課題番号　2013B—E36

軟Ｘ線レーザーの放射線生物学研究応用

Radiobiological application of 89 eV soft X-ray laser

佐藤　克俊[1)]、下川　卓志[1)]、今井　高志[1)]、錦野　将元[2)]

Katsutoshi SATO, Takashi SHIMOKAWA, Takashi IMAI, Masaharu NISHIKINO

[1)] 放射線医学総合研究所、重粒子医科学センター、先端粒子線生物研究プログラム　[2)] 日本原子力研究開発機構、量子ビーム応用研究部門、X 線レーザー応用研究グループ

（概要）

軟Ｘ線レーザーを用いた放射線生物学研究の基盤形成を目的として、軟 X 線レーザーを用いた培養細胞照射装置を開発した。その装置を用いて軟 X 線レーザーにより誘発される DNA 損傷の種類の同定、活性酸素種の発生、細胞膜の脂質過酸化について評価した。その結果、培養細胞に対する軟 X 線レーザーの照射は DNA 二本鎖切断（DSB）を誘発することが明らかとなった。しかし、DNA 一本鎖切断（SSB)、活性酸素種（ROS）の発生、細胞膜の過酸化反応は、利用した方法の感度や分解能などの限界により検出することができなかった。

キーワード：

軟 X 線レーザー、DNA 二本鎖切断

１．目的

軟 X 線レーザーの照射によって誘発される DNA 損傷として DNA 一本鎖切断（SSB)、DNA 二本鎖切断（DSB）の発生に着目して解析する。さらに、照射により起こる活性酸素種の発生や細胞膜脂質の過酸化を解析する。これにより軟 X 線レーザーの照射によりどのような損傷が細胞に起こるかを明らかにする。

２．方法

ヒト肺腺がん細胞株 A549 を 100 nm 厚の窒化シリコン（SiN）膜上に撒き、細胞が接着した SiN 膜を軟 X 線レーザー照射用ディッシュに設置し、5 ショットの軟 X 線レーザー (89 eV) を照射した。照射終了 30 分後に DNA 二本鎖切断(DSB)のマーカーとして抗γ-H2AX(Cell signaling technology)、リン酸化 DNA-PKcs(p-DNA-PKcs)(Abcam)、リン酸化 ATM(p-ATM)抗体(Abcam)、DNA 一本鎖切断（SSB）のマーカーとして抗 XRCC1 抗体(Abcam)を用いた免疫染色を行った。さらに、CellRox®（Life technologies）を用いた活性酸素種(ROS)、Click-iT® Lipid Peroxidation Imaging Kit®（Life technologies）を用いた細胞膜脂質の過酸化反応の検出を行った。

３．結果及び考察

5 ショットの軟 X 線レーザーを A549 細胞に照射した結果、p-DNA-PKcs フォーカスが明確に検出された。さらに、軟 X 線レーザー照射によるγ-H2AX や p-ATM フォーカス形成も再現性良く検出できた。しかし、軟 X 線レーザー照射による XRCC1 のフォーカス形成、ROS の発生及び細胞膜脂質の過酸化反応は検出できなかった。XRCC1 フォーカス形成、ROS 発生、脂質過酸化が検出できなかった理由は、本研究で用いた方法の検出感度や分解能が不十分であったことが考えられる。これらを検出するためには、検出方法の改良が必要である。

細胞核内のγ-H2AX、p-DNA-PKcs 及び p-ATM フォーカス形成部位は、DSB の発生部位を意味している。従って、本研究により培養細胞に対する軟 X 線レーザーの照射は DSB を誘発することが示された。更なる検討が必要であるが、DSB 発生の理由として、軟 X 線レーザー光子が細胞核に到達したことと、軟 X 線レーザーの照射により水分子や、炭素、窒素、リン等の生体構成分子から光電子が放出されたことが考えられる。特に、光電子のエネルギーは低く、これらの DNA に対するエネルギー付与は大きい。従って、光電子が細胞核内やその近傍で発生し、これらが DNA に到達した場合、直接的に DSB を誘発する可能性がある。

一方、本研究で用いた軟X線レーザーのエネルギーは89eVと著しく低いため、細胞内のタンパク質、細胞膜や核膜のような脂質膜による光子の吸収は無視できない。つまり、軟X線レーザー光子や二次的な光電子は細胞核内のDNAまで到達できない可能性もある。この問題を解決するためには、前述の生体構成分子からの光電子発生に加えて、細胞の構成分子と軟X線レーザーの相互作用を考える必要がある。これは本研究における今後の課題である。

現在、この結果を論文誌（Journal of Radiation Research）の投稿するための準備を行っている。

４．引用(参照)文献等

なし