

細胞外微粒子に起因する生命現象の解明とその制御に向けた  
基盤技術の創出

2019年度採択研究代表者

2021年度 年次報告書
-----------------

小椋 俊彦

産業技術総合研究所健康医工学研究部門

上級主任研究員

革新的液中ナノ顕微鏡開発と細胞外微粒子の包括的解明

## § 1. 研究成果の概要

本研究提案は、革新的な液中ナノ観察技術の開発を行い、これを用いた細胞外微粒子の細胞機能への影響や細胞との相互作用の解明を目標とする。これまで我々は、非染色・非固定の生きた細胞を水溶液中で直接観察可能な、世界唯一の走査電子誘電率顕微鏡を開発してきた。本提案では、これをより高機能化して、細胞外微粒子と細胞との相互作用を高コントラストかつ高分解能で観察し、その構造変化の解析を進める。このような新たに開発した液中ナノ観察技術を用いて、細胞外微粒子である環境中のナノ微粒子や、癌治療に役立つ抗体複合体微粒子及びメラノソームやエクソソーム等の細胞機能への影響の解明を目指す。

本年度は、昨年度に高機能化を行った走査電子誘電率顕微鏡を用いて、溶液中の様々な細胞外微粒子や細胞内微粒子の直接観察を行った。まず抗体医薬に用いられる IgG 抗体の直接観察を行い、アルギニンの溶液濃度に依存して抗体の凝集状態が大きく変化する事が明らかとなった<sup>1)</sup>。また、溶液中の金属を取り込み、内部に蓄積する特殊な藻の観察を行い、藻の内部に蓄積される金属微粒子等の分布を明確に観察する事に成功した<sup>2)</sup>。スペクトル分析が可能な多波長の走査電子インピーダンス顕微鏡の開発では、ホルダー下部の金属端子に 30~500kHz の 8 波長の正弦波を混合して加え、この信号強度を 10 倍に増幅する高速・高電圧アンプを設置する事で、検出感度と SN 比の大幅な向上に成功した<sup>3)</sup>(図1)。さらに、ポリスチレンビーズや日焼け止め粒子の直接観察を行い、8 波長のインピーダンス成分による分析・解析を行った。こうした研究の過程で、これまで報告されていないポリスチレンビーズと窒化シリコン薄膜との特殊な光学特性を見出す事が出来た<sup>4)</sup>。以上の成果に示すように、新たに開発した高機能走査電子誘電率顕微鏡とインピーダンス顕微鏡は、今後細胞外微粒子とその細胞機能への影響の解析に大きく貢献する事が期待される。

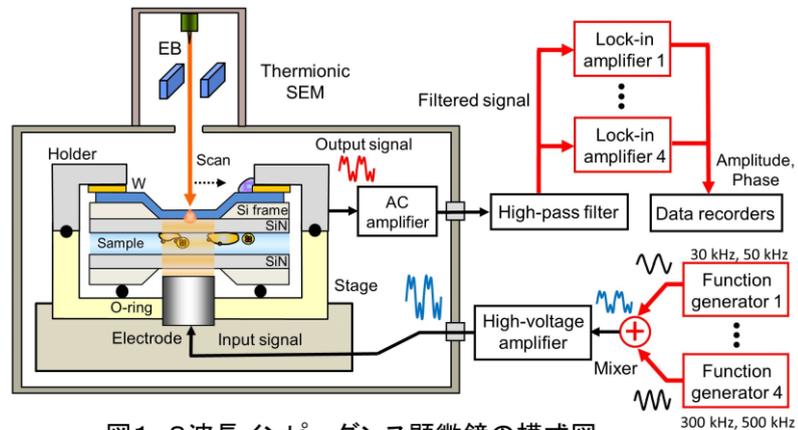


図1 8波長インピーダンス顕微鏡の模式図

## § 2. 研究実施体制

### (1) 小椋グループ

- ① 研究代表者: 小椋 俊彦 (産業技術総合研究所健康医工学研究部門 上級主任研究員)
- ② 研究項目
  - ・高機能誘電率顕微鏡の開発
  - ・スペクトル分析インピーダンス顕微鏡の開発
  - ・5次元インピーダンス顕微鏡の開発
  - ・ナノプラスチック、PM2.5 の細胞取り込み機構の解析
  - ・環境中微粒子取り込みによる細胞の遺伝子変化の解析

### (2) 佐藤グループ

- ① 主たる共同研究者: 佐藤 和秀 (名古屋大学高等研究院 特任助教)
- ② 研究項目
  - ・抗体-IR700 複合体による癌細胞破壊時のタンパク質・遺伝子変化の解析
  - ・誘電率顕微鏡による抗体-IR700 複合体の細胞破壊メカニズムの直接観察と解析

### (3) 村上グループ

- ① 主たる共同研究者: 村上 伸也 (大阪大学大学院歯学研究科 教授)
- ② 研究項目
  - ・誘電率顕微鏡用タグの作製および遺伝子導入と誘電率顕微鏡観察
  - ・ゲノム編集を用いた誘電率顕微鏡用タグノックイン細胞の作製
  - ・遺伝子ノックアウト細胞を用いた誘電率顕微鏡による細胞機能解析
  - ・オルガネラ迅速単離による細胞外微粒子の形成メカニズム解明(若手チャレンジ)

## 【代表的な原著論文情報】

- 1) S. Oki, S. Nishinami, Y. Nakauchi, T. Ogura, K. Shiraki, “Arginine and its derivatives suppress the opalescence of an antibody solution”, J. Pharma. Sci., vol. 111, No. 4, 1126-1132, 2022
- 2) S. Miyashita, T. Ogura, T. Kondo, S. Fujii, K. Inagaki, Y. Takahashi, A. Minoda, “Recovery of Au from dilute aqua regia solutions via adsorption on the lyophilized cells of a unicellular red alga Galdieria sulphuraria: A mechanism study”, J. Hazard. Mat., vol. 425, 127982, 2022
- 3) T. Ogura, “Development of multi-frequency impedance scanning electron microscopy”, PLOS ONE, vol. 17, No. 1, e0263098, 2022
- 4) T. Ogura, “Raman scattering enhancement of dielectric microspheres on silicon nitride film”, Sci. Rep., vol. 12, 5346, 2022
- 5) S. Taki, K. Matsuoka, Y. Nishinaga, K. Takahashi, H. Yasui, M. Shimizu, C. Koike, M. Sato, K. Sato, “Spatiotemporal depletion of tumor-associated immune checkpoint PD-L1 with near-infrared photoimmunotherapy promotes antitumor immunity”, J. Immunother. Cancer, vol.

9(11), e003036, 2021