

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20612013

研究課題名(和文) 収束式重イオンマイクロビーム装置を用いた細胞内小器官ラジオ
サージェリー技術の開発研究課題名(英文) Development of targeting method of subcellular organelles using
focusing heavy-ion microbeam.

研究代表者

舟山 知夫 (FUNAYAMA TOMOO)

独立行政法人 日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究主幹

研究者番号：40354956

研究成果の概要(和文):

重イオンに対する細胞の放射線応答において、細胞内小器官が果たす役割を解明するために、集束式重イオンマイクロビームを用いた細胞内特定領域への照準照射技術を開発することを目的に研究を実施した。細胞への照射を実現するために、細胞照準システムの設置、細胞試料調製法の確立、および、細胞位置の正確な検出を実現する画像解析コードの開発を行い、集束式重イオンマイクロビームによる細胞への正確な照準照射を実現した。

研究成果の概要(英文):

To elucidate mechanisms underlying biological responses of heavy-ion irradiated cells, a targeting method of subcellular regions using focusing heavy-ion microbeam was developed. An installation of a cell targeting system, an establishment of protocol for preparing target sample, and a development of an image analysis code that can extract cell coordinates from fluorescent-dye-stained cell image were carried out. The developed system was able to target and irradiate individual cultured cells using focusing heavy-ion microbeam.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:放射線生物学

科研費の分科・細目:量子ビーム・量子ビーム科学

キーワード:低線量放射線影響・重イオン・マイクロビーム

1. 研究開始当初の背景

マイクロビームは、細胞の放射線応答機構解明に極めて有効なツールで、研究開始当初において、生物照射技術の開発を進めていた機関は、世界全体で約 30 拠点、国内でも 6 拠点が存在していた。研究代表者の所属する日本原子力研究開発機構は、これらの機関のなかでもいち早く開発したコリメート式重イオンマイクロビーム装置を用いた細胞照準照射の実現で、世界

のマイクロビーム細胞照射研究でトップ 3 の研究を進めていた。

それまでの細胞の放射線応答研究では、放射線誘発の DNA 損傷が重視されてきた。しかし、放射線応答の分子生物学的解析が進んだことによって得られた知見で、細胞膜に照射が引き起こした損傷が、遺伝子の働きを介して管理・調節される細胞死であるアポトーシスを誘導することや、細胞内小器官の一つであるミトコンドリアが、

放射線照射された細胞の近傍に存在する非照射細胞に照射細胞同様の細胞応答が細胞間シグナル伝達経路を介して誘導される放射線誘発バイスタンダー効果に関与する可能性などが示唆され、細胞内小器官が放射線応答に果たす役割の解明が求められていた。

2. 研究の目的

研究では、細胞内小器官が放射線応答に果たす役割を、重イオンマイクロビームを用いた細胞照射実験で解明する技術を開発することを目標とした。具体的な目標として、細胞内の特定領域を正確に照準して重イオンを照射する技術の開発を設定した。

生命科学的研究においては、観察対象の機能部位を破壊し、あるいは、欠損する生物株を作出し、その機能解析を行なうことは、基本的な研究手法である。微生物や培養細胞の特定遺伝子欠損株や、ノックアウトマウス、RNA 干渉による遺伝子機能解析は、その一例である。また、マイクロレーザーでの組織の微小切除もこれに当たる。また、原子力機構では、コリメート式マイクロビーム装置を用いた重イオンマイクロラジオサージェリーで生物個体の機能解析を行ない多くの成果を挙げている。

しかし、研究開始当初に利用が可能だったコリメート式重イオンマイクロビーム細胞照射装置では特定の細胞をマイクロビーム照射で不活性化できても、ビームのサイズと照準精度の限界から差渡し 10-20 μm の細胞の一部だけを正確に不活性化することはできなかった。

その一方で、研究開始当初、従来のコリメート式重イオンマイクロビームよりも高精度で微細なビームを形成できる収束式重イオンマイクロビーム技術が原子力機構で開発され、すでに真空中で 1 μm 径のビームサイズのビームを形成することに成功していた。そこで、この高精度ビームを用いて細胞、ひいては細胞内の特定領域を照準し照射する技術を開発することで、細胞内小器官を狙ったマイクロラジオサージェリーが実現できることが予想された。そこで研究代表者は収束式重イオンマイクロビーム装置による細胞内特定領域の照準照射技術の開発を目的とする研究に着手した。

3. 研究の方法

集束式重イオンマイクロビーム形成装置で形成した精密なマイクロビームを、個々の培養細胞の特定領域に照射する技術を実現するため、新たに設計した細胞照準システムを形成装置エンドステーションのビーム取りだし用真空窓直下に設置した。設置したシステムの概略図を図 1 に示す。システムは、生物用電動倒立顕微鏡と合計 7 軸となる複数の電動ステージから構成され、それらの全てを照射室内に設置した PC に接続することで、システム全体の機能を照射室外から遠隔制御できる。このステージによって、

照射する試料の位置を XYZ の 3 軸で制御することが可能となるとともに、大気中に取り出したビームスポットと顕微鏡視野の相対位置を正確に調整することが可能になる。試料は、試料用ステージにとりつけた、アーム状の試料台先端に設置し、真空窓直下に配置することでマイクロビームによる照射を行う。照射試料の交換を容易にするため、システムには、試料用ステージ全体を待避することができる試料ステージ待避用ステージを組み込んだ。

振動による照準誤差発生回避は、システム全体をマイクロビーム形成装置の磁気レンズに懸架・固定することで実現した。顕微鏡の対物レンズレボルバには、半導体検出器が専用治具を用いて取り付けられており、この検出器で試料を貫通したイオンを検出・計数し、高速ビームシャッターを駆動して、試料への照射イオン数が制御できる。また、ビームスポット検出時におけるシンチレータの微弱発光や、照準対象細胞の蛍光像を明瞭に検出するため、高感度冷却 CCD カメラを、顕微鏡の底面ポートに設置した。

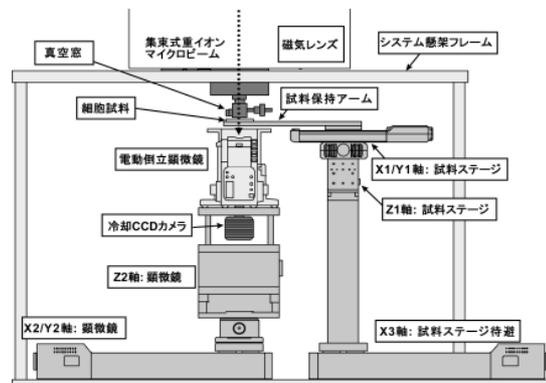


図 1 集束式重イオンマイクロビーム細胞照準システムの概略図

細胞照射実験では、ヒト子宮頸がん由来細胞 HeLa 株を材料に用いた。細胞は 10%FBS と PSG を加えた MEM 培地を使って、37°C、5% CO₂、100%湿度条件で継代した。照射には、対数増殖期の細胞を使用した。

細胞照射実験に使用した細胞試料調整法の概略を図 2 に示す。蛍光顕微鏡で細胞を検出するため、播種前に、細胞質生体蛍光染色試薬 CellTracker Orange (Invitrogen 社)で染色した。試料に照射したイオンの細胞へのヒット位置を正確に検出するため、細胞は、100 μm 厚のイオン飛跡検出プラスチック CR39 フィルム (TNF-1, 長瀬ランダウア社)の上に播種した。細胞が CR39 に接着しやすいように、あらかじめその中央部分を CellTak (Beckton Dickinson & Co 社)で処理し、トリプシン処理した細胞 4500 個を、CR39 中央の 5mm 直径エリアに播種した。播種後、37°C、5%CO₂、100%湿度条件で 4 時間以上培養し、照射直前に、培地を除き、試料を照射した。照射時は、培地除去操作によって細胞

試料が乾燥しないように、CR39 の細胞接着面を厚さ 8 μm のカプトン膜で被った。カプトン膜は、試料全体を保持するためのアルミフレームにあらかじめ両面テープを用いて固定し、70%エタノール処理および紫外線処理で滅菌した。細胞を播種した CR39 の周囲にあらかじめワセリンを薄く塗布しておくことで、カプトン膜でカバーした際、その周囲がワセリンで密封されるように試料を工夫し、カプトン膜の端からの培地乾燥による細胞へのダメージを防いだ。

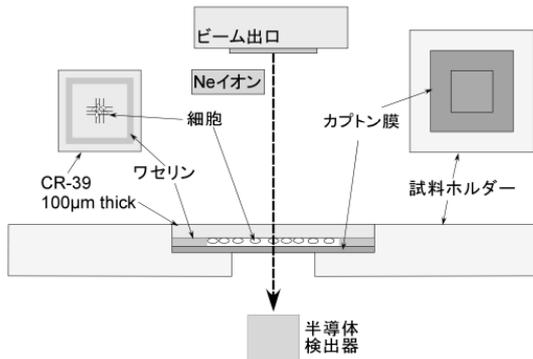


図 2 照射用細胞試料の調製

CellTracker Orange 色素で生体染色した HeLa 細胞を 100 μm 厚の CR39 フィルム上に播種し、カプトン膜で覆い周囲をワセリンで密封することで、照射中の試料乾燥を防いだ。

細胞照射実験では、調製した試料を、細胞照射システムの試料ステージに設置し、真空窓に近づけた。真空窓と細胞試料間の距離は、0.5 mm 以下とした。光量を抑えたハロゲン光による落射照明で、細胞を可視化し、高感度冷却 CCD カメラで細胞の蛍光染色画像を撮影した。撮影した画像を、CellTracker Orange 染色画像の処理に最適化した細胞位置検出コードで処理し、細胞の位置座標を抽出した。抽出した座標を元に、試料をステージを移動し、シンチレータで検出したビーム位置に細胞を定位した。照射は、高速シャッターと NIM カウンタモジュールを連動させ、あらかじめ設定した個数のイオンを細胞に照射した。細胞試料を貫通した照射イオンを、試料直下に設置した半導体検出器で検出し、計数することで照射イオン数を制御した。照射後、細胞試料を回収し、PBS でリンスした後、2% パラホルムアルデヒド/PBS 溶液で、室温で 20 分固定した。固定した試料の CR39 細胞非接着面を 13.4N KOH 溶液で 6 時間室温処理することで、試料にヒットしたイオンの飛跡をエッチピットとして可視化した。また、細胞を抗 γH2AX モノクローナル抗体を用いた *in situ* 蛍光染色することで、細胞に生じた DNA 二重鎖切断部位を可視化した。

4. 研究成果

細胞の特定領域を照準して正確にマイクロビームで照射するには、顕微鏡観察した細胞をマ

イクロビームスポットの位置に正確に定位し、照射を実行する必要がある。そのためには、顕微鏡下で、細胞の位置と、マイクロビームスポットの位置を正確に検出することが必要である。そこで、顕微鏡下でマイクロビームスポットと個々の細胞の絶対座標を正確に検出する実験を行った。

ビームスポット位置検出実験では、シンチレータ発光を用いたスポット検出実験を実施した。ビーム位置の検出には、発光輝度が高い無機シンチレータを用いた。実験では、 $\text{CaF}_2(\text{Eu})$ と、 $\text{ZnS}(\text{Ag})$ の二種類のシンチレータを用い、検出感度を比較した。シンチレータを細胞照射システムの試料ステージに載せ、顕微鏡観察下でビームによるシンチレーション発光を冷却 CCD カメラで撮影した。その結果、いずれのシンチレータでも、細胞照射と同一条件のビームでシンチレーション発光によるビーム位置の特定ができた(図 3)。同一ビーム条件で照射したシンチレーション発光スポットの輝度を測定し比較した結果、 ZnS による発光輝度が、 CaF_2 のその 3 倍以上であることが確かめられた。この結果から、 ZnS シンチレータを用いてビームスポット位置の検出することで、細胞照射条件のビームスポット位置を明瞭かつ正確に検出することが可能であることが示唆された。

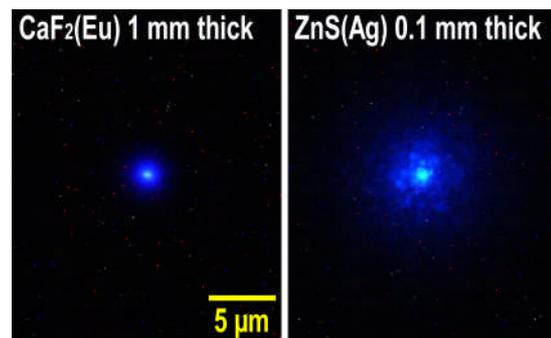


図 3 無機シンチレータを用いた集束式重イオンマイクロビームスポットの検出

集束式重イオンマイクロビームを照射した $\text{CaF}_2(\text{Eu})$ と、 $\text{ZnS}(\text{Ag})$ の二種類の無機シンチレータの発光スポットを細胞照射系の電動倒立顕微鏡下で検出し、冷却 CCD カメラを用いて撮影、比較した。

次に、細胞の正確な位置を検出する実験を実施した。細胞位置の正確な検出を実現することを目的に、細胞質を生体染色した細胞の蛍光顕微鏡観察画像から、個別の細胞の絶対位置座標を抽出する画像解析コードを開発した。開発したコードを用いた画像処理の流れの概要を図 4 に示す。最初に、取得した画像をグレースケール変換する。グレースケール変換像に、閾値を設定し画像を二値化する。二値化した画像に生じる非細胞オブジェクト由来のノイズを除去した後、画像中のオブジェクトの輪郭を抽出する。輪郭抽出過程では、複数の近接した細胞が融合したオブジェクトを判別し、細胞一つ一つの輪郭として抽出する。最後に、抽出した輪郭を楕

円近似し、その中心点を算出することで、細胞の中心点の座標の一覧を得る。本コードを用いることで、図 4f で示したように、原画像に含まれる全ての細胞位置がほぼ完全に抽出可能であることが確認できた。本コードは、標準で、細胞質染色した HeLa 細胞の位置抽出に最適化したパラメータが設定されているが、画像処理における各段階の処理パラメータを適宜変更することで、様々な細胞の解析に対応できる。そのため、今後、他の細胞へのマイクロビーム照射実験を行う際でも、パラメータの最適化のみで、容易に細胞位置検出が可能になると考えられた。

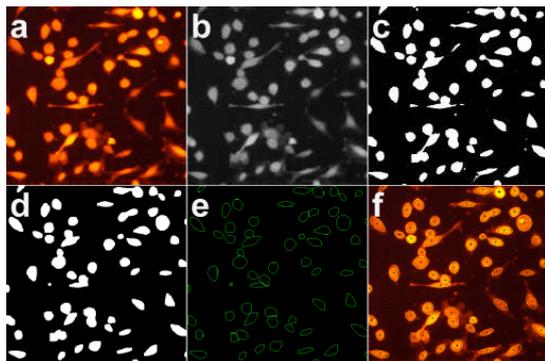


図 4 新規開発した画像解析コードを用いた細胞位置座標の自動抽出

CellTracker Orange で細胞質を生体染色した細胞画像から細胞位置座標を新規開発した画像解析コードを用いて自動抽出した。原画像に含まれるほぼ全ての細胞の位置を正確に検出することが可能であることが実証された。図は、原画像および、画像解析の中間段階の画像を示す。(a) 原画像、(b) グレースケール変換像、(c) 二値化像、(d) ノイズ除去後の画像、(e) 輪郭抽出及び分割後の画像、(f) 抽出した細胞位置と細胞画像の合成画像

次に、シンチレータを用いて検出したビームスポット位置と、画像処理コードを用いて抽出した細胞位置を用いて、個々の細胞への集束式重イオンマイクロビームの照射を行った。照射は、抽出した細胞座標をステージ座標に変換し、ステージを動かすことで、細胞をビームスポット位置に移動して行った。細胞に照射するイオン数は、試料を貫通したイオンを試料直下の半導体検出器で検出・係数することで制御した。照射後、試料を固定し、 γ H2AX の *in situ* 染色による DNA 二重鎖切断の可視化と、細胞を播種した CR39 のエッチングによるヒットイオン飛跡の可視化を行った。可視化後、細胞の位相差観察像、 γ H2AX foci の蛍光観察像、および、エッチピットの観察像を撮影し、それぞれの位置関係を検討した。

照射したイオンは、3-5 μm の拡がりを持つスポットとなっていた(図 5a)。真空中の Cu メッシュの SEM 画像から見積もられたイオンスポットのサイズは 2 μm で、これが大気取り出し窓の 200 nm 厚の Si_3N_4 フィルムによって散乱を受けて広がっ

たと考えた場合、このスポットのサイズは妥当なものであると考えられた。次に、細胞の位相差観察像と CR39 上にエッチピットとして可視化されたイオンヒット位置を重ね合わせることで、細胞へのイオンヒット位置を検討した結果、照射イオンが、細胞を照準した位置に正確にヒットしていたことが確認できた(図 5b, 5c)。このことから、用いた手法により、照準した細胞の特定の位置への正確なマイクロビーム照射を実現できたと考えられた。さらに、細胞の γ H2AX 蛍光染色像で、照射した細胞に DNA 二重鎖切断の誘発を意味する、 γ H2AX のフォーカスが生じていることが確認された(図 5d)。このフォーカスの位置と、試料にヒットしたイオンの位置を重ね合わせた結果、イオンヒット位置近傍に γ H2AX フォーカスが形成されていることが確かめられた(図 5e)。この結果は、細胞にヒットしたイオンによって、細胞核の DNA に DNA 二重鎖切断が生じたことを意味している。このことから、本研究課題で開発した技術を用いることで、集束式重イオンマイクロビームで細胞を決められた数のイオンで照準照射し、照射が引き起こす細胞照射効果の解析が実現できるようになったことが示された。

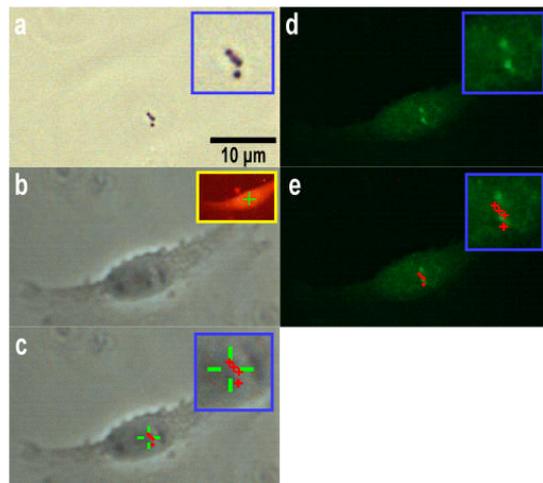


図 5 集束式重イオンマイクロビームを用いた HeLa 細胞照準照射

細胞を集束式ネオンイオンマイクロビームで照射し、イオンヒット位置と γ H2AX のフォーカスを可視化した。(a) CR39 フィルムをアルカリ処理して可視化したイオンヒット位置を示すエッチピット。右上の青枠内画像は、ピット位置の拡大図 (b) 照準した細胞の位相差顕微鏡観察画像。右上の黄枠内の画像は、照射時に撮影した蛍光観察像。緑十字マークは照射位置を示す (c) イオンヒット位置と細胞画像の合成図。緑の照射位置を示す。赤の十字マークは、イオンヒット位置を示す。右上の青枠内画像は、照射位置の拡大図 (d) 抗 γ H2AX 抗体を用いて *in situ* 蛍光染色した細胞の蛍光観察像。 γ H2AX のフォーカスが検出された (e) イオンヒット位置と γ H2AX フォーカスの位置の合成図。イオンヒット位置近傍に γ H2AX フォーカスが形成され、DNA 二重鎖切断が生成したことが示された。

最後に本研究課題で得られた成果をまとめる。

- (1) 集束式重イオンマイクロビームで細胞を顕微鏡下で照準できる細胞照準システムを構築した
- (2) 顕微鏡観察下で、集束式重イオンマイクロビームスポットの位置を正確に検出する方法を確立した
- (3) CellTracker Orange 色素を用いて生体蛍光染色した細胞の蛍光顕微鏡画像から、細胞の位置を正確に抽出することができる画像解析コードを開発した
- (4) 開発した細胞照準システムと画像解析コードを用いて、細胞への集束重イオンマイクロビーム照射実験を実施し、開発した技術が細胞への重イオンマイクロビーム照準照射を実現できるものであることを実証した

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)

- ① T. Funayama, T. Sakashita, Y. Yokota, Y. Kobayashi, Target irradiation of individual cells using focusing heavy-ion microbeam of JAEA-Takasaki, JAEA-Review 2010-65, 査読無, 2010, 86-86
- ② T. Funayama, K. Fukamoto, Y. Yokota, M. Suzuki, T. Sakashita, Y. Kobayashi, Development of new cell targeting system for collimating heavy-ion microbeam system, JAEA-Review 2009-41, 査読無, 2009, 89-89
- ③ 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 坂下 哲哉, 小林 泰彦, 原子力機構 TIARA のマイクロビーム装置によるバイスタンダー効果研究, Isotope News, 査読無, 2009 年 9 月号, 2009, 7-11
- ④ T. Funayama, N. Hamada, T. Sakashita, Y. Kobayashi, Heavy-ion microbeams - development and applications in biological studies, IEEE T. Plasma. Sci., 査読有 vol 36, 2008, 1432-1440
- ⑤ T. Funayama, K. Fukamoto, Y. Yokota, S. Kurashima, Y. Kobayashi, Utilization of new ion species for analysis of heavy-ion radiation-induced bystander effect, JAEA-Review 2008-55, 査読無, 2008, 91-91

[学会発表] (計 13 件)

- ① 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 坂下 哲哉, 小林 泰彦. 集束式重イオンマイクロビーム装置による細胞照準照射. 日本放射線影響学会第 53

回大会, 京都, 京都テルサ, 10 月 20-22 日, 2010.

- ② 舟山 知夫, 坂下 哲哉, 横田 裕一郎, 小林 泰彦. 集束式重イオンマイクロビームによる細胞の照準照射. 第 5 回高崎量子応用研究シンポジウム, 高崎, 高崎シティーギャラリー, 10 月 14-15 日, 2010.

- ③ Funayama, T., Sakashita, T., Yokota, Y., Kobayashi, Y.. Target irradiation of individual cells using focusing heavy-ion microbeam of JAEA-Takasaki. 9th International Microbeam Workshop, Technical University of Darmstadt, Darmstadt, Germany, July 15-17, 2010.

- ④ Funayama, T., Sakashita, T., Yokota, Y., Kobayashi, Y.. Target irradiation of individual cells using focusing heavy-ion microbeam. 49th Annual Meeting of the Particle Therapy Co-Operative Group (PTCOG 49), Green Dome Maebashi, Maebashi, Japan, May 20-22, 2010.

- ⑤ 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 坂下 哲哉, 鈴木 芳代, 小林 泰彦. 原子力機構の重イオンマイクロビーム装置を用いた細胞照準照射技術. 第 10 回 SICE システムインテグレーション部門 (SII部門)講演会 SI2009, 東京, 芝浦工業大学豊洲キャンパス, 12 月 24-26 日, 2009.

- ⑥ 舟山 知夫, 坂下 哲哉, 横田 裕一郎, 小林 泰彦. 集束式マイクロビーム装置による細胞照準照射の試み. 日本放射線影響学会第 52 回大会, 広島, 広島市南区民文化センター, 11 月 11-13 日, 2009.

- ⑦ 舟山 知夫, 深本 花菜, 横田 裕一郎, 鈴木 芳代, 坂下 哲哉, 小林 泰彦. コリメーション式重イオンマイクロビーム装置用 新規細胞照準システムの開発. 第 4 回高崎量子応用研究シンポジウム, 高崎, 高崎シティーギャラリー, 10 月 8-9 日, 2009.

- ⑧ 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 坂下 哲哉, 小林 泰彦. 原子力機構の重イオンマイクロビーム装置を用いた細胞照射応答研究. 第 20 回眼科酸化ストレス研究会, 大阪, 梅田スカイビル, 7 月 25 日, 2009.

- ⑨ 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 坂下 哲哉, 小林 泰彦. 原子力機構 TIARA のマイクロビーム装置によるバイスタンダー効果研究. 第 46 回アイトープ・放射線研究発表会, 東京, 日本科学未来館, 7 月 1-2 日, 2009.

- ⑩ 舟山 知夫, 坂下 哲哉, 佐藤 隆博, 深本 花菜, 倉島 俊, 横田 裕一郎, 横田 渉, 神谷

富裕, 小林 泰彦. 原子力機構 TIARA における生物照射用マイクロビーム装置の現状. 日本放射線影響学会第 51 回大会, 北九州, 北九州国際会議場, 11 月 19-21 日, 2008.

⑪ Funayama, T., Sakashita, T., Fukamoto, K., Yokota, Y., Suzuki, M., Kobayashi, Y.. Development of heavy-ion microbeam systems for biological and medical research. The 4th International Symposium on Biomedical Research Using Accelerator Technology, Gunma University, Maebashi, Japan, Nov 16-17, 2008.

⑫ Funayama, T., Fukamoto, K., Sakashita, T., Yokota, Y., Suzuki, M., Kobayashi, Y.. Development of new cell targeting system for heavy-ion microbeam systems at JAEA-Takasaki. 8th International Workshop on Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, NIRS, Chiba, Japan, November 13-15, 2008.

⑬ 舟山 知夫, 深本 花菜, 横田 裕一郎, 小林 泰彦, 倉島 俊. 生物用重イオンマイクロビーム装置における新規重イオン種照射利用の検討. 第 3 回高崎量子応用研究シンポジウム, 高崎, 高崎シティーギャラリー, 10 月 9-10 日, 2008.

6. 研究組織

(1)研究代表者

舟山 知夫 (FUNAYAMA TOMOO)

独立行政法人 日本原子力研究開発機構・

量子ビーム応用研究部門・研究主幹

研究者番号:40354956