

## 養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名：小幡谷 育夫
2. 養成カリキュラム名：細胞内エネルギー変換・情報変換に関する1分子制御技術の開発
3. 養成カリキュラムの達成状況

今年度、本技術開発の中で原子間力顕微鏡の操作、細胞の取り扱いおよび遺伝子工学等を専門的なレベルまで習得した。これらの技術をもとに、これまで困難だった生細胞の内部へのアクセスを精密に行う材料と装置をほぼ完成させた。特に、細胞内へ挿入する探針の先端形状や径に関する知見は、本技術のみならず、細胞操作一般に共通する情報であることが示唆された。そのため、既存のマイクロキャピラリー技術などにも特許の適用拡大が考えられる。今年度の下期に遺伝子工学的な手法を用いて生細胞に対する情報挿入を試みており、技術開発に関してはカリキュラムに即して順調に進捗していると考えている。

対外発表は、国内外での口頭発表を中心に精力的に行った。論文発表は特許申請の関係で遅れているが、基本的な特許は平成 15 年中に出願・公開されたため、次年度には成果を論文発表できると考えている。

### 4. 成果

我々が開発している技術はいわば細胞の外科手術 (cell operation) である。原子間力顕微鏡 (AFM) によってナノスケールレベルで位置制御されナニュートンレベルでの力学測定が可能なカンチレバーは、正確に動き、小さな触圧を逃さない敏感な外科医の指に対応する。また、ダメージを最低限に抑えるための切削した先鋭化探針は、鋭利なメスや注射針に対応する。今年度の成果は、先鋭化探針が細胞を圧入した後に挿入される過程を定量的に判断できるモデルの構築、および先端形状や針径に依存した挿入確度および侵襲性の評価である。

#### (1) 先鋭化探針挿入過程のモデル化

先鋭化探針が細胞に挿入される際に探針にかかる力学応答を解析し、その挙動のモデル化を行った。力学応答という定量的なデータから、探針が細胞のどの位置まで挿入されたかという情報を得られる。光学顕微鏡下で操作する既存のマニピュレーション技術ではこのような情報は原理的に得ることができない。

探針が細胞に接触した後に探針にかかる力学応答は、その形状に依存していた。先端形状が円錐形のものを用いて細胞に探針を挿入した場合、探針にかかる力は二次関数の力の上昇として現れた後、一次関数の力の上昇として現れた (図 1A)。この力学応答の次数の変化点は電子顕微鏡で観察した形状の変化点と一致していた。一方、先端形状が円柱状のものでは一次関数の力の上昇が見られた後に挿入される (図 1B)。これらの挙動は軟材料を圧入する場合の力応答のモデルである Hertz モデルと一致しており、このモデルによって針の位置及び挿入過程が定量的に判断できることが明らかとなった。(特願 2003-276374) このような情報により細胞膜の圧入と通過、さらに細胞内部器官との接触などを検出することができると考えられる。

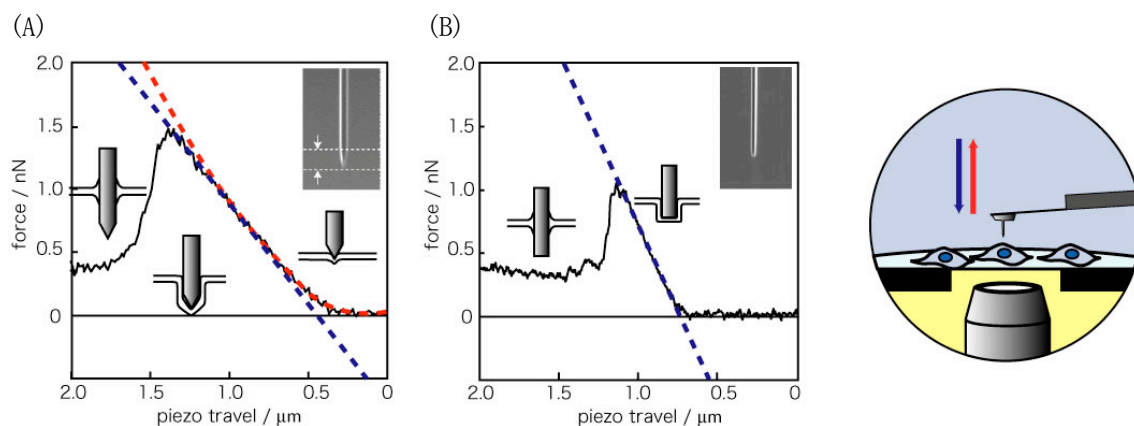


図 1 AFM を用いて先鋭化探針を細胞に挿入した際の力学応答および細胞操作の概略図。先端形状が円錐形のものを用いた場合(A)、および先端形状が円柱形のものを用いた場合(B)。

(2) 先端形状の挿入確度の評価

先端の形状の異なる探針における力学応答の結果から、円筒形のものの方が圧入距離が少なく、細胞内部に挿入される頻度が高いことを見いだした。これは非常に柔らかい細胞膜を通過するには、先端が尖っていれば良いというわけではなく、むしろ細胞膜を垂直に破断できる円筒形のものを用いた方が良いということを示唆している。この挿入確度を評価するために、先端形状と針径の異なる探針を用い、針が細胞内部に挿入できる頻度を比較した (図2)。その結果、径が 200 nm のものを用いると先端形状にかかわらず、細胞内部への挿入が可能であったが、頻度は先端が円柱形のものの方が高い結果となった。それに対し、径が 800 nm のものを用いた場合、先端が円柱形のは細胞内部に挿入できたが、先端が円錐形のものでは針を押しつけていっても圧入するのみで、細胞内部に挿入することはできなかった。この結果は細胞膜と接触する物質の形状によって細胞内挿入をコントロールすることができることを示している。

先端形状 径	円錐形	円筒形
200 nm	○ (~ 80%)	◎ (≥ 90%)
800 nm	× (~ 0%)	◎ (≥ 90%)

図2 細胞への挿入確度と先端形状および先端形状の比較。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。)

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)

1. “Force analyses of interactions between surface of living cells and peptides by using modified AFM probes” 12th International Conference on Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Techniques (STM'03)、2003/7/22、Eindhoven, オランダ
2. “AFM 細胞操作技術における探針表面の化学修飾による効果の検討”  
第 55 回日本生物工学会大会、2003/9/17、熊本
3. “先鋭化 AFM 探針による細胞操作における力学解析”  
第 84 回日本化学会年会、2004/3/28、大阪

(3) 特許等の出願件数

2 件