

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22126

研究課題名(和文)液中環境における表面電荷分布のナノスケール可視化プローブ顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of nanoscale visualization probe microscope for surface charge distribution in liquid environment

研究代表者

岩田 太(Iwata, Futoshi)

静岡大学・電子工学研究所・教授

研究者番号：30262794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：液中環境での材料表面や生体細胞膜の表面といった固液界面の活性場において発現する現象は、電荷状態に直接的に関わっていることから、電荷分布の可視化はそこで生じる様々な現象の解明に極めて有効である。本研究は液中環境において試料表面の形状像と電荷分布像をナノスケールの分解能で可視化できるプローブ顕微鏡を開発した。走査型イオン伝導顕微鏡をベースに二つの開口を有するダブルバレルナノピペットをプローブとして用いた新奇なイオン電流検出法を開発することで実現した。本手法を用いて帯電処理したポリマー表面や染色体などの生体試料の電荷分布を可視化できることを実証し、その有効性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、液中環境において固液界面の電荷分布状態をナノスケールでの高分解能で解析・可視化する技術を開発するものである。細胞や組織といった生体試料表面では生体機能が発現する活性場として重要な役割を担っている。また、材料表面においては結晶成長や腐食、触媒反応といった物理・化学反応が盛んに生じている。これらの活性現象は界面上の電荷状態に直接的に関わっていることから、その電荷分布の可視化は極めて有効である。本手法は学術的意義のみでなく、二次電池やキャパシタの開発といった工業分野から細胞や組織の動態解析、病理検査などの医療分野まで広い分野への波及効果と応用展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Phenomena occurring at the active field of the solid-liquid interface, such as the surface of a material or a biological cell membrane in a liquid environment, are directly related to the charge state, and the visualization of charge distribution is extremely effective in clarifying various phenomena occurring there. In this study, we developed a probe microscope that can visualize the shape and charge distribution of a sample surface in a liquid environment with nanoscale resolution. A novel ion current detection method using a double-barrel nano-pipette with two apertures as a probe based on a scanning ion conduction microscope was developed. We demonstrated the effectiveness of this method in visualizing the charge distribution on the charged polymer surfaces and biological samples.

研究分野：プローブ顕微鏡開発

キーワード：走査型イオン伝導顕微鏡 ナノバイオ 表面形状計測 表面帯電分布

1. 研究開始当初の背景

近年、生体試料を生きたまま顕微鏡観察するバイオイメージング技術に注目が集まっている。ナノスケールでの生体試料の構造の観察手法として、走査型プローブ顕微鏡(Scanning Probe Microscopy:SPM)がある。中でも原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy:AFM)は液中環境で動作可能であることから、生体試料の観察に広く用いられている。しかしながら AFM はプローブであるカンチレバーと試料の接触により生体試料のような柔らかい表面を傷つけてしまう恐れがある。また、カンチレバーの形状により起伏の激しい表面形状の観察が困難であるという欠点がある。液中環境においてプローブが非接触で観察できる SPM として走査型イオン伝導顕微鏡(Scanning Ion Conductance Microscopy:SICM)がある。SICM はナノピペットを用いて電解液中においてイオン電流を検出することで非接触・低侵襲で表面形状を観察することができることから、生体試料の観察に適しており、近年盛んに研究されている。しかしながら、細胞や組織といった生体試料の表面は電荷が複雑に分布して帯電している場合が多い。このため、SICM の検出イオン電流が帯電の影響を受け、しばしば測定困難に陥る問題が指摘されていた。よって表面が帯電している資料においても表面形状が正確に測定できる手法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は液中環境において試料表面の形状像と電荷分布像をナノスケールの分解能で可視化できるプローブ顕微鏡を開発することである。SICM をベースに複数開口を有するナノピペットプローブを用いた新奇なイオン電流検出法を開発することで実現する。まず、試料帯電のアーティファクトのない正確な表面形状の測定法を開発する。次に電荷分布を可視化する手法を実現する。開発した手法を用いて生体試料による帯電分布を可視化することで、本研究で開発した新規ナノ顕微法の有効性を示す。

3. 研究の方法

1) 走査型イオン伝導顕微鏡 (SICM)

SICM は電界液中で試料の表面形状を取得する SPM の一種である。試料表面を走査するプローブとしてナノピペットと呼ばれるキャピラリーガラス管を用いており、その先端部の開口径は数十 nm 程度である。SICM により取得する画像の空間分解能はピペットの開口径に依存する。SICM の基本的な測定原理を図 1(a) に示す。

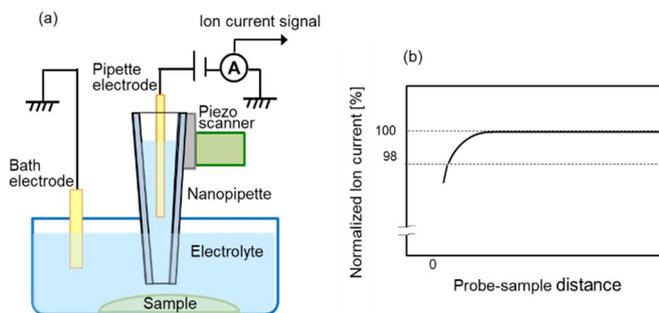


図 1 SICM の動作原理

ピペット内部には電解液が充填されており、ピペット内部のピペット電極と試料が入った電解液中のバス電極に電圧を印加することでピペット先端の開口を通してイオン電流が流れる。ピペットが試料表面へ近接した際のピペット-試料間距離とイオン電流の関係を示したグラフ(アプローチカーブ)を図 1(b) に示す。ピペット先端の開口を流れるイオン電流はピペットと試料間距離に依存し、ピペットが試料に近接すると先端開口部が試料により閉塞されることでイオン電流が減衰する。このイオン電流の減衰を検出し、ピペットと試料間の距離制御信号として用いることで試料表面を非接触で観察することが出来る。

2) 帯電試料の形状イメージング

単一開口ナノピペットを用いて、帯電の試料表面上で SICM 計測を行う場合、検出するイオン電流は試料表面の帯電により表面近傍に形成される電気二重層の影響を強く受ける。ピペット電極に負電圧を印加した場合の負帯電試料表面のイオン電流の振る舞いを図 2 に示す。ガラス製のナノピペットは液中で負帯電であり、ピペット先端内壁はカチオンによる電気二重層が形成されている。また、試料側の表面が負帯電の場合、試料表面近傍にはカチオン濃度が高い電気二重層が形成される。この状態で負電圧をピペット電極に印加した場合、カチオン分布の濃度勾配変化により、帯電試料表面近傍ではピペット先端抵抗が減少し、その結果、この図のアプローチカーブに示されるようにイオン電流が増加する。すなわち、試料表面近傍にナノピペット先端が近接した際のイオ

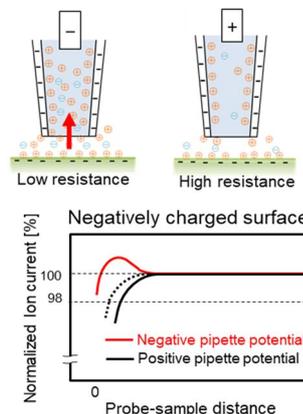


図 2 帯電試料表面上での SICM 計測

ン電流の減衰を検出して試料表面高さを計測する従来の計測原理では測定困難に陥る。

これに対して、本研究で提案する手法は、図3に示すようにダブルバレルナノピペットの各流路内に電極を挿入し、2開口の間で電圧を印加する構成を提案している。これにより、ピペット先端が帯電試料表面近傍に近接した際に、ピペット先端の2つの開口のうち片方のカチオン濃度は増加し電気抵抗が減少するのに対して、片方のカチオン濃度勾配は減少し電気抵抗が増加する。その結果、帯電の影響による濃度勾配での電気抵抗変化が相殺され、検出するイオン電流は試料帯電の影響をほとんど受けずに正確な表面形状を計測可能となる。

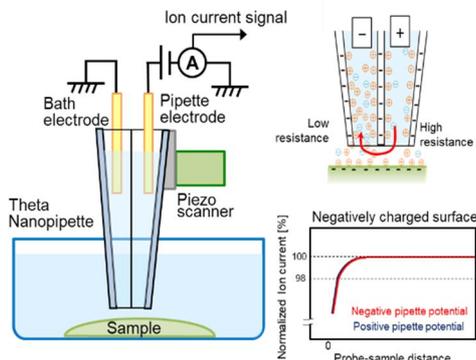


図3 開発した帯電試料のSICM計測法

### 3) 帯電試料の電荷分布イメージング

本研究における帯電分布の取得原理について述べる。まず上述したように形状像取得時はダブルバレル管の二つの開口間を流れる電流を検出することで試料表面の帯電の影響なく、試料表面近傍にピペット先端を位置決めし、試料表面高さを計測する。帯電状態の測定はこのピペット先端を試料表面近傍に位置決めした状態を保ったまま、単一開口の従来の電極配置に切り替えた際のイオン電流変化を測定することで行う。すなわち、2開口を用いて帯電状態を相殺してイオン電流を検出していた状態から単一開口による帯電状態の影響を受けるイオン電流に切り替えた際のイオン電流の増減を検出することで表面帯電状態を計測できる。実際の構成ではダブルバレルナノピペットプローブの2電極のうちの1電極を無効にし、デッシュ溶液内に配置されたバス電極との間に電圧を印加するように切り替えることで従来の構成となる。この際、バス電極側もダブルバレルナノピペットの電極を用いると、ピペット電極とバス電極で対称的な電極構成を形成することで試料表面帯電のみの影響を計測している。

### 4) 装置構成

本研究で使用したSICMの装置構成を図4に示す。本研究のSICMで使用されるダブルバレルナノピペットは外径1.5 mm、内径1.17 mmのダブルバレル管(BT150-10, Sutter)をプラーにより熱引きすることで、先端開口径を約100 nm程度以下に先鋭化した。SICMのユニットは、倒立型顕微鏡のステージ上に設置されている。本装置における試料表面に対するピペット先端の垂直、水平方向の位置決めは、倒立型の光学顕微鏡を使用しながら、小型圧電モータにより駆動する粗動機構と圧電スキャナの微動機構を組み合わせ、ナノメートルオーダーの精度で行われる。圧電スキャナは、PCからの制御信号を圧電素子駆動アンプで増幅し、印加することで駆動する。イオン電流の検出はIV変換アンプで増幅してPCへと入力される。

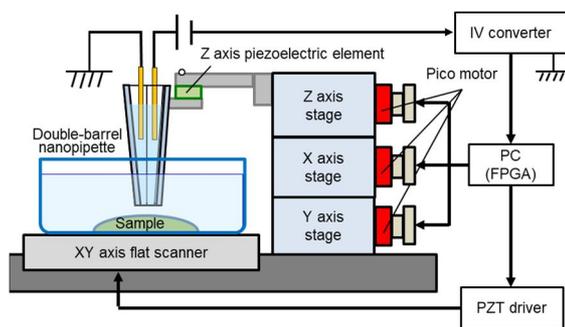


図4 帯電試料測定可能な装置構成

形状像取得時の電極は、従来のSICM装置ではピペット内及び電解液中に挿入されるのに対し、本装置ではダブルバレルナノピペットの各流路内に挿入する。また、帯電分布測定時は、イオン電流に帯電試料の影響のみが表れるよう、バス電極はプローブと同様の先端形状のダブルバレルナノピペット内に挿入される。

## 4. 研究成果

### 1) 帯電試料上での形状計測

負帯電を有する試料として、ホエジカ染色体を用いて、単一開口を用いた従来の装置構成による計測と本研究で開発したダブルバレルナノピペットを用いた装置構成による計測を比較した。図5(a)は従来の手法による単一開口ナノピペット先端を帯電試料表面に近づけた際に検出されたイオン電流の振

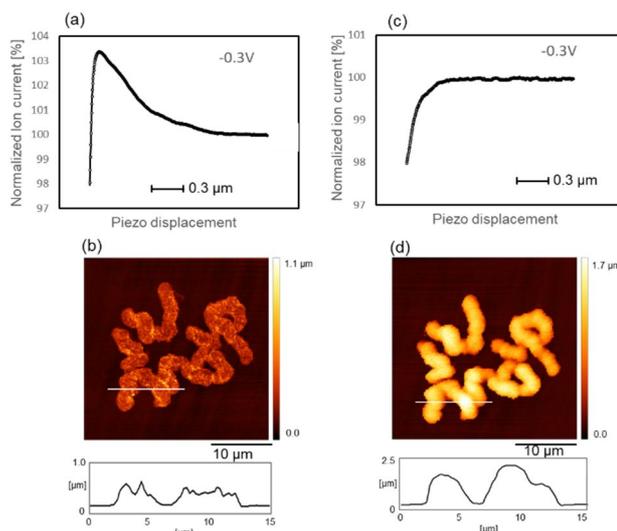


図5 強い負帯電を有する染色体の計測

- (a) 従来の手法によるイオン電流の距離依存（アプローチカーブ）
- (b) 従来の手法による形状計測
- (c) 提案手法によるイオン電流の距離依存（アプローチカーブ）
- (d) 提案手法による形状計測

る舞い(アプローチカーブ)である。グラフ左方向が近接方向である。ピペット電極は負電位に設定している。この図に示されているように、試料表面近傍に近づくにつれて電流が増加しており、表面帯電の影響を受けていることが分かる。図 5(b)は取得した表面形状像である。染色体表面でイオン電流の減衰が検出できないためピペット先端が表面を計測できずに、表面形状が正しく計測できていないことが分かる。これに対して図 5(c)は本研究で開発したダブルバレルナノピペットを有する SICM を用いたアプローチカーブである。負帯電した表面近傍において、電流が減衰していることがわかる。図 5(d)は本手法で取得した表面形状像である。鮮明に染色体が計測できており、断面像からも形状が歪んでいない様子が分かる。よって開発した本手法を用いることで、従来測定が困難であった、帯電を有する試料においても、帯電の影響を受けずに正確な表面形状を測定可能であることを実証した。

## 2) 帯電試料の帯電分布可視化計測

形状像と帯電分布像を測定するために帯電試料表面上でのイオン電流の電圧依存性(電流電圧曲線)を計測した。帯電試料には、プラズマを試料表面に照射することで試料表面を負に帯電させたポリジメチルシロキサンを用いた。まず、2開口を用いて帯電の影響を相殺する形状像取得時の構成で取得した電流電圧曲線を図 6(a)に示す。試料から離れた位置で取得したデータを赤線、試料表面近傍で取得したデータを青線で示している。この図より正電圧印加時と負電圧印加時のイオン電流が対称性を示していることから、検出するイオン電流に帯電の影響が現れないことが確認できる。次に、帯電分布計測用に上述した方法で2開口電極のうちの片方の電極を無効にし、溶液のバス電極との間で電圧を印加する構成に切り替えて取得した電流電圧曲線を図 6(b)に

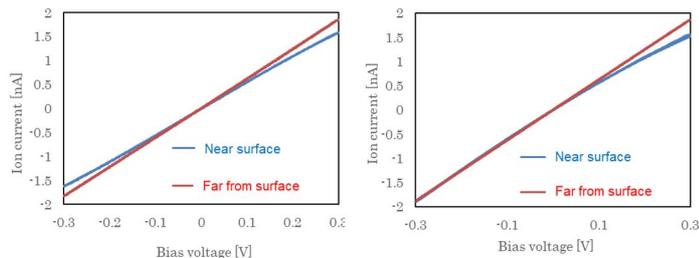


図 6 負帯電を有するポリジメチルシロキサン表面上での電流電圧計測  
(a) 形状計測用の構成での計測, (b) 帯電分布計測用の構成での計測

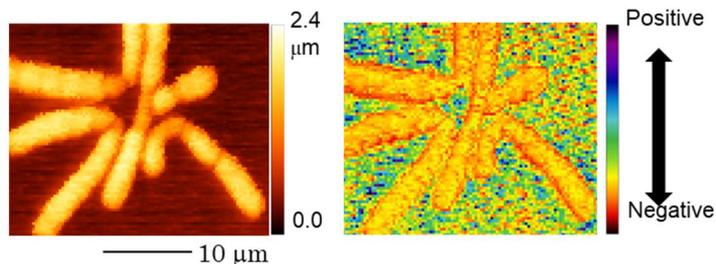


図 7 染色体の形状計測と帯電分布の同時測定  
(a) 形状計測像, (b) 帯電分布像

示す。試料から離れた位置で取得したデータを赤線、試料表面近傍で取得したデータを青線で示している。この図より、試料表面近傍で取得したイオン電流にのみ帯電の影響が現れていることから、本研究の構成で帯電分布計測が可能であることが確認できる。

帯電の影響を相殺する表面形状計測と帯電の影響を受ける帯電分布計測を1画素ごとにスイッチングを切り替えて取得する画像取得プログラムにより、表面形状と帯電分布計測を行った。試料は強い負帯電を有することが知られているホエジカ染色体を用いた。形状観察用の構成を用いて取得した染色体の形状像を図 7(a)に示す。また、帯電分布計測用の構成を用いて同時に取得した同一サンプルの帯電分布像を図 7(b)に示す。図 7(a)より、帯電試料である染色体の鮮明な形状像を取得できていることが確認できる。また図 7(b)より、染色体が液中環境において負に強く帯電していることが確認できた。

本報告では、帯電試料の形状イメージングと帯電分布計測を同時に行う SICM を用いた新たなナノ顕微法を提案した。また、本手法を用いて帯電試料表面近傍での電流電圧曲線を取得し、帯電計測時の構成でイオン電流に試料の帯電の影響が表れることを確認した。負帯電試料である染色体を観察し、本手法により形状像と帯電分布像を同時に取得することが可能であることを実証し、本手法の有効性を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwata Futoshi, Shirasawa Tatsuru, Mizutani Yusuke, Ushiki Tatsuo	4. 巻 70
2. 論文標題 Scanning ion-conductance microscopy with a double-barreled nanopipette for topographic imaging of charged chromosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 423-435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfab009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ushiki Tatsuo, Ishizaki Kimihiro, Mizutani Yusuke, Nakajima Masato, Iwata Futoshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Scanning ion conductance microscopy of isolated metaphase chromosomes in a liquid environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chromosome Research	6. 最初と最後の頁 95 ~ 106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10577-021-09659-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 岩田 太
2. 発表標題 SICMによる細胞・組織の計測とマニピュレーション
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚本 照輝, 潤間 中澤 健太, 岩田 太
2. 発表標題 静電容量保障した電流減を有する走査型イオン電導顕微鏡の開発
3. 学会等名 2021年度精密工学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚本 照輝, 潤間 威史, 中澤 謙太, 岩田 太
2. 発表標題 走査型イオン伝導顕微鏡の走査速度向上化による細胞微絨毛の動的観察
3. 学会等名 第20回 日本表面真空学会中部支部学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Tsukamoto, T. Uruma K. Nakazawa and F. Iwata
2. 発表標題 A current-source amplifier with capacitance compensation for scanning ion conductance microscopy
3. 学会等名 8th International colloquium on scanning probe microscopy (ICSPM28)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 F. Iwata
2. 発表標題 Scanning ion conductance microscopy for various biological applications: From electroporation to electrical charge mapping
3. 学会等名 Kanazawa University NanoLSI Open Seminar (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Katsura, Y. Mizutani, T. Ushiki, K. Nakazawa and F. Iwata
2. 発表標題 Visualizing charge distribution of biological tissue using scanning ion conductance microscopy with double barrel nanopipettes
3. 学会等名 27th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM27) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Katsura, Y. Mizutani, K. Nakazawa, T. Ushiki, F. Iwata
2. 発表標題 Observation of charge distribution of biological tissue sections using scanning ion conductance microscopy
3. 学会等名 The30th 2019 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Katsura, T. Shirasawa, Y. Mizutani, T. Ushiki, K. Nakazawa, F. Iwata
2. 発表標題 Observation of biological tissues using label free charge imaging method based on scanning ion conductance microscopy
3. 学会等名 the 8th International Conference of Asian Society for Precision Engineering and Nanotechnology (ASPEN 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桂 悠一郎, 水谷 祐輔, 牛木 辰男, 中澤 謙太, 岩田 太
2. 発表標題 走査型イオン伝導顕微鏡による帯電分布測定を用いた生体組織切片の観察
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	牛木 辰男  (Ushiki Tatsuo)  (40184999)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	早津 学  (Hayase Manabu)  (40468898)	新潟大学・医歯学系・助教    (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関