

特集 バイオイメージング技術の最先端

《特集》「バイオイメージング技術の最先端」企画にあたって

近年、細胞・組織あるいは生物個体レベルにおける分子、イオン等の分布及びその動態を画像解析する「バイオイメージング技術」は、疾病の解明、あるいは創薬といったライフサイエンス分野における重要な技術として注目・関心を集めています。記憶に新しいところでは、細胞バイオイメージングでは欠かせない緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発見された下村 脩先生が 2008 年ノーベル化学賞を受賞されており、今後益々の注目を集めるとともに、その発展が非常に期待される計測技術分野です。

バイオイメージングでは、疾病解明、創薬といった応用分野に目がとらわれがちですが、そこでは分析化学とも密接に関係している多くの計測技術が用いられています。そこで、本誌では、計測技術に焦点を当てた「バイオイメージング技術の最先端」を特集として企画いたしました。本特集が、読者の皆様の計測技術としての側面からバイオイメージングを捉えるきっかけとなれば幸いです。

なお、本企画は“イメージング”ということもあり、本誌初の試みとして、各話題ごとにフルカラーを各 1 ページ掲載しました。ご尽力いただきました関係者各位に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

「ぶんせき」編集委員会

AFM・SNOM によるバイオイメージングとプローブ技術

村 松 宏

1 はじめに

走査トンネル顕微鏡 (STM)¹⁾、原子間力顕微鏡 (AFM)²⁾、走査型近接場光学顕微鏡 (SNOM)³⁾ に代表される走査プローブ顕微鏡 (SPM) は、微小領域の高分解能表面形状観察を得意とした技術であり、平坦な表面の試料では、原子・分子分解能で表面観察を行うことができる。STM は、先鋭な金属探針に近接した試料間にバイアス電圧をかけてトンネル電流を検出して、トンネル電流が一定となるように制御しながら表面を走査することで、表面形状を得る。AFM では、カンチレバー上の探針と試料表面に作用する力を検出することで、試料表面の走査を可能にしている。AFM の方式としては、静的に力検出を行うコンタクトモードとカンチレバーを振動させるダイナミックフォースモード (DFM) に分けられ、DFM は、主にサイクリックコンタクトモード (タッピングモード)⁴⁾ とノンコンタクトモード⁵⁾ に分けられる。SNOM では、主に、微小光学開口からの近接場光を用いて、高分解能な光学像の取得を行う。力検出による制御を行うことで、表面形状と近接場光学像が同時に観察できる。

SPM によるバイオサンプルのイメージングの対象は、DNA、タンパク、染色体、培養細胞、その他の生体高分子である^{6)~8)}。DNA 観察においては、DNA の形態や二重らせん構造の確認などの課題に続いて、塩基配列の読み出しが最終的な目標といえる。タンパク観察では、タンパク二次元結晶の観察やタンパク結晶成長の観察などがあるが、タンパクの形状をより詳細に観察できれば X 線回折の結果との対比が可能になり有益である。細胞の観察では、その形態に基づく細胞の機能を解析する目的から詳細な形態の観察が行われるとともに、細胞の粘弾性計測や尖鋭化した探針を細胞内に挿入するなど、細胞内部の情報の収集も試みられている。細胞表面の膜タンパクの分布やその活動状態を分子レベルで評価することも研究課題となっている。その他のバイオ試料としては、コラーゲンやアミロースなどの生体高分子の会合などの解析も進められている。一方、生体分子を利用した分子デバイスの構築やその評価においても、SPM は不可欠なツールである。SPM によるバイオサンプルの観察の基本は、その形態を詳細に捉えることであるが、さらに、詳細な情報を得るためにフリクション、粘弾性、表面電位などの機能情報のイメージングが

行われるとともに、電子や光による刺激を与えたり、温度を変化させるなどの種々の方法がとられている。

特に、最近のSPMの進歩は、高速AFM⁹⁾¹⁰⁾やノンコンタクトモードAFM¹¹⁾の開発にある。高速AFMによって、生体分子の動きをビデオレートでイメージングすることが可能になっている。また、ノンコンタクトモードAFMでは、高真空中や液中での表面配列分子のイメージングが可能となっている。一方、大気中での観察では、試料表面を吸着水が覆っているため、大気中でのイメージングには課題がある。また、SPMは、狭い平坦な領域を原子分解能で観察可能であるが、比較的大きなバイオサンプルでは、どの部分を観察しているのかわからなくなる場合もある。このため、光学顕微鏡や走査電子顕微鏡と組み合わせた装置も開発されている。しかし、同じSPM装置で広い範囲の観察を行い、その中の任意の領域が拡大できれば理想的といえる。

SPMにおけるプローブの技術は、きわめて重要であり、AFMプローブに関しては、現在では、シリコンプロセスによる量産が可能となっている。逆に、シリコンプロセスの制約も抱えているともいえる。このため、先端の収束イオンビームによる加工やカーボンナノチューブの固定¹²⁾などによる改良が図られたり、疎水処理によって、吸着水の影響を抑えることも行われている。また、シリンドリカルなチップが細胞観察では有効であることなど¹³⁾、チップ形状の重要性も報告されている。SNOMプローブに関しては、現在のところ発展段階であり、安定な性能のプローブを作製する技術の開発が望まれている。

AFMのプローブ制御方式としては、従来の光てこや光干渉方式に加えて、水晶音叉式や圧電抵抗検出素子を内蔵した自己検知型プローブが開発されており¹⁴⁾、さらに進歩の余地がある。特に、液中DFM観察において問題となるのが、液体の粘性によるカンチレバー振動の減衰や共振波形への周囲の振動の混入である。共振波形の問題は、圧電励振の代わりに磁気励振¹⁵⁾や光熱励振などを用いることでも改善が可能である。粘性による影響を改善する方法として、カンチレバーの受ける粘性抵抗の信号成分を励振信号にフィードバックしてカンチレバーのQ値を改善するQコントロール法¹⁶⁾が用いられているが、微小空間での粘性の影響は劇的に大きくなり、液中での観察技術には、さらなる改善の余地がある。

このようなバイオイメージングの状況の中で、本稿では、プローブ技術の開発を中心とした筆者の研究グループの研究の一部を紹介する。なお、AFMによる生体分子間の解離力の測定¹⁷⁾は、AFMの重要なアプリケーションになっており、筆者の研究グループにおいても、人工ペプチドとタンパクの解離力の評価¹⁸⁾を行っているが、イメージングの範疇から外れるため、本稿では割愛する。

2 マイクロ光造形AFMプローブによるバイオイメージング

まず、大気中での吸着水の問題、広範囲のイメージングへの対応、液中DFMでの共振特性の改善への対応のため、マイクロ光造形法によるプローブの作製について検討した例について説明する。

マイクロ光造形法では、未硬化の光硬化性樹脂の中にレーザー光を集光させ、焦点部分の樹脂を硬化させるもので、レーザー光を走査することで、サブミクロンレベルの分解能で三次元構造を作製するものである^{19)~21)}。特に、フェムト秒レーザーを用いて、2光子吸収を起こさせることで、100 nmレベルの微細な構造の作製が可能である²¹⁾。

樹脂製プローブの製作では、既存のAFMマイクロカンチレバーを未硬化の樹脂槽内に置いて、レーザー光を走査して樹脂を局部的に光硬化させることで、カンチレバー上に樹脂プローブを形成する。図1は、マイクロ光造形法によってコンタクトモード用カンチレバー上に尖鋭な樹脂プローブを形成した結果を示したSEM写真である²²⁾。プローブ先端は、100 nm以下にまで尖鋭化が可能である。樹脂プローブという点では、これまでに、厚膜型レジストのSU8を用いて形成した例があるが²³⁾、レバー部も弾性率の低い樹脂で形成していたため、シリコンカンチレバーに匹敵するような共振特性を得ることができなかった。

大気中では、親水性試料表面には、吸着水が存在しており、親水性の探針が試料表面に近接した際にキャピラリフォースが作用する。この力は、AFMで検出する力としては、かなり大きな力となり、しばしば観察分解能の低下を引き起こしている。このため、探針を疎水性にして、キャピラリフォースを逃れようという試みがなされている。一般的には、カンチレバーの疎水処理²⁴⁾が

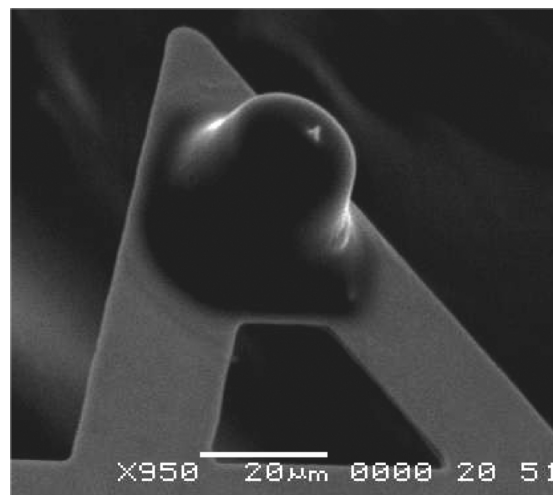


図1 マイクロ光造形法によりコンタクトモード用カンチレバー上形成した樹脂プローブ

行われるが、薄膜では、徐々に離脱してしまうなどの問題がある。そこで、光硬化性樹脂が疎水性であることを利用して、親水性表面の観察能力の向上について検討した。

図2(a)は、窒化シリコンカンチレバーのフォースカーブをマイカ表面に対して測定したものである²²⁾。吸着水によるキャピラリフォースによって、カンチレバーを離していくときに大きな吸着力(A)が作用していることがわかる。図2(b)は、窒化シリコンカンチレバー上に樹脂プローブを形成した場合のフォースカーブであり、カンチレバーを近づける際に、吸着水の影響と見られるふくらみ(B)が観測されている。離していく過程では、キャピラリフォースによる吸着がほとんどみられない(C)ことが確認できる。同様に、DFMモードで、一般的なシリコンプローブでは、カンチレバー振動の位相遅れが大きくなるのに対して、樹脂プローブでは、位相遅れが小さく抑えられていることも確認されている²²⁾。このような違いを示す例として、実際にコンタクトモードでマイカ表面の観察を行った結果を図3に示す²²⁾。窒化シリコンプローブでは、図3(a)のように水の吸着層の影響で、マイカ表面の段差を観察することができないが、樹脂プローブでは、図3(b)のように

マイカ表面の微小な段差の観察ができていることがわかる。さらに、図3(c)は、樹脂プローブによるDNA分子の観察結果を示したものであり、樹脂プローブによっても、高分解能な観察が可能であることがわかる。

細胞や食品微粒子などのバイオサンプルでは、全体のどの部分を拡大しているかという点も重要であり、そのために凹凸の大きな試料の観察ができることも望まれる。チップの短いプローブでは、凹凸の大きな試料に対して、カンチレバー部分が、試料に接触することもあり得ることから、十分に長い探針が必要であり、また、シリンドリカルな形状のチップが、試料の形状をより正確に捉えるために有効である。

図4は、サイクリックコンタクトモード用シリコンカンチレバー上に長探針プローブを作製した例を示したもので、チップ長100 μm のプローブが形成されている。このプローブの観察特性について評価するため、従来のシリコン製プローブ、および、作製した樹脂プローブを用い、米微粒子の観察を行った結果が、図5である。図5のように、従来のシリコン製プローブでは、試料の深い部分では探針側面等が試料にあたり、正確に形状を取得できていないことがわかる。一方、長探針型プローブでは、試料の深い位置まで形状の観察が行えて

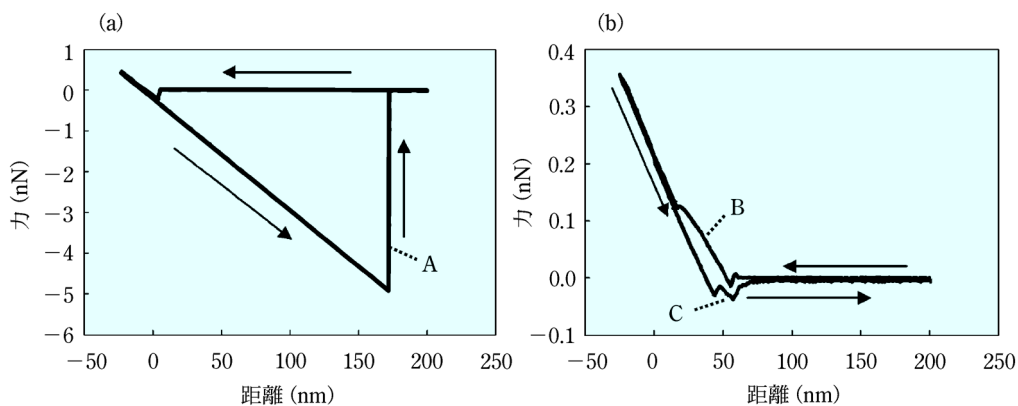


図2 マイカ表面に対して、窒化シリコンプローブ (a) および樹脂プローブ (b) で測定したフォースカーブ

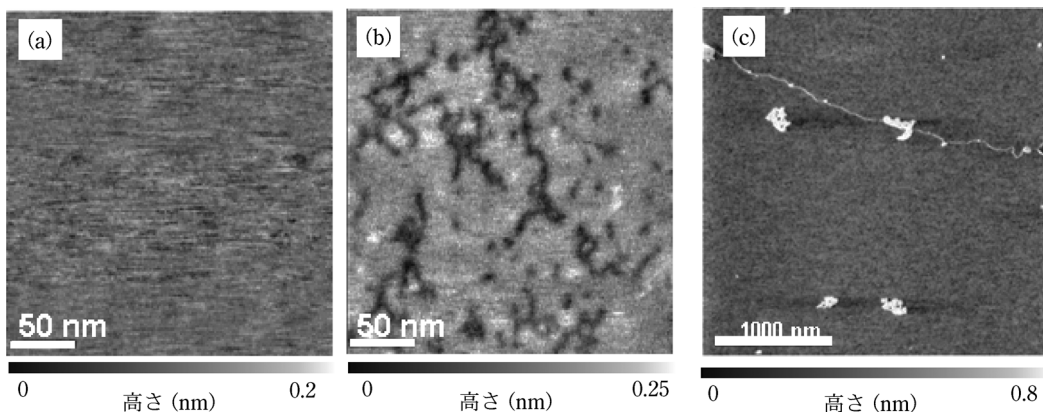


図3 窒化シリコンプローブ (a) および樹脂プローブ (b) でのマイカ表面の観察結果と、樹脂プローブ (c) によるDNA試料の観察結果

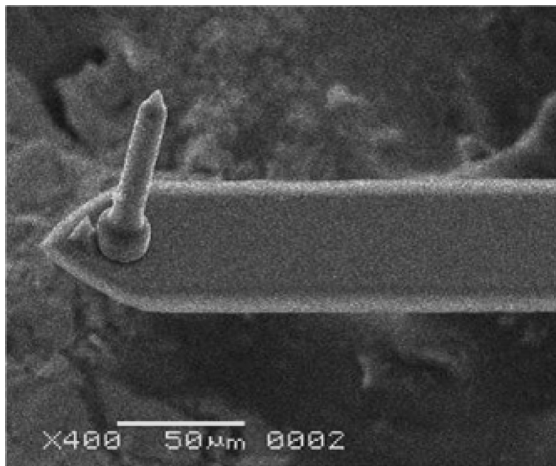


図4 シリコンカンチレバー上に長探針プローブを作製した例

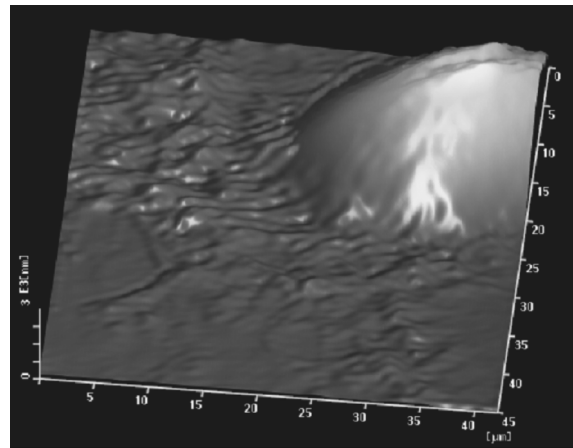


図6 長探針樹脂プローブによる液中の生細胞の観察結果

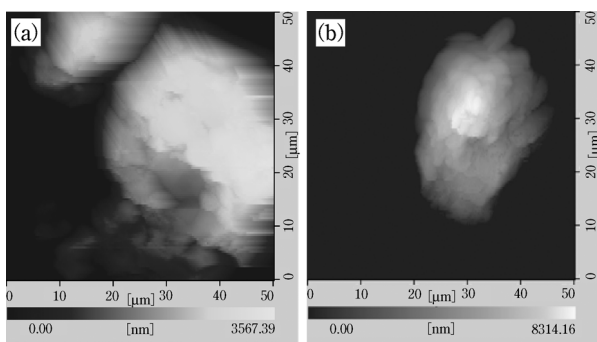


図5 シリコン製プローブ (a) および樹脂プローブ (b) を用い、米微粒子の観察を行った結果 (試料提供: 食品総合研究所)

いることが確認できる。

長探針型のプローブは、液中サイクリックモード観察においても有用であることも示されている。液中サイクリックコンタクトモードで、カンチレバーが試料面に対して、 $100\ \mu\text{m}$ 以下に接近すると、カンチレバーと試料間に生じる粘性抵抗が急激に大きくなる現象が起こるが、探針を長くすることで、この現象を回避することができ、走査時の安定性も向上することが期待できる。プローブを試料基板表面にアプローチするときのカンチレバー振動の減衰率を調べると、カンチレバー面と試料表面との距離に対して、一般的な探針長さ $10\ \mu\text{m}$ のシリコンプローブでは、カンチレバーと試料間の距離が $100\ \mu\text{m}$ くらいから振幅が徐々に減少し始めることが確認されている²⁵⁾。これに対して、同じカンチレバーに $35\ \mu\text{m}$ 、 $70\ \mu\text{m}$ 、 $100\ \mu\text{m}$ のプローブを形成したものは、カンチレバー面と試料表面間の距離に対する減衰曲線に沿って振幅が減衰して、プローブ先端が試料に接触し始めた時点で、近距離の減衰が起きる²⁵⁾。すなわち $100\ \mu\text{m}$ のプローブでは、アプローチに伴う遠距離の振動減衰がほとんど観測されない。このように、探針が長くなることにより、スムーズなアプローチが可能になり、検出感度の低下も防げる。この長探針プローブを用いて、

図6のように、液中の生細胞の観察が行えることが確認されている²⁶⁾。

一方、AFMで細胞などの粘弾性測定を行う場合には、通常のAFM探針では鋭すぎて細胞を突き破ってしまうことがあるため、一定の面積を有する探針が必要となっている。このための方法として、マイクロ光造形法によって半球状の先端を形成したプローブ、および、マイクロビーズをプローブ先端に固定するための土台をマイクロ光造形法で作製し、そこにマイクロビーズを装着したプローブの製作も行っている。

3 AFM制御SNOMプローブによるバイオイメージング

SNOMの分類としては、エバネッセント場にプローブを近づけ散乱した光を検出するPSTM (photon STM) と微小開口プローブを用いるSNOM、さらに、金属探針先端の電場増強作用を利用する散乱型SNOMがあるが、バイオサンプルの観察では、蛍光像を取得することで、特に意味のある知見が得られることから、蛍光像の取得に有利な微小開口型のSNOMが用いられている。微小開口型SNOMでは、光ファイバプローブを用いるのが主流で、 CO_2 レーザーによる加熱伸延により作製する方法とフッ化水素によるエッチングにより形状を作製し、先端以外を金属コートする。また、制御方式は、光ファイバーを横方向に振動させながら試料に近づけていくシアフォース方式と、試料と垂直方向の力を検出するAFM方式がある。図7は、2段階エッチング法で作製したAFM方式の微小開口型プローブである²⁷⁾。先端開口径は、 $20\ \text{nm}$ 程度まで小さくすることができる。

SNOMによるバイオサンプルの観察例としては、蛍光標識した細胞骨格タンパク、DNA、染色体、細胞内GFPなど多くの例がある。DNAの観察例として、DNA上にPNA (peptide nucleic acids) プローブが、ハイブリダイズした状態を可視化した例を図8に示

す²⁸⁾。図 8(a) は、直線状に伸ばした DNA 上に蛍光色素 Alexa532 で標識した PNA プローブがハイブリダイズし、蛍光色素 (YOYO-1) が DNA にインターカレートしている状態を模式的に示した図である。図 8(b) は、 λ -DNA を用いた試料における YOYO-1 に対応する近接場光学像であり、図 8(c) は、Alexa532 に対応する近接場光学像である。この例では、 λ -DNA 上の特定の遺伝子の先頭部分に対応する 15 mer の PNA プローブを用いたもので、図 8(c) の矢印で示した部分に蛍光標識した Alexa532 の 1 分子蛍光が観察されている。一方、図 8(b) では、PNA プローブがハイブリダイズした部分で YOYO-1 の蛍光が観測されなくなっているのがわかる。PNA がハイブリダイズした部分の形状像の結果では、DNA の太さが 20 nm 程度に観察されており、近接場蛍光像では半値幅で 13 nm という結果が得られている。この幅は、塩基配列の 50 bp 分に相当し、50 bp 程度の分解能でハイブリダイズした PNA プローブ (あるいは DNA プローブ) の位置が識別可能といえる。

液中の光ファイバースプローブの特性は、通常の AFM カンチレバーに比べ、良好である。この特性の違いは、

AFM 長探針プローブと同じように AFM カンチレバーが、平板に近い形状でチップ部分が短いに対して、光ファイバースプローブが、液体の抵抗を受けにくい円柱形をして長いチップを持っているためである²⁹⁾。次に、液中の培養細胞の観察例を図 9 に示す³⁰⁾。図 9 では、培養細胞のケラチンフィラメントを FITC 標識した抗ケラチン抗体で染色したものを液中で観察した形状像 (a) と蛍光像 (b) を示している。形状像 (a) で、丸い凸部が、核の部分であり、蛍光像 (b) の繊維状の部分が染色されたケラチンフィラメントであり、光学顕微鏡では困難な分解能で観察を行うことができる。また、SNOM では、高解像度の表面形状の取得も可能であることから、表面形状と蛍光像が同時に得られ対比して解析を行うことが可能である。

光ファイバースプローブによって、一定の性能を得ることができるが、作製の効率が悪いことや、より低いバネ定数のプローブが必要な場合もあることから、AFM プローブと同じマイクロカンチレバータイプの開発も行われている。その一つの例として、光造形 SNOM プローブの作製例を図 10 に示す。窒化シリコンカンチレバー上に、マイクロ光造形法によって、微小開口を形成して

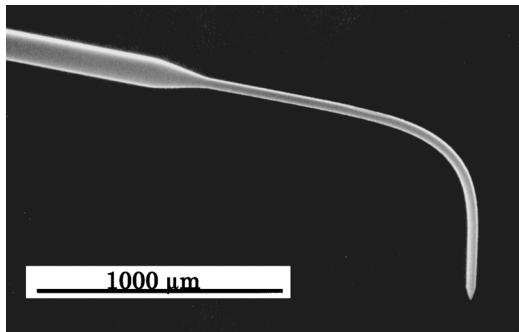


図 7 AFM 方式の微小開口型光ファイバースプローブ

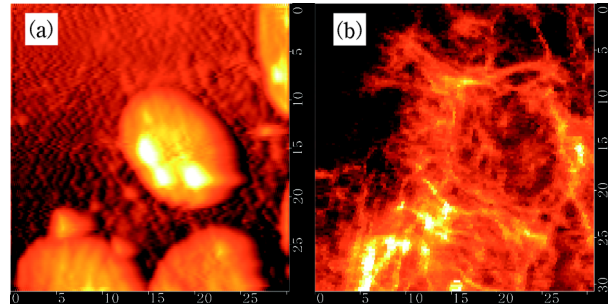


図 9 ケラチンフィラメントを FITC 標識した抗ケラチン抗体で染色した培養細胞の形状像 (a) と蛍光像 (b)

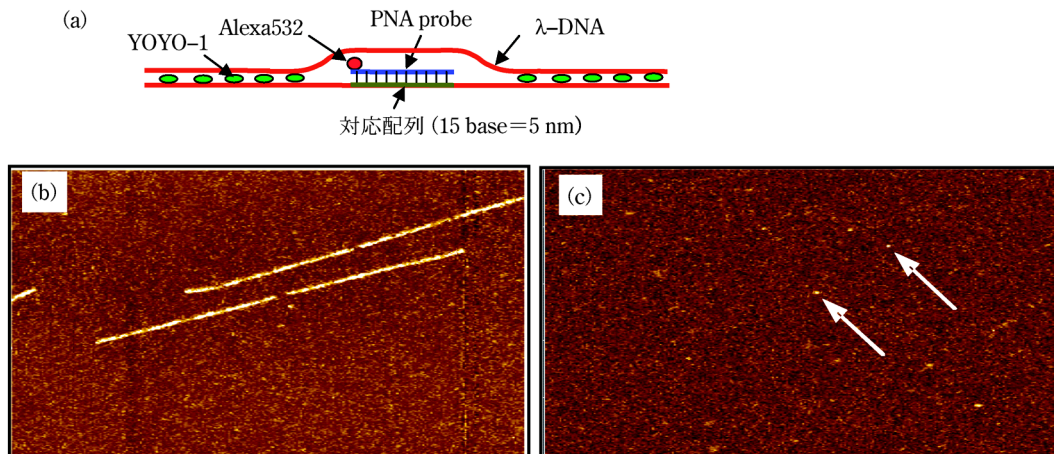


図 8 (a) : λ -DNA 上に蛍光色素 Alexa532 で標識した PNA プローブがハイブリダイズし、蛍光色素 (YOYO1) が DNA にインターカレートしている状態を模式図, (b) : YOYO-1 蛍光波長の蛍光像, (c) : Alexa532 蛍光波長の蛍光像

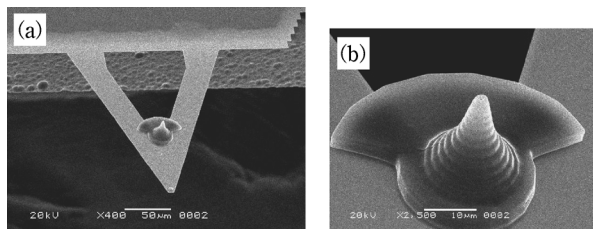


図 10 窒化シリコンカンチレバー上に光造形プローブを形成して作製した微小開口型 SNOM プローブ (a) とその拡大写真 (b)

いる。このプローブによって、形状像と光像の同時観察が可能であることが確認されている。

以上のように、やや特殊なプローブを用いるバイオイメーシング技術について説明したが、いろいろな試みによって、広い領域から高分解能領域まで観察可能な SPM が実現していくと考えられる。

文 献

- 1) G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, E. Weibel : *Phys. Rev. Lett.*, **49**, 57 (1982).
- 2) G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber : *Phys. Rev. Lett.*, **56**, 930 (1986).
- 3) D. W. Pohl, W. Denk, M. Lanz : *Appl. Phys. Lett.*, **44**, 651 (1984).
- 4) Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller, V. B. Elings : *Surf. Sci.*, **290** (1-2), L688 (1993).
- 5) T. R. Albrecht, P. Grütter, D. Horne, D. Rugar : *J. Appl. Phys.*, **69**, 668 (1991).
- 6) A. Engel : *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **20**, 79 (1991).
- 7) H. G. Hansma and J. H. Hoh : *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 115 (1994).
- 8) T. Ushiki, J. Hitomi, S. Ogura, T. Umemoto, M. Shigeno : *Arch Histol Cytol.*, **59** (5), 421 (1996).
- 9) T. Ando, N. Kodera, D. Maruyama, E. Takai, K. Saito, A. Toda : *Jpn. J. Appl. Phys.*, **41**, 4851 (2002).
- 10) A. D. L. Humphris, M. J. Miles, J. K. Hobbs : *Appl. Phys. Lett.*, **86**, 034106 (2005).
- 11) Y. Maeda, T. Matsumoto, T. Kawai : *Appl. Surf. Sci.*, **140**, 400 (1999) ; T. Ichii, M. Urabe, T. Fukuma, K. Kobayashi, K. Matsushige, H. Yamada : *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44**, 5378 (2005).
- 12) S. Akita, H. Nishijima, Y. Nakayama, F. Tokumasu, K. Takeyasu : *Appl. Phys.*, **32**, 1044 (1999).

- 13) F. Rico, P. Roca-Cusachs, R. Sunyer, R. Farré, D. Navajas : *J. Mol. Recognit.*, **20** (6), 459 (2007).
- 14) K. Karrai, R. D. Grober : *Appl. Phys. Lett.*, **66**, 1842 (1995).
- 15) W. Han, S. M. Lindsay, T. Jing : *Appl. Phys. Lett.*, **69**, 4111 (1996).
- 16) B. Anczykowski, J. P. Cleveland, D. Kruger, V. Elings, H. Fuchs : *Appl. Phys.*, **66**, 885 (1998).
- 17) M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, H. E. Gaub : *Science*, **276** (5315), 1109. (1997).
- 18) T. Okada, M. Sano, Y. Yamamoto, H. Muramatsu : *Langmuir*, **24**, 4050 (2008).
- 19) S. Maruo, O. Nakamura, S. Kawata : *Opt. Lett.*, **22**, 132 (1997).
- 20) S. Maruo, K. Ikuta : *Appl. Phys. Lett.*, **76**, 2656 (2000).
- 21) S. Kawata, H.-B. Sun, T. Tanaka, K. Takada : *Nature*, **412**, 697 (2001).
- 22) J. M. Kim, H. Muramatsu : *Nano Letters*, **5** (2), 309 (2005).
- 23) G. Genolet, J. Brugger, M. Despont, U. Drechsler, P. Vettiger, N. F. de Rooij, D. Anselmetti : *Rev. Sci. Instrum.*, **70**, 2398 (1999).
- 24) R. D. Piner, S. Hong, C. A. Mirkin : *Langmuir*, **15**, 5457 (1999).
- 25) H. Muramatsu, Y. Yamamoto, M. Shigeno, Y. Shirakawabe, A. Inoue, W. S. Kim, S. J. Kim, S. M. Chang, J. M. Kim : *Anal. Chim. Acta*, **611**, 233 (2008).
- 26) H. Muramatsu, Y. Yamamoto, A. Sato, S. Enomoto, W. S. Kim, S. M. Chang, J. M. Kim : *J. Microscopy*, **224** (2), 146 (2006).
- 27) H. Muramatsu, N. Chiba, and M. Fujihira : *Appl. Phys. Lett.*, **71**, 2016 (1997).
- 28) J. M. Kim, T. Hirose, S. Sugiyama, T. Ohtani, H. Muramatsu : *Nano Letters*, **4**, 2091 (2004).
- 29) H. Muramatsu, N. Chiba, K. Homma, K. Nakajima, T. Ataka, S. Ohta, A. Kusumi, and M. Fujihira : *Appl. Phys. Lett.*, **66**, 3245 (1995).
- 30) H. Muramatsu, N. Chiba, K. Nakajima, T. Ataka, M. Fujihira, J. Hitomi, T. Ushiki : *Scanning Microscopy*, **10**, 975 (1996).



村松 宏 (Hiroshi MURAMATSU)

東京工科大学応用生物学部 (〒192-0982 東京都八王子市片倉町 1404-1)。東京工業大学大学院修了。工学博士。《現在の研究テーマ》SPM および水晶振動子センサーによる生体分子計測。《趣味》登山。山スキー。

E-mail : muramatu@bs.teu.ac.jp