

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 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21651021

研究課題名（和文）

放射線応答細胞チップの開発

研究課題名（英文）

Development of cell chip for examination of radiobiological damage

研究代表者

飯田 敏行 (IIDA TOSHIYUKI)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60115988

研究成果の概要（和文）：高エネルギー α 線が照射された細胞を観察するための細胞チップを開発した。細胞チップの基板には CR-39 固体飛跡検出器を用いており、ターゲット細胞を貫通した高エネルギー粒子を検出することができる。細胞チップ上に HeLa 細胞が培養され、 α 粒子が照射され後、アルカリ溶液処理によってエッチトラックを形成させた。さらに、DNA 損傷を検出するために蛍光抗体を用いて細胞を染色した。光学顕微鏡を用いて細胞チップ内の HeLa 細胞の DNA 損傷と α 線の飛跡の関係を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A cell chip was developed for the examination of biological damage of cells irradiated by high-energy α -rays. A CR-39 track detector was employed as a chip substrate to identify high-energy charged particles traversing target cells. HeLa cancer cells on the chip were irradiated with alpha particles and stained with a fluorescent probe molecule for DNA damage detection. The CR-39 substrate was etched by means of an alkali solution during cell incubation. The HeLa cells and α tracks were successfully observed by microscopy at once.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	0	900,000
2010 年度	800,000	0	800,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	180,000	2,480,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：応答、細胞損傷、DNA 損傷

1. 研究開始当初の背景

(1) 自然放射能の健康影響について、2005 年に世界保健機構 (WHO) が自然放射能ラドン ^{222}Rn を肺がん発症の原因のひとつであると警告している。米国の環境保護庁は肺がん死亡者に対してラドンの被曝に起因する割合についても公表している。しかし、これ

らの議論では、肺がんのリスクを高線量被爆領域から直線外挿したものであり、その妥当性には疑問が残っている。

(2) 放射線治療のホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) では投与されたホウ素化合物薬剤 (アミノ酸) が腫瘍細胞にとりこまるが、完全ではなく正常組織にもある程度のアルフ

α線による損傷が生じる。従って、腫瘍細胞に限らず周辺の正常細胞を含めた微視的観点からの効果機構研究が、治療効果向上のために重要となっている。これらに共通する課題として、個々のα線照射に注目した微視的な細胞レベルでの測定とデータ解析を行うための技術開発が必要と考えた。

(3) 研究代表者は、半導体プロセス技術を利用した放射線検出器の開発等に取り組んでおり、細胞工学技術を取り入れることで、新しい応用が展開できると考えた。特に、マイクロ加工技術によって培養細胞を任意の位置に固定する技術に注目した。培養細胞を配列することで、個々の細胞の放射線影響を調べることが可能となる。そして、放射線計測技術と細胞放射線影響が同時に調べられる放射線応答細胞チップを考案した。

2. 研究の目的

細胞レベルでの放射線による影響と放射線量を同時に調べることが可能な細胞チップを開発する。例えば、BNCTでは、熱中性子吸収断面積が大きい ^{10}B を癌細胞に取り込ませて、 $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ 反応によって、高エネルギーαと ^7Li が細胞核のDNAに損傷を与え、細胞死を誘発させることを利用する。そこで、本研究では、α線が照射された細胞のDNA二重鎖切断の観察とαトラックが同時に観察できる実験システムを開発する。

3. 研究の方法

(1) 図1は放射線応答細胞チップの製作と実験手順について示している。HeLa細胞をSU-8でマイクロパターンが施された固体飛跡検出器CR-39上で培養する。HeLa細胞の活性度、細胞増殖について調べる。HeLa細胞はα線源で照射された後、DNA損傷を調べるための蛍光抗体で染色される。細胞に損傷が生じないようにCR-39は化学エッチング処理がなされ、αと ^7Li にエッチトラックを形成させる。蛍光顕微鏡を用いて、DNA損傷と荷電粒子の飛跡を同時に観察する。

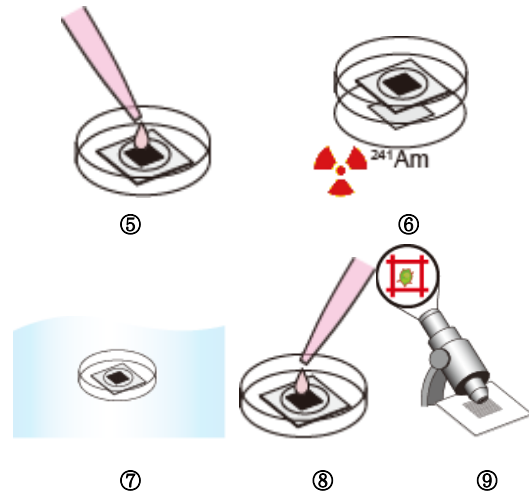
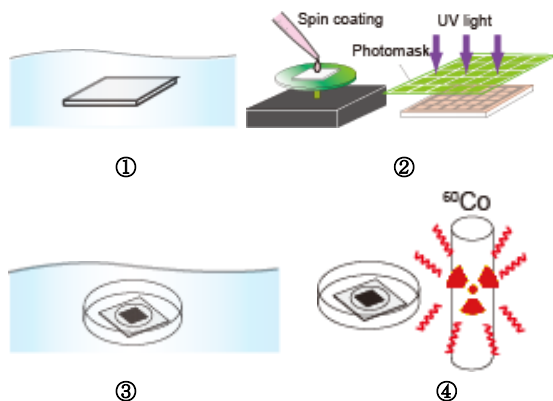


図1 放射線応答細胞チップの製作と実験手順

① CR-39基板を70℃メタノール水混合溶液でエッチングし、基板薄さを調整する。②CR-39基板上にSU-8樹脂を塗布し、リソグラフィでパターン形成する。③ CR-39をシャーレに接着し洗浄。④ ^{60}Co γ線を用いて細胞チップのシャーレを滅菌する。⑤HeLa細胞を播種。⑥培養シャーレの底から ^{241}Am α線照射。⑦39℃NaOH溶液でCR-39基板をエッチング。⑧HeLa細胞を蛍光抗体で染色。⑨細胞チップを蛍光顕微鏡で観察。

細胞損傷の観察は、細胞核のDNA二重鎖切断に注目し、抗体、蛍光試薬を用いてγ-H2AXを検出した。

(2) 図2にCR-39上にリソグラフィによって形成されたSU-8樹脂のマイクロパターンに示している。このグリッド状のパターンに従って、培養細胞が固定される。

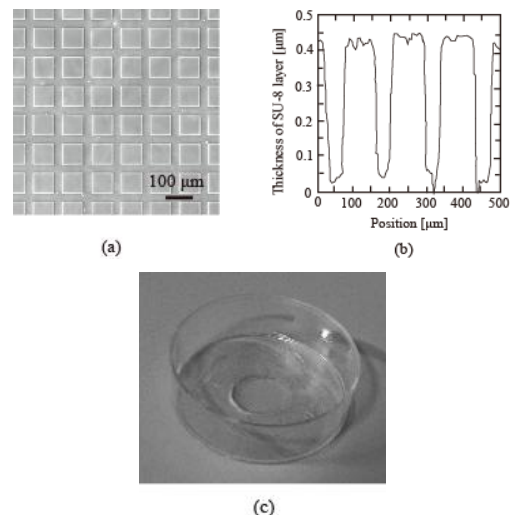


図2 放射線応答細胞チップ(a)CR-39基板上に形成されたSU-8マイクロチェンバー、(b)深さプロファイル測定、(c)中央に放射線応答細胞チップが取り付けられた培養シャーレ

4. 研究成果

(1) 図3は細胞チップ内の HeLa 細胞の様子である。SU-8 で形成されたマイクロパターンにしたがって、播種後 24 時間で HeLa 細胞がグリッドパターンに従って接着していることが確認できる。これは、HeLa 細胞の基板の材料に対する接着度の違いを利用したもので、エッチングされた CR-39 基板の接着度は小さく、SU-8 は高いためである。また、BCECF 試薬は細胞内の pH を調べるための蛍光プローブであり、細胞の活性について調べるのに適している。細胞チップ上で培養された HeLa 細胞とコントロールに大きな違いは見られなかった。また、図4が示すように、細胞チップ内の HeLa 細胞は初期の段階では、通常の細胞周期で増殖していることも確かめられた。ただし、分裂が進むにつれて、マイクロチェンバー内の細胞密度が高くなるために、細胞分裂しなくなる。

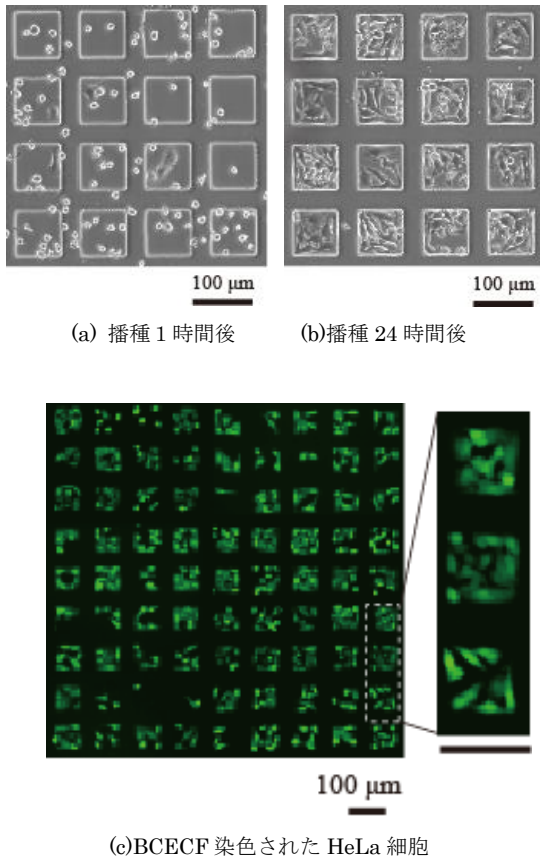
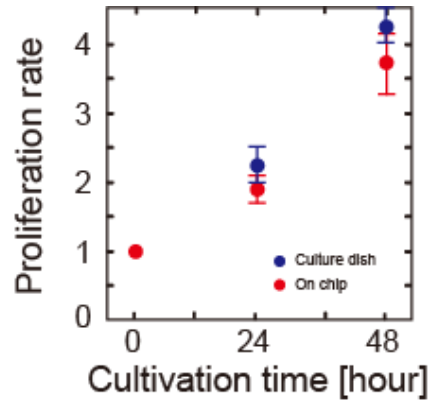
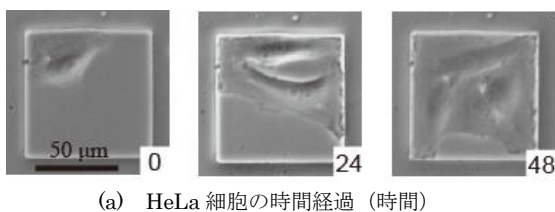


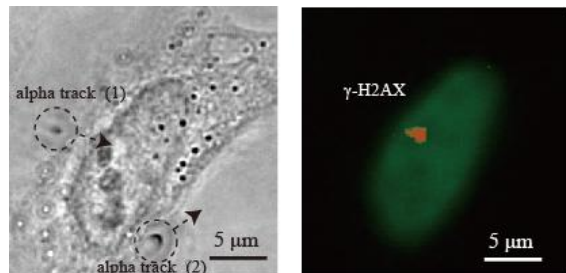
図3 細胞チップ内の HeLa 細胞



(b) 細胞増殖

図4 マイクロチェンバー内の HeLa 細胞の増殖

(2) 図5は α 粒子が貫通した HeLa 細胞の光学顕微鏡像である。HeLa 細胞は $15\mu\text{m}$ 厚さの CR-39 上に培養されている。図5(a)の光学顕微鏡像では、2カ所に α トラックが観察されている。 α トラックの形状は楕円で、その形状から α 線の入射方向を推定することが出来る。また、図5(b)の蛍光顕微鏡像では、細胞核内に1カ所 γ -H2AX によるフォーカスが確認できて、 α トラック(1)の延長上にあることが確認できる。



(a) 光学顕微鏡像 (b) 蛍光顕微鏡像

図5 α 粒子が貫通した細胞の様子

(3) まとめ 固体飛跡検出器 CR-39 を基板に細胞チップを開発した。CR-39 基板上は培養細胞の位置を制御するためのマイクロパターン加工が施されている。細胞チップ内で、HeLa 細胞が培養され、活性化試験、増殖観察により、細胞培養に対して適正をもっていることが確かめられた。

細胞チップの HeLa 細胞には α 線が照射され、アルカリエッチング処理によるトラック形成と蛍光抗体試薬による γ -H2AX (DNA 二重鎖切断) 検出が行われた。 α トラックと細胞核内の DNA 損傷の位置は一致しており、本研究で開発した放射線応答細胞チップの有効性が示された。

今後は、放射線応答細胞チップを用いた、

熱中性子細胞照射実験を行うことを計画している。

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)

[雑誌論文] (計1件)

- ① T. Kuchimaru, F. Sato, S. Tanaka, I. Murata, Y. Kato and T. Iida; "Development of Cell Chip Based on Track Detector for Examination of Biological Damages by Alpha Particles", Journal of Nuclear Science and Technology 47, pp.1206-1210 (2010). (peer-reviewed)
DOI: 10.1080/18811248.2010.9720987

[学会発表] (計3件)

- ① 田中聡一, 豊田康英, 高橋宏典, 佐藤文信, 清水喜久雄, 加藤裕史, 飯田敏行, "単一細胞のX線ビーム照射実験", 日本放射線安全管理学会第9回学術大会, 2010年12月2日、広島大学.
- ② C. Inagawa, Y. Aoi, T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Kato and T. Iida; "Development of Live Cell Chips to Research Effects of X-Ray Radiation to Neuronal Cells", 2nd Asian Congress of Radiation Research, May 17-20 (2009) Seoul, Korea.
- ③ 田中聡一, 稲川千津, 青位裕輔, 牧大介, 佐藤文信, 加藤裕史, 飯田敏行, "X線マイクロビーム照射用神経細胞チップの開発", 日本保健物理学会第43回研究発表会, 平成21年6月3日, 大阪.

[その他]

<http://fusion.eie.eng.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 敏行 (IIDA TOSHIYUKI)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：60115988

(2) 研究分担者

加藤 裕史 (KATO YUSHI)
大阪大学・大学院工学研究科・準教授
研究者番号：40224547

佐藤 文信 (SATO FUMINOBU)
大阪大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：40332746