

氏 名 前田 宗利

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 987 号

学位授与の日付 平成 18 年 9 月 29 日

学位授与の要件 高エネルギー加速器科学研究科 物質構造科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 放射光 X 線マイクロビーム細胞照射装置を用いた低線量域  
における細胞の放射線応答の研究

論文審査委員 主 査 助教授 加藤 龍一  
助教授 小林 克己  
教授 若槻 壮市  
教授 飯田 厚夫  
助教授 間瀬 一彦  
チーム 古澤 佳也（放射線医学総合  
リーダー 研究所）

## 論文内容の要旨

### 放射光X線マイクロビーム細胞照射装置を用いた低線量域における細胞の放射線応答の研究

#### 1. 研究の背景

近年の研究から、低線量放射線に暴露された細胞において、照射された細胞の数世代後におこる遺伝的不安定性、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において生物影響が生ずるバイスタンダー効果、事前の低線量照射により細胞に放射線耐性が誘導される適応応答などの新しい現象が発見された。これらの現象は、放射線被曝によって生ずるDNA損傷とその修復の結果として、放射線に暴露された細胞のみに放射線生物作用が生ずるという従来の考え方だけでは説明できず、そのメカニズムは十分に解明されていない。人間が社会生活を通じて年間に被曝する線量は、世界平均で2.8 mSvであり、これらの避けられない放射線被曝による人体の健康への影響を正しく理解するためには、低線量放射線に対する生物応答メカニズムを解明する必要がある。また、地球上には、環境からの放射線が常に存在するため、生物は、その誕生以来常に低線量放射線にさらされてきた。生物が、自己増殖を行うためには、遺伝情報が安定に保持されなければならない。有害なDNA損傷を修復する機構は、生物の進化のかなり早い段階で獲得され、保存、あるいは効率のよい修復機構へ進化してきたと考えられる。生物の基本構成単位である細胞の低線量放射線に対する応答メカニズムの解明は、「生命」を理解し、その起源と進化を追究する上でも必要不可欠な情報であると考えられる。

#### 2. 研究の目的

生物の放射線応答は、生体を構成する各成分の放射線応答が複合的に作用した結果である。放射線応答メカニズムを理解するためには、生物の基本構成単位である細胞の放射線応答メカニズムを解明する必要がある。放射線生物学では、従来、細胞集団に対する一様な放射線照射から得られた細胞集団の放射線応答を細胞の放射線応答として取り扱ってきた。低線量域では照射された細胞と照射されていない細胞が混在している。このため、低線量放射線による細胞の放射線応答メカニズムを解明するためには、細胞集団の放射線応答を被曝した細胞内のみで完結される反応ではなく、“個々の照射された細胞の応答”と、“照射された細胞から周辺の細胞に対する情報伝達の結果現れる応答（バイスタンダー効果）”による複合的な作用と捉え、それぞれのメカニズムを明らかにする必要があると考えられる。本研究では、照射された細胞の生存率と周辺の未照射細胞の生存率、すなわち、バイスタンダー効果による細胞死を測定し、低線量域における細胞死のメカニズムを明らかとすることを目的とした。

#### 3. 実験結果

細胞照射実験には、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の小林克己助教授らによって開発された、放射光X線マイクロビーム細胞照射装置を用いた。この装置では、5ミクロン角以上の任意のビームサイズの5.35 keV単色X線マイクロビームを細胞あるいは細胞核の一部に照射し、それらを個別に追跡して照射効果を検出することができる。本研究では、X線マイクロビームによって細胞核、あるいは細胞全体を照射し、照射された個々の細胞の生存率を測定し、X線の照射を受けた細胞の細胞死のメカニズムを検討した（II章）。また、X線マイクロビームによって細胞核、あるいは細胞全体を照射した細胞からのバイスタンダーシグナルによる情報伝達について、同様に生存率を測定し、そのメカニズムの検討を行った（III章）。

50ミクロン角のX線マイクロビームで細胞全体を照射した場合の生存率曲線は、5.35 keVのX線を用いて細胞集団を一様に照射した場合の生存率曲線とよく一致しており、生存率は線量の増加と共に単調に減少した。一方、10ミクロン角のX線マイクロビームで細胞核のみを照射した場合、照射線量の増加に伴う単調な減少ではなく、低線量域で線量と共に最初は生存率が減少するが、その後若干回復した後、再度線量と共に減少する低線量高感受性を顕著に示した。また、細胞核のみを照射した場合、バイスタンダー効果による周辺の未照射細胞の致死は、線量の増加に伴い一過的に増大し、その後回復して安定した。一方、細胞全体を照射した場合には、単調に減少し、その後線量と無関係に安定した。

#### 4. まとめ

低線量高感受性は、細胞のDNA修復機構と密接に関係しており、細胞全体が照射された場合、細胞質へのエネルギー付与によって細胞の修復活性が誘導され、DNA損傷の修復が促進されることによって低線量高感受性が抑制されると考えられる。また、バイスタンダーシグナルの生成には修復系が関与していることが知られている。照射された細胞における低線量高感受性と同様に、細胞質へのエネルギー付与がない場合に、低線量域でのバイスタンダー効果による致死の増大が起きることから、両者の誘導には同様のメカニズムが関与していると考えられる。本研究から、細胞核のみを照射された細胞における低線量高感受性およびバイスタンダー効果の増大は、修復系の誘導がない場合に見られ、この修復系の制御には細胞質へのエネルギー付与が関与することが明らかとなった。

本論文は、最近新しい知見が報告されている低線量放射線の生物影響の発現機構を放射光X線マイクロビーム照射装置を用いて研究したものである。

細胞に放射線を照射すると、遺伝情報を担うDNA分子に損傷が出来、それに対して細胞の修復作用が働き、修復できなかった損傷が残ることによって細胞死や突然変異などの生物影響が現れると考えられている。しかし最近になって低線量域では、照射された細胞の近傍で照射されていない細胞に放射線影響が見られるバースタンダー効果、低線量照射された細胞で一過的に生存率が低下する低線量高感受性、数世代後に影響が現れる遺伝的不安定性、等が見られることが報告されてきた。本論文ではバースタンダー効果および低線量高感受性に着目して、その線量依存性からこれらの生物影響の発現機構に関する研究を行った。

この研究で重要な研究手法となっている放射光単色X線マイクロビーム細胞照射装置は、標的となる個々の細胞を認識して、個別に照射し、それぞれの影響を個別に追跡できる装置であり、バースタンダー効果の研究には必須の装置である。

マイクロビーム照射装置を用いて細胞死を計測する手順とこれまで一般的に用いられてきた方法とは異なるために、本研究ではまずマイクロビーム照射法で用いる単一コロニー形成法で得られる結果がこれまでの方法で得られる結果と同じであることを示すことから始めている。利用したマイクロビーム照射装置の特長であるビームサイズ可変であることを利用して、50 $\mu$ m角のビームで細胞全体を照射して、生存率がこれまでの結果と同じであること確認した。次に10 $\mu$ m角のビームで細胞核を照射した場合には、細胞核内での平均線量を基に比較すると、高線量域ではほぼ同じ線量生存率曲線となるが、低線量域では10 $\mu$ m角で照射した場合に0.5Gyで60%程度にまで生存率が減少し、その後若干回復した後、再度線量とともに減っていくという低線量高感受性が非常に顕著に現れた。照射条件の差は細胞全体が照射されたか細胞核のみが照射されたかという点だけなので、低線量高感受性の原因となる修復作用誘導の遅れが細胞全体照射によって少なくなる、あるいは細胞質照射によって修復作用が誘導されるという結論が得られた。細胞質に放射線センサーの役割をするものが有ることが示唆された。

次に、10 $\mu$ m角のビームで細胞核のみを照射した場合と50 $\mu$ m角のビームで細胞全体を照射した場合に、それらの照射された細胞の近傍にいて照射されていない細胞におけるバースタンダー効果による細胞死誘導を比較した。細胞全体を照射した場合は線量と共に徐々に減少して93%程度で定常状態になるのに対して、細胞核のみを照射した場合には0.8Gy程度で90%に減少し、その後96%程度に回復して安定するという結果が得られた。この場合も細胞核のみを照射した時に一過性の細胞死増加現象が見られた。このことと上記の低線量高感受性の顕著な誘導が、どちらも同じ線量域で見られること、および細胞全体照射でどちらも抑えられることから、両者の誘導には共通するメカニズムが関与していると結論した。また、特異的な阻害剤を用いた実験からバースタンダーシグナルがNOラジカルであることも証明した。

以上により、マイクロビーム照射法を用いることによって、細胞質へのエネルギー付与が低線量放射線に対する生物応答の決定に重要な役割を果たしていることが明確に示され、放射線生物学の分野に新しい知見を加えることが出来たと認められる。従って審査委員会は全員一致で以上の研究は博士學位論文として適切なものであると判断した。