

令和元年6月28日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03868

研究課題名(和文) 走査型イオン伝導顕微鏡を用いた細胞・組織の液中立体イメージング法の確立

研究課題名(英文) Imaging of cells and tissues in liquid by scanning ion conductance microscopy

研究代表者

牛木 辰男 (USHIKI, TATSUO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40184999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)は、電極と電解質溶液で満たされたガラスマイクロピペットをプローブとして使用し、この電極とバス電極との間を流れるイオン電流を検出することでピペット-試料間距離を制御する。このSICMの生物応用を行ってきた。本研究では、凹凸の激しい組織試料(気管、腎臓、リンパ節など)の表面立体像をSICMで可視化することに成功した。また、SICM像と走査電子顕微鏡(SEM)像の比較によりSICMにより液中で細胞と組織の三次元構造を観察することの有用性を示した。また、組織切片像を用いることで、細胞小器官の観察と組織切片上の電荷分布測定が可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体組織の立体表面形状解析は、これまで走査電子顕微鏡(SEM)で行われてきたが、その場合、標本を乾燥させて金属コートする必要がある。この研究では、生体組織の表面立体形状観察が、走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)を用いることで、乾燥させずに液中で行えることを可能にした。このような凹凸の激しい構造の観察は、SICMと類似の原子間力顕微鏡(AFM)ではできないことから、学術的に大いに意義がある。さらにSICMを用いることで、試料表面の形状像とともに表面の電荷分布を測定できる可能性を示した。このことは、今後、この技法が医学生物分野の新しい液中イメージング技法として活用できることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：Scanning ion conductance microscopy (SICM) uses a glass micropipette as a sensitive probe, which contains electrode in an electrolyte. This technique allows force-free topographic imaging of soft samples under liquid conditions. Thus, we have been interested in the applicability of SICM to imaging of different types of biological samples, such as collagen fibrils, chromosomes and cultivated cells. In this study, we succeeded in obtaining images of tissue blocks such as trachea, kidney and lymph node. The comparison of the SICM and scanning electron microscopy (SEM) images showed that SICM is useful for observing the three-dimensional structure of cells and tissues in liquid conditions with the quality comparable to the SEM image. We also succeeded in obtaining images of tissue sections for studying such cell organelles as mitochondria. Finally, we showed the possibility of measurement of charge distribution of sliced tissues by SICM

研究分野：顕微解剖学

キーワード：走査プローブ顕微鏡 細胞・組織 バイオイメージング 液中3D観察

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 走査型プローブ顕微鏡(scanning probe microscope, SPM)は、鋭い探針(プローブ)を試料表面に近接した状態で走査させ、その際に生じる探針・試料間の物理化学的情報を指標に、試料の表面情報を取得する顕微鏡の総称である。1981年にBinnigとRoherにより発明された走査型トンネル顕微鏡(scanning tunneling microscope, STM)を嚆矢として、今では原子間力顕微鏡、摩擦力顕微鏡、粘弾性顕微鏡など様々な顕微鏡が報告され多様な分野に応用されてきている。

(2) 申請者は電子顕微鏡を専門とする傍らで原子間力顕微鏡(atomic force microscope, AFM)の生物応用を1993年頃から着手し、DNAやコラーゲン分子の可視化、染色体やコラーゲン細線維の観察、生きた細胞の動的観察などを可能にしてきた。その過程でこの顕微鏡が電子顕微鏡レベルの分解能で、液中観察が可能である点を示し、特に染色体やコラーゲン線維の微細構造解析に応用し、その医学生物研究における有用性を明らかにした。

(3) しかし、AFMは分子レベルの観察ができて、数十nmから数十 μm というオーダーの細胞や組織の観察には不向きで、特に凹凸の激しいサブミクロンオーダーの試料では、探針(の側面)が「触って」しまい、柔らかい構造がつぶれたり、変形をきたすという問題も浮き彫りになってきている。したがって、細胞・組織レベルの観察には、1)液中環境下で、2)接触することなく、3)凹凸の激しいものにも対応できる必要性が生じてきている。

(3)この問題を克服するために、申請者は、SPMの仲間である走査型イオン伝導顕微鏡(scanning ion conductance microscopy, SICM)に注目し、2009年からそのバイオ応用の可能性を調べてきた。SICMでは、探針(プローブ)にマイクロピペット電極を用い、液中のイオン電流を測定する(図1)。その際、ピペット電極が試料表面に近づくとき生じるイオン電流の変化を信号とし、試料の表面形状をトレースする。SICMの制御では、探針・試料間が近接したことにより生じる遮蔽効果により、イオン電流が減衰することを利用するので、AFMのように相互間力が働く距離まで探針(ピペット)を近づける必要がない。その点ではSICMは「触らずに(非接触)」試料形状をトレースできるので、細胞表面のソフトな形状の観察に対応できる可能性をもつ。申請者はこれまでの予備的な研究で、バイオ分野でのSICMの有用性を示した(Ushiki et al., 2012)。しかし、国内外でこの顕微鏡に注目しバイオ応用を進めている研究グループはまだ少なく、世界に先駆けた研究を進める上でも、その本格的な研究が急務である。

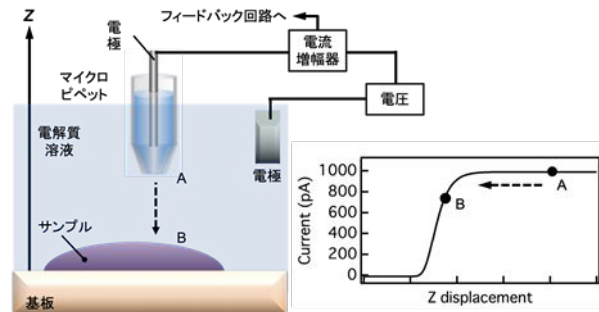


図1 走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)の基本構成および原理図

2. 研究の目的

SICMのバイオ分野への応用の進展に必要な次の3点の研究を行う。

- (1) SICMの生物試料イメージングに必要な測定環境の研究: 多様な生物試料のSICMイメージングを試みることで、この顕微鏡の測定環境と測定パラメータを解析し、最適条件を明らかにする。
- (2) SICMによる細胞レイヤーの高分解能ライブイメージングの確立: 細胞集団である培養細胞レイヤーの高分解能イメージングや、動的イメージングを可能にする。
- (3) SICMによる組織の液中高分解能イメージングの確立: 凹凸の激しい組織をSICM観察し、従来の走査電子顕微鏡像に匹敵する分解能で液中イメージングを可能にする。

3. 研究の方法

それぞれの研究目的を達成するために、以下のような方策を練る。

- (1) SICMの生物試料イメージングに必要な測定環境の研究: 実際の試料でSICMの測定環境と測定パラメータを解析し最適条件を明らかにする。
- (2) SICMによる細胞レイヤーの高分解能ライブイメージングの確立: 培養細胞レイヤーなどの動的イメージングを可能にする条件設定を検討し、測定を可能にする。
- (3) SICMによる組織の液中高分解能イメージングの確立: マイクロスライサー等で作製した凹凸の激しい組織構造や組織切片の液中イメージングを行いながら、高分解能測定の可能性を検討する。

4. 研究成果

- (1) 2016年度の主な成果

SICMの生物試料イメージングに必要な測定環境の研究と装置の改善: 次の5点について検討した。() SICMの測定モードの検討: 培養細胞と動物組織切片についてホッピングモードを用いる際の諸条件を検討した。() ガラスピペットの形状が分解能に及ぼす問題の検討: SICMの探針として用いるガラスピペットの径は、一般に内径50-100nm、外径

100-200nm であるが、このピペットで 10~50nm の分解能が十分得られることが再確認された。)SICM の最適なイオン環境の検討：ガラスピペット電極に加える電流の方向により、画像が取得できない現象について詳しく検討し、試料の荷電と関係することが示された。これに対する改善策を検討した。)その他の測定パラメータの検討：従来の測定方法が電圧一定モードであったものに対し、電流一定モードでの測定ができるように装置を改良し、より安定した測定ができる条件を明らかにした。)SICM 像と走査電子顕微鏡 (SEM) 像との比較検討：SICM 像が試料の表面形状を正しく表現しているかを評価するために、同一部位の比較検討を行った。

SICM による細胞レイヤーの高分解能動的イメージングのための予備実験：生きた細胞の解析には、固定細胞にはないいくつかの問題を克服する必要があることから、次の実験を行った。 固定した培養細胞のイメージング技法の確立：HeLa 細胞を始めとした多様な培養細胞を SICM で観察し、SEM 像と比較検討しながら、測定条件を適正化した。 生きた培養細胞のライブイメージングのセットアップ：上記の固定細胞のイメージングとともに生きた細胞のイメージングに必要なセットアップを行った。

(2) 2017 年度の主な成果

SICM の細胞試料イメージングに必要な測定環境の改善：昨年度に引き続き、いくつかの資料で SICM 測定のパラメータとイメージング画質の関係を解析した。その結果、試料が負にチャージした染色体では、電極に加える電流の方向により画質に大きな差ができることを明らかにし、その現象の解析と、克服法を考案した。

SICM による細胞レイヤーの高分解能動的イメージングの検討：生きた培養細胞の動的変化を、液中で高分解能で解析するためのパラメータ解析を行った。ホッピングモードの電流減衰率の閾値を 1% 以下にすることを含め、パラメータの最適化を図ることで細胞頂上部の微細な突起やヒダの分単位の動きを解析することが可能になった。

SICM による組織の液中高分解能イメージングの検討：生物の組織構造は凹凸が激しいことから、z レンジの大きな SICM 試作機を用いて、ラット腎臓やリンパ節の観察を試みた。また SICM と走査電子顕微鏡 (SEM) で同一部位の観察比較を行い、その画像の質を解析した。これにより、SEM 像と対応可能なリンパ組織の SICM 像の取得に成功した。

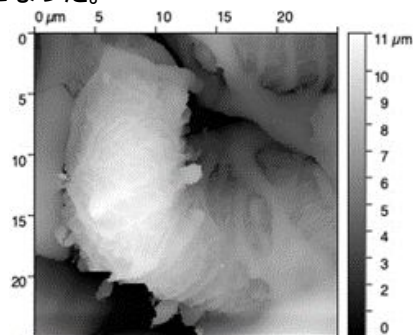


図 2 ラット腎臓にある糸球体表面の足細胞の SICM 像

(3) 2018 年度の主な成果

SICM による細胞レイヤーの高分解能動的イメージング：昨年度に引き続き、生きた培養細胞のイメージングの諸条件を検討しながら空間分解能と時間分解能の向上を目指したが、培養細胞の表面立体構造の観察については、数十 nm の空間分解能で、1 フレーム 2 分程度が一般的な測定法で現実的であることが分かった。

SICM による組織の液中イメージング：SICM のホッピングモードは激しい凹凸をもっと標本にも対応できるという特徴がある。昨年までに開発した z レンジの大きい SICM を用いながら、ラットの気管上皮、腎系球体、リンパ節などの凹凸の激しい組織の SICM イメージングに挑戦し、適切な試料作製法と測定環境により、SEM 画像に近いイメージングが可能になった (図 2)。また、組織切片の観察法を検討し、組織 (肝臓や腎臓など) を構成する種々の細胞の細胞内微細構造の高分解能液中イメージング法を可能にした。さらに、組織の形状像とともに表面の電荷イメージングを同時取得することを可能にし、光学顕微鏡の組織染色に近い電荷像を得ることを可能にした。

< 引用文献 >

Ushiki T, Nakajima M, Choi M, Cho SJ, Iwata F (2012) Scanning ion conductance microscopy for imaging biological samples in liquid: a comparative study with atomic force microscopy and scanning electron microscopy. *Micron*, 43:1390-1398

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Yoshioka M, Mizutani Y, Ushiki T, Nakazawa K, Iwata F (2019) Micropillar fabrication based on local electrophoretic deposition using a scanning ion conductance microscope with a theta nanopipette. *Japanese Journal of Applied Physics*, 58: 46503. DOI 10.7567/1347-4065/ab03e4

Nakajima M, Mizutani Y, Iwata F, Ushiki T (2018) Scanning ion conductance microscopy for visualizing the three-dimensional surface topography of cells and tissues. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 73:125-131.

DOI <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.09.024>

岩田 太、牛木辰男 (2017) 走査型イオン電導顕微鏡を用いた単一細胞エレクトロポレーション。応用物理 86: 791-795.

[学会発表](計 20 件)

水谷祐輔、山川明里、早津 学、牛木辰男, イオン伝導顕微鏡を用いた組織切片表面微細構造解析,日本顕微鏡学会第 75 回学術講演会, 2019

水谷祐輔、早津 学、三上剛和、牛木辰男, イオン伝導顕微鏡による細胞・組織イメージング, 第 124 回日本解剖学会・全国学術集会, 2019

水谷祐輔、牛木辰男: 走査型イオン伝導顕微鏡による組織・細胞観、2019 年度精密工学会春季大会学術講演会, 2019

桂悠一郎、白澤 樹、水谷祐輔、牛木辰男、中澤謙太、岩田 太: 走査型イオン伝導顕微鏡を用いたラベルフリーでの帯電分布可視化による生体組織の観察、2019 年度精密工学会秋季大会, 2019

Katsura Y, Shirasawa T, Mizutani Y, Ushiki T, Nakazawa K, Iwata F: Visualization of charge distribution of biological tissues without staining using scanning ion conductance microscopy. The 20th Takayanagi Kenjiro Memorial Symposium, 2018

Ushiki T, Mizutani Y: Scanning ion conductance microscopy for cell and tissue research. The 26th International Symposium on Morphological Sciences (ISMS) 2018

Mizutani Y, Mikami Y, Hayatsu M, Ushiki T: Simultaneous observation of the cell surface structure and cytoskeleton by scanning ion conductance microscopy and fluorescence microscopy. International Scanning Probe Microscopy (ISPM) Conference 2018, 2018

水谷祐輔、三上剛和、牛木辰男: 細胞表面微細構造と移動能の関連性についての走査型イオン伝導顕微鏡による解析, 日本顕微鏡学会第 74 回学術講演会, 2018

Shirasawa T, Mizutani Y, Ushiki T, Iwata F: Charge mapping method of biological samples using scanning ion conductance microscopy with a theta nanopipette, The 25th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM), 2017

Shirasawa T, Mizutani Y, Ushiki T, Iwata F, Topographical imaging and mapping of charged surface using scanning ion conductance microscopy with a theta nanopipette, The 28th 2017 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science(MHS), 2017

Ushiki T: Scanning ion conductance microscopy for cell and tissue research. The 25th International Symposium on Morphological Sciences (invited). 2017

Mizutani Y, Yamada Y, Mikami Y, Ushiki T: Movement of oral carcinoma cells investigated by scanning ion conductance microscopy. The 19th International Scanning Probe Microscopy Conference, 2017

Shirasawa T, Eguchi Y, Mizutani Y, Ushiki T, Iwata F, Imaging technique without surface charge influence using scanning ion conductance microscopy with a theta nanopipette, The 19th International Scanning Probe Microscopy Conference (ISPM), 2017

水谷祐輔、三上剛和、牛木辰男: 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡と蛍光顕微鏡による培養細胞の相補観察。第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会, 2017

白澤 樹、江口 由祐、水谷 祐輔、牛木 辰男、岩田 太: 走査型イオン伝導顕微鏡イメージングにおける複数開口ナノピペットを用いた試料表面帯電の影響低減。2016 年真空・表面科学合同講演会, 2017

Iwata F, Ushiki T: Development of nanomanipulators based on scanning probe microscopes for single cell manipulations. 4th Kanazawa Bio-AFM Workshop, 2016

白澤 樹、江口 由祐、水谷 祐輔、牛木 辰男、岩田 太: 複数開口プローブを有する走査型イオン伝導顕微鏡を用いた帯電試料イメージング。第 77 回応用物理学会秋季学術講演会, 2016

Ushiki T: Scanning Ion Conductance Microscopy in Biology. 20th International Vacuum Congress (Invited). 2016

Ushiki T, Mizutani Y, Shirasawa T, Iwata F: Imaging of biological tissue blocks in liquid by scanning ion conductance microscopy. The 18th International Scanning Probe Microscopy (ISPM) Conference, 2016

Mizutani Y, Ushiki T: Time lapse imaging of living cells using scanning ion conductance microscopy. The 18th International Scanning Probe Microscopy (ISPM) Conference, 2016

[図書](計 1 件)

山科正平、高田邦昭、牛木辰男、他(編集): ライフサイエンス顕微鏡ハンドブック、2018, 344

[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

<https://www.med.niigata-u.ac.jp/contents/activity/research/kiso/kaibou03.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：岩田 太

ローマ字氏名：(IWATA, futoshi)

所属研究機関名：静岡大学

部局名：電子工学研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：30262794

研究分担者氏名：水谷 祐輔

ローマ字氏名：(MIZUTANI, yusuke)

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：助教

研究者番号(8桁)：40646238

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：梶村 皓二

ローマ字氏名：(KAJIMURA, koji)

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。