

二次元培養ラット乳腺細胞への X 線マイクロビーム照射
 におけるビーム位置補正法の開発
 Beam position adjustment required in X-ray microbeam irradiation of two-
 dimensional cultured rat mammary gland cells

西村由希子^{1,2}, 神長輝一², 宇佐美德子³, 横谷明德², 今岡達彦²

¹公益財団法人環境科学技術研究所〒033-033 青森県上北郡六ヶ所村大字尾駮字家ノ前 1-7

²量子科学技術研究開発機構〒263-8555 千葉市稲毛区穴川 4-9-1

³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^{1,2}, Kiichi KAMINAGA², Noriko USAMI³

Akinari YOKOYA² and Tatsuhiko IMAOKA²

¹Institute for Environmental Sciences

1-7 Ienomae Obuchi, Rokkasho-mura, Kamikita-gun, Aomori 039-3212, Japan

²National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

4-9-1 Anagawa Inage-ku, Chiba 263-8555, Japan

³Photon 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、上記の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進めている。この実験では、照射後の効率的なタイムラプス撮影を可能とするために、マイクロビーム実験で一般的なマイラフィルム上の培養ではなく、ガラスボトムディッシュを用いた照射を行うこととした。この際、ターゲット細胞までの距離によってビーム位置にずれが起こっていることが、免疫染色の結果から分かった。Si 結晶を用いて光軸を水平から鉛直へとビームを跳ね上げる際の角度と、培養容器の高さの違いで生じる照射位置のずれについて、今回新たに得た情報と進捗について報告したい。

2 実験

2 種類のトランスジェニックラットから単離した、蛍光タンパクである GFP 及び DsRed を発現するそれぞれの乳腺細胞を 1:800~1:1000 の割合で混合し、多数の DsRed 発現細胞の中に少数の GFP 発現細胞が混ざった状態で二次元培養を行った。

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高さ 10.8 mm の培養ディッシュを下向きに設置し（図 1 右）、倍率 100×で観察しながら、ターゲットである GFP 細胞にそれぞれ 0、0.3、0.6、1、2、6、10 Gy を照射した。（マイクロビームのサイズ：50×50μm）

照射後 30 分でホルマリン固定を行い、PBS で洗浄後に 0.1% Triton-X100・1%ウシ胎仔血清含有リン酸緩衝生理食塩水で細胞膜透過処理を行った後、DNA 二重鎖切断マーカーである γH2AX の蛍光免疫染色をすることで、マイクロビームがターゲット細胞に正確に照射されているかの検証を実施した。

3 結果および考察

ビーム位置の調整を顕微鏡ステージの高さで行ってから照射した場合、照射ターゲットである GFP 細胞から約 30~100μm 離れた位置の周辺細胞に γH2AX が発現していることが分かった。（図 2）

照射位置にずれがあった理由として、①ビームのサイズを調節する際に用いるシンチレータと、実際に照射に用いるディッシュの高さに 10.8 mm の差があること、②オフライン顕微鏡とオンライン装置の座標を合わせる原点のキャリブレーションが正しくされていないことが考えられた。

①ビームは、図1のように、非対称カット結晶(Si 311)によるブラッグ反射で鉛直に跳ね上げた時に最大強度になるように上流の分光器を調節している。このため光軸に平行な方向におけるビームのずれは考えにくい。しかし、図1右の紙面に対して垂直の方向（光軸に対して横方向）に結晶からの反射ビームの軸がずれている可能性があった。図1左は実際の照射装置である。ビームの位置を記録する際に用いるシンチレータは図1-Aの位置にセットするが、サンプルはそれより高い図1-Bの位置にセットする。この時、記録されたビーム調節位置とターゲット位置との間に10.8 mmの高さの差があり、これが観察されたずれを生じさせた可能性がある。

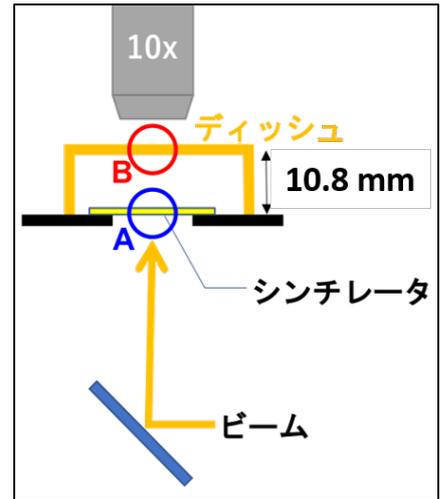


図1：シンチレータとディッシュの設置位置

②ディッシュ内のターゲット細胞をオフライン顕微鏡下で座標を記録し、オンライン装置で座標を入力して目的の位置へ自動で移動し、照射を行なっている。その際オフラインとオンラインの原点を正確にキャリブレーションされていない場合、50 μ mの微細なビームサイズには影響が現れる可能性がある。

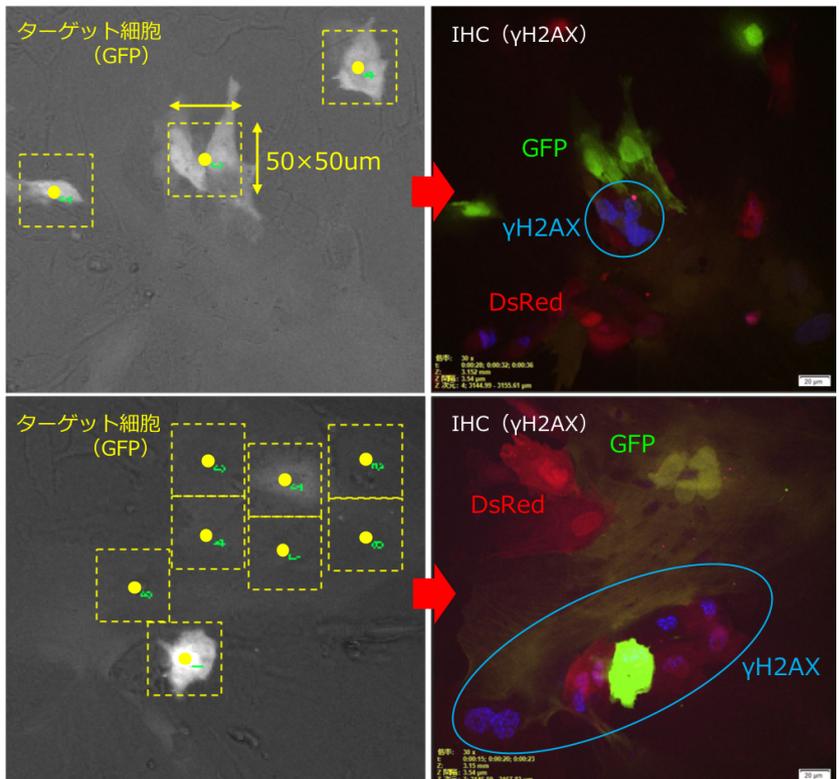


図2：黄色の点を中心に50 \times 50 μ mのマイクロビームを照射したGFP発現細胞（緑色）から、わずかに離れた周辺細胞に γ H2AXの発現（青色）が見られる。

①によるずれを検証し補正する手段として、図1-Bの位置にシンチレータを設置してビーム位置の確認及び記録を行うことが有効であると考えられる。そこで、培養ディッシュの底面をくりぬいてシンチレータを設置した道具を作製して、簡便なビーム位置の検証・補正が行えるようにした。

4 展望

2021年度の実験ではビームサイズの調節を行うシンチレータと、実際に照射するディッシュの高さを合わせることで、照射位置の距離の差によるビームのずれを防ぐ。またオフライン顕微鏡とオンライン装置の原点のキャリブレーションを正確に行い、目的の細胞に確実に照射できるよう調整する。

謝辞

本研究は基盤研究(C) (JP19K12334) の助成を受けた。

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).

* imaoka.tatsuhiko@gst.go.jp