄、古澤佳也、鶴岡千鶴
 高エネ機構 小林克己、宇佐美德子、前田宗利
 原子力機構 舟山知夫、坂下哲哉、横田裕一郎、深本花菜
 群馬大・原子力機構 浜田信行、小林泰彦

Radiation-quality-dependence in bystander cellular effects on normal human cells induced by carbon-ion and X-ray microbeams.

Masao Suzuki¹⁾, Yoshiya Furusawa¹⁾, Chizuru Tsuruoka¹⁾, Katsumi Kobayashi²⁾, Noriko Usami²⁾, Munetoshi Maeda²⁾, Tomoo Funayama³⁾, Tetsuya Sakashita³⁾, Yuichiro Yokota³⁾, Kana Fukamoto³⁾, Nobuyuki Hamada^{3,4)}, Yasuhiko Kobayashi^{3,4)}

1) National Institute of Radiological Sciences, Inage, Chiba 263-8555

2) High Energy Accelerator Research Organization, Tsukuba, Ibaraki 305-0801

3) Japan Atomic Energy Agency, Takasaki, Gumma 370-1292

4) Gumma University, Maebashi, Gumma 371-8511

E-Mail: m_suzuki@nirs.go.jp

Abstract: We have begun to investigate cellular bystander responses in normal human fibroblasts induced by microbeams of different radiation types. This year, we used two different microbeams, such as carbon ions as high-LET radiations and X rays as low-LET radiations. Carbon-ion microbeams ($^{12}\text{C}^{5+}$, 220MeV) were generated with the Takasaki Ion Accelerators for Advanced Radiation Application (TIARA) at Japan Atomic Energy Agency. Mono-energetic X-ray (5.35keV) microbeams were produced with the Photon Factory (PF) at High Energy Accelerator Research Organization. We designed that only 0.2% of total cells was irradiated with each microbeam. The percent cell survival in microbeam-irradiated dishes was ranging from 83% to 94% for carbon ions, while around 100% for X rays. Mutation frequency for carbon-ion-microbeam irradiated cells was about 6 times higher than that for non-irradiated control cells, but there was no difference in mutation frequency between X-ray-microbeam irradiated and control cells. There is clear evidence that bystander cellular effects induced by low-dose radiations depends on a radiation quality.

Key words; microbeam, carbon ion, synchrotron radiation, bystander effect

1. はじめに

宇宙空間環境あるいは高高度飛行における宇宙船・航空機内での人体に対する放射線影響に限らず、原子力エネルギー利用や放射線廃棄物を源とする環境放射線に対する人体への放射線影響、がんの放射線治療や診断に代表されるような医療被曝に関わる放射線影響などは、今後ますます大きな問題になることが予想される。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のは、低線量・低線量率の照射効果であり、想定される放射線照射は、直接放射線のヒットを受けた細胞の周囲に放射線のヒットを受けていない細胞（バイスタンダー細胞）が共存する環境である。このような環境では近年話題となっているバイスタンダー効果が生物影響研究にとって重大な鍵を握っている。

直接放射線が照射された細胞に現れる生物影響が周囲の非照射細胞へも伝播するバイスタンダー効果の解明は、特にスペースシャトルや宇宙ステーションで被曝する可能性の高いHZE粒子の人体影響を明ら

かにするためには必要不可欠である。しかしながら放射線誘発バイスタンダー効果の誘導機構については、まだまだ不明な点が多く、現在は世界各国それぞれの研究室で断片的な状況証拠が集められているのが現状である。さらにはそれら研究の大多数が ^{238}Pu から放出されるアルファ粒子を利用した確率的低フルエンス照射実験やヘリウムイオンマイクロビームを利用した照射実験によるものであり、ヘリウムよりも原子番号の大きな核種のイオンビームによる低フルエンス照射の生物影響研究やバイスタンダー効果研究は現段階で非常に限られているのが現状である。

本研究は、ヘリウムよりも原子番号の大きな核種である炭素のマイクロビームを用いて、重粒子線低フルエンス照射に対する生物効果とそのバイスタンダー効果を明らかにすると共に、低LET放射線であるX線マイクロビームを用いて、低線量（率）・低フルエンス放射線照射の生物影響の線質依存性を明らかにすることを最終目的として計画した。

2. 研究方法

ヒト正常細胞は、理化学研究所 BioResource Center 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。細胞レベルの生物効果として、細胞致死はコロニー形成法による細胞の増殖死として検出した。突然変異誘発はX染色体上にマップされる *hprt* 遺伝子座を突然変異の標的として、6チオグアニン耐性コロニーの出現頻度より突然変異誘発頻度を算出した。炭素イオンマイクロビームは、日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所のTIARAサイクロトロンで加速された220MeV（細胞照射位置での推定LET=103keV/μm）を用いた。シンクロトロン放射光単色X線マイクロビームの照射は、高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設マイクロビーム照射装置（エネルギー5.35keV）を利用して行った。何れのマイクロビーム照射においても、直径36mmの照射用シャーレ面上にコンフルエント状態に培養した細胞に対して図1に示すような16x16=256点格子状に照射した。マイクロビームは、各照射点に対してビームサイズ直径20μmに8個の炭素イオンまたは0.4GyのX線を照射するように計画した。この照射方法により、同一照射野にマイクロビーム照射細胞と非照射細胞（バイスタンダー細胞）を共存させることが出来、全細胞集団の生物効果を評価してバイスタンダー細胞への生物効果を推定することによってバイスタンダー効果の有無を判定した。また、バイスタンダー効果誘導メカニズムを探る目的で、コンフルエント状態で細胞同士の接触による増殖阻止能が働く正常細胞の特性に注目し、ギャップジャンクションの特異的阻害剤を併用して、細胞間情報伝達機構のバイスタンダー効果への関与を調べた。

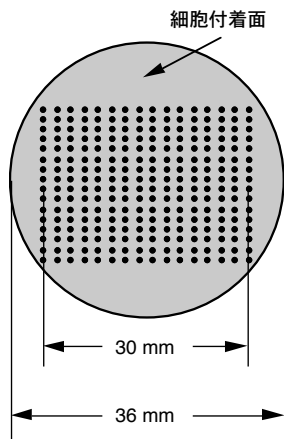


Fig.1 Designed microbeam-irradiation procedure using a 256 (16 x 16)-cross-stripe method. A microbeam dish was constructed with an aluminum ring of 36 mm diameter and attached 7.5 μm-thick polyimide film on the bottom of the ring. Eight ions of carbon and 0.4Gy of X rays were irradiated within each 20μm x 20μm beam size.

3. 結果及び考察

図2に細胞致死効果に対する結果を示す。炭素イオンマイクロビームでは、照射群の細胞生存率は、81-94%であった。また、照射時にギャップジャンクション特異的阻害剤を併用した場合は、生存率は100%前後であった。一方、放射光単色X線マイクロビームでは、照射単独群およびギャップジャンクション特異的阻害剤併用群いずれの場合も生存率は100%前後であった。

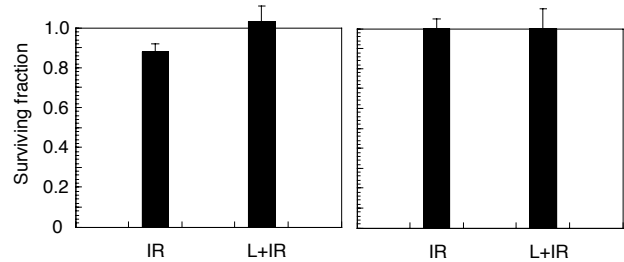


Fig.2 Cell-killing effects in normal human fibroblasts irradiated with either C-ion (left) or X-ray (right) microbeam treated with (IR+L) / without (IR) a specific inhibitor of gap-junction mediated cell-cell communication. Results presented are the mean and standard error of three or four independent experiments.

図3に突然変異誘発効果に対する結果を示す。炭素イオンマイクロビームではコントロールに対して約6倍高い突然変異の誘導が観察された。また、照射時にギャップジャンクション特異的阻害剤を併用した場合は、細胞致死効果と同様に突然変異誘発頻度はコントロールレベルまで減少した。一方、単色X線マイクロビームでは、照射単独群およびギャップジャンクション特異的阻害剤併用群いずれの場合も突然変異誘発頻度はコントロールレベルであった。

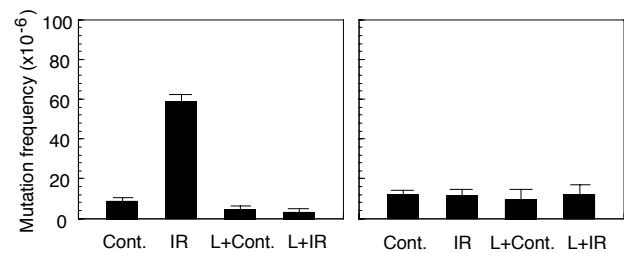


Fig.3 Mutation induction in normal human fibroblasts irradiated with either C-ion (left) or X-ray (right) microbeam treated with (IR+L) / without (IR) a specific inhibitor of gap-junction mediated cell-cell communication. Cont. means non-irradiated control cells. Results presented are the mean and standard error of three or four independent experiments.

今回得られた結果のうち炭素イオンマイクロビームにおいて、細胞致死および突然変異は炭素イオンが直接ヒットした細胞のみに生じ、非ヒット細胞には起

こらない、と仮定すると、イオンが照射された細胞が約 0.2%しか存在しない細胞集団に生ずる結果として説明することが出来ず、非照射細胞の一部にも二次的・三次的な何らかのメカニズムによって生物効果が誘導されたと考えることが必要となる。このことにより、炭素イオン照射された細胞集団において細胞致死および突然変異誘発効果にバイスタンダー効果が誘導されたと結論する。また、ギャップジャンクション特異的阻害剤を併用した実験結果から、観察されたバイスタンダー効果の誘導にはギャップジャンクシ

ンを介した細胞間情報伝達機構が密接に関与していることが示唆される。また、低 LET 放射線である X 線マイクロビームを用いた実験結果から、このような生物効果のバイスタンダー効果の誘導には、放射線の線質依存性が存在することが示唆される。

以上の結果から、宇宙空間において被曝する放射線の生物影響を正確に把握するためには、放射線の種類（電磁波放射線か粒子放射線か）やエネルギー（LET）の違いによる生物影響の違いを明らかにすることが必要不可欠であると考えられる。