

※課題番号 : F-12-HK-0068
※支援課題名 (日本語) : 生細胞用電極チャンバーの開発
※Program Title (in English) : Development of the electrode chamber for living cells
※利用者名 (日本語) : 本間 将人, 中林 孝和, 太田 信廣
※Username (in English) : Masato Honma, Takakazu Nakabayashi, Nobuhiro Ohta
※所属名 (日本語) : 北海道大学電子科学研究所
※Affiliation (in English) : Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University

※概要 (Summary) :

ナノ秒の非常に短いパルス幅を持つ電場を細胞に印加することによって、細胞膜を傷つけることなく、細胞内部の状態を変化させることができる。本課題では、培養細胞にナノ秒パルス電場を印加するための電極チャンバーを作成し、細胞のナノ秒パルス電場効果を単一細胞レベルで観察することを目的とした。カバーガラス上に楕形金電極を作成し、楕形金電極間で細胞の培養を行った。製作した電極チャンバーを蛍光寿命イメージングシステムに組み合わせ、生細胞の自家蛍光寿命イメージングの電場効果を検討した。

※実験 (Experimental) :

十分に洗浄したカバーガラス上にネガ型のフォトレジストの薄膜をスピコートによって作成する。ベーキングの後、マスクアライナー (ミカサ, MA-20) を用いて、楕形電極の鋳型を作成した。次にポジ型のフォトレジストの薄膜を基板上にスピコートによって作成し、楕形電極のマスクを用いてUV光を照射した。チタンを接着層にして金をヘリコンスパッタリング (アルバック, MPS-4000C1/HCl) によって蒸着した。チタンと金の厚さは10 nmと35 nmである。電極の側面に金属が蒸着されるように、30度およびマイナス30度方向で2回蒸着を行っている。金属蒸着の後、ベーキングを行い、ポジ型のフォトレジストを溶解させ、電極上だけに金属が蒸着されるようにした。細胞には付着細胞であるHeLa細胞を用いた。蛍光寿命イメージングシステムは、フェムト秒レーザーと共焦点蛍光顕微鏡を用い、画像の各点において時間ゲート法によって蛍光寿命画像を得る構成とした¹⁾。

※結果と考察 (Results and Discussion) :

製作した楕形金電極のパターンと3DイメージをFig. 1に示す。約0.1 mmの金電極の間隙で細胞を培養し、細胞の外部電場による変化について、倒立型の蛍光寿命イメージングシステムを用いて観測を行う。400 V

の電圧で約4 MV m⁻¹の電場を試料に印加することができる。電極の高さは、約0.02 mmである。周波数1 kHz, パルス幅50 ns, 電圧400 Vのパルス電場を1分間HeLa細胞に印加することによって、プログラム化された細胞死であるアポトーシスを観測することができた。さらに、HeLa細胞内にある補酵素であるNADHの自家蛍光寿命イメージングの測定にも成功している。現在、ナノ秒パルス電場の印加に伴うNADHの自家蛍光寿命画像の変化について検討している。

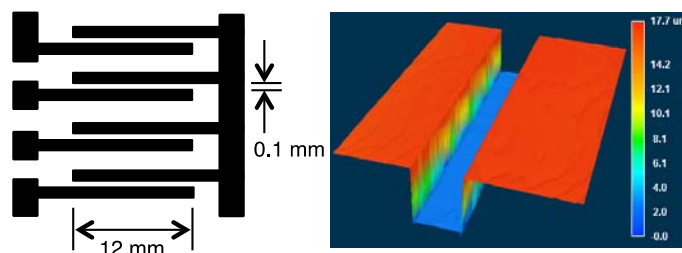


Fig. 1 (Left) Top view of the four-channel Au electrodes on a cover glass. (Right) 3D-image of the electrode.

※その他・特記事項 (Others) :

印加するパルス電場のパルス幅, 電圧, 印加パルス数などの依存性の測定を行う。さらに、様々な培養細胞への応用を行い、系統的な理解を目指す。

(参考文献)

1. S Ogikubo, T. Nakabayashi, T. Adachi, Md. S. Islam, T. Yoshizawa, M. Kinjo, and N. Ohta, J. Phys. Chem. B, 115, 10385-10390, (2011).

共同研究者等 (Coauthor) :

Kamlesh Awasthi (北海道大学)

論文・学会発表

(Publication/Presentation) :

なし

関連特許 (Patent) :

なし