

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32613

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K04678

研究課題名(和文) 走査型マイクロインジェクション顕微鏡の要素技術開発

研究課題名(英文) Development of component technology for scanning microinjection microscope

研究代表者

高見 知秀 (Takami, Tomohide)

工学院大学・教育推進機構(公私立大学の部局等)・教授

研究者番号：40272455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、走査型マイクロインジェクション顕微鏡の実現に向けて、次に挙げる3つの要素技術の開発を行った。(1)インジェクション時にピペットを細胞膜に貫通させる時の動作制御。(2)インジェクション時の細胞への物質注入の確度を上げるために、ピペット内壁の清浄度を非破壊評価する方法として、ナノピペットを2つの真空槽の間に設置して、その真空コンダクタンスの押し圧依存性から評価する方法の開発。(3)イオン選択膜を内包するナノピペットの開発と、走査型ピペット顕微鏡で用いる白金電極の電解研磨法の確立。

研究成果の概要(英文)：We have developed the following three element technologies to realize scanning microinjection microscope. (1) Motion control during the penetration of the pipette into the cell membrane during injection (2) Development of a non-destructive evaluating method of the cleanliness of the nanopipette inner wall by measuring the entrance pressure dependence of the vacuum conductance through a nanopipette set between two vacuum chambers in order to increase the accuracy of substance injection into cells during injection, and (3) Development of ion-selective nanopipette probe containing ion-selective membrane and establishment of the electrochemical etching of platinum electrode used in scanning pipette microscope.

研究分野：表面物理化学

キーワード：ナノピペット 走査型プローブ顕微鏡 細胞工学 イオン選別

1. 研究開始当初の背景

Hansma らによって開発された走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)は、Korchev らによって生細胞の観察に応用され、近年では新潟大の牛木によって溶液中の繊維観察まで可能となっていた。また SICM と似た走査型電気化学顕微鏡(SECM)は Bard らによって開発され、近年では東北大の末永・高橋によって細胞表面の構造観察と化学物質の濃度計測も実現されていた。そして静岡大の岩田は新潟大の牛木との共同で、SICM と電気穿孔法を複合した生細胞への分子注入装置を開発していた。[本申請書では SICM と SECM を総称して「走査型ピペット顕微鏡」と称する。]一方細胞へのマイクロインジェクションは前世期初頭から存在する手法で、Eppendorf 社の Injectman®をはじめとして自動化を謳った装置が市販されていた。しかしこれらの注入装置では注入針の挿入が粗く、ほとんどの細胞を死滅させてしまう。農工大の松岡・斉藤は、シャーレ上の座標で細胞位置を登録して順次登録した細胞と注入針を適切な位置に自動配置する細胞操作支援ロボットを開発した。この装置において操作者は細胞に挿針するステップのみ集中できるため、分子注入効率および質を向上できた。しかし、挿針は人手により制御されるために操作者の練度により成功率は左右されるという限界があった。

2. 研究の目的

本研究では、「走査型マイクロインジェクション顕微鏡」装置の実現に向けて、次に挙げる要素技術の開発を行う。

インジェクション時にピペットを細胞膜に貫通させる時の動作制御

インジェクション時の細胞への物質注入の確度を上げるために、ピペット内壁の清浄度を非破壊評価する方法として、ナノピペットを2つの真空槽の間に設置して、その真空コンダクタンスの押し圧依存性から評価する方法の開発

イオン選択膜を内包するナノピペットの開発と、走査型ピペット顕微鏡で用いる白金電極の電解研磨法の確立

3. 研究の方法

上記の目的において、まず については、軸ブレすることなくピペット先端をタップ・ツイストの動作を行う「タップ・ツイスト型インジェクタ」を開発する。このタップ・ツイスト動作は、インジェクションを習熟した実験者がピペットを細胞膜に貫通させるときの動作をエミュレートしている。

そして については、真空コンダクタンスの押し圧依存性の計測する装置のプロトタイプを東北大学多元物質科学研究所高桑研究室において共同開発して、開発した装置を基に工学院大学において新規に装置を作製する。

更に については、既に開発したイオン選択ナノピペットのイオン選択性の確度を上げるための技術開発を行い、白金電極作製のための交流電解研磨の周波数依存性を調べる。

4. 研究成果

(1) タップ・ツイスト型インジェクタの開発

タップ動作については、これまでの研究により、直線リニアアクチュエータおよび圧電素子により実現している。これにツイスト動作を加えるには、回転振動が必要となす。そこで本研究では、回転軸ステージ超音波リニアアクチュエータをテクノハンズ社から購入して、回転振動が 100 Hz を超える振動の実現を目指した。

回転軸ステージ超音波リニアアクチュエータの参照周波数を上げると回転振動は早くなることは確認したが、リニアアクチュエータの圧電素子への負荷と耐久性を考慮して 50 kHz に固定した。駆動電位についても同様に、圧電素子への負荷と耐久性を考慮して 33 V とした。圧電素子に印加する電位の ON/OFF デューティ比は、使用する圧電素子の特性を考慮して最適値の 25% で固定した。

回転振動の制御パラメーターとしては、制御パルスの持続時間(duration time)と間隔(interval)がある。図 1 に回転アクチュエータ振動周波数の制御信号持続時間(duration time)依存性を示す。図 1 において、間隔(interval)は 1 ms に設定した。振動周波数は、振動の回数を 1000 回に設定して、振動開始から終了までに要した時間を計測して求めた。その結果、パルスの持続時間に対して回転振動周波数が反比例する結果が得られた。

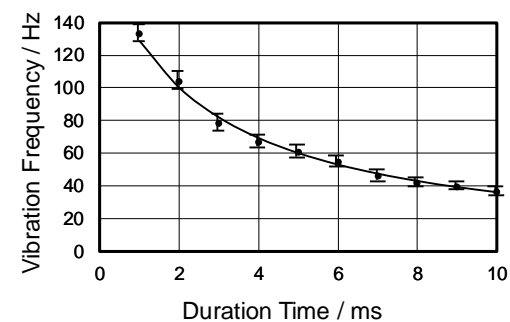


図 1 回転アクチュエータ振動周波数の制御信号持続時間依存性

図 2 に回転アクチュエータ振動周波数の制御信号間隔(interval)依存性を示す。図 2 において、持続時間(duration time)は 1 ms に設定した。振動周波数は図 2 のときと同様に、振動の回数を 1000 回に設定して、振動開始から終了までに要した時間を計測して求めた。制御信号間隔(interval)依存性の場合と同様に、パルスの間隔に対して回転振動周波数が反比例する結果が得られた。

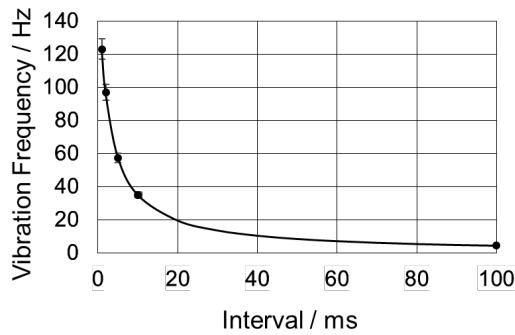


図2 回転アクチュエータ振動周波数の制御信号間隔依存性

以上の結果から、制御パルスの持続時間 (duration time) と間隔 (interval) をともに、本アクチュエータの制御限界である 1 ms において、0.15 度の回転振動条件で、130 Hz の回転振動周波数が達成された。

(2) ナノピペットの真空コンダクタンスの押し圧依存性によるピペット内壁の清浄度の非破壊評価法の開発

図3に装置のセットアップの概略を示す。2つの真空槽の仕切り部分にナノピペットを設置して、一方の真空槽の圧力を 0~1.3 kPa にしたときの反対側の真空槽の真空度を計測することで、微小な流量であるナノピペット内を流れる真空コンダクタンスを計測する方法を開発した。当初はピペットの太い側から先端に向かって気体を流していたが、計測中において真空槽内にある僅かな埃がピペット内に入って詰まることがあることがわかったため、逆にピペットの先端から気体を導入することでこの問題が解決できることが本研究からわかった。

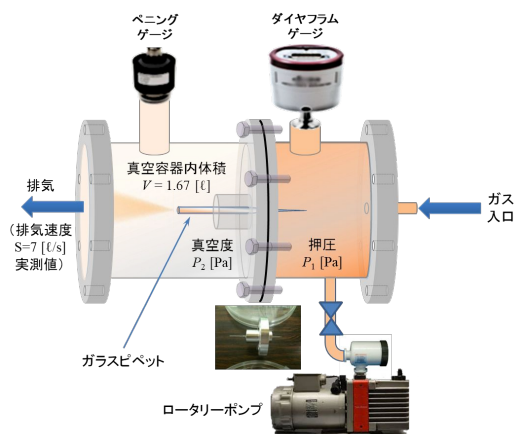


図3 ナノピペットの真空コンダクタンス計測装置の概略図

図4に測定結果の1例を示す。まず、下流真空槽の真空引きバルブを閉じてから上流にアルゴンガスを流して、下流真空度 (P_2) の押し圧 (P_1) 依存性を計測する。次に、アルゴン

ガスを流さない状態で下流真空槽の真空引きバルブを閉じてから下流真空度 (P_0) の時間依存性を計測する。この2つの真空度の差圧から $P_2 - P_0$ が求められ、この値を用いてコンダクタンス (C) の押し圧依存性が得られる。先端内径 100 nm (電顕での実測値) のピペットにおいて、押し圧が 50~100 kPa でのコンダクタンスの平均値は 0.5 nℓ/s であり、理論値 (0.43 nℓ/s) との比較から内径を求めると本測定から求めたピペットの内径は 108 nm と求められた。これは電顕観察結果から求められた値とよく一致したことから、電顕を用いずに非破壊的に内径を本測定から求められることが確認された。

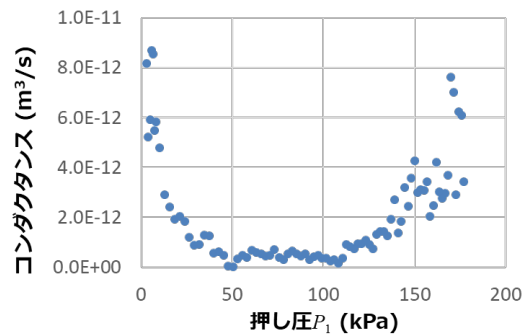


図4 アルゴンガスをを用いて計測した先端径 100 nm のナノピペットの真空コンダクタンスの押し圧依存性

更に、ピペットの内壁に真空コンダクタンスへ影響する規模の汚染物が付着していると、下流の真空度の押し圧依存性が不連続になることがわかった。このようにして、本計測からピペット内壁の清浄度も確認できることが見出された。

(3) イオン選択膜を内包するナノピペットの改良

我々はナノピペット内において、ポリ塩化ビニルに可塑剤を混ぜて柔軟にしてクラウンエーテルなどのイオノフォアを混ぜた透過膜をナノピペット内に作製することで、溶液中の特定のイオンを検出できるイオン選択ナノピペットを開発した。しかし、そのイオン選択性の確度は十分ではなかった。そこで、可塑剤の配合割合を調整すると共に、膜の原料を溶かしたテトラヒドロフラン溶媒がピペット内に予め充填した水と混じらないようにするためにシクロヘキサンを液相の間に入れるという製造法を開発することで、製造工程での問題を解決することができるようになった。更に我々は、セシウムイオンの選択測定にも成功した。これらの成果は、細胞内外において様々なイオンをピペットで捉えることで、蛍光分子と共焦点顕微鏡を用いたイオン計測法とは異なる知見を与えることになると期待される。

(4) 白金の交流電解研磨の周波数依存性

白金線をアルカリハライド溶液に浸して交流を印加すると、直流の場合では起こらない電解研磨ができることは、走査トンネル顕微鏡の探針作製法のひとつとしてよく知られていたが、その機構の詳細についてはよくわかっていないところがあり、このため交流電解研磨において副次的に発生する塩化物の電極探針への付着の問題が未解決であった。我々は、この交流電解研磨の周波数依存性を調べて、様々な電極作製において最適な交流周波数があることを見出し、塩化物の電極探針への付着の問題の解決法も見出した。また、副次的な成果として、電解研磨時に白金微粒子が作製されて、その粒径や形状が交流周波数と研磨される電極の形状に依存する、という発見をした。作製した白金微粒子は塩化物で覆われているが、この塩化物を除去することで触媒材料への応用が期待される。このように我々は、単に本研究の目的である要素技術の開発を行っただけでなく、新たな研究の礎となる萌芽的な成果を得ることもできた。

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4件)

西山北斗、高見知秀、ガラスナノピペット内に作製したセシウムイオン選択膜、査読なし、工学院大学研究報告、Vol.123、59-64 (2017)。

<http://opac2015.lib.kogakuin.ac.jp/webopac/TC40087810>

青山宜樹、高見知秀、白金イリジウム線の交流電解研磨における周波数依存性、査読なし、工学院大学研究報告、Vol.123、53-58 (2017)。

<http://opac2015.lib.kogakuin.ac.jp/webopac/TC40087809>

Tomohide Takami, Kiwamu Nishimoto, Tadahiko Goto, Shuichi Ogawa, Futoshi Iwata, and Yuji Takakuwa, Argon gas flow through glass nanopipette, Jpn J. Appl. Phys. Vol.55, 125202 (2016). DOI: 10.7567/JJAP.55.125202

高見知秀、細胞への自動インジェクション装置の開発と展望、査読あり、表面科学、Vol.36、No.12、637-643 (2015). DOI: 10.1380/jssj.36.637

[学会発表](計13件)

1. Tomohide TAKAMI, Haruka WATANABE, and Futoshi IWATA, Local ion-selective measurements with nanopipettes and the application, The 98th Chemical Society of

Japan Annual Meeting, 3PB003, Nihon University Funabashi Campus, March 22nd 2018.

2. 高見知秀, 西山北斗, 渡辺 悠, イオン選択ナノピペットの開発, 第11回分子科学討論会, 1P067, 東北大学, 2017年9月15日。

3. Tomohide TAKAMI, Futoshi IWATA, and Yuji TAKAKUWA, Development of gas flow method for the non-destructive evaluation of glass nanopipette: 254th American Chemical Society National Meeting, ANYL153, Washington DC, August 20th 2017.

4. 高見知秀, 岩田 太, 高桑雄二, ガスフロー法によるガラスナノピペットの非破壊評価法の開発, 2017年真空・表面科学合同講演会: 第37回表面科学学術講演会, 第58回真空に関する連合講演会, 3Cp03, 横浜市立大学, 2017年8月19日。

5. Tomohide TAKAMI and Yoshiki AOYAMA, Frequency dependence of AC chemical etching of platinum iridium wire: 33rd Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics, 1P02, Nagoya University, June 7th 2017.

6. 高見知秀, 青山宜樹, 白金イリジウム線の交流電解研磨の周波数依存性, 第64回応用物理学会春季学術講演会, 14p-316-12, パシフィコ横浜, 2017年3月14日。

7. Tomohide Takami, Kiwamu Nishimoto, Tadahiko Goto, Shuichi Ogawa, Futoshi Iwata, Takeshi Sugawara, and Yuji Takakuwa: "Vacuum Conductance of Rare Gas through Glass Nanopipette", The 20th International Vacuum Congress (IVC-20), BEXCO, Busan, 23 Aug. 2016.

8. 高見知秀, 菅原武志, 細胞へのインジェクションに用いるナノピペットの非破壊評価法の開発「生命動態の分子メカニズムと数理」生命動態システム科学四拠点・CREST・PRESTO・QBiC 合同シンポジウム, シェラトンホテル広島, 2016年3月25日。

9. 高見知秀, 後藤忠彦, 高桑雄二, ナノピペットにおける希ガスの真空コンダクタンス~その2~, 第63回応用物理学会春季学術講演会, 19p-H113-1, 東京工業大学, 2016年3月19日。

10. Tomohide Takami, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka, and Shin-ichi Tate: "Development of auto-injection system to single cells", Pacificchem 2015, Hawaii Convention Center, Honolulu, 18 Dec. 2015.

11. 高見知秀, 走査型マイクロインジェクション顕微鏡の要素技術開発, The 2nd Innovation Forum of Advanced Engineering and Education (IFAE2) 第2回先進工学イノベーションフォーラム, 工学院大学八王子キャンパス, 2015年11月2日.

12. Tomohide Takami: "Glass Nanopipette Exploring Nanoworld", The 14th International Symposium on Advanced Technology (ISAT-14), L03, Kogakuin University Hachioji Campus, 1 Nov. 2015.

13. 菅原武志, 高見知秀, 高桑雄二, ナノピペットにおける希ガスの真空コンダクタンスの理論計算, 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 13p4E-16, 名古屋国際会議場, 2015年9月13日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
工学院大学ホームページ
<http://er-web.sc.kogakuin.ac.jp/Profiles/13/0001275/profile.html>
工学院大学ナノ化学研究室ホームページ
<http://www.ns.kogakuin.ac.jp/~ft13537/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高見 知秀 (TAKAMI, Tomohide)
工学院大学・教育推進機構・教授
研究者番号: 40272455

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

岩田 太 (IWATA, Futoshi)
静岡大学・大学院工学領域・教授
研究者番号: 30262794

高桑 雄二 (TAKAKUWA, Yuji)
東北大学・多元物質科学研究所・教授
研究者番号: 20154768

(4) 研究協力者

菅原 武志 (SUGAWARA, Takeshi)
広島大学・大学院理学研究科・特任助教
研究者番号: 60713005

楯 真一 (TATE, Shin-ichi)
広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 20216998

斉藤 美佳子 (SAITO, Mikako)
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 20291346

松岡 英明 (MATSUOKA, Hideaki)
東京農工大学・大学院工学研究院・名誉教授
研究者番号: 10143653