

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05416

研究課題名(和文) ナノバイオロジーのためのMEMS電子顕微鏡技術の確立と細菌の動態研究への応用

研究課題名(英文) MEMS for electron microscopy to study nanobiology and its application to observation of bacterial dynamics

研究代表者

石田 忠 (Ishida, Tadashi)

東京工業大学・工学院・准教授

研究者番号：80517607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：通常、電子顕微鏡で試料を観察するためには試料を真空中に配置する必要があるが、電子顕微鏡の中で液体の中の細菌を観察できる技術をマイクロマシン技術で開発した。「電子顕微鏡の中に細菌の培養環境を構築する試料ホルダ」と「真空と液体を隔離する電子線透過膜を持つマイクロ流路デバイス」を開発した。これらを用いて、気泡や液滴の挙動を観察し、培養環境にあるシアノバクテリアを長時間にわたり観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Although specimens should normally be placed in vacuum condition for electron microscopes, we developed micro-electro-mechanical systems to visualize in-liquid bacteria. In this project, we developed a specimen holder to control cell cultural conditions, and a microfluidic device with a electron transparent membrane which separate vacuum and liquid. By using them, we visualized the dynamic motions of bubbles in liquid and droplets on the membrane, and observed cyanobacteria under cultural condition for long time.

研究分野：MEMS

キーワード：MEMS 電子顕微鏡 液体セル 細菌 動態観察

1. 研究開始当初の背景

全ての抗菌剤は、細菌が表面や内部で行う合成を阻害することで細菌を死滅させるが、その作用機序は数種類に限定される。近年、抗菌剤に耐性を持つ耐性菌が急増し、それぞれの作用機序に耐性を持つ耐性菌が出現している。さらに耐性菌は周囲の細菌と耐性を共有し、同一の作用機序に対して容易に耐性を獲得するため、ほとんどの抗菌剤に耐性を示す超多剤耐性菌まで確認されている。

新たな抗生物質の作用機序が求められるが、既に抗生物質探索はやりつくされ、既存技術の限界が来ている。そこで、抗生物質の作用機序の探索でまず行われる光学顕微鏡による生きた細菌の観察をより高分解能で観察できるようになれば、細胞分裂や細菌内外の物質輸送など、細菌の生命維持に不可欠な現象に伴う微視的な動態を探索可能となる。それに加え、細菌に存在する物質の分布が分かれば、それらも新しい作用機序の切り口となりうる。以上より、細菌の動態をより高分解能、つまりナノスケールで観察・分析することが求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、液中に存在する細菌を観察するための電子顕微鏡技術を開発し、生きた状態で細菌の動態の電子顕微鏡観察・分析を実現することである。マイクロ細加工技術を用いて MEMS デバイスを開発することで、電子顕微鏡技術や細菌培養技術を構築する。さらにそれらを融合した上で、電子線が細菌に与えるダメージを極限まで低減すると共に、電子顕微鏡内に細菌培養環境を構築することで、生きた細菌を高空間分解能かつビデオレートの観察と物質分布分析を行える実験系を構築する。本実験系で細菌を観察・分析することで、細菌表面におけるナノスケールの動態を調べる。

3. 研究の方法

生きた細菌の微視的な動態を高い時空間分解能で観察・分析するために、MEMS 技術を活用した電子顕微鏡技術を確立し、細菌の動態を高時空間分解能で観察・元素分析し、微細構造や成分分布変化の役割を明らかにする。

そのため、(A) 生きた細菌の動態を高空間分解能で観察するため、電子線ダメージの低減と培養環境制御機能を実現した MEMS 細菌観察セル、(B) 高時間分解能での観察のため高感度電子検出器、(C) 電子顕微鏡内に培養環境を構築する培養チャンバの三つの要素技術を確立する。それらを統合することで生きた細菌をナノスケールで観察・分析する実験系を構築する。

4. 研究成果

本研究では、3章で述べた(A)-(C)を開発し、それらを統合することで、MEMS 液体セル内

部で生じる現象を観察し、ビデオレートで動態を調べた。

(A) 細菌の培養環境制御機能を実装した MEMS 液体セル

開発した MEMS 液体セルを図 1 に示す。電子線透過膜で液体と真空を隔てた液体セルに、液体培地を還流するためにポリジメチルシロキサン(PDMS)製のマイクロ流路を実装した。観察窓の大きさは 200 μm 角の形状であり、電子線透過膜は 80 nm 厚のシリコン窒化膜とした。マイクロ流路にシリンジポンプを接続し培養液の還流に成功した。しかし、このときマイクロ流路の流路高さが低いと、流路壁と電子線透過膜の接触が頻繁に起こってしまい、デバイスの歩留まりが非常に低かったため流路高さを 50 μm とすることで、歩留まりを飛躍的に向上した。さらに、観察窓が破れても実験できるように観察窓数を 144 個以上に増やし、実験サイクルを向上することに成功した。

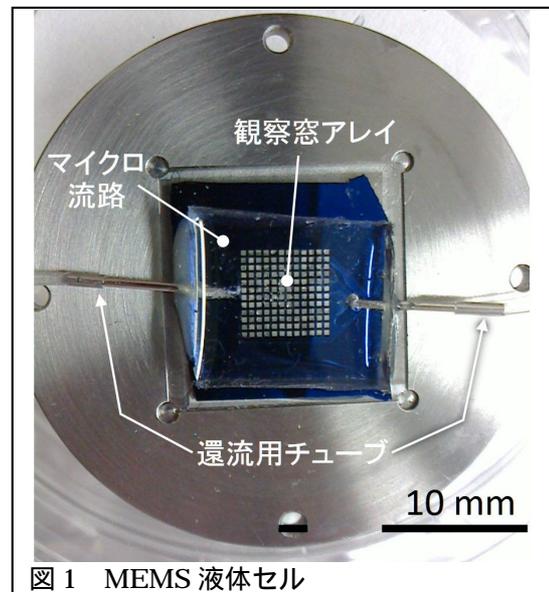
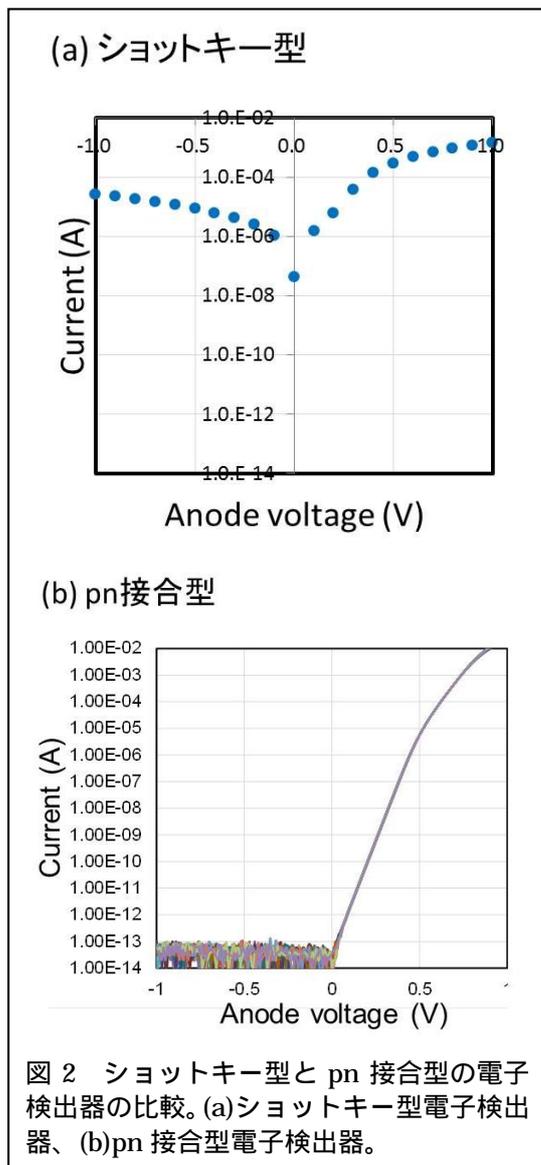


図 1 MEMS 液体セル

(B) 電子線ダメージの低減と高時間分解能を実現する高感度電子検出器

電子顕微鏡に初期状態で実装されている反射電子検出器は感度が足りず、実時間観察が困難であった。そこでショットキー型と pn 接合型の電子検出器を開発した(図 2)。ショットキー型電子検出器はカーボンと n ドープシリコンで形成したショットキー接合を使って電子を検出する。バックグラウンドのノイズが大きく、逆方向電流を用いた電子検出で感度を十分得られなかった。pn 接合型電子検出器を表面 BSF のドーズ量 $8 \times 10^{12} / \text{cm}^2$ で作製したところ、バックグラウンドノイズを飛躍的に低減することに成功し、ショットキー型電子検出器に比べ 10^9 高い感度を得ることができた。感度を向上したことで、低加速電圧の電子線でも明瞭な電子顕微鏡像を得る

ことが期待できる。



(C) 電子顕微鏡内に培養環境を構築する培養チャンバ

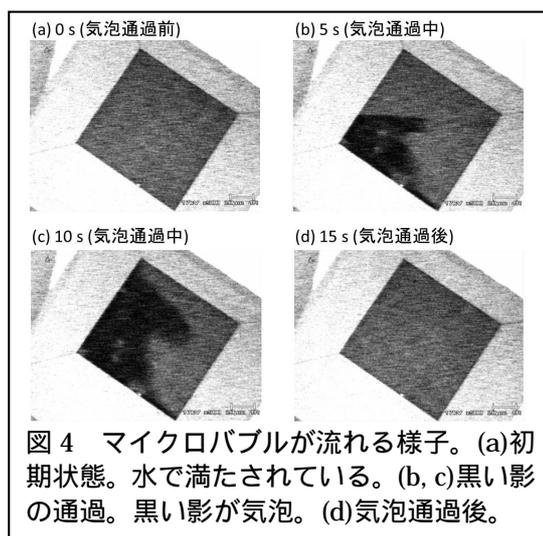
電子顕微鏡を用いて生きた細菌を観察するためには、電子顕微鏡内で細菌を培養する必要がある。そこで、MEMS 液体セル電子顕微鏡内に配置し、その周りに培養環境を作り出すための試料ホルダを開発した(図 3)。電子線が照射される部分に穴を有し、その穴に MEMS 液体セルの電子線透過膜側が配置されるように固定できる。試料ホルダの内部では温度制御と光照射が可能であり、培養液の還流のためのシリジポンプに接続するためのシリコンチューブを通すことのできる接続ポートを有している。この開発した培養ホルダにより、電子顕微鏡観察中に、シアノバクテリアの培養環境である 37℃、光照射、培養液の還流の培養環境を整えることが可能となった。培養液の還流は 20-100 $\mu\text{l}/\text{min}$ で行ったが、電子線透過膜は破れずに、還流を

1 時間にわたり問題なく行うことができた。



これらの開発した技術を統合して、液中の現象を動的に電子顕微鏡で観察することに成功した。具体的には、気泡や液滴、シアノバクテリアの動態観察を行った。電子線の加速電圧は 17 kV、走査速度は 0.2-30 fps で行った。

MEMS 液体セルに培養液を還流している際にすると、100 μm 級の気泡が観察窓を通過する様子を観察することに成功した(図 4)。反射電子は固体、液体、気体、真空の順に弱くなる。初期状態では電子線透過膜下部は培養液で満たされていた。その後、黒いコントラスト他 10 秒間かけて横切った。培養液の成分はほぼ水であるため、液体より密度が低い物体でないと黒いコントラストは生じない。そのため、この黒いコントラストは気泡であると結論付けた。



次に、マイクロスケールで液滴の形成過程を観察した(図 5)。MEMS 液体セルの電子線透過膜下部に、水が観察窓部に存在せずその周囲に存在する状態を構築した。その上でチャンバ内の温度を 50℃ に昇温したところ、シ

リコンチ化膜表面に直径数 μm の液滴が形成する様子を観察した。その後、マイクロ液滴が徐々に大きくなり、それらのマイクロ液滴間のギャップが小さくなると熱振動により互いが融着し、そのサイズが大きくなる様子を観察した。大きなマイクロ液滴に小さなマイクロ液滴が引き寄せられるように融合することが多かった。この工程を繰り返し、最終的にはマイクロ液滴が一つにまとまり、直径数十 μm のマイクロ液滴を形成した。この一連の工程は6分程度で完了した。これらの結果から、長時間にわたる動態観察が可能であることを実証したとともに、表面の濡れに関する重要な知見を得た。

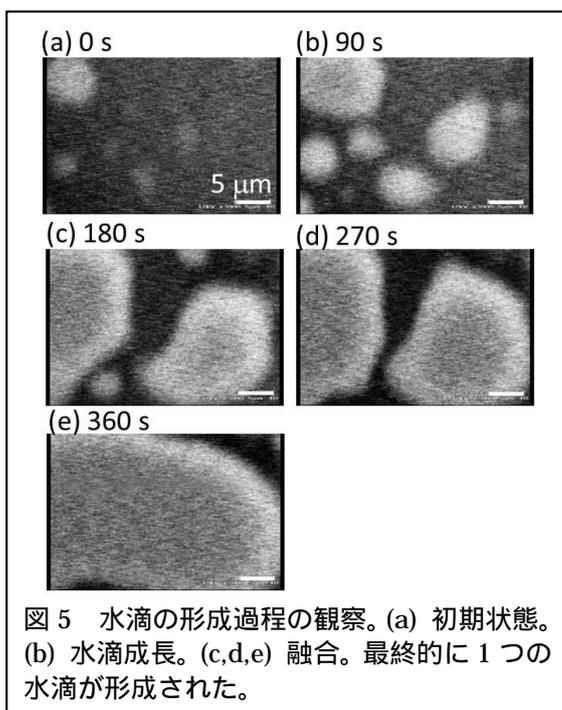


図5 水滴の形成過程の観察。(a) 初期状態。(b) 水滴成長。(c,d,e) 融合。最終的に1つの水滴が形成された。

しかし、流路断面の拡大したことで、シアノバクテリアの観察が困難になった。シアノバクテリアは重力によって MEMS 液体セルの下部に落ちてしまい、電子線透過膜とシアノバクテリアの距離が大きくなり、電子線がシアノバクテリアに到達できなくなったためである。そこで、電子顕微鏡を上下逆転することで、重力によりシアノバクテリアを電子線透過膜に接触することにした。さらに培養液の還流はシアノバクテリアを押し流してしまうため、今回のシアノバクテリアの観察では培養液の還流は行わなかった。

これによりシアノバクテリアを観察することが可能となった。37 にした上で光照射をし、シアノバクテリアの培養を行った。光照射を30分、電子顕微鏡観察を10分という工程を1セットとして繰り返した。三つのシアノバクテリア(2 μm 程度)の塊を観察したが、シアノバクテリアの大きさは変化なく、細胞分裂も見られなかった(図6)。

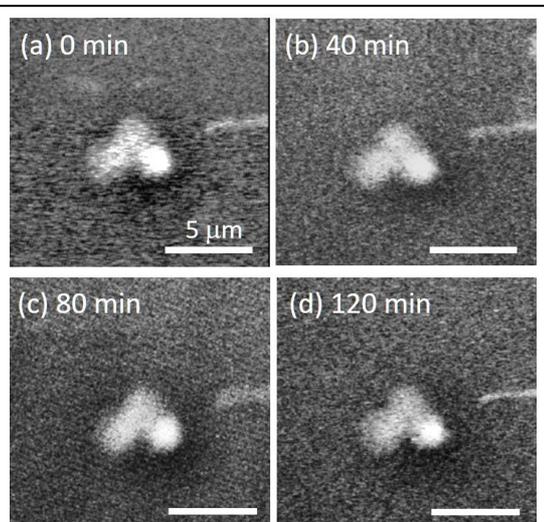


図6 シアノバクテリアの長時間培養観察。(a) 初期状態。(b) 40分後。(c) 80分後。(d) 120分後。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

M. Egawa, T. Ishida, L. Jalabert, H. Fujita, "In-situ Realtime Monitoring of Nanoscale Gold Electroplating Using Micro-Electro-Mechanical Systems Liquid Cell Operating in Transmission Electron Microscopy," *Applied Physics Letters*, **108**, 023104 (2016). 査読有

〔学会発表〕(計3件)

T. Ishida, "Microfluidic Liquid Cell in Scanning Electron Microscope for Visualization of In-liquid Living Cell," *28th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science*, Nagoya University, Nagoya, Dec. 2017.

石浦史也、石田忠、高谷信之、小俣達男、小俣透、「シアノバクテリアのマイクロ空間分裂抑制装置 —局所的封入法の開発—」, *ロボティクス・メカトロニクス講演会2017*、ビックパレットふくしま、郡山、2017年5月。

石田忠、近藤晃弘、高谷信之、小俣達男、小俣透、「多量のシアノバクテリアの一括分裂抑制マイクロ流体デバイス」, *ロボティクス・メカトロニクス講演会 2016*、2A2-18b1、パシフィコ横浜、横浜、2016年6月。

〔その他〕

ホームページ等

http://www.olab.pms.titech.ac.jp/research/research_frame.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石田 忠 (ISHIDA, Tadashi)
東京工業大学・工学院・准教授
研究者番号：80517607

(4)研究協力者

大野 輝昭 (OHNO, Teruaki)
テクネックス工房・技術者

角嶋 邦之 (KAKUSHIMA, Kuniyuki)
東京工業大学・工学院・准教授
研究者番号：50401568

小俣 達男 (OMATA, Tatsuo)
名古屋大学・生命農学研究科・教授
研究者番号：50175270

高谷 信之 (TAKATANI, Nobuyuki)
名古屋大学・生命農学研究科・研究員