

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 3 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26600139

研究課題名(和文)ダイヤモンドによるセンサー内包型細胞培養ディッシュの開発

研究課題名(英文)Development of cell cultivation dish based radiation detector in single-crystal CVD diamond membrane

研究代表者

加田 渉(Kada, Wataru)

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：60589117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、単結晶ダイヤモンド薄膜を基板として、細胞培養構造を内包した荷電粒子検出器を新たに開発した。酸素プラズマによる反応性イオンエッチング処理により、薄膜単結晶ダイヤモンド(3 mm × 3 mm × 30 μm)の表面に溝型構造を形成した。ダイヤモンド表面の生体親和性については、ヒト唾液腺由来腫瘍(HSG)細胞の培養実験により確認した。さらに、ダイヤモンド裏面に電極を形成し、細胞導入状態における加速器からの陽子線ならびに<sup>241</sup>Am線源からのアルファ粒子に対する放射線検出器応答を試験した。

研究成果の概要(英文)：In this study, charged particle detectors with embedded cell cultivating structure were newly developed with thin film single crystalline diamond. Trench structure for cell cultivation was formed on the surface of the thin-film single crystal diamond (3 mm × 3 mm × 30 μm) by reactive ion etching with oxygen plasma. Bio-compatibility of the diamond surface was confirmed by cultivating HSG cells on the device. Then, an electrode was formed on the backside of the diamond film to evaluate its detector response under cell cultivating conditions. Response of the developed charged particle detector was evaluated under radiation exposure of alpha particles from <sup>241</sup>Am source and protons from accelerator.

研究分野：量子ビーム科学

キーワード：ダイヤモンド 細胞培養ディッシュ 荷電粒子検出 反応性イオンエッチング イオンビーム微細加工  
アルファ粒子検出 イオンマイクロビーム

### 1. 研究開始当初の背景

自然環境からの低線量被爆に対する生体応答や、重粒子線がん治療で利用される炭素イオンなどの重イオンビームを含めた荷電粒子による生体の照射効果の基礎研究には、生体細胞をベースとした放射線照射効果の精密な解析がきわめて重要な役割を果たす。このとき、照射される放射線量を精密に測定することは、照射実験の遂行上極めて重要である。しかしながら、細胞に対する照射実験では、細胞培養プロセス、外部刺激となる放射線の照射実験プロセス、さらにはその後の経過観察過程といった複数のプロセスが存在する。実験の環境に合わせて細胞が培養環境(培養ディッシュ)から取り出されるため、細胞を取り巻く周辺環境には常に変化が起きることとなる。生体親和性の高い培養ディッシュ自身に、照射実験時に放射線を検出する機能や、観察時に必要な電気的信号取得機能が備わっていれば、細胞にストレスを与えずに、実験を効果的に遂行することができる。しかしながら、現実利用されている培養環境にこれらの機能が実現された例は確認できていない。

申請者は、ダイヤモンドを利用した放射線検出器開発の過程で、ダイヤモンドが有する半導体特性と生体親和性に着目し、この両方の特性を同時に利用可能とする細胞培養環境内包型のダイヤモンド半導体粒子検出器構造を新たに考案した。反応性イオンエッチング処理により、単結晶ダイヤモンド表面に微細加工を行うことで、細胞培養環境を構築し、その近傍におこる放射線誘起過渡電荷の収集を単結晶ダイヤモンドが有する半導体特性を利用することで、目的とする細胞培養環境と検出器の融合技術を目指した。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞に対する放射線照射実験の高効率化に資する生体親和性の高い荷電粒子センシングデバイスの開発を目的としている。図1に示すように、生体試料に対する放射線照射実験では、荷電粒子数を検出するという物理実験の要素と、生物細胞の取り扱いという生物実験の要素が同時に混在していることとなる。このため、放射線計測の前後で生体細胞を培養環境から取り出した後、放射線検出器との位置調整をおこなった上で照射をおこなう必要がある。加速器を利用した荷電粒子照射実験の場合、放射線の計数率は時間的に変動する恐れがあり、放射線計測と生体照射の間隔は極力短時間でおこなうことが理想的であるが、生物培養上の制約などにより操作時間が律束される。もし生体試料自体を検出器上に培養するデバイスが実現できれば、培養から放射線計測、照射実験までを一体的に扱うことが可能である。このため放射線計数の時間変化などはリアルタイムで検出可能であるため、より精度の高い実験が可能となると考えられる。

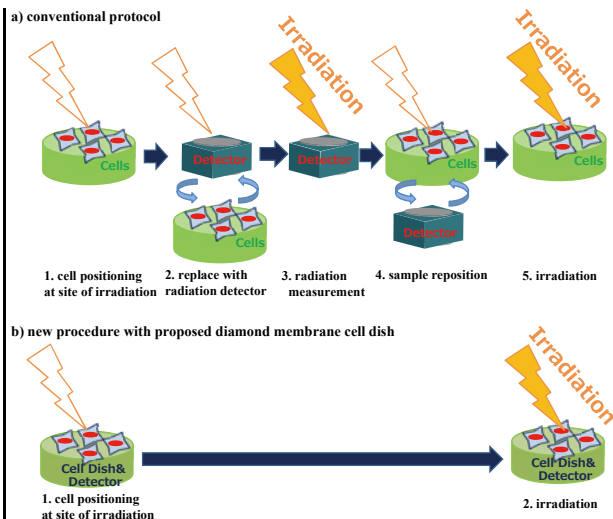


図1. 荷電粒子を含む放射線の生体影響を計測する上で、上)既存の照射体系と(下)検出器を内包する生体培養環境を利用した際の計測と実照射との時間差を示した概念図。

さらに本研究では、ダイヤモンドを検出器の構造材料として選択する。図2に、荷電粒子のエネルギーごとの放射線付与エネルギーについて、生体(水)との比較をおこなった計算例を示す。

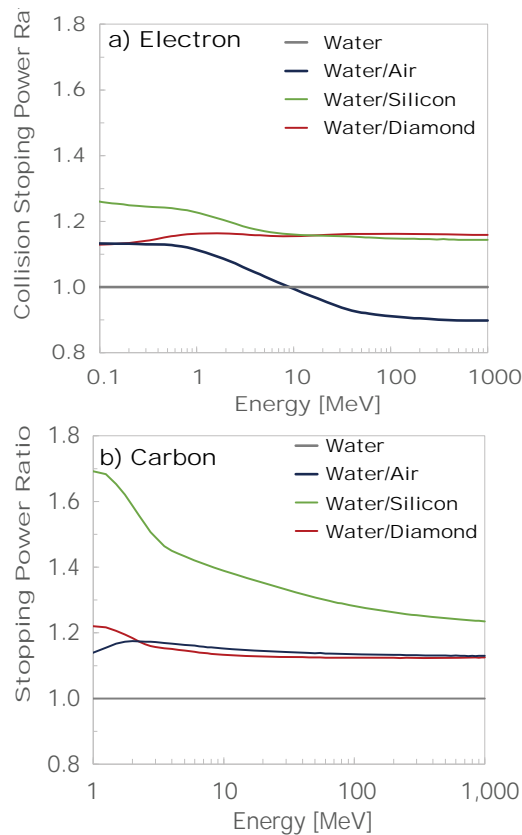


図2. a) 電子線、b) 炭素線に対する生体等価の水と主要な検出器候補材料である大気、シリコンならびにダイヤモンド材料での粒子線ごとの応答特性の比較. より直線に近似できる形状であるほど、線量付与計算が容易。

電子線についての計算は e-star プログラム、荷電粒子についての計算は SRIM2008 モンテカルロシミュレーションコードを利用した。計算においては主要な半導体検出器候補材料であるシリコンとダイヤモンド材料、ならびに通常利用される電離箱検出器での大気を構造材料として比較している。粒子線ごとの応答特性においては、生体等価の水との比較がより直線に近似できる形状であるほど、線量付与の計算が容易なため、優れた応答特性を有しているといえる。特にダイヤモンドはシリコンなどの既存半導体に対し直線的で、大気電離箱などと比較しても遜色ない直線的応答特性を有している。このため、本検出器の構造材料としてはダイヤモンドを用いることが理想的であることが確認できる。

これらの考察結果を踏まえ、本研究では、単結晶ダイヤモンドを基板とした荷電粒子検出器の内部に細胞培養構造を形成することにより、目的とする細胞培養環境内容型の荷電粒子検出器の開発をおこなった。ダイヤモンド薄膜に対する微細加工により、溝型構造を形成し、その内部における細胞の培養が可能であることを確認した。この上で検出器に細胞を接着させた状態で荷電粒子検出を行い、細胞培養条件下において荷電粒子検出が可能であることを実験的に確認した。本成果により、細胞培養環境下でも動作可能である放射線センサの原理実証が実現できた。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 細胞培養環境内包型検出器の開発

$^{241}\text{Am}$  等の  $\alpha$  線放射線源や、図. 3 に概念図を示す荷電粒子ビーム照射場における生物細胞照射実験において、細胞培養環境を検出器上に構築する構造が、今回の開発で目的とする検出器構造である。本構造では細胞培養環境を検出器に内包させることで、検出器本体が限りなく細胞培養位置に近い。

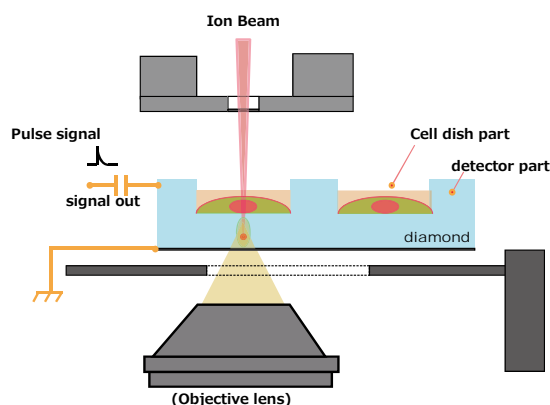


図 3. 荷電粒子ビーム照射下に配置された細胞培養環境内包型の荷電粒子検出器を配置した概念図での例示. 検出器設置位置について光学顕微鏡などを通じて確認した後、荷電粒子の照射を行う。

これまでに検出器としての利用実績のある薄膜型単結晶 CVD ダイヤモンド (Element Six 社製単結晶ダイヤモンド、本実験では 3 mm × 3 mm 厚さ 30 – 50  $\mu\text{m}$  の単結晶 CVD 光学グレードダイヤモンド薄膜) 表面において、細胞培養の可能性を検討した。図 4 に示すように、Ar/O<sub>2</sub> プラズマ下での反応性イオンエッチングを行い、荷電粒子検出器内部に溝型構造を掘り込み、細胞培養環境とした。本実験では、単純化のために、ダイヤモンドに対し単一の溝型構造 (2 mm × 2 mm 溝深さ約 23  $\mu\text{m}$ ) を形成し、細胞培養に利用した。加工後、ダイヤモンド薄膜裏面に電極を形成し、電荷信号の収集を可能とした。開発された細胞培養環境内包型のダイヤモンド半導体粒子検出器の構造外略図に合わせて光学顕微鏡観察例を図 4 に示す。

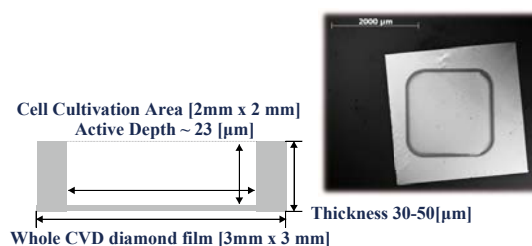


図 4 開発された細胞培養環境を内包した構造のダイヤモンド薄膜製荷電粒子検出器の (左) 構造概略図 及び (右) 同 光学顕微鏡観察例

#### 3.2 開発検出器での細胞培養

微細加工を施したダイヤモンド薄膜について、蒸留水で洗浄し、その後、紫外線を 20 分間照射することで滅菌処理を施した。次いで、細胞培養に利用される汎用の 6-well プレートに培地 (EMEM + FBS, L-Glu, PS) 1ml を加え、ダイヤモンド薄膜を沈めた。この内部に HSG 細胞を加え培養した。1 日おきに細胞の様子を観察し、増殖を確認した。さらに 3 日後、ダイヤモンド薄膜を別容器に移動させた(図 5)。これにより周辺の 6-well プレートで培養された細胞の混入を予防した。その後、培地 1ml を追加した。さらに同一の状態でも 3 日間静置して、細胞の増殖増強について評価した。

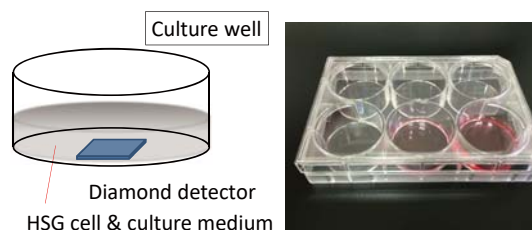


図 5 細胞培地中に設置されたダイヤモンド薄膜製荷電粒子検出器 (図 左模式図) について、6-well 細胞培養ディッシュの 1 領域を使い培養後、別の領域に移し変えて培養を継続 (図右 培養中の様子)

### 3.3 荷電粒子の照射

荷電粒子検出器としての応答評価を目的に、 $\alpha$ 線源ならびに陽子線ビームを利用した評価を行った。実験には、協力研究者の所属である原子力研究開発機構高崎量子応用研究所に設置された 3MV シングルエンド加速器軽イオンマイクロビームラインならびに  $^{241}\text{Am}$  線源を利用した。 $^{241}\text{Am}$  からの 5.5 MeV  $\alpha$ 線源の照射時は、検出器と線源間の距離を数 mm から 5 cm 程度の間で変更し、検出器上部に細胞及び培地を乗せた状態で、検出器裏面から放射線誘起過渡電荷を計測した。電荷信号の計測には通常の放射線計測に利用される電荷過敏型前置増幅器(Ortec 142C)ならびに線形増幅器を利用した。培地存在量が過渡電荷信号に与える影響を観察するため、任意量の培地を導入し照射を試行した。

加速器から発生する 3 MeV 集束陽子ビーム照射においては、水平に設置されたビームラインを利用したため、細胞培地を一旦取り除くことで、細胞がダイヤモンド表面に分布した状態を作り出し、照射に利用した。3MeV 陽子線は厚み 10  $\mu\text{m}$  以下の薄いポリイミド薄膜を經由して大気に取り出され、この条件下において、ダイヤモンドならびに細胞に照射された。

## 4. 研究成果

### 4.1 細胞培養の結果

図 6 にダイヤモンド薄膜部位に付着した細胞の観察画像を示す。細胞形状の違いから、場所ごとに細胞の接着性に差異が生じていることが確認できるものの、ダイヤモンド薄膜表面への細胞の接着と増殖が確認された。

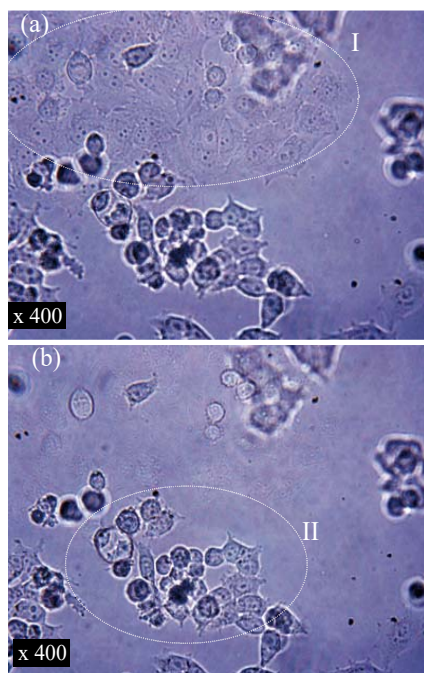


図 6. ダイヤモンド薄膜溝構造の底面近傍に分布している細胞の例。(a)底面近傍と(b)その上部数  $\mu\text{m}$  の光学顕微鏡焦点位置に分布する 2 つの細胞グループ (I, II) が存在。

ダイヤモンド内部に物理的衝撃により発生したクラック構造近傍で継続的に観察を行う限りでは、図 7 のように特段物理構造部分に細胞増殖が集中するような例は殆ど見られなかった。このことにより、細胞培養は表面物理構造には依存せず、ダイヤモンド表面終端等の化学的性質の影響が推定された。本試料ならびに厚さ 300  $\mu\text{m}$  の同一品質光学グレード薄膜 CVD ダイヤモンドを同様の前処理を施したものについて、表面ラマン分光分析を行った結果、細胞培養が可能な試料表面のみに OH 基の存在が確認できた。

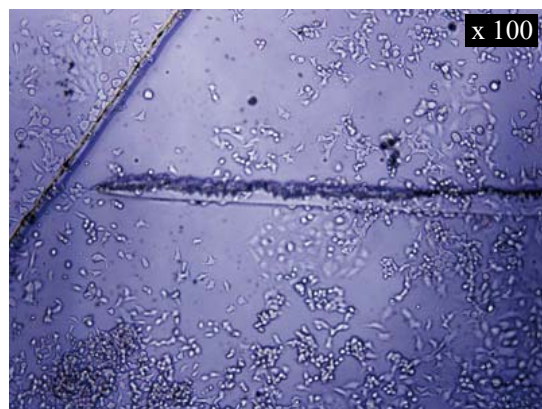


図 7. 薄膜に生じたクラック構造とその周辺に構造に影響を受けずに分布する細胞の光学顕微鏡による観察結果例。

次いで、物理的構造の影響を除いた上で、細胞培養の増殖率を評価することを目的に、微細構造を有さない同一品質光学グレードの単結晶 CVD ダイヤモンド表面に細胞を 3.2 節の要領で培養した。また、同一条件について、通常の細胞培養皿との増殖率を比較した。この結果を図 8 に示す。初期の増殖率が異なるものの、緩やかに増殖率が増加し、最も増殖率の低いダイヤモンド試料例において、20 日以降ではほぼ同程度の細胞密度となった。また一部のダイヤモンド試料においては、細胞培養ディッシュを上回る増殖率が得られた。このことから、本品質のダイヤモンド表面では、増殖率はやや異なるものの細胞培養自体は通常の細胞培養ディッシュにおける条件に近い状態が実現可能である可能性が示唆された。

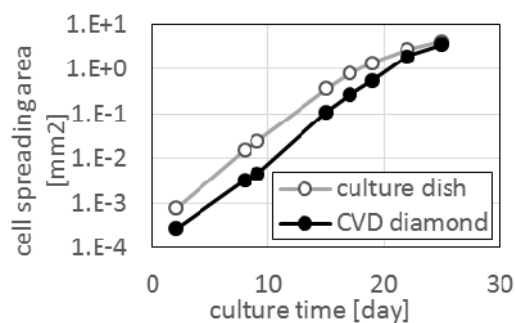


図 8. 通常の細胞培養ディッシュとダイヤモンド上での細胞増殖率の比較例。

#### 4.2 細胞培養環境下での荷電粒子検出

$^{241}\text{Am}$  線源からの  $\alpha$  線照射について、細胞培養環境にあるダイヤモンド薄膜荷電粒子検出器において計測した際の出力信号を図 9 に示す。ダイヤモンド薄膜内部の培地溶液が増加するに従って、(a),(b), そして(c)といったように、画像上端の前置増幅器の出力信号が減衰した[ 図(a),(b)については 5 mV/div, (c)については 2mV/div でそれぞれ計測]。しかしながら、検出器内部の溝構造内部を培地で満たす(c)の条件においても、微弱ながらパルス信号を背景雑音から分離して計測することが可能であり、線形増幅器 (Ortec amplifier 572A) を介してパルスの整形を行うことで、通常の放射線計測と同様に、細胞培養環境に入射する  $\alpha$  線の照射時間 (タイミング) を検出することが可能であった(図 9 各下段信号を参照)。

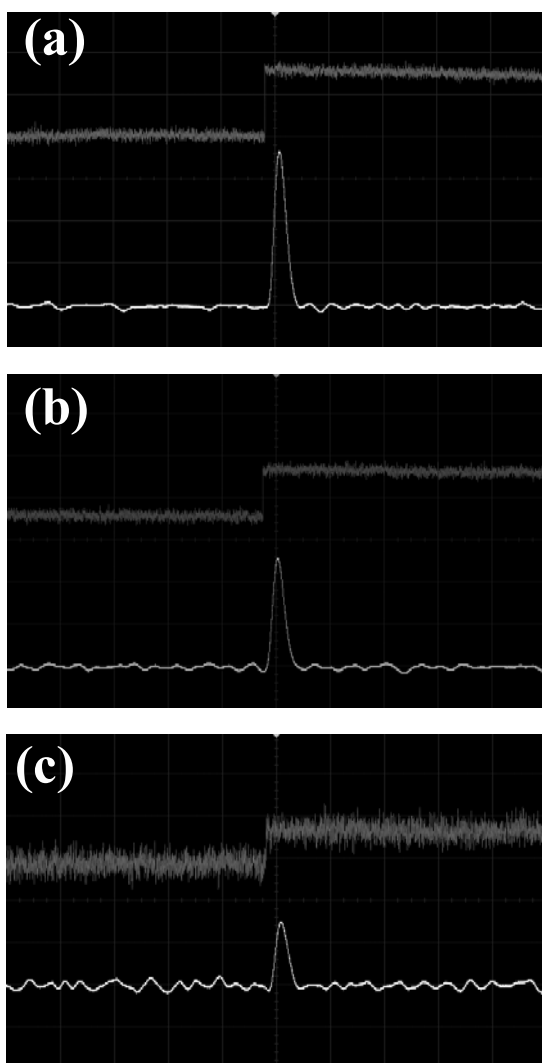


図 9.  $^{241}\text{Am}$  起因の  $\alpha$  線がダイヤモンド薄膜に入射した際に発生する放射線誘起過渡電荷信号の例. (a)細胞のみ、(b)薄膜溝構造の半分程度を培地で満たした条件、(c)溝構造をほぼ培地で満たした条件での前置増幅器出力(上段)と線形増幅器を経たパルス出力(下段)。

#### 4.3 集束ビーム照射下でのエネルギー分析

$\alpha$  線照射に利用された細胞と同一種の細胞を導入したダイヤモンド薄膜検出器から培地を取り除き、大気取り出し条件で 3 MeV 集束陽子線を照射した。荷電粒子照射時および同一条件での背景雑音をスペクトルとして計測した例を図 10 に示す。本実験体系では、特性 X 線を計測することで、ダイヤモンド表面の元素を分析することが可能であった。ダイヤモンド表面にリンやカルシウムなどの細胞構成元素が複数の円形状で均一に分布していることから、ダイヤモンド表面に細胞が固着している様子が確認できた。さらに荷電粒子照射量を制限し、十数 cps から 1000cps 以下でダイヤモンド薄膜内部でのイオンビーム誘起過渡電荷 (IBIC) の計測を行った。ダイヤモンド溝方構造部分に合致するように検出器前方に 2mm  $\Phi$  のアパーチャーを設置したため、得られた IBIC スペクトルはほぼ単一のピークを有した。また、荷電粒子照射下以外では信号計数が得られなかった。薄膜表面に細胞が分布するため、エネルギー Spektrum がガウス分布に対し、やや低エネルギー側に裾を有する形状となったと考えられる。

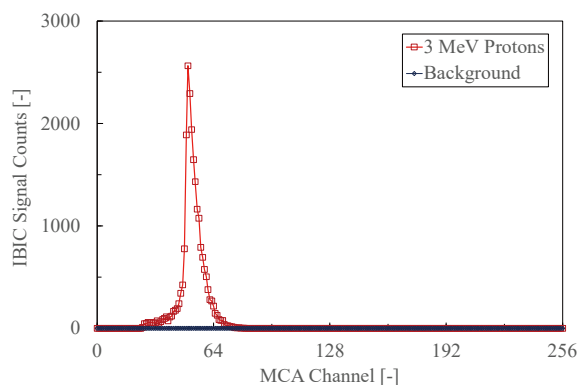


図 10. 細胞培養構造内包型ダイヤモンド薄膜検出器による 3MeV 集束陽子線照射時のイオンビーム誘起過渡電荷 (IBIC) スペクトルと背景雑音スペクトル. IBIC スペクトルはやや低エネルギー側にガウス分布から外れたテールを観察.背景雑音は同一範囲で計数が得られず、荷電粒子起因の信号であることを確認。

本研究では、細胞培養環境を内包するダイヤモンド薄膜型検出器について、その基礎デザインと細胞培養、さらには細胞環境下での荷電粒子応答の原理実証までを行った。反応性イオンエッチングにより、一般的に検出器に利用される電子デバイス品質よりやや結晶品質に劣る光学グレードの単結晶ダイヤモンドにおいて、細胞培養に適した溝方構造を形成することが可能となった。細胞培養条件下においても、荷電粒子照射時に薄膜部分にて電荷収集が可能なることを確認した。本特性は、生体試料への荷電粒子照射実験をおこなう上で必要不可欠である。

本研究で成果で原理実証された細胞培養環境内包型のダイヤモンド薄膜による荷電粒子検出器は、生体とセンサデバイスを結びつける技術であり、この応用範囲は単なる荷電粒子の生体照射検出用途への応用のみならず、多様な生体組織とダイヤモンドセンサデバイスを結びつける新たな研究展開を可能とすると想定できる。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

1. M. Sakai, W. Kada, M. Pomorski, and O. Hanaizumi, Living-cell Cultivation on a CVD Diamond Dosimeter, 2<sup>nd</sup> International Symposium of Gunma University Medical Innovation, Maebashi, Japan, 8<sup>th</sup> December (2015).
2. M. Sakai, Current R&D Status on Micro Dosimetry and Three-dimensional Dosimetry Technique using Compton Camera for Heavy Ion Radiation Therapy at Gunma University, The 11th International Workshop on Radiation Effects on Semiconductor Devices for Space Applications (11th RASEDA) & The 7th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (7th AMDE), Kiryu, Japan, 12<sup>th</sup> November, (2015) [Invited].
3. W. Kada, M. Sakai, M. Pomorski, V. Grilj, N. Skukan, Y. Kambayashi, T. Makino, M. Jakšić, S. Onoda, T. Ohshima, T. Kamiya, and O. Hanaizumi, Living cell cultivation on single-crystal CVD diamond membrane, 9th International Conference of New Diamond and Nano-Carbon (NDNC2015), Shizuoka, Japan, 25<sup>th</sup> May (2015).
4. 加田渉、酒井真理、Pomorski Michal、Grilj Veljko、Skukan Natko、神林佑哉、牧野高紘、Jakšić Milko、小野田忍、大島武、神谷富裕、花泉修、荷電粒子検出器となる薄膜型単結晶 CVD ダイヤモンド上での細胞培養の試み、2015 年(平成 27 年) 第 62 回応用物理学会春季学術講演会、2015 年 3 月 11 日-14 日、平塚、神奈川、日本 [12a-P3-3](2015).
5. M. Sakai, W. Kada, M. Pomorski, and O. Hanaizumi, CVD Diamond Dosimeter Dish for Living-cell Cultivation, 1<sup>st</sup> International Symposium of Gunma University Medical Innovation, Kiryu Japan, 5<sup>th</sup> December (2014).

[その他]

ホームページ等

<http://www.el.gunma-u.ac.jp/~hana/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

加田 渉 (KADA, Wataru)

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：60589117

##### (2)研究分担者

酒井 真理 (Makoto, Sakai)

群馬大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70727338