



超解像度ライブセル形状イメージング

ガラスナノピペットによる非接触・非侵襲イメージング

高橋康史 Yasufumi TAKAHASHI

液中での形状イメージングに特化した走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) の高速化に取り組み、生細胞表面におけるナノスケールの構造変化を非侵襲かつ高分解能でリアルタイム観察を可能にした。さらに、ナノ電極や FET を SICM に搭載することで、神経伝達物質や ATP をサブセラーレベルで検出することも可能とした。このような、生命現象の包括的理解に資する「ナノバイオセンシング」基盤技術の確立に向けて研究に取り組んでいる。

走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM)

細胞は細胞内外との物質のやり取りや、細胞間での相互作用、細胞自身が遊走することで、恒常性を維持している。このようなダイナミックな変化の一部は、ナノスケールの構造変化を伴うが、光学顕微鏡では、光の回折限界のため、直接可視化することが困難である。原子間力顕微鏡を中心とした走査型プローブ顕微鏡は、非標識で試料表面の形状や物性をナノスケールで可視化できるため、生細胞イメージングにおいても有効なツールである。

走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) は、ガラスナノピペットをプローブとして用いるユニークな走査型プローブ顕微鏡である。ナノピペット内と試料側に配置した Ag/AgCl 線の間に電圧を印加して、生じるイオンの流れに起因した電流をフィードバック信号として利用し、非接触で試料表面のナノスケールの形状を可視化する。SICM は、特に軟らかく複雑な構造を持つ生細胞表面において、非侵襲かつ高空間分解能での観察に有効である。また、単に形状をイメージングするだけでなく、ナノピペットを用いて、試料表面

や内部に試薬を導入することや、試料内部の溶液などをごく微量回収することも可能である。

SICM イメージングの高速化

SICM は、細胞のタイムラプス計測が可能であるが、凹凸の激しいサンプルの計測に有効であるホッピングモード¹⁾は、イメージングに時間 (20~30 分/Frame) を要するため、数秒から数分単位で生じるような細胞膜の構造変化の観察は困難であった。筆者らは、ホッピング時の引き上げ距離を最小化するとともに、急峻な形状変化が生じる点でピペットが試料に接触した際に、自動的に調整する (少し前の点に戻る) 手法を開発した (図 1)。その結果、1 イメージあたり 18 秒という高速イメージングを実現し、これまで困難であったライブセルでの動的構造変化の連続観察が可能となった。具体的には、成長因子を加えた際の上皮細胞表面の微絨毛の変化²⁾、一次絨毛³⁾、神経細胞内のカー

たかはし・やすふみ

名古屋大学工学研究科電子工学専攻 教授、金沢大学 WPI-NanoLSI 特任教授 (兼任)
〔経歴〕2008 年東北大学大学院環境科学研究科修了、博士 (学術)。同大学原子分子材料科学高等研究機構助教、金沢大学理工学域電子情報学系准教授を経て、21 年より現職。〔専門〕電気化学計測、ナノバイオ計測。〔趣味〕アウトドア。

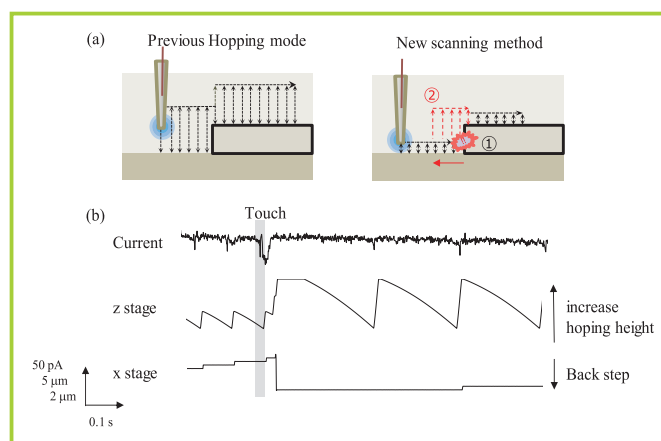


図 1 SICM の高速化アルゴリズムの概要

ゴ輸送⁴⁾、エンドサイトーシスの過程⁵⁾など、ナノスケールの形状イメージングに成功した。

代謝物の電気化学計測

SICM では、イメージング中に細胞表面の高さ情報を取得できるため、焦点が重要な蛍光イメージングなどの計測で取得した高さ情報を、ほかの計測技術に活用することが可能である。その一例として、走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は、マイクロ電極を用いて溶液中の化学物質を検出する技術であるが、ほかの SPM 技術に比べて空間解像度が劣る。その原因は、電極の大きさがマイクロメートルスケールであることと、電極とサンプルとの距離の制御が困難であり、試料と衝突しない十分に離れた距離で計測が行われている点にある。そこで、SICM の距離制御技術を SECM に組み合わせたハイブリッド型顕微鏡を開発した⁶⁾。プローブは、 θ 型ガラスキャピラリーの片方にボタンを充填・焼成してカーボン電極を作製し、他方からのバレルを SICM として用いる構成である。本手法は、半径 100 nm 以下の電極が容易に作製可能である。この技術を用いて、PC12 細胞に対しナノ電極による形状計測と、ナノスケールの局所刺激によるカテコールアミンの放出測定を実施した。その結果、細胞全体を刺激した際と比較し、局所刺激ではスパイク状の電流シグナルが大幅に減少しており、局所的な放出応答の観察が可能であることが示された (図 2)。

さらに、プローブ型電気化学トランジスタ (ケミカル FET) を開発した。これは、検出物質の濃度変化を pH 変化に変換し、その結果として生じるポリピロールの導電性変化をソース-ドレイン間の電流変化として計測するものである。酵素 (ヘキソキナーゼ) を固定化することで、ATP 濃度変化に伴う pH 変化を導電性の変化として検出でき、メラノサイトや心筋細胞の ATP 動態をセンシングすることに成功した⁷⁾。

ナノスケールで pH をリアルタイムに計測可能なナノポア pH センサーの開発にも取り組んだ。がん細胞は pH の低い微小環境を形成し、がん幹細胞の維持に関与するとされている。そこで、がん細胞表面の pH を単一細胞レベルで可視化することを目的とし、

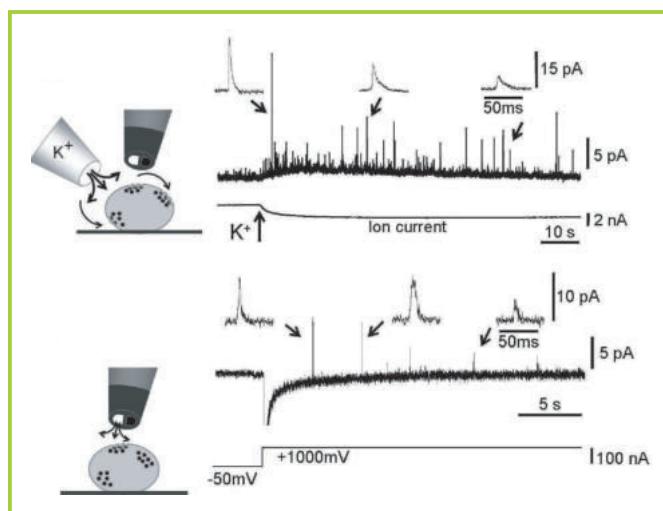


図 2 SECM-SICM を用いた神経伝達物質の計測

SICM との融合によるナノスケール pH イメージングを実現した⁸⁾。この pH センサーは、ナノピペット先端に Poly-L-Lysine と Glucose Oxidase の混合物をグルタルアルデヒドにより架橋して形成する。pH 変化によりこの電極幕の表面電荷が変化し、イオン電流に整流特性が現れる現象を利用して、pH をセンシングした。この pH センサーを θ 型ピペットの片方に配置し、もう片方を SICM に用いることで、細胞の表面形状と pH を同時にマッピング可能とした。実際にメラノーマ細胞に対する計測では、細胞表面に pH の不均一性が存在し、細胞ごとの代謝状態の違いが明確に可視化された。

おわりに

走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) は、生細胞表面のナノスケール構造を非接触・非侵襲的に観察できる手法であり、生命科学や薬理学における応用展開が大いに期待されている。

- 1) P. Novak et al., *Nat. Methods* **2009**, 6, 279.
- 2) H. Ida et al., *Anal. Chem.* **2017**, 89, 6016.
- 3) Y. Zhou et al., *Anal. Chem.* **2018**, 90, 2891.
- 4) Y. Takahashi et al., *Anal. Chem.* **2020**, 92, 2159.
- 5) Y. Takahashi et al., *Anal. Chem.* **2023**, 95, 12664.
- 6) Y. Takahashi et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, 50, 9638.
- 7) Y. Zhang et al., *Acs Nano* **2016**, 10, 3214.
- 8) Y. Zhang et al., *Nat. Commun.* **2019**, 10, 5610.

© 2025 The Chemical Society of Japan