

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号： 14301
 研究種目： 基盤研究（B）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22360404
 研究課題名（和文） シングルイオン卓上顕微照射装置の開発とその利用による放射線生物影響の解析
 研究課題名（英文） Development of the desktop type-single ion radiation system and analytical studies of radiation biological effects by the use of this system
 研究代表者
 川本 卓男（KAWAMOTO TAKUO）
 京都大学・放射性同位元素総合センター・教授
 研究者番号： 10231276

研究成果の概要（和文）：高 LET 放射線の低線量被ばく影響を分子・細胞レベルで明らかにするには、特定の細胞や細胞内小器官に対して局所的に放射線を照射し、照射後の損傷シグナル伝達機構や損傷修復過程にかかわる生体分子の挙動を詳細に解析・評価する必要がある。そこで我々は、顕微鏡下で視認しながら任意の標的細胞に対して He イオンを照射することが可能な新たな照射装置の開発が必須であると考え、ミクロンサイズの Po-210 微小線源を装着した卓上型 He イオン顕微照射装置の開発を行った。本装置を実際に用いてヒト培養細胞に対する照射実験を行い、照射後細胞のタイムラプス画像の連続撮像を行ったところ、DNA 損傷修復関連因子の時空間的な挙動変化を観察することに成功した。この結果は本装置の有用性を十分に示すものであった。

研究成果の概要（英文）：To analyze molecular mechanism of the radiation effects at the cellular scale, we have been developing micron size alpha source optimized for single cell-targeted irradiation experiments. Highly purified Po-210 was attached onto the tip of the platinum fine wire and this micro alpha source was manipulated in the vicinity of the targeted single cell. We have performed the single cell-focused irradiation by using the human cultured cells and succeeded in the time-lapse fluorescence imaging to observe DSBs-formation in response to alpha tracks.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2011年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：総合工学・原子力学

キーワード：キーワード：α線、放射線生物影響、照射装置、DNA 修復、飛程

1. 研究開始当初の背景

α線 (He²⁺イオン) のような高 LET 放射線による内部被ばくは、重篤な影響を及ぼすこともあって、その影響を分子・細胞レベルで理

解することが求められている。しかしながら、α線による DNA 二本鎖切断や細胞死の過程を細胞一個単位で観察することは非常に困難であった。

本研究課題開始以前、低 LET 放射線である X 線照射については、顕微鏡下でのマイクロ X 線照射系が既に構築されており、細胞単位の生体影響解析が進められていた。一方、高 LET 放射線の照射影響解析分野では、加速器によるイオンビームを細胞一つのスケールまで矮小化することに成功しており、細胞単位での照射実験が行われていた。しかしながら加速器を利用するには、高度な専門知識と大型の照射施設を要するため、多くの粒子線生体影響分野の研究者にとって敷居が高いのが現状であった。

2. 研究の目的

我々は、加速器を要さず、より簡便に細胞照射が行うことが可能な卓上型の He イオン照射装置を全く新規に開発することを第一の目標とした。次いで、この装置を実際に用いて任意の標的細胞に対する照射実験を行い、He イオン照射後の細胞内における分子レベルでの照射影響を時空間的に観察することを第二の目的とした。

この卓上型照射装置の構築に際しては、汎用性を考慮し、一般的な生化学系研究者に馴染みのある装置や部品類を使用することを要件とした。

本装置では、顕微鏡下で細胞に照準を定めて α 線を照射し、それと同時に照射細胞内の影響解析を行う。そこで本装置の満たすべき性能として、一個の He イオンを、標的とする一個のヒト培養細胞に対して局所照射できることを目標とした。また、He イオンの照射直後から、照射によって生じた DNA 二本鎖切断が修復される様子などをリアルタイムで時空間的に観察することができるよう、蛍光観察系の構築も同時に進めることとした。

3. 研究の方法

(1) 高純度 Po-210 溶液の精製

α 線放出核種である Po-210 を、陰イオン交換樹脂を充填したマイクロレジンカラムを用いて Pb-210 溶液より分離生成した。

Pb-210 は、Bi-210 を介して Po-210 へと壊変する。各核種の半減期は、Pb-210 が 22 年、Bi-210 が 5 日、Po-210 が 138 日である。このため、Pb-210 を保持していれば、ミルキング操作により幾度も Po-210 を取り出すことが可能である。

Po-210 は、 α 崩壊により約 5.3MeV および約 4.5MeV の α 線を放出し、安定核種 Pb-206 へと壊変する (図 1)。5.3MeV α 線と 4.5MeV α 線の放出比は 99.999:0.001 であり、4.5MeV α 線を放出した後は 803keV の γ 線を放出して安定核種となる。したがって、Po-210 より放出される放射線の殆どは 5.3MeV α 線である。

尚、Po-210 分離精製の際、崩壊時にわずかに

に放出される 803keV γ 線を指標とし、これを Ge 半導体式検出器を用いて測定することで精製度を検定した。

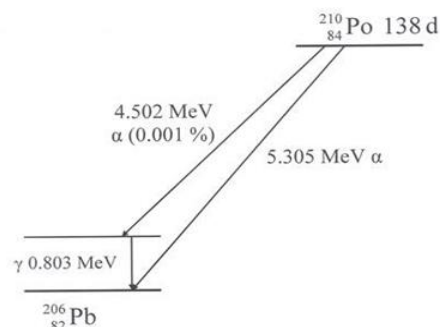


図 1 : Po-210 の壊変図式

(2) Po-210 微小 α 線源の作成、および卓上型 He イオン顕微照射装置の構築

得られた高純度の Po-210 を直径 $5\mu\text{m}$ の白金 (Pt) 芯線の先端部分に電着した。電着後、微小線源からのイオン放出率を、 α 線エネルギー spektrometer を用いて測定した。

次いで、このミクロンサイズの Po-210 α 線源をマイクロマニピュレーターに装着した。細胞照射時は、この線源を顕微鏡下で視認しながら培養液中で照射対象に近接させ、微小線源から放出される He イオン (5.3MeV) を標的に対して照射した (図 2)。

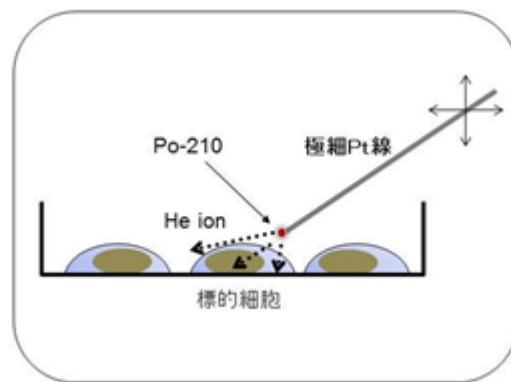


図 2 : 卓上型 He イオン顕微照射装置における He イオン細胞照射イメージ

Po-210 微小 α 線源を顕微鏡下、液体培地中で細胞等に近接させ照射を行った。

(3) 卓上型 He イオン顕微照射装置を用いた細胞照射実験、および照射後影響解析

卓上型 He イオン顕微照射装置下で、任意の一個の接着型ヒト培養細胞 (U2OS 株) に対する He イオン照射実験を行った。標的細胞として、DNA 二本鎖切断修復関連因子と蛍光蛋白質との融合蛋白質が発現するよう形質改変した細胞株を二種類用意した (MDC-1 と DsRED2 との融合タンパク質を発現する細胞

株と、RPA-70 と GFP との融合タンパク質を発現する細胞株)。MDC-1 と RPA-70 は、ともに DNA 上の二本鎖切断部位に集積し、損傷箇所の修復に関与する蛋白質である。これらについては、DNA 損傷箇所に集積するまでに要する時間が各々異なることが知られている。

細胞照射実験を行う際には、細胞照射前に固形粒子線検出樹脂 CR-39 を用いて微小線源から放出されるイオン数および照射野の範囲を評価。この結果を元に照射時間を設定し、標的細胞に対して 1 ～ 数イオンの照射を行うこととした。

照射後の細胞核内における DNA 二本鎖切断修復関連因子の挙動変化の様子は、蛍光蛋白質の集積 (foci 形成) を連続撮影することで追跡観察した。尚、観察系には高冷却 CCD カメラを装備した蛍光顕微鏡を用い、照射細胞の蛍光像をタイムラプス撮影した。

4. 研究成果

(1) 高純度 Po-210 溶液の精製

Po-210 を、マイクロレジンカラムを用い Pb-210 より分離生成した。図 3 A は分離前の Pb-210 原液、図 3 B は分離後の Po-210 溶液より放出された γ 線エネルギースペクトルである。分離後は、Po-210 よりわずかに放出される 803keV γ 線のピークのみが見られ、極めて高純度の Po-210 溶液が得られたことがわかった。

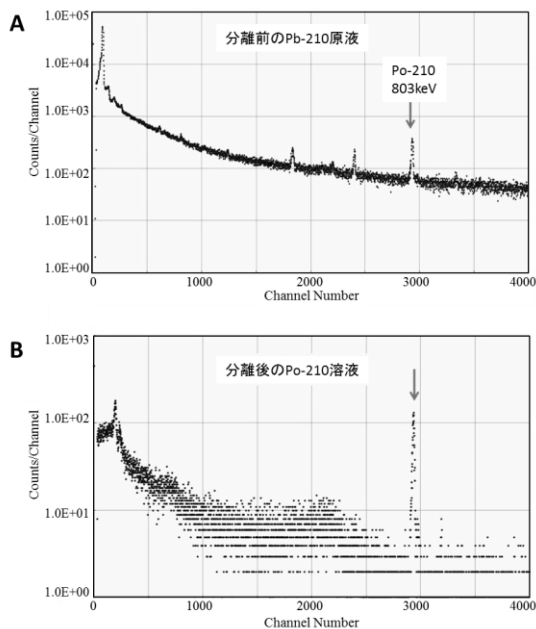


図 3 : カラム精製前後の溶液から放出された γ 線エネルギースペクトル

A 精製前の Pb-210 原液の γ 線エネルギースペクトル

B カラム精製後の Po-210 画分の γ 線エネルギースペクトル 矢印は Po-210 から放出される 803keV γ 線のピーク

(2) Po-210 微小 α 線源の作成

カラム精製により得られた高純度の Po-210 を直径 $5 \mu\text{m}$ の白金 (Pt) 芯線先端に電着し、これより放出される α 線 (He イオン) のエネルギースペクトル、および単位時間あたりに放出されるイオン数を真空中で測定した (図 4)。5.3MeV 付近にのみピークを有するミクロンサイズの微小 α 線源が完成した。

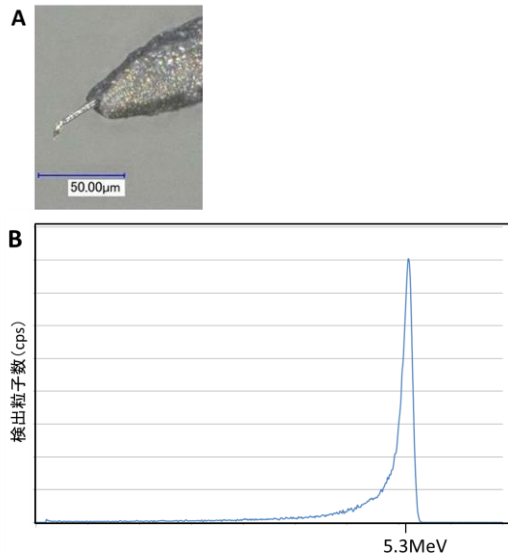


図 4 : Po-210 微小 α 線源

A Po-210 微小 α 線源の顕微鏡写真

直径 $5 \mu\text{m}$ 白金線の先端部分にのみ Po-210 を電着した。

B 真空中で微小線源から放出された α 線のエネルギースペクトル

(3) 卓上型 He イオン顕微照射装置を用いた細胞照射実験、および照射後影響解析

マイクロマニピュレーターに装着した微小 α 線源を、ヒト細胞の培養に用いる液体培地中で CR-39 表面に接触させたところ、エッチング処理後に検出されたエッチピットは全て線源を中心として直径 $80 \mu\text{m}$ の範囲内であった。これは、水中における Po-210 α 線飛程の推定値と一致する。このことから、液体培地中で微小 α 線源を用いて照射すれば細胞スケールまで、照射範囲を狭められる可能性がありことがわかったので、実際に接着型のヒト培養細胞 (U2OS 株) に対するイオン照射実験を行った。

細胞照射実験の際には、微小線源と細胞上面との距離を約 $10 \mu\text{m}$ とし、照射時間 (線源を細胞に近接させる時間) は He イオンが細胞核あたり 1 ～ 数個ヒットすると想定される時間とした。

照射後の標的細胞の細胞核内における MDC1-DsRed2 および RPA70-GFP の foci 形成過程の様子を、タイムラプス画像を撮影するこ

とで継続観察したところ、MDC1-DsRed2 は照射後数分後から foci が現れ始め、30 分後には明瞭な foci 形成が確認された (図 5)。一方、RPA70-GFP では、foci 形成開始に 30 分から 1 時間を要したが、一旦形成された foci はほぼ同じ形状と大きさのまま数時間にわたって維持されていた (図 6)。

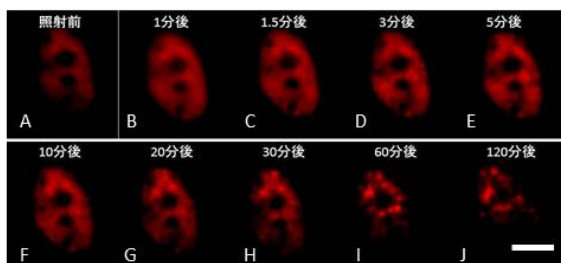


図 5 : MDC1-DsRed2 細胞株における照射後のタイムラプス画像

(A) 照射前の細胞核の蛍光像 (B) 照射終了から 1 分経過した細胞核の蛍光像 以下 (C) 1.5 (D) 3 (E) 5 (F) 10 (G) 20 (H) 30 (I) 60 (J) 120 分経過後の細胞核の蛍光像 (J) 右下の白線は、 $10 \mu\text{m}$

照射 3 分後 (D) か見られる foci の凝集は、照射 30 分後後 (H) に明確な foci となった。

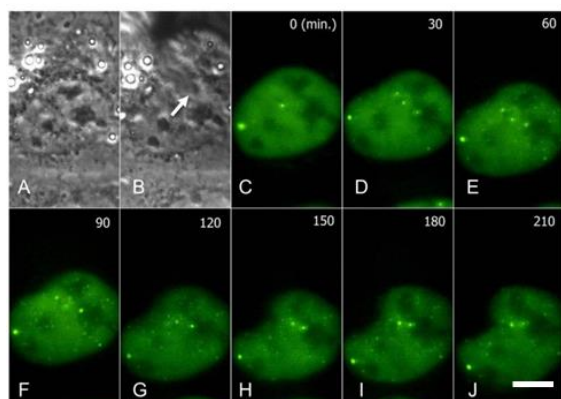


図 6 : RPA70-GFP 細胞株における照射後のタイムラプス画像

(A, B) 位相差像 (C-J) タイムラプス蛍光像

(A) 照射前の細胞核 (B) 照射中の細胞核 白矢印は微小線源の先端部の位置を示している。

(C) 照射直後の細胞核の蛍光像 (D) 照射終了から 30 分経過した細胞核の蛍光像 以下 (E) 60 (F) 90 (G) 120 (H) 150 (I) 180 (J) 210 分経過後の細胞核の蛍光像 (J) 右下の白線は $10 \mu\text{m}$

照射 30 分後 (D) に、照射直後 (C) では見られなかった新しい foci の出現が観察された。

これらの結果は、これまでに加速器等で行われてきたイオンビーム照射の結果と良く一致しており、開発した本装置が一細胞照射および照射後影響観察に十分な性能を有することを示すものである。

この様な、微小な RI 線源を用いて任意の一細胞照射に対してイオン照射を行うことが可能であることを示したのは、本成果が国内外発の事例である。

本装置は、高純度の α 線源さえ用意することができれば、比較的安価に構築することができ、またシステム構成に用いた装置類は生化学系研究者にとって馴染みの深いものばかりである。これらはシングルイオン卓上顕微照射装置の大きな長所である。

汎用小型であることや、細胞装置のハンドリングが簡便であるという点は、迅速に照射実験を繰り返す必要がある細胞照射実験を行う上で加速器よりも十分に優れていると言える。

一方で、本装置の現時点における限界としては RI を線源としている都合上、照射イオン数の調節と照射方向の厳密な制御 (コリメーション) が困難であることがあげられる。これらの問題点については、今後照射系やイオン検出系の改良あるいは新規開発を行うことで克服可能であると考えている。本装置をさらに改善して行く際の今後の課題である。

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)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 角山雄一、笹健太郎、加藤晃弘、川本卓男、戸崎充男、五十棲泰人 「Po-210 マイクロ α 線源を用いた一細胞照射影響観察系の開発」日本放射線安全管理学会第 11 回学術大会 平成 24 年 12 月 4 日 (大阪)
- ② 角山雄一、加藤晃弘、村上順一、笹健太郎、川本卓男、戸崎充男、五十棲泰人 「 α 線銃を用いた一細胞ライブイメージングシステムの開発」日本放射線安全管理学会第 10 回学術大会 平成 23 年 12 月 2 日 (横浜)
- ③ 角山雄一、村上順一、川本卓男、戸崎充男 「Po-210 α 線を用いた細胞照射影響観察システムの開発」第 48 回アイソトープ・放射線研究発表会 平成 23 年 7 月 7 日 (東京)
- ④ 村上順一、角山雄一、大迫清子、戸崎充男、川本卓男 「Po-210 α 線照射細胞における DNA 損傷修復関連蛋白質の挙動変化の観察」第 48 回アイソトープ・放射線研究発表会 平成 23 年 7 月 7, 8 日 (東京)
- ⑤ 川本卓男 「シングルイオン卓上顕微照射装置の開発」極限粒子ビームシンポジウム 平成 23 年 6 月 30 日 (埼玉)
- ⑥ 角山雄一、川本卓男、村上純一、大迫清子、戸崎充男、五十棲泰人 「細胞レベル

の放射線影響を調べるための α 線銃の開発
発] 日本放射線安全管理学会第9回学術
大会 平成22年12月1日(広島)

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/euroouno/ytsunoyamalabo.26>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川本 卓男 (KAWAMOTO TAKUO)

京都大学・放射性同位元素総合センター・
教授

研究者番号：10231276

(2) 研究分担者

戸崎 充男 (TOSAKI MITSUO)

京都大学・放射性同位元素総合センター・
准教授

研究者番号：70207570

角山 雄一 (TSUNOYAMA YUICHI)

京都大学・放射性同位元素総合センター・
助教

研究者番号：90314260

大澤 大輔 (OHSAWA DAISUKE)

京都大学・放射性同位元素総合センター・
助教

研究者番号：90324681

高屋 成利 (TAKAYA SHIGETOSHI)

京都大学・放射性同位元素総合センター・
助教

研究者番号：70444495

(3) 連携研究者

五十棲 泰人 (ISOZUMI YASUTO)

京都大学・放射性同位元素総合センター・
名誉教授

研究者番号：50027603

加藤 隆久 (KATO TAKAHISA)

京都大学・放射性同位元素総合センター・
再雇用職員

研究者番号：50152715