

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02654

研究課題名（和文）電子線直接照射によるナノ領域の生細胞刺激法の開発

研究課題名（英文）Nanometric cell stimulation with focused electron beam irradiation

研究代表者

川田 善正（Kawata, Yoshimasa）

静岡大学・その他部局等・理事

研究者番号：70221900

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生きた生物細胞に電子線を直接照射し、ナノメートルスケールの局所領域に電氣的刺激を与え細胞反応の活性化制御および細胞に電子を直接供給し還元反応を人為的に誘発し細胞機能を制御する全く新しい細胞の刺激・制御法を開発することを目的とし、基礎研究をおこなった。細胞に電子線を直接照射するための基礎システムを構築するとともに、細胞に電子線を照射した場合のカルシウムイオン濃度の上昇の時間経過を観察した。カルシウムイオン濃度変化のメカニズムについて検討をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで任意のイオンチャンネルに直接アクセスすることができなかった、非接触で電氣的な刺激を与えることが可能な手法を確立するとともに、イオンチャンネルの挙動および基礎特性を解明するための理論体系を構築するものである。とくにイオンチャンネルの活性化制御のメカニズムを解明すれば、細胞の高効率な制御手法、反応活性化の向上などを実現することができ、医療、医薬、食品、燃料電池、洗浄、農業など、さまざまな応用分野に展開することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, our primary objective was to advance basic research in the field of cellular stimulation and control by devising a novel methodology. Specifically, we aimed to regulate the activation of cellular reactions through the direct irradiation of living biological cells with electron beams, allowing for precise electrical stimulation at the nanoscale level. The overarching goal of our research was to develop an innovative approach to stimulate and regulate cellular functions. To this end, we established a fundamental framework capable of directly irradiating cells with electron beams. By employing this system, we examined the temporal patterns of calcium ion concentration changes in response to electron beam irradiation.

研究分野：応用光学

キーワード：光学顕微鏡 電子顕微鏡 バイオイメーjing 細胞刺激 ナノテクノロジー 細胞機能解明

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は、生体内において温度変化やイオン濃度変化、圧力変化、膜電位変化など、外部からさまざまな刺激を受けて活動している。例えば神経細胞においては、電気的な刺激により細胞が活性化し、信号伝達が行われる。筋細胞では、神経細胞から受け取った電気信号によって細胞の大きさが変化し、筋肉の収縮・弛緩が制御されている。また、神経細胞や筋細胞以外の細胞種においても、外部からの刺激によって遺伝子の発現状態やタンパク質の活性状態が変化する。

細胞に外的な刺激を与え、刺激と応答の関係を調べることにより、複雑な生命現象を細胞レベルで解析する手法の開発が盛んに進められている。外的な刺激を個々の細胞に局所的に作用させることにより、形態変化、機能変化、発生や分化、代謝、信号伝達といった生命現象を細胞レベルで解析することが可能となる。細胞の刺激応答反応を利用した生命現象の解析では、細胞内カルシウムイオン(Ca^{2+})の濃度変化の観察がされており、 Ca^{2+} -依存性タンパク質が引き起こす連鎖的な化学反応を通して、神経伝達や筋収縮、遺伝子発現、細胞分裂など、多岐にわたる生体機能が制御されている。

細胞への刺激法としては、これまで、ガラスニードルによる機械刺激、微小電極針による電気刺激、化学物質の添加による薬品刺激、レーザー照射による光刺激などが開発されてきた。これらの刺激法は、それぞれの特徴を生かしてさまざまな細胞機能の解明に応用され、生体機能の解明、新たな治療法の確立、創薬などに大きく貢献してきた。今後は、より詳細な機能解明を目指して、空間分解能の高い細胞刺激法が開発が望まれている。ナノスケールの細胞刺激法が開発できれば、任意の位置のイオンチャンネルに個々に刺激を与えることや複数のイオンチャンネルに同時に刺激を与えることができ、イオンチャンネルの機能や相互作用を解明することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、生きた生物細胞に電子線を直接照射し、ナノメートルスケールの局所領域に電氣的刺激を与え細胞反応の活性化制御および細胞に電子を直接供給し還元反応を人為的に誘発し細胞機能を制御する全く新しい細胞の刺激・制御法を開発することを目的として研究を行った。

細胞は外部からのさまざまな刺激に応答し機能を発現・制御しているため、ナノスケールの局所的な刺激を与えることができれば、細胞の発生、代謝、信号伝達などの生命現象をイオンチャンネルレベルで解析することが可能となる。とくに微生物の代謝反応は、酸化還元反応であり細胞内では動的平衡状態が保たれている。そのため、細胞膜表面上の電位を任意に変化させることにより、代謝スイッチングを制御できることを期待して研究を進めた。本研究では、薄膜で真空と大気圧を分離することにより、薄膜を通して集束電子線を生きた生物試料に直接照射した。集束電子線を用いているため、照射領域を生物試料上の数 nm から数 10 nm に制限することができ、直接電氣的な刺激を非接触で与えることが可能となる。電子線照射に対する生物試料の基礎特性を明らかにするとともに、電子線の電流量、加速電圧、集束スポットの大きさなどに対する基礎特性を明らかにした。

3. 研究の方法

本手法では、厚み 50nm 程度の薄膜で真空と大気圧を分離し、電子線を透過させ、薄膜上の細胞を直接刺激した。細胞の刺激に集束電子線を利用することで、(1)細胞の数 nm から数 10nm の局所領域のみに刺激を与えることが可能、(2)非接触での刺激が可能、(3)電氣的な刺激が可能、などの特徴を有する刺激法を実現できることが大きな特徴である。

本刺激システムでは、電子線を集束させて生細胞に直接照射するため、ナノスケールの分解能が実現可能である。電子線は、光などに比べて集束性がよくナノスケールの大きさの微小スポットを形成できるからである。照射された電子線は薄膜や試料内を伝搬する間に、拡散により拡がるものの、加速電圧を制御することにより数 μm 程度の深さまで数 10nm 以下の集束スポットを形成できる。

本研究では、電子線による刺激の生体反応を同時に蛍光により観察した。したがって、さまざまな蛍光プローブや顕微分光技術、高速度カメラ、高感度カメラ等を用いることにより、刺激に対する細胞の反応の素過程を解析し、電子線の照射位置に対する反応の差異、照射電流量に対する反応活性化の範囲の解析など、より詳細な反応過程を可視化、解析することが可能となった。細胞を制御する技術が確立し、細胞機能の解明だけでなく、さまざまな医療、治療への応用などを検討した。これらの応用研究に向けて、電子線による細胞および器官へのダメージについても検討した。電子線の加速電圧、照射量、集束スポットの大きさに対する特性を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 基礎システムの開発

本研究で開発した基礎システムは、装置下部に倒立型走査型電子顕微鏡 (APCO Ltd., MINI-

EOC)を備え、上部には光学顕微鏡(Olympus, BXF)を備えている。標的とする細胞試料は、倒立式走査型電子顕微鏡上部に設置されている。細胞は培養ディッシュ中で培養した。

この培養ディッシュは、厚さ 0.25 mm のアルミニウム底板、膜厚 50nm の窒化シリコン薄膜基盤、直径 35mm の培地保持プラスチックディッシュから構成される。これら 3 つの要素は、エポキシ系樹脂によって互いに接着した。窒化シリコン薄膜基盤は走査型電子顕微鏡の真空環境と、細胞培養の大気圧環境を分離する機能を担う。

倒立式走査型電子顕微鏡は、電界印加方式の偏向器を持ち、外部より電圧を印加することで、電子線を走査した。また、その鏡筒内部には、試料表面から発生する二次電子の像を取得するためのユニットを搭載し、電子線照射によって、窒化シリコン薄膜裏面から生じる二次電子像を取得した。マイクロメータによって試料ステージを変位することで、細胞培養ディッシュの位置を電子線の電子線の照射点に対して操作できるシステムとした。

光学顕微鏡は、電子線照射の標的とする細胞を可視化し、電子線照射後の細胞応答を可視化するために使用した。光源には LED を使用し、対物レンズ直上にあるフィルターユニットを適宜選択することで、蛍光観察や反射像観察も取得できるシステムとした。観察像の撮像は、CMOS カメラ(Hamamatsu, ORCA-Flash4.0, ORCA-Fusion BT) によって行なった。光学顕微鏡は、水平 2 軸方向に操作可能なステージ上に設置されており、このステージを操作することで、顕微鏡の視野を電子顕微鏡 による電子線の操作領域や試料ステージとは独立に位置決めすることを可能とした。

(2) 電子線照射位置の精度評価

電界式偏向器によって集束電子線の照射位置を偏向し、所望の標的へ照射するためには、偏向前の電子線の照射位置を知る必要がある。窒化シリコン薄膜上部には大気がある場合に、電子線を窒化シリコン薄膜に対して照射すると、図 1(a)に示す様な発光が観察される。発光の光学スペクトルを図 1(b)に示す。電子線照射時に観察される発光は、電子線によって空気がプラズマ化し、発光していると考えられる。このプラズマ発光を観察することで、電子線の命中点を推定することが出来る。

校正した電子線の偏向における正確度を評価した。初めに偏向コイルへの印加電圧を(0, 0)とした時のビーム命中点(原点)から、5 μm 間隔で並んだ 24 点へビームを偏向し、各偏向点で生じる発光を撮像した。それぞれの発光像から、その輝度中心を推定し、意図した標的点に対する偏向が実現されたか、その偏向の正確度を評価した。以上の手法により、偏向の 80 % 以上が、標的点から 250nm 以内の範囲に命中していることが確認できた。現在使用している正立型顕微鏡による細胞観察では、その空間分解能は 1 μm 程度であり、使用している正立顕微鏡で可視化できる細胞構造に対する電子線の選択的な照射が十分可能である正確度を達成できた。

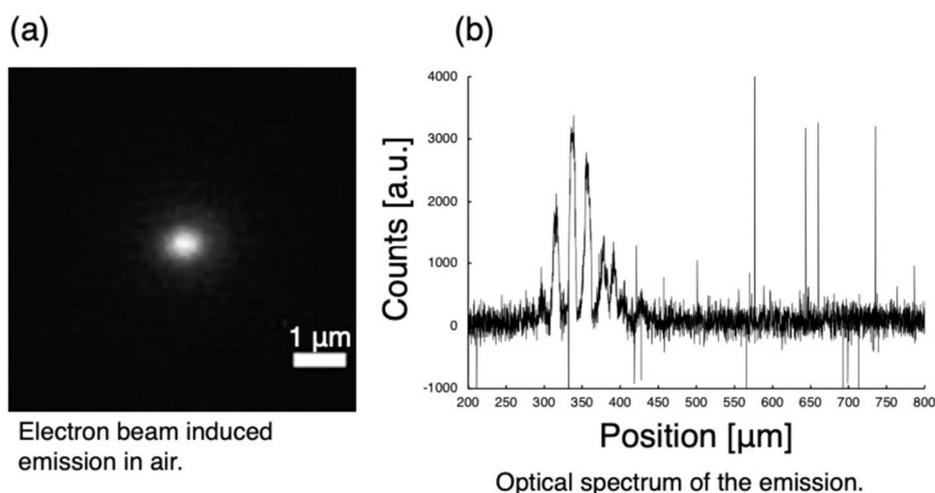


図 1. 電子線照射によって観察される発光

(a)発光の顕微鏡観察像。(b)発光の光学スペクトル

(3)カルシウムイオン濃度変化の観察

電子線照射後に発生する細胞内 Ca^{2+} 濃度変化について検討を行った。細胞内 Ca^{2+} 濃度の可視化には、細胞内 Ca^{2+} インジケータである、Fluo4-AM を使用した。Fluo4-AM は、AM 基を持つことから、細胞膜に対する透過性を有している。細胞内に入った Fluo4-AM は、細胞内のエステラーゼ活性によって脱 AM 化され、細胞内に閉じ込められる。Fluo4-AM は Ca^{2+} と反応し、その蛍光強度が変化する。 Ca^{2+} 濃度が増加すると、蛍光強度も増加するため、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化が可視化できる。本研究では、Fluo4-AM に加えて、Fura Red-AM (Invitrogen)を併用し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を可視化している。Fura Red-AM も同様に、 Ca^{2+} の濃度依存的にその蛍光強度が変化する。Fluo4-AM とは異なり、 Ca^{2+} 濃度が増加すると、その蛍光強度は減光する。

図 2(a)-(d)には、電子線照射の標的とした細胞 SH-SY5Y の電子線照射前後での Fluo4 と Fura Red の蛍光強度変化を示す。図 2(a), (b)は電子線照射前後での Fluo4 の蛍光強度変化を示し、図 2(c), (d)には電子線照射前後での Fura Red の蛍光強度変化を示す。カラーバーと画像を対比することにより、図 2(a), (b)からは、電子線照射によって、細胞内の Fluo4 蛍光強度が上昇していることがわかる。また、図 2(c), (d)からは、細胞内の Fura Red 蛍光強度が低下していることがわかる。図 2(e)には、この変化を定量的に示したグラフを示す。図 2(e)より、電子線照射直後より、Fluo4 と Fura Red の蛍光強度は対称な蛍光強度変化を示しており、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇していることがわかる。以上より、電子線照射によって細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が生じることを確認した。

電子線照射によって上昇した Ca^{2+} 濃度の上昇幅について検討した。電子線照射によって細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、その上昇がおよそ平衡状態に達した時点で、細胞外液にイオノマイシン溶液を灌流する実験を行った。イオノマイシンはカルシウムイオンのイオノフォアであり、細胞外の Ca^{2+} を細胞内へと流入させる作用を持つ。この実験によって、電子線照射によって生じる Ca^{2+} 濃度上昇によって、細胞外との濃度勾配について検討した。仮に電子線照射によって細胞内外の Ca^{2+} 濃度勾配が消失していた場合には、イオノマイシン溶液を灌流しても、電子線照射細胞では、更なる Fluo4 の蛍光強度の上昇は確認されないと予想されるためである。

実験においては、イオノマイシン灌流後に、電子線を照射した細胞において Fluo4 の蛍光強度の更なる立ち上がりを確認できた。このことから、電子線照射によってもたらされる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、細胞内外の Ca^{2+} 濃度勾配を消失させるほど大きな上昇幅を持たないことが確認できた。

さらに、電子線照射後に確認される細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が、細胞外からの流入であるかどうかを検討した。細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇する機序は、細胞外液に含まれる Ca^{2+} が細胞質へ流入する場合と、細胞内で Ca^{2+} を格納している構造である、小胞体等から Ca^{2+} が細胞質へと放出される機序に大別することができる。上昇している Ca^{2+} が細胞外液に含まれる Ca^{2+} であるかを確認するために、細胞外液として Ca^{2+} を含まず、かつ、 Ca^{2+} のキレーターである EGTA を外液に添加した培地中で細胞に対する電子線照射を行なった。この状況で電子線を照射し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が観察された場合には、それは細胞内の Ca^{2+} ストア構造からの Ca^{2+} 放出であることが考えられ、逆に Ca^{2+} 応答が発生しない場合には、細胞外液の Ca^{2+} の流入が発生していることが確認できる。

実験の結果、細胞外 Ca^{2+} を除外し、EGTA によるキレートをする、電子線照射後の Ca^{2+} 濃度上昇が観察されなくなることが確認できた。したがって、電子線照射による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入によって起きていることを確認し、 Ca^{2+} 濃度上昇のメカニズムを明らかにした。

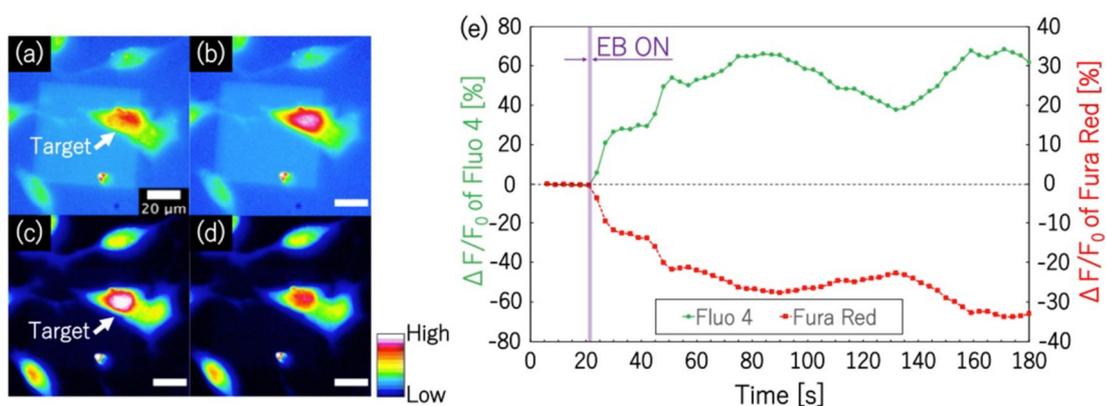


図 2. Fluo4 と Fura Red を用いた細胞内 Ca^{2+} 濃度変化の可視化。(a) 電子線を照射する前の標的 SH-SY5Y 細胞における Fluo4 の蛍光強度分布。(b) 照射後の標的 SH-SY5Y 細胞における Fluo4 の蛍光強度分布。(c) 電子線を照射する前の標的 SH-SY5Y 細胞における Fura Red の蛍光強度分布。(d) 照射後の標的 SH-SY5Y 細胞における Fura Red の蛍光強度分布。(e) 標的 SH-SY5Y 細胞における Fluo4 と Fura Red の時間経過に対する蛍光強度変化。図中で紫色に網掛けした時間領域で電子線を照射している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mayu Sao, Satoru Takeda, Wataru Inami, and Yoshimasa Kawata	4. 巻 45
2. 論文標題 Depth structure analysis by surface scanning in near-field microscope	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Optics Letters	6. 最初と最後の頁 6302-6305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/OL.402490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中朝陽, 居波涉, 川田善正
2. 発表標題 電子線照射による神経細胞の高空間分解能刺激
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長野裕太, 居波涉, 川田善正
2. 発表標題 電子線照射による生体応答制御
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村竣亮, 居波涉, 川田善正
2. 発表標題 電子線の侵入長の違いを用いた走査型電子顕微鏡による3次元構造観察
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 朝陽, 居波 渉, 川田 善正
2. 発表標題 電子線照射による生細胞の高空間分解能刺激
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福原淳志, 居波渉, 川田善正
2. 発表標題 電子線直接励起蛍光顕微鏡の高分解能化
3. 学会等名 第15回情報フォトンクス研究会関東学生研究論文講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石飛 秀和 (Ishitobi Hidekazu) (20372633)	大阪大学・生命機能研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	居波 渉 (Inami Wataru) (30542815)	静岡大学・電子工学研究所・教授 (13801)	
研究分担者	井上 康志 (Inoue Yasushi) (60294047)	大阪大学・生命機能研究科・教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------