

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0225

研究課題名（和文）高感度小型磁気共鳴力計測装置による早期アポトーシス検出技術の開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Development of an early detection technique of apoptosis by high sensitive magnetic resonance force measurement system(Fostering Joint International Research)

研究代表者

戸田 雅也 (Toda, Masaya)

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：40509890

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：より迅速な細胞診断をするために、本研究ではハイスループットで個々の細胞が測定できるフローサイトメトリーと非侵食で細胞内部の活性濃度を直接測定する電子スピン共鳴力計測法に着目した。ラジカルの濃度を計測するための微小振動子を用いて大気圧下液中にいる細胞を計測対象とするために、真空封止型の磁気センサの開発を行った。また、ダイヤモンド膜内にあるNVセンターを有するプローブを作製し、それが蛍光強度計測に基づく磁気プローブセンサとして応用することができることを示した。また、アポトーシスを起こした細胞の質量変化（数ピコグラム）を計測できるような振動型のマイクロ流路の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：To detect cell healthies, mass and radical density of cell is an important role to monitor cell's states. To measure the radical density in cell, the force measurement system is useful by detecting electron magnetic resonances. For higher sensitivity in air, vacuum packaged magnetic sensors and diamond nitrogen vacancy (NV) center on Si probes have been developed. The magnetic sensor showed the detectable magnetic field of  $2.4 \times 10^{-10}$  T. The probe with NV center is usable for magnetic detection using optical methods based electron magnetic resonance. To measure the mass changes of cell, an assembled micro-tube resonator for mass sensing in liquid is fabricated and evaluated. Flowing liquid is injected as the evaluation of mass change detection performance of the device. Self-oscillation experiment has been used for recording actual mass change based on the resonance frequency shift with flowing liquid. Minimum mass resolution of the device is in the value of 1.04 pg.

研究分野：マイクロシステム

キーワード：磁気計測 細胞診断

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の死に至るプロセスであるアポトーシスの異常に関連する病気には、ガン、エイズ、ウイルス感染など様々あげられるが、例えば、ガン細胞においては、アポトーシスの不具合により細胞が不死化し分裂増殖していることがよく知られている。また近年は、アルツハイマー病とアポトーシス誘導の関係性についてなども研究されている。細胞内で特定の因子を制御し、アポトーシスの発現を早期に検出することは、発現原因の同定に繋がり、また様々なパラメータで総合評価することにより、新薬の開発や発病原因の特定が可能になる。

一般的に細胞の形状や染色による細胞死数を数えることでアポトーシスを検出しているが、これには時間が掛かり、細胞数を計測するにも技術者の慣れが必要になっている。そのため、効率化の観点からより迅速なアポトーシスの検出技術が求められている。

細胞の生き様を細胞単位で観察することは、顕微鏡観察を起源として最も標準的な細胞解析技術である。

近年、細胞集団における個々の遺伝子発現が不均一であることが示されているなど、今後単細胞解析技術の重要性は増している。そこで、ハイスループットで個々の細胞が測定できるフローサイトメトリーは、細胞をマイクロ流路に流して計測する技術であり、多数の細胞を複数のパラメータで同時に測ることができ、細胞診断の効率化が可能な技術として期待されており、磁気共鳴力計測法に基づくフローサイトメトリー技術を構築し、細胞といった液中試料の電子スピン共鳴法による活性酸素濃度計測評価をするため、高感度カンチレバー型のカンチレバーの作製と、高真空中で使用可能な薄膜 Si 窓を有する磁気共鳴力計測のための細胞を流すマイクロ流路の作製、並びに NV センターを有するダイヤモンドプローブデバイスの開発を行った。

### 2. 研究の目的

微細加工技術を駆使して作製する「生きた細胞を流せるマイクロ流路」と生体の3次元非破壊解析を行う磁気共鳴イメージング(MRI)で知られる「磁気共鳴力計測法」を用いて早期アポトーシス検出技術を開発するために、今までの細胞解析技術は、染色培養による細胞の生死判定を行うので、解析に時間がかかるという課題がある。本研究では、より迅速な診断をするために、ハイスループットで個々の細胞が測定できるフローサイトメトリーと非侵食で細胞内部の活性酸素濃度(ラジカル濃度)や密度の変化を直接測定できる細胞診断技術の確立を図る。

国際共同研究において、細胞内の特異検出に用いる高分子スピンラベル剤の合成に実績のあるドイツの研究グループと協力し、日本で開発する細胞診断技術に効率的に応用

できるラベルプローブ技術を検討した。

### 3. 研究の方法

ラジカル(電子スピン)の濃度を計測するための微小振動子を用いた高感度センシングにはセンサの高真空環境が求められる。大気圧下液中にいる細胞を計測対象とするためには、センサを真空封止する方法が考えられ、真空封止型の磁気センサの開発を行った。また、高感度な電子スピンプローブとして知られているダイヤモンド粒子内にある NV センターを利用して、NV センターを有するプローブを作製し、蛍光強度計測に基づく磁気プローブセンサとして応用することが可能かを検証した。さらに、アポトーシス等を起こした細胞の密度(質量)変化(数ピコグラム)を計測できるような振動型のマイクロ流路の作製と、さらにその性能の実証を行った。

#### (1) センサの真空封止

より高感度なセンサを実現するために、微小磁石を有する振動子の真空封止デバイスを作製した。図1に示すように振動空間と真空を保つためのゲッターを設置する空間を有するガラス基板と精密に加工された Si カバー基板とを陽極接合し、より高真空下にパッケージングされた磁石付の磁気センサの作製を行った。

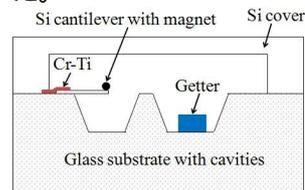


図1: Schematic diagram of the vacuum packaged Si cantilever with a mounted magnet based on anodic bonding

作製した真空パッケージ型の磁気センサの性能を評価するために、図2に示すように、大気環境下にある電子スピン標準として利用される試料(DPPH)の中で起こる電子磁気共鳴(ESR)現象の深さ方向のマッピングを行った。振動の計測は、レーザードップラー振動計により振動振幅より、ラジカル密度を計算した。

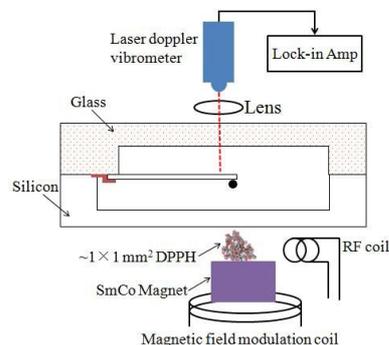


図2: MRFM measurement setup with the vacuum packaged cantilever sensor at atmospheric environment

## (2) NV センタープローブ

電子スピンによるカラー中心であるダイヤモンド欠陥 (NV) を有する膜を成膜しパターンニングすることによって、図3に示すような、走査型プローブ上に設置したプローブを作製した。

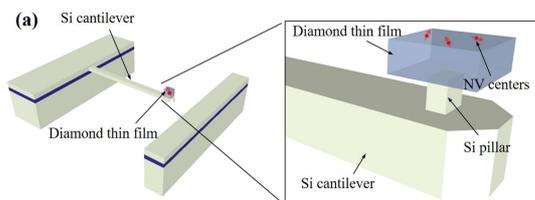


図3 : Schematic diagram of a silicon scanning probe with NV center in diamond-thin-film

作製した窒素欠陥を有するダイヤモンドプローブの磁気共鳴による蛍光強度変化を計測するために、図4に示すような共焦点系の蛍光計測光学系をセットアップし、520nmの励起光を用い、NV欠陥からの600nm-800nmの蛍光強度を2.87GHz近傍周波数の電磁波を照射しながら、強度変化を評価した。

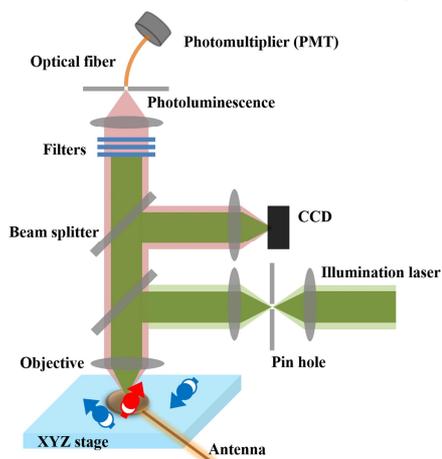


図4 : Confocal ODMR measurement setup

## (3) マイクロ流路型振動子デバイス

アポトーシス等の原因で、質量が変化していることを観測するために、細胞のごくわずかな質量変化を計測できるようなマイクロ流路型振動子を作製した。このマイクロ流路作製には、細胞が流れることができる程度の中空構造のチューブを用いる必要があり、大 $10\mu\text{m}$ を超える大きな細胞も流すことができるように高さ幅ともに $35\mu\text{m}$ 程度の流路を作製した。ウェハプロセスによる面内加工では、この加工サイズを実現するのは困難なため、図5に示すような流路構造の振動子部とそれを挟み込む指示部とを別々に作製し、それらを組み立て、隙間に接着剤を浸透させて封止することで作製した。実際に、液体を流路に挿入し、質量変化の妥当性と質量分解能を求めた。

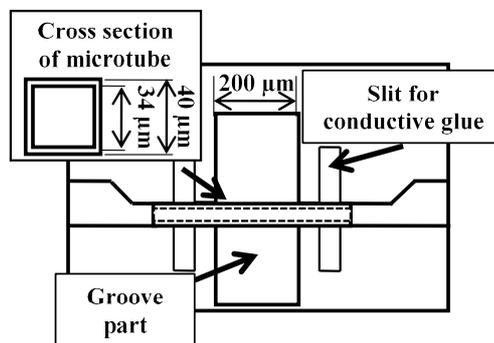


図5 : Design and fabrication process of assembled micro-tube resonator

## 4. 研究成果

### (1) センサの真空封止

微小磁石付の真空封止されたカンチレバーを図6のように作製した。カンチレバーの厚さは、 $1.5\mu\text{m}$ であり、先端に約 $20\mu\text{m}$ のNdFeB粒子が導電性接着剤で固定してある。真空封止されていることから、振動子のQ値を計測することで、どの程度の真空度に封止されているかを見積もることができ、 $7.3 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3$  Paの封止状態であることがわかった。また、そのことから、このセンサが $1.1 \times 10^{-13}$  N/ Hzの力感度を有しており、 $4.0 \times 10^{-6} \sim 2.4 \times 10^{-10}$  Tの交流磁場下において振動振幅をレーザードップラー振動計で観測することができた。これは、ノイズレベルに近く $2.4 \times 10^{-10}$  T以上の磁気計測の分解能を有していることが示された。

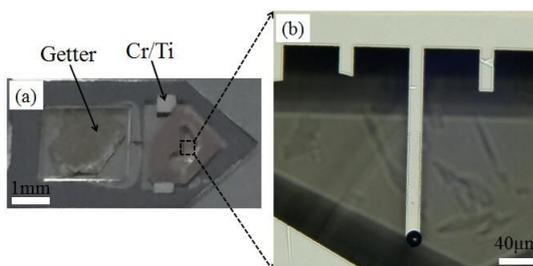


図6 : Optical image of the overall view of the fabricated vacuum packaged cantilever magnetic sensor (a), and magnified top view of the cantilever after the magnet mounting process (b)

また、電子スピン共鳴を計測するために標準試料 (DPPH) を真空封止されたセンサの外側から近づけたとき、磁気共鳴を起こす電子波の周波数を500MHzから1000MHzまで変化させることで試料内部に産まれる磁気共鳴面をスキャンし、そのときのカンチレバーの振動振幅より、試料内部のラジカル濃度に応じた強度分布が得られた (図7)。封止型微小磁石付センサをつかうことで、大気雰囲気下でも磁気共鳴を力計測によって観測することが可能であることを示すことができた。

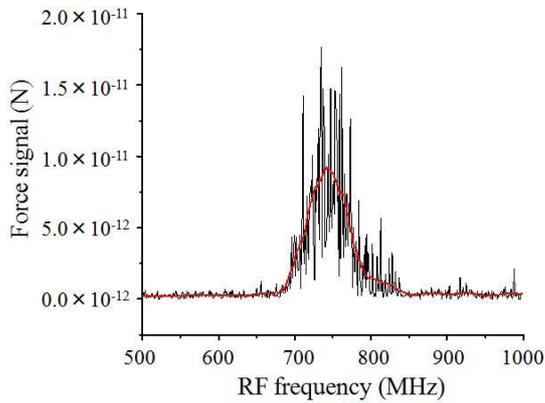


図 7 : ESR force signals in the DPPH sample versus scanning radio frequency of the coil at atmospheric environment

## (2) NV センタープローブ

Silicon-on-insulator (SOI)基板を用いて、厚さ 20 $\mu\text{m}$  のシリコン製カンチレバーの先端に不純物として窒素を微量に含ませるようにしてのダイヤモンドを MPECVD 法によって成膜した。厚さ約 1 $\mu\text{m}$  ダイヤモンドを成膜し、その後、XeF<sub>2</sub> ガスを用いて Si をエッチングすることにより、周囲に不要に成膜されてしまった部分を除去した部分的なダイヤモンド膜をパターニングすることに成功した。(図 8)その後、作製した NV センターを有するダイヤモンドをカンチレバー振動子の先端に設置されダイヤモンドに含まれる欠陥(NV センター)の蛍光特性の評価を行った。その結果、磁気共鳴を起こす 2.87GHz のところで、確かな蛍光強度変化(減光)が確認され、プローブ先端のダイヤモンドに NV センターが含まれており、それが磁気共鳴計測に応用できることを示すことができた(図 9)。

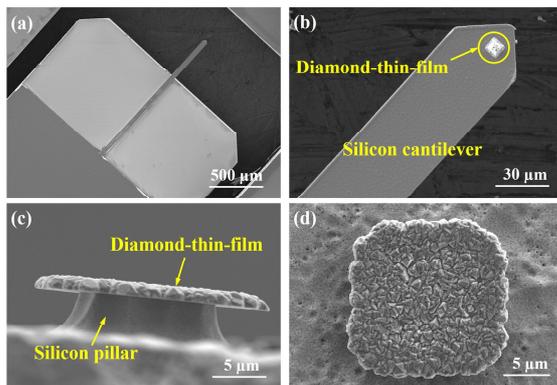


図 8 : (a) SEM image of fabricated scanning probe with selectively deposited diamond-thin-film with NV centers. (b) Enlarged image of the tip part with the diamond-thin-film. (c) Enlarged side view of diamond-thin-film. (d) Enlarged top view of diamond-thin-film.

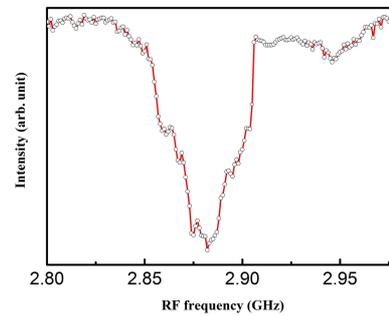


図 9 : ODMR spectrum of NV centers in diamond-thin-film

## (3) マイクロ流路型振動子デバイス

マイクロ流路型のシリコン製振動子を振動部と同じく Si 製の指示部を別々に作製しそれらを組み立てることで作製した。組み立てた直後の SEM 画像を図 10 に示す。その後、ガラス基板を上部より接合し、隙間を接着剤によって封止した後、実際に、液体を流路に挿入し、質量変化の妥当性と質量分解能を求めた。その結果、図 11 に示すように、8.51MHz という振動子固有の共振周波数が 7.69MHz に減少し、流れる水の質量約 125ng という妥当な質量変化を確認し、共振周波数をモニタするフェーズロックループ(PLL)法を用いたときの共振周波数の揺らぎから求められる最小計測質量変化を求めると 1.04pg であることがわかった(図 12)。アポトーシス等で変化する細胞の質量変化が数ピコグラムであることから、この振動型質量センサが細胞の微小な質量変化を捉える能力を有するデバイスであることを示すことができた。

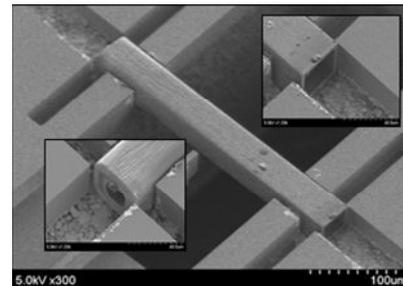


図 10 : Fabricated assembled microtube resonator. (a) outlet (b) inlet.

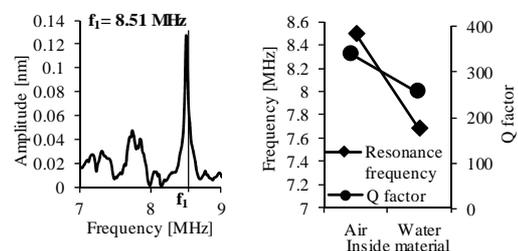


図 11 : (a.) Peak at resonance frequency measured by Laser doppler vibrometer. (b.) Actuation voltage and position dependence of resonance peak

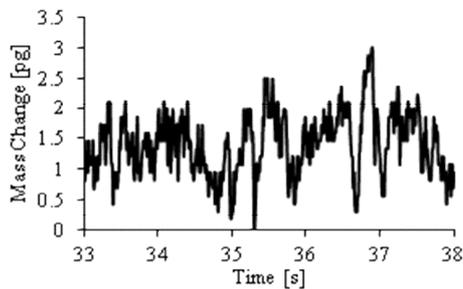


図 1 2 : Measurement mass stability after liquid injection

5 . 主な発表論文等  
(研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Masaya Toda, Koji Miyake, Liqiang Chu, Marjan Zakerin, Renate Förch, Rüdiger Berger, Akiko N. Itakura, Young 's modulus of plasma-polymerized allylamine films using micromechanical cantilever sensor and laser-based surface acoustic wave techniques, *Plasma Processes and Polymers* 15、査読有、2018、pp.1800083-1-1800083-9 DOI:10.1002/ppap.201800083

Ioana Voiculescu, Meiyong Liao, Marjan Zakerin, Ruediger Berger, Takahito Ono, Masaya Toda、Pico-thermogravimetric material properties analysis using diamond cantilever beam, *Sensors and Actuators, A: Physical* 271、査読有、2018、pp.356-363 DOI:10.1016/j.sna.2018.01.004

Mohammad Aki ta Indianto, Masaya Toda, and Takahito Ono、Fabrication and evaluation of assembled micro-tube resonator for mass measurement in flowing liquid、Proceedings of the IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems 27、査読有、2018、pp.1261-1263 DOI:10.1109/memsys.2018.8346793

Minjie Zhu, Jinhua Li, Masaya Toda, Takahito Ono、Microfabrication of a scanning probe with NV centers in a selectively grown diamond thin film through a xenon difluoride etching process, *Journal of Micromechanics and Microengineering* 31、査読有、2017、pp.125007-1-125007-7 DOI:10.1088/1361-6439/aa8f12

Ioana Voiculescu, Masaya Toda, Meiyong Liao, Takahito Ono, Pico-thermogravimetric material properties analysis using diamond cantilever beam、Proceedings of the International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems 19、査読有、2017、pp.2223-2226 DOI:10.1109/TRANSDUCERS.2017.7994519

Gaopeng Xue, Masaya Toda, Takahito Ono,

Vacuum packaged cantilever sensor mounted with a magnetic particle for magnetic force, Proceedings of the International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems 19、査読有、2017、pp.1096-1099

DOI:10.1109/TRANSDUCERS.2017.7994243

Marjan Zakerin, Antonin Novak, Masaya Toda, Yves Emery, Filipe Natalio, Hans-Jürgen Butt and Rüdiger Berger, Thermal characterization of dynamic silicon cantilever array sensors by digital holographic microscopy, *Sensors (Switzerland)* 17、査読有、2017、1191-1-1191-11

DOI:10.3390/s17061191

Minjie Zhu, Masaya Toda, Takahito Ono, Fabrication of an Assembled Scanning Probe with Nitrogen Vacancy Centers in Diamond Particle, *IEEE Transactions on Nanotechnology* 16、査読有、2017、pp.545-550 DOI:10.1109/TNANO.2016.2640191

Masaya Toda, Naoki Inomata, Takahito Ono and Ioana Voiculescu, Cantilever beam temperature sensors for biological applications, *IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering* 12、査読有、2017、pp. 153-160 DOI:10.1002/tee.22360

〔学会発表〕(計 3 件)

Mohammad Aki ta Indianto, Masaya Toda, and Takahito Ono、Fabrication and evaluation of assembled micro-tube resonator for mass measurement in flowing liquid, *IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS2018)*、2018 年、Ireland、Belfast

Ioana Voiculescu、Masaya Toda、Meiyong Liao and Takahito Ono、Pico-thermogravimetric material properties analysis using diamond cantilever beam, *The 19th International Conference on Solid-State Sensors (Transducers 2017)、Actuators and Microsystems*、2017 年、Kaohsiung、Taiwan

Gaopeng Xue, Masaya Toda, and Takahito Ono, Vacuum packaged cantilever sensor mounted with a magnetic particle for magnetic force detection、*The 19th International Conference on Solid-State Sensors (Transducers 2017)、Actuators and Microsystems*、2017 年、Kaohsiung、Taiwan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nme.mech.tohoku.ac.jp/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

戸田 雅也（TODA、Masaya）

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：40509890

### (2)研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

Berger Rüdiger

マックスプランク高分子研究所・Physics at  
Interface・プロジェクトリーダー

〔その他の研究協力者〕

Ioana Voiculescu

ニューヨーク市立大学・Grove School of  
Engineering・准教授