

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310073

研究課題名(和文)重イオンマイクロビームを用いたバystanダー応答イメージング解析システムの構築

研究課題名(英文)Development of long-term bystander imaging system using heavy-ion microbeam

研究代表者

舟山 知夫 (Funayama, Tomoo)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門・量子ビーム応用研究センター・研究主幹

研究者番号：40354956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：極低線量放射線被曝が生物に及ぼす影響の解明を実現するため、重イオンマイクロビームで細胞にバystanダー効果誘導し、長期ライブイメージングで解析するシステムを開発した。最初に、照射制御やライブイメージングシステムなど複数の目的に応じたソフトウェアを構築できるソフトウェアプラットフォームを開発し、これを用いて集束式重イオンマイクロビーム統合照射制御ソフトウェアを実現、細胞への高速/高精度な照準照射技術を実現した。次に、長期ライブイメージングの実現に必要な試料面への自動合焦制御コードやタイムラプス撮影ライブラリの開発を行い、バystanダー応答イメージング解析システムを完成した。

研究成果の概要(英文)：To explore the molecular mechanisms of heavy-ion induced bystander effect, a system for long-term live imaging of microbeam-irradiated cell sample was developed. As a first step, I developed a software framework for developing multiple software for different experimental purpose. Using the framework, a novel cell targeting software was build, which enables integrated sample irradiation with focusing heavy-ion microbeam. This software enabled a rapid and accurate irradiation of targeted cells with focusing heavy-ion microbeam. Thereafter, I developed software libraries for long-term real-time autofocusing and automatic imaging of the target sample. Finally, these codes were integrated into the software framework to establish a long-term bystander imaging system.

研究分野：放射線生物学

キーワード：量子ビーム医療応用 重イオンビーム マイクロビーム バystanダー効果 低線量放射線影響

### 1. 研究開始当初の背景

極低線量放射線被曝が生物に及ぼす影響の解明は喫緊の重要課題であるが、研究開始当初において  $\mu\text{Sv}$  オーダーの極低線量領域での細胞集団の生物応答機構が十分に解明されたとはいえなかった。

細胞1つ当たりの平均付与線量が、照射する放射線の素反応(ガンマ線なら1電離、イオンなら1ヒット)あたりの付与線量を下回ると、極低線量の被曝を受けた細胞集団では、エネルギーが付与された照射細胞と、付与されない非照射細胞が混在するようになり、放射線誘発バースタンダー効果による影響が顕在化する。このような状況は、高LETの重イオンでは、0.1~1 Gy 以下、LETの低いガンマ線でも、1~10 mGy 以下で生じる。

バースタンダー効果は、放射線に非照射の細胞(バースタンダー細胞)が、近隣の照射細胞の放出した照射シグナル伝達物質によって、細胞死や突然変異誘発、染色体異常誘発などの照射効果を示す現象である。この現象は、1990年代にその存在が明らかにされ、以来、精力的な解明研究が進められてきたが、その機構には、多くの不明な点が残されていた。

研究開始当初時点までにおいて、研究代表者は原子力機構・高崎のイオン照射研究施設に設置したコリメーション式重イオンマイクロビーム装置で細胞を照射する技術を世界で初めて実現し、この技術を用いて重イオン誘発バースタンダー効果の解明研究を実施してきた。さらに、より高度な解析の実現を目指し、極めて精密なビームスポットを形成できる集束式重イオンマイクロビーム装置を用いた細胞への精密な照準照射の実現に至った。

### 2. 研究の目的

これらの背景を踏まえ、研究では、このマイクロビーム細胞照射システムに近年、急速に発展し実用化されてきた細胞内の分子動態を最小1分子から細胞を生かしたまま観察できるライブイメージング技術を組み込み、マイクロビーム照射技術とライブイメージング技術を融合することで強化した照射・観察システムを開発することで、従来の分子生物学的解析法を用いている限り解明することができなかったバースタンダー応答の時間的・空間的動態に関わる諸問題を明らかにすることを目的とした。また、当該システムの開発の過程で得られた成果を、集束式重イオンマイクロビーム装置を用いた細胞への精密な照準照射技術にフィードバックすることで、集束式重イオンマイクロビーム照射技術の高度化も目指した。

### 3. 研究の方法

蛍光観察における励起照明は細胞にとってストレスとなるため、長期ライブイメージングの実現においては、その影響を最小限に

留める必要がある。そのためには、蛍光観察時の励起光照明を最低限に抑えなくてはならないが、この最低限の照明では得られる蛍光シグナルは極めて微弱なものとなる。そこで、この微弱なシグナルを鮮明なイメージング像として取得できる高感度カメラとして、浜松ホトニクス製高感度 CMOS カメラ (ORCA-Flash4.0 型)を導入した。また、長期間の顕微培養は、その過程で顕微鏡フォーカスの変動を生じるため、変動の補正を行う装置が必要となる。そこで、ライブイメージングに用いる電動倒立顕微鏡(オリンパス社 IX81 型)にフォーカスを補正することができるオートフォーカスユニット(オリンパス社 IX81-ZDC2 型)を追加導入した。

新規導入した装置類を含めたシステム全体を制御するソフトウェアの開発では、既存のコリメーション式重イオンマイクロビーム装置用照射制御ソフトウェアを開発の土台とした。このソフトウェアコードに対し、複数カメラの制御を実現するカメラ制御コードのモジュール化および制御インターフェースの共通化の改良を行った。また、アプリケーションコード全体においてもモジュール化を行い、同一コードから照射制御やライブイメージングシステムなど複数の目的に応じた制御ソフトウェアを構築できるように改良を施した。

### 4. 研究成果

最初に、コリメーション式重イオンマイクロビーム装置用照射制御ソフトウェアを開発の土台とし、従来は単一の NTSC ビデオキャプチャユニットにしか対応していなかった、ソフトウェアの画像取得機能を、共通インターフェースを持つ画像キャプチャモジュール単位で組み込むことが可能になるように改良、複数のカメラを当該ソフトウェアで切り替えて使用することを可能とした。次に、導入した高感度 CMOS カメラおよび、これまでの研究で蛍光画像撮影に使用していた冷却 CCD カメラ用の画像キャプチャモジュールを開発し、複数のカメラを有機的に組み合わせることで観察を可能とするイメージングシステム構築の基盤を確立した。

併せて、アプリケーションコード全体においてもモジュール化を行い、同一コードから照射制御やライブイメージングシステムなど複数の目的に応じた制御ソフトウェアを構築できるように改良を施すことで細胞照射・解析システム制御ソフトウェアプラットフォームを確立した。

この細胞照射・解析システム制御ソフトウェアプラットフォームを用いて、蛍光顕微鏡写真撮影ソフトウェアの作製を進め、自動ステージと連動した効率的な細胞画像自動取得を可能とするソフトウェアを実現した。また、このソフトウェアプラットフォームを用いて集束式重イオンマイクロビームシステムで課題となっていた統合照射制御ソフト

ウェアを実現するための開発を行った。

集束式重イオンマイクロビーム装置は、原子力機構・高崎量子応用研究所・TIARAのAVFサイクロトロンに設置されており、最小径 1  $\mu\text{m}$  のビームスポットを形成して大気中に取り出し照射を行うことができる。これまでの研究で、このビームスポットを顕微鏡観察下でシンチレーターを用いて検出し、当該位置に、自動検出した一つ一つの細胞の位置を電動メカニカルステージで重ねることで、細胞を高精度で照準し照射する技術を実現していた。

しかし、この手法を用いる限り、照射精度の向上は望めても、照射速度は電動ステージの駆動速度に制限される。そこで、集束ビームスポットを高速に走査することを可能にするビームスキャナでスポットを細胞位置に重ねることで細胞照射速度を向上することを目的に、顕微鏡で検出した細胞の絶対座標にビームスポットを移動するための、スキャナ印加電圧値を算出するプログラムコードの開発を行った。

開発したコードは、細胞の顕微鏡観察画像の画像解析で取得した画像内の細胞位置情報と、スキャナに電圧を印加していないときのスポット位置情報から、印加電圧あたりのスポット移動距離や XY スキャナの交差角度を踏まえて、個々の細胞位置へスポットを移動するために XY の各スキャナに印加する電圧値を算出する。

このコードを用い、既取得の細胞画像から抽出した座標値をスキャナ印加電圧値に変換し、得られた電圧値のセットを順次スキャナに印加しながら CR-39 を照射することで、画像と同様の細胞分布パターンを描画できるかを検証した結果、イオン飛跡の CR-39 上の分布パターンが、スキャナ電圧を算出するために用いた細胞画像と良く合致していることが確かめられた。

これに併せて、従来、異なる PC・ソフトウェアを用いて別々に制御していた、スキャンビームと顕微鏡、画像取得用カメラの制御を、単一の PC で制御するために、マイクロコントローラーを用いたビームシャッターコントロールボックスと、対応するソフトウェアコードを開発した。このシステムの改良で、細胞試料へのスキャンビーム照射を単一の PC 上の単一のソフトウェアから制御することを可能にした。

これらのスキャンビーム制御に関わるソフトウェアコードを細胞照射・解析システム制御ソフトウェアプラットフォームに組み込み、集束式重イオンマイクロビームシステム統合照射制御ソフトウェアを実現した。

ソフトウェアの機能を検証することを目的に、細胞へのスキャンビーム照射を行った。照射では、ヒト子宮頸がん由来培養細胞株 HeLa の細胞質を Cell Tracker Orange 色素で蛍光生体染色した後に、CR-39 フィルムの上に播種、カプトン膜で覆い、周囲をワセリン

で密封することで、照射中の細胞試料の乾燥を防いだものを用いた。試料を、集束式重イオンマイクロビームシステムの試料台に設置し、蛍光顕微鏡下で可視化した細胞の蛍光像をもとに、ネオンイオン(13.0 MeV/u, LET = 380 keV/ $\mu\text{m}$ )マイクロビームをもちいたスキャンビーム照射を行った結果、CR39 上のエッチピットとして可視化された試料にヒットしたイオン飛跡と細胞位置、および蛍光免疫染色を用いて可視化した細胞 DNA に生成した DNA 二重鎖切断の位置が合致したことで、照準した細胞への正確で高速な照準照射を集束ビームの走査技術を用いて実現できたことを確かめた(図 1)。

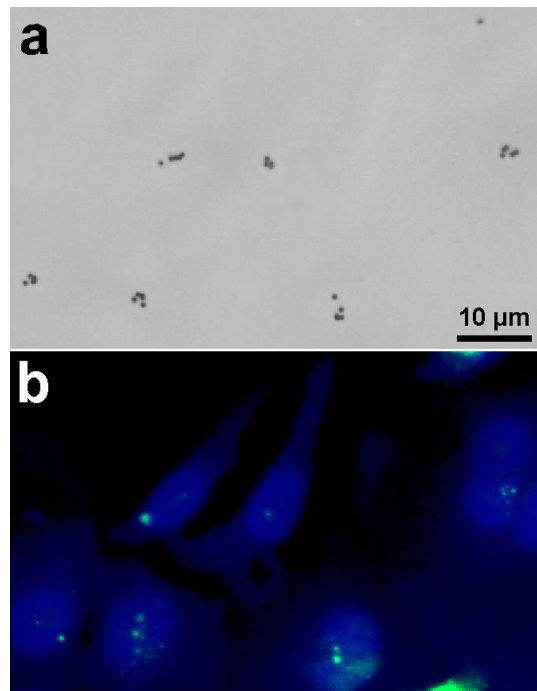


図 1 走査ネオンマイクロビームを用いた細胞の高速/高精度照準照射

蛍光顕微鏡下で可視化した細胞の蛍光像をもとに、ネオンイオンマイクロビームで試料をスキャンビーム照射した。(a) 照射イオン分布の CR-39 フィルムを用いた検出 (b) 抗  $\gamma$ -H2AX 抗体による蛍光免疫染色で検出した照射細胞における生成 DNA 二重鎖切断。イオン飛跡位置に DNA 二重鎖切断の位置が合致したことで細胞への正確で高速な照準照射が確認された。

この集束式重イオンマイクロビームシステム統合照射制御ソフトウェアの開発と並行し、長期ライブイメージングの実現に必要な、電動倒立顕微鏡に付加したオートフォーカスユニットによる試料面への自動合焦制御コードの開発と、経時的に同一細胞の画像データ取得を実現するタイムラプス機能を実現するコードライブラリを開発を行った。

自動合焦制御コードは、オートフォーカスユニットに対応した対物レンズと非対応のレンズを切り替えて制御することで、非対応レンズを用いた試料面への合焦を実現した。

また、タイムラプス機能を実現するコードライブラリは、試料内に設定した複数の観察領域を、指定した画像撮影条件で長期にわたり経時的に観察することを可能とした。

これらのコードライブラリを細胞照射・解析システム制御ソフトウェアプラットフォームに組み込むことで、照射後数日～2週間に及ぶ長期間のライブイメージング観察を実現するバイスタンダー応答イメージング解析システムを完成した(図2)。

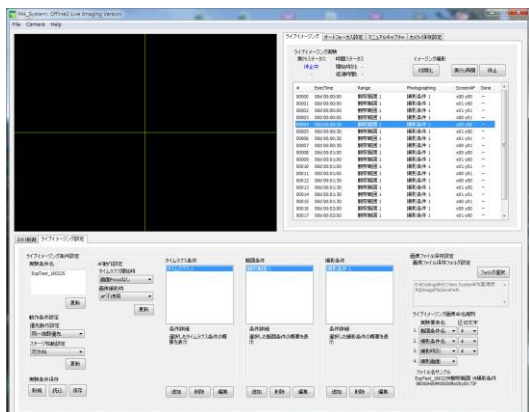


図2 バイスタンダー応答イメージング解析システム

このソフトウェアを用いることで、マイクロビーム照射した試料を長期にわたりライブイメージング観察し、バイスタンダー応答の動態を細胞一つ一つに着目して解析することが可能となる。

最後に本研究課題で得られた成果をまとめる。

- (1) 細胞照射・解析システム制御ソフトウェアプラットフォームを開発した
- (2) 開発したソフトウェアプラットフォームを用い、集束式重イオンマイクロビーム統合照射制御ソフトウェアを実現した
- (3) 集束式重イオンマイクロビーム統合照射制御ソフトウェアを用いて CellTracker Orange 色素を用いて生体蛍光染色した細胞をネオンイオンマイクロビームでスキャンビーム照射し、細胞への高速/高精度な照準照射技術を実現した
- (4) 電動蛍光倒立顕微鏡に設置したオートフォーカスユニットによる試料面への自動合焦制御コードの開発と、経時的に同一細胞の画像データ取得を実現するタイムラプス機能を実現するコードライブラリの開発を行い、マイクロビーム照射試料の長期ライブイメージングシステムを実現するソフトウェアを完成した

## 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 Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota,

Michiyo Suzuki, Tetsuya Sakashita, Yasuhiko Kobayashi. Target Irradiation of Individual Cells Using Focusing Heavy-Ion Microbeam of JAEA-Takasaki (VI): Development of Novel Cell Targeting Software for Integrated Sample Irradiation with Microbeam. JAEA-Review 2015-22, JAEA Takasaki Annual Report 2014 (査読無), p. 65, 2015 年.  
DOI: 10.11484/jaea-review-2014-050

- ② Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota, Michiyo Suzuki, Tetsuya Sakashita, Yasuhiko Kobayashi. Target Irradiation of Individual Cells Using Focusing Heavy-Ion Microbeam of JAEA-Takasaki (V): Irradiation of Individual Cells with Scanned Heavy-ion Microbeam. JAEA-Review 2014-50, JAEA Takasaki Annual Report 2013 (査読無), p. 73, 2014 年.

- ③ Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota, Tetsuya Sakashita, Yasuhiko Kobayashi. Target Irradiation of Individual Cells Using Focusing Heavy-Ion Microbeam of JAEA-Takasaki (IV): An Improvement of Control Pathway of Scanned Beam Irradiation for “Actual” Cell Sample Irradiation. JAEA-Review 2013-059, JAEA Takasaki Annual Report 2012 (査読無), p. 72, 2013 年.

- ④ Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota, Tetsuya Sakashita, Yasuhiko Kobayashi. Target Irradiation of Individual Cells Using Focusing Heavy-Ion Microbeam of JAEA-Takasaki (III): A Development of Rapid Cell-Targeting System Using Beam Scanner. JAEA-Review 2012-046, JAEA Takasaki Annual Report 2011 (査読無), p. 63, 2013 年.

- ⑤ Yasuko Mutou-Yoshihara, Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota and Yasuhiko Kobayashi. Involvement of bystander effect in suppression of the cytokine production induced by heavy-ion broad beams. Int. J. Radiat. Biol. (査読有), 88 巻, p.258-266, 2012 年.  
DOI: 10.3109/09553002.2012.636138

[学会発表] (計12件)

- ① 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 鈴木 芳代, 坂下 哲哉, 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 (VI). 第10回高崎量子応用研究シンポジウム, 日本原子力研究開発機構・高崎量子応用研究所 (群馬県・高崎市), 10月8-9日, 2015.

- ② Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota, Tetsuya Sakashita, Michiyo Suzuki, Yasuhiko Kobayashi. Focusing Heavy-ion Microbeam System of JAEA-Takasaki. The 12th International Workshop on Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, 若狭湾エネルギー研究センター (福井県・敦賀市), Japan, May 31-June 2, 2015.
- ③ Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota, Tetsuya Sakashita, Michiyo Suzuki, Hiroko Ikeda, Yasuhiko Kobayashi. Target irradiation of Cells and Individuals with Heavy-ion Microbeams of JAEA-Takasaki. 15th International Congress of Radiation Research, 京都国際会館 (京都府・京都市), May 25-29, 2015.
- ④ 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 鈴木 芳代, 坂下 哲哉, 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 (V). 第9回高崎量子応用研究シンポジウム, 高崎シティーギャラリー (群馬県・高崎市), 10月9-10日, 2014.
- ⑤ 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 坂下 哲哉, 鈴木 芳代, 小林 泰彦. 集束式重イオンマイクロビームを用いた細胞への高速走査照射技術の開発. 日本放射線影響学会第57回大会, かごしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市), 2014年10月1-3日, 2014.
- ⑥ 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 鈴木 芳代, 池田 裕子, 坂下 哲哉, 小林 泰彦. 原子力機構・高崎の生物照射用マイクロビーム装置. 日本マイクロビーム生物研究会第4回連絡会議, ホテルクラウンパレス青森 (青森県・青森市), 10月18日, 2013.
- ⑦ 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 坂下 哲哉, 鈴木 芳代, 池田 裕子, 小林 泰彦. 原子力機構・高崎における重イオンマイクロビーム照射技術開発の現状. 日本放射線影響学会第56回大会, ホテルクラウンパレス青森 (青森県・青森市), 10月18-20日, 2013.
- ⑧ 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による細胞の照準照射 (VI). 第8

回高崎量子応用研究シンポジウム, 高崎シティーギャラリー (群馬県・高崎市), 10月10-11日, 2013.

- ⑨ Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota, Michiyo Suzuki, Hiroko Ikeda, Tetsuya Sakashita, Yasuhiko Kobayashi. Recent Progress in Development of Heavy-Ion Microbeam Systems of JAEA-Takasaki. 11th International Workshop on Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, Bordeaux (France), Oct 3-4, 2013.
- ⑩ Tomoo Funayama, Yuichiro Yokota, Tetsuya Sakashita, Michiyo Suzuki, Hiroko Ikeda, Yuya Hattori, Yasuhiko Kobayashi. Current Status of Heavy-ion Microbeam Systems of JAEA-Takasaki. 3rd Asian Congress of Radiation Research, Beijing (China), May 10-13, 2013.
- ⑪ 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による細胞の照準照射 (III). 第7回高崎量子応用研究シンポジウム, 高崎シティーギャラリー (群馬県・高崎市), 10月11-12日, 2012.
- ⑫ 舟山 知夫, 横田 裕一郎, 池田 裕子, 小林 泰彦. 放射線のエネルギー付与の微視的空間分布における不均一性とマイクロビーム. 日本放射線影響学会第55回大会, 東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市), 日本, 9月6-8日, 2012.

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
舟山 知夫 (FUNAYAMA TOMOO)  
国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門・量子ビーム応用研究センター・研究主幹  
研究者番号: 40354956