

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360041

研究課題名（和文）

X線マイクロビームを用いた神経細胞回路作成技術の開発

研究課題名（英文）

Development of Neuron Circuit Fabrication Method with X-Ray Microbeam

研究代表者

飯田 敏行（IIDA TOSHIYUKI）

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60115988

研究成果の概要（和文）：X線マイクロビーム照射によって、特定された単一神経様細胞（PC12）の神経分化誘導に成功した。ただし、神経成長因子（NGF）を使用した分化に比べて、神経突起の伸張は短く、最大の分化誘導率は吸収線量 15Gy で 14% である。また、リソグラフィ技術を用いて培養細胞を特定の位置に固定する細胞チップを開発し、PC12 細胞を培養することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Differentiation of PC12 cell can be individually induced with X-ray microbeam. Neurite extension for the PC12 cell differentiated by radiation was small, compared to normal extension by nerve growth factor (NGF). The maximum differentiation was 14% at absorbed dose 15 Gy. A cell chip to arrange individual cell positions was fabricated with lithography and cell technology. PC12 cells were successfully incubated in the cell chip.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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、マイクロビーム、神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

（1）生命科学分野の重要な研究の一つに神経回路に関する研究がある。そして、生命科学分野以外でも、神経回路網の論理モデルが文字・音声認識やロボットの運動制御等に適用され、神経回路研究の重要性が高まりつつある。生命体中の神経細胞は、シナプスを介して複雑な神経回路（ニューラルネットワーク）を形成し、その情報伝達機構については、解明が進みつつある。その一方で、神経回路形成機構については未だに解明されてい

い点が多い。神経細胞は遺伝子に支配されたプログラムに従って正しい位置に配置され、神経突起を成長させ他の細胞と結合する。また、正しい神経回路を残すため、誤った神経回路は除かれることが最近判りつつある。しかし、遺伝子プログラムを操作して、任意の神経回路を形成させる技術はまだ先の話である。工学的なアプローチとしては、神経細胞を人工的に配置して、その特性を調べる方法が幾つか提案されている。

（2）我々のグループでは、フォトリソグラ

フィ技術を利用して、基板上にエポキシ系有機膜層を形成し、特殊なタンパク質を介して細胞を正確に配置する方法を開発した。この方式は、既に報告されているプリント方式に比べて、細胞の接着効率が大きく、複雑なパターンの形成が可能である。

(3) 我々のグループはこれまでに、卓上型 X線マイクロビーム照射装置を開発している。国内外のマイクロビーム照射実験は、イオンビーム加速器や放射光施設等の大型装置を利用して行われてきたが、卓上型 X線マイクロビーム照射装置を利用すれば、目的を絞った研究グループの実験能率が大幅に向上し、より複雑な実験条件を設定することも可能となる。

(4) 我々の研究成果の一つに、X線照射誘導による PC12 細胞の分化制御の成功がある。神経突起は、通常、神経成長因子 (NGF) 薬剤を投与することによって成長させることができる。さらに、PC12 細胞は NGF 薬剤投与無しの場合でも、X線照射によって分化するユニークな特性を持つことが判ってきた。X線照射に伴うラジカルが分化誘導のトリガーとして働くためと考えられるが、詳しいメカニズムは判っていない。

## 2. 研究の目的

X線マイクロビームを用いた個々の細胞の分化誘導技術を開発する。さらに、マイクロ加工技術を用いることで、細胞チップ内で細胞を X線マイクロビーム照射で分化制御することで、精密な人工配列の神経回路が形成できると考えた。そして、本研究で開発する技術により基本的な神経回路が製作できて、それら情報伝達機構のより詳細な解明が期待できる。また、実用の観点からは、神経回路用細胞チップの技術を発展させて、神経細胞と電子素子を組み合わせた新しい視聴覚センサー開発への応用展開が考えられる。

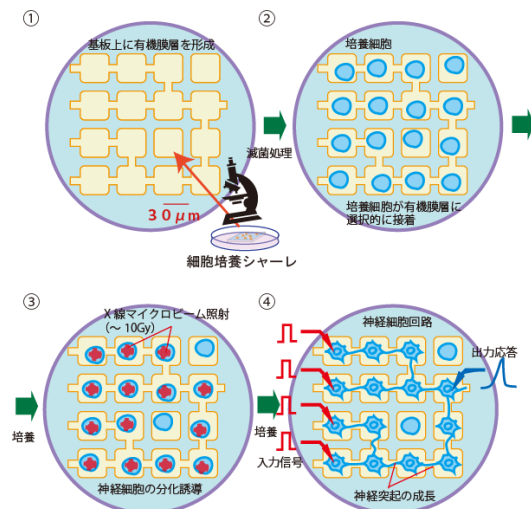


図1 X線マイクロビームを用いた神経回路作成の概要

## 3. 研究の方法

(1) PC12 細胞を人工的に配列するための細胞チップを製作する。図2に細胞チップの製作工程の概略を示している。細胞チップ用基板には、照射線量が正確に測定できるように X線に高い感度を有する蛍光ガラス線量計材料を用いる。この基板利用により、照射細胞と X線マイクロビームの位置関係を蛍光顕微鏡で観測することができる。また、神経細胞の電気応答を測定する場合は、微小電極アレイ付きのガラス線量計基板を選択する。微小薄膜電極の製作には、研究室所有のマイクロイオンビーム装置及びプラズマエッチング装置を用いる。

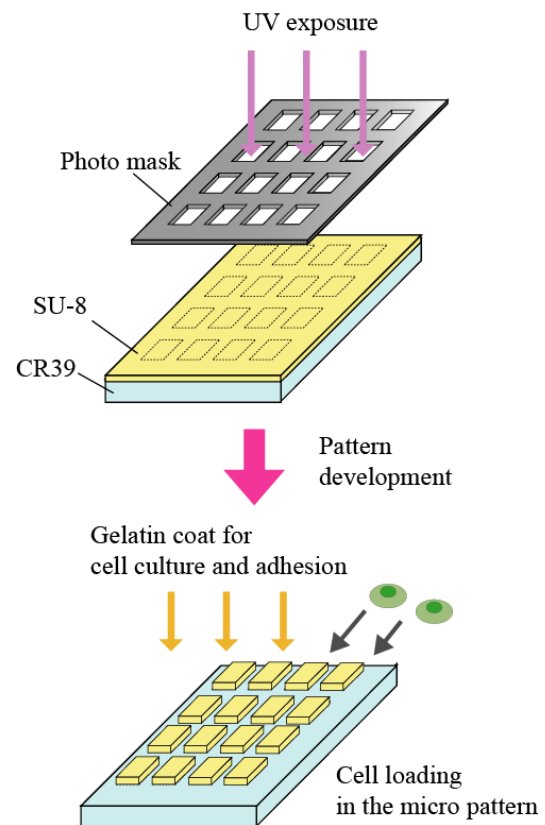


図2 細胞チップの製作工程

次に、基板表面にフォトレジストと培養細胞の足場となるエポキシ系有機層を塗布する。フォトマスクで露光した後、デベロッパ溶液でレジストパターンを形成させる。特に、基板は高純度水で十分に洗浄し、有害な化学物質を除去する。γ線及び熱処理で滅菌処理を行った後、細胞接着用タンパク質を塗布する。細胞を播種し、CO<sub>2</sub>ガスインキュベータで数日培養して配置パターンを形成させる。細胞の健全性は、活性度試薬で調べることができる。

(2) X線ビームをもちいて、PC12 細胞の分化誘導制御実験を行う。未分化 PC12 細胞に照射線量を変えて X線を照射し、照射後イ

ンキュベータで培養し、細胞の形態観察を行う。細胞サイズに対して 10%以上の長さまで神経突起が伸張したものを分化細胞と判定し、分化誘導率は全細胞数に対する分化細胞数の割合で定義した。

#### 4. 研究成果

(1)PC12 細胞を人工的に配置する神経細胞チップを開発した。図3は製作した神経細胞チップの様子である。プラスチック (CR-39) 基板には、リソグラフィ技術を用いて SU-8 フォトポリマー層をパターン形成させて、滅菌処理等を施した後、PC12 細胞をインキュベータ内で培養した。

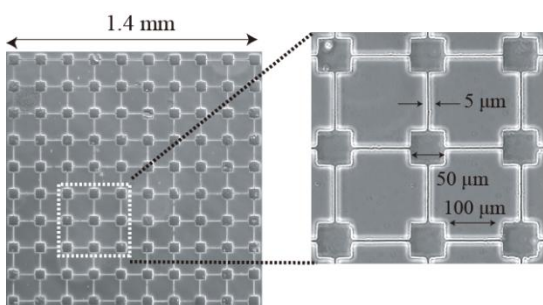


図3 神経細胞チップのパターン形成

図4に示すように、PC12 細胞は基板上的細胞接着性の違いから、SU-8 のパターンに沿って固定される。さらに、神経成長因子で分化させて、人工配列された神経細胞集団を形成させた。

さらに、神経細胞チップ内の細胞の活性化を調べるために、蛍光試薬や細胞増殖率測定を行い、正常に培養されていることを確かめた。

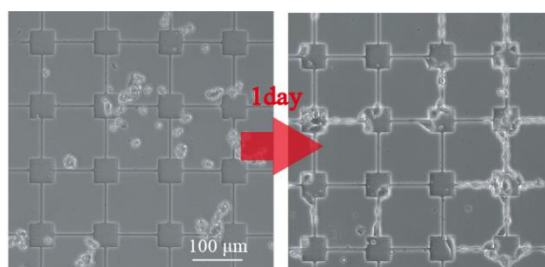


図4 細胞チップ上に人工配置された神経細胞

(2) X線照射誘導による培養細胞 PC12 の分化制御について調べた。X 線照射装置を用いて培養シャーレ内の個々の PC12 細胞を最大吸収線量 20Gy まで照射し、10 日間、炭酸ガスインキュベータで培養し、照射細胞の形態を観察した。

図5はX線による PC12 細胞の分化誘導率の結果である。分化誘導率は、吸収線量の増加とともに増加して吸収線量 15Gy で最大となり、14%であった。この実験結果は、<sup>60</sup>Co

による均一γ線照射による結果ともほぼ一致している。ただし、X線誘導によって分化した細胞の形態は、NGFの投与にくらべて、神経突起の成長は小さいことが特徴であることが判った。図6,7はX線照射によって分化した PC12 細胞の形態である。

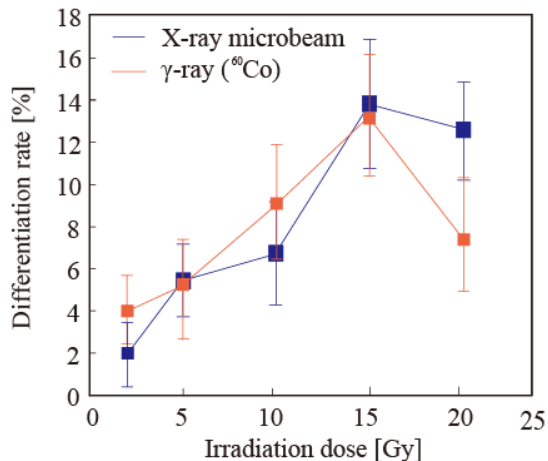


図5 X線マイクロビームによる PC12 細胞の分化誘導率

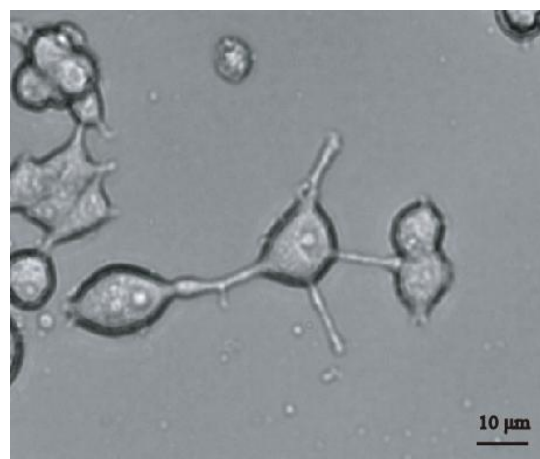


図6 X線照射によって分化した PC12 細胞 (光学顕微鏡観察)

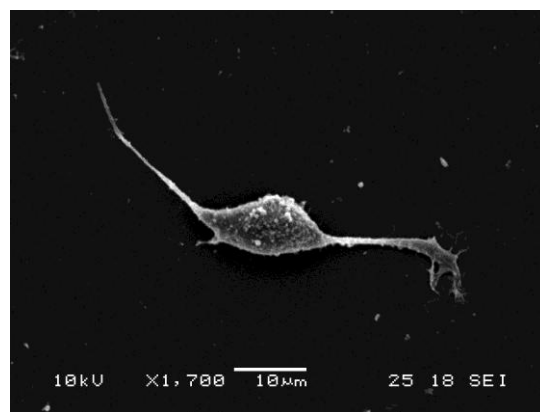


図7 X線照射によって分化した PC12 細胞 (細胞を固定処理し、電子顕微鏡観察)

現在、細胞チップ上に人工配列された PC12 細胞に対して X 線マイクロビーム照射を行った場合、分化誘導率が低いため、任意の神経回路形成が容易でないことが問題となっている。特に、照射しても分化誘導しない細胞を排除し、別の細胞に置き換える方法が必要である。

#### 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 3 件)

- ① 飯田敏行、“マイクロビームが探る新しい世界”、生産と技術 64, No.2 pp.75-78 (2012).
- ② 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 Damages by Alpha Particles”, Journal of Nuclear Science and Technology 47, pp.1206-1210 (2010). (peer-reviewed)  
DOI: 10.1080/18811248.2010.9720987
- ③ 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”, Jpn. J. Appl. Phys. 48, 056001 (2009). (peer-reviewed)  
DOI: 10.1143/JJAP.48.056001

[学会発表] (計 4 件)

- ① 高橋宏典、豊田康英、池田祐希、佐藤文信、清水喜久雄、加藤裕史、飯田敏行,” X線照射された細胞のパッチクランプ実験”, 日本放射線安全管理学会第 10 回学術大会, 2011 年 12 月 1 日、東京工業大学.
- ② 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, 2010 年 12 月 2 日、広島大学.
- ③ 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”, 2nd Asian Congress of Radiation Research, May 17-20 (2009) Seoul, Korea.
- ④ 田中聡一、稲川千津、青位裕輔、牧大介、佐藤文信、加藤裕史、飯田敏行,” X線マイクロビーム照射用神経細胞チップの開発”, 日本保健物理学会第 43 回研究発表会, 平成 21 年 6 月 3 日、大阪.

[その他]

<http://fusion.eie.eng.osaka-u.ac.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

飯田 敏行 (IIDA TOSHIYUKI)  
大阪大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：60115988

##### (2) 研究分担者

加藤 裕史 (KATO YUSHI)  
大阪大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：40224547

佐藤 文信 (SATO FUMINOBU)  
大阪大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：40322746