

## 蛍光標識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-dimensionally cultured rat mammary cells expressing fluorescent proteins

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 千葉県稲毛区穴川 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 Institutes for Quantum 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、低線量被ばくが生体に及ぼす影響の解明が社会から求められている。放射線健康影響は重要な課題であるにも関わらず、低線量率被ばくの発がんリスクについての疫学データは精度が高くない。また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一方で、低線量域では影響を受ける細胞は全体のごく一部であり、その影響はまだはっきりと解明されていない。現在は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]が注目を集めている。

ターゲット細胞にのみ照射することができるマイクロビームは、低線量率照射に近い状態を再現できる照射法であると考えられ、上記の現象を研究する為の有用なツールとなり得る。乳腺は放射線感受性が高いことが知られており、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分かっている[3]。そこで我々は2017年から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。またこの実験では、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に行われる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っている。

これまでの実験では照射位置のずれが起き、ターゲット細胞が正確に照射されていないことが分かっていた。前年度はビームを跳ね上げる際の Si 結晶の角度や、培養容器の高さの違いについて検証したが、今回新たに培養容器を設置するアタッチメントについての情報と進捗を得たので報告したい。

#### 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 もしくは DsRed の一方を発現する乳腺細胞を 1:800~1:2000 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。

検討① 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た(図1)。このときディッシュを設置するためのアタッチメントを用いた場合(図2)と、アタッチメントを用いず直接台座に両面テープで固定した場合(図3)を比較した。設置したディッシュを倍率 100×で観察しながら、ターゲットである GFP 細胞に 4 Gy を照射した。(マイクロビームのサイズ: 50×50μm)

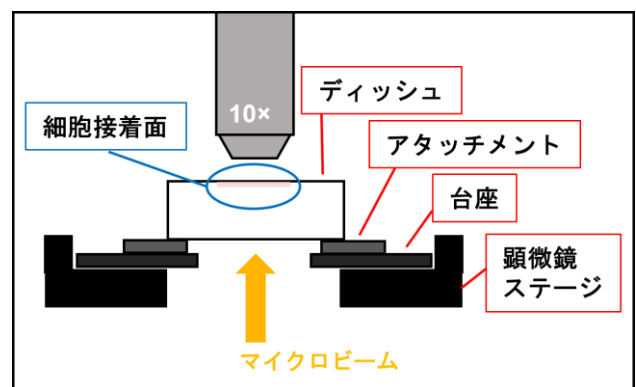


図 1: 台座にアタッチメントをセットした場合の照射の状況

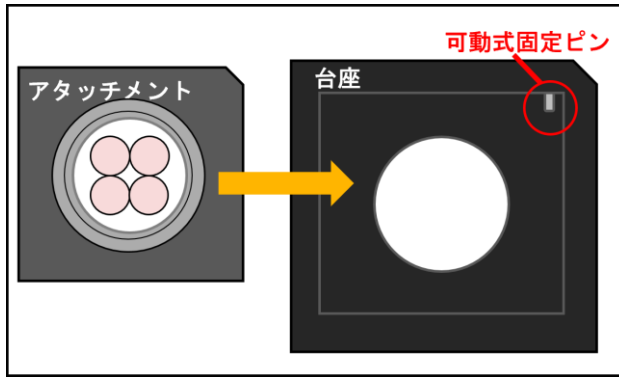


図2：アタッチメントにディッシュをセットし、台座に設置する。

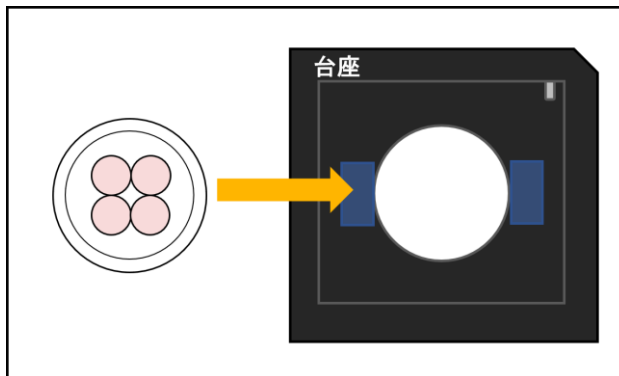


図3：両面テープを用い、直接ディッシュを台座に設置する。

照射位置のずれを検証するため、4ウェルディッシュを用い、細胞を培養する面に X 線で感光するフィルム（ガフクロミックフィルム Ashland 社製）を貼り付けて  $100 \times 200 \mu\text{m}$  のマイクロビームを照射した。ステージ座標 0.0 を中心として 60 秒照射し、X 軸方向または Y 軸方向に  $1000 \mu\text{m}$  移動後、再び座標 0.0 に戻って 30 秒照射した後、ビーム位置を感光画像上で確認をすることで、ステージの移動がビーム位置のずれに関係しているかどうかを検証した。

検討② 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  $\gamma\text{H2AX}$  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のみ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

#### 検討①

ディッシュを設置する際にアタッチメントを使用して照射した場合、中心に照射後 X 軸方向に  $+1000 \mu\text{m}$  または  $-1000 \mu\text{m}$  移動してから再び中心に戻った際、図4のように照射位置が XY 軸方向におおよそ  $50\text{-}100 \mu\text{m}$  ずれるが、Y 軸方向に  $+1000 \mu\text{m}$  また

は  $-1000 \mu\text{m}$  移動してから再び中心に戻った際には照射位置がずれないことが分かった。

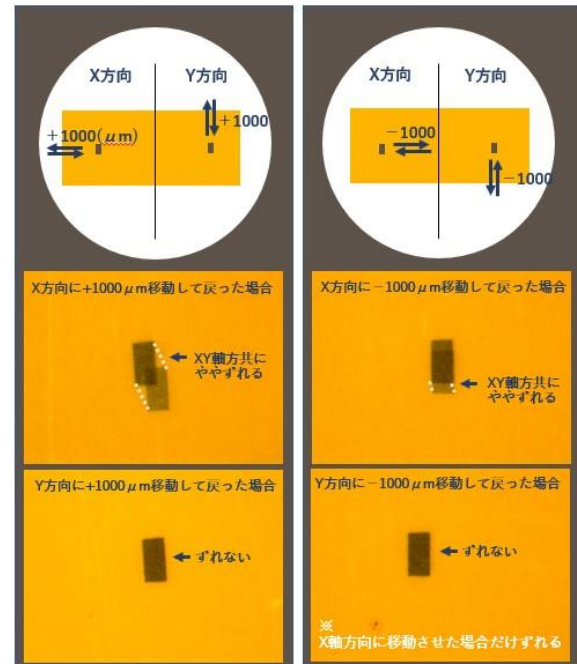


図4：原点から X 軸方向に移動して原点に戻った場合は位置がずれるが、Y 軸方向に移動して戻った場合は位置がずれない。

ディッシュを設置する際にアタッチメントを使用せず、ディッシュを直接台座に固定して照射した場合、同様に中心に照射後 X 軸方向に  $+1000 \mu\text{m}$  または  $-1000 \mu\text{m}$  移動してから再び中心に戻った際、また Y 軸方向に  $+1000 \mu\text{m}$  または  $-1000 \mu\text{m}$  移動してから再び中心に戻った際にも、図5のように照射位置はずれなかった。



図5：原点から X 軸方向または Y 軸方向に移動して戻っても、位置はずれない。

①の検証結果から、アタッチメントのディッシュを固定する可動性のピンが、X 軸方向に顕微鏡ステージを動かした時にだけややずれていることが考えられた。アタッチメントを使用せず、台座に直接ディッシュを設置することで、照射位置のずれがなくなった。

#### 検討②

アタッチメントを使用せず、直接台座にディッシュを設置してターゲット細胞にマイクロビームを照射した場合、 $\gamma$ H2AX の発現は照射した細胞にのみ見られた (図6)。

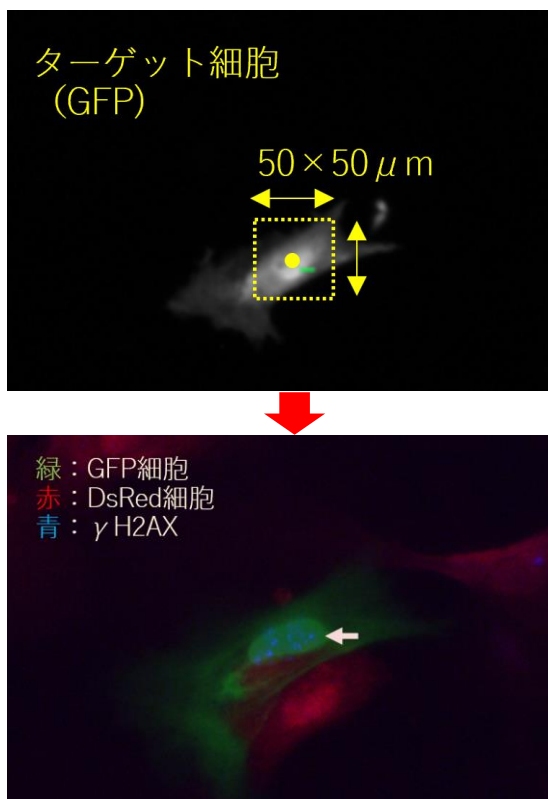


図6：(上) 黄色の点を中心に  $50 \times 50 \mu\text{m}$  のマイクロビームを照射した GFP 細胞 (白色)。  
(下) 照射された GFP 細胞 (緑色) にのみ  $\gamma$

H2AX の発現 (青色) が見られ、隣り合った DsRed 細胞には  $\gamma$ H2AX が見られない。

#### 4 展望

2022 年度の実験では、これまでの検証を元に細胞集団の中のターゲット細胞に正確にマイクロビーム照射を行い、その動態をタイムラプス撮影にて観察する。

#### 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](mailto:imaoka.tatsuhiko@gst.go.jp)