

立教大学学術推進特別重点資金 (立教 S F R)
大学院生研究
2003年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院	理学	研究科	生命理学	専攻
指導教員	所属・職名	氏名			
	理学部・教授	檜枝 光太郎 印			
自然・人文の別	自然・人文	個人・共同の別	個人・共同	2名	
研究課題	重粒子線細胞核内イオントラックの可視化				
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年	氏名			
	理学研究科 ・博士後期課程1年	小西 輝昭 印			
研究組織	在籍研究科・専攻・学年	氏名			
	理学研究科 ・博士前期課程2年	竹安 明浩			
研究期間	2003 年度				
研究経費	473 千円				

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

重粒子イオン線には2つの特徴的な物理的性質がある。①イオンの飛跡(イオントラック)に沿って密かつ局所的に電離・励起を引き起こす。②イオンの止まり際において急激なLETの上昇(Braggピーク)を示す。この性質を利用して、放射線医学総合研究所では、がん治療装置HIMACを用いたがん治療が開始され、有効性が明らかにされつつある。しかし、重粒子イオンの生体内でのイオントラック構造という生物効果を明らかにする上で最も基本的な情報がほとんど得られていない。そこで、我々は哺乳類細胞に重粒子イオンを照射し、細胞核に生じるDNA損傷を可視化して、イオントラック構造を解明することを考えた。具体的には、DNA主鎖切断を免疫蛍光染色法で可視化して、イオントラック構造を解明する。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[重粒子イオン] [DNA主鎖切断] [Tuna1法]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

放医研 HIMAC (千葉市) にある中エネルギービームコースを用いてすべての照射実験を行った。この中エネルギービームコースでは主に 6 MeV/n の He、C、Ar、Fe、Xe、Kr の低エネルギー重粒子イオンを空气中に引き出すことが出来る。まずは、Ar イオンまたは Fe イオンを用いて照射実験を行った。Ar と Fe イオンの LET (線エネルギー付与) は大きく (Ar: 1500-3000 keV/μm、Fe: 3500-7000 keV/μm)、He と C イオンよりも効率よく dsb を誘発すると考えられた。照射実験には HeLa (人ガン細胞) 細胞と CV-1 (アフリカ緑ザル腎由来) 細胞を用いた。2003 年度は、以下の [1]-[3] を明らかにすることを目標とした。個々について以下に報告する。

[1] Ar および Fe イオンの両方のイオンについて、照射線量に対する細胞の生存率変化 (生存率曲線) を測定し、それぞれのイオンの細胞致死効果を明らかにすることを目的にした。

HeLa 細胞および CV-1 細胞に Ar (LET: 2,500 keV/μm) イオンまたは Fe イオン (LET: 4,700 keV/μm) を照射後、コロニー形成法を用いて生存率を測定した。CV-1 細胞は、その細胞の性質上コロニーを形成しなかったため、同様の手法による生存率曲線は得られなかった。HeLa 細胞への照射実験は Ar イオンで 1 回、Fe イオンで 3 回行った。横軸: フルエンス (ion/m²)、縦軸: 生存率として、片対数グラフにプロットした。生存率は、フルエンスに対して直線的な減少を示したことから、以下の式で曲線フィットした。この生存率曲線は、

$$S = \exp(-\sigma \times F) \quad S: \text{生存率} \quad F: \text{フルエンス}$$

で表される。σ: 作用断面積である。これは、重粒子イオンによる細胞致死効果の指標である。HeLa 細胞に Ar イオンおよび Fe イオンを照射した際、作用断面積は、 8.38×10^{-11} 、 $(9.80 \pm 0.06) \times 10^{-11}$ (m²) であり、HeLa 細胞の細胞核 (217 μm²) あたり Ar イオンは 2.6 イオン、Fe イオンは 2.2 イオン照射されると致死が誘発されることがわかった。

研究成果の概要 つづき

【2】 照射後の細胞に免疫蛍光染色法を用いて、細胞核内に誘発された DNA 主鎖切断を可視化することを目的とした。具体的には、照射後の細胞をすぐに固定し、タンネル法を用いて、イオンによって誘発された細胞核内主鎖切断末端に BrdU を TdT (terminal deoxynucleotidyl tranferase) を用いて連結させた。その BrdU を特異的に認識する anti-BrdU-FITC 標識抗体を用いて蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像を取得した。取得した照射後の細胞核画像には FITC の蛍光を示す領域がフォーカス(点状)に現れた。X 線や γ 線を照射し、同様の処理をして得られた細胞核画像では、重粒子イオンを照射した場合とは異なり、蛍光フォーカスを示すことはなく、細胞核全面が FITC の蛍光を示した。つまり、イオン照射によって誘発された DNA 主鎖切断は、局所的に誘発されていることを明らかにした。

【3】 前述したように、Ar イオンおよび Fe イオン照射した細胞核を免疫蛍光処理後、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、誘発された DNA 主鎖切断が蛍光フォーカスとして確認できた。そこで、1 イオンが細胞核内を通過するとその飛跡に沿って主鎖切断が誘発され、一個の蛍光フォーカスとして確認できるのかを調べた。共焦点顕微鏡で取得した画像から 細胞核内に認識できたフォーカス数と細胞核あたりの照射イオン数を比較した。その結果、CV-1 細胞に Ar イオンまた Fe イオンを照射した場合、観察されたフォーカス数と細胞核あたりの照射イオン数の比はそれぞれ 0.91 ± 0.02 、 0.91 ± 0.02 を示し、ほぼ 1 であることからイオントラックに沿って必ず DNA 主鎖切断が誘発されていることを統計的に証明した。

【結論】

Bragg ピーク近傍の Ar イオンおよび Fe イオンは細胞核を通過する際、そのイオントラックに沿ってかならず DNA 主鎖切断を誘発する。さらに細胞致死には細胞核あたり 2 イオン以上通過しなければ引き起こされない。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)

②図書 (著者名、出版者、書名、発行年、総ページ数)

③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)

④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

①

H. Yamaguchi, Y. Sato, H. Imaseki, N. Yasuda, T. Hamano, Y. Furusawa, M. Suzuki, T. Ishikawa, T. Mori, K. Matusumoto, **T. Konishi**, M. Yukawa, F. Soga. **Single Particle irradiation system to cell (SPICE) at NIRS**. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. **210**: 2003, 292-29

竹安明浩、小西輝昭、石澤紗智、山浦晋、松本健一、小口靖弘、安田仲宏、佐藤幸夫、古澤佳也、檜枝光太郎。CR-39を利用した細胞核内イオン通過部位とDNA主鎖切断部位の比較。放射線 **Vol. 29**, No3. (2003)

④

Traversal of single Iron Ion through the Nucleus of Mammalian Cell Induces γ -H2AX Focus and 0.45 Lethal Hit

T. Konishi¹, Akihiro Takeyasu¹, S. Yamaura¹, S. Ishizawa¹, N. Yasuda², Y. Sato², Y. Furusawa², and K. Hieda¹ (1 Life Science Dpt., Rikkyo University, 2 National Institute of Radiological Sciences); 12th International Congress of Radiation Research, Brisbane, Australia, 2003

DNA strand breaks induced by ions near the Bragg peak - Are DSBs induced more efficiently than SSBs?

¹Takashi Fujisaki, ¹**Teruaki Konishi**, ² Yukio Sato, Japan, ² Nakahiro Yasuda, ² Yoshiya Furusawa, and ¹ Kotaro Hieda. (1 Life Science Dpt., Rikkyo University, 2 National Institute of Radiological Sciences); 12th International Congress of Radiation Research, Brisbane, Australia, 2003

Each Ion Traversal Induces a DSB Cluster in Cell Nucleus.

Akihiro Takeyasu¹, **Teruaki Konishi**¹, Izumi KOYAMA¹, Toshiyuki NATSUME¹, Kenichi MATSUMOTO², Nakahiro YASUDA³, Yukio SATO³, Yoshiya FURUSAWA³, Kotaro HIEDA¹ (1Dept. Sci. Rikkyo Univ.; 2 Depth Sci. Toho Univ.; 3 National Inst. Radiological Sci.), 日本放射線影響学会 第46大会 京都