

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24686033

研究課題名(和文) ナノインジェクションシステムの開発と線形動物への応用

研究課題名(英文) Development of Nanoinjection System and Application for Nematoda

## 研究代表者

中島 正博 (Nakajima, Masahiro)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80377837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、モデル生物である線虫の生体組織内部の局所領域に対して、ナノマニピュレーションに基づいて局所的にインジェクションするためのナノインジェクションシステムを構築した。まず、光学顕微鏡下でのマイクロマニピュレーションを応用し、マイクロチャネルに閉じ込めた線虫に対して高精度な局所インジェクションを行った。また、環境制御型電子顕微鏡内ナノマニピュレーションシステムを応用することで、ナノスケールの高精度な局所インジェクションを実現した。

研究成果の概要(英文)：The local injection system was constructed for a model organism Nematoda. The local injection was demonstrated by fixing *C. elegans* inside a micro-channel. The nano-injection was demonstrated for *C. elegans* by the nanomanipulation system inside an environmental scanning electron microscope.

研究分野：マイクロ・ナノシステム工学

キーワード：ナノインジェクション 線形動物 局所操作 環境制御型電子顕微鏡 ナノマニピュレーション

### 1. 研究開始当初の背景

モデル生物は、生物が進化の過程で保存している基本的な性質（代謝や発生等）のヒトとの相同性に基づいて、ヒトの生命機能を解明に用いられている。特に、線形動物である線虫は、細胞数が約 1000 個であるため、相互的な細胞応答の解析が容易であり、世代交代が 3 日程度と短く、扱いが容易であることなどから広く用いられている。

一方で、我々はこれまで環境制御型電子顕微鏡内ナノマニピュレーションシステムを構築し、細胞を含水状態で高分解能観察し、各種ナノツールを応用することで細胞や生体試料の局所的な計測・操作について取り組んできた。

### 2. 研究の目的

本研究ではモデル生物である線形動物の生体組織内部の局所領域に対して、ナノマニピュレーション技術を応用し、局所的にナノインジェクションするためのナノインジェクションシステムを構築する。まず、光学顕微鏡下でのマイクロマニピュレーションを応用し、マイクロチャンネルに閉じ込めた線虫に対して高精度な局所インジェクションを行う。また、環境制御型電子顕微鏡内ナノマニピュレーションシステムを応用することで、ナノスケールの高精度な局所インジェクションを実現する。

これにより、例えば、線虫の神経軸索の再生速度や方向制御など、モデル生物として用いることで、生命現象の解明や薬剤に対する応答や解析に应用することができる。

### 3. 研究の方法

本研究で提案した主な研究方法について述べる。

#### 1) マイクロチャンネルを利用した線虫への局所インジェクション

光学顕微鏡下でのマイクロマニピュレーションを用いて、薬剤を包埋したマイクロゲルビーズをインジェクションする技術を構築した。特に神経軸索の周囲の局所領域に対してインジェクションを行い、共焦点顕微鏡を用いて 3 次元的な解析を行った。また、光学顕微鏡下でのマイクロマニピュレーションを利用して、高精度かつ効率的にインジェクションを行うために、線虫をマイクロチャンネルに閉じ込め、インジェクションを行う手法を提案した。

#### 2) 環境制御型電子顕微鏡内ナノマニピュレーションシステムに基づいたナノインジェクション

通常の電子顕微鏡は、試料室が真空環境となるため、含水性の試料の観察に適していない。そこで我々は、含水試料を観察可能な環境制御型走査電子顕微鏡 (Environmental-SEM : E-SEM) 内に構築したナノマニピュレーションシステムを用いた。吸引型インジェクションツールを用いて、薬剤を包埋したゲル

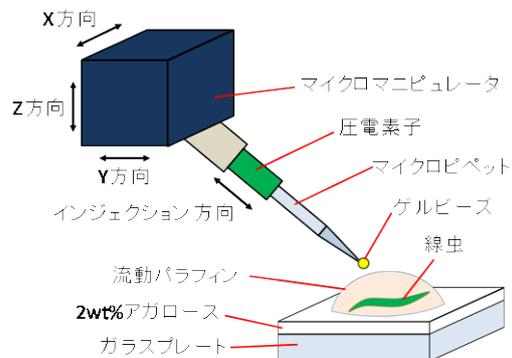


図1 マイクロマニピュレーションによる線虫へのインジェクション実験

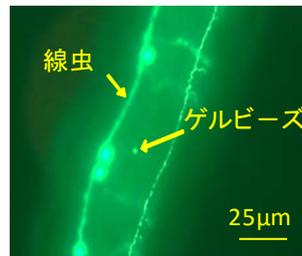


図2 インジェクション後の線虫の蛍光顕微鏡像

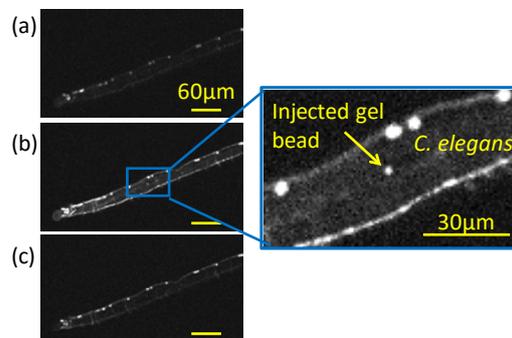


図3 線虫へのインジェクション後の共焦点画像 (a)線虫上面から 10 μm (b)線虫上面から 20 μm (c)線虫上面から 30 μm

ビーズをインジェクションツール先端部にピックアップして、線虫内部にインジェクションした。

### 4. 研究成果

本研究で提案した主な研究成果について述べる。

#### 1) マイクロチャンネルを利用した線虫への局所インジェクション

光学顕微鏡下でのマイクロマニピュレーションを用いた線虫へのインジェクション実験について述べる。図1に示すような圧電素子によるインジェクターを用いた。本インジェクターは、3軸マイクロマニピュレータに組み込んだ。インジェクターを圧電素子で駆動することにより、インジェクション方向へのゲルビーズの挿入を行うことが可能となった。これにより、3軸マイクロマニピュレータのみでは、インジェクション時に線虫の表皮が裂かれていたが、インジェクション方向にツールを挿入することが出来たため、線虫へのダメージが低減された。また、積層

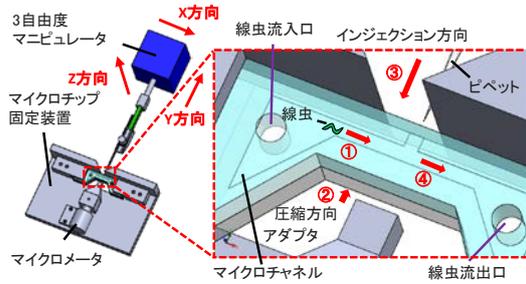


図4 マイクロチャネル内での線虫へのインジェクションシステム

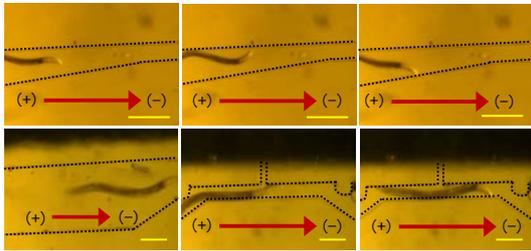


図5 電気走性を利用したマイクロチャネル内での線虫のインジェクションポートへの位置決め実験(スケールバー: 200  $\mu\text{m}$ )

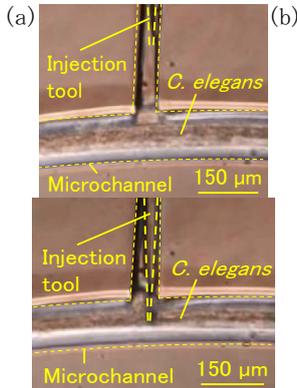


図6 位置決めした線虫へのインジェクションツールの操作 (a)位置決め後 (b)インジェクションツールの操作

圧電素子を利用し、インジェクションに十分な駆動範囲と位置決め精度を実現した。

本システムを用いて、線虫へのインジェクション実験を行った。基板上にアガロース塗布し線虫の動きを停止し固定した。また、生体適合性の油を滴下することで、線虫が乾燥することを防いだ。薬剤として、例えば蛍光物質などを含むゲルビーズを作製するために、塩析法を用いた。ピペット型ツールに負圧により吸引することでゲルビーズをピックアップし、インジェクターを用いて線虫にインジェクションを行った。

インジェクションしたゲルビーズは、図2に示すように蛍光顕微鏡により、線虫体内にインジェクションされたことを確認した。ただし、蛍光顕微鏡像のみでは、2次元情報であるため、線虫の体内にゲルビーズが入っているとは言い切れない。そこで、図3に示すように、インジェクション後の線虫の共焦点像を取得した。共焦点像は1  $\mu\text{m}$ ごとに49枚、線虫上部から基板方向に撮影した。線虫上部から20  $\mu\text{m}$ の共焦点像より、蛍光ゲルビーズ

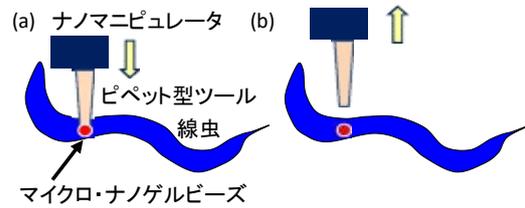


図7 ナノマニピュレータによるピペット型ツールを用いた線虫へのマイクロ・ナノゲルビーズのインジェクション実験

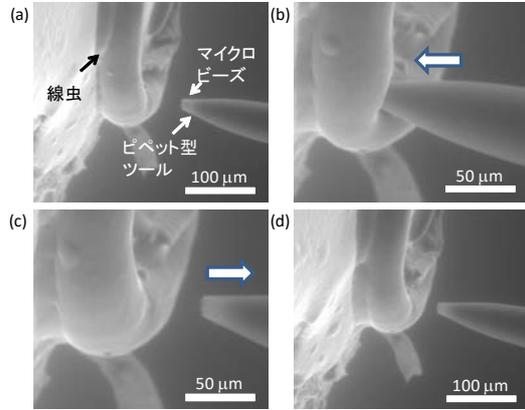


図8 環境制御型電子顕微鏡内ナノマニピュレータによる線虫へのインジェクション実験

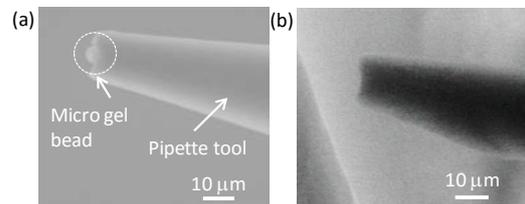


図9 インジェクション前後のピペット型ツール (a)インジェクション前 (b)インジェクション後

が最も明るい蛍光を示した。したがって、蛍光ゲルビーズが線虫体内にあることが確認できた。また、基板から蛍光ゲルビーズと蛍光ゲルビーズに最も近い神経軸索の高さはそれぞれ約15  $\mu\text{m}$ 、12  $\mu\text{m}$ であった。したがって、深さ方向には、約3  $\mu\text{m}$ の距離にインジェクションしたことを示した。

本手法では、基板上に固定した線虫に対して、斜め方向からインジェクションツールを挿入した。したがって、位置決め中は、ターゲットとなる線虫の高さとインジェクションツール先端の高さにずれが生じる。この焦点面の違いにより、観察が困難になる問題があった。したがって、線虫のターゲット面とインジェクションツール先端が同じ焦点面にあることが望まれる。

そこで線虫をマイクロチャネルにより固定し、インジェクションするシステムを提案した。この構成を図4に示す。マイクロチャネルの流路幅は、線虫の幅よりやや広い100  $\mu\text{m}$ とした。また、線虫の固定は、マイクロチャネルの弾性変形を利用して、圧縮力をかけてマイクロチャネルの流路幅を狭めるこ

とで固定する手法を提案した。

ここで、線虫をインジェクション位置に位置決めするために、チャンネル内の流体の吸引に加えて、線虫の電気走性を利用した。この電気走性を利用したインジェクションポートへのチャンネル内での線虫の位置決め実験の結果を図5に示す。また、位置決めを行った線虫に対して、インジェクションポートからインジェクションツールを線虫に対して操作している結果を図6に示す。以上のように、本研究では、提案したマイクロチャンネルを利用して、線虫への局所インジェクションを達成した。

2) 環境制御型電子顕微鏡内ナノマニピュレーションシステムに基づいたナノインジェクション

本研究では吸引型マイクロ・ナノインジェクションツールにより、インジェクションするマイクロ・ナノゲルビーズを吸い取ることで、ツール先端部に組み立てた。これにより、液中からゲルビーズを引き上げる際に吸引力によりゲルビーズの脱着を低減した。また、任意のサイズのビーズを選別し組み立てた。さらに、マイクロ・ナノインジェクションツール先端部は、FIB (Focused Ion Beam, 集束イオンビーム) 加工により、先端径をそろえると共に、窪みの形状などに加工することで、液中から取り出した際に、脱着しにくい構造を提案した。

この吸引型インジェクションツールを用いたゲルビーズのインジェクションの概念図を図7に示す。吸引型インジェクションツールを環境制御型電子顕微鏡内ナノマニピュレータで操作し、線虫内部へ挿入後、マイクロゲルビーズのみを線虫内部へインジェクションした。本システムによるインジェクション実験の結果を図8に示す。吸引型インジェクションツールの先端部にマイクロゲルビーズをピックアップし固定した。また、図9にインジェクション前後の吸引型インジェクションツールの先端部の画像を示す。以上の結果から、線虫体内にゲルビーズがインジェクションされたことが確認できた。以上のように、本研究では、環境制御型電子顕微鏡内ナノマニピュレーションシステムに基づいたナノインジェクションを達成した。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 21 件)

- [1] Masahiro Nakajima, Masaru Takeuchi, Toshio Fukuda, Yasuhisa Hasegawa, Qiang Huang, In situ Nanomanipulation with 3D SEM-CT Observation inside Environmental SEM, 2015 Int. Symp. on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2015), pp. 170-171, 2015
- [2] Masahiro Nakajima, Yuki Ayamura, Masaru Takeuchi, Naoki Hisamoto, Strahil Pastuho, Yasuhisa Hasegawa,

Toshio Fukuda, Qiang Huang, Survival Microinjection into *C. elegans* with In vivo Observation based on Micromanipulation, 2015 IEEE/RSJ Int. Conf. on Intelligent Robots and Systems (IROS2015), pp. 183-188, 2015

- [3] Masahiro Nakajima, Masaru Takeuchi, Kouya Shimazaki, Naoki Hisamoto, Yasuhisa Hasegawa, Toshio Fukuda, Qiang Huang, Aqueous Imaging by SEM-CT System inside Environmental-SEM, 15th Int. Conf. on Nanotechnology (IEEE NANO2015), pp. 85-88, 2015
- [4] 中島正博, 嶋崎功也, 竹内大, 久本直毅, 長谷川泰久, 福田敏男, 環境制御型電顕内での SEM-CT による含水観察, ロボティクス・メカトロニクス講演会 2015 (Robomech 2015), 1P1-P03, 2015
- [5] 中島正博, 永尾圭, 竹内大, 久本直毅, 長谷川泰久, 福田敏男, 含水状態での環境制御型電顕内 SEM-CT 撮影, 第33回日本ロボット学会 学術講演会 (RSJ2015), 1F1-05, 2015
- [6] Masahiro Nakajima, Masaru Takeuchi, Taisuke Masuda, Takahisa Anada, Osamu Suzuki, Toshio Fukuda, Qiang Huang, Yasuhisa Hasegawa, SEM-CT Observation of Bone from Mice using Environmental-SEM, 2014 Int. Symp. on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2014), pp. 228-229, 2014
- [7] Masahiro Nakajima, Masaru Takeuchi, Naoki Hisamoto, Toshio Fukuda, Yasuhisa Hasegawa, Qiang Huang, Cross-sectional Imaging of *C. elegans* by SEM-CT using Environmental SEM for Nanomanipulation, 14th IEEE Int. Conf. on Nanotechnology (IEEE NANO2014), pp. 41-44, 2014
- [8] 中島正博, 中西直哉, 竹内大, 久本直毅, 福田敏男, 複数マイクロビーズの線虫への局所マイクロインジェクション, ロボティクス・メカトロニクス講演会 2014 (Robomech 2014), 3A1-H01, 2014
- [9] 綾村友貴, 中島正博, 竹内大, 久本直毅, 長谷川泰久, 福田敏男, 線虫への局所マイクロインジェクションと体内でのゲルビーズ観察, 第32回日本ロボット学会 学術講演会 (RSJ2014), 2G2-03, 2014
- [10] 中島正博, 竹内大, 久本直毅, 福田敏男, 長谷川泰久, SEM-CT による線虫の3次元観察とナノマニピュレーション応用, 第32回日本ロボット学会 学術講演会 (RSJ2014), 2G2-04, 2014
- [11] Masahiro Nakajima, Masaru Takeuchi, Qiang Huang, Toshio Fukuda, Micro-CT imaging of *Caenorhabditis elegans* under Environmental-SEM, 2013 Int. Symp. on Micro-NanoMechatronics and

- Human Science (MHS2013), pp. 288-290, 2013
- [12] Masahiro Nakajima, Nakanishi, Naoki Hisamoto, Masaru Takeuchi, Hirotaka Tajima, Michio Homma, Qiang Huang, Toshio Fukuda, Long Survival Observation of *C. elegans* inside Environmental SEM for Nanomanipulations, 13th IEEE Int. Conf. on Nanotechnology (IEEE NANO2013), 187-190, 2013
- [13] 中西直哉、中島正博、福田敏男、久本直毅、本間道夫、田島寛隆、マイクロゲルビーズを用いた線虫への局所薬剤インジェクション、ロボティクス・メカトロニクス講演会 2013 (Robomec 2013), A1-006, 2013
- [14] 中西直哉、中島正博、竹内大、久本直毅、本間道夫、福田敏男、蒸発を抑制することによる生きた線虫の環境制御型電顕観察、第 31 回日本ロボット学会学術講演会 (RSJ2013), 2M2-01, 2013
- [15] Masahiro Nakajima, Naoya Nakanishi Naoki Hisamoto, Hirotaka Tajima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Local Injection Probe of Functional Micro-Nano Gel Tools into *Caenorhabditis elegans*, 2012 Int. Symp. on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2012), pp. 59-63, 2012
- [16] Masahiro Nakajima, Takahiro Hirano, Masaru Kojima, Naoki Hisamoto, Naoya Nakanishi, Hirotaka Tajima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Local Nano-injection of Fluorescent Nano-beads inside *C. elegans* based on Nanomanipulation, 2012 IEEE/RSJ Int. Conf. on Intelligent Robots and Systems (IROS2012), pp. 3241-3246, 2012
- [17] Masahiro Nakajima, Hirotaka Hida, Yajing Shen, Masaru Kojima, Kazuo Sato, Toshio Fukuda, Multi-slicing of *C. elegans* tissue using micro-nanocutting probe based on nanomanipulation, 12th Int. Conf. on Nanotechnology (IEEE-NANO2012), pp. 1-4, 2012
- [18] Masahiro Nakajima, Takuya Kawamoto, Takahiro Hirano, Masaru Kojima, Toshio Fukuda, Nanotool Exchanger System Based on E-SEM Nanorobotic Manipulation System, 2012 IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation (ICRA2012), pp. 2773-2778, 2012
- [19] 平野貴大、中島正博、小嶋勝、福田敏男、ハイブリッド顕微鏡内ナノマニピュレーションシステムによる線虫への蛍光ナノビーズ・インジェクション、ロボティクス・メカトロニクス講演会 2012 (Robomec 2012), 1A2-V04, 2012
- [20] 中島正博、肥田博隆、申亞京、垣尾翼、佐藤一雄、福田敏男、櫛歯電極型ナノツールを用いた細胞解析システム、ロボティクス・メカトロニクス講演会 2012 (Robomec 2012), 2A2-S02, 2012
- [21] 中西直哉、中島正博、田島寛隆、久本直毅、本間道夫、福田敏男、インジェクション用スポイト型ツールによるマイクロゲルビーズの組み立て、第 30 回日本ロボット学会学術講演会 (RSJ2012), 2E2-4, 2012
- [招待講演] (計 4 件)
- [1] Masahiro Nakajima, Micro-Nanomanipulation System under Environmental Scanning Electron Microscope for *C. elegans*, The 5th International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale (3M-nano 2015), 2015
- [2] Masahiro Nakajima, Nano-biomanipulation for *C. elegans* under Environmental-SEM, The 13th IEEE International Conference on Nanotechnology, (IEEE-Nano 2013), 2013
- [3] Masahiro Nakajima, In-situ Nanomanipulation System for Nano Injection into *C. elegans*, International Conference on Mechanical, Industrial and Materials Engineering (ICMIME 2013), 2013
- [4] Masahiro Nakajima, Semi-wet Manipulation of *C. elegans* in Micro-Nano scale, 2013 International Conference on Advanced Computer Science and Information Systems (ICACSIS 2013), 2013
- [その他] (計 2 件)
- [1] Masahiro Nakajima, For achievement in bio-nanomanipulation systems, Early Career Award in Nanotechnology, The IEEE Nanotechnology Council, 2013
- [2] Masahiro Nakajima, Naoya Nakanishi, Naoki Hisamoto, Hirotaka Tajima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Best Paper Award in 2012 Int. Symp. on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2012), 2012

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 正博 (NAKAJIMA MASAHIRO)  
名古屋大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：80377837