

環境制御型電子顕微鏡内での バイオナノマニピュレーションシステムの構築

1. はじめに

現在、これまで広く行われてきた集団細胞解析に代わり、単一細胞に対して個々の解析を実現した単一細胞解析技術が注目されている。このためには、単一細胞に対して各種マイクロ・ナノスケールの微細なツール・デバイスを任意の局所環境に操作し、計測・制御する技術が必要である⁽¹⁾。

我々はこれまで、マイクロスケールの操作技術として、レーザートラッピング技術やマイクロマニピュレータによるマイクロ・ナノピペット技術を構築してきた。たとえば、マイクロ・ナノピペットを用いた局所環境制御技術により、単一バクテリアのべん毛モータの回転数制御に成功している⁽²⁾。

一方、ナノスケールの操作技術では、現在主に用いられている原子間力電子顕微鏡 (Atomic Force Microscope : AFM) では、溶液中でナノ操作・計測が可能であるが、一般的に観察と操作を同時に行うことができず、作業範囲は二次元平面内に限定される。そこ

で、我々は含水性の試料を直接的に観察することができる環境制御型電子顕微鏡 (Environmental-Scanning Electron Microscope : E-SEM) 内にナノマニピュレータを構築し、実時間・三次元操作を実現し、単一細胞解析技術として応用したので、ここに紹介する。

2. 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

通常の電子顕微鏡 (Electron Microscope : EM) では、ナノスケールの高分解能な実時間画像が得られるが、通常、電子線の散乱による影響を低減するために高真空 (High Vacuum : HV) 環境下に試料が置かれる。したがって、水分を含んだ試料を直接的に観察することはできず、通常、生物試料などの含水性の試料を観察する際には、乾燥処理や染色処理などを経た特殊な観察手法が必要であった。

そこで我々は含水性の試料を直接的に観察することができる環境制御型電子顕微鏡に注目した。本電子顕微鏡は、特殊な二次電子検出方法を採用し、試料の温度 ($-5^{\circ}\text{C}\sim 0^{\circ}\text{C}$) と圧力 (最大 2600Pa) を制御することによりナノメートルオーダの高分解能で含水試料を直接観察することができる。本電子顕微鏡内に、計7自由度かつ3ユニットの多自由度多ユニット型ナノマニピュレータを構築 (図1) し、主に単一細胞レベルの局所計測・評価技術に関して研究を行っている。

3. 単一細胞の硬さ計測

本研究では、イースト菌として、原生菌 (W303) を用い、細胞の増殖段階による硬さおよびプローブの貫通力の違いを調べた (図2)⁽³⁾。細胞の増殖段階は、制限された増殖環境において、一般に、early log, middle log, late log, saturation といった各増殖段階を経る。われわれは、細胞の変形量を E-SEM 画像により計測し、印加力を集束イオンビーム加工 (Focused Ion Beam : FIB) により AFM カンチレバーを微細加工したナノプローブの座屈変形から算出することで、単一細胞の硬さ計測を行う手法を提案した⁽⁴⁾。

各増殖段階における貫通力は、増殖段階が進行するほど、貫通力が増加し、early log と saturation では、約 2.5 倍

程度の差が見られた。一方で、細胞のヤング率としては、約 3.3MPa の一定の値であった。これは、菌体の細胞表面の細胞壁の厚み、特性の変化を計測しているためであると考えられる。以上により、これまで明らかでなかった各細胞増殖期間での単一細胞レベルでの硬さの特性の違いを明らかにし、細胞の硬さと細胞の状態を評価した。

4. 単一細胞の電気伝導特性計測

また、FIB 加工により導電性のナノプローブを作製し、単一細胞の表面・内部の電気伝導特性の計測を行った。図3に示すように単一のイースト細胞に対して、デュアルナノプローブを操作し、生きた細胞と死んだ細胞を計測した結果、生きた細胞では、導電性である一方、死んだ細胞ではほとんど導電性を示さなかった⁽⁵⁾。以上より、単一細胞の活性計測の新たな手法としての可能性を見出した。

5. まとめ

本稿では、環境制御型電子顕微鏡下でのナノマニピュレーションシステムにより、単一のイースト菌細胞の硬さ計測および電気伝導特性計測について述べた。今後は、単一細胞のみならず、細胞と基板間の状態や細胞同士のインタラクションについて、技術の進展が望まれる。

(原稿受付 2010年2月1日)

[福田敏男, 中島正博 名古屋大学]

●文献

- (1) Fukuda, T., ほか, Bringing the nanolaboratory inside electron microscopes, *IEEE Nanotech. Magazine*, 2-2 (2008), 18-31.
- (2) Nogawa, K., Rotational Speed Control of Na⁺-driven Flagellar Motor by Dual Pipettes, *IEEE Trans. Nanobioscience*, 8-4 (2009), 341-348.
- (3) Ahmad, M. R., ほか, In-situ Single Cell Mechanics Characterization of Yeast Cells using Nanoneedles inside Environmental-SEM, *IEEE Trans. on Nanotech.*, 7-5 (2008), 607-616.
- (4) Ahmad, M. R., ほか, The Effects of Cell Sizes, Environmental Conditions and Growth Phases on the Strength of Individual W303 Yeast Cells using ESEM-Nanomanipulator, *IEEE Trans. on Nanobioscience*, 7-3 (2008), 185-193.
- (5) Ahmad, M. R., ほか, Single Cells Electrical Characterizations using Nanoprobe via ESEM-Nanomanipulator System, *Proc. of 9th IEEE Conf. on Nanotechnology (IEEE-Nano 2009)*, 2009-7.

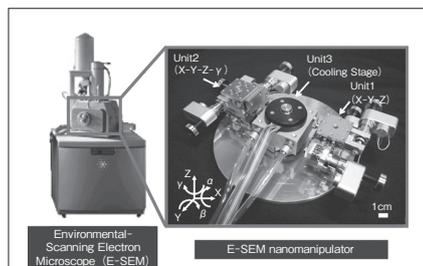


図1 環境制御型電子顕微鏡内でのバイオナノマニピュレーションシステム

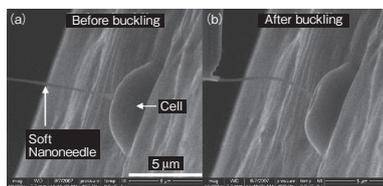


図2 ナノプローブによる単一細胞の硬さ計測実験

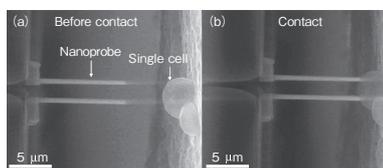


図3 デュアルナノプローブによる単一細胞の電気伝導特性計測実験