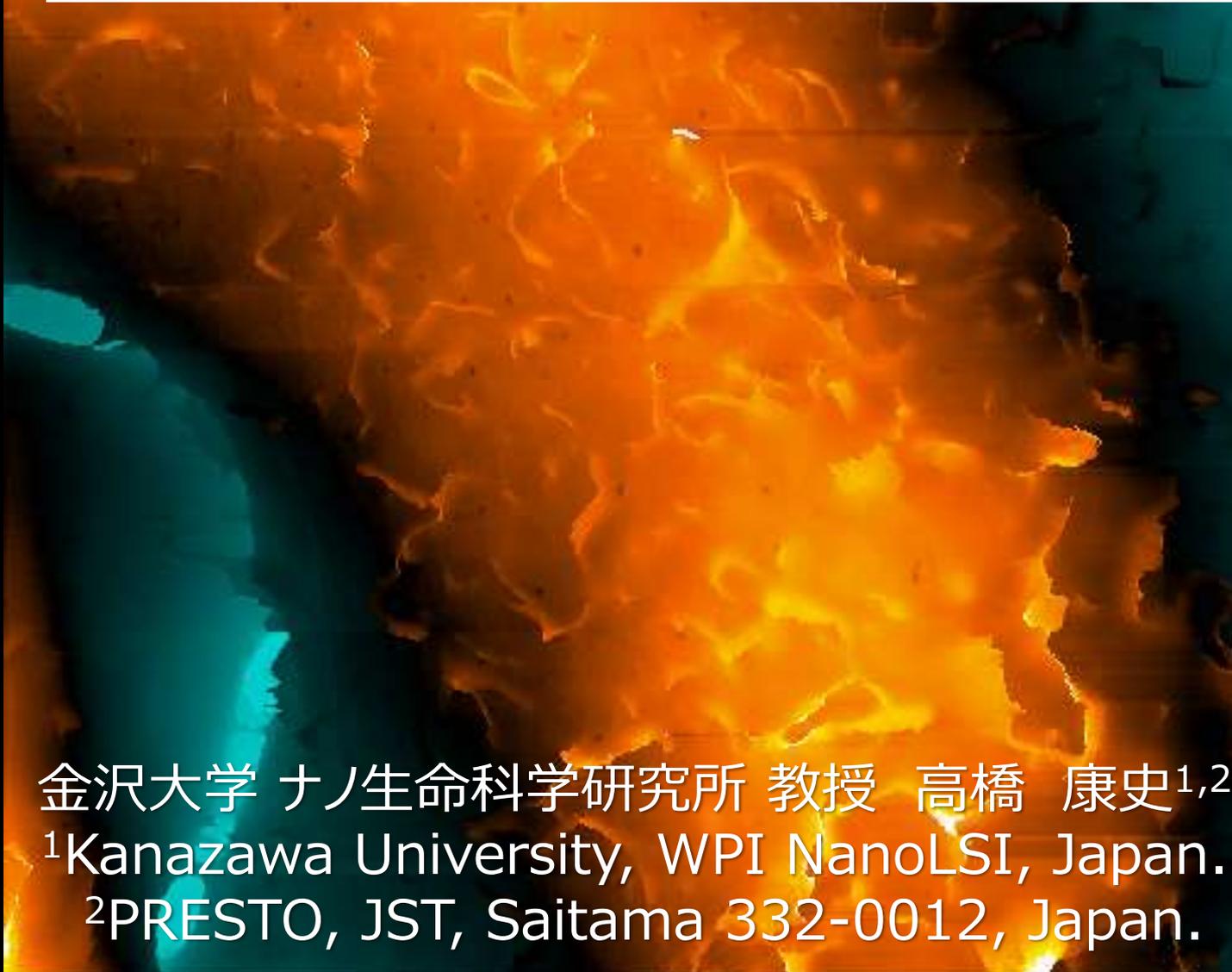


# 機能性イメージングを実現する 次世代プローブ顕微鏡技術



6  $\mu\text{m}$



0  $\mu\text{m}$

金沢大学 ナノ生命科学研究所 教授 高橋 康史<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Kanazawa University, WPI NanoLSI, Japan.

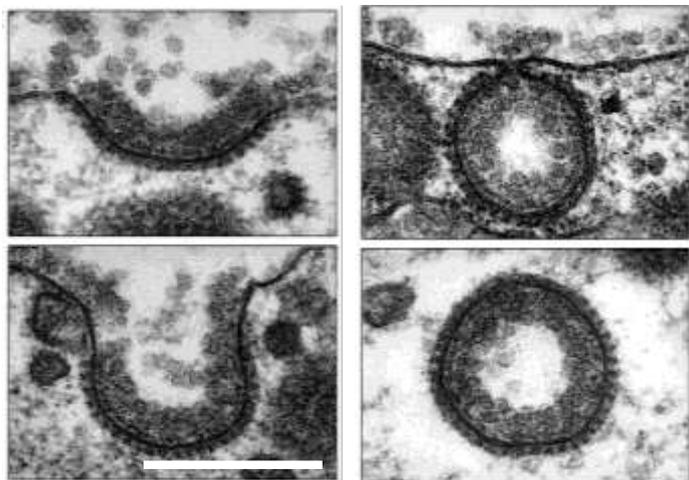
<sup>2</sup>PRESTO, JST, Saitama 332-0012, Japan.

512 × 512 points  
20 × 20  $\mu\text{m}$

# ナノスケールの形状と化学物質の濃度プロファイルをリンク

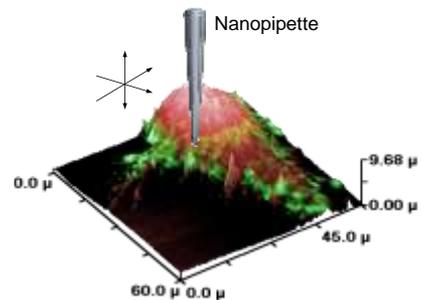
## 静的な細胞の評価

## 動的な細胞の評価

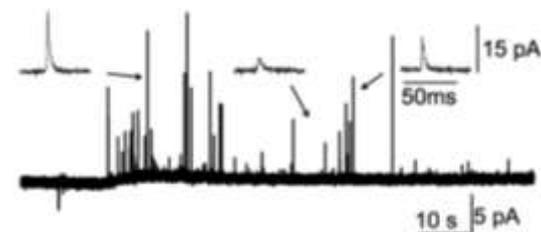


120 nm

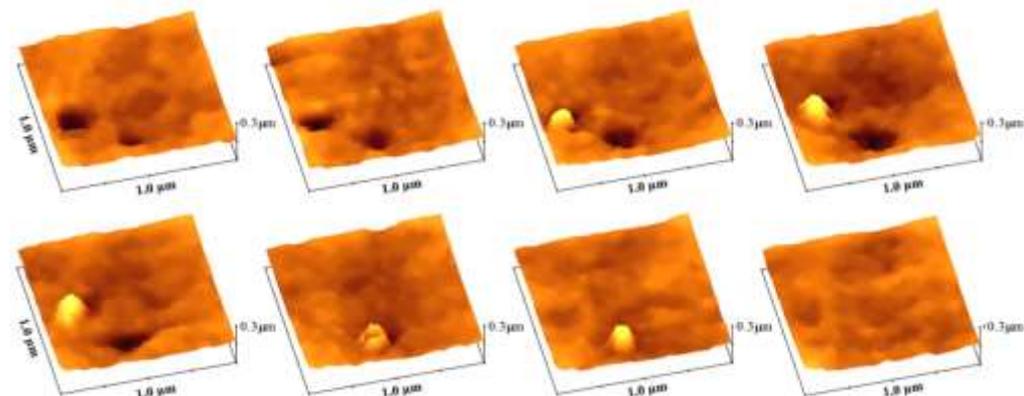
個々の情報の  
張り合わせ



## その場でのセンシング技術



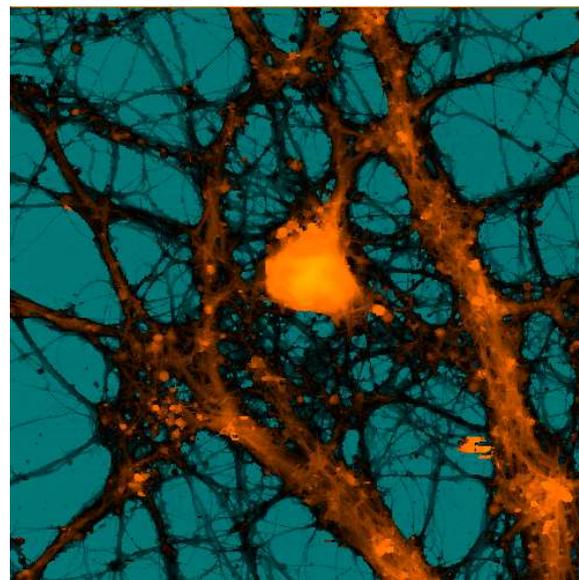
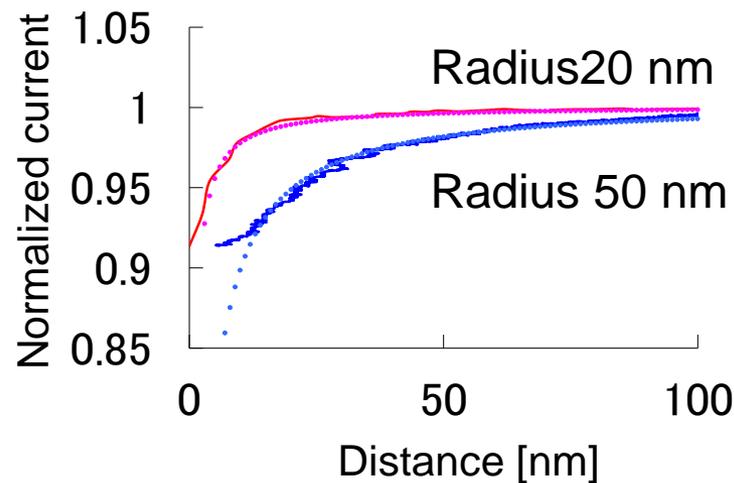
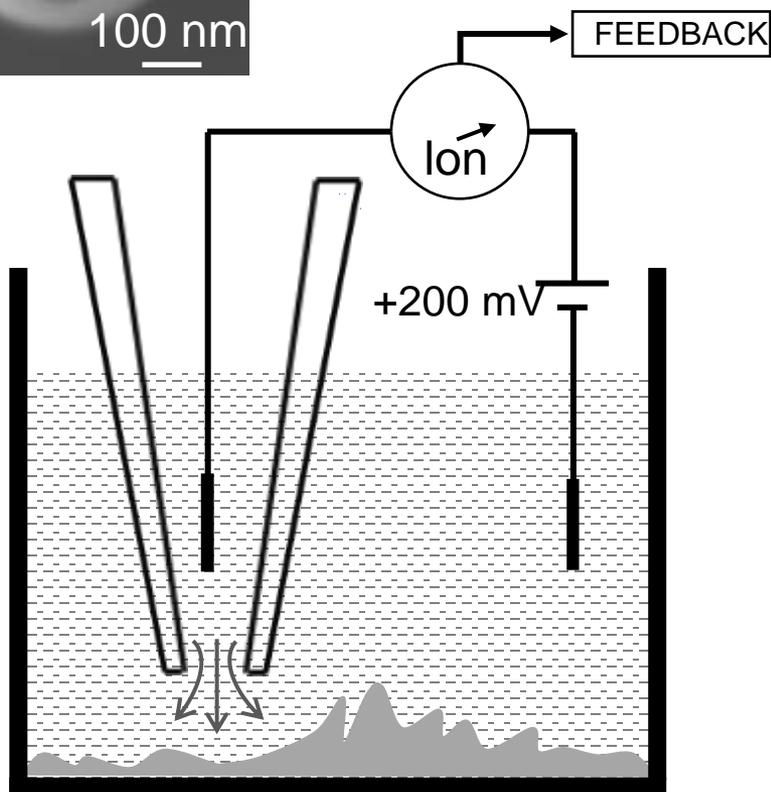
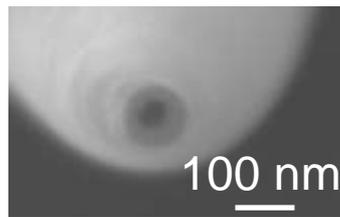
## 局所刺激を行う“摂動技術”



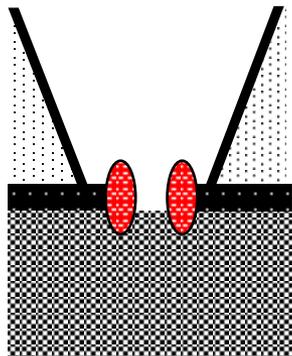
## ナノスケールでの連続的な形状測定技術

# 独自に開発している走査型プローブ顕微鏡による 細胞の局所分析

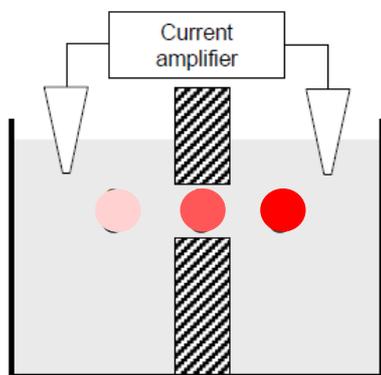
# 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) とは



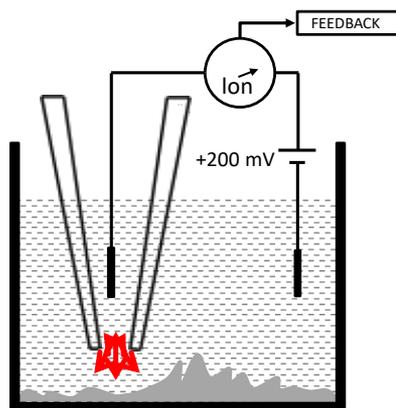
# 微小空間におけるイオン電流計測方法と計測対象



パッチクランプ  
チャンネルの開閉

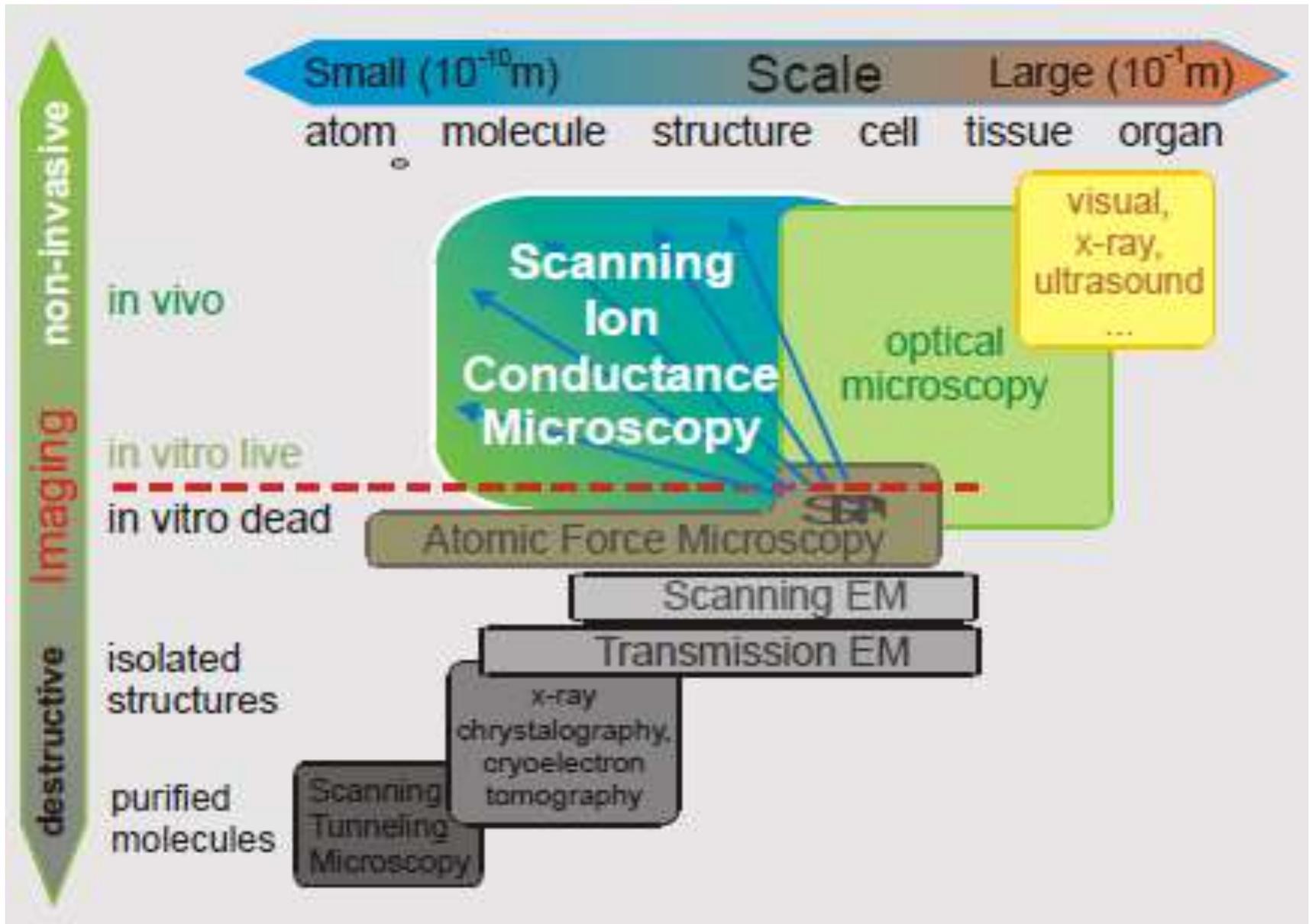


ナノポアセンサー  
検出物の通過



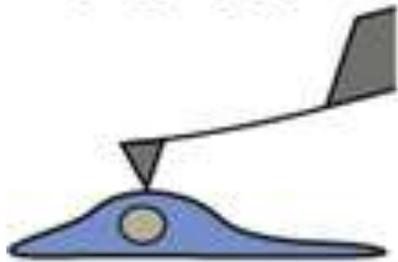
SICM  
イオンの移動しやすさ  
位置の制御

# イメージングの分解能と測定環境



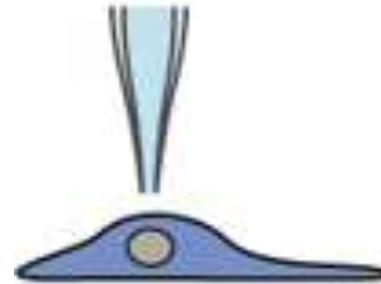
# SICMとAFMの比較

AFM



カンチレバーの  
共振周波数  
数MHz

SICM

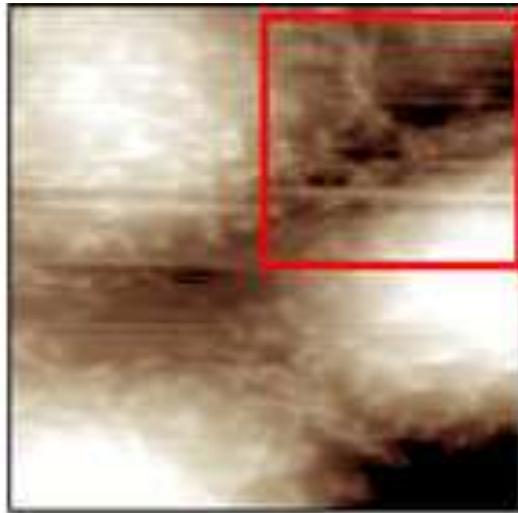


電流計測  
数kHz～数十kHz

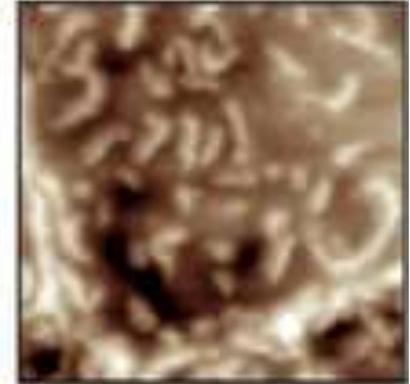
高解像度化と高速化はトレードオフ

# SICMとAFMの比較

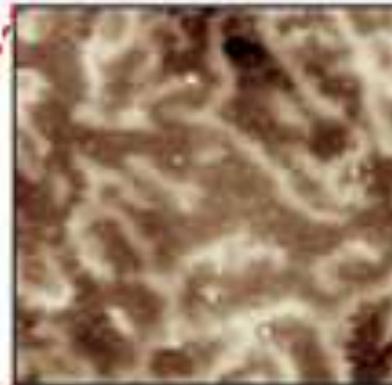
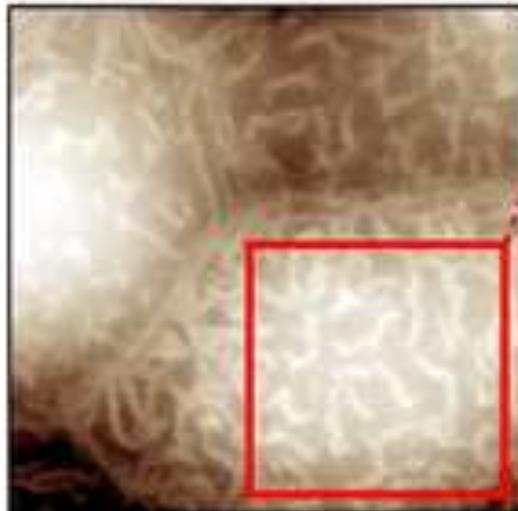
(測定例)



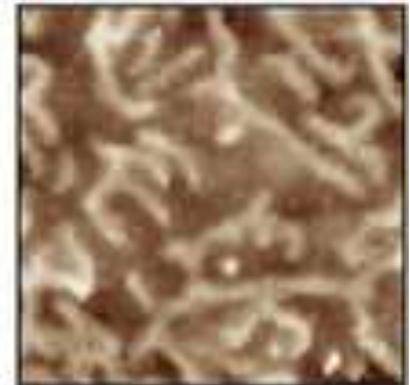
living



fixed



living



fixed

# 阻害剤の評価

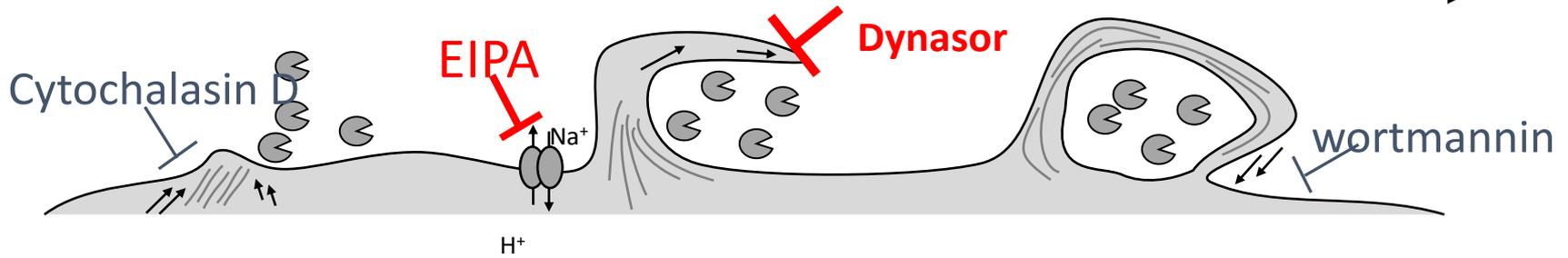
(SICMによる測定例)

Actin filaments

polymerization

Ruffling

Ruffle fusion



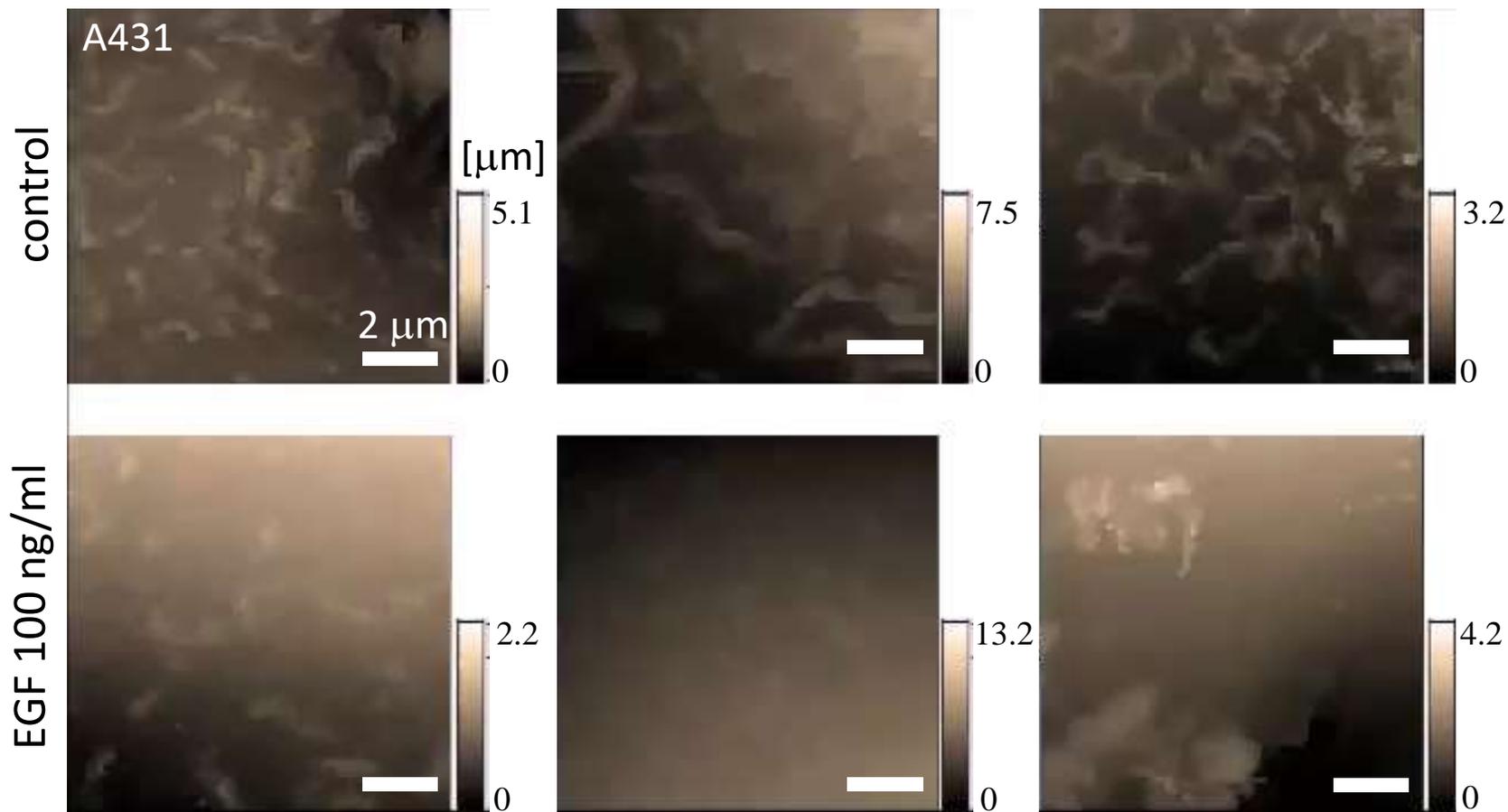
10 X 10 um, Time 137.30 min



10.00 X 10.00 um, Time 0.00 min



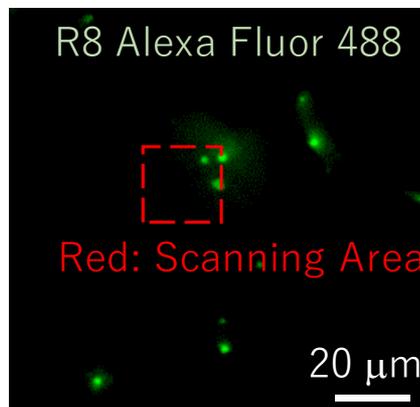
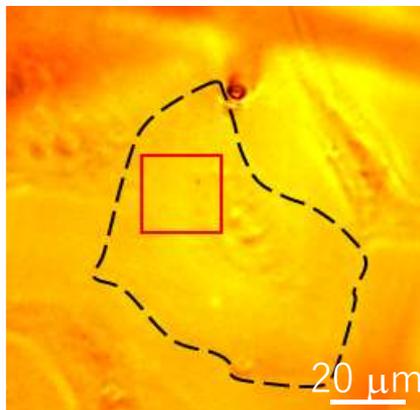
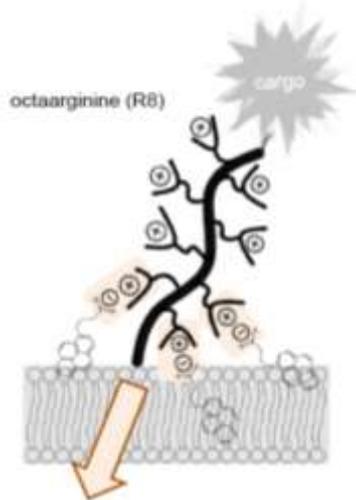
# (SICMによる測定例) 成長因子と形状の関係



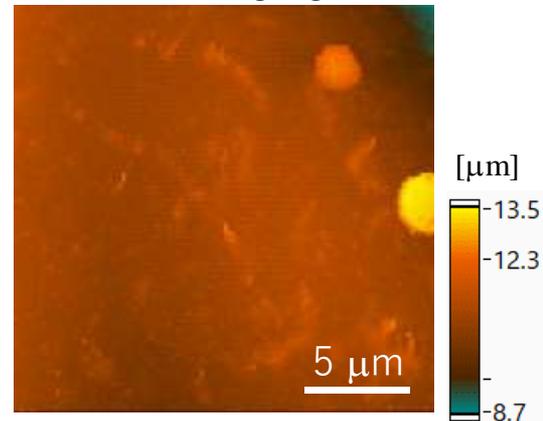
**20 s/ image;  $10 \times 10 \mu\text{m}$**

# (SICMによる測定例) 細胞とペプチドの相互作用

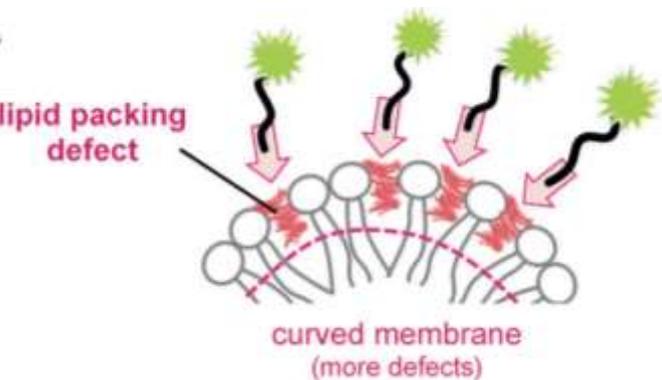
## Electrostatic interaction



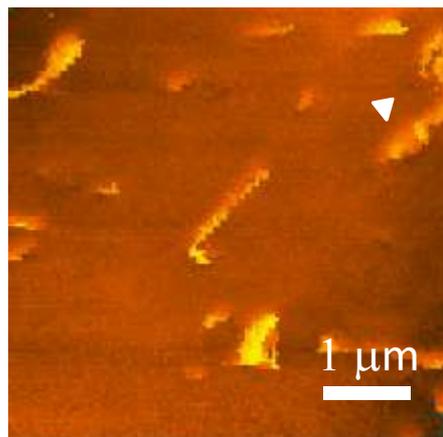
## SICM Imaging



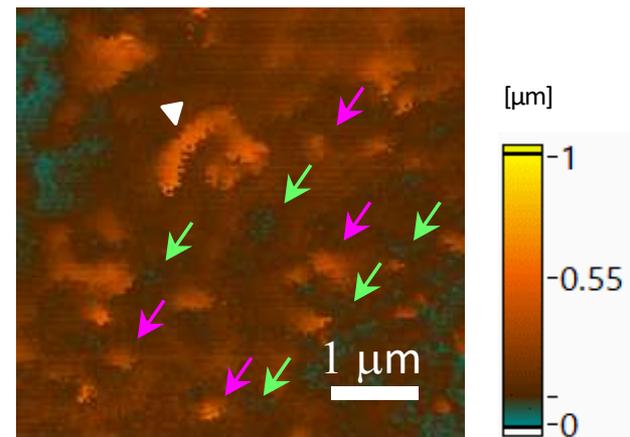
## Change the cell curvature



## Before treatment



## After treatment



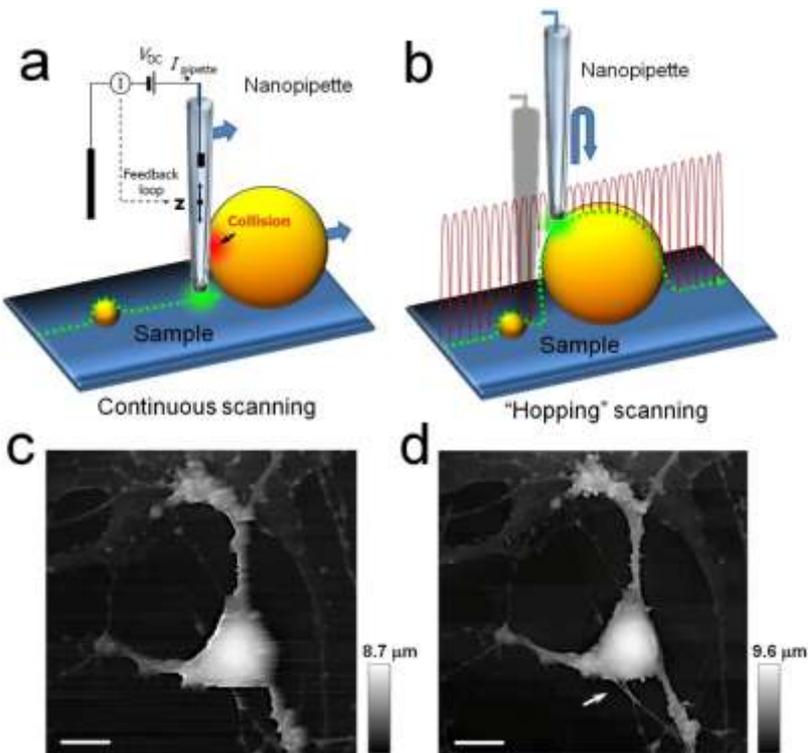
R8の流入点（こぶ状の領域）を可視化  
膜曲率の変化だけでなく微絨毛様の構造体が増加

*Angew. Chem. Int. Ed.*  
**2017**, 56, 7644.

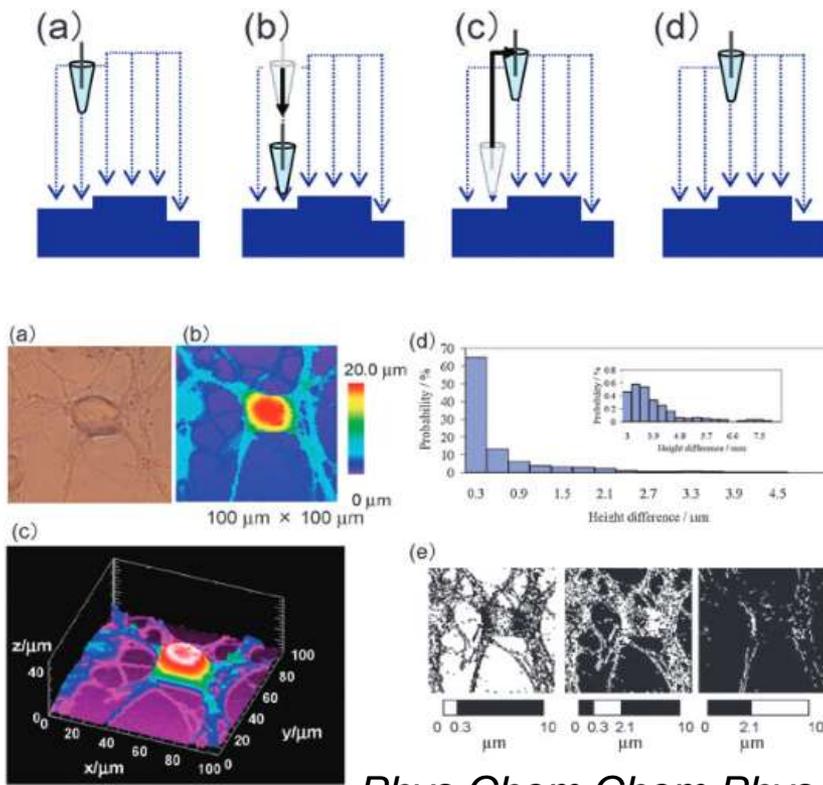
# ホッピングモード SICM

Korchev group

My work



*Nature Meth* (2009) 6: 279-281



*Phys.Chem.Chem.Phys.*, (2010)  
,12: 10012-10017.

ホッピングモードでは、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、探針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、更には生きた細胞の動的観察も可能。

# 時間分解能の向上

Approach speed  
50 nm/ms

Imaging time  
20 min

*Nat. Methods* **2009**, 6 (4), 279-281.

500 nm/ms

15 s/32 × 32 points=14.6 ms/point

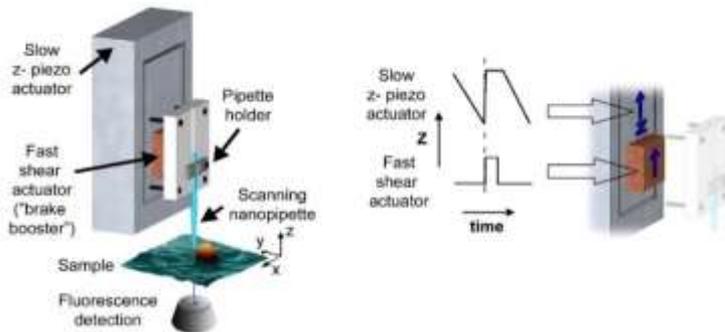
*J. Cell Biol.* **2012**, 197 (4), 499-508.

15 s/32 × 32 points=14.6 ms/point

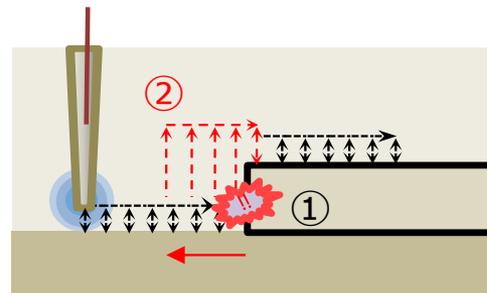
*Nano Lett.* **2014**, 14 (3), 1202-1207.

18 s/64 × 64 points=4.4 ms/point

*Anal. Chem.* **2017**, 89 (11), 6015-6020.



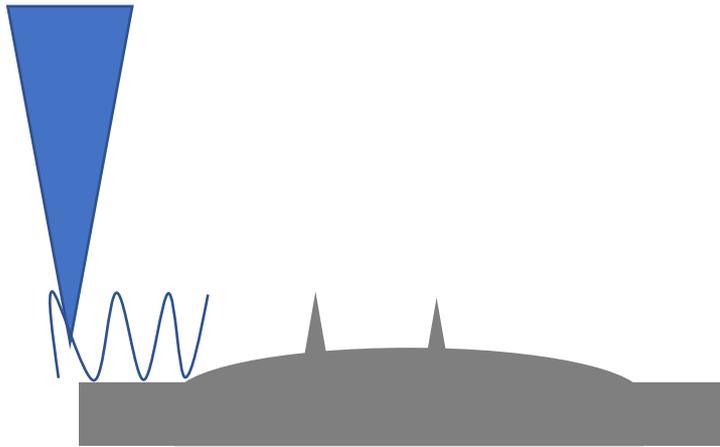
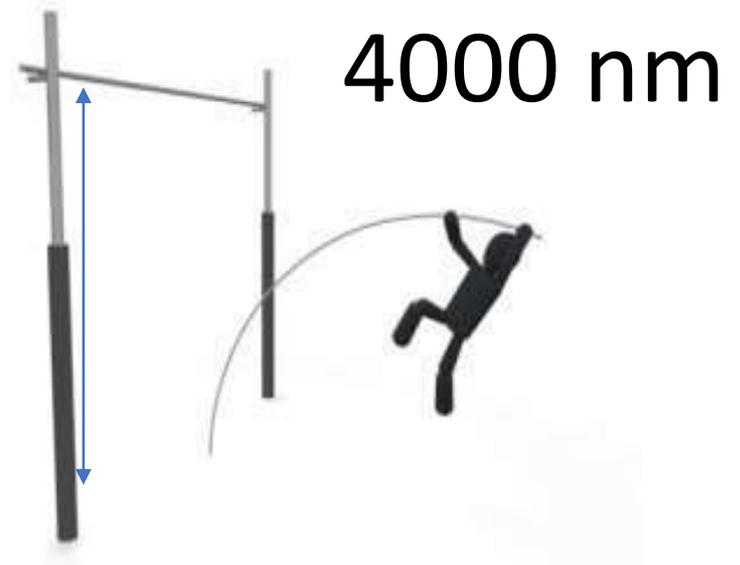
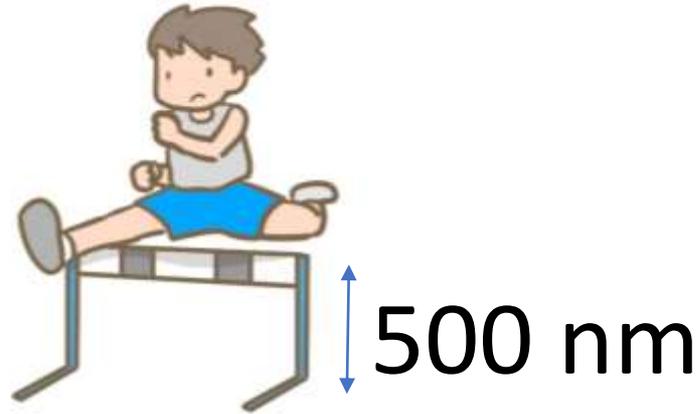
New scanning method



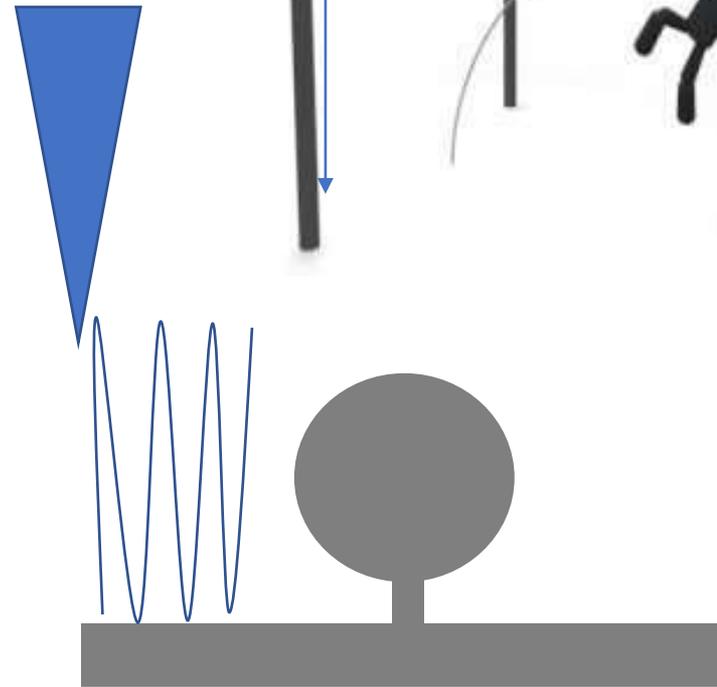
1200 nm/ms

9 s/64 × 64 points=2.2 ms/point

# 課題：凹凸の著しい計測



Microvilli imaging



Neuron imaging

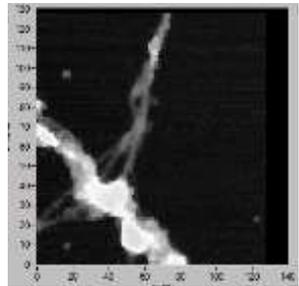
新技術

課題の解決法 1

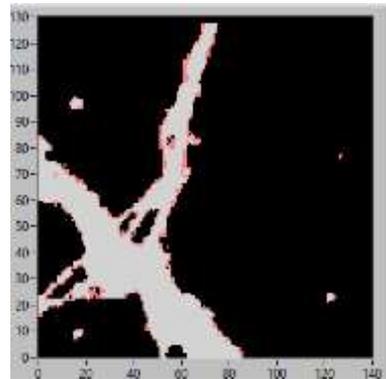
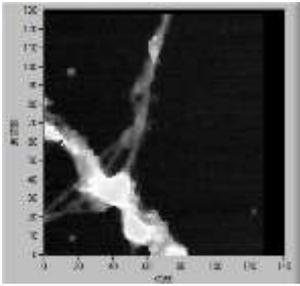
# 計測領域を絞ることで高速イメージングを実現

特許第6842750号

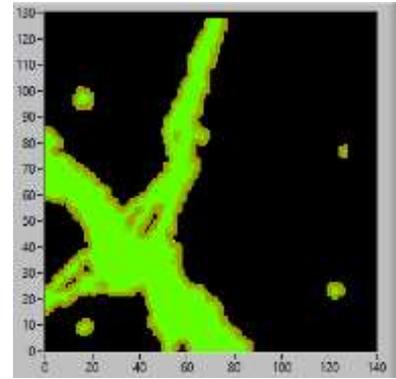
1回目



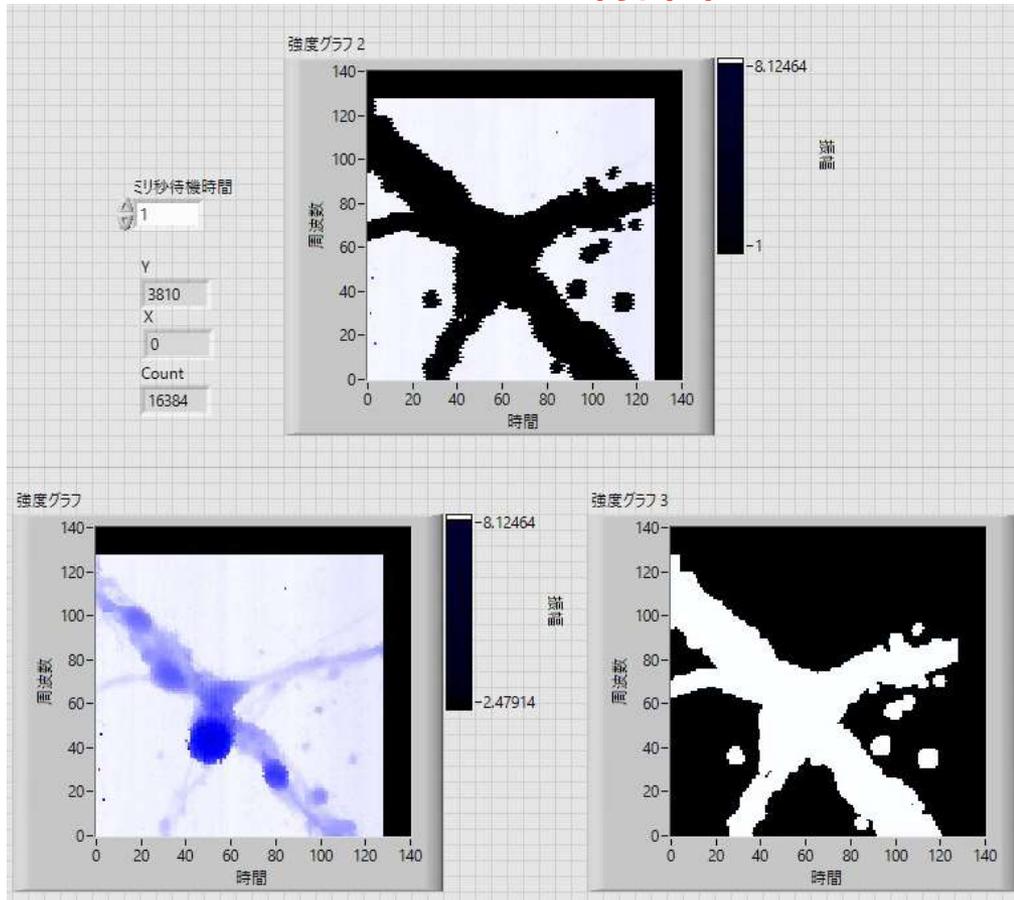
2回目



1,2回目のオーバー  
プロット



1回目の画像に肉付け  
(変化領域をカバー)



2-4倍の高速化に成功

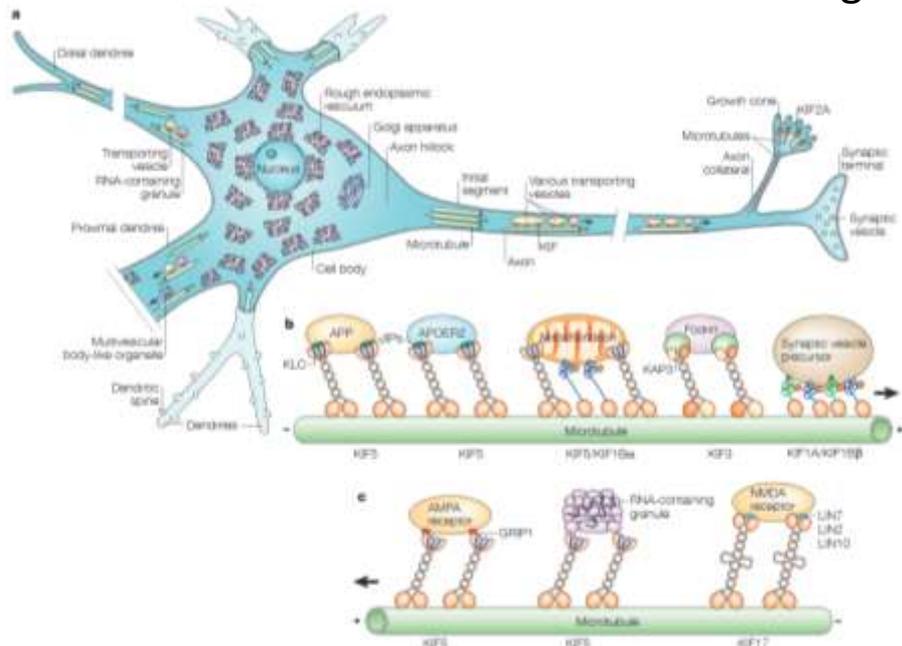
今後は、変化の起きる場所に重みを付けて連続的に高さを計測する

Takahashi, et al., Anal. Chem. 2020, 92, 2, 2159-2167

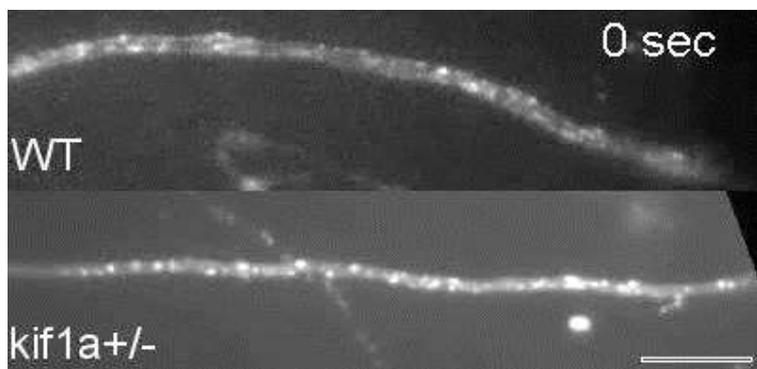
# 神経細胞内でのカーゴ輸送

領域を絞った測定例

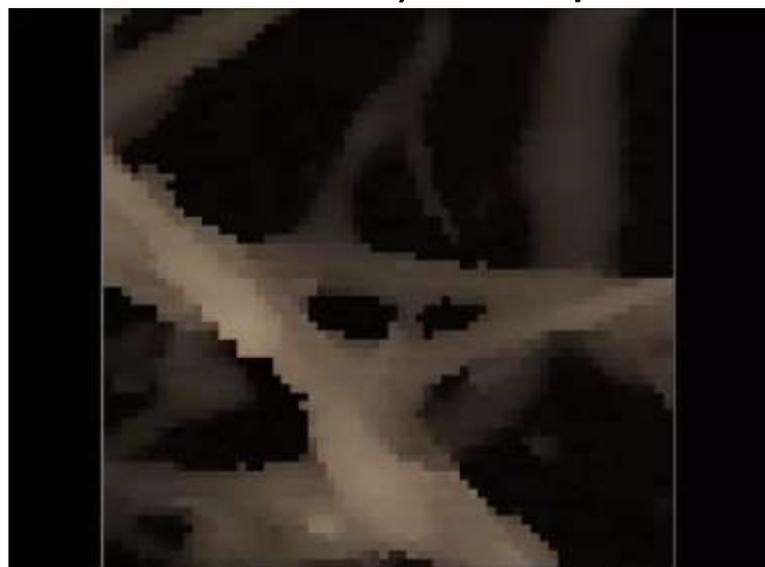
Professor Hirokawa group



15 × 15 μm, 3 min/Frame



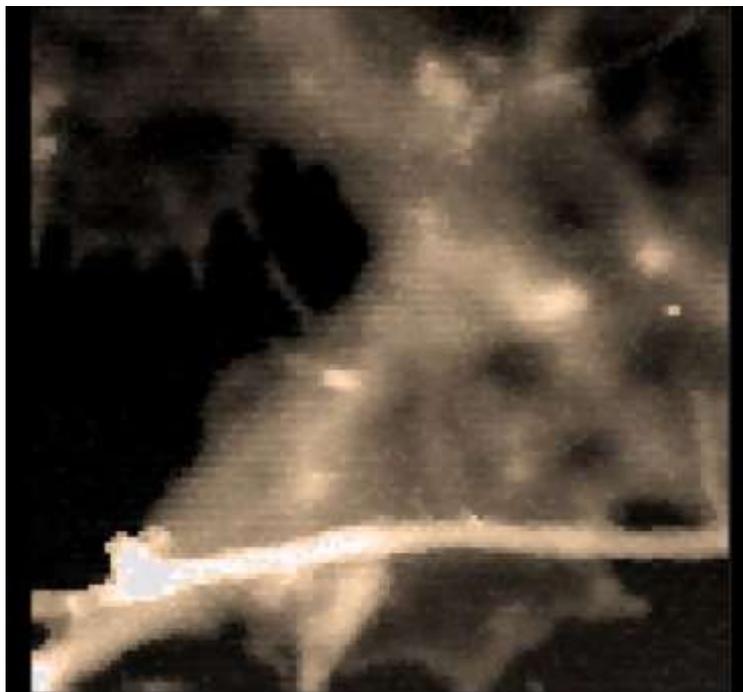
5 μm



5 × 5 μm, 1 min/Frame

領域を絞った測定例

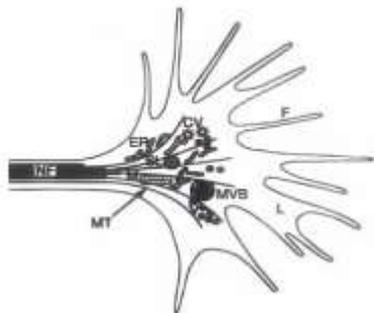
# 測定例神経細胞の連続イメージング



15 × 15 μm, 4 min/Frame  
plasmalemmal precursor vesicles (ppvs)



5 × 5 μm, 1 min/Frame



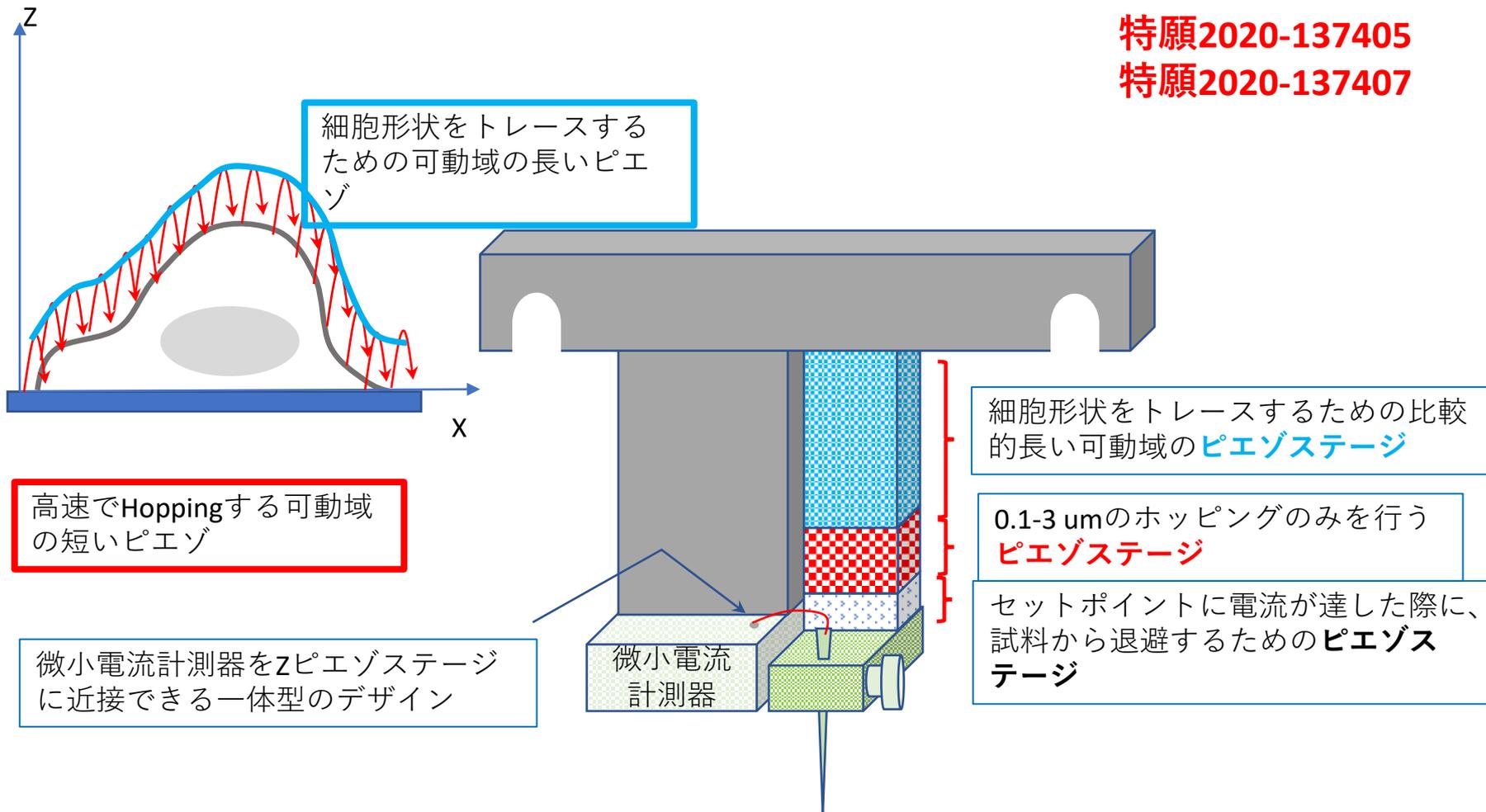
新技術

課題の解決法 2

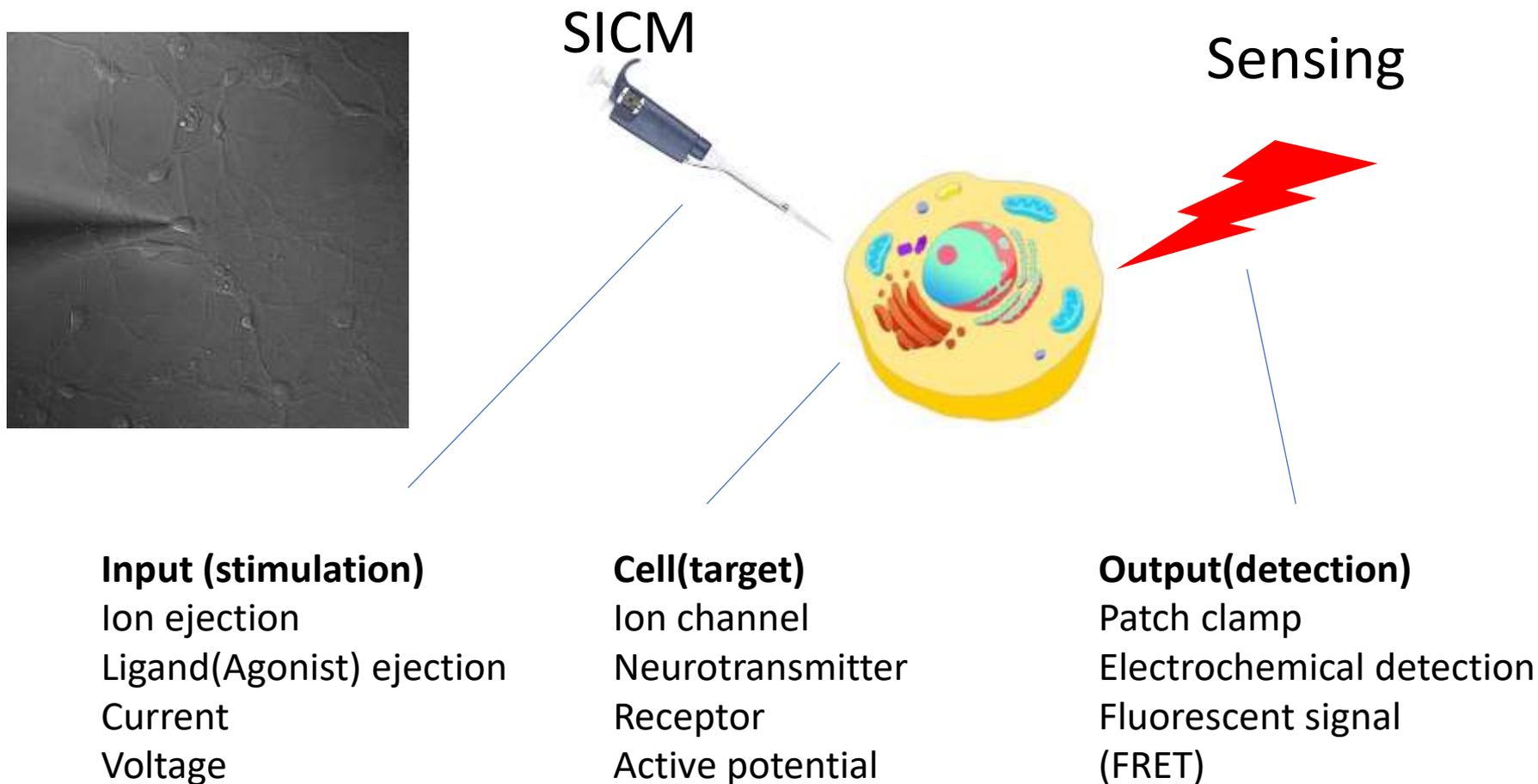
# 高速駆動可能なZ軸ステージ

特願2020-137405

特願2020-137407



# 細胞の機能性イメージングの戦略



SICMは形状イメージングツールにとどまらない生体センシングの可能性を有する

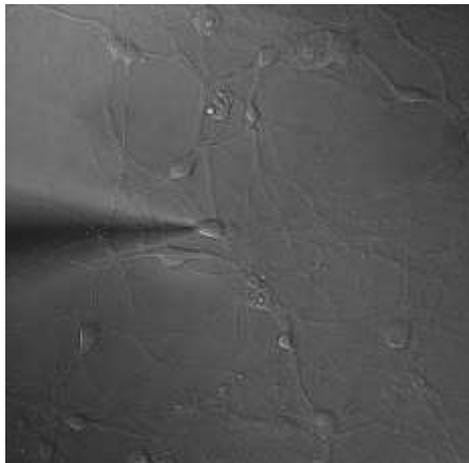
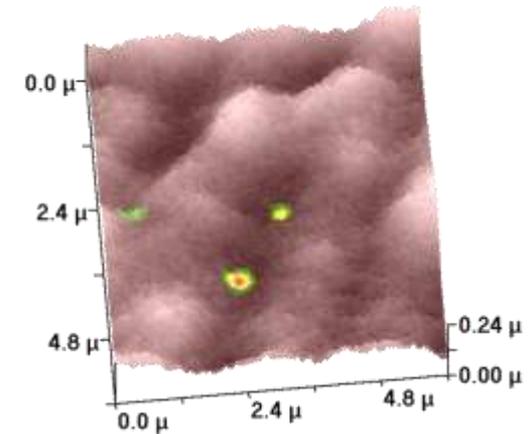
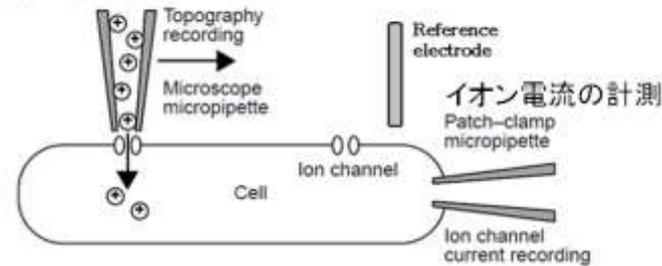
# 化学物質の局所投与



## イオンチャネルのマッピング (SICM+パッチクランプ)

*Nature Cell Biol* 2, 616-619 (2000).

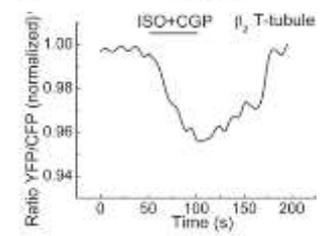
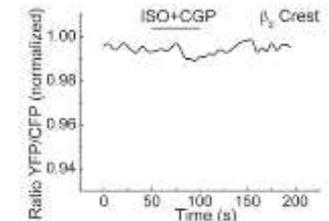
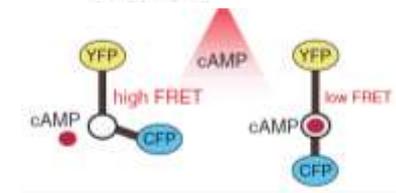
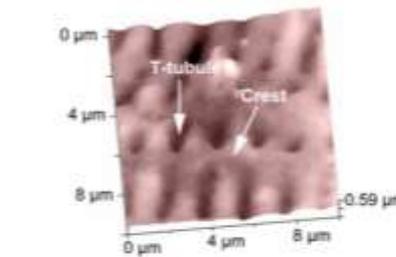
形状測定/カリウム  
イオン放出



## 受容体のマッピング (SICM+FRET)

*Science* 327, 1653-1657 (2010).

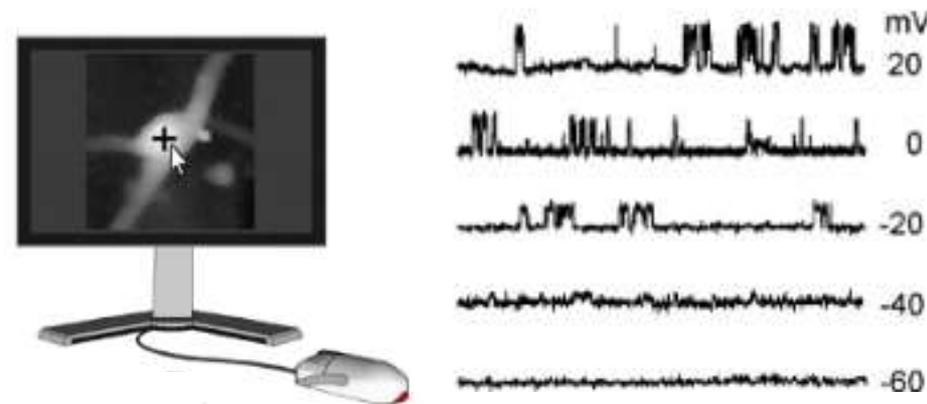
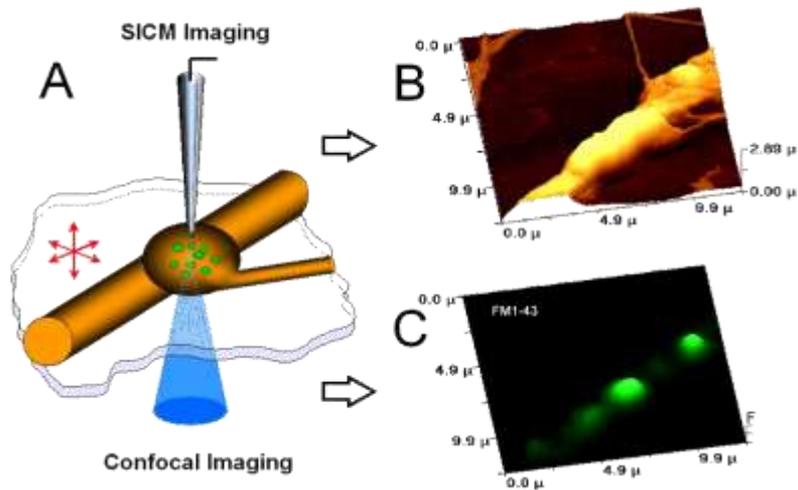
- ①リガンドを局所投与
- ②cAMPの濃度が変化
- ③FRETシグナルの減少



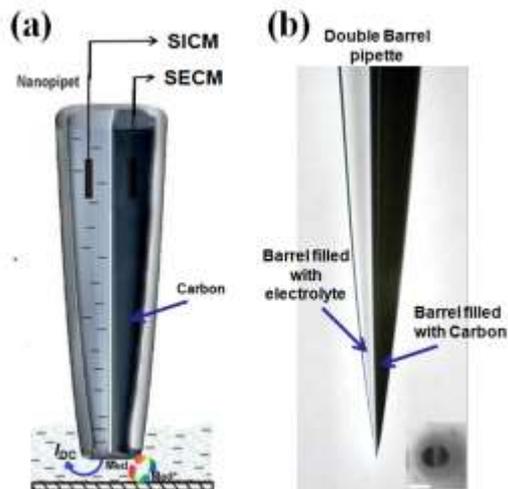
# 他の分析との融合

表面共焦点イメージ

局所パッチクランプ



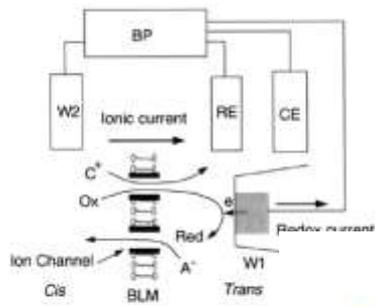
*Neuron* 79, 1067 (2013).



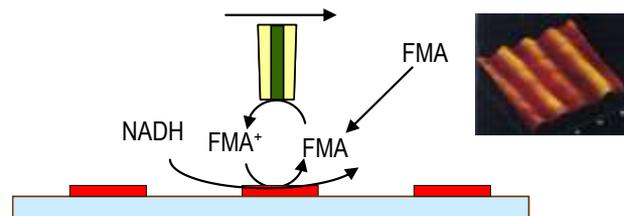
## SICMに電極を搭載 ナノ電気化学顕微鏡

# 走査型電気化学顕微鏡 (SECM)

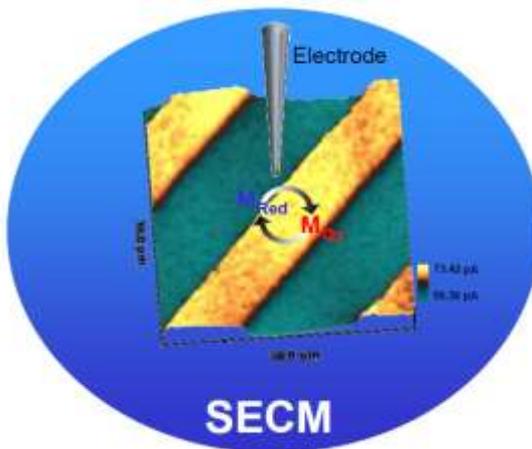
Membrane permeability 1994



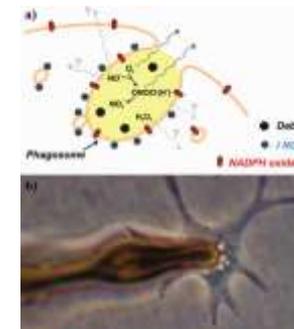
Enzyme Reaction 1996



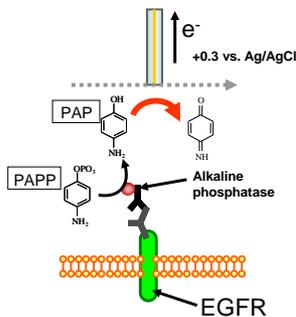
Embryos Respiration 2001



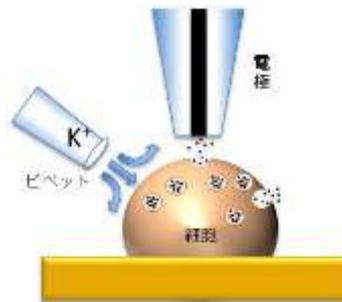
Nitric Oxide 1990



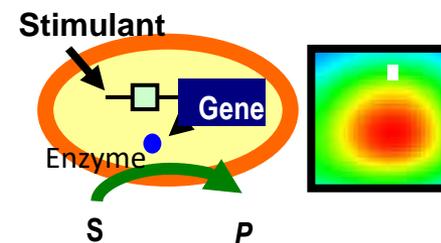
Membrane Protein 2009



Neurotransmitter 1983



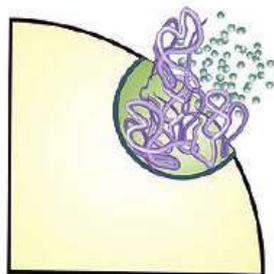
Gene Expression 2004



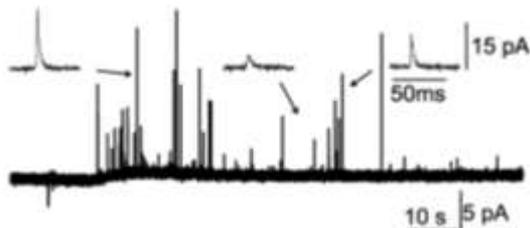
# SECMの利点

時間分解能が広範囲に及ぶ (ミリ秒から数日の事象を計測可)

ミリ秒

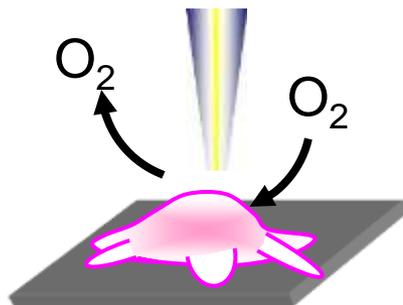


神経伝達物質

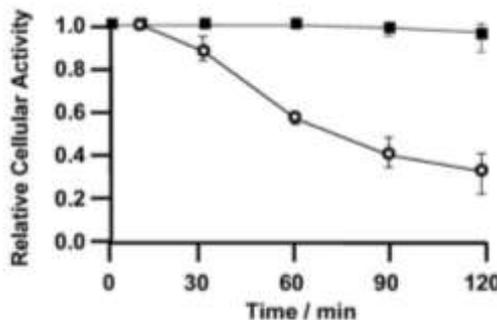


Takahashi, Y. et al.  
*Angew. Chem. Int. Ed.*  
**50**, 9638-9642 (2011).

秒～分



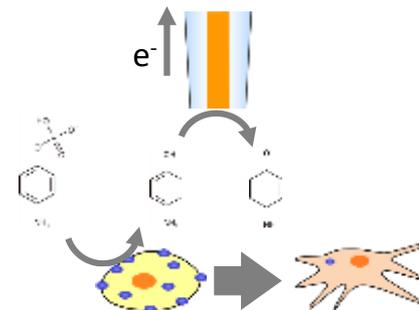
呼吸活性



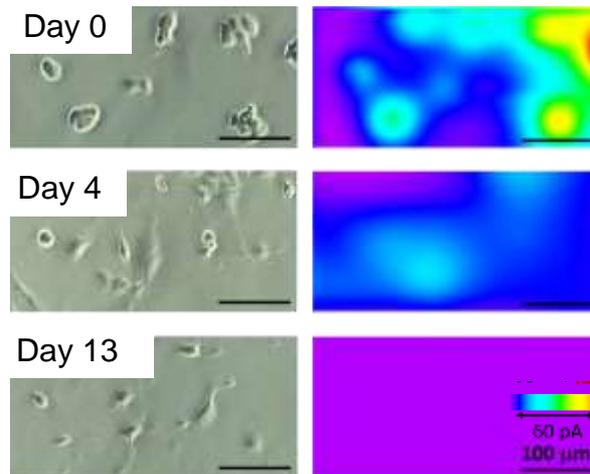
薬物感受性

*Anal. Chem.* **2003**,  
75 (9), 2154-2158.

数日



タンパク質 (酵素) の発現

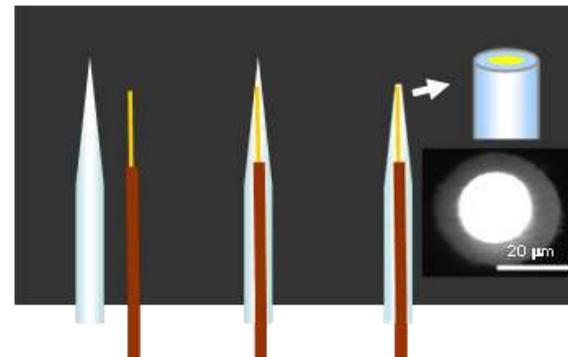
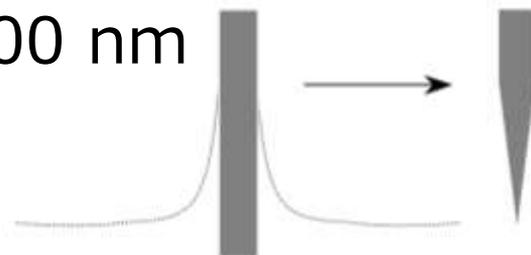


Matsumae, Y., Takahashi, Y.  
et al. *Chem. Commun.* **49**,  
6498-6500 (2013).

# 電極作製

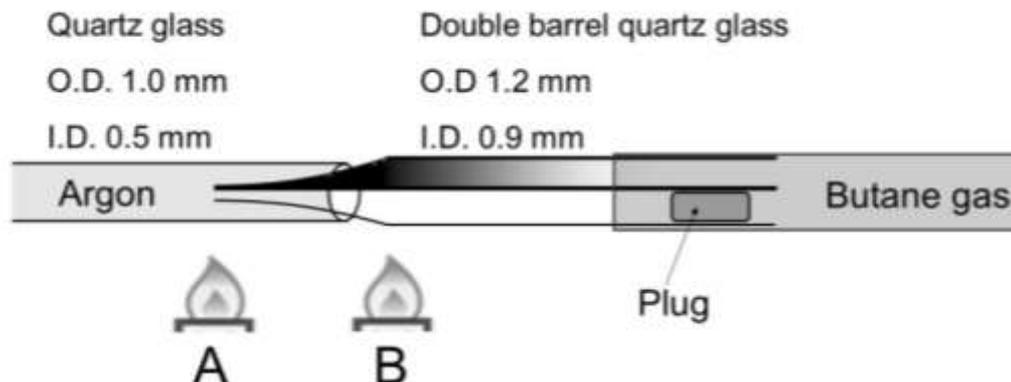
## ① 金属を細線化する

半径 10,000 nm



## ② ガスをカーボンにする

半径 100 nm  
以下



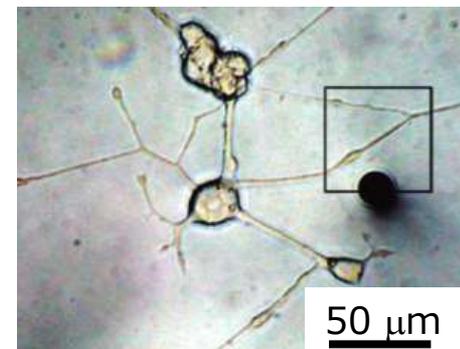
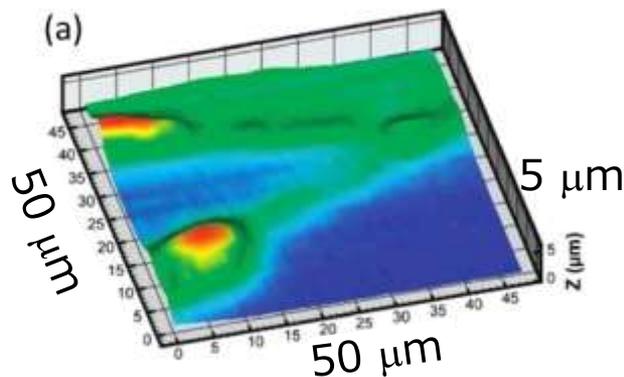
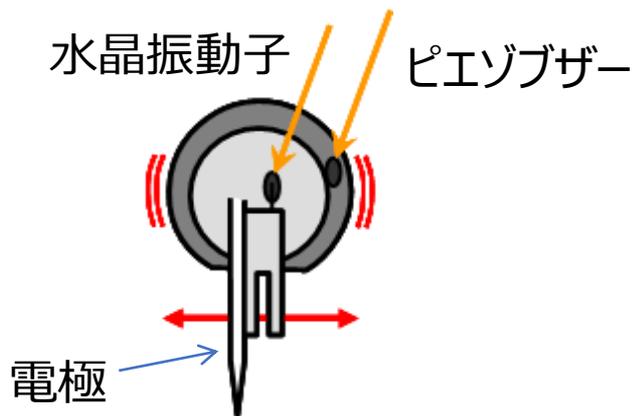
Takahashi, Y., et. al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 9638-9642 (2011)

**特開2010-261923(P2010-261923A)**

**3分**でナノ電極が簡便に作製可能

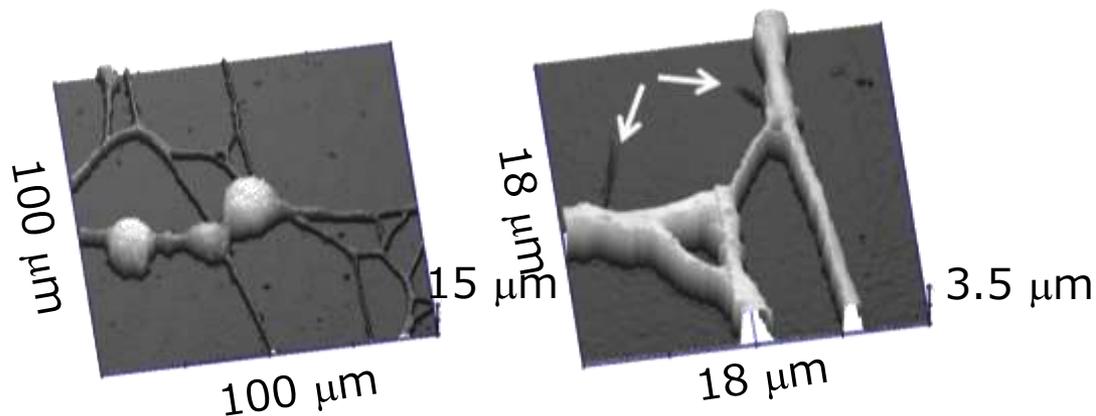
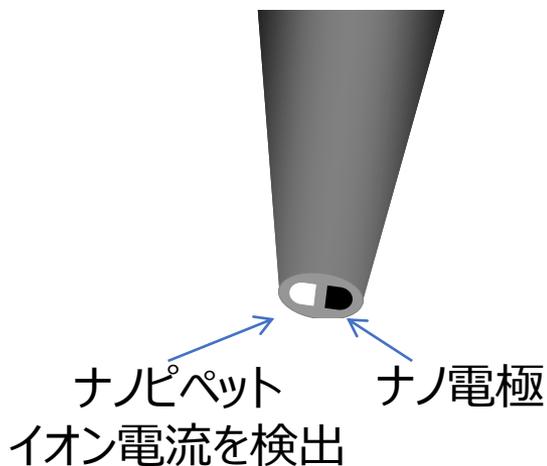
# 電極 - 試料間距離制御

## ① 従来法 “力” を利用



*Anal. Chem.*, 77, 1111 (2005).

## ② “電流” を利用



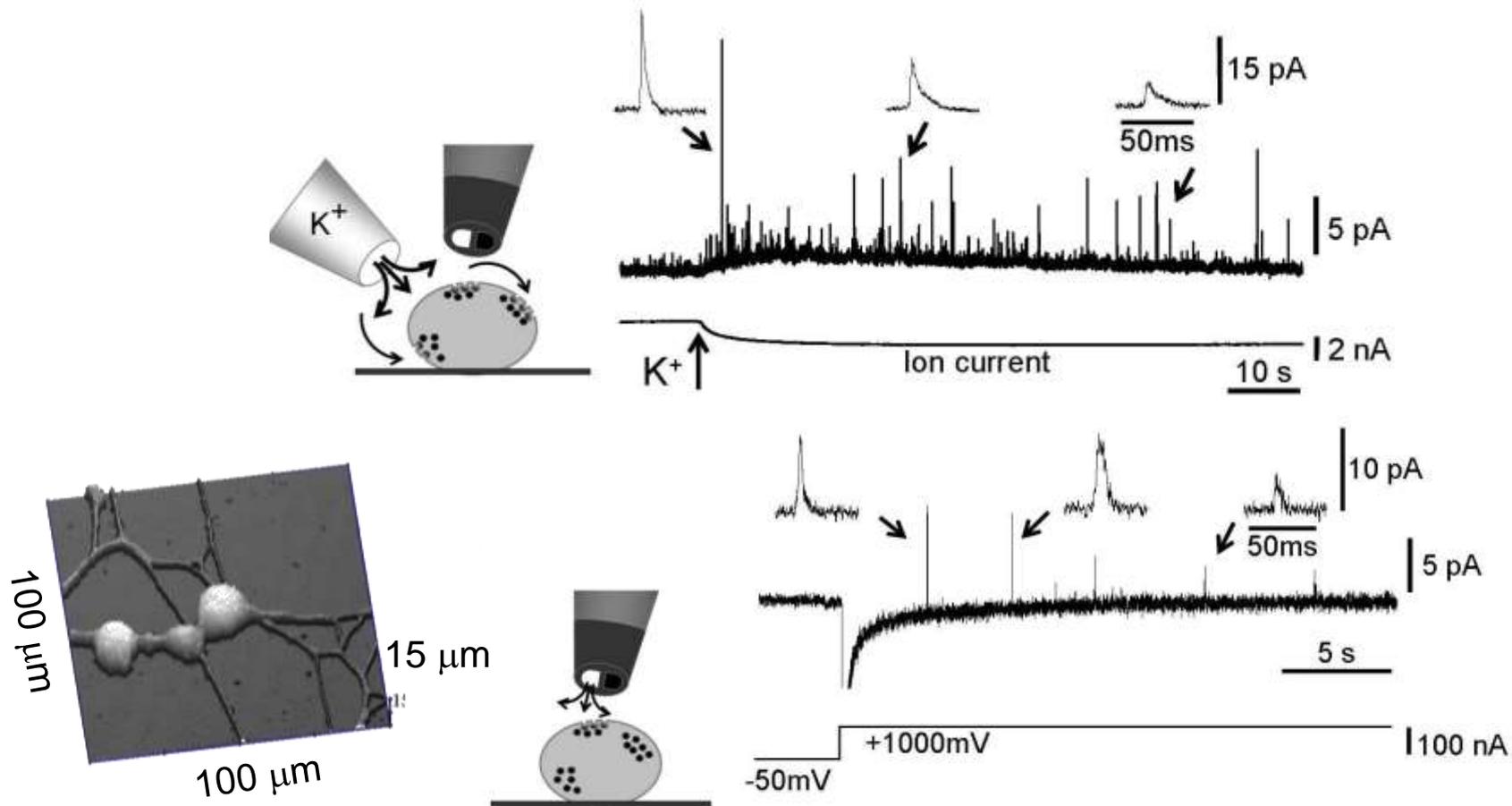
Takahashi, Y., et. al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 9638 (2011).

**光で見るとよりも鮮明**

SECMによる測定例

# 局所的な刺激と神経伝達物質の計測

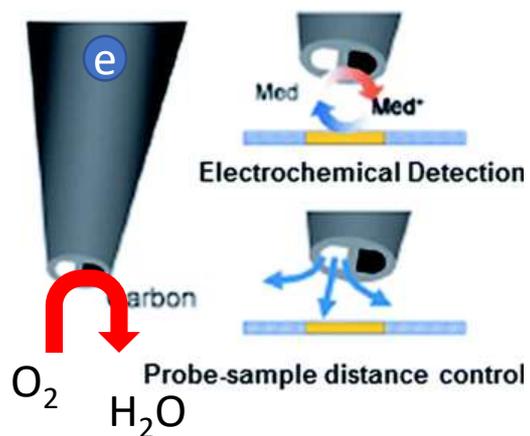
## Local K<sup>+</sup> stimulation



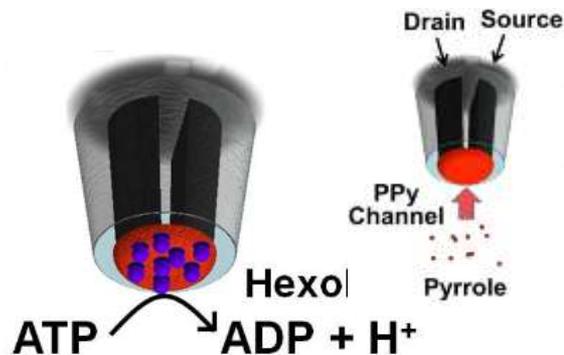
*Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9638–9642

# ケミカルの検出の戦略

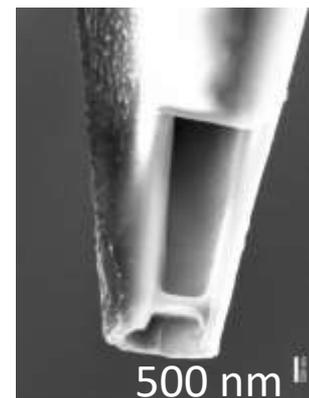
## Electrochemical detection



## Electron conductance detection



## Ion conductance detection



Sensitivity	△
Selectivity	◎
Resolution	◎
Response	◎

Resolution	×
Sensitivity	◎
Selectivity	○
Response	×

Resolution	◎
Sensitivity	◎
Selectivity	△
Response	◎

# 新技術の特徴・従来技術との比較

- これまでのプローブ顕微鏡のほとんどが構造を可視化するものであった。
- 新技術は化学物質の濃度変化等をとらえることができる。
- 更にこれらの技術を確立している
  - 高速化技術（走査機構／画像処理）
  - ライブセルイメージング技術
  - 試薬に対する応答を可視化

# 想定される用途

液中に存在するサンプルのナノスケールの構造変化や  
化学物質の濃度変化の計測

(例)

- 細胞表面の形状測定・代謝物測定
- 蓄電材料の評価
- 触媒材料の評価

(今後) ナノピペットを用いた刺激・センシングと光学  
技術の融合により、シグナル伝達と形状変化の関係を  
評価

# 企業への期待

- イメージング技術を取り扱っている企業は、本技術の導入が有効と思われる。
- 共同研究に関しても受け付けております。

# 本技術に関する知的財産権

## 特許 1

- 発明の名称 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡
- 出願番号 特願2020-137405
- 出願人 国立大学法人金沢大学
- 発明者 高橋 康史

## 特許 2

- 発明の名称 走査型イオンコンダクタンス顕微鏡
- 出願番号 特願2020-137427
- 出願人 国立大学法人金沢大学
- 発明者 高橋 康史

# 本技術に関する知的財産権

## 特許3

- 発明の名称 走査型プローブ顕微鏡及びその制御方法
- 特許番号 特許第6842750号
- 出願人 国立大学法人金沢大学
- 発明者 高橋 康史

# お問い合わせ先

金沢大学ティ・エル・オー

TEL 076-264-6115

FAX 076-234-4018

e-mail [info@kutlo.co.jp](mailto:info@kutlo.co.jp)