

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24240070

研究課題名(和文)細胞機能イメージングを実現する多機能走査型バイオプローブ顕微鏡の開発

研究課題名(英文)Development of Multi-functional Biological Scanning Probe Microscope for Imaging of Cellular Functions in Living Cells

研究代表者

柴田 隆行 (SHIBATA, TAKAYUKI)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10235575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,400,000円

研究成果の概要(和文)：培養環境を維持したまま生きた細胞の機能発現過程を時空間的に可視化(細胞機能イメージング)するためのキーデバイスとして“ナノニードル搭載型バイオプローブ”の開発を行った。作製したバイオプローブの基本性能の評価として、液中での生細胞(HeLa細胞)のAFM計測が可能であることを示した。また、先鋭化ナノニードルによる細胞膜への穿孔が可能であり、振動援用によって穿孔確率が向上することを明らかとした。さらに、電場駆動力を利用した微小流体制御技術を提案し、新規な細胞内デリバリー技術としての可能性を示した。加えて、倒立顕微鏡組込み型ラマン分光光学系を構築し、細胞内の生体分子イメージングの可能性を実証した。

研究成果の概要(英文)：In order to achieve spatial and temporal imaging of cellular functions in single living cells, we have developed a newly designed probe for atomic force microscope (AFM), named “bioprobe. As a fundamental study of conventional AFM functions, we demonstrated the ability of the bioprobe to capture AFM images of living cells. We proposed a vibration-assisted insertion method to give a high degree of probability of penetrating the cell membrane. We also proposed a novel intracellular delivery method based on electrokinetically driven flow. The method has the potential to enable the quantitative introduction of biomolecules and the extraction of an extremely small number of biomolecules or cellular components. Moreover, a study of the feasibility of intracellular imaging based on tip-enhanced Raman scattering (TERS) was performed with a homemade Raman system. The result will allow us to add TERS functionality to the bioprobe for the dynamic functional analysis of living cells.

研究分野：MEMS, マイクロ・ナノマシニング

キーワード：走査型プローブ顕微鏡 原子間力顕微鏡 (AFM) 細胞機能解析 細胞操作 細胞内デリバリー チップ
増強ラマン分光 (TERS) バイオMEMS

1. 研究開始当初の背景

「健康・安心な理想社会」の実現には、生命科学の新たな知を創出し、医療・医薬分野のイノベーションへと進化・発展させることが極めて重要な課題である。このためには、生命の本質、すなわち「システムとしての生命」の理解が不可欠であり、ゲノム、タンパク質、糖鎖などの生体分子の構造・機能解明に加えて、生命活動の基本単位である細胞の機能を解き明かすことが、ライフ・イノベーション創出の命題となる。このためには、①培養環境を維持したまま生きた細胞の機能発現過程を時間的・空間的に可視化する先端計測・分析技術の確立ならびに②外部刺激（環境因子）による細胞機能制御因子の高効率探索を高度に支援する革新的な技術の確立が極めて重要な課題となる。

2. 研究の目的

本研究では、生命機能機序の新たな知の創出を支援するキーテクノロジーとして、細胞の機能発現過程における様々な生体機能情報（物理量・化学量）を空間的・時間的に可視化（細胞機能イメージング）する多機能走査型バイオプローブ顕微鏡の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本提案のキーデバイスとなるナノニードル搭載型バイオプローブの開発を行った。本プローブの最大の特徴は、原子間力顕微鏡（AFM）で使用される通常の探針（中実の針状構造体）のかわりに、中空構造を有するSiO₂製の先鋭化ナノニードル（先端径<50nm）がSi製カンチレバー先端に一体形成されていることである。さらに、カンチレバー内部に形成したマイクロ流路と連通させることで、微小流体のハンドリングが可能な構造となっている。このため、本提案のバイオプローブは、①AFMのもつ多彩な機能（形状観察・物性評価機能）に加えて、②単一細胞への高精度な生体分子の注入や③細胞内で発現した極微量物質の採取を可能とする新機能（細胞内外デリバリー技術）を備え、かつ④高感度チップ増強ラマン散乱イメージングを同一の空間・時間領域で実現し得る先端計測・分析技術である。本研究では、バイオプローブの作製技術を確認し、提案技術の基礎的検討を行い、その有用性を実証した。

4. 研究成果

(1) ナノニードル搭載型バイオプローブ

図1に提案するナノニードル搭載型バイオプローブの概要を示す。本プローブの最大の特徴は、原子間力顕微鏡（AFM）のシリコン（Si）製のカンチレバー先端に形成される通常の探針（先端が鋭利な針状の構造）のかわりに、中空構造を有する酸化シリコン（SiO₂）製の先鋭化ナノニードル（先端径<50nm）が一体形成されていることである。このため、

①AFM計測・物性評価機能に加えて、Siカンチレバー内部に形成するマイクロ流路（直径10μm程度）と連通させることで、細胞に穿刺したニードルを介し、②生体分子（DNA, mRNA, タンパク質など）の高精度な注入（生化学的刺激付与）や③細胞内で発現した極微量の物質（tRNA, タンパク質など）の採取（生化学的応答計測）が可能となる。

図2に作製したバイオプローブの一例を示す。Siカンチレバー（長さ651μm、幅40μm、厚さ19μm）の先端部にSiO₂ナノニードル（根元外径3μm、全長67μm、突出部長さ29μm、先端径<50nm）が形成されている。また、ニードルに十分な機械強度をもたせるために、根元部分にSi構造体（幅105μm、高さ38μm）を位置選択的に形成している。さらに、Siカンチレバー内部には、幅3μm、深さ10μmのマイクロ流路が形成されており、厚さ0.9μmのSiO₂膜で密閉している。最終的には、集束イオンビーム（FIB）加工を用いて、ニードル先端部を斜めにカットすることで、曲率半径を50nm以下に保ちつつ、直径500nm程度の開口部を形成する。この提案プロセスによって、高精度かつ再現性よくバイオプローブの作製が可能となった。

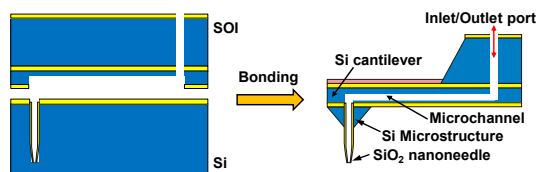


図1 ナノニードル搭載型バイオプローブの模式図

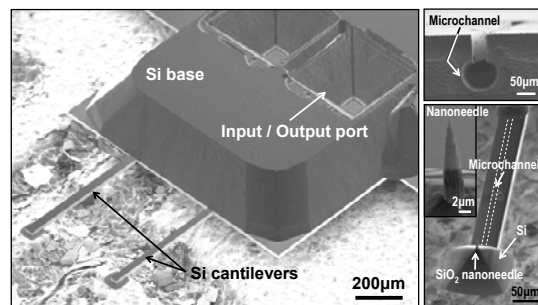


図2 ナノニードル搭載型バイオプローブの作製例

(2) バイオプローブの基本性能評価

ガラス基板に接着させたHeLa細胞（ヒト子宮頸癌由来細胞株）の液中（リン酸緩衝生理食塩水、PBS）でのAFM計測を行った。図3は走査速度5.0μm/s（0.07Hz）の条件でタッピングモード（共振周波数60kHz）で取得した振幅像である。細胞表面の微細な凹凸形状も観察されており、液中での細胞形状イメージングが可能であることがわかった。

図4にバイオプローブ（ $k = 150\text{N/m}$ ）を用いて測定した生細胞のフォースカーブ（押込速度300nm/s）を示す。押込み量が407nmに達した時点で荷重が一旦減少している。これは、ナノニードル先端が細胞膜を穿孔した

ことに起因している。このときの穿刺力は337nNである。一方、ばね定数が小さな市販のAFMプローブ($k = 0.026\text{N/m}$, 先端角 70°)を用いた場合(図(b))には、荷重1.93nN(押し込み量854nm)で穿刺が行われ、穿刺力の値に大きな差異が認められた。また、測定したフォースカーブから細胞のヤング率を求めた。ヤング率は先端形状を円錐と仮定したヘルツの接触モデルを用いて算出した。

図5(a)に種々のばね定数をもつプローブを用いて評価した生細胞のヤング率の測定結果を示す。市販のAFMプローブ($k < 0.11\text{N/m}$)の場合には1~5kPa程度と一般に報告されている生細胞のヤング率とほぼ同程度の値となった。一方、バイオプローブ($k = 150\text{N/m}$)ではヤング率は1.0MPa程度と大きく評価された。これはバイオプローブ特有の現象ではなく、市販のAFMプローブを用いた場合でも大きなばね定数のプローブ($k = 64\text{N/m}$, 先端角 35°)ではヤング率($E = 0.5\text{MPa}$)は大きく見積られる結果となった。この理由としては、プローブのたわみにくさの影響やプローブ自身の硬さが反映された結果であると考えられる。また、柔らかいプローブ($k < 0.11\text{N/m}$)を用いた場合には、固定細胞のヤング率(図(b))は、生細胞に比べて1桁程度大きくなった。これは、グルタルアルデヒドによってタンパク質同士の架橋反応が起こったためである。また、バイオプローブを用いた場合でもヤング率は2倍程度の差が認められ、相対的には生細胞と固定細胞の違いが評価できることを示している。

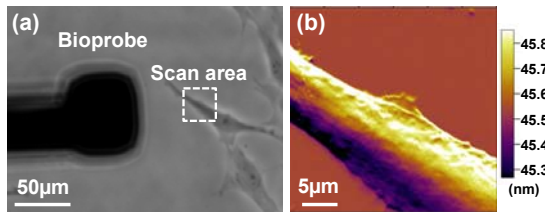


図3 液中でのHeLa細胞のAFM像

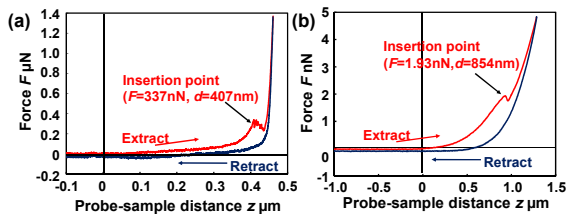


図4 細胞膜穿孔時のフォースカーブの例

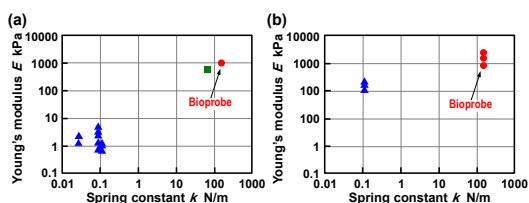


図5 生細胞および固定細胞のヤング率の測定結果

(3) 振動援用細胞膜穿孔技術

基礎的検討として、生細胞(HeLa)への穿刺実験を行った。実験方法は、ガラス基板上に培養したHeLa細胞の培養液を生細胞染色用色素(Calcein-AM) $0.2\mu\text{mol/L}$ を添加したリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に置換し、バイオプローブを穿刺した。この際、細胞膜に形成された穿孔を通じて染色試薬が細胞内に取り込まれた場合には、細胞が黄緑色の蛍光(波長515nm)を発する。実験には、先端曲率半径60nmの SiO_2 ナノニードルをSiカンチレバー($k = 167\text{N/m}$)先端部に形成したプローブを用いた。図6にその結果を示す。培養液中に添加したCalcein-AMが細胞内へ導入されており、細胞膜穿孔が可能であることがわかる。また、使用した蛍光色素は、細胞内エステラーゼによって加水分解されることで蛍光性の化合物へ変化するため、蛍光色素の発色は穿刺後も細胞が生きた状態を維持していることを意味している。

図7は生細胞における穿刺力と穿刺されるまでの押し込み量の評価結果である。ヤング率の測定結果と同様に、ばね定数が大きいほど穿刺力が大きく見積もられた。一方、押し込み量については、柔らかい市販のプローブ($k < 0.11\text{N/m}$)に比べてバイオプローブの方が小さくなっており、細胞の変形量が小さく、穿刺が容易に行われていることを示している。

細胞へのダメージを極力低減するために、細胞膜穿孔時の振動援用効果を検討した。本実験では、ばね定数0.13N/mの市販のAFMプローブを用い、カンチレバーを周波数10kHz、振幅100nmで振動させた状態で細胞膜の穿刺を行った。図8に細胞膜穿孔時の押し込み量の測定結果を示す。細胞高さや押し込み量の間には明確な相関は認められない。一方、押し込み量500nm以下での穿刺確率を比較すると、振動を印加しない場合(22%)に比べて、振動を印加することで、穿刺確率は73%と3倍程度と大きくなった。これは、高い周波数で細胞を変形させることで、粘性抵抗が増加し、小さな変形量でも効率よく高

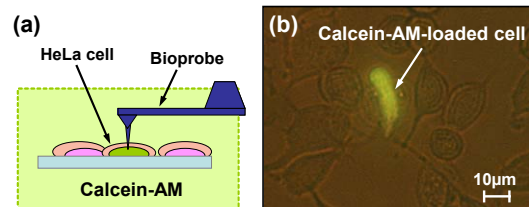


図6 生細胞への穿刺実験(Calcein-AMの導入)

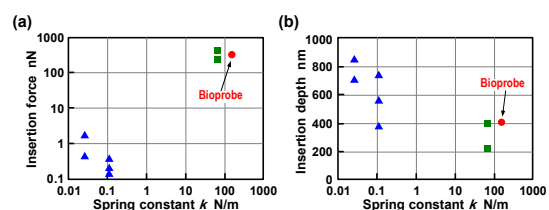


図7 生細胞の穿刺力と細胞膜穿孔時の押し込み量

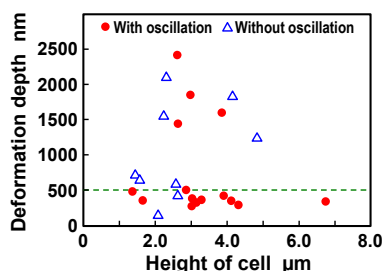


図 8 生細胞の穿刺力と細胞膜穿孔時の押込み量 (振動援用細胞膜穿孔)

い応力が発生するためと考えられる。

(4) 電場駆動力による細胞内デリバリー

細胞内へ生体分子を高精度に導入する方法として、電場駆動力を用いた極微小流体制御技術について検討した図 9 に吐出実験装置の概略図を示す。基礎実験として、ナノニードル単体を用いて実験を行った (図(b))。シリコン樹脂 (PDMS) にマイクロ流路 (幅 1mm, 高さ 30 μ m) を形成したものをニードル基板に貼り付け、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を満たしたシリコンゴムシート製の容器内に浸漬した。ナノニードル根元部分と容器内に 1 対の Ag/AgCl 電極を配置し、直流電圧を印加し、液体の吐出挙動を調べた。

図 10 に DNA の吐出実験を行った結果を示す。ナノニードル (開口径 800nm) には蛍光標識 DNA (塩基長 19bp) を TE バッファで溶解し 40 μ M としたものを充填した。図中の写真は印加電圧 1V, 吐出 10s 後の吐出状態を観察した蛍光顕微鏡像である。図のように、印加電圧と吐出流量は比例し、 $Q = 86.6V$ との関係式が得られた (図(a))。また、イオン電流 I [nA] は印加電圧 V [V] に比例して増加し、その関係は $I = 88.3V - 11.7$ となった (図(b))。

以上の結果から、電場駆動力を利用することで高精度な液体吐出 (pL/s オーダ) が実現できることが示された。原理的には、電圧の極性を反転させることで、極微量の生体分子

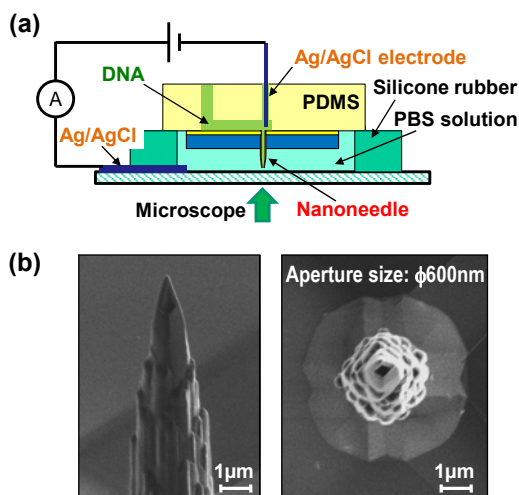


図 9 電場駆動力を利用した吐出実験装置

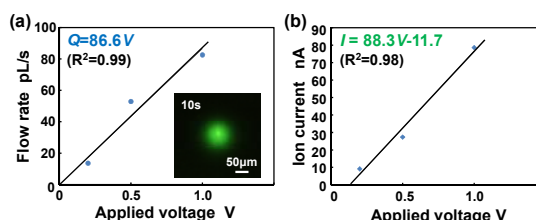


図 10 蛍光 DNA の吐出結果

を細胞内から抽出することも可能となる。また、吐出中に計測されるイオン電流はニードル先端と対象物 (細胞) との距離に依存して変化することから、細胞への穿刺過程をイオン電流の変化として捉えることができる。

(5) 段付き中空ナノニードル探針の作製

バイオプローブの性能を左右するナノニードル先端形状を高精度かつ再現性よく形成するために、段付き中空ニードルの作製プロセスを確立した。図 11(a) に示すように、熱酸化膜 (SiO₂ 膜) を形成した Si 基板の表面に、電子ビーム (EB) 描画および反応性イオンエッチング (RIE) によって、SiO₂ 膜にナノニードル先端部となる円形パターン (直径 1 μ m 以下) を形成する。次に、フォトリソグラフィと RIE によって Si 基板の裏面に円形パターン (直径 15 μ m) を形成する。その後、DRIE によって探針部と支持部を個別に作製し両者を連通させる。その後、熱酸化を行い、TMAH を用いて Si のみを選択的にエッチングすることで、段付き中空ニードル探針を露出させる。

図 (b) に作製した段付き中空ナノニードルの一例 (SEM 像) を示す。探針先端部は外径 1.5 μ m, 内径 0.8 μ m, 長さ 22 μ m の中空構造の SiO₂ ニードルである。さらに、ニードル先端部は中空構造の支持部 (外径 15 μ m, 長さ 78 μ m) と連通しており、AFM プローブの探針としては十分な長さをもっている。また、支持部の根元部分には機械的強度を保つために Si 構造体 (幅 44 μ m, 高さ 23 μ m) を選択的に形成している。

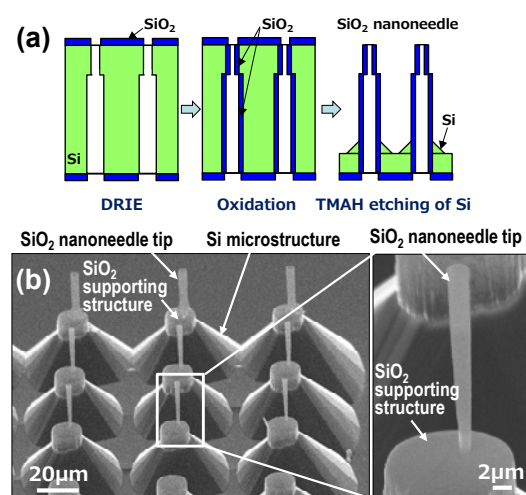


図 11 段付き中空ナノニードル探針の作製例

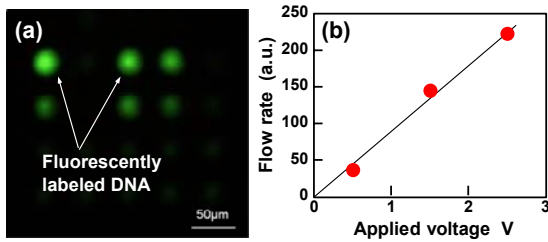


図 12 段付きニードルからの蛍光 DNA の吐出実験

図 12 に電場駆動力を利用した蛍光 DNA の吐出実験結果を示す。ニードル先端部と支持部を個別に作製し、両者を連通させた段付き中空ナノニードルから再現性よく DNA の吐出が確認できた。また、吐出量（相対値）も印加電圧に比例しており、電場駆動力を利用した極微量の DNA の高精度な吐出制御が可能であることを示した。

(6) 細胞内 TERS イメージング

チップ増強ラマン散乱 (TERS) イメージング (細胞機能発現可視化技術) による生体分子の細胞内ダイナミクス観察手法を実現するために、倒立顕微鏡に組み込み可能なラマン分光装置を設計・試作した (図 13)。

基礎実験として、静電的相互作用によってガラスピペット表面に Ag ナノ粒子 (平均粒径 60nm) を固定化し、細胞内 TERS イメージングを行った。図 14 にガラスピペット先端を HeLa 細胞に穿刺したときのラマン分光結果を示す。図のように、細胞内の DNA, タンパク質, 細胞膜の脂質に起因するラマンスペクトルが得られることを実証した。

(7) 今後の展望

本提案技術の最も特徴的な生化学的操作を行うための細胞内デリバリー技術として、振動援用による低侵襲細胞膜穿孔ならびに電場駆動力による高精度 DNA 吐出制御技術を融合した新規な低侵襲細胞内デリバリー技術を確立した。また、細胞内ラマン (TERS) イメージングを実現するために、当初の研究計画通り、倒立顕微鏡組み込み型 TERS 分光システムを設計・試作し、細胞内の DNA ならびにタンパク質のラマンスペクトルが得られることを実証した。さらに、ナノニードル先端形状を形成するための段付き中空ナノニードルの新規作製プロセスを確立したことで、本提案の多機能走査型バイオプローブ顕微鏡のキーデバイスであるバイオプローブを高精度かつ再現性よく作製することが可能となった。

今後は、本提案の多機能走査型バイオプローブ顕微鏡の実用化を目指し、段付き中空ニードルを一体形成したバイオプローブの作製と高感度力学応答計測を実現するためのカンチレバー厚み方向の薄型化プロセスについて引き続き検討する。また、バイオプローブを用いた細胞の生化学操作 (DNA 導

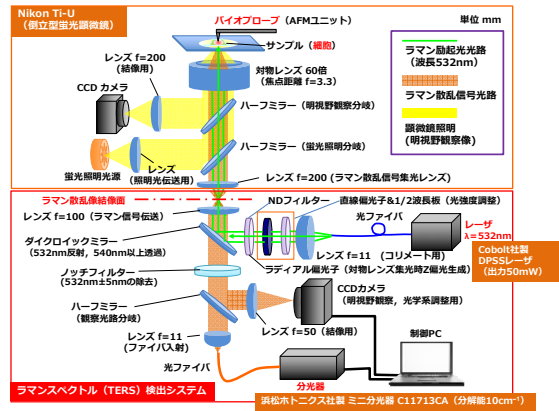


図 13 倒立顕微鏡組み込み型チップ増強ラマン分光 (TERS) 装置の概略図系

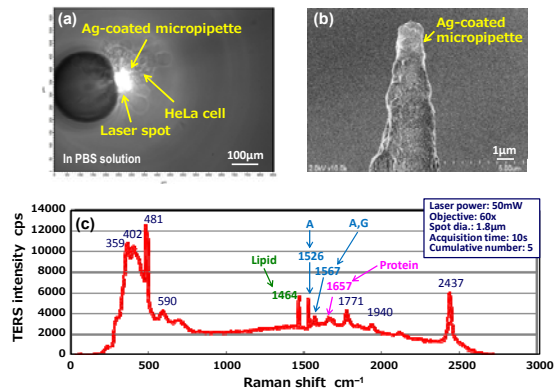


図 14 HeLa 細胞内の TERS イメージングの一例

入) と細胞内 TERS イメージングの同時計測、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) 機能の付加についても実現し、さらなる高機能化を図る。さらに、本提案技術の実用的な意味での有効性を検証するために、黄色蛍光タンパク質 (YFP) の遺伝子発現効率の調査ならびに iPS 細胞樹立実験などの細胞実験を行い、生命科学の研究者ならびに関連企業との共同研究を視野に入れて研究を推進する。

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 7 件)

- ① T. Shibata, Y. Ito, T. Ozawa, M. Nagai, T. Kawashima, Intracellular Delivery Method Based on a Combination of Electrokinetic Forces and Vibration-Assisted Cell Membrane Perforation, AIP Conf. Proc., 査読有, 1585, 2014, 45-52. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4866617>
- ② M. Nagai, T. Miyamoto, T. Kawashima, T. Shibata, Fabrication and Characterization of Hollow Needle Array for Electrokinetic Intracellular Delivery of Biomolecules, AIP Conf. Proc., 査読有, 2014, 117-122.

<http://dx.doi.org/10.1063/1.4866628>

- ③ T. Shibata, K. Nakamura, S. Horiike, M. Nagai, T. Kawashima, T. Mineta, E. Makino, Fabrication and Characterization of Bioprobe Integrated with Hollow Nanoneedle for Novel AFM Applications in Cellular Function Analysis, *Microelectron. Eng.*, 査読有, 111, 2013, 325-331.
DOI: 10.1016/j.mee.2013.02.051
- ④ M. Nagai, T. Torimoto, T. Miyamoto, T. Kawashima, T. Shibata, Electrokinetic Delivery of Biomolecules into Living Cells for Analysis of Cellular Regulation, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, 52, 2013, 047002(5pp).
DOI: 10.7567/JJAP.52.047002
- ⑤ T. Kawashima, T. Matsugase, K. Tanaka, M. Nagai, T. Shibata, T. Mineta, E. Makino, Fabrication of Hollow SiO₂ Nanoneedle Array and Characterization of Simultaneous Multi-site Ion-conductance Recordings for Cell Morphology Imaging, *Microelectron. Eng.*, 98, 2012, 663-667.
DOI: 10.1016/j.mee.2012.07.014

[学会発表] (計43件)

- ① 伴野元紀, 永井萌土, 川島貴弘, 沼野利佳, 柴田隆行, 細胞機能解析のためのナノニードル搭載型バイオプローブの開発 (第11報) - 一段付き中空ニードル探針の一体形成プロセスの検討 -, 2015年度精密工学会春季大会学術講演会, 2015年3月19日, 東洋大学 (東京都文京区)
- ② T. Shibata, M. Banno, Y. Ito, M. Nagai, Development of Novel Scanning Probe Microscopy Techniques for Cellular Function Analysis, *Int. Conf. of Global Network for Innovative Technology (IGNITE 2014)*, 2014年12月15日, Penang (Malaysia).
- ③ T. Shibata, Y. Ito, M. Nagai, T. Kawashima, Minimally Invasive Intracellular Delivery Based on Electrokinetic Forces Combined with Vibration-Assisted Cell Membrane Perforation, *The 40th Int. Conf. on Micro and Nano Engineering 2014 (MNE 2014)*, 2014年9月25日, Lausanne (Switzerland)
- ④ 伊藤康治, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行, 電場駆動力を利用した生体分子の細胞内デリバリー技術の開発 (第4報) - チップ増強型ラマン分光法による生体分子イメージングの基礎的検討 -, 2014年9月18日, 鳥取大学 (鳥取県・鳥取市)
- ⑤ 伴野元紀, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行, 細胞機能解析のためのナノニードル搭載型バイオプローブの開発 (第10報) - 一段付き中空ニードル探針の作製プロセスの

検討 -, 2014年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2014年9月17日, 鳥取大学 (鳥取県・鳥取市)

- ⑥ T. Shibata, Y. Ito, M. Banno, M. Nagai, T. Kawashima, Design and Development of Hollow-Nanoneedle-Based AFM Probe for Functional Analysis of Living Cells, *The 9th Int. Conf. on Micro Manufacturing (ICOMM 2014)*, 2014年3月26日, Singapore
- ⑦ T. Shibata, M. Banno, Y. Ito, M. Nagai, T. Kawashima, T. Mineta, E. Makino, Novel Approach for Intracellular Delivery of Biomolecules Using Bioprobe Integrated with Hollow Nanoneedle, *The 39th Int. Conf. on Micro and Nano Engineering 2013 (MNE 2013)*, 2013年9月17日, London (UK)

[図書] (計1件)

- ① 柴田隆行, 永井萌土, 川島貴弘, 注射剤・経口製剤に代わる新しい薬剤投与デバイスの開発, *技術情報協会*, 2014, pp. 26-31.

[その他]

ホームページ等

<http://mems.me.tut.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 隆行 (SHIBATA, Takayuki)
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 10235575

(2) 研究分担者

林 照剛 (HAYASHI, Terutake)
九州大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 00334011

木村 剛 (KIMURA, Tsuyoshi)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授
研究者番号: 10393216

(3) 連携研究者

川島 貴弘 (KAWASHIMA, Takahiro)
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 50378270

永井 萌土 (NAGAI, Moeto)
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 00580557