

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651106

研究課題名(和文)イオンビームによる細胞へのドーピングと細胞機能修飾

研究課題名(英文)Functional modification of live cells by focused ion beam doping

研究代表者

品田 賢宏 (Shinada, Takahiro)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノエレクトロニクス研究部門・研究部門付

研究者番号：30329099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請代表者らが半導体物性制御用に世界に先駆けて開発した単一イオン注入技術(イオンを1個ずつ数10nmの精度で注入可能)を応用して、ドーパント原子を生きた細胞に注入し、細胞機能修飾を試みた。具体的には、細胞注入用のイオン注入装置を開発し、筋芽細胞(C2C12)およびがん細胞(HeLa)にAuおよびAsイオンを注入を試みた。その結果、コントロール(未注入)と比較し、細胞活性が変化することを確認した。イオン注入法による細胞活性の変化を観測した、恐らく初の成果である。イオン照射による“損傷”に基づく改質ではなく、イオンを生きた細胞に“注入”し、細胞に物質を導入する新しい手法を提案した。

研究成果の概要(英文)：A novel heavy-metal implantation method for living cells using focused ion-beam (FIB) were proposed. We performed Au and As ion doping into living cells by using the FIB implantation method; then intracellular level of adenosine triphosphate (ATP) molecule, which is the energy storing molecule for organisms, was evaluated. The ATP level of the implanted cells was found to be modified compared with that of the non-implanted control cells. Our ion implantation technique may be a more accurate tool to quantitatively elucidate the dose-dependent effects of dopants than the conventional methods.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：量子ビーム科学

キーワード：ドーピング イオン注入

1. 研究開始当初の背景

生命現象を解明するために、マイクロインジェクションに代表される細胞膜を透過しない物質を生きた細胞に導入する手法は、細胞生物学研究において常套手段となっている。しかし、導入可能な細胞腫が限られる他、環境によって導入効率が変化し、また、導入できたとしても導入の度に条件設定が必要などの課題がある。イオンビームも特定の目的に応用されているが、従来、高エネルギー重イオンを細胞に貫通させ、“照射損傷”の導入によって細胞機能変異を誘導する仕組みであり、打ち込まれるドーパント原子自体を機能改質に適用する試みはこれまでなかった(図1)。本研究では、イオン照射による“損傷”に基づく改質ではなく、イオンを生きた細胞に“注入”し、細胞に物質を導入する新しい手法を提案する。

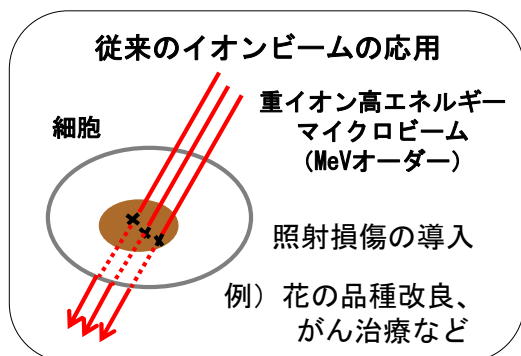


図1 従来の高エネルギーイオンビーム“照射”による細胞機能修飾

従来、ナノスケール半導体の電気的特性制御を目的として、単一イオン注入法によって半導体へのドーピングを試みてきたが、生命科学への応用を模索する過程で先験的な Au ナノ粒子の治療効果にヒントを得て、半導体のみならず生きた細胞へのドーピングを着想した。単一イオン注入技術が有する、注入イオンの個数制御性、数 10nm の位置制御性と合わせて、10 数種類に及ぶ注入可能なイオン種の多様性が、細胞機能の解析と制御に有力な新手法を提供するものと考えてに至っ

ている。

2. 研究の目的

本研究では、イオン照射による損傷に基づく改質ではなく、単一イオン注入法を用いてドーパントイオンの個数を制御して生きた細胞に“注入”し、細胞応答機構を解明することを目的とした(図2)。具体的には、慢性関節リウマチなどの治療に実績のある Au、抗がん剤シスプラチンに含まれる Pt を手掛かりに、細胞への Au もしくは Pt などのイオン注入を実施、細胞機能評価を通じて生きた細胞に対するドーピング効果を検証した。本研究2年目には、注入可能なイオン種を拡大して、がん細胞への注入を試み、がん細胞増殖抑制もしくは死滅効果を有する元素を探索し、がん治療に有用な知見を得ることを目指した。

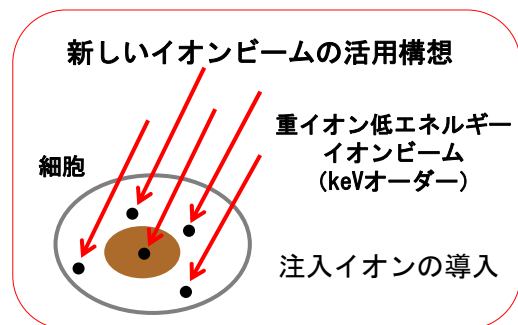


図2 低エネルギーイオン“注入”による細胞機能修飾

通常、重金属の過剰摂取は細胞のアポトーシスをもたらすのが常識であるが、ドースを精密に制御して細胞の特定部位に狙い撃ちすることで作用機構に新たな知見獲得が予想できる。学術的には、半導体ナノテクノロジーとバイオサイエンスとの真の融合を目指す試みであり、半導体分野では一般的なイオン注入技術を活用し、細胞機能解析に新しい手法を提案する意義があったと自己評価している。

本研究の真価は、社会的ニーズの高いがん治療に有効な元素を発見することにあつた

と言える。制がん剤の1つである白金製剤の原型はシスプラシンで、その発見は白金電極を用いた細菌培養で電流を流すと細菌の発育が阻害される知見に基づいている。この様にシンプルな実験系での発見が創薬に重要な発見をもたらしている。

厚生労働省人口動態統計によると、今日、死亡原因の第1位は悪性新生物(がん)であり、全ての死亡者に対するがんによる死亡者の割合は3割を越え、3人に1人はがんで死亡しているのが現状である。がんが克服されると、平均寿命が男性で約4歳、女性で約3歳延びるとされており、社会的インパクトは言うまでもなく大きい。半導体物性制御用に開発された精密なイオン注入法による細胞機能修飾を通じて、生命現象の解明を通じて予防、診断、治療に貢献し、科学研究費補助金の中核たる基盤研究に繋げる確かな基礎を築けるかが鍵である。

3. 研究の方法

研究期間を平成24年度～平成25年度の2年間とし、2つの研究項目に取り組んだ。具体的には、(1)AuおよびAsイオンを細胞に注入し、細胞機能を評価、(2)注入イオン種を拡大してがん細胞増殖阻害もしくは死滅に有用な元素を探索、効果を検証した。

半導体用に設計されたイオン注入装置では、ロードロック室が大きく真空排気に時間を要するためスループットが低い他、 10^{-9} Torr程度の真空度が維持されており、凍結されているとはいえ水分を含んだサンプルによる真空度低下が放電を誘発し、装置への負荷が大きい問題が生じたため、細胞専用イオン注入装置を設計・試作し、所期性能を確認した段階にあった。凍結状態の細胞が高真空環境に耐えることを確認し、治療効果が確認されているAuイオン注入効果の検証に本格的に着手する準備が整っていた状況で本研究課題を提案し、実施に至ったところ

である。

液体金属イオン源から放出されるイオンビームは、コンデンサレンズと対物レンズによって集束され、試料に到達する。所望のイオン種を取り出すために、質量分離器が設置されている。試料台には、細胞の凍結状態を保持するため、冷却機構が設けられている。加速電圧は10kV、Be, B, Si, P, Fe, Co, Ni, Cu, Ga, Ge, As, Pd, In, Sb, Pt, Auのイオンを照射することが可能である(図3)。

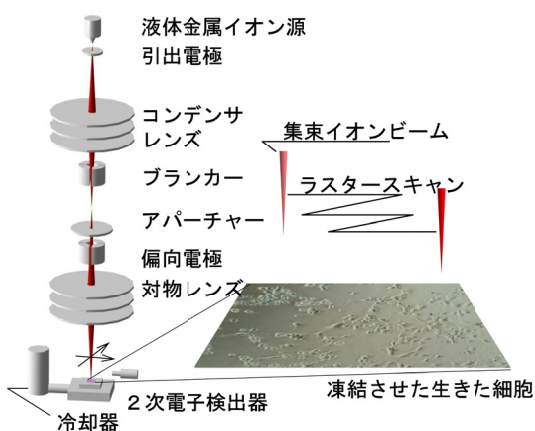


図3 細胞機能修飾用に新たに開発したイオン注入装置(上)と集束イオンビーム光学系(下)

研究項目1: 生きた細胞へのドーピング効果の検証

生きた細胞を凍結させた状態でAu、およびAsイオンを注入し、細胞機能評価を通じてドーピング効果を検証した。細胞には従来使用してきた筋芽細胞の他、がん細胞を用いた。細胞機能評価には、アデノシン三リン酸

(ATP) アッセイ (CellTiter-Glo, Promega) を行った (図4)。ただし、ATP 量の増減には、細胞内における ATP 産生と消費が関わるため、細胞増殖曲線を取得して細胞増殖能への影響調査を合わせて行った。

筋芽細胞 (C2C12)、およびがん細胞 (HeLa) を使用し、CO₂ インキュベーターを用いて、20%のウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS)、1%のペニシリンストレプトマイシン (penicillin streptomycin: PS) を添加したイーグル培地中で培養させた。無血清凍結保存液を用いて-80°Cで筋芽細胞を凍結後、真空度 10⁻⁵Pa の真空中に 30 分間放置し、真空暴露前後のアデノシン三リン酸 (ATP) 量を計測することによって細胞活性を評価した。細胞活性は、Promega 社製 CellTiter-Glo[®] 試薬を用い、マイクロプレート光度計によって ATP 量を計測した。

2 価の Au および As イオンを 10kV、すなわち 20keV で集束イオンビームをラスタースキャンすることによって照射した。イオン照射用細胞ウェル中におよそ 30,000 個の筋芽細胞を用意した。細胞 1 個当たりの照射個数は 1,000~10,000 個である。照射量は、ビーム電流および照射時間によって制御することができる。イオン照射中、細胞は約マイナス 190°C の低温に保たれている。比較のため未照射のコントロールサンプルも用意した他、毒性を有する元素として As の注入も実施し、細胞活性のドーズ依存性を調査した。As の照射量は細胞 1 個当たり 1,000~2,000 個である。なお、イオン照射後、培養せずに凍結後、直ちに ATP 計測を実施した。

イオン照射された Au もしくは As の一部は、凍結保存液中に止まることが考えられる。しかし、凍結保存液に止まった Au や As は ATP 計測のため保存液と共に廃棄され、測定には影響しないことは確かである。ATP 量の増減には、細胞内における ATP 産生と消費が関わるため、細胞増殖曲線を取得して細胞増殖能

への影響を合わせて調査した。

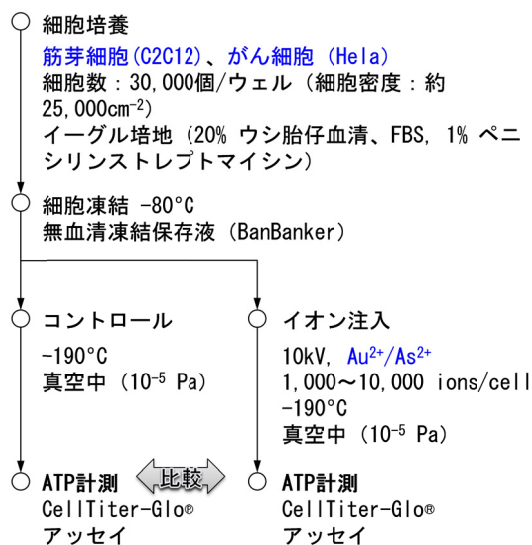


図4 実験プロトコル

研究項目 2 : 細胞レベルでの治療に有用な元素の探索

先述の通り、制がん剤の 1 つである白金製剤の原型はシスプラシンで、その発見は白金電極を用いた細菌培養で電流を流すと最近の発育が阻害される知見に基づいている。この様にシンプルな実験系での発見が創薬に重要な発見をもたらすことがあるのは事実である。注入イオン種および細胞種を拡大して治療に有用な元素を探索する。制がん剤に含まれる Pt イオンを生きたがん細胞への注入を試みる。がん細胞増殖阻害もしくは死滅に有用な元素を探索した。

研究項目 3 : ナノ毒性学 (Nanotoxicology) への展開

一方、当然のことながら、毒性を有する元素の発見を伴う。近年、ナノテクノロジー、ナノ材料研究の進展に伴いナノ粒子の安全性を扱う Nanotoxicology と呼ばれる分野が急速に立ち上がりつつあり、実際、国際半導体テクノロジーロードマップ (ITRS) 2009 edition でも Environment, Safety and Health (ESH) の章を設け関心を見せている。細胞レベルでの毒性評価、感受性試験に当該

技術の展開を図る。細胞の凍結を必要としない、試料室の大気圧化の検討も行った。

4. 研究成果

研究項目1 生きた細胞へのドーピング効果の検証

生きたがん細胞(HeLa)を凍結させた状態で Au イオンを注入し、細胞活性の評価を通じてドーピング効果を検証した。細胞活性評価には、アデノシン三リン酸(ATP)アッセイ(CellTiter-Glo, Promega)を用いた。がん細胞1個当たり1000~10000個のAuイオンを注入すると、未注入の細胞と比べて平均して20~40%ほどATP量が向上し、細胞が活性化していることが確認された。日数経過後もコントロールと比較し、高いATP量を保っている。一方、Asイオンを注入すると、逆に約10~20%ATP量が減少した。日数が経過すると、コントロールと比較し、ATP量の減少傾向が強くなっている(図5、図6)。

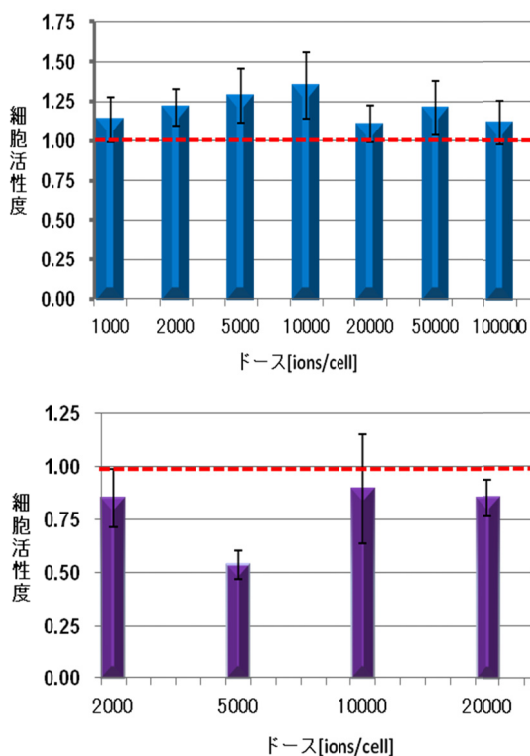


図5 Au (上)、および As (下) イオン注入細胞の細胞活性度のドーズ依存性

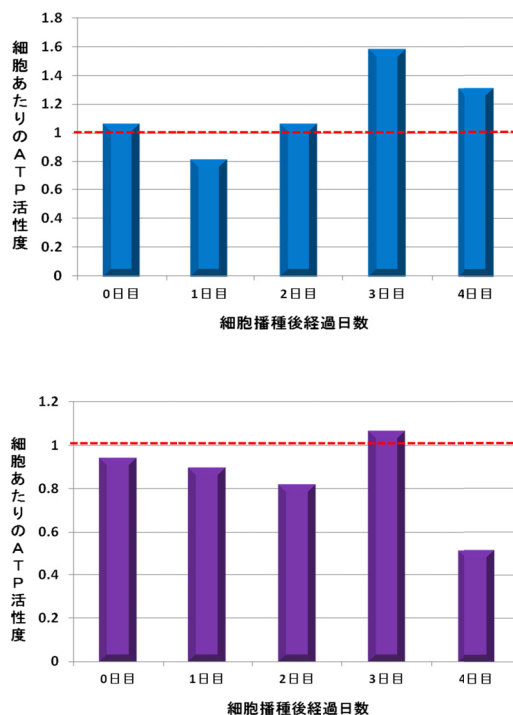


図6 Au (上)、および As (下) イオン注入細胞の細胞活性度の日数変化

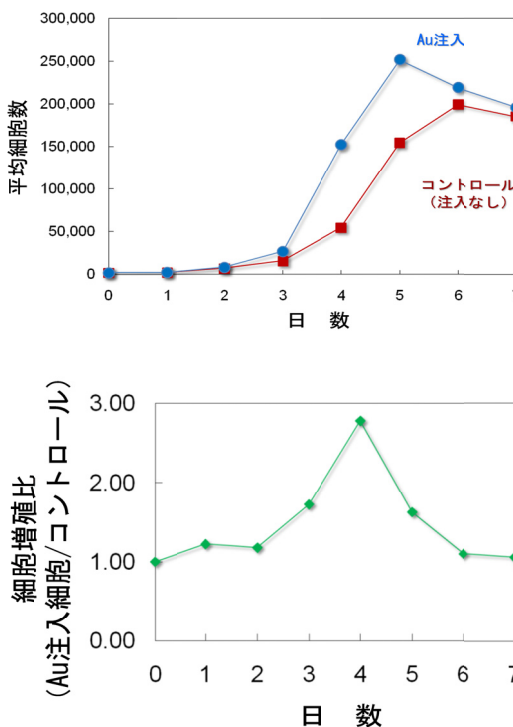


図6 Au イオン注入細胞の細胞増殖曲線(上)とコントロールで規格化した細胞増殖比(下)。

Au イオン注入細胞の増殖曲線がコントロールと比較し、増殖能が高いことが判明し、注入された Au イオンが細胞活性を高めたこ

とを裏付けている (図6)。

なお、培養液のみのサンプルに Au イオンを注入した場合、ATP 発光量は検出されなかったことから注入された Au 自体は細胞活性の上昇には寄与していない。イオン注入法による細胞活性の変化を観測した、恐らく初の成果である。

研究項目 2 : 細胞レベルでの治療に有用な 1 元素の探索

生きたがん細胞 (HeLa) を凍結させた状態で Au イオンを注入し、アデノシン三リン酸 (ATP) 量の測定を通じて、ドーピング効果を検証

した。その結果、未注入の細胞と比べて約 50% ATP 量が増加することを確認した。また、Ge の細胞への有用性を見出し、Ge イオン注入実験に着手した。

研究項目 3 : ナノ毒性学 (Nanotoxicology) への展開

本研究手法は定量性に強みを有する。通常、元素種に依らず細胞への過剰暴露はアポトーシスをもたらすことが常識となっている中で、特に微量元素の導入が可能で有り、生きた細胞へのドーピング効果の確認を得て、創薬だけでなく、半導体製造で多用される As ドーパントの細胞への影響検証など毒性学に資するツールを提供できることを実証した。国際半導体テクノロジーロードマップ (ITRS) が章を設置して関心を寄せる環境・安全・健康 (ESH) に対して、本研究手法の有用性を確認した。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 7 件、うち招待講演 3 件)

- ① Takahiro Shinada, “Deterministic doping for nanoelectronics and the application to biological system” 2012 Energy Materials Nanotechnology (EMN), 2012 年 04 月 17 日,

Florida, USA (招待講演)

- ② Takahiro Shinada, “Deterministic doping for nanoelectronics and the application to biological system”, MANA International Symposium 2013, 2013 年 03 月 01 日, Tsukuba (招待講演)
- ③ 坂口雄紀, 郷家ひさ, 谷井孝至, 秋本崇之, 品田賢宏, “低エネルギー集束イオンビームによるがん細胞の Au 照射効果”, 第 73 回応用物理学会学術講演会, 2012 年 09 月 13 日, 松山
- ④ 益田顕太郎, 一澤晃太, 柿沼瑛介, 山本英明, 品田賢宏, 佐藤裕子, 谷井孝至, 緑茶カテキンが癌細胞特異的に細胞接着能を抑制する作用機序の調査, 第 60 回応用物理学会学術講演会, 2013 年 03 月 29 日, 神奈川
- ⑤ 柿沼瑛介, 一澤晃太, 益田顕太郎, 山本英明, 品田賢宏, 佐藤裕子, 谷井孝至, “有機シラン単分子膜パターン基板を用いた癌細胞の接着能評価”, 第 60 回応用物理学会学術講演会, 2013 年 03 月 30 日, 神奈川
- ⑥ 野間口達洋, 坂口雄紀, 澤村直哉, 谷井孝至, 品田賢宏, 朝日透, “イオンビームを用いた Au²⁺導入による生細胞への影響検証”, 2014 年応用物理学会春季学術講演会, 2014 年 03 月 18 日, 神奈川
- ⑦ 品田賢宏, “単一原子制御への挑戦 -ERM 決定論的 (Deterministic) ドーピングのご紹介-”, 2014 STRJ ワークショップ, 2014 年 03 月 07 日, 東京 (招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

品田賢宏 (SHINADA, Takahiro)

産業技術総合研究所・ナノエレクトロニクス研究部門・研究部門付

研究者番号 : 30329099

(2) 研究分担者 (平成 25 年度より研究分担者)

朝日透 (ASAHI, Toru)

早稲田大学・先進理工学部・教授

研究者番号 : 80222595