

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18805

研究課題名（和文）光触媒AFMプローブを用いたナノ空間制御加工プロセスの可視化技術の開発

研究課題名（英文）Development of Visualization Technique of Nanofabrication Processing with Photocatalytic AFM Probes

研究代表者

柴田 隆行（SHIBATA, Takayuki）

豊橋技術科学大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：10235575

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、将来のナノ・バイオテクノロジーを支える革新的な製造基盤技術として、原子間力顕微鏡（AFM）を応用した新規なナノ加工・計測技術の開発を行った。具体的には、光触媒であるTiO<sub>2</sub>を被覆したAFMプローブを用いた細胞のナノ加工技術（光触媒酸化反応）と、Agナノ粒子を被覆したAFMプローブを用いた細胞内の生体分子の動態イメージング技術（チップ増強ラマン分光法：TERS）を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療・医薬分野のさらなる発展には、生命現象の統合的理解とその制御が必要不可欠となる。このためには、ゲノム、タンパク質、糖鎖などの生体分子の構造・機能解明に加えて、生命活動の基本単位である細胞の機能を解き明かすことが、ライフ・イノベーション創出の命題となる。本研究では、生きた細胞を低侵襲で加工し、細胞内部の情報を一分子レベルで可視化する技術を確立した。細胞の機能発現過程を高度に制御・可視化する本提案技術は、生命科学の基礎研究における強力なツールとなり得る。

研究成果の概要（英文）：With the aim of providing an innovative manufacturing technology required to support future advances in nanotechnology and biotechnology, a novel atomic force microscopy (AFM)-based nanofabrication and nanomeasurement technique has been developed. In this study, the photocatalytic nanofabrication of living cells can be performed based on highly localized photochemical oxidation with a catalytic titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-functionalized AFM probe. Moreover, tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS) imaging for analyzing the dynamic behavior of biomolecules in a living cell can be achieved with AFM probes functionalized with silver (Ag) nanoparticles.

研究分野：MEMS，マイクロ・ナノ加工

キーワード：原子間力顕微鏡（AFM） AFMナノ加工 酸化チタン光触媒酸化反応 チップ増強ラマン分光法（TERS）  
細胞操作

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

### 1. 研究開始当初の背景

製造業のグローバル化にともない、従来型の「ものづくり」から新たな価値を創成する「ことづくり」への転換が求められており、持続的発展可能な日本の産業構造を再建する上で重要な課題となっている。しかし、世界の産業を牽引してきた日本の高度な「製造技術」や「生産技術」の必要性が否定されたわけではない。新たな製品の開発には、誰にも真似のできない『コア技術＝強み』をもつことが前提条件となる。この意味では、日本が得意とするものづくり技術をさらに進化・発展させることは極めて重要な課題である。本研究では、将来のナノ・バイオテクノロジーを支える革新的な製造基盤技術として、原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy, AFM) を応用した新規なナノ加工・計測技術を開発することを目的としている。本提案技術の実現は、他の類を見ないユニークなナノ加工・計測技術を提供することにつながり、ナノ・バイオテクノロジーの革新的な発展に寄与することが大いに期待できる。

### 2. 研究の目的

医療・医薬分野のさらなる発展には、生命現象の統合的理解とその制御が必要不可欠となる。このためには、ゲノム、タンパク質、糖鎖などの生体分子の構造・機能解明に加えて、生命活動の基本単位である細胞の機能を解き明かすことが、ライフ・イノベーション創出の命題となる。本研究では、原子間力顕微鏡 (AFM) に新たな機能を付加することで、生細胞のナノ加工・計測技術の確立を目的としている。本研究では、光触媒である酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) を被覆した AFM プローブを利用した細胞膜穿孔ならびに Ag ナノ粒子を担持したプローブを用いたチップ増強ラマン分光法 (Tip-enhanced Raman spectroscopy, TERS) による細胞内の生体分子の高感度イメージングの可能性について基礎的検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 光触媒 AFM プローブを用いた細胞膜穿孔

本研究では、光触媒である  $\text{TiO}_2$  薄膜を被覆した AFM プローブを利用して、探針先端の極近傍のみに光触媒酸化反応を局在化することで、ナノメートルレベルの位置選択的な有機物 (細胞膜) の化学的除去加工を行った。図 1(a) に実験方法の概略図を示す。倒立顕微鏡 (ニコン Ti-U) 上に設置した AFM 装置 (Asylum Research MFP-3D-BIO) を用い、プローブ探針先端を一定の速度で HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌由来細胞株) へと押し込んだ。本研究では、押し込み速度を 50 ~ 300 nm/s と変化させて細胞膜穿孔に及ぼす影響を調査した。細胞膜穿孔実験には、市販の Si 製 AFM プローブ (オリンパス AC200TN, 公称ばね定数 9 N/m, 公称先端半径 7 nm) の探針表面に陽極酸化によって  $\text{TiO}_2$  薄膜を形成したものを使用した。また、 $\text{TiO}_2$  光触媒 AFM プローブの探針先端 (先端半径: 約 50 nm) への紫外線照射には、超高圧水銀ランプ (ニコン C-HGFI Intensilight) を用い、光学フィルタ (ニコン UV-2A, 透過波長 330 ~ 380 nm) によって波長を選別し、対物レンズ (60 $\times$ , NA = 0.7) を介して探針先端に焦点が合うように調整した。光強度は 1.25 mW/cm<sup>2</sup> 一定とした。図(c)に細胞膜穿孔実験の様子を示す。

#### (2) 細胞内ラマン分光 (TERS) イメージング

本研究では、Ag ナノ粒子 (粒径 30 nm 程度) を担持した AFM プローブを用いて、局所表面プラズモン共鳴 (LSPR) 効果を発現させ、細胞内の生体分子のダイナミクス観察機能を付与することを目的として実施した。図 1(b) に細胞内 TERS イメージングの実験方法の概略図を示す。実験には倒立顕微鏡組込み型の自作のラマン分光装置を使用した。励起光源には、波長 532 nm, 出力 50 mW の半導体励起固体レーザー (Cobolt Samba 53250) を使用した。ビーム条件を調整した後、レーザー光を倒立顕微鏡 (ニコン Ti-U) 内に導入し、対物レンズ (60 $\times$ , NA 0.7, スポット径 1.8  $\mu\text{m}$ ) を介して AFM 探針先端に集光した。また、試料 (探針先端の極近傍) から得られたラマン散乱光は、同一の対物レンズで集光し、分光器 (浜松ホトニクス C11713CA, 分解能 10 cm<sup>-1</sup>) に導入することで、ラマンスペクトルを取得した。図(c)に TERS 分光測定の様子を示す。

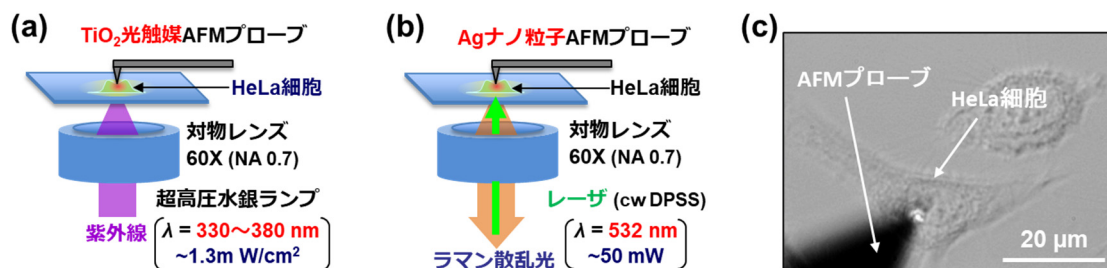


図 1 光触媒 AFM プローブを用いた生細胞のナノ化学加工 (細胞膜穿孔) と Ag ナノ粒子担持 AFM プローブを用いた細胞内 TERS イメージング

#### 4. 研究成果

##### (1) 光触媒 AFM プローブを用いた細胞膜穿孔

図 2 は押し込み速度を変化させたときに得られた細胞膜穿孔時の典型的なフォースカーブである。図(a)は押し込み速度 300nm/s である。図から、探針先端が細胞膜と接触(図中 CP)し、荷重が増加した後、約 230nm 押し込んだ時点で荷重が急激に減少していることがわかる。これは AFM 探針先端が細胞膜を穿孔したことに起因している。この例では細胞膜が穿孔された際の荷重(穿孔荷重)は 162nN であった。図(b)は押し込み速度を 150nm/s と減少させたときの結果である。同様に探針先端が細胞膜に接触することで荷重の増加し、押し込み荷重が 141nN に達した時点で荷重が一旦減少しており、細胞膜が穿孔されたことがわかる。しかし、その後は荷重がほぼ一定となる特異な現象(図中 CFR)が認められた。この例では荷重が一定となっている押し込み量は 37nm であり、時間としては 250ms に相当する。本実験では、前者を平坦部距離、後者を接触時間と定義する。この現象は、押し込み速度の減少とともにより顕著となり、平坦部距離は、図(c)の 100nm/s で 74nm (接触時間 740ms)、図(d)の 50nm/s では 126nm (接触時間 2.52s) と増加した。

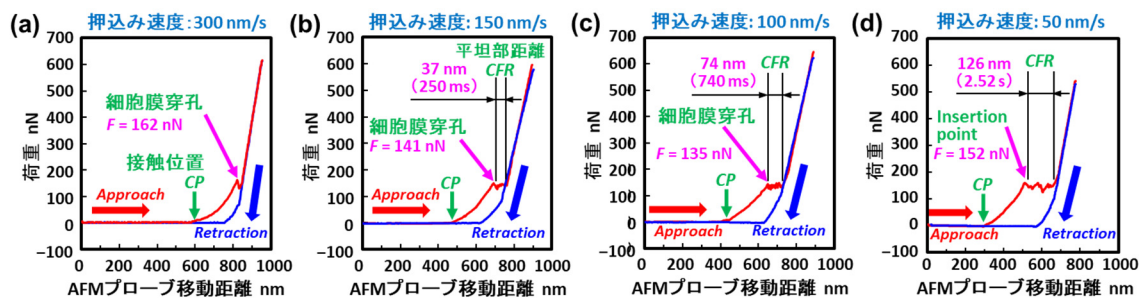


図 2 光触媒 AFM プローブを用いた細胞膜穿孔実験 (押し込み速度の影響)

図 3 に平坦部距離および接触時間に及ぼす押し込み速度の関係を示す。図(a)から、平坦部距離は、押し込み速度が減少するにしたがって大きくなるのがわかる。押し込み速度 300nm/s では、平坦部が現れる確率は 55% (11/20) であった。ただし、平坦部距離の平均は  $10 \pm 9$  nm ( $n = 11$ ) と小さく、細胞膜の厚さ (7nm) とほぼ同程度であった。一方、押し込み速度を 150nm と減少させた場合には、平坦部が現れる確率は 100% ( $n = 7$ ) となり、平坦部距離も  $40 \pm 26$  nm ( $n = 7$ ) と増加した。ここで、荷重が一定であることは、細胞膜表面に探針先端が押し付けられているのにも関わらず、AFM プローブに反力が加わっていないことを意味しており、この状態を維持したまま探針先端部分が細胞内に 40nm 程度の深さまで押し込まれていることになる。このことから、TiO<sub>2</sub> 光触媒酸化反応によって細胞膜が分解されながら穿孔が行われているものと考えられる。同様に、押し込み速度 100nm/s の条件下でも平坦部が認められる確率は 100% ( $n = 10$ ) となり、平坦部距離は  $80 \pm 31$  nm ( $n = 10$ ) とさらに増加した。以上の結果は、探針先端が細胞内に押し込まれる速度が減少したことで、細胞膜を分解・除去(光触媒酸化反応)するために必要となる十分な反応時間が確保できていることを示唆しているものと思われる。さらに低速となる 50nm/s でも平坦部が認められる確率は 100% ( $n = 20$ ) であり、この仮説を支持している。ただし、平坦部距離については、 $94 \pm 30$  nm ( $n = 20$ ) となり、一定値に収束する傾向を示した。

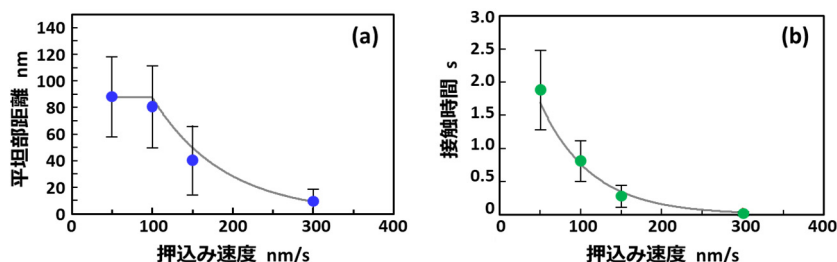


図 3 平坦部距離および接触時間に及ぼす押し込み速度の影響

図 4 に細胞膜穿孔確率および穿孔荷重に及ぼす押し込み速度の影響を示す。図から、細胞膜の穿孔確率は押し込み速度 100nm/s 以下の条件で 100% となっていることがわかる。一方、穿孔荷重については、押し込み速度による影響は認められず、ほぼ一定となっていた。

図 5 は細胞膜穿孔後の生存確率の評価の一例である。生細胞染色試薬 Calcein-AM (濃度 8μM) を用いて生死判別を行った。図から、穿孔後も緑色の蛍光を発色していることから、HeLa 細胞が生存していることがわかる。生存確率は、押し込み速度 300nm/s の条件で 100% ( $n = 8$ )、50nm/s の場合も 100% ( $n = 10$ ) であり、本提案手法が低侵襲な細胞膜穿孔技術として有用であることが実証できた。

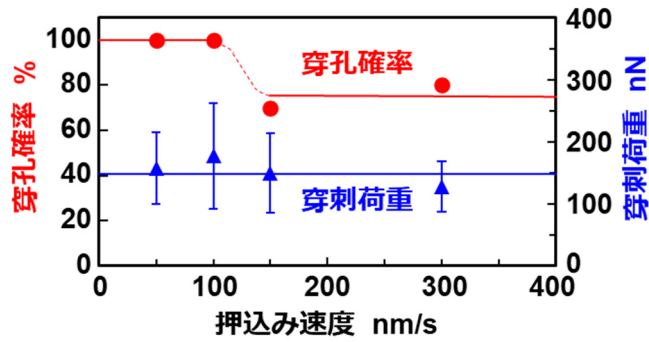


図 4 細胞膜穿孔確率および穿孔荷重に及ぼす押し込み速度の影響

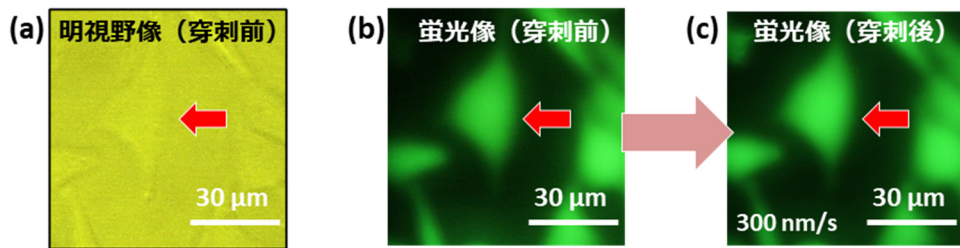


図 5 細胞膜穿孔後の細胞生存率の評価実験（押し込み速度：300nm/s）

## (2) 細胞内ラマン分光 (TERS) イメージング

図 6(a)に細胞内 TERS スペクトルの時間変化の一例を示す。Ag ナノ粒子を担持した AFM プローブの探針先端を HeLa 細胞に穿孔した後に、2min 間隔で 20 回のラマン分光データを取得した（レーザーパワー50mW，露光時間 10s，積算回数 3 回）。図に示すように，細胞内のタンパク質（ $1004\text{cm}^{-1}$ ,  $1604\text{cm}^{-1}$ ），DNA（ $793\text{cm}^{-1}$ ），グリコーゲン（ $484\text{cm}^{-1}$ ）に起因するピークが明瞭に認められた。図(b)に主な細胞内分子のラマンピーク強度の時系列変化をプロットした結果を示す。図から，DNA に起因するピーク強度の時間依存性はほとんど認められない。一方，タンパク質（ $1004\text{cm}^{-1}$ ）とグリコーゲンに起因するピーク強度は大きく変動しており，ピーク強度の増減の関係には完全な逆相関があることがわかった。さらに，2つのタンパク質のピーク強度の増減については，その傾向が完全に一致していることがわかった。現時点では細胞の代謝メカニズムにおける生理学的な意味は不明ではあるが，本実験は，細胞内の分子動態のイメージングが可能であることを示唆する結果と言える。

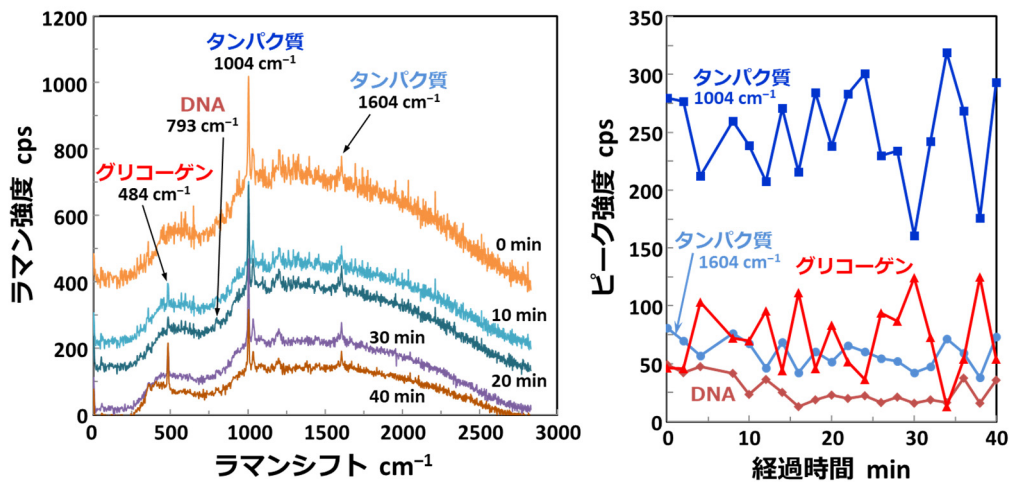


図 6 細胞内ラマンスペクトルの時系列変化および代表的なピーク強度の時間変化

図 7(a)および(b)は，同一の HeLa 細胞の細胞核および葉状仮足（細胞質）から取得したラマンスペクトル（ピーク強度）を定量的に比較した結果である（レーザーパワー50mW，露光時間 10s，積算回数 3 回，同一場所でラマンスペクトルを 3 回取得）。図から，シトクロム *c* およびタンパ

ク質のピーク強度には両者で大きな差異は認められない。一方、DNA に起因するピークは細胞核で強く現れ、仮足では弱いことがわかる。これは、細胞核内の DNA 濃度が高いことを反映した結果である。また、脂質については、細胞核ではピークが認められず、仮足のみで確認ができた。これは、細胞高さが小さい仮足部分では探針先端部が細胞膜（脂質）に接触し、その結果、脂質の情報を取得したことを意味している。このように、単一細胞内の場所による違いを明瞭にイメージングできることが実証できた。

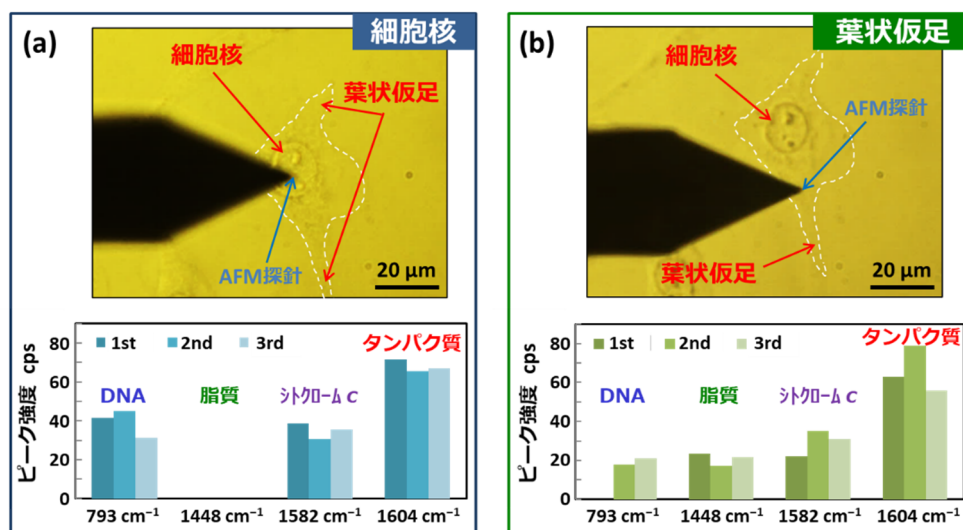


図 7 HeLa 細胞の細胞核と葉状仮足（細胞質）のラマンスペクトルの比較

### (3) まとめと今後の展望

本研究では、TiO<sub>2</sub> 光触媒 AFM プローブを細胞膜のナノ化学加工(光触媒酸化反応)に適用し、細胞膜穿孔確率および穿刺荷重に及ぼす押込み速度の影響を明らかにし、低侵襲な細胞膜穿孔技術としての可能性を実証した。さらに、Ag ナノ粒子を担持した AFM プローブを用いた細胞内ラマン (TERS) イメージングを行い、細胞内の分子動態を時系列的に取得可能であることを示した。また、細胞内での特徴の違い(細胞核と細胞質)をナノスケールの空間分解能で同定が可能であることを実証した。加えて、基礎実験の結果から、ナノ加工用の紫外線励起光とナノ計測用のレーザー光を同軸で細胞に照射した場合においても、光の干渉が起こらずにラマンスペクトルが取得できることを確認した。将来的には、本研究成果をさらに発展させて、インプロセスかつリアルタイムでの加工状態の可視化技術を実現し、ナノ・バイオテクノロジーの発展を支える革新的なプラットフォームを提供する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 柴田隆行	4. 巻 84
2. 論文標題 精密工学と生命科学との接点	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 精密工学会誌	6. 最初と最後の頁 887-891
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.2493/jjspe.84.887">https://doi.org/10.2493/jjspe.84.887</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takayuki Shibata, Hiromi Furukawa, Yasuharu Ito, Masahiro Nagahama, Terutake Hayashi, Miho Ishii-Teshima, Moeto Nagai	4. 巻 11(5)
2. 論文標題 Photocatalytic Nanofabrication and Intracellular Raman Imaging of Living Cells with Functionalized AFM Probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 495(13pp)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi11050495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柴田隆行
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を応用した次世代ナノ加工・計測技術
3. 学会等名 精密工学会「知的ナノ計測専門委員会」特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田隆行
2. 発表標題 マイクロ・ナノ構造創成技術
3. 学会等名 表面技術協会関西支部「平成30年度第1回表面物性研究会」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田隆行
2. 発表標題 微細加工技術 (MEMS) を駆して細胞の機能を “ 診る ” , “ 操る ” , “ 創る ”
3. 学会等名 第8回高専-TUT太陽電池合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柴田隆行
2. 発表標題 MEMS技術によるオンチップ細胞ファクトリーの実現
3. 学会等名 第47回名古屋駅前イノベーションハブ技術発表会「MEMS 関連技術～MEMS のプロセス・評価技術から応用展開～」 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Shibata, Kazutaka Uchida, Junya Araki, Miho Ishii-Teshima, Terutake Hayashi, Moeto Nagai
2. 発表標題 Photocatalytic Nanofabrication and Intracellular Imaging of Living Cells Using Functionalized AFM Probe
3. 学会等名 The 45th International Conference on Micro and Nano Engineering 2019 (MNE 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田和孝, 筒井舜平, 手島 (石井) 美帆, 林 照剛, 永井萌土, 柴田隆行
2. 発表標題 機能化AFMプローブを応用した生細胞のナノ加工・計測技術の開発
3. 学会等名 第10回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 T. Shibata, J. Sasano, M. Nagai	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 957
3. 書名 “Catalytic AFM-Based Nanofabrication”, in Jiwang Yan (ed.), Micro and Nano Fabrication Technology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

豊橋技術科学大学 機械工学系 マイクロ・ナノ機械システム研究室ホームページ <a href="http://mems.me.tut.ac.jp/">http://mems.me.tut.ac.jp/</a> 豊橋技術科学大学 教員紹介ホームページ <a href="https://www.tut.ac.jp/university/faculty/me/64.html">https://www.tut.ac.jp/university/faculty/me/64.html</a>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----