



Title	Radiation Biological Application of Laser Plasma X-ray Source
Author(s)	佐藤, 克俊
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58146">https://hdl.handle.net/11094/58146</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【10】	
氏 名	佐 藤 克 俊
博士の専攻分野の名称	博 士 (保健学)
学 位 記 番 号	第 24454 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科保健学専攻
学 位 論 文 名	Radiation Biological Application of Laser Plasma X-ray Source (レーザープラズマX線源の放射線生物学応用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 手島 昭樹 (副査) 教 授 松浦 成昭 教 授 中谷 敏

#### 論 文 内 容 の 要 旨

放射線照射技術や治療計画の発展に伴い、早期のがんでは外科手術に匹敵するまでの治療成績が得られている。この様な物理工学的な研究に加え、放射線治療成績の向上を目指して放射線生物学的研究も積極的に行われている。しかし、実験手技や治療技術の発展と同時に、これまで報告されてこなかった新しい現象や

放射線生物学的な問題等も次々と明らかになっており、がん細胞における放射線生物学的効果の解明のために更なる研究が必要とされている。特に、近年、放射線照射を直接的に受けた細胞だけでなく、照射を受けていない周辺の細胞においても、まるで放射線照射を受けた様な現象が誘発されることが報告されている。これはバイスタンダー効果と呼ばれており、これまで染色体異常、突然変異、DNA損傷反応など様々な影響として同定されている。しかし、生体や腫瘍におけるバイスタンダー効果の意味や役割は未だ不明である。従って、放射線照射によって生じるバイスタンダー効果の発生機構の解明は、放射線生物影響の解明や放射線治療成績の向上にとって非常に重要である。現在、これらの解明を目的とした研究も数多く展開されているが、これらの研究で一般的に利用されているX線管や医用直線加速器は、照射終了までに少なくとも数分間を費やすことから照射直後から細胞を観察できず、また、その照射野が比較的広い。このためバイスタンダー効果や放射線照射後に引き起こされる細胞間情報伝達について高い信頼性をもって評価することは難しい。

近年のレーザー技術の発展に伴い、レーザープラズマX線や軟X線レーザーのような高強度超短パルスX線が利用できるようになった。レーザープラズマX線は、一般的に利用されているX線管と比較して、1パルスがピコ( $10^{-12}$ )秒程度であり、かつパルスあたりの輝度が高く、単色エネルギー、集光可能であるという特徴を持つ。また、軟X線レーザーは、その指向性は非常に良く、可干渉性を持つ。この様な特徴から、レーザープラズマX線や軟X線レーザーはある領域を特異的に照射する細胞照射様マイクロビーム照射装置に最適である。本研究では、レーザープラズマX線源の医学生物学研究応用を目的として、レーザープラズマX線および軟X線レーザーを用いた培養細胞照射用のX線マイクロビーム照射装置を開発し、放射線照射によって引き起こされるがん細胞におけるDNA二本鎖切断およびバイスタンダー効果に関する評価を行った。

はじめに、レーザープラズマX線マイクロビーム照射装置の開発を行い、レーザープラズマX線の放射線生物学影響を、従来利用されているX線による影響と比較した。レーザープラズマX線を発生させるため、日本原子力研究開発機構のTi:Sapphireレーザーを銅ターゲット上に集光させ、銅のK $\alpha$  X線(8 keV)を発生させた。発生させたレーザープラズマX線をポリキヤピラリーX線レンズにより培養細胞上へ集光照射した。培養細胞としてヒト肺腺がん細胞株A549を用いて、照射後に引き起こされるDNA二本鎖切断部位を評価した。細胞が放射線照射を受け、これによりDNA二本鎖切断が生成されると、DNA二本鎖切断の修復に関与するタンパク質であるヒストンH2AXおよびAtaxia telangiectasia mutated(ATM)がリン酸化され、DNA二本鎖切断部位に集積する。本研究では、リン酸化型H2AX( $\gamma$ -H2AX)およびリン酸化型ATM(p-ATM)をDNA二本鎖切断部位の指標とし、これらの抗体を利用して免疫蛍光染色法を行うことにより $\gamma$ -H2AXおよびp-ATMの集積部位( $\gamma$ -H2AXおよびp-ATMフォーカス)を計測してDNA二本鎖切断生成数を定量化した。照射30分後、抗 $\gamma$ -H2AXおよびp-ATM抗体を用いた免疫蛍光染色法を行い蛍光顕微鏡により観察した結果、X線スポットに一致する領域において $\gamma$ -H2AXフォーカス陽性細胞が明瞭に同定された。また、既存のX線発生装置として医用直線加速器からのX線(1.7 MeV)を照射した場合の $\gamma$ -H2AXおよびp-ATMフォーカス数と、レーザープラズマX線によるフォーカス数と比較した。その結果、レーザープラズマX線照射によって引き起こされた $\gamma$ -H2AXおよびp-ATMのフォーカス数は、1.7 MeV X線照射によるフォーカス数とほぼ同等であることが示された。この結果により、レーザープラズマX線は既存の装置と同様に放射線生物学研究において利用可能であることが示された。

また、レーザープラズマX線のX線スポット径の縮小および線量率を向上させ、がん細胞に引き起こされるバイスタンダー効果に関する研究を行った。現在、様々な影響がバイスタンダー効果として同定されているが、それらの多くが培養細胞に何らかのストレスが与えられた結果として発生した現象とみなすことができ

る。そこで、ストレス反応で重要な役割を果たすp53をバイスタンダー効果の指標として、直接的に照射を受けた細胞(標的細胞)と実際には照射を受けていない細胞(非標的細胞)におけるp53の核内移行を評価した。ここで、照射後に抗 $\gamma$ -H2AX抗体と抗p53抗体による二重染色を行い、 $\gamma$ -H2AXフォーカス陽性細胞を標的細胞、 $\gamma$ -H2AXフォーカス陰性細胞を非標的細胞とみなし、両者におけるp53の発現および局在の変化について評価を行った。その結果、照射2時間後に、標的細胞だけでなく本来照射を受けていないはずの非標的細胞においてもp53の核内移行が確認された。興味深いことに、p53の核内移行は、標的細胞に隣接していない、比較的離れた場所に位置する非標的細胞においても確認された。以上の結果から、放射線照射によって引き起こされるバイスタンダー効果にはp53が深く関与することが明らかとなった。しかし、本研究では、X線の集光にポリキヤピラリーX線レンズを利用しており、培養細胞上の集光点におけるX線強度分布がガウス分布に従うため、培養細胞上におけるX線スポットの境界を明確に区別することができなかった。この問題は微視的な領域に照射を行うマイクロビーム照射装置にとって非常に重要なことから今後の研究課題であると言える。

レーザープラズマX線マイクロビーム照射装置に加えて、本研究では軟X線レーザーを用いたX線マイクロビーム照射装置の開発も行った。軟X線レーザーとして日本原子力研究開発機構で開発されたダブルターゲット方式のニッケル様銀イオンレーザー(89 eV)を用いた。培養細胞としてヒト肺腺がん細胞株A549を用いた。軟X線レーザーのエネルギーは89 eVと非常に低いことから、大気中や水中を透過できない。そこで、培養細胞基質である厚さ100 nmの窒化シリコン(SiN)膜をマイクロビーム照射装置の真空窓として利用できる照射線量専用ディッシュを新たに開発し、照射実験を行った。本研究では、軟X線レーザーの照射によりDNA二本鎖切断が生成されるかどうかを検証するために、p-ATMまたはリン酸化型DNA dependent protein kinase catalytic subunit (p-DNA-PKcs)フォーカス形成を調査した。その結果、わずか1ショットの軟X線レーザーの照射によりp-ATMおよびp-DNA-PKcsフォーカス形成が確認され、ショット数の増加に伴いこれらのフォーカス数が増加することが明らかとなった。軟X線レーザーが細胞に入射した場合、99%以上の光子が約1  $\mu$ mの飛程内において吸収される。すなわち、光子は核にほとんど到達せず、細胞膜もしくは細胞質でほとんどの光子が吸収される。これは細胞膜や細胞質に非常に大きなX線エネルギーが付与されたことを意味している。本研究により、細胞膜や細胞質に対するエネルギー付与はDNA損傷応答を誘発する可能性があることが示された。しかしながら、軟X線レーザーの細胞内における伝搬距離や吸収線量などを正確に計算する必要があることも同時に示された。

本研究ではレーザープラズマX線の医学応用の可能性を、培養細胞を用いた実験により世界で初めて実証し、レーザープラズマX線源の医学利用のための基盤を築いた。現在、高輝度単色X線は大型放射光施設を中心としてその開発や医学応用を目指した基礎的研究が展開されているが、レーザー駆動による単色X線源を開発できれば、従来の大型放射光施設よりも格段に小型、安価、そして高輝度なX線源として医学、生物学をはじめとして創薬や工業分野などに大きく貢献できる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は高強度レーザーを用いて生成されるレーザープラズマX線源、特にレーザープラズマX線と軟X線レーザーを放射線生物学研究、さらには医学研究へ応用するための研究である。レーザープラズマX線は、1パルスがピコ( $10^{-12}$ )秒程度であり、高輝度、単色エネルギー、集光可能であるという特徴を持つ。また、軟

X線レーザーは指向性が良く、可干渉性である。本研究では、レーザープラズマX線および軟X線レーザーを用いた培養細胞照射用のX線マイクロビーム照射装置を開発し、それを用いて培養細胞を照射し、引き起こされる放射線生物学的效果を評価した。はじめに、レーザープラズマX線マイクロビーム照射装置の開発を行い、レーザープラズマX線の放射線生物学的效果を一般的に利用されているX線を用いた場合と比較した。

Ti:Sapphireレーザーの銅ターゲット上への集光により発生した銅の $K\alpha$  X線(8 keV)をポリキャビラリーX線レンズにより培養条件下のヒト肺腺がん細胞株A549へ集光照射した。その後、DNA二本鎖切断修復タンパク質の一つである $\gamma$ -H2AX(phosphorylated histone H2AX)の免疫蛍光染色を行い、DNA二本鎖切断部位を可視化した。その結果、直径約900  $\mu$ mの範囲に $\gamma$ -H2AX陽性細胞が検出された。この範囲は、フィルム法によって測定されたX線集光径とほぼ一致した。また、レーザープラズマX線照射により生じたリン酸化ATM(p-ATM; phosphorylated ataxia telangiectasia mutated)と $\gamma$ -H2AXフォーカス数を計測した結果、その数は既存のX線(1.7MeV X線)を照射した場合とほぼ同等であることが示された。この結果により、レーザープラズマX線は既存の装置と同様に放射線生物学研究において利用可能であることが証明された。

レーザープラズマX線マイクロビーム照射装置に加えて、本研究では軟X線レーザー(90 eV)を用いたX線マイクロビーム照射装置の開発も行った。軟X線レーザーのエネルギーは90 eVと非常に低いことから大気中や水中を伝搬できない。そこで、大気や水による減弱を無視して細胞を照射できる軟X線レーザー照射専用ディッシュを新たに開発して細胞照射実験を行った。軟X線レーザーをヒト肺腺がん細胞株A549に照射し、その後、DNA二本鎖切断修復タンパク質であるp-ATMおよびリン酸化DNA-PKcs (p-DNA-PKcs; phosphorylated DNA dependent protein kinase catalytic subunit) の免疫蛍光染色を行った結果、わずか1ショットの軟X線レーザーの照射によりp-ATMおよびp-DNA-PKcsフォーカス形成が確認された。さらに、ショット数の増加に伴いこれらのフォーカス数が増加することが明らかとなった。軟X線レーザーが細胞に入射した場合、99%以上の光子が約1  $\mu$ mの飛程内において吸収される。言い換えれば、細胞膜もしくは細胞質に多大なX線エネルギーが付与される。本研究により、細胞質や細胞膜へのエネルギー付与がDNA二本鎖切断もしくはこれに関連する反応を引き起こす可能性が示された。しかしながら、核に到達した一部の光子がDNA二本鎖切断を誘発させた可能性も十分に考えられるため、軟X線レーザーの細胞内における伝搬距離や吸収線量を正確に計算する必要性があることも同時に示された。

本研究ではレーザープラズマX線の医学応用の可能性を、培養細胞を用いた実験により世界で初めて実証し、レーザープラズマX線源の医学利用のための基盤を築いた。現在、高輝度単色X線は大型放射光施設を中心としてその開発や医学応用を目指した基礎的研究が展開されているが、レーザー駆動による単色X線源を開発できれば、従来の大型放射光施設よりも格段に小型、安価、そして高輝度なX線源として医学、生物学をはじめとして創薬や工業分野などに大きく貢献できる。以上のことにより、本論文は博士(保健学)の学位授与に値するものと考えられる。