

筑波大学

博士（医学）学位論文

Lineal energy-based evaluation of oxidative DNA damage induced by proton beams and X-rays

(Lineal energy に基づいた陽子線及び
エックス線による DNA 酸化損傷の評価)

2013

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

洪 正善

目 次

第1章 研究の背景と目的

1.1 背景

1.1.1 がん放射線治療の現状

1.1.2 陽子線治療とは

1.1.3 マイクロドシメトリ

1.1.4 放射線によるDNA損傷

1.1.5 エダラボン

1.2 研究の目的

第2章 Lineal energyの測定

2.1 背景と実験目的

2.2 材料と方法

2.3 実験結果

2.4 200 kV 20 mA エックス線の lineal energy 値について

第3章 エダラボンの細胞毒性

3.1 背景と実験目的

3.2 材料と方法

3.3 実験結果

第4章 放射線によるDNAの塩基損傷とエダラボンの防護効果 (DNAレベル)

4.1 背景と実験目的

4.2 材料と方法

4.2.1 DNA溶液の準備と照射

4.2.2 8-OHdG の抽出

4.2.3 HPLC-ECD 法による 8-OHdG の検出

4.3 実験結果

4.4 小括

第5章 放射線によるDNAの二本鎖切断とエダラボンの防護効果 (DNAレベル)

5.1 背景と実験目的

5.2 材料と方法

5.2.1 ST-DNAの照射とサンプルの保存

5.2.2 サンプルの電気泳動

5.3 実験結果

5.4 小括

第6章 放射線によるDNAの二本鎖切断とエダラボンの防護効果 (細胞レベル)

6.1 背景と実験目的

6.2 材料と方法

6.2.1 MOLT-4細胞の照射

6.2.2 γ -H2AXの蛍光免疫染色

6.3 実験結果

6.4 小括

第7章 考察

第8章 総括

参考文献

謝辞

第1章 研究の背景と目的

1.1 背景

1.1.1 がん放射線治療の現状

厚生労働省の統計によると、1981年からがんは日本人の死亡原因の第1位となった。2008年には日本人の2人に1人はがんに罹患し、がんによる死亡者は全死亡者の30.0%で、およそ3人に1人はがんで死亡していることになる。従って、がんを制御する事は極めて重要な課題と言える (<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai08/kekka3.htm>)。

現在のがんの治療は、手術療法、化学療法、放射線療法の三大治療方法で成り立っている。中でも、放射線療法は患者の負担が少なく、治療中、治療後の生活の質 (quality of life: QOL) を維持できることに大きな利点がある。1895年レントゲンがエックス線を発見したが、翌年には Voigt が咽頭がん患者にエックス線を照射して疼痛の緩和されたことをハンブルグ医師会誌に報告し、表在性腫瘍の放射線治療が開始された。その後、1930年にアメリカの Cockroft と Walton が 1 MV の Cockroft-Walton 型高圧エックス線発生装置を製作し、高エネルギーエックス線治療を開始した (1)。現在は、高エネルギーエックス線が広い範囲で利用されており、単独または手術療法、化学療法と併用されて、がんの治療において重要な役割を果たしている。

1.1.2 陽子線治療とは

放射線治療に使われる電離放射線には光子線と粒子線の二種類があり、エックス線とガンマ線は光子線に分類されている。一方、粒子線には陽子線、中性子、炭素線などが含まれる。がん治療で最も一般的に用いられる放射線はエックス線であるが、エックス

線は人体に入ってから数センチの深さでビルドアップ (build-up) 領域を作り、付与されるエネルギーが最も高くなるが、それ以降は指数関数的に減衰する。従って、ターゲットとなる腫瘍の前方にある正常組織の線量が高くなるとともに、腫瘍後方の正常組織にも通過したエックス線が照射されるために、腫瘍周囲でエックス線が通過する皮膚や臓器への影響は避けることができない。

一方、高エネルギーに加速された陽子線は、人体へ照射されるとエネルギーの値に従って一定の深度で完全に停止するとともに一気にエネルギーを放出する。そのピークはブラッグピーク (Bragg peak) と呼ばれ、このピークの後方では付与されるエネルギーはゼロとなるので (図-1)、腫瘍組織に集中して線量を与えることが可能となる。1946年に物理学者 Wilson が陽子を加速して医療に用いることを考案したことが陽子線治療の原点となっている (2)。1954年に米国のローレンスバークレー国立研究所の物理学者 J. H. Lawrence と Tobias らは初めて乳がん患者の下垂体機能を抑制する目的として下垂体に陽子線照射を行った (3、4)。日本では、1979年に千葉県の放射線医学総合研究所で眼腫瘍や表在性腫瘍を対象として陽子線を使用した。これが日本においての陽子線治療の始まりと言われている (5)。筑波大学では、1983年につくば市内の高エネルギー物理学研究所 (現、高エネルギー加速器機構) の加速器を利用してがんに対する陽子線治療を開始し、2001年からは大学病院構内に建設した現在の陽子線医学利用研究センターにおいてがん陽子線治療を行ってきた。

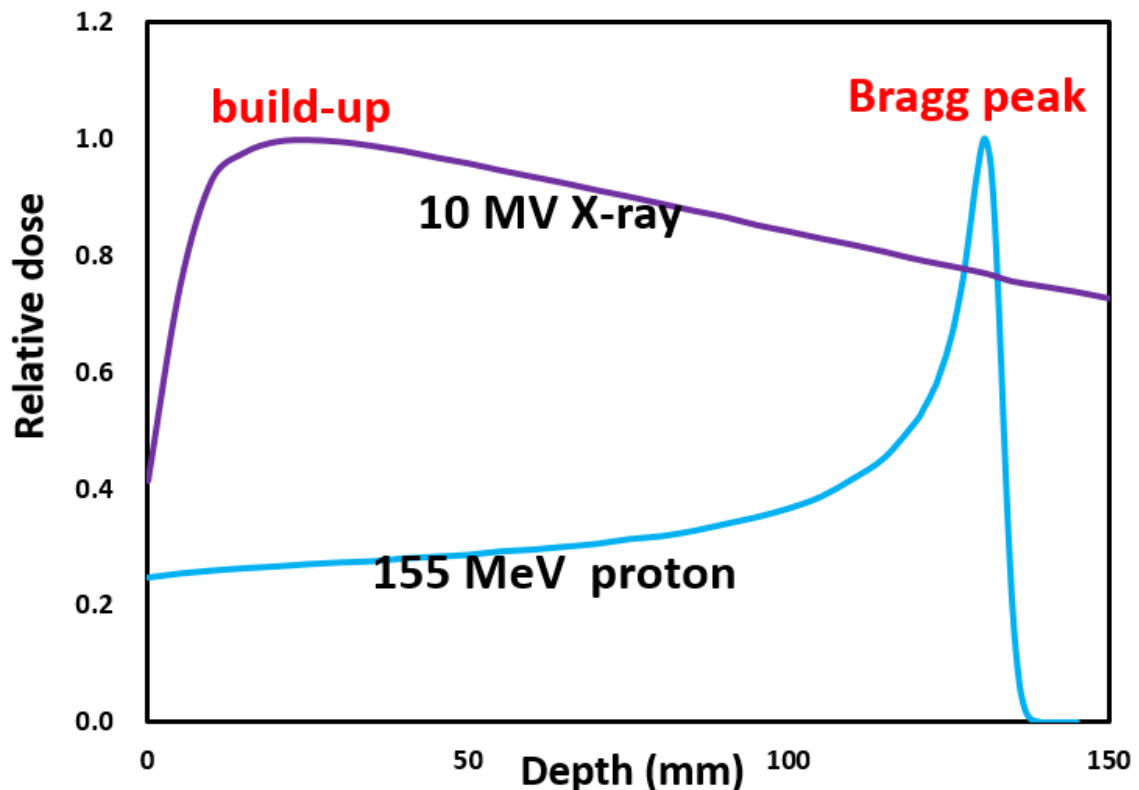


図-1 : 10 MV エックス線及び 155 MeV 陽子線のエネルギー分布図.

1.1.3 マイクロドシメトリ (Microdosimetry)

放射線の線質は、放射線が生体を通過する際に周囲に付与するエネルギーによって示され、一般には周囲に与えるエネルギーが高いほど生物学的効果も高くなると考えられている。

この線質を表す単位として最も一般的に使われている放射線の線質の単位は線エネルギー付与 (linear energy transfer: LET) である。LETは、荷電粒子が生体を通過する時、通過した飛跡に沿って物質に与えるエネルギーで、1 μm あたりの平均付与エネルギー (keV) を表しており、単位は $\text{keV}/\mu\text{m}$ である (6) (図-2A)。LETは単位距離あたりのエネルギー付与を表しているが、種類の異なる高エネルギー粒子線による生物学的効果を正確に評価するには、

微小領域における空間的なエネルギー密度を考慮する必要がある(7)。

マイクロシメトリでは、細胞やDNAサイズの微小領域における電離密度をlineal energyという単位で表す(8)。マイクロシメトリに基づく放射線の生物学的効果についての研究は、KellererとRossiにより開始された。彼らは比例計算管内に組織等価ガスを封入する方法で細胞核に相当するサイズの領域を想定して、そこに付与されたエネルギーを測定し、微視的エネルギー吸収分布と生物学的効果に関係をつける理論(Theory of Dual Radiation Action; TDRA)を提唱した(9、10)。マイクロシメトリで提唱される線質を表す単位は、線エネルギー；lineal energy (y)という量で、単位イベントにより微小体積のサイトに付与するエネルギー ε をその体積の平均弦長 $\langle l \rangle$ で除した値と定義される($y = \varepsilon / \langle l \rangle$) (図-2B)。Lineal energyの単位はLETと同じく $\text{keV}/\mu\text{m}$ である(8)。Lineal energyにより、様々な電離放射線の微小領域における電離密度に基づく生物学的効果を一意的に表す事が可能になる。

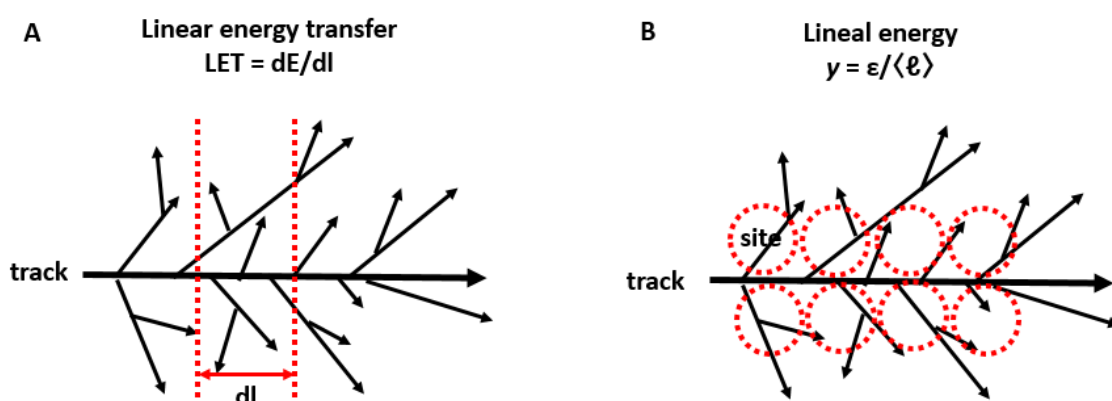


図-2：放射線の線質の単位LETとlineal energyの比較。AはLETの定義を説明する略図で、Bはlineal energyの定義を説明する略図。

1.1.4 放射線によるDNA損傷

放射線のターゲットは細胞核内の染色体DNAである。DNAはリボースとリン酸基からなる糖鎖骨格の部分と遺伝子情報を担う塩基からなる糸状の高分子である。電離放射線によるDNA損傷は、その部位によって主に塩基損傷と糖鎖切断に分類できる。

放射線によるDNA損傷メカニズムには、間接作用と直接作用がある。間接作用とは、放射線が水分子に作用してラジカルを生成し、そのラジカルが、DNAに損傷を与える作用で、ヒドロキシルラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ラジカル）がその主成分である。一方、直接作用とは、反超電子あるいは粒子自体が直接DNAを損傷する作用である（図-3）。エックス線によるDNA損傷の60-70%は間接作用によると言われており（11）、吸収線量1 Gyのエックス線やガンマ線が細胞に照射されると、塩基損傷が約6400個、DNA一本鎖切断が600-1000個、DNA二本鎖切断が16-40個生じると言われているが（12）、陽子線によるDNA損傷の種類やその割合などについての詳細な報告はまだない。

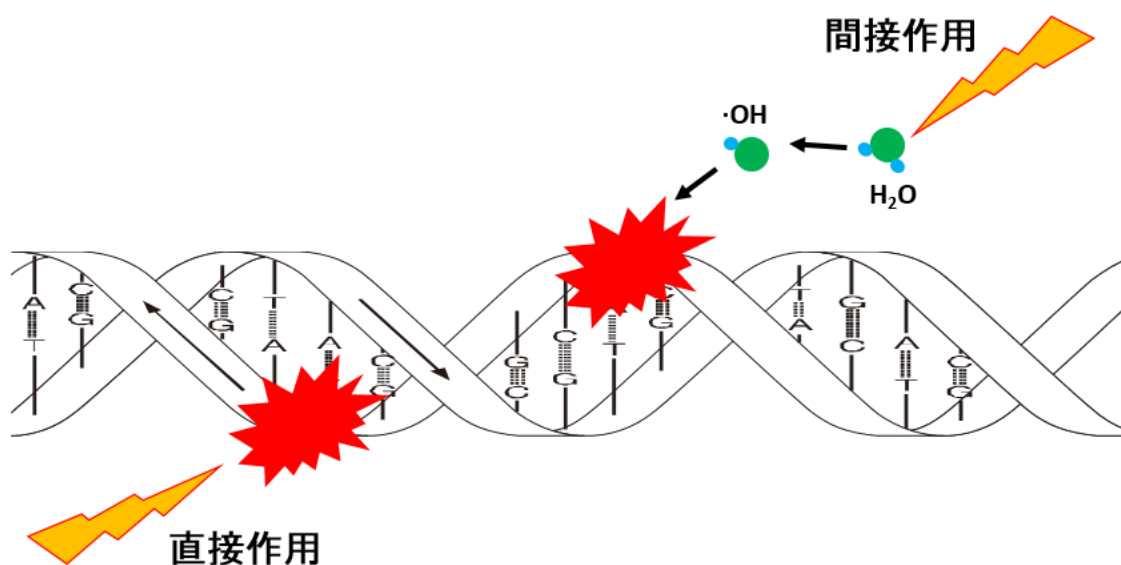


図-3：放射線によるDNA損傷の直接作用と間接作用の説明図。

1.1.5 エダラボン

エダラボン（化学名 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one ; MCI-186 ; 分子量174.20）は、フリーラジカル消去剤で、脳梗塞急性期において虚血再還流時に生じるフリーラジカルを除去することで脳梗塞巣を縮小させる効果があることが明らかにされ（13）、2001年4月に世界初の脳保護剤として、急性期脳梗塞に対する治療薬として日本で承認された（14）。

エダラボンは生理的条件下で約50%がアニオンとして存在し、このエダラボンアニオンが電子を供与して種々のラジカルを消去する。その際に酸化力を持たないエダラボンラジカルを生じ、反応系中の酸素分子と反応してエダラボンペルオキシルラジカルに変化し、最終的にフリーラジカルとは無関係な反応生成物である 2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid (OPB) になる（15）。

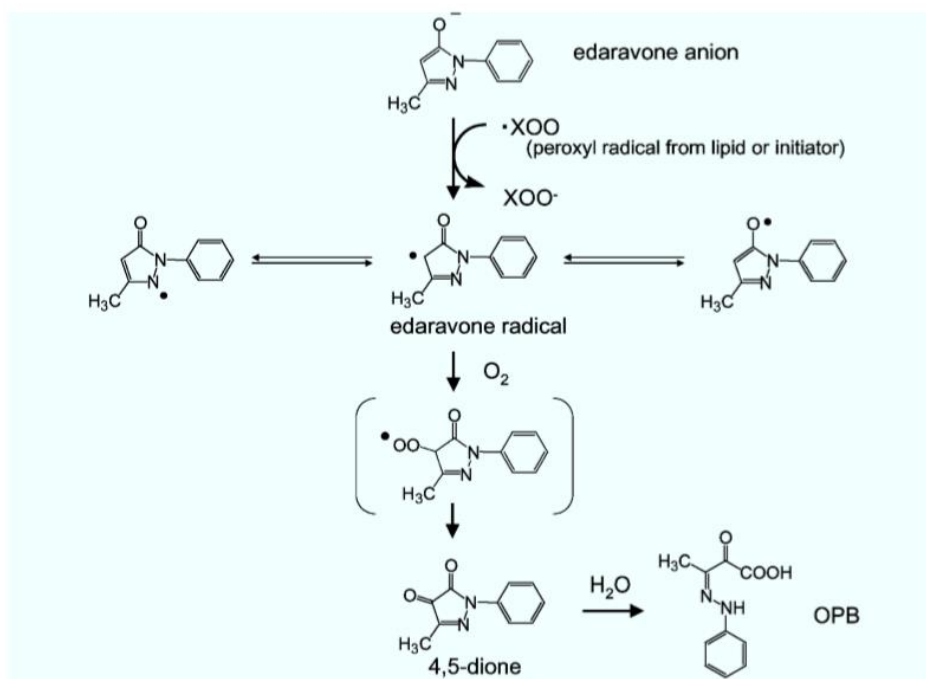


Fig. 7. A Hypothetical Reaction Mechanism of Edaravone with Free Radicals
Electron donation from edaravone to free radicals yields peroxy anion and edaravone radical, which is transformed into 4,5-dione. Details are described in the text. The hydrolysis of 4,5-dione gives OPB. ·XOO: free radicals, XOO⁻: peroxy anion, 4,5-dione: 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-4,5-dione, OPB: 2-oxo-3-(phenylhydrazono)-butanoic acid.

図-4：エダラボンのラジカル除去反応（15）。

Anzaiらはエダラボンの放射線防護効果を検討した。彼らはC3Hマウスにエダラボンを腹腔内投与し、30分後にエックス線8 Gyを全身照射したところ、投与していない対照群と比べて投与したマウスでは生存期間が延長した。ただし、エックス線照射直後にエダラボンを投与した群ではエダラボンの放射線防護効果は認められなかった(16)。

1.2 本研究の目的

以上のように、陽子線は新たな放射線治療法一つとして注目されているが、陽子線によるDNA損傷のメカニズムにはまだ不明な部分が多い。そこで本研究では陽子線とエックス線により生じるDNA損傷を比較し、その違いから陽子線によるDNA損傷のメカニズムを明らかにすることを目的としている。

そこで、我々はサケ精子DNA (ST-DNA) 溶液とヒト白血病細胞 MOLT-4細胞を実験対象とし、200 kV 20 mAエックス線、155 MeV 陽子線のプラトーとブラッグピーク近傍での照射により生じるDNAの塩基損傷とDNA二本鎖切断の生成を比較する事とした。

第2章 Lineal energyの測定

2.1 背景と実験目的

放射線が生体内に与える影響は、生体を通過する際に周囲に与えるエネルギーと放射線の種類によって異なる。線エネルギー付与 (linear energy transfer: LET) は粒子線の生物作用を評価する時に使われる線質を示す単位で、距離あたりのエネルギー付与 ($\text{keV}/\mu\text{m}$) を表している。しかし、LETが同じ荷電粒子でも、高エネルギー荷電粒子では高エネルギー電子 (デルタ線) の生成断面積が大きくなるため、微視的に見た場合、飛跡周辺の電離密度は、低エネルギー荷電粒子よりも低くなる (17)。従って、LETでは微小領域における付与エネルギーの空間的な分布を正確に表すことはできない。また、エックス線には飛跡がないことから電離のパターンが異なり、LETの概念を単純に用いる事は出来ないので、LETに基づいてエックス線と陽子線の生物学的効果を比較することは困難である。それに対して、lineal energyは単位体積あたりに付与するエネルギーの分布、つまりランダムに配置した球状サイト内の付与エネルギーを表わすことから (17)、電離パターンの異なるエックス線と陽子線を比較することも可能になる。そこで、本研究では、200 kV 20 mAエックス線と155 MeV陽子線のプラトーとブラッグピークへの生物作用を比較するために、筑波大学陽子線医学利用センターの155 MeV陽子線のlineal energyを測定した。

2.2 材料と方法

本実験では、筑波大学陽子線医学研究利用センターの155 MeV陽子線のlineal energyを測定した。微小サイズ組織を組織等価ガスで模擬する組織等価比例計数管 (TEPC、図-5) を利用して測定を行った。アイソセンターにTEPC (LET1/2; Far West Technology Inc,

CA, USA) を置き、TEPCをタフウォーターで囲み、TEPC前のタフウォーターの厚さを変えて（図-6の部分）陽子線を照射し、TEPCへのエネルギー付与を測定した（図-6）。TEPC先端の感度領域は直径が1.27 cmの球で中には以下の成分のガスが封入されており、有感体積の直径（サイトのサイズ）はガスの成分と圧力で調節することができる。この実験では、有感体積の直径が1 μmになるように、C₃H₈（55.00%）、CO₂（39.60%）、N₂（5.40%）が混合された組織等価ガスを用い、圧力が4.40 kPaなるように設定した。測定した γ 値に対する線量スペクトルを積算して線量平均 γ 値を計算し、 $\gamma = 150 \text{ keV}/\mu\text{m}$ でoverkill補正を施した線量平均 γ 値（以下はlineal energy値と呼ぶ）を図-7にまとめた。

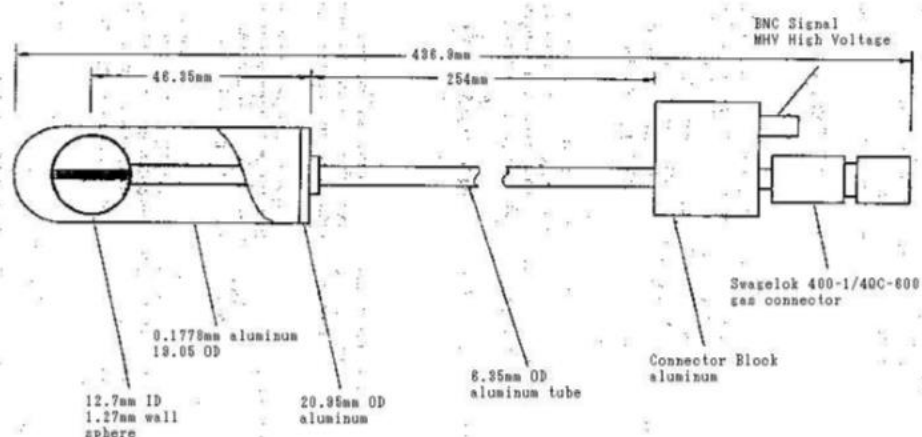


図 3.4.1 球形比例計数管 (LET-1/2) の概略図[10]



図 3.4.2 球形比例計数管 (LET-1/2) の概観写真

図-5：組織等価比例計数管（TEPC）（文献9から引用）。

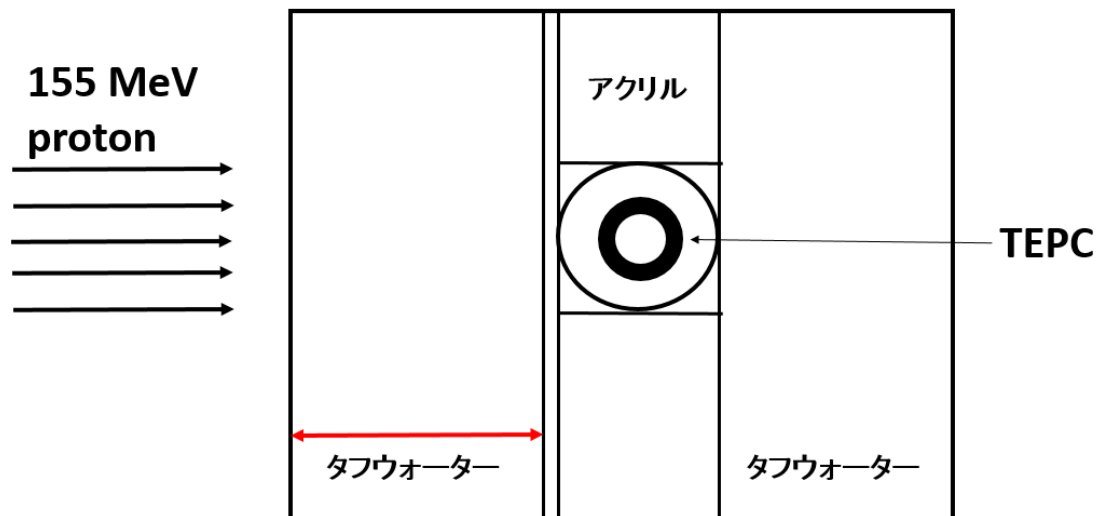


図-6 : マイクロドシメトリ照射略図. 陽子線は左から照射し, TEPC前にタフウォーターの厚み (↔の部分)を変更してTEPCへのエネルギー付与を測定した.

2.3 実験結果

実験の結果は図-7で示したとおり、黒い実線は155 MeV 陽子線の深さ方向での相対線量を示している。Lineal energy値は赤い点で表してあり、プラトーの部分は値が低いが、ブラッグピーク近傍から上がり続け、ブラッグピークの後方になっても増大している。本研究で設定した、実験サンプルを照射する2カ所は、深さが7.2 mmのプラトー部分と深さが131.4 mmのブラッグピーク近傍部分で、lineal energy値がそれぞれ $4.48 \pm 0.56 \text{ keV}/\mu\text{m}$ と $7.02 \pm 0.08 \text{ keV}/\mu\text{m}$ となった (図-7)。

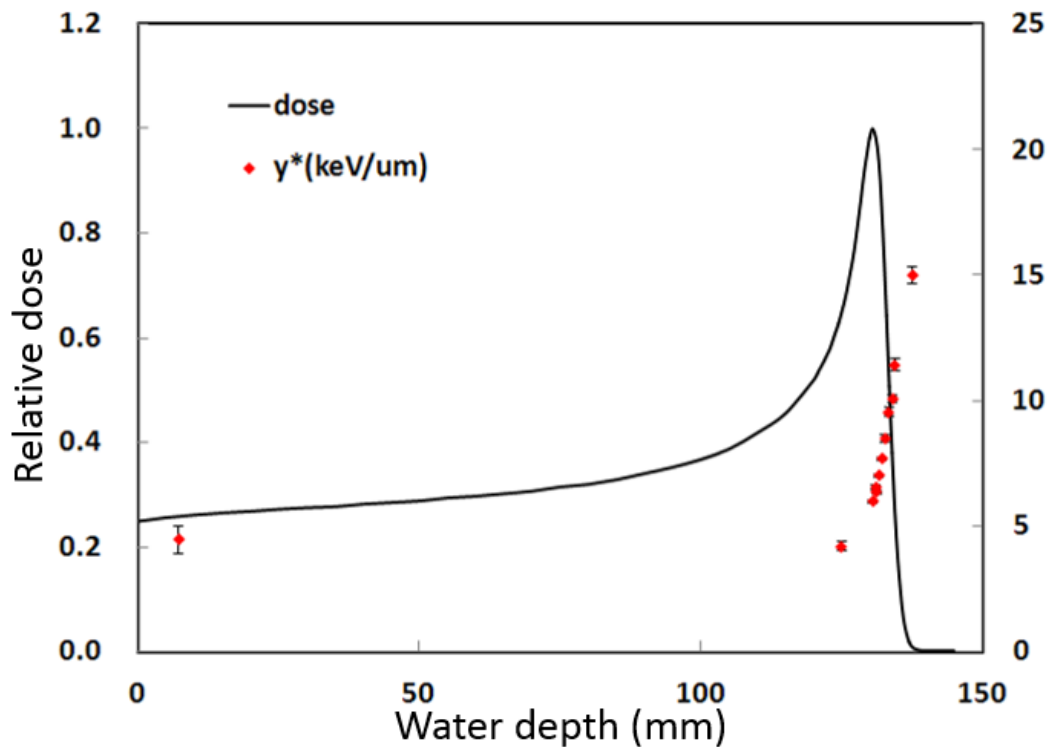


図-7：筑波大学陽子線医学利用センター155 MeV陽子線のエネルギー分布（実線）とlineal energy（赤い点）の測定結果.

2.4 200 kV 20 mAエックス線のlineal energy値について

一方、本研究で利用したエックス線照射装置は日本放射線医学総合研究所のPantac HF-320-Sの200 kV 20 mAエックス線装置である。Okamotoらはこの装置を用い、上記と全く同様の方法でマイクロドシメトリを行い、その結果を報告している（18）。そこで、本研究ではその結果に基づき、200 kV 20 mAエックス線のlineal energy 値を、 $4.51 \pm 0.05 \text{ keV}/\mu\text{m}$ として、以下のデータ解析を行った。

第3章 エダラボンの細胞毒性

3.1 背景と実験目的

フリーラジカル消去剤エダラボン (MCI-186; 化学名 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one; 分子量 174.20) は脳梗塞急性期において虚血再還流時に生じるフリーラジカルを除去することで脳梗塞巣を縮小させる効果があり、すでに臨床で利用されている薬剤である。動物実験で放射線の防護効果があることはAnzaiらによって報告されている (16)。

本実験では、照射実験の際に利用するエダラボン濃度を決定するために、エダラボンのMOLT-4細胞に対する毒性を確認する実験を行った。

3.2 材料と方法

- ① T75 フラスコに培養した対数増殖期の MOLT-4 細胞浮遊溶液を 1.8×10^6 個/ml、20 ml 以上になるように調整する。
- ② MOLT-4 細胞浮遊溶液を 50 μ l ずつ 96 ウェルプレートの各ウェルに播種し (0.9×10^5 個/well)、1 時間インキュベーター内に静置する。
- ③ エダラボン (最終濃度はそれぞれ、1 μ M、10 μ M、100 μ M、1 mM、2 mM、4 mM、8 mM) を細胞と 0~24 時間接触させる (このときコントロールのウェルには MOLT-4 細胞は入れず RPMI medium (10% FBS+, PS+) とエダラボン水溶液のみとする)。
- ④ CCK-8 キット (Cell counting kit-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を各ウェル 10 μ l ずつ添加して呈色反応を行い、4 時間後にマイクロプレートリーダーで吸光度を測定する (測定波長 450 nm)。

3.3 実験結果

エ达拉ボンの添加濃度が1 μ M、10 μ M、100 μ Mの場合、24時間接触後のMOLT-4細胞の生存率はそれぞれ98.34 \pm 2.22%、97.92 \pm 1.36%、88.86 \pm 2.43%であった。エ达拉ボン1 mMを添加したサンプルの細胞生存率は接触時間が長くなるとともに下がって行った。エ达拉ボン2 mM、4 mM、8 mM添加した場合のMOLT-4細胞の生存率は20-30%であった。(図-8)。本研究では細胞に対する影響が少ない1 μ M、10 μ M、100 μ Mの3種類の濃度を選択し、その後の実験を行った。

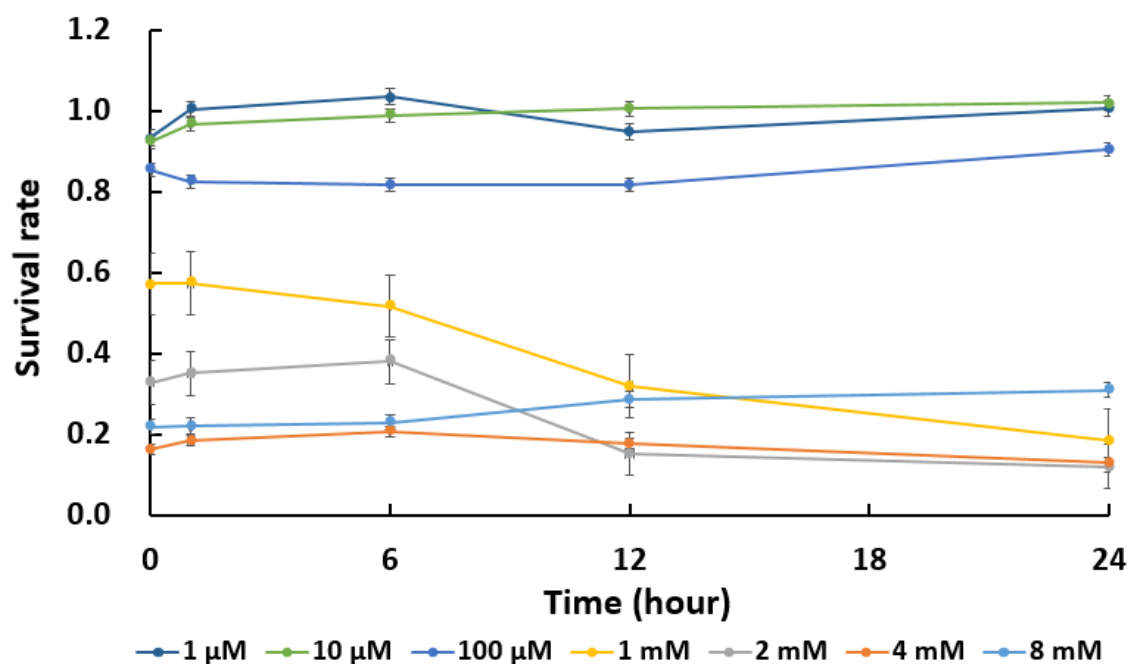


図-8：エ达拉ボン接触後，MOLT-4細胞の生存率（CCK-8キットで測定）。

第4章 放射線によるDNAの塩基損傷と エダラボンの防護効果 (DNAレベル)

4.1 背景と実験目的

放射線のターゲットは細胞核のDNAであり、放射線によるDNA損傷には直接作用と間接作用がある。放射線照射により生成した酸化型のラジカルがDNAと結合して、DNAに損傷を与えて間接作用を起こすが、このラジカルにはヒドロキシルラジカルのDNAの損傷作用が大きい。エックス線ではこのような間接作用が主であり、全体の60-70%を占めている(11)。しかし、陽子線の間接作用についての詳細な報告はまだないので、本研究では陽子線とエックス線によるDNAの塩基損傷を比較した。

放射線照射後、DNA塩基はラジカルにより化学的修飾を受ける。例えば、デオキシグアノシン(dG)はDNAの4種類の塩基のうち最も酸化還元電位が低いため、活性酸素による酸化を受けやすい。dGの8位がヒドロキシル化されて8-hydroxy-2-deoxyguanosine(8-OHdG)になる。このためこのdGの主要な酸化生成物である8-OHdGは、DNA酸化損傷のマーカーとしてよく利用されている(19)。8-OHdGの測定方法にはELISA法、高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出(HPLC-ECD)法などがあるが、HPLC-ECD法は精度が高く定量化しやすい方法として知られており、本研究ではHPLC-ECD法で放射線照射後の8-OHdGの生成量を測定した。

エックス線及び陽子線によるエダラボンの塩基損傷の防護効果を確認するために、エダラボンの濃度を1 μ M、10 μ M、100 μ Mに変化させて実験を行った。

4.2 材料と方法

4.2.1 DNA溶液の準備と照射

- ① サケ精子DNA (ST-DNA, Sigma) 20 mgと蒸留水 (DW) 10 mlを大気条件で50 ml遠心チューブ中で混ぜた後、アルミホイルで遮光して10分攪拌して溶解する。
- ② エダラボン (M. W. =174.2) 17.42 mg DW 10 mlに溶解し、超音波を用いて十分に溶解する。
- ③ ST-DNA溶液とエダラボン水溶液を混合し、サンプルのST-DNAの最終濃度は1 mg/ml、エダラボンの最終濃度は0 μ M、1 μ M、10 μ M、100 μ Mに調整する。
- ④ サンプル2 mlを、自家製の容器に入れ、200 kV 20 mAエックス線、155 MeV陽子線をプラトー (7.2 mm water depth) とブラッグピーク近傍 (131.4 mm water depth) で10 Gyの照射を行う (図-9、10)。
- ⑤ 照射後はサンプルを速やかに氷冷した後、2 ml遠心チューブに移して、速やかに-80°Cで冷凍する。

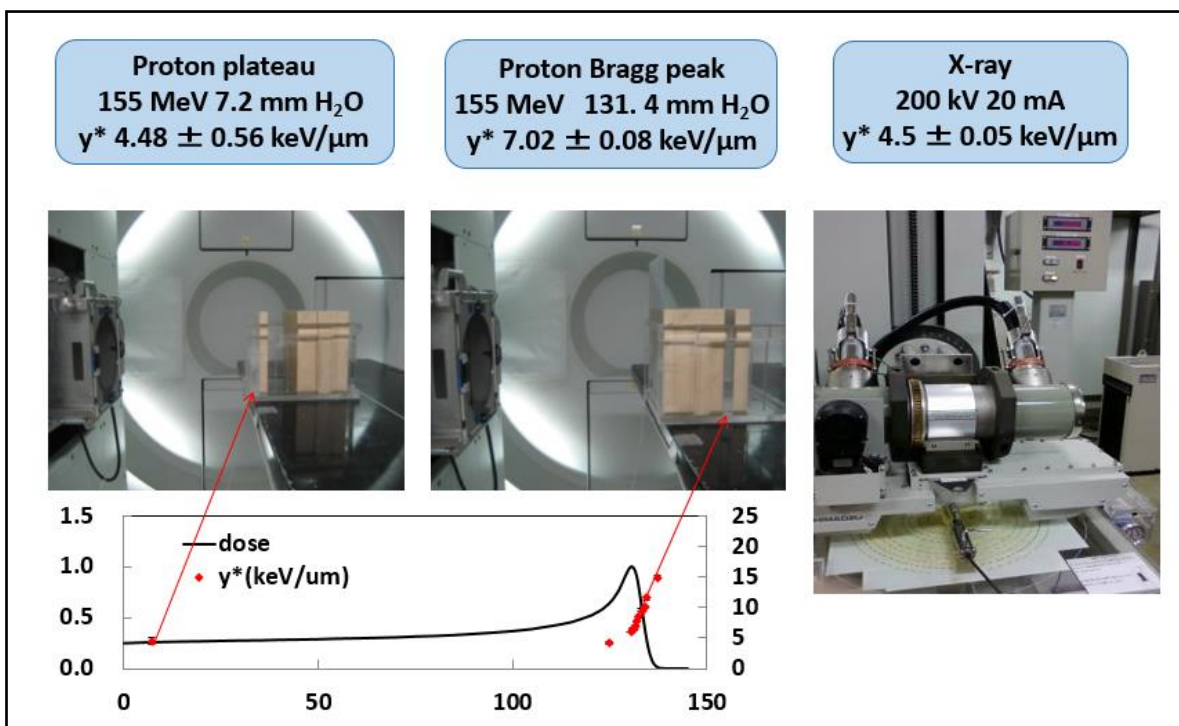


図-9 : サンプル照射写真と、照射条件説明図.

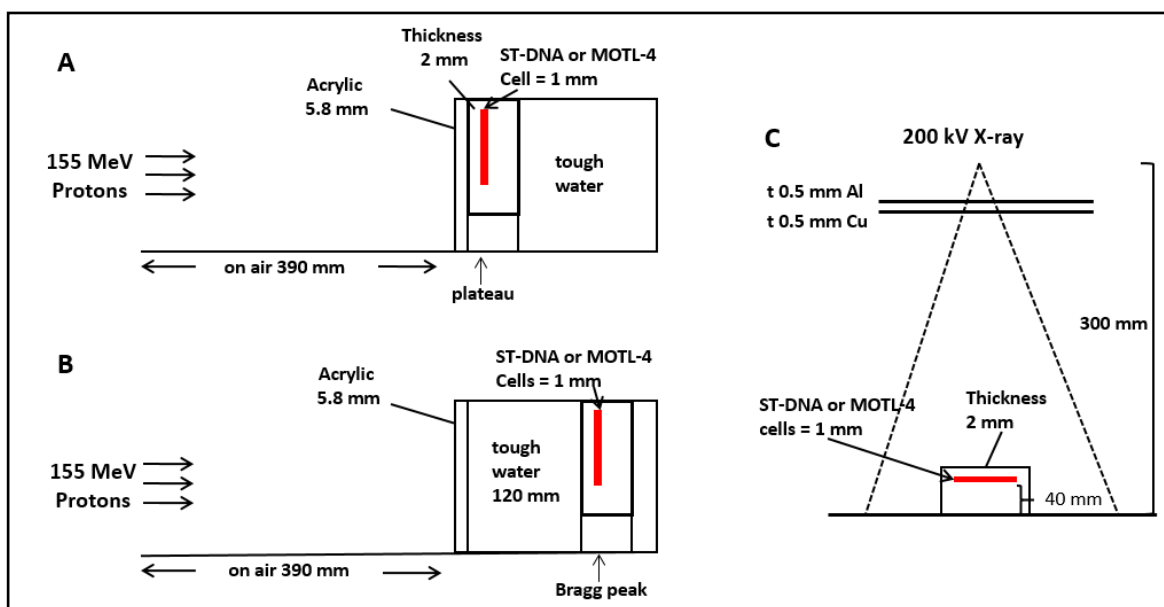


図-10：サンプルの照射設置略図。Aは陽子線のプラトーでの照射，Bは陽子線のブラッグピークでの照射，Cはエックス線での照射を示す。照射サンプルは赤い印をつけた部分に添加する。

4.2.2 8-OHdG の抽出

- ① -80°C に保存しているサンプルを室温で溶かし、サンプル $50\ \mu\text{l}$ に対して $1.0\ \text{mM}$ エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を $100\ \mu\text{l}$ 加えて 95°C で 5 分間 (恒温水槽) 加温し、終了後直ちに氷に漬ける。
- ② $1.0\ \mu\text{l}$ 2M 酢酸ナトリウム、 $10\ \mu\text{l}$ 核酸分解酵素 P1 (nuclease P1, Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan) を加えて、 37°C で 70 分間、恒温水槽で保温する。
- ③ $16\ \mu\text{l}$ $1\ \text{M}$ トリス塩酸バッファー (Tris-HCl、 $\text{pH}\ 7.5$)、 $4\ \mu\text{l}$ アルカリホスファターゼを加えて、 37°C で 70 分間、恒温水槽で保温する。
- ④ サンプルを遠心 ($15,000\ \text{rpm}$ 、3 分、 4°C) する。
- ⑤ 上清を濾過フィルター付き遠心管 (Ultrafree-MC Amicon) に移し、遠心 ($10,000\ \text{rpm}$ 、3 分、 4°C) する。

⑥ 上清液を HPLC-ECD 法で 8-OHdG の生成量を検出する。

4.2.3 HPLC-ECD 法による 8-OHdG の検出

8-OHdG のピークは HPLC 装置の ECD 検出器 (electrochemical detector, coulochem2; Dionex Company, CA, USA)、dG のピークは UV 検出器 (UV-970; JASCO Corporation, Tokyo, Japan) で検出する。移動相には超音波で脱気した 10 mM リン酸-1-ナトリウム 8%メタノール溶液を使用し、抽出したサンプルをオートサンプラー (AS-2059 Plus; JASCO) にセットし、30 分毎に測定する。

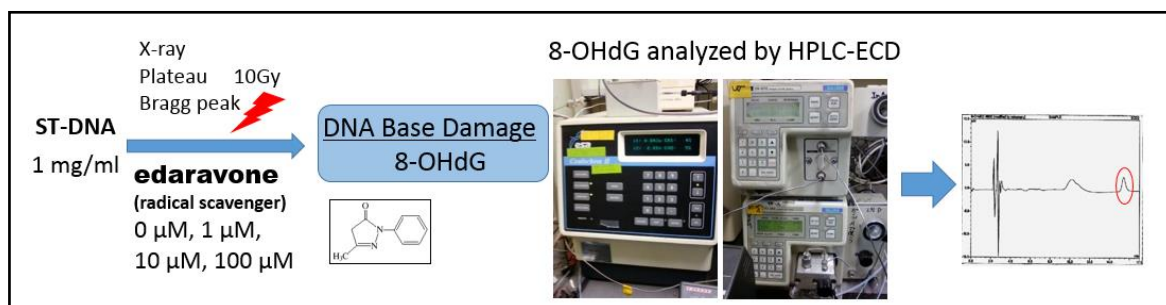


図-11 : ST-DNA を用いた放射線による DNA の塩基損傷の実験方法略図.

4.3 実験結果

まず標準サンプルを流して8-OHdGの信号が出るタイミングを確認した。その結果、8-OHdGのピークはサンプルを流し始めてから14-15分で出現することが分かった。各サンプルの8-OHdG生成量を図-12に示した。ピークの定量化は黒色部分の面積で行うが、標準サンプルとの比較から8-OHdGの絶対値を計算し、 $8\text{-OHdG}/\text{dG} \times 10^5$ を図-12のグラフに表した(図-13)。実験結果からは、エダラボンを添加していない場合、放射線照射による8-OHdGの生成量はエックス線が一番高く、次は陽子線のプラトー、ブラッグピークの順であった。また、エダラボンの添加後は8-OHdGの生成量はエダラボンの濃度が上がるとともに減少した(図-13)。エダラボンの濃度が $1 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ の場合、エックス線のエダラボンの防護効果は、

陽子線のプラトーと陽子線のブラッグピーク近傍より高いが、100 μ Mでは有意差は認められなかった（図-14）。

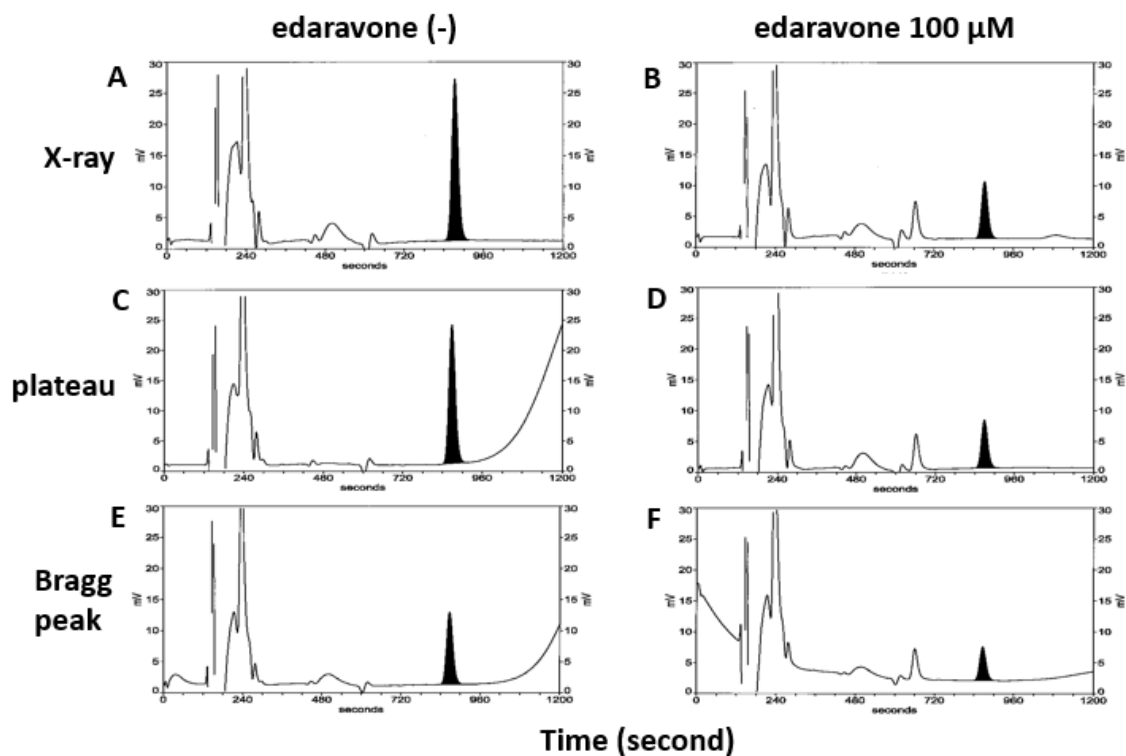


図-12 : HPLC-ECD法で測定した8-OHdGのグラフ（黒いピーク部分）。A, Bはエックス線で照射したサンプル, C, Dは陽子線プラトーで照射したサンプル, E, Fは陽子線ブラッグピークで照射したサンプル。8-OHdGのピークはエックス線>陽子線プラトー>陽子線ブラッグピークの順である。エダラボン添加したサンプルの8-OHdGピークがエダラボン添加していないサンプルより小さい。

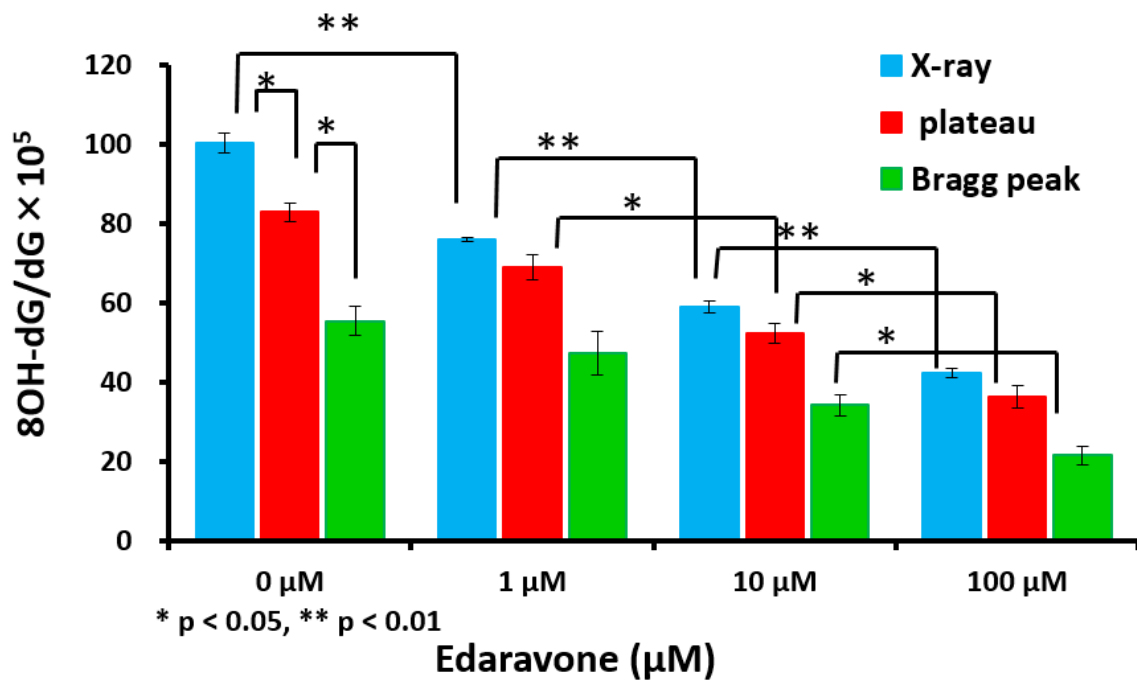


図-13：放射線照射後8-OHdGの生成量及びエダラボンの防護効果. 青い色はエックス線, 赤い色は陽子線プラトー, 緑色は陽子線ブラッグピーク. エダラボンを添加していない時, 8-OHdGの生成量はエックス線>陽子線プラトー>陽子線ブラッグピークの順である. エダラボンの添加濃度が上がるとともに8-OHdGの生成量が有意に減少していく.

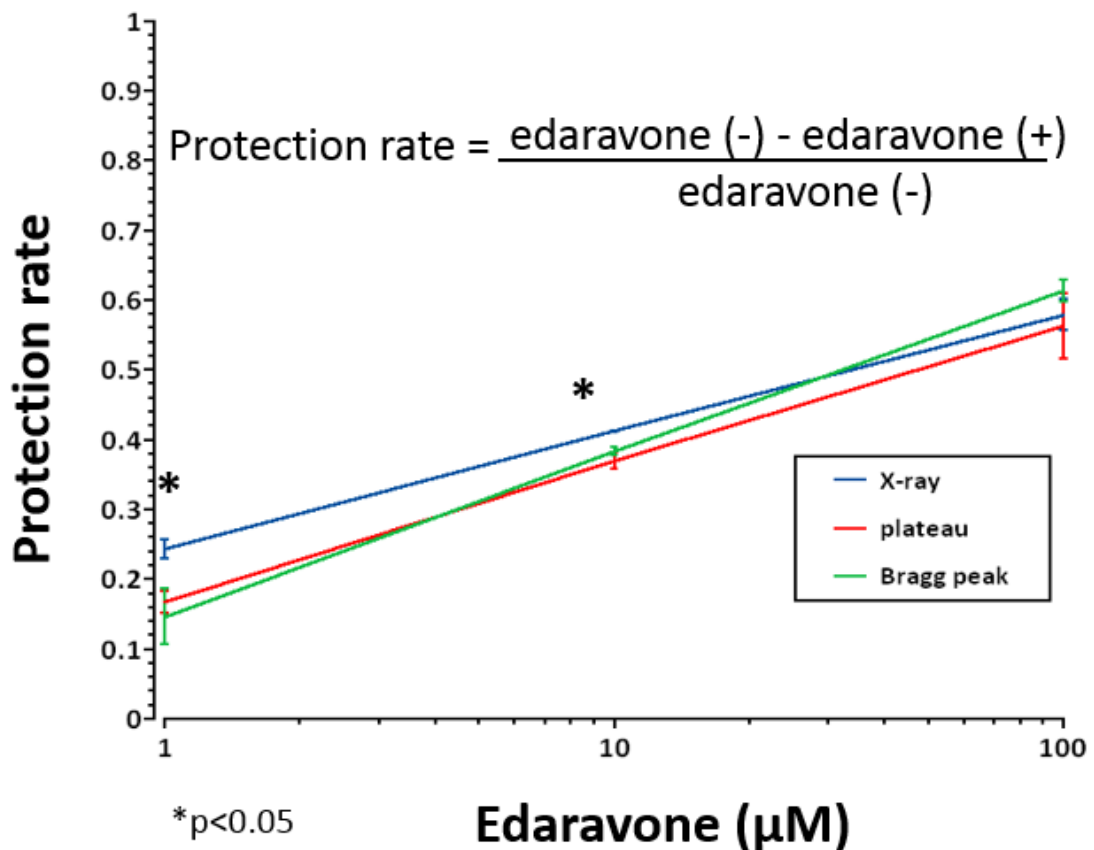


図-14：放射線によるDNA塩基損傷のエダラボンの防護効果. エダラボンの添加濃度が1 μM、10 μMの場合、エックス線のエダラボンの防護効果は陽子線のプラトーと陽子線のブラッグピーク近傍より高い. 添加濃度が100 μMの場合は各放射線によるエダラボンの防護効果の差は認められなかった.

4.4 小括

エックス線によるDNA損傷の間接作用は約60-70%とされているが、陽子線の間接作用についての詳細な報告はまだない。8-OHdGはDNA酸化損傷のマーカーとしてよく利用されている。陽子線によるDNA損傷の間接作用を解析するために、ST-DNA溶液を対象として、200 kV 20 mAエックス線と155 MeV陽子線のプラトー、ブラッグピーク近傍での8-OHdG生成量をHPLC-ECD法で測定した。その結果、

エックス線照射による8-OHdGの生成量は陽子線照射より高く、陽子線照射ではプラトーがブラッグピークより高かった。エ达拉ボンは8-OHdGの生成量を減少させ、その濃度が1 μ M、10 μ Mの場合、エックス線のエ达拉ボンの防護効果は、陽子線プラトーと陽子線ブラッグピーク近傍より高いが、100 μ Mでは有意差はなかった。

第5章 放射線によるDNAの二本鎖切断と エダラボンの防護効果 (DNAレベル)

5.1 背景と実験目的

放射線によるDNA損傷の直接作用は、反超電子あるいは粒子自体が直接DNAを損傷する作用である。2カ所の1本鎖切断が3塩基以内の距離で近接して起こるのも二本鎖切断とされている。

核酸はマイナスに荷電しているので、泳動槽で陰極から陽極に移動させることができる。放射線照射によりDNA二本鎖切断が起きるとDNAのサイズが短くなる。そこで、照射後のDNAをアガロースゲルで電気泳動すると、分子量が小さいDNAほど移動のスピードが速いのでDNAのサイズを解析することが可能となる。

陽子線はエックス線と線質が異なるために、照射によるDNA損傷のメカニズムにも違いがあると推定される。そこで、本研究では、陽子線とエックス線によるDNA二本鎖切断を定量化して比較し、そのメカニズムの違いを明らかにするための実験を行った。

5.2 材料と方法

5.2.1 ST-DNAの照射とサンプルの保存

- ① ST-DNA 2 mg を DW 10 ml に混合させた後、手で 10 分間攪拌して完全に溶解させる。
- ② エダラボン (M. W. =174. 2) 3. 484 mg を 10 ml DW に加えて攪拌し (アルミホイルで遮光) 十分に溶解させる。
- ③ ST-DNA溶液とエダラボン水溶液を混ぜ、サンプルのST-DNAの最終濃度が0. 2 mg/ml、エダラボンの最終濃度が0 μ M、 100 μ M になるように混合させる。
- ④ サンプル2 mlを、自家製の容器に入れ、200 kV 20 mAエックス線、155 MeV陽子線プラトー (7. 2 mm water depth) とブラッ

グピーク近傍 (131.4 mm water depth) で20 Gyの照射をする。

- ⑤ 照射後は速やかに氷冷したのち、2 ml遠心チューブに移して、
-80°Cで冷凍する。

5.2.2 サンプルの電気泳動

- ① 50 ml TAE バッファー (Tris-acetate-EDTA running buffer; Wako) にアガロース粉末 0.75 g を入れて電子レンジで加熱し、
溶液が均等な濃度になるように溶解する。
- ② TAE バッファーアガロース溶液にエチジウムブロマイド
(ethidium bromide; Wako) 2.5 μ l を加えてよく混合させる。
- ③ TAE バッファーアガロース溶液を型に入れて、室温でアガロースゲルを固める。
- ④ TAE バッファーアガロースゲルを泳動槽 (FAS-III; Toyobo Co. Ltd, Osaka, Japan) の中に設置し、ゲルの表面が過ぶるまで泳動溶液を添加する。
- ⑤ ゲルの穴に DNA サンプルと標準マーカ―を添加する (DNA サンプル 20 μ l にローディングバッファー2 μ l を添加する)。
- ⑥ 電圧 100 V で、25-35 分間電気泳動する。
- ⑦ 電気泳動後のアガロースを 4°Cの冷蔵庫で 1-2 時間静置し、ローディングバッファーが消えるまで待つ。
- ⑧ UV カメラで撮影し、画像を「Image J」ソフトウェア (U. S. National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>) で解析する。



図-15 : ST-DNA を用いた放射線による DNA の二本鎖切断の実験方法略図.

5.3 実験結果

アガロース電気泳動により生成したDNAのスミアをUVカメラで撮影した(図-16)。得られた画像を解析ソフトウェアである「image J」ソフトウェアを利用して解析し、DNAサイズの間値を得た。次に、以下の計算式を用いてDNA損傷の頻度 (the frequency of DNA breaks) を $\Phi = [L]_{n,+}^{-1} - [L]_{n,0}^{-1}$ として求めた。ここで、 $[L]_{n,+}$ は照射されたDNAサイズの間値、 $[L]_{n,0}$ は照射されていないDNAサイズの間値である。その結果、DNA損傷の頻度は陽子線プラトーが最も高く、陽子線ブラッグピーク近傍とエックス線ではほぼ同じであった(図-17)。また、エダラボンを $100 \mu\text{M}$ 添加した後には、いずれの放射線照射でもDNA損傷の頻度が有意に減少した(図-17)。

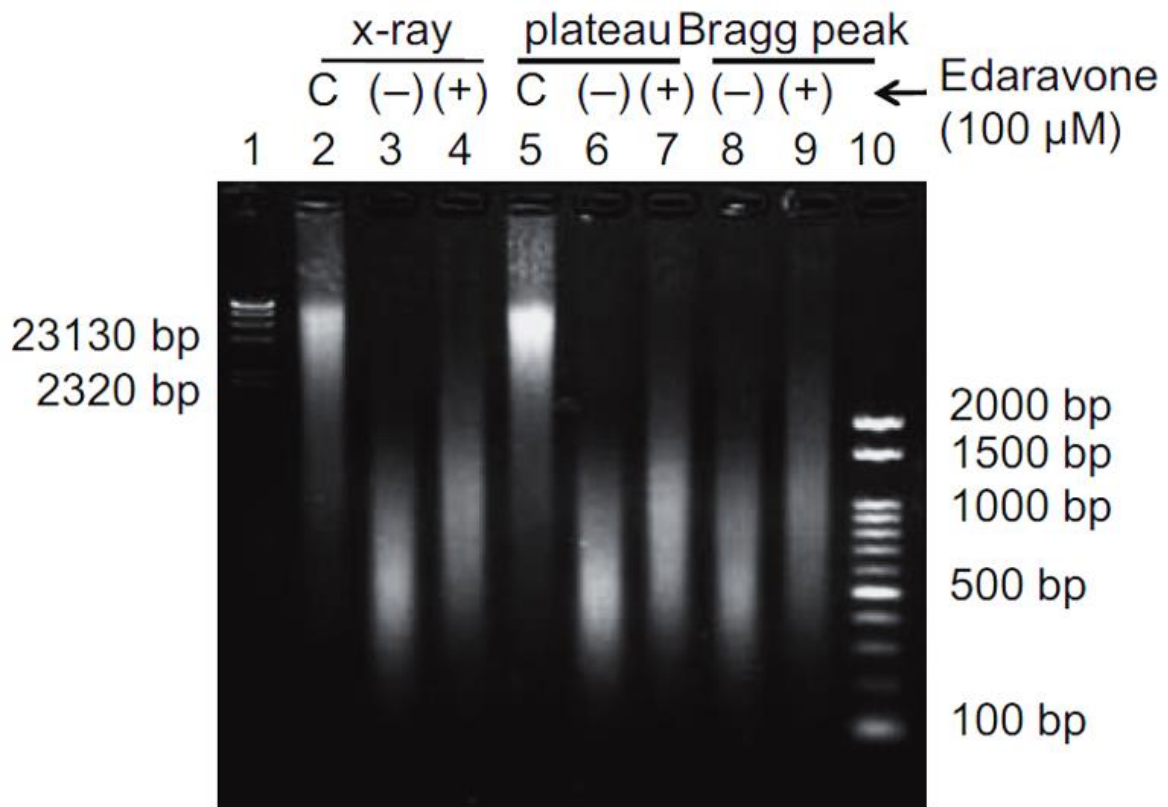


図-16：放射線照射後のST-DNA溶液のアガロース電気泳動図。添加したサンプルは左から、1は標準サンプル（λ hand III）、2はコントロール、3はエックス線のエダラボン添加なし、4はエックス線のエダラボン添加後、5はコントロール、6は陽子線プラトーのエダラボンの添加なし、7は陽子線プラトーのエダラボンの添加後、8は陽子線ブラッグピークのエダラボンの添加なし、9は陽子線ブラッグピークのエダラボンの添加後、10は標準サンプル(Gene ladder 100)の順である。

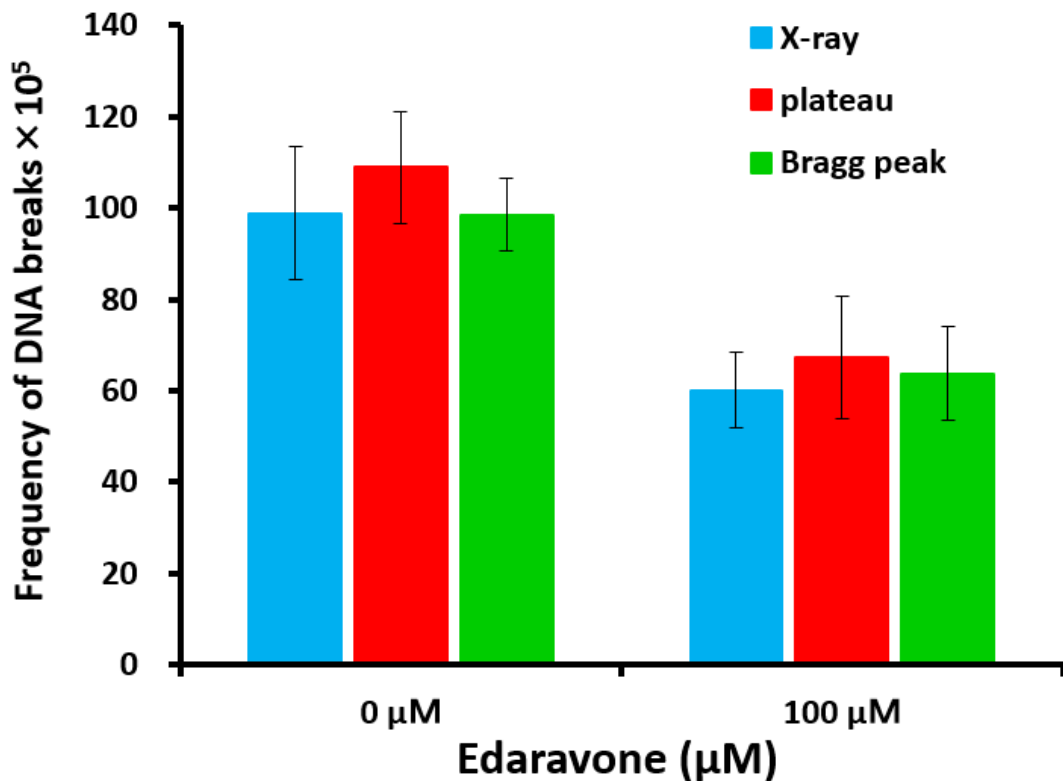


図-17：放射線によるDNAの二本鎖切断及びエダラボンの防護効果. 青い色はエックス線, 赤い色は陽子線のプラトー, 緑色が陽子線のブラッグピーク. エダラボンを添加していない場合, DNA損傷の頻度は陽子線プラトー>エックス線=陽子線ブラッグピークの順であった. エダラボンを添加後にはDNA二本鎖切断が有意に減少した.

5.4 小括

ST-DNA溶液を対象として、200 kV 20 mAエックス線と155 MeV陽子線プラトー(7.2 mm water depth)及びブラッグピーク近傍(131.4 mm water depth)で20 Gy照射して、照射後のDNAをアガロースゲルで電気泳動した。その結果、陽子線のプラトー部分で照射した場合にDNAの二本鎖切断が一番多く、ブラッグピークとエックス線ではほぼ同じであった。エダラボンを100 μM添加した後にはDNA二本鎖切断が有意に減少したが、各放射線の種類によるエダラボ

ンの防護効果には有意な差は認められなかった。

第6章 放射線によるDNAの二本鎖切断と エダラボンの防護効果(細胞レベル)

6.1 背景と実験目的

ここまでの実験ではDNA溶液を対象として、修復がない状態でのDNAの塩基損傷とDNA二本鎖切断を解析したが、さらに細胞レベルでの変化を明らかにするために、MOLT-4細胞を用いて各放射線によるDNA二本鎖切断生成を解析した。

放射線照射後、DNAのヒストンH2Aの139位にあるセリン残基がリン酸化され、 γ -H2AXとなる。 γ -H2AXは細胞のDNA二本鎖切断のマーカーとしてよく利用されている(20)。放射線照射後の細胞をホルマリン固定した後、 γ -H2AXの蛍光免疫染色を行うことで、蛍光顕微鏡でDNA二本鎖切断は γ -H2AXのフォーカスとなり可視化され定量的解析が可能となる。

この実験では、我々はヒト白血病細胞のMOLT-4細胞を対象とし、ST-DNAの実験と同じく、エックス線及び陽子線のプラトーとブラッグピーク近傍で照射を行い、 γ -H2AXのフォーカスを観察した。

6.2 材料と方法

6.2.1 MOLT-4細胞の照射

- ① T75 フラスコで培養した対数増殖期のMOLT-4細胞を遠心回収し、濃度が 4×10^7 個/ml なるように培養液(FBS-, PS-)で希釈する。
- ② エダラボン(M. W. = 174.2)原末 1.742 mg を 5 ml RPMI medium (FBS-, PS-)に加えて攪拌し、(アルミホイルで遮光)十分に溶解させる。
- ③ 照射の5分前にMOLT-4細胞溶液にエダラボンを添加し(エダラボンの最終濃度が $0 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$)、その細胞溶液を照射容

器に入れる。(エダラボン添加していないサンプルは RPMI 培養液を代わりに入れる)

④ 上と同じ方法で、細胞に対し陽子線のプラトーとブラッグピーク近傍、ならびにエックス線で、其々0.5 Gy、1 Gy、2 Gy の照射を行う。

① 細胞溶液を 0.4 ml ずつに分け、インキュベーターで培養する。

6.2.2 γ -H2AXの蛍光免疫染色

② 照射後 10 分、30 分、1 時間、6 時間に細胞浮遊液をマイクロチューブ遠心機で遠心し、4% ホルマリン 1 ml を入れて 10 分間、室温で固定する。

③ 細胞浮遊液をマイクロチューブ遠心機で遠心し、1 ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗う。

④ 0.5% Triton X-100 (Merck Ltd, Hesse, Germany) 1 ml を入れて 15 分、室温で反応させ、膜透過性を高める。

⑤ 細胞浮遊液をマイクロチューブ遠心機で遠心し、1 ml PBS で 3 回洗う。

⑥ 3%ウシ血清アルブミン (BSA; Wako) 1 ml を入れて室温で 30 分ブロッキングする。

⑦ 500 倍希釈した一次抗体 (H2AX (Ser139) monoclonal antibody; Millipore Corporation, MA, USA) 200 μ l を入れて室温で 1 時間反応させる。

⑧ 細胞浮遊液をマイクロチューブ遠心機で遠心し、1 ml の PBS で 3 回洗う。

⑨ 1000 倍希釈した二次抗体 (Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-mouse immunoglobulin G(H+L) antibody; Life Technologies Japan Ltd, Tokyo, Japan) と DAPI (Wako) の混合液を 200 μ l 入れて室温で 1 時間反応させる。

- ⑩ 細胞浮遊液をマイクロチューブ遠心機で遠心し、1 ml の PBS で 3 回洗う。
- ⑪ 遠心した後、上清を捨て、残った PBS と細胞を懸濁して、スライドガラスに乗せる。
- ⑫ 封入剤 (mounting medium; DAKO) をスライドガラス上に滴下し、カバーガラスで封入する。
- ⑬ 蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8000, Keyence Corporation, Osaka, Japan) で細胞の写真を撮り、Z スタック後、「focicounter」でフォーカスの数を数える。

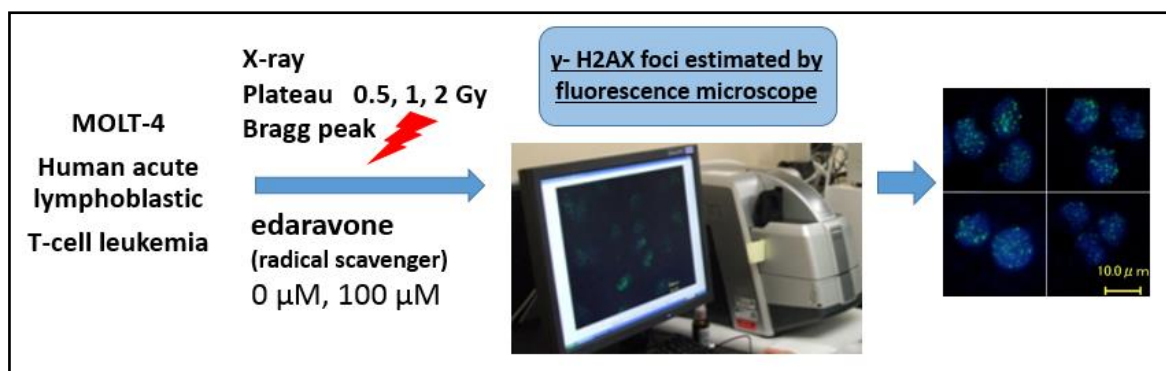


図-18 : MOLT-4細胞を用いた放射線によるDNAの二本鎖切断の実験方法略図.

6.3 実験結果

結果の一部を図-19に示した。青く染色された部分は細胞の核を示しており、明るい緑の点が γ -H2AXフォーカスである。各時間のポイントで50個ずつの細胞をランダムに選んで画像を取り込み、「focicounter」というソフトウェア (Institute of Theoretical Physics, University of Wroclaw, Poland, <http://focicounter.sourceforge.net/>) を利用してフォーカスの数を数え、平均値を出した。結果を図-20に示した。まず、 γ -H2AX フォーカスは照射線量が増えるに従って増加した。また、フォーカス

数は照射後30分で一番多く、その後徐々に減少した。エダラボン添加前では、3種類の放射線で照射したサンプルのフォーカス数に差は認められなかったが、エダラボン添加後では、エックス線で照射したサンプルのフォーカスが減少し、2 Gy照射後1時間以内においては陽子線よりもフォーカス数が有意に減少した。その事は、エックス線と陽子線では細胞DNA二本鎖切断生成のメカニズムが異なる事を示している。

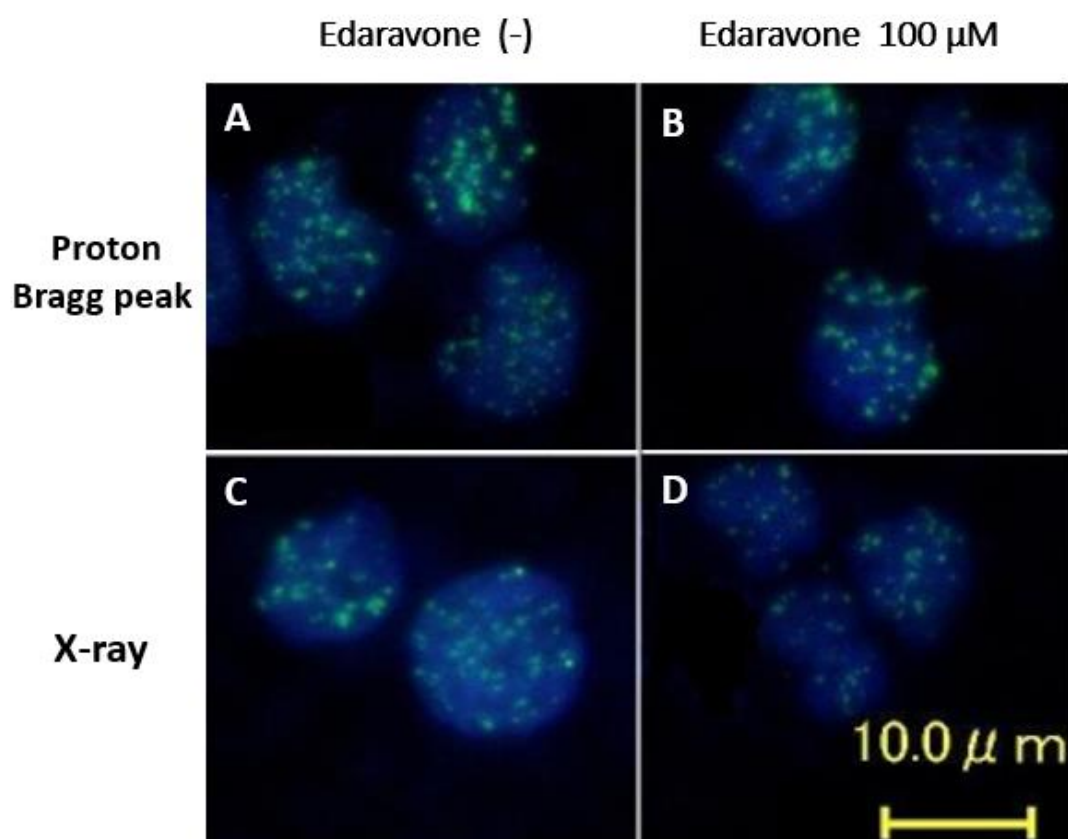


図-19 : 2 Gy照射後30分に固定したサンプルの γ -H2AX蛍光免疫染色写真. A, Bは陽子線のブラッグピークで照射したサンプル, C, Dはエックス線で照射したサンプルである. 陽子線のブラッグピークで照射したサンプルは照射前にエダラボンを添加してもフォーカス数の変化は見られなかったが, エックス線で照射したサンプルは照射前のエダラボン添加によりフォーカス数は減少した.

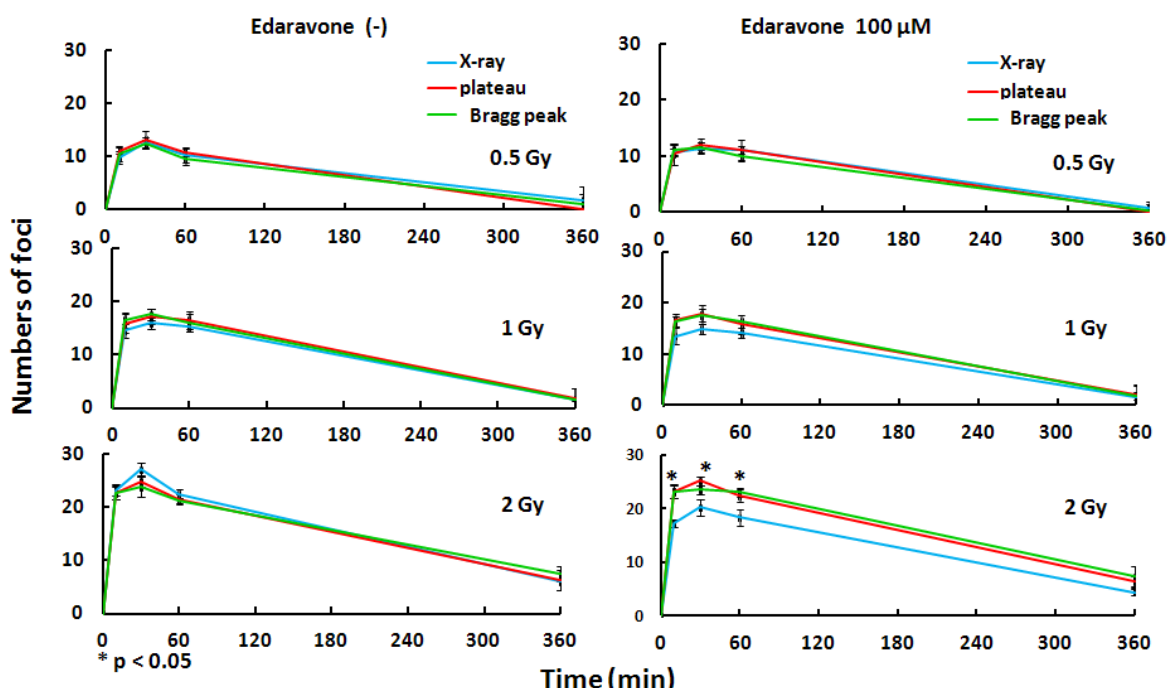


図-20：放射線照射後 γ -H2AXフォーカス数の時間変化。青い線はエックス線，赤い線は陽子線のプラトー，緑線は陽子線ブラッグピーク。エダラボンを添加していないサンプルではエックス線と陽子線照射によるフォーカス数の違いが見られない。エダラボン添加した実験では，エックス線2 Gy照射後1時間以内のサンプルのフォーカス数が陽子線より有意に少なかった。

6.4 小括

本章では細胞レベルでの陽子線とエックス線によるDNA二本鎖切断を解析するためにヒト白血病細胞のMOLT-4細胞を利用し、200 kV 20 mAエックス線、155 MeV陽子線プラトー（7.2 mm water depth）とブラッグピーク近傍（131.4 mm water depth）で0.5、1、2 Gy照射した後に、経時的に生成される γ -H2AXフォーカスを定量化した。その結果、エダラボンを添加していない場合、エックス線と陽子線の二カ所におけるDNA二本鎖切断生成には違いは認められなかったが、エダラボン添加後1時間以内ではエックス線によるDNA二本鎖切断は陽子線より有意に減少した。

第7章 考察

高エネルギー陽子線は、生体に照射されるとそのエネルギーに伴い決められた深さで完全に止まる性質がある（図-1）。陽子線ビームが通過する部分においてはエネルギー付与が少ないが、停止する直前ではブラッグピークを作り周囲へエネルギーを集中して付与するので、周囲の正常組織を温存し、深部の腫瘍に集中した照射が可能である。

陽子線のガンマ線に対する生物学的効果比（relative biological effectiveness: RBE）は一般的には1.1とされている（21）。しかし、治療用の200 MeV陽子線と同じく治療用10 MVエックス線の効果を比較した我々の研究成果からは、MOLT-4細胞を用いたコロニーサバイバルアッセイではRBE値が 1.06 ± 0.04 であり、さらに選択するエンドポイントによってRBE値は変化する事が明らかとなった（20）。また、Ibanez, Matsuuraらは、陽子線ビームのエネルギー値によって陽子線のRBEは異なることを報告した（22、23）。このような陽子線のRBE値の不確実性は、陽子線の電離パターンと、その結果生じるDNA損傷の種類が、エックス線あるいはガンマ線とは異なる点に由来していると考えられる。そこでその違いを明らかにし、陽子線の生物学的効果の不確実性を解消することは、陽子線の臨床的な効果を最適化するためにも必須な課題である。特に、高エネルギー陽子線によるDNA塩基損傷に関する研究はこれまでほとんど行われてこなかった。

放射線の生物学的効果は、放射線の種類とそのエネルギー値に依存する。荷電粒子線には飛跡があり、その飛跡に沿って単位長さ当りに局所的に与えられるエネルギー量を線エネルギー付与（LET）と呼び、線質を表す単位で、生物学的効果を評価する際の指標として使われる（24）。ところが、エックス線やガンマ線に

は飛跡がなく、荷電粒子線とは電離パターンが異なるためにこのLETと吸収線量を用いてこれらの生物学的効果を比較する事は困難である(図-21)。それに対して細胞単位の微小領域における電離の空間分布あるいは密度を表すlineal energy (y) という概念では、放射線の種類によらず単位体積に付与するエネルギー分布を指標にする事から理論的には荷電粒子線とエックス線やガンマ線を比較することが可能となる(25)。Chenらは、lineal energyは三次元のエネルギー分布を表しているので、LETよりも放射線の性質の違いを正確に表す事が出来ると報告した(26)。ただし、lineal energy値を得るには、マイクロシメトリにより細胞核のサイズに相当する微小領域に付与されるエネルギーを推定することが必要である。そこで本研究では筑波大学陽子線医学利用センターで、TEPCを用いて155 MeV 陽子線のマイクロシメトリを行い、lineal energy値を算出した(図-7)。また、同様の測定で得た200 kV 20 mAエックス線のlineal energy値(18)を用いて生物学的効果を比較した。我々の知る限りでは、lineal energyに基づいて高エネルギー陽子線とエックス線のDNA損傷を比較したのは本研究が初めてである。

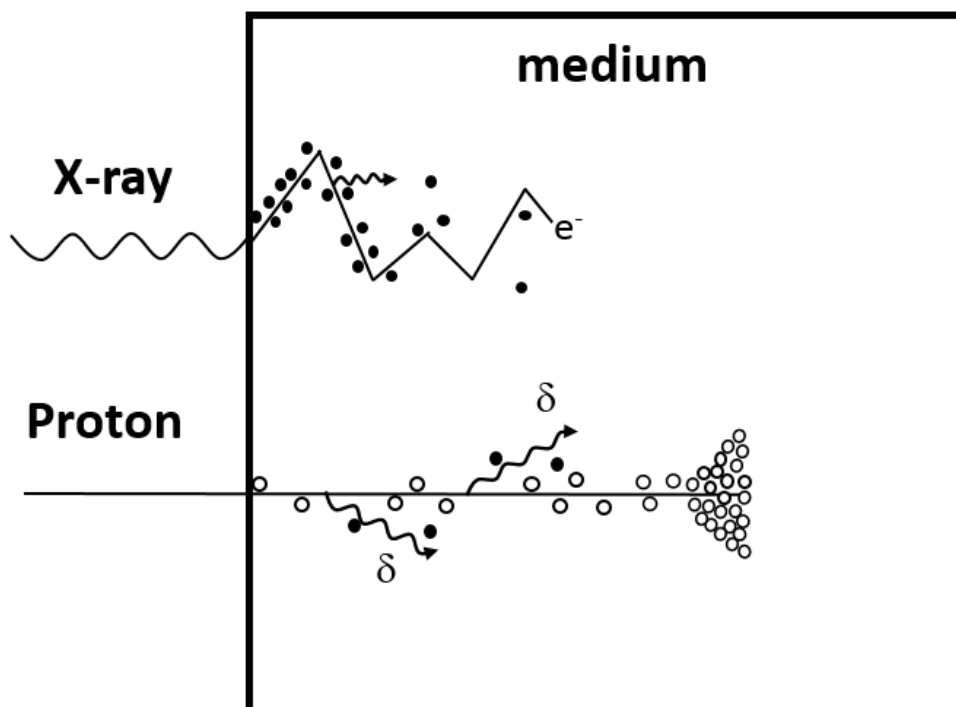


図-21 : エックス線と陽子線のエネルギー分布模型図.

次に、陽子線及びエックス線によるDNAの塩基損傷とDNA二本鎖切断を評価するために、本研究では、①ST-DNA溶液における8-OHdGの生成量、②ST-DNA溶液におけるDNA二本鎖切断生成量、③ヒト白血病細胞MOLT-4細胞における γ -H2AXフォーカス生成量、をエンドポイントとして設定した。DNA一本鎖切断が8-OHdGの生成量と比例するとの報告から(27、28、29)、本研究ではDNAの一本鎖切断については検討しなかった。8-OHdGが酸化ストレスにより生成される物質であり、1984年にKasaiとNishimuraによっではじめて報告された(30、31)。現在、8-OHdGはDNA酸化損傷のマーカースとして幅広く利用されている(19)。我々の実験結果からは、陽子線による8-OHdGの生成量はlineal energy値が上がるとともに減少することが明らかとなった。また、同じlineal energy値において、エックス線照射による8-OHdGの生成量は陽子線より多いことが示され

た(図-22)。これらの結果は、lineal energy値が同じであっても、エックス線は陽子線よりDNA酸化損傷の割合が多く、陽子線ではlineal energyが上がるとともにDNA酸化損傷の割合が減少することを示している。

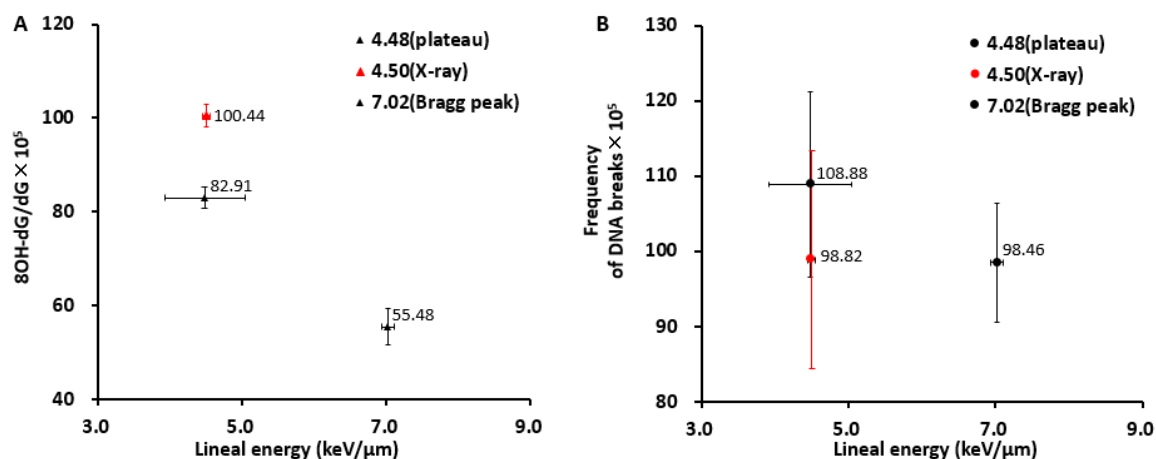


図-22 : DNA損傷とlineal energyの関係図. Aの縦軸はDNA酸化損傷, Bの縦軸はDNA二本鎖切断である. 横軸は放射線にlineal energy値を表している. 照射線量が同じ時、陽子線ではlineal energyが上がるとともにDNA酸化損傷の割合とDNAの二本鎖切断が減少するが、lineal energy値が同じであっても、エックス線は陽子線よりDNA酸化損傷の割合が多く、DNA本鎖切断が少ない。

2004年にAbeらはエダラボンにフリーラジカル消去効果があることを初めて報告した(32)。さらに、Anzaiらはマウスを用いた実験で、エダラボンには放射線の防護効果があることを報告した(16)。本研究の結果から、ST-DNA溶液を対象としたDNA修復が起きない状況においては、エダラボンが照射後のフリーラジカル生成を抑制することが認められた。ただし、細胞レベルでこの効果を明らかにする事は極めて困難である。我々はMOLT-4細胞に対してガンマ線を100 Gy照射し、塩基損傷の修復を防ぐために直ちにアセトンとドライアイス混合液に入れて凍結後、HPLC-ECD法で

8-OHdGの測定を試みたが、相当するピークは得られなかった。これは恐らく塩基損傷の修復が極めて早いためであると考えられる。

DNAのアガロース電気泳動はDNA二本鎖切断を定量的に解析する方法である。我々のST-DNA溶液を対象とした実験結果では、陽子線を同じ線量を照射した場合、lineal energy値が大きくなるとともにDNA二本鎖切断が減少するという結果が示された。Rootらは同じ線量の粒子線を照射した場合LETの値が大きくなるとともにDNA二本鎖切断が減少することを報告しており(33)、これは我々の結果と一致している。つまり、吸収線量が同じである場合、ブラッグピーク近傍では陽子の粒子あたりのエネルギーが高いために生じるDNA損傷の質は重篤となるが、線量あたりの粒子数が減少することから全体の損傷のイベント数は減少するものと考えられる(図-23)。また、エックス線と陽子線プラト一部分を比較してみると、エックス線の方がDNA二本鎖切断の生成は少なく、同じlineal energy値でも陽子線によるDNA二本鎖切断はエックス線より多いことが示唆された(図-22)。なお、本実験では対象としたST-DNAのサイズが均一ではないため、予め電気泳動にてST-DNAのサイズをおおよそ均一にした上で同様の実験を行ったが、照射後の泳動ではDNAのスミアは認められなかった。恐らく、通常のアガロースゲルではなくアルカリDenaturingゲルで泳動を行うべきであったと考えている。

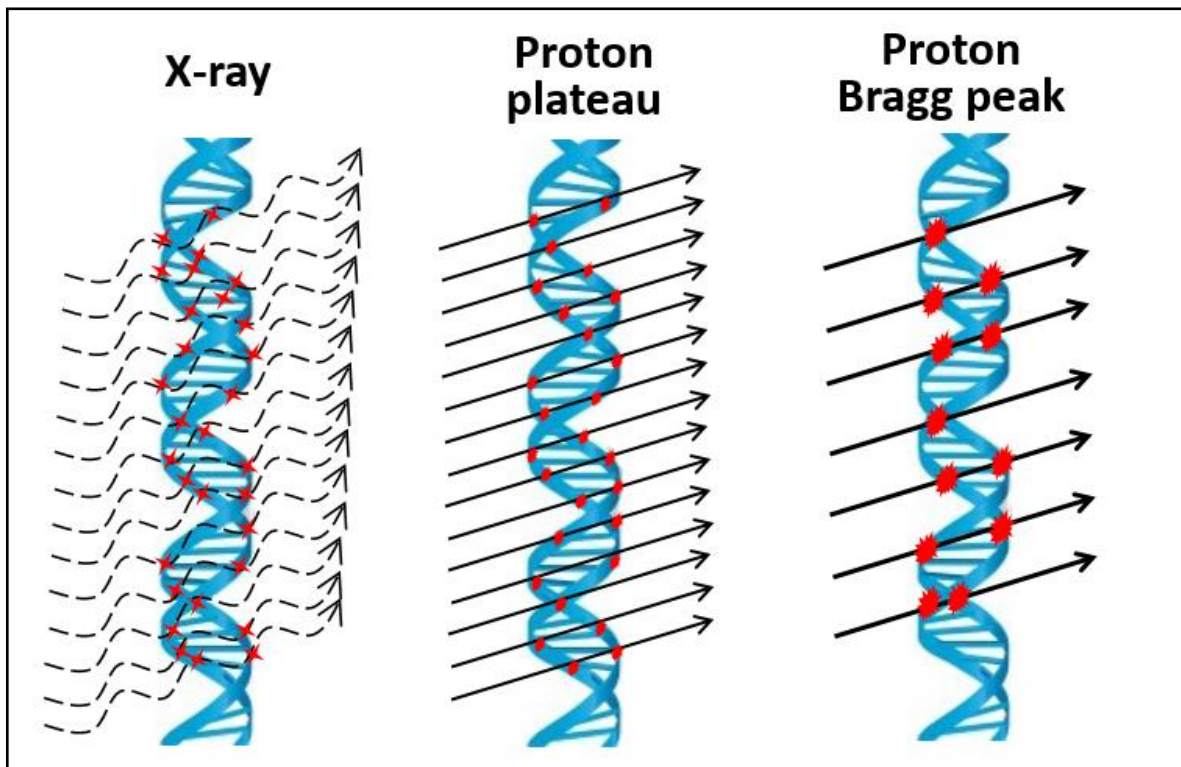


図-23: エックス線, 陽子線プラトー及び陽子線ブラッグピークのDNA損傷模型図.

細胞の核に生じるDNA二本鎖切断は、 γ -H2AXの蛍光免疫染色でフォーカスとして可視化する事が出来る(34、35、36)。本研究では、エックス線、陽子線プラトー、陽子線ブラッグピーク近傍でMOLT-4細胞を照射したが、二本鎖切断を示す γ -H2AXフォーカスの生成数には有意な差は認められなかった。しかし、フリーラジカル消去剤であるエダラボンを照射前に添加したところ、エックス線2 Gy照射の照射後1時間以内のDNA二本鎖切断の数は陽子線照射後より有意に減少した。この結果は、DNA二本鎖切断のメカニズムは、陽子線照射とエックス線では異なることを示唆している。本研究では、 γ -H2AXのフォーカスを解析するために「Focicounter」という画像解析ソフトウェアを利用した(37)。この方法では、2個以上のフォーカスが重なっている場合には1個のフォーカスとカウントされるために、出される結果は実際の数よりも若干少な

くなる可能性がある。しかし、フォーカスを検出するパラメーターが一定に設定されているので、実験者が眼でカウントする場合よりも客観性の高いデータが得られると考えられる。

第8章 総括

陽子線は先進的がん放射線治療法として臨床応用が進んでいるが、陽子線によるDNA損傷のメカニズムについてはまだ十分に解明されていない部分が存在している。エックス線によるDNA損傷では間接作用の割合が約60-70%とされているが、陽子線によるDNA損傷における間接作用についての研究は極めて少ない。Lineal energyは細胞単位の微小領域における電離の空間分布あるいは密度を表す線質を表す単位で、放射線の種類に依らず単位体積に付与するエネルギー分布を指標にする事から、理論的には様々な線質の放射線の生物学的効果を比較する事が可能である。そこで、本研究ではlineal energyに基づいて陽子線とびエックス線によるDNA損傷を評価した。

研究の結果をまとめると、陽子線では、同じ線量を照射した場合、lineal energy値が上昇するとともにDNA塩基損傷とDNA二本鎖切断は減少することが示唆された。さらに、lineal energy値が同じ場合、エックス線は陽子線より塩基損傷を多く生成し、DNA二本鎖切断の生成は少ないことが示された。粒子線治療では、lineal energy値が上昇した場合には生成されるDNA損傷の質が異なることが予想されるが、その詳細な解析は今後の課題である。

参 考 文 献

1. 平岡 眞寛, 小久保 雅樹. 2010. がん放射線療法2010 第一章序説. 篠原出版新社 p3.
2. Wilson RR. 1946. Radiological use of fast protons. *Radiology* 47:487-491.
3. Lawrence JH. 1957. Proton irradiation of the pituitary. *Cancer* 10:795-798.
4. Lawrence JH, Tobias CA, Born JL, Mccombs RK, Roberts JE, Anger HO, Low-beer BV, Huggins CB. 1958. Pituitary irradiation with high-energy proton beams: a preliminary report. *Cancer Research* 18:121-34.
5. Tsunemoto H, Morita S, Ishikawa T, Furukawa S, Kawachi K, Kanai T, Ohara H, Kitagawa T, Inada T. 1985. Proton therapy in Japan. *Radiation Research* 8:235-43.
6. International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU). 1970. Linear Energy Transfer (ICRU Report 16). Bethesda, MD: ICRU Publications.
7. Kase Y, Kanai T, Matsumoto Y, Furusawa Y, Okamoto H, Asaba T, Sakama M, Shinoda H. 2006. Microdosimetric measurements and estimation of human cell survival for heavy-ion beams. *Radiation Research* 166:629-638.
8. International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU).1983. Microdosimetry. (ICRU Report 36). Bethesda, MD: ICRU Publications.

9. 加瀬 優紀. 2006. 組織等価比例計数管を用いた重粒子線ビームの線質測定と生物効果の推定. 東京工業大学大学院 学位論文 p20.
10. Kellerer AM and Rossi HH. 1972. The theory of dual radiation action. Current topics in radiation research quarterly 8:85-158.
11. Von Sonntag C. 1987. The chemical Basis of Radiation Biology. Taylor and Francis, New York.
12. 細井 義夫. 2010. がん放射線療法2010. 第三章放射線生物学 放射線腫瘍学の生物学的基礎. 篠原出版新社 P150.
13. Watanabe T, Yuki S, Egawa M, Nishi H. 1994. Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 268:1597-604.
14. Edaravone Acute Infarction Study Group. 2003. Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. Cerebrovascular Diseases 15:222-9.
15. Watanabe T, Tanaka M, Watanabe K, Takamatsu Y and Tobe A. 2004. Research and Development of the Free Radical Scavenger Edaravone as a Neuroprotectant. The Pharmaceutical Society of Japan 124:99-111.
16. Anzai K, Furuse M, Yoshida A, Matsuyama A, Moritake T, Tsuboi K, Ikota N. 2004. *In vivo* radioprotection of mice by 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (Edaravone; Radicut (R)), a clinical drug. Radiation Research 45:319-323.
17. 佐藤 達彦. 2010. マクロドジメトリとマイクロドシメトリの融合. 日本放射線化学会 89:25-29.

18. Okamoto H, Kanai T, Kase Y, Matsumoto Y, Furusawa Y, Fujita Y, Saitoh H, Itami J, Kohno T. 2011. Relation between Lineal Energy Distribution and Relative Biological Effectiveness for Photon Beams according to the Microdosimetric Kinetic Model. *Radiation Research* 52:75-81.
19. Kawai K, Li YS, Kasai H. 2007. Accurate Measurement of 8-OH-dG and 8-OH-Gua in mouse DNA, urine and serum: effects of X-ray irradiation. *Genes and Environment* 29:107-114.
20. Gerelchuluun A, Hong ZS, Sun L, Suzuki K, Terunuma T, Yasuoka K, Sakae T, Moritake T, Tsuboi K. 2011. Induction of in situ DNA double-strand breaks and apoptosis by 200 MeV protons and 10 MV X-rays in human tumour cell lines. *International Journal of Radiation Biology* 87: 57-70.
21. International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU). 2007. Recording and Reporting Proton-Beam Therapy. (ICRU Report 78). Bethesda, MD: ICRU Publications.
22. Ibanez IL, Bracalente C, Molinari BL, Palmieri MA, Policastro L, Kreiner AJ, Burlon AA, Valda A, Navalesi D, Davidson J, Davidson M, Vázquez M, Ozafrán M, Durán H. 2009. Induction and rejoining of DNA double strand breaks assessed by H2AX phosphorylation in melanoma cells irradiated with proton and lithium beams. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 74:1226-1235.
23. Matsuura T, Egashira Y, Nishio T, Matsumoto Y, Wada M, Koike S, Furusawa Y, Kohno R, Nishioka S, Kameoka S, Tsuchihara K, Kawashima M, Ogino T. 2010. Apparent absence of a proton beam dose rate effect and possible differences in RBE between Bragg peak and plateau. *Medical Physics* 37:5376-5381.

24. Moritake T, Tsuboi K, Anzai K, Ozawa T, Ando K, Nose T. 2003. ESR spin trapping of hydroxyl radicals in aqueous solution irradiated with high-LET carbon-ion beams. *Radiation Research* 159:670-675.
25. Cucinotta FA, Nikjoo H, Goodhead DT. 1998. The effects of alpha rays on the number of particle-track traversals per cell in laboratory and space exposures. *Radiation Research* 150:115-119.
26. Chen J. 2011. Microdosimetric characteristics of proton beams from 50 keV to 200 MeV. *Radiation Protection Dosimetry* 143:436-439.
27. Milligan JR, Aguilera JA, Ward JF. 1993. Variation of Single-Strand Break Yield with Scavenger Concentration for Plasmid DNA Irradiated in Aqueous Solution. *Radiation Research* 133:151-157.
28. Toyokuni S, Sagripanti JL. 1996. Association between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA strand breaks mediated by copper and iron. *Free Radical Biology and Medicine* 20:859-864.
29. Toyokuni S, Sagripanti JL. 1999. Iron chelators modulate the production of DNA strand breaks and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Free Radical Research* 31:123-128.
30. Kasai H, Hayami H, Yamaizumi Z, Saitô H, Nishimura S. 1984. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives *Nucleic Acids Research* 12:2127-2136.
31. Kasai H, Nishimura S. 1984. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Research* 12:2137-2145.
32. Abe S, Kirima K, Tsuchiya K, Okamoto M, Hasegawa T, Houchi H, Yoshizumi M, Tamaki T. 2004. The reaction rate of edaravone

- (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186)) with hydroxyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 52:186-191.
33. Roots R, Holley W, Chatterjee A, Irizarry M, Kraft G. 1990. The formation of strand breaks in DNA after high-LET irradiation: a comparison of data from *in vitro* and cellular systems. *International Journal of Radiation Biology* 58:55-69.
34. Karlsson KH, Stenerlöv B. 2004. Focus formation of DNA repair proteins in normal and repair-deficient cells irradiated with high-LET ions. *Radiation Research* 161:517-527.
35. Kinner A, Wu WQ, Staudt C, Iliakis G. 2008. γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research* 36:5678-5694.
36. Mahrhofer H, Burger S, Oppitz U, Flentje M, Djuzenova CS. 2006. Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 64:573-580.
37. Jucha A, Wegierek-Ciuk A, Koza Z, Lisowska H, Wojcik A, Wojewodzka M, Lankoff A. 2010. Foci Counter: A freely available PC program for quantitative and qualitative analysis of γ -H2AX foci. *Mutation Research* 696:16-20.

謝 辞

本研究を行うにあたり、御指導、ご協力いただきました皆様に深く御礼を申し上げます。

人間総合科学研究科生命システム医学専攻	坪井康次教授
人間総合科学研究科疾患制御医学専攻	盛武敬講師
静岡がんセンター研究所陽子線治療研究部	加瀬優紀先生
人間総合科学研究科疾患制御医学専攻	榮武二教授
日本薬科大学 物理系薬学分野	安西和紀教授
放射線基礎医学研究グループ放射線生物研究室の皆様	
陽子線医学利用センターの皆様	