

ベント型ナノピペットプローブを有する 走査型イオン伝導顕微鏡の開発

[1] 組織

代表者：牛木 辰男

(新潟大学大学院 医歯学総合研究科)

対応者：岩田 太

(静岡大学電子工学研究所)

分担者：

水谷 祐輔

(新潟大学大学院 医歯学総合研究科)

白澤 樹 (静岡大学工学部)

江口由祐 (静岡大学大学院 工学研究科)

[2] 研究経過

近年、生体試料を生きたまま顕微鏡で観察するバイオイメージング技術に注目が集まっている。生体試料を生きたまま、かつ非破壊的な状況で観察することは、医学、生物学の進展において不可欠な要素である。ナノスケールでのイメージングデバイスとして、走査型プローブ顕微鏡 (Scanning Probe Microscopy: SPM) がある。中でも原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy: AFM) は液中環境で動作可能であることから、生体試料の観察には広く用いられている。しかしながら AFM はプローブであるカンチレバーと試料の接触により生体試料のような柔らかい表面を傷つけてしまう恐れがある、また、カンチレバーの形状により起伏の激しい表面形状の試料観察は困難であるという欠点がある。

走査型イオン伝導顕微鏡 (Scanning Ion Conductance Microscopy: SICM) は SPM の一種であるが、電解液中でのイオン電流を検出することによりプローブを制御し、試料の表面形状を取得するバイオイメージングデバイスである。その動作原理から非接触で生体試料を生きたまま培養液中で観察することが期待される。

SICM は一般に倒立顕微鏡によりプローブと試料の位置決めを行い生体試料の観察を行うため、観察対象は単層の培養細胞など光透過性がある試料では位置決めが容易である。しかし、厚い組織試料のように不透明な生体試料の場合、プローブと試料の位置合わせを倒立顕微鏡で行うことは困難である。

そこで本研究ではプローブにベント型ナノピペッ

トを用い、プローブと試料を実体顕微鏡により同時観察しながら位置決めを行うことにより、不透明な試料も観察可能な SICM を基礎とした新規なバイオ顕微イメージングデバイスの開発に取り組んだ。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

1) ベント型ナノピペットプローブの製作

ベント型ナノピペットプローブの製作に関して再現性よく電流検出可能なプローブ形状の製作条件の最適化を行った。SICM で使用されるナノピペットは研究室の保有設備であるピペットプラー (P-2000, SUTTER INSTRUMENT COMPANY) により作製した。外径 1.0 mm, 内径 0.6 mm のキャピラリーガラス管をプラーにより熱引きし開口径約 100 nm のピペットを作製した。その後、作製したピペット先端を曲げ加工するため、マイクロフォーグ (MF-900, ナリシゲ) を使用し、曲げ加工を行った。この際、曲げ加工を行う位置は、熱による影響でピペット先端開口部が閉塞しない位置の条件出しを行い、加工パラメータを最適化した。

2) ベント型ナノピペットを使用可能な SICM イメージングデバイスを構築

SICM では開口径数十 nm のナノピペットをプローブとして用いる。電極をピペット内部と外部に挿入し、電圧を印加するとナノピペット開口をイオン電流が流れる。ナノピペット開口を流れるイオン電流はナノピペット - 試料間距離に依存している。ナノピペットが試料表面へとアプローチしていくとナノピペット開口が試料表面によって閉塞されることによりイオン電流が減衰していく。このイオン電流を検出することで距離制御を行い、試料表面の形状像を取得することが可能である。SICM の測定方法として、ナノピペットを試料から十分に離れた場所から振り下ろし、イオン電流が閾値よりも減衰した時点での高さ情報を 1 画素ずつ取得して画像化を行う方法をバックステップモード (またはホッピングモード) という。これにより起伏の激しい試料に対

してナノピペットが試料と接触することなく走査可能となる。本研究ではこの手法を用いて構築した。

3) ベント型ナノピペットを用いた位置決め技術

SICMの測定においてピペット先端を観察したい試料に位置決めすることは大変重要である。本装置において通常、倒立顕微鏡のステージ上にSICM本体を設置して、試料下方より観察して位置決めする。しかしながらこの場合、ガラス基板表面に培養した細胞のような透明な試料では問題なく位置決めできるが、組織切片のような不透明な試料を位置決めすることは困難である。よって本研究では実体顕微鏡を用いて上方より位置決めを可能にするようなベント型ナノピペットプローブを用いた顕微イメージングデバイスを構築した。

4) 組織試料の観察

本実験装置を構築後、動物組織標本（ラットの腎臓および肝臓など）の観察を行った。ラットの組織切片は厚さ数mmで光学的不透明な標本でもナノピペットの位置決めが可能であり、本装置の良好な操作性を実証できた。観察に用いたラット腎臓は試料表面の凹凸がはっきりとしており、特徴的な構造である糸球体のスケールが約100 μm 程度であることから、実体顕微鏡を用いて上方から位置決めした。またラット肝臓の標本に関しても本装置を用いて観察した。肝細胞は腎臓の糸球体と比べて光学的に均一なコントラストを有する組織であり、実体顕微鏡での組織構造観察が困難だが、SICMを用いることで高分解能観察を実現した。これらの結果より、光学的な不透明な試料においても、本装置の良好な操作性や有効性を実証できたと思われる。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究で開発するSICM装置は、光学的に不透明な試料でも観察したい位置にナノピペット（プローブ）の先端を位置決めできることから、従来のSICM装置に対して扱える試料の対象を大きく広げることができる。特に本装置は液中で観察できるため、生体試料の観察において組織試料を特別な処理なく生きた状態で観察することが可能である。その点でバイオにおける顕微イメージングデバイスとして大変実用的であり、且つ学術的意義は大きい。よって本課題は電子工学研究所の生体計測研究部門で取り組む内容として有意義な成果を得られたと思われる。

本プロジェクトは、精密工学会および日本顕微鏡学会のバイオSPM研究会において発表した際、学外研究者に大変興味と関心をもっていただき、その後、研究室見学など交流が活性化した。また次年度

に向けて学外研究者との新たな共同研究を開始する打合せも行うことができ、今後の発展が期待できる。

[4] 成果資料

- (1) 白澤 樹, 平田 惇, 水谷 祐輔, 牛木 辰男, 岩田 太: “ベント型ナノピペットを有する走査型イオン伝導顕微鏡の開発と生体組織の観察”, 第63回応用物理学会春季学術講演会、講演番号 20a-W631-1 2016.03.20 (東京工業大学)
- (2) 白澤 樹, 平田 惇, 中島 真人, 水谷 祐輔, 牛木 辰男, 岩田 太: “ベント型ナノピペットを用いた走査型イオン伝導顕微鏡の開発とラット組織の観察”, 日本顕微鏡学会走査型プローブ顕微鏡分科会「SPMによる高速走査の可能性と応用」, pp.2 2015.12.6-7 (湯沢ニューオータニホテル)
- (3) 平田 惇, 白澤 樹, 中島 真人, 牛木 辰男, 岩田 太: “ベント型ナノピペットを用いた走査型イオン伝導顕微鏡の開発”, 2015年度精密工学会秋季大会, 講演番号 E68 2015.09.04-06 東北大学

出張報告

氏名：牛木 辰男

所属：新潟大学大学院医歯学総合研究科・顕微解剖学分野

期間：平成27年11月1日～平成27年11月3日

用務先：静岡大学

用務内容：走査型イオン伝導顕微鏡を用いた生体組織観察に関する実験を行う。

主たる対応者：岩田 太

氏名：水谷 祐輔

所属：新潟大学大学院医歯学総合研究科・顕微解剖学分野

期間：平成27年11月1日～平成27年11月3日

用務先：静岡大学

用務内容：走査型イオン伝導顕微鏡を用いた生体組織観察に関する実験を行う。

主たる対応者：岩田 太

氏名：牛木 辰男

所属：新潟大学大学院医歯学総合研究科・顕微解剖学分野

期間：平成28年1月22日～平成28年1月24日

用務先：静岡大学

用務内容：走査型イオン伝導顕微鏡を用いた生体組織観察に関する実験を行う。

主たる対応者：岩田 太

氏名：水谷 祐輔

所属：新潟大学大学院医歯学総合研究科・顕微解剖学分野

期間：平成28年1月24日～平成28年1月25日

用務先：静岡大学

用務内容：走査型イオン伝導顕微鏡を用いた生体組織観察に関する実験を行う。

主たる対応者：岩田 太