

低線量放射線の生物影響研究のための放射光 X 線マイクロビーム細胞照射装置

宇佐美徳子 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1
 小林 克己 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

要旨

低線量放射線の生物影響を理解することは社会的要請となっている。私たちは低線量光子放射線の生物影響を研究することを目的として放射光 X 線マイクロビーム細胞照射装置を開発した。この装置を用いてヒトの培養細胞にマイクロビーム細胞照射実験を行い、免疫染色法により DNA 損傷を検出した。狙った位置に正しくマイクロビームが照射できること、照射した細胞の位置を正しく記憶し再現できることなどの性能が実現していることが確認できた。

1. はじめに

私たちの周りには多くの放射線が常に存在する。宇宙や地表から放出される自然放射線はもちろんのこと、病院に行けば数多くの放射線を用いた検査に出会う。また「放射光」の読者の方の多くは、日常的に放射線を駆使して研究をされていることと思う。病気を初期のうちに発見でき正しい治療ができるようになったり、他の手段では見えない物質の構造や電子状態に関する情報が得られたり、現代社会において放射線は他には代え難い便利なツールのひとつであろう。

一方放射線は人体に対して有害な影響を及ぼすこともよく知られている。しかし、日常生活で出会うような微量の放射線が生物に与える影響をきちんと知るは大変難しい。ヒトに対する放射線の影響を推定する根拠となっているのは、広島や長崎の被爆者等の疫学的調査か、あるいは比較的精度良く得られている高線量域の放射線を用いた生物学的実験データをもとに低線量での生物影響を推測・評価しているのが現状である。細胞が放射線を受けると、細胞死やがん化といった影響が起こるまでに、多くの細胞内の応答機構が関与する複雑な過程をたどるが、特に低線量放射線の場合はこれらの生物影響がどのようにして発現するか、そのメカニズムが十分に理解されているとはいえない。

本稿では、低線量放射線の生物影響を研究することを目的として、高エネルギー加速器研究機構・放射光科学研究施設において開発した放射光 X 線マイクロビーム細胞照射装置について報告する。

2. 低線量放射線の生物影響研究

1990年代の初めまでは、放射線の生物影響とは放射線が直接あたった細胞にのみ現れる効果であると考えられていた。ところが1992年に Nagasawa and Little によってこの概念をくつがえす興味深い現象が発見された。細胞に低

線量の α 線を照射し染色体に現れる効果を調べたところ、全体の 1% の細胞しか放射線を受けないような極微量の放射線を照射したのにもかかわらず、30% の細胞に染色体の変化が起こっていたのである¹⁾。これは放射線を直接受けていない細胞にも放射線の影響があらわれることを最初に示した報告であり、この現象は「バイスタンダー効果 (bystander = 傍観者)」と呼ばれ、今では低線量の放射線の生物影響にとって非常に重要なメカニズムであると考えられるようになった。細胞集団が高線量と低線量の放射線にさらされている場合の概念図を Fig. 1 に示す。低線量というのは「放射線を直接受けていない細胞が大部分である」状態であり、「傍観者」の細胞に何らかの影響が起こるとすれば、それを無視することはできなくなる。

それでは身近な放射線はどのぐらい「低線量」なのだろうか。年間の自然放射線の線量は、地域や環境にもよるが日本では約 2 mSv (シーベルト) であり、これは細胞あたり 10 keV 程度の電子線が 1 年間に 1 個通過する線量に相当する (これを X 線の光電効果によって生じた光電子とみなせば、10 keV 程度のフォトンが 1 年間に 1 個、と考えてもよい)。 α 線の場合はもっと極端で、単位飛跡長さあたりの付与エネルギー (LET, linear energy transfer) が 100 keV/ μm の α 線の場合、細胞の大きさを直径 20 μm の球と仮定すると、 α 線が細胞を通過すると細胞に 2 MeV のエネルギーを与えることになり、これをジュールに換算して細胞の質量で割ると、細胞あたり 80 mGy (グレイ, 1 Gy = 1 J/kg) という線量が得られる。自然放射線レベルの 2 mSv とは α 線ではどのような線量かと言うと (Sv という単位には線質係数という物理的でない係数が入っているので、ここでは簡単のため 2 mSv = 2 mGy とする)、細胞集団で見て平均 40 個の細胞のうち 1 個に α 線が通過し、その細胞にのみ 80 mGy という線量が与えられた状態、に相当する。このような状況を想像するだけで、放射線が当たった細胞と当たっていない細胞を区別しないで生物影響を調べる方法では低線量の生物影響発現のメカニ

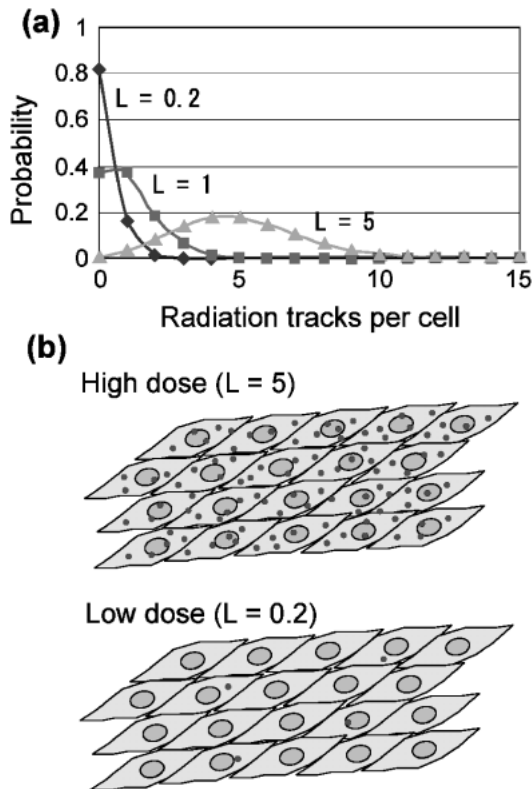


Figure 1. (a) Poisson distribution for number of radiation tracks traversed individual cell in various doses (L represents an average number of tracks). (b) Schematic illustration of the cells irradiated with high dose (L=5) and low dose (L=0.2).

ズムを捉えることは不可能であることがわかる。このような観点から、個々の細胞に個別に放射線を照射し、個別に効果を分析する研究手法の必要性が認識され、それを可能にするマイクロビーム細胞照射装置が開発されるようになった。英国の Gray Cancer Institute^{2,3)}、米国の Columbia University⁴⁾では、それぞれ粒子線を用いたマイクロビーム細胞照射装置がいち早く開発され、先駆的な研究が行われている。

これらのマイクロビーム細胞照射装置は、陽子線やヘリウムといった「重粒子」を用いた装置である。欧米では、自然放射線の中でのラドンの寄与が大きく、ラドンは呼吸によって肺に入り、体内で α 線を放出し、肺ガンの原因になると言われている。このような事情で欧米では低線量の重粒子線の生物影響の研究が重要視されているが、日本ではラドンによる自然放射線は世界平均の半分以下であり、それ以外の放射線、つまり、X線や γ 線といった光子放射線の作用が相対的に重要になってくる。このような理由で、私たちは、まだほとんど手がつけられていない低線量の光子放射線の生物影響を研究するために、放射光を用いたX線マイクロビーム細胞照射装置を作ることを計画した⁵⁾。

光子放射線のマイクロビーム細胞照射装置は、前述した

Gray Cancer Institute に超軟X線を利用するものがあるが⁶⁾、X線領域のものとしては私たちの装置が世界初である。放射光を用いた同種の研究としては他に Advanced Light Source (ALS) の X-ray Microprobe Beamline (10.3.1) において低線量光子放射線の生物影響に関する実験が行われており、マイクロビームの利用も視野に入れているが、現在のところは100 μm 幅のビームを用いた予備的な実験の段階である⁷⁾。

放射光X線マイクロビーム細胞照射装置は以下の仕様を目指して設計した。

- ビームサイズは1ミクロン程度であること。

細胞を個別に照射できるだけでなく、細胞小器官のレベルで標的を選択できることを目的とする。また、この仕様によって選択するX線のエネルギーも制約を受ける。X線のエネルギーが高くと、生体中にフォトンが吸収されたときに生じる光電子の飛程が長く、せっかくマイクロビームを作ってもその領域外にエネルギー付与が起ってしまう。水中での5 keVの光電子の飛程は0.78 μm 、10 keVでは2.5 μm であるので、5 keV程度が望ましい。

- ビームは試料の下方から垂直方向に照射されること。

実験に用いる試料は動物培養細胞で、通常は培養用のディッシュに培地を入れて培養される。乾燥などの環境変化は細胞の生理的条件を損なうので、再現性良くかつ生物学的に意味のある実験を行うには細胞の生理的条件の変化は避けたい。したがって、ディッシュに培地を満たしたままの状態に細胞を照射できるように、放射光X線ビームはSi(311)面を用いて垂直に反射させ、ディッシュの下から照射する方式を採用した。Si(311)面の反射を用いているので、X線のエネルギーは5.35 keVに限定されることになるが、これは、前述した「光電子の飛程が1ミクロン程度以下」の条件を満たしている。

- 細胞の認識は蛍光顕微鏡像で行うこと。

最も一般的な細胞核を狙った照射では、細胞核を蛍光色素で染色し、その蛍光顕微鏡像を取得することによって細胞の位置を認識することになるが、蛍光色素で染めた細胞に近紫外や可視光を照射すると細胞に損傷を与える可能性があるため、蛍光色素の濃度および励起光の強度はなるべく低く抑える必要がある。そのために高感度のCCDカメラを組み込む。

- 短い時間で多くの細胞を照射できること (ハイスループット)。

細胞の生理的条件を損なわないためには、なるべく短時間で照射を行いたい。そのため、細胞の認識および照射を自動化するような制御用ソフトウェアを開発する。

3. 放射光X線マイクロビーム細胞照射装置

放射光X線マイクロビーム細胞照射装置のシステム図を Fig. 2 に、全体の写真を Fig. 3 に示す。この装置は、(1)マイクロビームを作るための光学系、(2)試料を設置する

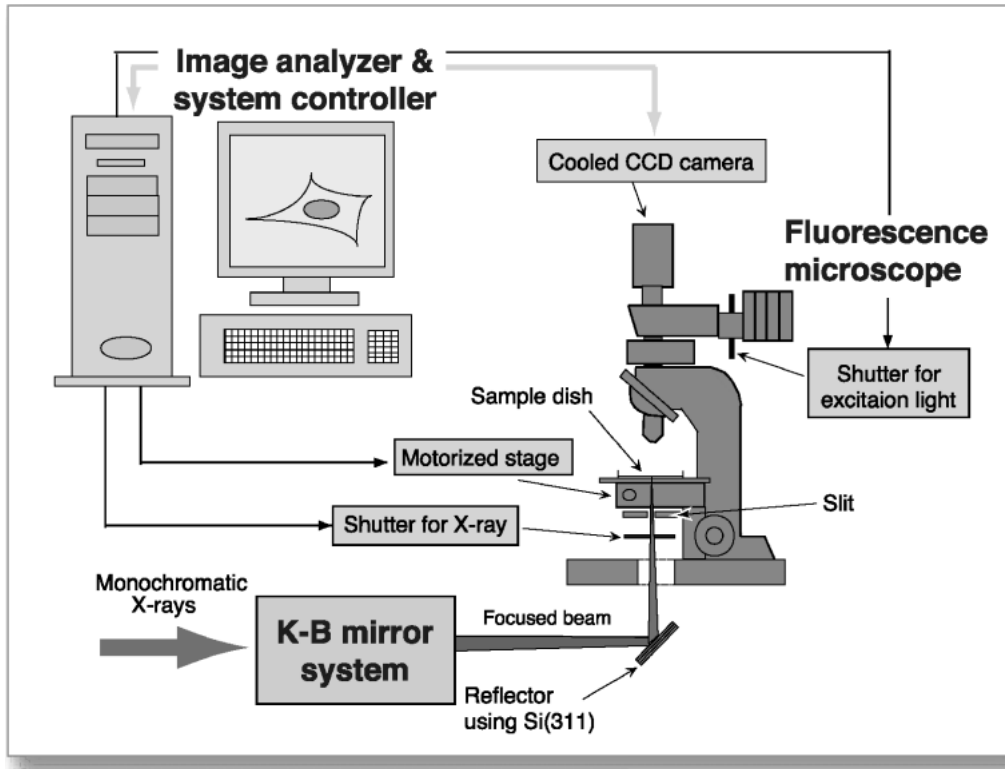


Figure 2. Microbeam irradiation system for radiobiology at the Photon Factory.

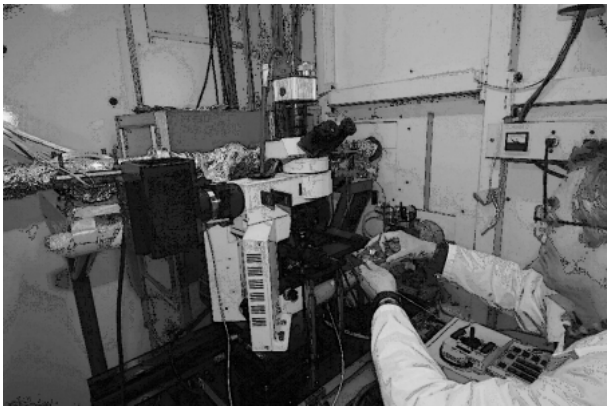


Figure 3. Photograph of the microbeam irradiation system for radiobiology at the Photon Factory, BL-27B.

自動ステージと高感度 CCD カメラを備えた蛍光顕微鏡、(3)自動ステージ、CCD カメラ、X 線シャッター等を制御する制御系、から成り立っている⁸⁾。単色化された放射光 X 線は、数ミクロンサイズに集光された後、蛍光顕微鏡の直下に置いたシリコン結晶で90度真上にはね上げられ、顕微鏡ステージの上に置いた細胞試料に下方から照射される。

3.1 ビームライン

装置を設置するビームラインは、高エネルギー加速器研究機構・放射光科学研究施設（フォトンファクトリー）

BL-27B を選んだ。このビームラインには、動物細胞を培養する設備を備えた生物試料準備室が隣接されているため、細胞の準備や照射後の分析を速やかに行うことができる⁹⁾。光源は偏向電磁石で、4 keV~20 keV の X 線領域の光を使うことができる汎用ステーションであり、主として生物照射実験、XAFS、X 線回折実験に用いられている¹⁰⁾。

3.2 光学系およびスリット

マイクロビームの作成には Kirkpatrick-Baez (K-B) ミラーを採用した。ビームラインの途中に（光源点から 19.84 m 下流位置）直径 20 μm のピンホールを挿入し、疑似光源点とした。疑似光源点から 9.84 m 下流に第一ミラー ($R=167.5\text{ m}$) を置き鉛直方向を集光、その 105 mm 下流の第二ミラー ($R=145.6\text{ m}$) により水平方向を集光している。第二ミラーから集光点までの距離は 0.63 m であり、この間にビームは Si(311) 結晶により真上にはね上げられ、顕微鏡のステージに置かれた試料位置で集光点となるように設計されている。この方式で集光したビームの水平方向を、精密ステージに取り付けたナイフエッジでビームをスキャンして測定したところ、最小で 2 μm 幅のビームを作ることに成功した (Fig. 4)。グラフからわかるように、形成した 2 μm 幅のマイクロビームには数ミクロンのテーリングが見られる。そこで、試料の直前に高精度の四象限スリットを導入し、余分なテーリングはカットできるようにした。

これを執筆している2004年春現在までに行った細胞照

射実験は、K-B ミラー系による集光は用いずに、この高精度スリットでのみマイクロビームを形成して使用している。前述したように BL-27B は汎用ステーションであり、マイクロビーム照射装置はビームタイム毎のセットアップが必要で、強度とビームサイズを犠牲にしても、最適な集光条件を見つけるために必要となるミラー調整の時間を省いたほうがビームタイムを有効に使えるからである。

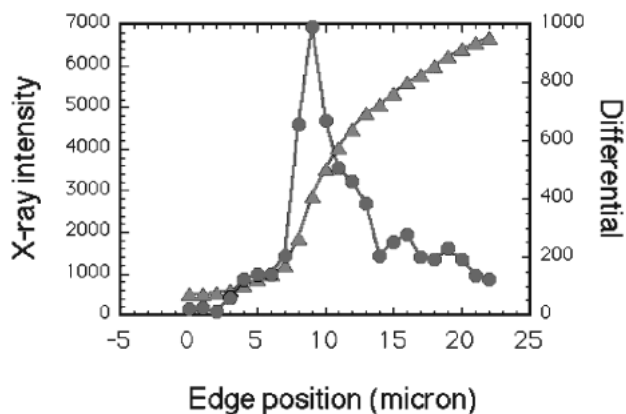


Figure 4. Size of microbeam focused by the K-B mirror system. FWHM is about 2 micrometer.

この方法では放射光 X 線ビームは集光されていないので、光子密度は集光ビームより 1 桁程度低くなるが、調整が簡単なことと、光子密度を変えずにビームの大きさを簡単に変更できるという利点がある。この方法で作成したマイクロビームのサイズは最小 $5 \mu\text{m}$ 角である。

2004 年秋からは集光系も含めたマイクロビーム細胞照射装置は BL-27B ハッチ内に常設されるので、常時集光ビームを使えるようになる予定である。

3.3 蛍光顕微鏡および精密ステージ, CCD カメラ

蛍光顕微鏡は、Olympus 生物顕微鏡 BX51WI をベースとして用いた。この顕微鏡は、通常の顕微鏡がステージを上下に動かしてフォーカスを合わせるのに対し、対物レンズユニットを上下させてフォーカスを合わせるステージ固定式が採用されている。試料を載せる精密ステージは、Prior 社の ProScan 電動ステージ H101 を用いた。これは現在市販されている顕微鏡用電動ステージでは最高精度のものである。直径 $5 \mu\text{m}$ の蛍光マイクロスフィアを固定したディッシュを用いて、(1)マイクロスフィアの位置を記録、(2)ステージを数十 mm 動かし、記録した位置に戻す、(3)位置のずれを測定、という手順でステージの再現性のテストを行ったところ、ずれの平均値は $0.91 \pm 0.48 \mu\text{m}$ であった。これは、1 ミクロンオーダーの標的を狙うにはまだ

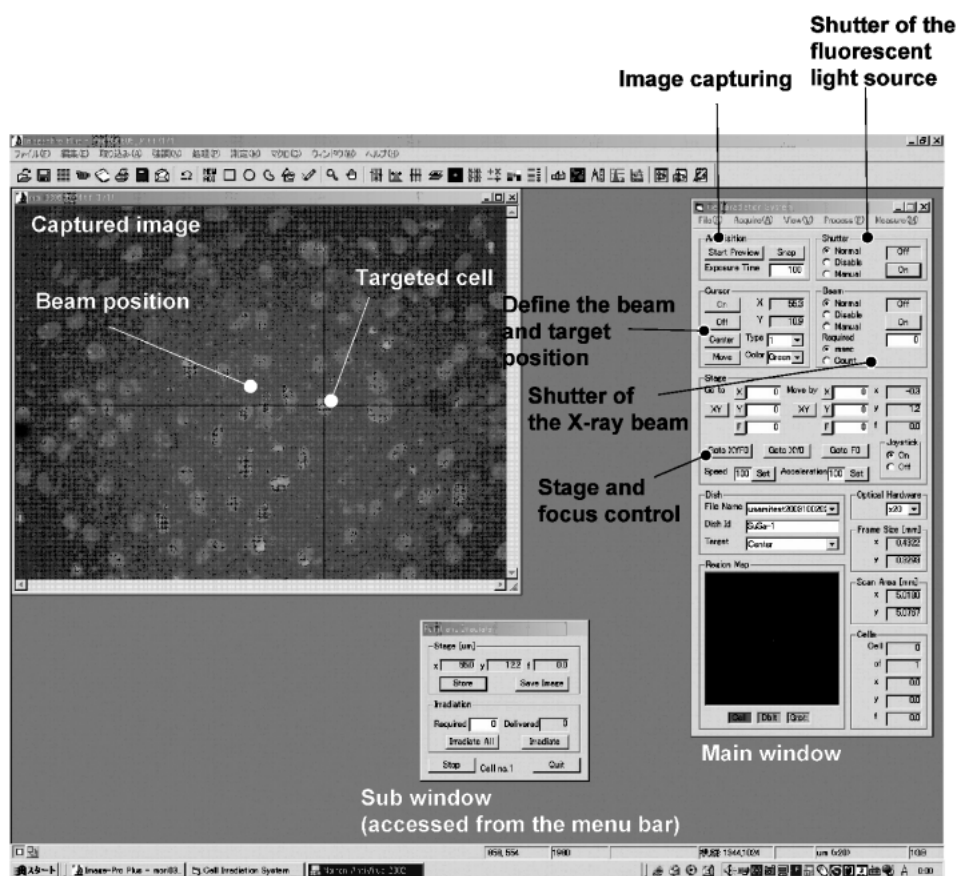


Figure 5. Control software for the microbeam irradiation system. The software can control all of the processes including image-capturing, image analysis, stage movement and X-ray irradiation.

十分な精度とは言えないが、動物培養細胞の核（直径10 μm 程度）を個別に選んで照射するためには十分な精度である。

画像取得のための CCD カメラは、浜松ホトニクス社のデジタル冷却 CCD カメラ ORCA-ER を用いている。1~2 mM の Hoechst33258 で細胞核を染色した場合、通常の露光時間は数10ミリ秒である。励起光は、画像取り込み時のみ照射されるように、次項で説明する制御系によって励起光シャッターと CCD カメラを連動して制御している。

3.4 制御系

照射システム全体の制御は、制御用ソフトウェアを用いて行われる。ソフトウェアは Visual Basic を用いて開発され、CCD カメラによる画像取得および画像処理部分には Media Cybernetics 社の画像処理ソフトウェア Image-Pro Plus を用いている。制御用ソフトウェアのウィンドウを Fig. 5 に示す。

4. 細胞照射実験

4.1 マイクロビーム照射用ディッシュ

細胞試料を載せるディッシュは、底面から X 線マイクロビームが照射できるように、底面が薄膜でできた特殊なディッシュを設計した。精密ステージ上に載せたディッシュの写真およびディッシュの断面図を Fig. 6 に示す。フレームはステンレス製で、2枚のフレームの間に薄膜をはさんで固定する方式になっている。フレームの角の切り欠き部分を精密ステージ上のガイドピンに合わせることで正確に位置決めができるので、分析のためステージか

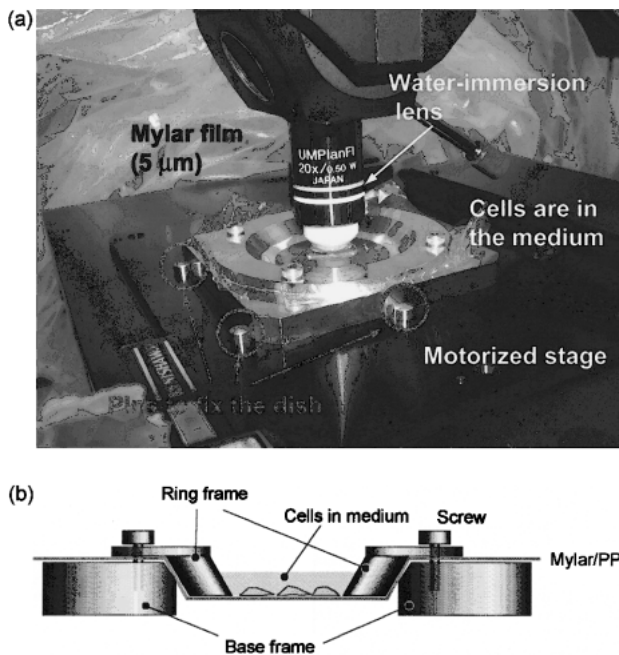


Figure 6. (a) Photograph of the microbeam dish installed on the motorized stage in the microbeam irradiation system. (b) Sectional view of the microbeam dish.

らいったんディッシュを外した後でも細胞を追跡できる。

薄膜を固定した状態のディッシュはオートクレーブにより滅菌することが可能である。細胞はこのディッシュ上で通常の培養方法と同様に培養され、培地を満たしたまま照射することができる。薄膜には現在 Mylar または polypropylene が用いられており、polypropylene の方が薄膜自身のバックグラウンド蛍光が小さく質の良い蛍光像が得られるが、細胞の接着能は Mylar に比べると劣るため、実験によって使い分けている。

4.2 強度測定

現在用いている非集光ビームではフラックス分布が比較的一定であるので、以下の方法で測定を行っている。(1)高精度スリットを調整して310 μm 角のビームを形成する、(2)強度をフォトダイオードで測定、(3)ビームの面積比を乗じてマイクロビームの強度とする。マイクロビームのビーム面積は、照射用ディッシュの底面にシンチレータ板を組み込んだものをステージに取り付けビームの蛍光像を取得し、画像処理ソフトウェア上で面積を計測している。

この方法で測定した非集光マイクロビームの強度は、毎秒 $1.4 \times 10^4 \text{ photons}/(10 \mu\text{m})^2$ であり、これは毎秒0.4 Gy と同等のフルエンスに相当する。

4.3 照射実験の手順

典型的な細胞照射実験の手順を以下に記す。(1)シンチレータを組み込んだディッシュでマイクロビームの蛍光像を取得し、制御用ソフトウェア上でビーム位置を記録する。(2)細胞核を1~2 mM の Hoechst33258 で染色した細胞（を載せたディッシュ）の画像を取得する。(3)照射する目標（現在は細胞核）の位置を記録する。手動で選ぶこともできるし、ある領域を指定し、その中にある細胞核をすべて自動認識することもできる。(4)個々の細胞に照射する線量（X 線シャッター開放時間で制御）を入力すると、記録した位置の細胞すべてにマイクロビーム X 線が照射される。

4.4 γ -H2AX 抗体による DNA 損傷の可視化

実際にマイクロビームが照射された領域に DNA 損傷が生じていることを確かめるため、ヒト繊維芽細胞 (NB1-RGB) にマイクロビームを照射し、生じた DNA 損傷を可視化して観測することを試みた。細胞核内の DNA に二重鎖切断が起こると、核内タンパク質であるヒストン H2AX がリン酸化される。これを利用して、リン酸化ヒストン H2AX を抗原とする抗体 (γ -H2AX 抗体) で標識すると、DNA 損傷 (DNA 二重鎖切断) をその場で検出することができる¹¹⁾。

照射後の細胞は通常の培養条件である37°C、5%CO₂存在下に15分間保持し、H2AX のリン酸化を誘発させた後、メタノールアセトンで固定し、 γ -H2AX 抗体（一次抗体）および FITC 結合二次抗体でリン酸化 H2AX を標識した。また、核の外形を同時に観測するために Propidium Iodide (PI) で二重染色を行い、再度マイクロ

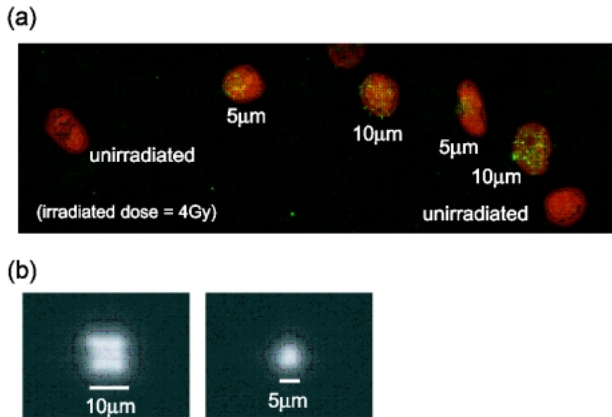


Figure 7. (a) Human fibroblast cells irradiated with X-ray microbeam. Irradiated area in the cell nucleus could be successfully visualized with γ -H2AX immunostaining (green). Nuclei were stained with propidium iodide (red). Difference in size of the stained area can be easily recognized when compared between cells irradiated 5 μ m beam and those irradiated with 10 μ m beam. (b) Size of the microbeam visualized with the scintillator dish. The scale is same as (a).

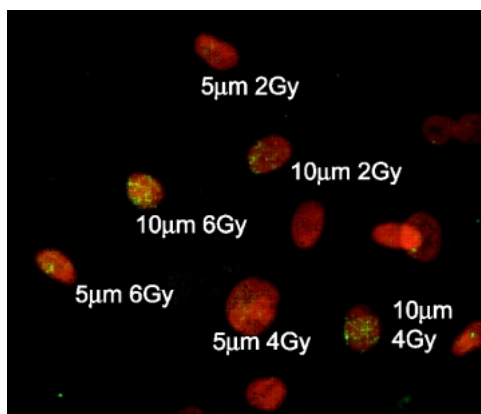


Figure 8. Dose dependence of DNA double strand breaks visualized with γ -H2AX.

ビーム装置にセットして、照射した細胞を観測した。

照射された領域と DNA 損傷が生じる領域に相関があるかどうかを調べるため、ビームサイズをスリットで調整し、10 μ m 角、および 5 μ m 角の 2 種類のマイクロビームを照射した。得られた蛍光顕微鏡像を Fig. 7 に示す。照射したすべての細胞は、照射時に記録された座標で観測され、周りの非照射細胞に比べてリン酸化 H2AX の存在をあらわす緑の蛍光が明らかに多く生じていた。またリン酸化 H2AX はビームサイズにほぼ対応した領域に特異的に誘発され、DNA 二重鎖切断がマイクロビームで照射された領域に集中して生じていることが確認できた。同様な照射を、ビームサイズだけでなく線量も変えて照射した細胞の蛍光顕微鏡像を Fig. 8 に示す。線量に依存してリン酸化 H2AX の量が増加していることがわかる。

5. おわりに

低線量放射線の生物影響研究のために開発された放射光 X 線マイクロビーム照射装置について、装置を設計・製作し、細胞照射実験を行いながら少しずつ改良していくことによって、ほぼ設計性能を達成するところまで到達することができた。今後は、個々の細胞で起こる微小な変化を感度良く検出できる系を用いて、低線量放射線の生物影響のメカニズムに少しでも迫れるような研究を進めていきたい。また、この装置は共同利用実験に公開されているので、いろいろなアイデアを持った方に使っていただき、良い成果をあげてもらいたいと思っている。

謝辞

放射光 X 線マイクロビーム細胞照射装置の開発にあたっては、英国 Gray Cancer Institute の Barry D. Michael 教授のグループに感謝します。宇佐美は 1997 年～1998 年に文部省在外研究員として滞在する機会を得て粒子線マイクロビーム照射装置を用いた細胞照射実験を体験し、小林は 2002 年の訪問で、システム全体や制御ソフトウェアに関する貴重な情報をいただきました。これらの情報や経験が私たちの装置の基本となっています。

また、免疫染色に関しては、奈良県立医科大学の森俊雄助教授、放射線医学総合研究所の江口-笠井清美博士に多くの技術的指導をいただきました。

この研究は、徳島大学の前澤博教授、立教大学の檜枝光太郎教授、国際基督教大学の高倉かほる準教授、榊林創研の林徹氏との共同プロジェクトです。

装置の製作は科学研究費補助金基盤 (A) (14208069) の援助を得ておこなわれました。

参考文献

- 1) H. Nagasawa and J. B. Little: *Cancer Res.* **52**, 6394 (1992).
- 2) M. Folkard, B. Vojnovic, K. M. Prise, A. G. Bowey, R. J. Locke, G. Schettino and B. D. Michael: *Int. J. Radiat. Biol.* **72**, 375 (1997).
- 3) M. Folkard, B. Vojnovic, K. J. Hollis, A. G. Bowey, S. J. Watts, G. Schettino, K. M. Prise and B. D. Michael: *Int. J. Radiat. Biol.* **72**, 387 (1997).
- 4) G. Randers-Pehrson, C.R. Geard, G. Johnson, C. D. Elliston and D. J. Brenner: *Radiat. Res.* **156**, 210 (2001).
- 5) K. Kobayashi, N. Usami, K. Hieda, K. Takakura, H. Maezawa and T. Hayashi: *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A* **467-8**, 1329 (2001).
- 6) M. Folkard, G. Schettino, B. Vojnovic, S. Gilchrist, A. G. Michette, S. J. Pfauntsch, K. M. Prise and B. D. Michael: *Radiat. Res.* **156**, 796 (2001).
- 7) E. A. Blakely, K. A. Bjornstad, P. Y. Chang, C. J. Rosen, D. Sudar, R. I. Schwarz and A. C. Thompson: *Advanced Light Source Compendium of User Abstracts* <http://www-als.lbl.gov/als/compendium/> (2002).
- 8) K. Kobayashi, N. Usami, H. Maezawa, T. Hayashi, K. Hieda and K. Takakura: *Congress Series* **1258**, 207 (2003).
- 9) K. Kobayashi: *Proc. of International School of Physics 'Enrico Fermi' Course CXXVIII*, IOS Press, 333 (1996).

- 10) H. Konishi, A. Yokoya, H. Shiwaku, H. Motohashi, T. Maki-
ta, Y. Kashihara, S. Hashimoto, T. Harami, T.A. Sasaki, H.
Maeta, H. Ohno, H. Maezawa, S. Asaoka, N. Kanaya, K. Ito,
N. Usami and K. Kobayashi: *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res.*
A **372**, 322 (1996).
- 11) E. P. Rogakou, C. Boon, C. Redon and W. M. Bonner: *J. Cell.*
Biol. **146**, 905 (1999).

著者紹介



宇佐美徳子
高エネルギー加速器研究機構・物質構造
科学研究所・助手
E-mail: noriko.usami@kek.jp
専門：放射線生物学

略歴：

1991年 高エネルギー物理学研究所 放射光実験施設
(現 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科
学研究所 放射光科学研究施設) 助手 現在に
至る



小林克己
高エネルギー加速器研究機構・物質構
造科学研究所・助教授
E-mail: katsumi.kobayashi@kek.jp
専門：放射線生物物理

略歴：

1978年 筑波大学生物科学系 常勤講師
1986年 高エネルギー物理学研究所 放射光実験施設
(現 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科
学研究所 放射光科学研究施設) 助教授 現在
に至る

Development of photon microbeam irradiation system for low-dose radiobiology

Noriko USAMI Photon Factory, High Energy Accelerator Research Organization (KEK),
Oho, Tsukuba 305-0801, JAPAN
Katsumi KOBAYASHI Photon Factory, High Energy Accelerator Research Organization (KEK),
Oho, Tsukuba 305-0801, JAPAN

Abstract

Risk evaluation of low dose irradiation has been great concern for human societies utilizing modern technologies. We have succeeded in developing an X-ray microbeam irradiation system using synchrotron radiation, by which we can recognize cells individually and irradiate one by one with desired dose of monochromatic X-rays. For the performance test of the system, especially accuracy and repeatability of the positioning, the cell irradiation experiments were performed. Irradiated area in the nucleus of human fibroblast cell could be successfully visualized with gamma-H2AX immunostaining.