

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310075

研究課題名(和文)無染色生体組織内での磁気微粒子局在化のADF-STEM解析

研究課題名(英文)ADF-STEM Analysis of Magnetic Particles in Bio-system without Staining

研究代表者

磯田 正二(Isoda, Seiji)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：00168288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,500,000円、(間接経費) 2,550,000円

研究成果の概要(和文)：生体への外部粒子の伝達機構を考える上で、その伝達経路と最終集積部位の同定は生体と粒子系の相互作用の理解に不可欠である。本研究の目的は伝達経路の直接的な空間分布解析を実現する生体試料の高分解能電子顕微鏡解析の方法論を提案することにある。

そのために、軽元素からなる試料でもコントラスト形成可能で、厚い試料でも観察可能である走査型透過電子顕微鏡暗視野法による無染色解析方法を提案した。結果、磁性粒子を導入した細胞試料の無染色電顕観察により、微粒子の細胞内での局在化を解析することができた。

研究成果の概要(英文)： In the transfer mechanism of external particles into the biological system, the identification of pathways and final accumulation sites is essential for the understanding of the interaction of particles and biological systems. The aim of this study was to propose a methodology for high-resolution electron microscopic analysis of biological samples for realizing the direct spatial distribution analysis of the particle transfer.

In this study, a scanning transmission electron microscope dark field method was proposed for the analysis of a specimen mainly composed of light elements such as biological cells, by which we proposed a non-staining and also thick sample analysis. As a result, it was possible to analyze the localization of microparticles in cell samples introduced with magnetic particles by means of the non-staining electron microscopy.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：無染色可視化 暗視野電子顕微鏡 ソフトマテリアル メゾスコピック系

## 1. 研究開始当初の背景

ドラッグデリバリーシステムの研究は、生体への何らかの作用機能を有する材料を作用部位へ選択的に望ましい濃度や時間に送り込む方法論の開発である。その材料は治療薬のこともあれば、予防薬、診断剤などの様々な試薬などのこともある。いずれにせよ、投与された薬剤を作用させるべき部位に確実に伝送されなければならない。これら薬剤の体内分布と同時に細胞内分布の制御を要求される。例えば、ミトコンドリアと糖尿病や癌、心筋梗塞、遺伝病などとの関連が明らかになってきている。その現状では、これらの治療のためには細胞内ミトコンドリアを標的とした薬物送達システムが必須であり、ミトコンドリアの電気的な特性を利用した方法などが提案されている。

このような場合、血管壁や組織間構造物などの伝達と同時に、細胞壁や細胞内オルガネラ膜などの生体バリアの伝達過程を可視化する方法が重要になっている。生体への外部からの材料の伝達機構を考える上で、その伝達経路と最終集積部位の同定は相互作用の理解に不可欠であり、逆に新しい伝達方法の開発にも有用な情報をもたらしてくれるものと考えられる。そこで、注入された薬剤が確実に作用させるべき部位に到達するの可否かの判定を行うための直接的な解析方法の開発が望まれる。

近年発達の著しいレーザー顕微鏡などの光学顕微鏡は大きな発展をみせ、生体での分子動態までも明らかにしつつある。そこでは、特異抗体などを介して蛍光分子や金コロイドなどのマーカーを膜タンパクや脂質に結合させ、運動を可視化することも可能となってきた。しかし、生体分子そのものを直視してはいないことも事実で、相補的なより直接的な観察方法の開発が期待されている。そのことでマーカーを介しない解析が可能となり生体内の直接的な情報を得ることができると考えられる。

電子顕微鏡は動態情報の解析には不向きであり電子線損傷が解析を複雑化するものの、その高い空間分解能は大きな武器である。動的状態解析には、材料の伝達を各時間軸上で急速凍結し観察するとか、電子線損傷の低減のために極低温状態で観察することなどの手法が提案されている。これらを有効に組み合わせるための一方法としてクライオ電子顕微鏡が利用され、膜タンパクの構造解析などに大きな貢献がされてきた。しかし、電子顕微鏡ではもう一つの問題があり、それは像のコントラストである。通常生体試料は炭素、窒素、酸素、水素などの軽元素から構成されていて、光学顕微鏡と同様に、電子顕微鏡下でコントラストの生成が困難であるものが多い。

そのために、古くから試料の固定法と染色法がさまざまな形で開発されてきた。しかし、

染色材料による汚染、染色過程での試料の変質などの問題があり、無処理の試料を解析することが望まれる。たとえば、最近にも化学固定法の問題点が指摘され、従来から信頼されてきた固定方法に警鐘が鳴らされるようになってきた。従って、無染色での電子顕微鏡による生体材料観察が望まれるところであり、本研究の目的はその方法を提案し実施することであり、細胞とナノ材料の相互作用を解明することを計画した。

## 2. 研究の目的

無染色での生体試料の高分解能電子顕微鏡解析のための方法論を提案することであり、具体的にはナノ磁気微粒子の細胞内での伝達集積経路の解析方法の研究を進める。その伝達分布を解析するには電子顕微鏡が有力な方法であるが、従来は細胞組織を何らかの方法で重金属染色することで微粒子と生体の構造的な相互作用を解析してきた。しかし染色の結果、試料のナノスケール重金属汚染を引き起こすこともあり改良すべき点であった。この問題の解決法の一つとして、円環暗視野走査型透過電子顕微鏡(ADF-STEM)法による無染色解析方法を提案する。本方法を用いて、染色汚染されていない細胞を固定して細胞構造を可視化することで、磁気微粒子の細胞内での伝達機構を検討する方法を提示する。このことで、さまざまなドラッグデリバリーシステム解析の方法へと応用できると考えている。

## 3. 研究の方法

我々はADF-STEMを有機材料の無染色観察法を開発を進めてきたので、その方法をさらに生体試料へも展開しようとするものである。研究の開始時には、無染色切片を通常の透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した像とADF-STEM像を比較したところ、ADF-STEMを用いれば、熱散漫散乱を効率的に検出し画像化することで、密度の微小な差異を画像化できることが分かった(Z-contrast)。TEMでは観察できなかった微小な微細構造を明らかにすることに成功した。生体試料系においても無染色の試料を電子顕微鏡下で観察できることが期待される。この方法を用いて、生体系試料へのドラッグデリバリーシステムの代表としての磁気微粒子について、細胞や細菌でのその伝達経路を精査し伝達集積経路の同定を試みる。以下の各項目について順次研究を進めた。

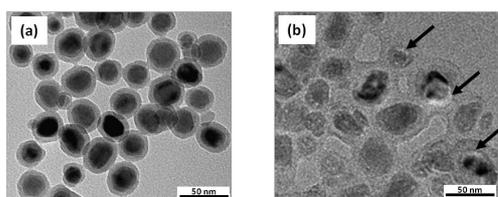
- (i) 磁気微粒子の作成、磁気微粒子の表面修飾による細胞への導入の実施。
- (ii) ADF-STEM像観察法の応用研究。
- (iii) ADF-STEMの利用による細胞試料の無染色電顕観察の試み。
- (iv) ADT-STEMによる磁気微粒子の組織での非局在化。

(v) 研究のまとめ。

#### 4. 研究成果

##### (1) 磁気微粒子の作成

本研究で、生体内伝達の試料として磁気微粒子を選定した理由は以下の3項目である。(i)磁気磁性体であれば、生体内での電子顕微鏡による分布同定が容易であり、生体試料の無染色観察問題の解決だけに研究を専念できる。(ii)MRI センサーや加熱療法剤としての視点から重要な材料であり医学療法的に無害であると考えられている。(iii)磁気誘導により生体内動態を制御できる能動的な標的指向性ドラッグデリバリーや、生理活性に關与する標的タンパクを同定・単離するアフィニティ精製の担体への応用も期待できる。これらを念頭におき、SiO<sub>2</sub>-nanoreactor methodにより、シリカでコーティングされた磁気微粒子(粒径が100 nm以下)を作成し研究に用いることとする。この磁気微粒子はシリカでコーティングされたもので、比較的安定に様々な環境下でも変質することがないし、シリカ表面を利用して化学的物理的修飾が容易である点に特長がある。合成研究者に協力を依頼し、ヘマタイト、マグネタイト、白金鉄の微粒子を作成し、特にサイズと形態の異なる微粒子系を調整する。この微粒子を細胞に取り込ませ、細胞内での局在化を無染色電子顕微鏡法により解析し、微粒子と細胞の相互作用と伝達経路を解明するための標準材料として準備する。下図は代表的な微粒子である。下図(a)はSiO<sub>2</sub>でおおわれたFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>微粒子で、(b)はそれを還元したFe微粒子である。これらを有機分子で修飾し試料とした。



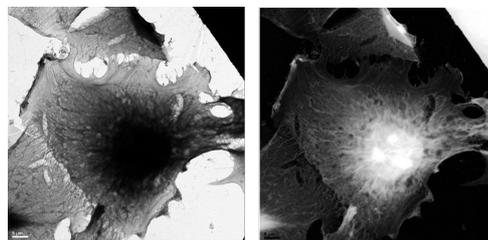
##### (2) ADF-STEM 像観察方法の応用研究

従来のTEM法で撮影した筋肉切片の電顕像とADF-STEMで撮影した類似部位の像を比較した。この両像の違いから明確なように、ADF-STEMでは像コントラストの向上が著しく、微細な構造も浮かび上がって見える。この試料は染色されたものであったが、ともあれ、ADF-STEMの優位性が確認できる。つまり、そのコントラスト、分解能、厚さ依存性のなさ、などの点で優れていると判断される。

##### (3) ADF-STEM の利用による細胞試料の無染色電顕観察の試み。

細胞を固定した状態の試料を、ADF-STEMにより解析した。従来のTEM法では、電子線を試料に入射しそこから発生する散乱電子をレンズで拡大結像するので、試料が厚くなるに従い増加する非弾性散乱電子がレンズの色収差により画像をボケさせ、分解能を大きく損なうことがよく知られている。しかし、AADF-STEM法では、電子ビームの縮小化にはレンズを用いるが、試料により散乱されて以降はレンズを用いていないので、比較的厚い生物試料でも観察可能である。このことを利用して、厚い細胞試料の観察の可能性を探る。

下図は線維芽細胞を明視野と暗視野で観察した場合の違いを検討したものである。左図は明視野で、特に中央部の核の部分は厚さのために、ほとんどその内部構造は判然としない。一方、右図は暗視野像(ADF-STEM)で観察したもので、中央部の厚い核の部分でも可視的なコントラストが生成され、核小体も直接観察できる。このことから明らかなように、レンズの色収差により画像ボケを可及的に低減することのできるADF-STEMは細胞観察に有効な方法であると本研究で結論付けられる。



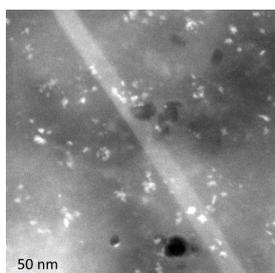
##### (4) ADT-STEM による磁気微粒子の組織での非局在化

本研究は、極低温観察とADF-STEMを組み合わせることで、無染色での生体試料の高分解能電子顕微鏡解析のための手法を提案することにあり、さまざまな生体試料への応用が期待できる。従来の電子顕微鏡法ではコントラストがつかない試料に対しても、ADF-STEMではZ-contrastにより観察可能なコントラストを形成できる。

下図は細胞内に分布する鉄微粒子の空間分布を観察した例である。ADF-STEMでは、暗視野法であることから、重原子微粒子は明るく輝いて観察される。明るい微粒子とともに細胞組織にもコントラストが形成されているので、生体組織と微粒子の空間的な関係を視覚化できることが明らかになった。

この方法で磁気微粒子の生体への伝達機構を解析することで、磁気微粒子をドラッグデリバリーシステムへの展開をするための指針を得ることができると考えている。バイオイメージング材料である半導体量子ドットやフォトサーマル効果のある金属ナノ粒子の生体内分布の観察に利用できる。実際、高分子材

料、有機—金属複合体、カーボン材料とタンパクの複合体の観察など有効に利用できることが期待される。



## 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 15 件)

“Quantitative Imaging of T<sub>g</sub> in Block Copolymers by Low-Angle Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscopy”, Ryotaro Aso, Hiroki Kurata, Takeshi Namikoshi, Tamotsu Hashimoto, Shiao-Wei Kuo, Feng-Chih Chang, Hirokazu Hasegawa, Masahiko Tsujimoto, Mikio Takano, and Seiji Isoda; *Macromolecules*, 査読有, **46**(21), 8589-8595 (2013),

“Integration of porous coordination polymers and gold nano-rods into core-shell mesoscopic composites towards light-induced molecular release”, Kira Khaletskaya, Julien Reboul, Mikhail Meilikhov, Masashi Nakahama, Stéphane Diring, Masahiko Tsujimoto, Seiji Isoda, Franklin Kim, Ken-ichiro Kamei, Roland A. Fischer, Susumu Kitagawa and Shuhei Furukawa; *J. American Chemical Society*, 査読有, **135**(30), 10998-11005 (2013).

“Highly ordered alignment of polymer chains by host-guest cross-polymerization”, Gaetano Distefano, Takashi Uemura Hirohito Suzuki, Masahiko Tsujimoto, Seiji Isoda, Silvia Bracco, Angiolina Comotti, Piero Sozzani and Susumu Kitagawa; *Nature Chem.*, 査読有, **5**(4), 335-341 (2013).

“Role of Adsorption Structures of Zn-Porphyrin on TiO<sub>2</sub> in Dye-Sensitized Solar Cells Studied by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy and Ultrafast Spectroscopy”, Shen Ye, Arunkumar Kathiravan, Hironobu Hayashi, Yujin Tong, Yingyot Infahsaeng, Pavel Chabera, Torbjörn Pascher, Arkady P. Yartsev, Seiji Isoda, Hiroshi Imahori and Villy Sundström; *J. Physical Chemistry, C.*, 査読有, **117**, 6066-6080 (2013).

“Shape Memory Nanopores Induced in Coordination Frameworks by Crystal

Downsizing”, Yoko Sakata, Shuhei Furukawa, Mio Kondo, Kenji Hirai, Nao Horike, Yohei Takashima, Hiromitsu Uehara, Nicolas Louvain, Mikhail Meilikhov, Takaaki Tsuruoka, Seiji Isoda, Wataru Kosaka, Osami Sakata, and Susumu Kitagawa; *Science*, 査読有, **339**(6116), 193-196 (2013).

“Anionic Complexes of MWCNT with Supergiant Cyanobacterial Polyanions”, Okajima, MK.; Maiko K.; Kumar, A.; Fujiwara, A.; Mitsumata, T.; Kaneko, D.; Ogawa, T.; Kurata, H.; Isoda, S.; Kaneko, T.; *Biopolymers*, 査読有, **99**(1), 1-9 (2013).

“Photodynamic and Photothermal Effects of Semiconducting and Metallic-Enriched Single-Walled Carbon Nanotubes”, Murakami, Tatsuya; Nakatsuji, Hirohito; Inada, Mami; Matoba, Yoshinori; Umeyama, Tomokazu; Tsujimoto, Masahiko; Isoda, Seiji; Hashida, Mitsuru; Imahori, Hiroshi; *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, **134**(43), 17862-17865 (2012).

“Modular Design of Domain Assembly in Porous Coordination Polymer Crystals via Reactivity-Directed Crystallization Process”, Fukushima, Tomohiro; Horike, Satoshi; Kobayashi, Hirokazu; Tsujimoto, Masahiko; Isoda, Seiji; Foo, Maw Lin; Kubota, Yoshiki; Takata, Masaki; Kitagawa, Susumu; *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, **134**(32), 13341-13347 (2012).

“Nanotubes Assisted by Self-assembled Peptides Designed in Conjunction with  $\beta$ -Sheet Formation”, Yasuhiko Hashida, tomokazu Umeyama, Jyunya Mihara, Hiroshi Imahori, Masahiko Tsujimoto, Seiji Isoda and Mikio Takano; *J. Pharmaceutical Sciences*, 査読有, **101**(9), 3398-3412, (2012). “Highly photoconducting  $\pi$ -Stacked Polymer accommodated in coordination nanochannels”, Takashi Uemura, Noriyuki Uchida, Atsushi Asano, Akinori Saeki, Shu Seki, Masahiko Tsujimoto, Seiji Isoda, and Susumu Kitagawa; *JACS*, 査読有, **134** (20), 8360-8363 (2012).

“Guest-to-Host Structural Transmission for Stimuli-Responsive Adsorption Property”, Nobuhiro Yanai, Takashi Uemura, Masafumi Inoue, Ryotaro Matsuda, Tomohiro Fukushima, Masahiko Tsujimoto, Seiji Isoda, and Susumu Kitagawa; *JACS. Communication*, 査読有, **134**(10), 4501-4504 (2012).

“A Photoconductive, Thiophene-Fullerene Double-Cable Polymer, Nanorod Device”, Hiroshi Imahori, Shinji Kitaura, Aiko Kira, Hironobu Hayashi, Masayuki Nishi, Kazuyuki Hirao, Seiji Isoda, Masahiko Tsujimoto, Mikio Takano, Zhang Zhe, Yuji Miyato, Kei Noda, Kazumi Matsushige, Kati Stranius, Nikolai V. Tkachenko, Helge

Lemmetyinen, Lidong Qin, Sarah J. Hurst and Chad A. Mirkin; *J. Phys. Chem., Lett.*, 査読有, **3**, 478-481 (2012).

"Effects of Fullerene Encapsulation on Photodynamics of Porphyrin-Linked Single-Walled Carbon Nanotubes", Tomokazu Umeyama, Junya Mihara, Hironobu Hayashi, Naoki Kadota, Vladimir Chukharev, Nikolai V. Tkachenko, Helge Lemmetyinen, Kaname Yoshida, Seiji Isoda and Hirohi Imahori; *Chem. Commun.*, 査読有, **47**(42), 11781-11783 (2011).

"Photoinduced Charge Carrier Dynamics of Zn-Porphyrin-TiO<sub>2</sub> Electrodes – The Key Role of Charge Recombination for Solar Cell Performance", Imahori, Hiroshi; Kang, Soonchul; Hayashi, Hironobu; Haruta, Mitsutaka; Kurata, Hiroki; Isoda, Seiji; Canton, Sophie; Infahsaeng, Yingyot; Kathiravan, Arunkumar; Pascher, Torbjorn; Chabera, Pavel; Yartsev, Arkady and Sundstrom, Villy; *The Journal of Physical Chemistry, A*, 査読有, **115**(16), 3679-3690 (2011).

"Photophysics and Photoelectrochemical Properties of Nanohybrids Consisting of Fullerene-encapsulated Single-Walled Carbon Nanotubes and Poly-(3-hexylthiophene)", Noriyasu Tezuka, Tomokazu Umeyama, Yoshihiro Matano, Tetsuya Ogawa, Seiji Isoda, Kati Stranius, Vladimir Chukharev, Nikolai V. Tkachenko, Helge Lemmetyinen and Hiroshi Imahori; *Energy & Environmental Science*, 査読有, **4**, 741-750 (2011).

〔学会発表〕(計 9 件)

"Surface Modification of 1D Nanostructures", Seiji Isoda; The 5th Symposium of Promotion Center for Global Materials Research (PCGMR), Tainan, Taiwan, 2013/12/12-13.

"Quantitative Imaging of Micro-phases in Copolymers by LAADF-STEM", Ryotaro Aso, Hiroki Kurata, and Seiji Isoda; The 13th Pacific Polymer Conference (PPC 2013), Kaohsiung, Taiwan, 2013/11/17-22.

"Photodynamic and Photothermal Effects of Semiconducting and Metallic-Enriched Single-Walled Carbon Nanotubes for Cancer Cell Killing", Hirotaka Nakatsuji, Tatsuya Murakami, Mami Inada, Yoshinori Matoba, Tomokazu Umeyama, Masahiko Tsujimoto, Seiji Isoda, Mitsuru Hashida and Hiroshi Imahori, 223rd ECS Meeting, Toronto, Ontario, Canada, 2013/05/12-17.

"Molecular imaging by electron microscopy", S. Isoda and H.Kurata, The 30-th Annual Conference of Microscopy Society of Thailand, Chanthaburi, Thailand, 2013/01/23-25.

"Atomic resolution imaging of organic crystals by STEM", Mitsutaka Haruta, Seiji Isoda and Hiroki Kurata; The 9-th Polish-Japanese-Joint Seminar on Micro and Nano Analysis, Sieniawa, Poland, 2012/09/10-13.

"ADF-STEM Analysis for Soft Materials", Ryotaro Aso, Masahiko Tsujimoto, Hiroki Kurata, and Seiji Isoda; The 9-th Polish-Japanese-Joint Seminar on Micro and Nano Analysis, Sieniawa, Poland, 2012/09/10-13.

"ADF-STEM Imaging of Block Copolymers without Staining", Ryotaro Aso, Mitsutaka Haruta, Takeshi Namikoshi, Tamotsu Hashimoto, Hiroki Kurata and Seiji Isoda; The International Union of Materials Research Societies - International Conference in Asia (IUMRS-ICA), Taipei, Taiwan, 2011/09/19-23.

"Environmentally-friendly Materials as Photosensitizers for Dye-sensitized Solar Cell", H. Takano, S. Isoda, M. Tsujimoto, M. Adachi, T. Kiyomura, T. Nemoto and H. Kurata; The International Union of Materials Research Societies - International Conference in Asia (IUMRS-ICA), Taipei, Taiwan, 2011/09/19-23.

"Mesocrystalline Structure of Copper Oxalate Nanocrystals", Jean-Christophe Valmalette, Tetsuya Ogawa, Julien Romann and Seiji Isoda; E-MRS conference, Nice, France, 2011/05/09-13.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯田 正二 ( ISODA, Seiji )  
京都大学 物質-細胞統合システム拠点  
研究者番号 : 00168288

(2)研究分担者

高野 幹夫 ( TAKANO, Mikio )  
京都大学 物質-細胞統合システム拠点  
研究者番号 : 70068138

(3)連携研究者

なし