

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字	ISHII KEIZO					
①研究代表者氏名	石井 慶造			②所属研究機関・部局・職	東北大学・大学院工学研究科・教授	
③研究課題名	和文	細胞内を高速・高空間分解能で立体観察できる3次元ミクロンCTの開発				
	英文	Development of 3D micron-CT to observe the interior of cells with high space resolving power and high-speed photograph				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	43,200	19,100	7,200	14,500	0	84,000
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
石井 慶造	東北大学・大学院工学研究科・教授	放射線場評価学	研究の統括、マイクロビーム形成装置の開発、マイクロPIXEカメラの開発			
山崎 浩道	東北大学・大学院工学研究科・助教授	放射線場評価学	マイクロビーム形成装置の開発、ターゲットの検討			
松山 成男	東北大学・大学院工学研究科・助手	放射線場評価学	マイクロビーム形成装置の開発、マイクロPIXEカメラの開発			
菊池 洋平	東北大学・大学院工学研究科・助手	放射線場評価学	X線CCDカメラの性能評価			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>20世紀の後半より、クローン技術、遺伝子治療など細胞を直接に操作する技術が発達しており、これまで不治の病といわれた難病の治療に大きく前進しています。しかし、これらの技術においては、細胞自身が本質的にもつ性質、ウイルスおよびバクテリアの適合性などにより、その適用には制限があります。これに対して、粒子ビームは細胞内の核、ミトコンドリアなどの器官を自由に選択して、それを直接に精密に加工することが可能です。実際、重イオンを加速し、ミクロン径まで絞り、重粒子1個を細胞に照射するシングルイオンヒット技術が現在開発されています。しかし、細胞を生きたまま観察する装置としては位相差光学顕微鏡、X線顕微鏡などあるが画像は平面的であり、イオンを細胞のどこにどう正確に当てるかはできません。</p> <p>そこで、本研究ではマイクロ粒子ビーム照射による点X線源を用いた3次元ミクロンCTの基礎開発を行ないます。このために、1) マイクロ粒子ビームの形成と性能評価、2) マイクロ粒子ビームによるスパイラルターゲット走査技術の開発、3) 3次元ミクロンCTにおける画像再構成および動画像化の開発、4) 3次元ミクロンCTのシステムの製作、5) 生きた状態の細胞を納入できる3次元ミクロンCT用マイクロチューブの開発、6) 3次元ミクロンCTの性能を評価し、超高空間分解能化、シングルイオンヒット技術との組み合わせ、さらに本システムの実用化への検討を行ないます。その特徴は以下の通りです。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 細胞が観察中に被曝によって死なない。→数百 eV から数 keV の粒子線励起特性 K-X 線を用いる。 2) 高速撮影ができる。→粒子ビームのスパイラル走査による点 X 線源の3次元高速移動。 3) 高空間分解能。→マイクロビームと X 線 CCD カメラにより、1μm の空間分解能を実現。 4) 立体画像。→コーンビームスキャンにより、3次元画像が取得できる。 5) 画像が鮮明→粒子線ビームなので、制動放射 X 線が非常に小さく、単色に近い X 線が利用。 6) 元素分布濃度の画像化ができる。→含有元素の K 吸収端の利用。 						

⑦研究成果の概要（研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。）

本研究では、先ず、マイクロCTの点X線源となるマイクロビーム形成システムを日本原子力研究開発機構のTIARAグループの協力の下に開発した。本装置は、東北大学大学院工学研究科の高速中性子実験施設のダイナミトン加速器に接続された。図1にその概観図を示す。マイクロビーム形成のための強収束レンズとして、地元企業のトーキンマシナリー株式会社と共同で二連四重極電磁石を特別に開発した。本装置の性能として、陽子3 MeVでビームスポットサイズ $1\ \mu\text{m}$ 以下、ビームカレント40 pA以上、焦点深度100 μm の世界水準の性能が、低価格で製作できた。（発表論文8）。



図1 東北大学マイクロビーム形成システム

このマイクロビーム形成システムを用いて、細胞内の元素分布を測ることができるマイクロPIXEカメラを開発した。本研究では、マイクロPIXEカメラのマイクロビーム走査機能をマイクロCTに応用する。図2に、3 MeV陽子ビームで撮れたウシの血管内皮細胞のPとFeの分布画像を示す。Feが細胞内で局在しているのが良く分かる。マイクロPIXEカメラを細胞の分析に加えて、大気浮遊塵のマイクロ解析にも応用した（発表論文4）。

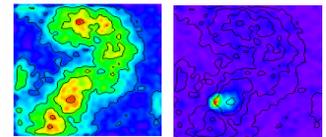


図2 ウシ血管内皮細胞中のPとFeの分布

マイクロCTのX線検出器部として浜松フォト製X線CCDカメラC8800X（ $8\ \mu\text{m} \times 8\ \mu\text{m}$ 、画素数 1000×1000 、30フレーム/秒）を購入し、その性能評価を行なった。CCDカメラに直接3 MeV陽子が入射するとCCDカメラに損傷を与えるので、CCDカメラの前面を100 μm 厚のマイラー膜で覆い、このマイラーの吸収効果とCCDカメラの検出効率を考慮して、マイクロCTの最適なX線エネルギーとしてはTi-K-X線近傍であることが分かった（発表論文2）。

我々の開発したマイクロCTは、試料を回転させ、固定された点線源からのコーンビームX線をCCDカメラで検出するので、数学的に完全なデータが得られるのは、試料回転軸に垂直な断面だけである。そこで、この断面の再構成画像を基にして、逐次近似法で他の断面図を得る方法を開発した（発表論文3）。

マイクロビーム形成システム、CCDカメラ、及びマイクロチューブ試料台をLabVIEWで駆動制御するマイクロCTを開発した。生体試料を納めるマイクロチューブは、肉厚25 μm で外形1mmのポリイミドチューブを用いて作製した。最初、人毛髪の断層画像撮影を行い、Ti-K-X線によるマイクロCTの画像再構成の調整を行なった。次に、生体試料として体長3mmの山蟻をホルマリンに浸けた後、マイクロCTで測定した。図3に、山蟻の頭部の写真（中央）、マイクロCTで撮れた3次元立体画像（左図）及び断層画像（右図）を示す。左図は、表面を強調した立体画像であるが、蟻の頭部の複雑な構造が良く観測できている。一方、右図の断層図は、山蟻の複眼、脳の断面図を良く表しているのが分かる。（発表論文1）

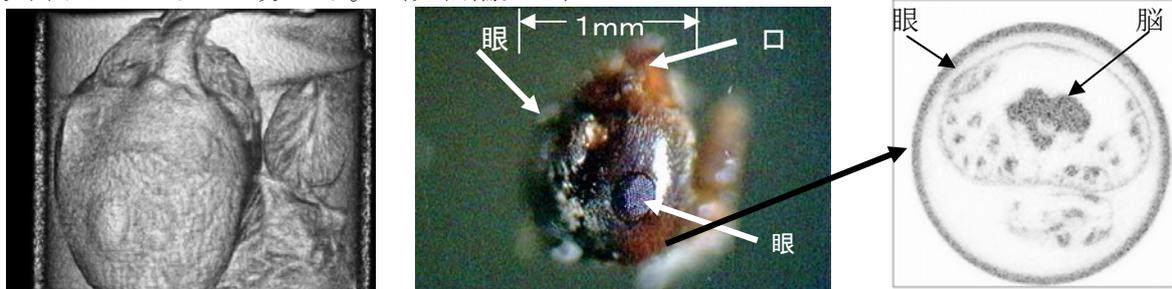


図3 山蟻の頭部のマイクロCT画像：3次元立体画像（左）、写真（中央）、断層画像（右）

我々の開発したマイクロCTの空間分解能は約4 μm であり、この精度での微細構造が確認できた。更に、生きた蟻の頭部のCT画像の撮影にも成功し、ホルマリン浸けのものと大きく異なることが分かった。（国際会議発表1）

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

1. マイクロビーム形成システムの低価格の実現

地元企業の協力のもとに非常に短期間(約6ヶ月)に、通常価格の2~3分の1の低価格で、目標とした基本性能を持ったマイクロビーム形成システムを製作できた。この製作により、精密機器及び精密加工の地場産業の育成に大いに貢献することができた。

2. 小型加速器によるミクロンCTの実現と小型加速器の利用の多機能化

ミクロンCTは、放射光実験装置からのX線を用いて行なうことができ、実際、これを用いた実験結果が報告されている。我々、PIXEからの特性X線を準単色X線として利用することによって、放射光からの単色X線を用いたミクロンCTと同様の性能を持たせることを可能にした。このような試みは、世界で我々が最初の試みである。(発表論文2)

更に、本研究による小型加速器を用いたミクロンCTの実現により、1台の小型加速器を用いて、試料内の元素分布画像を与えるマイクロPIXEカメラ、試料の形態画像を与えるSTIM (Scanning Transmission Ion Microscopy)、表面元素分析を可能にするRBS、シングルイオンヒット等と様々な加速器の利用方法に生きている試料の分析方法が加わった。

3. バリエティーに富んだCT画像の実現

本研究においては、ミクロンCTからのデータをいくつかの画像表現を行なうことができた。

以下に、3つの3次元画像を示す。

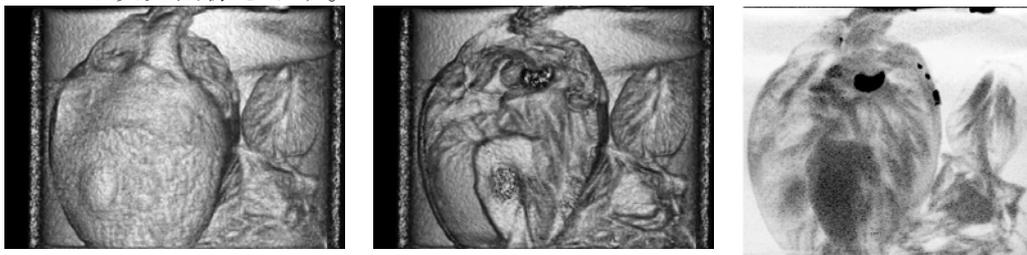


図4 山蟻の3次元CT画像：表面強調(左)、内部強調(中央)、透過強調(右)

右図の透過強調3次元CTでは、脳の位置が良く確認できる。また、口付近に吸収の高い部分が見られる、Ti-K-X線によるCT画像であることを考えると、Ca又はKであることが推測される。

4. 細胞の観察

我々のミクロンCTは、空間分解能が4 μm 程度であるので、このサイズより小さいものは見えない。図5は山蟻の脳の一部を拡大したものである。四角図の濃淡の構造はノイズレベルより大きいもので、脳の微細な構造を捉えていることが分かった。

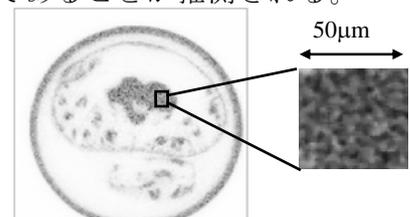


図5 蟻の脳の微細構造

5. 解剖図との一致

ホルマリン浸けの山蟻の頭部のCT画像と顕微鏡で観察して描いた解剖図と比較した結果を図6に示す。内部構造が非常に良く一致していることが分かる。

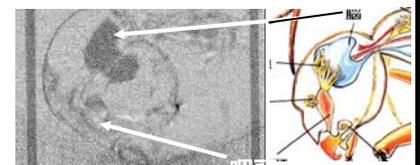


図6 蟻の頭部の解剖図とCT画像

6. 生きた蟻の頭部の断層図撮影に成功

山蟻をクロロホルムで眠らせ、2時間のCT撮影後、眠りから覚めたことを確認した。眠った状態でのCT画像を図7に示す。明らかに図6のものと異なる。つまり、図6の解剖図はホルマリン浸けで内部が変形したものを観察して描いたもので、実際に生きたものとは大きく異なることが、ミクロンCT画像で分かった。これまで、放射光からのX線を用いて、イースト菌の様な小さな生物の断層画像を捉えた報告はあるが、体長3mmの山蟻のような生物の生きた状態での断層図を捉えた例は、本報告が初めてと考えられる。この成果は、「分子イメージング技術に関する第1回ヨーロッパ会議」

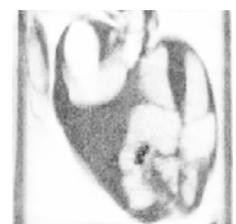


図7 生きた蟻の頭部の断層画像

(平18年5月)で発表する予定である。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

① K. Ishii, S. Matsuyama, H. Yamazaki, Y. Watanabe, Y. Kawamura, T. Yamaguchi, G. Momose, Y. Kikuchi, A. Terakawa and W. Galster,
3D-CT imaging using characteristic X-rays and visible lights produced by ion micro-beam bombardment,
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B in press.

② K. Ishii, S. Matsuyama, H. Yamazaki, Y. Watanabe, T. Yamaguchi, G. Momose, T. Amartaivan, A. Suzuki, Y. Kikuchi and W. Galster,
Micron-CT using PIXE with Micro-beams,
International Journal of PIXE, 15(3&4), 111-124 (2005).

3. T Yamaguchi, K. Ishii, H. Yamazaki, S. Matsuyama, Y. Watanabe, S. Abe, M. Inomata, A. Ishizaki, R. Oyama and Y. Kawamura,
Development of an image reconstruction method for Micron-CT using PIXE,
International Journal of PIXE, 15(3&4), 195-202 (2005).

4. S. Matsuyama, K. Ishii, H. Yamazaki, Y. Kikuchi, Ts. Amartaivan, S. Abe, K. Inomata, Y. Watanabe, A. Ishizaki, R. Oyama, Y. Kawamura, A. Suzuki, G. Momose, T. Yamaguchi and H. Imaseki,
Microbeam analysis of single aerosol particles at Tohoku University
International Journal of PIXE, 15(3&4), 257-262 (2005).

5. S. Matsuyama, K. Ishii, S. Abe, H. Ohtsu, H. Yamazaki, Y. Kikuchi, Ts. Amartaivan, K. Inomata, Y. Watanabe, A. Ishizaki, Y. Barbotteau, A. Suzuki, T. Yamaguchi, G. Momose and H. Imaseki,
Microbeam analysis at Tohoku University for biological studies
International Journal of PIXE Vol 15 Nos 1&2, 41-46 (2005).

6. H. Komori, K. Mizuma, K. Ishii, H. Yamazaki, S. Matsuyama, Ts. Amartaivan, Y. Ohishi, M. Rodriguez, T. Yamaguchi and A. Suzuki,
Beam damage of cellular samples in In-air micro PIXE analysis
International Journal of PIXE, 14(3&4), 75-81 (2004).

7. S. Harada, K. Ishii, A. Tanaka, T. Satoh, S. Matsuyama, H. Yamazaki, T. Kamiya, T. Sakai, K. Arakawa, S. Oikawa and K. Sera,
Method for determining the localization of trace elements observed by the Micro PIXE camera
International Journal of PIXE, 14(3&4), 83-88 (2004).

⑧ S. Matsuyama, K. Ishii, H. Yamazaki, Y. Barbotteau, Ts. Amartaivan, D. Izukawa, H. Hotta, K. Mizuma, S. Abe, Y. Ohishi, M. Rodriguez, A. Suzuki, R. Sakamoto, M. Fujisawa, T. Kamiya, M. Oikawa, K. Arakawa, H. Imazaki and N. Matsumoto,
Microbeam analysis system at Tohoku University
International Journal of PIXE, 14(1&2), 1-8 (2004).

9. Y. Barbotteau, K. Ishii, K. Mizuma, H. Yamazaki, S. Matsuyama, T. Sakai, T. Satoh and T. Kamiya
Behavior of pet foil used as beam extraction window during irradiation at atmospheric pressure
International Journal of PIXE, 14(1&2), 19-26 (2004).

10. K. Mizuma, K. Ishii, Y. Barbotteau, S. Abe, H. Yamazaki, S. Matsuyama, E. Sakurai, K. Yanai, T. Kamiya, T. Sakai, T. Satoh, M. Oikawa and K. Arakawa,
The elemental analysis of IgE-sensitized RBL-2H3 cells using In-air micro PIXE
International Journal of PIXE, 14(1&2), 27-34 (2004).

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

11.R.Watanabe, J.Hara, C.Inoue, T.Chiba, Ts. Amartaivan, S.Matsuyama, H.Yamazaki and K.Ishii
Mapping of heavy metals accumulated in plants using Submilli-PIXE camera,
International Journal of PIXE, 14(1&2), 35-42(2004).

12.H.Yamazaki, K.Ishii, S.Matsuyama, Y.Komori, K.Mizuma and T.Izukawa,
Summary of the workshop on practical problems in biological application of micro-PIXE analysis
International Journal of PIXE, 13 (1&2), 89-96(2003).

13.S.Matsuyama, K.Ishii, H.Yamazaki, R.Sakamoto, M.Fujisawa, Ts.Amartaivan, Y.Oishi,
M.Rodriguez, A.Suzuki, T.Kamiya, M.Oikawa, K.Arakawa and N.Matsumoto,
Preliminary results of micro-beam at Tohoku university
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B210, 59-64 (2003).

14.Y. Oishi, K. Hotta, K. Ishii, Y. Komori, S. Matsuyama, H. Yamazaki, T. Amartivan, M. Rodriguez,
K. Katoh, D. Izukawa, K. Mizuma, T. Satoh, T. Kamiya, T. Sakai, K. Arakawa, M. Saidoh, M.
Oikawa,
3D imaging of elemental distributions using multi-angle RBS 2D-data
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B210, 117-122 (2003).

15.T. Satoh, K. Ishii, T. Kamiya, T. Sakai, M. Oikawa, K. Arakawa, S. Matsuyama, H. Yamazaki,
Development of a large-solid-angle and multi-device detection system for elemental analysis
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B210, 113-116 (2003).

16.S. Harada, Y. Tamakawa, K. Ishii, A. Tanaka, T. Satoh, S. Matsuyama, H. Yamazaki, Y. Komori, T.
Kamiya, T. Sakai, K.Arakawa, M Saitoh, M.Oikawa and K.Sera,
The kinetics of Fe and Ca for the development of radiation-induced apoptosis by micro-PIXE
imaging,
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B210, 383-387 (2003).

17.T.Sakai, T.Kamiya, M.Oikawa, T.Satoh, A.Tanaka, K.Ishii,
JAERI Takasaki in-air micro-PIXE system for various applications
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B190, 271-275 (2002).

18.S.Harada, Y.Tamakawa, K.Ishii, A.Tanaka, T.Satoh, S.Matsuyama, H.Yamazaki, T.Kamiya,
T.Sakai, K.Arakawa, M.Saitoh, S.Oikawa, K.Sera
The Kinetics of Fe and Ca for the development of radiation-induced apoptosis by micro-PIXE
imaging,
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B189, 437-442 (2002).

19.A.Tanaka, K.Ishii, S.Matsuyama, H.Yamazaki, Y.Oishi, M.Rodriguez, Ts. Amartaiva, K.Kubota,
H.Fukuda, T.Kamiya, T.Satoh, T.Sakai, M.Oikawa, K.Arakawa and M.Saidoh,
In-air micro-PIXE analysis of tissue samples
International Journal of PIXE, 12 (3&4), 79-83(2002).

20.K.Ishii, A.Sugimoto, A.Tanaka, T.Satoh, S.Matsuyama, H.Yamazaki, C.Akama, T.Amartivan,
H.Endoh, Y.Oishi, H.Yuki, S.Sugihara, M.Satoh, T.Kamiya, T.Sakai, K.Arakawa, M.Saidoh and
S.Oikawa,
Elemental analysis of cellular samples by in-air micro-PIXE
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B181,448-453 (2001).

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

国際会議

1. First European Conference on Molecular Imaging Thechnology, 19-21 May, 2006, Marseille, 3D-imaging using micro-PIXE,
K.Ishii, S.Matsuyama, H.Yamazaki, Y.Kikuchi, Y.Watanabe, T.Yamaguchi, G.Momose and A.Ishizaki
2. 17th International Conference on Ion Beam Analysis, June 26 - July 1, 2005, Sevilla, Spain, 3D-CT imaging using characteristic X-rays and visible lights produced by ion micro-beam bombardment,
K. Ishii, S. Matsuyama, H. Yamazaki, Y. Watanabe, Y. Kawamura, T. Yamaguchi, G. Momose, Y. Kikuchi, A. Terakawa and W.Galster.
- 3.10th International Conference on Particle-induced X-ray Emission and its Analytical Applications, June. 4-8, 2004, Ljubljana – Portoroz, Slovenia, Microbeam analysis at Tohoku University for biological studies,
S.Matsuyama, K.Ishii, K.Ohtsu, H.Yamazaki, A.Suzuki, Y.Barbotteau, T.Amartaivan, D.Izukawa, K.Hotta, K.Mizuma, S.Abe, Y.Oishi, M.Rodriguez, R.Sakamoto, M.Fujiwara, M.Nagakura, T.Kamiya, S.Oikawa, K.Arakawa, N.Matsumoto and H.Imazeki
4. 5th International Symposium on BioPIXE, Jan. 17-21, 2005, Wellington, New Zealand, Micro-CT using PIXE with microbeams
K.Ishii, S.Matsuyama, H.Yamazaki, Y.Watanabe, T.Yamaguti, G.Momose, T.Amartaivan, A.Suzuki, Y.Kikuchi
- 5.5th International Symposium on BioPIXE, Jan. 17-21, 2005, Wellington, New Zealand, Microbeam analysis of single aerosol particles at Tohoku University,
S.Matsuyama, K.Ishii, H.Yamazaki, Y.Kikuchi, T.Amartaivan, S.Abe, K.Inomata, Y.Watanabe, A.Ishizaki, R.Oyama, Y.Kawamura, A.Suzuki, G.Momose, T.Yamaguti and H.Imazeki
- 6.The 3rd International Symposium on Future Medical Engineering based on Bio-nanotechnology (21st Century COE Program), Advanced Technologies in Functional Biomedical Lmaging, Nov. 4-6, 2003, Togatta, Miyagi
Development of microbeam system at Tohoku University,
S.Matsuyama, K.Ishii, H.Yamazaki, R.Sakamoto, M.Fujisawa, Ts. Amartaivan, Y.Ohishi, M.Rodriguez, A.Suzuki, T.Kamiya, M.Oikawa, K.Arakawa, H.Imaseki and N.Matsumoto
- 7.8th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications
September 8-13, 2002, Takasaki, Japan
New microbeam syetem of Tohoku University,
S.Matsuyama, K.Ishii, H.Yamazaki
- 8.The 4th International Symposium on Bio-PIXE, 2002/4/15-19,
In-air micro-PIXE analysis of tissue samples
A.Tanaka, K.Ishii, S.Matsuyama, H.Yamazaki, Y.Oishi, T.Sakai, T.Kamiya, M.Oikawa, M.Saido, R.Tanaka and T.Satoh

国内会議

1. 東北大学百周年記念セミナー、「生命の質への飛躍」先端科学と次世代医療、 2005年12月5日、加速器とライフサイエンス 粒子ビームで生きている細胞を観る、石井慶造
東北大学インターネットスクール特別講義公開中 http://www.istu.jp/kougi/ishii_vol4_2006/ishii.html
2. 日本原子力学会、2005年秋の大会、2005年9月13日-15日、八戸(青森)
三次元ミクロンCTの開発(1) -システムの開発-
渡辺慶人、石井慶造、山崎浩道、松山成男、菊池洋平、山口喬、川村悠、小山亮平