

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23246044

研究課題名(和文) ナノサージェリシステム構築を基盤とした高速バイオセンシング技術の開発

研究課題名(英文) Higher Speed Biosensing Techniques based on Nano-surgery System

研究代表者

福田 敏男 (Fukuda, Toshio)

名城大学・理工学部・教授

研究者番号：70156785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,200,000円、(間接経費) 11,460,000円

研究成果の概要(和文)：現在，生物を直接利用することにより，安心・安全・高感度に環境物質を解析し，同時に生物への影響を解析するバイオセンシング技術が注目を集めている．本研究では，これまで構築してきたナノマニピュレーションシステムを応用し，新たな各種ナノツールを用いて，単一細胞レベルの局所操作及び計測技術を開拓した．また，マイクロ流体チップによりモデル生物を選択的に解析することで，重金属のバイオインジケータデバイスとして新たな応用を開拓した．

研究成果の概要(英文)：Currently, the bio-sensing technologies have been received much attention for smart, safe, and high-sensitive analysis of environmental materials using living organism directly with some effects on ecosystem. In this research, we applied our nanomanipulation technique to realize single cell level local analysis using various nano-tools. We proposed a bio-indicator device for heavy metal inside some solution by controlling a micro-fluidic chip to use a model organism.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学，知能機械学・機械システム

キーワード：ナノサージェリ バイオセンシング マイクロ・ナノデバイス モデル生物 マイクロ流体デバイス

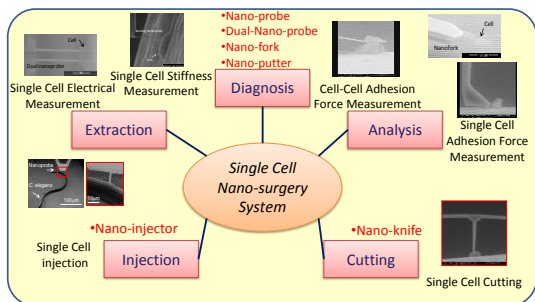


図1 ナノツールを利用したナノサージェリシステムの構築

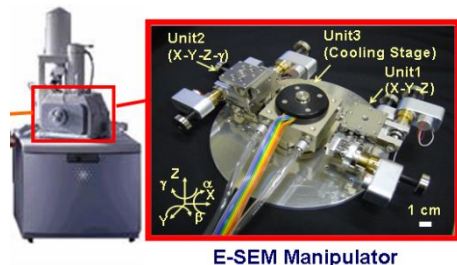


図2 環境制御型電子顕微鏡(E-SEM)内でのナノマニピュレーションシステム

1. 研究開始当初の背景

現在、生物を直接利用することにより、安心・安全・高感度に環境物質を解析し、同時に生物への影響を解析するバイオセンシング技術が注目を集めている。本技術により、クロマトグラフィ、フローサイトメトリ、電気泳動など、多大な時間と煩雑な作業に対する労力及び多大なコストが不要となることが期待されている。

本研究では、これまで構築してきたナノマニピュレーションシステムを応用し、各種ナノツールを用いて、単一細胞レベルの局所操作、計測技術を新たに開拓した。また、マイクロ流体チップを用いてモデル生物を利用したバイオセンシング技術として、重金属溶液に対するバイオインジケータデバイスを構築した。

2. 研究の目的

我々はこれまで、単一細胞を高精度・高感度に解析する新たな技術として、局所環境を計測可能なマイクロ・ナノスケールの微細なツールを提案し、マイクロ・ナノマニピュレーションシステムに応用してきた。本技術に基づいて、各種マイクロ・ナノツールを利用した単一細胞レベルのナノサージェリシステムを提案してきた(図1)。

具体的には、環境制御型電子顕微鏡(Environmental-Scanning Electron Microscope: E-SEM)内でのナノバイオマニピュレーションシステムを構築した(図2)。本システムは、含水状態において細胞をナノスケールの高分解能で観察することができるため、我々のナノマニピュレータによりナノスケールの高精度な操作を実現することが出来る。これにより、ナノプローブを用い

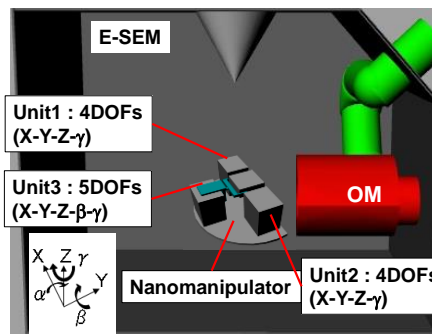


図3 ハイブリッド顕微鏡内でのナノマニピュレーションシステム

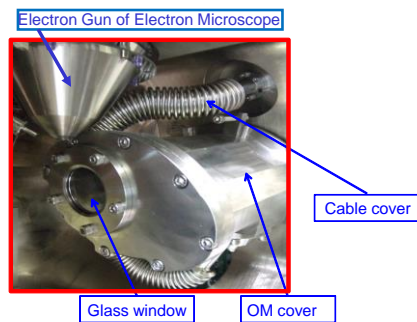


図4 ハイブリッド顕微鏡システム

た単一細胞の局所硬さ計測による細胞活性評価、ナノフォークを用いた単一細胞・基板間の付着力評価、デュアル・ナノプローブを用いた細胞内部の電位計測による生死判別評価などの様々な新たなナノバイオ応用技術を構築してきた。

そこで、本研究では、本システムを発展させ、細胞の診断、切除・取り出し、挿入、埋め込みを実現するナノサージェリツールを利用したナノサージェリシステムを構築する。また、生物を用いたバイオセンシング技術を実現するために、モデル生物である線虫をマイクロチップ内で局所的に環境制御下することで重金属といった環境物質の検出のためのバイオインジケータデバイスを提案し、基礎的な新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、これまで構築してきた環境制御型電子顕微鏡に光学顕微鏡を組み込んだハイブリッド顕微鏡を新たに提案した。図3及び図4に本研究で構築したハイブリッド顕微鏡システムを示す。環境制御型電子顕微鏡の電子銃に直行する方向に、光学顕微鏡を設置した。これにより、電子顕微鏡では得ることが出来ない、試料の高さ方向の情報を得ることができる。本構造を実現するために、電子顕微鏡の試料室のポートから、光学顕微鏡用のカバー及びケーブルを通すための筐体を取り付けた。また、筐体の一部にガラス窓を設け、これを通して、光学顕微鏡により試料を観察することができる。また、光学フィルタを設置することで、明視野像に加えて、蛍光像を撮影することが可能である。

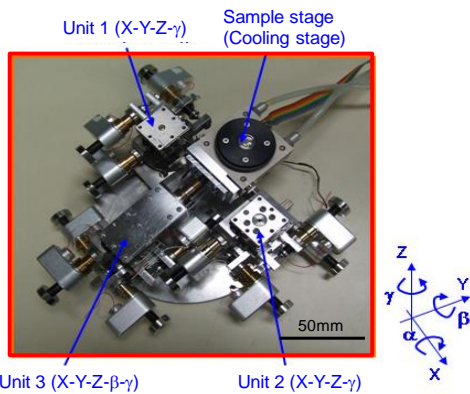


図5 ハイブリッド顕微鏡内ナノマニピュレータ

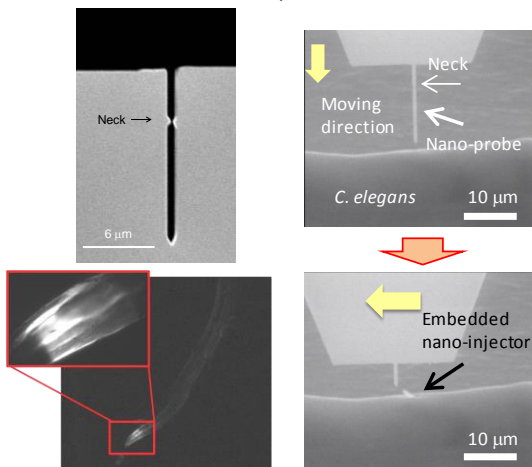


図6 ハイブリッド顕微鏡内ナノマニピュレータによるナノインジェクション実験

4. 研究成果

本研究の主な成果として、代表的な結果について述べる。

4-1 ハイブリッド顕微鏡下でのナノマニピュレーションシステムとモデル生物へのナノインジェクション応用

図5に本研究で構築した、ハイブリッド顕微鏡内でのナノマニピュレーションシステムを示す。合計で7自由度、3ユニットにて構成することで、多自由度・多ユニットによる自在なナノマニピュレーションを実現した。

本システムを用いてモデル生物である線虫へのナノインジェクションを行った。図6にハイブリッド顕微鏡内ナノマニピュレータによるナノインジェクション実験結果を示す。ナノプローブは、シリコン材料を集束イオンビーム加工(Focused Ion Beam: FIB)により加工した。ナノプローブの先端部は、対象物に挿入しやすいように、鋭利な形状とした。また、ナノプローブの一部に、ネックとなる幅が小さい部分を設けることで、対象物に挿入後、ネック部で切断し、ナノプローブを対象物内に挿入する状態を保つことできる。この際、ナノプローブをインジェクシ

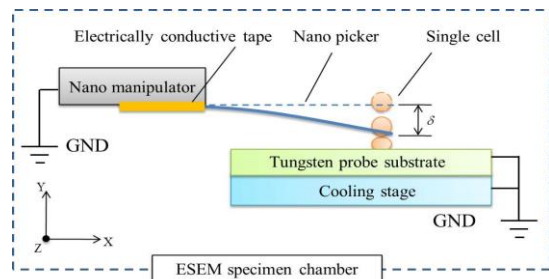


図7 ナノピッカーを用いた単一細胞-細胞間付着力計測実験

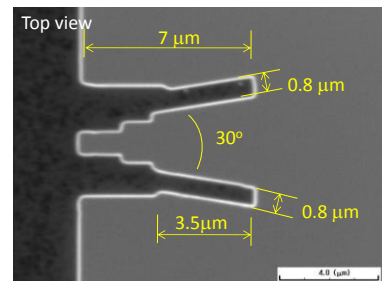


図8 作製したナノピッカー

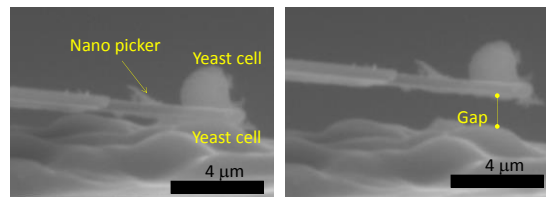


図9 ナノピッカーを用いた単一細胞間の付着力計測実験

ンする物質で予めコーティングすることで、対象物内へのインジェクションを達成することができる。図6に示すように、本研究では、蛍光物質をコーティングしたナノプローブを、線虫内部に挿入し、ナノプローブを切断することで、線虫の局所に蛍光物質を導入することが出来ることを確認した。

4-2 ナノピッカーによる単一細胞間の付着力計測

我々は、単一細胞レベルでの局所的な操作・計測を行うための新たなナノツールとして、ナノピッカーによる単一細胞間の付着力計測を行った。本手法の実験模式図を図7に示す。重なり合った単一細胞間にナノピッカーをナノマニピュレーションにより挿入し、そこから上方向に移動させることで、上部の単一細胞を持ち上げる。この際に、上部と下部の単一細胞間の付着力を、シリコンカンチレバーの変形量から計測する手法である。

実際に作製したナノピッカーを図8に示す。シリコンカンチレバー先端部に、FIB加工により作製した。環境制御型電子顕微鏡内ナノマニピュレーションシステムを用いて、ナノピッカーによる単一細胞間の付着力計測実験の環境制御型電子顕微鏡像を図9示す。本

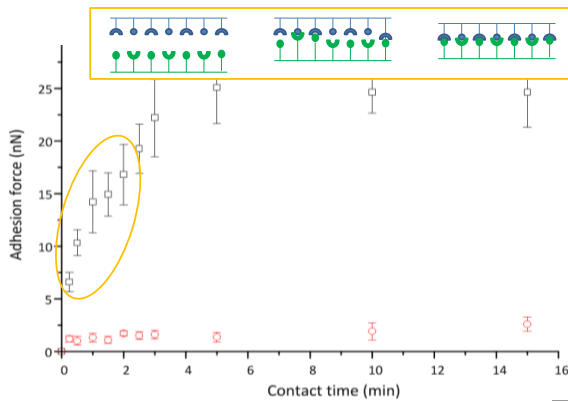


図 10 ナノピッカーによる単一細胞—細胞間の付着力計測結果

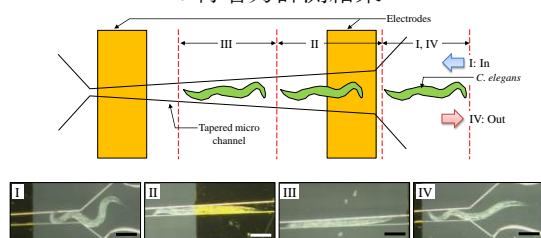


図 11 バイオインジケータのためのマイクロ流路内での単一線虫の静電容量計測実験

研究では、細胞としてイースト菌を用いた。細胞のサイズは、直径が約 2~3 マイクロメートルである。図 10 にナノピッカーによる単一細胞間の付着力の計測結果を示す。以上により、ナノピッカーを用いて、単一細胞間の動的な付着力を計測することが出来た。

4-3 マイクロ流体チップによる線虫を利用したバイオインジケータデバイス

本研究では、モデル生物である線虫を利用したバイオインジケータデバイスを提案した。線虫は、さまざまな環境要因に応じて、代謝などの影響から、成長速度など様々な影響を受けることが知られている。本研究では、重金属を含む溶液中で線虫を培養し、重金属による線虫の成長サイズを検出することで、溶液中の重金属をインジケートするバイオインジケータを構築した。

図 11 に提案したバイオインジケータのためのマイクロ流路内での単一線虫の静電容量計測方法と実験の様子を示す。マイクロ流路内に線虫を培養し、計測用チャンネル内に閉じ込めて静電容量変化を計測することで、選択的に単一の線虫のサイズを検出するデバイスを作製した。図 11 では、テーパ形状を有したマイクロ流路を用いることで、線虫をマイクロ流路内部に固定する構造とした。

多チャンネル型マイクロ流体チップによる複数溶液用バイオインジケータデバイスを提案した。本多チャンネル型マイクロ流体チップの構成を図 12(a)に示す。本研究では、異なる 3 種類の溶液を同時に導入し、中央部の計測部に対して、左右に設置したチャンバー内部で線虫を培養することが可能なデバイスを設計した。それぞれのチャンバーに対

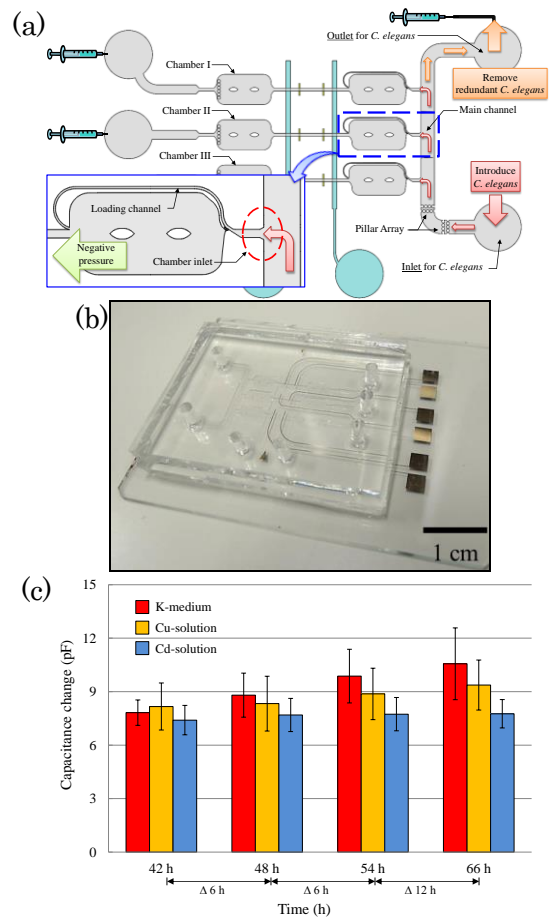


図 12 多チャンネル型マイクロ流体チップによる複数溶液用バイオインジケータデバイス、(a)マイクロ流体チップの構成、(b)マイクロ流体チップの外観、(c)マイクロ流体チップによる複数溶液中で培養した線虫の静電容量計測結果

して計測用電極を設け、複数溶液中の線虫のサイズを同時に計測することができる。また、線虫をローディングするためのチャンネルを設計し、そのチャンネルの形状により、チャンバー内に導入した線虫をチャンバー内部にとどめる設計とした。実際に作製した多チャンネル型マイクロ流体チップの外観写真を図 12(b)に示す。

提案した多チャンネル型マイクロ流体チップによる溶液として、①通常培地、②銅を含む重金属溶液、③カドミウムを含む重金属溶液を導入して線虫を培養し、培養時間に応じて静電容量計測を行った。計測結果を図 12(c)に示す。線虫の代謝などの影響に応じて、銅を含む重金属溶液よりもカドミウムを含む重金属溶液で培養した線虫の方が、静電容量変化の減少量が多いことを確認した。したがって、培養する重金属溶液に応じて、線虫の成長速度が低下し、線虫のサイズを静電容量変化から検出するバイオインジケータデバイスの基礎特性が得られた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12件)

[1] Jaehoon Jung, Masahiro Nakajima, Masaru Takeuchi, Qiang Huang, Toshio Fukuda, A microfluidic device with multi valves system to enable simultaneous several exposure tests on *Caenorhabditis elegans*, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, Vol. 24, No. 3, p. 035012, 2014. 査読有

[2] Jaehoon Jung, Masahiro Nakajima, Hirotaka Tajima, Toshio Fukuda, Microfluidic device for the continuous culture and analysis of *Caenorhabditis elegans* in a toxic aqueous environment, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, Vol. 23, p. 085008, 8 pages, 2013. 査読有

[3] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Zhan Yang, Hirotaka Tajima, Zoran Najdovski, Michio Homma, Toshio Fukuda, Single cell stiffness measurement at various humidity conditions by nanomanipulation of a nano-needle, *Nanotechnology*, Vol. 24, Number 14, p. 145703, 2013. 査読有

[4] Mohd Ridzuan Ahmad, Masahiro Nakajima, Masaru Kojima, Seiji Kojima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Instantaneous and Quantitative Single Cells Viability Determination Using Dual Nanoprobe Inside ESEM, *IEEE Transactions on Nanotechnology*, Vol. 11, No. 2, pp. 298-306, 2012. 査読有

[5] Mohd Ridzuan Ahmad, Masahiro Nakajima, Masaru Kojima, Seiji Kojima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Nanofork for Single Cells Adhesion Measurement via ESEM-Nanomanipulator System, *IEEE Transactions on Nanobioscience*, Vol. 11, No. 1, pp. 70-78, 2012. 査読有

[6] Jaehoon Jung, Masahiro Nakajima, Masaru Kojima, Katsutoshi Ooe, Toshio Fukuda, Microchip device for measurement of body volume of *C. elegans* as bioindicator application, *Journal of Micro - Nano Mechatronics*, Vol. 7, pp. 3-11, 2012. 査読有

[7] Yajing Shen, Mohd Ridzuan Ahmad, Masahiro Nakajima, Seiji Kojima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Evaluation of the single yeast cell's adhesion to ITO substrates with various surface energies via ESEM nanorobotic manipulation system, *IEEE Transactions on Nanobioscience*, Vol. 10, No. 4, pp. 217-224, 2011. 査読有

[8] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Seiji Kojima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Study of the time effect on the strength of cell-cell adhesion force by a novel

nano-picker, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Vol. 409, No. 2, pp. 160-165, 2011. 査読有

[9] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Seiji Kojima, Michio Homma, Masaru Kojima, Toshio Fukuda, Single cell adhesion force measurement for cell viability identification by using AFM cantilever based micro puffer, *Measurement science and technology*, Vol. 22, No. 11, p. 115802, 2011. 査読有

[10] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Zhan Yang, Seiji Kojima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Design and characterization of nanoknife with buffering beam for in situ single cell cutting, *Nanotechnology*, Vol. 22, No. 30, 305701, 2011. 査読有

[11] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Mohd Ridzuan Ahmad, Seiji Kojima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Effect of ambient humidity on the strength of the adhesion force of single yeast cell inside environmental-SEM, *Ultramicroscopy*, Vol. 111, No. 8, pp. 1176-1183, 2011. 査読有

[12] Mohd Ridzuan Ahmad, Masahiro Nakajima, Seiji Kojima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Buckling Nanoneedle for Characterizing Single Cells Mechanics inside Environmental SEM, *IEEE Transactions on Nanotechnology*, Vol. 10 Issue 2, pp. 226-236, 2011. 査読有

[学会発表] (計15件)

[1] Jaehoon Jung, Masahiro Nakajima, Masaru Takeuchi, Qiang Huang, Toshio Fukuda, Microfluidic device for Coincident Multi-exposure test on *C. elegans*, *Proceedings 2013 International Symposium on Micromechanics and Human Science*, pp. 60-63, 2013. 査読有

[2] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Zhan Yang, Qiang Huang, Toshio Fukuda, Real-Time Measurement of the Adhesion Force by Hybrid System of ESEM and AFM Cantilever, *Proceedings 13th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE-Nano 2013)*, pp. 325-328, 2013. 査読有

[3] Jaehoon Jung, Masahiro Nakajima, Hirotaka Tajima, Toshio Fukuda, Micro Fluidic Device to Analyze the Effect of Cadmium on *Caenorhabditis elegans*, *Proceedings of the 2012 International Symposium on Micromechanics and Human Science (MHS 2012)*, pp. 262-267, 2012. 査読有

[4] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Masaru Kojima, Toshio Fukuda, Auto Nanomanipulation System for Single Cell Mechanical Property Characterization inside an Environmental SEM, *Proceedings*

of the 2012 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robotics and Systems (IROS 2012), pp. 646-651, 2012. 査読有

[5] Jaehoon Jung, Masahiro Nakajima, Masaru Kojima, Hirotaka Tajima, Toshio Fukuda, Micro Fluidic Device to Control the Position and to Analyze the Condition of *C. elegans* as a Bioindicator, Proceedings of the 2012 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robotics and Systems (IROS 2012), pp. 932-937, 2012. 査読有

[6] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Zhan Yang, Michio Homma, Toshio Fukuda, Nano Needle with Buffering Beam for Single Cell Stiffness Measurement by Nanorobotic Manipulators inside ESEM, Proceedings of the 2012 12th IEEE Conference on Nanotechnology (IEEE-Nano 2012), 4 pages, 1-4, 2012. 査読有

[7] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Tao Yue, Seiji Kojima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Development of the Auto Manipulation System towards the Single Cell Automatic Analysis inside an Environmental SEM, Proceedings of the 2012 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA 2012), pp. 4594-4599, 2012. 査読有

[8] Takahiro Hirano, Masahiro Nakajima, Masaru Kojima, Naoki Hisamoto, Michio Homma, Toshio Fukuda, Selective Nano-injection using Nano-Probe based on Nanomanipulation under Hybrid Microscope Proceedings of the 2011 International Symposium on Micromechatronics and Human Science (MHS 2011), pp. 216-221, 2011. 査読有

[9] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Zoran Najdovski, Zhan Yang, Masaru Kojima, Seiji Kojima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Method to Study the Single Cell's Time-variation Adhesion Strength during the Manipulation inside ESEM, Proceedings of the 2011 International Symposium on Micromechatronics and Human Science (MHS 2011), pp. 210-215, 2011. 査読有

[10] Jaehoon Jung, Masahiro Nakajima, Masaru Kojima, Toshio Fukuda, Measurement of Body Volume of Live *C. elegans* by Microchip, Proceedings of the 2011 International Symposium on Micromechatronics and Human Science (MHS 2011), pp. 204-209, 2011. 査読有

[11] Jaehoon Jung, Masahiro Nakajima, Masaru Kojima, Toshio Fukuda, Microchip Analysis Device for Fixed *Caenorhabditis elegans* by Tapered Micro channel, Proceedings of the SICE Annual Conference 2011, pp. 2421-2426, 2011. 査読有

[12] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Zhang Yang, Seiji Kojima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Masaru Kojima, Evaluation of Nano-Knife's Edge Angle for Single Cell Cutting by Using Nanorobotic Manipulators Inside ESEM, Proceedings of the 2011 11th IEEE Conf. on Nanotechnology (IEEE-Nano 2011), Vol. 1, pp. 155-160, 2011. 査読有

[13] Masahiro Nakajima, Takanori Hirano, Masaru Kojima, Naoki Hisamoto, Michio Homma, Toshio Fukuda, Direct Nano-injection Method by Nanoprobe Insertion based on E-SEM Nanorobotic Manipulation under Hybrid Microscope, Proceedings of the 2011 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA 2011), pp. 4139-4144, 2011. 査読有

[14] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Seiji Kojima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Characterization of Oscillating Nano Knife for Single Cell Cutting by Nanorobotic Manipulation System inside ESEM, Proceedings of the 2011 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA 2011), pp. 4133-4138, 2011. 査読有

[15] Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Seiji Kojima, Michio Homma, Toshio Fukuda, Measurement for Viability Identification using Nanorobotic Manipulation System inside ESEM, Proceedings of 2011 IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS 2011), pp. 944-947, 2011. 査読有

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 微生物の電気化学的特性の解析用マイクロチップデバイス

発明者: 福田敏男, 中島正博, 小嶋勝

出願人: 福田敏男, 中島正博, 小嶋勝

出願番号: 特願 2011-231134

出願日: 2011 年 9 月 16 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mein.nagoya-u.ac.jp/index.j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 敏男 (FUKUDA TOSHIO)

名城大学・理工学部・教授

研究者番号: 70156785

(2) 研究分担者

中島 正博 (NAKAJIMA MASAHIRO)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号: 80377837

(3) 連携研究者

なし