

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20760047

研究課題名 (和文) 神経細胞チップのX線マイクロビーム照射実験による神経伝達機構の解明

研究課題名 (英文) Research on mechanisms of neural transmission by neuron cell chip and X-ray microbeam irradiation system

研究代表者

佐藤 文信 (SATO FUMINOBU)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：40332746

研究成果の概要 (和文)：

半導体、細胞工学の技術を用いて、培養シャーレ内に神経細胞様モデル細胞PC12が人工的に配置された神経細胞チップを開発した。PC12細胞の人工配列には、ガラス基板上に細胞接着性層のパターンをリソグラフィで製作し、次に、ガラス基板は滅菌後、PC12細胞を蒔種、インキュベータ内で培養し、神経成長因子によって分化させた。さらに、神経回路を構成する特定の単一細胞にX線マイクロビームを照射し、放射線照射影響による細胞核の損傷、修復などについて蛍光免疫染色法やパッチクランプ法を用いて調べた。

研究成果の概要 (英文)：

A cell chip on which PC12 cells were artificially-arranged was developed by use of techniques of semiconductor device fabrication and biotechnology. Patterned layer for cellular adhesiveness was printed on a glass plate by lithography. After sterilizing the glass plate, the PC12 cells were seeded on the glass plate and cultured in an incubator. The neural differentiation of the PC12 cells was induced by nerve growth factor. Some PC12 cells on the cell chip were irradiated by X-ray microbeam. The radiobiological effects such as damage and repair in the target cell were investigated by immunofluorescence staining and patch clamp methods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎・応用物理学一般

キーワード：放射線、細胞照射

## 1. 研究開始当初の背景

国内・国外の幾つかの研究所（米国 Columbia University など）では、イオンビーム加速器や放射光施設に細胞照射用マイクロビームラインが設置されている。さらに、

マイクロビームを用いたバイスタンダー効果などの単一細胞レベルでの細胞死に関する研究が進められている。個別に細胞死を誘発するためには、極細プローブやレーザー光を利用した方法も考えられるが、それらの方

法ではターゲット細胞に機械的、熱的損傷を与えることが出来るものの、放射線誘起による生化学的効果は期待できない。それに対して、高エネルギー荷電粒子、X線によるマイクロビーム照射では、ターゲット細胞のみを放射線電離作用によって細胞死を誘導することが可能である。放射線生物学分野ではマイクロビームを用いた新しい研究展開が期待され、それに伴って照射技術の高度化が望まれている。

しかし、従来のマイクロビーム実験では、照射強度、ビーム品質など高い性能を有するが、大型装置であるために特別な条件の実験は不向きである。そこで、研究代表者は卓上型X線マイクロビーム照射装置を開発した。開発したマイクロビーム照射装置は50kVマイクロフォーカスX線源とX線導管で構成され、ビーム径10 $\mu$ mのX線ビームをターゲット細胞に吸収線量率0.1Gy/sまで照射することが出来る。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、半導体、細胞工学の技術を用いて神経回路が人工的に設計された神経細胞チップを開発する。さらに、神経回路を構成する特定の単一細胞にX線マイクロビームを照射し、その影響による神経回路の情報伝達特性の変化(損傷、修復など)について調べる。神経細胞チップは細胞培養用シャーレ上にフォトリソグラフィ等の微細加工技術を利用して、個々の細胞を収容するマイクロピットや神経突起を誘導するためのマイクロチャンネルが形成されている。はじめに、神経突起(樹状突起、軸索)が未成長の培養細胞を蒔種する。次に神経成長因子薬剤を投与することによって情報を伝達するための神経突起を発現させて、人工的に設計された神経回路が形成される。神経回路の情報伝達の様子は、細胞チップの微細電極や蛍光分子プローブ試薬によって測定する。次に細胞チップ内の特定細胞にX線マイクロビームを照射し、神経死を誘導することで、神経ネットワークの一部が遮断される様子や、細胞の自己回復によって修復される様子を観測する。

## 3. 研究の方法

神経回路中の単一細胞が機能低下した場合、回路全体にどのような影響を及ぼすかについて、神経細胞チップを用いたX線マイクロビーム照射実験を計画している。マイクロビームと細胞チップの技術を組み合わせることで、神経回路の状態を細胞単位で解析的に調べることが出来ると考えた。

本研究計画は、主に(1)神経細胞チップの開発、(2)X線マイクロビーム照射実験の神経細胞観測システムの開発、(3)神

経細胞チップのX線マイクロビーム照射実験に大別される。

細胞チップの製作工程では、厚さ0.5mmの蛍光ガラス基板表面にMEMS製作用のネガタイプのリソレジストSU-8を塗布する。SU-8の厚さは1 $\mu$ mである。フォトマスクを被せ、紫外線露光した後、デベロッパ溶液によってレジストパターンを形成させる。フォトマスクのリソレジストパターンは、大きさ50 $\mu$ m $\times$ 50 $\mu$ mの格子が150 $\mu$ m間隔で並び、それぞれの格子間は幅5 $\mu$ mのチャンネルで結ばれている。次に、細胞チップ基板をプラズマ表面処理し、メタノール、純粋で洗浄した後、コバルト60 $\gamma$ 線を用いて滅菌する。

培養液(DMEMに10% Horse Serum+5% FBS)で満たされたシャーレ内に細胞チップを置き、PC12細胞を蒔種し、炭酸ガスインキュベータで24時間培養する。光学顕微鏡観察でPC12細胞が選択的にSU-8上に接着していることを確認した後、神経成長因子NGFを投与し、PC12細胞の分化を誘導する。1週間後には、格子間のチャンネル上に神経突起が成長し、格子間が軸索、樹状突起で結ばれていることが確認できた。

卓上型のX線マイクロビーム発生装置は光学防振台上に設置されており、装置の大きさは、幅30cm、奥行き50cm、高さ60cmである。マイクロX線ビーム発生部は、市販のマイクロフォーカスX線管を用いている。マイクロフォーカスX線管のターゲットにはRhを用い、最大管電圧は50kV、最大管電流は1mA、最小電子ビーム径は約70 $\mu$ mである。また、さらに細いX線ビームを生成するために、発生したX線を1mm厚で、孔径25 $\mu$ mのタングステンコリメータを用いてビームを整形している。試料ステージおよび試料の観察は、光学顕微鏡コンポーネントを使用している。従って、X線照射中も通常の顕微鏡観察が可能となっている。また、顕微鏡観察視野内にX線マイクロビームが照射されるように調整するために、マイクロフォーカスX線管とタングステンコリメータは独立したXYZステージに設置されている。X線ビームは、光学顕微鏡部の対物レンズ用レボルバーに開発した小型CCDカメラが取り付けられており、それを持ちいてX線マイクロビームの位置調整を行う。

X線マイクロビームの強度とエネルギースペクトルは、試料位置にシリコン半導体検出器を取り付けて測定を行った。X線エネルギースペクトルは、2.7keVのRh-L、20keVのRh-K $\alpha$ 、そして、22keVのRh-K $\beta$ の特性X線と制動放射による広がりをもったスペクトルとなっていた。

また、ターゲット細胞位置におけるX線マイクロビームの強度分布については蛍光ガラス線量計材料を用いて調べた。蛍光ガラス

線量計材料は、メタリン酸ナトリウムとメタリン酸アルミニウムを混合したガラスに、ラジオフォトルミネセンス蛍光中心をもつ銀をドーブした材料である。蛍光ガラスは、放射線に高い感度を持ち、放射線積算量に比例して、紫外線励起によるオレンジ色の蛍光を放つ性質を持っている。従って、ガラス線量計板をサンプルステージに設置し、蛍光観察を行うことで正確な X 線ビームプロファイルを測定することが出来る。孔径  $25\ \mu\text{m}$  のタングステンコリメータを用いたときの X 線ビーム径は  $25\ \mu\text{m}$  となっている。また、 $100\ \mu\text{m}$  以上のコリメータを用いた場合は、X 線ビームは大きな拡がりをもっており、ターゲット位置でのビーム径は 10-20%程度大きくなって観察される。

ターゲット細胞の X 線マイクロビームに対する照射線量は、電子光子輸送計算コード EGS5 で評価した。放射線源にシリコン半導体検出器で測定された X 線エネルギースペクトル、ビーム径は試料位置で  $25\ \mu\text{m}$  になるように入力データを作成した。ターゲット細胞は 0.5mm 厚のガラス基板の底に置かれ、上部は水液で満たされており、X 線マイクロビームは下方からガラス基板を通過して照射される。細胞の吸収線量率は試料位置に水分子で構成された直径  $30\ \mu\text{m}$  の球で模擬し、最大  $0.1\text{Gy/s}$  程度と算出された。

細胞の X 線照射実験では、製作された細胞チップを試料ステージにセットし、細胞の形態を観察しながら実験を進めた。PC12 細胞のカルシウム濃度は Fluo-3-AM 試薬で調べた。また、X 線照射後、DNA 二重鎖切を調べるために、 $\gamma\text{-H2AX}$  抗体を用いた蛍光観察を行った。

また、別の照射実験では X 線マイクロビーム照射装置にパッチクランプシステムを導入し、X 線照射に伴う細胞膜の電位の変化を測定した。

#### 4. 研究成果

はじめに、神経細胞チップの特性を調べるために、神経細胞の活性状態を Fluo3-AM ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 蛍光試薬と微小電極プローブを用いて、細胞チップ内に配置された細胞内のカルシウム濃度イメージを測定した。特定の細胞に微小電極プローブで刺激を与えて、カルシウム濃度の変化をビデオカメラで撮像した。カルシウム濃度の変化による情報伝達実験では、神経細胞チップ内の PC 1 2 細胞は通常方法で培養されたコントロールサンプルと比べて、大きな違いがないことが示された。

次に、細胞チップを用いた X 線マイクロビーム照射実験をおこなった。最大吸収線量  $10\text{Gy}$  までにおいて、X 線マイクロビーム照射中の PC12 細胞のカルシウム濃度変化は測定時間内では大きな変化はなく、照射後 2 0 分程度の観察では、わずかに変化がみられる細胞

もあったが、顕著な変化は見られなかった。高線量照射された細胞については、細胞死などによって徐々にカルシウム濃度の変化が生じることが考えられるが、蛍光プローブ性能の低下が生じるために、実際に X 線照射によってカルシウム濃度の変化については確かめることは出来なかった。ただし、過酸化水素水などを細胞チップに投与した場合、急激なカルシウム濃度の変化は観測されている。独国の研究グループによって類似した実験が実施されているが、放射線照射に伴う過渡的なカルシウム濃度の変化については、細胞種に依存することが示されている。

また、X 線マイクロビーム照射後、1、6、12、24 時間後にターゲット細胞核の DNA 二重鎖切について調べた結果では、1 時間後に最も DNA 二重鎖切のフォーカスが多く観察され、24 時間後においては 1 時間の結果にくらべて 20%まで減少していた。これは、放射線によって損傷した DNA が修復酵素によって修復されているためである。従って、ターゲット細胞は十分に X 線照射が行われたが、顕著なカルシウム濃度の変化はなかったと考えている。

さらに、パッチクランプ法を用いて、X 線照射中における細胞膜の電気的特性を調べた。照射サンプルは HeLa 細胞である。X 線ビームを吸収線量率  $0.1\text{Gy/s}$  で  $2\text{Gy}$  まで照射し、細胞膜の電流変化を調べた。照射前におけるパッチ電極からの応答は、通常のパッチクランプ実験の結果とほぼ同じである。ただし、X 線照射中においては、まだ、実験結果の信頼性は低く、十分な実験データが取得されていない。その原因として、マイクロフォーカス X 線管に高電圧を印加した時に、電子雑音が生じて、正確な測定が出来ていないからである。しかし、X 線照射後では、パッチクランプアンプは正常に動作するために照射後における細胞膜電位については十分な実験結果が得られている。

パッチクランプ法では、電圧を変化させて、細胞膜に電流を測定する。未照射時では細胞膜の電気的等価回路モデルとして Hodgkin-Huxley モデルが有名である。Hodgkin-Huxley の等価回路モデルでは数個の電源、可変抵抗、コンデンサーの組み合わせとなっており、細胞膜の生化学的機能について電源の電位と可変抵抗の変化によって説明することが可能である。

HeLa 細胞に  $5\text{Gy}$  まで X 線照射した結果では、細胞膜に流れる電流は徐々に変化、24 時間後で 3 桁程度増加した。また、印可電圧のステップ応答から算出される細胞膜の静電容量も減少することがわかった。従って、放射線照射によって、Hodgkin-Huxley モデルにおける、抵抗器、コンデンサーが減少することに対応している。これらの実験結果につ

いての詳細な考察はまだであるが、放射線照射によって、細胞死が誘発される過程で細胞膜内のイオンチャネルの機能低下または意図的に細胞外のイオンを取り込んでいると考えられる。

パッチクランプ実験については引き続き実験の継続を行う。特に、X線照射中のデータが取得できるように装置の改良は不可欠である。また、生化学的な実験と組み合わせることにより、放射線照射下でのイオンチャネルの特性について調べることは重要課題であると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) T. Kuchimaru, F. Sato, S. Tanaka, I. Murata, Y. Kato and T. Iida, "Development of cell chip based on track detector for examination of biological damage by alpha particles", Journal of Nuclear Science Technology, 47, 12, 1206-1210 (2010).

(2) Y. Aoi, T. Kuchimaru, D. Maki, F. Sato, T. Ikeda, Y. Kato, T. Yamamoto, and T. Iida, "Radiophotoluminescent observation of X-ray microbeam track in silver-activated phosphate glass", Japanese Journal of Applied Physics 48, 056001 (2009).

(3) T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Aoi, T. Fujita, T. Ikeda, K. Shimizu, Y. Kato and T. Iida, "Microchamber arrays for the identification of individual cells exposed to an X-ray microbeam", Radiation and Environmental Biophysics, 47, 535-540 (2008).

〔学会発表〕(計2件)

(1) 田中聡一、豊田康英、高橋宏典、佐藤文信、清水喜久雄、加藤裕史、飯田敏行、"単一細胞のX線ビーム照射実験"、日本放射線安全管理学会第9回学術大会、広島大学、平成22年12月1-3日。

(2) C. Inagawa, Y. Aoi, T. Kuchimaru, F. Sato, Y. Kato and T. Iida, "Development of live cell chips to research effects of X-ray radiation to neuronal cells", 2<sup>nd</sup> Asian Congress of Radiation Research, Seoul, Korean, May 17-20, (2009).

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 文信 (SATO FUMINOBU)  
大阪大学・工学研究科・助教