細胞への自動インジェクション装置の開発と展望

高 見 知 秀

工学院大学基礎教養教育部門 ☎ 192-0015 東京都八王子市中野町 2665-1

(2015 年 6 月 26 日受付 ; 2015 年 10 月 15 日掲載決定)

Development and Perspective of Automatic Cell Injection System

Tomohide TAKAMI

Division of Liberal Arts, Kogakuin University, 2665-1 Nakano-machi, Hachioji, Tokyo 192-0015

(Received June 26, 2015 ; Accepted October 15, 2015)

The developed apparatus and system for the injection method to introduce genes, proteins, and chemical compounds into single living cells and the perspective were reviewed. Especially, the trial to produce auto-injection machine, the merit, and the problem to realize practically and the methods to solve the problem were reviewed.

KEYWORDS : auto-injection, living cell, nanopipette, micropipette, femto-injection

1. は じ め に

生きた細胞を思いのままに操ることは、人類共通の夢の一つである。近年、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS 細胞) や胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞) などの幹細胞の研究が進み、人工臓器や人工毛髪など前世期では SF であったものが実現されつつある。一方で新たな倫理・安全性の問題が浮上しているが、これらはすべての新技術において共通の問題と言えよう。しかし、このような人工細胞の研究開発において技術的な問題の一つに「どのようにして細胞を高効率に活かした状態で操作するのか？」がある。

従来の細胞操作の方法として、次にあげる手法がある。まず、細胞を操作する方法として、外来遺伝子を細胞へ導入する遺伝子導入¹⁾があり、植物やバクテリア・酵母へ場合には形質転換²⁾、動物細胞へ場合にはトランスフェクション³⁾という。トランスフェクションの方法として、核酸を取り込んだリポソームを細胞へ取り込ませるリポフェクション⁴⁾、ウイルスを利用して細胞へ取り込ませる形質導入⁵⁾、金属微粒子を遺伝情報物質 (DNA 等) で包んで細胞へ打ち込むパーティクルガン法⁶⁾、そして電気パルスをかけて細胞膜に穴をあけたと

きに核酸を細胞へ取り込ませるエレクトロポレーション⁷⁾などがあげられる。しかし、これらのトランスフェクション法では取り込ませる核酸の量を制御することは困難であり、その量を制御するにはピペットを用いて直接注入する方法がある。これをマイクロインジェクション⁸⁾と呼ぶ。

このマイクロインジェクションは単に遺伝子導入を行うだけでなく、蛍光タンパク質や蛍光物質を付加した物質を導入することで、その物質が時間を追ってどのように移動するか、さらに核に取り込まれた場合には核内のどこに局在するのかを追跡することで、遺伝にかかわる染色質 (クロマチン) の動態 (ダイナミクス) を追うこともできる。すなわち、細胞の人工的な改質だけでなく細胞内反応ダイナミクスといった基礎的な研究への応用という観点からもこのインジェクション法は注目されている。

一方筆者は 15 年以上に亘り、走査トンネル顕微鏡 (STM) と原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた分子の観察と操作の研究を行ってきて⁹⁾、近年になってそのプローブを金属探針からガラスピペットに替えた¹⁰⁾。そこで本解説では、インジェクション法についてこれまでに開発されてきた装置や手法について紹介し、インジェクション法における問題点について筆者らのこれまでの走査プローブ顕微鏡自作のノウハウ等を活かして試みてきた取

り組みについても紹介する。

2. マニュアルインジェクション法

日本で一般にマイクロピペットとは、ブッシュボタン式の液体用微量体積計で、先端がプラスチック製の使い捨てになっているものを指す。本稿で称するマイクロピペットはそれとは異なり、直径1ミリ前後のガラスの細管からプラーと呼ばれる装置を使って引き延ばして作製した、Fig. 1に示したような形状のガラス製ピペットを指す。

1902年にBarberによって細胞内の微小電極としてガラスのマイクロピペットが使われて以来、マイクロピペットは細胞生物学において重要な道具として用いられてきた^{11, 12)}。現在マイクロピペットの作製は、主にSutter Instruments社の横型レーザープラー¹³⁾等を用いることが多くなっているが、たとえばナリシゲ社の縦型プラーを用いれば三極以上のマルチチャンネルマイクロピペットの作製は可能である¹⁴⁾。ピペットの径や形状のカスタマイズにこだわらない場合には、Eppendorf社からFemtojet[®]という名称でマイクロピペットは市販されている¹⁵⁾。

マニュアルインジェクションの装置は市販されており、その代表例としてEppendorf社のInjectman[®]とFemtojet[®]の組み合わせ¹⁵⁾そしてナリシゲ社のインジェクタとマニピュレータとの組み合わせ¹⁶⁾等があげられる。これらのインジェクション装置は、既存の倒立型光学顕微鏡に取り付けることで、インジェクションする細胞とピペットを顕微鏡で観察しながらピペット位置を操作して細胞へのインジェクションの様子を逐次観察することができる。

実際のマニュアルインジェクションで細胞内動態がどこまでわかるかを示すために一例をFig. 2に示す¹⁶⁾。Fig. 2 (a)に模式的に示した核移行シグナルをもつタンパク質 (High Mobility Group Box 1: HMGB1) のN末端に黄緑色蛍光タンパク質 (mNeonGreen)¹⁷⁾を付加したタンパク質 (ヌクレオソームシャペロン) を、ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) の細胞質にインジェクションを行ったときに、打ち込んだタンパク質がどのような時間変化で細胞核へと移行するかを、蛍光強度をCCDカメラでビデオ撮影して追跡した。インジェクションから時間が経つにつれて細胞質に打ち込まれたmNeonGreen付加HMGB1が細胞核へと移行し、80分程度で移行が完了することがわかる (Fig. 2 (b))。これに対して、HMGB1のN末端と反対側のC末端側で酸性アミノ酸に富むacidic tailが欠損した変異体 (Fig. 2 (c)) について同様にN末端にmNeonGreenを付加したヌクレオソ

Fig. 1. (color online). Typical glass micropipette used for cell injection.

Fig. 2. (color online). Example of the injection of fluorescent protein with nucleus transfer signal into HeLa cell. (a) Schematic drawing of HMGB1 box with acidic tail, (b) Time dependent fluorescent intensity of mNeonGreen-tagged HMGB1 box with acidic tail at nucleus ($\diamond$) and cytoplasm ($\square$) in HeLa cell after the injection, (c) Schematic drawing of HMGB1 box without acidic tail, (d) Time dependent fluorescent intensity of mNeonGreen-tagged HMGB1 box without acidic tail at nucleus ($\diamond$) and cytoplasm ($\square$) in HeLa cell after the injection.

ームシャペロンをHeLa細胞に打ち込んだ場合、初期段階 (0~20分) では正常体の場合と比べて早く細胞核へと移行するが、移行後は定常状態にならず、核に移行したタンパク質の濃度が不安定に減少していくことがわかった (Fig. 2 (d))。この結果は、HMGB1のacidic tailがHMGB1自身の核移行シグナルにあたる部位を立体遮蔽することで核移行が制限・制御されているという既報の結果¹⁸⁾を支持している。そしてこれと同様なインジェクション実験はほかにも報告されている¹⁹⁾。

しかし、このマニュアルインジェクション法の結果には再現性という大きな問題がある。特に、インジェクションの成功確率とインジェクション後の細胞生存確率は、実験者の腕と経験に大きく依存する、という問題が

Fig. 3. (color online). Single-cell manipulation supporting robot system (From Ref. 22). ©2011 Matsuoka H, Saito M, Funabashi H. Published in InTech under CC BY-NC-SA 3.0 license. Available from : <http://dx.doi.org/10.5772/23766>.

あり、これが再現性を左右しているのが現状である。

3. 単一細胞操作支援ロボットによるフェムトインジェクション —座標基準チップとスグワカルチャーシステム—

東京農工大の齊藤と松岡らは、前章で示した問題を解決することを目的として、Fig. 3 に示す単一細胞操作支援ロボットを開発した²⁰⁾。細胞が入った試料ディッシュの外側底面に座標基準チップを取り付けることで、ディッシュ平面内のXY座標が登録できるようになり、インジェクションを行った細胞のXY座標位置が登録されることで、他の顕微鏡に試料ディッシュを移動させてもその細胞の位置がすぐにわかるシステム（スグワカルチャーシステム）になっている²¹⁾。従来のマイクロインジェクションでは、エレクトロポレーションやリポフェクションにおける懸濁液中の濃度制御とあまり変わらない定量性しか得られなかったが、このシステムの開発により、フェムトグラムオーダーでの定量性をもつ「フェムトインジェクション」が実現された²²⁾。さらに、実験者の操作時の負担が軽減されることで実験の確度の向上が得られ、色素の導入であれば50%以上、遺伝子発現までなら10~20%が可能となった。1ウェルで200個の細胞登録ができ、一旦登録しておけばこれへのインジェクションが1~2時間以内に迅速に行える。実際に、Fig. 2 に示した実験はこのシステムを用いて行った。

4. 走査イオン伝導顕微鏡と組み合わせたインジェクション法

Hansma らによって開発された走査型イオン伝導顕微鏡 (SICM)²³⁾、そして Bard らによって開発された走査型電気化学顕微鏡 (SECM)²⁴⁾は、ともに先端径が1マイクロメートル未満のガラスナノピペットをプローブとして、プローブからの信号強度が一定になるように走査することで顕微鏡像を得るという走査プローブ顕微鏡に

属する。このガラスピペットプローブを単に顕微鏡像を得るためのプローブとして使うだけではなく、逆にピペットから物質を送り込むという使い方ができて、これをインジェクションと組み合わせることで従来のインジェクション法では実現していない精密なインジェクション制御が可能となる。

新潟大の牛木と静岡大の岩田は、SICM とエレクトロポレーションとを組み合わせたトランスフェクション法を開発している。ナノピペットをプローブとするSICMを用いることで、従来では細胞群に対して用いられていたエレクトロポレーションを単一細胞に適応することを可能にし、かつSICMの距離検出技術により単一細胞へのエレクトロポレーションにおける低侵襲性を実現している²⁵⁾。さらに最近では、二つの開口を有するナノピペットであるシータ管を用いることで、一つの開口を用いて分子の吐出制御を行い、もう一方の開口を用いて細胞とピペット先端との距離の検出と電圧印加を行うことで、単一細胞エレクトロポレーションの操作性を向上させている²⁶⁾。

Actis らは、シータ管のナノピペットを細胞に挿入した際に、シータ管内の電極間に電圧を印加した際に起こる電気浸透 (electro-osmosis) を利用して、細胞へ電圧をかけることなくインジェクションを行う手法を開発した²⁷⁾。これによりインジェクション後の細胞の生存確率は飛躍的に向上した。彼らはまた、逆に細胞質からミトコンドリアやRNAをナノピペットで抽出して遺伝子解析を行う単一細胞シーケンスも行っている²⁸⁾。

以上の結果は、整った環境で優れた実験者が操作することで成功しており、一般の細胞生物の研究者がこれらの手法を各研究室で容易に導入できるわけではない。そのためには実験者の勘や腕に依存しない自動化が必要となってくる。

5. 自動インジェクション装置の開発

細胞へのインジェクションの自動化のシステムについてはこれまでに多くの研究者によって提案されて開発されている。

富士通は、NEDO「バイオ・IT融合機器開発プロジェクト」の助成を受けて、細胞に物質を注入する自動マイクロインジェクション装置「CELLINJECTOR, CI-2000」を開発して製品化した²⁹⁾。微細孔をもつシリコンチップを用いて細胞を自動的に吸引捕捉し、独自に開発したシャーレステージとマイクロマニピュレータを用いて、高速マイクロインジェクションを実現した。実験者は、導入物質を充てんしたキャピラリーと専用シャーレを装置にセットし、浮遊細胞をシャーレ上に滴下するだけ

でマイクロインジェクションを行うことが原理的には可能となっている。

Jensen らは、マイクロ流体ジェットによって細胞に物質を打ち込む装置を開発した³⁰⁾。このマイクロ流体ジェットは非接触であるため簡便にインジェクションができる。しかしインジェクション後の細胞生存確率については言及されていない。人体に対するジェット注射器は「ハイジェッター」として60年代から80年代に使用されたが、安全性と感染の問題から使用されなくなった。特にインジェクションによる皮膚への損傷の問題については、細胞におけるインジェクションにおいても同様な損傷問題が懸念される。

卵細胞のように大きな細胞へのインジェクションのためのマイクロメートルスケールでのピエゾ駆動インジェクタについてはいくつかの開発例がある^{31, 32)}。しかし直径が数十マイクロメートル以下の細胞については、単に位置制御だけでなくインジェクションによる細胞への損傷の軽減が問題となり、単純にスケールダウンするだけの開発ではうまくいかない。

自動インジェクションについての理論的な論文はいくつかあるが³³⁻³⁶⁾、細胞への損傷についての考察がなされているものは皆無であり、実際にインジェクションを行ったときの確度や生存確率の向上には寄与しない。

以上のように、これまでに開発された自動インジェクションシステムの問題点は、ピペットの位置決めや操作などの機械的な問題ではなく、細胞にいかに損傷を与えないようにインジェクションを行うかであり、この点における開発が現状では不十分となっている。

6. インジェクションの自動化の問題点とその解決法

上記のインジェクション法において用いられるガラスピペットは、6回程度のインジェクション操作により挿入した細胞の細胞質基質に由来する汚染物がピペット先端に付着することで、挿入する細胞に損傷を与えるだけでなくインジェクション操作が困難になるという問題があった。そこで筆者らは、ガラスピペット外壁表面のみ

Fig. 4. (color online). Coating of micropipette used for cell injection (From Ref. 38). © 2014 Surface Science Society of Japan.

Fig. 5. (color online). Development of gas flow method for non-destructive evaluation of glass nanopipette.

Fig. 6. (color online). Schematic diagram of developing cell injection system.

をクロロベンゼン基で修飾されたポリシロキサン高分子でコーティングする技術を開発した (Fig. 4)。そしてコーティングの検証を顕微ラマン分光法, 走査電子顕微鏡法, エネルギー分散型 X 線分光法 (EDX), そして電子プローブ微小分析法 (EPMA) によって行った³⁷⁾。この技術開発により, 細胞への損傷を与えることなく 20 回以上のインジェクション操作でも問題なく使用できるようになった³⁸⁾。

さらに, インジェクション法における細胞への損傷軽減について最も重要となるパラメータの一つにピペット先端の形状とピペット内部状態があげられる。たとえばピペット内径が 200 nm 未満になると蛋白質などの化合物のインジェクションは困難になるが, ピペット外径が 500 nm 以上になるとインジェクション後の細胞の生存確率は激減する。また, ピペット内部にゴミ等が存在すると数回のインジェクション操作でゴミが詰まってしまうその後のインジェクションが不能になる, という問題がある。しかし先端が数百ナノメートルのピペット先端を光学顕微鏡で観察するには困難があり, 電子顕微鏡で観察した後のピペットを使うことはできない。そこで筆者らは, 非破壊的にピペット先端の形状と内部状態を評価するためにガスフロー法による検査システムを開発した。(Fig. 5) 具体的には, ピペットを差動排気真空層に設置してアルゴン等の希ガスを流し, ピペット入口の圧力を 2000~200000 Pa に変化させていったときの出口の真空度を計測して, クヌーセン流から中間流に変化するときの圧力とポアゾイユ流での圧力依存プロットの傾きからピペット先端径とシャンク長がわかり, 圧力依存性が不連続でないときにはピペット内部に流れを妨げるゴ

ミが存在することがわかった³⁹⁾。

以上のように, 自動インジェクションを実現させるためには, その基盤となるいくつかの要素技術が不可欠であり, これらを統合することによって自動インジェクションシステムが完成すると筆者は考えている。

7. 細胞-ピペット間距離を検知して制御するインジェクションプローブの開発

これまでにあげてきたことを鑑みて筆者が現在開発している装置の概略図を Fig. 6 に示す^{40, 41)}。第 4 章に示したように SICM と組み合わせることで細胞-ピペット間距離の検知が可能となるが, 一般の細胞生物学の研究者ユーザーにとって SICM の操作は煩雑なものとなる。そこで本装置では, SICM におけるフィードバック機構のみを残して, microscopy すなわち顕微鏡像を得ることは行わず, あくまで細胞とピペット先端との相互作用の検知に特化して開発を行っている。ピペットの細胞への挿入を円滑に行うためにピペット先端に挿入方向に振動するように piezo 素子がインジェクションヘッドに組み込まれている。これとは独立にピペットの挿入・拔出操作を行うための piezo も組み込まれている。ピペット先端と細胞との距離は, 細胞膜のゼータ電位を検知することによって行う。ピペット内に挿入した銀/塩化銀電極によって検知した電位のピペット-細胞距離依存性を示すグラフを図中に示した。ピペット先端が細胞に近づくにつれて電位が上昇し, 接触したところで最大となり, 挿入するにつれて電位が減少するという結果が得られた。このような実験データを蓄積することによって細胞とピペット先端との距離を制御することが可能となる。さら

Fig. 7. (color online). Image schematics showing the concept of an injection robot based on the technique of Besocke-type scanning tunneling microscope (From Ref. 10). ©2014 Takami et al.; licensee Springer.

に、回転振動の動作を行えるピエゾを組み込むことによって、直線振動だけでは再現できない実験熟練者が挿入時に行っている動作のエミュレーションが可能となる。以上のように、細胞に損傷を与えないで挿入を行うことに特化した装置を開発して、前章に示した要素技術を組み合わせることによって、従来のインジェクション装置では困難であった幹細胞へのインジェクションの生存確率向上を目指している。

一方筆者は、Fig. 7に示すインジェクションロボットを考案した⁴²⁾。観測・操作の対象物に対してプローブヘッドの大きさが巨大過ぎると、機械的な共振値(Q値)の問題等から測定・操作に支障をきたしやすい。たとえば、「クレーン車に鉛筆をつけて文字を書かせる」ことに対応する。これはプローブ顕微鏡装置開発において考慮すべき重要な問題である⁴³⁾。そこで筆者らは、インジェクションヘッドを小型化するためにBesocke型走査トンネル顕微鏡⁴⁴⁾からヒントを得て5センチ前後の大きさのインジェクションロボット「ナノモスキート」を作製し、機械的な動作確認を行った。理想的には、蚊の大きさまでのより小型化と軽量化を目指すことが必要であり、これについては現在製作構想中である。

8. む す び

現状の市販のインジェクション装置のコンセプトは、「下手な鉄砲も数うち当たる」で、確かに熟練した実験者であれば成功率は良いが、それは実験室レベルの話であって、装置の製品化まではよいが工業化という点では使えない。細胞生物学の観点からは、一個成功した細胞があればこれを培養増殖すればよい、という考え方

もあるが、細胞内反応ダイナミクス等の基礎研究には使えない。一方で機械工学を基として開発している自動インジェクション装置は、理論上の問題はないが、ほとんどにおいて実際に使用すると細胞を殲滅する装置となっている。筆者は、ある機械系の会社に自動インジェクション装置の開発を依頼したが、後日断られたという経緯があり、その理由にこれがあげられる。また、研究室レベルでのインジェクションの高精度化はSICMとの組み合わせで可能となっているが、工業化には程遠い。工業生産に使える自動インジェクション装置の実現には、これらのことを踏まえて統合的に開発する必要がある。自動インジェクション装置の実現のためにもう一つ重要な概念として筆者が考えていることは、自然界において営まれているインジェクションに学んでそこから新しいモノを作り出す「Learn from nature, and create what is not in nature.」である⁴⁵⁾。筆者がFig. 7に示した「ナノモスキート」は、まさにこの発想から得られたコンセプトである。

最後に、筆者がガラスマイクロピペットをプローブとして用いる研究の動機について言及して結びの言葉とする。本研究の動機は、筆者が1994年にIBMチューリッヒ研究所にいたとき、走査トンネル顕微鏡と原子間力顕微鏡を世界で初めて「作った」Gerber博士が、ガラスピペットを使ってなにやら実験をしていて、そのときにGerber博士から話していただいたことが由来となっている。そのとき彼が構想していたプローブ顕微鏡はまだ実現されていないが、おそらく今世紀中には誰かが実現するであろうという希望的観測を抱きながらこの稿を終えることにする。

謝 辞

本研究は科研費基盤研究C(課題番号15K04678)の助成を受けたものです。また、本研究の一部は物質・デバイス領域共同研究拠点における共同研究です。また、本研究は文部科学省生命動態システム科学推進事業「核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理研究拠点」の助成を受けたものです。拠点長の楯真一先生と菅原武志博士をはじめとして広島大学クロマチン動態数理研究拠点のメンバーには大変お世話になりました。東京農工大学の斉藤美佳子先生と松岡英明先生そして研究室の皆様、特に学生の小川佳英さんと小山真人さんには細胞の準備調整から実際のインジェクション実験に至るまでお世話になりました。また東北大学多元研の高桑雄二先生と研究室の小川修一先生と学生の尾白佳大さん西本亮さんにはピペットの評価実験でお世話になりました。そしてピペットの組成分析評価では広島大学自然科学研究支

援開発センター (N-BARD) 低温・機器分析部門の前田誠様にお世話になりました。ここに厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) A.R. Clarke : "Transgenesis Techniques : Principles and Protocols" (Humana Press, Totowa, 2002).
- 2) S.B. Gelvin : *Micrbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 16 (2003).
- 3) T.K. Kim and J.H. Eberwine : *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 3173 (2010).
- 4) P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold and M. Danielsen : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7413 (1987).
- 5) A.J.F. Griffiths, J.H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin and W.M. Gelbart : "An Introduction to Genetic Analysis", 7th edition, (W.H. Freeman, New York, 2000).
- 6) J.J. Finer, P. Vain, M.W. Jones and M.D. McMullen : *Plant Cell Rep.* **11**, 323 (1992).
- 7) J.C. Weaver and Y.A. Chizmadzhev : *Bioelectrochem. Bioenerg.* **41**, 135 (1996).
- 8) Y. Zhang and L.C. Yu : *BioEssays* **30**, 606 (2008).
- 9) T. Takami : *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* **12**, 157 (2014).
- 10) T. Takami, B.H. Park and T. Kawai : *Nano Convergence* **1**, 17 (2014).
- 11) K.T. Brown and D.G. Flaming : "Advanced micropipette techniques for cell physiology" (John Wiley & Sons, Chichester, 1986), p. 2.
- 12) A. Bretag : *Trends in Neurosci.* **6**, 365 (1983).
- 13) <http://www.sutter.com/>
- 14) <http://www.narishige.co.jp/>
- 15) <http://www.eppendorf.com/>
- 16) T. Takami, J. Uewaki, H. Ochiai, M. Koyama, Y. Ogawa, M. Saito, H. Matsuoka and S. Tate : JSAP (Japan Society of Applied Physics)-OSA (Optical Society of America) Joint Symposia 2014 (in The 75th JSAP Autumn Meeting 2014) (2014) 18p-C4-12.
- 17) N.C. Shaner, G.G. Lambert, A. Chamma, Y. Ni, P.J. Cranfill, M.A. Baird, B.R. Sell, J.R. Allen, R.N. Day, M. Israelsson, M.W. Davidson and J. Wang : *Nat. Methods* **10**, 407 (2013).
- 18) M. Watson, K. Stott and J.O. Thomas : *J. Mol. Biol.* **374**, 1286 (2007).
- 19) X. Wei, V.G. Henke, C. Strübing, E.B. Brown and D.E. Clapham : *Biophys. J.* **84**, 1317 (2003).
- 20) H. Matsuoka, S. Shimoda, M. Ozaki, H. Mizukami, M. Shibusawa, Y. Yamada and M. Saito : *Biotechnol. Lett.* **29**, 341 (2007).
- 21) Y. Yamada, N. Yamaguchi, M. Ozaki, Y. Shinozaki, M. Saito and H. Matsuoka : *Microsc. Microanal.* **14**, 236 (2008).
- 22) H. Matsuoka, M. Saito and H. Funabashi : "Functional Control of Target Single Cells in ES Cell Clusters and Their Differentiated Cells by Femtoinjection", in *Embryonic Stem Cells-Basic Biology to Bioengineering*, ed. by Prof. M. Kallos (2011) DOI : 10.5772/23766.
- 23) P.K. Hansma, B. Drake, O. Marti, S.A. Gould and C.B. Prater : *Science* **243**, 641 (1989).
- 24) A.J. Bard, F.R.F. Fan, J. Kwak and O. Lev : *Anal. Chem.* **61**, 132 (1989).
- 25) F. Iwata, K. Yamazaki, K. Ishizaki and T. Ushiki : *Jpn. J. Appl. Phys.* **53**, 036701 (2014).
- 26) 櫻井智史, 山崎晃資, 牛木辰男, 岩田 太 : 第 75 回応用物理学会秋季学術講演会講演予稿集 (2014) 19a-A8-5.
- 27) R.A. Seger, P. Actis, C. Penfold, M. Maalouf, B. Villozny and N. Pourmand : *Nanoscale* **4**, 5843 (2012).
- 28) P. Actis, M.M. Maalouf, H.J. Kim, A. Lohith, B. Villozny, R.A. Seger and N. Pourmand : *ACS Nano* **8**, 546 (2014).
- 29) <http://www.nedo.go.jp/content/100096458.pdf>
- 30) A. Adamo, A. Sharei, O. Roushdy, R. Dokov and K.F. Jensen : 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (2011) p. 1514.
- 31) H.B. Huang, S.U. Hao, H.Y. Chen and J.K. Mills : "Medicine Meets Virtual Reality 18", eds. by J.D. Westwood et al. (IOS Press, 2011) p. 231.
- 32) Y. Sun and B.J. Nelson : *Int. J. Robot. Res.* **21**, 861 (2002).
- 33) W. Xu, C. Cai and Y. Zou : *J. Control. Theory Appl.* **11**, 207 (2013).
- 34) Y. Tan, D. Sun, W. Huang and S.H. Cheng : *IEEE Trans. Nanobiosci.* **9**, 171 (2010).
- 35) H. Huang, D. Sun, J.K. Mills, W.J. Li and S.H. Cheng : *IEEE Trans. Automat. Sci. Eng.* **6**, 565 (2009).
- 36) H. Huang, D. Sun, J.K. Mills and S.H. Cheng : *IEEE Trans. Robot.* **25**, 727 (2009).
- 37) 高見知秀, 楯 真一, 小川佳英, 斉藤美佳子, 松岡英明, 尾白佳大, 小川修一, 高桑雄二 : 特願 2014-220411.
- 38) T. Takami, Y. Ojio, Y. Ogawa, S. Ogawa, Y. Takakuwa, M. Saito, H. Matsuoka and S. Tate : *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* **13**, 79 (2015).
- 39) T. Takami, K. Nishimoto, T. Goto and Y. Takakuwa : The 30th Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics (2014) 2P06.
- 40) T. Takami, J. Uewaki, H. Ochiai, M. Koyama, Y. Ogawa, M. Saito, H. Matsuoka, Y. Ojio, K. Nishimoto, S. Ogawa, Y. Takakuwa and S. Tate : Pacific Rim Symposium on Surfaces, Coatings and Interfaces (PacSurf 2014) (2014) BI-TuP3.
- 41) 高見知秀, 尾白佳大, 西本 究, 小川佳英, 小山真人, 小川修一, 高桑雄二, 斉藤美佳子, 松岡英明, 楯 真一 : 日本物理学会第 70 回年次大会 (2015) 22pPSA-68.
- 42) T. Takami, X.L. Deng, J.W. Son, B.H. Park and T. Kawai : *Jpn J. Appl. Phys.* **51**, 08KB12 (2012).
- 43) Ch. Gerber : private communication.
- 44) K. Besocke : *Surf. Sci.* **181**, 145 (1987).
- 45) H. Rohrer : private communication.