

機関番号：24506
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20310068
 研究課題名（和文） 集束イオンビーム3次元ナノ構造形成によるバイオナノツールの作製と評価
 研究課題名（英文） Fabrication and evaluation of 3 dimensional bio-nanotool by focused-ion-beam
 研究代表者
 松井 真二(MATSUI SHINJI)
 兵庫県立大学・高度産業科学技術研究所・教授
 研究者番号：00312306

研究成果の概要(和文):バイオナノツールをガラスキャピラリー先端部に集束イオンビーム(FIB)CVDにより作製し、バイオ実験に使用し、その有効性を実証した

研究成果の概要(英文): The bio-nano-tool was developed on a top of glass capillary by using focused-ion-beam -CVD (FIB-CVD) and the excellent performance was demonstrated in a bio-experiment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：ナノテクノロジー

科研費の分科・細目：2102

キーワード：集束イオンビーム、FIB、CVD、バイオツール

研究開始当初の背景

単一小器官のメカニズム等を計測するには、細胞以下のレベルで自由に小器官を操作および計測できることが必要である。これまでに、細胞レベルでの光や次期を利用したマニピュレータや生体情報の計測を行うためのセンシングデバイス等について報告されているが、細胞内の単一オルガネラの選択抽出・機能計測には至っていない。そこで、細胞内単一小器官の選択抽出およびその生態機能計測を行えるナノツールを研究し、その有用性を実証する。

2. 研究の目的

現在、生体のメカニズムを調べるために、大量の生体試料を準備し、生体試料全体の特性を計測する手法が一般的に利用されている。例えば、20万～30万個のラン藻細胞を破碎し、遠心分離法によりチラコイド膜を取り出し、光を当てたときに発生する電流を電極または分光学的測定により計測することで、光合成メカニズム(活性・効率等)の研究が行われてきた。この場合では、チラコイド膜を取り出す際に、計測対象であるチラコイド膜に損傷をあたえている可能性が高く、また、1つの葉緑体内部やチラコイド膜の働きを調べることは困難が予想される。そのため、生体

内に存在する個々のオルガネラの働きやそのメカニズムをより深く理解するためには、大量の生体試料を計測(多細胞計測)するのではなく、一つ一つの働きを見ていく事(単一細胞内計測)が重要であると考えている。単一オルガネラのメカニズム等を計測するためには、細胞以下のレベルで自由にオルガネラを操作できることが重要である。そのため、その目的を達成するために、集束イオンビーム励起表面反応による化学気相成長法(FIB-CVD: Focused-Ion-Beam Chemical-Vapor-Deposition)を用いて、単一オルガネラ操作のためのバイオナノツールに関する研究を行った。集束イオンビーム励起表面反応を用いた立体ナノ構造形成技術を用いて、バイオナノツールを作製し、その機能性を評価する。

3. 研究の方法

生命科学分野や医療分野において、細胞を扱う場合ガラスキャピラリーを利用することが一般的である。そのため、ガラスキャピラリーの位置を3次元的に制御するためのマニピュレータなどの高精度位置操作技術に関しても確立されている。そのため、本実験に対してもガラスキャピラリーを利用したバイオナノツールを作製する。まず、マイクロピペットプラーによりガラスキャピラリーの先端径を $1\mu\text{m}$ にすることができる。次に、Gaイオンビームによるチャージアップを避けるために、ガラスキャピラリー表面にAuをDCスパッターによりコーティングする。最後に、FIB-CVDを用いてガラスキャピラリー先端にフィルタリングツール構造を作製する。CVDソースガスとしては、フェナントレンガスを用いてFIB-CVDを行う。堆積材料はDLC(ダイヤモンドライクカーボン)である。任意の3次元構造作製は、FIB装置外部に設置した3-D CAMIにより、ビームのX方向、Y方向、Z方向、ブランキングの位置、時間制御を行う。集束イオンビームCVDにより、バ

イオナノツールとして、神経成長阻害バイオナノツールをガラスキャピラリー先端部に集束イオンビーム(FIB)CVDにより作製し、バイオ実験に使用し、その有効性を実証した。

4. 研究成果

フェナントレンガス($\text{C}_{14}\text{H}_{10}$)ソースを用いたダイヤモンドライクカーボン(DLC)堆積薄膜の評価をこれまでに行ってきたが、水素含有量による材料物性評価が機械的強度に関係すると考えられる。そのため、ダイヤモンドライクカーボン堆積薄膜の水素含有量を測定した。FIB-CVD DLC薄膜の元素組成をRBSとERDAで測定した結果、Cが87.4%、Gaが3.6%、Hが9.0%であった。また、FIB-CVDで作製したDLCでは一般的なCVD法と比べてやや水素含有率の少ないDLCが生成されていることが分かった。

FIB-CVD DLCの物性のうち、DLCピラーのヤング率は堆積速度によって、80-600Gpa程度まで変化する。このDLCのヤング率等の機械的強度に影響を与える要因のひとつにHの含有率が考えられる。一般的にDLC薄膜では水素含有量が多いほどヤング率が小さく、少ないほどヤング率が大きくなる傾向が知られている。ナノピラーと薄膜は同じ装置と原料ガスで作製しているため、今回の測定でHの存在が明らかになったDLC薄膜と同様にナノピラーでもHを含むと考えられる。そのため、ヤング率や密度が幅広い値をもつ理由の一つとして、Hの含有量の違いがあるのではないかと推測される。

さらに、DLCの機械的強度などの物性はCの結合状態によっても大きく異なる。今回の測定で、DLCの構成元素に3.6程度あるGaがCの sp^3 構造形成を促進しているという結果が得られている。炭素原子間における構造はダイヤモンドに由来するものであり、 sp^3 構造が多いほどDLCの機械的強度が大きくなると考えられる。これにより、ナノピラーのヤング率が堆積速度で変化する理由

の一つにGaの含有量の違いがあると推測される。

バイオナノツールとして、神経成長阻害バイオナノツールをガラスキャピラリー先端部に集束イオンビーム(FIB)CVDにより作製した。CVDガスとしてフェナントレン(C14H10)を用いた。堆積材料はダイヤモンドライクカーボン(DLC)であることを、放射光XAFSにより確認した。この神経成長阻害バイオナノツールの機械的強度を走査プローブ顕微鏡のカンチレバーによるヤング率測定により行い、100GPaと十分な機械的強度を有することを確認した。さらに、FIB-CVDにより作製した立体バイオナノツールとガラスキャピラリー先端部との界面状態を知るために、モンテカルロ計算によるGaイオンの侵入深さを計算した。その結果、Gaがガラスキャピラリー先端にイオン注入された深さが20nm程度であった。神経成長阻害バイオナノツールを実際のバイオ実験に使用した結果、操作性、強度共に有用に機能することが実証された。

(ナノ構造物を用いた発生中の脊椎動物の中樞神経内での回路形成改変の試み)

胚の中で神経回路が発生するためには、それぞれの軸索が正確に、正しい目標に向かって舵を取って進んでいく必要がある。これは主に、軸索の先端にある成長円錐と呼ばれる部分がアメーバのように動き先導することによって、また通り道にある細胞外基質や他の細胞と相互作用する事によって実現されている。神経回路形成は、これまで、生化学、遺伝学、分子生物学的手法によって詳しく解析されてきた。今回の発表では、これらとは全く異なるアプローチを試みている。我々は、FIB-CVDによるナノ立体構造形成技術を用いて、ナノ/マイクロスケールの構造物「軸索ブロッカー」をつくり、物理的に軸索の伸長を阻害する実験を試みた。

この実験では、ゼブラフィッシュ胚のマウスナー

一神経細胞をモデルとして用いた。マウスナー細胞は、個体が危険な刺激を受けた時に、それと反対側に逃げる逃避行動に重要な役割を持っている。後脳第4節に存在する一対のマウスナー細胞の軸索は、まず正中線に向かってのび、正中線を越えてから尾側にまがり、体の反対側の脊髄へと縦方向にのびていくことがわかっている。私達は、正常な胚だけでなく、マウスナー細胞の数が普通の約30倍ある突然変異体 mindbomb も実験材料として使用した。我々が、マウスナー細胞の軸索が正中線を越えるすこし前に、正中線上に軸索ブロッカーを挿入したところ、幾つかの軸索が異常となり、体の反対側ではなく同側側にのびる事が観察された。

この結果は、発生途上において特定のタイミングで単純な物理的操作を行う事で、神経回路形成を、生きた脊椎動物の体内で改変する事が可能である事を示唆している。

4. 今後の研究の推進方策

引き続き、FIB-CVDにより作製した神経成長阻害バイオナノツールを用いた実験を行い、神経成長阻害のメカニズムを探索する。

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2件)

- ① Y. Kometani, S. Ishihara, K. Kanda, Y. Haruyama, T. Kaito and S. Matsui, Education Position control of Incorporated Gallium in Diamond-Like Carbon Deposition by Focused-Ion-Beam Chemical Vapor Deposition, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有Vol.47, 2008, 5032-5035.
- ② K. Kand J. Igaku, A. saikubo, R. Kometani, T.Suzuki, K. Nishihara, H. Satoh and S. Matsui, Effects of Annealing on Material Characteristics of Diamond-Like Carbon Film Formed by Focused-Ion-Beam Chemical Vapor Deposition, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有Vol. 47, 2008, 7464-7466.
- ③ Y. Nakai, Y. Kang, M. Okada, Y. haruyama, K. kanda, T. Ichihashi, and S. Matsui, Mechanical Characteristics of Nano spring fabricated by Focused-Ion-Beam

- Chemical Vapor deposition Using Ferrocene Source Gas, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有 Vol. 49, 2010, 06GH07-1-06GH07-4.
- ④ Y. Kang, M. Okada, C. Minari, K. Kanda, Y. Haruyama and S. Matsui, Room-Temperature Nanoimprinting Using Liquid-Phase Hydrogen Silsesquioxane, Jpn. J. Appl. Phys., 査読有, Vol. 49, 2010, 011005-1011005-5
- ⑤ Y. Kang, S. Omoto, Y. Nakai, M. Okada, K. Kanda, Y. Haruyama and S. Matsui, Nanoimprint application of nonplanar nanostructure fabricated by focused-ion-beam chemical vapor deposition, J. Vac. Sci. Technol., 査読有, Vol. B20, 06GL13-106GL13-5

〔学会発表〕 (計 件)

- ① 神田一浩、岡田真、姜有志、松井真二「FIB-CVD法で成膜したDLC薄膜に対するアニール効果」、第56回応用物理学関係連合講演会、平成21年4月1日、筑波大学
- ② 中井康喜、姜有志、岡田真、神田一浩、春山雄一、市橋徹也、松井真二「集束イオンビーム励起化学気相成長法で作成した鉄含有ナノスプリングへのアニール効果」、第57回応用物理学関係連合講演会、平成22年3月19日、東海大学
- ③ 中井康喜、姜有志、岡田真、神田一浩、春山雄一、松井真二「FIB-CVD法で成膜されたFe₀Ga含有薄膜のアニール効果」、第71回応用物理学学会学術講演会、平成22年9月14日、長崎大学
- ④ 中井康喜、姜有志、岡田真、神田一浩、春山雄一、市橋徹也、松井真二「FIB-CVDで成膜したFe-Ga含有DLC膜のアニールによるFeおよびGaの挙動観察」、第58回応用物理学関係連合講演会、平成23年3月26日、神奈川工科大学
- ⑤ Y. Nakai, Y. Kang, M. Okada, Y. Haruyama, K. Kanda and S. Matsui, "Mechanical Characteristics of Nanosprings Fabricated by Focused-Ion-Beam Chemical Vapor Deposition Using Ferrocene Source Gas", 22nd International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 平成21年11月18日、シエラトン札幌
- ⑥ Y. Nakai, Y. Kang, M. Okada, Y. Haruyama, K. Kanda and S. Matsui,

"Annealing effect of Fe-Ga doped DLC film formed by Focused-ion-beam chemical vapor deposition using ferrocene source gas", 23rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 平成22年11月12日、リーガロイヤルホテル小倉

〔図書〕 (計 2 件)

- ① 松井真二、米谷玲皇、シーエムシ出版、「細胞分離・操作技術の最前線 (分担出版) 第4章 集束イオンビームを用いたバイオナノツールの作製と応用」(31-41頁) 2008年
- ② 松井真二、米谷玲皇、(株)エヌ・ティ・エス、「ナノイメージング (分担執筆)、第4章 第3章 集束イオンビームCVDによる立体ナノ構造形成の動的観測」(341-348頁) 2008年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.lasti.u-hyogo.ac.jp/nanotechnology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 真二 (MATSUI SHINJI)

兵庫県立大学・高度産業科学技術研究所・教授

研究者番号：00312306

(2) 研究分担者

神田 一浩 (KANDA KAZUHIRO)

兵庫県立大学・高度産業科学技術研究所・教授

研究者番号：20201452

八田 公平 (HATTA KOHEI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：40183909