

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19560836

研究課題名（和文）3次元ミクロンCT照準による3次元細胞照射技術の開発

研究課題名（英文）Development of 3D cell irradiation system using 3D Micron CT

研究代表者

松山 成男(Matsuyama Shigeo)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70219525

研究成果の概要：

細胞を3次元的に形態観察し、イオンビーム照射することのできるシステムを構築するために、照準システムの開発とマイクロビームシステムと3次元ミクロンCTの大幅な高性能化を図った。その結果、マイクロビームシステムは数100ナノメートルの分解能を達成し、数10ミクロンの大きさの細胞を3次元的に鮮明にとらえることが可能となり、照準システムにより照射が可能となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・原子力学

キーワード：ミクロンCT、マイクロビーム、形態観察、細胞照射システム

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子操作等により細胞を直接に操作し、病気の治療を進める試みが行われている。これらの技術は細胞が本質的に持つ性質やウイルスやバクテリアの適合性などにより限界がある。これに対してイオンビームのような高速荷電粒子線は、生体の分子に対する局所的なエネルギー付与によって細胞にダメージを与えることが可能であるため、粒子線をナノレベルまで収束させたナノビームを用いることにより、細胞内の核、ミトコンドリア等の器官のみを照射すれば、細胞レベルでの治療が可能になると考えられる。実

際に高エネルギーの重イオンを加速し、ミクロン径まで収束させ細胞に照射するシングルヒット技術が開発されており、生体組織に対する放射線応答についての研究が進められている。これらの研究においては、細胞を平面的(2次元)に培養し、光学顕微鏡を用いて二次元的に細胞をとらえ、マイクロイオンビームを透過させることにより、細胞単位での照射が行われているのみである。これらの技術を細胞レベルでの照射に適応するためには、三次元的な細胞観察技術とナノレベルでの照射技術を開発する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、生きたままの細胞をミクロンの空間分解能にて3次元的に観察出来る3D-ミクロンCTを中核にし、細胞を3次元的に形態観察し、そのままの状態を細胞を3次元的にイオンビーム照射することのできるシステムの構築を図ることを目的とする。

3. 研究の方法

現有の3D-ミクロンCTでは、形態を観察するシステムに特化しているため、形態観測後に照射することが出来ない。そこで、照射システムを組み込むために形態観測システムの再構築を行い、得られた形態情報を元に照射位置を決定し、そのままの状態を引き続き照射を行うことのできるシステムの構築を行う。細胞の形態観察は、これまでに開発した3DミクロンCTの分解能向上を図る必要があるため、そのために、マイクロビーム強度の増大とミクロンCTシステムの高度化を図った。

4. 研究成果

細胞を3次元的に形態観察し、そのままの状態を細胞をイオンビーム照射することのできるシステムを構築するためには、現有の3DミクロンCTの分解能向上が必要であるが、この為には、まず、マイクロビームシステムの高性能化、強度の増大が必要である。マイクロビーム強度の増大には、加速器の輝度の向上、安定度の向上が必要となる。そのため、高電圧印可時の加速器の各種運転情報を多次元に取り込み解析した。その結果、制御システムに問題があることが判明し、高性能化を図った。その結果、加速器の輝度は従来の2倍以上、電圧安定度は 10^{-3} 台から 10^{-5} 台へと大幅に向上した。また、マイクロビーム形成システム縮小率の向上と寄生磁場の低減を図ることにより、1ミクロンのビーム径においては200pA、数100ナノメートルの分解能においては数10pAの電流を得ることが可能となり、短時間のCT撮影と高分解能の照準が可能となった。また、これらの改造によりビーム電流の安定度が大幅に向上し、画像に生じていたアーチファクトが大幅に低減した。下図1は加速器の安定化によって改善されたシノグラムデータである。本システムではCCDによって投影データを収集しており、その露光インターバルはビームカレント(すなわちX線収量)によって規格化がなされ、角度毎の投影データにおけるコントラストのばらつきを抑制している。しかしながら、ビームカレントの揺らぎが大きい場合、冷却型のCCDを用いてもダークノイズが投影データの画質に与える影響が大きくなり、各角度における投影データのコントラストにばらつきが生じて図1の(a)に示すように、

シノグラムデータに横方向の縞模様アーチファクトが現れてしまうという問題があった。これまでは画像上で補間処理を施すなどの対策をとって、この問題に対処してきたが、加速器の安定化によって図1の(b)に示すように優れた画質のシノグラムデータを収集出来るようになり、補間処理などによってCT画像の空間分解能やコントラストの悪化もふせげるようになった。

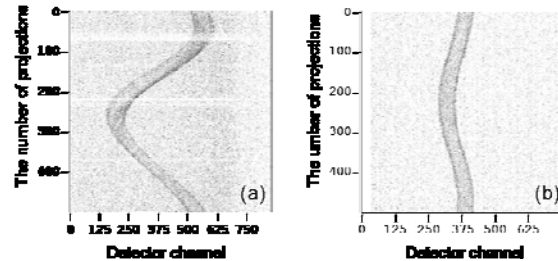


図1. 加速器の安定化とシノグラム画像

細胞照射システムとして、ビームスキャンシステムの高度化を行った。STIMによる形態観察に対応してスキャンパターンを任意に設定することのできるシステムを構築することが出来た。数100ナノメートルのビーム径を達成しているため、高精度でのビーム照射が可能となった。

3D-ミクロンCTシステムにおいては、回転軸精度等が悪い場合、細胞観察が十分でなかったが、回転軸精度を重視し設計製作した高精度ステージを導入することにより改善を図った。回転ステージとして用いられているシャフトはリニア軸受け機構によって保持されており、チャンバー内の真空を保持するために、2つのバイトンOリングを潜って固定される。そのため、シャフトやOリングに傷がつくと、それが軸回転精度の悪化につながる。この問題を解決するために、シャフトが回転軸に対して平行に回転するためのガイドとして新たにスラストベアリングを導入するとともに、シャフトを高真円度(～4 μ m)で表面に高周波焼入れが施されているものに新調し、シャフトに傷がついて回転精度が劣化することを防いだ。

また、コーンビーム拡大投影のジオメトリ最適化を行うことで、取得される投影データの高分解能化を図った。本システムでは拡大投影で試料の投影データを取得する。そのため、その空間分解能に影響を及ぼす第一の因子は拡大率によって変化する投影データのサンプリングピッチであり、第二の因子はX線の焦点が有限のサイズを持つが故に生じる半影である。X線発生点が点と見なせるような理想的なCTシステムの場合、その空間分解能を向上させるためには拡大率を大きくすれば良い。つまり、焦点とX線CCD間距離を大きくし、焦点と試料までの距離を小

さくすれば良い。しかしながら、実際の CT システムでは X 線焦点が有限の大きさを持つために図 2 に示すように投影データに半影が生じて、空間分解能を劣化させる。

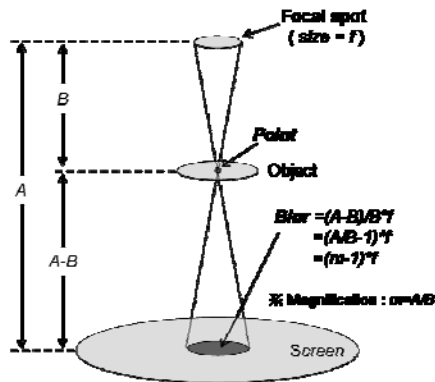


図 2. X 線源サイズの投影像のぼやけ

図 3 には上述したサンプリングピッチと半影の影響を考慮して、各ビーム径における拡大率と推定される投影データの空間分解能の関係をグラフを示す。この図 3 よりビーム径が CCD のピクセルサイズ(=8mm)に比べて十分に小さい場合には、拡大率を出来る限り大きくしたほうが、優れた分解能の投影データを得られることが分かる。

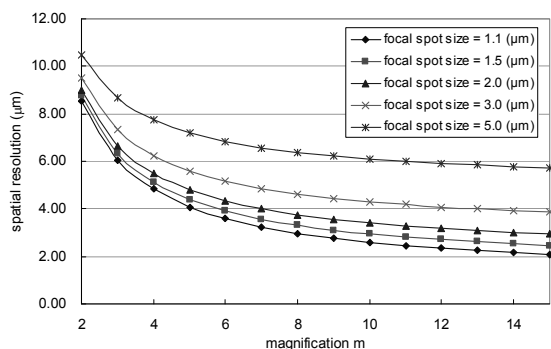


図 3. 拡大率と空間分解能の関係

実際に 3MeV のプロトンビームのビームスポットを $1.1 \times 1.1 \mu\text{m}^2$ とし、拡大率を 12.4 に設定して、細胞試料を封入するために用いているカプトン製のマイクロチューブ(MicroLumen 社 030-I; 内径 $80 \mu\text{m}$ 、厚さ $10 \mu\text{m}$)の CT 撮影を行い、得られたチューブの断層画像データから空間分解能を評価した結果(図 4)、およそ $3.4 \mu\text{m}$ を達成しており、この値は図 3 に示した推定値ともよく一致していることが分かった。

これらの高度化を図ったシステムを用いて、 PbCrO_4 を暴露したヒト上皮細胞のミクロン CT イメージングを行った。クロム化合物は人体にとって極めて毒性の高い物質であり、6 価クロムは細胞内でヒドロキシラジカルを生成し DNA を損傷させると考えら

れているが、詳細なメカニズムはわかっておらず、現在その解明のために細胞内での元素分布を 3 次的に画像化する技術が求められている。

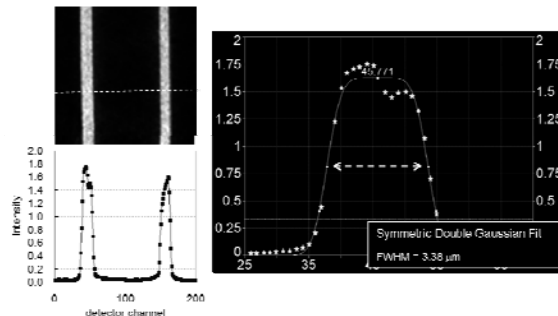


図 4. チューブの断層画像と分解能評価

ヒト上皮細胞を培養後、内径 80 ミクロンのミクロンチューブ内で凍結乾燥し、形態を保存した状態での観測を行った。金属ターゲットにはスキャンジウムを新たに導入することにより、下図 5 に示すとおり、細胞を固定するために用いているチューブと細胞とのコントラストの差がはっきり現れるようになった。図 6 には本システムで構築した CT データをもとに細胞の 3 次元描画をしたものも示しているが、数 10 ミクロンの大きさの細胞の形態をコントラスト良く観察することが可能となり、開発した照準システムにより細胞照射が可能となった。

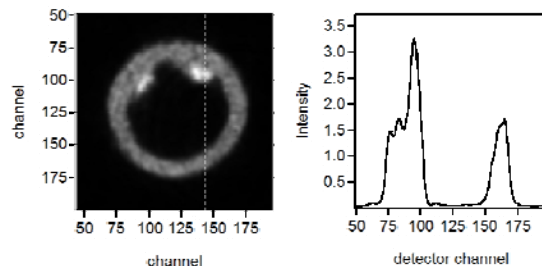


図 5. 細胞の 2 次元断層画像及び X 線吸収プロファイル

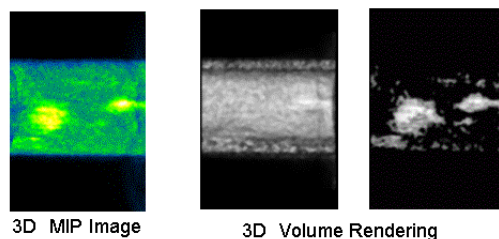


図 6. 細胞の 3 次元イメージング

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 8 件)

- ① S.Matsuyama, K.Ishii, M.Fujisawa, Y. Kawamura, S.Tsuboi, K.Yamanaka, M.Watanabe, Y.Hashimoto, S.Ohkura, M.Fujikawa, T.Nagaya, K.Komatsu, H.Yamazaki, Y.Kikuchi, Upgrading of the 4.5 MV Dynamitron accelerator at Tohoku University for microbeam and nanobeam applications, Nuclear Instrument and Method in Physics Research (掲載決定), 2009、査読有り
- ② S.Matsuyama, K.Ishii, H.Yamazaki, Y.Kikuchi, M.Fujiwara, Y.Kawamura, K.Yamanaka, M.Watanabe, S.Tsuboi, P.Pelicon and M.Zitnik, International Journal of PIXE, vol.18(3&4) 199-208, 2008、査読有り
- ③ S.Ohkura, K.Ishii, S.Matsuyama, H.Yamazaki, A.Terakawa, Y.Kikuchi, M.Fujiwara, Y. Kawamura, S.Tsuboi, K.Yamanaka, M.Watanabe and M.Fujikawa, μ -CT Images of the Egg of Drosophila, International Journal of PIXE, vol.18 (3&4), 167-174, 2008、査読有り
- ④ S. Matsuyama, K. Ishii, H. Yamazaki, Y. Kikuchi, Y. Kawamura, R. Oyama, K. Yamanaka, T. Yamamoto, M. Watanabe, S. Tsuboi and K. Arao, Microbeam analysis of yellow sand dust particles, X-ray Spectrometry, 37, 151-155, 2008、査読有り
- ⑤ R.Oyama, S.Matsuyama, K.Ishii, H.Yamazaki, Y.Kikuchi, K.Inomata, Y.Watanabe, A.Ishizaki, Y.Kawamura, T.Yamaguchi, G.Momose, DEVELOPMENT OF MICROBEAM SCANNING SYSTEM, International Journal of PIXE Vol. 17 (1&2), 23-31, 2007、査読有り
- ⑥ S. Matsuyama, K. Ishii, H. Yamazaki, Y. Kikuchi, K. Inomata, Y. Watanabe, A. Ishizaki, R. Oyama, Y. Kawamura, T. Yamaguchi, G.Momose, M.Nagakura, M.Takahashi, T.Kamiya, Progress and application of the Tohoku microbeam system, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B260, 55-64, 2007、査読有り
- ⑦ Y. Kawamura, K. Ishii, H. Yamazaki, S. Matsuyama, Y.Kikuchi, T.Yamaguchi, Y. Watanabe, R. Oyama, G. Momose, A. Ishizaki, S. Tsuboi, K. Yamanaka and M. Watanabe, *In-vivo* Elemental Analysis by PIXE- μ -CT, International Journal of PIXE, vol.17 (1&2), 41-46, 2007、査読有り
- ⑧ K.Ishii, S. Matsuyama, Y. Watanabe, Y. Kawamura, T. Yamaguchi, R. Oyama, G. Momose, A. Ishizaki, H. Yamazaki and Y. Kikuchi, 3D-imaging using micro-PIXE, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A571, 64-68, 2007、査読有り

[学会発表] (計 7件)

- ①第9回イオンビームによる表面・界面解析特別研究会、2008年12月5-6日、高知(高知)、マイクロイオンビームを用いたエアロゾル粒子の個別粒子分析、松山 成男、石井

慶造、山崎 浩道、菊池 洋平、藤原 充啓、川村 悠、山中 健太郎、渡辺未樹、大倉 暁、藤川 誠、橋本 悠太郎

②第25回PIXEシンポジウム、2008年9月10日~12日、群馬、ヒト肺細胞中の発ガン性クロム化合物の3次元CTイメージング~SAKURAプロジェクト~、松山成男、石井慶造、山崎浩道、菊池洋平、寺川貴樹、藤原充啓、川村悠、山中健太郎、坪井真太郎、渡辺未樹、Richard Ortega、Guillaume Deves、Asuncion Carmona

③11th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Application, 20-25, July 2008, Debrecen, Hungary, Upgrading of the 4.5 MV Dynamitron Accelerator at Tohoku University for Micro- and Nanobeam Application, S. Matsuyama, K. Ishii, M. Fujisawa, T. Nagaya, K. Komatsu, Y. Hashimoto, Y. Kawamura, H. Yamazaki and Y. Kikuchi

④Sixth International Symposium Dedicated to advances in biological, medical, and environmental applications of Proton-Induced X-Ray Emission BioPIXE6, June 16-20, 2008, Richland, Washington, USA, Analysis of Single Aerosol Particles Collected in a Factory and a Laboratory, S. Matsuyama, K. Ishii, H. Yamazaki, Y. Kikuchi, Y. Kawamura, K. Yamanaka, M. Watanabe, S. Tsuboi, P. Primoz and M. Zitnik

⑤Sixth International Symposium Dedicated to advances in biological, medical, and environmental applications of Proton-Induced X-Ray Emission BioPIXE6, June 16-20, 2008, Richland, Washington, USA, Micron-CT For The Egg of the Drosophila, S. Okura, K. Ishii, H. Yamazaki, S. Matsuyama, A. Terakawa, Y. Kikuchi, M. Fujiwara, Y. Kawamura, S. Tsuboi, K. Yamanaka, M. Watanabe, and M. Fujikawa

⑥XI International Conference on Particle Induced X-ray Emission and Its Analytical Application, May 25-29, 2007, Puebla, Mexico, Development of 3D micron-CT using PIXE, Y.Kawamura, K.Ishii, H.Yamazaki, S.Matsuyama, Y.Kikuchi, T.Yamaguchi, Y.Watanabe, R.Oyama, G.Momose and A.Ishizaki

⑦XI International Conference on Particle Induced X-ray Emission and Its Analytical Application, May 25-29, 2007, Puebla Mexico, Micronbeam analysis of yellow sand dust particles, S.Matsuyama, K.Ishii, H.Yamazaki, Y.Kikuchi, Y.Kawamura, R.Oyama, T.Yamamoto, A.Ishizaki and G.Momose

[図書] (計 0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

なし

○取得状況（計 0件）

なし

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 成男 (MATSUYAMA SHIGEO)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70219525

(2) 研究分担者

山崎 浩道 (YAMAZAKI HIROMICHI)

東北大学・サイクロトロン RI センター・

教授

研究者番号：00166654

菊池 洋平 (KIKUCHI YOUHEI)

東北大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：50359535

(3) 連携研究者

なし