走査型イオン伝導顕微鏡のバイオ応用

牛木辰男¹・中島真人¹・岩田 太²¹新潟大学大学院医歯学総合研究科 顕微解剖学分野 〒951-8510 新潟県新潟市中央区旭町通1番町757-5
²静岡大学大学院工学研究科 機械工学専攻 機械工学科 〒432-8561 静岡県浜松市中区城北3-5-1

(2013年5月29日受付; 2013年7月16日掲載決定)

Biological Application of Scanning Ion Conductance Microscopy

Tatsuo USHIKI¹, Masato NAKAJIMA¹ and Futoshi IWATA²¹Division of Microscopic Anatomy, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences,
757-5 Asahimachi-dori-1, Chuo-ku, Niigata 951-8510²Department of Mechanical Engineering, Graduate School of Engineering, Shizuoka University,
3-5-1 Johoku, Naka-ku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561

(Received May 29, 2013; Accepted July 16, 2013)

Scanning ion conductance microscopy (SICM), first introduced by Hansma et al. (1989), can obtain topographic images of the sample surface and has been expected to be useful for biological studies. In this paper, we explained the principle of the SICM and showed some results of the application of SICM to biology. We showed SICM images of collagen fibrils, chromosomes and cultivated cells in liquid. We then applied SICM for imaging the surface of tissue blocks (e.g., trachea, etc.). Sequential time-lapsed SICM images of live cells were also shown for revealing the movement of cellular processes on the time scale of minutes. The advantages of SICM imaging in biology were discussed by comparison with atomic force microscopy (AFM) and/or scanning electron microscopy (SEM) images.

KEYWORDS : scanning ion conductance microscopy, collagen fibrils, chromosomes, cultivated cells

1. はじめに

走査型イオン伝導顕微鏡 (scanning ion conductance microscope, SICM) は, 走査型プローブ顕微鏡 (scanning probe microscope, SPM) の仲間として, 1989年にP.K. Hansmaらによって提案された¹⁾。SPMと呼ばれる一群の顕微鏡は, 探針 (プローブ) を試料表面に走査するタイプの顕微鏡の総称で, 探針を試料表面に近接させた際に生じる探針・試料間の物理化学的情報を信号として, 探針を制御しながら, 何らかの画像を得ることができる。このうち, 生物学分野でもっと広く利用されているSPMは, 探針・試料間の相互間力を制御する原子間力顕微鏡 (atomic force microscope, AFM) であるが^{2,3)}, ここで紹介するSICMでは, 探針にマイクロガラス電極を用い, 液中に留置した対照電極との間に生じるイオン

電流を測定・制御しながら, 画像を形成する。

SICMはAFMと同様にもに試料の表面立体形状を画像化する顕微鏡であるが, 液中での観察に特化している点や, 試料に接触することなく観察ができる可能性を秘めている点で, とくに最近ではそのバイオへの応用が注目され始めている^{4~7)}。

ここでは, SICMの基本原則を紹介するとともに, その生物応用の実際を筆者らのデータを中心に紹介し, この顕微鏡の今後の可能性について考える。

2. SICMの原理と装置構成

2.1 基本原理

上で簡単に述べたが, SICMは探針にマイクロガラス電極を使用する (Fig. 1 a)。この電極は, 先端開口径が100 nm程度のガラスピペットからなり, その中には塩化銀でコートした銀電極が挿入され, 電解質が満たされている。一方, 対照電極として, 別の銀電極が試料を入

Fig. 1. (color online). The principle of SICM (a) and an approach curve showing the relationship between the ion current and tip-sample distance (b).

れた液中セルの中に留置されているので、電極間に電圧をかけるとイオン電流が流れることになる。SICMでは、このイオン電流を探針（ガラス電極）の制御信号として利用している。すなわち、探針を試料表面に近づけていくと、ガラス電極の先端が少しずつ試料に遮蔽されるために、イオン電流が減少する（Fig. 1 b.）。この減衰率をもとに探針の位置を z 方向に制御しながら xy 平面に走査し、試料の表面形状を画像化する。

このように SICM では、探針と試料間の制御にイオン電流を用いることから、制御の仕方によっては探針を試料にじかに接することなく、表面形状の画像化が可能となる。この点で、これまでバイオに用いられてきた AFM とは大きく異なっている。

2.2 測定モード

SICM の主な測定モードには次のようなものがある（Fig. 2）。

1) 直流モード（DC mode）：探針（ピペット）をイオン電流の変化が生じるまで試料に接近させた後に、この状態を維持して試料表面を走査し、表面像を得る⁴⁾。

2) 交流モード（AC mode）：探針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用いて検出する。この場合、試料に探針が接近すると、イ

Fig. 2. (color online). Operation modes of SICM.

Fig. 3. (color online). View of an SICM (XE-Bio system).

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を走査し、画像を取得する。

3) ホッピングモード（hopping mode）：最初に試料から遠ざかった位置に探針を引き上げ、その後にイオン電流をモニターしながらピペットを試料へと接近させる⁵⁾。この際、ピペットと試料が接近しすぎないように、イオン電流の減少量に閾値を設定し、その閾値までイオン電流が減少したところでピペットを引き戻す。この動作を xy 平面の各走査点で行うことで、表面形状を画像化する。その動作から、バックステップモード（backstep mode）とか ARS モード（approach-retract scanning mode）と表現する場合もある。このモードはほかの二つのモードと異なり、探針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できるという利点があるが、一方で測定に時間がかかる点と、分解能が若干劣る傾向があることは注意すべき点である。

2.3 装置構成

一般に SICM は倒立顕微鏡のステージの上に搭載して使用されることが多い。私たちが主に使用している装置（XE-Bio system, Park Systems Corp.）も、Fig. 3 のように倒立顕微鏡の上に搭載されている。この装置では、 xy 平面の走査を行う圧電素子（ x , y スキャナ）がステージ上に配置され、垂直方向の走査を制御する圧電素子（ z スキャナ）は別に配置されている。探針（ピペット）は z スキャナに固定してあり、試料を入れた液中セルの

中には、対照電極が留置してある。一般に生物試料は凹凸の激しいものが多いことから、今回の生物試料の観察にはホッピングモードを用いた。なお、ガラスピペットは通常のボロシリケートのキャピラリー管（内径 0.6 mm, 外径 1 mm）をサッター社のレーザー・プラーで引いて、先端内径が 100 nm 程度、外径が 200 nm 程度になっているものを用いた。また、測定時の電圧は約 100 mV、電流の大きさは約 1 nA とし、測定時のイオン電流は 0.6~2% 減衰を閾値とした。

3. SICM による生物試料観察⁶⁾

3.1 コラーゲン細線維網の観察

コラーゲン細線維は、コラーゲン分子が会合してできる太さ数十~数百 nm の長い線維状の構造物である。ここでは、このコラーゲン細線維を豊富に含むラット尾腱の小片をガラス上に載せ、これを薄く引き延ばしながらコラーゲン細線維をほぐして、ガラス上に伸展した。これを一旦乾燥させた後に生理食塩水またはリン酸緩衝液に浸し、ホッピングモード SICM で観察した。

この標本ではコラーゲン細線維が縦横に重なり合っているため、一部の細線維は宙吊りになっている。SICM ではこのような複雑な細線維網についても、きわめて明瞭な画像を得ることができる (Fig. 4.)。このことは、SICM の測定においては、AFM と異なり、試料に力が加わりにくいことを示すと同時に、ホッピングモードが高低差の大きい試料にきわめて有用であることを示している。また、内径 100 nm 程度の探針（ピペット）を用

いた場合でも、太さ 50 nm ほどの細線維が観察できることから、SICM の分解能は探針の内径よりも小さいことが想像される所見である。

3.2 染色体の観察

染色体は真核細胞の細胞分裂期に出現する DNA とタンパク質の複合体である。分裂中期の培養細胞を回収

Fig. 4. (color online). Collagen fibril networks observed by hopping mode SICM.

Fig. 5. (color online). Human chromosomes observed by AFM (left) and SICM (right).

Fig. 6. (color online). SICM images of cultivated HeLa cells which was fixed with 2% glutaraldehyde.

し、低張処理をしたのちに酢酸アルコール液（メタノール：酢酸＝3：1）で固定したものを、ガラス上に滴下することで、ガラス表面に染色体を展開することができる⁸⁾。この標本をリン酸緩衝液にSICMで観察すると、AFMと同様に染色体を液中で観察することができる⁶⁾。

ちなみに同一の染色体をSICMとAFMで観察して比較してみると、得られる像はよく似ているが、染色体の高さ（厚み）は、SICMで観察した染色体のほうが高く（厚く）見えることがわかる（Fig. 5）。これはSICMとAFMのどちらを先に観察しても変わらない。この結果は、SICMではAFMより試料から離れた距離、すなわち試料に接触することなしに表面形状観察が可能であることを示している。染色体は液中ではきわめて柔らかい試料のため、AFMではしばしば探針で押しつぶしてしまうことを思うと、SICMの有用性が期待される観察例である。

一方で、SICMで染色体を観察する場合、バイアス電圧の印加方向により画像の安定性が異なることがわかってきている。染色体そのものがマイナスに荷電していることが原因と考えられるが、この点については現在、検討中である。

3.3 培養細胞の観察

液中での培養細胞の表面立体形状観察は、これまで主にAFMによって行われてきた⁹⁾。しかし、AFMでは細胞表面を引きずったり引っ掻いてしまうことも多く、細胞辺縁の基板に伸び出した突起の形状の観察はできても、細胞上部表面に伸び出した微細な細胞突起は、たとえ細胞をグルタルアルデヒドで固定したとしても、探針で押しつぶしてしまう傾向があった。

こうした細胞をSICMで観察してみると、細胞辺縁の突起に限らず、細胞上部に伸び出した微細な突起についても明瞭に観察できることがわかってきた^{4, 6, 10)}。その形状については、SICMで画像取得後に、同一標本を走査電子顕微鏡で観察することでさらに詳しく検討することができる（Fig. 6）。こうしてSICMと走査電子顕微鏡の像を比較してみると、SICMでは乾燥による収縮の影響を受けずに、ふっくらとした細胞像を取得することができることがわかる。またグルタルアルデヒド等で固定した細胞であれば、柔らかく微細な細胞突起についても、SICMにより液中で忠実に画像化できることがわかった。もっとも、HeLa細胞のように細く長い細胞突起が密集している場合は、突起が液中で揺らいでしまうせいか、SICMでは観察できないこともある点は注意する必要がある。

また、ホッピングモードSICMでは、zスキャナの可動範囲で凹凸の激しい試料も測定が可能である。実際に、細胞の核のあるもっとも高い部分が10 μmもあるような背の高い細胞でも、探針を引きずることなく観察を行うことができる点がホッピングモードSICMの魅力である。

3.4 組織試料の観察

ホッピングモードSICMが凹凸の激しい試料の観察に適していることを利用して、走査電子顕微鏡のように組織片の観察が可能かを、ラットの気管を例にして検討してみた⁶⁾。

グルタルアルデヒドで灌流固定をしたラットの気管を小片として切り出し、気管内腔面が上向きになるようにガラスに瞬間接着剤（アロンアルファ）で固定したの

Fig. 7. (color online). SICM image of the luminal surface of tracheal epithelium.

ちに、SICMでその表面観察を行ったところ、線毛細胞の線毛や分泌細胞頂上部の微細突起などを明瞭に観察することができた (Fig. 7)。このことは、 z スキャナの可動範囲による制約はあるものの、凹凸の激しい多様な組織にSICMが利用できる可能性を示している。走査電子顕微鏡とは異なり、標本を乾燥させることなく、液中での組織の表面形状を直接観察できる点で、今後の展開が大いに期待できるアプローチということができそうである。

3.5 生きた細胞のイメージング

これまで紹介してきた観察例は、コラーゲン細線維を除き、いずれも細胞や構造物をグルタルアルデヒド等で固定したものである。一方で、バイオの液中観察が可能となった場合に、やはりもっとも期待されるのは、生きた (すなわち未固定の) 細胞の観察だろうか。その点で、SICMによる生きた細胞の観察の可能性を考えることはきわめて重要である。

生きた細胞を観察するには、 CO_2 インキュベータと同様な環境を観察セル内に作るとともに、ドリフトを防ぐために温度の正確なコントロールが必要である。こうした環境を作るための専用の液中セルを用意して、生きた培養細胞をそのままSICMで観察を行うと、液中での培養細胞の観察が可能となる (Fig. 8)。これにより、いわゆるコマ撮り撮影を行うと、細胞の輪郭の変化を観察する程度のことは可能である。その際、1個の細胞を観察する場合は、表面の凹凸の激しいものが多いことから、ホッピングモードSICMが効果的である。

ただし、ホッピングモードSICMを用いる場合、どうしても1枚の画像の取得に時間がかかり、現状ではせい

Fig. 8. (color online). SICM image of live culture cells.

ぜい 128×128 ピクセルの画像で1枚あたり6分程度が限界である。その点で、動きの速い細胞の観察には不適であることから、この制限を克服する試みが今後さらに期待されるところでもある。

4. ま と め

本稿では、SICMの原理と基本的な装置構成を解説し、バイオ応用のいくつかの例を紹介した。

SICMは、AFMと異なり、制御信号にイオン電流を利用することから、探針で試料表面に力を加えることなく試料の表面形状観察ができるという大きな利点を持っている。その点で、バイオの試料のようなきわめて柔らかい素材の観察に適しており、AFMでは難しかった培養細胞の表面観察などに今後大いに期待が持てそうである。とくにホッピングモードSICMの出現で、凹凸の激しい構造でも観察が可能となってきており、生きた細胞の動的観察への期待も大きくなってきている。

一方で、SICMにおけるバイオ応用は、イギリスのY. Korchevのグループによりほぼ独走態勢で進められてきたことから、他のグループによる報告が少なく、まだその応用例は限られており、その理論的な検討もそれほど多くないのが現状である。その点で、探針のピペット径と分解能の関係や、試料のチャージがもたらすイオン電流の変化など、まだ多くの基礎的な研究が期待されるところでもある。

また、SICMはマイクロガラス電極を用いる点や、イオン電流を信号として用いる点で、生理学分野で用いられるパッチクランプとよく似た構成をとっている。このことから、SICMとパッチクランプとの併用方法による細胞の表面形状と細胞膜電流の測定の組み合わせなども

紹介されている¹¹⁾。同様に SICM と走査型電気化学顕微鏡 (scanning electrochemical microscopy) との組み合わせも可能である¹²⁾。その点で、マルチプローブ顕微鏡としての利用を含め、SICM の今後の多様な発展が期待できそうである。

謝 辞

本研究の一部はパークシステムズのご協力により、一部は科学研究費補助金 (no. 21390051) と新潟大学プロジェクト推進経費 (発芽研究) によるものである。

文 献

- 1) P.K. Hansma, B. Drake, O. Marti, S.A. Gould and C.B. Prater : *Science* **243**, 641 (1989).
- 2) G. Binnig, C.F. Quate and C. Gerber : *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930 (1986).
- 3) T. Ushiki and K. Kawabata : “Applied Scanning Probe Methods X. Biomimetics and Industrial Applications”, ed. by B. Bhushan, H. Fuchs and M. Tomitori (Springer, Heidelberg, 2008) p. 285.
- 4) Y.E. Korchev, C.L. Bashford, M. Milovanovic, I. Vodyanoy and M.J. Lab : *Biophys. J.* **73**, 653 (1997).
- 5) P. Novak, C. Li, A.I. Shevchuk, R. Stepanyan, M. Caldwell, S. Hughes, T.G. Smart, J. Gorelik, V.P. Ostanin, M.J. Lab, G.W. Moss, G.I. Frolenkov, D. Klenerman and Y.E. Korchev : *Nat. Methods* **6**, 279 (2009).
- 6) T. Ushiki, M. Nakajima, M. Choi, S.J. Cho and F. Iwata : *Micron* **43**, 1390 (2012).
- 7) P. Happel, D. Thatenhorst and I. Dietzel : *Sensors* **12**, 14983 (2012).
- 8) O. Hoshi, R. Owen, M. Miles and T. Ushiki : *Cytogenet. Genome Res.* **107**, 28 (2004).
- 9) T. Ushiki, S. Yamamoto, J. Hitomi, S. Ogura, T. Umemoto and T. Shigeno : *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, 3761 (2000).
- 10) J. Rheinlaender, N.A. Geisse, R. Proksch and T.E. Schaffer : *Langmuir* **27**, 697 (2011).
- 11) Y. Gu, J. Gorelik, H.A. Spohr, A. Shevchuk, M.J. Lab, S.E. Harding, I. Vodyanoy, D. Klenerman and Y.E. Korchev : *FASEB J.* **16**, 748 (2002).
- 12) Y. Takahashi, A.I. Shevchuk, P. Novak, Y. Murakami, H. Shiku, Y.E. Korchev and T. Matsue : *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 10118 (2010).