

電子線描画を用いた細胞膜穿孔現象の閾値探索

Search for a Threshold of Cell Membrane Poration using Electron Beam Lithography

○吉岡 基、宮廻 裕樹、我妻 玲、満洲 邦彦、星野 隆行（東京大学）

○Moto Yoshioka, Hiroki Miyazako, Akira Wagatsuma, Kunihiro Mabuchi and Takayuki Hoshino

(Univ. of Tokyo)

E-mail: moto_yoshioka@ipc.i.u-tokyo.ac.jp

1. 緒言

近年、細胞集団の中での個々の細胞の働きを調べる単一細胞解析(Single-Cell Analysis)が盛んに研究されており、その解析のための基盤技術として期待されている手法の 1 つに単一細胞電気穿孔(Single-Cell Electroporation: SCEP)がある。SCEP は主に細胞内への物質導入を目的としており、微小電極を用いた手法が主流である。

これに対し、我々は電子線描画システムを用いて微小領域での物理現象の操作を行っており、細胞に電子線を照射して細胞膜に穿孔現象を起こすことに成功している。この手法では、電子線照射によって SiN 薄膜内に蓄積した電荷が仮想電極として働くことで電場が形成され、細胞膜で電気穿孔が生じていると考えられる。したがって、電子線の焦点の切り替えが容易であることによる多数の細胞に対する素早いアプローチと、電子線の収束性を利用したサブマイクロスケールでのマニピュレーションの両立が期待できる。

本研究では、電子線の加速電圧と電流値を一定に保ちながら照射時間を変化させることで照射する電子線のエネルギーを変化させ、この穿孔現象が生じるエネルギーの閾値を探索した。

2. 実験

細胞試料には C2C12 細胞(マウス筋芽細胞株, Riken cell bank)を用いた。C2C12 細胞はディッシュでの培養後に細胞懸濁液とし、ポリエチレンイミンで表面をコーティングされた SiN 薄膜に播種した。SiN 薄膜への接着を確認した後に培養液を無血清培地(Dulbecco's modified Eagle medium: DMEM)に取替え、濃度が 10 $\mu\text{g/mL}$ 、または 20 $\mu\text{g/mL}$ となるよう PI(Propidium Iodide)を添加して試料とした。

この試料中の個々の C2C12 細胞に対して、電子線を 1 回ずつ照射した。電子線は、パワーが一定となるよう、加速電圧は 2.5kV、電流値は 4.2nA とした。一方で電子線の照射時間は 100 ms, 10 ms, 1 ms として条件を変化させた。前二者では PI 濃度を 10 $\mu\text{g/mL}$ とし、1 ms では 20 $\mu\text{g/mL}$ とした。照射の直前と照射の 1 分後には明視野での撮像と蛍光撮像を行った。PI の蛍光波長に合わせるため蛍光撮像には、TRITC フィルタ(励起波長: 540-565nm, 蛍光波長: 580-630nm)を用いた。解析では、明視野像を用いて細胞の存在範囲を決定し、蛍光像での細胞の存在範囲における平均輝度と背景の平均輝度の差を算出し、照射前後でのこの差の変化を調べることで蛍光強度の変化を求めた。

3. 実験結果

すべての照射時間において 1%以上の蛍光強度の上昇が見られた。これより、今回設定したパワーにおける電子線の照射時間に関する穿孔現象の閾値は 1ms 以下であると考えられ、SCEP で電場を作用させる時間の標準的な範囲(μs ~ms)に収まる。また 100ms と 10ms の照射では、後者のほうが輝度の上昇が低い傾向にあったため、電子線のエネルギーが低下するにつれて穿孔現象が減少すると考えられ、電子線の照射時間によって穿孔現象を制御できる可能性が示唆された。

参考文献

- [1] Manyan Wang, Owe Orwar, Jessica Olofsson and Stephen G. Weber, "Single-cell electroporation," *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397.8 (2010): 3235-3248.
- [2] Takayuki Hoshino and Kunihiro Mabuchi, "Closed-looped in situ nano processing on a culturing cell using an inverted electron beam lithography system," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432 (2) (2013): 345-349.
- [3] Moto Yoshioka, Hiroki Miyazako, Akira Wagatsuma, Kunihiro Mabuchi and Takayuki Hoshino, "Single-Cell Membrane Surgery by Virtual Electrodes using an Inverted Electron Beam Lithography System," *Proceedings of the 2014 IEEE/SICE International Symposium on System Integration (SII 2014)*, (2014): 68-71.