

Title	細胞における放射線効果の解析にむけたX線マイクロビームシステムの開発
Author(s)	口丸, 高弘
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/855">https://hdl.handle.net/11094/855</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

細胞における放射線効果の解析にむけた  
X線マイクロビームシステムの開発

2009年1月

口丸 高弘

# 要旨

本論文は、細胞での放射線効果の解析にむけた X 線マイクロビームシステムの開発についてまとめたものである。卓上型 X 線マイクロビーム照射装置の開発、単一細胞におけるマイクロドジメトリの評価、マイクロビーム照射効果分析のための細胞培養チップの開発と、それらを組み合わせた単一細胞照射実験について述べた。

開発した卓上型 X 線マイクロビーム照射装置においては、顕微鏡観察下の単一細胞を選択的に照射可能である。装置は、マイクロフォーカス X 線管、X 線集光素子のガラスキャピラリと倒立型顕微鏡によって構成されている。生成された X 線マイクロビームのサイズ、強度などについて、測定実験、シミュレーションから評価し、直径約 10  $\mu\text{m}$  [FWHM]の X 線マイクロビームを顕微鏡観察下の単一細胞に照射可能であることを確かめた。また、ガラスキャピラリによる X 線マイクロビームの輸送モデルを構築し、光子・電子輸送モンテカルロ計算コードである EGS4 を用いて、X 線マイクロビームによる単一細胞に対するマイクロドジメトリについて評価した。その結果、単一細胞照射研究に十分な 0.3 Gy/s の線量付与が見積もられ、ターゲット細胞以外の周辺細胞において散乱電子などによる影響が十分小さいことを確認した。

また、単一細胞における X 線マイクロビーム照射効果を分析するために、単一細胞の格納が可能なマイクロチャンバーを集積した細胞培養チップを開発した。マイクロチャンバーアレイはフォトリソグラフィによって感光性樹脂を微細加工することで作製した。作製したチップでの細胞培養に関する特性試験をおこない、細胞照射研究に有効な手法となることを確認した。さらに、細胞でのマイクロビーム照射効果についてより高度な解析をおこなうためのマイクロパターンニング培養手法について考案し、評価試験をおこなった結果、空間選択性の高いマイクロパターンニング培養が可能であることを示した。

そして、X 線マイクロビーム照射装置と細胞培養チップを組み合わせた、単一細胞照射・分析手法を用いて細胞照射実験をおこなった。その結果、X 線マイクロビーム照射細胞に特定のたんぱく質の産生、DNA 損傷などの放射線効果に関するデータを取得することに成功し、本研究で開発した単一細胞照射・分析手法が、今後のマイクロビームを用いた細胞照射研究において有効となることを示した。

# 目次

<b>第1章 緒論</b> .....	1
1.1 量子マイクロビームを用いた細胞照射研究.....	1
1.2 単一細胞分析技術の開発.....	3
1.3 本研究の目的と論文構成.....	4
参考文献.....	5
<b>第2章 卓上型 X 線マイクロビーム照射装置</b> .....	7
2.1 緒言.....	7
2.2 卓上型 X 線マイクロビーム照射装置の構成.....	7
2.2.1 X 線マイクロビームの生成.....	10
2.2.2 ガラスキャピラリによる X 線の集光.....	13
2.2.3 細胞観察系の構築.....	18
2.3 X 線マイクロビームの特性試験.....	19
2.3.1 サイズ測定.....	19
2.3.2 照射強度の見積もり.....	25
2.3.3 単一細胞照射試験.....	26
2.4 レーザープローブによるマイクロビーム照射実験の高度化.....	29
2.4.1 光ピンセットによる細胞位置操作.....	30
2.4.2 レーザー蛍光法による細胞応答観察.....	32
2.5 結言.....	33
参考文献.....	34
<b>第3章 単一細胞に対するマイクロドジメトリ</b> .....	36
3.1 緒言.....	36
3.2 ガラスキャピラリによる X 線マイクロビーム輸送モデルの構築.....	36
3.2.1 X 線輸送計算モデル.....	36
3.2.2 X 線輸送計算.....	38
3.3 光子・電子輸送計算コードによる微小領域での線量付与評価.....	41

3.3.1 EGS4 を用いた微小領域への線量付与計算.....	41
3.4 結言.....	48
参考文献.....	49
<b>第 4 章 細胞培養チップ.....</b>	<b>50</b>
4.1 緒言.....	50
4.2 フォトリソグラフィによる細胞培養チップの作製.....	50
4.2.1 フォトリソグラフィ微細加工.....	50
4.2.2 マイクロチャンバーアレイチップの作製.....	51
4.2.3 微細構造の評価.....	53
4.3 マイクロチャンバーアレイチップでの細胞培養.....	54
4.3.1 蛍光試薬を用いた細胞活性試験.....	56
4.3.2 細胞増殖特性の評価.....	56
4.3.3 細胞培養密度の最適化.....	56
4.4 マイクロパターニング培養技術の開発.....	58
4.4.1 細胞のマイクロパターニング培養手法.....	59
4.4.2 培養チップの作製.....	61
4.4.3 細胞培養試験.....	65
4.5 結言.....	68
参考文献.....	69
<b>第 5 章 単一細胞照射による放射線効果.....</b>	<b>71</b>
5.1 緒言.....	71
5.2 神経細胞における放射線効果の調査.....	72
5.2.1 神経モデル細胞 PC12 における放射線効果.....	72
5.2.2 PC12 における放射線効果の調査.....	73
5.3 X 線マイクロビーム照射効果の解析.....	77
5.3.1 X 線マイクロビーム照射実験.....	77
5.4 バイスタンダー効果の解析.....	80
5.4.1 PC12 細胞における細胞応答解析.....	80
5.5 結言.....	82
参考文献.....	83

第6章 結論.....	85
付録.....	87
A 光ピンセットの原理・理論解析.....	87
B 生物実験プロトコル.....	93
謝辞.....	102
研究業績.....	104

# 第1章 緒論

## 1.1 量子マイクロビームを用いた細胞照射研究

イオン, X線, 電子や高強度レーザーをビーム形成した量子ビーム技術は, 基礎研究, 産業の様々な分野において必要不可欠なものとなっている. 例えば, 半導体材料へのイオン注入, イオン, X線ビームによる表面元素分析や電子顕微鏡など, 材料加工, 分析やイメージング技術の基盤をおおいに担っている. 加えて近年, 放射線癌治療技術や, CT などの高度治療・診断技術など医学産業分野への利用も活発である. 応用分野の拡大とともに, ビーム技術も多様な進歩を遂げており, 電子工学や材料工学が扱うサイズの微小化に従って, 量子ビームを微小領域に収束させる技術が開発されてきた[1].

そして, 近年, 量子マイクロビーム技術は, 生体組織や生物細胞の特定領域に電離性放射線を照射する手法として注目されている. 図 1.1.1 に示すように 1 細胞より小さなサイズ(~10  $\mu\text{m}$ )まで収束させた量子マイクロビームを大気下に取り出し, 生細胞集団中の任意の細胞を狙って照射する, または, 細胞の特定部位のみを照射することが可能になり, 従来の照射手法では不可能であった様々な実験を遂行することが可能になった[2]. このマイクロビームを用いた細胞照射研究によって, 新たな放射線生物学的な知見が見出されることが期待されている. 例えば, 1990 年初頭に報告されたバイスタンダー効果と呼ばれる, 細胞集団中で照射細胞から非照射細胞に放射線効果が伝達される現象や[3], また, 低線量領域の非線形的な放射線効果などが解明されることで[4], 生

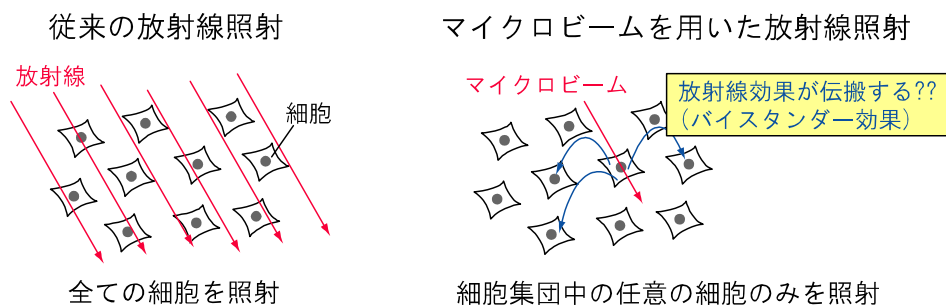


図 1.1.1 量子マイクロビームを用いた細胞照射の概略図

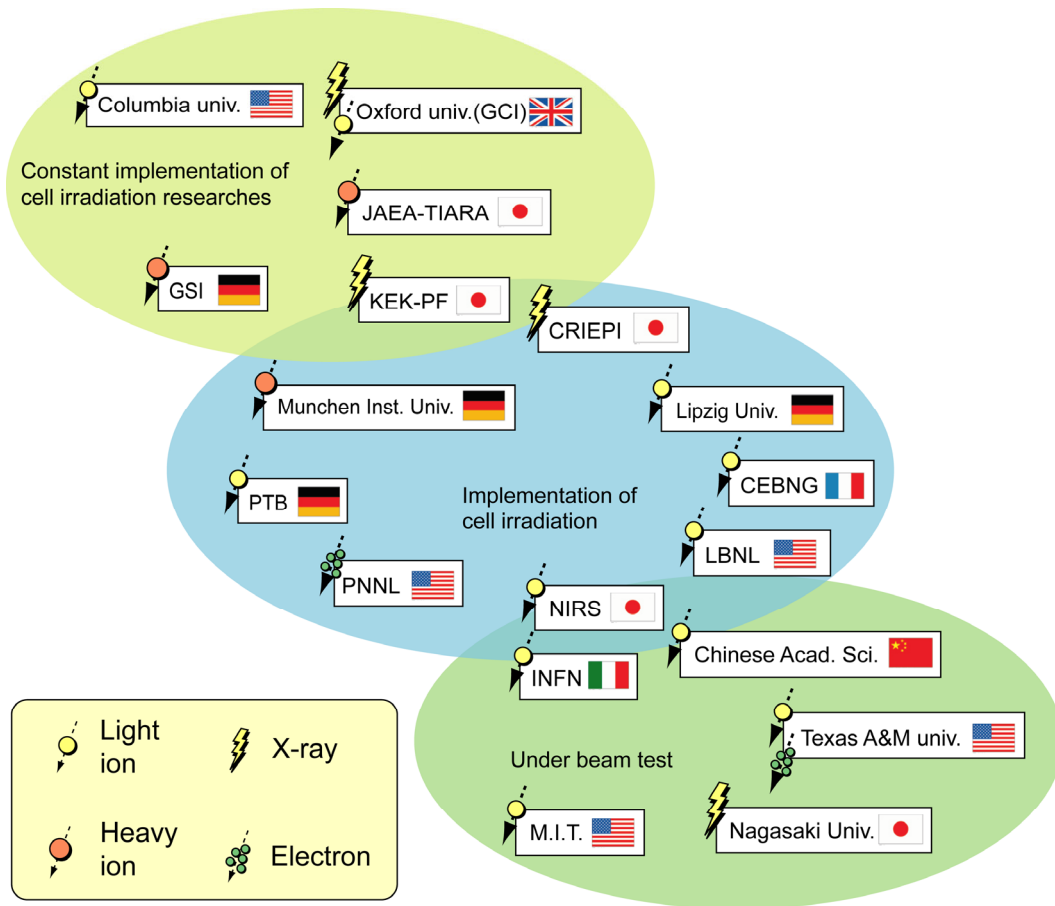


図 1.1.2 世界各国のマイクロビーム照射装置の利用・開発の動向

物学的な放射線影響をより正確に理解することに繋がり、高度放射線癌治療法の開発や、放射線の生体へのリスク評価などにおいて重要な知見となると考えられている。

現在、世界各地で細胞照射用マイクロビーム装置の開発が活発に取り組まれている(図 1.1.2)[5-8]。これまでに、細胞照射研究を実現しているマイクロビームシステムは、加速器や放射光施設といった大型装置に細胞照射用のビームラインを構築した研究施設[9,10]が主であったが、マシンタイムの制約による実験効率の低さが問題になっており、今後、マイクロビームを用いた細胞照射研究によって得られた生物学的な知見においても、十分な回数 of 検証実験をおこなう必要がある。そこで、小型化が可能な X 線や電子線マイクロビーム照射装置に関しては実験効率の高い、細胞照射研究専用の小型装置の開発がマイクロビーム細胞照射研究の進展にむけて急務となっている。



## 1.2 単一細胞分析技術

これまでにこなわれてきたマイクロビームを用いた細胞照射研究での、生物学的な分析においては、細胞集団中の一部の細胞を照射した後に、系全体にどのような放射線効果が現れるかを分析することで、バイスタンダー効果のような放射線効果を評価してきた。このような分析においては、照射後、マイクロビーム照射細胞と非照射細胞が必ずしも個々の細胞として区別されておらず[2, 11]、マイクロビーム照射効果をより正しく理解するためには、照射細胞と非照射細胞の確実な同定手法の必要性が求められている。

現在、先端的な医学・生物学研究分野においては、個々の単一細胞の分析をおこなう手法として、工学技術を取り入れた細胞分析のためのチップ型デバイスの導入が進んでいる(図 1.2.1)。このようなチップ型デバイスは、半導体デバイスの作製などに用いられてきた、微細加工技術によって、細胞の培養・分析のためのナノ・マイクロメートルサイズの微細構造を、チップ上に集積したものであり[14]、特殊な培養環境下での細胞観察・分析[15,16]や、その空間サイズによる分子の拡散速度の速さを利用して反応時間の飛躍的な短縮を目指した、新しい分析プラットフォーム[17]として期待されている。マイクロビームを用いた細胞照射実験においても、最適な微細構造を有するチップ型デバイスの開発によって、照射一細胞の分析、ひいてはバイスタンダー効果の解析など、細胞レベルでの放射線効果の分析に有効なツールとなることが考えられる。

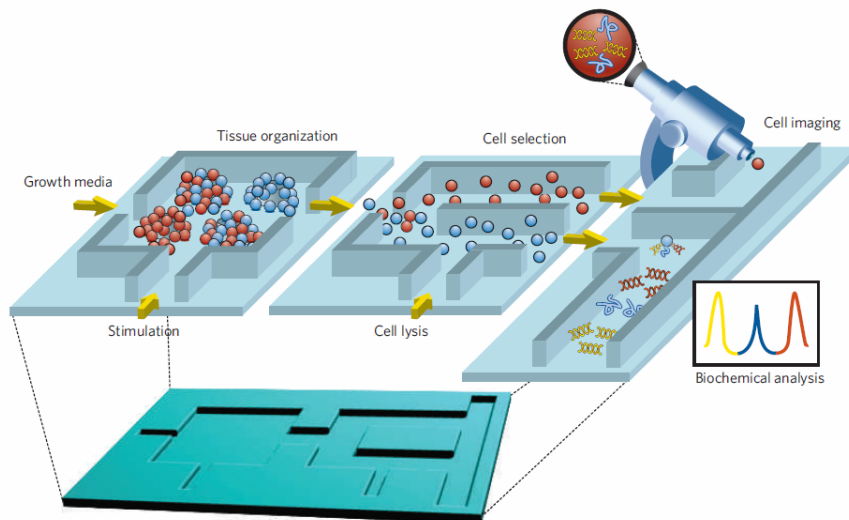


図 1.2.1 細胞研究のためのチップ型デバイスの概念図[14]

### 1.3 本研究の目的と論文構成

本研究では、顕微鏡観察下の単一細胞を選択的に照射可能であり、卓上型 X 線マイクロビームシステムの開発をおこなった。また、X 線マイクロビーム照射後の細胞を高精度に分析するために、フォトリソグラフィによる微細加工技術を用いて、単一の細胞を格納できるマイクロチャンバーを集積した細胞培養チップの開発をおこなった。そして、X 線マイクロビーム照射装置と細胞培養チップを用いて、高精度・高効率な単一細胞照射による放射線効果の解析手法を考案した。

本論文は、上記を目的として以下の各章から構成されている。

第2章では、開発した卓上型 X 線マイクロビーム照射装置の概要を述べている。X 線マイクロビームの特性を、測定実験、計算コードによるシミュレーションによって評価した。

第3章では、X 線マイクロビームによるマイクロドジメトリについて述べている。ガラスキャピラリーによる X 線マイクロビームの輸送モデルの構築をおこない、光子・電子輸送計算コードである EGS4 を用いて、X 線マイクロビームによる単一細胞への線量付与を評価した。

第4章では、単一細胞照射研究のための細胞培養チップについて述べている。フォトリソグラフィ微細加工技術を用いた細胞培養チップの作製工程、細胞培養のためのチップの特性を評価した。

第5章では、X 線マイクロビーム照射された神経様細胞における放射線効果(DNA 損傷、バイスタンダー因子の産生)について生物学的な分析手法を用いて調べ、バイスタンダー効果の誘発について考察した。

第6章は以上より得られた知見を総括した、結論を述べている。

## 参考文献

- [1] 世界物理年フォーラム「量子ビーム・テクノロジー革命」実行委員編, 「量子ビームテクノロジー革命」, シュプリンガー・ジャパン, (2006).
- [2] K. M. Prise et al., “Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam”, *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol.74, pp.793-798 (1998).
- [3] H. Nagasawa et al., “Induction of sister chromatid exchanges by extremely low dose of  $\alpha$ -particles”, *Cancer Res.*, Vol.52, pp.6394-6396 (1992).
- [4] K. M. Prise et al., “New insight on cell death from ionizing radiation”, *Lancet Oncol.*, Vol.6, pp.520-528 (2005).
- [5] R-P. Gerhard et al., “The Columbia university single-ion microbeam”, *Radiat. Res.*, Vol. 156, pp.210-214 (2001).
- [6] K. Kobayashi et al., “Development of microbeam irradiation system for radiobiology”, *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A*, Vol.467-468, pp.1329-1332 (2001).
- [7] M. B. Sowa et al., “A variable-energy electron microbeam: A unique modality for targeted low-LET radiation”, *Radiat. Res.*, Vol.164, Issue 5, pp.695-700 (2005).
- [8] 舟山知夫 他, “世界各国の生物照射用マイクロビーム装置の動向”, *KEK Proceedings of Workshop on Cellular Responses to Radiation Using Microbeam Cell Irradiation Systems*, pp.70-71 (2008).
- [9] K. Kobayashi et al., “Synchrotron X-ray microbeam irradiation system for radiobiology”, *J. Biomed. Nanotechnology*, Vol.2, No.2, pp.116-119 (2006).
- [10] A. C. Thompson et al., “A synchrotron-based X-ray exposure station for radiation biology experiments”, *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A*, Vol. 582, pp. 226-228 (2007).
- [11] L. J. Wu et al., “Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 96, pp. 4959-4964 (1999).
- [12] S. T. Al Rashid et al., “Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks in vivo”, *Cancer Res.*, Vol.65, pp.10810-10821 (2005).
- [13] G. Schettino et al., “Low-dose studies of bystander cell killing with targeted soft X-rays”, *Radiat. Res.*, Vol.160, Issue.5, pp.505-511 (2003).
- [14] J. El-Ali et al., “Cells on chips”, *Nature*, Vol.442, pp.403-411 (2006).
- [15] H. Moriguchi et al., “An agar-microchamber cell-cultivation system: flexible change of microchamber shapes during cultivation by photo-thermal etching”, *Lab Chip*, No.2, pp.125-130 (2002).
- [16] G. P. Gross et al., “Applications of microfluidics for neuronal studies”, *J. Neurol. Sci.*, Vol. 252, pp.135-143 (2007).

- [17] H. A. Stone et al., “Engineering flows in small devices: microfluidics toward a lab-on-a-chip”, *Annu. Rev. Fluid Mech.*, Vol.36, pp.381–411 (2004).

## 第2章 卓上型 X 線マイクロビーム照射装置

### 2.1 緒言

近年、X 線は可視光の回折限界を超えた超解像度を実現する X 線顕微鏡や[1]、X 線リソグラフィ[2]などへの応用が進められており、それらの実現に向けて、光学素子の開発や集光技術についても研究が進んでいる[3]。そして、X 線マイクロビーム技術を用いて細胞集団中の単一細胞の照射が実現され、生物・医学分野の基礎研究において新しい研究手法として確立しつつある状況で、駆動率の高い小型装置の開発が急務となっている[4]。

本章では開発した卓上型 X 線マイクロビーム照射装置についてその構成と特性について述べる。また、X 線集光素子であるガラスキャピラリの集光原理について述べ、生成された X 線マイクロビームの特性試験を行い、単一細胞照射が可能であるか評価した。最後に X 線マイクロビーム照射実験の高度化を図る目的でレーザープローブを導入したシステムについて述べた。

### 2.2 卓上型 X 線マイクロビーム照射装置の構成

卓上型 X 線マイクロビーム照射装置の概略図を図 2.2.1、その写真を図 2.2.2 に示す。卓上型 X 線マイクロビーム照射装置は、堀場製作所が製品化している X 顕微鏡の XGT-5000 の X 線マイクロビーム生成部と、倒立型顕微鏡を組み合わせることで構成されている[5]。マイクロフォーカス X 線管で発生した X 線は、ガラスキャピラリーによって集光され、マイクロビームとして大気下に取り出される。そして、倒立型顕微鏡の XYZ 電動試料ステージ(位置精度:1  $\mu\text{m}$ )に設置された、細胞試料を正確にマイクロビーム照射することができる。照射室は、生体試料の活性に適した、37°C 雰囲気にて保たれている。試料観察用のハロゲン照明が、穴あきミラーを用いて試料上に投光されており、試料の観察に用いる対物レンズは、X 線マイクロビームとのアライメント調整のため電動ステージ上に設置されている。倍率は 20 倍と 40 倍から選択することができる。また、ガラスキャピラリーの出口近傍に取り付けられたシリコン半導体検出器を用いて、照射試料から発生する蛍光 X 線を検出し、MCA(Multi Channel Analyzer)によって、エネルギー弁別をおこなうことで元素分析が可能である。画像取得用の CCD カメラなどが接続された光学系は、レーザー光を試料位置に導入することが可能であり、詳細は 2.4 節にて述べる。

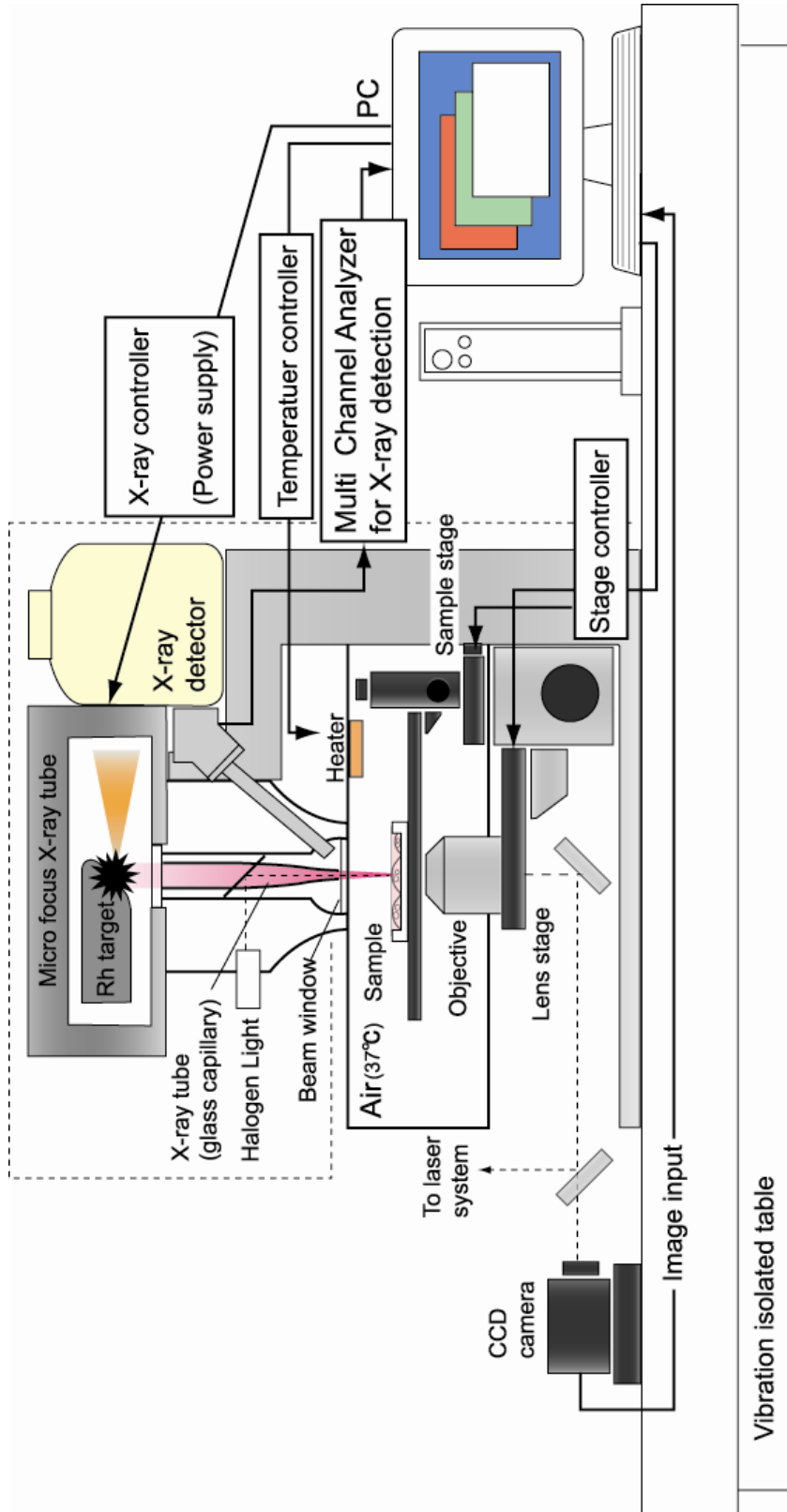


図 2.2.1 卓上型 X 線マイクロビーム照射装置の概略図

第2章 卓上型 X 線マイクロビーム照射装置



図 2.2.2 卓上型 X 線マイクロビーム照射装置の写真

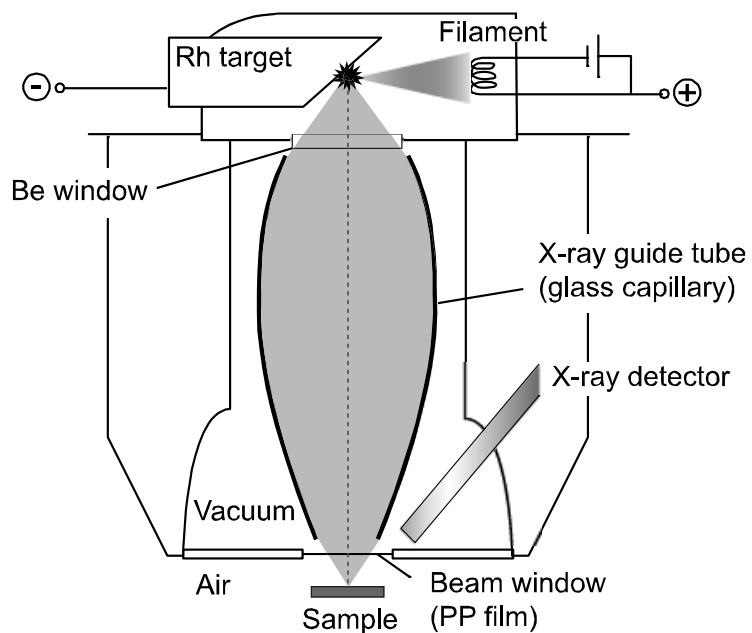


図 2.2.3 X 線マイクロビーム生成部のレイアウト

### 2.2.1 X 線マイクロビームの生成

X 線マイクロビーム生成部のレイアウトを図 2.2.3 に示す。X 線の生成にはマイクロフォーカス X 線管を使用しており、タングステンフィラメントに電流(~1 mA)を流し、放出された熱電子を電界加速(~50 kV)して、ロジウムターゲット上でおよそ 30  $\mu\text{m}$  に収束されせることで X 線を発生させる。発生した X 線はベリリウム窓から、X 線導管(ガラスキャピラリ)に入射し、集光されることで X 線マイクロビームが生成される。

X 線発生部からガラスキャピラリの入り口までの距離は 30 mm、キャピラリの長さは 125 mm である [6]。また、キャピラリが設置してあるチャンバーには蛍光 X 線分析用のシリコン半導体検出器が設置してあり、低エネルギーの特性 X 線検出のため、100 Pa 以下に排気している。そして、X 線マイクロビームは、厚さ 4  $\mu\text{m}$  のポリプロピレンフィルム(PP)素材のビーム窓から、大気下へと取り出される。以下に、X 線の発生原理と、ガラスキャピラリによる X 線の集光原理について述べる。また、X 線生成部に設置された、半導体検出器を用いた蛍光 X 線分析についても述べる。

#### ・ X 線の発生原理

X 線の発生は、図 2.2.3 に示したように、フィラメント(陰極)と金属ターゲット(陽極)に高圧電源のマイナスとプラスを接続し、フィラメントから放出された熱電子を加速してターゲットに衝突させる[7]。この時、電子の運動エネルギーの大部分は放射線と熱に変換されてエネルギーを失う。その時の X 線生成変換効率  $\varepsilon$  は

$$\varepsilon = 1.1 \times 10^{-9} ZV \quad (2.2.1)$$

で近似することができ、 $V$ : 加速電圧[kV](X 線管電圧)、 $Z$ : ターゲット元素の原子番号である。電子の運動エネルギーの~1 %程度が X 線のエネルギーに変換され、99 %は熱に変わるため、ターゲット表面は非常に高温になる。したがって、ターゲット材料には、融点の高いタングステンやモリブデンなどが用いられる。

先に記述したように、得られる X 線スペクトルは、広く連続的に分布した連続 X 線スペクトルと元素固有の線スペクトルである特性 X 線スペクトルによって成っている。一定電圧で電子を加速して X 線を発生させた場合、その連続 X 線スペクトルには、短波長側に明瞭な限界が存在する。最短波長  $\lambda_m$  は電子がターゲットに衝突する際、電子のもつ全運動エネルギーが、X 線光子に変わった場合にみられる。従って、最短波長はターゲット物質の種類によらず、電子の加速電圧のみに影響される。最短波長  $\lambda_m$  と電子の加速電圧  $V$  の関係を次に示す。

$$\lambda_m = \frac{hc}{eV} \quad (2.2.2)$$



ここで,  $e$ : 電子の電荷,  $h$ : プランク定数,  $c$ : 光速である. 連続 X 線は, 電子がターゲットに衝突する際, 電子のもつ運動エネルギーの一部が X 線に変わる場合, すなわち制動放射によって生成される. その強度  $I$  は X 線管電圧  $V$  と共に増加し X 線管の管電流  $i$  とすると,

$$I \propto iV^2Z \quad (2.2.3)$$

となる.

特性 X 線の波長は, ターゲット物質を構成する元素について固有の値をとり, これらは K, L, M, . . . 等の系列に分類される. 各系列波長は  $K < L < M < . . .$ , の順になっている. 各系列は近接した数個の波長群より構成されている. たとえば K 系列は  $K_{\alpha 1}$ ,  $K_{\alpha 2}$ ,  $K_{\beta 1}$ , . . . , L 系列は,  $L_{\alpha 2}$ ,  $L_{\beta 1}$ , . . . である. 図 2.2.4 に示すように, 入射電子の運動エネルギーが電子の原子核への結合エネルギーより大きくなれば, その殻から電子をたたき出す(光電効果)によって, K 殻の電子が励起された場合には, その空席に L, M, N, . . . 殻の電子が入りこむ時に, K 系列の特性 X 線が発生し, その波長は次式で与えられる.

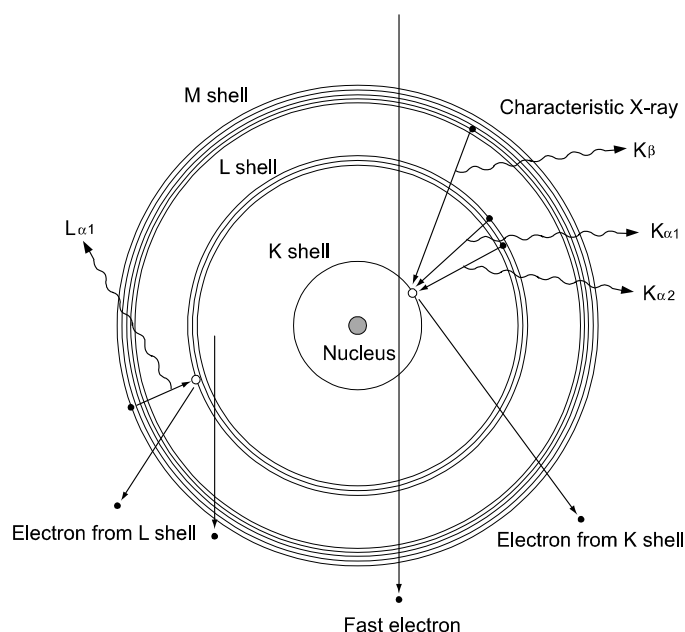


図 2.2.4 特性 X 線の発生機構の概略図

$$E_n - E_k = h\nu_k = h \frac{c}{\lambda_k} \quad (2.2.4)$$

$E_n$ : L, M, N, ... 殻電子のエネルギー,  $E_k$ : K 殻電子のエネルギー,  $\lambda_k$ : K 系列の特性 X 線の波長である.  $K_{\alpha 1}$ ,  $K_{\alpha 2}$  本の線は, 波長が非常に近接しているため普通一本とみなし, これを  $K_{\alpha}$  とよぶ.

双方の遷移確率比は 2:1 であるから,  $K_{\alpha}$  の波長  $\lambda_{k\alpha}$  はこれらの加重平均で与えられる.

$$\lambda_{k\alpha} = \frac{1}{3}(2\lambda_{k\alpha 1} + \lambda_{k\alpha 2}) \quad (2.2.5)$$

$\lambda_{k\alpha 1}$ :  $K_{\alpha 1}$  線の波長,  $\lambda_{k\alpha 2}$ :  $K_{\alpha 2}$  線の波長とした. ターゲットに加速電子を衝突させたとき, その運動エネルギーがターゲット元素の束縛された電子を解放するのに必要な最小加速電圧を, 励起電圧という. K 線を励起するには, K 吸収端のエネルギー以上の励起電圧が必要となる. 特性 X 線の強度  $I$  は, 次の実験式で与えられる.

$$I \propto i(V - V_0)^n \quad (2.2.6)$$

ここで,  $V$ : X 線管電圧,  $i$ : X 線管電流,  $V_0$ : 励起電圧,  $n$ : 管電圧に対する定数であり,  $V$  が  $V_0$  の 2~3 倍なら  $n=2$ ,  $V > 3 V_0$  ならば  $n=1$  となり, 強度の割合は減少する. 本装置で X 線生成のためのターゲット材料に用いられているロジウム(原子番号: 45)の X

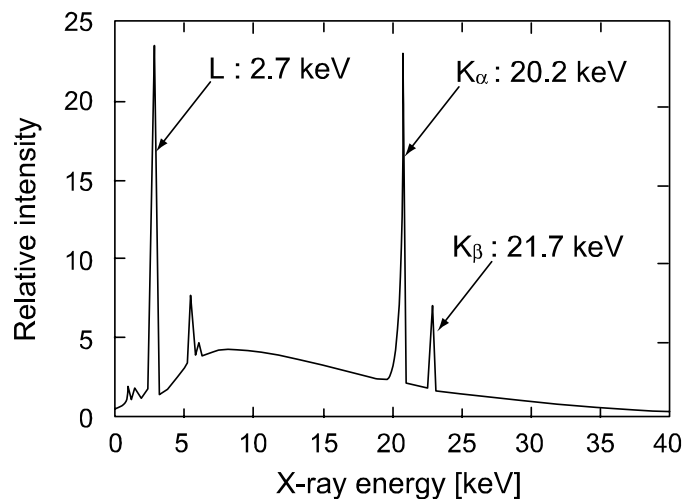


図 2.2.5 ロジウムの X 線エネルギースペクトル

線エネルギースペクトルを図 2.2.5 に示す.  $E=2.7 (L_{\alpha}), 20.2 (K_{\alpha}), 21.7 (K_{\beta})$  keV 付近に特性 X 線によるピークが見られる.

### 2.2.2 ガラスキャピラリによる X 線の集光

X 線の物質に対する屈折率は 1 よりわずかに小さな値であり [8], 凹レンズを用いれば集光は可能であるが, その屈折角は非常に小さいため, 有効な X 線集光能力を有したレンズやプリズムは, 可視～赤外の光を扱う光学素子のように簡単に作製することができない. これが X 線の集光を困難にしている原因である. しかし, X 線の集光技術は様々な用途に要望が多く, 湾曲結晶ミラー, 多層膜ミラーや回折レンズ(ゾーンプレート)[9,10]及び X 線導管などを用いて集光が可能である. 回折現象を用いた技術は, 回折条件が X 線の波長によって決まるため, 単色のみの X 線しか集光できない. そこで, 本装置では, 白色線スペクトルに対応した, X 線導管(ガラスキャピラリ)によって X 線を集光している. ここでは, X 線の全反射現象, ガラスキャピラリの特徴と集光原理を説明する.

#### ・ X 線の全反射現象

ガラスキャピラリによる X 線の集光は X 線の全反射現象[8]を利用して, X 線の集光をおこなう. 物質表面に対し X 線が臨界角よりも小さな視野角で入射すると, 全反射を起こす. X 線に対する物質の屈折率  $n$  は

$$n=1-\delta-i\beta \quad (2.2.7)$$

と表される.  $\delta$ と $\beta$ は

$$\delta = \frac{Nr_0}{2\pi} \lambda^2 f_1 \quad (2.2.8)$$

$$\beta = \frac{Nr_0}{2\pi} \lambda^2 f_2 \quad (2.2.9)$$

であり,  $10^{-5} \sim 10^{-6}$  程度の値になる. ここで  $N$ : 単位体積中の原子数,  $r_0$ : は古典電子半径であり,

$$r_0 = \frac{e^2}{mc^2} = 2.818 \times 10^{-13} [\text{cm}] \quad (2.2.10)$$

である.  $f_1, f_2$  はそれぞれ入射 X 線に対する試料の原子散乱因子  $f$  の実部と虚部であり,

$\lambda$  は入射 X 線の波長である。試料が単体でなく数種類の元素から成る場合には、第  $k$  番目の元素の単位体積中の原子数を  $N_k$ 、原子構造因子の実部、虚部をそれぞれ  $f_{1k}$ 、 $f_{2k}$  とすると、 $Nf_1$ 、 $Nf_2$

$$Nf_1 = \sum_k N_k f_{1k} \quad (2.2.11)$$

$$Nf_2 = \sum_k N_k f_{2k} \quad (2.2.12)$$

のように置き換える。この時、臨界角  $\phi_c$  は

$$\phi_c = \sqrt{2\delta} \quad (2.2.13)$$

で与えられる。式 (2.2.13) を用いてガラスキャピラリにおける臨界角  $\phi_c$  と、X線のエネルギーの関係を図2.2.6に示す。計算にはガラス( $\text{SiO}_2$ )の密度 $2.5 \text{ g/cm}^2$ とHenkeのデータブック[8]より得た原子散乱因子 $f_1$ の値を用いた。ロジウムの特性X線である $E=20.2 \text{ keV}$ 、 $2.7 \text{ keV}$ の臨界角は $0.89 \text{ mrad}$  ( $0.05^\circ$ )、 $6.61 \text{ mrad}$  ( $0.38^\circ$ )となる。

・ X 線導管の集光原理と特徴

先に説明したようにX線導管は、X線の物質表面での全反射を利用してX線の集光を

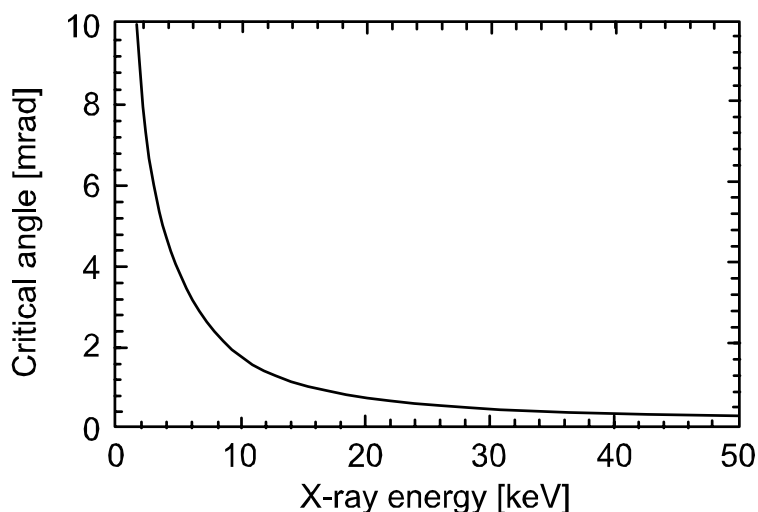
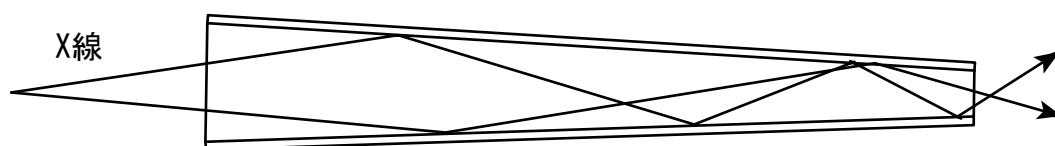


図 2.2.6 X 線エネルギーと臨界角の関係

おこなう光学素子である。全反射を用いることで、従来のコリメータ法に比べて、X線の有効立体角が拡大され、X線強度を増加させることができる。なお、全反射の効率、表面粗さによって大きく影響を受けるので、一般的に内表面を滑らかに加工できるガラス材料を使用したガラスキャピラリーを用いる。X線集光素子として用いられるガラスキャピラリーには、一本のキャピラリーによってX線を集光するモノキャピラリーと、キャピラリーを複数束ねて、集光

モノキャピラリー

原理	特徴
導管内を、X線を全反射させながら誘導し、導管そのものを細く絞って照射する。	<ul style="list-style-type: none"> <li>・白色 X 線の集光が可能。</li> <li>・X 線ビームの広がり小さい。</li> </ul>



ポリキャピラリー

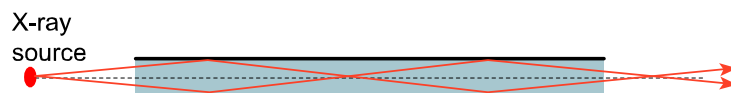
原理	特徴
モノキャピラリーを多数束ね、より立体角を増して強度を増加させる。	<ul style="list-style-type: none"> <li>・白色 X 線の集光が可能。</li> <li>・X 線ビームの広がり大きい。</li> <li>・X 線強度が高い。</li> <li>・モノキャピラリーより WD(Working Distance)を長くする必要があるので、数十 <math>\mu\text{m}</math> 以下に集光するのは困難。</li> </ul>



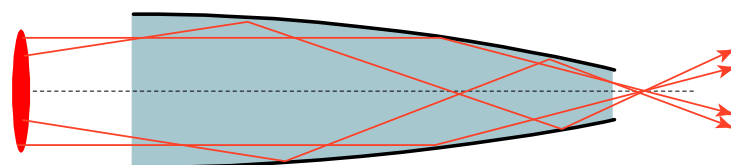
図 2.2.7 モノキャピラリーとポリキャピラリーの集光原理と特徴

形状	特徴
平行型 (Parallel type)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 作製が容易</li> <li>・ 有効立体角が小さく，多重反射で輸送するため，輸送効率が低い</li> </ul>
放物面型 (Paraboloid type)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 平行成分を多く含む光源(放射光)に有効</li> <li>・ 発散成分は多重反射によって輸送されるため，発散成分を多く含む光源には不向き</li> </ul>
楕円型 (Elliposoid type)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発散成分を一回反射で集光するため，発散成分を多く含む光源に対して輸送効率が高い</li> <li>・ 形状が複雑なため高度な作製技術が必要</li> </ul>

Parallel type



Paraboloid type



Elliposoid type

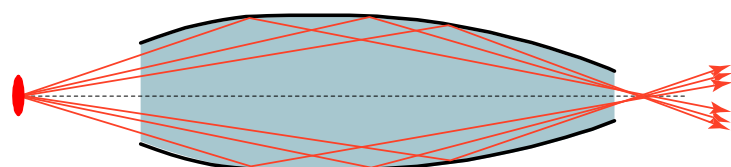


図 2.2.8 ポリキャピラリの形状による特徴

形状に形成したポリキャピラリがある(図2.2.7)[11]. モノキャピラリは集光点でのX線強度は高くなるが, それぞれのモノキャピラリに輸送されるX線が空間的な広がりを持つために, 30  $\mu\text{m}$  以下の集光径を実現することは難しいのが実情である. また, 現在, 最小5  $\mu\text{m}$ 程度[12]の集光径が実現されているモノキャピラリにおいては, 集光点でのX線強度を高めるために, キャピラリ形状が工夫されている(図2.2.8). 平行管形状や回転放物面形状は平行成分が多い光源には有効であるが, 発散成分を含むX線管光源では多重反射による輸送が主になりX線の輸送効率が低下する. そこで, 本装置に搭載されているガラスキャピラリには回転楕円形状のガラスキャピラリを採用した[13].

### ・蛍光 X 線分析

X 線マイクロビーム生成部の下方に取り付けられた X 線半導体検出器を用いて, マイクロビーム照射試料から発生する蛍光 X 線を検出し, 元素分析を行うことが可能である.

X 線半導体検出器[14]は, 半導体結晶中に入射した X 線によって生成される電子正孔対を, 電界をかけて収集することで, 入射した X 線の数や, エネルギーを決定する X 線検出器として動作する. 半導体結晶としては, シリコンやゲルマニウムが用いられる. シリコンは低エネルギーX線検出のために用いられ, 入射してくる数 keV から約 20 keV の X 線に対してほとんど 100 %の検出効率がある. ゲルマニウムに比べてシリコンは原子番号が小さいので, 高エネルギー光子に対する検出効率は低く, 50 keV 程度が実用の上限である. 素子の温度上昇による損傷を防ぐために, 動作時には, 液体窒素で冷却しなければならない. 検出器の有感部分が面している部分の真空容器には, X 線の吸収が小さいように薄いベリリウム窓が付いている.

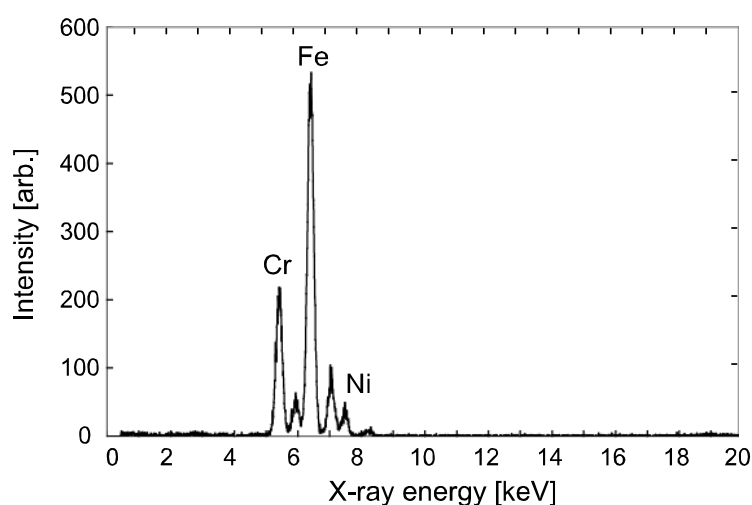


図 2.2.9 蛍光 X 線スペクトルの例(ステンレス)

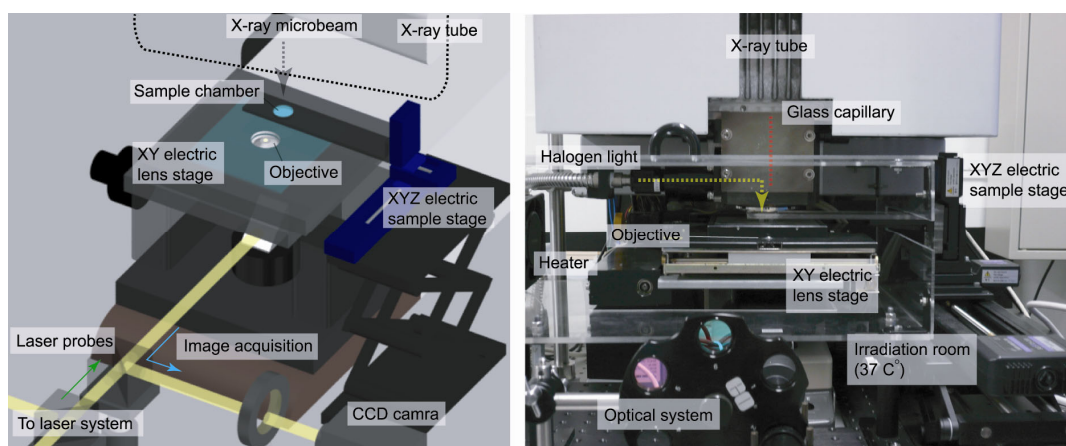


図 2.2.10 試料観察系のレイアウト(左)とその様子(右)

本装置に導入されている X 線検出器は、高純度シリコン半導体検出器であり、X 線が入射すると禁制帯の電子が導電帯に励起され、励起された電子の分だけ電流が流れる。X 線検出の場合、X 線光子 1 個の入射に対応する電流パルス 1 個を測定する。1 パルスの瞬間的な電流値は入射した X 線のエネルギーに比例するので電流パルスの波高を測定することで X 線のエネルギーが求められる。図 2.2.9 は、ステンレス材料を蛍光 X 線分析した結果の一例である。ステンレスの成分である、鉄、クロム、ニッケルなどの特性 X 線スペクトルが観察されている。

### 2.2.3 細胞観察系の構築

細胞観察系のレイアウトとその様子を図2.2.10に示す。倒立型の顕微鏡システムをX線マイクロビーム生成部の下方に構築した。XYZ電動試料ステージ(位置精度:1  $\mu\text{m}$ , SGSP-20, SGSP-200, シグマ光機)に設置された細胞試料は、観察用対物レンズ(倍率: 20, 40倍, Olympus)とCCDカメラ(BS-40L, BITLAN)によって、その場観察することができる。試料ステージの制御系はPIC(Peripheral Interface Controller, Microchip Technology Inc.)を用いた制御回路を作製し、電動ステージの位置情報を読み出すことでリアルタイムに位置座標を取得するシステムを構築した[15]。また、X線マイクロビームのアライメントの調整(2.3節にて詳細を述べる)をおこなうために、観察用対物レンズは、XY電動ステージに設置してあり、1  $\mu\text{m}$ の精度でその位置を決定することが可能である。照射試料室は、ヒーターと温度制御システムを用いることで、細胞試料を扱うのに適した37°C雰囲気を保つことができる。観察光学系はレーザープローブを導入することが可能となっており、X線マイクロビームとレーザープローブを組み合わせた実験システムについては、2.4節に詳細を述べた。



## 2.3 X 線マイクロビームの特性試験

X 線マイクロビームの特性試験を次の、(1) マイクロビーム径の測定と集光特性(発散成分)の評価、(2) マイクロビームのエネルギースペクトル測定・計算、(3) マイクロビームによる単一細胞への照射線量の見積もり、(4) マイクロビームの照射位置精度の測定についておこなった。

本節ではこれらの項目の特性試験について、評価手法の説明、評価結果について述べる。

### 2.3.1 サイズ測定

銀活性リン酸塩ガラス(RPL ガラス)を用いた蛍光イメージングと、蛍光 X 線測定とナイフエッジ法を組み合わせた手法によって、X 線マイクロビームのサイズを測定した。また、それらの手法を用いて、マイクロビームの集光特性を評価した。

#### ・銀活性リン酸塩ガラスを用いた蛍光イメージング

銀活性リン酸塩ガラスは、個人被ばく線量計のガラスバッジに用いられており、放射線が照射された領域が、紫外線励起によって橙色の蛍光(RPL : Radio Photo Luminescence)を発する。この RPL ガラスに X 線マイクロビームを照射し、蛍光顕微鏡を用いて蛍光観察することで、ビームのプロファイル観察を試みた。

#### RPL ガラスの発光原理

図 2.3.1 に銀活性リン酸塩ガラスの RPL 発光中心の生成メカニズムを示す[16]。電離放射線が蛍光ガラス線量計素子に照射されると、素子内に電子および正孔の対が作られる。生成された電子は、ガラス構造中の  $\text{Ag}^+$  に捕獲され  $\text{Ag}^0$  が生ずる。一方、生成した正孔

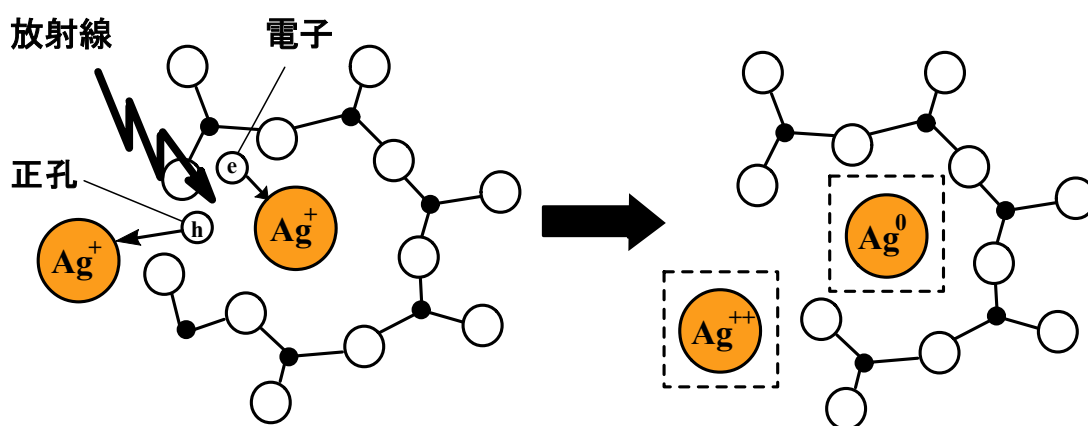


図 2.3.1 RPL ガラスの蛍光中心の生成機構

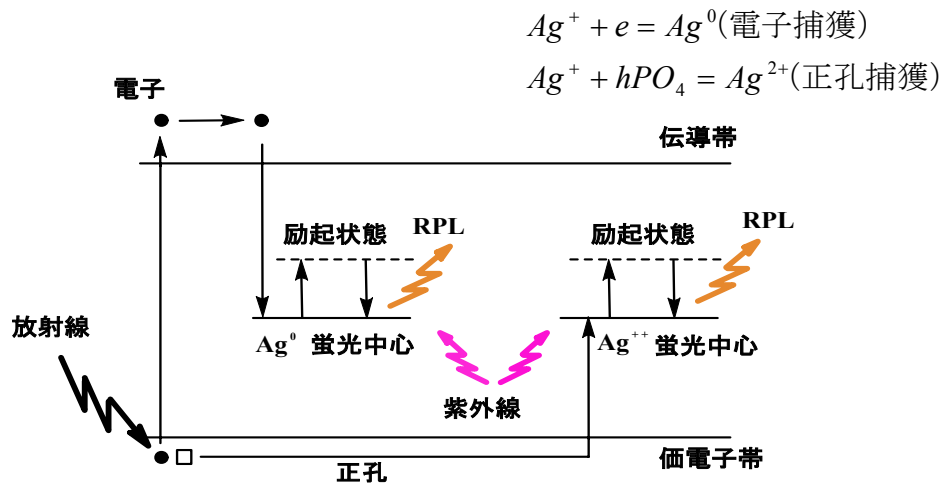


図 2.3.2 RPL ガラス線量計の蛍光発生過程

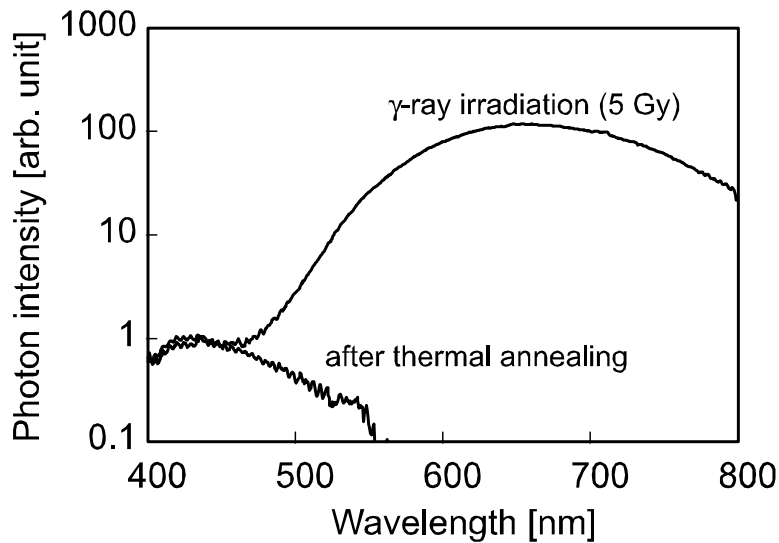


図 2.3.3 RPL ガラスの蛍光特性

はいったん  $PO_4$  四面体に捕らえられるが、時間の経過にともない  $Ag^+$  へ移行し、より安定な  $Ag^{2+}$  が形成される

図 2.3.2 には、RPL 発光過程を模式的に示している。また、図 2.3.3 に、 $\gamma$ 線照射前と照射後の RPL ガラスにおける、紫外線励起による蛍光スペクトルを示した。蛍光ガラス線量計内に生じた発光中心は非常に安定であり、 $150^\circ C$  を越えるような高温にしない限り消失せず、蛍光中心は繰り返しの読み取り操作によっても消失することはない。

RPL ガラスを用いたマイクロビームの蛍光イメージング

試料ステージに蛍光ガラス線量計材料である RPL ガラス板(10×7 mm, 厚さ:1 mm)を設置して, X 線マイクロビームを照射後, 蛍光顕微鏡(IX71, Olympus)を用いて蛍光観察した. 蛍光観察のフィルタセットには, 励起:330-380, 蛍光: 590 - (それぞれ透過成分の波長[nm]を示す)を用いて観察した. 始めに, RPL ガラスの X 線マイクロビーム照射量に対する蛍光応答を調べた. 図 2.3.4 は, X 線マイクロビーム照射時間と RPL の輝度値の関係を示したグラフと蛍光観察した様子である. 蛍光画像の取得に用いた冷却 CCD カメラの露出時間を固定して取得した RPL 画像を, ImageJ [17]を用いて解析した結果, 照射時間と RPL の輝度値の間には線形性が確認された.

次に, マイクロビーム取り出し窓から RPL ガラスの照射面までの距離を変えて, マイクロビームの集光特性を調べた. 図 2.3.5 に, ビーム窓からの各距離における RPL 領域の蛍光分布プロファイルを示す. ビーム窓から 1 mm の距離で, 蛍光領域のサイズは最少の約 20  $\mu\text{m}$  [FWHM]となり, 距離を離していくことで顕著な蛍光領域の広がり確認された. これは X 線マイクロビームが焦点面を持っていることを示している. しかし, X 線マイクロビームはガラス材料に対して数 mm に亘って侵入することが予測され, 蛍光領域に奥行が生じるため, RPL 領域の観察からマイクロビームのサイズを正確に測定することは難しい. また, RPL ガラスの側面に X 線マイクロビームを入射させた RPL ガラス中の, X 線マイクロビームの輸送軌跡を観察した(図 2.3.6, 第 3 章に実験の詳細を述べた)[18]. この結果, X 線マイクロビームの輸送に伴う, RPL が~5 mm の深さまで

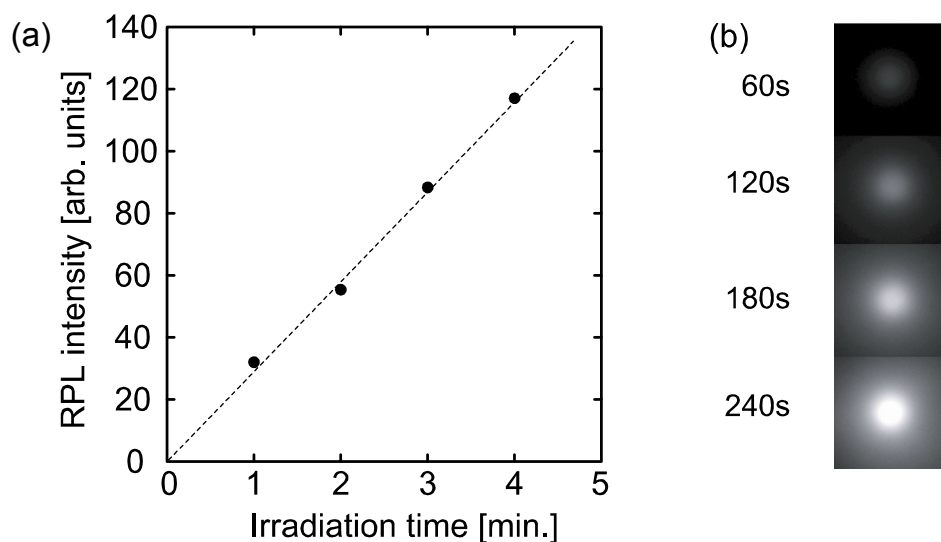


図 2.3.4 (a) X 線マイクロビーム照射時間と RPL の輝度値の関係 (b) X 線マイクロビーム照射による RPL を蛍光観察した様子

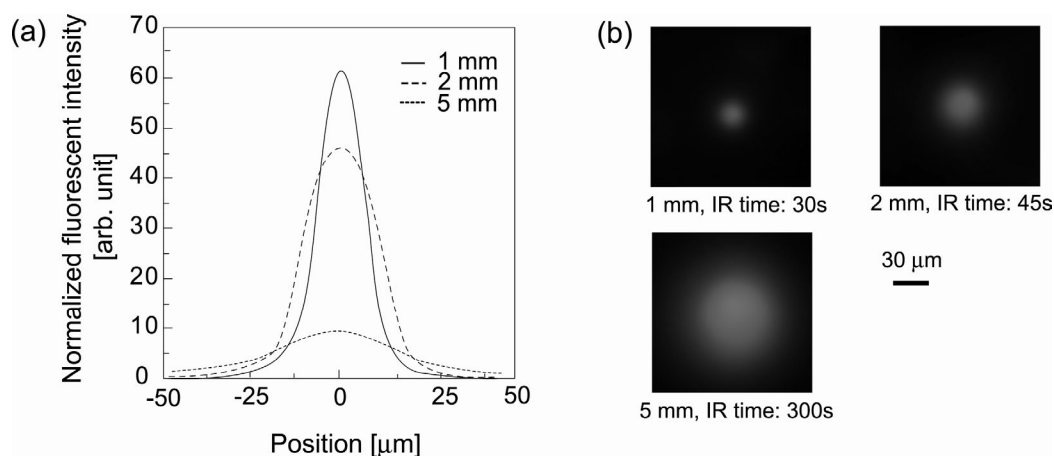


図 2.3.5 (a) ビーム窓からの距離(1, 2, 5 mm)による X 線マイクロビームのプロファイル (b) 各距離における RPL を蛍光観察した様子(画像取得においては照射時間(IR time)を任意に設定し, グラフ内ではこれらの蛍光強度を標準化した)



図 2.3.6 RPL ガラス中の X 線マイクロビームの軌跡を蛍光観察した様子(X 線マイクロビームは左面から入射)

確認された. RPL ガラスを用いた X 線マイクロビームのプロファイル観察により, ビーム取り出し窓から 1 mm の付近にマイクロビームの集光焦点が存在し, そこから約 10 mrad の発散角を持って広がることを確認された. これらの結果より, RPL ガラスと蛍光顕微鏡を用いた蛍光イメージング法は, マイクロ領域の放射線照射に対して, 照射線量, 照射位置の測定を簡便におこなえることが示された.

#### ・ナイフエッジ法によるマイクロビーム径の測定

RPL ガラスを用いた蛍光イメージングだけでは, マイクロビームのサイズを正確に測定することができなかったため, ナイフエッジ法と蛍光 X 線測定を組み合わせて, X 線マイクロビーム径の測定をおこなった. 金が真空蒸着 (厚さ: 0.3  $\mu\text{m}$ )されたステンレスナイフを電動試料ステージに取り付け, X 線マイクロビームをエッジ部分で水平方向に捜査しながら, 金原子の蛍光 X 線強度を測定することでビームプロファイルを求めた

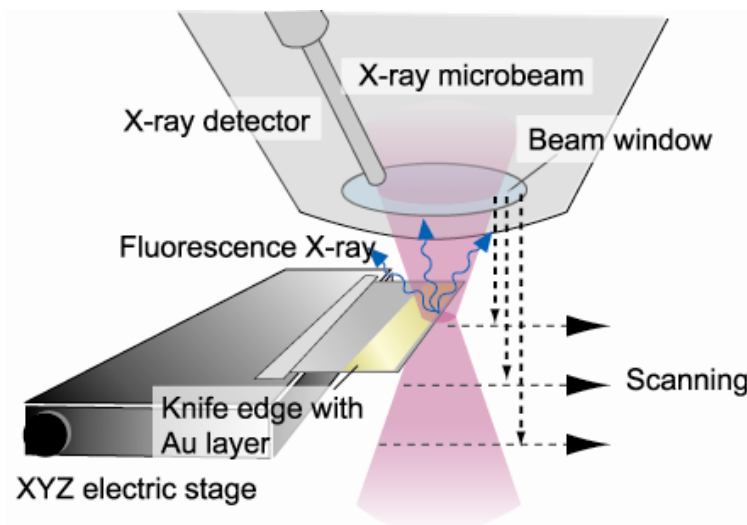


図 2.3.7 蛍光 X 線分析とナイフエッジ法を用いた X 線マイクロビームのサイズ測定実験

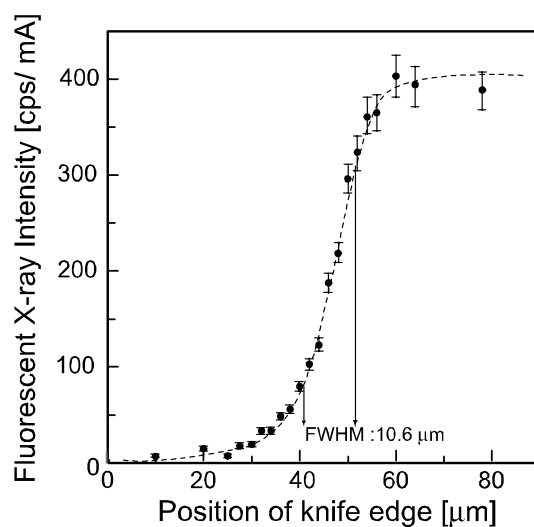


図 2.3.8 ナイフエッジの位置と金の蛍光 X 線強度から得られた X 線マイクロビームプロファイル

(図 2.3.7). 図 2.3.8 に、ビーム窓から 1 mm の位置で、ナイフエッジの位置と金の蛍光 X 線(M 線:  $E = 2.12 \text{ keV}$ )強度の関係から測定されたビームプロファイルを示す. その結果, X 線マイクロビームのビーム径は  $10.6 \mu\text{m}$  [FWHM]と求められた. さらに, マイクロビームは白色光であり, 低エネルギーと高エネルギー成分のそれぞれの広がり調査する

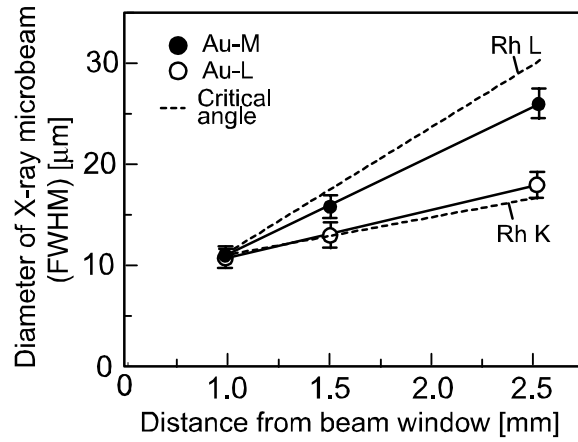


図 2.3.9 ビーム窓からの距離と X 線マイクロビームの直径の関係

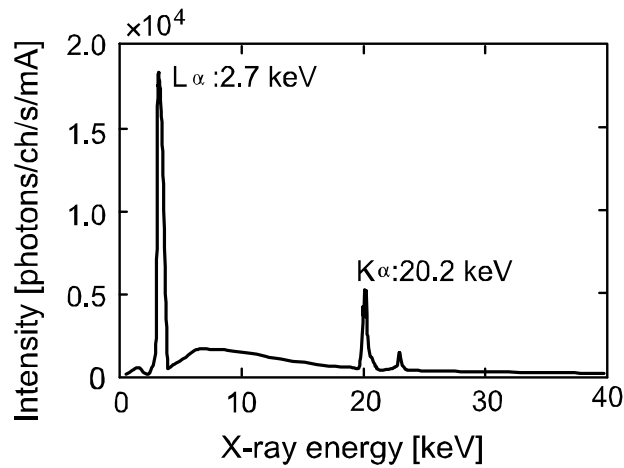


図 2.3.10 X 線マイクロビームのエネルギースペクトル

ため、M 殻由来の蛍光 X 線に加えて、 $L_{\alpha}$ 線( $E = 9.7 \text{ keV}$ )を、ビーム窓からの各位置で測定した結果を、図 2.3.9 に示す。その結果、低エネルギー成分は大きな発散角を持って広がっていることが確認された。図 2.3.9 に示したロジウムの特性 X 線である  $2.7 \text{ keV}$  と  $20.2 \text{ keV}$  の臨界角を傾きとした直線と比較すると、X 線マイクロビームの発散成分はおよそ X 線の臨界角に依存しており、低エネルギー成分による発散角は  $10.2 \text{ mrad}$  であることが求められた。

### 2.3.2 照射強度の見積もり

X 線マイクロビームを大気下に取り出した直後に、シリコン半導体検出器によって測定したエネルギースペクトルを図 2.3.10 に示す。ロジウムの特性 X 線による、2.7 keV ( $L_{\alpha}$ )と 20.2 keV ( $K_{\alpha}$ )付近のピークと、制動 X 線による連続スペクトルが確認された。この測定した X 線エネルギースペクトルを基に、細胞照射系において、単一細胞に照射される X 線エネルギースペクトルを光子・電子輸送モンテカルロ計算コード EGS4 [19] を用いて算出した(計算の詳細は第 3 章に述べた)。

X 線マイクロビーム照射用の細胞試料は、図 2.3.11(a)に示すような、直径 10 mm の穴を空けた厚さ 1 mm のポリプロピレン板にワセリンを用いて培養基盤を接着して作製した専用の培養ディッシュに培養し、培養液を封入した後、カプトン膜で上面を閉じた。照射時のレイアウトは、電動試料ステージに設置した培養ディッシュの上面を図 2.3.11(b)に示すようにビーム窓に密着させて、細胞が培養されている面がマイクロビームの最小径が得られる、ビーム窓から約 1 mm の位置にくるようにした。このような細胞照射系を想定して、計算コードを用いて算出されたエネルギースペクトルを図 2.3.12 に示す。細胞照射系において X 線が培地層を通過時に、低エネルギーの X 線は散乱・吸収されるため、細胞へのエネルギー付与に關与する主なエネルギーは 5~10 keV であることが見積もられた。算出した各培地層の厚みにおけるエネルギースペクトルから、細胞核相当の直径 10  $\mu\text{m}$  の水球に付与されるエネルギーを算出することで、X 線マイクロビームによる単一細胞への線量率 [ $\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = \text{Gy} \cdot \text{s}^{-1}$ ]を見積もった(図 2.3.13)。その結果、動物細胞において調査される放射線照射量が~10 Gy 程度であることを考えると、試料細胞に付与する培地量を正確に量りとることで、細胞照射実験に必要な線量率を安定して実現できる培地層の厚み 250  $\mu\text{m}$  を採用し、その時の X 線マイクロビームによる線量率は最大 0.3 Gy/s と算出された。また、この微小空間での放射線によるエネルギー付与(マイクロドジメトリ)に関する詳細な考察は第 3 章にて述べている。

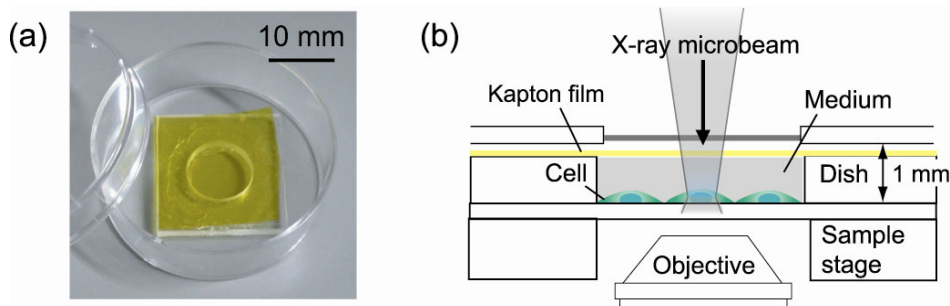


図 2.3.11 (a)X 線マイクロビーム照射用培養ディッシュ (b)マイクロビーム照射時のレイアウト

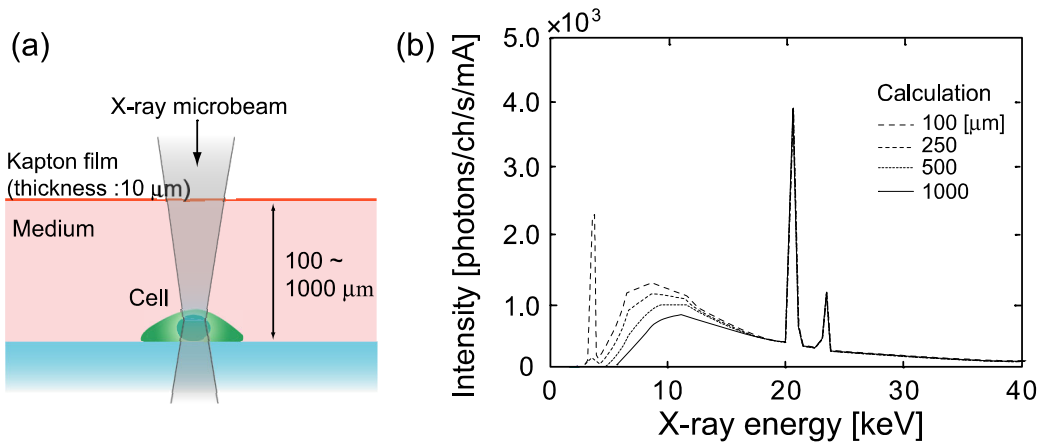


図 2.3.12 (a) 細胞照射系の計算モデル (b) 培地層の深さ位置において算出された X 線マイクロビームのエネルギースペクトル

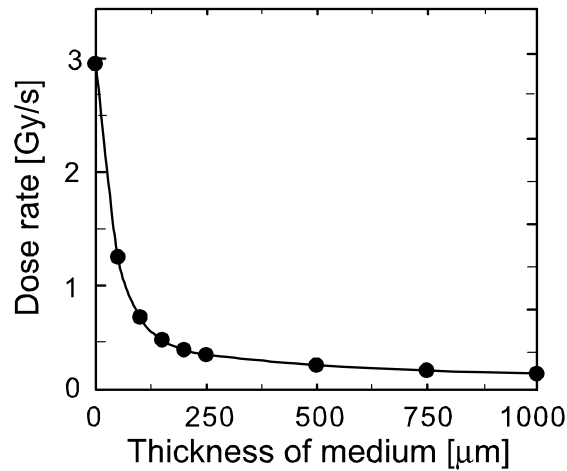


図 2.3.13 培養液層の厚みと細胞への線量率の関係

### 2.3.3 単一細胞照射試験

#### ・ X 線マイクロビームの照射精度の調査

X 線マイクロビームと対物レンズのアライメントを以下の手順によって調整した(図 2.3.14).

手順 1 : 試料ステージに金属ワイヤターゲット(素材 : 白金, 直径 : 10 μm)を設置し, 顕微鏡観察下の表面を X 線マイクロビームで XY 方向に捜査しながら蛍光 X 線を検出する.



手順 2 : 蛍光 X 線の強度とワイヤターゲットの位置関係から X 線マイクロビームの位置を決定し、電動レンズステージを用いて、観察視野の中心に X 線マイクロビームが位置するように対物レンズの位置を移動させる。

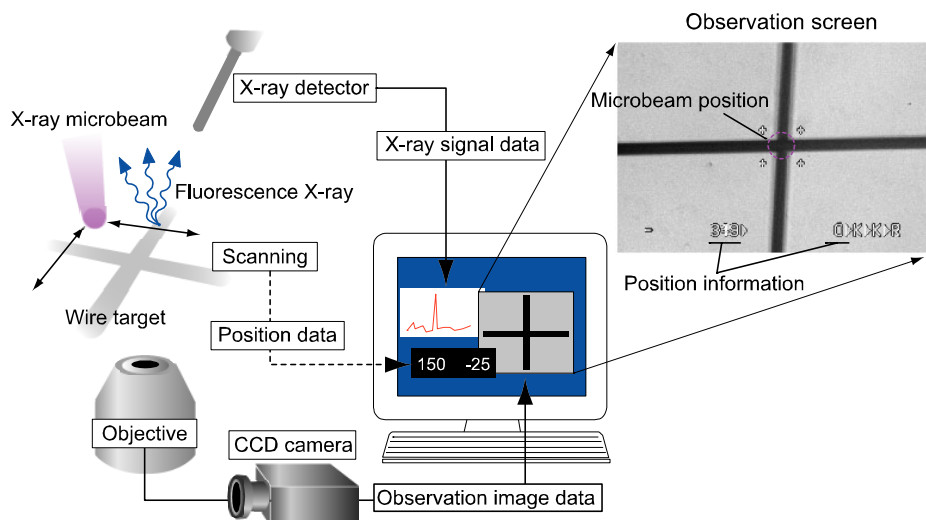


図 2.3.14 X 線マイクロビームのアライメントの調整方法

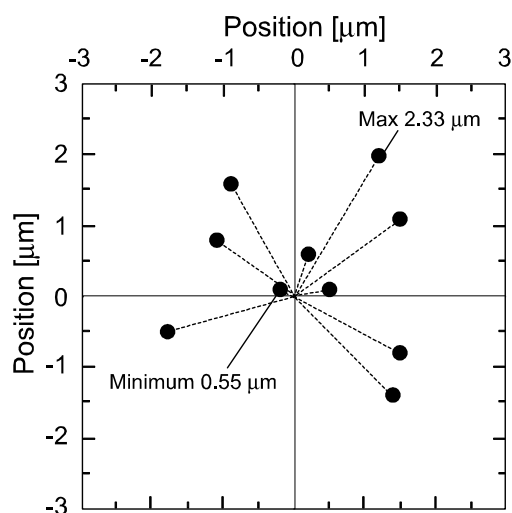


図 2.3.15 ターゲット(座標(0,0))に対する X 線マイクロビーム照射の精度

またアライメントを調整後, RPL ガラス上のランドマークを用いてマイクロビーム照射精度の調査をおこなった. 狙った位置への照射精度を独立した 10 回のアライメント調整に対して調べた結果を図 2.3.15 に示す. その結果, 平均して約 1.8  $\mu\text{m}$  以下の精度によって X 線マイクロビームの照射位置を決定できることがわかった. これは, ターゲットとなる細胞のサイズ(20  $\mu\text{m}$ ~)から, 1 細胞照射に十分な精度であると考えられる. 現在, RPL ガラスによる RPL イメージングシステムを X 線マイクロビーム照射装置に組み込んでおり, 薄型の RPL ガラスの開発と合わせて, より容易に X 線マイクロビームのアライメント調整が可能になる予定である. 図 2.3.16 は試料細胞(図中ではラット神経細胞)を照射しているときの観察画面の様子である. X 線マイクロビームのアライメントの調整によって, 観察画面の中央に位置する細胞に X 線マイクロビームを照射することが可能である.

#### ・単一細胞照射試験

RPL ガラス上に動物細胞を培養し, 細胞集団中の個々の一細胞の細胞核を照射することで, X 線マイクロビームを用いた単一細胞照射をおこなった. ゼラチンコートした PRL ガラス(詳細は付録 B を参照)上に培養された, 細胞試料は電動ステージによって照射位置に移動した後, 対物レンズと CCD カメラで観察した細胞集団中の任意の細胞に対して細胞核の位置を確認し, 単一細胞照射をおこなった. 単一細胞照射後に, マイクロビーム照射によって DNA が損傷したことを確認するために, 蛍光物質による細胞染色技術(詳細な手順は付録 B に記述)を用いて DNA 損傷と細胞核を蛍光観察した. 図 2.3.17 に示すように, DNA 損傷, 細胞核, RPL をそれぞれの励起光と蛍光波長に対応したフィルタセットを用いて合成画像を作成することで, X 線マイクロビームを狙った 1 細胞の細胞核を照射できていることを確認した[20].

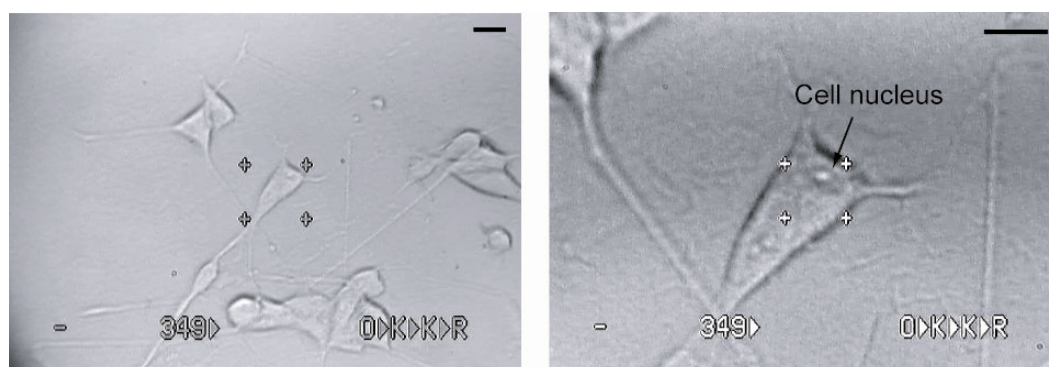


図 2.3.16 細胞照射時の観察画面. それぞれ倍率 20 倍(左), 40 倍(右)の対物レンズを用いて観察した様子であり, スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示している.

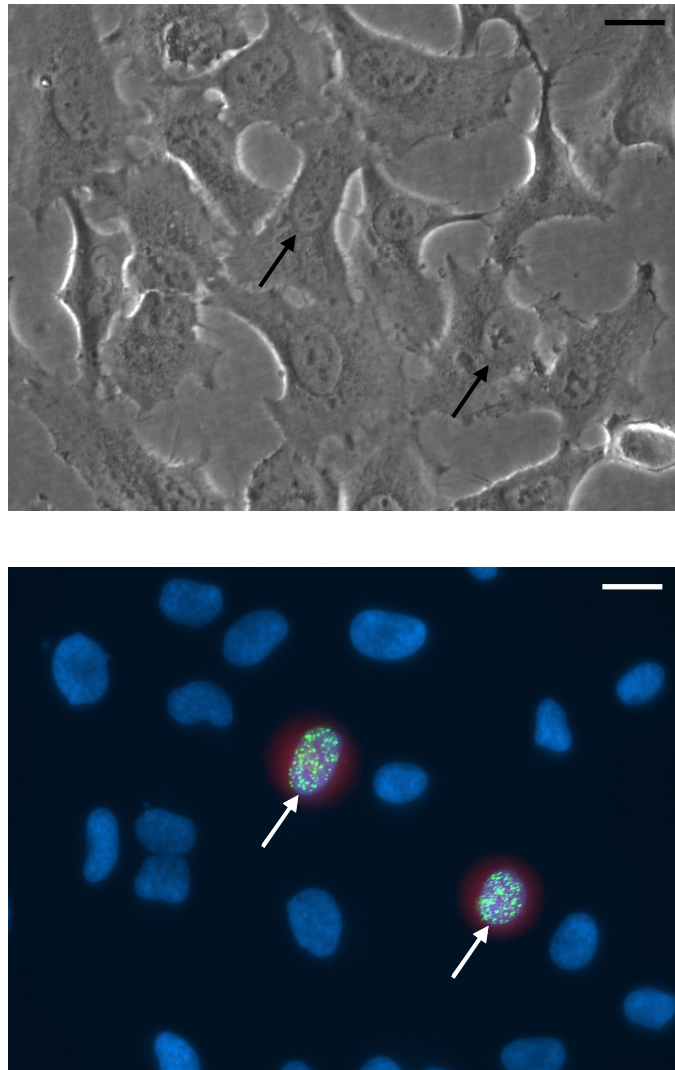


図 2.3.17 RPL ガラス上に培養され、マイクロビーム照射された HeLa 細胞(矢印)の光学観察写真(左)と蛍光観察写真(右). 蛍光観察写真では、細胞核(青)、DNA 損傷(緑)、マイクロビームのプロファイル(赤)が一致して観察されている. 図中のスケールバーは、10  $\mu\text{m}$  を示している.

## 2.4 レーザープローブを導入したマイクロビーム照射実験

卓上型 X線マイクロビーム照射装置の試料観察系からレーザープローブを導入することで、多様な生物学研究に対応できるシステム開発をおこなった. 図 2.4.1 にその概略

図を、図 2.4.2 にその様子を示す。本節では(1)光ピンセットを用いた単一細胞の空間位置操作と(2)レーザー蛍光法による細胞応答観察を X 線マイクロビーム照射実験に併用するために、開発したレーザーシステムとそれらを用いた予備実験について述べる。

### 2.4.1 光ピンセットによる細胞位置操作

#### 光ピンセットシステム

赤血球やリンパ球といった浮遊細胞へのマイクロビーム照射効果の調査には、照射精度などに多くの課題がある[24]. そこで、X 線マイクロビーム照射効果を調べるために、光ピンセットによる浮遊細胞の空間位置制御をおこないながら、X 線マイクロビームを照射可能なシステムの構築をおこなった。

光ピンセットは、高開口数のレンズによってレーザー光を集光することで集光焦点に発生する光放射圧を利用して、数十 nm から数十  $\mu\text{m}$  の対象物を焦点面に捕獲すること

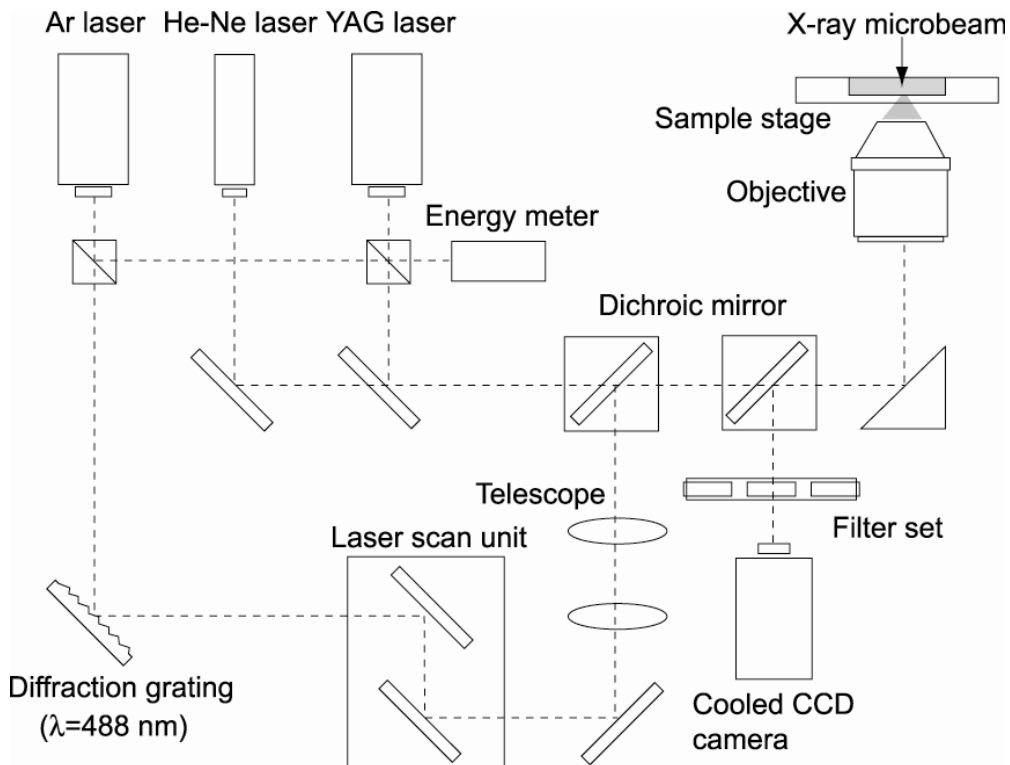


図 2.4.1 X線マイクロビーム照射装置に組み合わせたレーザーシステムの概略図

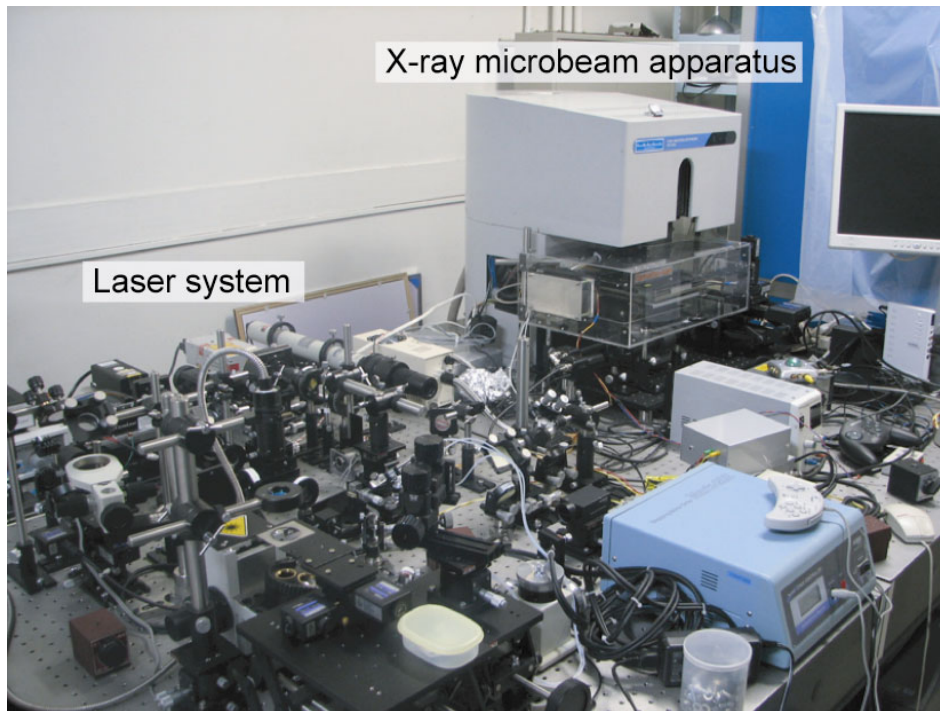


図 2.4.2 X 線マイクロビーム照射装置とレーザーシステムの様子

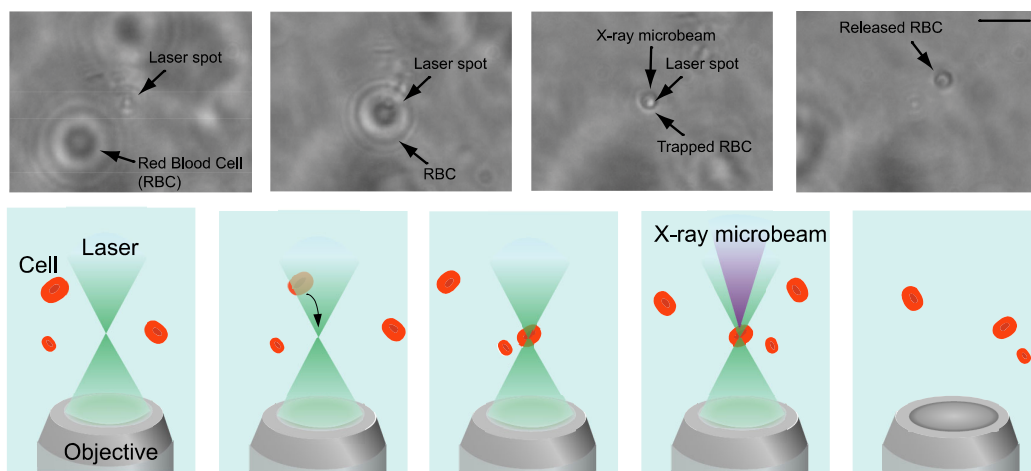


図 2.4.3 光ピンセットを用いた浮遊細胞(赤血球)の X 線マイクロビーム単一細胞照射の様子(上)と概略図(下). スケールバーは  $20\ \mu\text{m}$  を示している.

によって、空間位置制御などをおこなう技術である[21]。その原理については付録 A に記述した。図 2.4.1 に示された X 線マイクロビーム照射装置に組み合わせたレーザーシステムにおいて、光ピンセット用のレーザー光には細胞試料での熱損傷を避けるため[22]、捕獲用レーザーに近赤外光である CW : YAG レーザー( $\lambda=1064$  nm)を用いている。また CCD カメラ観察画面で、光ピンセットのガイドレーザーとして He-Ne レーザー( $\lambda=635$  nm)を導入した。本システムにおいて、細胞の捕獲力を計測した実験では、対物レンズ(NA:1.25, オリンパス)に入射したレーザーの出力 20 mW に対して、約 10 pN の力が発生し、レーザーの出力に比例して捕獲力が上昇することを確認している[23]。

#### 光ピンセットを用いた X 線マイクロビーム照射実験

光ピンセットによる浮遊細胞の空間位置制御をおこないながら、X 線マイクロビームによる単一細胞照射を試みた(図 2.4.3)。その結果、X 線マイクロビームの集光位置に任意の細胞を捕獲し、マイクロビーム照射が可能であることを確認した。本システムを用いることで、浮遊細胞系でのバイスタンダー効果などの研究が効率よくおこなえると考えられる。

### 2.4.2 レーザー蛍光法による細胞応答観察

#### レーザー蛍光法による細胞内カルシウムイオン応答観察

細胞内カルシウムイオンは細胞活動において、その濃度を細胞膜に存在するイオンチャンネルによって調節することで、種々の細胞応答に重要な役割を担っている[25]。放射線の照射によっても、数秒から数時間といった時間スケールにおいてカルシウムイオンの濃度変化が生じることで、高次の放射線細胞応答を引き起こす要因になっていることが報告されている[26]。X 線マイクロビーム照射下の細胞内カルシウムイオン濃度の動的な変化を捉えることによって、照射後、数分以内に誘起される放射線細胞応答を評価するシステムの構築をおこなった。図 2.4.1 に示すように、カルシウムイオン感受性の蛍光色素を励起して蛍光観察するための励起プローブに、アルゴンレーザー( $\lambda=454.5\sim 514.5$  nm, 出力:40 mW, LGK7872ML, LASOS)を用いた。レーザー走査モジュールは、レゾナントミラー(CS-18-10, 振動周波数:200 Hz $\pm$ 10%, OPTRON), 電動回転ステージ(SGSP-60YAW-0B, シグマ光機)にミラーを設置した自作のガルバノミラーと PIC による制御回路によって構成され、200 $\times$ 200  $\mu\text{m}^2$ の領域を 1Hz で走査することができる。また、対物レンズ瞳中心でレーザーを回転させるために、テレスコープを設置している[27]。レーザープローブによって励起された蛍光は、波長選別のための光学フィルタを通して冷却 CCD カメラ(BS-40L, BITLAN)で撮像した。

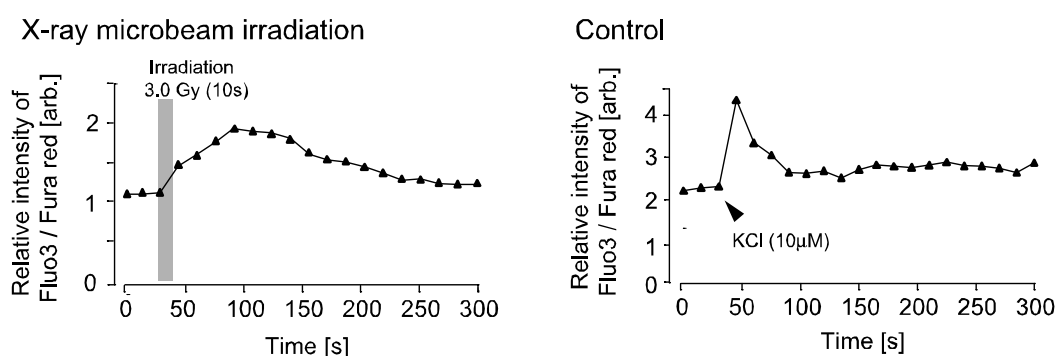


図 2.4.4 X 線マイクロビーム照射による細胞内カルシウムイオン濃度の変化(左, 3 Gy 照射)とコントロール測定(右, 10  $\mu$ M KCl 刺激)

### X 線マイクロビーム照射細胞内カルシウムイオンのダイナミックイメージング

細胞膜透過性のカルシウムイオン感受性の Fluo-3 と Fura-red をヒト癌細胞である HeLa 細胞に導入し(詳細な手順は付録 B に記述), X 線マイクロビーム照射細胞における Fluo3, Fura red 由来の蛍光を光学フィルタによって選別しながら, 冷却 CCD カメラを用いて蛍光画像を取得した. 取得した蛍光画像は ImageJ McMaster[28]を用いて経時的な蛍光強度の解析をおこない, Fluo-3/Fura red 蛍光強度の比を求めることで, 細胞内カルシウムイオン濃度の変化を解析した. 図 2.4.4 は, X 線マイクロビーム照射後の細胞内カルシウムイオン濃度の経時変化の一例を示したグラフである. 3 Gy 照射数十秒後に, カルシウムイオン濃度の上昇が観察された. しかし, 放射線照射による HeLa 細胞でのカルシウムイオン濃度の変化は, 細胞周期に大きく依存していることが報告されており[29], 今後より詳細な実験が必要である.

## 2.5 結言

本章では, 単一細胞照射用の卓上型 X 線マイクロビーム照射装置の開発について述べた. X 線管, ガラスキャピラリと倒立型顕微鏡を組み合わせることで卓上型 X 線マイクロビーム照射装置を構築した. また, X 線マイクロビームのサイズ, 強度などについて, 測定実験とシミュレーション計算から正確に評価し, 本 X 線マイクロビーム照射装置において, 直径約 10  $\mu$ m [FWHM], 照射線量率 0.3 Gy/s の X 線マイクロビームを顕微鏡観察下の単一細胞に照射可能であることを確かめた.

## 参考文献

- [1] D. Y. Parkinson et al., “Quantitative 3-D imaging of eukaryotic cells using soft X-ray tomography”, *J. Stru. Biol.*, Vol.162, pp.380-386 (2008).
- [2] B. Charles et al., “Ultra-deep X-ray lithography of densely packed SU-8 features: I . An SU-8 casting procedure to obtain uniform solvent content with accompanying experimental results”, *J. Micromech. Microeng.*, Vol.15, pp.1242-1248 (2005).
- [3] W. Chao et al., “Soft X-ray microscopy at a spatial resolution better than 15 nm”, *Nature*, Vol.435, pp.1210-1231(2005).
- [4] M. Folkard et al., “The use of microbeams to investigate the bystander effect in cells and tissues”, *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res.B*, Vol.231, pp.202-206 (2005).
- [5] T. Kuchimaru et al., “Microdosimetric characteristics of micro X-ray beam for single cell irradiation”, *IEEE Trans. Nucl. Sci.*, Vo.53, No.3, pp.1363-1366 (2006).
- [6] S. Ohzawa et al., “High intensity monocapillary X-ray guide tube with 10 micrometer spatial resolution for analytical X-ray microscope”, *Sepectrachimica Act. Part B*, Vo.59, pp.1295-1299(2004).
- [7] 飯田敏行監修, 「先進放射線利用」, 大阪大学出版会, (2005).
- [8] B. L. Henke et al., “X-ray interactions : photoabsorption, scattering,transmission, andreflection at E=50-30,000 eV, Z=1-92”, *At. Data Nucl. Data Tables*, Vol.54, pp.181-343(1993)
- [9] K. Yamamura et al., “Fabrication of elliptical mirror at nanometer-level accuracy for hard c-ray focusing by numerically controlled plasma chemical vaporization machining”, *Rev. Sci. Intrum.*, Vol.74, No.10, pp.4549-4553 (2003).
- [10] H. Kinoshita et al., “Soft X-ray reduction lithography using multilayer mirrors”, *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol.30, No.11, pp.3048-3052 (1991).
- [11] B. Lengeler et al., “A microscope for hard X ray based on parabolic compound refractive lenses”, *Appl. Phy. Lett.*, Vol.74, pp.3924-3926 (1999).
- [12] J. Bartoll et al.,”Micro-X-ray absorption near edge structure spectroscopy investigations of baroque tin-amalgam mirrors at BESSY using a capillary focusing system”, *Sepectrachimica Act. Part B*, Vol.59, pp.1587-1592 (2004).
- [13] 大澤澄人, “X 線ガイドチューブの開発”, *HORIBA Technical Reports*, No.33, pp.71-73 (2007).
- [14] G. F. Knoll 著, 木村逸郎, 坂井英二訳, 「放射線計測ハンドブック」, 日刊工業新聞社, (1982).
- [15] 東野優, 「単一細胞照射用 X 線マイクロビーム照射装置の開発」, 大阪大学大学



- 院工学研究科電気電子情報工学専攻博士前期課程修了論文, (2006).
- [16] 岸暖也, 「ガラス線量計システムの高性能化に関する研究」, 大阪大学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻博士前期課程修了論文, (2008).
- [17] ImageJ website <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- [18] Y. Aoi et al., “Radiophotoluminescent observation of X-ray microbeam transport in silver-activated phosphate glass”, submitted to *Jpn. J. Appl. Phys.*
- [19] M. D. Felici et al., “Determination of dosimetical quantities used in microbeam radiation therapy (MRT) with Monte Carlo simulations”, *Med. Phys.*, Vol.33, pp. 3248-3259 (2006).
- [20] F. Sato et al., “X-ray microbeam measurement with radiophotoluminescent glass plate for single cell irradiation”, *Radiat. Meas.*, Vol.43, pp.912-916 (2008).
- [21] A. Ashkin et al., “Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles”, *Opt. Lett.*, Vol.11, No.5, pp.288-290 (1986).
- [22] E. J. G. Peterman et al., “Laser-induced heating in optical traps”, *Biophys. J.*, Vol.84, pp.1308-1316 (2003).
- [23] 口丸高弘, 「光ピンセットを用いたマイクロ X 線照射装置の開発」, 大阪大学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻博士前期課程修了論文, (2005).
- [24] Y. Yokota et al., “Development of an ion microbeam system for irradiating single plant cell[s]”, *Biol. Sci. Space*, Vol.17, No.4, pp.298-301 (2003).
- [25] P. Nicotera and S. Orrenius, “The role of calcium in apoptosis”, *Cell Calcium*, Vol.23, pp.173-180 (1998).
- [26] C. A. Watson et al., “Modulation of calmodulin by UV and X-rays in primary human endothelial cell cultures”, *Int. J. Radiat. Res.*, Vol.76, No.11, pp.1455-1461 (2000).
- [27] B. Shao et al., “Manipulation of microspheres and biological cells with multiple agile VCSEL traps”, *Sens. Actuat. B*, Vol.133, pp.866-874 (2006).
- [28] Macmaster ImageJ website <http://www.macbiophotonics.ca/imagej/>
- [29] D. G. Todd and R. B. Mikkelsen, “Ionizing radiation induces a transient increase in cytosolic free[Ca<sup>2+</sup>] in human epithelial tumor cells”, *Cancer Res.*, Vol.54, Issue.19, pp.5524-5230 (1994).

## 第3章 単一細胞に対するマイクロドジメトリ

### 3.1 緒言

荷電粒子や $\gamma$ 線, X線といった電磁波放射線が生体内に侵入すると, 物理的な過程を経て, 生体環境にエネルギーが付与され, その結果, 様々な放射線生体効果が引き起こされる. X線マイクロビームによる単一細胞への放射線効果を調査する上で, 放射線によって引き起こされる生体効果をミクロ領域に掘り下げていくと, DNA損傷を代表として, 生体を構成する分子の放射線の作用によって引き起こされる物理化学反応にいきつく. しかし, 個々の細胞内の物理化学反応に対して, 普遍的な指標を導入することは極めて難しい. そのため, 放射線生物学では, 放射線による付与エネルギーを表す吸収線量(Gy)に対して評価することが一般的である. ただし, マイクロビーム照射においては, その吸収線量の定義も難しくマイクロドジメトリの評価は不可欠になる.

本章では, 単一細胞におけるX線マイクロビームによるマイクロドジメトリを理解するために, 単一細胞へのX線マイクロビームの輸送過程と微小領域へのX線のエネルギー付与について評価した. まず, ガラスキャピラリを用いたX線マイクロビーム輸送モデルの構築について述べ, 実験結果と比較することで構築したモデルの評価をおこなった. そして, 単一細胞へ輸送されたX線マイクロビームによる線量付与について, モンテカルロシミュレーションによって評価した.

### 3.2 ガラスキャピラリによるX線マイクロビーム輸送モデルの構築

微小領域での線量付与を理解するために, ガラスキャピラリによって生成されたX線マイクロビームの輸送計算モデルを構築について述べる. 第2章で述べたガラスキャピラリによるX線の集光原理に基づいてX線マイクロビームの輸送計算モデルを構築し, RPLガラスを用いた実験の結果と比較することで, 構築した計算モデルの妥当性を評価した.

#### 3.2.1 X線輸送計算モデル

ガラスキャピラリによるX線集光, 輸送計算モデルの構築を試みた. 図3.2.1は, キャピラリによるX線輸送計算のための物理モデルである. 第2章に述べたように, X線は全反射臨界角よりも小さな角度でキャピラリ内壁に侵入したときに, 全反射を起こす. この時, 個々のX線の軌跡を図3.2.2に示すようなフローチャートに従って導き出す計算モデルを構築した[1,2].

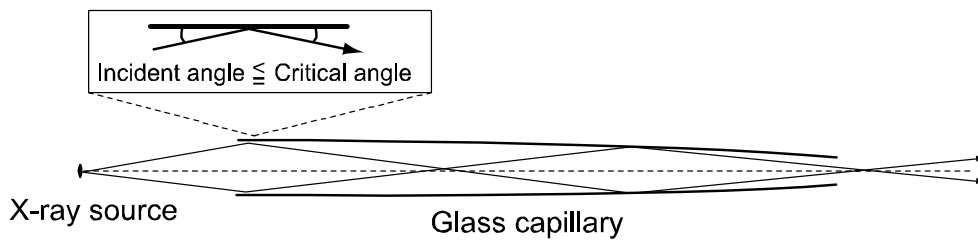


図 3.2.1 ガラスキャピラリを用いた X 線輸送計算の物理モデル

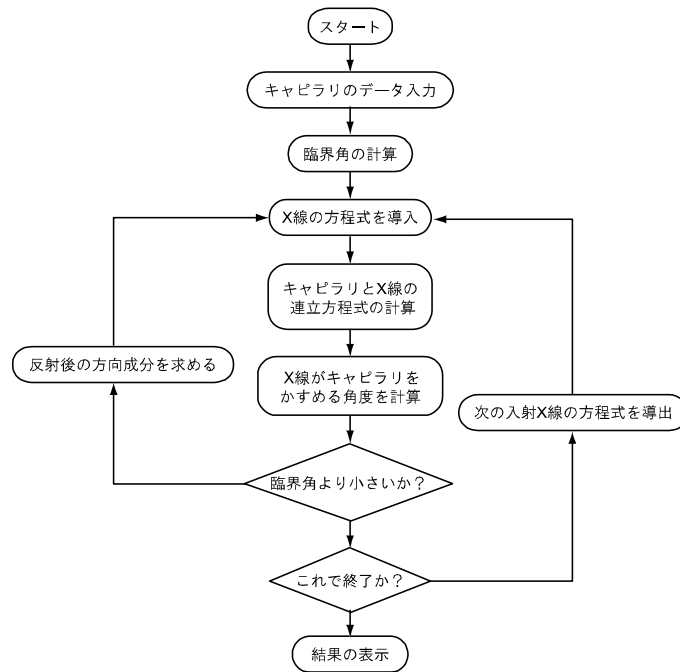


図 3.2.2 X 線輸モデルの構築における計算フローチャート

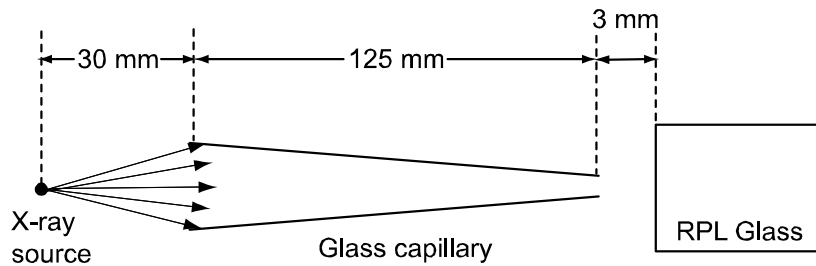


図 3.2.3 計算モデルにおける X 線源, キャピラリと RPL ガラスの位置関係

### 3.2.2 X線マイクロビーム輸送計算

構築した計算モデルを用いて X 線マイクロビームの輸送計算をおこない、計算結果と RPL ガラスを用いた実験結果と比較した[3]。ガラスキャピラリの形状と線源との位置関係を示した模式図を図 3.2.3 に示す。線源は点線源とし、線源から発生する X 線のエネルギースペクトルはロジウムの X 線スペクトルを用いた。線源からのガラスキャピラリの入り口までの距離は 30 mm とし、キャピラリ入口の径は 200  $\mu\text{m}$ 、出口の径は 20  $\mu\text{m}$ 、キャピラリの長さは 125 mm とした。また、出口から 3 mm の位置で X 線は RPL ガラス模擬材料(32% リン, 51% 酸素, 11% ナトリウム, 6% アルミ, 0.2% 銀, 密度 2.5  $\text{g}/\text{cm}^2$ )に入射し、入射後の各位置における X 線マイクロビームの広がりや線量付与強度について計算した。また、X 線マイクロビームの輸送について RPL ガラスを用いて測定した結果を図 3.2.4 に示す。RPL ガラス(厚み: 1mm)の側面に X 線マイクロビ

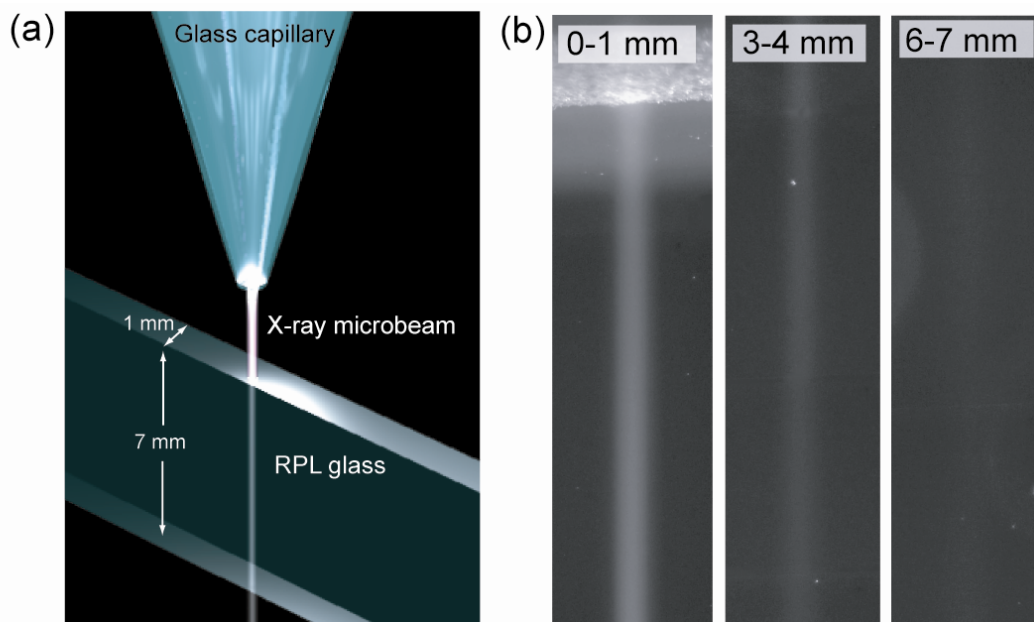


図 3.2.4 (a)RPL ガラス中の X 線マイクロビーム輸送観察実験の概略 (b)X 線マイクロビームの軌跡に沿って RPL ガラス中に生成された RPL を蛍光観察した様子(挿入している値は入射面からの距離を示しており、各蛍光画像の取得においては、カメラの露光時間を固定して撮像した)。

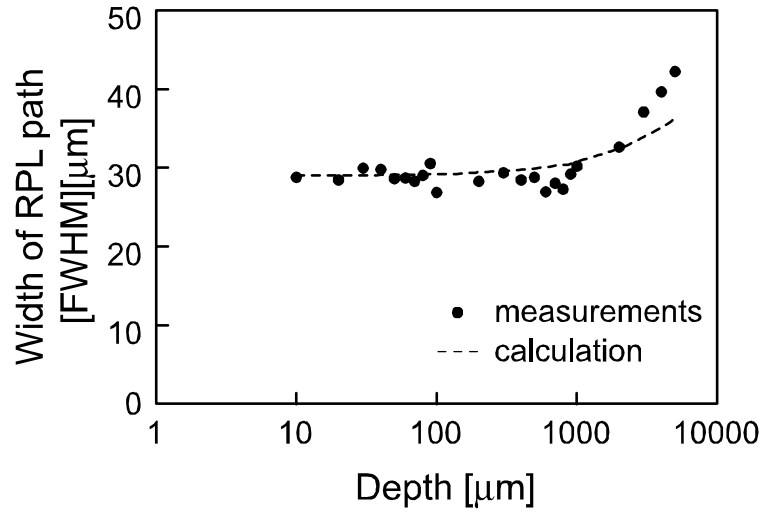


図 3.2.5 RPL ガラスへの入射面からの深さと X 線マイクロビームサイズの計算結果, 測定された RPL 領域の幅との関係

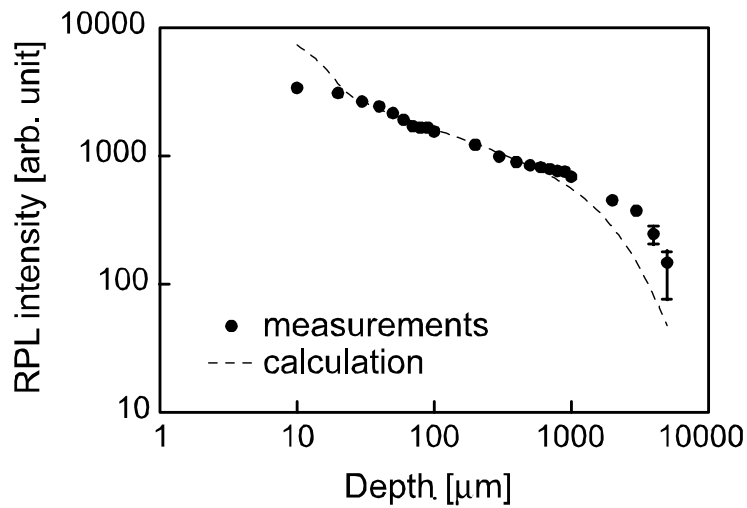


図 3.2.6 RPL ガラスへの入射面からの深さと測定された RPL 強度, X 線マイクロビームによるエネルギー付与量の計算結果との関係

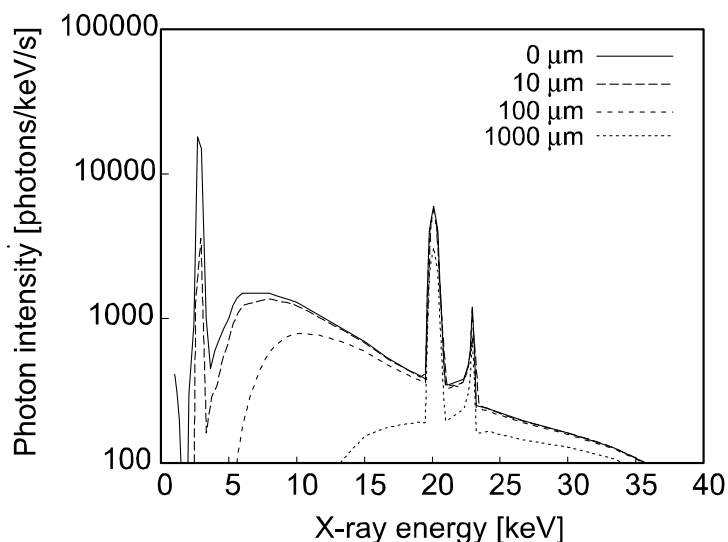


図3.2.7 RPL ガラスの入射面からの深さにおける X 線マイクロビームのエネルギースペクトルの計算結果

ームを入射させ、ガラス中を X 線マイクロビームが輸送される様子を蛍光観察した。ガラス入射面からの各位置における RPL の蛍光領域のサイズと蛍光強度から、X 線マイクロビームの広がり(図 3.2.5), エネルギー付与(図 3.2.6)に関して、計算モデルで得られた結果と比較した。図 3.2.6 で示した計算結果は、図 3.2.7 に示した入射面からの各位置における X 線マイクロビームのエネルギースペクトルを計算した結果から算出した。その結果、入射面から~1 mm の深さにおいては、計算結果と測定結果に良い一致が見られたが、さらに深部においてはビームサイズと強度、両方において計算結果と測定値に差異が生じることが確認された。図 3.2.5 に示されたビームサイズについては、ガラスキャピラリの詳細な形状情報を計算モデルに組み込んでいないため、集光特性が正確に再現できていないと考えられる。また、X 線によるエネルギー付与に関しては、エネルギー付与量が非常に小さくなる RPL ガラス深部での蛍光量の測定精度の低さが影響を与えていると考えられる。

これらの結果より、構築した X 線輸送計算モデルは、物質中への~1 mm 以下の侵入深さにおいては、良い一致を示すことが確認されたが、物質深部でのより精度の高い輸送計算モデルの構築には、計算コードと評価手法のさらなる改良が必要であると考えられる。

### 3.3 光子・電子輸送計算コードによる微小領域での線量付与評価

本節では、X線による物質へのエネルギー付与過程を光子・電子輸送計算コードである EGS4 を用いて計算し、X線マイクロビームによる単一細胞レベルの領域への線量付与について評価した。

#### 3.3.1 EGS4 を用いた微小領域への線量付与計算

X線が物質中を通過する際には、物質との相互作用により、弾性散乱(トムソン散乱)、光電効果、Compton 散乱、電子対創生といった物理現象を引き起こしながら、X線の強度は指数関数的に減弱する[4]。生体の重量の 75%程度は水によって占められることを考えると、放射線によって引き起こされる生体効果の大部分は、水分子が電離して生成されるラジカルによって引き起こされる[5]。水分子と X 線の相互作用が、単一細胞へのマイクロドジメトリを評価する上で重要になる。X線のエネルギーと、水分子に対して各反応が引き起こされる割合との関係を図 3.3.1 に示す。X線マイクロビームによって単一細胞内で引き起こされるこれらの現象に基づいて、マイクロドジメトリの計算コードを用いた評価をおこなった。

#### ・ EGS (Electron Gamma Shower)4 とは

EGS は、汎用の電子・光子モンテカルロ計算コードの中で最も広く使用されている電磁カスケードモンテカルロ計算コードである[6,7]。EGS4 コードシステムでは、以下の

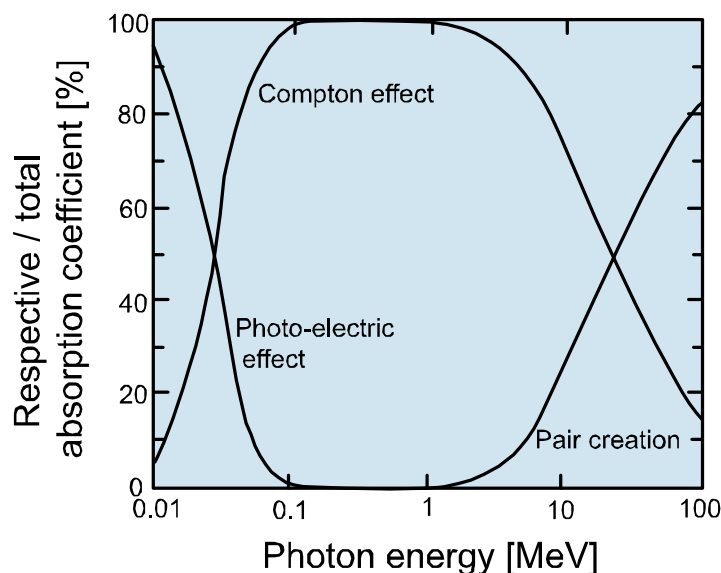


図 3.3.1 光子エネルギーと水に対する各相互作用の発生する割合

電子(陽電子を含む)及び、光子の物理反応が扱われている。光核反応及びその結果生じる粒子の取扱は含まれていない。

- ・ 電子・ 陽電子
  - 制動輻射
  - バーバー散乱 (陽電子-電子散乱)
  - メラー散乱 (電子-電子散乱)
  - 陽電子消滅 (飛行中及び停止時) と消滅ガンマ線の発生
  - 弾性散乱 (モリエール多重散乱モデルを使用)
  - 電離損失
- ・ 光子
  - 電子・ 陽電子対生成
  - コンプトン散乱
  - 弾性散乱
  - 光電吸収

これらの物理現象に関する諸データは、原子番号 1~100 まで元素、化合物の断面積データを用いて計算される。また、EGS4 で扱えるエネルギー範囲は、数千 GeV から、光子では約 1 keV、電子では約 10 keV である。入射粒子として扱えるのは、光子、電子、陽電子または中性の $\pi$ 中間子の崩壊に伴い発生する 2つのガンマ線となっている。

#### ・ EGS4 による単一細胞への線量付与計算

第 2 章の X 線マイクロビームの特性試験において述べたように、細胞照射系における X 線マイクロビームによる線量付与について EGS4 を用いて評価した。ここでは、EGS4 を用いて、細胞に到達した X 線マイクロビームによる線量(エネルギー)付与過程について詳細に述べる。

EGS4 を用いた線量付与計算における計算要素をまとめた説明図を図 3.3.2 に示す。半導体検出器を用いて測定した X 線マイクロビームのエネルギースペクトルから、照射体系において細胞に到達するマイクロビームのエネルギースペクトルを求めた結果は、第 2 章で示したように、図 3.3.3 のようになる。そして X 線マイクロビームが細胞核相当の直径 10  $\mu\text{m}$  の水球に付与するエネルギーを計算することで付与線量を評価した。

また、X 線と水分子の相互作用によって生成された散乱電子によるエネルギー付与領域の拡大についても考察した。この計算中には、X 線と水分子との相互作用(光電効果、Compton 効果)によって生成される散乱電子によるエネルギー付与のみを考慮した。最終的な付与線量は線量率[Gy/s]単位を用いた。Gy(グレイ)は、放射線によって対象物の単位質量あたりへ与えられたエネルギー[J/kg]によって定義されるので、X 線によって対象物に付与されるエネルギーと、その対象物の質量によって決定される。



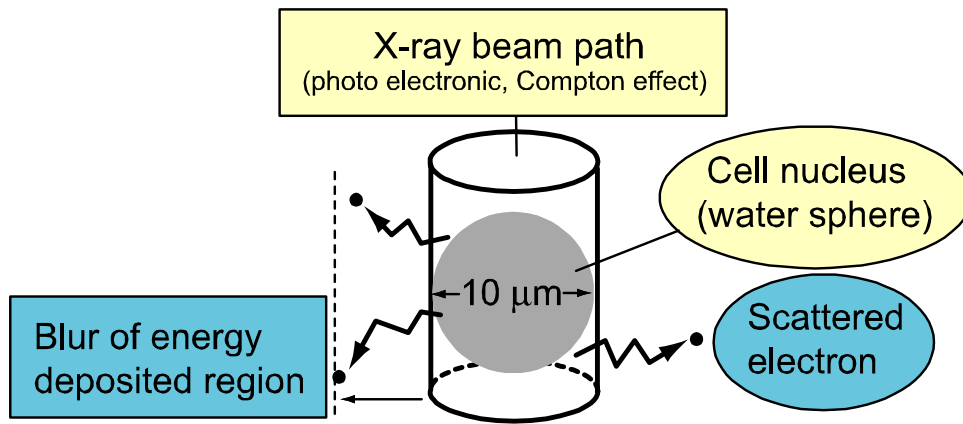


図 3.3.2 EGS4 を用いた X 線マイクロビームによる単一細胞への線量付与計算の説明図

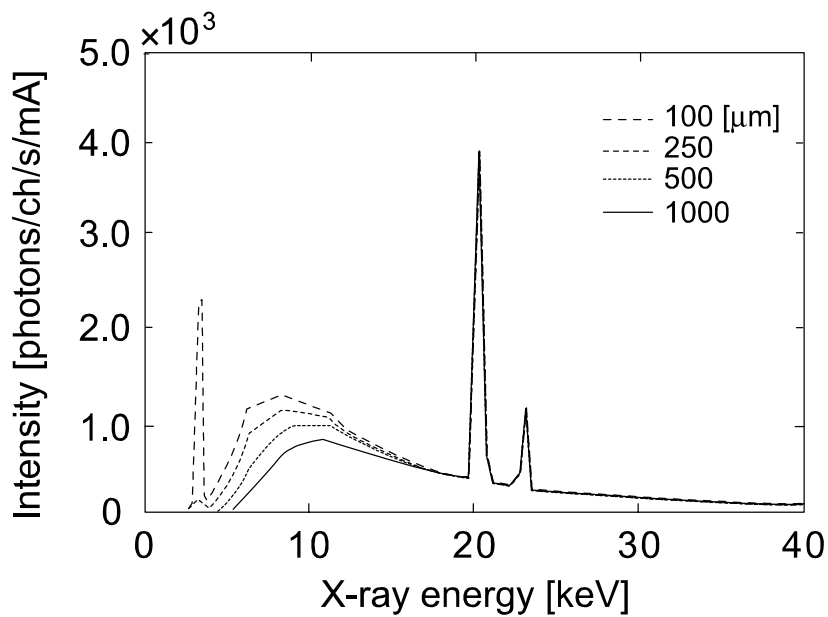


図 3.3.3 培地層を通過して細胞に到達する X 線マイクロビームのエネルギースペクトルの計算結果(培地層の厚みが 100, 250, 500, 1000  $\mu\text{m}$  のときの結果を示した)

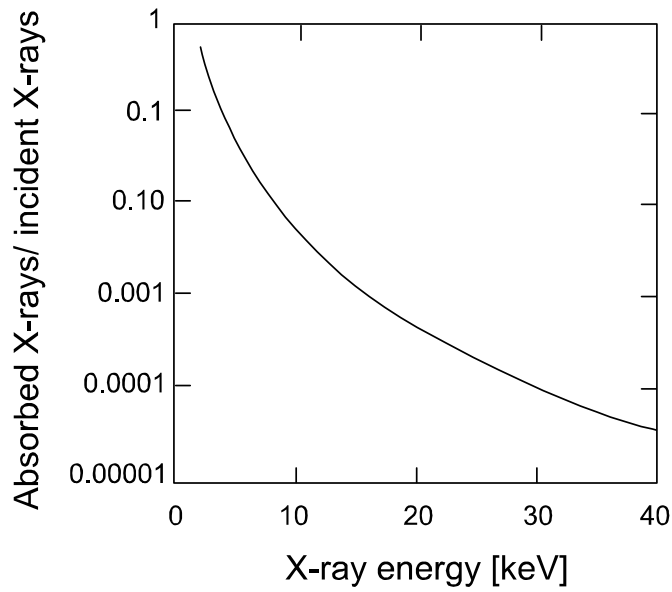


図 3.3.4 10  $\mu\text{m}$  の水層に対する X 線のエネルギーと吸収率の関係

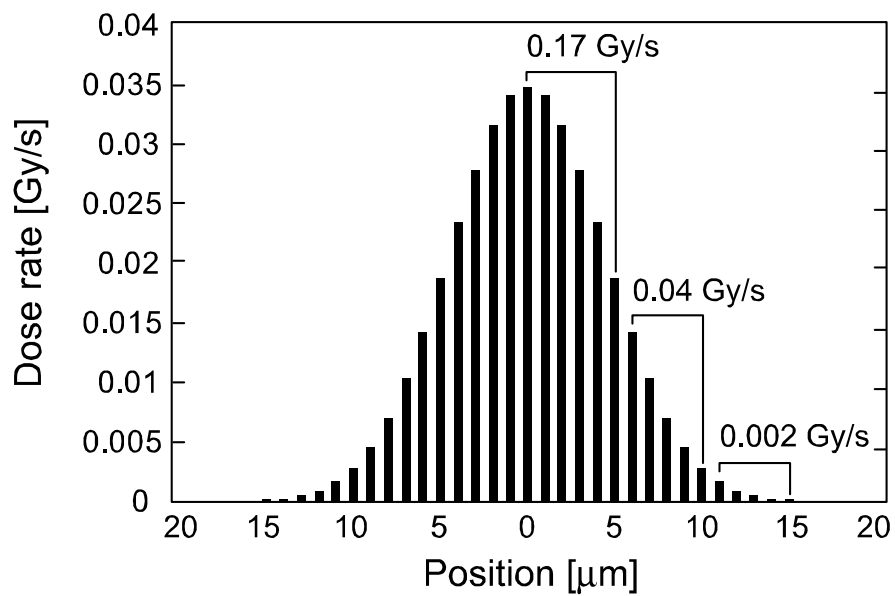


図 3.3.5 X 線マイクロビームによる線量付与の空間分布. (線量率 0.3 Gy/s のときの各領域における線量率を示している)

10  $\mu\text{m}$  の水層に対する X 線のエネルギーに対する吸収率曲線を図 3.3.4 に示す. この吸収曲線と図 3.3.3 に示した細胞に到達するエネルギースペクトルを掛け合わせ, 単位質量, 単位時間あたりへのエネルギー付与量を算出することによって線量率を求めた結果, 照射系において $\sim 0.3 \text{ Gy/s}$  の線量率が見積もられた(図 2.3.13).

次に X 線マイクロビームの線量率の空間分布を, 第 2 章でナイフエッジ法によって測定したマイクロビームのプロファイルから 算出した結果を図 3.3.5 に示す. 図中に示されるように, X 線マイクロビーム中心から 5~10  $\mu\text{m}$  の領域においては, 中心部(0~5  $\mu\text{m}$  の領域)の約 26%, 10~15  $\mu\text{m}$  の領域においては約 1.3%の線量付与がなされることが見積もられた.

またこの時, X 線マイクロビームによって生成される散乱電子のエネルギー分布を図 3.3.6 に示す. 図 3.3.2 に示したように, X 線と水分子の相互作用によって生成された電子は周囲に散乱するため, 大気中で測定した X 線マイクロビームのサイズよりもエネルギー付与領域が拡大することになる. そこで, 実際の細胞照射実験において, ターゲット細胞以外の周辺細胞に与える影響を評価するために, 散乱電子のトラック長を考慮したエネルギー付与領域のにじみを考察した. 図 3.3.7 に EGS4 の計算によって得られた, 水溶液環境での X 線エネルギーに対応した散乱電子のトラック終端位置の空間分布を示す. 図中では, 原点(0, 0)に入射した X 線によって生成される散乱電子のトラック終端位置を 5000 回の X 線の入射に対して計算してプロットした. また, ここで得ら

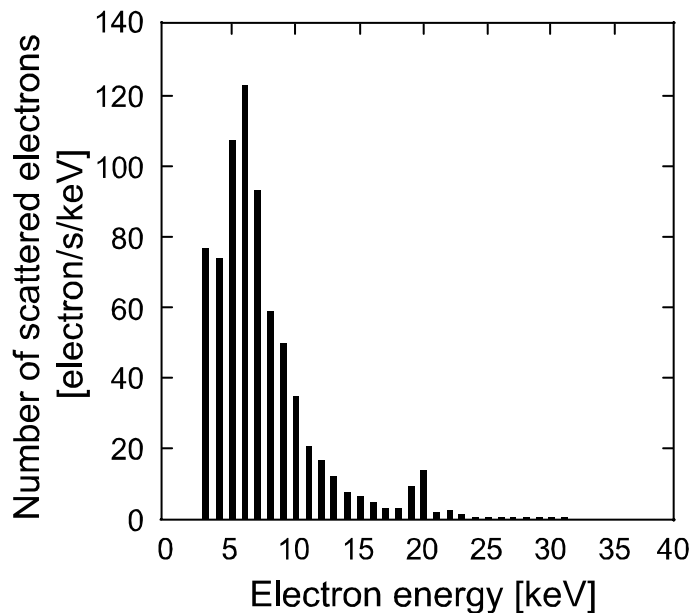


図 3.3.6 X 線マイクロビームによって単位時間あたりに生成される散乱電子のエネルギー分布

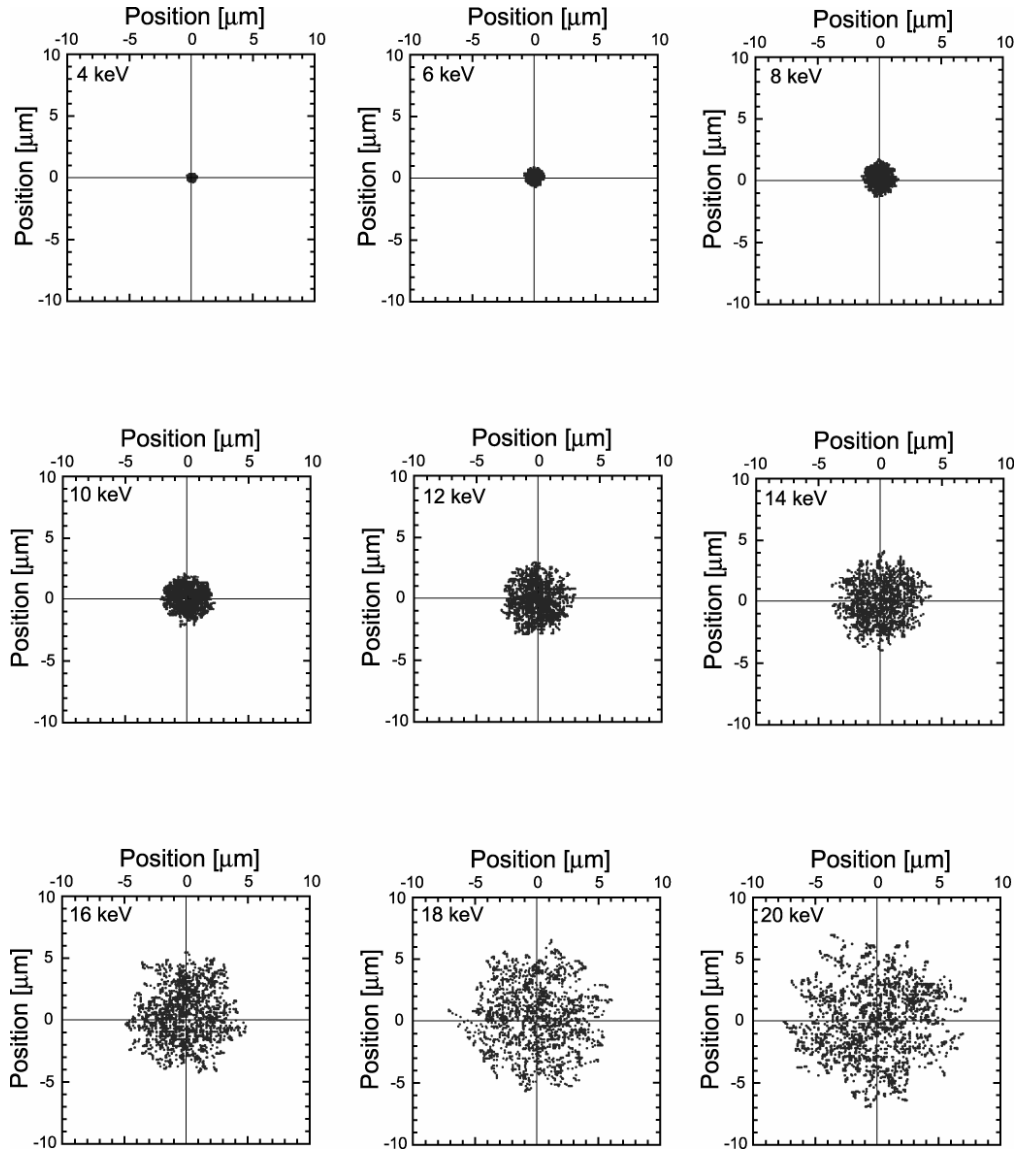


図 3.3.7 水溶液環境において X 線によって生成される散乱電子トラックの終端位置の空間分布を計算した結果. X 線は原点(0, 0)に入射し, エネルギーが 4 ~20 keV のときの結果を示した.

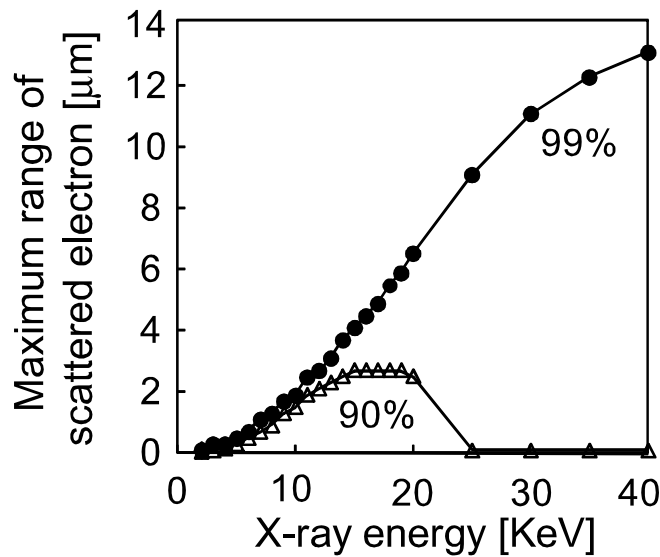


図 3.3.8 X 線エネルギーと散乱電子の最大トラック長さの関係

れた散乱電子の最大トラック長さから、X 線入射位置からの散乱電子の最大到達位置と X 線のエネルギーとの関係を調べた(図 3.3.8). 図中では、生成された散乱電子数の 90%、99%を考慮した結果を示した。

図 3.3.6 と図 3.3.8 に示した結果から、X 線マイクロビームの最外領域から散乱電子が外側に向かって飛び出した場合、マイクロビーム中心から最大 20  $\mu\text{m}$  程度の位置まで到達し、ターゲット細胞周辺の細胞と相互作用する可能性が示された。しかし、20 keV 以上の高エネルギーの散乱電子が生成する数から考えると、周囲細胞への影響は電子数個以下によってもたらされる程度が可能性として考えられ、仮に 20 keV の電子 1 つが細胞核にエネルギーを付与したときの線量値を計算すると、約  $3.0 \times 10^{-4} \text{Gy}$  となり、非常に小さな値にとどまると考えられる。

これらの結果より、ターゲット細胞に 10 Gy 程度の線量付与する場合、測定によって求められた X 線マイクロビームの半値幅径約 10  $\mu\text{m}$  に加えて、半径 5  $\mu\text{m}$  程度までの領域においては、 $\sim 1 \text{Gy}$  の線量が付与される可能性が見積もられ、照射実験においては考慮が必要であることが示された。そしてマイクロビーム入射中心から 10~20  $\mu\text{m}$  程度の、さらに外側の領域においては、わずかながら散乱電子による影響があることがわかった。

### 3.4 結言

本章では, X線マイクロビームによる単一細胞へのマイクロドジメトリを理解する目的で, X線マイクロビームの輸送モデルの構築とモンテカルロシミュレーション計算による単一細胞への線量付与計算をおこなった. ガラスキャピラリを用いた X線の輸送計算モデルを構築し, RPL ガラスを用いた実験結果と比較した. また, 光子・電子輸送モンテカルロ計算コードである EGS4 を用いて, X線マイクロビームによる単一細胞への線量付与について評価した.

## 参考文献

- [1] D. J. Theil et al. “Production of intense micrometer-sized x-ray beams with tapered glass monocapillaries”, *Rev. Sci. Instrum.*, Vol.64, pp.2872-2878 (1993).
- [2] 清原崇之, 「生体分子クラスターとイオンビームの相互作用に関する研究, 大阪大学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻博士前期課程修了論文, (2007).
- [3] Y. Aoi et al., “Radiophotoluminescent observation of X-ray microbeam transport in silver-activated phosphate glass“, submitted to *Jpn. J. Appl. Phys.*(2008).
- [4] 竹井力, 「放射線物理学」, 南山堂, (1971).
- [5] 山口彦之, 「放射線生物学」, 裳華房, (1995).
- [6] W. R. Nelson and H. Hirayama, “The EGS4 code system”, *Standord Linear Accelerator Center Report SLAC-265* (1985).
- [7] 平山英夫, “電磁カスケードモンテカルロコード EGS4 とその応用”, 財団法人高度情報科学時術研究機構 RISTNEWS, NO.31, pp.20-31 (2001).
- [8] Y. Namito et al., “Outline of EGS5 code system”, *Trans America. Nucl. Soc.*, Vol.95, pp.753 (2006).

## 第4章 細胞培養チップ

### 4.1 緒言

数 cm サイズのチップ上に細胞培養や分析のための機能性微細構造を集積し、細胞レベルでの新しい分析ツールとして提案されているチップ型デバイスは、生物・医学分野への応用を目指して、その開発が進められている[1-4]。これらの技術を X 線マイクロビーム照射研究に用いることで、単一細胞におけるマイクロビーム照射効果の分析においても精度の高い分析が可能になる。

本章では、感光性樹脂をフォトリソグラフィ微細加工技術によって作製した、X 線マイクロビーム照射細胞を高精度・効率に分析するための細胞培養チップについて、その作製手法や細胞培養のための特性試験について述べる。そして、新しい細胞照射研究のための特殊な細胞培養系を実現するマイクロパターンニング培養手法について述べる。

### 4.2 フォトリソグラフィによる細胞培養チップの作製

細胞集団中の X 線マイクロビーム照射細胞を高精度・高効率に分析するために、1 細胞を格納できるマイクロチャンバーをアレイ状に集積したチップを作製した。個々のマイクロチャンバーに格納された 1 細胞は、同時並列的に長時間にわたって追跡できるため、マイクロビーム照射細胞について高精度・高効率な照射効果の分析が可能になる。

本節では、UV 光を用いたフォトリソグラフィ微細加工技術と感光性樹脂である SU-8 を用いたマイクロチャンバーアレイチップ(Microchamber Array Chip: McAC)の作製手法、について述べる。

#### 4.2.1 フォトリソグラフィ微細加工

フォトリソグラフィ技術はエレクトロニクス産業において、LSI の集積度を決定する微細加工技術として用いられてきた[5]。フォトリソグラフィは、光によってフォトレジスト内に光化学反応が誘起され、現像溶液に対して溶解性を示したり、不溶性を示したりする、感光性材料であるフォトレジストを用いて微細加工を実現する。光が照射された領域が溶解するレジスト材料をポジ型、照射領域が固化するものをネガ型レジストと呼んでいる[6]。この性質を利用して、微細パターンを有するフォトマスクを通して光をレジスト膜に投影することで、様々な微細構造を作製することができる。



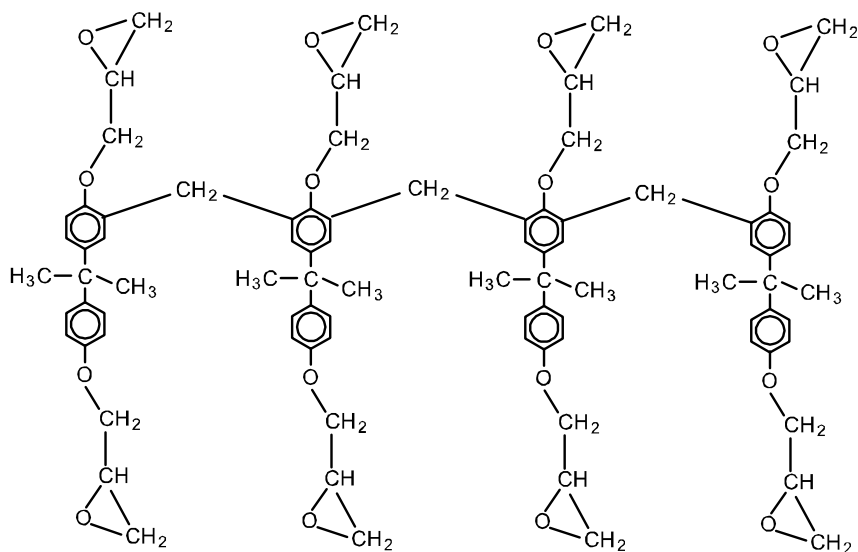


図 4.2.1 SU-8 の化学構造

SU-8 は、図 4.2.1 に示すように 8 つのエポキシ環構造を持つ化合物で、光酸化剤を含有したエポキシ系樹脂ベースのネガ型感光性樹脂である[7,8]. UV 光( $\lambda = \sim 350 \text{ nm}$ )を吸収することで光重合反応によって固化し、個体樹脂材料として利用できる. そして、優れた加工特性、透明性、機械強度、熱・化学的安定性を有し、生体毒性の低さから、生体互換材料として生体工学などの分野でも広く用いられていることから[9,10], UV リソグラフィを用いて SU-8 を微細加工することで細胞培養チップを作製した.

#### 4.2.2 マイクロチャンバーアレイチップの作製

1 細胞を格納できるマイクロチャンバーをチップ上に集積した McAC の作製工程を図 4.2.2 に示す. SU-8 の取り扱いを含め、大まかな工程は化薬マイクロケム社によるマニュアルを参考にした[11]. カバーガラス(18×18 mm, 厚み:  $\sim 170 \mu\text{m}$ )上に塗布した, SU-8 (3050, 化薬マイクロケム)を、スピンドーターを用いて 2000 rpm (60 秒間)でスピンドットした. その後、95°Cで 5 分間の前加熱工程によって SU-8 層中のガス抜きをおこなった後、任意のマイクロパターンを有したフォトマスクを介して、UV 光( $\lambda = 365 \text{ nm}$ , 40  $\text{mW}/\text{cm}^2$ )の照射をおこなった. 架橋反応をさらに促進させるための後加熱工程(95°C, 5 分)を経て、デベロッパー溶液(化薬マイクロケム)で、固化していない SU-8 を洗い流した. その後、細胞培養のためにチップを生理食塩水で洗浄し、オートクレーブユニット

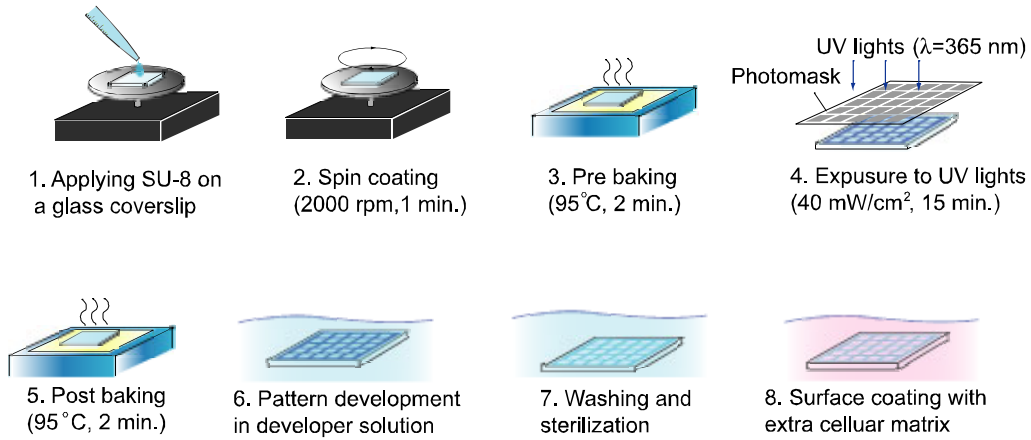


図 4.2.2 McAC の作製工程

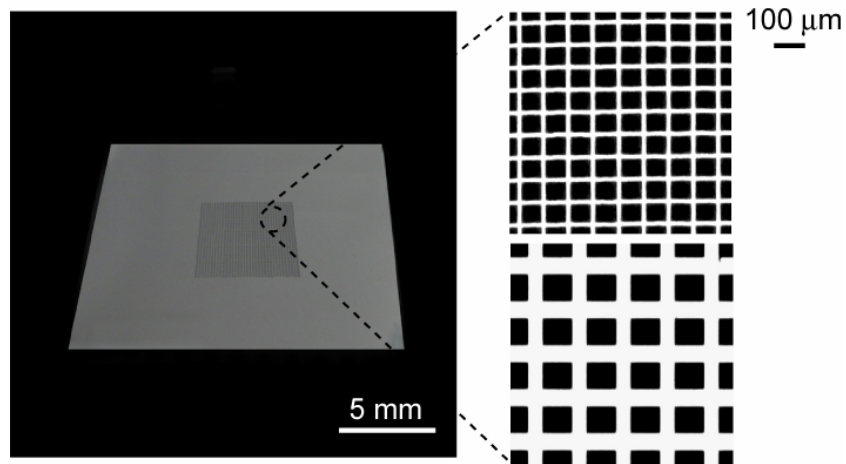


図 4.2.3 使用したフォトマスクの写真と異なるサイズのマイクロパターンを透過光によって顕微鏡観察した様子。

を用いて加熱滅菌(121°C, 15 分)した。最後に、細胞が基板に接着しやすいように、ゼラチンなどの細胞外基質で表面をコートした(細胞培養のための基板の表面処理は付録 B に詳細を記述した)。

McAC の作製に用いたフォトマスクは、レーザー走査システムを用いて作製した[12]。異なるサイズ(50×50 μm<sup>2</sup> と 100×100 μm<sup>2</sup>)のマイクロチャンバーを作製するために用いたフォトマスクの写真を図 4.2.3 に示す。

### 4.2.3 微細構造の評価

図 4.2.4 に作製した McAC の写真を示す. 2 種類の写真を用いて作製したマイクロチャンバーのサイズを測定したところ, およそマスクのマイクロパターンのサイズに従ったマイクロチャンバー数千個が, 一様に作製できていることを確認した. また, 図 4.2.4 の挿入図に示しているように, フォトマスクのマイクロパターンにおいて, 右上の角に位置する 2 つのマイクロチャンバーを欠けさせることで, 顕微鏡観察したときに McAC の方向を容易に確認できるようにした. 図 4.2.5 に McAC の表面形状を, 接触式表面計測装置(Dektak3, アルバック)で測定した結果を示す. マイクロチャンバーを仕切る壁の高さは約 15  $\mu\text{m}$  であった.

次にマイクロビーム照射細胞の分析に用いる蛍光顕微法における, SU-8 の自家蛍光の影響について評価した. 図 4.2.6 に, 生物蛍光分析のためのフィルタセットに対応した, SU-8 の発光と細胞試料における検出対象(詳細は第 5 章に記述)の蛍光強度を測定した結果を示す. 蛍光観察は, 励起光源に水銀ランプ(U-LH75XEAP0, Olympus), 蛍光検

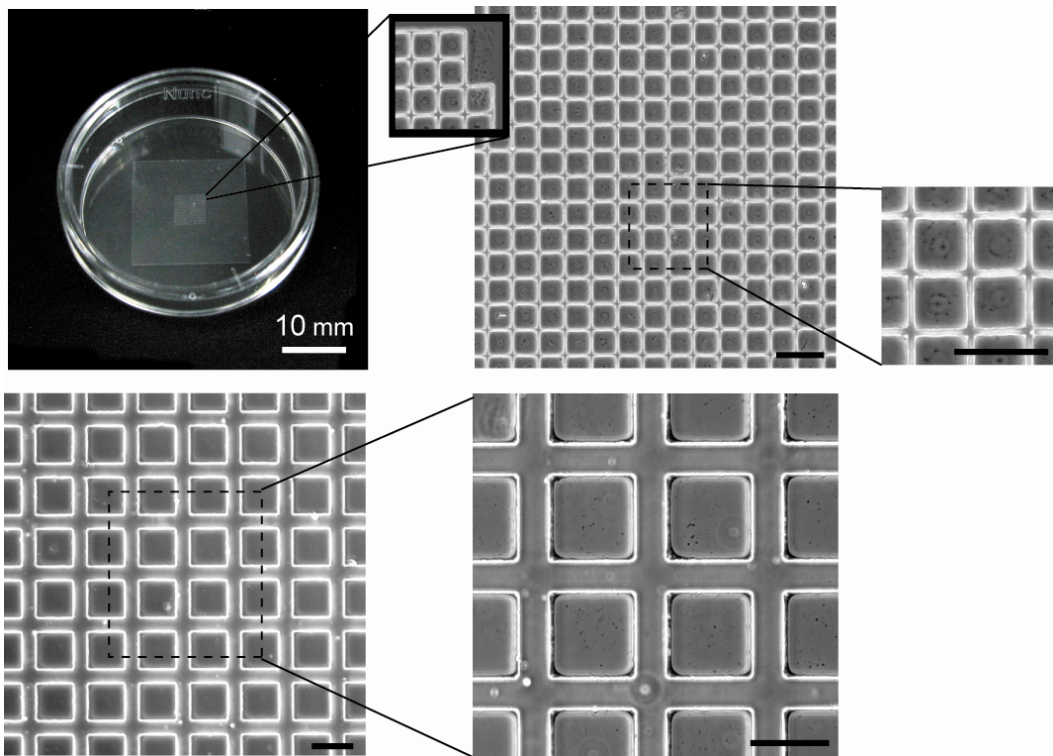


図 4.2.4 作製した二種類の McAC の写真. スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示している.

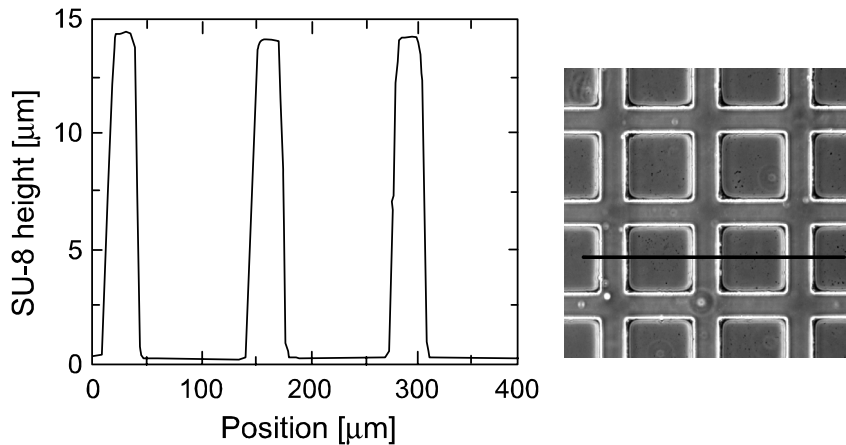


図 4.2.5 McAC の表面形状(右図内のに示した線上を走査した).

出に冷却 CCD カメラ(DP30BW, Olympus)を用いた蛍光顕微鏡システム(IX-71, Olympus)を用いた。その結果、各フィルタセットにおいて、SU-8 の自家蛍光は、検出対象由来の蛍光強度に対して十分小さいことを確認し、蛍光顕微法における分析への影響はほぼないことが示された。

また、固化した SU-8 の溶解温度は約 380 °C であり、機械的強度も高いことから、作製したチップは細胞試料の培養過程における、毎回の加熱滅菌、洗浄過程においても繰り返し使用が可能であることを確認した。

### 4.3 マイクロチャンバーアレイチップでの細胞培養

作製した McAC 上で細胞を培養するにあたって、幾つかの項目において特性試験をおこなった。本節では、McAC 上に培養された動物細胞に対して、蛍光試薬を用いた細胞の活性や、細胞の増殖特性を調査した結果について報告する。また、X 線マイクロビーム照射実験のための最適な細胞培養密度の調査結果についても述べる。

#### 4.3.1 蛍光試薬を用いた細胞活性試験

McAC 上に培養した細胞が生命活動を維持しているかどうかを細胞膜透過性の蛍光試薬 BCECF-AM を用いて調査した。BCECF-AM は細胞膜透過性の化合物であり、細胞

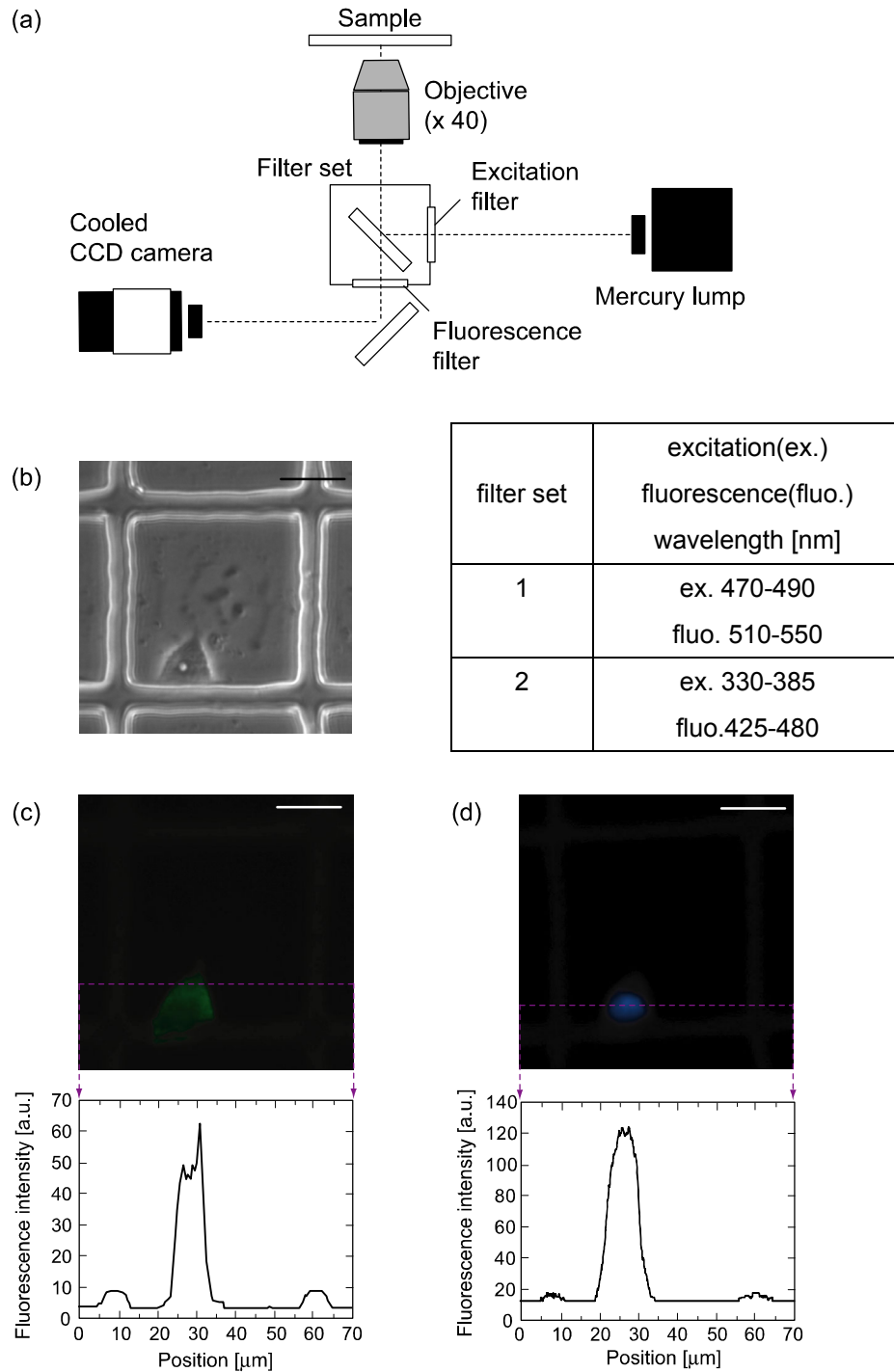


図 4.2.6 (a)蛍光観察システムのレイアウト (b)測定した細胞試料の光学顕微鏡写真 (b)フィルタセット 1 を用いて Alexa Fluor 488 でラベルした IL-6 を蛍光観察した様子(カメラ露光時間 : 1.5 s) (c)フィルタセット 2 を用いて Heochest 33324 染色した細胞核を観察した様子(露光時間 : 500 ms). スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示している.

内に侵入した後、生きている細胞内でのみ加水分解され、特定の波長の励起光に対して蛍光特性を示す蛍光物質となって細胞内にとどまる[13]。この性質を利用して BCECF-AM を導入した細胞に対して、488 nm の励起光を用いて BCECF 由来の蛍光を観察することで各細胞の生死を知ることができる[14]。

McAC 上にラット神経様細胞である PC12 を蒔種 24 時間後に顕微鏡観察し、細胞の浮遊塊や、正常の細胞形態に比べて大きく変質した細胞など、明らかな異常がないことを確認した後、BCECF-AM を細胞内に導入した (PC12 の細胞培養と BCECF-AM 導入の詳細なアッセイ手順は付録 B に記述した)。蛍光顕微鏡を用いて、BCECF-AM を導入した PC12 細胞を蛍光観察した様子を図 4.3.1 に示す。大多数の細胞において 488 nm の励起光に対して強い蛍光を示しており、McAC 上で細胞が生命活動を維持しており、活性を保っていることが確認された。

### 4.3.2 細胞の増殖特性の評価

細胞増殖は、細胞において最も基本的な活動であり、その速度は細胞の種類と培養条件によっておよそ一定になる。McAC 上に培養した細胞が正常な活動を維持していることを調べるために、McAC 上に培養した PC12 細胞の増殖特性を調査した。細胞蒔種 24 時間後から、各マイクロチャンバーを追跡観察し、細胞の増殖率について調べた。図 4.3.2 は、マイクロチャンバー内の細胞を追跡観察した様子と各条件における増殖率曲線である。50  $\mu\text{m}$  サイズのマイクロチャンバーについては、3 細胞程度になると空間的制限によるためか細胞増殖率が低下することがわかった。100  $\mu\text{m}$  サイズのマイクロチャンバーについては、観察時間内においては、概ね通常の培養環境に近い増殖率を示した。この結果から、マイクロチャンバー内において 1 細胞からの増殖に関しては、正常な増殖率を示すことを確認した。

### 4.3.3 細胞の培養密度の最適化

McAC に培養した試料細胞において X 線マイクロビーム照射効果を効率よく調しらべるために、各マイクロチャンバーに単一細胞が格納される細胞培養密度を調査した。35mm ペトリディッシュ内で McAC に PC12 細胞を異なる密度で蒔種し、24 時間後、各マイクロチャンバーに格納される細胞数と、調査したマイクロチャンバー 400 個に対するその割合を、異なる細胞密度において調査した結果を図 4.3.3 に示す。その結果、1 つのマイクロチャンバーに格納される細胞数の分布はポアソン分布に従わず、密度が大きくなるにつれて複数個の細胞がマイクロチャンバーに格納される確率が高くなる傾向にあった。これは、細胞密度が大きくなると細胞懸濁液において、細胞同士が接着しやすくなるためであると考えられる。

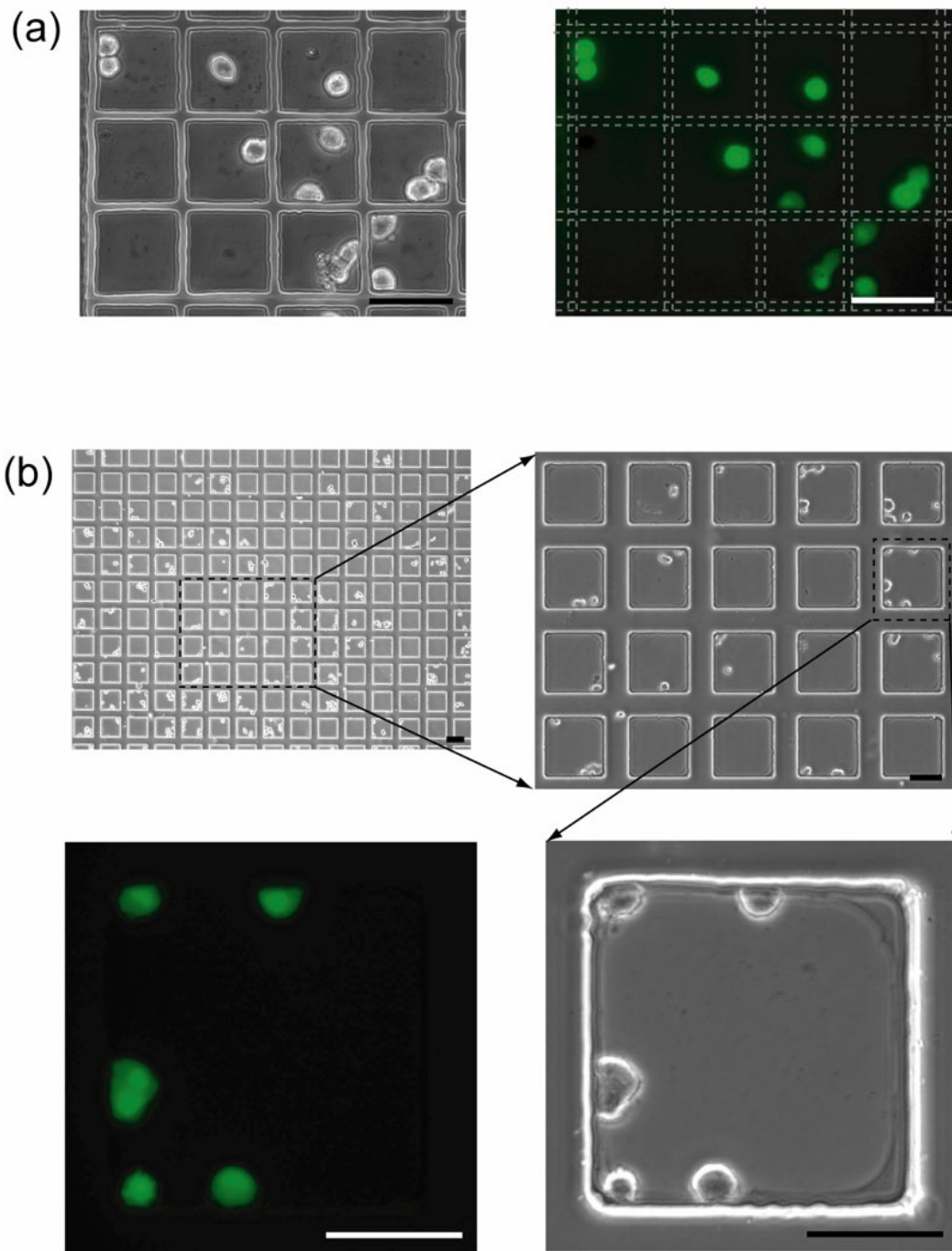


図 4.3.1 (a) 50  $\mu\text{m}$  サイズと(b)100  $\mu\text{m}$  サイズの McAC 上での BCECF を導入した PC12 細胞を蛍光観察した様子. スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示している.

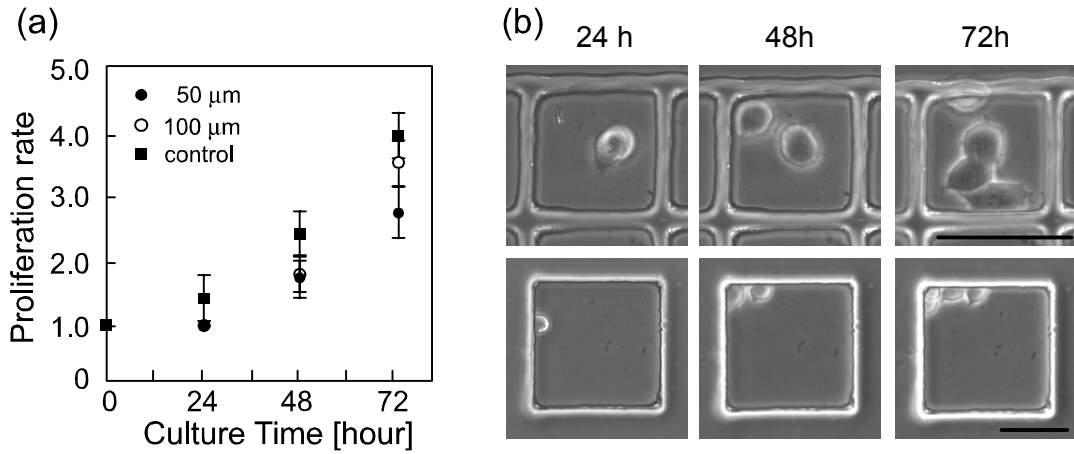


図 4.3.2 (a) McAC での PC12 細胞の増殖特性. 誤差棒は標準偏差を示している.  
 (b) 50, 100 μm 四方のマイクロチャンバーにおける蒔種後 24, 48, 72 時間後の様子. スケールバーは 50 μm を示している.

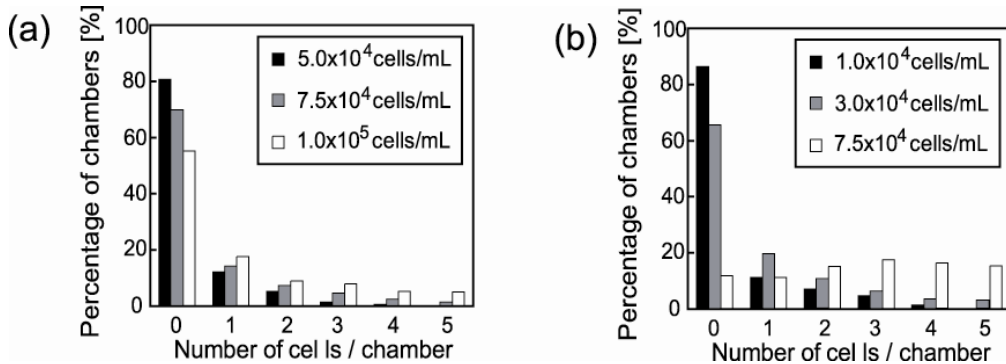


図 4.3.3 (a) 50 μm サイズと(b)100 μm サイズの McAC 上に異なる細胞密度で細胞を蒔種した時の, 各マイクロチャンバーに格納される細胞数とその割合の関係. 測定結果は 3 度の独立した蒔種におけるデータの平均値を示している.

#### 4.4 マイクロパターンニング培養手法の開発

マイクロビームを用いた単一細胞照射研究において, 照射細胞と周囲の非照射細胞の位置関係は, バイスタンダー効果のような細胞間コミュニケーションを調査する上で非常に重要になる. 現在までに, バイスタンダー効果の誘発機構として, 照射細胞からバ



イスタンダー効果誘発因子が(1)培養液中に放出される[15], (2)細胞間のギャップ結合を介して移動する[16]、の2つのバイスタンダー因子の移動経路が考えられており、後者の機構は細胞同士が物理的に接触する状態でしか発生しない。細胞間の距離を制御することができれば、バイスタンダー効果の研究に有効な培養系となり得る。

本節では、マイクロビーム細胞照射研究に応用が考えられるマイクロパターニング培養技術の開発について、その手法の説明と作製した培養チップの特性について述べる。

#### 4.4.1 細胞のマイクロパターニング培養手法

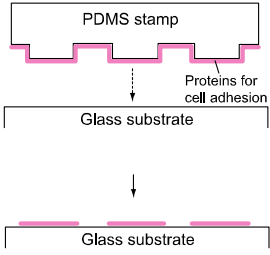
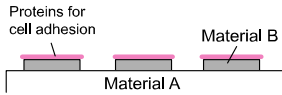
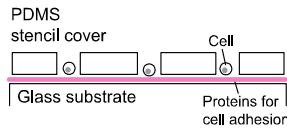
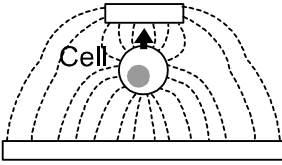
現在まで、細胞間の距離を制御するためのマイクロパターニング培養手法には多くの技術が提案されている。それらの技術は、生体内環境を *in vitro* で再現し、生物学の基礎研究や薬剤効果の正確な評価体系への利用が期待されている[17,18]。表 3.4.1 に、現在、マイクロパターニング培養に用いられている代表的な手法についてまとめた。マイクロパターニング培養手法が研究され始めた当初は、半導体のフォトリソグラフィ過程と同様に、レジストでマスクした基板を細胞接着性たんぱく質で表面処理した後、レジストを取り除くことで接着たんぱく質のパターニング基板を作製していた。しかし、接着たんぱく質自体がレジストの剥離剤などにさらされてしまうため、細胞毒性が高まる問題があった。

その後、Whiteside らによって、特定の基板材料表面に対する、接着分子の選択的な吸着(自己組織化)を利用したパターニング[19]と、この10年で最も普及した $\mu$ CP法が開発された[20]。 $\mu$ CP法は、フォトリソグラフィによって作製した構造物を鋳型にしたPDMS(ポリジメチルシロキサン)スタンプを作製する。このPDMSスタンプの表面に接着たんぱく質を吸着させ、ガラス基板に押し付けることで、接着たんぱく質のマイクロパターンを転写することができる。そして、基板表面が露出した部分を細胞に対して非接着性を示すたんぱく質で処理することで、マイクロパターニング培養が可能になる。スタンプを作製すれば、フォトリソグラフィのシステムがなくともパターニング培養基板を大量生産でき、数種類のたんぱく質のパターニングを同時におこなうことができる利点もあるが、スタンプ自体のたんぱく質の吸着性の低さや、基板との機械的な密着性によっては正確なパターニング基板が作製できない、といった問題への解決方法が検討されている[21,22]。

その他に表 4.4.1 に示した、パターニングされた細孔を有するPDMSなどで作製されたマスクの上から細胞を蒔種し、細胞接着後マスクを取り除いて細胞をパターニングするステンシル法[23]や、微小電極を配置した基板上で、細胞に対して電場を用いた誘電泳動力を作用させることでパターニングする誘電泳動法[24]などがあるが、それぞれ一長一短あり、必要とされるパターニング分解能(1細胞もしくは複数細胞)、細胞周囲の成長空間の必要性やパターニングの可変性など、目的に応じて選択されている。

ここでは、これまでも報告されてきた、基板表面へのたんぱく質の自己組織化を利

表 4.4.1 代表的な細胞のマイクロパターンニング培養手法

手法	特徴	問題点
<p>μCP 法</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 量産が容易</li> <li>・ 数種類のたんぱく質を 1 つの基板上にパターンニングできる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ PDMS スタンプへのたんぱく質の吸着具合や、基板とスタンプの密着具合によってパターンニング精度が低下する</li> </ul>
<p>分子自己組織化法</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ パターンニングの精度が高い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ パターン作製過程が複雑</li> </ul>
<p>ステンシル法</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 量産が容易</li> <li>・ パターンニング後、細胞の培養空間が制限されない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 基板とステンシルマスクの密着具合によってパターンニング精度が低下する</li> </ul>
<p>誘電泳動法</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 電極への印可周波数を選択することでその場でパターンニングのパターンを調整できる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ パターンニングの精度は低い</li> <li>・ 電界の細胞への影響</li> </ul>

用する手法に注目した。この手法は、大面積に高いパターンニング精度を実現することが可能であるが、多くの場合は、金属膜の形成、エッチングや表面処理などが必要であり、作製過程が複雑であった[25]。そこで、たんぱく質、細胞に対して高い非接着特性を示す新しいプラスチック基板材料とフォトリソグラフィによる微細構造作製技術を組み合わせることで、従来の手法に比べて作製が容易であり、高い接着、非接着選択性を有するマイクロパターンニング培養基板の開発を試みた。

#### 4.4.2 培養チップの作製

荷電粒子の飛跡検出器として用いられている CR-39 プラスチック基板は、アリルジグリコールカーボネイトをモノマーとした無色透明、非結晶性の熱硬化性プラスチックである(図 4.4.1)[26]。細胞照射研究において、細胞を通過した荷電粒子の情報を取得することができる細胞培養基板として用いられており[27]、細胞と荷電粒子との相互作用

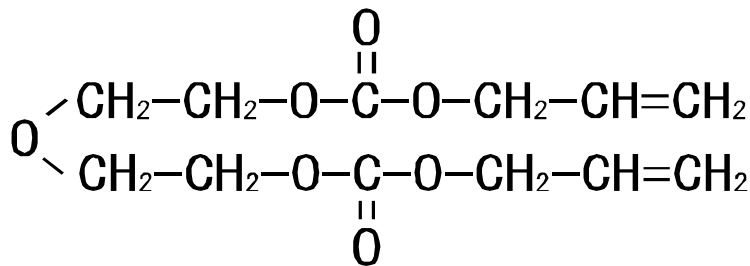


図 4.4.1 CR-39 モノマーの構造

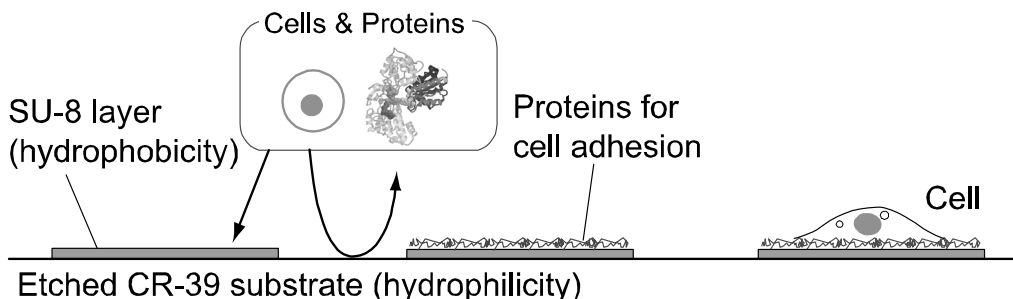


図 4.4.2 マイクロパターンニング培養チップの概略図

を詳細に解析するための検出技術も提案されている[28]. このような細胞照射研究のための培養基板としての特性についても調査されており, 強アルカリ溶液によって表面エッチング処理をおこなうことで, 表面の親水性が上昇するため, 細胞の接着性が低下することなどが報告されている[29]. この性質とたんぱく質が疎水性の表面に吸着される, 疎水効果[30]を利用して, エッチング処理した CR-39 基板上に, 高い疎水性を示す[31] SU-8 の微細構造を作製することで, 細胞接着性たんぱく質の自己組織化現象を利用した細胞のマイクロパターンニング培養が可能かどうかを試みた(図 4.4.2).

大まかな工程は図 4.2.3 に示したマイクロチャンバーアレイチップの作製工程と同様であるが, ポリプロピレンクリコール1モノメチルエステル2アセテート(ナカライ)を用いて2倍に希釈した SU-8 (3010, 化薬マイクロケム)と, 基板に強アルカリ溶液で化学エッチングした CR-39 プラスチック基板(フクビ化学工業)を用いた. また, フォトリソグラフィのため, 新たに細胞接着領域を格子状に配置したものを, 培養領域のサイズと領域間の距離を変えて数種類作製した(図 4.4.3). これらを用いて作製したマイクロパターンニング培養チップの写真とその表面を蛍光ゼラチンで処理した後, 蛍光観察した様子を図 4.4.4 に示す. SU-8 のマイクロパターン領域に強い蛍光が観察されており, 接着たんぱく質分子のマイクロパターンに従った自己組織化が確認された. また, 図 4.4.4(a)に示したマイクロパターンニングチップの表面形状を接触式表面計測装置(Dektak3, アルバック)で測定したところ, SU-8 層の厚みは約  $0.4 \mu\text{m}$ であった(図 4.4.5).

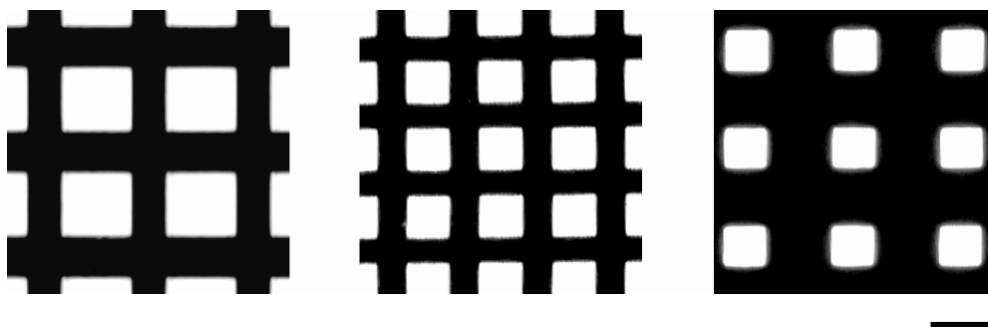


図 4.4.3 使用したフォトマスクのうち幾つかを透過光照明で顕微鏡観察した様子. スケールバーは  $50 \mu\text{m}$  を示している.

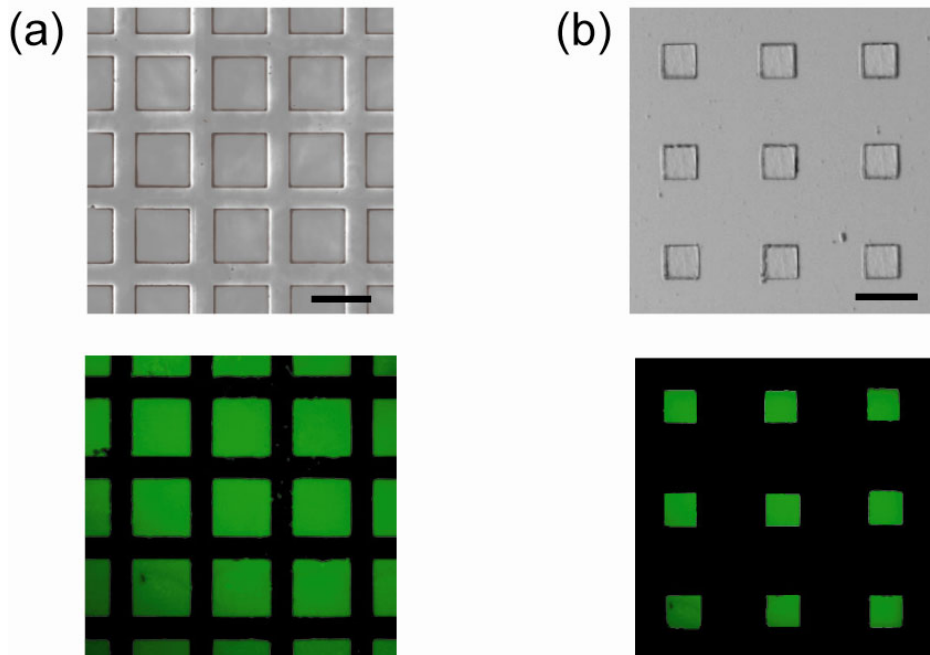


図 4.4.4 エッチングした CR-39 上に作製した SU-8 マイクロパターンの顕微鏡写真と蛍光ゼラチン処理して蛍光観察した様子. スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示している.

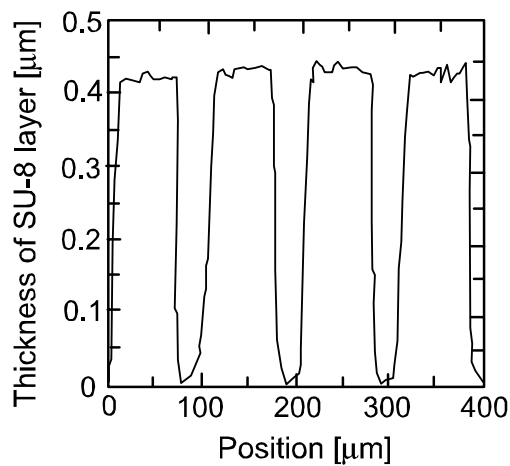


図 4.4.5 CR-39 上の SU-8 マイクロパターンの表面形状

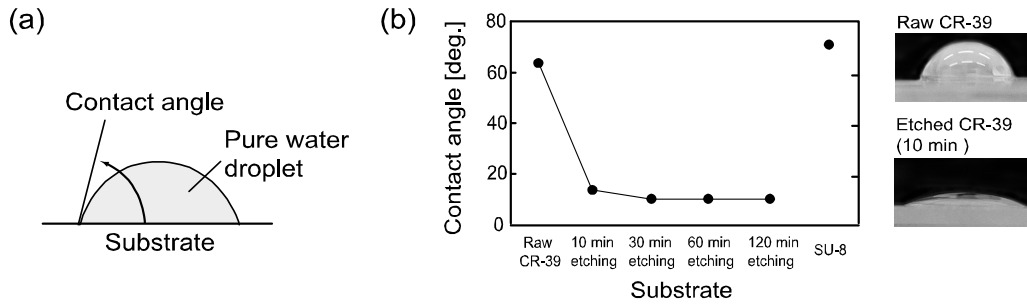


図 4.4.6 (a)基板表面と水滴の接触角の測定 (b)各基板における接触角の測定結果

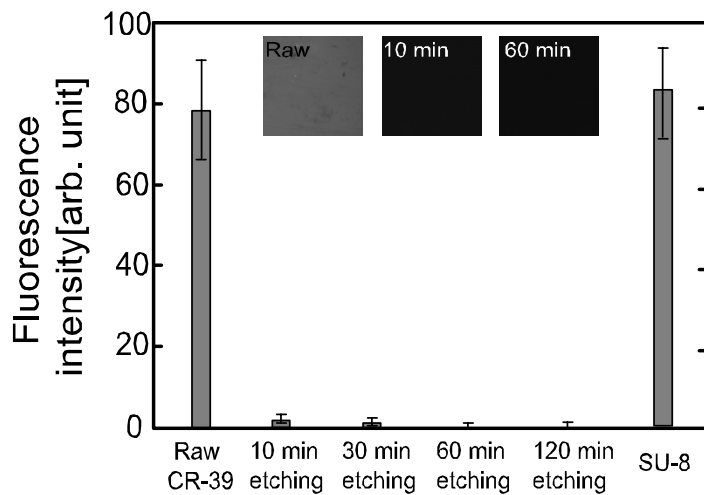


図 4.4.7 蛍光ゼラチン処理後の各基板表面の蛍光強度。蛍光強度はバックグラウンドを差し引いた値，誤差棒は平均値の標準偏差を示している。

・マイクロパターニング培養チップ作製のための予備実験

マイクロパターニング培養チップの作製おこなうために，CR-39 と SU-8 表面へのたんぱく質と細胞の接着性を調査した。まず，表面未処理の CR-39 と SU-8，6 mol/L の水酸化ナトリウム水溶液で異なる時間表面処理した CR-39 について，表面の親水性を，液滴の接触角を計測することで評価した結果を図 4.4.6 に示す。各基板の表面に，マイクロピペットを用いて 10  $\mu$ L の蒸留水を滴下し，真横からデジタルカメラによって撮影した写真を拡大することで，液滴と基板の接触角を測定した。図中に示した接触角の値は，各基板において，3 箇所測定した結果の平均値である。その結果，エッチング処

理によって接触角は顕著に小さくなっており、エッチング後の CR-39 表面は親水性が大幅に向上していることを確認した。

次に、細胞接着性を向上させるゼラチンの基板表面への吸着を調べた。図 4.4.7 に、蛍光性ゼラチンを用いて表面の蛍光輝度を観察した結果を示す(蛍光ゼラチンによる表面処理の詳細な手順は付録に記述した)。未処理の CR-39 と SU-8 には蛍光ゼラチンの吸着が確認されたが、60 分以上のエッチング処理をおこなった CR-39 基板への蛍光ゼラチンの吸着は確認されなかった。また、10 分、30 分のエッチング処理をおこなった基板表面には、わずかにコントロールより高い蛍光輝度が観察されたが、疎水効果によって、たんぱく質分子が基板表面に吸着されることが示された。

そして、ゼラチン表面処理した各基板において細胞を蒔種した後、24 時間培養して観察した様子を図 4.4.8 に示す。培養試験には細胞の形態が基板表面の状態によって変化しやすいヒト癌細胞である HeLa 細胞を用いて、その接着率と形態から各基板表面の細胞培養への適合性を判断した。

その結果、未処理の CR-39 と SU-8 表面では、正常な形態の細胞が高い接着率を示すことが確認されたが、60 分以上エッチング処理した CR-39 表面への細胞の接着はほぼ確認されなかった。この結果から、60 分エッチング処理した CR-39 上に SU-8 のマイクロパターンを作製した基板をゼラチン処理することで、マイクロパターンニング培養基板が作製できることが示唆された。

#### 4.4.3 培養チップでの細胞培養試験

作製したマイクロパターン培養チップで、高コントラストのパターンニング培養が可能かどうかを調査した。図 4.4.9 は、表面をゼラチン処理したマイクロパターン培養チップに HeLa 細胞を  $1.0 \times 10^4$  cells/mL で蒔種した 24 時間後、基板表面を洗浄した後の様子である。SU-8 のマイクロパターンに従った細胞の接着が確認され、CR-39 表面への細胞の接着はほぼ観察されなかった。この時、蒔種する細胞密度を大きくすると、一つの細胞接着領域に過剰に細胞が密集してしまうことを確認した(データは示していない)。この時、細胞活性指示薬である BCECF-AM を導入し、蛍光観察した様子から(図 4.4.9 挿入図)、マイクロパターンニング培養された細胞が活性を保っていることを確認した。

次に、100  $\mu$ m 四方の細胞接着領域を有するマイクロパターンニング培養チップに HeLa 細胞を蒔種し、特定の領域を追跡観察することで、マイクロパターン上での細胞の増殖率を調べた。その結果、図 4.4.10 に示すように、蒔種 48 時間後までは、通常の培養環境に近い増殖率を示すことが確認され、マイクロパターンニング培養された細胞が細胞活動を維持していることから、マイクロビームを用いた細胞照射研究に有効な培養プラットフォームとして利用できることが示された。

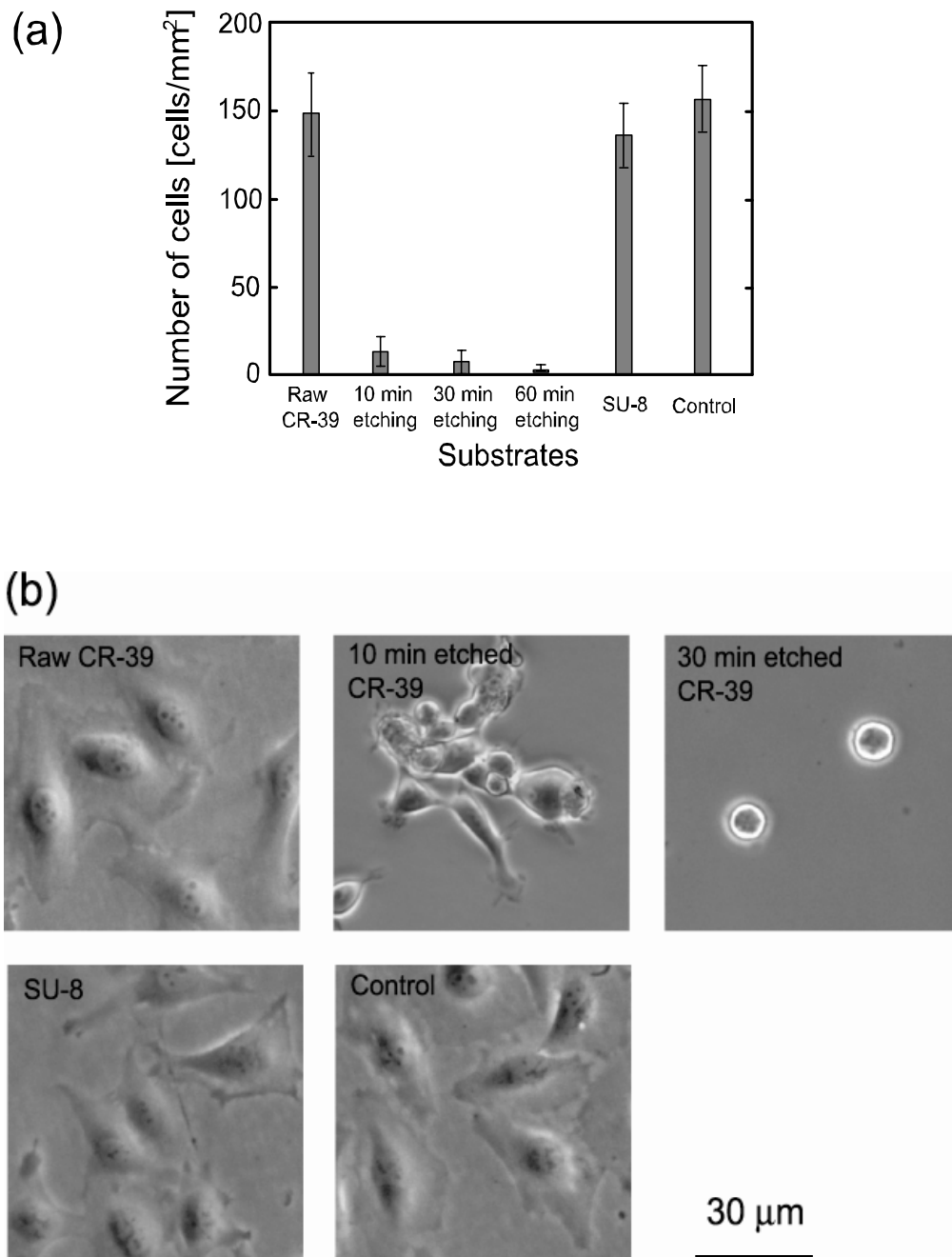


図 4.4.8 各基板における(a)細胞接着率と(b)細胞形態の様子. コントロールには細胞接着加工を施したペトリディッシュを用い, 誤差棒は標準偏差を示している.



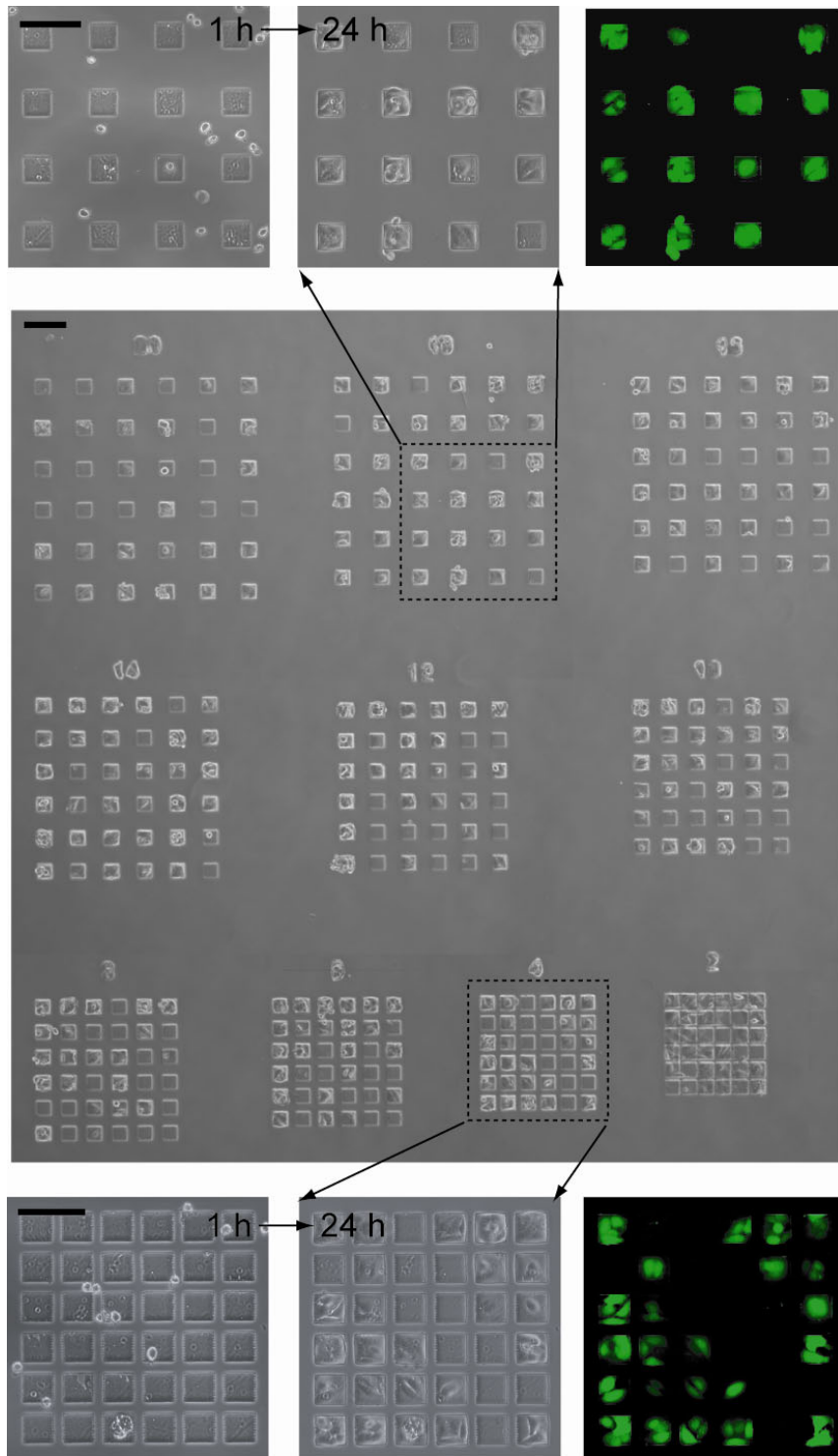


図 4.4.9 マイクロパターンニング培養チップ上での細胞培養の様子. スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示している. (挿入図: 蒔種 1 時間後, 24 時間後と BCECF-AM 導入後に 蛍光観察した様子)

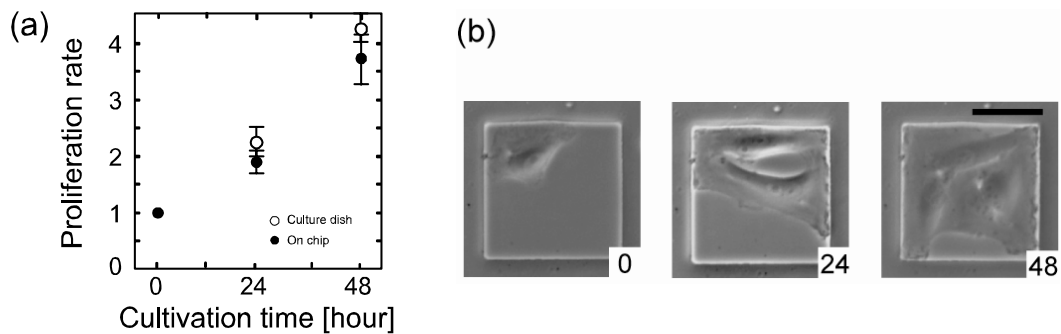


図 4.4.10 (a)マイクロパターン培養チップ上での細胞増殖率 (b)マイクロパターン上での細胞増殖の様子(0~48 時間). スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示している.

## 4.5 結言

本章では、フォトリソグラフィ微細加工技術と感光性樹脂である SU-8 を用いた細胞培養チップの開発について述べた。まず、単一細胞における X 線マイクロビーム照射効果を分析する目的で、単一細胞の格納が可能なマイクロチャンバーをチップ上に集積した、マイクロチャンバーアレイチップ(McAC)の作製工程について述べた。そして、作製した McAC 上での細胞培養について、蛍光指示薬を用いた細胞活性、細胞の増殖特性や培養のための細胞密度について評価し、McAC が単一細胞の分析に有効であることを確認した。また、より高度な細胞照射実験を可能にするためのマイクロパターンニング培養技術について、CR-39 プラスチックを基板としたマイクロパターンニング培養チップを作製し、細胞のマイクロパターンニング培養について評価試験をおこなった結果、SU-8 表面のみに細胞の接着が観察され、微細構造に対して選択性の高いマイクロパターンニング培養が可能であることが示された。

## 参考文献

- [1] V. I. Chinet et al., “Microfabricated platform for studying stem cell fates”, *Biotech. Bioeng.*, Vol.88, No.3, pp.399-415 (2004).
- [2] S. K. Sia and G. M. Whitesides, “Microfluidic device fabricated in poly-(dimethylsiloxane) for biological studies”, *Electrophoresis*, Vol.24, pp.3563-3576 (2003).
- [3] E. E. Hui and S. N. Bhatia, “Micromechanical control of cell-cell interactions”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.104, pp.5722-57 (2007).
- [4] C. A. Ahn et al., “Disposable smart lab on a chip for point-of-care clinical diagnostics”, *Proc. IEEE*, Vol. 92, No.1, pp.154-173 (2004).
- [5] 岡崎信次 他, “はじめての半導体リソグラフィ技術”, 工業調査会, (2003).
- [6] 伊藤洋 他, “レジスト材料”, 共立出版, (2005).
- [7] J. M. Shaw et al., “Negative photoresists for optical lithography”, *IBM J. Res. Develop.*, Vol.41, pp.81-94 (1997).
- [8] D. Wong et al., “Study of X-ray lithographic conditions for SU-8 by Fourier transform infrared spectroscopy”, *Microelectr. Eng.*, Vol.83, pp.1912-1917 (2002).
- [9] G. Voslerician et al., “Biocompatibility and biofiling of MEMS drug delivery devices”, *Biomater.*, Vol.24, pp.1959-1967 (2003).
- [10] J. Z. Hilt et al., “Microfabricated drug delivery devices”, *Int. J. Pharmac.*, Vol. 306, pp. 15-23 (2005).
- [11] Microchem website  
<http://www.microchem.com/products/pdf/SU-8%203000%20Data%20Sheet.pdf>
- [12] 藤田智久, “単一神経細胞への X 線マイクロプローブ照射手法の開発”, 大阪大学工学研究科電気電子情報工学専攻博士前期課程修了論文, (2008).
- [13] S. A. Weston and C. R. Parish, “New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy”, *J. Immun. Meth.*, Vol.133, , pp.87-97 (1990).
- [14] C. R. Chu et al., “In situ assessment of cell viability within biodegradable polylactic acid polymer matrices”, *Biomater.*, Vol.16, pp.1381-1384 (1995).
- [15] E. I. Azzam et al., “Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from a-particle irradiated to nonirradiated cells”, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol.98, pp.473-478 (2001).
- [16] H. Yang et al., “Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts”, *Oncogene*, Vol.24, pp.2096-2103 (2005).

- [17] A. Folch and M. Toner, “Microengineering of cellular interactions”, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, Vol. 2, pp.227-256 (2000).
- [18] T. H. Park and M. L. Shuler, “Integration of cell culture and microfabrication technology”, *Biotechnol. Prog.*, Vol.19, pp.243-253 (2003).
- [19] M. R. Lussi et al., “Selective molecular assembly patterning: A new approach to micro- and nanochemical patterning of surface for biological applications”, *Langmuir*, Vol. 18, pp.3281-3287 (2002).
- [20] A. Kumar and G. M. Whitesides, “Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching”, *Appl. Phys. Lett.*, Vol.63, pp.2002-2004 (1993).
- [21] B. C. Wheeler et al., “Microcontact printing for precise control of nerve cell growth in culture”, *J. Biomech. Eng.*, Vol.121, pp.73-78 (1999).
- [22] J. P. Renault et al., “Fabricating microarrays of functional proteins using affinity contact printing”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, Vol. 41, pp.2320-2323 (2002).
- [23] C. R. Chu et al., “Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures”, *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol.52, pp.346-353 (2000).
- [24] S. Ogata et al., “Dielectrophoretic manipulation of a single chlorella cell”, *Bioelectrochem.*, Vol.54, pp.33-37 (2001).
- [25] D. Falconnet et al., “Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays”, *Biomater.*, Vol.27, pp.3044-3063 (2006).
- [26] B. G. Cartwright et al., “A nuclear track recording polymer of unique sensitivity and resolution”, *Nucl. Inst. Meth.*, Vol.153, pp.457-460 (1978).
- [27] S. Gaillard et al., “Production and validation of CR-39 based dishes for  $\alpha$ -particle radiological experiments”, *Radiat. Res.*, Vol.163, pp.343-352 (2005).
- [28] T. Kuchimaru et al., “Three-dimensional track imaging of boron neutron capture reaction in nuclear track detector”, *Radiat. Meas.*, Vol.43, pp.s125-s127 (2008)
- [29] W. Y. Li et al., “Studies of biocompatibility of chemically etched CR-39 SSNTDs in view of their applications in alpha-particle radiobiological experiments”, *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B*, Vol. 248, pp.319-323 (2006).
- [30] G. B. Sigal et al., “Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents”, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol.120, pp.3464-3473 (1998)
- [31] M. Hennemeyer et al., “Cell proliferation assays on plasma activated SU-8”, *Microelectr. Eng.*, Vol.85, pp.1298-1301 (2008).

# 第5章 単一細胞照射による放射線効果

## 5.1 緒言

電離性放射線(荷電粒子, X線, 電子)をマイクロメートルオーダーの空間サイズまで収束させるマイクロビーム技術は, 細胞集団中の特定の細胞のみを放射線照射することを可能にした[1]. 現在, マイクロビーム技術を用いて, 従来の照射方式ではアプローチが難しかった, 新しい放射線細胞応答の解明が期待されている(図 5.1.1)[2,3]. その中で, 1992年の報告以来, 最も注目されてきた放射線細胞応答が非標的効果(バイスタンダー効果)である[4]. この10年, マイクロビームを用いて細胞集団中の一部の細胞を放射線照射することによって, 周囲の非照射細胞にも遺伝的不安定性, 微小核形成やDNA損傷などの放射線効果が誘発されることが報告されている[5,6]. これは周囲の細胞が放射線に曝されることで, 非照射細胞にも放射線照射によるリスクが存在することを示唆しており, 特に低線量の放射線生体効果の理解に重要になると考えられている. さらに, 機構の解明が放射線癌治療において, 少ない放射線照射線量で癌細胞に効率的に細胞死を誘導する方法論となりうることを期待されている.

本章では, 培養神経細胞でのバイスタンダー効果の機構解明を目指して, ラット神経細胞様細胞であるPC12におけるバイスタンダー効果の誘発モデルに関する仮説をたて, X線マイクロビームと細胞培養チップを用いた単一細胞照射実験と細胞応答解析について述べる.

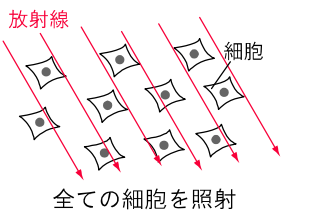
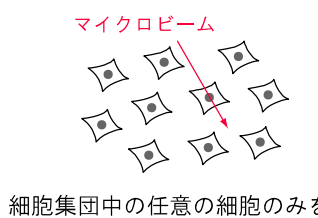
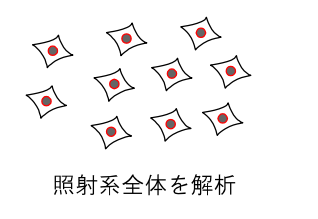
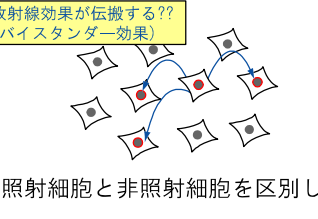
	従来の放射線照射	マイクロビームを用いた放射線照射
照射	 <p>全ての細胞を照射</p>	 <p>細胞集団中の任意の細胞のみを照射</p>
解析	 <p>照射系全体を解析</p>	 <p>照射細胞と非照射細胞を区別した解析</p>

図 5.1.1 マイクロビームを用いた新しい細胞照射研究

## 5.2 神経細胞における放射線効果の調査

現在, 様々な細胞種においてバイスタンダー効果についての調査がおこなわれている [7,8]. 本節では未だ報告がなされていない, 神経細胞種でのバイスタンダー効果の誘発について X 線マイクロビームを用いて調べるために, バイスタンダー効果誘発モデルの考察とその予備実験について述べる.

### 5.2.1 神経モデル細胞 PC12 における放射線照射効果

ラット副腎褐色由来細胞腫である PC12 は, Green らによって 1976 年に単離された株細胞である [9]. その特徴は, 株化した腫瘍細胞として未分化の特性を保持しており, 神経成長因子(NGF : Nerve Growth Factor)の存在によって神経線維を成長させ, 交換神経様細胞へと神経分化する(図 5.2.1). また, 神経伝達物質であるドーパミンやノルアドレナリンを合成して細胞内に貯蔵している. アセチルコリンなどの刺激によって脱分極し, 合成したドーパミンなどを放出するといった神経細胞の分泌応答も持ち合わせていることから, 神経モデル細胞として, 神経分野の研究に欠かすことのできない細胞となっている [10].

PC12 細胞における放射線照射効果の報告は非常に少ないが, X 線の照射によって以下に記述したような, 幾つかの特徴的な細胞応答を示すことが報告されている [11].

- ・インターロイキン-6(IL-6)の自己産生
- ・神経分化応答(神経線維の成長)

報告の中で, これらの応答は IL-6 中和抗体を添加してやると神経線維の成長が低下することから互いの相関性が示唆されているが, 現在まで詳細な調査はおこなわれていない. 細胞から分泌されて細胞間の情報伝達を担うサイトカインと総称されるたんぱく質に分類される IL-6 は, 1988 年に岸本らによって発見され, 構造が同定された [12]. 当初,

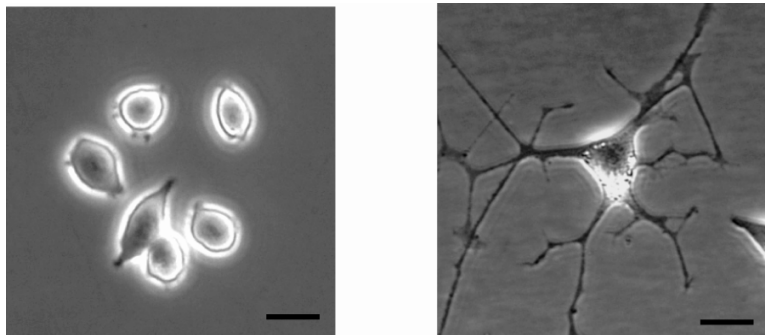


図 5.2.1 未分化の PC12 細胞(左)と NGF によって神経細胞分化した PC12 細胞(右)を顕微鏡観察した様子. スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示している.

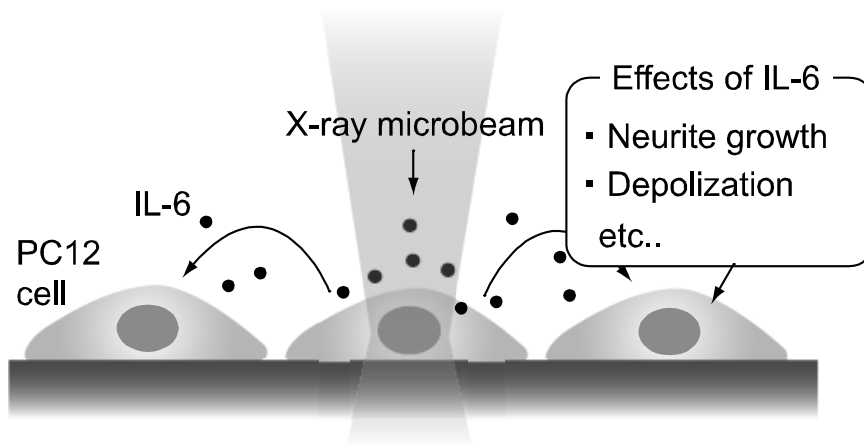


図 5.2.2 PC12 細胞における IL-6 を介したバイスタンダー効果モデル

免疫系において，リンパ球の T 細胞と B 細胞の間で抗体産生を促す放出性因子として研究が進められていたが，その後，多くの細胞で多様な役割を担う伝達因子として働いていることがわかっている[13]．神経系統においても多様な働きが報告されており[14]，ラットの中枢神経細胞においても，放射線照射によって IL-6 が産生されることが報告されている[15]．

これらの報告から PC12 細胞を神経細胞モデルシステムとして，IL-6 の分泌によるバイスタンダー効果誘発の仮説モデルを検討した(図 5.2.2)．X 線マイクロビーム照射細胞から IL-6 が放出され，周囲の非照射細胞が IL-6 を受け取ることで，神経線維の成長や脱分極などの細胞応答が誘発されるかどうかを調べた実験とその結果について以下に述べた．

### 5.2.2 PC12 における放射線効果の調査

X 線マイクロビームの照射効果を調査するにあたって，従来の放射線照射手法を用いて，PC12 での放射線効果を調査するための予備実験をおこなった．放射線線源には大阪大学産業科学研究所の共同利用施設である $\gamma$ 線照射装置( $^{60}\text{Co}$ ，370 TBq，2000 年)を用いた．全ての実験において照射時間は 15 分とし，線源からの距離によって照射線量を決定した(図 5.2.3)．

#### ・PC12 細胞の培養

PC12 細胞は大阪大学工学研究科環境・エネルギー工学専攻の櫛引俊宏博士より譲りうけた．培地には，ダルベッコ変法イーグル培地に 10%子牛胎児血清と 5%馬血清を添加したものをを用い，37°C，5%CO<sub>2</sub>環境下で培養した．ダブリングタイムは約 48 時間であり，週 1 回，比率 1:6 で継代した．照射試料細胞は，照射 24 時間前に  $5.0 \times 10^5$  cell/mL

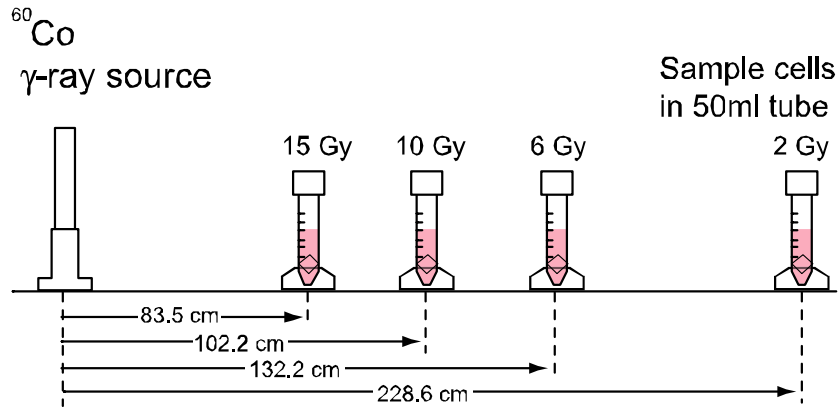


図 5.2.3 γ線照射実験のレイアウト. それぞれの線量に対応した線源からの距離 (2008年10月14日時点)を示した.

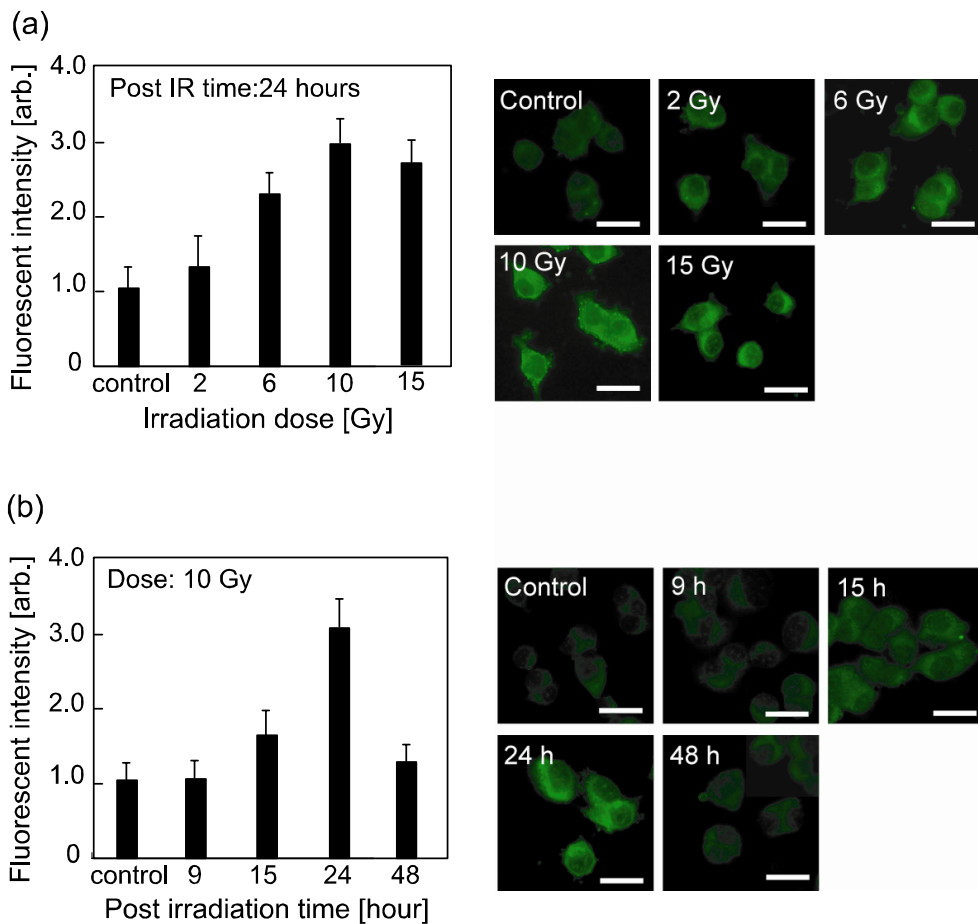


図 5.2.4 (a) γ線照射線量と IL-6 の蛍光量との関係(γ線照射 24 時間後に測定した). (b) γ線照射後の時間と IL-6 の蛍光量との関係(γ線照射量は 10 Gy とした). 誤差棒は標準偏差を, スケールバーは 20 μm を示している.



で、ポリリジンコートした(詳細は付録 B に記述した)カバースリップ(18×18 mm<sup>2</sup>)に蒔種したものを、50 mL チューブに入れて照射した。

・IL-6 の産生

γ線照射した PC12 細胞を任意の時間 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した後、免疫抗体染色法を用いて IL-6 の産生について調べた(詳細な手順は付録 B に記述した)[16]。一次抗体には、ラット IL-6 抗体(SUNTA CRUZ BIOTHECH.)を、二次抗体には Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (Molecular Probes)を用いた。図 5.2.4 に、照射線量と照射後の培養時間を変化させた時の免疫抗体染色した試料細胞を蛍光観察した結果を示す。蛍光強度の解析は、ImageJ を用いておこない、各データは 30 の細胞について分析した結果である。照射 24 時間後の細胞試料においては、照射線量 10 Gy までは、線量の増加に伴って IL-6 の産生に由来した蛍光量に優位な増加が観察された。また、10 Gy 照射後の細胞試料に対して、照射後 1, 3, 9 時間においてはコントロール試料に対して優位な蛍光量の差が確認できなかった。その後、15, 24, 48 時間においては、照射 24 時間後付近において蛍光量が最大となり、微量ながら 48 時間まで IL-6 の産生がおこなわれていることを確認した。この時、照射時の細胞数に対する照射 24, 48 時間後の生存細胞数をプロピジウムイオダイドを用いたアッセイ(詳細は付録 B に記述)によって調査することで生存率を評価した結果を図 5.2.5 に示す。2~15 Gy において、照射線量の増加に伴って、細胞の生存率が低下することを確認した。

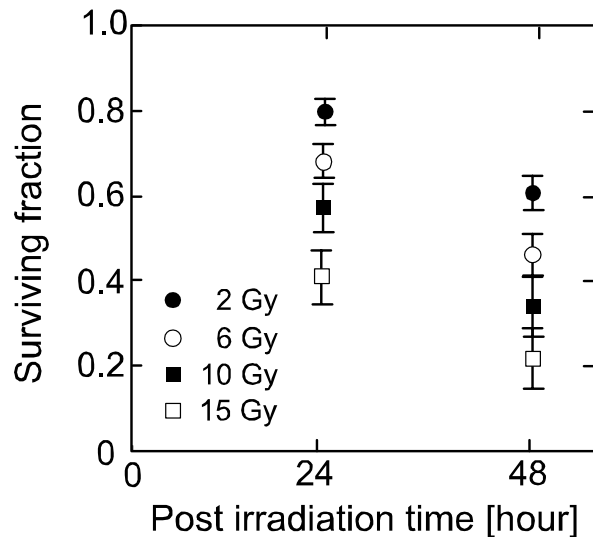


図 5.2.5 γ線照射後の時間と細胞生存率の関係。誤差棒は平均値の標準偏差を示している。

• DNA 二本鎖切断の検出

DNA 二本鎖切断は、二本の DNA 分子鎖の向かい合った位置が同時に切断される現象で、細胞死、遺伝的不安定性や突然変異などを誘発する直接的な原因となる、細胞にとって最も重篤な放射線効果の一つである[17]。また、DNA 切断後には、細胞内に様々な信号カスケードが立ち上がることで、多くの細胞応答が誘起される。IL-6 の産生を促す転写因子の活性化にも DNA 二本鎖切断の生成が関与していることが示唆されており[18,19]、IL-6 の産生までの過程を知るためには非常に重要となる。

DNA 二本鎖切断の検出には、DNA 分子鎖が巻きついているヒストン 8 量体たんぱく質の一つである H2AX が、DNA 二本鎖切断部に集積した修復タンパク質酵素によって

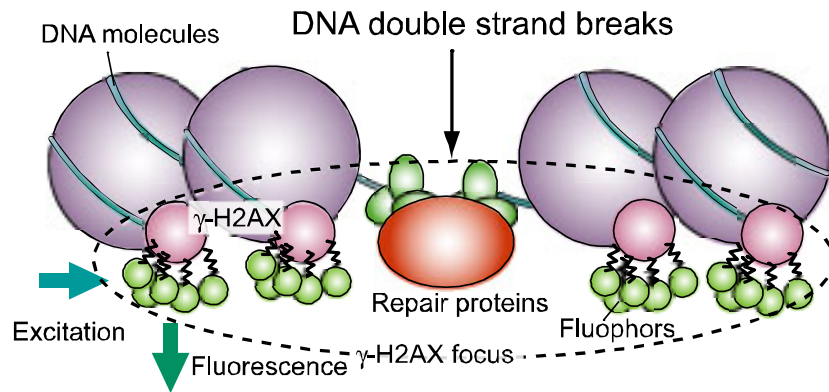


図 5.2.6  $\gamma$ -H2AX を利用した DNA 二本鎖切断の蛍光イメージングの概略図

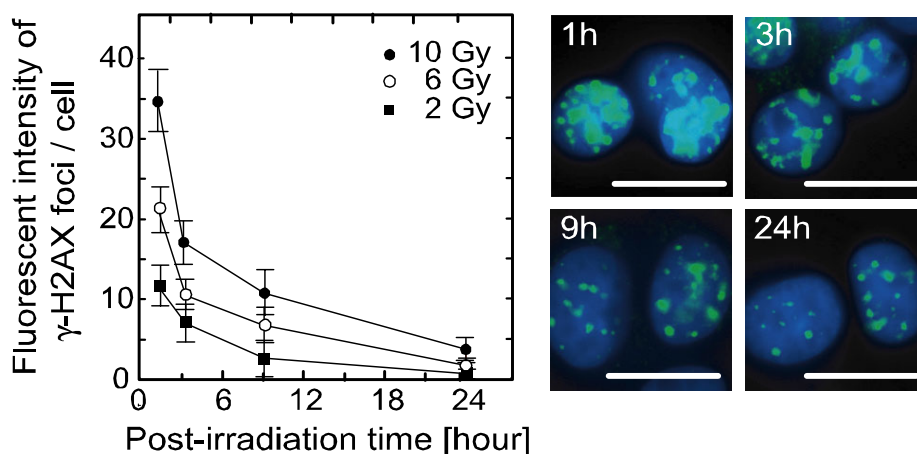


図 5.2.7 照射後の時間と $\gamma$ -H2AX フォーカスの蛍光強度の関係と 10 Gy 照射時の蛍光像の様子(緑： $\gamma$ -H2AX フォーカス，青：細胞核). 誤差棒は標準偏差を，スケールバーは 10  $\mu$ m を示している.

リン酸化されることで生成する $\gamma$ -H2AX を利用した(図 5.2.6).  $\gamma$ -H2AX は DNA 二本鎖切断部周辺に特異的に生成, 集積してフォーカスを形成する. そして, 切断の修復と共に分解することが確かめられており, 生成・修復量を定量的に評価できる[20].

$\gamma$ 線照射した PC12 細胞を任意の時間 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した後,  $\gamma$ -H2AX を免疫抗体染色法によって検出することで, DNA 二本鎖切断の検出を試みた. 蛍光強度の解析は, ImageJ を用いておこない, 各データの算出には, 30 の細胞から得たデータに対してバックグラウンドを差し引くことで得られた値を用いた. 図 5.2.7 に 2, 6, 10 Gy 照射した時の $\gamma$ -H2AX 蛍光強度の経時変化を示した. 照射後に生成される $\gamma$ -H2AX の量は照射線量によって増加し, 照射 24 時間後では, 生存細胞においては大部分の $\gamma$ -H2AX フォーカスの消去が観察された. つまり, ほとんどの DNA 二本鎖切断が修復されたことを確認した.

### 5.3 X線マイクロビーム照射効果の解析

X線マイクロビーム照射によって PC12 細胞に誘起される細胞応答を調査した. 本節では, PC12 細胞において, バイスタンダー効果誘発因子となり得る IL-6 の産生と DNA 二本鎖切断の生成・修復について調査した結果について述べる.

#### 5.3.1 X線マイクロビーム照射実験

マイクロチャンバーアレイチップ(McAC)に PC12 細胞を培養し, X線マイクロビーム照射実験をおこなった. マイクロビーム照射実験の手順を図 5.3.1 に示す. 照射 24 時間前に 35 mm ディッシュ内にて, McAC に  $5.0 \times 10^4$  cells/mL で PC12 細胞を蒔種した. そして, 照射ステージに McAC を設置し, 約 30  $\mu$ l の培養液を添加してカプトン膜で表面を覆った後, 単一細胞照射をおこなった. 一回の照射実験において, McAC 上の約 20 の細胞を任意に選択して照射した. その時, 照射細胞が格納されたマイクロチャンバーの位置を記録していくことで, 照射後の培養系において照射された 20 程度の細胞を同時並行的に分析した[21]. IL-6, DNA 二本鎖切断の検出方法は, 先に述べた $\gamma$ 線照射実験の解析に用いた免疫抗体染色法によって, 同様の手順でおこなった.

図 5.3.2 は, McAC 上でマイクロビーム照射された PC12 細胞における IL-6 の産生を観察した様子である. 照射 24 時間後においては, 照射細胞に IL-6 の産生が確認されたが, 照射 1, 3, 9 時間後においては産生が確認されなかった. 次に, DNA 二本鎖切断の生成・修復について調査した結果を図 5.3.3 に示す.  $\gamma$ 線照射実験と同様に, 生存細胞においては照射 24 時間後までに, 生成された DNA 二本鎖切断の約 90%は修復されたことを確認した.

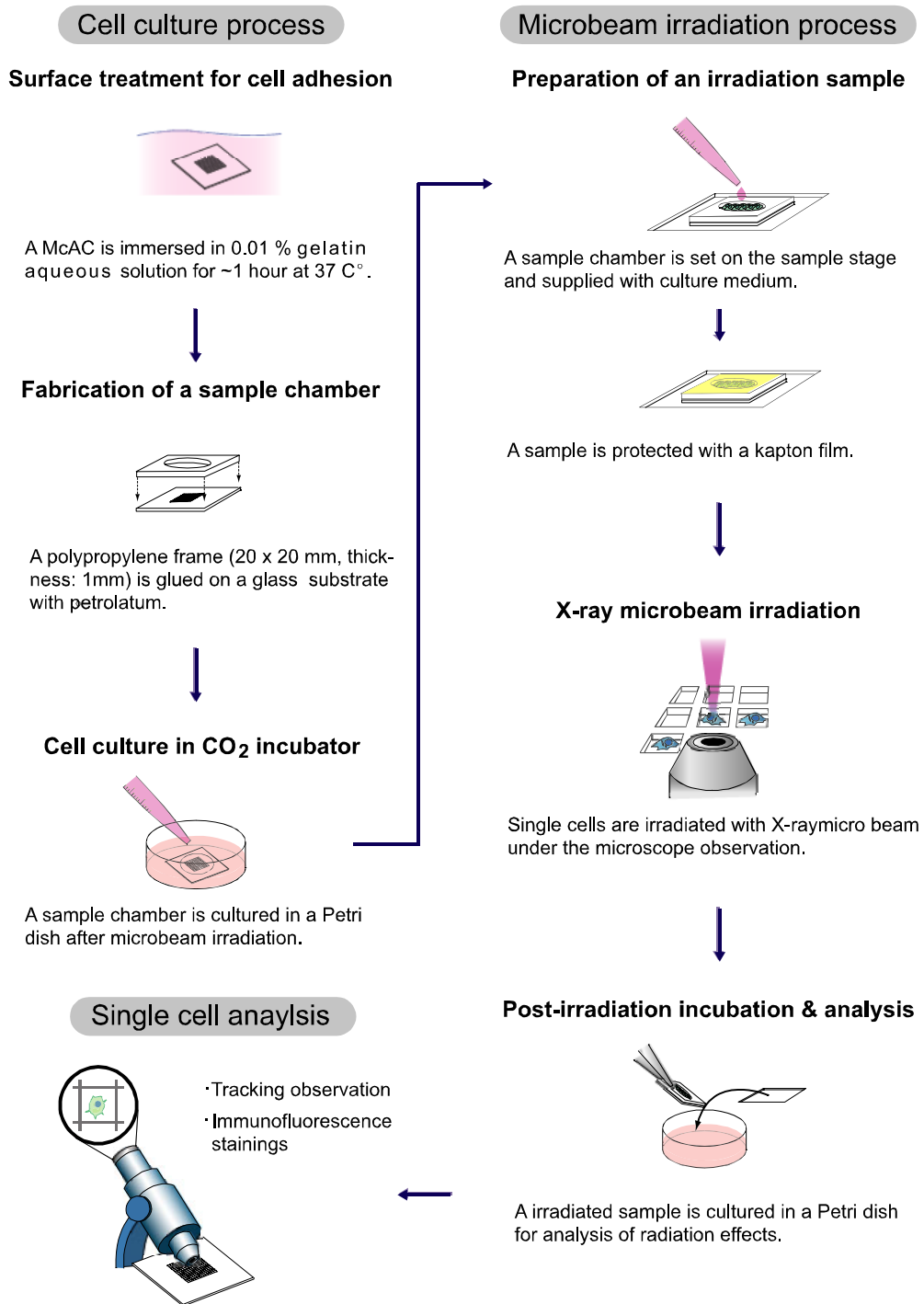


図 5.3.1 McAC と X 線マイクロビームを用いた単一細胞照射応答の解析の実験手順

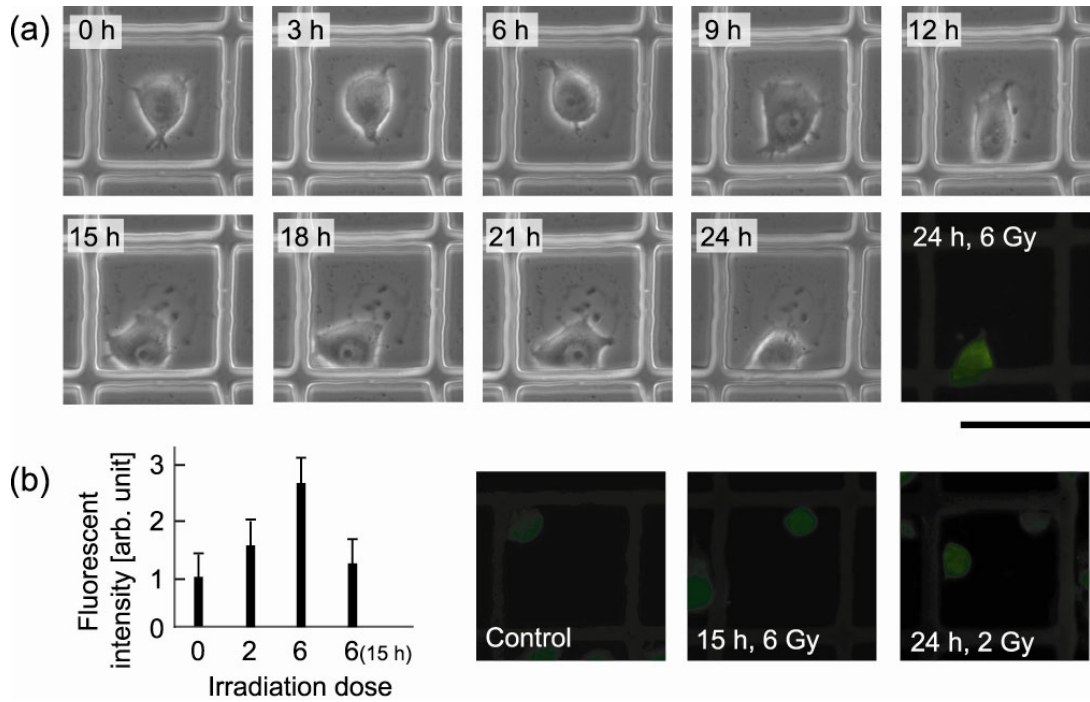


図 5.3.2 (a) X 線マイクロビーム照射した PC12 細胞における IL-6 の産生を観察した様子. (b) 各照射線量と照射後の時間における IL-6 蛍光の強度とその様子. 数値データはそれぞれ 10 細胞の測定から求めた. 誤差棒は標準偏差を, スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示している.

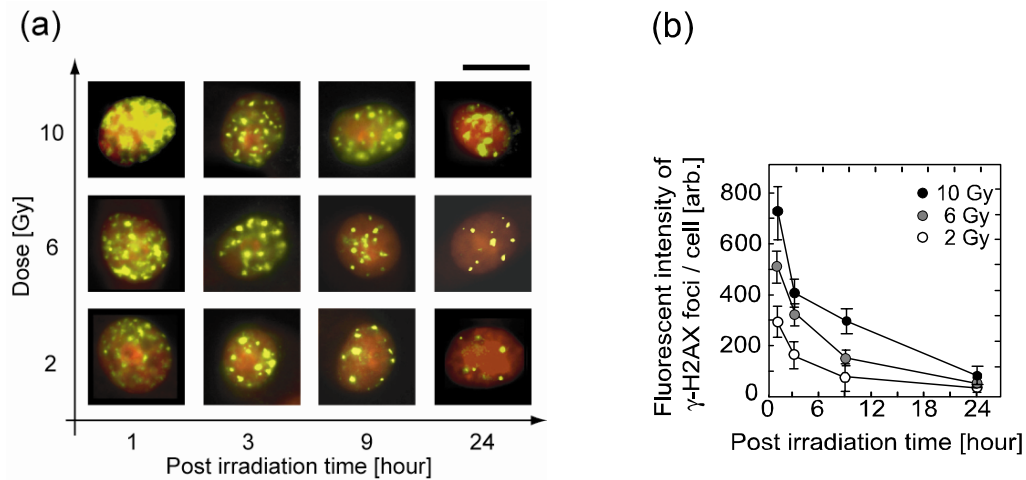


図 5.3.3 (a)各線量, 照射後の時間において  $\gamma\text{-H2AX}$  フォーカスを蛍光観察した様子. 60 倍の水浸対物レンズ(NA : 1.25, Olympus)を用いて撮像した. スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示している. (b)各線量における照射後の時間と $\gamma\text{-H2AX}$  フォーカスの蛍光強度の関係. 各データは少なくとも 20 細胞について解析した値であり, 誤差棒は標準偏差を示している.

## 5.4 バイスタンダー効果の解析

X線マイクロビーム照射実験から得られた結果と報告されている知見から、PC12細胞におけるバイスタンダー効果の誘発について考察を述べる。

### 5.4.1 PC12細胞におけるバイスタンダー効果の解析

X線マイクロビーム照射実験から照射細胞にIL-6の産生と、DNA二本鎖切断の生成・修復の経時変化を見ることで、バイスタンダー効果が誘発されるまでの過程を考察した(図5.3.4)。DNA二本鎖切断の修復に関係した信号カスケードによって、IL-6の産生を促す転写因子のNF- $\kappa$ BがDNAに再結合することが報告されている[18,19,22]。照射実験から得られた結果より、照射直後から開始される修復過程の途中で、IL-6の産生が顕著におこなわれるのは照射15時間後以降であると考えられる。そして一般的なIL-6の性質からすると、周囲への放出も同時に開始されることになる。その後、放出されたIL-6が周囲の細胞の膜受容体に結合することで、バイスタンダー効果が誘発されると考えられる。

その際に、周囲細胞に誘起される細胞応答としては、図5.2.2で示したような、PC12細胞とIL-6の相互作用として報告されている神経分化応答、脱分極や細胞死からの防御などが考えられる[11, 23, 24]。その中でも神経分化応答は、細胞の形態観察によってその応答を確認することができるため、バイスタンダー効果を確認する有望な応答であると考えていたが、我々の実験においてはバイスタンダー効果による、優位な神経分化

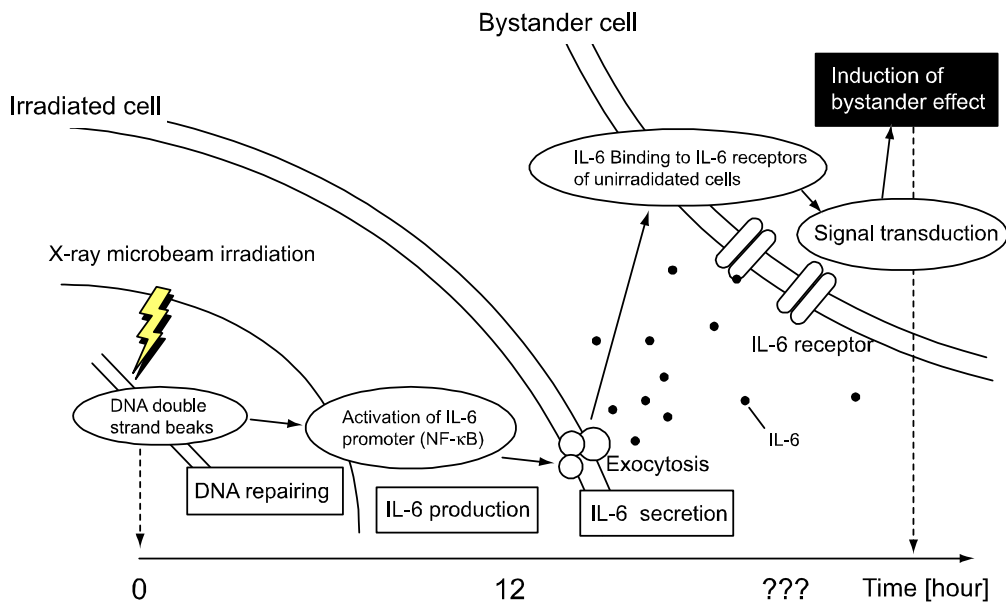


図 5.3.4 PC12細胞におけるバイスタンダー効果誘発考察モデル

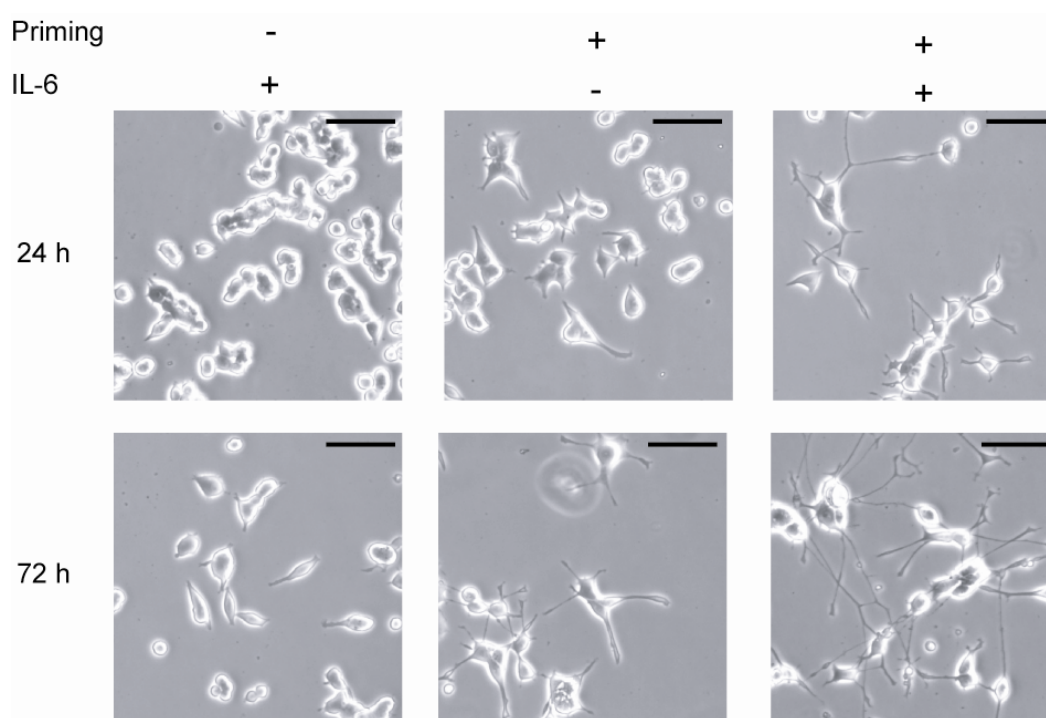


図 5.3.5 NGF によるプライミング(30 ng/mL, 3 時間)と IL-6 (30 ng/mL)の添加による PC12 の神経突起の成長を観察した様子.

応答は確認することができなかった.

その理由として, 過去に IL-6 によって PC12 に神経分化応答が誘起することが報告されているが[25], 後の調査で, IL-6 に対して神経分化応答を示す PC12 細胞は, 一部の亜種に限られることがわかった. 現在, 世界中で 500 回を越える継代を繰り返した PC12 には性質が徐々に変化した亜種が多く, IL-6 に対する 2 種類の膜受容体の発現量の違いが神経分化応答に大きな相違をもたらす事が指摘されている[14]. その他の神経細胞に関しては, 海馬由来の初代神経細胞に, IL-6 単独の作用で神経突起の成長が報告されているが[26], Native に近い PC12 では, IL-6 による神経分化応答は誘起されず, NGF を添加した培養液で数時間の培養(プライミング)をおこなった細胞に対して, IL-6 を培養系に添加してやることで, 顕著な神経線維の成長を誘起することが報告されている[27]. 我々が照射実験に用いた PC12 においても, プライミングをおこなった条件でしか, IL-6 による神経線維の成長は確認できなかったため(図 5.3.5), バイスタンダー効果の誘発を評価することはできなかった.

また, 細胞膜の脱分極やシナプスの可塑性の変化[28]に関しては, 神経細胞の活動に

大きな影響を与えるが、パッチクランプ法や電極培養チップなどによる評価方法が必要であると考えられる[29,30].

## 5.5 結言

本章では、神経モデル細胞である PC12 において、X 線マイクロビーム照射細胞の放射線応答の解析について述べた。γ線照射による予備実験において、PC12 細胞において、バイスタンダー効果の伝達因子となり得る IL-6 の産生を免疫抗体染色法によって確認し、その産生機構に深く関わる DNA 二本鎖切断の検出が可能であることを確認した。また、γ線照射実験と同様に、X 線マイクロビーム照射実験においても、照射細胞に IL-6 の産生を確認し、DNA 二本鎖切断の生成・修復の経時過程に関する調査をおこなった。その結果から、PC12 細胞におけるバイスタンダー効果の誘発を考察し、今後のマイクロビームを用いた細胞照射研究における可能性を示唆した。



## 参考文献

- [1] R-P. Gerhard et al., "The Columbia university single-ion microbeam", *Radiat. Res.*, Vol. 156, pp.210-214 (2001).
- [2] K. M. Prise et al., "New insight on cell death from ionizing radiation", *Lancet Oncol.*, Vol.6, pp.520-528 (2005).
- [3] K. M. Prise et al., "Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam", *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol.74, pp.793-798 (1998).
- [4] H. Nagasawa et al., "Induction of sister chromatid exchanges by extremely low dose of  $\alpha$ -particles", *Cancer Res.*, Vol.52, pp.6394-6396 (1992).
- [5] H. Zhou et al., "Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particle in mammalian cells", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol.97, pp.2099-2104 (2000).
- [6] S. Burdak-Rothkamm et al., "ATR-dependent radiation-induced  $\gamma$ H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells", *Oncogene*, Vol.26, pp.993-1002 (2007).
- [7] M. V. Sokolov et al., "Ionizing radiation induces DNA double -strand breaks in bystander primary human fibroblasts", *Oncogene*, Vol.24, pp.7257-7265 (2005).
- [8] C. Shao et al., "Nitric oxide-mediated signaling in the bystander responses of individually targeted glioma cells", *Cancer Res.*, Vol.63, pp.8473-8442 (2003).
- [9] L. A. Green and A. S. Tischler, "Establishment of noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol.73, pp.2424-2428 (1976).
- [10] 畠山寛, "神経成長因子ものがたり", 羊土社, (1992).
- [11] K. Abeyama et al., "Interleukin 6 mediated differentiation and rescue of cell redox in PC12 cells exposed to ionizing radiation", *FEBS Lett.*, Vol. 364, pp. 298-300 (1995).
- [12] M. Kawano et al., "Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas", *Nature.*, Vol.332, pp.83-85 (1988).
- [13] S. Akira, "Interleukin-6 in biology and medicine", *Adv. Immun.*, Vol.54, pp.1-78 (1993).
- [14] A. Gadiant et al., "Interleukin-6 (IL-6) a molecule with both beneficial and destructive potential", *Prog. Neurobiol.*, Vol.52, pp.379-390 (1997).
- [15] U. Raju et al., "NF $\kappa$ B activity and target gene expression in the rat brain after one and two exposures to ionizing radiation", *Radiat. Oncol. Invest.*, Vol. 7, pp.145-152 (1999).
- [16] C. Tabata et al., "All-trans retinoic acid modulates radiation-induced proliferation of lung fibroblasts via IL-6/IL-6R system", *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, Vol.290, pp.597-606 (2006).
- [17] K. K. Khanna and S. P. Jackson, "DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the

- cancer connection”, *Nat. Genet.*, Vol.27, pp.247-254 (2000).
- [18] Z. H. Wu et al., “Molecular linkage between the kinase ATM and NF- $\kappa$ B signaling in responses to genotoxic stimuli”, *Science*, Vol.311, pp.1141-1146 (2006).
- [19] Y. Habraken and J. piette, “NF- $\kappa$ B activation by double-strand breaks”, *Biochem. Pharmacol.*, Vol.72, pp.1132-1141 (2006).
- [20] I. B. Nazarov et al., “Dephosphorylation of histone  $\gamma$ -H2AX during repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells and its inhibition by calyculin A”, *Radiat. Res.*, Vol.160, pp.309-317 (2003).
- [21] T. Kuchimaru et al., “Microchamber arrays for the identification of individual cells exposed to an X-ray microbeam”, *Radiat. Environ. Biophys.*, Vol. 47, pp.535-540 (2008).
- [22] T. A. Libermann and D. Baltimore, “Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- $\kappa$ B transcription factor”, *Mol. Cell. Biol.*, Vol.10, pp.2327-2334 (1990).
- [23] P. Marz et al., “Induction of interleukin-6 by depolarization of neurons”, *J. Neurosci.*, Vol.20, pp.8637-8642 (2000).
- [24] P. Marz et al., “Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6”, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol.95, pp.3251-3256 (1998).
- [25] T. Satho et al., “Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-Cell stimulatory”, *Mol. Cell. Biol.*, Vol.8, pp.3546-3549 (1998).
- [26] M. Sarder et al., “Comparative effect of IL-2 and IL-6 on morphology of cultured hippocampal neurons from fetal rat brain”, *Brain Res.*, Vol.715, pp.9-16 (1996).
- [27] S. Ihara et al., “Identification of interleukin-6 as a factor that induces neurite outgrowth by PC12 cells primed with NGF”, *J. Biochem.*, Vol.120, pp.865-868 (1996).
- [28] N. L. Sparkman et al., “Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers”, *J. Neurosci.*, Vol.26, pp.10709-10716 (2006).
- [29] J. Streit and H. D. Lux, “Voltage dependent calcium currents in PC12 growth cones and cells during NGF-induced cell growth”, *Eur. J. Physiol.*, Vol.408, pp.634-641 (1987).
- [30] G. Zeck and P. Fromherz, “Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip”, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol.98, pp.10457-10462 (2001).

## 第6章 結論

本論文は、細胞での放射線効果の解析にむけた X 線マイクロビームシステムの開発についてまとめたものである。本論文の内容を各章ごとに以下にまとめる。

第2章では、卓上型 X 線マイクロビーム照射装置の開発について述べた。X 線管、ガラスキャピラリと倒立型顕微鏡を組み合わせることで卓上型 X 線マイクロビーム照射装置を構築した。また、生成された X 線マイクロビームのサイズ、強度などについて測定実験とシミュレーションから評価し、直径約 10  $\mu\text{m}$  [FWHM]、照射線量率 0.3 Gy/s の X 線マイクロビームを顕微鏡観察下の単一細胞に照射可能であることを確かめた。そして、レーザープローブを導入したシステムを構築し、予備実験の結果から、より高度な照射実験が可能であることを示した。

第3章では、X 線マイクロビームによる単一細胞に対するマイクロドジメトリを理解する目的で、X 線マイクロビームの輸送モデルの構築とモンテカルロシミュレーション計算による線量付与計算をおこなった。ガラスキャピラリを用いた X 線の輸送計算モデルを構築し、RPL ガラスを用いた実験結果と比較することで構築したモデルを評価した。また、光子・電子輸送モンテカルロ計算コードである EGS4 を用いて、X 線マイクロビームによる単一細胞への線量付与について評価し、X 線マイクロビームが単一細胞照射実験において有効となる結果を得た。

第4章では、フォトリソグラフィ微細加工技術と感光性樹脂である SU-8 を用いた細胞培養チップの開発について述べた。単一細胞における X 線マイクロビーム照射効果を分析する目的で、単一細胞の格納が可能なマイクロチャンバーをチップ上に集積した、マイクロチャンバーアレイチップ(McAC)の作製工程について述べた。そして、作製した McAC 上での細胞培養について、蛍光指示薬を用いた細胞活性、細胞の増殖特性や培養のための細胞密度について評価し、McAC が単一細胞の分析に有効であることを確認した。また、より高度な細胞照射実験を可能にするためのマイクロパターンニング培養技術について、CR-39 プラスチックを基盤としたマイクロパターンニング培養チップを作製し、細胞のマイクロパターンニング培養について評価試験をおこなった結果、ハイコントラストなマイクロパターンニング培養が可能であることが示された。

第5章では、神経モデル細胞である PC12 において、X 線マイクロビーム照射細胞の放射線応答の解析について述べた。 $\gamma$ 線源を用いた予備実験をおこない、PC12 細胞において、バイスタンダー効果の伝達因子となり得る IL-6 の産生と、その産生機構に深く関わる DNA 二本鎖切断の検出が可能であることを確認した。また、X 線マイクロビーム照射実験の結果、照射細胞に IL-6 の産生を確認し、DNA 二本鎖切断の生成・修復の経時過程に関する調査をおこなった。得られた結果から、PC12 細胞におけるバイスタ

## 第6章 結論

ンダー効果の誘発を考察し、今後のマイクロビームを用いた細胞照射研究における可能性を示唆した。

本研究で開発した X 線マイクロビームシステムは、マイクロビームを用いた細胞照射研究の進展に向けて開発が急務となっている小型システムであり、顕微鏡下で生きた個々の細胞を選択的に照射可能である。そして、フォトリソグラフィ微細加工技術によって作製した細胞培養チップと組み合わせることで、1細胞における放射線効果を正確に分析できることを示した。これらの工学技術を結集したビームシステムによって、今後の細胞照射研究の進展を期待して本論文の結びとする。

## 付録 A 光ピンセットの原理・理論解析

### A.1 緒言

光ピンセットは、1980年代に Ashkin らによってその原理が提唱され、技術開発がおこなわれた[1,2]. 高開口数のレンズを用いて収束させたレーザー光の焦点位置に発生する光圧によって、ナノメートルからマイクロメートルサイズの透明な誘電体物質を補足し、動かすことのできる技術である. ここでは、細胞の空間位置を制御する手法として用いた光ピンセットについて、その原理と理論解析について述べる.

### A.2 光ピンセットの理論解析

光ピンセットの原理は、捕獲する対象物のサイズと、プローブに用いる光の波長との関係によって異なる. 捕獲対象物のサイズが、光の波長に対して十分小さいときは、補足物質はレーザー光によって生じた電磁場中で振る舞う双極子とみなされ、電場勾配に従って焦点面付近に捕獲される[3]. 対して、捕獲対象物のサイズが光の波長に対して、同程度から大きくなるときは、その原理は、捕獲対象物質の表面、内部で生じる光子の運動量保存則により、物質を焦点位置付近に捕獲することができる[4].

ここでは、後者の原理に従う、動物細胞などマイクロメートルオーダーの対象物に適用される幾何光学に基づいた光ピンセットの理論解析について述べる.

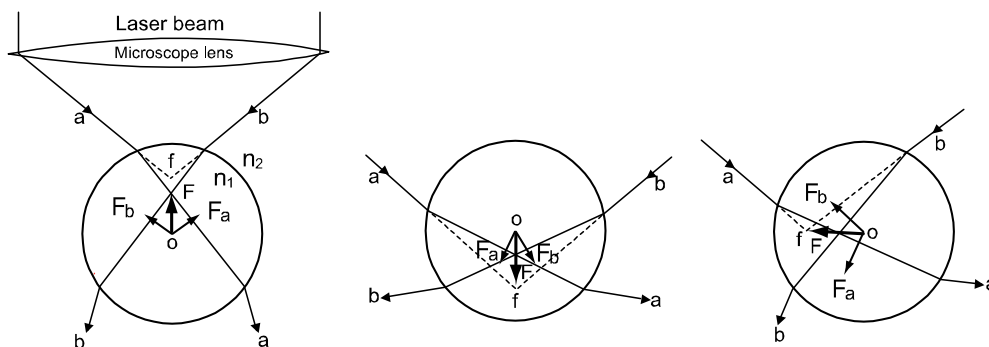


図 A.2.1 集光されたレーザー光の焦点位置と物体の各位置関係において発生する光圧の説明図

光の波長に比べて粒子のサイズが十分大きい時、高開口数の対物レンズなどで集光した光によって働く光圧は幾何光学的な光の屈折、反射現象によって発生し、粒子表面での屈折、反射による光子の運動量の変化が運動量保存の法則に従い光圧として粒子に加わる。図 A.2.1 に示すように、粒子の屈折率  $n_1$  が周囲の媒質の屈折率  $n_2$  よりも大きい時、屈折が支配的となる透明な粒子では、光線 a と光線 b によって働く  $F_A$ ,  $F_B$ , の和は光圧  $F$  となり、粒子の中心から光の焦点方向  $f$  に向かって力が発生し、レーザー光に対して引力となる。この力が粒子のブラウン運動を抑制するのに十分な大きさ(～数 pN)である場合に粒子は光焦点付近に補足される。

これらの幾何光学理論に基づいて光ピンセットによって、補足対象物に作用する補足力を解析モデル[4]によって計算した。パワー  $P$  の光線が球形物体に及ぼす光圧は、図 A.2.2 に示すような、各光線の軌跡に関する幾何光学に基づいて算出される光圧を足し合わせるによって求められる。捕捉対象物質の反射率  $R$ , 透過率  $T$  とすると、光線が物体に入射したとき、一部は表面で反射され、そのパワーは  $PR$  となる。そして、物質内部に侵入した光線は、屈折と反射を繰り返す、そのパワーは、 $PT^2$ ,  $PT^2R$ ,  $\dots$ ,  $PT^2R^n$ ,  $\dots$  となる。それらの光線が入射軸に対してなす角は、 $\pi+\theta$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha+\beta$ ,  $\dots$ ,  $\alpha+n\beta$ ,  $\dots$  となるので、単位時間あたりに  $Z$  方向に発生する力  $F_z$  は、

$$F_z = \frac{n_1 P}{c} - \left[ \frac{n_1 PR}{c} \cos(\pi + 2\theta) + \sum_{n=0}^{\infty} \frac{n_1 P}{c} T^2 R^n \cos(\alpha + n\beta) \right] \quad (\text{A.2.1})$$

となる。ここで、 $n_1 P/c$  は、 $Z$  方向に単位時間あたりに入射する光線の運動量である。同様に、 $Y$  方向の力  $F_y$  は、

$$F_y = 0 - \left[ \frac{n_1 PR}{c} \sin(\pi + 2\theta) + \sum_{n=0}^{\infty} \frac{n_1 P}{c} T^2 R^n \sin(\alpha + n\beta) \right] \quad (\text{A.2.2})$$

と与えられる。よってそれらを足し合わせた力  $F_{tot}$  は、複素平面において、 $F_{tot} = F_z + iF_y$ ,  $\alpha = 2\theta - 2r$  と  $\beta = \pi - 2r$  の関係を用いて、

$$\begin{aligned} F_{tot} &= \frac{n_1 P}{c} [1 + R \cos 2\theta] + i \frac{n_1 P}{c} R \sin 2\theta - \frac{n_1 P}{c} T^2 \sum_{n=0}^{\infty} R^n e^{i(\alpha + n\beta)} \\ &= \frac{n_1 P}{c} [1 + R \cos 2\theta] + i \frac{n_1 P}{c} R \sin 2\theta - \frac{n_1 P}{c} T^2 e^{i\alpha} \left[ \frac{1}{1 - \text{Re}^{i\beta}} \right] \end{aligned} \quad (\text{A.2.3})$$

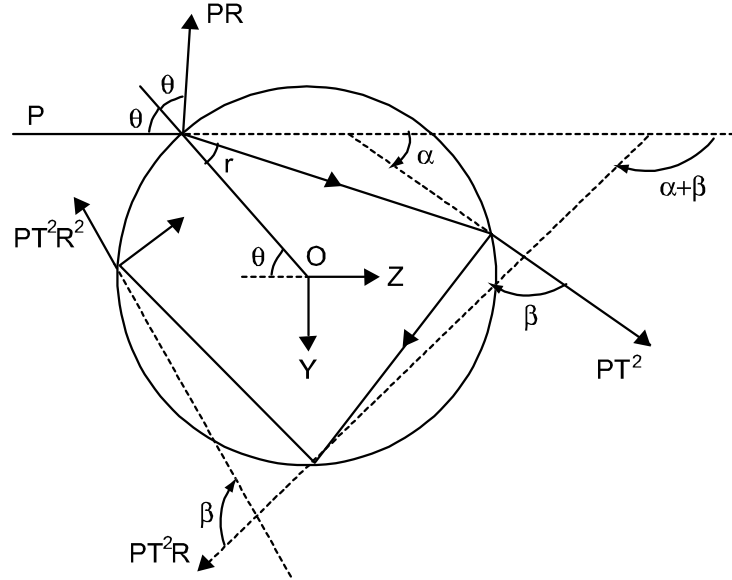


図 A.2.2 光線による光圧計算のための幾何光学解析モデル

となる。となる。(A.2.3)式に入射光の物質関する反射率  $R$  と透過率  $T$  の条件を加える。光によって運ばれるエネルギー密度はポインティングベクトル  $\vec{S}$  を用いて

$$\vec{S} = \frac{1}{2}(\vec{E} \times \vec{H}) \quad (\text{A.2.4})$$

で表され、その大きさは電界と磁界の積の 1/2 になる。S 波、P 波についてそれぞれの反射、透過係数を  $R_s$ ,  $T_s$ ,  $R_p$ ,  $T_p$  とすると

$$R_s = \left( \frac{n_1 \cos \theta_1 - \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1}}{n_1 \cos \theta_1 + \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1}} \right)^2 \quad (\text{A.2.5})$$

$$T_s = \left( \frac{n_2 \cos \theta_2}{n_1 \cos \theta_1} \right) \left( \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_1 \cos \theta_1 + \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1}} \right)^2 \quad (\text{A.2.6})$$

$$R_p = \left( \frac{n_2 \cos \theta_1 - \frac{n_1}{n_2} \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1}}{n_2 \cos \theta_1 + \frac{n_1}{n_2} \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1}} \right)^2 \quad (\text{A.2.7})$$

$$T_p = \left( \frac{n_2 \cos \theta_2}{n_1 \cos \theta_1} \right) \left( \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_2 \cos \theta_1 + \frac{n_1}{n_2} \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1}} \right)^2 \quad (\text{A.2.8})$$

と与えられる。ここで入射角、反射角(屈折角)を $\theta_1$ ,  $\theta_2$ とし,  $n_1$ ,  $n_2(n_1 < n_2)$ はそれぞれ周囲媒体と捕捉対象物質の屈折率とした。

これらの式を用いて, TEM<sub>00</sub>モードのレーザー光(波長 1064 nm)を最大入射角 70° (対物レンズ NA=1.25)で水中( $n=1.33$ )のアクリル球形粒子( $n=1.47$ , 直径 3 μm)を光捕捉するとき粒子に, 作用する光圧の大きさと作用する方向を計算した結果が図 A.2.3 である。図中の各ベクトルの始点にレーザー光の焦点が位置するときアクリル粒子に働く力

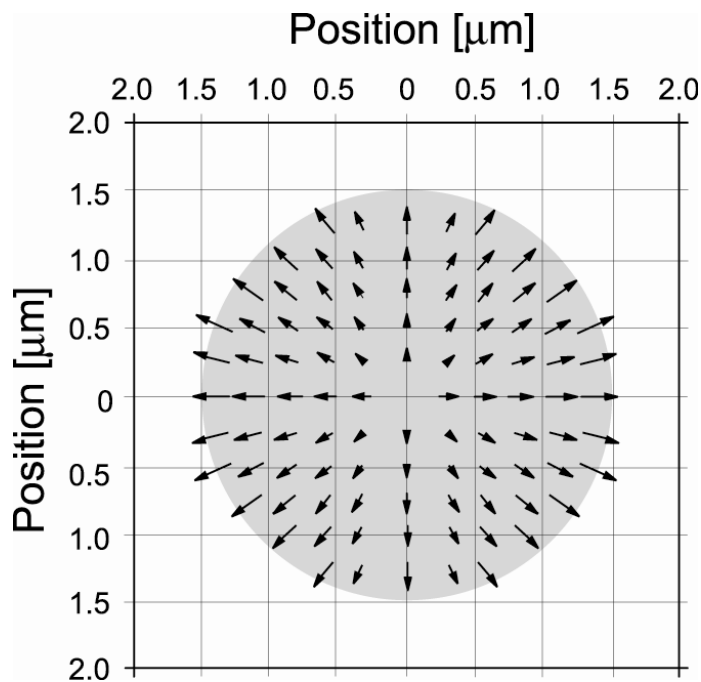


図 A.2.3 レーザー光によって発生する光圧の大きさと方向の関係。



を示した。この結果から、ビームウエストの中心に向かって粒子を捕捉する力が発生していることが確認された。また、この計算においてレーザーパワーが 20 mW のとき、約 20 pN の捕捉力が発生していることが見積もられた[5]。

### A.3 結論

光ピンセットの原理について説明し、幾何光学に基づいた解析モデルから、光ピンセットによって球形粒子に働く捕捉力を計算した。その結果、ブラウン運動する粒子の動きを制止するのに十分な力が発生することを確認した。

## 参考文献

- [1] A. Ashkin et al., “Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles”, *Opt. Lett.*, Vol.11, pp.288-290 (1986).
- [2] A. Ashkin et al., “Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams”, *Nature*, Vol.330, pp.769-771 (1987).
- [3] A. Ashkin, “Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime”, *Biophys. J.*, Vol.61, pp.569-582 (2008).
- [4] Y. Harada and T. Asakura, “Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime”, *Opt. Comm.*, Vol.124, pp.529-541 (1996).
- [5] 口丸高弘, 「光ピンセットを用いたマイクロ X 線照射装置の開発」, 大阪大学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻博士前期課程修了論文, (2005).

## 付録 B 生物実験プロトコル

### B1. 緒言

ここでは、本研究で用いた生物学的な分析をおこなうための実験プロトコルについて述べる。具体的には、細胞試料の培養と細胞分析のための蛍光イメージングについて述べる。

### B2. 細胞の培養

本節では、細胞培養に関するプロトコルを解説する。細胞培養の手法については、細胞の種類はもちろんのこと、実験条件に応じて最適化を図る必要がある[1]。ここで述べるプロトコルは本研究用に、最適化されたものについてまとめている。

#### ・細胞培養容器・基板の選択

細胞の培養は、滅菌された専用の培養容器や、細胞接着因子によって表面処理されたカバースリップなどにおこなう。培養容器には、大まかに分けるとディッシュ型とフラスコ型のものがあり、前者の方が細胞の取扱いは楽だが、後者の方が菌汚染(コンタミネーション)の感染の確率が小さい。培養容器の素材は、一般的にはポリプロピレンであり、表面に細胞が接着し易いように、プラズマ処理などが施されている。また、カバーガラスなどに細胞を培養するためには、細胞外基質の成分であるゼラチンや、荷電性分子であるポリリジンなどによって表面処理しなければならない。以下に、ゼラチンとポリリジンを用いた基板表面処理の手順を示した。

#### ゼラチン

生体内で細胞外の空間を充填するほか、接着の足場として働いている細胞外基質の主成分であるコラーゲンから抽出した高分子がゼラチンである。ゼラチンもコラーゲン同様に細胞の接着を助ける役割があり、コラーゲンよりも安価であるため、*In vitro* の実験に用いられる。以下にガラス基板(プラスチック基板もほぼ同様の手順で可能であるが、プラスチックの種類によっては細胞に有害なものもあり、事前の調査が必要となる)表面をゼラチンコートするための手順を述べる。

1. 基板を 70%v エタノールに 1 時間程度浸して滅菌し、PBS で洗浄した後、0.01%ゼラチン水溶液(ES-006-B, CHEMICON INTERNATIONAL)に 37°C 環境下で 30 分浸す。

2. ゼラチン水溶液から取り出した基板は、そのまま細胞培養に使用するか、クリーベンチ内で風乾させる。風乾した基板は、4°Cで保管し、なるべく早く(1週間以内)使用する。

### ポリリジン

電気的な極性が高い高分子であり、基板表面をポリリジン処理すると、細胞の接着特性を向上させることができる。接着力の弱い神経系統の細胞を培養するときに用いられることが多い。以下に、以下にガラス基板(プラスチック)表面をポリリジンコートするための手順を述べる。

1. 基板を 70%v エタノールに 1 時間程度浸して滅菌し、PBS で洗浄した後、0.01%ポリリジン水溶液(P6407, SIGMA)に 37°C環境下で 5 分浸す。
2. ポリリジン水溶液から取り出した基板は、クリーベンチ内で風乾させる。風乾した基板は、4°Cで保管し、なるべく早く(1週間以内)使用する。

### 蛍光ゼラチン, ポリリジン

ゼラチン、ポリリジン分子に蛍光物質が結合しており、基板への接着を蛍光顕微観察によって可視確認が可能である。本研究では、蛍光ゼラチン(G-13187, Molecular Probes)、蛍光ポリリジン(P3069-10MG, SIGMA)をミリ Q 水で~0.01 %に濃度調整し、先に述べたプロトコルに従って基板表面をコート処理した後、蛍光顕微鏡を用いて蛍光像を観察した。

### ・細胞の培養

本研究で用いた、3 種類の細胞(PC12, HeLa, AG01522B)の培養プロトコルを述べる。

### PC12

ラット副腎褐色由来細胞腫である PC12 細胞は、大阪大学工学研究科環境・エネルギー工学専攻 櫛引博士より譲り受けた。細胞は、37°C、5 %CO<sub>2</sub>環境下で 10%子牛胎児血清(GIBCO)、5 %馬血清(GIBCO)を添加したダルベッコ変法イーグル培地(14429-95, ナカライ)を用いて培養した。細胞のダブリングタイムは約 2 日である。細胞の継代、回収には 0.25 %トリプシン-EDTA 溶液(T049, SIGMA)を用いた。また、神経分化させる際には、NGF(NC011, CHEMICON INTERNATIONAL)を 50 ng/mL で無血清培地に添加し、~4 日間培養した。

### HeLa

ヒト頸部由来癌細胞である HeLa 細胞は、HS 研究資源バンクより購入した。細胞は、37°C、5 %CO<sub>2</sub> 環境下で 10%子牛胎児血清(GIBCO)を添加したイーグル基礎培地(21443-15, ナカライ)を用いて培養した。細胞のダブリングタイムは約 1 日である。細胞の継代、回収には 0.25 %トリプシン-EDTA 溶液(T049, SIGMA)を用いた。

### AG01522B

正常ヒト繊維芽細胞である AG01522B 細胞は、Coriell Institute for Medical Research より購入した。細胞は、37°C、5 %CO<sub>2</sub> 環境下で 10%子牛胎児血清(GIBCO)を添加したイーグル基礎培地(21443-15, ナカライ)を用いて培養した。細胞のダブリングタイムは約 1 日である。細胞の継代、回収には 0.25 %トリプシン-EDTA 溶液(T049, SIGMA)を用いた。

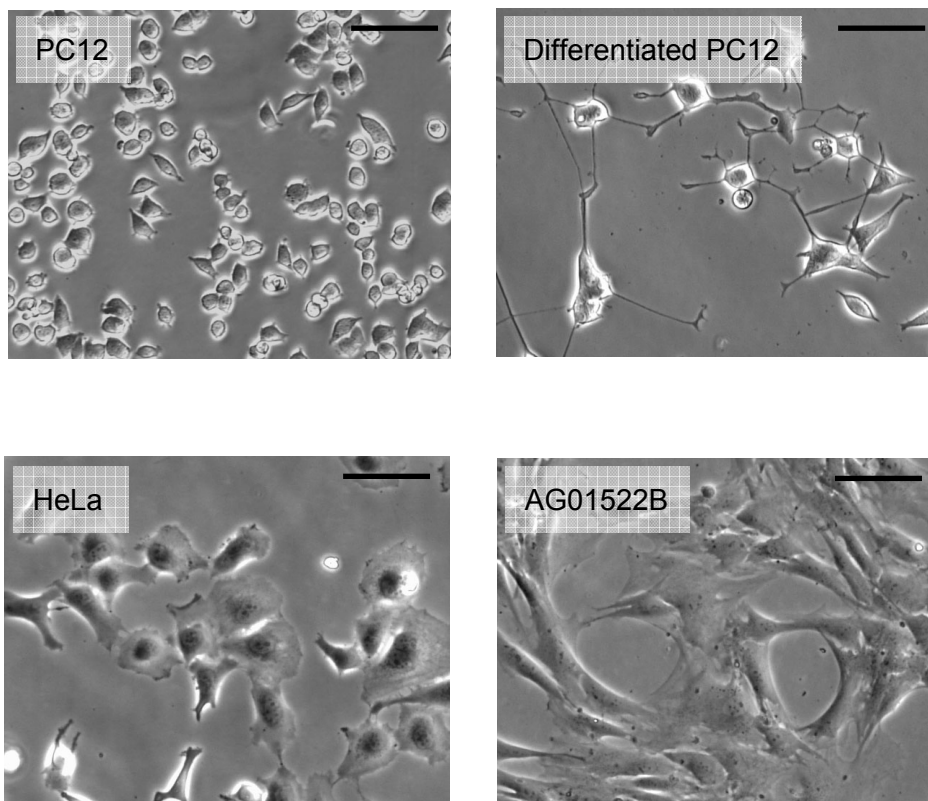


図 B2.1 各種細胞の様子。位相差対物レンズを用いて撮像した。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示している。

## B3. 蛍光染色

ここでは、細胞の生物学的な分析に用いた蛍光染色のプロトコルを述べる。

### ・細胞活性試験(BCECF AM)[2]

BCECF AM は細胞膜透過性を高めたエステル化合物であり、生細胞に取り込まれた時のみに加水分解され、蛍光特性を示す物質(BCECF)になる。この性質を利用することで、細胞の生死を判定することが可能である。また、細胞内 pH の感受性物質でもあり、2 波長の励起光による蛍光強度を比較する(レシオメトリック測定)ことで、細胞内の pH を測定することができる[3]。

- ① 細胞を培養している培地に 5  $\mu\text{g/mL}$  の BCECF AM DMSO 溶液(B3051, Molecular Probes)を添加し、37°C環境下で、30 分培養する。DMSO 溶液の調整には、組織培養用 DMSO(13408-64, ナカライ)を用いた。
- ② 培地を抜き取り、新しい培地で細胞表面を 1 回洗浄した後、蛍光顕微鏡を用いて観察する。

### ・細胞の生死判定(プロピジウムイオダイド)

核酸に結合する蛍光色素であるプロピジウムイオダイド(PI : propidium iodide)は、死細胞の細胞膜のみを透過するので、染色後、蛍光観察することで、細胞の生死を判定することが可能である[2]。

- ① 細胞の培養系に 5  $\mu\text{g/mL}$  の PI DMSO 溶液(29004-41, ナカライ)を添加し、37°C環境下で、20 分培養する。
- ② 培地を抜き取り、新しい培地で細胞表面を 1 回洗浄した後、蛍光顕微鏡を用いて観察する。

### ・生細胞の細胞核染色(ヘキスト)

Hoechst(ヘキスト)33342 は、細胞膜透過性の蛍光色素であり、核酸と結合する。生きた細胞の細胞核を染色することが可能である。蛍光観察時には、紫外領域の励起光を用いるために、光毒性への注意が必要である。

- ① 細胞を培養している培地に 5  $\mu\text{g/mL}$  の Hoechst33342 DMSO 溶液(04915-81, ナカライ)を添加し、37°C環境下で、30 分培養する。
- ② 培地を抜き取り、新しい培地で細胞表面を 1 回洗浄した後、蛍光顕微鏡を用いて観察する。

### ・細胞内カルシウム濃度の計測(Fluo-3, Fura Red)[4, 5]

Fluo-3 AM, Fura Red AM は細胞膜透過性の蛍光色素であり、細胞内で分解されるこ

とで、カルシウムイオン濃度感受性の蛍光特性を示す。Fluo-3 はカルシウムイオンの濃度の上昇によって蛍光強度が増加し、Fura Red はその逆の特性を示すため、同波長の励起光(一般的には 488 nm)による Fluo-3 と Fura Red 由来の蛍光を計測し、Fura Red/Fluo-3 の蛍光強度によるレシオメトリック測定から、細胞内カルシウムイオンの濃度変化を正確に知ることができる。また、蛍光強度と一般的に与えられる式を用いて、カルシウムイオン濃度を算出することも可能である。カルシウムイオン濃度の急激な上昇が起こる系においては、Fluo-3 のみの導入でその評価が可能であるが、ラシオメトリーによってより正確なカルシウムイオン濃度の変化を測定できる。

- ① 細胞を培養している培地に 5 µg/mL の Fluo-3 DMSO 溶液(F1422, Molecular Probes) と Fura Red DMSO 溶液(F3021, Molecular Probes)を添加し、37°C環境下で、60 分培養する。
- ② 培地を抜き取り、新しい培地で細胞表面を 3 回洗浄した後、蛍光顕微鏡を用いて観察する。

### ・免疫蛍光染色[6]

検出対象に特異的に結合する抗体の性質を利用して、抗体を金コロイドや酵素や蛍光マーカーなどで標識し、細胞や組織中の光源の局在を検出する方法である。免疫蛍光染色法には大きく分けて 2 種類あり、マーカーを直接抗原特異的抗体(一次抗体)に結合させたものを用いる直接標識法と、一次抗原に対する抗体(二次抗体)に標識する間接標識法がある。直接標識法は、抗原抗体反応が 1 度で済むうえ、非特異的な染色が少ない。しかし、一次抗体は多種にわたるため、有名な抗原でない限り標識一次抗体を購入することはできないが、標識二次抗体は購入することが可能である。また、一つの一次抗体に複数の二次抗体が結合することが可能なため、情報を増幅して検出することが間接標識法のメリットである。実際の実験では、この両手法において、検出対象に応じて、抗

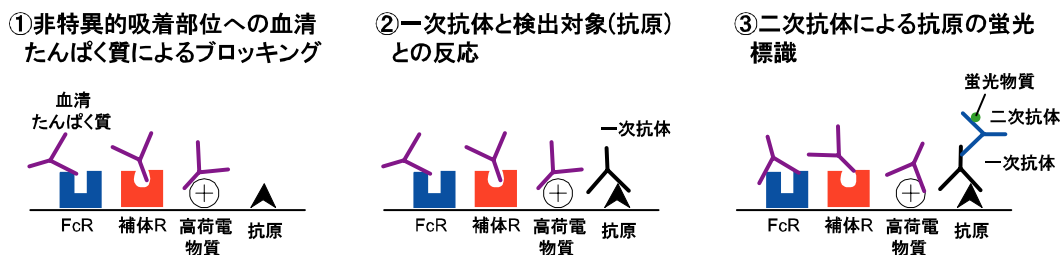


図 B3.1 間接標識法の原理. 非特異的部位への抗体の吸着を防ぐために、血清たんぱく質を用いたブロッキング処理の後、一次抗体と二次抗体で抗原を蛍光検出する。

体の希釈率や、反応時間を最適化する必要がある。

また、複数の目的タンパク質が同じ局在をとるかを知りたいなど、多重染色が必要な場合は、用いる色素に最適な波長帯だけを透過させる励起・蛍光フィルタを使ってそれぞれの蛍光色素を分離する必要がある。

図 B3.1 に本研究に用いた間接標識法の概略図を示す。そして以下に、各検出対象のためのプロトコルについて述べる。

#### DNA 二本鎖切断の検出[7,8]

DNA 二本鎖切断によってその近傍に付随して生成されるリン酸化 H2AX( $\gamma$ -H2AX)を免疫蛍光染色によって評価する。 $\gamma$ -H2AX に特異的に結合する $\gamma$ -H2AX 抗体を一次抗体として用い、二次抗体に $\gamma$ -H2AX 抗体に結合する蛍光抗体を用いることで、 $\gamma$ -H2AX の生成位置と生成数を可視的に評価できる。

- ① 培地を取り除いて、PBS で 3 回洗浄する。
- ② 4 °C(on ice)で 10 分間、4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液で細胞を固定した後、再び PBS で 3 回洗浄する。(細胞内外に浸透したホルムアルデヒド分子が、分子中のアルデヒド基が主に組織中の蛋白質のアミノ基に結合し、さらに架橋することで、蛋白質の立体構造を損なわせ、酵素活性、輸送、分泌などの様々な生物活性を働かなくさせる。細胞内の検出対象(たんぱく質)を保持するためのこの一連の作業を細胞の固定処理という)
- ③ 細胞膜の透過性を上げ、非特異的抗体反応を防ぐために、TNBS 溶液(0.1%Triton-X (35501-02, ナカライ), 5%BSA(01859-34, ナカライ)溶液)で室温、30 分間培養する。
- ④ 500 倍希釈の抗 $\gamma$ -H2AX マウスモノクローナル抗体(05-636, Upstate )を加えた 2% BSA PBS 溶液において室温で 1.5 時間培養した後、TNBS 溶液で 5 分×3 回洗浄する。
- ⑤ TNBS 溶液で 5 分×3 回洗浄した後、250 倍希釈 Alexa Fluor 488 抗マウス IgG 抗体 (A-11001, Molecular Probes )PBS 溶液で室温、1 時間培養した後、TNBS 溶液で 5 分×3 回洗浄する
- ⑥ 細胞核を Hoechst33342 もしくは PI を用いて染色した(5 $\mu$ g/ml, 20 分, 室温)後、退色防止溶液 Anti Fade(S36937, Molecular Probes)を加えて、マニキュア液でカバーガラスを封じて、蛍光顕微鏡で観察する。図 B3.2 に繊維芽細胞に $\gamma$ 線を照射し(5 Gy),  $\gamma$ -H2AX と細胞核を染色した様子を示す。



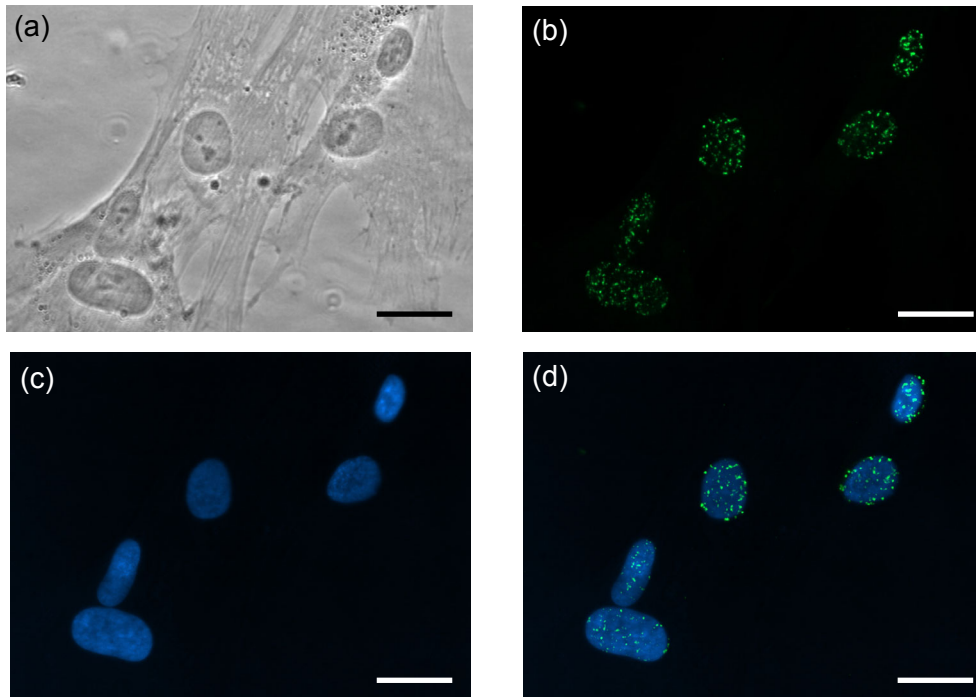


図 B3.2 (a)染色した細胞を光学顕微鏡観察した様子. (b) $\gamma$ -H2AX を蛍光観察した様子. (c)ヘキスト染色した細胞核を蛍光観察した様子. (d)蛍光画像を合成した様子. スケールバーは 20  $\mu$ m を示している.

#### インターロイキン 6(IL-6)の検出[9]

- ① 培地を取り除いて、PBS で 3 回洗浄する.
- ② 4  $^{\circ}$ C(on ice)で 10 分間、4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液で細胞を固定した後、再び PBS で 3 回洗浄する.
- ③ 透過性を上げるために、TNBS 溶液(0.1%Triton-X, 1%子ウシ血清 PBS 溶液)で室温、30 分間培養する.
- ④ 200 倍希釈の抗ラット IL-6 マウスモノクローナル抗体(sc-1265, SANTA CRUZ BIOTHCHNOLOGY )を加えた 2%BSA PBS 溶液において、4 $^{\circ}$ Cで一晩培養した後、TNBS 溶液で 5 分 $\times$ 3 回洗浄する.
- ⑤ TNBS 溶液で 5 分 $\times$ 3 回洗浄した後、250 倍希釈 Alexa Fluor 488 抗マウス IgG 抗体 (PBS 溶液で室温、1 時間培養した後、TNBS 溶液で 5 分 $\times$ 3 回洗浄する
- ⑥ 細胞核を Hoechst33342 もしくは PI を用いて染色(5 $\mu$ g/ml, 20 分, 室温)した後、Anti Fade を加えて、マニキュア液でカバーガラスを封じて、蛍光顕微鏡で観察する.

### ・蛍光色素の励起・蛍光波長

ここで用いた蛍光物質の最大励起波長と蛍光波長を表 B3.1 にまとめた。蛍光観察においては、それらに対応したフィルタセット(励起光フィルタ, 蛍光フィルタ, ダイクロミックミラー)を用いる必要がある。

表 B3.1 各蛍光物質の最大励起波長と最大蛍光波長

蛍光物質	最大励起波長 [nm]	最大蛍光波長 [nm]
Alexa Fluor 488	495	519
Alexa Fluor 350	350	445
BCECF	488	535
Fluo-3	506	525
Fura Red	473	670
Hoechst 33342	343	461
Propidium iodide	488/536	617

## B4. 結言

細胞試料の培養手法と、生物学的な分析のための蛍光イメージング手法のプロトコルについて述べた。これらのプロトコルに従って、細胞レベルでの生物学的な分析をおこなった。

## 参考文献

- [1] 渡辺俊雄著, 「すくすく育て細胞培養」, 秀潤社, (1996).
- [2] C. R. Chu et al., “In situ assessment of cell viability within biodegradable polylactic acid polymer matrices”, *Biomat.*, Vol.16, pp.1381-1384 (1995).
- [3] L. Carpenter et al., “The kinetics substrate and inhibitor specificity of the lactate transporter of Ehrlich-Lette tumour cells studied with the intracellular pH indicator BCECF”, *Biochem. J.*, Vol.304, pp.751-760 (1994).
- [4] P. Lipp and E. Niggli, “Ratiometric confocal  $Ca^{2+}$  -measurements with visible wavelength indicators in isolated cardiac myocytes”, *Cell Calcium*, Vol. 14, pp.359-372 (1993).
- [5] A. Kozak et al., “Intracellular calcium levels regulate the actions of nerve growth factor on calcium uptake in PC12 cells”, *J. Neurosci. Res.*, Vol.33, pp.33-36 (1992).
- [6] 井関祥子他編, 「バイオ実験で失敗しない!免疫染色・イメージングのコツ-サンプル調整から抗体の選択, 染色法の手技, 顕微鏡観察までの実践的ノウハウ(実験医学別冊 21)」, 羊土社, (2007).
- [7] B. Hu et al., “The time and spatial effects of bystander responses in mammalian cells induced by low dose radiation”, *Carcinogenesis*, Vol.27, pp.245-251 (2006).
- [8] J. Bewerdorf et al., “H2AX chromatin structures and their response to DNA damage revealed by 4Pi microscopy”, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol.103, pp.18137-18142 (2006).
- [9] C. Tabata et al., “All-trans retinoic acid modulates radiation-induced proliferation of lung fibroblasts via IL-6/IL-6R system”, *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, Vol.290, pp.597-606 (2006).

## 謝辞

本研究の遂行および本論文の作成に際し、終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻 飯田敏行教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の作成に際し、大変貴重な御指導、御助言を賜りました本学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 栗津邦男教授、電気電子情報工学専攻 村田勲准教授に深甚なる感謝の意を表します。

本学在学中、御指導を賜りました本学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻 田中和夫教授、上田良夫教授、兒玉了祐教授、三間罔興教授、實野孝久教授に深謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、御指導と貴重な御意見を頂きました本学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻 加藤裕史准教授に厚謝の意を表します。

本研究の生物試料の放射線照射実験において、御指導、御助言を頂きました本学ラジオアイソトープ研究センター 清水喜久雄准教授に厚謝の意を表します。

本研究の遂行に際し、生物学実験に関する御指導、御助力を頂きました本学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻 櫛引俊宏特任講師に厚謝の意を表します。

本研究の $\gamma$ 線照射実験の遂行に際し、御指導、御助力を頂きました、本学産業科学研究所 池田稔治助教に厚謝の意を表します。

本研究を始めるにあたり、御指導、御助力を頂きました本学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻 佐藤文信助教に厚謝の意を表します。

本研究の遂行に際し、計測機器の開発に有益な御助言を頂きました核融合科学研究所炉工学研究センター 田中照也助教に感謝の意を表します。

本研究において、共に装置の開発をおこなった、平成 17 年度本学大学院工学研究科博士前期課程修了 東野優氏、平成 18 年度本学大学院工学研究科博士前期課程修了 本田和裕氏、平成 19 年度本学大学院工学研究科博士前期課程修了 藤田智久氏、本学大学院工学研究科博士前期課 青位祐輔氏、稲川千津氏、本学工学部 田中聡一氏に心から感謝の意を表します。

本研究において、実験に協力して頂いた、平成 17 年度本学大学院工学研究科博士前期課程修了 則竹康秀氏、平成 18 年度本学大学院工学研究科博士前期課程修了 清原崇之氏、松浦良太郎氏に心から感謝の意を表します。

研究をはじめとする様々なことでサポートして下さった、平成 18 年度本学大学院工学研究科博士後期課程修了 浅地豊久氏、香川武史氏、平成 20 年度本学大学院工学研究科博士前期課程修了 石川一平氏、井原洋平氏、Nidal Dwaikat 氏、加

## 謝辞

田渉氏，牧大介氏，小林初美氏，田口正樹氏，松井祐樹氏，渡辺剛吉氏，久津見修氏，末安雅人氏，久門聡氏，平井嘉晃氏他，本学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻 先進ビームシステム工学領域の諸兄らに感謝の意を表します。

本研究を助成して頂いた，日本科学協会(笹川研究助成)，日本学術振興会(特別研究員奨励費)に感謝の意を表します。

そして，私生活において，様々な助言や激励を頂きました多くの友人に感謝の意を表します。

最後に，長年にわたる学業，研究生活を支えてくれた家族に心から感謝の意を表します。

## 研究業績

### 主要論文

- [1] T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Aoi, T. Fujita, T. Ikeda, K. Shimizu, Y. Kato and T. Iida, "Microchamber arrays for the identification of individual cells exposed to an X-ray microbeam", *Radiat. Envir. Biophys.*, Vol. 47, pp.535-540 (2008).
- [2] T. Kuchimaru, F. Sato, K. Honda, Y. Kato and T. Iida, "Three-dimensional track imaging during etching and sequential reconstruction of track structures", *Radiat. Meas.*, Vol.43, pp.s125-s127 (2008).
- [3] T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Higashino, K. Shimizu, Y. Kato, and T. Iida, "Microdosimetric characteristics of micro X-ray beam for single cell irradiation", *IEEE Trans. Nucl. Sci.* Vol.53, No.3, pp.1363-1366 (2006).
- [4] T. Kuchimaru, T. Fujita, F. Sato, K. Shimizu, Y. Kato and T. Iida, "Single cell irradiation with patterned cell assembly", *Indi. J. Radiat. Res.*, Vol.3, Number 4, p.287 (2006).
- [5] 口丸高弘, 東野優, 佐藤文信, 清水喜久雄, 加藤裕史, 飯田敏行, "単一細胞照射のためのマイクロ X 線ビーム照射装置の開発", *放射線* Vol.32, No.2, pp.128-133 (2006).
- [6] T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Aoi, C. Inagawa, Y. Kato and T. Iida, "Micropatterned cell culture technique for particle irradiation experiments", submitted to *Jpn. J. Appl. Phys.*

### 関連論文

- [1] F. Sato, T. Kuchimaru, T. Ikeda, K. Shimizu, Y. Kato, T. Yamamoto and T. Iida, "X-ray microbeam measurement with radiophotoluminescent glass plate for single cell irradiation", *Radiat. Meas.*, Vol. 43, pp. 912-916 (2008).
- [2] F. Sato, T. Kuchimaru, Y. Kato and T. Iida, "Digital image analysis of etch pit formation in CR-39 track detector", *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol. 47, No.1, pp. 269-272 (2008).
- [3] T. Kuchimaru<sup>\*</sup>, F. Sato, Y. Higashino, Y. Kato, and T. Iida, "Measurement of Profile of Micro X-ray Beam", Proc. the 19<sup>th</sup> Workshop on Radiation Detectors and Their Uses, Vol.15, pp.121-125 (2005)
- [4] 口丸高弘, 佐藤文信, 飯田敏行, "スパッタ中性粒子のための質量分析装置の開発", *放射線* Vol.30 No.2, pp.179-182 (2004).
- [5] Y. Aoi, T. Kuchimaru, D. Maki, F. Sato, T. Ikeda, Y. Kato, T. Yamamoto and T. iida, "Radiophotoluminescent observation of X-ray microbeam transport in silver-activated

phosphate glass”, submitted to *Jpn. J. Appl. Phys.*

## 国際会議における発表

- [1] T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Aoi, C. Inagawa, T. Ikeda, Y. Kato and T. Iida, “Development and testing of micropatterned cell culture platform for biological analysis of single cell irradiation”, ab33, International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications, Debrecen, Hungary, July 20-25, 2008. (poster presentation)
- [2] T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Aoi, Y. Kato and T. Iida, “X-ray microbeam system with laser scanning probe for measurement of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration”, ab141, International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications, Debrecen, Hungary, July 20-25, 2008. (poster presentation)
- [3] T. Kuchimaru, T. Fujita, F. Sato, K. Shimizu, Y. Kato and T. Iida, “Single cell irradiation with patterned cell assembly”, 198, International Conference on Radiation Biology, Varanasi, India, November 20-22, 2006. (oral presentation, invited talk)
- [4] T. Kuchimaru, F. Sato, K. Shimizu, Y. Kato and T. Iida, “X-ray microbeam system for irradiation of living cells”, 1p453, 5<sup>th</sup> East Asian Biophysics Symposium & 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS & BSJ 2006), Naha, Okinawa, Japan, November 12-16, 2006. (poster presentation)
- [5] T. Kuchimaru, F. Sato, K. Honda, Y. Kato and T. Iida, “Three-dimensional track imaging of boron neutron capture reaction in nuclear track detector”, 213p, 23th International Conference of Nuclear Track Society, Beijing, China, September 11-15, 2006. (poster presentation)
- [6] T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Higashino, K. Shimizu, Y. Kato, and T. Iida, "Development of Compact Micro X-ray Beam Irradiation System", The 1st Asian Congress of Radiation Research, Hiroshima, Japan, November 16 - 17, 2005. (poster presentation)
- [7] T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Higashino, K. Shimizu, Y. Kato, and T. Iida, "Microdosimetric Characteristics of Micro X-ray Beam for Single Cell Irradiation", IEEE Nuclear Science Symposium & Medical Imaging Conference, Puerto Rico, USA, October 23 - 29, 2005 (poster presentation)