



最近の研究と技術

多元素微粒子プローブアレイ標識による 1 細胞 *in situ* 発現解析を目指すアダプティブ SEM の開発

Development of Adaptive SEM Technology for *in situ* Molecular Expression Analysis in Single Cell Level Using Nano-Particle Probe Array Consisting of Various Elements

金 賢徹^a, 寺蘭 英之^a, 竹井 弘之^{a, b},
安田 賢二^{a, c, *}

Hyonchol Kim, Hideyuki Terazono, Hiroyuki Takei
and Kenji Yasuda

^a財団法人神奈川科学技術アカデミー

^b東洋大学生命科学部生命科学科

^c東京医科歯科大学生体材料工学研究所システム研究部門
情報分野

要 旨 多数の標的分子の発現状態を nm 空間分解能で同時かつ網羅的に定量計測することを可能とする「アダプティブ SEM」技術開発について紹介する。異なる粒径と元素を組み合わせた 500 種類以上のナノ粒子標識プローブセットを新規開発し、FE-SEM 反射電子定量計測を利用して 6 種類以上の異なる元素の粒子を同時に識別同定することで、サイズと元素の異なるナノ粒子標識セットの空間分布を同時識別計測する技術を開発した。

キーワード：アダプティブ電子顕微鏡，反射電子分析，金属微粒子，1 細胞計測，走査型電子顕微鏡

1. はじめに

生命を構成する基本単位である細胞の内部にはタンパク質や RNA など様々な生体分子が存在し、これらが動的でかつ複雑なネットワーク化した相互作用を繰り返しており、その結果があるときは細胞の応答として反映され、またあるときは変化に抵抗する恒常性として反映される。したがって、生命の不変性・恒常性と、その対局にある学習・順応・応答のプロセスを理解するためには、複雑なネットワーク内に存在する細胞内分子の動的な変化の 1 分子スケール観察と、マクロな全体としての（細胞）応答の関係という生命の基本原則

を関連付けることが必要である。その一つのアプローチとして、細胞の性質を特徴付ける鍵となる生体分子の発現状態と結合・解離状態、すなわちそれら分子の数と空間局在分布をネットワーク全体として同時に、かつ、網羅的に定量計測する技術の開発が重要となる。

細胞内の分子発現状態を網羅的に計測する代表的な技術のひとつとして、DNA チップ解析が挙げられる^{1,2)}。ガラスやシリコンなどの基板の上に標的 DNA や RNA を捕捉するための短い DNA プローブ（20 塩基長程度、以下、標的分子を標識して検出するために、標的分子に対して選択的に結合する分子を「プローブ」と呼ぶ）を固定化したチップに対して、細胞から抽出した DNA や RNA を反応させた後、蛍光標識を行うことにより検出する。一塩基多型（Single nucleotide polymorphism, SNP）を解析するための最新の市販品では、一度に 100 万種類以上の遺伝子マーカー解析が可能であり、網羅的分子発現解析の代表技術として広く利用されているが、解析を行うためには多数の細胞が必要となるため、元来、ヘテロな集団として構成されている個々の細胞の情報、特に集団中に存在する少数の特徴的な細胞の情報が埋もれてしまい、これを同定して検出することは難しい。また、これら特徴的な細胞が他の細胞と実際にどのような空間配置であったのかという空間分布情報も失われてしまうという問題が残っている。

細胞の空間配置を維持したまま標的分子を検出する技術としては、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法や免疫蛍光抗体法がある^{3,4)}。細胞の標的分子に対して蛍光標識を施した DNA プローブや抗体プローブを反応させることにより（あるいはプローブ分子反応後に蛍光標識を行うことにより）、細胞内や細胞表面の標的分子を可視化することができる。この方法ではたしかに細胞内発現分子の空間分布情報が保持されるが、蛍光色素を標識として利用するため、同時検出が可能な標的分子数は蛍光エネルギー移動等の問題から 4 種類程度が上限であるのが現状である。また、光学的手段を使うため、原理的な空間分解能の限界はその波長分解能程度となり、nm オーダーでの空間分解能を持った標的分子の計測や、1 分子単位のカウントが可能な定量的計測は困難であるのが現状である。

すなわち、細胞の性質を特徴付ける多量の標的分子を、空間分布情報を保持したまま同時に、かつ網羅的に、1 細胞単位で計測するためには、従来の光学計測法に代わる新たな計測技術を開発する必要がある。

2. 「アダプティブ電子顕微鏡」計測技術の原理

我々は、標的分子の空間局在分布を 1 細胞単位で網羅的に計測することを可能とするために、従来の蛍光標識と光学計測の組み合わせから脱却し、新たなコンセプトを提案することにした。それは様々な粒径・元素のナノ粒子を作製してその表面に DNA や抗体などの様々なプローブをそれぞれ固定化して標識プローブセットとし、その微粒子プローブセット

[†] 〒 101-0062 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10

TEL: 03-5280-8046; FAX: 03-5280-8049

* E-mail: yasuda.bmi@tmd.ac.jp

2011 年 11 月 14 日受付

を観察したい対象（この場合は細胞）と相互作用（反応）させた後、細胞表面や細胞内の標的分子と結合した微粒子プローブセットの種類と数、空間分布を電界放出形走査電子顕微鏡（FE-SEM）で定量的に特定することにより、網羅的かつ定量的分子発現解析を1細胞単位で、空間分布情報を保持したまま行うことを目指すものである（図1）。これは、サイズが異なる金ナノ粒子を利用して標的分子を標識する従来の一般的な免疫電子顕微鏡法⁵⁾に対して、標識材の多様性を粒径軸に加えて元素軸にも拡張するものである。これにより、標的分子を高空間分解能で、かつ網羅的に標識・検出・同定することが可能となる。微粒子プローブセットの計測ではFE-SEMを使用しており、現状では乾燥状態の試料を用いて評価を行っているが、乾燥によるアーティファクトを回避したい場合は本技術をクライオ電子顕微鏡法に適用して計測を行う。従来の蛍光ライブイメージングに加えて、標的分子の高空間分解能・網羅的計測を本技術により可能とすることにより、1細胞計測解析をより詳細に推進することが可能となる。

元素の種類の特定では、標識として用いるナノ粒子の粒径や元素の種類、粒子を構成する元素の膜厚（後述）が厳密に制御されていることを効果的に利用して、反射電子計測（Backscattered electron 計測、以下 BE 計測）によるナノ粒子元素と粒径の定量的測定を実現する方法を開発している。その基本原理は以下の通り、非常にシンプルである。まず、ナノ粒子の元素同定については、既知の同定しやすい元素の組み合わせを標識粒子セットの素材に選んだ上で、一般に重い元素ほど電子を多く反射するため BE 画像中で明るく表示されることを利用する^{6~8)}。これにより元素の種類は BE 像中の輝度コントラストの差として判別可能で、空間分解能は特性 X 線分析などの方法と比べて高く、また計測時間も相対的に短い特長がある。FE-SEM 観測条件を固定した上で標識として利用するナノ粒子を粒径・元素毎に BE 輝度を予め計測してライブラリを構築しておき、標的分子標識実験で検出された未知のナノ粒子プローブをライブラリと照合することにより、ナノ粒子の元素の種類、すなわち検出された標的分子の種類を特定することができる。ナノ粒子の BE 輝度ラ

イブラリを精細に作製することにより、本技術は様々な試料環境に対して適応可能であることから、「アダプティブ電子顕微鏡」技術と呼んでいる。以下、アダプティブ電子顕微鏡技術の要となる2つの要素技術、ナノ粒子プローブの作製法と、BE 計測による異なる元素の識別法について、基礎技術検討結果を紹介する。

3. 様々な元素で構成されたナノ粒子プローブセットの作製

一般的な自己重合法や粉砕法によるナノ粒子作製技術では、材質により作製の方法と難易度が異なり、また粒径分布幅も変動係数（CV）20%程度とばらつきが大きい。我々は簡便な方法で粒径が揃った様々な元素のナノ粒子作製を可能とするために、ポリスチレン球を鋳型として、その表面に元素薄膜を被覆してナノ粒子を作製する技術を開発した⁹⁾。具体的な手順は、次のとおりである（図2）。はじめに、ポリスチレン球懸濁液に適量の塩を加えた溶液をガラスやシリコンなどの平坦基板に滴下することにより、基板上にポリスチレン球を単層固定化する。必要に応じて、基板上のポリスチレン球に対して数秒のプラズマエッチング処理を行うことにより、大きなポリスチレン球を削って任意の直径のポリスチレン球を作製する。次に真空蒸着法を利用して、金や銀、ニッケルなど、作製を望む元素で基板上のポリスチレン球表面を被覆する。その後、UV-オゾン処理などの有機物分解処理を行い、鋳型ポリスチレン球を除去して中空カップ状のナノ粒子を得る。作製したナノ粒子を溶媒中に分散させる場合は、任意の溶媒をナノ粒子の上に滴下した後、ナノ粒子が附着している基板の裏側から卓上超音波洗浄機などを使用して超音波を当てることにより、滴下した任意の溶媒中にナノ粒子を分散させることができる。

この手法の最大の特長は、蒸着可能な元素種であればどのようなナノ粒子でも作製可能であり、また、2重、3重シェル構造の粒子を容易に作製できることである¹⁰⁾。また、サイズ校正用途として利用されているポリスチレン球の粒径分布幅は小さいため（CV 値5%以下）、サイズが揃った粒子を作製可能である。さらに真空蒸着法を利用しているため、元素

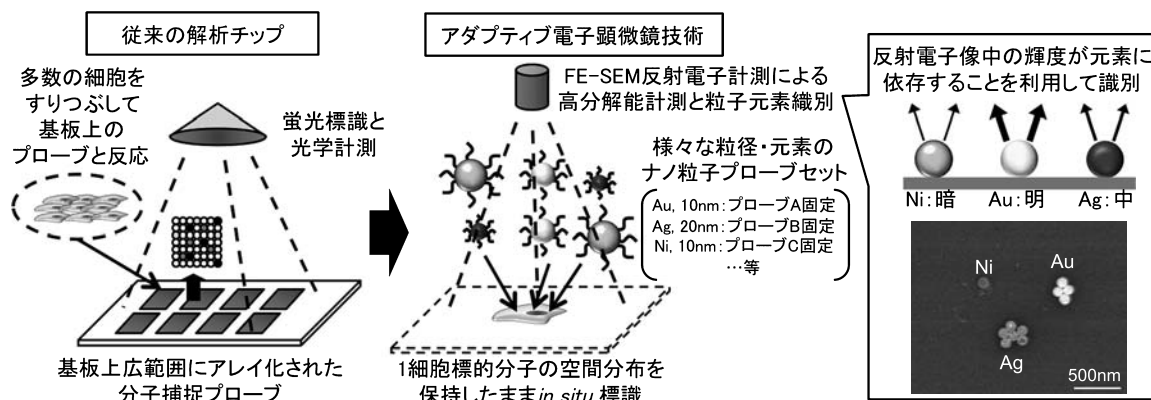


図1 アダプティブ電子顕微鏡技術の原理。

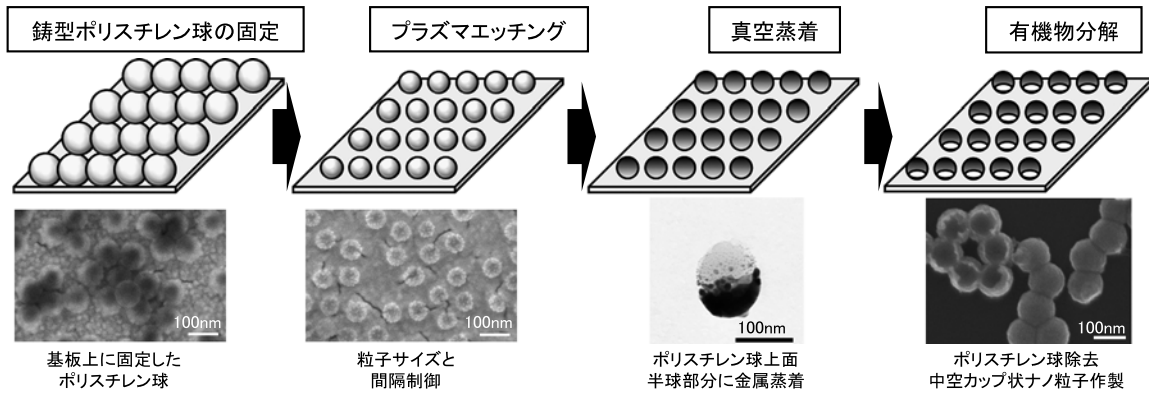


図2 中空カップ状ナノ粒子の作製法⁹⁾。 鋳型となるポリスチレン球を基板上に配置後、プラズマエッチング処理を行い希望の直径とする。その後、真空蒸着によりポリスチレン球上面半球部分を目的元素で被覆した後、UV-オゾン処理等の有機物分解処理によりポリスチレン球鋳型を取り除き、中空カップ状ナノ粒子を得る。図中のFE-SEM写真では、写真左側のナノ粒子で中空カップの開口部空洞部分が見えている。

の膜厚もナノメートルレベルで制御可能である。BE計測でのナノ粒子輝度は特に元素膜厚に依存するが、我々の方法では膜厚を厳密制御した粒子を作製できるからこそ、BE輝度が揃った標識ナノ粒子を作製できる。我々は本技術を利用することにより、粒径30 nmから100 μmの範囲で31種類、元素19種類、合計589種類の粒子を作製することに成功している。鋳型ポリスチレン球はプラズマエッチング処理により任意の粒径を作製可能で、元素の種類は蒸着もしくはスパッタ可能な種類であればどのようなものでも作製可能であり、複層シェル構造の粒子やアロイ金属まで含めると、作製可能な粒子の種類は上記の数に留まらず膨大である。

アダプティブ電子顕微鏡技術開発では、作製したナノ粒子をBE計測で識別する方法を検討している。図3はその一例として、直径100 nmの粒子にゲルマニウムを10 nm蒸着した後、UV-オゾン処理を行い、ポリスチレン球を取り除いた中空状ナノ粒子の2次電子像(Secondary electron像、以下SE像)とBE像、さらには比較のためのポリスチレン球除去前のSE像、BE像である⁹⁾。SE像(図3a)は対象の表面構造観察に適しており、作製した中空カップ状ナノ粒子の開口部が明瞭に観察されている。一方、SE像には観察対象の元素情報は含まれないため、粒子の元素特定は難しい。そのため、粒子の元素特定を行うためにはBE計測が必要となる。ポリスチレン球除去前後のBE像を比較すると、ポリスチレン球を除去した場合(図3b)はBE計測において1粒子内の輝度ムラがなく、均一である一方、ポリスチレン球を除去しなかった場合(図3d)は、ポリスチレン領域とゲルマニウム領域で電子の反射量が異なるため、1粒子内に明らかな輝度分布差が生じている。アダプティブ電子顕微鏡技術でナノ粒子の元素種類を正確に特定するためには1粒子内の輝度分布が均一である必要があるが、図3に示したBE像から明らかであるとおおり、鋳型ポリスチレン球を除去して中空カップ状ナノ粒子とすることにより、BE輝度ムラの無い、元素特定に適した標識ナノ粒子を作製できることが分かった。

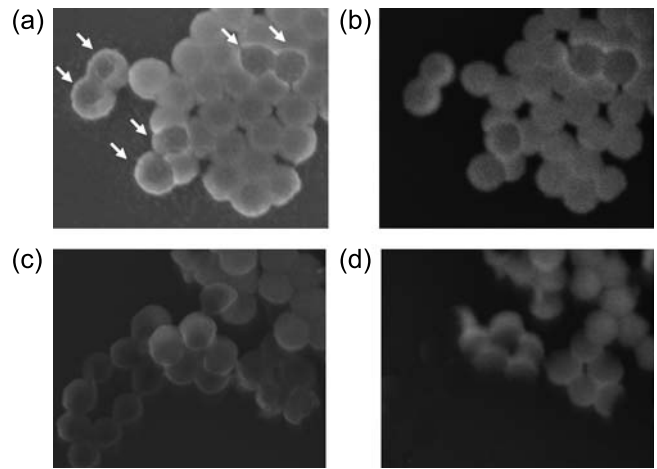


図3 直径100 nmのポリスチレン球にゲルマニウムを10 nm蒸着した後、UV-オゾン処理を行い、ポリスチレン球を取り除いた中空状ナノ粒子のSE像(a)とBE像(b)、および、比較のためのポリスチレン球除去以前の同粒子のSE像(c)とBE像(d)⁹⁾。図中の矢印は中空カップ状ナノ粒子の開口部を示す。(Bar = 100 nm)

4. BE計測による薄膜状元素の定量識別

次に、BE計測による元素識別分解能を評価するために、中空カップ状ナノ粒子の膜厚と同程度の薄膜を基板上に形成した試料をモデルとして、元素膜厚とそれに最適なBE計測条件の関係評価を行った。試料はシリコン基板上に金(Au)、銀(Ag)、ゲルマニウム(Ge)、銅(Cu)、鉄(Fe)の5種類の元素を50 nmの厚さで真空蒸着法により蒸着し、シリコン(Si)を含む計6種類の元素が同一視野中にて観測可能な条件下で入射電子線加速電圧Vを3 kVから30 kVまで1 kVずつ変化させつつBE画像を取得し、元素間の輝度コントラストが最大となる条件を評価した(図4a)¹¹⁾。加速電圧を計4度上下させて計測することにより、加速電圧上昇と下降に対する電子銃特性のヒステリシスの有無を同時に計測し

た。BE 計測は入射電子に対して 16° から 60° の反射角度間の電子を検出することにより行った。また、BE 画像中の各元素輝度は画像解析ソフトウェアを用いて 8 ビット階調として計測した。

異なる V で得られた BE 画像中の各元素輝度値を比較評価するためには、規格化を行う必要がある。本研究では、得られた BE 画像中において最も明るい元素の輝度値を I_{max} 、最も暗い元素の輝度値を I_{min} とした時、規格化した元素 Z の薄膜の BE 輝度値 \tilde{I}_Z を

$$\tilde{I}_Z \equiv (I_Z - I_{min}) / (I_{max} - I_{min}) \quad (1)$$

により定義して規格化を行った^{11,12)}。ここで I_Z は規格化前の元素 Z の輝度値であり、 I_{max} は本研究での試料の場合 Au の輝度に、 I_{min} は Si の輝度に相当する。図 4 (b) は、 V と \tilde{I}_Z の関係をプロットしたグラフである¹¹⁾。 $\tilde{I}_Z = 100\%$ は Au の輝度値に、 $\tilde{I}_Z = 0\%$ は Si の輝度値に相当する。4 回の繰り返し測定に対する CV 値は 1-4% の範囲であり、 V の上下によるヒステリシスの影響はほとんど無く、再現性の高い計測結果を得ることができた。

アダプティブ電子顕微鏡法では多種類の元素ナノ粒子標識

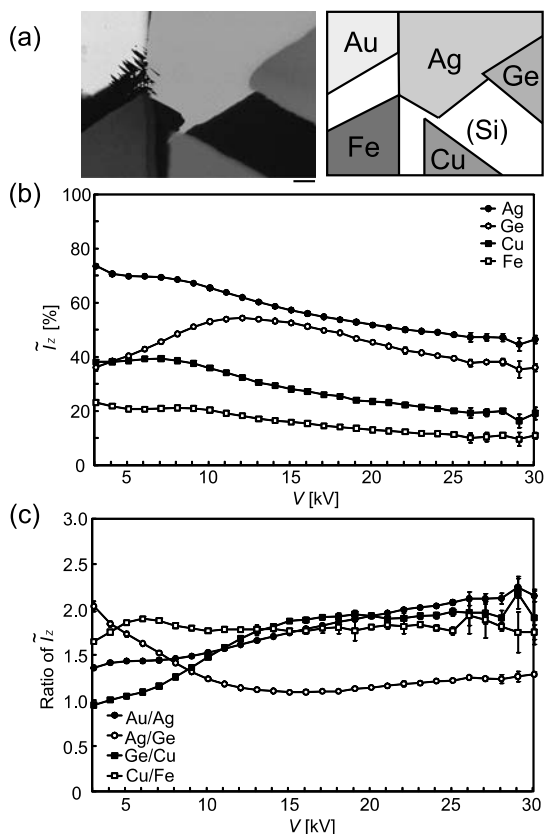


図 4 6 種類の元素 (Au, Ag, Ge, Cu, Fe, Si, 膜厚 50 nm) BE 輝度の加速電圧に対する依存性¹¹⁾。(a) 試料を加電圧 5 kV で観察した場合の BE 像。(Bar = 5 μ m) (b) 相対 BE 輝度 \tilde{I}_Z と加速電圧 V の関係。 $\tilde{I}_Z = 100\%$ は Au の輝度値に、 $\tilde{I}_Z = 0\%$ は Si の輝度値に相当する (本文参照)。(c) 原子番号が近接する元素薄膜間の \tilde{I}_Z の比と V の関係。

プローブを同時に識別することを目指すため、特定の元素間輝度差のみが最大となる条件ではなく、計測対象全ての元素の BE 輝度比が最大となる条件、すなわち、計測対象中で最も識別が難しい元素間の BE 輝度比が最大となる条件で観測を行うことが望ましい。これを識別最適条件と定義する。図 4 (c) は原子番号が近接する元素薄膜間の \tilde{I}_Z の比をまとめたグラフである¹¹⁾。識別最適条件は図 4 (c) 中の Ag/Ge と Ge/Cu が交差する点に相当し、その際の V の値は 8.8 kV であった。交点での \tilde{I}_Z の比の値は約 1.3 であることから、BE 像の輝度コントラストを利用した識別方法で Au, Ag, Ge, Cu, Fe, Si の 6 種類の元素を 1.3 倍以上の輝度比で識別することが可能であると結論づけた。この結果は、BE 輝度分布幅が少なくとも 30% 以下となるような、均一なナノ粒子標識を作製する必要があることを意味する。BE 輝度が粒径と元素膜厚に依存すると考えた場合、直径 100 nm のポリスチレン球鑄型の粒径 CV 値は 3% 以下、作製したナノ粒子の CV 値も 5% 以下であり⁹⁾、また、50 nm 膜厚の薄膜を真空蒸着法により作製する際の膜厚 CV 値は 10% 以下であることを確認している。すなわち、本研究でのナノ粒子作製技術を利用すると BE 輝度が極めて均一な粒子を作製できるため、1.3 倍の輝度比により十分に識別可能であると考えている。

アダプティブ電子顕微鏡法で標的分子を標識するためには、様々な元素のナノ粒子表面にプローブ生体分子を固定化しなければならない。そのための簡便な方法は、ナノ粒子を 2 層構造とし、1 層目を様々な元素、2 層目を薄い Au の層とすることである。Au 表面にはチオール基が容易に結合することが広く知られているため、これにより、どのような元素の粒子にもチオール基を介して分子を固定化することが可能で、DNA を例とした場合では 2 nm の Au 層を形成することにより十分に分子を固定可能であることを確認している¹³⁾。この 2 層構造ナノ粒子を BE 計測にて識別可能であるか評価するために、図 4 の試料表面上にさらに Au を 2, 5 もしくは 10 nm 蒸着して、同様の BE 輝度比評価を行った (図 5)¹²⁾。識別最適条件での V の値は、Au 層が無い場合 (図中の点線, 8.8 kV) に比べ、表面の Au 層が 2, 5, 10 nm と厚くなるにつれて 9.0 kV, 9.4 kV, 10.2 kV と高くなることが分かった。Au 層膜厚と識別最適条件の V の値の関係は、傾き 143 V/nm の線形関係であり ($R^2 > 0.99$)、これは入射電子の試料表面への潜り込み深さに関係していると考えられる。また、その際の \tilde{I}_Z の比の値は変わらず約 1.3 であった。すなわち、10 nm 以下の Au 層を 2 層目として形成した場合でも V を適切に設定することにより、Au 層が無い場合と同様の輝度コントラスト比で識別可能であることが分かった。

モデルとして使用した平坦薄膜試料の評価結果が球状のナノ粒子プローブに適用可能であるか評価を行った。直径 200 nm と 300 nm の Ge (50 nm) \cdot Au (5 nm) 2 層構造粒子を作製し、 V と \tilde{I}_Z の関係を測定した (図 6)¹²⁾。その際、直径 500 nm の Au (膜厚 55 nm = Au50 nm + Au5 nm) 粒子を同時計測して I_{max} とし、また Si 基板の BE 輝度を I_{min} とした。

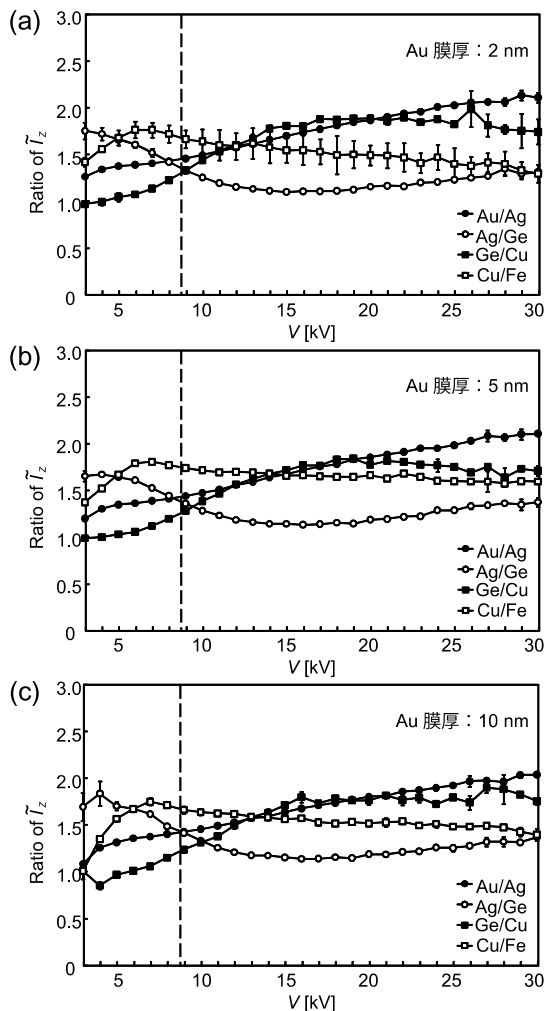


図5 図4の試料に対して、さらにAu薄膜を2層目として2 nm (a), 5 nm (b), 10 nm (c) 積層した場合の、近接する元素薄膜間の \bar{I}_z の比とVの関係¹²⁾。

図5でのGe (50 nm)・Au (5 nm)の結果と比較したところ、Vが10–20 kVの範囲で誤差6%以内であった。また、直径200 nmと300 nm粒子の \bar{I}_z を比較した結果、3–30 kVの範囲で誤差10%以内であった。即ち、一般的に観測に広く用いられる加速電圧10–20 kV程度の範囲では、平坦薄膜の結果はナノ粒子に対しても誤差6%以内で適用可能であり、かつ粒径の影響も直径1.5倍の差に対して誤差10%以内であることが分かった。

5. まとめ

標的分子の空間局在分布を1細胞単位で網羅的に計測することを可能とするために、様々な粒径・元素のナノ粒子を作製して標識プローブセットとし、標的分子を標識後、粒子の元素種類をBE計測により特定する、アダプティブ電子顕微鏡技術の要素技術開発について紹介した。真空蒸着法を応用して500種類以上の中空カップ状ナノ粒子を作製することに成功し、粒径と元素膜厚が均一であることから、BE計測時

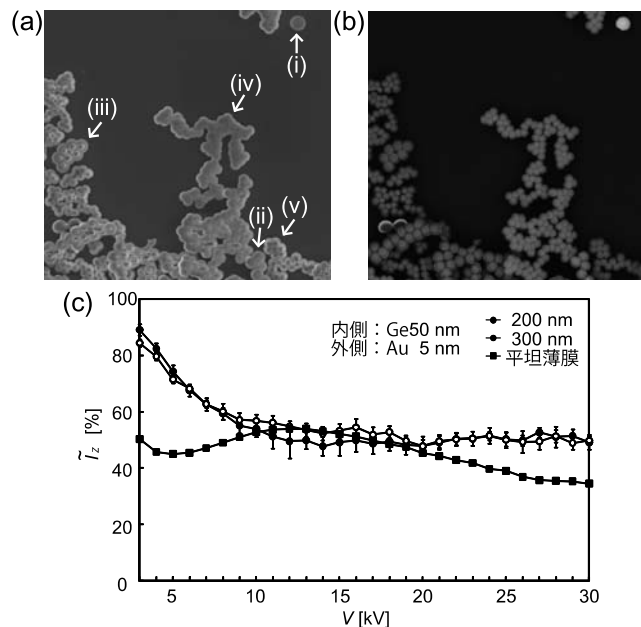


図6 平坦薄膜試料と中空カップ状ナノ粒子のBE輝度比較¹²⁾。(a) 内層Ge (膜厚50 nm)、外層Au (5 nm) 2層構造の、直径200 nmおよび300 nmナノ粒子を混合しSi基板に滴下した試料のSE像。BE輝度基準とするためにAu粒子 (直径500 nm、膜厚55 nm)を加えてある。图中、(i) 輝度基準のAu粒子、(ii) Ge粒子300 nm径、開口部が基板向き、(iii) Ge粒子300 nm径、開口部が上向き、(iv) Ge粒子200 nm径、開口部が基板向き、(v) Ge粒子200 nm径、開口部が上向きである。(b) 同試料のBE像。(c) 200 nm径、300 nm径粒子および同膜厚の平坦薄膜試料 (図5b中のGe) の \bar{I}_z とVの関係の比較。

の輝度が揃っており、アダプティブ電子顕微鏡技術のコンセプト達成に適していることが分かった。また、薄膜試料を用いたBE計測評価では、少なくとも6種類の異なる元素を輝度比1.3倍以上で識別可能であることを確認し、さらにその上に10 nm以下のAu層を形成した場合も適切な加速電圧値を選択することにより、同様の輝度比で識別可能であることを示した。今後はそれぞれのナノ粒子標識に様々なプローブを固定化し、細胞内分子を網羅的に同時検出する評価へとつながる予定である。

6. 謝辞

本研究は財団法人神奈川科学技術アカデミー創造展開プロジェクト事業の支援を受けて推進されました。電子顕微鏡計測評価全般について、日本電子株式会社工藤政都様、根岸勉様のご助力をいただきました。研究推進では財団法人神奈川科学技術アカデミー草野敦子補助員、笹島美佐補助員、阿部陽子補助員、三神裕美補助員、村上麻希補助員、菅沼由佳補助員、麻生くみ補助員の補佐をいただきました。ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O.: *Science*, **270**, 467–470 (1995)
- 2) Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H. and Brown, E.L.: *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1675–1680 (1996)
- 3) Rudkin, G.T. and Stollar, B.D.: *Nature*, **265**, 472–473 (1977)
- 4) Nederlof, P.M., Robinson, D., Abuknesha, R., Wiegant, J., Hopman, A.H., Tanke, H.J. and Raap, A.K.: *Cytometry*, **10**, 20–27 (1989)
- 5) Koeck, P.J.B. and Leonard, K.R.: *Micron*, **27**, 157–165 (1996)
- 6) Neubert, G. and Rogaschewski, S.: *Physica Status Solidi A Appl. Res.*, **59**, 35–41 (1980)
- 7) Niedrig, H.: *J. Appl. Phys.*, **53**, R15–R49 (1982)
- 8) Jablonski, A., Hansen, H.S., Jansson, C. and Tougaard, S.: *Phys. Rev. B*, **45**, 3694–3702 (1992)
- 9) Kim, H., Takei, H. and Yasuda, K.: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **49**, 048004 (2010)
- 10) Kim, H., Hayashi, M., Terazono, H., Takei, H. and Yasuda, K.: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **50**, 06GJ03 (2011)
- 11) Kim, H., Negishi, T., Kudo, M., Takei, H. and Yasuda, K.: *J. Electr. Microsc.*, **59**, 379–385 (2010)
- 12) Kim, H., Negishi, T., Kudo, M., Takei, H. and Yasuda, K.: *J. Surf. Anal.*, **17**, 341–345 (2011)
- 13) Kim, H., Takei, H. and Yasuda, K.: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **49**(8), 087001 (2010)