

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05284

研究課題名(和文) Po-210線源による線マイクロ照射制御検出システムの開発とその応用

研究課題名(英文) Development and application of alpha-ray micro-irradiation control detection system using Po-210 radiation source

研究代表者

戸崎 充男 (Tosaki, Mitsuo)

京都大学・環境安全保健機構・准教授

研究者番号：70207570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、線放出核種を線源としたシングルイオン照射法と2次元照射位置検出法を確立した。これらを光学顕微鏡への組み込み、光学観察と照射制御を両立させるシングルイオン細胞照射実験用装置の開発を行った。

イオン照射にマイクロサイズの線源(Po-210)を用いて、細胞サイズに照射可能な線源を開発した。ビデオ素子を改造して μm の分解能で2次元の照射位置と照射イオン個数を撮像制御をし、また、その照射イオンのエネルギーを決定(測定)できるシステムを開発した。

このシステムを用いて、照射後のHeLa細胞のDNA損傷・修復についてH2AX検出法による実験手法の整備を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年生物学の放射線影響の研究は、外見的身体的影響から細胞分子レベルの影響へと移ってきた。その中で加速器によるイオンビームを用いた新規な細胞照射実験研究に注目が集まり、加速器の生物学分野への新しい研究手法の開拓が世界中で試されている。

本研究の学術的問いは、加速器などの大型装置のイオンビームでなく、分子生物研究者は、通常行なっている実験手法の延長としての実験環境(マイクロ照射制御システム)を求めている、という点である。この問いは、分子生物学の研究者の現状に即した研究ツールの要求であり、本研究では、シングルイオン照射を探針とした細胞の生命機構の解明に応用するための装置の開発をした。

研究成果の概要(英文)： We have established a single-ion irradiation method and a two-dimensional irradiation position detection method using α -ray emitting nuclides as a radiation source. By incorporating these into an optical microscope, we have developed a single-ion cell irradiation experimental device that achieves both optical observation, and irradiation control and ion image detection.

We have developed a radioactive source that can irradiate cell using a micro-sized α -ray source (Po-210) for ion irradiation. We have developed a system that can control the two-dimensional irradiation position with a resolution of μm and the number of irradiation ions by modifying the image sensor, and can measure the energy of the irradiation ions.

Using this system, we are developing an experimental method using the H2AX detection method for DNA damage and repair of HeLa cells after irradiation.

研究分野：放射線物理、放射線計測、原子核物理

キーワード：シングルイオン 細胞照射 イメージセンサ coms素子 Heイオン 2次元位置検出 顕微鏡 Po-210

1. 研究開始当初の背景

近年生物学の放射線影響の研究は、外見的な身体的影響から細胞分子レベルの影響へと移ってきた。その中で加速器によるイオンビームを用いた新規な細胞照射実験研究に注目が集まり、加速器の生物学分野への新しい研究手法の開拓が世界中で試されている。しかし、これら加速器の実験手法は、通常の生物系研究者が簡単に独自の研究推進に転用できるものではない。また加速器は高価な装置設備であるだけでなく、生物系研究者にとって基礎研究を広げていく汎用装置として使いこなすのは難しい装置である。

本研究の学術的問いは、加速器などの大型装置のイオンビームでなく、分子生物研究者は、通常行なっている実験手法の延長としての実験環境(マイクロ照射制御システム)を求めている、という点である。この問いは、分子生物学の研究者の現状に即した研究ツールの要求であり、本研究では、研究者のアイディアに柔軟に対応し活用できる装置として、シングルイオン照射を探针とした細胞の生命機構の解明に応用するための「Po-210 線源によるマイクロ照射制御検出システム」の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、 α 線放出核種を線源としたシングルイオン照射法と2次元照射位置検出法を確立する。さらに、これらを光学顕微鏡への組み込み、光学観察と照射制御を両立させるシングルイオン細胞照射の in situ 実験用装置の開発を目的とする。

具体的には、イオン照射にマイクロサイズの α 線源(Po-210)を用いて、細胞サイズの範囲に照射可能な線源を開発する。また、ビデオ素子を改造して μm の分解能で2次元の照射位置と照射イオン個数を撮像制御をする。さらにその照射イオンのエネルギーを決定(測定)できるシステムを開発する。

サンプル(細胞)を光学顕微鏡で観察し、シングルイオン照射の照射位置の発光スポットをリアルタイムに撮像し、細胞照射の動画撮影が可能な実験装置とする。シングルイオンの2次元の照射位置と照射イオン個数を観察しながら制御でき、その後の細胞の観測が可能な従来の光学顕微鏡に照射検出制御機能を付加した装置の開発をする。

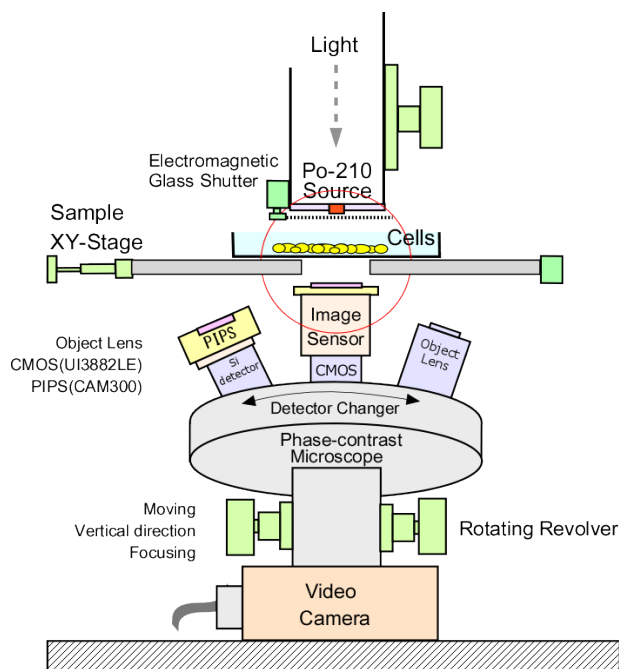


図-1 照射制御検出システムの概念図

3. 研究の方法

開発した照射システムの全体概念図を図-1に示す。この装置は、既存(オリンパス IX70)の倒立・蛍光顕微鏡の光学機能を利用して目的に併せて最適化した。 α 線源からのシングルイオンをサンプル(細胞)に照射・制御・検出する機能を開発し、分子生物学の研究者が使い慣れた光学顕微鏡の実験環境の延長で、細胞照射実験研究が推進できるシステムを、現場の声を聞きながら設計構築した。特に、この開発にあたり念頭においたのは、顕微鏡による光学システムを活かしたシングル He イオン照射システムとの両立を考慮した。光学的機構・機能を損なわないように、新たな改造の材料として観測光を妨げない工夫をした。また、大気中での実験を想定して、照射イオンのエネルギー損失を抑えるために薄膜マイラーを活用して装置を設計した。以下に、主な機構の構造及びその特徴について説明する。

(1) 線源作成及び形状

He シングルイオン照射線源として、放射性核種 Po-210 を用いた。Po-210 は、5.305 MeV の α 線を放出(ほぼ 100%)し、半減期は 138.37 日である。Po-210 は、Pb-210 から分離精製したあと、石英ガラス(1mm 厚)板中央に付けた ϕ 0.1mm の窪みに Po-210 を注入し乾固してガラス板上に点線源を作成した(図-2の中央の黒丸)。さらに、この線源を石英ガラス(1mm 厚)板に開けた ϕ 0.2mm 貫通穴でコリメートした(図-2の黒丸の外円)。この Po-210 線源の支持材とコリメータをガラス材とすることで、顕微鏡の観測光を遮ることがなく、かつ被写界深度で焦点をぼらすこと

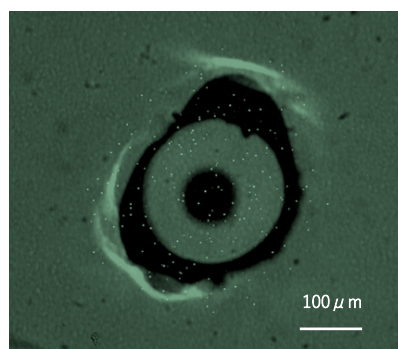


図-2 Po-210 点線源とコリメータ

で線源と細胞の位置合わせをすることができる。図-2は、ガラス板上に組み込んだPo-210とそれにガラス製のコレリメータを重ねた状態の線源セットの写真である。

(2) 照射制御(シャッター)機構

コレリメータ付きのPo-210線源を、マイラー(1.5 μm)でカバーして照明塔端に取り付けた(図-3)。シングルイオン(α 線)の照射個数の制御のために、遮蔽に十分な厚み(0.1mm)のガラス板($\phi 15\text{mm}$)を使用したシャッターを線源の直下、サンプル(細胞)との間に設置した。このガラス製シャッターは、He照射制御するために、遠隔操作で照射onとoffの切り替え用として電磁駆動装置に取り付けた。線源、コレリメータ、シャッターをガラス製にすることで、顕微鏡の光学機能(透過照明)を損なわず、線源の位置、試料の位置等を照射と同じ条件で軸合わせ(焦点合わせ)をすることができる。



図-3 Po-210線源とシャッター

(3) 検出器(照射個数及びエネルギー測定)

マイクロ α 線源、検出器(エネルギー、照射個数)および制御機構を光学顕微鏡に組み込み改造し、照射検出制御の機構の最適化を行った。検出器として3種類の観測機能を備えた：①通常の蛍光顕微鏡としての対物レンズによる観測機能、②イメージセンサーによる照射位置の検出(撮像)、③照射Heのエネルギー測定機能。

対物レンズは5, 10, 20, 40倍のレンズ、イメージセンサー素子cmos(裏側入射型:Sony IMX178、ピクセルサイズ2.4 μm) (図-4)、エネルギー測定はSi半導体検出器(PIPS:CAM300)を用いた(図-5)。これらの検出器(機能)を顕微鏡の回転盤の空席対物レンズの位置に設置し、光軸を合わせ目的ごとに検出器の選択を可能とした。



図-4 イメージセンサー(回転盤上)

照射2次元位置の検出用のイメージセンサー(cmos:IMX178)のカバーガラス等を除去して、 α 線を直接撮像素子に入射させ検出できる構造に改造した。照射イオンの位置を、輝度スポットの位置分解能1 μm 以下で2次元撮像することができる。2次元の撮像範囲(約7.4mm x 5mm:3088x2076ピクセル)でシングルイオン照射位置が検出できる。また、このイメージ素子では静止画と動画の撮像・記録が可能で、露光時間も120秒まで設定できる。リアルタイムの撮像(モニター)に加え、細胞照射実験用に最適化した光学・照射検出機能を有する総合顕微鏡システムを完成した。

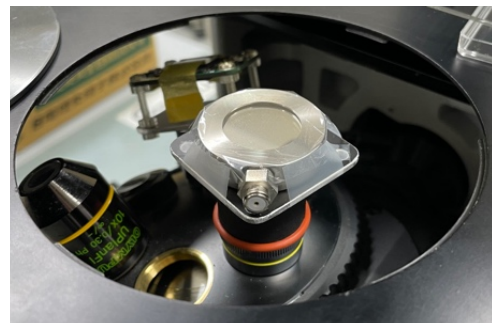


図-5 半導体Si検出器(回転盤上)

当初、システムとして構築する際、連動して機能するシステムの設計をしていた。既存の顕微鏡の機構に依存して、主要部品を組み込もうとした。最適化を進めるうちに難点が多々見つかった。例えば、観察系の軸と測定系の軸合わせ、設置及び可動スペース、あるいは照射撮像と光学的観察の手順の問題(複雑で実用でない)があり、既存の顕微鏡の設計に沿って構築することを断念した。個々の主要な部品(線源部、試料台、検出器、顕微鏡)をコンパクトで独立に開発し、個々を調整できるベンチ上に組み込む設計で最適化した。具体的には、既存の顕微鏡で残す機能を明確にし、開発ベンチ(図-6参照)を活用し、レールおよび回転軸に個々の部品を設置し、かつ個々の位置はXYZステージで独立に調整できるようにした。この開発ベンチにより、個々の機能の最適化や改造がスムーズになり、また操作性も実用的な設計ができるようになった。

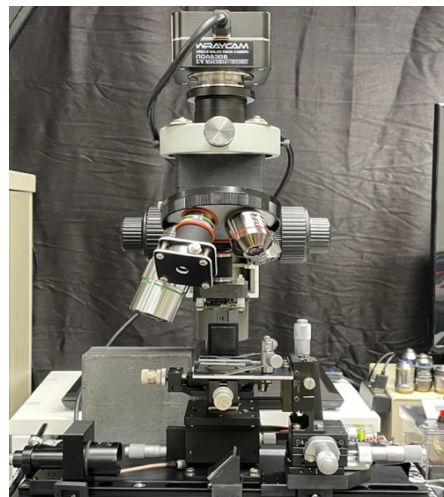


図-6 主な機能の開発ベンチ

工夫をした主な箇所は、光学的観測と照射制御測定のコEXISTENCEで、実際には、光(観測光路)を遮断する構造を避けた。例えば、Po-210 線源は)は ガラス板にドリルでφ0.1-0.3 mm の窪みを作り埋め込み、点線源のコリメータもガラス板 (1mm 厚) に穴 (φ0.1-0.2mm) を開けたものを組み重ねた。さらに、シャッター板(遠隔操作)もガラス板(0.1mm 厚)に改造した。これによりシステム全系を照射状態と同じ状態で観測が出来る。これら照射系と観測系の両立はこの装置のメリットである。既存の顕微鏡対物レンズレボルバーに長作動対物レンズを取り付け、作動距離を20-30mm 取ることが出来るように改良した。このスペースが確保できることで、照射時の撮像(エネルギー測定)装置と細胞観測装置の共存が可能で、実験中の観測測定条件を崩すことなく、装置のIn/Outで切り替えが可能となった。この開発テストベンチ(図-6)は、機能開発だけでなく、生物研究者のいろいろなアイデア、研究目的を試すのに最適であるだけでなく、柔軟な対応が可能な装置として有効であることがわかった。今後は開発だけでなく研究用に使える装置として活用したい。最終的には、各基本機能を完成させ、図-2~6で示した装置を既存の倒立共焦点蛍光顕微鏡(IX70)に組み込み最適化して、図-1のシステムを完成させた。

4. 研究成果

本システムの特徴は光学的観測と照射制御測定のお互いの機能を両立共存することができる。具体的には、光(観測光路)を遮断する構造をガラス仕立てにした事、またエネルギー損失が非常に高いα線を大気中で細胞に照射し検出するため、その回避策(構造、材質等)を駆使して当初の目的を達成するシステムが出来た。

このシステムの検証実験として、HeLa 人細胞の照射実験を行った。その時の実験配置条件を図-7に示す。Po-210 線源と細胞及びイメージセンサーは大気中にセットされ、それぞれの分離(間)は、極薄のマイラー(1.5μm 厚)で仕切られている。

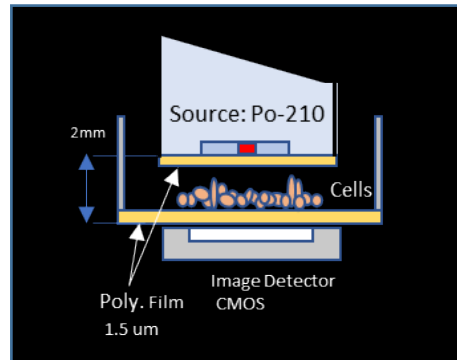


図-7 線源、細胞とセンサーの位置

(1) 基本性能

Po-210 線源 (φ0.12mm) から放出された強度毎秒3.2 (He イオン) α線を、HeLa 細胞に数秒~数分照射して、照射検出のシステム性能検証実験を行った。He イオンのエネルギーは約5MeVで照射され、大気、仕切りマイラー2枚(1.5μm 厚 x 2)、培地液+細胞を透過して、2-3MeVのエネルギーでイメージセンサーで撮像される。

細胞を透過したHe イオンの撮像スポット(照射位置)はリアルタイムにモニターで発光スポットとして観測することができる。また動画としてこの照射過程を記録することが出来る。照射個数も制御可能である。図-8に、900秒間(He イオン2862個)照射した時の撮像スポットの積分した結果(動画処理結果)を示す。照射は、φ0.5mm以内の範囲(図中の赤丸)に収まり、かつ照射したイオンの95%以上が撮像されていることが確認できた。これはPo-210線源に付けたコリメータと拡大散乱をさせた薄膜マイラー(セパレーター)の効果で、予定通りの照射範囲に細胞照射をする事ができた。これによりサンプル(細胞)に照射する場所を、あらかじめ限定することが出来る。

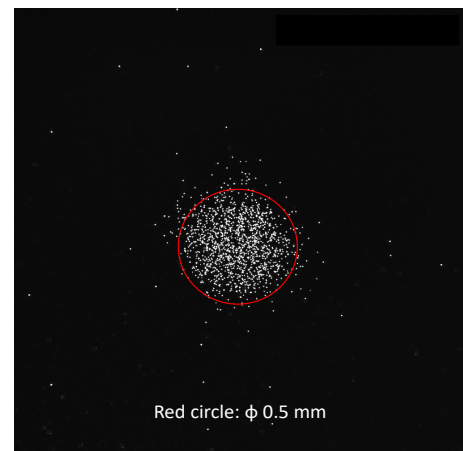


図-8 α線照射 2D 位置分布

イオンの発光スポットを詳細に調べるために、後処理(画像粒子解析: ImageJ)で発光スポットを3次元(位置と発光量)で表示した結果を図-9に示す。He イオン(1粒子)の発光スポットはイメージセンサー上で平均4.5ピクセル(分解能1pixel=2.4μm)の発光として観測される。これはセンサーへのエネルギー付与のサイズである。スポットの重心を求めることで、シングル照射の位置はμmオーダーで決定できる。図-9の結果はシングルHe イオンのスポットの撮像結果を示すもので、図-8の照射(限定範囲の長時間照射)では、このスポットは、2~5個のイオンが重なった重複スポットとして観測されている。この場合の照射では、1スポットで何個のHe イオンが照射されたかを判定することが、シングル照射実験では必要となる。

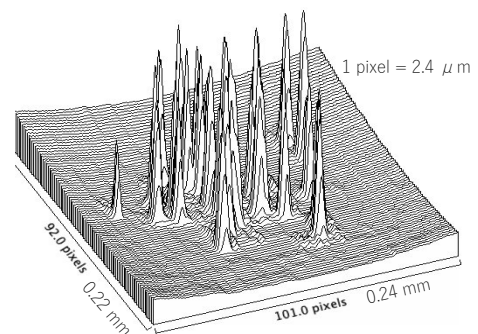


図-9 α線照射 3D 撮像光度分布

図-10 に、照射イオン 2862 粒子の照射スポットの重複頻度の結果を示す。粒子解析により、スポットの発光総量から重複度を求めることが可能で、その結果 65%はシングルイオンのスポットであるが、20%は重複した(ダブル)のスポットであることが解析できる。したがって、本システムでは、 μm オーダーで、He イオンの照射(シングルかダブルか)の重複度を決定することが出来る。つまりシングルイオン照射の重複度の影響を考慮できる機能を有する装置である。

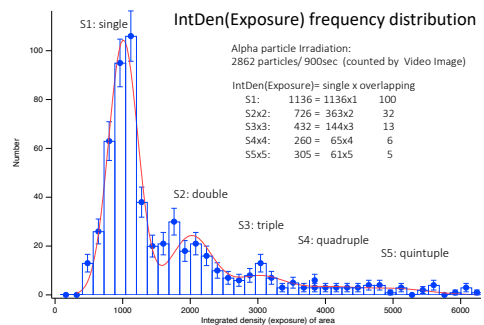


図-10 発光量分布 (重複度推定)

現在、このシステムを用いて、照射後の HeLa 細胞の DNA 損傷・修復について γH2AX 検出法を用いて実験手法の整備を進めている。He イオン照射後にこの検出法を用いて HeLa 細胞の蛍光発光を観測した結果を図-11 に示す。リングの内側に蛍光発光が観測できないのは細胞が死滅した(線量が強すぎた)を示すものである。

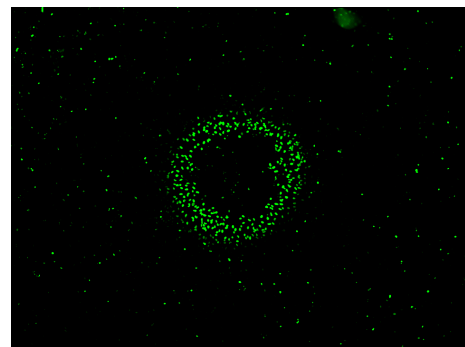


図-11 HeLa 細胞照射実験 (γH2AX)

現在、実験目的を明確にして、照射・検出・制御して観測する一連の操作を整備し、本格的な細胞照射実験にこのシステムを活用すべく取り組んでいる。

(2) 今後の展開

現在のシステムでは、シングルイオン照射位置を動画でスポット撮像し、照射位置を輝度スポットとして測定している。この測定データを解析(粒子解析)して、照射輝度スポット強度の評価から、輝度とエネルギーの関係を明らかにしたい。したがって、エネルギー測定をこの輝度で決定できれば、照射位置、個数、そしてそのエネルギーの情報をイメージング素子(CMOS カメラ)で総合的に検出可能となる。

また、今のシステムでは、細胞観察と照射スポット観察を同時にリアルタイムに観測できない。つまり、細胞を観測しながら照射された位置(発光スポット)をリアルタイムに確認できない。後の解析が必要となる。したがって、今後のこのシステムの発展として、細胞の位置を確認しながら、その照射スポットの確認をリアルタイムで観測できる仕組みを検討したい。

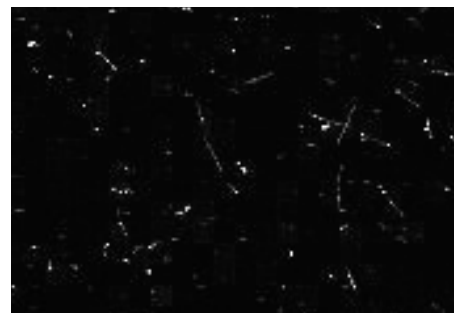


図-12 β 線(Sr-90)の照射撮像

(3) 更なる応用

このシステムは、シングルイオン照射を探針とした細胞の生命機構の解明に応用するための「Po-210 線源によるマイクロ照射制御検出システム」として開発した。ところが、線源を α 線に限る必要もなく、別の線源でも細胞の生命機構の解明に応用できる装置になりうることに期待できる。そのためのテスト実験を行ったので、その報告を併せて行う。図-12, 13 に β 線源として Sr-90 (Y-90 と放射平衡になり、共に β 崩壊する)を用いて同じイメージング素子で撮像実験をした結果を示す。

興味ある結果は、図-12 の β 線(電子)の発光スポットが、 α 線の場合(図-8)と異なり、点ではなく線状となることである。これは、 α 線と β 線のエネルギー損失の過程の違いを反映している、と考えられる。同様に、図-13 のベータ線のイメージング素子の発光スポットの様子は、 α 線と異なり(図-9)、これもスポットでなく線状である様子がわかる。このように線種で発光スポットの様子が異なるということは、つまりエネルギーの付与のあり方が違うことの表れであり、細胞に限らず色々なサンプルでこのシステムを活用(高度応用)が出来る可能性があることが期待される。

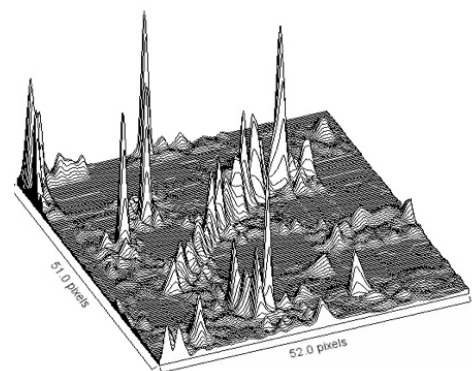


図-13 β 線照射 3D 撮像光度分布

今後、これらのことも含め、広い視野でこのシステムを改良し、求める目的に合った汎用性の高い実験装置として開発して行きたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	角山 雄一 (Tsunoyama Yuichi) (90314260)	京都大学・環境安全保健機構・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関