

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19360040
 研究課題名 (和文) X線マイクロビームを用いた神経細胞の接合・切断技術の開発

研究課題名 (英文) Development of Neural Network Formation Technique
 using X-ray Micro Beams

研究代表者
 飯田 敏行 (IIDA TOSHIYUKI)
 大阪大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：60115988

研究成果の概要：

近年、放射線の利用分野は拡大し、特に放射線治療などの医学・医療分野への重要性が高まっている。そして、この分野における放射線利用技術の高度化を進めるためには、放射線ビーム利用を対象とする先端工学と医学・医療分野等の複合領域における研究や技術開発が不可欠となっている。本研究では、ミクロな視点から、医学・医療分野における放射線利用技術の高度化を図った。具体的には、単一細胞の放射線影響を調べるために、細胞核の大きさのビーム径を有する卓上型 X 線マイクロビーム照射装置を開発した。さらに、培養細胞 PC12 の放射線照射効果を利用して、この X 線マイクロビームを用いた培養細胞の分化誘導技術を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎・応用物理学一般

キーワード：放射線、X 線マイクロビーム、細胞照射

1. 研究開始当初の背景

放射線の利用分野は拡大し、特に放射線治療などの重要性が高まっている。しかし、細胞や生体への放射線影響に関する研究では、まだ解明されていない点（特に低線量領域での影響）が多いことが、多くの研究者によって指摘されている。例えば、放射線影響が照射細胞から非照射細胞に伝達する現象ーバイスタンダー効果や、放射線影響の閾値の有無などの例があげられる。

そこで、従来のマクロな統計的解析に基づいた研究手法ではなく、個々の細胞を対象に

したミクロな観点から放射線照射効果研究に取り組む手法が提案されつつある。ミクロな視点からの研究手法の一つとして、特定の細胞にのみ放射線影響を生じさせることができる放射線マイクロビーム照射装置の利用が考えられ、その開発が進められている。

放射線マイクロビームを用いた細胞照射研究では、生物工学分野だけでなく、放射線工学や加速器工学分野などの物理的な技術要素も必要で、それらの技術の高度化は重要課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、汎用性の高い X 線マイクロビーム照射実験装置を用いて、個々の細胞を対象に放射線影響を誘発する技術を開発した。この研究で対象としたサンプル細胞は PC12 細胞で、ラットの副腎髄質由来の褐色細胞腫で、神経細胞分化のモデルとして知られている。細胞の増殖も容易であり、さらに PC12 細胞に神経成長因子 (NGF) を投与することで、細胞のシグナル伝達分子が活性化され、神経細胞のように樹状突起を伸ばす性質をもっている。また、強い放射線や電磁波の影響によっても神経突起成長が見られることが報告されている。

そこで、X 線マイクロビームを用いて、特定の PC12 細胞について、神経突起の成長を誘発させる技術、さらに、分化した神経細胞を X 線マイクロビームによって細胞死を誘発させる技術を開発した。課題名は、「X 線マイクロビームを用いた神経細胞の接合・切断技術の開発」である。具体的な技術開発の内容は以下の通りである。

- (1) 細胞照射実験用卓上型 X 線マイクロビーム照射装置の開発
- (2) 効率的細胞照射実験のための、細胞位置制御用神経細胞チップの開発
- (3) 単一 PC12 細胞の神経突起成長の X 線マイクロビーム照射下その場観察装置の開発

3. 研究の方法

図 1 に開発した卓上型 X 線マイクロビーム照射装置の概略図を、その写真を図 2 に示す。この卓上型 X 線マイクロビーム照射装置は、堀場製作所製 X 線顕微鏡 XGT-5000 を改造した装置である。新しい X 線マイクロビーム生成部を設け、倒立型顕微鏡が導入された構造になっている。マイクロフォーカス X 線管で発生した X 線は、ガラスキャピラリー (全反射型 X 線導管) によって集光され、X 線マイクロビームとして大気下に取り出される。そして、倒立型顕微鏡の XYZ 電動試料ステージ (位置精度: $1\mu\text{m}$) に設置された細胞試料を正確に X 線マイクロビームで照射することができる。X 線照射室は、生体試料の活性に適した 37°C の温度雰囲気中に保たれている。また、ガラスキャピラリーの出口近傍に取り付けられた高純度シリコン半導体検出器を用いて、照射試料から発生する蛍光 X 線のエネルギー分析を行うことができる。つまり、ターゲット試料の組成 (元素) 分析が可能である。それから、画像取得用の CCD カメラなどが接続される光学系に、レーザー光を導入することで、ターゲット細胞に対してレーザー誘起蛍光観察やレーザー切断を行うことができる。

マイクロフォーカス X 線管の電子ビーム

ターゲット材料には Rh を用いており、真空保持射出窓から得られる X 線ビームのエネルギースペクトルは、Rh-L: 2.7 keV, Rh-K α : 20 keV、そして、Rh-K β : 22 keV の特性 X 線成分と最大 50keV まで連続して広がっている制動 X 線成分である。

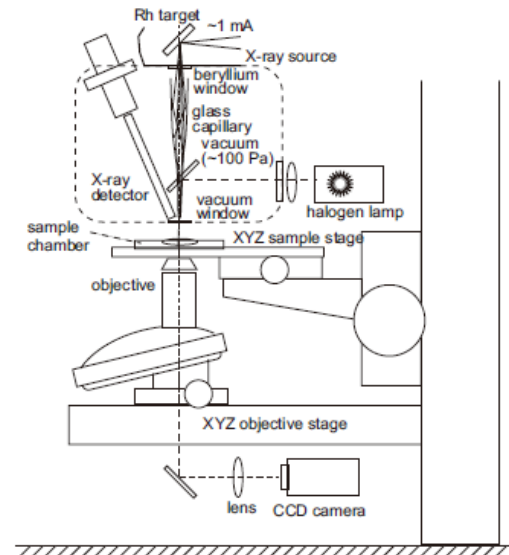


図 1 卓上型 X 線マイクロビーム照射装置



図 2 卓上型 X 線マイクロビーム照射装置の写真

X 線マイクロビームのビーム径は、金を $0.3\mu\text{m}$ 厚で真空蒸着したナイフエッジを精密サンプルステージに取り付け、この金からの特性 X 線の強度の変化から求めた。ガラスキャピラリーの出口から 1mm のところで、最小ビーム径 $12\mu\text{m}$ が得られ、また、X 線ビームの発散角については、Au-M (2.12keV) の蛍光 X 線応答では約 11mrad 、Au-L (9.7keV) の X 線では約 2.5mrad であった。

次に、光子・電子輸送コード EGS4 を用いてターゲット細胞へのエネルギー付与について調べた。シミュレーションモデルでは、ターゲット細胞を直径 $10\mu\text{m}$ の水 (H_2O) 球体で模擬し、水で満たされたガラス基板の底

に置いた。そして、X線マイクロビームで厚さ0.5 mmの水層を通して、ターゲット細胞を照射するとした。本装置における細胞の吸収線量率は、最大0.05 Gy/sと推定された。この吸収線量率の値は、細胞の低線量領域の放射線影響を実験的に調べるのには十分な強度である。

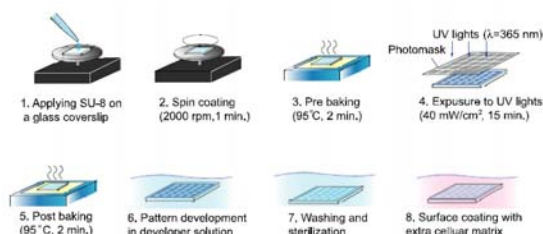


図3 細胞チップの製作工程

図3に細胞位置制御用神経細胞チップの製作工程を示している。細胞チップの基板材料には、PADC（アリルジグリコールカーボネイト）を使用した。PADCは無色透明、非結晶性の熱硬化性プラスチックで、エネルギー荷電粒子検出のための固体飛跡検出器材料でもある。PADC基板上に、高い疎水性を示すフォトリジストSU-8でマイクロパターンを作成し、細胞接着性たんぱく質の自己組織化現象を利用した細胞のマイクロパターンニング培養を可能としている。

図4は細胞チップの写真である、基板状に100 μm間隔で格子状のSU-8パターンが正確に形成されている。細胞培養するためには滅菌処理後、細胞を蒔種し、インキュベータで培養する。

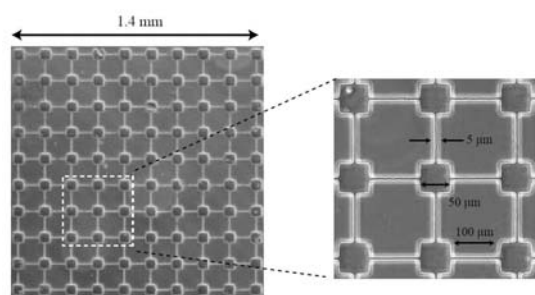


図4 神経細胞チップ

X線マイクロビームで照射したPC12細胞を、照射後インキュベータで培養し、1日間隔で分化の様子を光学顕微鏡で観測した。さらに、細胞核のDNA二本鎖切断を抗体蛍光染色法で調べた。DNA二本鎖切断は向かい合った二本のDNA分子鎖が同時に切断される現象で、細胞死、遺伝的不安定性や突然変異などを誘発する直接的な原因となる。そのため、細胞の放射線効果の基本的な要因の一つに挙げられている。DNA二本鎖切断の検

出には、DNA分子鎖が巻きついているヒストン8量体たんぱく質の一つであるH2AXがDNA二本鎖切断部に集積した修復たんぱく質酵素によってリン酸化されることを利用する。このリン酸化で生成するγ-H2AXを検出する。γ-H2AXは、DNA二本鎖切断部周辺に特異的に生成集積し、抗体を介して染色することで、蛍光顕微鏡観察が可能である。また、γ-H2AXの蛍光強度からDNA二本鎖切断について定量的に評価できることが判っている。

X線マイクロビーム照射実験と併用して、全体に対するガンマ線照射実験(⁶⁰Co, 370 TBq)も実施した。

4. 研究成果

卓上型X線マイクロビーム照射装置を用いた単一細胞の照射実験について述べる。図5は、線量測定用の蛍光ガラス基板上に動物細胞HeLaを培養し、細胞集団中の個々の一細胞の細胞核を照射した実験の様子である。単一細胞照射後に抗体蛍光染色し、DNA損傷を起こしている細胞核を蛍光観察した。

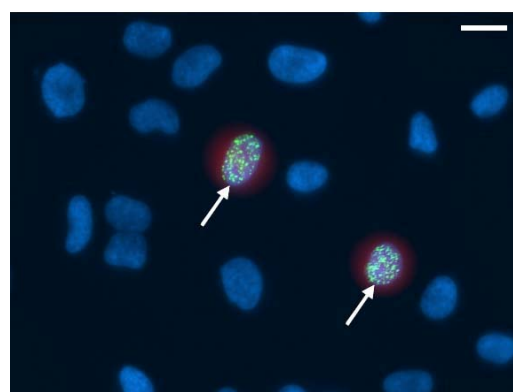
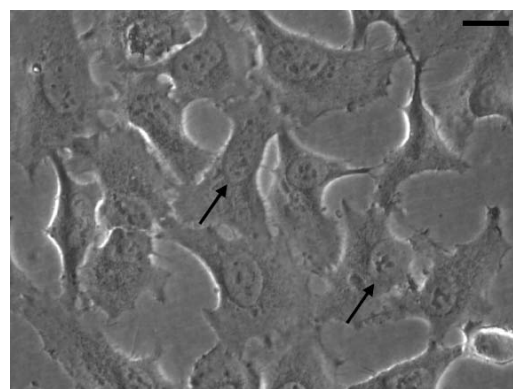


図5 マイクロビーム照射されたHeLa細胞(矢印)の光学観察写真(上)と蛍光観察写真(下)。蛍光観察写真では、細胞核(青)、DNA損傷(緑)、X線マイクロビームのプロファイル(赤)が一致して観察されている。図中のスケールバーは、10 μmである。

図 6 は、 ^{60}Co ガンマ線照射実験で得られた分化した PC12 細胞の様子で、20 Gy 照射した後、5 日後に観察した結果である。NGF を投与した通常の成長に比べて、神経突起が短く、変形した細胞が多く見られる。

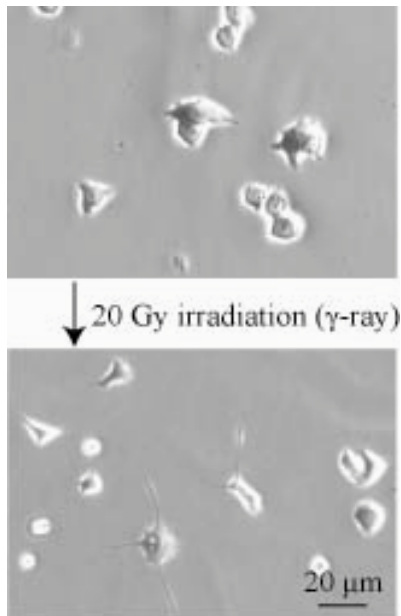


図 6 ガンマ線照射された PC12 細胞

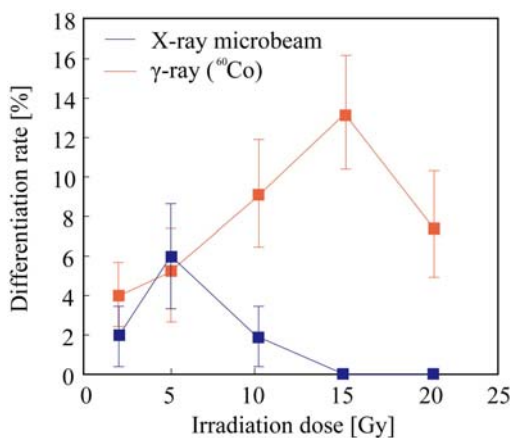


図 7 放射線照射量に対する PC12 細胞の分化誘発率

図 7 は X 線マイクロビームと ^{60}Co ガンマ線照射について、放射線照射量に対する PC12 細胞の分化率を示している。 ^{60}Co ガンマ線照射に比べて X 線マイクロビーム照射では、分化を誘発する効率は低く、分化誘発効率が最大となる線量も異なっていることが示されている。この原因については、十分に考察されていないが、細胞そのものの照射だけでなく、液体培地からのラジカル生成が関係すると考えている。これらの実験結果は X 線マイクロビームと ^{60}Co ガンマ線の照射結果を単純に比較できないことを示している。

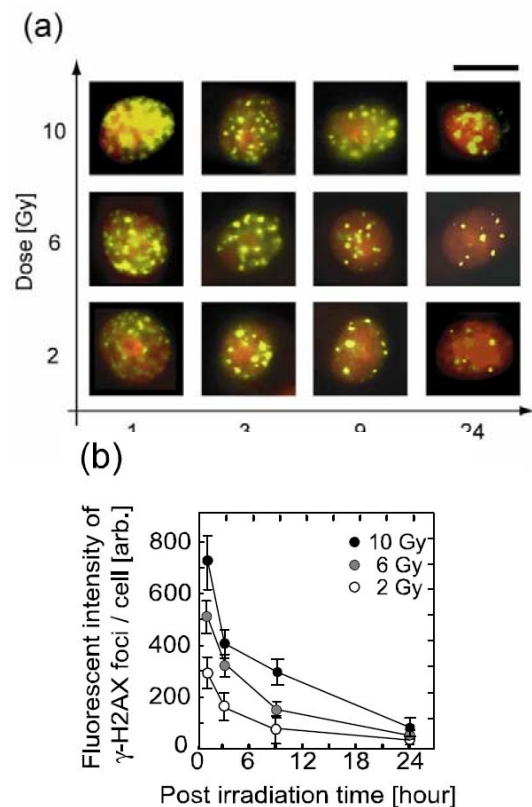


図 8 (a)各線量、照射後の時間において γ -H2AX フォーカスを蛍光観察した様子。スケールバーは 10 μm を示している。(b)各線量における照射後の時間と γ -H2AX フォーカスの蛍光強度の関係。各データは少なくとも 20 細胞について解析した値であり、誤差棒は標準偏差を示している。

図 8 は X 線マイクロビームで照射した PC12 細胞における DNA 二本鎖切断の生成・修復について調べた結果である。ガンマ線照射実験と同様に、生存細胞においては照射 24 時間後までに生成された DNA 二本鎖切断の約 90%は修復されたことが示されている。しかし、全ての DNA 損傷は完全に修復されず、遺伝子の損傷などを生じさせることが判っている。ガンマ線照射においても同様の実験を実施したが、同様の結果を示していた。

図 9 は細胞チップに PC12 細胞を蒔種直後と、24 時間培養後、さらに NGF を投与し、4 日間培養したときの結果である。蒔種 24 時間後では、ほとんどの細胞がマイクロパターンに従って基板と接着していることが確認された。さらに、NGF 投与によって、神経線維を成長させた場合、図 9(b)で示すように、神経突起の成長も細胞外マトリックスのパターンに沿っていることが示されている。今後はさらに、細胞チップを用いた X 線マイクロビームの分化誘導実験を計画している。

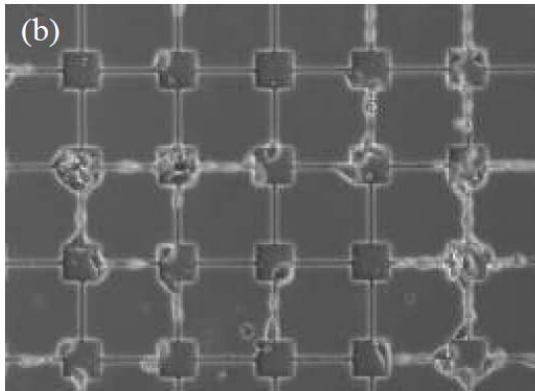
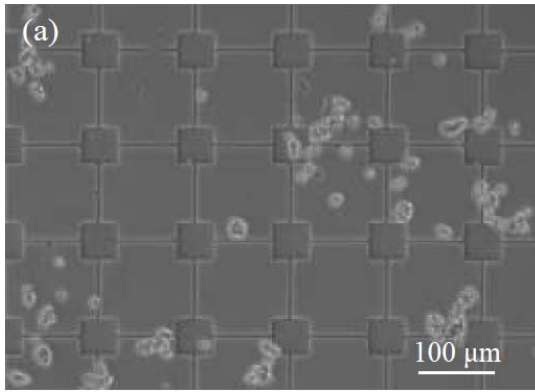


図9 パターニングされたPC12細胞 (a)蒔種直後、
(b) 24時間培養後、NGFを投与し4日間培養

また、細胞チップのパターニングを工夫することで、細胞培養の条件を変えることが可能である。例えば、細胞チップ内の細胞が分裂して増殖する場合、マイクロパターン内のみで増殖するために、個々の世代間における細胞の放射線影響を調べることができる。

最後に本研究課題で得られた成果をまとめる。

- (1) 汎用性の高い卓上型X線マイクロビームを開発し、単一細胞を正確に照射し、その放射線影響について観察する実験装置を開発した。
- (2) X線マイクロビームを用いてPC12細胞を照射し、単一細胞の分化を誘導することに成功した。さらに分化誘導率は同じ線量のガンマ線照射条件に比べて小さいことが示された。
- (3) X線マイクロビーム照射実験の高度化を図るために、細胞外マトリックスがマイクロプリントされた細胞チップを開発し、人工配列された神経細胞網を開発した。

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5件)【すべて査読有】

- ①Y. Aoi, T. Kuchimaru, D. Maki, F. Sato, T. Ikeda, Y. Kato and T. Iida, Radio photo luminescent observation of X-ray microbeam transport in silver activated phosphate glass, Japan Journal of Applied Physics 48, (2009) in press.
- ②T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Aoi, T. Fujita, T. Ikeda, K. Shimizu, Y. Kato and T. Iida, Microchamber arrays for the identification of individual cells exposed to an X-ray microbeam, Radiation and Environmental Biophysics 47, pp. 535-540, (2008).
- ③青位祐輔、口丸高弘、佐藤文信、加藤裕史、飯田敏行、単一細胞照射実験のための小型マイクロX線ビーム装置、日本放射線安全管理学会誌 7、163-167頁 (2008) .
- ④F. Sato, T. Kuchimaru, T. Ikeda, K. Shimizu, Y. Kato, T. Yamamoto T. Iida, X-ray microbeam measurement with radiophotoluminescent glass plate for single cell irradiation, Radiation Measurements 43, pp. 912-916 (2008).
- ⑤T. Kuchimaru, F. Sato, K. Honda, Y. Kato and T. Iida, Three-dimensional track imaging during etching and sequential reconstruction of track structures, Radiation Measurements 43, pp. 125-127 (2008).

〔国際会議発表〕(計3件)

- ①T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Aoi, Y. Kato and T. Iida, X-ray microbeam system for irradiation of living cells, International Conference on Nuclear Micro-probe Technology and Applications July 20-25, 2008, Debrecen, Hungary.
- ②T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Aoi, C. Inagawa, T. Ikeda, Y. Kato and T. Iida, Development and testing of Micro patterned cell culture platform for biological analysis of single cell irradiation, International

Conference on Nuclear Micro-probe
Technology and Applications, July
20-25, 2008, Debrecen, Hungary.

- ③ T.Kuchimaru, F.Sato, T.Fujita,
T.Ikeda, K.Shimizu, Y.Kato and T.Iida,
Radiation effects of X-ray micro beam
irradiation on the function of
neuronal network, International
Congress of Radiation Research
2007. July. 8-12, San Francisco, USA.

[図書] (計1件)

- ①小田啓二、佐藤文信、飯田敏行、児玉靖司、高
淵雅廣, エックス線取扱の基礎, 財団法人
電子科学研究所編集委員会 全 169 頁
(2008) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 敏行 (IIDA TOSHIYUKI)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：60115988

(2) 研究分担者

加藤 裕史 (KATO YUSHI)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：40224547
佐藤 文信 (SATO FUMINOBU)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：40332746

(3) 連携研究者