

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700531

研究課題名（和文） 細胞機能イメージングのためのナノニードルアレイの開発

研究課題名（英文） Development of nanoneedle array for imaging of cell functions

研究代表者

川島 貴弘(KAWASHIMA TAKAHIRO)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50378270

研究成果の概要（和文）：本研究は，細胞機能の発現過程における細胞の動的形態および細胞内で発現する生体分子を時間的・空間的に可視化することを可能とする細胞機能イメージング用ナノニードルアレイの開発を目標として実施した。MEMS技術を用いて，細胞機能イメージングにおいてキーデバイスとなる中空構造を有したSiO₂製ナノニードルアレイの作製を行った。また，細胞機能イメージングの実現可能性について検討を行った。

研究成果の概要（英文）：This research is focused on the development of nanoneedle array for cell function imaging which can realize imaging of cell morphology and of molecules expressed in cell during cell growth. In this research, an array of hollow SiO₂ nanoneedles was successfully fabricated. In addition, cell morphology imaging and fluorescent imaging were examined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノニードルアレイ，細胞機能イメージング，多点同時計測，BioMEMS

1. 研究開始当初の背景

近年，健康寿命の延伸や人が健康で安心して暮らせる社会の実現を目指し，ナノテクノロジーとバイオテクノロジーを融合した新たな分野の研究が世界的に盛んに進められている。そうした中で，生体組織を構成する細胞の組織構築・機能発現過程を解明することは，将来の医療・医薬分野の発展に必要なものとなる。そうした背景のもと，細胞の形態変化や分化などを調節する細胞内情報伝達物質としてのCa²⁺の分布パターンをリアルタイムでイメージングする技術や緑色蛍光タンパク質GFPによる蛍光標識プローブを用いて細胞内で発現する種々の生体分子（遺伝子・タンパク質）のシグナル伝達過程の解明を目指した研究などが進められ

ている。しかしながら，培養環境下にある多数の細胞の組織構築・機能発現過程における動的形態と細胞内に局在して存在する生体分子を同時に検出してマッピングを行うことで形態と生体分子の因果関係を明らかにすることが必要であり，細胞単体のみならず細胞間の相互作用までも高効率かつ網羅的に解析する高度な細胞機能解析システムを実現することが必須となる。

2. 研究の目的

本研究は，細胞機能の発現過程における細胞の動的形態および細胞内で発現する生体分子を時間的・空間的に同時に可視化する細胞機能イメージング用ナノニードルアレイの開発を行う。本デバイスは，中空構造を有し

たナノニードルをアレイ化することによって実現し、電解質などのイオン電流変化を検出して細胞の形態を計測する走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) のみならず、生体分子に起因する蛍光シグナルの検出を可能とする走査型近接場光学顕微鏡 (SNOM) としての機能も備えた、細胞の機能発現過程における細胞の形態と生体分子の局在性をマッピングするデバイスの実現を目指すものである。

3. 研究の方法

提案するシステムの概略図を図1に示す。ナノニードル根元近傍のマイクロ流路内に形成した電極と基板近傍の電極間でのイオン電流を測定することで、細胞の形状計測が可能となる。これは、イオンコンダクタンスがニードル先端と測定対象との距離に依存することで計測を可能とする SICM を実現する。同時に、ナノニードル裏面よりレーザー光を導入し、その先端部に発生する近接場光を照明光 (励起光) とすることで、局所的に蛍光の誘起を実現可能であり、従来の蛍光顕微鏡に比べて格段に高い分解能をもつ SNOM としての蛍光イメージングが実現でき、2次元的に走査することで、形状と蛍光の同時多点計測が可能となる。本研究では、半導体製造技術を用いた Microelectromechanical system (MEMS) 技術を用いて、細胞機能イメージングにおいてキーデバイスとなる中空構造を有した SiO₂ 製ナノニードルアレイの作製を行った。また、細胞機能イメージングを実現する SICM による形態の計測方法および多点化に向けた検討を行い、細胞形態イメージングシステムとの一体化に向けた検討を行った。

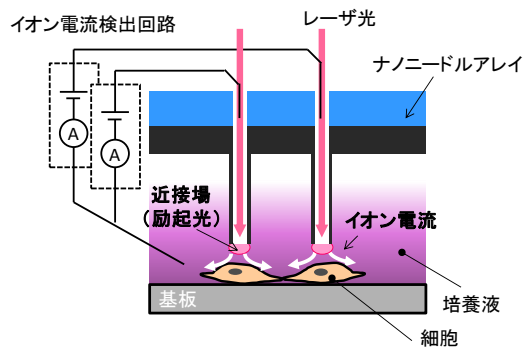


図1 細胞機能イメージング用ナノニードルアレイの概略図

4. 研究成果

(1) ナノニードルアレイの作製

細胞の形態と蛍光の同時多点計測を実現するための SiO₂ 製ナノニードルアレイを図2に示すプロセスにて作製した。これは、Si 基板上に熱酸化により SiO₂ 膜を形成し、EB リソグ

ラフィおよび反応性イオンエッチング (RIE) により、基板表面の SiO₂ 膜上にナノメートルオーダーの円形パターンを形成する。また、裏面の SiO₂ 膜も同様にパターンニングを行う (図2a)。Si の深堀りエッチング (DRIE) を用いることで基板両面から貫通孔を形成し、さらに熱酸化を行うことによって貫通孔内部に SiO₂ 膜を形成し、ナノニードルアレイを Si 基板内に形成する (図2b)。その後、RIE による裏面の SiO₂ 膜除去および水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液 (TMAH) を用いた選択的 Si エッチングを行うことでナノニードルを露出させる (図2c)。このプロセスにより作製したナノニードルの SEM 画像を図3に示す。これは表面のナノニードル先端部の作製プロセスのみを実施した結果であるが、中空構造を有した SiO₂ 製ナノニードルアレイ (内径: 720 nm, 外径: 970 nm, 露出部長さ: 6.6 μm, ピッチ: 5 μm) にて作製可能であることを示した。作製したナノニードルの先端外径に対する円筒構造部の高さの関係を図4に示す。この結果より、先端外径に対してニードル高さは線形に増加し、実現可能なナノニードル円筒部のアスペクト比は6であることがわかった。しかしながら、さらに TMAH による選択的 Si エッチングを行った結果、ナノニードル根元部が先鋭化されており、ナノニードルの作製プロセス条件の最適化が必要であることがわかった。ナノニードル先端部を形成可能であることが分かったことで、基板裏面からの貫通孔形成プロ

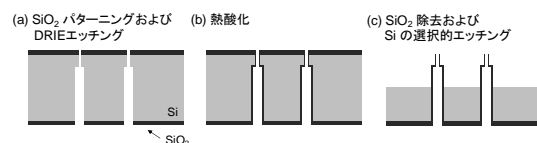


図2 ナノニードルアレイの作製プロセス

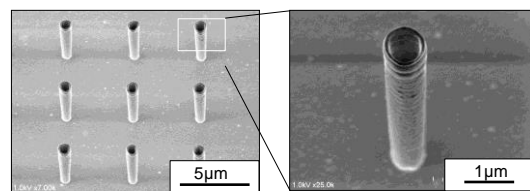


図3 作製したナノニードル

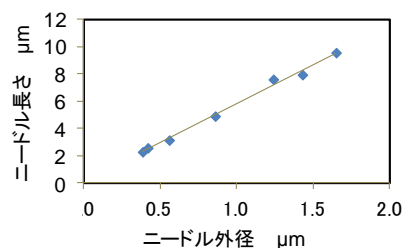


図4 ニードル外径に対する長さの関係

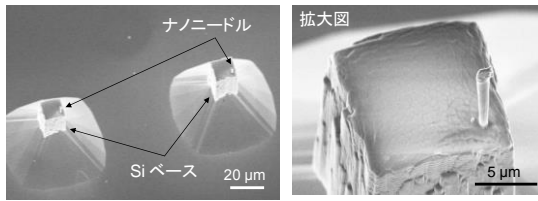


図5 作製した中空ナノニードルアレイ

セスを実施し、中空構造を有したナノニードルアレイの作製を行った。結果を図5に示す。この結果より、図2に示す提案した作製プロセスによって、外径約1 μm 、長さ7.3 μm のナノニードル先端部をSiベース上に形成したSiO₂製中空構造ナノニードルアレイが実現可能であることを示した。

(2) 細胞機能イメージング

①イオン電流計測方法の検討

微小なイオン電流変化は電圧印加時のドリフトやノイズの影響を非常に受けやすいため、細胞形態イメージング時におけるイオン電流計測に変調を用いた方法について見当を行った。走査プローブとして内径400 nmのガラスピペットを用い、固定したピエゾステージによって励振させる方式を検討した。ピペットの励振は100 Hz、振幅80 nmとし、NaCl水溶液(0.17 M)中で、ピペット内のAg/AgCl電極に対して100mVを印加する条件で実験を行った(図6a, b)。アプローチカーブは、測定対象となるシリコンゴムシートに垂直に10 nmステップで接近させ、各ステップにおいてサンプリング周波数10 kHzでA/D変換を行い取得した(図6c)。ピペットの励振周波数に同期した信号は、ロックインアンプを仮想し、FFT解析を行うことで変調されたイオン電流の振幅値を算出した(図中の赤線)。比較として、ピペットを励振しない実験も行い、計測されたイオン電流の平均値を算出した(図中の青線)。この結果、励振を行った場合は、励振を行わなかった場合と比べて50 nm程度離れた位置からイオン電流の変化が観測されており、変調信号を用い得ることでより高感度にアプローチカーブを取得することができることがわかった。次に、マイクロデバイスへの組み込みを考え、電気的に変調を行う交流印加方式についても検討した。図6aに示す同様の実験セットアップにて、NaCl水溶液(0.17 M)中で、50mVの振幅で印加周波数を10, 100, 1kHzと変化した条件でイオン電流の計測実験を行った。その結果、1kHz以上では、測定対象から離れた位置と対象近傍間でのイオン電流の変化量が小さくなった(図7a)。これは、周波数の上昇に伴いピペット側面容量に起因したリーク電流が生じることで電流変化が

小さくなったものと考えられる。開発するナノニードルにおける周波数特性を見積もるためにSPICEモデルを用いて電気的な評価を行った。評価した等価回路図と計算結果を図7b, cに示す。この計算結果からも1kHz時の電流変化が減少する傾向を示したことからモデルが妥当であると考え、図5に示すSiO₂製ナノニードルについても計算した結果、同様の結果が得られ、100Hz以上の交流電圧に対しては、リーク電流の影響が無視できなくなる結果となった。

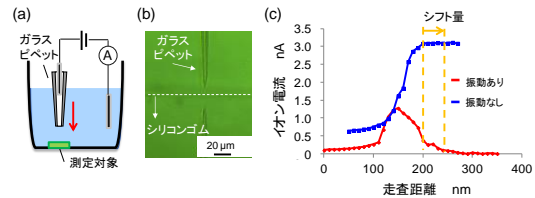


図6 プローブ励振時のイオン電流変化

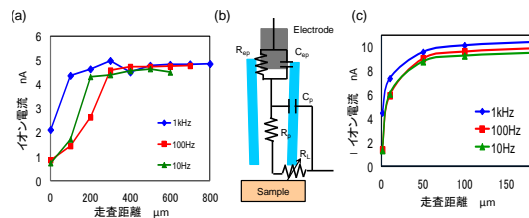


図7 交流電圧印加時のイオン電流変化

②多点計測の検討

走査プローブのアレイ化に向けて、隣接させた片方のガラスピペット内の電極に電圧を印加し、2つのピペットに流れるイオン電流を測定することでクロストークの影響を評価した。ピペット先端間の距離は140 μm とした(図8a)。電圧印加ピペットをシリコンゴムシートにアプローチさせ、電圧非印加ピペットは、シリコンゴムシートとは離れた配置にて測定を行った。ピペットの励振は100 Hz、振幅100 nm、印加電圧を400 mVとした。測定結果を図8bに示す。この結果より、電圧印加ピペットではイオン電流変化が観測されたが(図中の赤線)、電圧非印加ピペットではイオン電流の変化が検出されなかった(図中の青線)。この結果、クロストークの影響は観察されず、多点同時計測に応用可

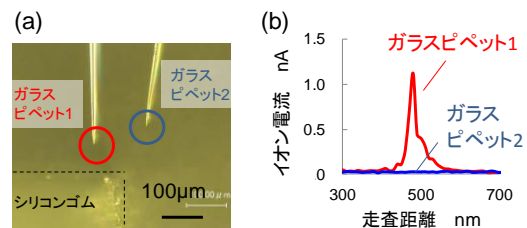


図8 多点計測性能の評価

能であることが示された。交流印加方式についても同様に評価を行った。その結果、周波数が高くなるにつれて側面容量の影響が生じ、ピペット単体での評価と同様、変調周波数を100Hz以下にする必要があることがわかった。

③細胞形態イメージングの検討

測定対象は HeLa 細胞とし、カバーガラス上に播種して MEM (Minimum essential medium) +10%FBS (Fetal bovine serum) 中で 36h 培養した後、2.5%グルタルアルデヒドで固定化を行ったものを用いた。測定対象とピペット先端が 200 nm 以上離れているときのイオン電流値が 0.03 nA であったことから、アプローチ時に増加するイオン電流の閾値を 0.1 nA として走査した。図 9a に HeLa 細胞の光学画像を示す。図中の白線 20 × 40 μ m を走査範囲とし、走査ピッチ 2 μ m で測定を行った。図 9b に平滑化処理を行った HeLa 細胞のイメージング像を示す。その結果、光学画像とよく一致しており、プローブ励振による細胞形態イメージングが可能であることを実証した。

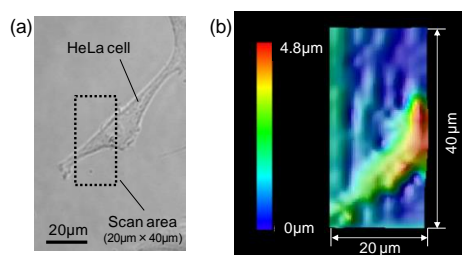


図 9 細胞形態イメージング

④細胞機能イメージングの検討

細胞形態取得と蛍光観察を実現するシステムを構築するため、照明光として CW レーザ (波長 488nm, 100mW) を用いて光ファイバーによってプローブとしたガラスピペット裏面よりレーザ光を導入して局所照明による蛍光観察を試みた。細胞として Calcein-AM 蛍光染色した HeLa 細胞を用い、形態観察はプローブ励振方式で行った。励振周波数を 10Hz, 印加電圧を 350mV とし、500nm ステップで一次元方向に走査した。測定時の光学顕微鏡像を図 10a に、取得した細胞形態の測定結果を図 10b に示す。図 10a に示すとおり、今回構築したシステムにおいて、プローブ裏面より入射したレーザ光はプローブ先端部でスポット光として細胞へ照射が可能であることがわかった。しかしながら、蛍光観察までには至っておらず、照明光の導入方法についてさらなる検討が必要である結果となった。一方、図 10b で観察された細胞の形状は約 6 μ m と考えられ、光学顕微鏡で観察された細胞のサイズとほぼ一致することから、今

回用いたシステムで、細胞への局所照明および細胞形態計測が可能であることがわかった。

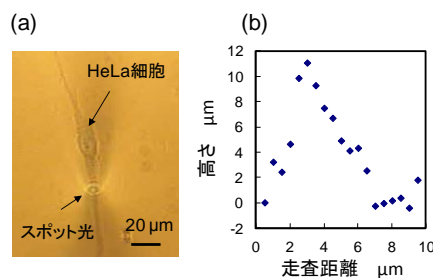


図 10 細胞機能イメージング

(3) 細胞の動的形態および細胞内で発現する生体分子を蛍光観察によって可視化するシステムの構築を目指し、その要素技術の評価を行った。結果として蛍光観察においてさらなる検討が必要な結果となったが、細胞形態イメージングの実現可能性を示した。本研究で開発する細胞機能イメージング用ナノニードルアレイは、細胞表面の膜タンパクの同定、細胞の機能発現過程における細胞の形態と生体分子の局在性マッピングや細胞内シグナリング過程を解明することを可能とするものであり、高効率かつ網羅的に解析する高度な細胞機能解析システムへと展開でき、将来の医療・医薬分野、再生医療などの高度先端医療、医薬品開発の分野の発展へ大きな貢献をもたらすものと期待できる。

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 1 件)

(1) T. Kawashima, T. Matsugase, K. Tanaka, M. Nagai, T. Shibata, T. Mineta, E. Makino, Fabrication of hollow SiO₂ nanoneedle array and characterization of simultaneous multi-site ion-conductance recordings for cell morphology imaging, Microelectronic Engineering, 査読有, Vol.98, 2012, pp.663-667
DOI: 10.1016/j.mee.2012.07.014

[学会発表] (計 4 件)

(1) 松ヶ瀬智哉, 田中一匡, 川島貴弘, 永井萌土, 柴田隆行, 峯田貴, 牧野英司, 細胞形態イメージングのためのナノニードルアレイ搭載型多点同時計測イオンコンダクタンス顕微鏡の開発, 2012 年度精密工学会春季大会学術講演会, 2012 年 3 月 16 日, 首都大学東京 (東京都)
(2) 松ヶ瀬智哉, 田中一匡, 川島貴弘, 永井萌土, 柴田隆行, 峯田貴, 牧野英司, 細胞形態イメージングのための多点同時計測イオ

ンコンダクタンス顕微鏡の開発, 第 54 回自動制御連合講演会, 2011 年 11 月 20 日, 豊橋技術科学大学 (愛知県)

(3) T. Matsugase, K. Tanaka, T. Kawashima, M. Nagai, T. Shibata, T. Mineta, E. Makino, Development of simultaneous multi-site ion conductance microscopy integrated with nanoneedle array for cell morphology imaging, International Workshop on Micro/Nano-Engineering, 2011 年 12 月 17 日, 京都大学 (京都府)

(4) T. Kawashima, T. Matsugase, M. Nagai, T. Shibata, T. Mineta, E. Makino, Development of simultaneous multi-site ion-conductance microscope for imaging of cell morphology, 37th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE2011), 2011 年 9 月 20 日, BCC Berliner Congress Center (Germany)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://mems.me.tut.ac.jp/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 貴弘 (KAWASHIMA TAKAHIRO)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号 : 50378270

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし