

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23656179

研究課題名（和文）オンデマンド型導電性ナノワイヤ構築と細胞インターフェースへの応用

研究課題名（英文）On-demand wiring of electro conductive nano wire toward cell interface

研究代表者

星野隆行 (HOSHINO TAKAYUKI)

東京農工大学・大学院生物システム応用科学府・特任助教

研究者番号：00516049

研究成果の概要（和文）：

バイオ環境中で電子線描画により導電性立体ナノ構造を「その場」構築し、細胞インターフェースとして応用するナノ加工技術の開発である。このようなオンデマンド型のインターフェースにより、細胞ネットワークへ分子レベルで接続できる情報入出力ネットワークを構築することを目指している。

研究成果の概要（英文）：

An electron-beam induced fabrication was carried out for a cellular interface. An electric conductive three-dimensional nano structure was directly patterned to be utilized for a cellular electrode. We expect this technique would construct on-demand type cellular interface to connect the bio molecule of living cells to a monitoring system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：ナノテクノロジー

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：マイクロ・ナノメカトロニクス

1. 研究開始当初の背景

細胞を解析する方法論では、電気的計測と電気刺激を入出力するインターフェースを細胞に対して構築する方法が広く用いられている。インターフェースを細胞に接続し、生体の運動や情報処理を工学的デバイスと融合させ生体の機能を増強することや、反対に機械システムに生物機能を融合させる試みはサイボーグ工学として研究されている。

従来から神経ネットワークの解析には、超微細加工技術を用いてアレイ状に作製した透明なマイクロ電極上に細胞を培養する技術が用いられている。しかしながら、微細で多数の電極がアレイ状に並んでいるものの、電極の間隔や配置は電極作製段階であらかじめ決めた位置にしかなく、培養した細胞の位置にあわせた電極の配置はできない。したがって、電極に周囲に培養した細胞ネットワークが付着せず、まったく計測ができない電

極が生じる問題点がある。

このような問題に対する解決策として、培養後に計測点を設定できるオンデマンド型の電極インターフェースが考えられる。化学物質を含有したケージド化合物へのレーザー 2 光子吸収による化合物放出を原理とした刺激方法や、遺伝子工学的に発現させた光感受性受容器への光刺激を用いた行動制御実験が行われている。また光励起による培養基板の導電特性を任意に変化させ、光照射位置に電極を任意の場所に生成させる研究が報告されている。これらの光学プローブによるインターフェースは、分解能と照射可能範囲が細胞器レベルから個体の行動レベルのスケールであるが、より小さい分子レベルからカバーする方法にはプローブサイズの限界が存在する。細胞膜を構成する分子レベルのシステム応答は生物の働きの本質を知る上での重要な現象である。

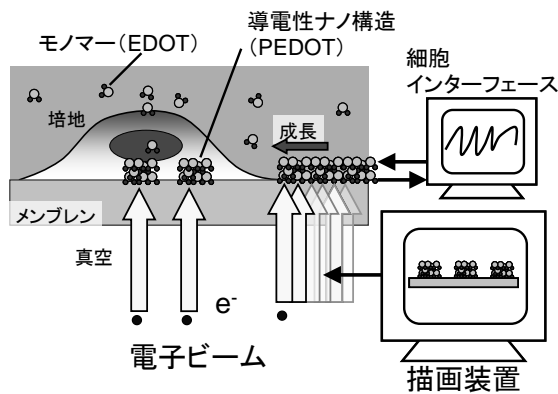


図1 導電性高分子による細胞インターフェース構築. 電子線照射により導電性高分子を堆積させ, 任意の時刻と場所に細胞に対するインターフェースを構築する.

2. 研究の目的

そこで, これまで我々が報告してきた生きた細胞に対するナノ造形法を応用し, 導電性のナノ配線を任意に構築し, 細胞に接続するインターフェースを構築することが可能であることを提案し報告する. これまで我々は電子線を生きたままの細胞に直接電子線を照射し, 培養液中に溶解させた前駆物質 (EDOT) を電解重合させれナノパターンを構築することに成功している. この電子線を用いて, 任意の時刻に任意の部位に導電性立体ナノ構造体を造形し, 細胞小器官への電気的プローブを構築することを提案した (図1). 本報告では, 生体適合性のある導電性材料と加工条件を明らかにし, 任意に作製できるオンデマンド型細胞ナノインターフェースの構築システムについて報告する.

3. 研究の方法

導電性材料はその導電性と生体適合性を考慮して選定した. 導電性材料は有機半導体や太陽電池の研究において広く使われているが, 生体の活性を阻害せず培養環境に適合する材料は限られる. また, 導電性材料とともに前駆物質にもと生体適合性があることが必要条件である. オンデマンド型のインターフェースを構築する際には, 培養液に溶解した前駆物質から電子線によるエネルギーで析出, 堆積させる必要があるからである.

表1 導電性材料

Electro conductive materials	Precursor materials	Concentration for deposition	pH	Biocompatibility
PEDOT	3,4-ethylenedioxythiophene	10-20 mM [12-14]	neutral	High (>10 mM)
Au	Na(AuCl) 2H ₂ O	100 mM [10]	acescence	Low (<0.1 mM) [9]
Pt	H ₂ (PtCl) 6H ₂ O	~20 mM (= 1 wt%) [14]	acid	Low (<0.1 mM) [9]

表1に水溶液中で電析する導電性材料の一例をあげる. 近年, 導電性高分子の研究が盛

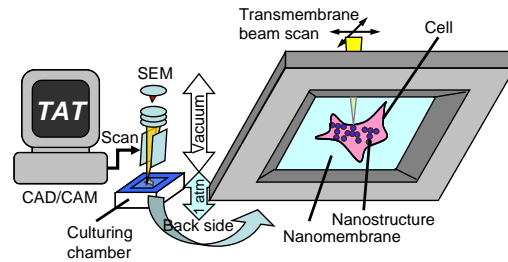


図2 培養液中の細胞への電子線描画システム. 厚さ100 nmのSiN薄膜を透して低加速電子線が培養環境に照射される.

んに行われており, 3,4-ethylenedioxythiophene (EDOT) や pyrrole などの高分子による電極作製が報告されている. このなかでもEDOTは導電性が高いことが知られている. 一方で, AuやPtは導電性は高いが, 前駆物質の金属イオンが毒性をもち, 通常電析に使用する濃度の1/100の量でも50%生存濃度を超えることが報告されている. また金属構造体は光に不透明な性質を持つため, 導電性において多少劣る導電性高分子のほうが透明であり培養細胞観察のうえで優れている. 以上のことから, 本研究ではEDOTを前駆物質として用い, 電子線のエネルギーによる導電性ナノ構造体を構築する,

本研究では生きたままの細胞に直接電極インターフェースをオンデマンドでナノ加工する. 電子線は水中において運動エネルギーを消費しながらナノ空間内に化学反応場を励起する. この電子線励起の原理を用い分子レベルの導電性立体ナノ構造構築を行う.

ナノ加工を行うにあたって電子線直接描画を細胞に対して行う必要があり, 高真空を必要とする電子線と大気圧・水中の培養環境を接続させる必要がある. そのために, 厚み100 nmの窒化シリコンの薄膜を高真空と水中環境の間にはさみ, 気圧差の隔壁および電子線が透過する窓として利用する. (図2) このような窒化シリコン薄膜越しの電子線照射は, 従来ウェット環境の細胞観察に用いられる技術として広くもちいられているものである. しかしながら, 従来までの研究では細胞観察のために固定化した細胞 (死細胞) を重金属で抗体染色しているので生きた状態で照射・観察した報告は少ない. また, 加速した電子線の生じるラジカルによりタンパク質分子が破壊されるためモータタンパク質の運動などの観察だけにとどまり, 電子線で加工するという報告はない.

ラジカルによるダメージの問題は, 照射する電子線を低加速化して, さらに窒化シリコン薄膜中で1次電子を減速させることで解決する. 1次電子が窒化シリコン薄膜内で停止させ細胞近傍でのラジカルや2次電子の

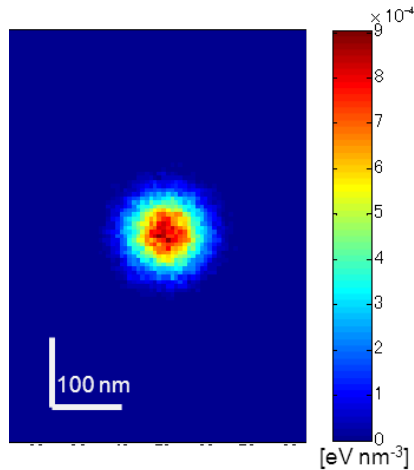


図3 透過電子線の吸収エネルギー分布. 厚さ100 nmのSiN薄膜を透過して水中に2.5 keVの電子線が照射されたときのシミュレーション結果(縦断面). 吸収エネルギーは対数表示.

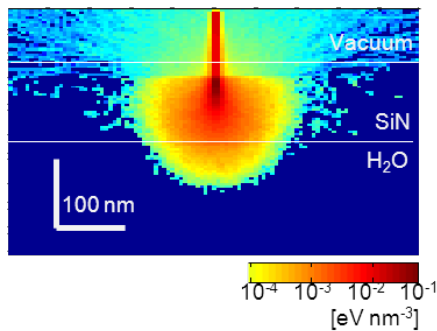


図4 SiN薄膜と水との界面における吸収エネルギー分布.

発生を抑制できる. 電子線が流れ込むときのビーム電流により電気化学反応だけを励起させることが期待できる. 先に我々が報告した結果において, 低加速な電子線は細胞膜を損傷させない照射条件があることを示している. (T. Hoshino, *Appl. Phys. Lett.* **99**, 174102, 2011)

4. 研究成果

4.1. 電子線照射シミュレーション

電子線照射時に試料がうける損傷を予測するために試料の吸収エネルギーをモンテカルロシミュレーションで評価した. シミュレーションモデルとして, それぞれの厚さが100 nmの真空層とSiN薄膜を液体状態の水に重ねた3層構造の試料を設定し, 直径10 nm, 2.5 keVの電子線を真空層側から垂直に照射したときの試料の吸収エネルギーを評価した. 電子線の散乱過程はモンテカルロシミュレーション(CASINO)を用い計算した.

図3および図4に示すように2.5 keVの低

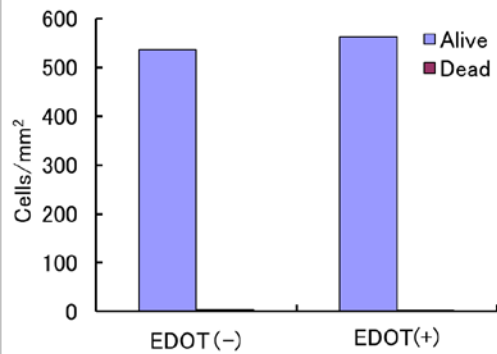


図5 EDOTの生体適合性評価. EDOTを20 mM溶解させた培養液で1時間培養したあとの生細胞と死細胞を計数した.

加速電子線の大部分のエネルギーはSiN薄膜内で吸収され, 水との界面に作用するエネルギーは非常に低いことがわかる. 1 nm^3 の試料が受けるエネルギーは 10^{-3} eV 程度であり, これは水素結合の平均的エネルギー0.13-0.3 eVを下回る. したがって, タンパク質などの水素結合には重篤な損傷を与えず, ナノ領域において熱ゆらぎと同様な効果が制御できることが期待できる. 導電性材料の前駆物質をこのエネルギーで堆積, 加工できれば, 細胞膜の機能に損傷を与えずに細胞膜機能を直接操作できるインターフェースが「その場」で構築できることを示している.

4.2. 導電性材料の生体適合性評価

導電性材料の前駆物質であるEDOTの生体適合性を評価した. 生体適合性評価には筋芽細胞株C2C12 (Riken Cell Bank)をもちい, 24-wellプレートに分散培養して, EDOTを10 mM含有した培養液と, 参照群として含有しない培養液にそれぞれ1時間暴露した. それぞれの死細胞, 生細胞を計数し比較した. 培養液は, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)に10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1%抗生物質が含まれるものを使用した. 細胞の生死判定には蛍光色素Calcein-AMとPIの2重染色を用い, 蛍光顕微鏡像からそれぞれにラベルされた細胞数を計数した.

図5はEDOTに暴露したC2C12細胞の生死細胞数を比較したものである. 生細胞, 死細胞ともに対照群と同じ結果が得られ, 10 mMの濃度のEDOTに対する急性の毒性は認められなかった. 長時間暴露した場合の影響はまだ不明であるが, インターフェースを構築する短時間程度であれば毒性の問題はなく, 培養可能である.

4.3. EDOTの電子線描画

電子顕微鏡(Keyence, VE-8800)を電子源として用い, 厚さ100 nmのSiN薄膜を透し

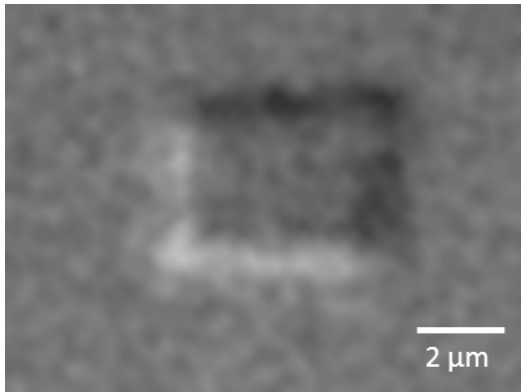


図6 前駆物質 EDOT の堆積パターン

て 2.5 keV の電子線を $5.7 \text{ pA } \mu\text{m}^{-2}$ の電流密度でスキャン照射し、矩形のパターンを作製した。描画用の溶液として基礎培地として DMEM をもちい、20 mM の EDOT、10% FBS、1% 非必須アミノ酸を含有させたものをもちいた。

図6に電子線を走査させることで導電性材料の矩形パターンを SiN 薄膜上に作製した結果を示す。透過するエネルギーの大部分が SiN 薄膜内で散乱・吸収されて一部水溶液中まで透過して、堆積パターンを形成できたと考えられる。堆積量は照射量と加速電圧の関数となっており、電子線の吸収エネルギーによるものであることを示している。

また、大腸菌が遊泳している環境においてパターンニングを行い大腸菌の捕捉を試みた。図7は矩形パターンに堆積した EDOT の中に大腸菌が捕捉されたことがわかる。このように電子線のスキャンエリアにあるものを堆積物で捕捉・固定することができ、また熱ゆらぎ程度のエネルギーによるパターンニングなどで生体分子にも重篤な損傷を与えずに操作できることが期待できる。

導電性パターンの電気伝導性を計測した。図8に堆積パターンのインピーダンスを示す。細胞膜の活動電位を計測する帯域である 1 kHz 近傍での電気伝導率は電気伝導率： 0.033 S m^{-1} であり、標準的な導電性高分子である PDOT/PSS の 100 S m^{-1} に比べると電気伝導率はよくないことがわかる。これはドーブ材料である PSS を本実験では使用していないことが原因と考えられる。今後ドーブ材料などを含めた検討が必要である。

導電性パターンニングを「その場」で行い、任意の場所と時間に細胞や生体分子に直接インターフェースを構築する手法を提案した。電子線照射による培養液中の導電性高分子 EDOT の堆積が、材料の生体適合性と吸収エネルギーの面から利点があることを述べ、実際に EDOT を用いて矩形のパターンニングで実証した。堆積物のパターンニングにより遊泳する大腸菌を細くすることが可能であること

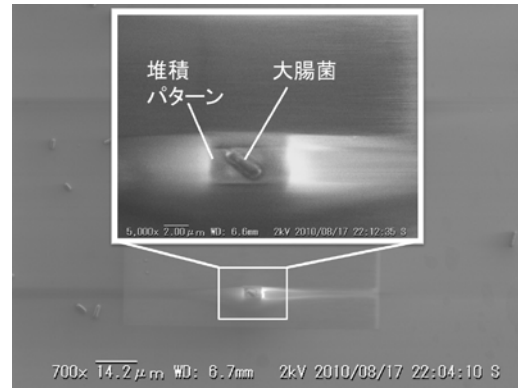


図7 描画した堆積パターンに捕捉された大腸菌。

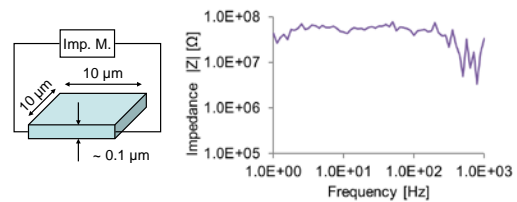


図8 造形したパターンの導電性評価結果

を示し、マイクロ、ナノ領域での新しいインターフェース構築と操作手法の可能性を示した。

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1件)

[1] Takayuki Hoshino, Keisuke Morishima, "Electron-Beam Direct Processing on Living Cell Membrane", *Applied Physics Letters*, **99**, pp.174102, (2011) 査読あり。

[学会発表] (計6件)

[1] Takayuki Hoshino, Keisuke Morishima, "Closed-looped Nano Stimulation Microscope for Living Cell Membrane", *Proc. 2012 7th IEEE International Conference on Nano/MicroEngineering and Molecular Systems (NEMS 2012)*, **T4C-6**, pp. 117-120, Kyoto (Japan), (March 5-8, 2012) (Oral).

[2] 星野隆行, 森島圭祐, "Electron-Beam Direct Processing on Living Cell Membrane Toward Ultra High-speed Molecular Manipulation", *細胞を創る研究会 4.0*, P-63, pp.137, 千里ライフサイエンスセンター(大阪), 2011.10.24-18.

[3] 星野隆行, 森島圭祐, "水溶液中の電子線

励起反応を用いたナノ空間の細胞膜の機能制御”, 日本機械学会第 3 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム講演論文集, 2-5, 船堀(東京), 2011.9.26.

[4] **星野隆行**, 森島圭祐, “水溶液中の電子線励起堆積およびアブレーションによる生細胞への電子線直接描画 (第2報) -低加速電子線励起による細胞培養液中の堆積反応-”, 第 72 回応用物理学会学術講演会, 山形大学(山形), 1a-V-12, 2011.9.1.

[5] **星野隆行**, 森島圭祐, “電子線励起作用による細胞膜上のナノパターン生成と生体分子操作にむけた応用 (On Cell Membrane Nano Patterning Using Electron-Beam Induced Chemical Reaction Toward Single Bio Molecule Manipulation)”, 第 49 回日本生物物理学会年会, 兵庫県立大学(姫路), 1J1348, 2011.9.16.

[6] **星野隆行**, 森島圭祐, “液相中の電子線励起化学成長法による細胞膜のナノ加工と導電性細胞インターフェースへの応用”, 第 29 回日本ロボット学会学術講演会論文集, 芝浦工業大学(東京), 1D3-2, 2011.9.7.

[その他]

ホームページ等

<http://space.geocities.jp/takahoshino/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 隆行 (HOSHINO TAKAYUKI)

東京農工大学・大学院生物システム応用科学府・特任助教

研究者番号 : 00516049

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし