

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710096

研究課題名(和文)レーザー駆動超短パルスX線マイクロビームを用いた放射線生物影響の解明

研究課題名(英文)Radiobiological effect induced by laser-plasma soft x-ray microbeam

研究代表者

錦野 将元 (NISHIKINO, Masaharu)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究副主幹

研究者番号：70370450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：超短パルス・超高強度レーザー技術による高輝度X線光源とX線光学素子を組み合わせて細胞程度まで集光可能な軟X線マイクロビーム照射装置を開発し、細胞試料に照射して誘発される放射線生物損傷の生成メカニズムに関する研究を実施した。また、マイクロビーム照射や軟X線顕微鏡へも応用可能な高原子番号金属材料を用いたレーザープラズマ軟X線源の開発や軟X線用フレネルゾーンプレートを用いた軟X線顕微法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Techniques for generating high energy bright short-pulse x-rays have been developed with utilizing intense ultrashort laser pulses. X-ray focusing optics has enabled focused x-ray beams of micron spot size in soft x-ray regions. The short duration of laser produced plasma source could be a new source in contrast to conventional x-ray sources in investigating the mechanism of the radiation effect on biological cells. We investigated whether the soft X-ray laser induces the DNA double strand breaks (DSB) and single strand breaks (SSB) in living cell or not. The appearance of DSB induced by soft X-ray laser was significantly different in that induced by a conventional high energy X-ray source. We also demonstrated an efficient extreme ultraviolet source for an X-ray microscopy technique, and developed a grazing angle incident reflection type soft-X-ray microscope using a Fresnel zone plate.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：量子ビーム科学・量子ビーム科学

キーワード：レーザープラズマX線 軟X線レーザー 放射線生物影響 マイクロビーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 軟 X 線照射装置と放射線生物影響

放射線治療や放射線影響研究では、細胞集団に誘発される放射線生物影響の研究を医用直線加速器や放射性同位体を利用して行われてきたが、90年代半ばより粒子線やX線を用いたマイクロビーム照射装置による細胞レベルの放射線生物影響の研究が日本、米国、欧州の加速器施設を中心に展開されている[1]。これらのマイクロビーム照射装置では、放射線照射された単一細胞の周辺の照射されなかった細胞において誘発される「バイスタンダー効果(放射線を照射されたかのような反応)[2]」について、情報伝達機構や周辺細胞での遺伝子発現について研究[3]が行われており、その中で放射線治療における低放射線量照射におけるバイスタンダー効果の検討が進められている[4]。そのような放射線生物影響の解明にレーザープラズマX線が持つ「超短パルス性」「集光能力」「光子エネルギー可変性」が有効であると考え、レーザープラズマX線を用いたX線ビーム照射装置の開発と放射線損傷の観察に関する研究を開始した。

(2) 軟 X 線計測技術の高度化

近年、プラズマ軟 X 線レーザー、レーザープラズマ軟 X 線源や X 線自由電子レーザーの開発により超短パルス・高輝度 X 線源による観察や加工、また放射線生物影響研究のような応用研究が可能となりつつある。軟 X 線の中でも波長 $\lambda=2.3-4.4\text{ nm}$ の領域は「水の窓」と呼ばれており、水にほとんど吸収されない反面、生体を構成する炭素に強く吸収される。そのため、この波長領域の X 線を使用した細胞をそのまま観察することが可能な軟 X 線顕微鏡を目指した研究が行われているが、軟 X 線の光子数が少ないため光源の高輝度化に関する研究が進められている[5]。また、X 線顕微手法においても放射光や X 線自由電子レーザーを用いた軟 X 線顕微鏡の開発が活発化している[6]。

そこで本研究では、生物試料観察に有利な波長である水の窓領域の高輝度軟 X 線光源の高度化に関する研究と同時に超短パルス・高強度レーザー技術による「レーザー駆動超短パルス軟 X 線源」と「X 線光学素子」を組み合わせた軟 X 線顕微計測装置の開発を行った。

(参考文献)

- [1] Y. Kobayashi *et al.*, *J. Radiat. Res.* **50**: Suppl., A29(2009).
- [2] V. M. Sokolov *et al.*, *Oncogene* **24**, 7257-7265 (2005).
- [3] N. Hamada *et al.*, *Mutat. Res.* **639**, 35 (2008); M. Iwakawa *et al.*, *Mutat. Res.* **642**, 57 (2008).
- [4] K. M. Prise and Joe M. O'Sullivan, *Nature Reviews Cancer* **9**, 351 (2009).

[5] T. Higashiguchi *et al.*, *Appl. Phys. Lett.* **100**, 014103 (2012).

[6] A. Barty *et al.*, *nature photonics*, **2**, 415

2. 研究の目的

本研究では、軟 X 線レーザー(90eV)を細胞程度の大きさまで集光し、可視光顕微鏡下で試料(細胞)に照射することが可能な軟 X 線マイクロビーム照射装置の開発、X 線光学素子を用いた顕微法、軟 X 線光源の開発を行う。また、開発した装置によりがん細胞へ軟 X 線照射を行い、その後に引き起こされる DNA 損傷の研究を行う。軟 X 線照射による損傷のメカニズムについて DNA 二本鎖切断の修復関連タンパク質の活性化を解析し、修復伝達機構へ与える影響や放射線応答について解析を行う。

また、幅広い生物応用研究への使用可能なビスマス等の高原子番号金属材料を用いた 200-300eV のエネルギー領域のレーザープラズマ X 線源の開発と同時に、軟 X 線用の光学素子を用いた高空間分解能を持つ軟 X 線顕微手法の開発を行う。

3. 研究の方法

レーザープラズマ軟 X 線を集光して細胞レベルの X 線照射を実現するには、可視光顕微鏡下でサンプルの照準を合わせ、これに軟 X 線ビームを集光・照射可能な装置が必要となる。軟 X 線照射による放射線損傷の実験として図 1 のような軟 X 線マイクロビーム照射装置の開発を行う。本装置は、30-50 μm 程度の大きさの単一細胞への軟 X 線照射を実現するために軟 X 線照射方向を制御可能な電動ミラーホルダを付加し、可視光による観測と軟 X 線照射とが調整可能な装置を真空容器内に製作する。また、複数の軟 X 線フィルターを電動で変更可能にすることで任意の細胞へ任意の光子数により軟 X 線照射を可能とさせる。軟 X 線照射実験では、まず始めに軟 X 線ビームの強度と集光位置・サイズを軟 X 線用背面照射型 CCD カメラにより確認し評価を行う。軟 X 線ビームの集光位置等を確認した後、細胞照射用顕微鏡装置に切り替え、同じ位置に細胞を設置して実際の照射を実施する。低光子エネルギー領域(90 eV程度)の軟 X 線を細胞に照射するためには、大気による X 線の減衰の影響を避ける必要があるため、窒化シリコン薄膜を細胞培養と同時に真空窓として使用し、X 線照射を行う。窒化膜上に貼り付いた細胞を窒化膜の裏側から軟 X 線を照射する設計のため、照射時に培養液を取り除く必要が無く、細胞のコンタミネーションの発生および、照射時の細胞へのストレスを抑制させることができる。放射線損傷研究では DNA 二本鎖切断を評価する

ための方法の一つとして、DNA 二本鎖切断に応じて活性化するタンパク質を抗原抗体反応により検出し、これを蛍光顕微鏡で観察する免疫染色法を利用した。

(a)



(b)

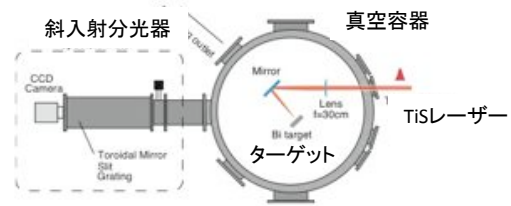


図 1 : 軟 X 線照射装置(a)外観と(b)真空容器内の軟 X 線光学素子配置

また、レーザー生成ビスマスプラズマによる軟 X 線発生を非圧縮パルスの子タンサファイアレーザー (最大エネルギー:500 mJ・パルス幅:200 ps(FWHM)・繰り返し周波数:10 Hz) を用いて行い、レーザー照射強度依存性について検討を行った。レーザー光は、平凸レンズ(焦点距離: $f=30$ cm)によりターゲットに集光照射した。得られる軟 X 線の特性は、斜入射分光器を用いたスペクトル計測により評価した。実験セットアップは図 2 (a)に示す。

水の窓領域の X 線を用いた軟 X 線顕微鏡開発を目指すため、非常に高い倍率の実現できる軟 X 線フレネルゾーンプレートを使用し、高空間分解計測手法の開発を行った。X 線の波長が短いほど空間分解能は向上するが、今回は、表面形状の観測を目的として最適である 90 eV (波長 13 nm) 光を用いて図 2(b)のような反射型の軟 X 線顕微鏡を構築した。

(a)



(b)

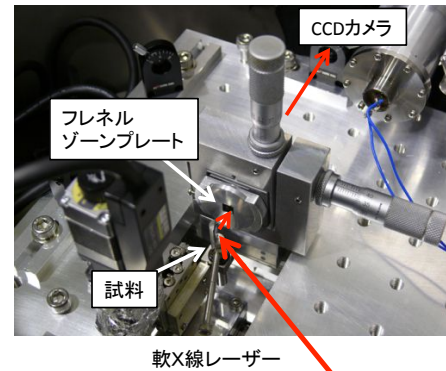
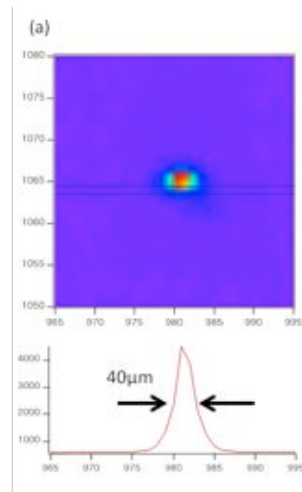


図 2 (a)軟 X 線発生実験装置の模式図 (b)斜入射型軟 X 線顕微鏡装置の写真

4. 研究成果

(1) 軟 X 線レーザー照射マイクロビーム照射装置の開発と放射線影響の確認

大気による X 線の減衰の影響を避ける必要があるため、厚さ $0.1\mu\text{m}$ の窒化シリコン膜を真空窓と細胞培養基板と同時に使用できる X 線照射方式により軟 X 線照射を行う。照射した軟 X 線ビームの空間プロファイルは、図 3 (a)のようになっている。レーザープラズマ軟 X 線ビームを照射したときに生成した DNA 損傷細胞核の様子を図 3 (b)に示す。89eV の軟 X 線照射では、核内の局所 (一部) に DNA 損傷が生成していることが確認できる。これは低い光子エネルギーにより細胞内の局所で軟 X 線エネルギーが吸収され、DNA 損傷生成が局所領域になったと考えられる。今後、エネルギー吸収領域と損傷情報の伝達について解析を行うことで DNA 損傷の生成について解明できると考えられる。これらの研究成果については、論文投稿中である。



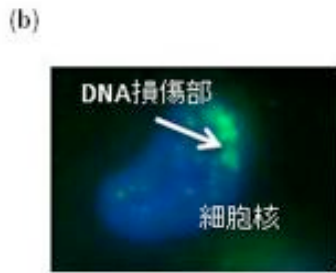


図3 (a)軟 X 線ビームプロファイル。(b)DNA 損傷が発生している細胞核

(2) 軟 X 線光源の開発

図 4(a)にビスマスプラズマの発光スペクトルを示す。図 4(b)に X 線発生強度のレーザーエネルギー依存性を示す。レーザーエネルギーが増加すると 3 nm 帯および 4 nm 帯の両方の放射強度が強くなっている。また、3 nm 帯に比べ 4 nm 帯の放射が強くなっていることについてはプラズマの電子温度が低いためであると考えられる。これらの結果から、プラズマの電子温度が、3 nm 帯の放射が強くなる以前の 4 nm 帯の放射がピークとなる温度に達していないものと考えられる。今後、プラズマの電子温度を上げるため、レーザーの強度を増加させ、3nm 帯、4nm 帯についてのレーザー強度依存性について研究を進めていく予定である。

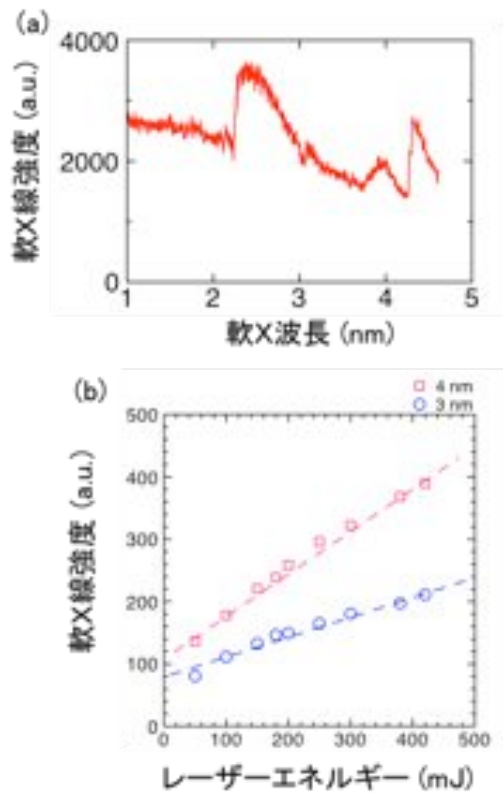


図 4(a)ビスマスプラズマからの発光スペクトル。(b)軟 X 線強度のレーザー強度依存性

(3) 反射型軟 X 線顕微手法の開発

軟 X 線を試料に 22.5 度の斜入射角で入射させて試料上の短軸 100 μm 程度の楕円状の領域を照明し、反射、散乱された軟 X 線は、有効径 500 μm 、 $f=10\text{mm}$ 、F 値 20 の FZP によって距離 800mm に設置した X 線用 CCD カメラ上に結像した。空間倍率は約 80 倍である。図 5(a)に取得された像を示す。垂直方向の空間分解能は横傷のエッジの立ち上がりから図 5(b)のように光学伝達関数の絶対値 (MTF) を求め決定した。その結果は、空間分解能は、170~255nm と算定された。水平方向の空間分解能は、斜入射角 22.5 度を考慮すると、この値の約 2.7 倍になる。今回開発を行った F=20 の光学系における回折限界は 170nm であり、ほぼ理論値に近い分解能を達成している。

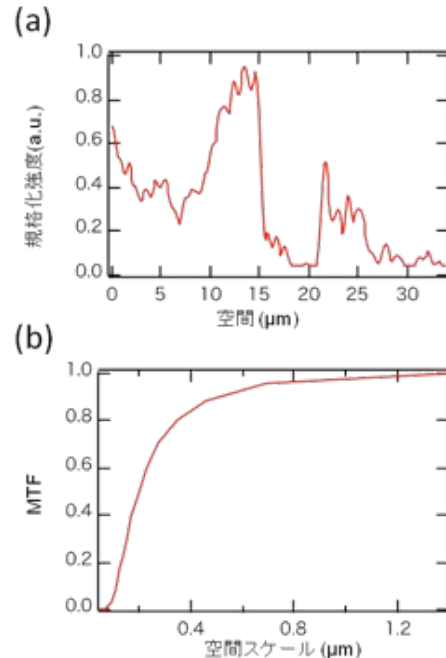


図 5(a)溝構造の空間プロファイル。(b)評価された光学伝達関数

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① M. Nishikino et al. (他 7 名), Development of Soft X-Ray Microscopy Using Fresnel Zone Plate for Observation of Laser-Induced Surface Dynamics, Springer Proceedings in Physics (X-Ray Lasers 2012), 査読有, Vol. 147, 2013, p.p. 199-202.
- ② M. Nishikino et al. (他 12 名), Observation of the nano-scale surface dynamics of femtosecond laser ablation by time-resolved soft x-ray imaging technique, Proceedings of SPIE, 査読有, vol. 8849, 2013, 88490E-1-6.

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① Masaharu Nishikino, Observation of the surface dynamics of femtosecond laser ablation by time-resolved soft x-ray imaging technique, The Eighth International Conference on Inertial Fusion Sciences and Applications, 2013 年 9 月 13 日, 奈良県立公会堂（奈良）
- ② M. Nishikino, Observation of the nano-scale surface dynamics of femtosecond laser ablation by time-resolved soft x-ray imaging technique, SPIE Optics+Photonics (X-Ray Lasers and Coherent X-Ray Sources; Development and Applications X), 2013 年 8 月 27 日, San Diego, USA
- ③ 錦野将元, プラズマ X 線レーザーの発生と物質アブレーション、2012 年応用物理学会秋期学術講演会、2012 年 9 月 11 日、愛媛大学（愛媛）
- ④ Masaharu Nishikino, Development of soft x-ray microscopy using Fresnel zone plate for observation of laser-induced surface dynamics, International conference on X-ray lasers 2012, 2012 年 6 月 14 日, Historical Center of Cordeliers, Paris, France

6. 研究組織

(1) 研究代表者

錦野 将元 (NISHIKINO Masaharu)
独立行政法人日本原子力研究開発機構
原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究副主幹
研究者番号：70370450

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし