

放射光 X 線マイクロビームを用いた細胞核限定照射による細胞致死効果

清野 晃平 (筑波大学 生物学類)

指導教員：伊藤 希 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

2011年3月11日、東北地方太平洋沖地震が発生し、それに伴う福島第一原子力発電所の事故に起因する放射性物質による環境汚染が起きた。そこで問題になったのが、セシウム 137 によるガンマ線の低線量(率)放射線被ばくの生物影響である。しかしながら、ガンマ線や X 線などの電磁波放射線のような比較的低い線エネルギー付与(Linear Energy Transfer: LET)の放射線に対する低線量生物影響についての研究は、未知の部分が多い。

そこで本研究では、低 LET かつ低線量の放射線の生物影響を調べるために、放射光 X 線マイクロビームの細胞核限定照射と X 線の細胞全体への照射を行い、細胞致死効果を調べた。

材料と方法

X 線を照射する細胞として NB1RGB(理化学研究所細胞材料開発室より購入したヒト新生児皮膚繊維芽細胞、細胞番号 RCB0222)を培養した(37°C、5%炭酸ガス培養器内)ものを用いた。培地は超純水 9L に対して、イーグル minimum essential medium (MEM)培地「ニッスイ」① 84.6 g、NaHCO₃ 9.9 g、L-glutamine 2.63 g を入れたものをフィルター滅菌し、450 ml に分注したものに牛胎児血清(HyClone Lot.No.KTE31760)を 50 ml を加えたものを使用した。

放射光 X 線マイクロビームの細胞核限定照射

細胞を照射用ディッシュのマイラーフィルム上に1000個プレーティングした。その際、細胞濃度を 200000 個/ml にした細胞懸濁液から 5 μ l をマイクロピペットで取り、照射用ディッシュの中央に静かに滴下し、培地が半球状になるようにした。この状態で培養し、細胞がマイラーフィルムに接着したのを確認後、培地を 2 ml 加えて、8~25 時間培養した。照射前にヘキスト 33342(1 μ l)を加え、染色した。ヘキスト 33342 を加えた 20 分後、培地を 2.5 ml 追加で加えた。コントロールは使用する照射用ディッシュを減らすためにひとつの照射用ディッシュに半球状の培地を作れるだけ作った(20~28 個)。

高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設(Photon Factory : PF) BL27B のシリコン結晶分光器とスリットでエネルギー 5.35 keV、サイズ 10 μ m \times 10 μ m のビームを作製し照射に用いた。照射用ディッシュをビームラインの蛍光顕微鏡にセットして細胞核蛍光画像を取得し、細胞核に照射線量 25 R(レントゲン)と 60 R の 2 種類の線量で照射した。それぞれどちらも照射用ディッシュ 33 枚分を行った。

照射後、培地をマイクロピペットで吸引除去し、2 ml の Phosphate buffered saline (PBS) で 1 回洗った後、1 ml のトリプシンを加えてすぐに除去した。トリプシン除去後、1 分放置し細胞とマイラーフィルムの接着を弱めた。その後、細胞を培地で何度も洗い流すようにはがした。

はがした細胞は、直径 10 cm の組織培養用ディッシュ(P100)に指定数播き、約 2 週間培養した。その後、P100 ディッシュ内の細胞のコロニー数をカウントし、コントロールの細胞のコロニー数をもとに生存率を求めた。コロニーは 50 個以上の細胞が密集しているもののみを生細胞としてカウントした。

X 線の細胞全体への照射

細胞を 25 cm² フラスコで細胞がフラスコの底面を埋め尽くすまで培養した。

X 線照射装置で管電圧を 50 kV に設定し、細胞をフラスコに入れたまま、フラスコごとに照射する線量を変えて、照射した。

照射後、培地を吸引ポンプで吸引除去し、3 ml の PBS で 2 回洗った後、2 ml のトリプシンを加えてすぐに除去した。トリプシン除去後、細胞とフラスコの底面の接着が弱まるまで待ち、よくピッペッティングして細胞をはがした。

はがした細胞は P100 ディッシュに、ディッシュあたり 50~60 個のコロニーが生じる様に播き、約 2 週間培養した。その後、P100 ディッシュ内の細胞のコロニー数をカウントし、コントロールの細胞のコロニー数をもとに生存率を求めた。コロニーは 50 個以上の細胞が密集しているもののみを生細胞としてカウントした。

結果と考察

放射光 X 線マイクロビームの核限定照射の結果、25 R 照射したものの平均生存率は 0.45、60 R 照射したものは 0.45 となり、線量によって生存率が変わらない結果となった。

現在、1 Gy 以下の低線量での X 線の細胞全体への照射や、マイクロビームの線量の Gy への変換などを行っている。

詳細な結果や考察は発表会にて報告する。

今後の展望

使用施設の関係上、十分な回数の実験を行えていないため、今後もこの実験を継続していく。

本研究では細胞致死で放射線の生物影響を調べたが、将来的には細胞レベルの影響以外にも、分子レベルや組織レベルでの放射線の生物影響も研究し、低線量放射線の生物影響を解明していきたい。

謝辞

本研究に際して、ご指導を頂いた大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所 放射光化学研究施設 放射光科学第二研究系講師 宇佐美徳子博士と国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部 上席研究員 鈴木雅雄博士のお二方に深く感謝の意を表す。