

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	ersion Type VoR	
URL	https://hdl.handle.net/11094/855	
rights		
Note		

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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 µm [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.

第1章 緒論	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

第2章 卓上型X線マイクロビーム照射装置......7 21 線章

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

第3章 単一細胞に対するマイクロドジメトリ...... 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

第4章 細胞培養チップ..... 50

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

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 B 生物実験プロトコル	87 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 μm)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

従来の放射線照射 放射網

細胞

全ての細胞を照射

マイクロビームを用いた放射線照射

マイクロビーム 放射線効果が伝搬する?? バイスタンダ-

細胞集団中の任意の細胞のみを照射

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

第1章 緒論



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,十分な回数の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

これまでにお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 α-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).
- 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. Nati. 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).

第1章 緒論

[17] H. A. Stoneet 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

車上型 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. 車上型 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 µm)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℃雰囲気に保たれて 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.



8

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 µm 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 µm 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*e*は

$$\varepsilon = 1.1 \times 10^{-9} ZV$$

(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 Am 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 Am と電 子の加速電圧 V の関係を次に示す.

$$\lambda_m = \frac{hc}{eV} \tag{2.2.2}$$

第2章 卓上型 X 線マイクロビーム照射装置

ここで, e:電子の電荷, h:プランク定数, c:光速度である. 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,

 $I \propto i V^2 Z$

(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 $K_{\alpha l}, K_{\alpha 2}, K_{\beta l}, \cdot \cdot , L 系列は, L_{\alpha 2}, L_{\beta l}, \cdot \cdot \cdot である. 図 2.2.4 に示すように、$ 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

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

 $E_n: L, M, N, \cdot \cdot \cdot$ 設電子のエネルギー, $E_k: K$ 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. $K_{\alpha l}, K_{\alpha 2}$ 本の線は, 波長が非常に近接しているので普通一本 とみなし, これを K_{α} とよぶ.

双方の遷移確率比は 2:1 であるから, K_αの波長λ_{ka}はこれらの加重平均で与えられる.

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

 λ_{kal} : $K_{\alpha 1}$ 線の波長, λ_{ka2} : $K_{\alpha 2}$ 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.

 $I \propto i(V - V_0)^n \tag{2.2.6}$

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_α), 20.2 (K_α), 21.7 (K_β) 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

$$n = 1 - \delta - i\beta \tag{2.2.7}$$

と表される. $\delta \geq \beta$ は

$$\delta = \frac{Nr_0}{2\pi}\lambda^2 f_1 \tag{2.2.8}$$

$$\beta = \frac{Nr_0}{2\pi} \lambda^2 f_2 \tag{2.2.9}$$

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、

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

である. f₁, f₂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,

 λ 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

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

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

のように置き換える.この時,臨界角 ¢ は

$$\phi_c = \sqrt{2\delta} \tag{2.2.13}$$

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 ϕ_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(SiO₂)の密度2.5 g/cm²とHenkeのデータ ブック[8]より得た原子散乱因子 f_i の値を用いた.ロジウムの特性X線であるE=20.2 keV, 2.7 keVの臨界角は0.89 mrad (0.05°), 6.61 mrad (0.38°)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

第2章 卓上型X線マイクロビーム照射装置

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,全反射の効率は,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には,一本の キャピラリによってX線を集光するモノキャピラリと,キャピラリを複数束ねて,集光

モノキャピラリ

原理	特徴
導管内を, X 線を全反射させ	・白色 X 線の集光が可能.
ながら誘導し,導管そのもの	・X 線ビームの広がりが小さい.
を細く絞って照射する.	



ポリキャピラリ

原理	特徴
モノキャピラリを多数束ね,	・白色 X 線の集光が可能.
より立体角を増して強度を	・X 線ビームの広がりは大きい.
増加させる.	 X線強度が高い.
	・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μm以下に集光するのは困難.



図 2.2.7 モノキャピラリとポリキャピラリの集光原理と特徴

形状	特徴
平行型	・作製が容易
(Parallel type)	・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
放物面型	・平行成分を多く含む光源(放射光)に有効
(Paraboloid type)	 ・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
楕円型	・発散成分を一回反射で集光するため,発散成分を
(Elliposoid type)	多く含む光源に対して輸送効率が高い
	・形状が複雑なため高度な作製技術が必要

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 µm 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 µm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20keV 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、50keV 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 µm, 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,1µm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℃雰囲気に保つことができる.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

銀活性燐酸塩ガラス(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.

・銀活性燐酸塩ガラスを用いた蛍光イメージング

銀活性燐酸塩ガラスは、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 に銀活性燐酸塩ガラスの 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 Ag⁺に捕獲され Ag⁰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 PO₄四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⁺⁺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、γ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℃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 µm [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が確認 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が確認された. 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 線測定を組みあわせて、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 µm)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 第2章 卓上型 X線マイクロビーム照射装置



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 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 µm [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を調査する



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_a線(E=9.7 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 拡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 keV と 20.2 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 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_α)と 20.2 keV (K_α)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1mm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1mm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関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 um 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 $[J \cdot kg^{-1} \cdot s^{-1}] = Gy \cdot s^{-1}$ 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 µm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 µm 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 µm~)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 µm を示している.

第2章 卓上型 X線マイクロビーム照射装置



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 µm 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µm 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
第2章 卓上型X線マイクロビーム照射装置



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 µm 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(λ =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(λ =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 (λ=454.5~514.5 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±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、200×200 µm²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された励起された蛍光は、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.



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的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て卓上型 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 µm [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, and reflection 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 dosimetrical 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[Ca²⁺] 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γ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].



X-ray source

Glass capillary





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 µm,出口の径は 20 µm,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 g/cm²)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と線量付 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めていないため、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.

40

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π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 µm 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 µm のときの結 果を示した)

第3章 単一細胞に対するマイクロドジメトリ



図 3.3.4 10 µm 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 μm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~0.3 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 μm の領域においては,中心部(0~5 μm の領域)の約 26%, 10~15 μm 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 µm 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3.0×10⁴ 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 µm に加えて、半径 5 µm 程度までの領 域においては、~1 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 µm 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).

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(λ= ~350 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: ~170 μm)上に塗布した、SU-8 (3050, 化薬マイクロケム)を、スピンコーターを用いて 2000 rpm (60 秒間)でスピンコー トした. その後、95℃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(λ= 365 nm, 40 mW/cm²)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℃、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



1. Applying SU-8 on a glass coverslip



2. Spin coating (2000 rpm,1 min.)



3. Pre baking (95°C, 2 min.)



4. Expusure to UV lights (40 mW/cm², 15 min.)





in developer solution

7. Washing and sterilization



8. Surface coating with extra celluar matrix





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℃, 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 µm² と 100×100 µm²)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 種類のフォトマスク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 µm 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-LH75XEAPO, 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 µm を示している.

第4章 細胞培養チップ



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 ℃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 µm 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 µm 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 µm 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縣濁液において,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 µm サイズと(b)100 µm 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 µm 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μCP法が開 発された[20]. μCP 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ている.

ここでは、これまでにも報告されてきた、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ニング培養手法

手法	特徴	問題点
µCP 法 PDMS stamp Proteins for cell adhesion Glass substrate Glass substrate	・量産が容易 ・数種類のたんぱく質を 1 つの基板上にパターニング できる	・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ニ ング精度が低下する
分子自己組織化法 Proteins for cell adhesion Material B Material A	・パターニングの精度が高 い	 ・パターン作製過程が複 雑
ステンシル法 PDMS stencil cover Cell 回回回回 Glass substrate Proteins for cell adhesion	 ・量産が容易 ・パターニング後,細胞の 培養空間が制限されない 	・基板とステンシルマス クの密着具合によって パターニング精度が低 下する
誘電泳動法 Cell Micro electrode	 ・電極への印可周波数を選 択することでその場でパタ ーニングのパターンを調整 できる 	 ・パターニングの精度は 低い ・電界の細胞への影響

用する手法に注目した.この手法は、大面積に高いパター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



Etched CR-39 substrate (hydrophilicity)

図 4.4.2 マイクロパター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 µm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 µm を示している.

第4章 細胞培養チップ



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 µm 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 µL 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箇所で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 1.0×10⁴ 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 µm 四方の細胞接着領域を有するマイクロパター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.

第4章 細胞培養チップ



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.
第4章 細胞培養チップ



図 4.4.9 マイクロパター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 µm 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)

第4章 細胞培養チップ



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 µm 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ニング培養チッ プを作製し、細胞のマイクロパター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 ーニング培養が可能であることが示された.

参考文献

- V. I. Chinet 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, "Microflluidic 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. Nati. 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 biofuling of MEMS drug delivery devices", *Biomat*, 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. Immu. 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", *Biomat.*, Vol.16, pp.1381-1384 (1995).
- [15] E. I. Azzam et al., "Direct evidence for the participation of gap junction-meadiated 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. Biomedi. 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 microand 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", *Biomat.*, 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 α-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が期待されている.

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	<mark>放射線</mark>	マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム マイクロビーム
解析	 	放射線効果が伝搬する?? (パイスタンダー効果) レレンダー効果) レレンダー効果) レレンダー効果) レレンダー効果) レレンダー効果) レレンダー効果) レレンダー効果) レレンダー効果) レンダー効果) レンダー効果) レンダー効果) レンダー効果) レンダーの果り レンダーの泉り レンダーの泉り

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 µm 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γ線照射装置(⁶⁰Co, 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 加したものを用い、37℃、5%CO2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 ×10⁵ 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 mm²)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℃, 5%CO2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[®] 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 γ-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γ-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:γ-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 μm を示している.

リン酸化されることで生成するγ-H2AX を利用した(図 5.2.6). γ-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].

γ線照射した PC12 細胞を任意の時間 37℃, 5%CO₂環境下で培養した後, γ-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γ-H2AX 蛍光強度の経時変化を示した. 照射後に生成されるγ-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 γ-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 5.0×10⁴ 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 μl 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γ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. γ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 µm を示している.



図 5.3.3 (a)各線量,照射後の時間において γ-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 μm を示している. (b)各線量における照射後の時間とγ-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よって, IL-6 の産生を促す転写因子の NF-κB 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

- R-P. Gerhard et al., "The Columbia university single-ion microbeam", *Radiat. Res.*, Vol. 156, pp.210-214 (2001).
- 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 α-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 γH2AX 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 resucue 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. Gadient et al., "Interleukin-6 (IL-6) a molecule with both beneficial and destructive ptential", *Prog. Nuerobiol.*, Vol.52, pp.379-390 (1997).
- [15] U. Raju et al., "NFκB 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 beaks: 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-κB signaling in responses to genotoxic stimuli", *Scinece*, Vol.311, pp.1141-1146 (2006).
- [19] Y. Habraken and J. piette, "NF-κB activation by double-strand breaks", *Biochem. Pharmacol.*, Vol.72, pp.1132-1141 (2006).
- [20] I. B. Nazarov et al., "Dephosphorylation of histone γ-H2AX during repair of DNA double-strand breaks in marmalina cells and its inhibitation 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-κB 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., "Comparetive 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 memoy 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 durting 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て卓上型 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 µm [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ニング培養チップを作製し、細胞のマイクロパター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.γ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、 同程度から大きなときは、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 n₁が周囲の媒質の屈折率 n₂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 合わせること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し、そのパワーは、 PT^2 、PTR、…、 PTR^n 、 …となる. それらの光線が入射軸に対してなす角は、 $\pi+\theta$ 、 α 、 $\alpha+\beta$ 、…、 $\alpha+n\beta$ 、…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、

$$F_{z} = \frac{n_{1}P}{c} - \left[\frac{n_{1}PR}{c}\cos(\pi + 2\theta) + \sum_{n=0}^{\infty}\frac{n_{1}P}{c}T^{2}R^{n}\cos(\alpha + n\beta)\right]$$
(A.2.1)

となる.ここで、 $n_I P/c$ は、Z 方向に単位時間当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、

$$F_{\gamma} = 0 - \left[\frac{n_1 P R}{c} \sin(\pi + 2\theta) + \sum_{n=0}^{\infty} \frac{n_1 P}{c} T^2 R^n \sin(\alpha + n\beta)\right]$$
(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,

$$F_{tot} = \frac{n_1 P}{c} [1 + R\cos 2\theta] + i \frac{n_1 P}{c} R\sin 2\theta - \frac{n_1 P}{c} T^2 \sum_{n=0}^{\infty} R^n e^{i(\alpha + n\beta)}$$
$$= \frac{n_1 P}{c} [1 + R\cos 2\theta] + i \frac{n_1 P}{c} R\sin 2\theta - \frac{n_1 P}{c} T^2 e^{i\alpha} [\frac{1}{1 - Re^{ib}}]$$
(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

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

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

$$R_{s} = \left(\frac{n_{1}\cos\theta_{1} - \sqrt{n_{2}^{2} - n_{1}^{2}\sin^{2}\theta_{1}}}{n_{1}\cos\theta_{1} + \sqrt{n_{2}^{2} - n_{1}^{2}\sin^{2}\theta_{1}}}\right)^{2}$$
(A.2.5)

$$T_{s} = \left(\frac{n_{2}\cos\theta_{2}}{n_{1}\cos\theta_{1}}\right) \left(\frac{2n_{1}\cos\theta_{1}}{n_{1}\cos\theta_{1} + \sqrt{n_{2}^{2} - n_{1}^{2}\sin^{2}\theta_{1}}}\right)^{2}$$
(A.2.6)

付録A 光ピンセットの原理・理論解析

$$R_{P} = \left(\frac{n_{2}\cos\theta_{1} - \frac{n_{1}}{n_{2}}\sqrt{n_{2}^{2} - n_{1}^{2}\sin^{2}\theta_{1}}}{n_{2}\cos\theta_{1} + \frac{n_{1}}{n_{2}}\sqrt{n_{2}^{2} - n_{1}^{2}\sin^{2}\theta_{1}}}\right)^{2}$$
(A.2.7)

$$T_{P} = \left(\frac{n_{2}\cos\theta_{2}}{n_{1}\cos\theta_{1}}\right) \left(\frac{2n_{1}\cos\theta_{1}}{n_{2}\cos\theta_{1} + \frac{n_{1}}{n_{2}}\sqrt{n_{2}^{2} - n_{1}^{2}\sin^{2}\theta_{1}}}\right)^{2}$$
(A.2.8)

と与えられる。ここで入射角、反射角(屈折角)を θ_1 , θ_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、TEM₀₀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 ときに粒子に、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に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20mWのとき、約20pN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] ロ丸高弘, 「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% x 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℃環境下で 30 分浸す. 付録 B 生物実験プロトコル

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℃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% x 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℃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℃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あり,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.

<u>PC12</u>

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℃、5 %CO2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℃, 5 %CO₂ 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℃、5 %CO2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 µm を示している.

付録 B 生物実験プロトコル

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].

- 細胞を培養している培地に 5 µg/mL の BCECF AM DMSO 溶液(B3051, Molecular Probes)を添加し、37℃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].

- 細胞の培養系に 5 µg/mL の PI DMSO 溶液(29004-41, ナカライ)を添加し、37℃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)

Hoechest(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.

- 細胞を培養している培地に 5 µg/mL の Hoechest33342 DMSO 溶液(04915-81, ナカ ライ)を添加し、37℃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.

- 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℃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(γ-H2AX) を免疫蛍光染色によって評価する. γ-H2AX に特異的に結合するγ-H2AX 抗体を一次抗 体として用い,二次抗体にγ-H2AX 抗体に結合する蛍光抗体を用いることで,γ-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 ℃(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γ-H2AX マウスモノクロナール抗体(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(5µg/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γ線を照射し(5 Gy)、γ-H2AX と細胞核を染色した様子を示す.

付録 B 生物実験プロトコル



図 B3.2 (a)染色した細胞を光学顕微鏡観察した様子. (b)γ-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 µm 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 ℃(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 マウスモノクロナール抗体(sc-1265, SANTA CRUZ BIOTHCHNOLOGY)を加えた2%BSA PBS 溶液において、4℃で一晩培養した後、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 (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(5µg/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.

付録 B 生物実験プロトコル

・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 ロイックミラー)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-Lettre 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 Ca²⁺ -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

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 粟津邦男教授,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,三間圀興教授,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γ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
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

研究業績

主要論文

- 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] <u>T. Kuchimaru</u>, 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] <u>T. Kuchimaru</u>, 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] <u>T. Kuchimaru</u>, 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] <u>口丸高弘</u>,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] <u>T. Kuchimaru</u>, 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

- F. Sato, <u>T. Kuchimaru</u>, 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, <u>T. Kuchimaru</u>, 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] <u>T. Kuchimaru</u>^{*}, F. Sato, Y. Higashino, Y. Kato, and T. Iida, "Measurement of Profile of Micro X-ray Beam", Proc. the 19th Workshop on Radiation Detectors and Their Uses, Vol.15, pp.121-125 (2005)
- [4] ロ丸高弘, 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

研究業績

phosphate glass", submitted to Jpn. J. Appl. Phys.

国際会議における発表

- [1] <u>T. Kuchimaru</u>, 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] <u>T. Kuchimaru</u>, F. Sato, Y. Aoi, Y. Kato and T. Iida, "X-ray microbeam system with laser scanning probe for measurement of intracellular Ca²⁺ concentration", ab141, International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications, Debrecen, Hungary, July 20-25, 2008. (poster presentation)
- [3] <u>T. Kuchimaru</u>, 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] <u>T. Kuchimaru</u>, F. Sato, K. Shimizu, Y. Kato and T. Iida, "X-ray microbeam system for irradiation of living cells", 1p453, 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (EABS & BSJ 2006), Naha, Okinawa, Japan, November 12-16, 2006. (poster presentation)
- [5] <u>T. Kuchimaru</u>, 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] <u>T. Kuchimaru</u>, 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] <u>T. Kuchimaru</u>, 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)