

PF-UA 報告（今年度の活動）

庶務幹事 植草秀裕

2019年度4-7月運転が終わり、ひと段落というユーザーも多いのではないかと思います。PF-UAは、清水会長のもと、ユーザーの皆様の御協力をいただきながら第二年度の活動を進めて参ります。

2018年度はPF-UAの基礎である会則・細則を最近の情勢に合わせて整えました。その結果、3月の総会にて改定案をお認めいただきました。新しい会則・細則はホームページに掲載されておりますし、入会については、KRS上ですすでに対応を行っております。また、新しい会則・細則に基づき、IMSSとPF-UAとの相互協定に関する覚書を2019年4月に取り交わしております。

2019年度は引き続き、下記の活動を行う予定です。

- 1) 会則・細則の英語化
- 2) Webの整理と英語ページの作成
- 3) UGを予算的にサポートする方法の検討
- 4) 委員会の運営に関する規定を検討
- 5) 後期に次期会長の選出に関する手続きを開始する
今期は秋季に幹事会・運営委員会の開催を予定しております。

PF-UAの役割りは、UG活動のサポート、そしてPF-UA会員の声を施設側に届けることです。PF-UAの活動について、ご意見がございましたら、PF-UA事務局にご連絡いただけましたら幸いです。

今後ともPF-UAへのご参加、ご支援よろしく申し上げます。

放射線生物ユーザーグループの紹介

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 横谷明徳
東海大学 工学部 伊藤敦
国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 鈴木雅雄
電力中央研究所 原子力技術研究所 冨田雅典
国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 神長輝一
KEK 物構研 宇佐美徳子

1. 放射線生物ユーザーグループの目的と概要

本ユーザーグループ（以下、UG）は、単色X線・軟X線を利用して放射線生物作用の初期過程及び生物学的作用機構の解明を目指す研究の推進を図るため設立され、PFの発足当時から活動しています。近年の放射線利用技術の拡大及び医療・宇宙など放射線環境の増加に加え、2011年3月に発生した福島原発事故により、特に低線量放射線被ばくのリスクと作用機構を明らかにすることは喫緊の

課題となっています。放射線の線質による作用機構及び生物応答の相違、DNAの放射線損傷についても解明すべき点が多く、放射線生物影響のメカニズムの解明と放射線リスクの評価に関わる実験的知見の獲得は、放射光を利用した基礎研究と国民生活・社会との重要な接点でもあります。

本UGでは、高いエネルギー分解能を利用したDNAなどの生体分子の内殻イオン化とそれに応じた損傷生成や生体修復応答、及びマイクロビーム細胞照射技術を用いた照射部位限定法を主な研究手法とすることで、一般の放射線生物研究では実現できない技術的なブレイクスルーを実現し本研究領域を世界的に牽引してきました。ステーションに設置された装置運営の効率化を図るために、本年4月より、BL-27を主に利用する原子力科学UGとともに、ビームラインの分光光学系を含めた設備をPFと共同で運営するUG運営の体制に移行しました。

現在のUGの主な活動は次のようになります。

- BL-27Bに常設されたX線マイクロビーム（5.35 keV）を用いた生物試料照射装置の保守、高度化とユーザーの支援。
- BL-27Aに常設された軟X線（1.8～3 keV）の生物試料照射装置の保守、高度化とユーザーの支援。
- BL-27A、Bの側室に設置されている生物試料準備のための機器類の保守・管理とユーザー支援。
- BL-27以外のPFのビームラインを利用した、放射線生物影響研究のための利用実験。
- これらの装置や設備を利用する新規ユーザーの開拓と、PFシンポジウム（サイエンスフェスタ）や放射光学会などの機会を利用したユーザーグループミーティング及び研究会・セミナーの開催と情報交換。

以下に、本UGの研究課題のうち、最近得られた代表的な3課題について紹介します。

2. 軟X線誘発バイスタンダーシグナル伝達機構の解明 [2018G097]

従来、放射線生物影響は、放射線によりDNAに傷が生じることに起因するとして「標的理論」により説明されてきましたが、放射線によるDNAの初期応答に起因しない「非標的効果」がこの約30年間クローズアップされ、放射線防護上の意義が問題となっています。非標的効果の中でも、「放射線誘発バイスタンダー応答」は、放射線が照射された細胞の近傍に存在する、放射線がまったく照射されていない細胞にも、照射された細胞と類似の応答が生じる細胞間シグナル伝達の一つであり、臓器・組織内に照射細胞と非照射細胞が混在するような極低線量域でのリスクへの寄与が注目されていました。しかしながら、その議論に用いられた研究は、主に α 線などの粒子線を用いたもので

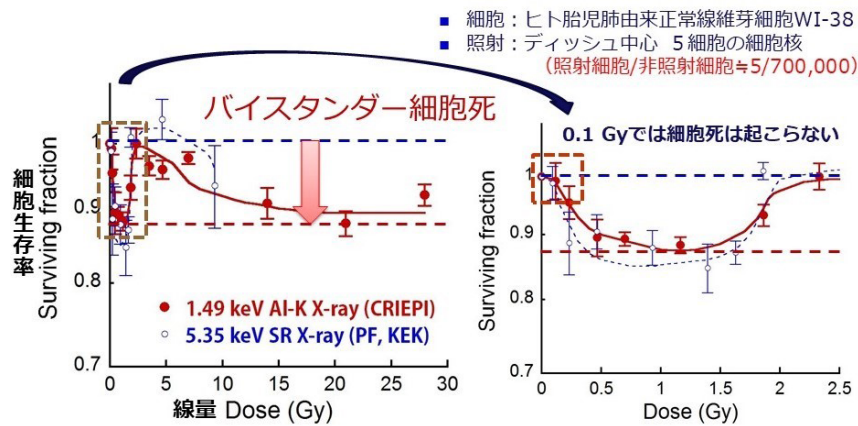


図1 マイクロビーム照射時のバイスタンダー細胞死の線量応答関係。1.49 keV Al-K X線 (CRIEPI) は、電中研のマイクロビーム装置を利用して得たデータ。右図は、左図の0 - 2.5 Gyの領域の拡大図。

あり、 γ 線やX線によるバイスタンダー応答については十分に明らかにされていませんでした。

本課題ではX線マイクロビーム細胞照射装置を用いることで、培養ディッシュ上の一部の細胞（例えばディッシュの中心付近の5細胞の細胞核）のみに線量を変えて照射した時の応答を詳細に調べることで、ヒト正常線維芽細胞やげっ歯類細胞に生じるバイスタンダー細胞死について詳細に解析してきました。その結果、X線によるバイスタンダー応答には特徴的な線量応答関係があることを明らかにしました。まず図1に示すように、数100 mGyを超えたところから全体の10-20%程度の細胞に致死（細胞分裂の不活性化）が生じたことから、バイスタンダー細胞死が誘発されたことがわかります。さらに線量が2~3Gyまで高くなると一旦生存率が非照射と同程度に回復し、さらに線量が高くなると再び低下し、その後は線量に依存せずに一定値を示す複雑な2層性の線量応答関係を示します [1]。逆に100 mGy以下の個々の細胞への放射線のヒットが不均一となるような線量域では、バイスタンダー細胞死は生じないことを示唆しています [2]。

なぜこのような複雑な線量応答を示すのかについては、まだ理解されていません。本課題では、この現象を分子メカニズムの面から裏付けるために、ヒト毛細血管拡張性運動失調症 (AT) の原因遺伝子産物であり、DNA 損傷シグナリングや細胞周期チェックポイント、細胞死誘導などに広く関与する ATM タンパク質の重要性に着目した研究を行っています。これまでに、細胞核のみ、細胞質のみ、細胞全体を照射した細胞の遺伝子発現解析などから、ATM がバイスタンダー応答を誘発する際の細胞外シグナル伝達だけでなく、細胞内シグナル伝達にも関与することを明らかにしつつあります (論文投稿準備中)。さらに詳細な実験を実施し、低線量域におけるバイスタンダー応答の解明を目指します。

3. マイクロビームを細胞質に限定的照射したときに誘導される細胞応答 [2017G695]

低線量下では、DNA が格納されている細胞の核ではな

く、細胞質のみに放射線のトラックが通過する確率も高いと考えられます。そこでPFのマイクロビームのユニークな特徴である、スリットを用いた任意のビーム形状を最大限利用し、ミトコンドリアや小胞体など細胞小器官が存在する「細胞質のみ」への線照射の効果を調べてきました。実験には国内の細胞バンクより購入したヒト由来正常線維芽細胞を用いました。30 μm \times 30 μm に絞ったX線マイクロビームに対してその中心部分に直径22 μm の金製ポストでX線を遮蔽したドーナツ状マイクロビームを作成しました。照射専用のマイラー膜を底とするディッシュに培養した細胞の核をあらかじめ蛍光染色により標識し、ドーナツ状マイクロビームの中心を照準して照射することによって、細胞質のみへのX線を照射を実現しました。まず最初に、全ての細胞の細胞質に対してドーナツ状マイクロビームを吸収線量が0.092 Gyとなるように照射しました(以下、前照射)。その後、3時間インキュベーター内で細胞を培養した後、今後は10 μm \times 10 μm に絞ったX線マイクロビームを細胞核に0.092 Gy照射し(本照射)、コロニー形成法により細胞致死効果を定量しました。得られた結果を基

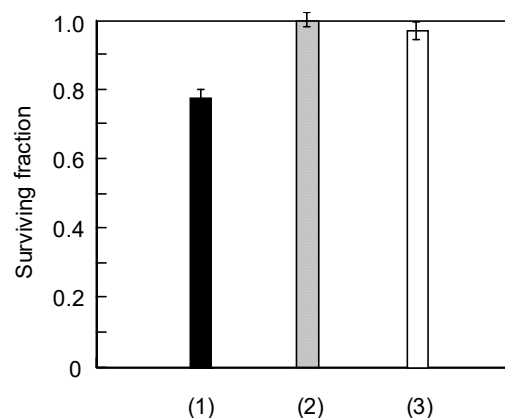


図2 細胞核、細胞質に限定的にX線を照射した時のヒト正常細胞の細胞致死効果。(1)細胞核のみに0.092 Gy照射,(2)細胞質のみに0.092 Gy照射,(3)細胞質に0.092 Gy照射→3時間炭酸ガスインキュベーター内で保持→細胞核に0.092 Gy照射場合を示す。

に、細胞質への前照射の有無により致死効果に違いが出るか否かを検証しました。

得られた結果を図2に示します。前照射せず、細胞核のみに0.092 Gy照射した時の生存率は、80%まで低下しました(図1の(1))。これに対し細胞質へのみ0.092 Gy照射(前照射)し、その後の細胞核への本照射を行わなかった場合、ほぼ生存率はほぼ100%でした(図1の(2))。これは、細胞質のみへの照射では細胞死が誘導されないことを示唆しています。さらに、前照射の後に細胞核照射を行った場合、生存率は97%となりました(図1の(3))。これは、統計学的には細胞質のみの場合と有意な差が無く、細胞が放射線に対して抵抗性を獲得したことを示しています。以上の結果から、細胞死を誘導しないような低線量のX線が予め細胞質に照射された場合、何らかの細胞応答が生じそれに引き続く細胞核照射による放射線損傷を軽減する効果(放射線適応応答)が誘導されていることが示唆されました。

4. 器官培養したマウス精巣に対するすだれ状X線マイクロビーム照射と精子形成に与える影響 [2017G565]

より生体に近い三次元的に構築された細胞組織として、実際のマウス胎児から取り出した精巣を器官培養し、これを試料として放射光X線マイクロビームを照射実施しました。組織レベルで「放射線がヒットする細胞とヒットしない細胞が混在する」状況を人為的に作り出すことで、不均一な放射線照射場が精子形成に与える生物学的影響について検討しました。当課題のグループの佐藤、小川らにより開発された、精子幹細胞から生殖能のある精子まで分化誘導を可能とする器官培養法を利用し[3]、分娩後7日目のAcr-GFPトランスジェニックマウスの精巣を摘出し、1 mm³程度の大きさのブロックに切り分けた後1.5%アガロースゲル上で培養しました。この器官培養(ex vivo)試料をPFに持ち込み、マイクロビーム照射を実施しました。X線は、横幅200 μmとする縦長ビームを400 μmの間隔で“すだれ”状に照射しました。質量エネルギー吸収係数から算出される試料に対するビームの透過率は約53%であり、照射部位の吸収線量は5 Gyでとなります。また比較のため、試料全体にX線2.5 Gyを照射した場合、及び非照射(コントロール)の場合についても同様に実験を行いました。照射後オフラインの蛍光顕微鏡を用いて、20日間に渡り試料の観察し、GFP蛍光発現により精子形成能を評価しました。

その結果、これまで実現不可能だった精子形成に対する不均一放射線照射場影響をリアルタイムで顕微鏡下に観察することに成功した。まず、精巣組織全体に均一にX線を照射して精子形成を検討し、線量依存的に精子形成が一次的あるいは永久的に阻害されるのが確認されました[4]。これらは臨床的に一時的不妊、永久不妊に相当するものと考えられます。さらに、マイクロビーム照射範囲を操作し、精巣体積約50%に当たるように5 Gyを照射した場合(すなわち2.5 Gy換算相当)と、2.5 Gyを全体に照射した場合で、精子形成阻害の程度に明らかな違い(Tissue-sparing

effects)が認められました(論文投稿中)。「放射線がヒットする細胞とヒットしない細胞が混在する」という不均一放射線照射場条件では、組織当たり同じ被ばく線量であっても精巣組織内の空間的な照射分布条件の差異によって精子形成に対する放射線影響が変わることが示されたこととなります。このように、組織レベルでの放射線被ばく応答を鑑みると、組織感受性が線量率(時間)、線量分布(空間)などの放射線被ばく条件によって変化する可能性が示唆されました。

参考文献

- [1] M. Tomita *et al.*, *Radiat Res.* **173**, 380-385 (2010).
- [2] M. Tomita & M. Maeda, *J Radiat Res.* **56**, 205-219 (2015).
- [3] T. Sato *et al.*, *Nature* **471**, 504-507 (2011).
- [4] Fukunaga *et al.*, *Radiat. Res.* **189**, 661-617 (2018).