放射線によって生じるヒドロキシルラジカルの 定量測定と分子レベル生成ジオメトリーの評価 2018年1月

千葉大学大学院融合科学研究科 ナノサイエンス専攻ナノバイオロジーコース 小川 幸大 (千葉大学審査学位論文)

放射線によって生じるヒドロキシルラジカルの 定量測定と分子レベル生成ジオメトリーの評価 2018年1月

千葉大学大学院融合科学研究科

ナノサイエンス専攻ナノバイオロジーコース

小川 幸大

目 次

ページ

第1章 序論 ――放射線の物理作用とフリーラジカル生成―

1.1 は	じめに	2
1.2 電	離放射線の分類	3
1.2.1.	電磁波	
1.2.2.	粒子線	
1.3 水	の放射線分解過程と生物影響	5
1.3.1.	物理的過程 (~10 ⁻¹⁶ 秒)	
1.3.2.	物理化学的過程 (~10 ⁻¹² 秒)	
1.3.3.	化学的過程 (~ 10 ⁻⁷ 秒)	
1.3.4.	生物学的過程 (数秒 ~)	
1.4 活	性酸素種とフリーラジカル	8
1.4.1.	ヒドロキシルラジカル ('OH)	
1.4.2.	水素ラジカル (H')	
1.4.3.	スーパーオキサイド (O2 [・])	

- 1.4.4. ヒドロペルオキシラジカル (HO₂)
- 1.4.5. 過酸化水素 (H₂O₂)
- 1.5 "がん"の放射線療法と放射線防護 …………………………………………… 10
 - 1.5.1. 放射線のがん治療への応用
 - 1.5.2. 放射線の深部線量分布と正常組織への影響
 - 1.5.3. 抗酸化剤による放射線防護のアプローチ
- - 1.6.1. 電子常磁性共鳴について
 - 1.6.2. スピントラッピング法

第2章 電子常磁性共鳴法を用いた

低LET放射線によるヒドロキシルラジカル生成ジオメトリー評価

2.1 2.2.1 EPRスピントラッピング剤: DMPOによるヒドロキシルラジカルの定量 X線の照射によるヒドロキシルラジカルの発生 2.2.2 2.2.3 y線の照射 によるヒドロキシルラジカルの発生 EPR による照射後試料の測定 2.2.4 カフェインによるヒドロキシルラジカルの消去 2.2.5 32 Gy X線 (3.2 Gy/min) の照射によるヒドロキシルラジカル生成密度 2.3.1 線量率もしくは線質の変化によるヒドロキシルラジカル生成密度の 2.3.2 変化の検証 16 Gy X線 (3.2 Gy/min) の照射によるヒドロキシルラジカル生成密 2.3.3 カフェインの添加によるヒドロキシルラジカル消去の影響 2.3.4 2.5 2.6

第3章 蛍光プローブを用いた

放射線によるヒドロキシルラジカル生成密度の検証

-	3.1	諸言		41
	3.2	材彩	↓と方法	42
	3.2	.1	蛍光プローブ: TPA-Naによるヒドロキシルラジカルの検出	
	3.2	.2	脱酸素条件での試料作成	
	3.2	.3	X線の照射によるヒドロキシルラジカルの発生	
	3.2	.4	蛍光光度計による照射後試料の測定	
	3.3	結果	Į	44
	3.4	考察	ξ	45
-	3.5	結論	à	46
2	3.6	図表		47

第4章 重粒子線がん治療装置HIMACを用いた

各種重粒子線によるラジカル生成密度の評価

- 4.1. 諸言
 51

 4.2. 材料と方法
 52
- 4.2.1. スピントラッピング剤: DMPO によるヒドロキシルラジカルの検出
- 4.2.2. 蛍光プローブ: TPA-Na によるヒドロキシルラジカルの検出
- 4.2.3. 脱酸素条件での試料作成
- 4.2.4. 重粒子の照射によるヒドロキシルラジカルの発生
- - 4.3.1. DMPO を用いた重粒子線によるヒドロキシルラジカル生成密度評価
 - 4.3.2. テレフタル酸二ナトリウムを用いた重粒子線によるヒドロキシルラジカ ル生成密度評価
 - 4.3.3. 脱酸素条件下におけるヒドロキシルラジカル生成密度評価

	4.5.	結論	 •••••		•••••		•••••	•••••	 	 	 •••••	58
	4.6.	図表	 •••••	•••••	••••	•••••			 	 	 	59
参考	贪文献		 •••••		••••			•••••	 	 	 	61
謝辞	ž		 						 	 	 	65

称

Binary Filter
290 MeV/n Carbon-ion beam
5, 5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide
Hydrogen radical adduct of DMPO
Hydroxyl radical adduct of DMPO
Superoxide adduct of DMPO
Deoxyribonucleic acid
Electron
Hydrated electron
Emission
Electron paramagnetic resonance
Electron spin resonance
Excitation
Ferrous
Ferric
500 MeV/n Iron-ion beam
Glutathione
Glutathione peroxidase
Glutathione disulfide
Hydrogen radical
Heavy ion medical accelerator in Chiba
Hydroperoxyl radical

H_2O_2	Hydrogen peroxide
hTPA	Hydroxyl terephthalate
LET	Linear energy transfer
O ₂	Oxygen
O ₂ .	Superoxide anion
¹ O ₂	Singlet oxygen
'ОН	Hydroxyl radical
PTFE	Polytetrafluoroethylene
QOL	Quality of life
ROS	Reactive oxygen species
Si490	490 MeV/n Silicone-ion beam
SOD	Superoxide dismutase
TE mode	Transverse electric mode
TEMPOL	4-Hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TPA-Na	Disodium terephthalate

第1章

序論 一放射線の物理作用とフリーラジカル生成―

1.1. はじめに

生体は生命の基本単位である細胞から構築されており、細胞の構成成分の約 80%を水 (H₂O) が占めている。したがって、生体に電離放射線が照射されたときに最 初に誘起される化学変化は、主に水の放射線分解であると考えられている [1]。水の放 射線分解による生成種としては、ヒドロキシルラジカル (OH)、水素ラジカル (H) と いったフリーラジカルと水和電子 (e_{aq}) が知られている。一般に細胞内には酸素 (O₂) が溶存していることから、 e_{aq} やH は酸素と反応して、スーパーオキサイド (O₂⁻) ある いはその共投酸であるヒドロベルオキシル (HO₂⁻) を生成するとされる [2]。OH や O₂⁻⁻ をはじめ、過酸化水素 (H₂O₂)、一重項酸素 (¹O₂) は活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) と呼ばれる。

放射線による生物学的効果は、生体に吸収された放射線のエネルギーによる生体構成分子の電離や励起を起因とする。Fig. 1 に示すように、放射線が DNA や酵素等の生体高分子に直接障害を与えるものを"直接作用 (direct action)"という。また、放射線が水分子などと反応して ROS を作り、生じた ROS が生体高分子に障害をあたえるものを"間接作用 (indirect action)"という [3]。しかしながら同じ吸収線量でも、放射線の種類が異なれば作用や効率が異なってくる。すなわち、放射線の線質の違いにより生体内に生じる電離と励起の量が変化するため、生物に対する影響も異なる。放射線が飛跡に沿って、単位距離当りに周囲の媒質へと付与するエネルギー量は、線エネルギー付与 (LET: linear energy transfer)と定義されている。LET は放射線の線質の違いを知る指標であり、単位として keV/µm などが用いられる。

生体の主成分である水の電離や励起に起因する活性化学種の初期生成密度は、 次に引き続いて進行する化学反応の道筋を決定しうる重要な因子と考えられる。特に 'OH は水の放射線分解によって極めて早い段階で生じ、かつ生体内での連鎖的ラジカル 反応の結果として生じる分子障害の実行役とも考えられる。生体内での'OH の反応機構 を正しく評価するためには、まず分子レベル、つまり nm レベルのラジカル生成ジオメ トリーを理解することは重要であると言える。

1.2. 電離放射線の分類

電離放射線は物質に電離作用 (イオン化)を及ぼす放射線であり、物質を通過 する際に物質を構成する原子周辺に配置された電子をはじき出すことができる。一般に は、電離放射線を単に放射線と称している [4]。放射線はその特性により、電磁波と粒 子線に分けられる (Fig. 2)。電離によって生じる電子は"二次電子"と呼ばれている。 電離や励起を引き起こすのに十分なエネルギー (> 100 eV)を有する二次電子はδ線と 呼ばれている。δ線は入射した放射線の飛跡から短く枝分かれしたような飛跡を示す

1.2.1. 電磁波

電磁波は、光や電波と同じ性質をもつ高速で進む波動である。もちろん電磁波 をすべて放射線とは呼ばず、電離放射線としての電磁波には X 線や γ 線が属する。こ れらを電磁波放射線と呼ぶこともある。電磁波放射線を照射した場合は、高エネルギー の電磁波の粒子(光子)が原子と相互作用し、生じたコンプトン電子や高電子などの二 次電子が、直接電離と同じ効果を与える。放射線の中でも、X 線や γ 線は LET が小さ いので低 LET 放射線と呼ばれている。

低 LET 放射線では、生物学的損傷の 1/3 が直接作用、2/3 が間接作用とされて おり、その割合は 1:2 である。間接作用では塩基への傷害のような酸化障害を引き起 こし、特に OH の影響が大きいと考えられている。低 LET 放射線において、初期の OH 生成密度を知ることは、放射線生物影響を正しく理解するために重要である。

1.2.2. 粒子線

粒子線は、質量をもった素粒子もしくは原子であり、電荷をもつ荷電粒子線と、 電荷をもたない非荷電粒子線に分けられる。荷電粒子線には、α線、陽子線、重粒子線 などが属する。荷電粒子線を照射した場合は、荷電粒子が原子あるいは分子をクーロン 力により直接電離する。非荷電粒子線には、ニュートリノなど中性微子や中性子線が属 している。α線、中性子線、その他重荷電粒子のLET は大きく、高LET 放射線と呼ば れる。

重荷電粒子の場合、物質中をほとんど直線的に進む。入射後、ある深さまでは あまりエネルギーを与えずに速い速度で物質中をかけぬけるが、荷電粒子が停止する直

- 3 -

前で速度を急に落とす。粒子がある速度で動いている場合と静止している場合では、粒子の持っている運動エネルギーが異なる。飛跡の終末に近づくにつれて、多くのエネル ギーを与えて線量のピークを作り、電離・励起を多量に起こす。この極大部分はブラッ グピーク (Bragg peak) と呼ばれる。

千葉県千葉市の国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総 合研究所 (National Institute of Radiological Sciences, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology. 以下、量研機構・放医研。) は重粒子線がん治療装 置 (HIMAC: Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba) を有している。重粒子とは広義には 電子より重いすべての粒子線であるが、HIMAC ではヘリウム以上の原子番号 (≥ 2) を 持つ原子の原子核 (重イオン) ビームを指す [5]。

重粒子線のような、高LET 放射線の生物影響は、DNA 等の標的分子にエネルギー が直接吸収される直接作用が主と考えられている。これは、高LET 放射線では飛跡に沿って の電離密度が高く、直接作用が起こりやすいからとされている。同時に、間接作用で生じた 'OH や H'を局所的に非常に高密度に生成するため、これらラジカルの再結合が生体内標 的分子との反応より先に起こるためである。重粒子線においても ROS の生成が生体影響 に関与している。高LET 放射線を水中へ照射した場合に最終的な収率が最も多い ROS は H₂O₂であり、これは'OH どOH のカップリングにより生成される。H₂O₂は比較的安定なROS で あるため、生体分子と直接反応することは少ないと考えられる。しかし、その安定性から長い距 離を移動することが可能であり、脂質透過、浸透もしくは細胞等への蓄積も可能になるので、 後続する影響を考える上で重要である。したがって、高LET 放射線においても、初期の'OH 生成密度を知ることはその後の生物影響を追う上で重要である。

1.3. 水の放射線分解過程と生物影響

放射線生物影響に関わる現象は、放射線と原子もしくは分子が持つ電子との直接 あるいは間接的な非弾性衝突から始まり、励起、二次電子の放出、イオンやフリーラジカ ルの生成、生成物の化学反応と拡散、そしてさらなる化学反応を経て起こる (Fig. 3)。前述 のように、生体内に最も多く存在する分子は"水"である。放射線の入射から開始する水の放 射線分解反応を介した一連の過程は、(1)物理的過程、(2)物理化学的過程、(3)化学的過 程の 3 つに大きく分けられる [6]。これら特徴的な過程は、放射線照射直後のエネルギー付 与から極めて短いタイムスケール内で進行する。その後、(4)生物学的過程へと進む。

1.3.1. 物理的過程 (~ 10⁻¹⁶ 秒)

最も高速な過程で、10⁻¹⁶ 秒までの間に起こる。放射線が生体などの物質に入射すると、分子と衝突するごとに媒質空間中に離散的にエネルギーを付与する。そのため媒体中のエネルギーの飛跡は空間的に不均一であり、エネルギーが与えられた場所に存在する水分子は式 1.1 で示すイオン化 (H₂O⁺) や、式 1.2 で示す励起状態 (H₂O*) を形成する。

$H_2O \rightarrow H_2O^+ + e^-$	(式 1.1)
$H_2O \rightarrow H_2O^*$	(式 1.2)

このエネルギーが付与された空間、すなわち半径数nmの球状の局所的な極小領域 は"スパー (spur)"と呼ばれる。低LET 放射線の場合、スパーどうしの間隔は、スパーの直径よ り大きくなる [7]。このため、スパーは孤立していると見なせ、十分に距離の離れたスパー群が 形成される。一方、高LET 放射線の場合、スパーの重なりが生じる。もはやスパーは孤立して いるとは言えず、ひとつの大きな領域と見なされる。この円柱状の領域は"トラック (track)"と 呼ばれる。Fig. 4 に低LET 放射線もしくは高LET 放射線によるスパー形成の模式図を示す。

1.3.2. 物理化学的過程 (~ 10⁻¹² 秒)

およそ10⁻¹² 秒までの間に完了する過程であり、イオン-分子反応、励起状態の解離 性緩和や再イオン化などといった多くの過程を含む [6]。 水分子の電離によって生じた H₂O⁺ と e⁻ はそれぞれ、式 1.3、式 1.4といった反応 によりフリーラジカルを生じる [8]。

 $H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH \qquad (\vec{\mathbf{x}} 1.3)$

 $e^{-} + H_2O \rightarrow OH^{-} + H^{-} \qquad (\vec{x} 1.4)$

また励起された水分子も式 1.5の反応を経てフリーラジカルを生成する。

 $H_2O^* \rightarrow H^{\bullet} + OH$ (式 1.5)

この段階で、主に H_3O^+ 、 H^+ 、'OH といった中間活性種が、空間の近傍 (< 10 nm) に局在して生じる。スパー内の最終生成物の収率は、LET に依存していると考えられて いる。低 LET 放射線 (X 線や γ 線)では δ 線がスパー形成の主役である [9]。スパー内 に生じる活性種のなかでも、'OH は非常に高い酸化力を有している。

1.3.3. 化学的過程 (~ 10⁻⁷ 秒)

物理化学的過程では、H'、OHといったフリーラジカルがスパー内に局在している。 化学的過程では、スパー内でフリーラジカル同士の反応が進む。スパー内に高密度で存在す るがゆえ、ならびにその反応性の高さゆえにフリーラジカルが消費され、H₂や H₂O₂、HO₂とい った分子種に変化していく。時間の経過に伴い、スパー内反応で生じた分子種は溶媒を拡散 しつつ互いに反応する。およそ10⁻⁷ 秒までには空間内にほぼ均一に拡散した状態となり、 スパー反応は終了する。

1.3.4. 生物学的過程(数秒~)

放射線の生物作用の主な標的は DNA であり、DNA に対する放射線影響は DNA 損傷として現れる [10]。 DNA 損傷が生じても、秒単位で DNA 損傷修復が始まる。 しかしなが ら、なかには修復されずに固定される場合や、修復のエラーが生じる場合もある。 DNA 損傷が 致命的である細胞は、時間単位で細胞致死を引き起こす。 一方、DNA 損傷が致命的でない 場合は、誤った DNA 情報のまま細胞分裂を繰り返し行うため、変異が生じる。 臓器や組織を 構成している細胞の多くが細胞死を引き起こせば、日から月単位で機能障害や組織障害とし て影響が現れる。そして、突然変異を起こした細胞が体細胞である場合は年単位で発がんの可能性が、生殖細胞である場合は世代を超えて遺伝的影響を引き起こす可能性がある。

1.4. 活性酸素種とフリーラジカル

不対電子をもつ分子や原子をフリーラジカルと定義している。通常の酸素分子 は三重項状態 (triplet oxygen: ³O₂) であり、不対電子を2個もつフリーラジカル (バ イラジカル) である。普通の化学物質では三重項状態は非常に不安定であるが、酸素だ けは例外で、三重項の方がエネルギー的に安定である [11]。O₂に比べて反応性が高く、 酸化力をもつ一群の分子種に与えられた呼称が ROS である。ROS によって誘起される 生体現象が酸化ストレス障害である [12]。酸化ストレスとは、「生体内の酸化反応と抗 酸化反応のバランスが崩れ、酸化反応が優先されることによる生体にとって好ましくな い状態」のことを指す。

1.4.1. ヒドロキシルラジカル (*OH)

・OH は、前述の放射線による水分子の電離や励起により、最も初期に生じる ROS である。生体の酸化障害を引き起こす主要因として、'OH が挙げられる。'OH は強い酸 化剤であり、非常に反応性が高い。しかし、その寿命は 10⁶ 秒以下と非常に短いので、 生じた部位のごく近くの分子としか反応しない。

脂質近傍で生成すると脂質から水素を引き抜いて脂質ラジカルを生成し、脂質 過酸化反応を開始させる。

1.4.2. 水素ラジカル (H*)

水分子の励起によって・OH と共に生じる H'は、フリーラジカルであるが ROS には分類されない。H'は比較的強い還元剤として働く。溶存酸素と反応することにより、 HO₂・が生成すると考えられる。

1.4.3. スーパーオキサイド (O₂⁻⁻)

 O_2 は OH ほどでないが、比較的酸化力が高く、他の成分と様々な反応を起こ す。また、 H_2O_2 や OH の前駆体となるので、結果として酸化ストレス障害の大きな要 因となると考えられている。生体には O_2 を特異的に消去する酵素としてスーパーオキ シドジスムターゼ (SOD: Superoxide dismutase) が存在する。 O_2 は SOD によって O_2 と H₂O₂に不均化される。

1.4.4. ヒドロペルオキシラジカル (HO₂*)

前述の通り、 HO_2 は O_2 の共投酸であり、水溶液中で平衡状態にある。酸解離 定数 pK_a は 4.8 であると報告されており [13]、中性水溶液中ではプロトンを放出し、 O_2 をして存在している。

1.4.5. 過酸化水素 (H₂O₂)

 H_2O_2 はフリーラジカルではないが ROS である。 H_2O_2 自身の反応性は高くはな い。しかしながら、二価の鉄イオン (Fe²⁺) 存在下では、Fe²⁺と反応することによりフェ ントン反応 (Fenton's reaction) を引き起こし、OH を発生させる (式 1.6)。生体内で生じ た H_2O_2 は、カタラーゼ (catalase) により O_2 と H_2O に代謝され、完全に無毒化される。 また、グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px: glutathione peroxidase)は、グルタチオ ン (GSH: glutathione) と H_2O_2 を基質として H_2O とグルタチオンジスルフィド (GSSG: Glutathione disulfide) を生成する。GSH は還元型グルタチオン、GSSH は酸化型グルタ チオンとも呼ばれる。

 $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^- \qquad (\not I.6)$

放射線による H₂O₂の生成過程では、水分子の分解からは直接生じることはな く、'OH どうしのカップリングによって主に生じる (式 1.7)。特に高 LET 放射線では、 その過密な電離により、'OH がスパー内・スパー間で十分に反応できる近距離で生じる。 したがって、高 LET 放射線における水分子の分解反応において、最終的には、寿命の 長い H₂O₂に収束していくものと考えられる。

 $OH + OH \rightarrow H_2O_2$ (式 1.7)

1.5. "がん"の放射線療法と放射線防護

日本人の死亡原因の年次推移において、"がん"は 50 年以上に渡り一貫して上 昇を続けている。1981 年以降、死亡原因の第1位となっており [14]、国民病と呼んで も過言ではない。今後も、がん患者数は増加の傾向にあると予想される。

理想的ながんの治療法として、がん患者の社会復帰を十分に考えて、臓器や体の形態をあまり損なわない治療法が望まれている。その他にも、治療の選択肢を増やす、 苦痛を軽減させる、身体的もしくは時間的拘束を減らすなどといった生活の質(QOL: quality of life)を向上させることが重要とされている。

1.4.6. 放射線の深部線量分布と正常組織への影響

放射線療法は、外科療法、化学療法と共にがん治療の3本柱のひとつである。 切除せずにがんを治す放射線治療は、近年の治療法の高度化と共に期待、注目されてお り、その患者数推移は増加傾向にある。その長所として、体の外部から病巣を狙って放 射線を照射するため、外科的手術に比べて体への直接的な負担が少なく、かつ化学的療 法と異なり場所を限定した治療が可能である。特に体深部の初期がんに対して有効であ るとされている (Table 1)。一方で、放射線が体を通過する際、病巣以外の正常組織も通 過するため、局所的ではあるが、脱毛、皮膚の炎症、メラニンの生成、肺の線維化、金組織の 収縮、腸管粘膜の壊死といった副作用が報告されている [15-17]。

体の表面からの深さに対する放射線の相対線量(%)をFig.1.5に示す。X線や γ線のような電磁波放射線では深部に進むにつれ、相対線量が減衰していく。これらの 特徴から深部のがんを治療する際、電磁波放射線は、がん病巣に到達するまでの正常組 織が最も障害を受けやすい。また、がん病巣よりも深部の正常組織へも影響を与える。 一方、重粒子線のような粒子放射線ではエネルギーに応じてある深さで急に相対線量が 増加し、その前後は少ない。ブラッグピークの部分を深部のがん病巣に合わせることに より、正常組織への障害を最小限に抑える事が可能である。

しかしながら、重粒子線の照射においても、正常組織に少なからず放射線が照 射されてしまう。また、近年の治療法の高度化により、標準的な照射よりも1回の照射線量 を増やし、照射回数を減らすことで患者の時間的拘束を軽減させる寡分割照射療法が利便的 かつ効果的とされている。それに伴い、腫瘍組織以外の正常組織に対する放射線障害が無 視できなくなることが予測される。

1.4.7. 抗酸化剤による放射線防護へのアプローチ

放射線治療に多く用いられている低 LET 放射線による細胞致死には、間接作用が 主に関与している報告がある [18-21]。放射線治療において腫瘍での治療効果を上げると同 時に正常組織への副作用を軽減することが求められており、正常組織を放射線から防護する ことは重要な課題である。そこで放射線防護のアプローチのひとつとして、放射線が生体組織 中に過剰に生じさせた ROS を消去するとともに、ROS によって乱れた酸化還元 (レドックス) 状態を整えることで放射線障害から組織を防護するための研究が数多く報告されている [22-24]。

1.6. 電子常磁性共鳴によるフリーラジカルの解析

1.6.1. 電子常磁性共鳴について

電子常磁性共鳴 (EPR: electron paramagnetic resonance) とは、静磁場の影響下に ある不対電子の電子スピンが、外部から電磁波 (マイクロ波) を加えられたときに示す "共鳴"現象である。EPRは電子スピン共鳴 (ESR: electron spin resonance)の同義語と して扱われている。EPR法は、このマイクロ波を共鳴吸収によって、高いエネルギー準 位へと遷移した状態を検出する分光光度法の1つである [11,25]。その他の各種分析機 器と比較して、EPR装置はフリーラジカル/常磁性物質を選択的に直接検出できる唯一の 手段であるという特徴を有する。そのスペクトルの形状から物質中に存在する不対電子 のスピンの状態を知ることが可能である。最も一般的に用いられているマイクロ波の周 波数は約 94 GHz であり、その周波数帯域からX-band EPRと呼ばれている。

例えば OHのように寿命の短いフリーラジカルは、再結合反応や不均化反応によって非常に速く反応が進み、消えてゆく。短寿命の不安定なフリーラジカルをEPRで検出するには、検出時間分解能を上げる方法(高速流通法や時間分解EPR) と、生成ラジカルの反応性を抑える方法(マトリックス分離法や凍結法)がある[26]。いずれも不安定ラジカルの状態のままでEPRを観測することでき、フリーラジカル生成の直接証明となる。一方、間接的な方法としてスピントラッピング法がある[26-29]。この原理を簡単に説明すると、「寿命の短いフリーラジカルをトラップしてできる比較的長寿命のラジカル生成物を検出する」という手法である。

1.6.2. スピントラッピング法

EPR スピントラッピング法では、短寿命のフリーラジカルをスピントラッピン グ剤と反応 (補足) させ、酸化生成物上に形成される安定ラジカル (スピンアダクト) 由来の EPR スペクトルを測定する。すなわち、スピントラップ剤 T が素早くフリーラ ジカル R'を補足することにより、スピンアダクト TR'を生成する。

$$R' + T \to TR' \tag{₹ 1.8}$$

一般的に使われているスピントラップ剤は、ニトロソ化合物とニトロン化合物

の2種類に大別される。いずれも短寿命のフリーラジカルをトラップしてニトロキシル ラジカル(nitroxyl radical)になる。このニトロキシルラジカルの EPR スピンアダクト は比較的長寿命であり、通常の測定の時定数の中で測定することが可能である。その EPR スペクトルを解析することで捕捉されたフリーラジカル種の特定が可能である。以 下に市販されている代表的なスピントラップ剤を列挙し、その構造を Fig. 1.6 に示す。

- ① 2-methy-2-nitrosopropane (MNP)
- ② 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulfonate (DBNBS)
- (3) α -phenyl-*N*-tert-butylnitrone (PBN)
- (4) α -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-tert-butylnitrone (POBN)
- (5) 5- (diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DEPMPO)
- 6 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO)

①と②はニトロソ化合物のスピントラップ剤であり、③~⑥ははニトロン化合物のスピントラップ剤である。ニトロン化合物である 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide
 (DMPO) は最も一般的であり、生化学的な研究などに非常によく用いられている
 [30-34]。

水の放射線分解による生成種の内、DMPO が補足するフリーラジカルは'OH、 H'、O₂・であり、スピンアダクトはそれぞれ DMPO-OH、DMPO-H、DMPO-OOH である (Fig. 1.7)。

1.7. 本研究の目的

上述の背景を踏まえ、放射線生物影響を正しく評価するためには、スパー以下 のボリュームに生じる'OH の局所濃度評価が重要であると考えられる。したがって、'OH の初期生成ジオメトリーを知り、その後の反応を予測して本質となる活性種を見極める 必要がある。これまでに放射線医学総合研究所の松本らは、DMPO を用いた EPR スピ ントラッピング法を応用した物理化学的な手法を用いて、放射線によって水中に生成 される'OH には"疎"と"密"な成分があることを報告している [34]。前報では、LET に応 じて、疎と密な'OH 生成の比が変化することが報告されている。LET の増加に伴って'OH の低密度成分が低下すると議論されているものの、2つの成分の存在の確定性について あまり詳しく検証されていなかった。特に超高密度成分については、「スパー拡散モデ ル」に基づいた疑問点が残されていた。スパー拡散モデルは、生じた'OH などの活性種 の挙動(10-12秒~1秒程度)を、溶媒中での粒子の運動による拡散と化学反応から予 測するモデルである。物理化学的過程での初期タイムスケールにおいて、拡散前のス パー内活性種は高密度に局在していると考えられている。OH が拡散もしくは消滅する 前に DMPO と'OH と反応するためには、隣り合う'OH の距離は、濃度として 200 mM 以上に相当する2nm以下である必要がある。そこで本稿では、EPR スピントラッピン グ法、ならびに蛍光プローブ法を応用し、物理化学的な'OH 生成密度の検証を行った。

1.8. 図表

Table. 1.1 がんの治療法毎の特徴

	外科療法	放射線療法	化学療法
適応	 早期がんから中 等度進行がん (0-II期がん)ま で 病変が局所に限 局 	 早期がん(I期) から手術不能 の局所進行が ん(III期)まで 病変が局所に 限局 	 主としてIV期の 遠隔転移のある がん及び白血病 病変が全身に進 展
長所	 根治性が高い 	 機能と形態の 欠損が少ない 全身への影響 が少ない 早期がんの治 療成績は外科 療法に匹敵 	 病状の進行がお さえられたり、 延命効果がある こともある
短所	 ときに機能と形 態の欠損が大き いことあり 部位・患者の条 件(年齢・合併症 など)により適応 に制限あり 	 局所進行がん では根治性は 手術療法に劣 る ときに局所に 副作用を残す ことあり 	 全身への影響が 大きい(副作用 が強い) 根治性が低い

参考文献 5 より表を引用。



Fig. 1.1 直接作用と間接作用

参考文献 3 より図を引用。



Fig. 1.2 放射線の種類

参考文献 4 より図を引用。



Fig. 1.3 放射線による活性種生成と時間スケール

放射線が生物へ影響を与えるまでの時間スケールは、物理的過程、物理化学的 過程、化学的過程そして生物学的過程の4つに分けられる。 低LET放射線



高LET放射線



Fig. 1.4 スパー生成の模式図

低 LET 放射線もしくは高 LET 放射線によって生じる飛跡のイメージとスパー 内の活性種生成の模式図。



Fig. 1.5 放射線の深部線量分布

参考文献 5 より図を引用。



Fig. 1.6 よく使用されるスピントラップ剤

代表的なスピントラップ剤の構造を示す。① MNP、② DBNBS、③ PBN、 ④ POBN、⑤ DEPMPO、⑥DMPO。



Fig. 1.7 DMPO-OH、DMPO-H、DMPO-OOHの構造式

DMPO と各フリーラジカルとのアダクトの構造式を示す。

第2章

電子常磁性共鳴法を用いた

低 LET 放射線によるヒドロキシルラジカル生成ジオメトリー評価

2.1. 諸言

第1章の記述の通り、水は生体内に最も豊富に存在する分子であり、その放射線分 解によって生成される活性種を介して生体高分子の損傷が引き起こされる。放射線が誘発す る活性種のうち、'OH はその高い反応性のために生物学的作用において重要な役割を果た すと認識されている。特に低 LET 放射線における生物影響の本質は、間接作用であると考え られている。

量研機構・放医研の松本らの先行研究では、LET に応じて"疎"と"密"な OH 生成の 比が変化することが報告した。しかしながら、主に高 LET 放射線である重粒子線の炭素線を 用いて実験をしており、さらに"密"な OH の生成については、実験的に十分に明らかにされて いなかった。そこで第2章では、低 LET 放射線によって水溶液中に生成される OH に焦点を 当て、スパー内に生じるような極めて高密度な OH の生成を証明しようと試みた。

スパーのような半径数 nm の領域内に集中して生じる OH を検出するため、スピント ラップ剤: DMPO を用いた EPR スピントラッピング法を応用し、新たに"プローブ密度 (nm⁻¹)" の概念を定義した。その単位: nm⁻¹ が示す通り、広義に"密度"として定義されている単位体 積あたりの質量のことではない。"プローブ密度"とは、なわち"単位距離あたりに存在する OH プローブの数"のことである。飛跡に沿って"飛び飛び"に形成されるナノサイズのスパー の中に生じ、さらに約 10⁻⁶ 秒という極短時間で消えていく OH 生成密度を評価するため には、飛跡線上 (距離) あたりに生じる OH 数の情報が重要になると考えた。プローブ 密度の概念図を Fig. 2.1 に示す。

水溶液中に nm 単位で DMPO を分布させ、可能な限り OH が消滅する前に補足を 試みた。隣り合う DMPO 分子間の距離を求めるにあたり、ある濃度の DMPO が水溶液中に均 ーに拡散していると仮定し、1 分子の DMPO が占める水の体積を立方体と考えた。その立方 体の 1 辺の長さを"プローブ間距離 (nm)"と定義し、プローブ間距離が 1~15 nm 相当になる DMPO 濃度を求めた。そのプローブ間距離の逆数を"プローブ密度"と定義した。

段階的にDMPO濃度を変え、試料中のDMPO密度と照射した試料中のDMPO-OH 生成量との関係から、OHの生成密度を予測した。同時にOHの生成密度から、隣り合う・ OH どうしの距離を計算し、生成ジオメトリーとして評価を行った。

2.2. 材料と方法

2.2.1. EPR スピントラッピング剤: DMPO によるヒドロキシルラジカルの定量

低 LET 放射線の照射によって水溶液中に生じる OH 量を、EPR スピントラッピ ング法を利用して測定した。本実験では、スピントラッピング剤として DMPO (Dojindo Laboratories, Ltd. Kumamoto, Japan)を用いた。隣り合う DMPO 分子の距離が 1~15 nm 間隔であるように段階的に DMPO 濃度を変えて試薬を調製した。使用した DMPO 濃 度とプローブ間距離、ならびにプローブ密度の関係を Table 2.1 に示す。全ての試薬の 調製には Milli-Q 水を用いた。

用時調製した DMPO 水溶液試料 (200 μL) を 1.5mL PE マイクロチューブに移し、 放射線を照射するまで氷上で保管した。照射後の各 DMPO 水溶液を X-band EPR スペクト ロメーターを用いて測定し、後述の DMPO-OH 由来の EPR スペクトルを得た。

2.2.2. X線の照射によるヒドロキシルラジカルの発生

量研機構・放医研の X 線発生装置 (PANTAK HF-320S, Shimadzu, Kyoto, Japan) を使用した。実行エネルギー: 80 keV、管電圧: 200 kV、管電流: 20 mA の条件にて照射し、 0.5 mm Al + 0.5 mm Cu の負荷フィルターを用いて低エネルギー成分を減弱した。 X 線管と 水溶液試料との間の距離を変えることにより、線量率を調整した。

本実験にて照射する線量を決定するにあたり、15 mM DMPO 水溶液試料に対して、 各線量 (2,4,8,16,24 or 32 Gy) の X 線を照射し、照射後試料の DMPO-OH 由来のスペクト ルを観察した (Fig. 2.2)。 DMPO-OH は比較的安定なラジカルであるが、放射線照射中ならび に照射直後に徐々に減衰していく。この減衰について、照射後 10 分間の連続 EPR 測定によ り得られた減衰速度と、正味の'OH 生成量の予測に基づく繰り返し計算により補正を行い、照 射時間内に生成された'OHの総量を算出する必要がある [35]。10 分間の連続 EPR 測定には +分なシグナルピーク面積が必要であるため、本実験における基準となる線量を 32 Gy に決 定した。また、基準となる線量率を 3.2 Gy/min とし、10 分間のX 線照射時間中の'OH 生成量 を求めた。

Table 2.1 に記載されている濃度に調整した DMPO 水溶液に対して、32 Gy の X 線 照射を行った。線量率は 3.2 Gy/min、4.8 Gy/min、6.8 Gy/min であり、対応する X 線管-水溶 液試料間距離は 300 mm、232 mm、212 mm であった。また、比較として 16 Gy の X 線照射 を 3.2 Gy/min の線量率で実施した。

2.2.3. γ線の照射によるヒドロキシルラジカルの発生

量研機構・放医研の¹³⁷Cs 源 γ 線照射装置 (Radiation Machinery Gammator M、 Parsippany、NJ) を使用した。¹³⁷Cs の崩壊率は 49.4 TBq であった。X 線の照射条件に基づき、 32 Gy の γ 線を照射した。 γ 線源とDMPO 水溶液試料との間の距離は 3.81cm (1.5 インチ) で あった。¹³⁷Cs の半減期: 30.17 年から考慮すると、約4か月間の実験期間中における線量率は 7.9 Gy /min であり [36]、変化はないものとした。照射時間は 4 分であった。

2.2.4. EPR による照射後試料の測定

照射終了後から EPR 測定開始までの時間をストップウォッチを使用して測定し、補正 に用いた。測定までの所要時間はおおよそ 2 分程度であった。照射した DMPO 水溶液 100 μ L を PTFE チューブ (内径: 0.32±0.001 インチ、壁厚: 0.002±0.0005 インチ; ZEUS, Orangeburg, SC) と石英製試料管に入れて、TE モードキャビティー内に固定した。WIN-RAD EPR データアナライザーシステム (Radical Research, Inc., Hino, Tokyo) を備えた X-band EPR スペクトロメーター (JES-TE100, JEOL, Tokyo, Japan) を用いて測定を繰り返した。 EPR の測定条件は下記の通りであった。

マイクロ波周波数:9.45GHz、マイクロ波パワー:2 mW、低磁場:336.1 mT、磁場掃引 幅:±1.25 mT、磁場掃引分解能:1024 point、掃引時間:60 秒、時定数:0.01 秒、磁場変調周 波数:100 kHz、電界変調幅:0.063mT

DMPO の OH アダクトである DMPO-OH は、特徴的なシグナル強度比 1:2:2:1 の 4 本線の EPR スペクトルを示す (Fig. 2.3)。一方、DMPO の H アダクトである DMPO-H はシグ ナル強度比 1:1:2:1:2:1:2:1:1 の 9 本線の EPR スペクトルを示し、DMPO-OH の EPR スペク トルと一部重複する。放射線照射試料中の DMPO-OH の濃度を決定するにあたり、この DMPO-H のスペクトル重複を回避することが望ましい。そこで、DMPO-OH に由来する 4 本の スペクトルのうち低磁場側から 2 番目を解析に利用した。得られた低磁場側から 2 番目の DMPO-OH の EPR スペクトル (1024 point のデジタルデータ) を量研機構・放医研の松本が 作成したラインフィッティングプログラムを用いて分析し、ガウス関数によるフィッティングを行っ た。フィッティングしたガウス線形のシグナルの高さ (signal height) と線幅 (line width) を記録し、EPR シグナル強度を(signal height) × (line width)² として計算した。DMPO-OH 濃度は、既知の濃度のニトロキシルラジカルである 4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPOL) 水溶液の EPR シグナル強度に基づいて算出した [34, 35]。

2.2.5. カフェインによるヒドロキシルラジカルの消去

X線照射前のDMPO水溶液中にラジカル消去剤を加え、予測される2種類のOH 生成について検証を試みた。本研究ではOH消去能が比較的高く [35]、消去剤由来のシ グナルが検出される懸念のないカフェインを選択した。カフェインの反応速度定数とし て、いくつかの値 (5.9, 6.9 or 7.3 × 10⁹ M⁻¹s⁻¹) が報告されている [37-39]。いずれにして も、OH消去能が高いことが分かる。Table 2 に示す一連のDMPO水溶液に、カフェイン を添加した。カフェインの最終濃度は5 mMであった。反応混合溶液 (200 μL) を同様に 処理し、次いでX線 (32 Gy, 3.2 Gy/min) を照射した。

2.3. 結果

2.3.1. 32 Gy X 線 (3.2 Gy/min) の照射によるヒドロキシルラジカル生成密度

Fig. 2.4 A に DMPO 密度の増加に対する DMPO-OH 生成量のプロットを示す。縦軸 は補正によって得られた照射中に水溶液中で生じた DMPO-OH の総量、すなわち溶液 全体の平均の OH 生成濃度 (µM) を示す。また、横軸は DMPO 密度 (µm⁻¹) を示す。 DMPO 密度の増加に対する DMPO-OH 生成量のプロットした曲線は、 DMPO 密度の増加に 伴って

①原点を通過する直線
 ②それに続くプラトー領域
 ③原点を通過する別の直線

といった、2 つの異なる原点を通る直線に特徴付けられる、3 相の傾向を示した。Fig. 2.4 A の①と②の変曲点における縦軸: DMPO-OH の総量は、20 μ M 程度であった。一方で、 変曲点における横軸: DMPO 密度は 125 μ m⁻¹ であった。125 μ m⁻¹ の DMPO 密度に相応 するプローブ間距離は 8 nm であり、DMPO 濃度は 3.2 mM であった (Table 2.1)。ここ まで結果は、試料溶液中には、約 20 μ M の'OH が生成しており、それら'OH の補足に は 3.2 mM の DMPO が必要であったことを示している。

上述のように DMPO 密度の増加に対する DMPO-OH 生成量のプロットは一度変 曲点を示し、十分量の DMPO をもって、生じた OH を補足したかと思われた。 しかしなが ら、極めて高密度の DMPO (DMPO 密度: 1000 μ m⁻¹ \Rightarrow DMPO 濃度: 1700 mM~) を用い ることで、再び③で示すような直線を示した。 ここまでの結果は X 線と炭素線の OH 生成密度を調べた前報と一致する。

2.3.2. 線量率もしくは線質の変化によるヒドロキシルラジカル生成密度の変化の検証

Fig. 2.4 B-C に示すように、この特徴的な2つの原点を通る直線を示すDMPO密度に対するDMPO-OH濃度のプロットは、線量率を変えた場合、もしくは線質を変えた場合でも同様の傾向を示した。低LET放射線により水溶液中に生成される、2相の傾向は、線量率を2倍 (3.2~7.9 Gy/min) に 上げた程度では変化しないことが明らかとなった。

2.3.3. 16 Gy X 線 (3.2 Gy/min) の照射によるヒドロキシルラジカル生成密度

線量率を3.2 Gy/minのまま変化させず、線量を32 Gy から16 Gy に半減させたとき の結果をFig. 2.5 に示す。32 Gy の結果と比較して、線量を半減させると縦軸の値: DMPO-OH生成量が半減した。上述の①-③の3段階の変化を経ることに変わりはなかった。

2.3.4. カフェインの添加によるヒドロキシルラジカル消去の影響

Fig.2.6 に5 mM のカフェイン添加試料の結果を示す。Fig. 2.4 A では、DMPO密度は125 µm⁻¹のとき (DMPO濃度が3.2 mM) のときに変曲点を示した。この結果に対し、5 m M のカフェインを添加すると、①および②の成分は消去され、高密度側で再び得られた③のの直線的な増加に沿うような形で'OH生成が検出された。
2.4. 考察

Carmichael らは、最大濃度 440 µM の DMPO に γ 線を照射し、DMPO の OH の捕捉率は 35%であると報告している [29]。これは②で示されるようなプラトー領域 での DMPO-OH 生成量と放射線化学収率 (G 値) から算出した OH 生成量との比から算 出している。本研究ではそれよりも高濃度の DMPO を用い、nm 単位で水溶液中に DMPO 分子を分布させ、可能な限り OH が DMPO 以外の分子と反応して消滅する前に 検出を行う実験系である。本研究では、DMPO の OH 補足率について特に補正は行っ ていない。

第1章での記述の通り、水の放射線分解によって生じる OH はスパー内に局在 して生じている。μM 単位の OH 生成に対し、mM 単位の DMPO が必要であった結果 は、極端に低い補足率を示しているのはなく、数 mM に相応する密度をもった OH が 水溶液中に局在している結果を反映したものであると考えられる。すなわち、低 LET 放射線により "疎"に点在するスパー内の OH は、約3 mM に相当する濃度で生成さ れていることが予測された。また、対応するプローブ間距離より、約 8 nm 間隔で OH が生成されていること考えることができる。

本実験の図の横軸は、段階的な DMPO 密度の変化を示しており、それら試料 間の照射条件は変化させていない。したがって、DMPO-OH として検出される'OH 量は 変化するものの、水溶液中に生じる'OH 量は一定である。そのため、'OH 生成量に対し て DMPO が十分量存在する状態では変曲点を示したのち、プラトー状態が続くかに思 われた。しかしながら、その後に③で示す原点を通過する直線が現れた。これは、極 めて高密度の DMPO (DMPO 密度: 1000 µm⁻¹ ≒ DMPO 濃度: 1700 mM~) であっても寿 命内の全ての'OH を検出できないことを示す。すなわち、隣り合う DMPO どうしが 1 nm 以下である極めて高いプローブ密度でないと、DMPO と反応する前に消滅してしま って検出されないほど、局所的かつ高密度な'OH の生成が示唆された。しかしながら、 孤立スパーを生じると言われている低 LET 放射線の照射によって、1700 mM を超える

"密"な'OH が生成される理由は本実験では解明できていない。想像になるが、二次電子の飛跡末端では、電子の運動量の向きが変化し、10 個以上のスパーが重なり合っている可能性がある。もしくは、スパー内での拡散前の'OH 生成を観察している可能性がある。

Fig. 2.3 に示すように、①-③の3相の傾向は、線量率を変えた場合、もしくは線質を変えた場合でも同様の傾向を示した。低 LET 放射線により水溶液中に生成され

る、"疎"と"密"な2つの異なる'OH 生成成分は、線量率を2倍(3.2~6.4 Gy/min)に 上げた程度では変化しない。線量率を変えず(3.2 Gy/min)、線量を32 Gyから16 Gy に変えたとき、3 段階の変化を経るプロットをそのまま残す形で水溶液中の DMPO-OH の総量は半減した(Fig. 2.4)。これは、スパー内の局所的な電離密度は変化せず'OH 生 成密度も変化しないことを示す。一般的な放射線療法で使用される線量は1~2 Gyで あり、本実験で基準とした線量:32 Gy は比較的高線量である。32 Gyから線量をさら に下げれば、それに伴い水溶液中の'OH の総量は減少するであろう。これは、線量の低 下により単位時間あたりに飛来するフォトン数が減少するが、一方で飛来するフォト ンあたりのエネルギーならびに電離能力は変化しないため、フォトンあたりで生じる 'OH の量は変化しないと予測される。したがって、生体への放射線防護のための'OH 消 去を考えたとき、高密度に生成される'OH に相応するラジカル消去剤の必要濃度は線量 によって違いはないだろう。

カフェインもDMPOも、それぞれ'OHと 1:1 の反応をするため、競合する。数 mM のDMPOで検出可能な'OHの生成は、5 mM のカフェインで消去することが可能であった。し かしながら、③の直線が示す'OHの生成は、5 mM のカフェインはでは消去不可能であった。 ③の直線が示す'OH生成は、5 mMのカフェインはでは制御不可能な、極めて高い濃度である ことが改めて検証された。

試料中の水分子の相対量や液中の粘度を考慮し、5 mM 以上のカフェインの添加 は行わなかったが、"密"なOHの生成を消去するためには、それに見合う濃度 (1000 mM 以 上) のOH消去剤が必要であろう。抗酸化物質によるOHの制御を考えた場合、mM単位の 消去剤が必要と予測され、投薬による制御を考えると現実的ではない。これは、従来の 細胞試料を用いた抗酸化剤の放射線防護能評価実験において、μMレベルの抗酸化剤で は効果が薄く、mMレベルの抗酸化剤を用いることでようやく効果が観察されていた結 果と関連づけられるかもしれない [40]。

超高密度に生じた'OHの制御は生体内ではほぼ不可能と言える。高密度な'OH は、'OHどうしの反応が可能である。その後、比較的長寿妙なH₂O₂やO₂・といったROS へ変化することが予測されるため、むしろそれらの制御を行うほうが合理的と思われる。

γ線については、その線源の壊変率から、放出されるγ粒子 (フォトン)数が求められる。試料に飛来するおおよその粒子数を計算した。32 Gy のγ線の照射時間中 (4分間) に、球形であると仮定した試料溶液 (200 μ L) の大円の断面積に当たった粒子数 は、おおよそ1.3 × 10⁻⁷ particles/nm³と計算された。水溶液中に生じたDMPO-OHの総量は

"疎"と"密"な生成を合わせると40 µM以上であると予測され、1つのγ粒子によって 180以上の'OHが生成されていると予想できた。γ線のように算出することはできないが、 おそらくX線においても同程度の'OHが、飛来するフォトンによって生成されると考え られる。これは、局在化された"疎"と"密"な'OH生成が2次的、3次的あるいはさら に連続する電離の過程を経て生じていることを示唆している。

2.5. 結論

先行研究 [21]で報告されたように、低LET放射線の照射により水溶液中で生成 する'OHは2つの異なる密度で生じていることを示す結果が、EPRスピントラッピング法 を用いて高い再現性をもって再び観察された。 照射線量が一定 (32 Gy) のとき、線量 率や線種の変化に関わらず、DMPO密度に対する'OH生成を示すプロットは、ほぼ同じ3 相の傾向を示した。また、同じ線量率で線量を半減させた条件では、'OH生成曲線の3 相の形状は維持されたまま、'OH生成量が半減した。5 mMのカフェインを'OHの消去剤 として反応系に添加すると、mM レベルの"疎"な'OH生成成分は消去され、1000 mM レ ベルの"密"な'OH生成を示す成分のみが残された。本論文における実験により、低LET 放射線による局所的な超高密度生成成分の存在を検証することができた。

2.6. 図表

Table 2.1 使用したプローブ濃度と分子間距離、およびプローブ密度の関係

DMPO concentration	Probe-to- probe distance*	Probe density*
(mM)	(nm)	(μm ⁻¹)
4.9×10 ⁻¹	15.0	67
9.6×10 ⁻¹	12.0	83
1.7	10.0	100
2.3	9.0	111
3.2	8.0	125
7.7	6.0	167
2.6×10^{1}	4.0	250
6.2×10^{1}	3.0	333
2.1×10^2	2.0	500
4.9×10^{2}	1.5	667
9.6×10^2	1.2	833
1.7×10^{3}	1.0	1000

*プローブ間距離は、1 分子の DMPO が占める立方体の一辺の長さとして計算した。 **プローブ密度は、プローブ間距離の逆数から求めた。



Fig. 2.1 実験概念

スパー内のナノスケールで生じる'OHを定量的に検出するため、1分子のプローブが 占める水の体積を立方体と考え、その1辺の長さを"プローブ間距離"とし、その逆数を、単位 距離当たりに存在するプローブの数、すなわち "プローブ密度"と定義した。



Fig. 2.2 各線量の X 線照射による DMPO-OH のスペクトル

(A) 32 Gy (3.2 Gy/min)、 (B) 24 Gy (3.2 Gy/min)、(C) 16 Gy (3.2 Gy/min)、
(D) 8 Gy (3.2 Gy/min)、(E) 4 Gy (1 Gy/min)、(F) 2 Gy (1 Gy/min)。低磁場側から 2 番目の DMPO-OH のスペクトルを観察した。



Fig. 2.3 X 線を照射したときの典型的な EPR シグナル

32 Gy のX線 (3.2 gy/min) を照射したときのDMPO-OHならびにDMPO-Hの EPRシグナルを示す。標準として使用したマンガンのシグナルを〇で示す。本実験で解 析に使用した低磁場側から2番目のDMPO-OHのシグナルを破線の枠で示す。



Fig. 2.4 線量率および線質を変えたときの・OH 生成

線量を変えず、線量率を変化させたプロットを示す。(A) X線 (3.2 Gy/min)、B) X線 (4.8 Gy/min)、(C) X線 (6.4 Gy/min)、(D)γ線 (7.9 Gy/min)。A-Dの線量は32 Gy であった。 原点を通る直線的な増加について最小二乗線形近似直線を示す。Dにおけるプロットの歪み は、X線管と照射試料との位置関係による影響が考えられる。



Fig. 2.5 X 線の線量を変えた場合

線量率を変えずに線量を16 Gy に変え、同様な実験を行った。16 Gy のX線 (3.2 Gy/min) の照射によって得られたプロットを■で、32 Gy のX線 (3.2 Gy/min) の照射によっ て得られたプロットを●で示す。原点を通る直線的な増加について最小二乗線形近似直線を 示す。



Fig. 2.6 カフェイン添加による"疎"な生成の消去

予測された3 mM 程度の・OHの生成は、5 mM のカフェインの添加により完全に消 去された。原点を通る直線的な増加について最小二乗線形近似直線を示す。5 mM のカフェ インの添加により、高密度側で再び得られた直線的な増加に沿うような形で・OH生成が検出さ れた。

第3章

蛍光プローブを用いた

放射線によるヒドロキシルラジカル生成密度の検証

3.1. 諸言

第2章では、スピントラップ剤として DMPO を用い、EPR スピントラップ法を応用した プローブ密度の概念を利用した手法によって、局所的に 1700 mM を超える高密度な・OH の 生成を検証した。しかしながら局所てきに生じる"密"な・OH を補足するためには、それに相応 する DMPO 濃度が必要である。すなわち、水溶液中に均一に分散する DMPO どうしの距離が 1 nm 以下にするためには、1700 mM を超える濃度の DMPO を使用する必要がある。使用し た Dojindo Laboratories 社製の DMPO の純度は 99.0%とされているが、水溶液サンプルの体 積パーセントにして 20%以上の DMPO を使用するにあたり、相対的に試薬原液不純物の量が 増えることが予測される。したがって、不純物が由来となる EPR シグナルへの影響が取り除き 切れていない。また放射線によって水分子だけでなく DMPO 分子の分解も予測され、DMPO 分解物由来のラジカルが EPR に検出されるといった問題が指摘されており、"密"な生成成分 については十分に証明されたとは言えない部分が残っている。

そこで、電子スピンを観察する EPR ではなく、酸化反応物から放出される蛍光を観察 する蛍光プローブ法を用いれば、上述の考え得る懸念は解消されると考えられる。テレフタル 酸二ナトリウム (TPA-Na: disodium terephthalate) は OH の蛍光プローブであり [41]、ラジカ ル付加生成物であるヒドロキシテレフタル酸 (hTPA: hydroxyl terephthalate) は 310 nm の励起 光によって 425 nm の蛍光を発する (Ex.310 nm/Em.425 nm)。 TPA-Na ならびに hTPA の構 造式を Fig 3.1 に示す。

しかしながら、TPA-Naは'OH だけでなく HO2'とも反応するため [42]、HO2'由来の蛍 光の影響が新たに示唆された。第1章での記述のように、HO2'は水の放射線分解過程で、水 の励起によって生じた H'が (式 3.1)、溶存酸素と反応し (式 3.2)、以下の式で生成される。

$H_2O \rightarrow H_2O^* \rightarrow H^+ OH$	(式 3.1)
$H^{\cdot} + O_2 \rightarrow HO_2^{\cdot}$	(式 3.2)

第3章では、第2章で得られた結果の妥当性を検証するため、TPA-Naを用いた蛍 光プローブ法にて'OH 生成密度の評価を再度行い、さらに HO₂'の検出による影響を検証した。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 蛍光プローブ: TPA-Na によるヒドロキシルラジカルの検出

蛍光プローブとして TPA-Na (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo Japan) を使 用した。第2章と同様に、"プローブ密度"の概念を下に試料濃度を調製した。1000 mM レベ ルの極めて密な'OH の生成を検出するためには、 DMPO と同様に高濃度の TPA-Na が必要 であるが、TPA-Na は DMPO と比較して溶解度が低い。そのため、実験に使用した最大濃度 は、 DMPO では 1.7×10^3 mM であったが、 TPA-Na は 2.1×10^2 mM とした。使用した TPA-Na 濃度とプローブ間距離、ならびにプローブ密度の関係を Table 3.1 に示す。全ての試 薬の調製には Milli-Q 水を用いた。

用時調製した TPA-Na 水溶液試料 (350 μL) を 1.5mL PE マイクロチューブに移し、 X線を照射するまで氷上で保管した。照射後の各 TPA-Na 水溶液を蛍光光度計を用いて測定 し、DMPO-OH 由来の EPR スペクトルを得た。

3.2.2. 脱酸素条件での試料作成

溶存酸素とH・との反応を排除するため、脱酸素 TPA-Na 水溶液に対しX線を照射 し、測定を行った。脱酸素 TPA-Na 水溶液の調製には、40 分間窒素ガスでバブリングし た Milli-Q 水を使用し、作業は窒素ガス置換したグローブボックス内(酸素濃度 0.0%) で行った。上記と同様に段階的に濃度を調整した TPA-Na 水溶液(350 mL)を 1.5mL PE マイクロチューブに移し、酸素非透過性の袋に密封した後、グローブボックスから取り 出して X 線を照射した。

3.2.3. X線の照射によるヒドロキシルラジカルの発生

32 Gy の X 線 (3.2 Gy/min) を上記の水溶液試料へ照射した。照射装置ならびに 照射条件は第1章に準ずる。

3.2.4. 蛍光光度計による照射後試料の測定

hTPAは安定であり、時間の経過によるシグナルの減衰は1時間程度ではほぼない。 したがって、時間経過によるhTPAのシグナル強度の補正は行っていない。照射後、すみやか に照射後試料を蛍光光度計 (RF-5300PC, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) にて測定した。hTPA 生成量の変化を Em.425 nm におけるピーク高をシグナル強度として比較した。セルフクエンチングを防ぐため、照射後使用 100 µL に対し Milli-Q 水を 2900 µL 加え、30 倍に 希釈した計 3000 µL の試料を石英セル (光路長:10 mm) に移しして測定を行った。測定条 件は下記の通りであった。

励起波長:310 nm、蛍光波長範囲:350-600 nm、スキャン速度:Spuer、バンド幅 (励起):5 nm、バンド幅 (蛍光):5 nm、レスポンス:Auto

試料中に生じた hTPA 濃度は、市販の hTPA (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo Japan) を用い、既知の濃度の hTPA 水溶液で作成した検量線に基づいて算出した。

3.3. 結果

3.3.1. TPA-Na を用いた X 線によるヒドロキシルラジカル生成密度評価

TPA-Na密度の上昇に伴って蛍光強度は増加し、プロットは緩やかな曲線的な 増加を示した。その後、TPA-Naの最大密度までプラトー領域が続いた (Fig. 3.2)。DMPO を用いたEPRスピントラッピング法を用いた結果とは異なり、TPA-Na密度に対する蛍 光強度を示すプロットは明確な変曲点を示さなかった。このような曲線的な増加ののち、 TPA-Na密度が125 μm⁻¹ 以降でプラトー領域を示した。また、1700 mMレベルの "密" な'OH生成を示す成分は、TPA-Naの溶解度の低さから測定不可能であった。

3.3.2. 脱酸素条件下での X 線によるヒドロキシルラジカル生成密度評価

窒素飽和による脱酸素条件では、非脱酸素条件と比較して、hTPAの蛍光強度 が約80%減少した。TPA-Na密度に対するhTPAのプロットは、やや直線性を示した。そ の後、TPA-Naの最大密度までプラトー領域が続いた (Fig. 3.3)。

3.4. 考察

溶存酸素存在下において蛍光プローブ法ではプローブ密度を徐々に増加させるにつれ、プロットは緩やかな曲線的な増加を示した。一方、脱酸素条件下では、hTPAの蛍光強度が約80%減少した。TPA-Naによる'OH検出は、溶存酸素による影響が大きいことが分かった。すなわちTPA-Naは、'OHよりもむしろHO₂'を検出しやすいものと思われる。また、蛍光プローブ法とEPRスピントラッピング法を比較して、'OH生成量を示す縦軸の値は、どちらもµM単位の値であるが、EPRスピントラッピング法の結果は一桁高い値となった。これはプローブの反応速度もしくは反応効率と関係していると考えられる。

溶存酸素による影響が大きく、TPA-Na密度に対するhTPA濃度の増加は曲線を 示しているものの、溶存酸素存在下ではおよそ 50 μm⁻¹ から、脱酸素条件下では 125 μm⁻¹ 以降からプラトー領域を示している。第2章で得られた結果と同様に、 OHの生成 を観察しているものと思われる。

TPA-Naは溶解度に限界があるため、予想通り、低LET放射線であるX線の照射 では極めて高密度な'OHの生成を観察することができなかった。低LET放射線と比較して、高 LET放射線はブラッグピークと呼ばれるエネルギーの極大部分を示し、高密度に電離または 励起を引き起こす。前報で報告のあるように、高LET放射線では比較的"疎"な'OH生成が減 少し、高密度な'OH生成が主になると考えられる。高LET放射線を照射することで、EPR 法で観察された、プラトー後に再び現れた原点を通る直線的な増加を得られる可能性がある。

3.5. 結論

X線の照射により水中で生じる'OHの2つの異なる密度について、その測定原 理をさらに検証するため、EPRスピントラッピング法とTPA-Naを用いた蛍光プロー ブ法とを比較した。TPA-Naは溶解度に限界があり、最大 208 mM までの測定に限ら れる。そのため、第2章にてEPRスピントラッピング法で観察された高密度なプロー ブを用いることでようやく検出されるような、原点を通る直線部は観察されなかっ た。このため、蛍光プローブ法でもTPA-Na密度の上昇に伴って蛍光強度が増加した が、TPA-Naの最大密度までプラトー領域が続いた。蛍光法では、明確な変曲点を示 したEPR法と異なり、プローブ密度を徐々に増加させるにつれ、プロットは緩やかな 曲線的な増加を示してプラトーに達した。この理由として、TPA-NaとHO₂とが反応 して蛍光を発した可能性が考えられた。しかし、脱酸素条件下では不明瞭ながらも TPA-Na密度: 125 µm⁻¹ にて観察される変曲点まで、直線的な増加を示した。

3.6. 図表

Table 3.1 使用したプローブ濃度と分子間距離、およびプローブ密度の関係

TPA-Na	Probe-to-	Probe
concentration	probe distance*	density*
(mM)	(nm)	(μm ⁻¹)
1.4×10 ⁻³	105.0	10
3.8×10 ⁻³	76.0	13
7.7×10 ⁻³	60.0	17
2.1×10^{-2}	43.0	23
4.2×10^{-2}	34.0	29
6.2×10^{-2}	30.0	33
2.1×10^{-1}	20.0	50
4.9×10 ⁻¹	15.0	67
7.6×10^{-1}	13.0	77
1.7	10.0	100
2.3	9.0	111
3.2	8.0	125
7.7	6.0	167
2.6×10^{1}	4.0	250
6.2×10^{1}	3.0	333
1.1×10^{2}	2.5	400
1.6×10^{2}	2.2	455
1.8×10^{2}	2.1	476
2.1×10^{2}	2.0	500

*プローブ間距離は、1分子のTPA-Naが占める立方体の一辺の長さとして計算した。 **プローブ密度は、プローブ間距離の逆数から求めた。



Fig. 3.1 TPA-Na ならびに hTPA の構造式

TPA-Naは蛍光を有しないが、TPA-Naの'OH付加体であるhTPAは特異な蛍光を有する (Ex.310 nm/Em.425 nm)。



Fig. 3.2 蛍光法による検出

蛍光法では、明確は変曲点を示さず、曲線的な増加を示した。その後、プラト ー状態のまま TPA-Na の最大濃度に達した。



Fig. 3.3 蛍光法による検出

脱酸素条件下ではシグナル強度が約80%減少した。

第4章

重粒子線がん治療装置 HIMAC を用いた 各種重粒子線によるラジカル生成密度の評価

4.1. 諸言

第3章では、X線の照射によって水溶液中に生じる OH の密度を TPA-Na を用いた 蛍光プローブによって、第2章と同じ解析原理に基づいて再度検証を行った。しかしながら、 TPA-Na は溶解度に限界があり、1000 mM を超えるような極めて"密"な OH 生成を検証 することが不可能であった。"プローブ密度"を解析法の基本原理を改めて検証するた め、重粒子線を用いて比較的 LET が低い条件と高 LET 条件の OH 生成密度を評価し、 比較した。

4.2. 材料と方法

4.2.1. EPR スピントラッピング剤: DMPO によるヒドロキシルラジカルの検出

第2章と同様にOHを測定するため、DMPOを用いた EPR スピントラッピング 法を利用した。DMPO 濃度ならびに測定法は第2章に準ずる。高 LET 条件でのブラッ グピークの幅 (奥行き方向) は非常に鋭く、3 mm 程度である。そのため、厚みのある 試料では照射されない部分が現れる。したがって、照射試料に対し重粒子線を均等に照 射するためには、鋭いピーク内に収まるよう試料の厚さをできる限り薄くすることが望 ましい。そこで各濃度の DMPO 水溶液 (350 mL) をチャック付きのポリエチレン製の 袋 (縦:55 mm、横:40 mm、 厚み:0.04mm) に密封し、極力厚さが1 mm 以下となる よう均一 に照射面となるアクリル板に平ら貼りつけた。

4.2.2. 蛍光プローブ: TPA-Na によるヒドロキシルラジカルの検出

第3章と同様に'OH を測定するため、TPA-Na を用いた蛍光法を利用した。 TPA-Na 濃度ならびに定量法は第3章に準ずる。重粒子線を照射するにあたり、前述と 同様にチャック付きのポリエチレン製の袋に密封し、アクリル板に平らに貼りつけた。

4.2.3. 脱酸素条件での試料作成

溶存酸素とH・との反応を排除するため、脱酸素 TPA・Na 水溶液に対し重粒子線を 照射し、測定を行った。第3章に準じ調製した脱酸素 TPA・Na 水溶液をチャック付きのポリエ チレン製の袋に密封し、酸素非透過性の袋に密封した後、グローブボックスから取り出し て炭素線を照射した。

4.2.4. 重粒子の照射によるヒドロキシルラジカルの発生

重粒子線を、それぞれの水溶液試料に照射した。重粒子線の照射には量研機 構・放医研の重粒子がん治療装置 HIMAC を用いた。ブラッグピークの深さや大きさ、 あるいは重粒子線を止める位置は、バイナリーフィルター (BF) を用いて、ある程度自 由に調節することが可能である。比較的 LET の低い重粒子線を照射するにあたり、BF を 0 mm にすることで、ブラッグピークより手前の部分、すなわち比較的低 LET 条件の 重粒子線を照射した。また、下記のBFを挿入することにより、ブラックピークの極大部分付近、すなわち高LET条件の重粒子線を照射した。

炭素線 (290 MeV/n)、シリコン線 (490 MeV/n)、鉄線 (500 MeV/n) をそれぞれ 照射した。低LET 条件の重粒子線を照射するため、各線種において BF を 0 mm 指定し、 LET を炭素線では 13 keV/µm、シリコン線では 55 keV/µm、鉄線では 200 keV/µm とし た。高LET 条件の重粒子線を照射するため、炭素線では BF: 147 mm を、シリコン線 では BF: 135 mm を、鉄線では BF: 70 mm を指定した。このときのLET は、炭素線 では 70 keV/µm、シリコン線では 272 keV/µm、鉄線では~ 590 keV/µm であった。

4.3. 結果

4.3.1. DMPO を用いた重粒子線によるヒドロキシルラジカル生成密度評価

Fig. 4.1にEPR法により測定した、LETの違いによるDMPO-OH生成量の比較を 示す。各種重粒子線において、第2章における低LET放射線の結果と同様に、プロット した曲線は3相を示した。ビーム核種ならびにLET条件に関わらず、変曲点の横軸 (DMPO密度)における位置は変わらず、約3 mM に相当する密度でOHが生成している ことが示された。一方で、BF:0 の低LET条件と比較して、ブラッグピーク付近の高LET 条件の照射では、変曲点における縦軸で示されるDMPO-OH生成量が低下した。

極めて高密度な'OH生成を示すと考えられる、DMPOの最大密度 (1000 μm⁻¹) におけ るDMPO-OH生成量は変化しておらず、LET条件を問わず再び原点を通る直線を示した。 しかしながら、高LET条件ではより多くの点が、より低密度のDMPOでも、プロットが 直線に乗る傾向がみられた。

4.3.2. テレフタル酸ニナトリウムを用いた重粒子線によるヒドロキシルラジカル生成密度評価

Fig. 4.2に蛍光法により測定した、LETの違いによるhTPA生成量の比較を示す。 LETが低い条件 (BF: 0 mm) では、第3章でのX線と同様のプロットを示した。すなわち、 TPA-Na密度の増加に従って、明確な変曲点を示さない曲線的な増加を示したのち、 TPA-Naの最大濃度までプラトー領域が続いた。

ブラッグピーク付近の高LET条件の重粒子線照射では、X線もしくはBF:0mm の条件と比較して、蛍光強度は低下した。さらに、TPA-Na密度が500 µm⁻¹ 程度の付近 で、低LET条件では観察されない原点を通ると思われる直線的な増加が観察された。

4.3.3. 脱酸素条件下におけるヒドロキシルラジカル生成密度評価

Fig. 4.3 に蛍光法により測定した、脱酸素条件下での hTPA 生成量を示す。炭素線の照射においても、第3章で得られた X線での結果と同様に、窒素飽和による脱酸素条件下では溶存酸素存在下と比較して、hTPA の蛍光強度が約80%減少した。また脱酸素条件下では hTPA 濃度の増加は直線的で変曲点も確認できた。しかしながら、新たに低 LET 照射では 16.6 µm⁻¹、高 LET 照射では 33.3 µm⁻¹付近に変曲点が観察された。

低 LET 条件では、TPA-Na 密度の上昇に伴って蛍光強度が増加したのち、

TPA-Naの最大濃度までプラトー領域が続いた。脱酸素条件下においても、高LET条件では、原点を通ると思われる直線的な増加が観察された。

4.4. 考察

EPR スピントラッピング法を用いた実験の結果から予測される、重粒子線によって水溶液中に生じる'OH の距離は、低 LET 放射線と同様に、プロットの変曲点から 8-10 nm であると算出された。同時に、この時のプローブ濃度は 3.2 mM であり、1 つ のスパー内に約 3 mM に相当する密度をもって'OH が生じていることが予測された。 の結果は第 2 章の結果と同じであり、スパー内部の'OH 生成に密度は各条件によって変 化しないだろうと考えられる。すなわち、1 つのスパー内における活性種の生成は、粒 子の電離能力に左右されるため、本実験で用いた程度の条件の変化によって大きく変わ りはないだろうと考えらえられる。3 mM 程度の "疎" な'OH の生成はビーム核種や LET の違いによってその生成密度は大きく変化しないことが明らかとなった。

また、BF:0 の低 LET 条件と比較して、ブラッグピーク付近の高 LET 条件の照 射では、変曲点における縦軸で示される DMPO-OH 生成量が低下した。スパーそのも のの局在は LET に依存しているため、低 LET 条件と高 LET 条件では、スパーの分布は 大きく異なると考えられる (Fig. 4.4)。ブラックピーク付近の高 LET 条件では、スパー 間距離が短く、トラック構造のようなスパーの重なりが生じる。したがって、高 LET 条件では、孤立スパーの割合が少なく、低密度なプローブで検出可能な"まばら"なOH 生成の検出量が少なくなったことを示唆している。

TPA-Na を用いた蛍光法において、各種重粒子線の LET の低い条件では、X 線 と同様のプロットを示した。しかしながら、ブラッグピーク付近の高 LET 領域では、 プローブ密度が 500 µm⁻¹ 近辺で、プラトー領域に続いて、原点を通る直線的な増加が 観察された。これは、低 LET 条件では水溶液中のプローブ間距離が 2 nm であっても"密" な生成を捕えることはできないが、高 LET 条件ではプローブ間距離が 2.5 nm 以降から 検出され始めることを意味している。

第2章でのX線照射実験においても、高密度なOHの生成が検出された。低LET 放射線では、飛跡末端部での一部スパーの重なりが予想されるが、高LET 放射線のよ うな明確なトラック構造あるとは言えず、その理由は不明であった。一方で、ブラッグ ピーク付近の高LET 条件では、トラック構造を形成するので、"密"なOH 生成成分 の割合が増えることが予想される。EPR スピントラッピング法と蛍光プローブ法のどち らの手法においても、極めて高密度なプローブでないと検出不可能な極めて高密度の OH 生成が観察された。これらの直線部は、依然高密度なプローブが必要なものの、低 LET 条件と比較して、より低密度のプローブでも検出が可能であった。この結果は、低 LET 条件で生成されるよりも大きな空間内での'OH 生成、すなわち球状のスパーの連な りである円柱状の、イオントラック構造のコアにおける高密度な電離をまさに反映した 結果であると考えられる。

脱酸素条件下での炭素線照射によって、新たに低 LET 照射では 16.6 μm^{-1} 、高 LET 照射では 33.3 μm^{-1} 付近に変曲点が観察されたことから、TPA-Na を酸化させる活性 種の密度が 16.6–33.3 μm^{-1} であったことを示している。重粒子線が生じる極めて密な OH 生成は、酸素消費を伴わない HO₂ の生成(式 4.1 および 4.2)を可能にしており、ここ で得られた結果は、HO₂ の生成密度を反映している可能性がある。

$OH + OH \rightarrow H_2O_2$	(式 4.1)
$H_2O_2 + OH \rightarrow H_2O + HO_2$	(式 4.2)

4.5. 結論

DMPOスピントラッピング法を用いた評価では、高LET条件では低LET条件 と比較して、"疎"な生成成分の減少が観察され、さらに"密"な生成成分の割合 が増えた。また、蛍光プローブ法を用いた評価では、高LET条件では、低LET条件で は観察されなかった原点を通る直線部高密度側に観察できた。高LET条件の重粒子線 の照射により、蛍光プローブ法においても、"疎"と"密"な2種類の·OH生成が確かめら れた。放射線による'OH生成には、"疎"と"密"な2種類の生成密度があり、これはビー ム種とは無関係に生じている。ビーム核種やLETの値によらず、プローブ密度:125 µm⁻¹ 以降でプロットがプラトーとなることから、スパー内部のような極めて局所的 な電離密度 (OH密度) は、LETの値やビーム核種によって変化しないだろうと考え られる。一方で、スパーが連立して形成されるトラック構造のように、LETの値によ ってスパーの偏在が変わると考えらえる。したがって、高LET条件ではスパーの重な りが生じ、"密"な生成の割合が増えると考えられる。これは、EPRスピントラッピ ング法にて、より低密度側のDMPO密度でもプロットが直線に乗る傾向を示した結果、 蛍光プローブ法にて高LET条件のみプラトー後に直線部を観察することができた結 果から予測される。TPA-Naを用いた蛍光プローブ法で、低酸素条件で新たに得られ た変曲点は、OHよりもむしろ酸素消費を伴わないHO,生成の密度を示していると思 われる。

LETによって"疎"な生成と"密"な生成の割合が変わることがEPRスピン トラッピング法ならびに蛍光プローブ法、2種類の測定法で確かめられた。極めて高 密度の'OH生成が、蛍光プローブ法で評価できたことから、本解析法の基本原理は正 しいと言える。

4.6. 図表



Fig. 4.1 EPR による検出

上段: 低 LET 領域 (BF 無し)、下段: 高 LET 領域 (ブラッグピーク付近)。 原点を通る直線的な増加について最小二乗線形近似直線を示す。



Fig. 4.2 蛍光法による検出

上段: 低 LET 領域 (BF 無し)、下段: 高 LET 領域 (ブラッグピーク付近)。原点を通る直線的 な増加について最小二乗線形近似直線を示す。



Fig. 4.3 脱酸素条件下での hTPA 生成密度の解

(A) 低 LET 領域 (BF 無し)、(B) 高 LET 領域 (ブラッグピーク付近)。原点を通 る直線的な増加について最小二乗線形近似直線を示す。



Fig. 4.4 LET の違いによるスパー形成の模式図

参考文献

- 小澤俊彦,安西和紀,松本謙一郎.放射線の科学 生体影響および防御と除去. 東京化学同人 2012: 56-57
- 2. Ozawa T. Generation of free radicals in living organisms by radiation and their functions. *National Institute of Radiological Sciences symposium* 1995; **26**: 5-13
- Hall EJ, Amato J G. *Radiobiology for the Radiologist*, seventh edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012; 9-10
- 環境省 ホームページ. 放射線の基礎知識 説明資料 (平成 28 年度版). URL: http://www.env.go.jp/chemi/rhm/kisoshiryo/h28shiryo1b.html. 閲覧日: 2018.12.14
- 5. 放射線医学総合研究所 ホームページ. 重粒子線治療について知りたい方へ. URL: http://www.nirs.qst.go.jp/hospital/index.shtml. 閲覧日: 2018.12.14
- 室屋 裕佐, 基礎編 5 水と水溶液の放射線化学, RADIOISOTOPES 2017; 66: 425-435

- Bobrowski K. Radiation chemistry of liquid systems. IN: Sun Y, Chmielewski AG, eds. *Applications of ionizing radiation in materials processing*. Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Warszawa 2017; 81-116
- 8. 日本アイソトープ協会. 放射線取扱の基礎 6版.丸善株式会社 2009: 180-183
- 9. 日本放射化学会. 放射化学用語辞典 (2006 年度版). 日本放射化学会 2016:65
- 10. 杉浦紳之. 放射線生物学 (放射線双書)3 訂版. 通商産業研究社 2008: 9-14
- 小澤俊彦. 電子スピン共鳴(ESR)で生体を探る. 北陸地域アイソトープ研究 会誌 2002; 4: 3-22
- Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1989; 70: 737-757
- Bielski BHJ, Cabelli DE and Arudi RL Reactivity of HO₂/O₂ radicals in aqueous solution. J. Phys. Chem. Ref. Date 1985; 14: 1041-1100
- 14. 厚生労働省.政府統計 平成 29 年我が国の人口動態 (平成 27 年までの動向).2017
- Ogawa Y, Ueno M, Sekine-Suzuki E, et al. Non-invasive measurement of melanin-derived radicals in living mouse tail using X-band EPR. J Clin Bio Nutr. 2016; 59: 160-164
- 16. Ding NH, Li JJ, Sun LQ. Molecular mechanisms and treatment of radiation-induced lung fibrosis. *Curr Drug Targets*. 2013; **14**:1347-1356.
- Ishii H, Choudhuri R, Mathias A, *et al.* Halofuginone Mediated Protection against Radiation-Induced Leg Contracture. J. Oncol 2009; 35: 315-319.
- 18. Tsai JY, Chen FH, Hsieh TY, *et al.* Effects of indirect actions and oxygen on relative biological effectiveness: estimate of DSB induction and conversion induced by gamma rays and helium ions. *J Radiat Res* 2015 ; 56: 691-699
- Hirayama R, Ito A, Tomita M, *et al.* Contributions of Direct and Indirect Actions in Cell Killing by High-LET Radiations. *J Radiati Res* 2009 ; **171**: 212-218
- 20. Hirayama R, Ito A, Noguchi M, *et al.* OH radicals from the indirect actions of X-rays induce cell lethality and mediate the majority of the oxygen enhancement effect. *J Radiat Res* 2013; **180**: 514-523

- Maxwell CA, Fleisch MC, Costes SV, *et al.* Targeted and nontargeted effects of ionizing radiation that impact genomic instability. *Cancer Res* 2008; 68: 8304-8311
- Weiss JF, Landauer MR, History and development of radiation-protective agents. *Int. J. Radiat. Biol* 2009; 85: 539-573
- 23. Sekine-Suzuki E, Nakanishi I, Shimokawa T, *et al.* High-throughput screening of radioprotectors using rat thymocytes, *Anal. Chem* 2013; **85**: 7650-7653.
- 24. Imai K, Nakanishi I, Ohno A, Kurihara M, *et al.* Synthesis and radical-scavenging activity of a dimethyl catechin analogue. Bioorg. Med. Chem. Lett 2014; **24**: 2582-2584.
- 25. George EP, 出口安夫他 訳. 常磁性共鳴. 化学同人 1966: 1-80.
- 26. 山内淳. 磁気共鳴-ESR—電子スピンの分光学 (新・物質科学ライブラリ (15)). サイエンス社. 2006: 218-221
- 27. Reinke LA, Moore DR, Sang H, *et al.* Aromatic hydroxylation in PBN spin trapping by hydroxyl radicals and cytochrome P-450. *Free Radic Biol Med* 2000; **28**: 345-350
- 28. Timmins GS, Liu KJ, Bechara EJ, *et al.* Trapping of free radicals with direct in vivo EPR detection: a comparison of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide and 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide as spin traps for HO• and SO₄⁻⁻. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 329-333
- Carmichael AJ, Makino K, Riesz P. Quantitative aspects of ESR and spin trapping of hydroxyl radicals and hydrogen atoms in gamma-irradiated aqueous solutions. *J Radiat Res*1984; 100: 222-234
- 30. Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 1997; **22**: 885-888
- 31. Mizuta Y, Masumizu T, Kohno M, *et al.* Kinetic analysis of the Fenton reaction by ESR-spin trapping. *Biochem Mol Biol Int* 1997; **43**: 1107-1120
- 32. Mikuni T, Tatsuta M, Kamachi M. Production of hydroxyl-free radical by reaction of hydrogen peroxide with *N*-methyl-*N*²-nitro-*N*-nitrosoguanidine. *Cancer Res* 1985; 45: 6442–6445
- Samuni A, Black CD, Krishna CM, *et al.* Hydroxyl radical production by stimulated neutrophils reappraised. *J Biol Chem* 1988; 263: 13797-13801

- Matsumoto K, Ueno M, Nakanishi I, *et al.* Density of Hydroxyl Radicals Generated in an Aqueous Solution by Irradiating Carbon-Ion Beam. *Chem Pharm Bull* 2015; 63: 195-199
- 35. Ueno M, Nakanishi I, Matsumoto K. Method for X-ray-induced hydroxyl radical-scavenging activity of biological compounds/materials. *J Clin Biochem Nutr* 2013; **52**: 95-100
- 36. Ishikawa T, Hiraoka T, Mitsui D, Suya T. 高線量率ガンマ線照射装置の線量測定. *NIRS Technology* 2010; **5**:13-19
- Shi X, Dalal NS, Jain AC. Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem Toxicol* 1991; 29: 1–6
- Kesavan PC. Oxygen effect in radiation biology: Caffeine and serendipity. Curr Sci 2005; 89: 318-327
- Devasagayam TPA, Kamat JP, Mohan H, Kesavan PC. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1282**: 63-70
- 40. Sekine-Suzuki E, Nakanishi I, Shimokawa T, *et al.* High-throughput screening of radioprotectors using rat thymocytes. *Anal Chem* 2013; **85**: 7650–7653
- 41. Linxiang L, Abe Y, Nagasawa Y, *et al.* An HPLC assay of hydroxyl radicals by the hydroxylation reaction of terephthalic acid. *Biomed Chromatogr* 2004; **18**: 470–474
- 42. Kwon BG, Lee JH. A kinetic method for HO₂'/O₂'- determination in advanced oxidation processes. *Anal Chem.* 2004; **76**: 6359-6364.
謝辞

本研究は国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究 所で行われました。また、本研究は放医研重粒子線がん治療装置の共同利用の一環とし て行なわれました。

本研究を遂行するにあたり、終始懇切丁寧なご指導と的確なご助言を頂きまし た、放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部 障害分子機構解析研究チームの松本 謙一郎 チームリーダー (千葉大学大学院客員教授) に厚く感謝の意を示すと共に、深 く御礼申し上げます。また、障害分子機構解析研究チームの皆様に深謝いたします。

千葉大学大学院の博士課程での研究生活は多くの方々のご協力により充実し た日々を送ることができました。誠にありがとうございました。