

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390051

研究課題名（和文） 走査プローブ顕微鏡による生体微細構造機能解明法の新展開

研究課題名（英文） Development of scanning probe microscopy in biomedical fields.

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、走査型プローブ顕微鏡の医学・生物学分野への更なる応用を目指し、とくに顕微解剖学分野の研究に益する次の3つの観察法の開発とその応用を行った。

- 1) 液中リアルタイムイメージング法の開発と顕微解剖学応用
- 2) 走査型イオン伝導顕微鏡法の開発と顕微解剖学応用
- 3) マニピュレーション法の開発と顕微解剖学応用

これにより、液中での細胞や組織の高分解能・三次元構造機能イメージングと微細解剖を可能にした。

研究成果の概要（英文）：In this project, we studied applicability of the following three techniques of scanning probe microscopy (SPM) to biological fields:

- 1) Real-time imaging in liquid by atomic force microscopy (AFM)
- 2) Scanning ion-conductance microscopy (SICM)
- 3) Manipulation using AFM manipulators

Our results showed that these techniques are useful in the field of microscopic anatomy and expected to become powerful tools for imaging and manipulation of cells and tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：走査型プローブ顕微鏡、原子間力顕微鏡、走査型イオン伝導顕微鏡、マニピュレーション、細胞

1. 研究開始当初の背景

走査型プローブ顕微鏡(scanning probe microscopy, SPM)は、1981年に Binnig と Roher により考案された走査型トンネル顕

微鏡(scanning tunneling microscope, STM)に端を発する触診型顕微鏡の総称である。この顕微鏡にはレンズが存在せず、代わりに鋭い探針(プローブ)を試料表面上で走査し、

探針・試料間の物理量を測定しながら、表面の形状や物性を測定する。このように一見単純な構造に関わらず、表面平坦な材料（グラファイトなど）については、原子配列が観察できる分解能を有しており、材料学の分野では電子顕微鏡と並ぶほど重要な顕微鏡として利用されてきている。

一方、SPM の生物学への応用は、とくに 1986 年に原子間力顕微鏡 (atomic force microscope, AFM) が考案されて以来、注目されはじめ、現在のナノテクノロジーの分野においては最も期待される分野でもある。しかし、生物応用については克服すべき問題（イメージングに数分かかること、柔らかい構造の液中高分解能イメージングの難しさなど）も多く、また一方で種々の新しい研究の流れや、単なるイメージングから多様なツールとしての利用法（ダイセクションなど）を目指す流れも出てきている。

このようなことから、申請者のこれまでの成果を進展させて、より細胞・組織学（ないし顕微解剖学）に役立つ新しい SPM 応用を目指そうとする着想が湧くに至った。

2. 研究の目的

上記の背景を念頭にして、顕微解剖学分野の研究に益する新しい SPM 法として、次の 3 点の研究を行う。

(1) 液中リアルタイムイメージング法の開発と顕微解剖学応用

これまでの AFM では、液中での一枚の画像の取得に数分から数十分という長い時間がかかった。本研究では、ブリストル大学の物理学のグループが開発した手法 (Picco et al. 2007, 2008) を生物試料に導入し、リアルタイムでの液中 AFM 観察の可能性を探る。

(2) 走査型イオン伝導顕微鏡法 (scanning ion-conductance microscopy, SICM) の開発と顕微解剖学応用

AFM では、探針・試料間の力をモニターするため、ごく柔らかい標本の表面観察において力のダメージがかかることがある。この点を克服する一つの手法として探針・試料間のイオン電流や抵抗を用いて測定する走査型イオン伝導顕微鏡 (Hansma et al., 1989) が考案されてきている。この方法を導入し、液中での細胞表面の高分解能構造機能イメージングの可能性を探る。

(3) マニピュレーション法の開発と顕微解剖学応用

AFM の特徴は、探針・試料の相互作用を測定できる点にある。このことは、探針で試料の操作・微小解剖が可能であることを示し

ている (Iwata et al., 2008)。そこで、この手法を顕微解剖学に利用する方法を探り、この手法を用いた細胞・組織構造解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 液中リアルタイムイメージング法の開発と顕微解剖学応用

基本となる技法のハードウェアは、ブリストル大学の物理学グループが開発したもの (Picco et al. 2007) を用い、これにより染色体とコラーゲン細線維のイメージングを中心に観察を行い、測定法の安定化、特に試料の調整法、測定条件の検討を行う。その際に液中リアルタイムイメージングの諸条件（試料側の条件、測定条件、装置の限界など）を整理し、本装置の特徴と将来性を明らかにする。

(2) 走査型イオン伝導顕微鏡法 (SICM) の開発と顕微解剖学応用

基本となる技法のハードウェアは、静岡大学の工学部のグループが材料分野の活用のために開発したものを、さらに市販の装置も用いる。まず、この顕微技法の可能性を探る意味で、培養細胞を固定した状態で液中観察し、従来の AFM における液中観察と比較検討する。これにより SICM の可能性を探り、さらに可能であれば、多様な応用を行うことで、この顕微技法の将来性を明らかにする。

(3) マニピュレーション法の開発と顕微解剖学応用

AFM は探針を試料に接触することができるので、試料のダイセクション、加工が可能である。しかし、AFM のイメージングと加工は同時に出来ないため、条件の設定やダイセクションの状態の適正化を検討するには、従来の AFM では難しい点がある。そこで、走査電顕の中で AFM が操作できるシステム (文科省の『次世代電子顕微鏡要素技術』で平成 20 年度までに開発) を利用して、AFM による細胞や組織の微細解剖の基本条件を検討する。

4. 研究成果

(1) 液中リアルタイムイメージング法の開発と顕微解剖学応用

平成 21 年度は、ブリストル大学のグループの装置を用い染色体とコラーゲン細線維の液中原子間力顕微鏡 (AFM) によるリアルタイムイメージングを試みた。また平成 22、23 年度は、同様の高速ユニットを静岡大学の工学部のグループに試作してもらい、同様の観察を試みた。これによりコラーゲン細線維

を1秒数コマ程度の速度で連続観察することを可能にしたが、一方でこの方法では試料に対するダメージが生じやすいことも明らかになった。

(2) 走査型イオン伝導顕微鏡法 (SICM) の開発と顕微解剖学応用

平成 21, 22 年度は、静岡大学工学部の連携研究グループと共同開発中の SICM を用いて、化学固定した培養細胞 (HeLa 細胞) の液中観察を可能とし、AFM における液中観察と比較検討した。その結果、分解能は AFM がまさるが、試料に対する力ダメージが SCIM で極めて少ないことが明らかになった。そこで平成 23 年度には、測定条件をさらに検討することで、生きた培養細胞の観察を可能にした (図 1)。

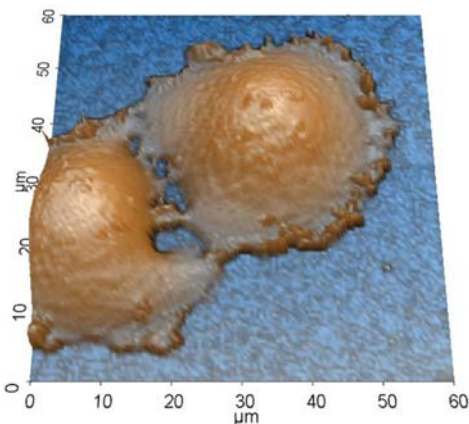


図1 生きた HeLa 細胞の SICM 像

さらに染色体、コラーゲン細線維、組織の薄切標本の液中観察を試み、AFM 像や SEM 像と比較することで SCIM の測定の問題点を抽出し、それに適した標本作製法を考案した。その結果、これらの多様な生物試料のイメージングを可能にすることができた (図 2)。

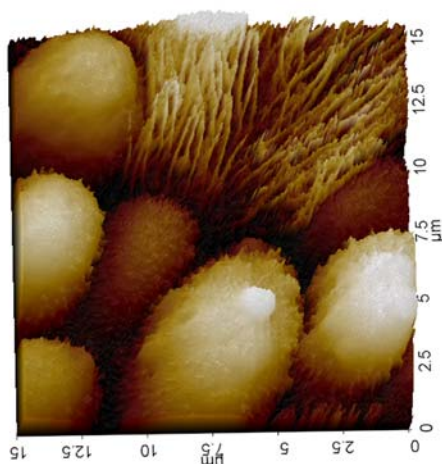


図2 気管内腔の SICM 像

(3) マニピュレーション法の開発と顕微解剖学応用

平成 21 年度は AFM が探針を試料に接触させることができる特徴を利用して、AFM 駆動型のマニピュレータを用い、おもに走査型電子顕微鏡の中での生物試料の加工を行い、その有用性と今後の可能性について検討した。その結果、現在保有するマニピュレータでは、腎糸球体の操作や、水晶体線維の加工などを行うことができた。そこで平成 22 年度には、走査電子顕微鏡内のマニピュレータシステムをさらに改良し、実用的なシステムを構築した。またこれを用いて、実際に腎糸球体や水晶体のマニピュレーションを行い、その有用性を立証した。また、さらにこのシステムを効果的に利用するための改良を行った。また平成 23 年度には、ナノピンセットやナノバサミを用いて、ゼブラフィッシュの胎仔を走査電子顕微鏡下で観察しながら複数のマニピュレータで解剖することに成功した (図 3)。

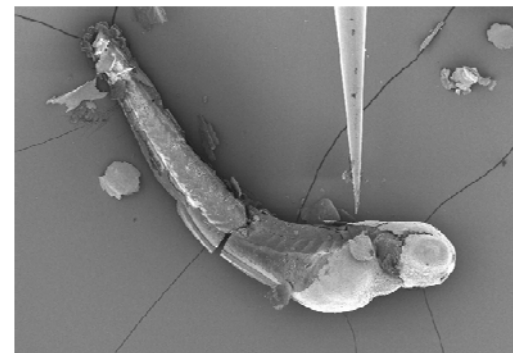
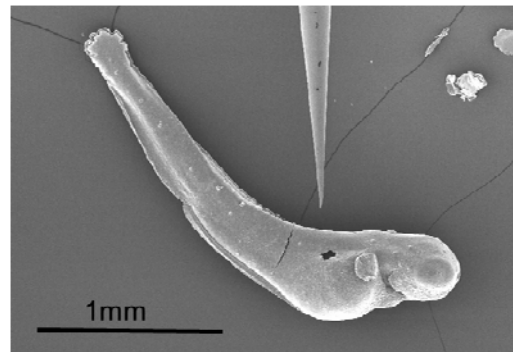


図3 AFM マニピュレータによるゼブラフィッシュ胚の解剖

(4) まとめと展望

本研究では、医学生物学分野に今後期待される 3 つの SPM 技法について、実際の生物応用を行いながら、問題点を抽出し、その将来性を検討した。これにより、それぞれの顕微鏡法の有用性と可能性を示すことができた。とくに SICM の生物応用と AFM 名のマニピュレータの将来への大きな可能性が示された点に大きな意義がある。一方で、高速

AFM については、今後克服すべき問題点が示された。

今後は、SICM の生物応用を推進し、これまでの電子顕微鏡や AFM による観察では不可能な液中での高分解能観察、動的観察に挑戦していく予定である。

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 8 件)

- ① Ushiki T et al.: Scanning ion conductance microscopy for imaging biological samples in liquid: A comparative study with atomic force microscopy and scanning electron microscopy. *Micron* (2012, in press) 査読有
- ② Iwata F et al.: Nanomanipulation of biological samples using a compact atomic force microscope under scanning electron microscope observation. *J Electron Microsc* 60: 359-366 (2012) Doi 10.1093/jmicro/dfr070 査読有
- ③ 中島真人、牛木辰男: 走査型プローブ顕微鏡で染色体の構造を解明する, 遺伝, 66: 119-124 (2012) 査読無
- ④ 岩田 太、牛木辰男: 電子顕微鏡における AFM のマニピュレータ利用. *O plus E*, 34: 229-234 (2012) 査読無
- ⑤ Hoshi O et al.: Replication banding patterns in human chromosomes detected using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation. *Acta Histochem Cytochem* 44: 233-237 (2011) 査読有
- ⑥ Iwata, F et al.: Operation of Self-Sensitive Cantilever in Liquid for Multiprobe Manipulation. *Jpn J Appl Phys.* 49: 08LB14-1-5 (2010) 査読有
- ⑦ 牛木辰男、他: リアルタイム 3D 走査電子顕微鏡の医学生物応用. *顕微鏡*. 45: 198-201 (2010). 査読有
- ⑧ 牛木辰男: 走査型電子顕微鏡と細胞・組織の 3D イメージング技術の進展. *新潟医師会報*. 475: 1-8 (2010) 査読無

[学会発表] (計 22 件)

- ① 中島真人、牛木辰男: 細胞分裂中期の分裂装置と走査型イオン伝導顕微鏡解析, 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012 年 3 月 27 日, 山梨大学甲府キャンパス (山梨県)
- ② 牛木辰男、中島真人: 走査型イオン伝導顕微鏡 (SICM) の生物応用, 日本顕微鏡学会関西支部会特別講演会 (招待講演), 2011 年 12 月 28 日, ウィンクあいち (愛知県)

- ③ 牛木辰男、他 (招待講演): 形態学から見た染色体の高次構造—走査電子顕微鏡と走査プローブ顕微鏡によるアプローチから—, 染色体学会第 62 回年会 (招待講演), 2011 年 11 月 12 日, 神奈川大学 (神奈川県)
- ④ Ushiki T: Atomic force microscopy and its related techniques for biological studies. *Russian Nanotox Week 2011* (招待講演), 2011 年 10 月 9-13 日, Vladivostok, Russia
- ⑤ Iwata F et al.: Interactive nanomanipulator coupled with a high speed imaging technique. *International scanning probe microscopy conference 2011*, 2011 年 6 月 19~23 日, TUM-IAS (Munich, Germany)
- ⑥ Ushiki T et al.: Atomic force microscopy of biological samples in a real-time stereo scanning electron microscope, *International scanning probe microscopy conference 2011*, 2011 年 6 月 19~23 日, TUM-IAS (Munich, Germany)
- ⑦ 牛木辰男: SEM 技術 現代から未来へ (医生物) 日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会 (指定講演), 2011 年 5 月 17 日, 福岡国際会議場 (福岡市)
- ⑧ 中島真人、他 動物体の構造機能解析のために分裂装置を単離する. 第 116 回日本解剖学会全国学術集会, 2011 年 3 月 28 日 (誌上開催), 横浜 (誌上開催)
- ⑨ 牛木辰男、他: リアルタイム 3D 走査電子顕微鏡内での生物試料のマニピュレーション, 第 116 回日本解剖学会全国学術集会, 2011 年 3 月 28 日 (誌上開催), 横浜 (誌上開催)
- ⑩ Hoshi O and Ushiki T: Collagen fibril formation by human osteosarcoma cells observed by atomic force microscopy. *Bristol nano science symposium 2010*, 2010 年 9 月 20~23 日, Bristol, UK
- ⑪ Iwata F and Ushiki T (招待講演), Multiprobe manipulation of biological samples using compact atomic force microscopies, *XXI International Symposium on Morphological Sciences*, 2010 年 9 月 18~23 日, Taormina, Italy
- ⑫ 牛木辰男、他 リアルタイムステレオ SEM による生物試料のマニピュレーション. 日本顕微鏡学会第 66 回学術集会, 2010 年 5 月 23~26 日, 名古屋
- ⑬ Hoshi O and Ushiki T: Collagen fibril formation by human osteosarcoma cells observed by atomic force microscopy. *The 12th International Scanning Probe Microscopy Conference*, 2010 年 5 月 10~12 日, 札幌
- ⑭ Iwata F and Ushiki T: Compact

manipulation based on an atomic force microscope coupled with a haptic device for multi-probe manipulation of biological samples. The 12th International Scanning Probe Microscopy Conference, 2010年5月10~12日, 札幌

- ⑮ 牛木辰男: 細胞と組織の構造機能解析ツールとしての原子間力顕微鏡、第115回日本解剖学会全国学術集会、2010年3月28-30日、盛岡
- ⑯ 星 治、牛木辰男: 培養細胞系を用いたコラーゲン線維形成過程の原子間力顕微鏡による構造解析、第115回日本解剖学会全国学術集会、2010年3月28-30日、盛岡
- ⑰ 浅井慶祐、河西晋佐、佐々木 彰、牛木辰男、岩田 太: AFM ナノマニピュレータを用いたバイオサンプルの顕微解剖、2009年度精密工学会春季大会、2010年3月13日、東京
- ⑱ Mizuguchi Y, Ozawa K, Ushiki T and Iwata F: Compact AFM for multi-probe manipulation of biological samples in liquid condition. The 17th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy, 2009年12月10日, Atagawa, Japan
- ⑲ 牛木辰男、米谷雄作、岩田 太: 走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)のバイオ応用、日本顕微鏡学会 SPM 研究部会、2009年11月28日、越後湯沢
- ⑳ 耕 秀之、河西晋佐、青山尚之、牛木辰男、岩田 太: 電子顕微鏡内で動作する力覚提示 AFM マニピュレータの開発と顕微解剖への応用、2009年第70回応用物理学学会学術講演会、2009年9月8~11日、富山
- ㉑ 耕 秀之、河西晋佐、青山尚之、牛木辰男、岩田 太: SEM 内での顕微解剖可能な AFM マニピュレータの開発、応用物理学学会 (M&BE 分科会) 有機バイオ SPM 研究会、2009年9月4日、幕張
- ㉒ Ushiki T, Iwata F: An atomic force microscope coupled with a haptic device for observation and manipulation of biological samples in a scanning electron microscope. VII International scanning probe microscopy conference, 2009年6月15~21日, Madrid, Spain

[図書] (計 1 件)

- ① 日本顕微鏡学会関東支部 編: 新・走査電子顕微鏡, 共立出版, 2011 (pp217-221)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

星 治 (HOSHI OSAMU)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 10303124
(H21, 22)

甲賀大輔 (KOGA DAISUKE)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 30467071

中島真人 (NAKAJIMA MASATO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 60588250
(H23)

(3) 連携研究者

岩田 太 (IWATA FUTOSHI)
静岡大学・工学部・教授
研究者番号: 30272794