

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18969

研究課題名（和文）界面形態および電荷分布の動的観察可能な高速イオン伝導顕微鏡の開発

研究課題名（英文）Development of a high-speed ionic conductance microscope capable of dynamically observing interface morphology and charge distribution

研究代表者

岩田 太（Iwata, Futoshi）

静岡大学・電子工学研究所・教授

研究者番号：30262794

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：液中環境での固体材料や生体細胞膜等の活性場界面を動的観察することはそこで生じる現象解明に極めて有効である。本研究の目的は液中環境において試料表面をナノスケールの分解能で動的観察可能な高速イメージング法を開発することである。走査型イオン伝導顕微鏡(Scanning Ion Conductance Microscopy: SICM)をベースに2流路のダブルバレルナノピペットを用いて容量成分のイオン電流を相殺する新奇な電流検出法により高速な電流検出を実現した。開発した装置の実証実験として生体試料を測定した。細胞表面で複雑に形態変化しながら活発に運動する微絨毛や突起の振る舞いの動的観察を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

液中環境において細胞や組織などの生体膜表面は、細菌やウイルス感染、分子やイオンの脱吸着、タンパク質や生体分子の発現の活性場である。また、材料表面においては結晶成長や腐食、触媒反応といった物理・化学反応が盛んに生じている。近年、その解明に向けての研究が精力的に進められている。本研究は複雑に変化する界面形態をナノスケールで高速イメージングすることで、動的に可視化することを実現した。本手法は、表面科学における学術的意義のみでなく、生細胞における菌の感染メカニズム、組織の動的解析といった医療分野から二次電池・キャパシタなどのデバイス開発といった工業的分野まで幅広い分野への応用展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Dynamic observation of active interfaces of solid materials and biological cell membranes in a liquid environment is extremely useful to elucidate the phenomena occurring there. The purpose of this study is to develop a high-speed imaging method for dynamic observation of sample surfaces in liquid environments with nanoscale resolution. Based on Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM), a novel current detection method using a double-barrel nano-pipette with two channels to cancel ion current of capacitive components was developed to realize high-speed current detection. Biological samples were measured as a demonstration of the developed system. Dynamic observation of the behavior of microvilli and protrusions actively moving on the cell surface while undergoing complex morphological changes was realized.

研究分野：プローブ顕微鏡開発

キーワード：走査型イオン伝導顕微鏡 ナノバイオ 表面形状計測 動的観察

1. 研究開始当初の背景

近年、バイオテクノロジーの発展に伴い、分子・細胞レベルでの生体試料の挙動を可視化することのできるバイオイメージング技術の研究に注目が集まっている。生体試料の挙動や構造を生きのまま非侵襲的に観察することは、医学、生物学等の研究発展に不可欠である。こうしたナノスケールでの生体試料の観察手法として、走査型プローブ顕微鏡 (Scanning Probe Microscope : SPM) の一種である走査型イオン伝導顕微鏡 (Scanning Ion Conductance Microscope : SICM) がある。SICM はプローブとして先端に微細な開口を有するナノピペットを用いて電解液中でイオン電流を検出することで、試料の表面形状を観察する。原子間力顕微鏡など他の SPM と比較して非接触・低侵襲で表面を観察できるため、柔らかい生体試料の観察に優位な点がある。また高アスペクト比のプローブを走査することで、起伏の大きい試料でも観察可能である。しかし、SICM は一般に、画像取得により多くの時間を要するという問題点がある。一般的な SICM の測定手法は 1 画素ごとにピペットを昇降させるホッピングモードと呼ばれる手法のためピペットの総移動量が多い。したがって 1 画像を取得するのに数分以上の時間を要するため、生体試料の動的変化を観察することは困難である。また、SICM の微小なイオン電流信号は外乱による電磁ノイズの影響を受けやすい。すなわち応答特性の改善に加え、電磁ノイズの抑制が SICM の信号検出の重要な課題である。前者の課題である測定時間の長期化の主な原因としては、ピペットの持つ浮遊容量による時定数で信号検出系の応答特性が決まってしまうことである。これについては、ピペットの静電容量を補償する検出回路を開発することによる応答特性の改善が報告されている。しかしながら、後者の課題である電磁ノイズの抑制を応答特性の改善とともに実現することは難しい。液中環境での材料や生体細胞膜の表面といった固液界面の活性場において、刻々と変化しながら発現する現象をナノスケールの高分解能で動的観察することは、そこで生じる様々な機能や現象の解明に極めて有効である。よって活性界面の動的観察を実現するために SICM の高速イメージング手法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は液中環境において試料表面をナノスケールの分解能で動的観察可能な高速イメージング法を開発することである。SICM をベースに 2 流路を有するダブルバレルナノピペットを用いて浮遊容量の成分を相殺する手法を開発した。さらに浮遊容量の相殺の過程でノイズ成分を抑制する機構を組み込むことによって、より高い信号雑音比を得る手法を開発した。これらの SICM における測定時間および信号雑音比の改善について評価し、さらに、実際に生体細胞の動的観察を行うことで、本手法の有用性を検証した。

3. 研究の方法

(1) SICM の動作原理

SICM は、ガラス管を熱引きして作製されたナノピペットをプローブとして用いて表面形状を取得する。ナノピペットの先端開口径は数十 nm 程度であり、SICM の取得画像の空間分解能はこのピペット先端の開口径に依存する。SICM の基本的な原理図を図 1(a) に示す。電解液で満たされたピペット内部および試料の入った電解液中に電極を配置し、電圧を印加することでピペット先端の細孔を通してイオン電流が流れる。ピペット先端が試料表面に極めて接近した場合、ピペットの先端開口部が試料によって閉塞され、イオン電流は減衰する。したがってイオン電流の大きさはピペットと試料間の距離に依存する。ピペット先端を試料にアプローチした際のイオン電流の挙動(アプローチカーブ)を図 1(b) に示す。このイオン電流の減衰を検知し、ピペットと試料間の距離制御信号として用いることで試料表面を非接触で観察することができる。

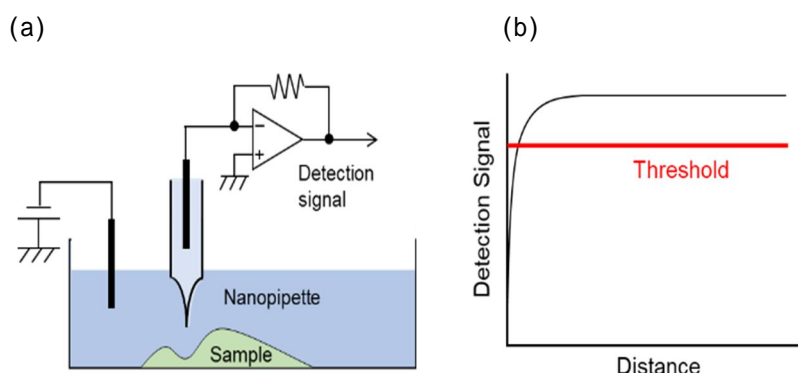


図1 一般的な SICM の測定原理
(a) 原理図 (b) アプローチカーブ

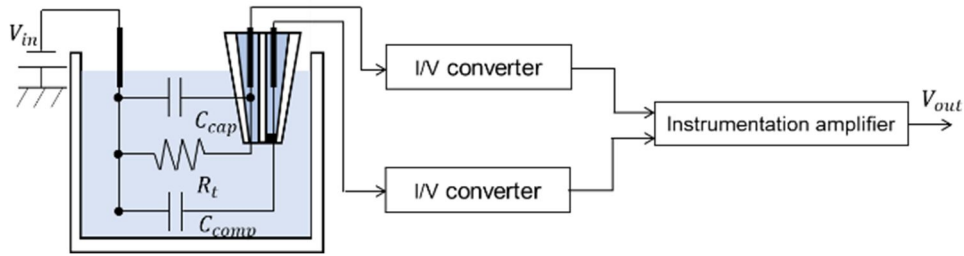


図2 静電容量補償を備えた信号検出回路の概略図

(2) ダブルバレルナノピペットを用いた静電容量補償

SICM のプローブであるナノピペットは、一般的に単一の先端開口を有する。これに対して、本研究では先端に二つの開口を有するダブルバレルナノピペットを用いて浮遊容量を相殺する手法を開発した。水溶液中において、ナノピペットのガラス表面は一般的に脱プロトン反応により負に帯電し、電気二重層を形成している。この電気二重層に由来する静電容量によってピペット開口に流れるイオン電流信号の応答が遅れる。本研究では、二つの開口のうち片側の開口を閉塞することで、片側開口のみをイオン電流が通過するナノピペットを作製した。このナノピペットから得られる二つの信号の差分を検出して、浮遊容量成分を相殺することで SICM のイオン電流信号の応答特性を改善する。

本研究で作製した静電容量補償を備えた信号検出の構成を図2に示す。ピペット電極はそれぞれの I/V 変換回路に接続され、計装アンプを通して差分信号を検出する。このとき等価回路として、2 開口あるナノピペットのうち、開口側にはピペット抵抗成分と静電容量成分の電流が流れる。これに対して閉塞側には静電容量のみ流れている。この二つの電流信号の差分を検出することで静電容量に流れる電流成分を相殺できる。

(3) SICM の装置構成

本研究の装置構成を図3に示す。SICM の XYZ 軸粗動機構は位置決めステージを圧電モータ (Picomotor, New Focus) により駆動している。XY 走査機構には 3D フラットスキャナ (NIS-70, Nanonics) を、Z 軸走査機構には自作の Z 軸圧電ステージをそれぞれ使用している。Z 軸圧電ステージには駆動機構と同様の機構を逆方向に取り付けることによって、慣性力を相殺する構成とした。ピペットの先端開口部を流れるイオン電流は自作の I/V 変換回路と浮遊容量相殺用の差動アンプで検出する。この出力は FPGA ボードに入力される。FPGA は信号検出回路からの出力信号の検知と、XYZ 軸圧電走査機構の制御および PC への測定データの送信を担っている。PC は各種パラメータの入力および測定データの表示を行っている。SICM の測定時間短縮化において機械的な応答速度の向上は重要な要因である。本研究では新たに Z 軸アクチュエータを作製することによって更なる高速化を試みた。アクチュエータに使用する圧電素子には中空圧電素子を採用した。中空圧電素子の中央にピペットを通す機構にすることにより、ピペットホルダーの小型化が可能となり質量を小さくおさえることができる。またピペットホルダー自体の共振も小型化によって高めることができる。

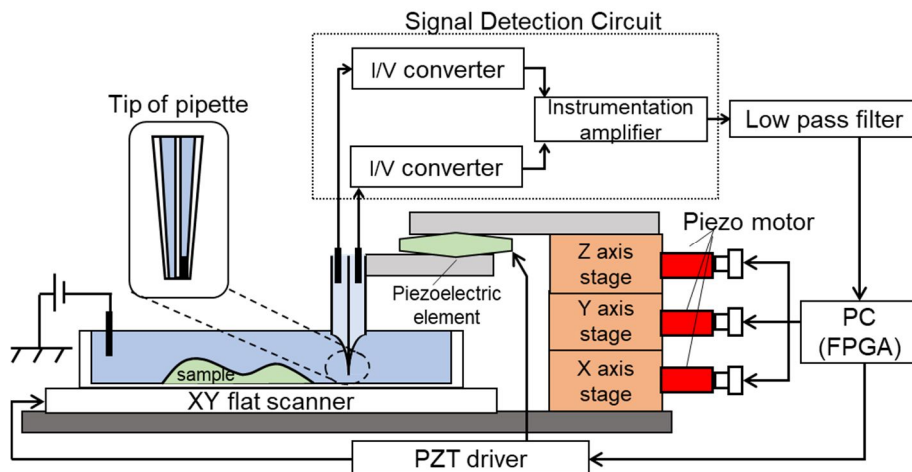


図3 SICM 装置構成概略図

4. 研究成果

(1) 出力信号の周波数応答

本研究で開発した静電容量補償回路を用いて、周波数応答を評価した。結果を図4に示す。本装置では容量性インピーダンスの低下により高周波になるにつれ出力信号は増加する。平坦時の+3 dBとなる周波数をカットオフ周波数とすると、容量補償を適用した場合の電流応答の帯域は500 Hzから4.7 kHzと約10倍の帯域改善を確認した。

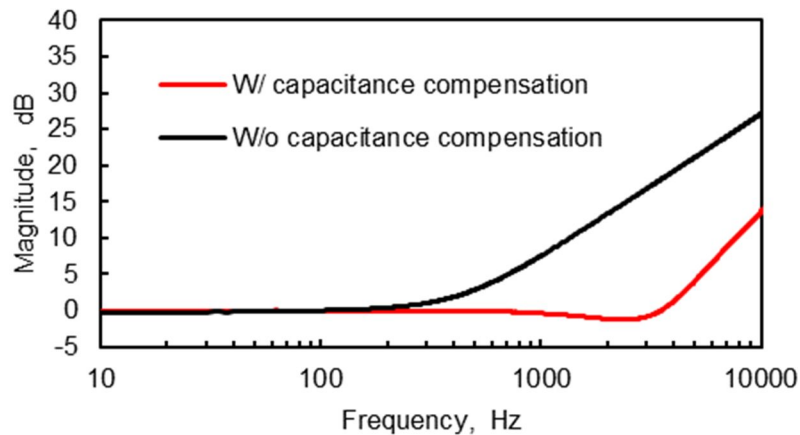


図4 出力信号の周波数応答

本装置の信号検出回路では計装アンプによって二つの電極から得られた信号を差分する。したがって電極からI/V変換回路の入力までに受ける電磁ノイズの影響も差分することによって相殺できる。本研究で開発した検出回路のノイズ密度を評価した結果、電源ノイズや外部からの結合ノイズを相殺して、低ノイズ化したことを確認できた。ダブルパレルナノピペットでは二つの電極は隣り合った状態であるため、電源など周辺機器から受ける電磁ノイズを同じように受けている。本手法を用いて両流路の出力を差分した結果、ノイズを抑制することが可能となった。

(2) 作製した中空Z軸アクチュエータの評価

本研究で作製した中空Z軸アクチュエータの周波数応答を測定した。測定結果を図5に示す。本研究で作製したアクチュエータの共振周波数は約47 kHzである。従来のカウンターウェイトによる慣性補償を適用していないZ軸アクチュエータの共振周波数は1 kHz程度となっており、従来から約50倍の共振周波数を得た。

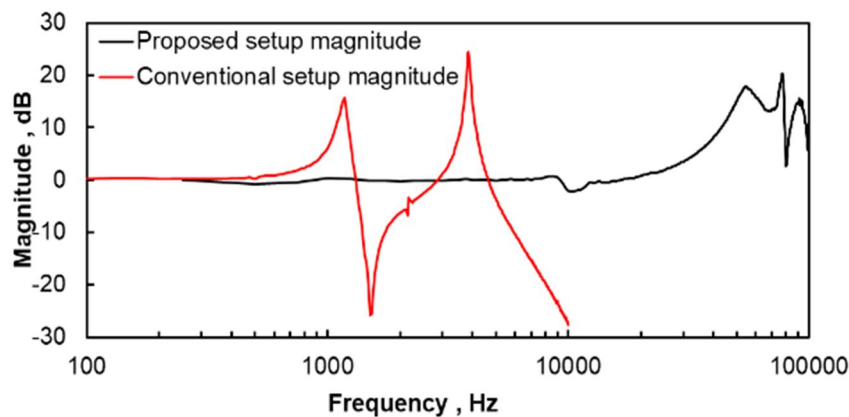


図5 作製したZ軸アクチュエータの周波数応答

(3) SICMの測定時間短縮化の評価

容量補償を適用したSICM像取得時の観察時間を評価した。観察対象にテストサンプルとしてクロスパターンが転写されたPDMS (Polydimethylsiloxane)を用いた。取得画素数は128pixel × 128 pixelである。改善前の装置を用いて取得したSICM像を図6(a)に、改善後のSICM像を図6(b)に示す。これらの画像より、改善前では1183秒程度の測定時間が必要であるのに対して、改善後は133秒程度と1/9以下の取得時間に短縮することができた。

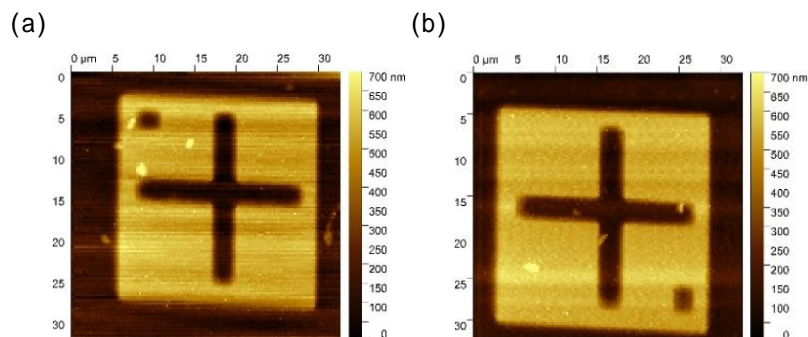


図6 テストパターンのSICM像
 (a) 取得時間 1183 秒 (改善前) (b) 取得時 133 秒 (改善後)

(4) SICMによるHeLa細胞の動的観察

本装置を用いて HeLa 細胞表面に存在する微絨毛の動的な観察を行った。取得画像を図 7 に示す。1 画像当たりの測定時間は約 20 秒である。図 7 より画面内に微絨毛が存在し、フレームごとに徐々に変化している様子が観察された。このように本研究で開発した手法により細胞表面の活性状態の動的観察を実現した。

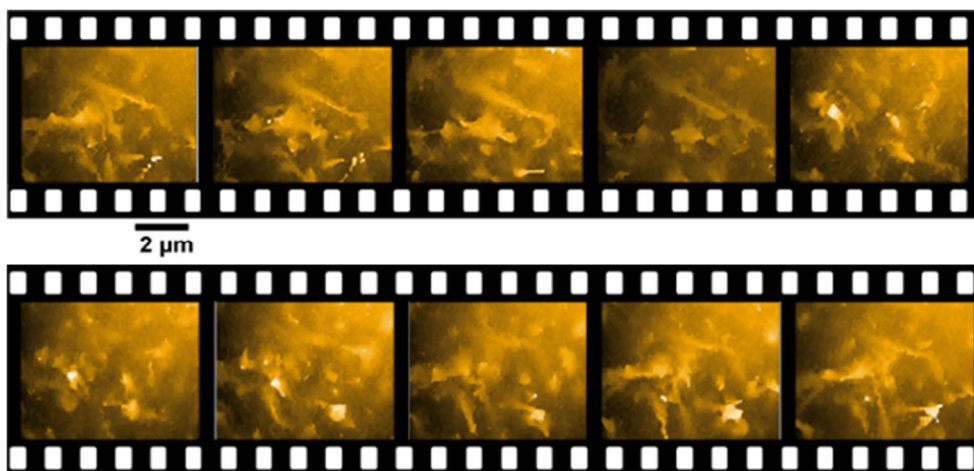


図7 HeLa細胞の連続観察像の切り抜き(1フレーム20秒)

本研究では、電気的な応答特性向上のためにダブルパレルナノピペットを用いた静電容量補償回路を開発し、応答特性を約 10 倍向上させた。さらに Z 軸の高速応答が可能な中空 Z 軸アクチュエータを作製した。これらの技術を実装した装置を開発することで、HeLa 細胞表面の微絨毛の動的変化の様子を観察した。今後の課題として走査時間の短縮化のため、走査方式の変更や XY 圧電走査機構の高速化が挙げられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 K. Nakazawa, T. Tsukamoto, and F. Iwata	4. 巻 94
2. 論文標題 Scanning ion conductance microscope with a capacitance-compensated current source amplifier	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Review of Scientific Instruments	6. 最初と最後の頁 73705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0150948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 N. Fukuzawa, K. Nakazawa, H. Kawasaki, T. Nagata, and F. Iwata
2. 発表標題 High-speed scanning ion conductance microscopy with capacitance compensation using a double-barrel nanopipette
3. 学会等名 The 24th Takayanagi Kenjiro Memorial Symposium（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 N. Fukuzawa, K. Nakazawa, and F. Iwata
2. 発表標題 Scanning ion conductance microscopy with capacitance compensation using a double barrel nanopipette for improving current detection response
3. 学会等名 The 22nd International vacuum congress (IVC-22)（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福澤 直人, 中澤 謙太, 岩田 太
2. 発表標題 ダブルバレルナノピペットによる容量補償を用いた高速走査型イオン伝導顕微鏡の開発
3. 学会等名 第22回 日本表面真空学会中部支部学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福澤 直人、中澤 謙太、河崎 秀陽、岩田 太
2. 発表標題 ダブルバレルナノピペットを用いた静電容量補償による走査型イオン伝導顕微鏡の検出信号応答性の改善
3. 学会等名 2022年度 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福澤 直人、中澤 謙太、岩田 太
2. 発表標題 ダブルバレルナノピペットを用いた静電容量補償による 走査型イオン伝導顕微鏡の測定時間短縮化(第2報) Z軸アクチュエータの広帯域化と細胞表面の動的観察
3. 学会等名 2022年度精密工学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 N. Fukuzawa, H. Inomata, T. Nagata, H. Kawasaki, K. Nakazawa, F. Iwata
2. 発表標題 Improved image acquisition time of scanning ion conductance microscopy
3. 学会等名 31st International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM31) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永田 年、猪股 仁志、岩田 太
2. 発表標題 走査型イオン伝導顕微鏡を用いたCaco-2細胞におけるリステリア菌感染の動的観察
3. 学会等名 令和5年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 河崎秀陽, 岩田 太
2. 発表標題 iPS細胞におけるウイルス感染抵抗性機序の解析の試みーナノスーツ法と走査型イオン伝導顕微鏡を用いて
3. 学会等名 令和5年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	河崎 秀陽 (Kawasaki Hideya) (90397381)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・准教授 (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------