

## 走査型イオン伝導顕微鏡のバイオサイエンスへの応用

## Application of Scanning Ion Conductance Microscopy to Biosciences

中島 真人, 牛木 辰男

Masato Nakajima and Tatsuo Ushiki

新潟大学大学院医歯学総合研究科 顕微解剖学分野

**要旨** 走査型イオン伝導顕微鏡 (SICM) は, 1989年に Hansma らが紹介した顕微鏡で, 内部を電解質で満たしたマイクロガラスピペット電極を探針として, 液中に留置した対照電極との間に生じたイオン電流を信号として用いている. このイオン電流は, マイクロガラスピペット電極の先端が試料に近接して遮蔽されることで減少するため, この現象を利用しながらマイクロガラスピペット電極を走査して, 試料表面の立体形状を画像化することができる. SICMは柔軟かい生物試料を液中で立体観察する道具として期待されていることから, 本稿では, その原理を簡単に解説し, 筆者らのバイオサイエンスへの応用例の一端を紹介した. まず, SICMによるコラーゲン細線維の液中観察像を示し, 次に, 化学固定した培養細胞と, 生きた細胞の形状変化観察への応用を示した. さらに気管線毛上皮などの組織観察への応用を示した. また, 走査型電子顕微鏡の像と比較し, SICMの特徴と今後のバイオサイエンスへの応用の可能性について論じた.

**キーワード**: 走査型イオン伝導顕微鏡, 走査型プローブ顕微鏡, ホッピングモード, コラーゲン細線維, 培養細胞

## 1. はじめに

走査型プローブ顕微鏡 (scanning probe microscope: SPM) は, 1982年に考案された走査型トンネル顕微鏡 (scanning tunneling microscope: STM)<sup>1)</sup>に端を発する一連の顕微鏡の総称である. これらの顕微鏡は, レンズの代わりに鋭い探針(プローブ)を使用し, 探針を試料に近接させた際に両者の相互作用で生じる物理情報や化学的性質を信号として取得する. さらにその信号を制御しながら探針で試料表面を走査することで, 試料表面の画像情報を得ることができる. このうち現在, 生物学領域で最も使用されている SPMは原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM)<sup>2)</sup>であるが, この場合, 探針と試料との間に生じる斥力や引力などの相互間力を信号とし, これを制御することで試料表面の立体形状を得ている.

一方, 走査型イオン伝導顕微鏡 (scanning ion conductance microscope: SICM)<sup>3)</sup>は走査型イオンコンダクタンス顕微鏡とも呼ばれ, マイクロガラスピペット電極を探針として使用し, 試料を浸した電解質液中に留置した対照電極との間に生じるイオン電流の変化を利用して, 試料表面の立体形状を画像化するもので, 柔軟かい生物試料の液中観察に期待が寄せられている. 著者らも, 最近この顕微鏡をさまざまな生物試料の観察に応用し, その可能性を検討している.

そこで本稿では, まず最初に SICMの原理と概要を説明し, 次に著者らが試みている生物応用例を紹介し, SICMの今後の可能性について考察することにする.

## 2. SICMの原理と概要

SICMの原理は1989年に Hansma らによって最初に報告された. すでに上でも述べたように SICMでは, 探針にマイクロガラスピペット電極を使用する. この電極は中空のマイクロガラスピペットの内部に塩化銀でコートした銀電極を挿入して, 電解質液で満たしたものである (図 1a). 一方, 試料を浸した電解質溶液中には別の銀電極が対照電極として留置されているので, 二つの電極間に電圧を加えるとイオン電流が生じる. このイオン電流を測定しながらピペットを試料へ近付けると, 探針が試料に近接したある時点から, ピペット先端が遮蔽され, イオン電流が減少する (図 1b). このように探針・試料間距離によってイオン電流が変化する現象を指標として, ピペットの動きを制御することで, 試料表面の形状を SICMで測定することができる.

私たちが現在, 主に使用している装置 (XE-Bio system, Park Systems Corp. 図 2) は, 倒立顕微鏡のステージ上に SICMが搭載されている. この装置では水平方向 (x, y 方向) の走査を行う圧電素子 (x, y スキャナ) が倒立顕微鏡のステージ上に配置され, 垂直方向 (z 方向) の走査を制御する圧電素子 (z スキャナ) は独立してマイクロガラスピペット電極側に配置されている. 測定の際に2つの電極は電解質液に浸かっているため2電極間にイオン電流が生じるが, これをアンプで増幅しモニターする. このイオン電流を指標にして z スキャナを制御しながら試料表面の走査を行い, 一方で z スキャナ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を取得することができる.

〒951-8510 新潟県新潟市中央区旭町通1番町757  
2013年8月27日受付

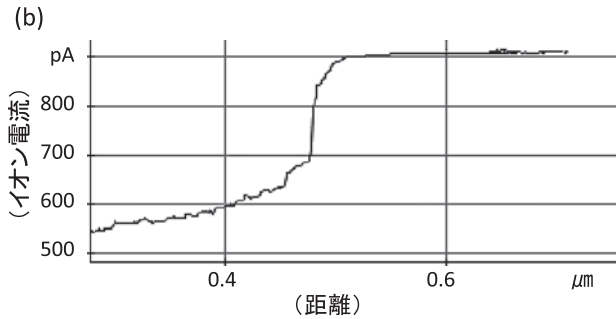
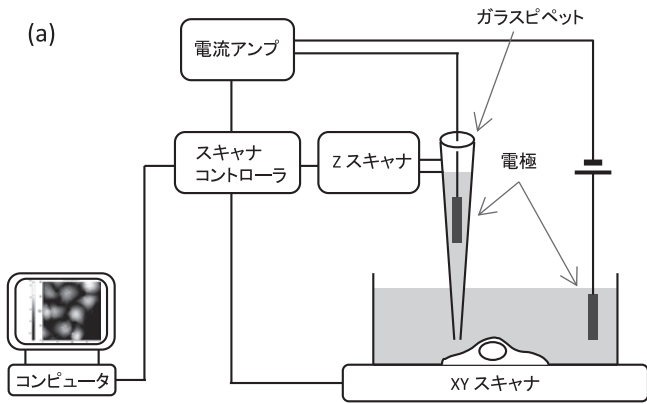


図1 SICM装置の概略 (a) とアプローチカーブ (b).

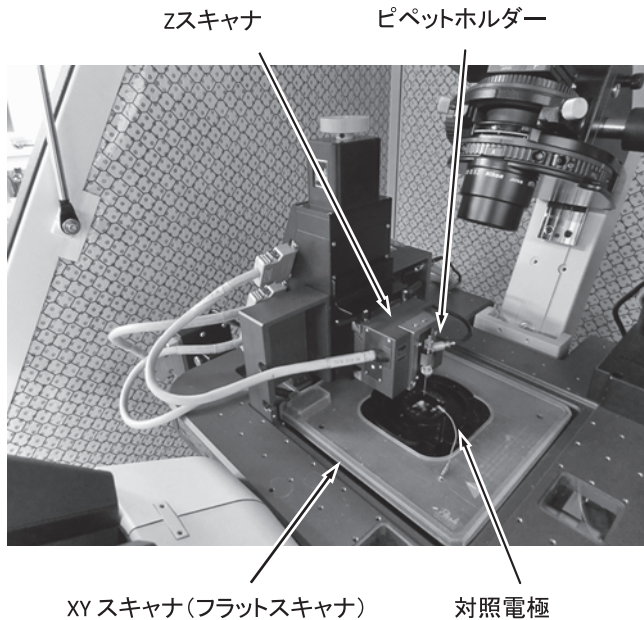


図2 私たちが実際に使用しているSICMの装置 (XE-Bio system). 倒立顕微鏡のステージ上にSICMのシステムが搭載されている。

SICMでピペットを走査する方法にはいくつかのモードがある (図3)。

1) 直流モード。

イオン電流の変化が検出できる近さまでピペットを接近させた後に、この状態を維持して試料表面をなぞるように走査

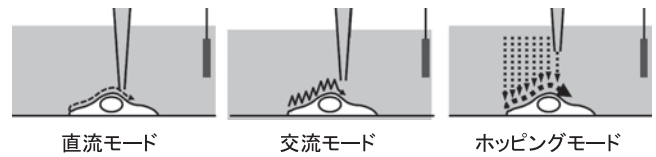


図3 SICMにおけるプローブの走査方法. ホッピングモードではピペットを上下に大きく動かすのが特徴である。

し、表面像を得るものである。

2) 交流モード。

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検出する。この場合、ピペットが試料に接近すると、イオン電流が減少することで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。

3) ホッピングモード (またはバックステップモード)。

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、その後に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。この際ピペットが試料に近接するとイオン電流が減少するので、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、イオン電流が閾値まで減少したところでピペットを上げる。こうしてピペットを上下することで、各走査点における高さ情報を取得することができる。他の2つのモードと異なりこのモードでは、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。

一般に生物試料は凹凸が激しいことから、ホッピングモードが有用である。なおマイクロガラスピペットは通常ポロシリケートのキャピラリー管 (内径0.1 mm, 外径1 mm) をレーザー・プレーで引いて、先端内径が100 nm程度、外径が200 nm程度にしたものを用いた。また、測定時の電圧は約100 mV、電流の大きさは約1 nAとし、測定においてはイオン電流の0.6 ~ 2%減衰を閾値とした。

3. SICMを用いた生物試料観察

3.1 コラーゲンのSICM観察

コラーゲン細線維<sup>5)</sup>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ているので、SICMの能力をAFMと比較する上では都合のよい試料である。まずコラーゲン細線維束からなる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すように伸展することで、コラーゲン細線維をほぐしてガラス上に展開した。次に、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、ホッピングモードSICMで観察した (図4)。この方法で、コラーゲン細線維が縦横に走る様子や、重なり合う細線維の関係を液中で明瞭に観察することができた。SICM像には高さ情報が含まれることから、図4の破線で示した部分の断面像を解析してみると、矢印の部分では高さが944 nm、幅が308 nmであることがわかる。これは、この標本ではコラーゲン細線維がガラスから離れて、



実な像が得られていることを想像させるものであるし、SEMでは収縮がさげられないことを意味している。

さて、固定した培養細胞の観察は、これまでAFMによっても行われてきたが、AFMでは探針が試料に加える力のダメージにより、細胞表面の微細な細胞質突起の観察が難しかった。しかしSICMではこうした微細な細胞質突起についても、液中で忠実に画像化することが可能であった。もっともHeLa細胞のように細く長い細胞質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ためか、SICMでも観察出来ないこともある点は注意する必要がある。

SICMの特徴を考えれば、生きた細胞の観察はさらに興味ある課題である。そこで、電解質液をリン酸緩衝液から細胞培養のための培地に変えて、5% CO<sub>2</sub> 環境下で、生きた（未固定の）HeLa細胞の観察を行った。図6は、撮影時間を1枚あたり約10分として連続撮影を行ったもので、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、あるいは細胞分裂後の細胞の分離などの運動が観察された例である。ただしホッピングモードでは、一枚の画像を取得するために数十分かかるのが一般的で、スピードをあげても現状での撮影時間は128×128ピクセルの画像で1枚あたり約6分程度が限界である。

### 3.3 組織試料の観察

以上のようにホッピングモードSICMは、高さの変化に富んだ柔らかい生物試料においても、液中で標本に力を加えることなく走査できる利点がある。そこでこの利点を利用して、走査型電子顕微鏡と同様の組織片の観察が可能かどうかを

ラットの気管壁やラットの腎糸球体を用いて検討した(図7)。まず2%グルタルアルデヒドで灌流固定を行ったラットから気管を摘出し、切開を加えて内腔を露出させ、気管内面が上を向くようにガラスに貼りつけ、これをホッピングモードSICMで観察した。これにより線毛(繊毛)細胞の線毛や、分泌細胞の微小な突起を明瞭に観察することができた。また、腎糸球体については、同様に固定したラットから腎臓を摘出し、マイクロスライサーにて50~100 μmの切片を作成した後、これをガラスに貼りつけ、ホッピングモードSICMで観察した。その結果、糸球体の血管を取り巻く足細胞の形状が走査型電子顕微鏡像と比較できるレベルで明瞭に観察することができた。これらの所見は、スキャナの可動範囲によって制約はあるものの、凹凸の激しい多様な組織にSICMが利用できる可能性を示すものである。

### 4. 今後の展望

本稿では、SICMの原理と概要、さらに現在までに著者らが行ってきた生物試料観察の一端を紹介した。SICMの魅力は、液中で柔らかい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。SICMの分解能は同じSPMの仲間であるAFMに比べるとそれほど高くないが、内径100 nmほどのピペットを用いた場合でも50 nm以下の分解能が得られることから、細胞や組織表面の観察においては十分な解像度を持っているともいえるだろう。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も対応が可能な点も魅力である。これらの点で、従来の

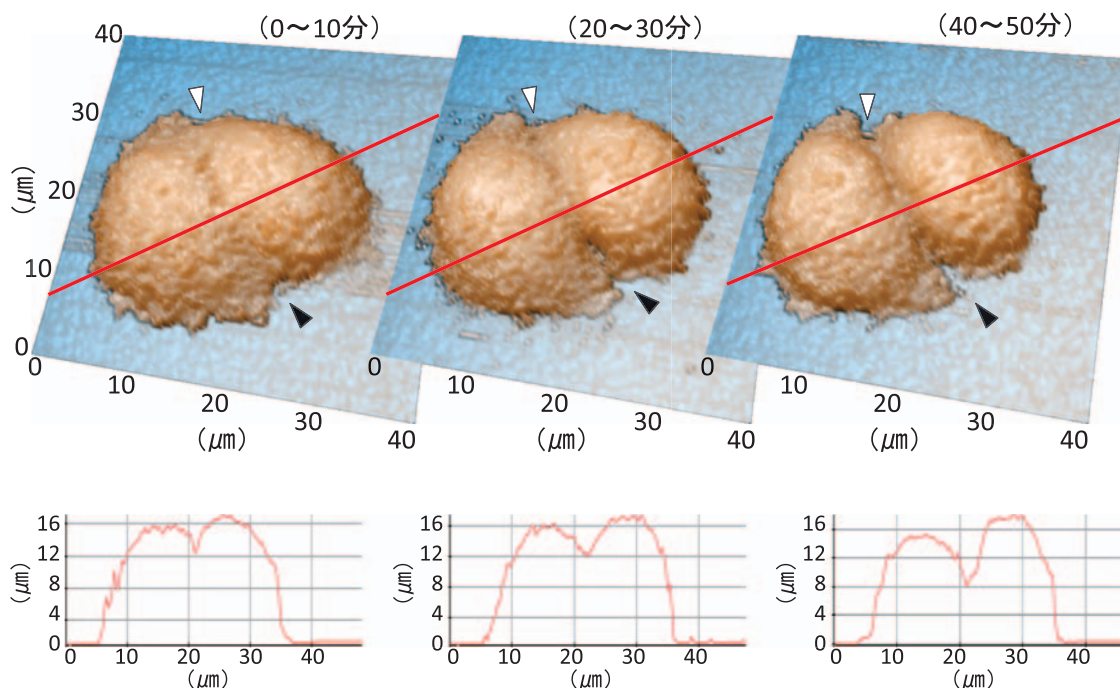


図6 生きたHeLa細胞のSICM観察。細胞分裂を終えたばかりの間期の細胞を示す。上は1枚あたり約10分の撮影時間で連続撮影した画像(128×128ピクセル)を1枚置きに並べたもの(すなわち20分毎の観察)。下は各図の実線部の断面像をしめす。細胞頂上部の微小突起の変化や分裂後の2つの細胞が徐々に分離する様子(矢尻)が観察できる。

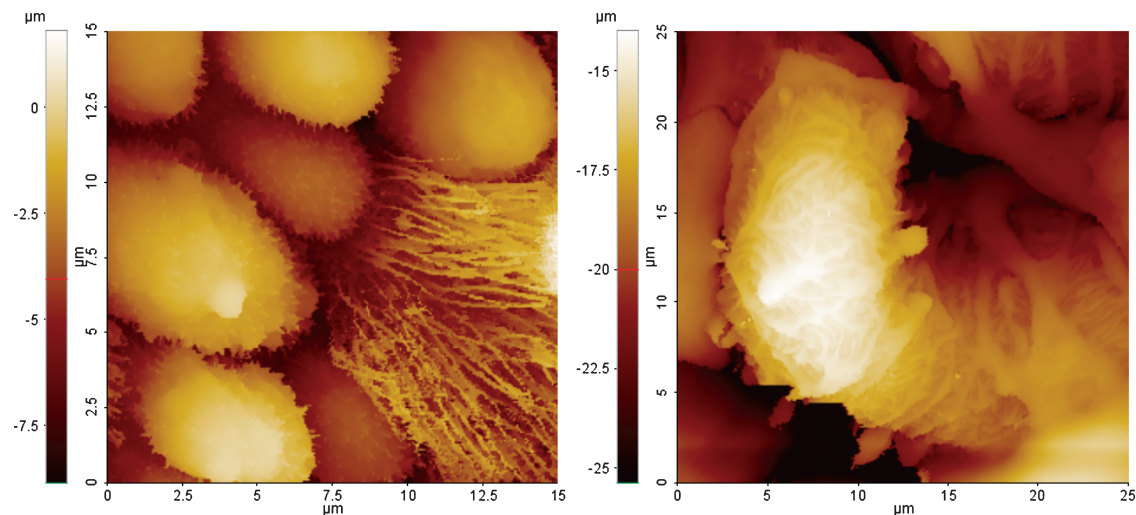


図7 ラット気管内面のSICM像(左)と腎糸球体のSICM像(右)

AFM 観察では難しかった培養細胞の表面形状観察において、今後その利用が大いに期待される。また、時間分解能の問題はあるものの、生きた細胞の観察において、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る可能性は、今後さらに検討すべき課題である。実際に細胞表面のエンドサイトーシス(細胞が細胞外の物質を取り込む過程の1つ)の像をSICMで観察した報告も既に行われている<sup>10)</sup>。

またSICMで使用するガラスピペット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パッチクランプのように測定することに利用できるという報告もある<sup>11)</sup>。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方法や、光学顕微鏡との組み合わせ観察など、SICMを用いた今後の生物応用のさらなる発展が期待されはじめています。

#### 文 献

- 1) Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. and Weibel, E.: *Phys. Rev. Lett.*, **49**, 57–61 (1982)
- 2) Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C.: *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 930–933 (1986)
- 3) Hansma, P.K., Drake, B., Marti, O., Gould, S.A. and Prater, C.B.: *Science*, **243**, 641–643 (1989)
- 4) Ushiki, T., Nakajima, M., Choi, M., Cho, S.J. and Iwata, F.: *Micron*, **43**, 1390–1398 (2012)
- 5) Yamamoto, S., Hashizume, H., Hitomi, J., Shigeno, M., Sawaguchi, S., Abe, H. and Ushiki, T.: *Arch. Histol. Cytol.*, **63**, 127–135 (2000)
- 6) Korchev, Y.E., Bashford, C.L., Milovanovic, M., Vodyanoy, I. and Lab, M.J.: *Biophys. J.*, **73**, 653–658 (1997)
- 7) Gorelik, J., Zhang, Y., Shevchuk, A.I., Frolenkov, G.I., Sánchez, D., Lab, M.J., Vodyanoy, I., Edwards, C.R., Klenerman, D. and Korchev, Y.E.: *Mol. Cell. Endocrinol.*, **217**, 101–108 (2004)
- 8) Rheinlaender, J., Geisse, N.A., Proksch, R. and Schäffer, T.E.: *Langmuir*, **27**, 697–704 (2011)
- 9) Rheinlaender, J. and Schäffer, T.E.: *J. Appl. Phys.*, **105**, 094905 (2009)
- 10) Shevchuk, A.I., Novak, P., Taylor, M., Diakonov, I.A., Ziyadeh-Isleem, A., Bitoun, M., Guicheney, P., Lab, M.J., Gorelik, J., Merrifield, C.J., Klenerman, D. and Korchev, Y.E.: *J. Cell Biol.*, **197**, 499–508 (2012)
- 11) Gorelik, J., Gu, Y., Spohr, H.A., Shevchuk, A.I., Lab, M.J., Harding, S.E., Edwards, C.R., Whitaker, M., Moss, G.W., Benton, D.C., Sánchez, D., Darszon, A., Vodyanoy, I., Klenerman, D. and Korchev, Y.E.: *Biophys. J.*, **83**, 3296–3303 (2002)