

## 三次元培養ラット乳腺細胞コロニーへの X 線マイクロビーム照射 及びその動態追跡

### Observation system of cell dynamics of three-dimensional cultured rat mammary cell colonies irradiated with an X-ray microbeam

西村由希子<sup>1</sup>, 神長輝一<sup>1</sup>, 宇佐美徳子<sup>2</sup>, 横谷明德<sup>1</sup>, 今岡達彦<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>量子科学技術研究開発機構〒263-8555 千葉県稲毛区 4-9-1

<sup>2</sup>高エネルギー加速器研究機構〒305-0801 つくば市大穂 1-1

Yukiko NISHIMURA<sup>1</sup>, Kiichi KAMINAGA<sup>1</sup>, Noriko USAMI<sup>2</sup>

Akinari YOKOYA<sup>1</sup> and Tatsuhiko IMAOKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Quantum and Radiological Science and Technology  
4-9-1 Anagawa Inage-ku Chiba 263-8555 Japan

<sup>2</sup>Photon Factory, IMSS, KEK 1-1 Oho Tsukuba 305-0801 Japan

#### 1 はじめに

東京電力福島第一原子力発電所事故以降、低線量被ばくの生体影響の解明が社会から求められている。しかし低線量率被ばくの発がんリスクについては疫学データの精度が高くなく、放射線健康影響に関する重要な課題である。

低線量放射線が細胞に与える影響としてバイスタンダー効果（照射された細胞だけでなく、周囲の細胞にも同様な影響が現れる現象）[1]や、細胞競合（異常な細胞、また適応性の低い細胞が正常な細胞集団から排除される現象）[2]が今注目を集めている。被ばくの線量がある程度以上高い場合、照射野のほとんど全ての細胞が放射線の影響を受けるが、低線量域では影響を受ける細胞は全体のごく一部である。

以上の理由により、ターゲットとなる細胞のみに照射することができるマイクロビームは、低線量率に近い効果であると考えられ、前記した現象を研究する為の有用なツールとなる可能性がある。ラットに低線量率のγ線を照射すると、高線量率と比べて発がんの頻度が低下することが知られている[3]。そこで我々は2017年から三次元培養したラット乳腺細胞コロニーを用いた X 線マイクロビーム照射実験を行ってきた。

#### 2 実験

蛍光タンパク（GFP、DsRed）発現ラットから単離した乳腺細胞を 1:500 の割合で混合し、少数の GFP 発現細胞と、多数の DsRed 発現細胞の混ざった三次元コロニーを作製した。BL-27B 生物ステーションの X 線マイクロビーム照射装置にディッシュを設置し、倍率 100X で観察しながら、ターゲットである GFP 細胞（図 1）に 1Gy または 10Gy を照射した。CO<sub>2</sub> インキュベーターを付属した共焦点蛍光顕微鏡システムを用いて、照射直後から、1~3 時間の間隔で最大 144 時間までタイムラプス撮影を行った。

Z 軸方向にステップサイズ 30μm でスタック画像を取得し、コロニー内のターゲット細胞を追跡して観察した。（コロニーの直径は 200~300μm）

#### 3 結果および考察

照射したコロニー、またコロニー内の GFP 細胞を追跡してタイムラプス撮影した結果、照射された細胞がコロニー内で移動しながら生存している様子が観察できた（図 2）。

タイムラプス撮影時間の間隔を 1 時間とし、培養ウェル内の 10 視野以上のコロニーを撮影した場合、照射・非照射に関わらず GFP 細胞が消滅していく様子が観察された。励起光による光毒性が疑われたため、撮影間隔を 3 時間、12 時間に延長したところ、どちらの場合でも、GFP 細胞の消滅は見られなくなった。そこで、撮影間隔は 3 時間以上とすることにした。

また、時間の経過と共にコロニーがディッシュ内で移動し、撮影範囲から外れてしまい、移動したコロニー同士が接触して合体するという課題が見つかった。コロニーを形成する細胞は常にコロニー内を上下左右に動いているため、ステップサイズが 30μm だと取得した画像中に細胞が写らないこともあり、Z 軸方向のスタック撮影のステップサイズの検討が必要であることが分かった。

#### 4 まとめ

三次元培養したラット乳腺細胞コロニーへの X 線マイクロビーム照射実験において、ターゲットとなった細胞を長時間追跡して観察・撮影することができた。今後は照射されたコロニー、ターゲット細胞の解析をすすめることで細胞競合現象の研究へと繋げたい。

参考文献

- [1] S.G. Sawant *et al.*, *Radiat. Res.* **155**, 397-401 (2001).
- [2] O. Niwa *et al.*, *Ann. ICRP.* **44**, 7-357 (2015).
- [3] T. Imaoka *et al.* *Radiat. Res.* **191**, 245-254 (2019).

- 2. Imaoka et al. 44th European Radiation Research Congress (ERRS44), August 2018, Pécs, Hungary
- 3. 今岡達彦ほか. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018 年 9 月. 大阪.

成果

- 1. 西村由希子ほか. 日本放射線影響学会第 60 回大会. 2017 年 10 月. 千葉.

\* imaoka.tatsuhiko@qst.go.jp

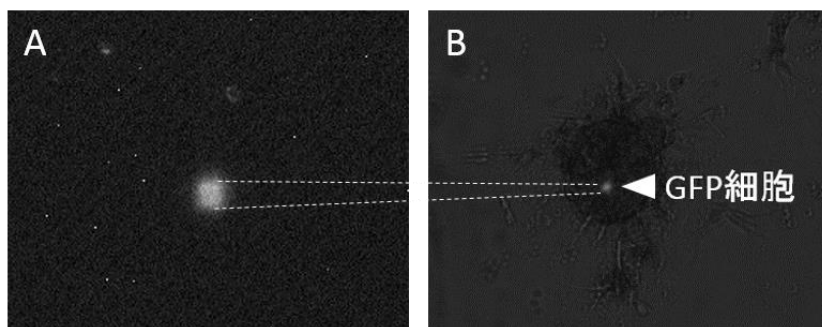


図 1 : BL-27B の照射画像 A は実際の X 線マイクロビームを蛍光板に照射した像 (ビームサイズは  $10 \times 10 \mu\text{m}$ )、B は GFP 発現細胞のみを用いて照射した際の制御 PC 上のターゲティング画面で確認した GFP 発現細胞 (矢印)。

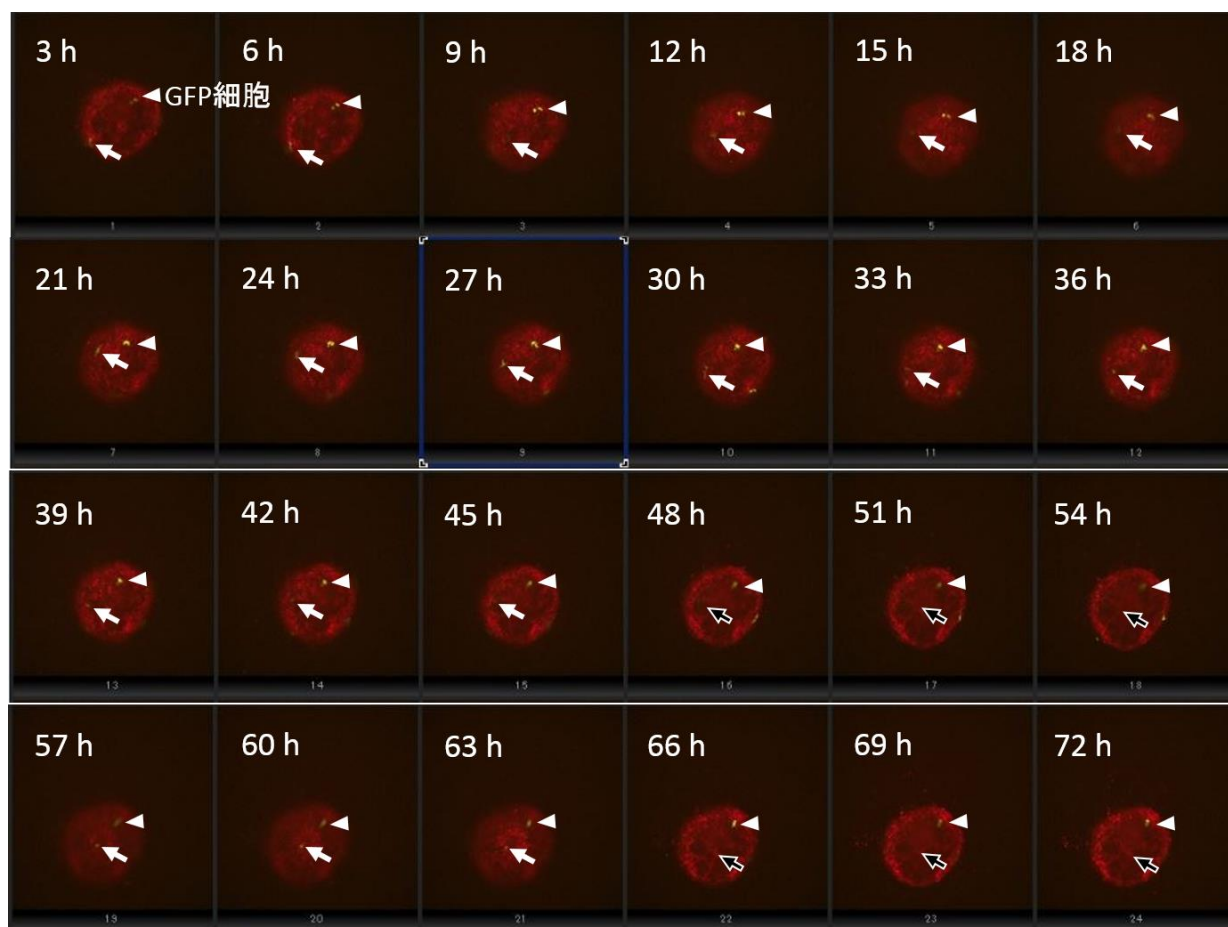


図 2 : タイムラプス撮影画像の例。左上から右方へ、3 時間ごとに 72 時間後まで。ステップサイズが  $30 \mu\text{m}$  だと取得した画像中に細胞が写らない場合がある (黒矢印)。