

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07739

研究課題名(和文)量子ビームが開始する初期化学反応から生体内機能分子障害へ至る反応の定量解析

研究課題名(英文)Quantitative analysis of quantum beam induced initial/primary chemical reactions relating to biological molecular damage

研究代表者

上野 恵美 (UENO, MEGUMI)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所 放射線規制科学研究部・研究員

研究者番号：30296826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放射線由来の活性化学種の生成およびそれによる酸化反応量の定量測定に基づき、生物応答の引き金となる初期化学反応の解析を試みた。X線照射により水中に生じる高濃度H₂O₂クラスター間の距離を測定した結果、40-50 nm程度であることを明らかにした。放射線のLETが大きいほど酸素非依存的なH₂O₂生成が増加し、酸素依存的なH₂O₂が減少することを確認した。放射線によるプラスミドDNA切断は、大気下よりも低酸素下で増加することを認めた。放射線が油脂溶液中に生成するラジカルを簡便かつ定量的に測定できる可能性を見出した。水中の溶存酸素は、放射線によるROSの生成量を必ずしも増加させなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果からは、これまで主な障害因子と考えられてきたヒドロキシルラジカルよりも、むしろ高濃度の過酸化水素の低酸素環境での反応性に注目すべきであろうと思われるデータが得られている。そのため、偏在したROSの局所での濃度(密度)を考慮した定量と、分子レベルのジオメトリーを考慮した反応解析を徹底し、各ROSの反応の相手(ターゲット分子)を予測することにより、新しいコンセプトの放射線化学および放射線生物影響評価への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is analyzing initial and/or primary chemical reactions of radiation-induced reactive oxygen species (ROS), which would trigger the biological reaction, based on quantification of ROS and its reactions. X-ray induced highly concentrated H₂O₂ clusters in water were detected and the inter-cluster distance was evaluated as 40-50 nm. Amounts of oxygen-independent H₂O₂ generation were increased with LET increasing, and oxygen-dependent H₂O₂ generation were decreased with LET increasing. Radiation induced plasmid DNA breakage was increased under hypoxic condition, by either X-ray or carbon-ion beam. A method for measuring lipid radical caused by radiation in oil was developed. Resolved oxygen in water was not always increase ROS generation by ionizing radiations, such as X-ray or carbon-ion beam.

研究分野：放射線化学

キーワード：放射線 重粒子線 炭素線 生物影響 活性酸素 フリーラジカル ヒドロキシルラジカル 過酸化水素

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

従来の放射線生物学では、基本的に「線量と生存率」という関係に基づいて放射線の生物影響が評価されてきた。そのため、がん化の可能性や致死に至らない回復可能な影響などを考慮するには情報として不十分な場合が多い。そこで、放射線由来の活性化学種の生成およびそれによる酸化反応量を定量的に解析し、生物応答の引き金となる初期化学反応を明らかにする必要がある。研究代表者らは、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) 生成が局在しており、数 mmol/L レベルの比較的疎な生成と、mol/L レベルの極めて密な生成が起きていることを明らかにした (引用文献)。また極めて密な生成と比較的疎な生成の割合が線質により変わり、線エネルギー付与率 (LET) が高いほど密な生成の割合が大きいことを報告してきた。生成した複数の $\cdot\text{OH}$ の分子間距離によって $\cdot\text{OH}$ 同士の反応の可否が決まり、次に続く反応過程が変わる。そのため活性種の局在した反応条件の予測を行う必要がある。そのうえで割合による相対的評価を排除して、モル数を単位とする絶対量の評価を徹底し、生体応答を引き起こすに必要な初期活性種の量の評価が必要と考えるに至った。

2. 研究の目的

細胞の内部は脂質膜構造が複雑に入り組んでおり、その中で生成する各 ROS の寿命も分布も分子種によって異なる。たとえば過酸化水素 (H_2O_2) は反応性が低く、しかも比較的脂溶性が高く生体膜を容易に通過して移動することが可能である。しかしマイナス電荷を持つスーパーオキサイド ($\text{O}_2^{\cdot-}$) は膜中に入ることにすら困難と言える。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ と水中で平衡関係にあるヒドロペルオキシラジカル (HO_2^{\cdot}) は脂質膜中に移行することが可能と思われるが、 HO_2^{\cdot} は酸化反応性が高く、長い距離を移動するより前に周囲の分子と反応してしまうものと思われる。 $\cdot\text{OH}$ は活性酸素種の中でも極めて高い反応性を持つため、生成したその場で周囲の分子と反応してしまい、ほとんど移動することができないと考えられる。そのため本研究では、放射線の線質 (LET) と線量当たり生成する各 ROS の定量と、局所生成濃度の解析、ROS により引き起こされる酸化反応の定量的評価を試みた。またこれらに対する酸素の影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) X 線あるいは炭素線照射により水中に生じる高濃度 H_2O_2 クラスタ間距離の測定を行った (引用文献)。濃度の異なる (0.76~1661 μM) TEMPOL の水溶液を調製し、酸素透過性のポリエチレン (PE) 製の袋に約 300 μL を封入した。低酸素の照射条件では、TEMPOL 水溶液を封入した PE 袋を更に酸素非透過性 (シリカ蒸着ナイロン/ポリエチレン製) の袋に酸素吸収剤および酸素指示薬とともに密封した。試料に炭素線 (290 MeV/nucleon) を照射した後、電子常磁性共鳴 (EPR) 装置で測定し、試料中の TEMPOL の還元量を求めた。照射線量は試料中の TEMPOL 濃度に応じて、TEMPOL の還元量がもとの TEMPOL 量の 30% 以下に収まるように 0.5 ~ 256 Gy の間で調整した。TEMPOL の還元量を、試料溶液中のもともとの TEMPOL 密度に対してプロットして得られる 2 相の曲線の変曲点から高濃度 H_2O_2 クラスタのクラスタ間距離を解析した。

(2) 放射線による過酸化水素生成量に対する酸素および LET の影響を評価した（引用文献）。ミリ Q 水を酸素透過性のポリエチレン製の袋に約 300 μL を封入した。低酸素の照射条件では、試料水を封入したポリエチレン袋を更に酸素非透過性の袋に酸素吸収剤および酸素指示薬とともに密封した。炭素線 (290 MeV/nucleon) を 64 Gy 照射し、試料水中に生成した H_2O_2 量を測定した。照射した試料水 90 μL に 1.0 M の DMPO 水溶液 10 μL を添加して、UVB を 12000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の条件で 5 分間照射し、試料中に生じた DMPO-OH を EPR で測定した。予め作成した検量線に基づいて DMPO-OH 量から H_2O_2 量を求めた。

(3) 放射線によるプラスミド DNA 切断に対する酸素の影響を評価した。プラスミド DNA の水溶液 10 μL をポリエチレン製のマイクロチューブの底部に静かに入れて付着させた。低酸素の照射条件では、試料溶液を入れたマイクロチューブには蓋をせずに更に酸素非透過性の袋に酸素吸収剤および酸素指示薬とともに密封した。大気下の照射の場合も同様に、マイクロチューブを酸素非透過性の袋に入れたが、ただし袋は密閉せずにおいた。X 線あるいは LET の異なる条件 (LET = 13、20、40、60、80、または >100 keV/ μm) で炭素線を照射した。照射はチューブの口から底の方向で行った。照射後、プラスミド DNA 溶液を電気泳動で分離し、オープンサークル (OC) 型のバンドの出現量に基づいてプラスミド DNA の切断量を評価した。

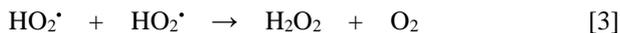
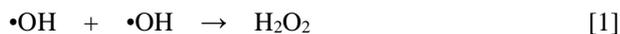
(4) 放射線により油脂中に生じるフリーラジカル反応の検出を試みた。0.1 mM の carboxy-PROXYL のコーン油溶液 350 μL を酸素透過性のポリエチレン袋に封入し、酸素吸収剤と酸素マーカーとともに酸素非透過性の特殊コーティングされたポリエチレン袋に封入し、4°C で保管した。約 18 時間後に LET = 13、20、40、60、80、 >100 keV/ μm の条件で炭素線を 32 Gy 照射した。照射後、試料は水中に保管し、照射約 2 時間後に X-bad EPR で測定した。

4. 研究成果

(1) 高濃度 H_2O_2 雰囲気に関与する TEMPOL の還元反応に基づいて、高濃度 H_2O_2 クラスタを検出し、点在して生じているであろうクラスター間の距離を測定することを試みた。X 線では大気下において約 50 nm の距離間隔で高濃度 H_2O_2 クラスタが生じていると思われる結果が得られた（引用文献）。炭素線ではこれより広い距離を予想していたが、実験してみた結果、大気下において 20 nm 程度と評価できた。高濃度 H_2O_2 雰囲気に関与する TEMPOL の還元反応は低酸素条件下において有意に増加した。低酸素条件下では、X 線では距離が 80 nm と大気下での結果よりも若干広く評価された。またクラスターのボリュームが小さくなるためにクラスターあたりに反応できる TEMPOL の数が減ると予想される結果が得られた。低酸素条件では、炭素線が生じる H_2O_2 クラスタ間距離は約 80 ~ 100 nm と評価できた。

(2) H_2O_2 の生成量を大気下と低酸素条件下でそれぞれ測定した結果(図 1) 大気下における H_2O_2 の生成量(黒)は、LET の増加とともに減る傾向が見られた。しかしながら低酸素条件下での H_2O_2 の生成量(薄灰)は、LET の増加とともに増加してブラッグピーク付近 (LET80) で最大になった。LET >100 の条件はブラッグピークより深部の情報を主に含んでいると思われ、低酸素条件下での H_2O_2 の生成量(薄灰)は再び低下した(引用文献)。

低酸素条件下での酸素非依存的な H₂O₂ 生成は、以下の式 1～3 の反応によると考えられる。



式 1 の反応が起こるには 2 つの $\cdot\text{OH}$ が、式 2 の反応が起こるには H₂O₂ と $\cdot\text{OH}$ が極めて近い距離で生成しなければならない。そのため低酸素条件下での H₂O₂ 生成は $\cdot\text{OH}$ が極めて密に複数生成する環境で生じると考えられ、図 1 の結果は同時に LET が高くなると $\cdot\text{OH}$ が極めて密に生成する環境が増えることを示している。また極めて密に生成する $\cdot\text{OH}$ から H₂O₂ が生じていることを考えると、生じる H₂O₂ の初期濃度も極めて高い状態で生じると予想できる。酸素非依存的な H₂O₂ 生成過程で、高濃度 H₂O₂ クラスタが生じる可能性を裏付けている。生体内では酸素非依存的な H₂O₂ 生成が主に生じると思われ、これらは局在して比較的高濃度で生じていると考えられる。

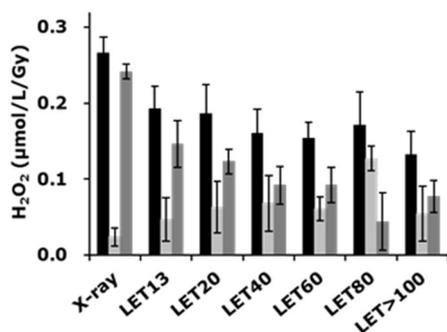


図 1. X 線または炭素線を照射した水中での過酸化水素生成量。

(3) 放射線によるプラスミド DNA 切断に対する酸素の影響を評価した。X 線でも炭素線でも、低酸素条の照射条件で、オープンサークル (OC) の割合が大気下の照射よりも増加した。炭素線では、LET の増加に伴って、線量当たりの OC の割合が低下したが、カウント当たりの OC の割合は LET60～LET80 の条件で最大になった。LET>100 の条件は、プラグピークより深部の情報が主に含まれているため、カウント当たりの OC の割合が低下するものと思われる。LET が大きくなると、一つの粒子による DNA 切断量が増加すると考えられる。

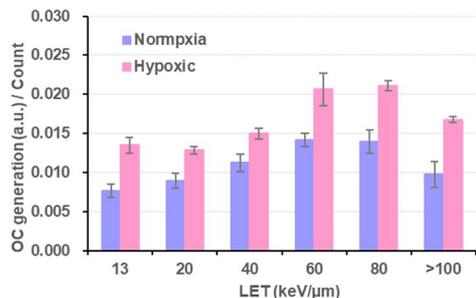


図 2. 炭素線照射によるプラスミド DNA 切断量。

(4) 低酸素条件下に置いた PROXYL 系ニトロキシラジカル油溶液に X 線または炭素線を照射するとそのシグナルが減衰した。大気条件下では、TEMPO 系ニトロキシラジカルにも PROXYL 系ニトロキシラジカルにも X 線または炭素線照射による EPR シグナル減衰は見られなかった。carbamoyl-PROXYL 油溶液に低酸素下で様々な LET 条件で炭素線を照射したところ、一定線量を照射した場合には、13 keV/μm の炭素線で減衰量が一番多く、LET が大きいほど減衰量が低下する傾向が見られた (図 3)。X 線による carbamoyl-PROXYL の減衰は少なく、80 あるいは 100 keV/μm の炭素線と同程度であった。

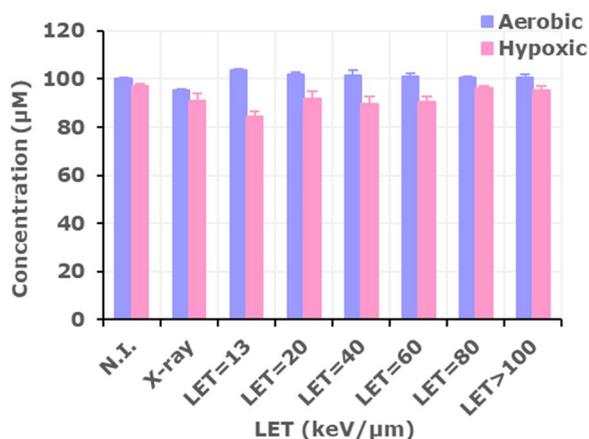


図 3. 炭素線照射によるコーン油中での carbamoyl-PROXYL のラジカル消失。

低酸素条件下で観察される油脂中のニトロキシラジカルの還元反応は、現段階では反応メカニズムが確かめられていないが、脂質中に生成するラジカルの検出に応用できると考えている。

(5) ケミカル OER の評価

酸素のモル数当りの ROS 生成量の変化 ((大気下での ROS 生成量 - 低酸素条件下での ROS 生成量) / 大気下での溶存酸素量) を「ケミカル OER」と定義したとき、水中の溶存酸素は必ずしも放射線の、特に炭素線による ROS の生成量あるいは ROS による反応量を増加しておらず、放射線の生物影響における OER と、ケミカル OER とは必ずしも正の相関関係が得られないことが分かった。

< 引用文献 >

- Matsumoto K, Ueno M, Nakanishi I, Anzai K. Density of hydroxyl radicals generated in an aqueous solution by irradiating carbon-ion beam. *Chem. Pharm. Bull.* 63, 2015, 1–5.
- Ueno M, Nakanishi I, Matsumoto K. Generation of localized highly concentrated hydrogen peroxide clusters in water by X-rays. *Free Radic. Res.* 54, 2020, 360–372
- Matsumoto K, Ueno M, Nyui M, Shoji Y, Nakanishi I. Effects of LET on oxygen-dependent and-independent generation of hydrogen peroxide in water irradiated by carbon-ion beams. *Free Radic. Res.* 55, 2021, 589–594

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Matsumoto Ken-ichiro, Ueno Megumi, Nyui Minako, Shoji Yoshimi, Nakanishi Ikuo	4. 巻 55
2. 論文標題 Effects of LET on oxygen-dependent and-independent generation of hydrogen peroxide in water irradiated by carbon-ion beams	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 589 ~ 594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2021.1915489	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Makino Yusuke, Ueno Megumi, Shoji Yoshimi, Nyui Minako, Nakanishi Ikuo, Fukui Koji, Matsumoto Ken-ichiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Simplifying quantitative measurement of free radical species using an X-band EPR spectrometer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 213 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.21-83	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 Matsumoto Ken-ichiro, Ueno Megumi, Shoji Yoshimi, Nakanishi Ikuo	4. 巻 27
2. 論文標題 Estimation of the Local Concentration of the Markedly Dense Hydroxyl Radical Generation Induced by X-rays in Water	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 592 ~ 592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27030592	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 Ueno Megumi, Nakanishi Ikuo, Matsumoto Ken-ichiro	4. 巻 55
2. 論文標題 Inhomogeneous generation of hydroxyl radicals in hydrogen peroxide solution induced by ultraviolet irradiation and in a Fenton reaction system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 481 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2020.1819995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueno Megumi、Shimokawa Takashi、Sekine-Suzuki Emiko、Nyui Minako、Nakanishi Ikuo、Matsumoto Ken-ichiro	4. 巻 68
2. 論文標題 Preparation of an experimental mouse model lacking selenium-dependent glutathione peroxidase activities by feeding a selenium-deficient diet	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 123 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.20-36	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 Matsumoto Ken-ichiro、Ueno Megumi、Shoji Yoshimi、Nakanishi Ikuo	4. 巻 55
2. 論文標題 Heavy-ion beam-induced reactive oxygen species and redox reactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 450 ~ 460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2021.1899171	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 Ueno Megumi、Nakanishi Ikuo、Matsumoto Ken-ichiro	4. 巻 54
2. 論文標題 Generation of localized highly concentrated hydrogen peroxide clusters in water by X-rays	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 360 ~ 372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2020.1774574	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 松本 謙一郎、上野 恵美、荘司 好美、中西 郁夫	4. 巻 55
2. 論文標題 水の放射線分解で生成する活性酸素種の定量測定と生成密度の評価	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 303-321
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minako Nyui, Yoshimi Shoji, Megumi Ueno, Ikuo Nakanishi and Ken-ichiro Matsumoto	4. 巻 65
2. 論文標題 Reduction of molecular oxygen by redox active thiols: comparison of glutathione, N acetylcysteine, cysteine, and homocysteine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Clin. Biochem. Nutr.	6. 最初と最後の頁 185-192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.19 25	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 Matsumoto Ken-ichiro, Nyui Minako, Ueno Megumi, Ogawa Yukihiro, Nakanishi Ikuo	4. 巻 65
2. 論文標題 A quantitative analysis of carbon-ion beam-induced reactive oxygen species and redox reactions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.18-34	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 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ueno Megumi, Minako Nyui, Nakanishi Ikuo, Matsumoto Ken-ichiro
2. 発表標題 Generation of hydrogen peroxide in water irradiated by carbon-ion beam; Effects of dissolved oxygen and LET
3. 学会等名 20th Biennial Meeting of SFRR International (SFRR-I 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ueno Megumi, Minako Nyui, Nakanishi Ikuo, Matsumoto Ken-ichiro
2. 発表標題 Oxygen independent generation of hydrogen peroxide in water irradiated by carbon-ion beam
3. 学会等名 27th Annual Conference of the Society for Redox Biology & Medicine (SfRBM 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本謙一郎、上野恵美、中西郁夫
2. 発表標題 炭素線による水中における酸素非依存的な過酸化水素の生成
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会 / 第20回日本NO学会 合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Megumi Ueno, Ikuo Nakanishi, Ken-ichiro Matsumoto
2. 発表標題 Presence of X-ray induced high concentrated hydrogen peroxide clusters
3. 学会等名 SfRBM 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野 恵美, 中西 郁夫, 松本 謙一郎
2. 発表標題 Radiation induced generation of localized highly concentrated hydrogen peroxide in water
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken-ichiro Matsumoto, Megumi Ueno, Minako Nyui, Yoshimi Shoji, Ikuo Nakani.
2. 発表標題 Free Radical Generations and Reactions in an Aqueous Sample Irradiated by X-ray or 290 MeV Carbon-Ion Beam. Oxygen Radicals
3. 学会等名 Oxygen Radicals, Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野 恵美、松本 謙一郎、中西 郁夫
2. 発表標題 放射線を照射した際に見られるニトロキシラジカルの減衰に対する高濃度過酸化水素の関与
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 謙一郎、乳井 美奈子、上野 恵美、小川 幸大、中西 郁夫
2. 発表標題 重粒子線により水中に生成する活性酸素量のLET依存性
3. 学会等名 2018日本放射化学会年会・第62回放射化学討論会
4. 発表年 2018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
研究協力者	松本 謙一郎 (Matsumoto Ken-ichiro) (10297046)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門放射線医学研究所 放射線規制科学研究部 障害分子機構解析研究グループ・グループリーダー (82502)	
研究協力者	中西 郁夫 (Nakanishi Ikuo) (70356137)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門量子生命科学研究所 量子レドックス化学研究グループ・グループリーダー (82502)	
研究協力者	下川 卓志 (Shimokawa Takashi) (20608137)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命・医学部門量子医科学研究所 物理工学部 粒子線照射効果研究グループ・研究統括 (82502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------