

[H30-4]

クラスターイオンの生物効果に関する研究 Study on the Biological Effects of Cluster Ions

長谷純宏^{#A,B}, 佐藤勝也^{A,B}, 千葉敦也^A, 平野貴美^A, 森林健悟^B, 鳴海一雅^A
Yoshihiro Hase^{#A,B}, Katsuya Satoh^{A,B}, Atsuya Chiba^A, Yoshimi Hirano^A, Kengo Moribayashi^B,
Kazumasa Narumi^A

^A) Takasaki Advanced Radiation Research Institute,
National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology (QST)

^B) Institute for Quantum Life Science, QST

Abstract

Lethal and mutagenic effects of cluster ions were examined using *Bacillus subtilis* spores as a model organism. The 2-MeV H₂⁺ showed a clearly lower lethal effect than 340-keV H⁺, even though both have a comparable LET. The 2-MeV H₂⁺ dissociates into a pair of 1-MeV H⁺ by losing the bonding electrons at the target surface. The estimated internuclear distance and the radial dose distribution suggest that the split of deposited total energy into two places separated only by up to several nanometers diminishes the lethality considerably, and that the energy density in the very center of the trajectory, possibly within a 1-nm radius, has a great impact on lethality. We also performed a whole genome resequencing of the surviving colonies to compare the molecular nature of mutations but failed to find a clear difference in overall characteristics. Our results suggest that cluster beams may be a useful tool for understanding biological effects of high LET radiation.

Keyword: cluster ions, spore, lethality, mutation, radial dose

1. はじめに

クラスターイオンは複数の原子が nm 距離に近接した状態で物質に入射することから、特徴的なエネルギー付与を示すが、生物試料に対する致死効果及び変異誘発効果は調べられていなかった。我々は、真空チャンバー内での照射が可能な枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の胞子をモデル試料として、クラスターイオンの生物効果に関する研究を行ってきた。最終年度となる 2020 年度は、水素クラスターイオンの致死効果に関して核間距離及び動径線量を考慮した考察を行うとともに突然変異の特徴について調査した。

2. 実験方法

2.1 胞子への照射と生存率測定

枯草菌胞子の照射試料を前報に記載したように作製した¹⁾。約 10 mm 角にカットしたシリコンウェハ上に胞子の水懸濁液 2.7 μl (2×10⁵ 個の胞子を含む) を滴下した。凍結乾燥した試料を氷上に置くことで結露して生成した水滴の表面で胞子の塊を伸展させ、風乾することでほぼ単層に配置された試料を作製した。量研高崎研イオン照射研究施設 TIARA のシングルエンド加速器及びイオン注入装置を用いて、真空チャンバー内で LET の異なる 3 種類の単原子イオン (340-keV H⁺ (LET; 75.0 keV/μm)、500-keV H⁺ (58.9) 及び 1-MeV H⁺ (37.7))、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 (2-MeV H₂⁺ (見かけの LET; 37.7×2=75.4)) を照射した。照射翌日に、各シリコンウェハ上の胞子を 1 ml の PBT バッファー (10 mM sodium phosphate buffer、0.01% Tween 20、pH 7.0) に回収した。同バッファーで希釈系列を作製し、LB 培地に塗布した試料を

37℃で一晩培養後、形成されたコロニー数と希釈倍率に基づいて生存率を求めた。

2.2 LET、核間距離及び動径線量の評価

枯草菌胞子中の LET は、胞子の厚み 0.48 μm、密度 1.52 g/cm³、元素組成 (C_{40.14}, H_{75.24}, O_{21.16}, N_{4.72}, K_{0.50}, P_{0.46}, Mg_{0.12}, S_{0.02}) として SRIM で評価した。核間距離は、真空中で理想的に解離した場合のクーロン斥力による広がり、及び SRIM で評価した多重散乱による軌道中心からのずれに基づいて評価した。動径線量は Moribayashi²⁾の方法に従って評価した。

2.3 全ゲノム解析による突然変異の検出

菌体から抽出したゲノム DNA から、市販のキット (KAPA HyperPlus Kit 及び IDT for Illumina TruSeq DNA UD Indexes) を用いてシーケンズライブラリーを作製した。次世代シーケンサーで生成した 150-bp ペアエンドリードを枯草菌の参照ゲノム配列にマッピングし、3 種類のアルゴリズム (GATK Haplotype Caller、Pindel 及び BreakDancer) を用いて変異候補を検出した。複数の検体で共通する変異候補は擬陽性として除外した。さらに、変異アレルの頻度 (変異箇所での全リードに占める変異リードの割合) が 80%以上、且つその他の全ての検体での当該変異のアレル頻度が 5%以下であるものに絞り込んだ上で、Integrative Genomics Viewer で確認されたものを確からしい変異とした。検出した変異は、塩基置換 (SBS)、1 塩基欠失 (-1)、2 塩基以上の欠失 (Del ≥ 2 bp)、1 塩基挿入 (+1)、2 塩基以上の挿入 (Ins ≥ 2 bp)、複合型 (Complex) 及び構造変化 (SV) の 7 つに分類した。複合型は、塩基置換や挿入欠失が 10 bp 未満の間隔で発生した場合や連続した塩基置換を示し、

#hase.yoshihiro@qst.go.jp

[H30-4]

これらは1つの変異イベントとみなした。

3. 結果と考察

3.1 クラスターイオンの致死効果

照射した胞子の生存率を Figure 1 に示した。単原子イオンの致死効果は LET に依存的で、LET が最も高い 340 keV H⁺ が最も致死効果が高かった (Figure 1A)。2-MeV H₂⁺ は、1-MeV H⁺ に比べて粒子あたりで有意に高い致死効果を示した (Figure 1B、*t*-test、*p* < 0.01、 5×10^{10} particles/cm²)。2-MeV H₂⁺ の方が2倍の原子数が入射しているのに致死効果が高いことは妥当と考えられる。一方、原子あたりでは 1-MeV H⁺ に比べて 2-MeV H₂⁺ の方が致死効果が低い可能性があるが、直接比較できるデータポイントでは有意な差は認められなかった (Figure 1C、*p* = 0.122、 1×10^{11} atoms/cm²)。

2-MeV H₂⁺ の粒子あたりの見かけの LET は、340-keV H⁺ の LET と同等であるにもかかわらず、致死効果は 340-keV H⁺ の方が明らかに高かった。2-MeV H₂⁺ は試料表面で2つの 1-MeV H⁺ に解離するが、クーロン斥力による核間距離の広がり及び胞子中での多重散乱による軌道中心からのずれを考慮すると、2つの H⁺ の間の距離は概ね数 nm 以内と考えられた。従って、1つの 340-keV H⁺ が通過する方が、数 nm 離れて通過する2つの 1-MeV H⁺ よりも致死効果が高いことが示唆される。評価した動径線量では、340-keV H⁺ と 1-MeV H⁺ のいずれも軌道中心から半径 1 nm の範囲での線量が高く、また、この範囲での線量は 340-keV H⁺ の方が3倍以上高かった (データ非表示)。この結果は、付与されるエネルギー総量が同等でも、数 nm 離れた2ヶ所に分割して付与されるだけで致死効果が大きく低減すること、すなわち、致死効果が軌道中心のおそらく半径 1 nm 程度の範囲のエネルギー密度に大きく依存することを示唆する。

3.2 突然変異の特徴

微生物において放射線照射による変異率が最大になると考えられている、生存率が 1~10% の照射条件で得た生存コロニーから DNA を抽出し、上述の方法で変異を検出した。結果を Table 1 に示す。変異率は $59.3 \sim 107.8 \times 10^{-8}/\text{bp}$ の範囲にあり、生存率と負の相関関係が見られた (*R* = -0.73)。非照射区では塩基置換のみが検出されたのに対して、照射区では塩基置換に加えて、欠失、挿入、複合型及び構造変化が確認された。照射区での塩基置換は G:C→A:T、A:T→T:A 及び G:C→T:A の割合が高かった (データ非表示)。欠失変異では1塩基の欠失が最も多く、欠失のサイズが大きくなるに従って変異の数は低下した (データ非表示)。2-MeV H₂⁺ と 1-MeV H⁺ の間で欠失のサイズや頻度に明確な差は見られなかった。構造変化は変異全体の 1.5~8.0% を占めた。原因は不明だが、1-MeV H⁺ の方が 2-MeV H₂⁺ に比べて構造変化の発生頻度が高い傾向が見られた。総じて、本研究の実験条件では、単原子イオンとクラスターイオンで生じる変異の特徴に明確な差は見られなかった。

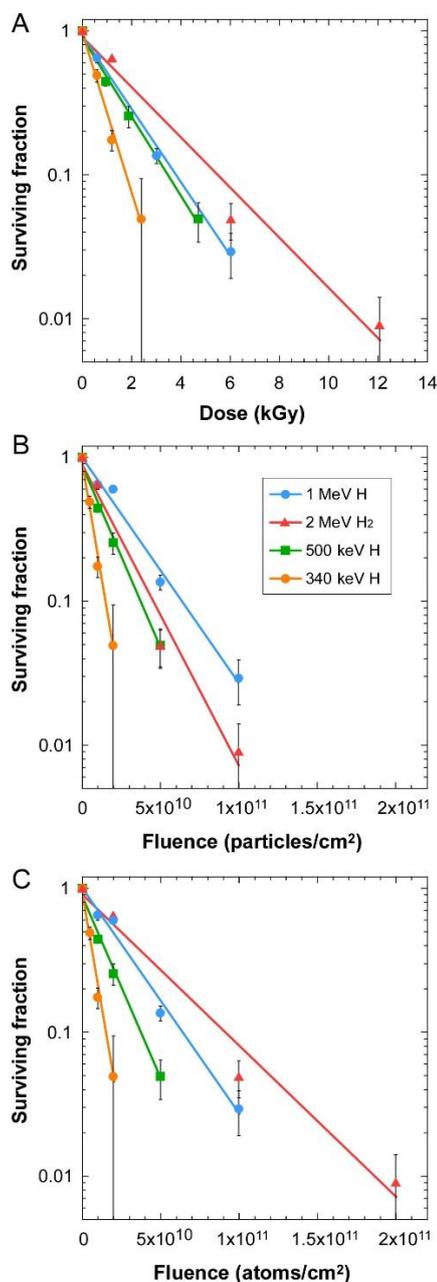


Figure 1. Survival fraction of irradiated spores. Surviving fraction relative to that of non-irradiated spores are shown as a function of kGy (A), particles/cm² (B) and atoms/cm² (C). Data points represent mean \pm SE of three to six independent experiments. An exponential regression was used to fit the data.

参考文献

- [1] Hase Y, Satoh K, Chiba A, Hirano Y, Tomita S, Saito Y and Narumi K. Experimental study on the biological effect of cluster ion beams in *Bacillus subtilis* spores. *Quantum Beam Sci.*, 3, 8 (2019).
- [2] Moribayashi K. Application of atomic and molecular data for plasma production and cancer therapy by heavy particle irradiation. *Jpn. J. Appl. Phys.* 59, SH0801 (2020).

[H30-4]

Table 1. Frequency of Each Mutation Type

Beam	Exp.	Fluence (p/ cm ²)	Fluence (atm/ cm ²)	Dose (Gy)	Surviving Fraction	No. of ana- lyzed colo- nies	Mutation frequency ($\times 10^8$ / bp) (Percent to total in each experiment)						Total		
							SBS	-1	Del ≥ 2 bp	+1	Ins ≥ 2 bp	Com- plex		SV	
2 MeV H ₂ ⁺	I	5 × 10 ¹⁰	1 × 10 ¹¹	6032	0.045	20	54.6 ± 8.6 (68.7%)	10.7 ± 3.2 (13.4%)	10.7 ± 3.2 (13.4%)	nd	nd	2.4 ± 1.6 (3.0%)	1.2 ± 1.2 (1.5%)	79.5 ± 11.5	
							II	5 × 10 ¹⁰	1 × 10 ¹¹	6032	0.036	30	71.2 ± 7.0 (76.3%)	8.7 ± 2.4 (9.3%)	9.5 ± 2.2 (10.2%)
	III	5 × 10 ¹⁰	1 × 10 ¹¹	6032	0.046	35	50.8 ± 6.2 (68.2%)	4.7 ± 1.9 (6.4%)	9.5 ± 2.5 (12.7%)	nd	1.4 ± 0.9 (1.8%)	6.1 ± 2.2 (8.2%)	2.0 ± 1.1 (2.7%)	74.6 ± 7.9	
							I	5 × 10 ¹⁰	5 × 10 ¹⁰	3016	0.097	20	36.8 ± 7.8 (62.0%)	2.4 ± 1.6 (4.0%)	8.3 ± 3.1 (14.0%)
	1 MeV H ⁺	III	1 × 10 ¹¹	1 × 10 ¹¹	6032	0.052	35	70.5 ± 8.6 (65.8%)	14.9 ± 3.8 (13.9%)	14.2 ± 2.6 (13.3%)	nd	nd	2.7 ± 1.3 (2.5%)	5.4 ± 1.7 (5.1%)	107.8 ± 11.1
								II	2 × 10 ¹⁰	2 × 10 ¹⁰	2400	0.094	30	48.2 ± 6.8 (75.3%)	5.5 ± 1.9 (8.6%)
Mock	I	0	0	0	1.000	20	4.7 ± 2.8 (100.0%)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4.7 ± 2.8	

Mutation frequency represents the number of mutation events divided by the length of the reference genome (4,215,606 bp); the values are mean ± standard errors of survived colonies. nd: not detected.