

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05133

研究課題名（和文）クラスターイオンの生物試料に対する照射効果

研究課題名（英文）Effects of cluster ion beam irradiation in biological materials

研究代表者

長谷 純宏（HASE, Yoshihiro）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・上席研究員（定常）

研究者番号：70354959

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：これまで生物照射に利用されたことのないクラスターイオンビームの生物効果について、枯草菌の胞子を生物材料のモデルとした評価を実施した。枯草菌の胞子を凍結乾燥と結露処理によってシリコンウェハの薄片上にほぼ単層に配置した試料を作製した。試料を真空チャンバー内で照射し、生存率を調査した。2MeV H₂⁺は1MeV H⁺に対して、入射原子数あたりの致死効果がやや低く、致死効果に関して負のクラスター効果が示唆された。1MeV H⁺と2MeV H₂⁺を照射した菌株の全ゲノム解析から、誘発される突然変異の特徴に差異がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、クラスターイオンビームの微生物胞子への照射方法を確立し、生物効果に関して世界で初めて“クラスター効果”を示唆する結果を得た。「クラスター数」という新たな要素を生物影響研究に導入することで、従来の単原子イオンでは達成できない空間的分布を持つエネルギー付与が可能となり、本研究を起点として、量子ビーム生物影響の線質依存性に関する様々な研究への波及効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：We examined the biological effect of cluster ion beams, which has never been used for the irradiation of biological samples, by using the spores of *Bacillus subtilis* as a model organism. Mono-layered spore samples were prepared on small pieces of silicon wafer by freeze drying followed by dew condensation treatment. The samples were irradiated in a vacuum chamber and the survival rate was determined. The lethal effect per number of atoms for 2MeV H₂⁺ was slightly lower than that for 1 MeV H⁺, suggesting a negative cluster effect regarding a lethal effect. The whole genome sequencing analysis of the irradiated spores suggested that 1 MeV H⁺ and 2MeV H₂⁺ may have some difference in the characteristics of induced mutations.

研究分野：量子ビーム科学

キーワード：クラスターイオン 枯草菌 致死効果 突然変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クラスターイオンビームは、静電加速器の進歩に伴い、10 原子程度の重イオンクラスターを MeV エネルギー級にまで加速できるようになった 90 年代から研究が盛んになり、極めて高いエネルギー密度に起因する非線形効果に興味が集まった。MeV 級の高速クラスターイオンが利用可能な施設は世界でも数えるほどしか存在しない。研究代表者が所属する量研高崎研のタンデム加速器は、世界をリードする研究が継続的に進められている施設の 1 つであり、これまでに、主に無機材料におけるクラスター効果の実証や、近年では C_{60} フラーレンイオン生成に関する技術革新に成功している。しかしながら、生物試料に対するクラスターイオンの照射効果に関する研究は世界でも例がない。

2. 研究の目的

クラスターイオン特有のエネルギー付与は、単原子イオンビームを収束させて照射する方法では達成不可能であり、生物試料でのターゲットとなるクロマチンやヌクレオソームの直径が 10 ~ 30 nm であることを鑑みると、単原子イオンとは異なる突然変異を誘発する可能性が高い。本研究では、産業微生物として重要な枯草菌及び麹菌の孢子を生物材料のモデルとして、クラスターイオンの照射方法を確立するとともに、遺伝子変異、ゲノム構造改変及び酵素活性改変という産業利用上重要な観点からクラスターイオンの生物効果の特徴を世界に先駆けて明らかにし、その有用性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

枯草菌 (*Bacillus subtilis* M168 株) の孢子の水溶液を、約 10 mm 角にカットしたシリコンウェハ上に 3 μ l (2 \times 10⁵ 個の孢子を含む) 滴下し、凍結乾燥の後、結露処理を行うことにより、ほぼ単層に配置された試料を作製した。量研高崎研 TIARA の 3MV タンデム加速器または 3MV シングルエンド加速器に接続された真空チャンバー内で照射した。照射翌日にウェハ上から孢子を回収し、希釈平板法により致死効果を評価した。比較試験として、サイクロトロンからの 5 種類のイオンビーム (線エネルギー付与 (LET); 24 - 2, 214 keV/ μ m) 及びガンマ線の致死効果を評価した。

4. 研究成果

平成 29 年度は枯草菌の孢子をほぼ単層に配置して均一に照射する方法の確立に成功した。孢子の厚みが約 0.48 μ m であるのに対して、計算値で 1.86 μ m の飛程を持つ 1MeV C においても、照射粒子数の増加に対して生存率が指数関数的に低下し、1 \times 10¹⁰ (p/cm²) で完全に致死したことから、孢子が大きな塊りになっていることはなく、一層に近い状態で配置されていることが確認された。その後、原子あたりエネルギーの等しい炭素イオンとして、2MeV C、4MeV C₂ 及び 6MeV C₃ (いずれも 2 MeV/atom) の致死効果を比較したが、大きな差異は確認されなかった。

平成 30 年度では、致死効果に大きな差異が確認されなかった原因が、照射粒子数の測定精度によるものではないかと考え、誤差を生じる可能性がある照射粒子数測定の確度について検討した。しかしながら、高速回転式スリットと飛跡検出器を組み合わせた試験により、照射粒子数の測定精度は極めて正確であることが確認された。その後、ビームの軌道やアテネーターでの減衰率などの照射条件を最適化し、独立した 3 回の照射試験により、2MeV C、4MeV C₂ 及び 6MeV C₃ では、粒子あたりの致死効果には有意な差がないことを確認した (図 1)。

2MeV C の LET は 1,141

keV/ μ m と計算される。

ガンマ線及び 24 - 2,214 keV/ μ m の LET を持つ 5 種のイオンビームを用いて致死効果を比較した結果、線量あたりの致死効果は 156 keV/ μ m 前後でピークとなった (図 2(A), (B))。また、不活化断面積は 468 keV/ μ m 以上で最大値 (0.2 - 0.3 μ m²) に達し、この値は報告されている枯草菌孢子のコア

(DNA が含まれている組織) の断面積と合致した (図 2(C))。これらのことから、2MeV C では孢子を致死させるのに必要な量以上のエネルギーが付与されるオーバーキルとなっており、また、1 原子のヒットで孢子が致死するため、2MeV C、4MeV C₂ 及び 6MeV C₃ の粒子あたりの致死効果に差が見られないことは妥当であるとの結論に達した。

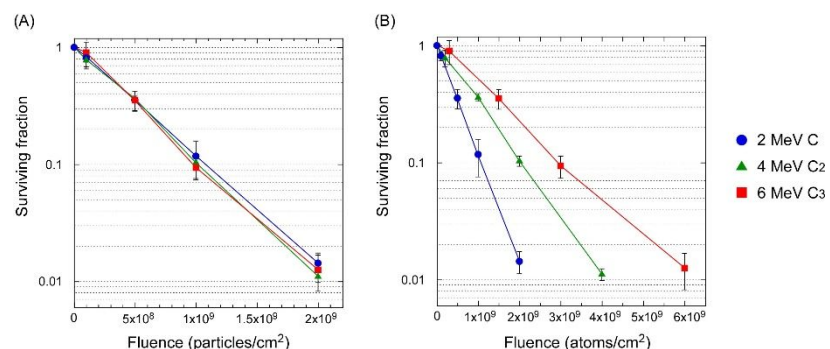


図 1 原子あたり 2MeV の炭素のクラスターイオン及び単原子イオンを照射した枯草菌孢子の生存率。(A)は粒子あたり、(B)は原子あたりでの生存率を示す。

平成 30 年度の試験結果から、単原子イオンとクラスターイオンの致死効果の差を評価するには、156 keV/μm 以下の LET 領域で比較することが相応しいと考えられた。そこで平成 31 年度（令和元年度）では、プロトンイオンを用いて単原子イオンとクラスターイオンの致死効果を比較した。LET の異なる 3 種類の単原子イオン（340keV H(LET 75.0 keV/μm)、500keV H(58.9 keV/μm) 及び 1MeV H(37.7 keV/μm)）ならびに 1 MeV H と原子あたりの入射エネルギーが等しいクラスターイオン（2MeV H₂）を照射した。いずれのイオン種においても生存率は入射原子数に対して指数関数的に低下した（図 3）。単原子イオンの致死効果は LET に依存的で、LET が最も高い 340keV H が最も致死効果が高かった。2MeV H₂ は、原子あたりの入射エネルギーは 1MeV H と等しいが、入射原子数あたりの致死効果がやや低く、致死効果に関して負のクラスター効果が表れていると考えられる（図 3(B)）。2MeV H₂ では、2 つの水素イオンが時間的・空間的に近接して入射するために同じ遺伝子に重複して作用し、入射原子数あたりに影響を受ける遺伝子数が 1MeV H に比べて少なくなると解釈できる。また、H₂ を 1 粒子とすると、2MeV H₂ の粒子あたりの LET は 340keV H の LET とほぼ等しいが、入射粒子数あたりの致死効果は 340keV H の方が高いことから、飛跡のエネルギー密度が致死効果に大きく影響することが実験的に示された（図 3(A)）。さらに、1MeV H と 2MeV H₂ を照射した各 20 系統の菌株の全ゲノム解析を実施し、突然変異の特徴を比較した。再試験で確認する必要があるが、欠失変異とその配列の特徴に関して、クラスターイオンと単原子イオンで DNA レベルでの突然変異の特徴に差異がある可能性が示唆された。

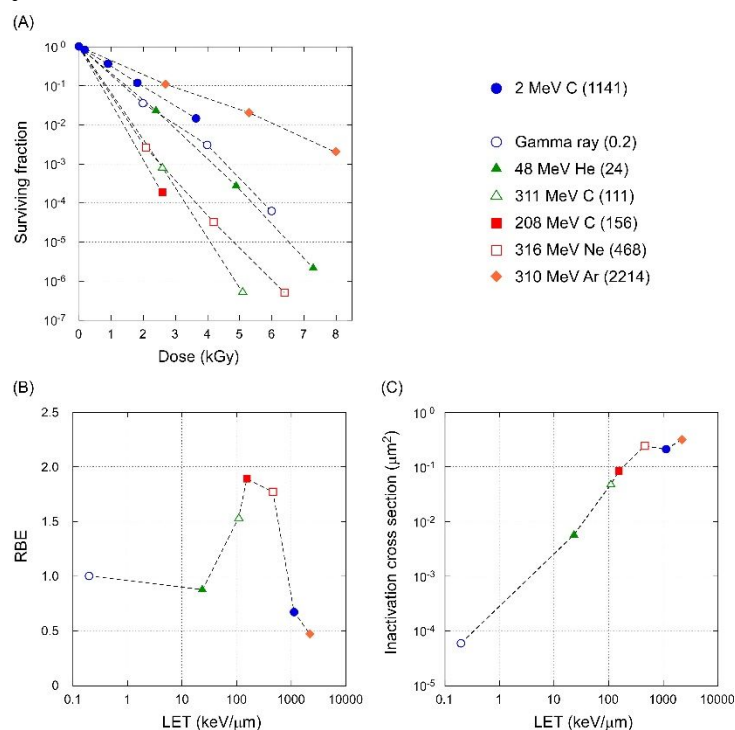


図 2 枯草菌胞子における致死効果、生物学的効果比(RBE)及び不活化断面積の LET 依存性。(A)生存率の線量反応、(B)D₁₀ 値に基づく RBE と LET との関係、(C)不活化断面積と LET との関係。凡例にある括弧内の数値は各イオン種及びガンマ線の LET(keV/μm)を示す。

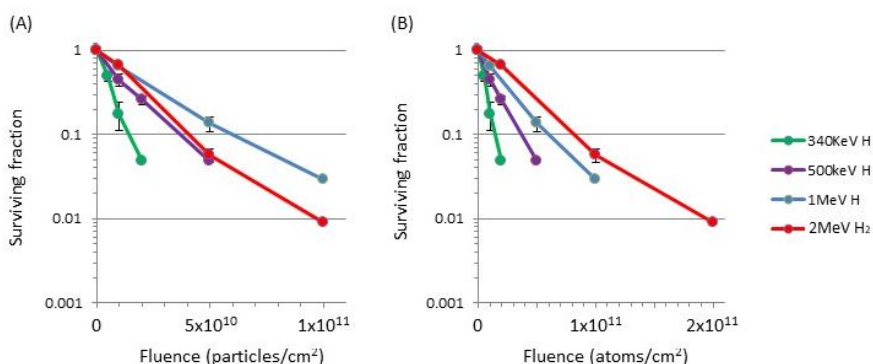


図 3 プロトンのクラスターイオン及び単原子イオンを照射した枯草菌胞子の生存率。(A)は粒子あたり、(B)は原子あたりでの生存率を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshihiro Hase, Katsuya Satoh, Atsuya Chiba, Yoshimi Hirano	4. 巻 QST-M-16
2. 論文標題 Evaluation of Particle Fluence of Cluster and Monomer Ion Beams Using a Solid-state Track Detector	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 QST Takasaki Annual Report 2017	6. 最初と最後の頁 93-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshihiro Hase, Katsuya Satoh, Atsuya Chiba, Yoshimi Hirano, Shigeo Tomita, Yuichi Saito, Kazumasa Narumi	4. 巻 3
2. 論文標題 Experimental Study on the Biological Effect of Cluster Ion Beams in Bacillus subtilis Spores	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Quantum Beam Science	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.3390/qubs3020008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hase Y, Satoh K, Chiba A, Hirano Y, Narumi K	4. 巻 QST-M-8
2. 論文標題 Biological effects of cluster ion beams in Bacillus subtilis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 QST Takasaki Annual Report 2016	6. 最初と最後の頁 103-103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hase Yoshihiro, Satoh Katsuya, Chiba Atsuya, Hirano Yoshimi, Saito Yuichi, Narumi Kazumasa	4. 巻 QST-M-23
2. 論文標題 Lethal effect of carbon cluster ion beams from TIARA 3MV tandem accelerator in bacterial spores	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 QST Takasaki Annual Report 2018	6. 最初と最後の頁 76-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 長谷純宏、佐藤勝也、千葉敦也、平野貴美、齋藤勇一、鳴海一雅	4. 巻 -
2. 論文標題 クラスターイオンの生物効果に関する研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 平成30年度連携重点研究成果報告書	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 長谷純宏、佐藤勝也、千葉敦也、平野貴美、齋藤勇一、鳴海一雅
2. 発表標題 生物試料に対するMeV級クラスターイオン照射効果の検討
3. 学会等名 第 17回放射線プロセスシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷純宏、佐藤勝也、千葉敦也、平野貴美、齋藤勇一、鳴海一雅
2. 発表標題 生物試料に対するMeV級クラスターイオン照射効果の検討
3. 学会等名 QSTサイエンスフェスタ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷純宏、佐藤勝也、千葉敦也、平野貴美、齋藤勇一、鳴海一雅
2. 発表標題 生物試料に対するMeV級クラスターイオン照射効果の検討
3. 学会等名 第1回重・クラスターイオンビーム利用による微生物由来高生産性、エネルギー、環境シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷純宏、佐藤勝也、新井 寛規、林 秀謙、三善 英彦、鳴海一成、千葉 敦也、平野 貴美、齋藤 勇一
2. 発表標題 枯草菌胞子におけるクラスターイオン照射効果の検討
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷純宏、佐藤勝也
2. 発表標題 生物試料に対するクラスターイオン照射効果の検討
3. 学会等名 かけはし：TIA連携プログラム探索推進事業シンポジウム 準相対論的的巨大クラスターイオンビームが招く世界
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hase Y
2. 発表標題 Frontiers of Ion Beam Breeding
3. 学会等名 FNCA-KSRI-KAERI Joint International Symposium on "Application of Radiation Technology and Mutation Breeding for Sustainable Agriculture" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hase Y
2. 発表標題 Mutagenic Effects of Ion Beams and Development of New Varieties by Ion Beam Breeding
3. 学会等名 1st International Symposium on Radiation & Radioisotopes Researches (ISRR2019), Korean Society of Radiation Industry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	千葉 敦也 (CHIBA Atsuya) (40370431)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所放射線高度利用施設部・主幹研究員 (82502)	
連携研究者	佐藤 勝也 (SATOH Katsuya) (90370402)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所放射線生物応用研究部・上席研究員 (82502)	