走査型イオン伝導顕微鏡とその生物応用

中島真人, 牛木辰男

新潟大学大学院医歯学総合研究科顕微解剖学分野

1. はじめに

近年, 走査型プローブ顕微鏡 (SPM: scanning probe microscope) が普及してきている. この顕微鏡は, 1982年に Binnig と Rohrer によって考案された走査型トンネル顕微鏡 (STM: scanning tunneling microscope)¹⁾ に端を発する一連の顕微鏡の総称である. SPM の仲間には, レンズの代わりに鋭い探針 (プローブ) を使用し, 探針・試料間に生じる物理化学的情報を取得して, それに対して何らかの制御をしながら, 試料表面を走査することで画像情報を得る. このうち, 生物学分野で最も応用されているのは原子間力顕微鏡 (AFM: atomic force microscope)²⁾ で, 探針・試料間の引力や斥力のような相互間力を取得しこれを制御することで, 試料表面の立体形状を画像化すること利用されてきた.

一方, 走査型イオン伝導顕微鏡 (SICM: scanning ion conductance microscope)³⁾ は, 探針にマイクロガラス電極を用い, 探針・試料間の距離の変化により生じるイオン電流の変化を利用するもので, 柔らかい生物試料観察への応用に期待が寄せられている.

本稿ではまず SICM の概要に触れ, 次に生物試料観察の実際⁴⁾ と生物応用の可能性について述べる.

2. SICM の概要

SICM は, 1989 年に Hansma らによって最初に報告された. この顕微鏡は, 探針として中空のマイクロガラスピペットを使用する (図 1a). ピペットの内部は電解質液で満たされ, 塩化銀でコートした銀電極が挿入されている. また, もう一方の電極は試料を浸した電解質液内に留置されている. この電極間に電圧をかけ, そこに生じる電流 (イオン電流) をモニターしながらピペットを試料へ近づけると, 試料表面に近接したある時点で, イオンの流れが阻害され, イオン電流が減少する (図 1b). このようなイオン電流の減少を

指標としてピペットの位置を制御することにより, SICM ではピペットで試料に直接接触することなく, 液中でその表面立体形状を取得することができる.

私たちが主に使用している装置 (XE-Bio system, Park Systems Corp.) は, 倒立顕微鏡のステージ上に SICM が搭載される. この場合, 水平方向 (x, y 方向) の走査を行う圧電素子 (x, y スキャナー) はステージ平面に配置され, 垂直方向 (z 方向) の走査を制御する圧電素子 (z スキャナー) は別に配置されている. ピペットは, z スキャナーに付属するホルダーで固定される. 試料を浸した電解質溶液中にある 2 つの電極間を流れるイオン電流は, アンプを通して増幅され, モニターされる. このイオン電流を指標にしてコントローラーでスキャナーを制御しながら試料表面に走査を行い,

図 1 SICM 装置の概略 (a) とアプローチカーブ (b).

Scanning Ion Conductance Microscopy for Imaging Biological Samples

Masato NAKAJIMA and Tatsuo USHIKI

Division of Microscopic Anatomy, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

※図 1- 図 7 は, 電子ジャーナル (<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています.

図 2

SICMにおけるプローブの走査方法。ホッピングモードではピペットを上下に大きく動かすのが特徴である。

その際の z スキャナーの動きを記録することで、各走査点における試料の高さ情報が取得される。こうして SICM では試料の立体表面形状を描出することが可能となる。

SICM のピペットの走査方法にはいくつかのモードが知られている (図 2)。このうち直流モードは、ピペット・試料間の距離に依存したイオン電流の変化を検出できる近さまでピペットを接近させた後に、この状態を維持するようにピペットで試料表面をなぞるように走査し、表面像を得るものである。一方交流モードでは、ピペットを小さく振動させた際に生じるイオン電流の振幅を、ロックインアンプを使用して検出する。この場合、ピペットと試料の間の距離が接近すると、イオン電流の減少に伴いこの振幅が増加するため、これを指標に試料表面の形状を取得することができる。ところで、このいずれの方法も凹凸の激しい試料には不向きであることがわかっている。そこで最近では、ホッピングモード (またはバックステップモード) と呼ばれる走査方法が生物試料に用いられていることが多い。この方法では各走査点において、最初に試料から遠ざかった位置にピペットを引き上げ、その後イオン電流をモニターしながらピペットを試料へと近づける。この際ピペットと試料が接触しないよう、イオン電流の減少量に閾値を設定し、イオン電流が閾値まで減少したところでピペットを引き戻す。こうして各走査点における高さ情報を取得することで、表面形状を画像化することができるようになる。このため、このモードのことを ARS (approach-retract scanning) モードと表現する場合もある。他の 2 つのモードと異なり、この方法はピペットを引き上げる距離を調節することで、凹凸の激しい試料表面の観察が容易となる。したがって今回の生物試料の観察にはホッピングモードを用いた。使用したマイクロガラスピペットの内径は約 100 nm で、測定時の電圧は約 100 mV、電流の大きさは約 1 nA とした。また測定においてはイオン電流の 1-2% 減衰を閾値とした。

3. SICM を用いた生物試料観察

①コラーゲンの SICM 観察

コラーゲン細線維⁵⁾は直径数十～数百 nm の棒状構造物であり、AFM の観察対象としてしばしば用いられてきた生物材料である。その点で SICM の生物試料への応用性を検討する格好の対象物といえる。コラーゲン細線維を豊富に含むラット尾腱の薄片をガラス上に載せ、これを薄く引き延ばすように伸展しながら、束となっているコラーゲン細線維をほぐしてガラス上に展開した。続いて、これを一旦乾燥させた後に電解質液 (生理食塩水あるいはリン酸緩衝液) に浸し、SICM で観察した (図 3)。この際、ホッピングモード SICM が、高さの変化の大きいサンプルに応用可能かを検討するため、コラーゲン細線維が網状に重なり合った部分を対象として観察を行った。その結果、コラーゲン細線維が密に入り組んで走行する様子や、それぞれの線維の重なり of 上下関係を明瞭に観察することができた。たとえば図 3 で解析したコラーゲン細線維では、高さが約 1.2 μm 、幅が約 260 nm であることから、このコラーゲン細線維が基板との接触が無く、浮いた状態となっていることが明らかである。したがって、

図 3

密に入り組んだコラーゲン細線維の SICM 像。実線部分の計測値を下に示す。

SICM の非接触の観察が、基板との固定の緩い、あるいは浮いた状態にある試料の観察にも有用であることがわかるだろう。

コラーゲン細線維には、電子顕微鏡あるいは AFM の観察で 60-67 nm 間隔の横縞（溝）が見られ、D 周期と呼ばれている。この D 周期は SICM では観察が困難であった。SICM の分解能の理論的根拠はまだ不明な点も多いが、経験的には径 50 nm 程度のコラーゲン細線維が観察可能なことから、水平方向の分解能としては D 周期の観察に十分と考えられる。しかし液中の D 周期の溝の深さは 2 nm 以下と考えられるため⁵⁾、これが SICM の垂直分解能以下であることが想像される。

②培養細胞の SICM 観察

培養細胞は SICM の生物応用において、最もよく用いられてきた⁶⁾⁻⁸⁾。いずれの報告においても SICM は、液中でナノスケールの培養細胞観察に有用であるとされている。そこで HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌由来の培養細胞）に対し 1% グルタルアルデヒド固定を行い、ホッピングモード SICM にて観察を行ってみた（図 4、図 5）。弱拡大で HeLa 細胞を観察すると、急峻な傾斜を有する、高さ 10-15 μm 程の細胞である。またその表面には微細な細胞質突起が存在し、拡大すると、高さが約 1 μm 、幅が 100-150 nm 程の大きさをした突起の

図 4 固定 HeLa 細胞の SICM 像。実線部分の断面高さ情報を下に示す。

図 5 HeLa 細胞頂上部を拡大した SICM 像。様々な形をした微小な細胞質突起が観察される。

不規則な形状も明瞭に観察できた。これらの所見は、SICM が液中で、高低差の激しい細胞に対しても大きな変形をきたすことなく、電子顕微鏡レベルの観察、ナノスケールの観察が可能であることを示している。

そこで次に、電解質液を通常の細胞培養に使用する培地として、5% CO_2 環境下で、生きた（未固定の）HeLa 細胞の観察を行った（図 6）。撮影時間を 1 枚あたり約 10 分として連続撮影を行ったところ、細胞の頂上部の微小突起や辺縁部での細胞質突起の動きや、細胞分裂後の細胞の分離などの運動が観察された。さらに現在私たちの使用する装置では、撮影時間を 128 $\times$ 128 ピクセルの画像で 1 枚あたり約 6 分まで縮めることが可能なことから、過去に AFM で行われた生細胞観察とはほぼ同様の時間分解能でのタイムラプス動画観察が可能と考えられた。この場合、従来の AFM による方法と異なる点は、プローブと試料の接触によるダメージを減らすか無くすることが期待できることにある。実際にこれらの観察において得られた生細胞の SICM 像は、固定培養細胞の観察時同様、細胞表面の大きな変形を認めないように思われる。したがって生細胞のナノスケールでの表面形状解析に SICM が広く用いられることが期待される。

4. 今後の展望

本稿では、SICM の概要と、現在までに私たちが行った生物試料観察の一端を紹介した。SICM の魅力は、生物にとって生理的な条件である液中で、柔らかい生物試料の変形をきたすことなく、ナノスケールでの表面構造解析を行うことができる点である。また、ホッピングモードを用いることで凹凸の激しい試料で

図6 生きた HeLa 細胞の SICM 観察。細胞分裂を終えたばかりの間の細胞を示す。左は1枚あたり約10分の撮影時間で連続撮影(128×128ピクセル)を行った画像を1枚置きに並べたもの(すなわち20分毎の観察)。右は各図の実線部の断面像を示す。細胞頂上部の微小突起の変化や分裂後の2つの細胞が徐々に分離する様子(矢尻)が観察できる。図内の数値は矢印間のくびれの距離。

図7 ラット気管壁の SICM 像。摘出した気管をカバーガラスに固定し、その内腔を観察した(15 μm 角で撮影)。気管内腔の線毛細胞(左上)および周囲の無線毛細胞が観察される。

も対応が可能である。その結果、培養細胞を用いた生細胞観察において、試料の変形をきたすことなく、細胞の動きを観察することができた。このほか私たちは、生体より摘出した組織標本の SICM 観察(図7)についてもよい感触を得ている。このように今後、より幅広い生物試料観察にこの顕微鏡を応用することができるのではないだろうか。

一方で現在のところ、SICM の分解能についての議論やイオン電流の変化のシミュレーションなどの研究⁹⁾は少なく、未だに不明な点も多い。その点からすると、SICM の理論的背景を明らかにすることは今後の重要な課題の1つといえそうである。また SICM で使用するガラスピペットは、その開口部を細胞膜表面などに密着させることで、密着部での膜電位の変化などを測定するパッチクランプ法にも利用できるという報告もある¹⁰⁾。このように SICM を画像の取得とパッチクランプの両者の目的で用いることで、形態学と生理学を結びつける装置としても期待できそうである。今後の様々な発展が楽しみな装置である。

文 献

- 1) Binnig, G. *et al.* (1982) Phys. Rev. Lett. **49**, 57-61.
- 2) Binnig, G. *et al.* (1986) Phys. Rev. Lett. **56**, 930-933.
- 3) Hansma, P. K. *et al.* (1989) Science **243**, 641-643.
- 4) Ushiki, T. *et al.* (2012) Micron **43**, 1390-1398.
- 5) Yamamoto, S. *et al.* (2000) Arch. Histol. Cytol. **63**, 127-135.
- 6) Korchev, Y. E. *et al.* (1997) Biophys. J. **73**, 653-658.
- 7) Gorelik, J. *et al.* (2004) Mol. Cell. Endocrinol. **217**, 101-108.
- 8) Rheinlaender, J. *et al.* (2011) Langmuir **27**, 697-704.
- 9) Rheinlaender, J. *et al.* (2009) J. Appl. Phys. **105**, 094905.
- 10) Gorelik, J. *et al.* (2002) Biophys. J. **83**, 3296-3303.

中島真人

中島真人(なかじま まさと)

新潟大学大学院医歯学総合研究科顕微解剖学分野 助教

2001年新潟大学医学部卒業。10年新潟大学大学院医歯学総合研究科博士課程修了。同年より現職。

研究内容:顕微解剖学

E-mail: m-nakaji@med.niigata-u.ac.jp

牛木辰男(うしき たつお)

新潟大学大学院医歯学総合研究科顕微解剖学分野 教授

1982年新潟大学医学部卒業。86年新潟大学大学院医歯学総合研究科博士課程修了。95年より現職。

研究内容:組織学・解剖学

連絡先:〒951-8510 新潟市中央区旭町通り1番町757番地

URL: <http://www.med.niigata-u.ac.jp/an3/welcome/html>

E-mail: t-ushiki@med.niigata-u.ac.jp

牛木辰男

理論/
実験技術