

平成21年 6月19日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19810032  
 研究課題名（和文） マイクロPIXEを用いた細胞内薬剤動態の画像化観察技術の開発  
 研究課題名（英文） Development of the Imaging Technique for Intracellular Pharmacodynamics using Micro-PIXE  
 研究代表者  
 齋藤 克代（SAITO KATSUYO）  
 高崎健康福祉大学・薬学部・助手  
 研究者番号：90455288

研究成果の概要：微量元素の動態を細胞レベルで明らかにすることは、医薬品などの機能性分子が細胞内でどのように働いているのかを解明することにつながり、新たな医薬品分子の設計や創薬に有用である。今回、細胞内の微量元素分布を高分解能で画像化できる手法を用いて、細胞内の小器官レベルでの元素分布を画像化した。この手法により、様々な機能性分子の細胞内分布を、細胞内小器官の位置情報と関連付けて視覚的に解析できる見通しを得た。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,350,000	0	1,350,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	405,000	3,105,000

研究分野：生命科学、アレルギー学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：PIXE／マイクロPIXE／マイクロビーム／微量元素／元素分布／金コロイド／細胞内小器官／イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

生体分子や医薬品の細胞内動態を解析することは、その機能や作用を解明する上で非常に重要であり、現在、分子イメージングの手法などを用いて盛んに行われている。また、マイクロPIXE（Particle Induced X-ray Emission：粒子線励起X線分析）は、標識や染色といった試料調製ステップを必要とせず、細胞内の微量元素分布をサブミクロンの空間分解能で画像化することができる、大変有用なツールである。そこで研究代表者

は、マイクロPIXEを用いて、細胞内小器官レベルでの微量元素の取り込みや移動から、医薬品などの生物活性分子の細胞内動態を解明する手法の開発を目指した。

一般的に細胞内の元素局在を調べる場合、目的細胞の破碎液を超遠心することによって核・ミトコンドリア・ゴルジ体・リソソーム・ペルオキシソームなどの細胞内小器官に分離し、誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）などによって分析している。しかし、大変煩雑な手順を要し、かつ、細胞非

破壊的にどの細胞内小器官に何の元素が分布しているか調べることは不可能である。

研究代表者が応募時に所属していた独立行政法人日本原子力研究開発機構（原子力機構）では、イオンマイクロビームを二次元的に走査し、大気中で個々の細胞内の微量元素分布をサブミクロンの空間分解能で画像化して視覚的に解析できる、大気マイクロPIXEの開発に成功した。マイクロPIXEは、1つの細胞サンプルで非破壊的に多元素同時二次元画像化を行うことが可能であり、多数の物質の相互作用から成る複雑なシステムである生物について、細胞レベルでの微量元素の動態解明研究に有望な手法であると注目されている。当時より、大学と原子力機構の連携重点研究「マイクロPIXE画像技術の精緻化とその生命科学への応用」及び群馬大学21世紀COEプログラム「加速器テクノロジーによる医学・生物学研究」が遂行されており、より精緻な分析を目指した装置の高感度化・高精度化の技術開発が進められている。

そこで研究代表者は、上述の高度なPIXE

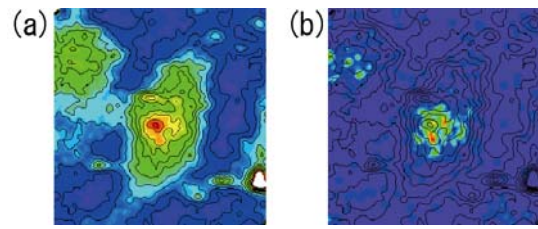


図1. マイクロPIXEの画像例 (a) リンの分布〈細胞膜〉と(b) 臭素の分布〈細胞核〉

分析技術の利用により、PIXE分析対象となり得る金属コロイドと蛍光色素の構造を併せ持つ試薬を、免疫染色法でミトコンドリアに特異的に輸送し、ミトコンドリアを画像化することを着想した(図2)。

## 2. 研究の目的

本研究の全体構想は、細胞内小器官レベルでの微量元素の取り込み・移動・代謝から、医薬品などの生物活性分子が細胞に取り込まれた後、細胞内のどこに輸送され、機能を発現し、どのように代謝されるのか、すなわち細胞内での生物活性分子の一生を解明することである。これを実現するために、本研究では、マイクロPIXEを用いることにより、細胞内小器官における薬剤分子由来の微量元素分布の観察手法を開発し、薬剤の細胞内動態や細胞内局在を画像によって視覚的に

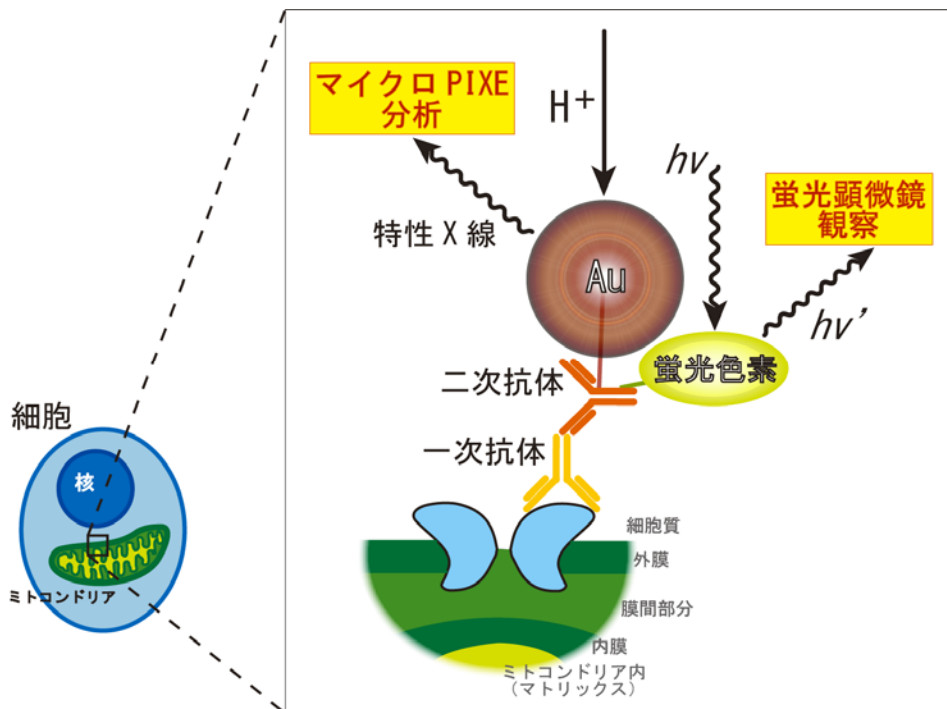


図2. 二重標識抗体を用いたマイクロPIXEによるミトコンドリアの画像化の概念図

解析できるようにすることが目的である。具体的には、PIXE 分析対象となり得る金属コロイドと光学観察用蛍光色素の構造で二重標識された試薬をミトコンドリアに特異的に輸送し、これにより標準画像を得る。

### 3. 研究の方法

本研究では、蛍光顕微鏡観察に用いられる間接免疫蛍光法と電子顕微鏡法で良く用いられる金コロイド標識抗体を、マイクロ PIXE に応用する。具体的には、マイクロ PIXE で分析したい細胞内小器官（ミトコンドリア）に局在する蛋白質の抗体を一次抗体とし、二次抗体に金コロイドと蛍光色素で二重標識された物質を用いて、ミトコンドリアをマイクロ PIXE で検出可能かつ蛍光顕微鏡で観察可能にする（図 2）。そのために、次の手順で研究を進めた。

#### (1)簡便で再現性の高い細胞接着膜の検討

次の①～④の項目を満たした膜を選定し、実際にマイクロ PIXE 分析を行って、本研究に適していることを確認した。

##### ① 組成

ナトリウム (Na) より軽い元素の特性 X 線は検出器の窓に吸収されてしまうため、細胞接着膜は、炭素 (C)、水素 (H)、酸素 (O)、窒素 (N) などの軽元素で構成されていると都合が良い。その他の元素が含まれていても、一様であれば問題ないが、マイクロ PIXE 分析のバックグラウンドとなる元素を含んでいない必要がある。

##### ②細胞接着性

細胞接着膜は、細胞の接着に適している必要がある。さらに再現性を重視し、独自に膜のコーティングは行わず、細胞接着用コーティング処理が既に施されている市販品の中から適した膜を選定することとした。

##### ③厚さと強度

細胞接着膜の厚みが増すと、制動輻射のためバックグラウンドが増大して定量精度が悪化し、鮮明な画像を取得できなくなる。そのため、ビームに対する耐久性を備えながら、極力薄い膜である必要がある。

##### ④色

蛍光顕微鏡観察が行えるように、透明である必要がある。

#### (2)化学固定法の検討

従来、マイクロ PIXE での細胞内元素分析には、凍結乾燥法による試料調製が採用され

てきた。しかし抗体を細胞内に取り込ませるためには、化学固定が必要である。そこで、マイクロ PIXE 分析のバックグラウンドとなる元素を含まず、細胞の形態を良く保持する固定液の検討を行った。

#### (3)免疫染色の条件検討

本研究で用いた二次抗体は、PIXE による検出が可能な金コロイドと蛍光色素で二重標識されているため、マイクロ PIXE 分析を行う前に、免疫染色の状態を蛍光顕微鏡で確認することが可能である。蛍光顕微鏡観察で確認しながら、一次抗体および二次抗体の濃度、反応時間、反応温度の検討を行い、細胞内の標的部位を特異的に染色できる反応条件を見いだした。

#### (4)金コロイド銀増感法の検討

3 で定めた条件により作成した試料を実際にマイクロ PIXE 分析したところ、金 (Au) の含有量が予想以上に少なく、PIXE スペクトルにおいて Au の特性 X 線のピークを判別することが困難であった。しかし、Au の含有量を多くするために免疫染色の条件を強くすると、非特異な反応が起こり、鮮明な画像が取得できなくなる。そこで、免疫染色の条件は維持したまま、金属銀を沈着させることによって金コロイドを増感した。

なお、本研究では、in vitro での研究に幅広く用いられている HeLa 細胞を用いた。また、本研究でのマイクロ PIXE 分析は全て、独立行政法人日本原子力研究開発機構 高崎量子応用研究所のイオン照射研究施設 (TIARA : Takasaki Ion Accelerators for Advanced Radiation Application) に設置されている 3MV シングルエンド静電加速器およびマイクロビーム形成装置を利用した。

### 4. 研究成果

#### (1)サンプル調製法

まず、3(1)～(3)での検討により定めた、細胞接着膜（表 1）、化学固定液（4% パラホルムアルデヒド）および免疫染色条件を用いてサンプルを調製し、標的としているミトコンドリアに二重標識抗体が適切に結合したことを、蛍光顕微鏡観察で確認した（図 3）。

表 1. 細胞接着膜の特徴

素材	ポリエステル
透明度	透明
細胞可視性	あり
細胞培養表面処理	処理済み
膜の厚さ	10 $\mu$ m
コラーゲンコート	未処理

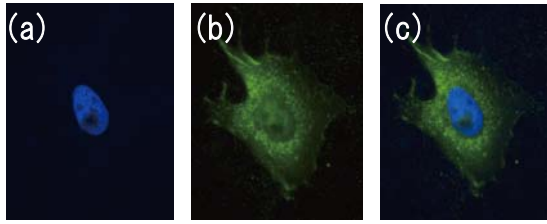


図3. 調製したサンプルの蛍光顕微鏡画像 (a)DNA を染める色素で対比染色した細胞核 (b)ミトコンドリア (c)細胞核(青) +ミトコンドリア(緑)

## (2)二重標識サンプルのマイクロPIXE

(1)のようにして作製したサンプルを、マイクロPIXE分析したところ、PIXEスペクトルにおいて、金コロイドのAuのL<sub>α</sub>線は、亜鉛(Zn)のK<sub>β</sub>線と重なってしまい、かつ、Auの含有量が少ないためにピークが小さく、Auの特性X線のピークを判別することは困難であることがわかった(図4)。なお、図4において、(b)のケイ素(Si)とマンガン(Mn)のピークは、細胞接着膜由来である。(a)は、緩衝液中の金コロイド標識抗体を測

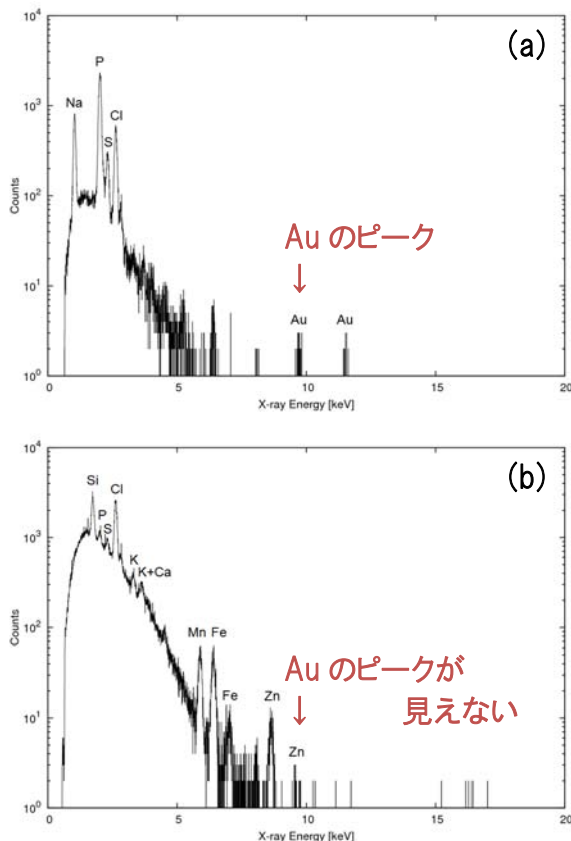


図4. PIXE スペクトル (a)金コロイド標識抗体のみ。Au のピークが判別できる。(b)二重標識した細胞サンプル。Zn のピークに隠れてしまい、Au のピークが見えない。

定したスペクトルであるが、本報告書で今まで述べてきた細胞接着膜ではなく、PIXEで検出されない軽い元素のみで構成された材料分析等に適している膜を用いたため、膜由来のピークは存在しない。

## (3)銀増感したサンプルのマイクロPIXE

銀増感した細胞サンプルのPIXEスペクトルから、銀の特性X線のピークを選んでマッピングした。その結果、ミトコンドリアの蛍光顕微鏡画像(図3)に類似した、細胞核の周囲に銀(Ag)が分布していると思われる画像を取得することができた(図5)。

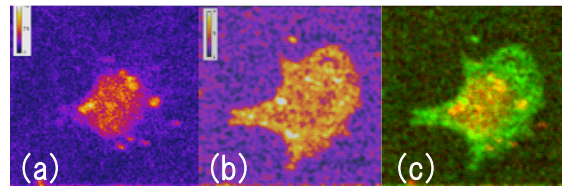


図5. マイクロPIXE画像 (a)硫黄の分布 (b)銀の分布 (c)硫黄(赤) + 銀(緑)

以上より、細胞内小器官のイオンマイクロビームによる可視化の見通しを得た。今後、今回得られたAgの分布とミトコンドリアが一致することのさらなる検証と、より鮮明な画像を得るための試料調製法の最適化が必要である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

T. Satoh, A. Yokoyama, T. Ohkubo, Y. Ishii, K. Saito, T. Kamiya, K. Arakawa, S. Matsuyama, and K. Ishii : Three-Dimensional Measurement of Elemental Distribution in Minute Samples by Combination of In-Air Micro-PIXE and STIM. JAEA-Review (JAEA Takasaki Annual Report 2008), in press, 査読無

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

齋藤 克代 (SAITO KATSUYO)  
高崎健康福祉大学・薬学部・助手  
研究者番号：90455288

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者