

機関番号：13901

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17076004

研究課題名（和文） ナノアセブリシステムによる局所環境計測・制御用バイオナノツールの創製

研究課題名（英文） Establishment of Bio-nanotool for Local-environmental Measurement and Control by Nano-assembly System

研究代表者：

福田 敏男 (FUKUDA TOSHIO)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：70156785

研究成果の概要（和文）：近年，生命システムの最小機能単位である細胞における環境の解析や制御について研究が活発である．環境を制御することで細胞との相互作用を能動的に引き起こし，その動的な変化を追うことで，新しい発見がなされてきた．しかしながら，電気化学的勾配やイオン濃度勾配などの環境情報を高精度に計測し，またナノメートル精度で空間的に制御することにより，その相互作用を局所的かつ能動的に計測することは未だに不可能である．また，細胞の物理化学特性を低・非侵襲に計測する技術も十分とはいえない．

そこで本研究では，材料科学，計測・制御，加工技術を統合して，新規ナノバイオ環境システム技術を確立するために，ナノマニピュレーションに基づいた局所環境計測・制御用バイオナノツールの創製を行った．すなわち，ナノメートルオーダーのバイオナノツールを構築し，マイクロメートルオーダーの細胞に対して応用することにより，これまで不可能であった局所的な環境情報を計測し，制御する技術を構築した．

研究成果の概要（英文）：Recently, analysis and control of biological system, especially for biological cell which is one of the primitive units of biological system, have been widely investigated. The important technique is to control and observe their local environment dynamically. However, the high precision measurement of electrochemical gradient, ionic concentration, and so on, is basically difficult in nano-scale until now. And, low/noninvasive measurement techniques for their physical/chemical properties are also needed.

In this research, we established bio-nanotools to measure and control the local environment of biological cells based on nanomanipulation technique by integrating material science, measurement/control/fabrication technologies. We proposed novel local environmental measurement and control technique by applying nano-meter scale bio-nanotools to micro-meter scale biological cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	34,200,000	0	34,200,000
2006年度	22,800,000	0	22,800,000
2007年度	25,800,000	0	25,800,000
2008年度	16,700,000	0	16,700,000
2009年度	14,400,000	0	14,400,000
総計	113,900,000	0	113,900,000

研究分野：ロボット工学，マイクロ・ナノシステム工学

科研費の分科・細目：特定領域研究 バイオ操作

キーワード：ナノアセンブリ，局所環境計測・制御，バイオナノツール

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

近年、生命システムの最小機能単位である細胞における環境の解析や制御について研究が活発である。環境を制御することで細胞との相互作用を能動的に引き起こし、その動的な変化を追うことで、新しい発見がなされてきた。しかしながら、電気化学的勾配やイオン濃度勾配などの環境情報を高精度に計測し、またナノメートル精度で空間的に制御することにより、その相互作用を局所的かつ能動的に計測することは未だに不可能である。このため、細胞内の各種構成要素の分子メカニズムや機能発現のしくみなどが現在未知とされている。また、細胞の物理化学特性を低・非侵襲に計測する技術も十分とはいえない。したがって、分子細胞学、材料科学、計測・制御、加工技術を統合して、新規ナノバイオ環境システム技術を確立するために、ナノマニピュレーションに基づいた局所環境計測・制御用バイオナノツールの創製が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、3次元ナノマニピュレーションに基づくナノアセンブリを行い、ナノメートルサイズの微細なナノツールを創製し、ナノ流体、超微小温度場など局所環境制御・計測技術を確立する。構築したバイオナノツールをマイクロメートルオーダーの細胞に対して応用することにより、これまで不可能であった局所的な環境情報を計測し、制御することが可能となり、さらに低侵襲な計測を実現することが可能となるため、生命科学における幅広い応用が期待できる。

特に、生命科学においては、これまで主に集団的に細胞を扱った集団解析技術により、生命科学現象の解明を行ってきた。本研究で確立するナノマニピュレーション・ナノアセンブリ技術に基づいたナノツールを創製することにより、これまで困難であった単一細胞解析技術を実現することができる。細胞一単位での振る舞いを得る事で、新たな知見を創造するとともに、単一細胞の計測技術に適した細胞内外での局所的な情報を得るための新たな技術を創造する。

3. 研究の方法

これまで、ナノアセンブリに関する研究は自己組織化(Self Assembly)、超分子化学、走査型プローブ顕微鏡 (SPM) によるマニピュレーションなどが中心的に行われてきた。自己組織化により規則的なナノ構造物を一度で大量に作製することができるが、複雑なナノ構造物の作製することは困難である。ま

た、超分子化学によって複雑な構造物が合成できるが、今まで数十個の原子以上のシステムは実現されていない。また、走査型プローブ顕微鏡などによって二次元の構造物を原子から組み立てる可能性はあるが、複雑なナノ構造物には対応できない。

そこで、本研究では、以上の技術によって創製された比較的単純な構造物を利用して、姿勢制御が可能な3次元ナノロボットマニピュレーションシステムによって、更に複雑なナノデバイスをアセンブリし、バイオ、医学領域への応用を試みた。構築したナノデバイスを単一細胞に応用するために、ナノマニピュレーション技術を応用することで、局所環境計測・制御システムを構築した。

4. 研究成果

環境制御型電子顕微鏡内の7自由度の多自由度型ナノマニピュレータを構築し(図1)、無蒸着処理で水分や油分を含んだ試料を、実時間・高分解能観察環境下でナノ操作を実現した。試料の温度調整と試料室内の圧力調整により、生体試料が水分を含んだ状態でナノメートルオーダーの高分解能画像計測することができる。これにより、細胞の局所的な温度を計測するために、集束イオンビーム(Focused Ion Beam: FIB)加工により作製したプローブ型ナノ温度センサ(図2)を作製し、この特性計測及び水中での較正評価を行った。

また、カーボンナノチューブ(Carbon Nanotube: CNT)を用いた極微小な温度センサを作製するために、CNTを局所的に成長させる技術として、触媒層の上に堆積されたバリア層を、FIB加工により選択的にバリア層を除去した後、化学気相堆積法(Chemical Vapor Deposition: CVD)させるといった手法を提案した。これにより、半導体で用いられている微細加工手法によらず、CNTを選択的に成長させることができる。さらに、微小なプローブの先端などの三次元形状の微小構造物上の任意位置に選択的にカーボンナノチューブを成長できることを実験的に示した。本手法で提案する手法により、高い生産性で任意位置に選択的にカーボンナノチューブを配置させることができ、将来求められるカーボンナノチューブナノデバイス応用に重要であると期待され、また構築したナノアセンブリシステムにより、CNTの局所加工技術として、酸素ガスアシスト型の切断手法についても検討を行った。

また、マイクロ・ナノヒータ・温度センサ組み込み型マイクロ流路チップとして、フォトフィソグラフィー加工により作製し、感熱

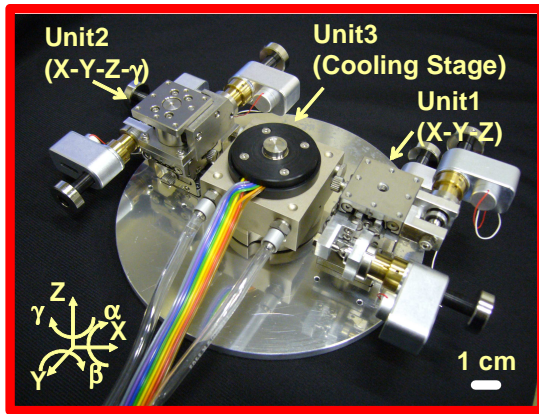


図 1. 環境制御型電子顕微鏡用ナノマニピュレーションシステム

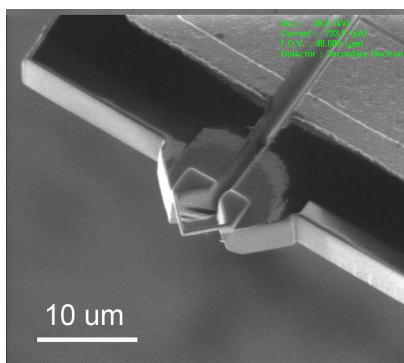


図 2. プローブ型ナノ温度センサ

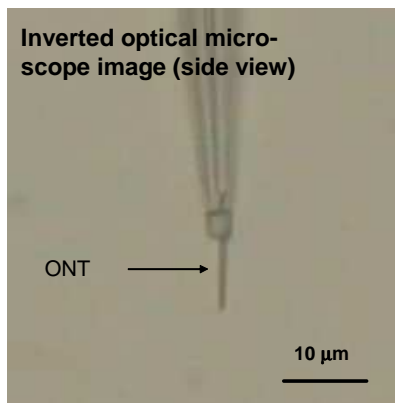
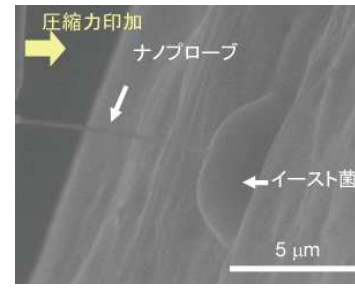


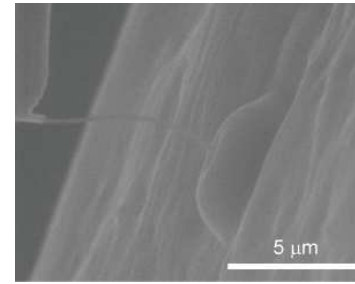
図 3. ONT (Organic Nanotube) を用いたナノピペット

ゲルによる細胞試料の捕獲とマイクロ流路を用いた培養液導入による形態その場観察システムについて試作・検討した。また、流路中に pH 計測や温度計測など機能性を有したマイクロツールの導入と応用について検討した。

また、単一細胞硬さ計測やナノインジェクタ作製について取り組み、単一細胞への局所環境の計測・制御の可能性を探った。ナノプローブとして、原子間力顕微鏡用プローブを用いて、単一細胞における硬さ計測をナノメートルオーダーの高分解能計測の可能性につ



圧縮力印加前



圧縮力印加後

図 4. ナノプローブの座屈変形を利用した微小力計測法を応用した環境制御型電顕内での単一細胞の局所硬さ計測

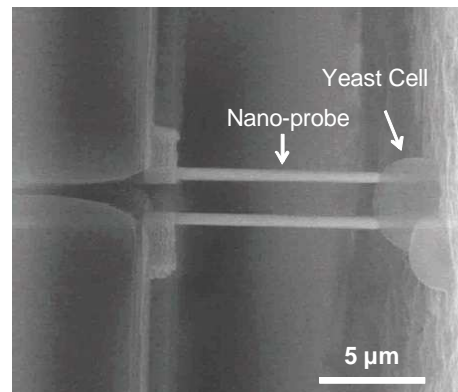


図 5. ナノプローブを用いた単一細胞電気特性計測に基づいた生死判別評価

いて探った。ナノプローブは、FIB エッチングもしくはデポジションにより、ナノメートルオーダーの各種微細プローブを作製した。また、有機ナノチューブ (Organic Nanotube: ONT) を通常のガラスピペット先端にアセンブリすることで、ナノ流路として用いた ONT ナノピペット (図 3) を作製し、電気浸透流による ONT からの微量溶液の噴出制御実験を行った。

本システム及びデバイスを応用することで、含水状態の単一細胞に対する応用として、例えば、図 4 に示すように、環境制御型電子顕微鏡内に導入した単一のイースト菌に対して、ナノプローブの座屈変形に基づいて、nN~uN オーダーの微小力計測を実現することにより、局所的な硬さ計測を行った。さらに、ナノプローブの先端形状の違いや細胞の成長段階や圧力・温度などの計測条件による、

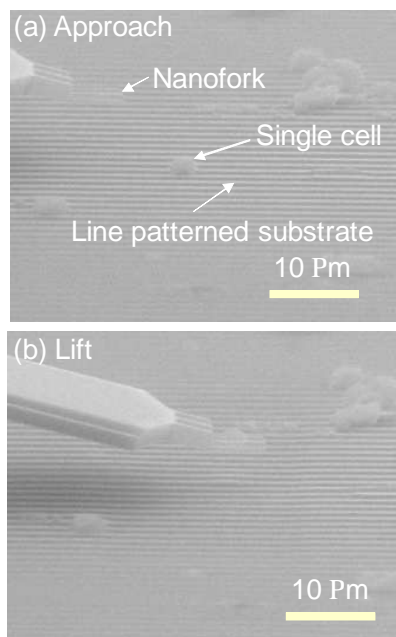


図6. ナノフォークを用いた単一細胞—基板間付着力計測

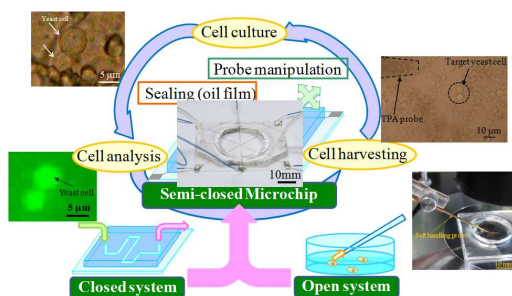


図7. セミクローズド・マイクロチップによる単一細胞操作システム

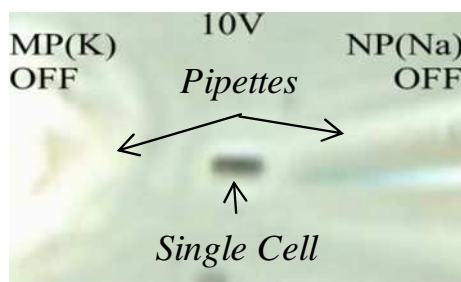


図8. ナノ・マイクロピペットを用いたバクテリアの単一べん毛モータの回転速度制御実験

硬さ特性について明らかにした。また、図5に示すように、電気特性計測用のナノプローブを用いて、細胞の活性特性、特に生死判別評価について示した。また、細胞—基板間の付着力計測用ナノフォーク（図6）、単一細胞切断用ナノナイフなどを提案・構築し、単一細胞解析技術を構築してきた。

また、微細流路を有したマイクロチップ内でマイクロマニピュレーションを併用する

ため、セミクローズド・マイクロチップ（図7）を世界で初めて提案した。これにより例えば、単一バクテリアの局所イオン濃度環境を制御することで単一べん毛モータの回転速度制御（図8）に成功した。

今後も本研究で得られた成果を基として、継続して、『生命機能の環境応答計測と制御』を中心課題として、工学とバイオが連携することでバイオツールの創製と実験環境の構築を進めており、今後も細胞内各種構成要素の分子メカニズム・機能発現のしくみを明らかにするための研究を進めていく方針である。

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36件）

- ① T. Fukuda, M. Nakajima, M. R. Ahmad, Y. Shen, M. Kojima, "Micro- and Nanomechanics", IEEE Industrial Electronics Magazine, refereed, Vol. 4, pp. 13-22, 2010.
- ② M. Takeuchi, M. Nakajima, M. Kojima, T. Fukuda, "Nanoliters Discharge/Suction by Thermoresponsive Polymer Actuated Probe and Applied for Single Cell Manipulation", refereed, J. of Robotics and Mechatronics, Vol. 22, No. 5, pp. 644-650, 2010.
- ③ M. Nakajima, Y. Matsuno, M. Kojima, Y. Takiguchi, K. Takiguchi, K. Nogawa, M. Homma, T. Fukuda, "Quantitative Evaluation of Injected Molecules into Phospholipid-Coated Microdroplets for In-Situ Biological Reactions", refereed, J. of Robotics and Mechatronics, Vol. 22, No. 5, pp. 651-658, 2010.
- ④ M. Ridzuan Ahmad, M. Nakajima, S. Kojima, M. Homma, and T. Fukuda, "Nanoindentation Methods to Measure Viscoelastic Properties of Single Cells Using Sharp, Flat, and Buckling Tips Inside ESEM", refereed, IEEE Transactions on Nanobioscience, Vol. 9, No. 1, pp. 12-23, 2010.
- ⑤ T. Fukuda, M. Nakajima, P. Liu, and El-Shimy Magdy, "Nanofabrication, Nanoinstrumentation and Nanoassembly by Nanorobotic Manipulation", The International Journal of Robotics Research, refereed, Vol. 28, No. 4,

- 537-547, 2009.
- ⑥ K. Nogawa, M. Kojima, M. Nakajima, S. Kojima, M. Homma, and T. Fukuda, "Rotational Speed Control of Na⁺-driven Flagellar Motor by Dual Pipettes", IEEE Transactions on Nanobioscience, refereed, Vol. 8, No. 4, pp. 341-348, 2009.
- ⑦ T. Fukuda, M. Nakajima, and P. Liu, "Nano Robotic Manipulation inside Electron Microscopes", SICE J. of Control, Measurement, and System Integration, refereed, Vol. 1, No. 1, pp. 40-50, 2008.
- ⑧ M. R. Ahmad, M. Nakajima, S. Kojima, M. Homma, T. Fukuda, "The Effects of Cell Sizes, Environmental Conditions and Growth Phases on the Strength of Individual W303 Yeast Cells using ESEM-Nanomanipulator", IEEE Transactions on Nanobioscience, refereed, Vol. 7, Issue 3, pp. 185-193, 2008.

[学会発表] (計 108 件)

- ① K. Nogawa, M. Kojima, M. Nakajima, Michio Homma, Toshio Fukuda, "Manipulation of Flagellar Driving Force by Local Environmental Control System with Multiple Nanoprobes", 2011 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA2010), 2010. 5, Anchorage, USA
- ② T. Fukuda, M. Nakajima, "Mechatronics - Past, Present and Future -", Mechatronics 2010, 2010. 6, Zurich, Switzerland
- ③ T. Fukuda, M. Nakajima, M. Kojima, "Micro-Nano Robotics and Automation System", Large Scale Systems: Theory and Applications (12th LSS Symposium), 2010. 7, Villeneuve d'Ascq, France
- ④ M. Takeuch, M. Nakajima, T. Fukuda, "Semi-Closed Microchip for Probe Manipulation and the Target Cell Harvesting (I)", The 2009 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA2009), 2009.5, Kobe, Japan
- ⑤ T. Fukuda, "Micro - Nano Robotic Manipulation System", Workshop on Intelligent Systems, 2009. 8, Budapest, Hungary

[図書] (計 1 件)

「細胞分離・操作技術の最前線」, シーエムシー出版刊, 監修 福田敏男, 新井史人, 387

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

名称: 感熱応答性ポリマーを用いた微小物操作のためのプローブ型装置

発明者: 福田敏男, 中島正博, 小嶋勝, 竹内大

権利者: 福田敏男, 中島正博, 小嶋勝, 竹内大

種類: 特許

番号: 特願 2010-261750

出願年月日: 2010.11.5

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/Bio-manipulation/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 敏男 (FUKUDA TOSHIO)

名古屋大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 70156785

(2) 研究分担者

齋藤 弥八 (SAITO YAHACHI)

名古屋大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 90144203

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

(H20→H21)

今泉 吉明 (Yoshiaki IMAIZUM)

名古屋大学・大学院工学研究科・研究員

研究者番号: 00377813

(H17→H18)

(3) 研究連携者 なし