

令和元年6月19日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00552

研究課題名(和文)重イオン生物応答メカニズムのテーラーメイドマイクロビーム照射による解析

研究課題名(英文) Analysis of biological response of heavy-ion radiation using microbeam irradiation with specially designed irradiation dish

研究代表者

舟山 知夫 (FUNAYAMA, Tomoo)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・上席研究員(定常)

研究者番号：40354956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、従来の汎用マイクロビーム照射容器では実現が難しい、放射線誘発バイスタンダー効果誘導における細胞間情報伝達の距離限界の解析を念頭においた、テーラーメイド照射容器の開発を行った。3次元CADソフトウェアを用いて設計した、幅2mmの溝を迷路状に配置した壁面部品に、細胞接着面となるカバーガラスを接着し、細胞接着性を改善する真空プラズマ処理を行った。製作した容器に、ヒト子宮頸がん由来培養細胞HeLaを播種し、容器の迷路端を重イオンマイクロビーム装置細胞照準系の顕微鏡下で観察し、炭素イオンマイクロビームで照射を行うことができることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重イオン特有の生物効果の解明は、その応用である重粒子線がん治療やイオンビーム育種の高度化、長期宇宙滞在における宇宙放射線リスク評価において重要な課題である。重イオンマイクロビームを用いた細胞への照準照射はこの課題を解決する上で極めて有効な手法であるが、従来の汎用マイクロビーム照射容器を用いた照射では実現可能な実験が限定されていた。本研究で確立した、ラピッドプロトタイピング技術を用いた、照射実験の要件ごとに形状を最適化したテーラーメイド照射容器を製作する技術は、重イオンマイクロビームを用いて実現できる実験の幅を大きく拡大し、重イオン特有の生物効果の解明や、その応用の高度化に寄与する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a specially-designed cell irradiation dish for analyzing the distance limitation of intercellular communication in radiation-induced bystander effect, which is difficult to carry out with the conventional general-purpose microbeam irradiation dish. A cover glass to be a cell attaching surface was adhered to a wall component in which grooves having a width of 2 mm were arranged in a maze shape designed using three-dimensional CAD software. To improve cell attachment efficiency on a cover glass, a treatment with a vacuum plasma was performed. HeLa cells were inoculated in a developed specially-designed cell dish, thereafter, placed on a cell targeting system of a collimating heavy-ion microbeam system of QST-Takasaki. We confirmed that the cells attached in the dish were observed enough clear for targeting, and was able to irradiate with defined number of carbon ion microbeam.

研究分野：放射線生物学

キーワード：マイクロビーム 重イオン 高LET 重イオンヒット効果 バイスタンダー効果

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

重イオン特有の生物効果の分子機構の解明は、その応用である重粒子線がん治療やイオンビーム育種の高度化、長期宇宙滞在における宇宙放射線リスク評価において重要な課題である。重イオンは、その高い LET に起因する高い線量のため、1 イオンのヒットがヒット位置に付与するエネルギー量が非常に大きい。この重イオンが持つ物理的な性質は、細胞へのヒットにおいては、集中したエネルギー付与に起因したクラスター損傷の生成による高い致死効果に、また、細胞集団に対しては、LET の増大に伴う離散的なエネルギー付与が無視できなくなる線量域の高線量側への拡大による、エネルギーが付与された細胞と、付与されなかった細胞の混在を引き起こし、放射線誘発バースタンダー効果を始めとする非標的効果の寄与割合の拡大をもたらす。

だが、重イオンの照射効果研究を行うにあたり、試料に対して照射する放射線量を吸収線量ベースで定める拡大照射法を用いると、ポアソン分布に従ったランダムなイオンヒット分布と、高 LET に起因する離散的なエネルギー付与のため、細胞試料全体への均一なエネルギー付与を行うことができず、細胞へのイオンの直接ヒット効果と、エネルギー付与の不均一に起因するバースタンダー効果の和としての生物応答しか観測することができない。このため、重イオンの分子機構の生物効果の解明にあたっては、細胞レベルと組織・個体レベルの双方いずれにおいても、それぞれの応答を切り分けて解析するための細胞へのエネルギー付与分布の制御が重要となる。

そこで、私は、重イオンの生物影響を正確に解析することを目的に、細胞あるいは細胞集団にヒットするイオンの位置と数を正確に制御できる重イオンマイクロビーム装置を用いた細胞および細胞集団への照準照射技術の開発を行ってきた。これまでの研究・開発を通じて、重イオンマイクロビーム装置を用いた細胞への照準照射を実現し、培養細胞、あるいは培養細胞集団を対象に、放射線誘発バースタンダー効果を中心とした照射効果の解析を行った。しかし、一般的に想定される単一種類の細胞におけるバースタンダー効果の解析を前提とした汎用のマイクロビーム照射容器では、放射線誘発バースタンダー効果誘導における細胞間情報伝達の距離限界の解析など、解明できない問題がある。このような問題を解明するためには、それぞれの照射実験に最適化した照射容器を個別に開発する必要がある。しかし、従来の開発において、特定の実験に特化した照射容器を製作するためには、容器形状をデザインし、外部にその製作を委託、必要に応じて改良して再製作を行う必要があった。そのため、従来のマイクロビーム照射で解明できる現象は、汎用の照射容器で実現可能な実験に限定されていた。

しかし、CAD による 3D モデルを直接、3D プリンタや切削加工機を用いて製作するラピッドプロトタイプング技術の急速な普及に伴い、研究者自身が個別の実験に最適化した照射容器の開発できる環境が整ってきた。そこで、私は、細胞レベルの重イオンヒット効果と、細胞集団レベルの重イオン誘発バースタンダー効果の分子機構を明らかにするために、ラピッドプロトタイプングを用いた照射実験の要件ごとに形状を最適化した照射容器である、テーラーメイド照射容器を実現する研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、量研高崎研の重イオンマイクロビーム装置で照射実験に供することができる、実験の目的に最適化した形状をもつテーラーメイド照射容器製作技術の実現を、その目的とした。目的を実現するために、従来の汎用照射容器では実現が難しい、放射線誘発バースタンダー効果誘導における細胞間情報伝達の距離限界の解析を念頭においた、テーラーメイド照射容器の開発を行った。

3. 研究の方法

最初にテーラーメイド照射容器の製作手法の検討を行った。テーラーメイド照射容器には、(1) 実験目的に特化した容器形状の製作技術の実現、(2) 市販組織培養容器と同等の細胞接着性を有する細胞接着面の実現が求められる。実験目的に特化した形状の容器の製作は、デスクトップ切削加工機を導入し、これを用いて任意の形状を持つ照射容器枠を製作し、これに細胞接着面となる底面素材を接着することとした。

その後、開発したテーラーメイド照射容器に細胞を播種し、マイクロビーム照射装置を用いた正確な照準及び照射イオン数を制御した照射が可能となるかを検証した。

4. 研究成果

テーラーメイド照射容器の製作技術を確立することを目的に、放射線誘発バースタンダー効果誘導における細胞間情報伝達の距離限界の解析に特化した形状を持つ容器の製作を行った。

放射線誘発バースタンダー効果は、放射線の照射を受けた細胞が放出した情報伝達分子が、周囲の非照射細胞(バースタンダー細胞)に照射シグナルを伝達し、バースタンダー細胞においても照射細胞と同様の照射応答が誘導される現象である。マイクロビーム装置は、細胞集団中の特定の細胞のみを狙って照射を行うことができるため、このバースタンダー効果の解析研究に極めて有効なツールである。しかし、従来の 35mm、あるいは 60mm 径の細胞培養シャーレの形状をもとに開発された汎用照射容器では、細胞を培養できる容器底面の面積に制限がある。一方で、マイクロビーム照射装置の試料台に設置可能な照射容器のサイズには制限があるため、

よりサイズの大きな容器を用いた照射実験を行うこともできない。そのため、バイスタンダー効果の情報伝達が及ぶ距離の限界を解析することは、これまでのマイクロビーム照射技術では困難であった。そこで、従来の汎用容器と同程度の面積の底面を迷路形状の壁で仕切った照射容器を作成することで、バイスタンダー効果における細胞間情報伝達の距離限界を明らかにできるテーラーメイド照射容器を開発することにした。

照射容器は、ポリカーボネート板を切削加工して製作した壁面部品にイオンビームが透過できる厚みの底面材を接着することで製作した。3次元CADソフトウェアを用いて、幅2mmの溝を迷路状に30mm×40mmのサイズに配置することで、60mm径シャーレに収容できるサイズで、かつ、最も遠い細胞間が259mmの距離となる、迷路形状の壁面部品をデザインした(図1上図)。このCADデータを元に、4mm厚のポリカーボネート板を本研究計画で導入したデスクトップ切削加工機で加工し、壁面部品を製作した。

底面材としては、3 μ m厚のポリプロピレンフィルム、および、約150 μ m厚の市販カバーガラスについて、細胞接着性を検討した。ポリプロピレンフィルムは、ポリカーボネートで製作した25mm角の枠に、紫外線硬化型接着剤を用いてフィルムを接着し、表面を穏やかに熱風で処理することで収縮させ、フィルムのたるみを除いた。中性洗剤で洗浄後、70%エタノールで滅菌し、乾燥させた後、ヒト子宮頸がん由来培養細胞HeLaをフィルム面に播種し、経時的に細胞接着の状態を確認した。カバーガラスは、中性洗剤で洗浄後、70%エタノールで滅菌し、市販の細胞培養シャーレに静置し、細胞の播種を行った。その結果、ポリプロピレンフィルム、カバーガラスともに、市販の細胞接着処理済培養シャーレと比較して、細胞接着性が低いことが確かめられた。ポリプロピレンフィルムとカバーガラス間の比較では、ポリプロピレンフィルムがより細胞接着性が低かった。そこで、細胞接着面の親水性を向上させる、真空プラズマ処理を行い、処理による細胞接着性の変化を確認した。その結果、真空プラズマ処理を行うことで、ポリプロピレンフィルム、カバーガラス共に、細胞接着と増殖の改善が認められ、カバーガラスでは、市販の細胞接着処理済培養シャーレと同等の細胞接着及び増殖性能が認められた。この結果から、テーラーメイド照射容器の底面材には、真空プラズマ処理を行ったカバーガラスを用いることとした。

次に、テーラーメイド照射容器を用いた細胞へのマイクロビーム照射実験条件の検討を行った。ポリカーボネート板を切削して製作した迷路形状の壁面部品と、30mm×40mmのカバーガラスを紫外線硬化型接着剤で接着し、洗浄後、真空プラズマ処理を行い、70%エタノール処理で滅菌した(図1下図)。容器に 2.5×10^5 個の細胞を播種し、細胞が細胞接着面に十分に接着した後、量研高崎研イオン照射研究施設のコリメーション式重イオンマイクロビーム装置の試料台に設置した。照射時の細胞試料の滅菌状態を保持するため、試料を設置するための専用照射ホルダーを製作し、滅菌状態を保ったホルダー内に試料を密封して、照射台上に設置した。

重イオンマイクロビーム装置の細胞照準系で、照射対象となる、テーラーメイド照射容器の迷路端を顕微鏡観察した結果、容器に接着した細胞像が確認され、目的とする領域の照準が可能であることが確かめられた。次に、この試料を炭素イオンマイクロビームで照射したところ、照射したイオンが、試料を貫通し、直下に設置したイオン検出器で検出可能であることを確認することができた。このことから、開発した技術を用いて製作したテーラーメイド照射容器を用いて、細胞試料に照射するイオン数を制御したマイクロビーム照射を行うことができることが確かめられた。

本研究で得られた成果により、従来の汎用のマイクロビーム照射容器では実現が難しかった重イオン照射効果の解析を、テーラーメイド照射容器を製作することで実現できるようになった。研究計画終了後は、実現した照射技術を用いて重イオンの生物作用機構を明らかにしていく。



図1. 3次元CADソフトウェアを用いて設計したテーラーメイド迷路形状照射容器の壁面部品の3Dモデル(上)。デスクトップ切削加工機でポリカーボネートを切削し、カバーガラスと接着して製作したテーラーメイド迷路形状照射容器(下)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 11 件）

- ① Heavy-Ion Microbeams for Biological Science: Development of System and Utilization for Biological Experiments in QST-Takasaki. Tomoo Funayama. Quantum Beam Science (査読有), 3 巻, p13, 2019 年.
- ② 重イオンマイクロビームを用いた生物照射技術とその利用研究 . 舟山 知夫, 鈴木 芳代. 放射線 (査読無), 44 巻, p.151-156, 2019 年.
- ③ 放射光マイクロビームを使った生物照射効果研究 . 鈴木 雅雄, 宇佐美 徳子, 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 鈴木 芳代 and 小林 泰彦. 放射線 (査読無), 44 巻, p.147-149, 2019 年.
- ④ Validation of ion species and beam size availability in collimating ion microbeam system of TIARA. Tomoo Funayama, Michiyo Suzuki. QST-M-16, QST Takasaki Annual Report 2017 (査読無), p.78, 2018 年.
- ⑤ Histone deacetylase inhibitors sensitize murine B16F10 melanoma cells to carbon ion irradiation by inducing G1 phase arrest. Katsuyo Saito, Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota, Takashi Murakami, Yasuhiko Kobayashi. Biological and Pharmaceutical Bulletin (査読有), 40 巻, p.844-851, 2017 年.
- ⑥ Abscopal activation of microglia in embryonic fish brain following targeted irradiation with heavy-ion microbeam. Takako Yasuda, Miyuki Kamahori, Kento Nagata, Tomomi Watanabe-Asaka, Michiyo Suzuki, Tomoo Funayama, Hiroshi Mitani, Shoji Oda. International Journal of Molecular Sciences (査読有), 18 巻, p.1428, 2017 年.
- ⑦ Target irradiation of individual cells using focusing heavy-ion microbeam of QST-Takasaki (VII): Utilization of polypropylene film dish for analyzing heavy-ion hit effect of irradiated cells. Tomoo Funayama, Suguru Tabei. QST-M-8, QST Takasaki Annual Report 2016 (査読無), p.84, 2017 年.
- ⑧ *In vivo* 3D analysis of systemic effects after local heavy-ion beam irradiation in an animal model. Kento Nagata, Chika Hashimoto, Tomomi Watanabe-Asaka, Kazusa Itoh, Takako Yasuda, Kousaku Ohta, Hisako Oonishi, Kento Igarashi, Michiyo Suzuki, Tomoo Funayama, Yasuhiko Kobayashi, Toshiyuki Nishimaki, Takafumi Katsumura, Hiroki Oota, Motoyuki Ogawa, Atsunori Oga, Kenzo Ikemoto, Hiroshi Itoh, Natsumaro Kutsuna, Shoji Oda, Hiroshi Mitani. Scientific Reports (査読有), 6 巻, p.28691-, 2016 年.
- ⑨ 重イオン線によるバイスタンダー応答の特徴 . 富田 雅典, 松本 英樹, 舟山 知夫. 放射線生物研究 (査読有), 51 巻, p.324-335, 2016 年.
- ⑩ 量研機構・高崎の重イオンマイクロビーム . 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 鈴木 芳代. 放射線生物研究 (査読有), 51 巻, p.336-356, 2016 年.
- ⑪ Development of live-cell imaging system for long-term analysis of bystander cell populations irradiated with heavy-ion microbeams. Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota, Yasuhiko Kobayashi. QST-M-2, QST Takasaki Annual Report 2015 (査読無), p.109, 2016 年.

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① 舟山 知夫, 鈴木 芳代. 重イオンマイクロビームを用いた生物照射技術とその利用研究. 第 65 回 応用物理学学会 春季学術講演会, 東京, 日本, 3 月 17-20 日, 2018 年 (招待講演).

- ② 舟山 知夫, 鈴木 芳代. 重イオンマイクロビームを用いた生命科学研究. 量子生命科学研究会第2回学術集会, 東京, 日本, 5月10日, 2018年.
- ③ 舟山 知夫. 放射線の微視的線量分布とマイクロビーム. 日本放射線影響学会第61回大会, 長崎, 日本, 11月7-9日, 2018年.
- ④ 舟山 知夫, 横田 裕一郎. 重イオンマイクロビームシステムオフライン観察系の高度化 . 第1回QST高崎研シンポジウム, 高崎, 日本, 1月26-27日, 2017年.
- ⑤ 舟山 知夫, 鈴木 芳代, 横田 裕一郎. 量研高崎の重イオンマイクロビームを用いた生物照射効果解析技術. 日本宇宙生物科学会第31回大会, 前橋, 日本, 9月20-22日, 2017年.
- ⑥ 舟山 知夫, 鈴木 芳代, 横田 裕一郎. 量研高崎におけるマイクロビーム生物研究. 日本放射線影響学会第60回大会, 千葉, 日本, 10月25-28日, 2017年.
- ⑦ 舟山 知夫, 白井 孝治, 保田 隆子, 浅香 智美, 尾田 正二, 三谷 啓志, 鈴木 芳代. 重イオンマイクロビームを用いたモデル生物研究. 日本放射線影響学会第59回大会, 広島(JMSアステールプラザ), 日本, 10月26-28日, 2016年.

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

<https://www.qst.go.jp/site/taka/2072.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。