

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04804

研究課題名(和文)単一細胞用サブピコワット高感度熱計測システム

研究課題名(英文)Sub-pico Watt high sensitive thermal measurement system for single cells

研究代表者

猪股 直生(Inomata, Naoki)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：40712823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、単一の培養細胞を計測対象とした高分解能熱計測デバイスの開発を行った。温度センサとして酸化バナジウムサーミスタを使用すること、断熱のために薄膜浮遊構造を用いること、デバイス上で細胞が培養できることをデバイスの特徴とする。微細加工技術によって作製したデバイス上に細胞を培養し、細胞の温度計測を行った。細胞に対して薬液刺激を行ったところ、ゆっくりとした長時間の温度上昇を観察した。また、薬液刺激を行わない状態で環境温度25と37における細胞の温度信号の違いを比較したところ、後者の方が揺らぎの大きい温度信号を観測した。以上、目的としたデバイスの開発とそれを用いた細胞の温度計測に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度は細胞内部で生じる生化学反応の結果であるため、細胞の熱挙動をモニタリングするための計測パラメータとして、細胞の発する温度信号は最適であると言える。本研究で開発したデバイスを用いることで、従来手法では観測できなかった細胞の温度信号を観測することができた。どちらの手法が優れているというわけではなく、各々の長所を活かした計測を行うことで、より詳細な細胞の熱挙動を観測できるようになる。これにより、細胞の生理機能や応答機構、機能発現の仕組みの解明に近づくことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：A thermal measurement device with high-temperature resolution for single cultured cells were developed. The device had vanadium oxide thermistors as temperature sensors, suspended membrane structure under the sensors for thermal insulation, and a chamber for cell culturing. The device was fabricated using microfabrication techniques. The temperature signals from the cells cultured on the device were measured. The gradual and long-time temperature increase was observed by chemical stimulating. Also, the signals at the environment temperature of 25 and 37 °C were compared, resulting in the larger temperature fluctuation at 37 °C. We succeeded in developing the target device and measuring the temperature signals of single cultured cells.

研究分野：マイクロ・ナノ工学

キーワード：マイクロ温度センサ MEMS 細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

温度は生体や細胞に対するトリガーとして様々な生理機能に影響を与え、生体の恒常性維持と密接な関わりがある。異常時、がん化時、ウイルス感染時の発熱はもちろん、生体リズム、更には快不快の情動にまで影響を及ぼす等、生体にとって温度は最も重要なパラメータのひとつである。細胞の温度計測手法として、蛍光プローブ温度センサを用いた細胞向けの温度計測技術が確立された。単一細胞内部の温度分布が可視化できるようになり、細胞内部の温度分布は均一でないことや細胞内小器官の温度が局所的に変化することが示されている。一方、細胞外部から熱を計測する手法として、MEMS デバイスを用いた電気的手法や機械的手法がある。前者は熱電対やサーミスタ、後者は共振温度センサが該当する。どちらの場合も、微細加工技術で作製した微小温度センサに細胞を接触させて温度を計測するもので、非侵襲性、熱分解能の高さ、応答速度が利点である。種類によるが、細胞の発熱量は数 pW~数 nW/cell である。しかし、従来の MEMS 温度計測システムの熱分解能は最高で 4 nW と、単一細胞の発熱に対して十分ではなかった。細胞の熱機能の解明にはサブ pW オーダの熱分解能が求められる。高い熱・温度分解能を有するデバイスが実現できれば、従来手法では観測できなかった熱現象が観測できるようになり、細胞内外での温度変化や熱挙動の差異を比較することで細胞の熱的機能や温度応答機構、機能発現の仕組みを解明することが可能になる。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の温度現象を高温度分解能で計測できるデバイスを開発すること、また、デバイスの社会的な応用も考慮し、容易に使用可能である小型で簡便な計測系によって実現することを目指し、「小型で簡便な超高分解能熱計測デバイスの開発」を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1)誘電材料 BST(チタン酸バリウムストロンチウム)薄膜の成膜条件の検討

従来研究によれば、バルクの BST はキュリー点付近で誘電率が大きく変化する(6.7%/°C)。一般的なサーミスタ材料の白金(Pt)の温度による電気抵抗変化が 0.4%/°C であることから、この数値は温度センサとして非常に大きな可能性を秘めていることがわかる。BST 薄膜(~1µm)を PLD(パルスレーザーデポジション)法にて成膜し、その誘電率の温度依存性を評価した。

(2)高抵抗温度係数材料酸化バナジウム薄膜の検討

BST の代替センサ材料として、電気抵抗温度係数の大きい酸化バナジウム(VO₂)によるサーミスタを用いたデバイスを検討した。一般的に VO₂ は 68°C に相転移温度があり、その近辺(±10°C 程度)で大きな抵抗変化が生じるが、その前後の温度帯でも温度に依存して抵抗値は変化する。VO₂ の成膜にはゾルゲル法を用いた。

(3)デバイスの設計と作製

培養状態の細胞を用いることで、センサ部との接触面積を大きくすることができる利点、更に、従来得られている知見と比較する際に条件を揃えることができる利点がある。断熱用薄膜構造上に温度センサを設け、その上面一面に細胞を培養し、偶発的にセンサ上にのった細胞の温度を計測する構想とした。

(4)デバイスの特性評価

デバイスの評価項目として、電気ノイズをもとにした温度分解能、応答速度、センサの電圧に対する応答(センサが電圧には応答せず温度にのみ応答すること)を確認した。細胞は膜電位を発しているため、センサは電圧に応答しない必要があり、それを確認した。

(5)デバイスを用いた細胞の温度計測

計測対象の細胞は、従来の細胞温度計測の研究によく用いられる COS7 を使用した。一般的な培養手順でチャンバ内に COS7 を培養し、脱共役剤である FCCP 溶液による薬液刺激を行った際の細胞の温度信号を観察した。また、薬液刺激を行わない状態で、周辺環境温度における細胞の温度信号の違いを比較した。

(参考)新原理の温度センサ①：イオン液体熱電対

イオン液体である水酸化ナトリウム含有ポリエチレングリコール(PEG-NaOH)は-11mV/°C のゼーベック係数を有する。一般的な個体材料のゼーベック係数が、大きくても 500 µV/°C (ドーピングシリコンの場合)であることから、この値がいかに大きいかわかる。熱電対はゼーベック係数の符号が異なる 2 種の材料が温度検知点で接する必要があるが、液体では界面が維持できない問題があった。マイクロ流体チップを用いて 2 つのイオン液体を温度検知領域で電氣的に接させることでこの問題を解決した。他方のイオン液体としてヨウ素系のもの(ゼーベック係数: +0.53 mV/°C)を用いた。実際にデバイスを作製し、特性を評価した。

(参考)新原理の温度センサ②：磁気浮上温度センサ

高温分解能温度センサのためには、検知した熱を逃がさないことが重要である。いかなる温度センサでも構造上何かと接さざるを得ない、例えば、サーミスタや熱電対であれば必ず配線が必要になる。理想的な断熱状態は温度検知部が何とも接していないことであり、磁気浮上に着目した。カーボンは反磁性材料であり、その浮上高さは温度で変わることが報告されている。しかし、反磁性磁気浮上を温度センサとして用いた報告はこれまでなかった。反磁性磁気浮上温度センサを作製し、特性を評価した。ポリスチレンの微小片を試料として、示差熱分析を行った。

4. 研究成果

(1)BST 薄膜の誘電率温度依存性の評価

成膜条件のパラメータとして温度と圧力がある。複数条件で製膜した BST の誘電率温度依存性を計測した結果、最大で 0.62%/°C と、バルクのそれよりも 1 桁以上も小さな値となった。薄膜 BST では想定していた性能を得られない、もしくは我々の有する成膜装置では適切な成膜条件を得られないことが示唆された。

(2)VO₂ 薄膜の成膜と電気抵抗温度係数の評価

ゾルゲル法を用いて、VO₂ 薄膜の成膜に成功した。室温～50°C の抵抗温度係数が -1.65%/°C (図 1) と、Pt のそれよりも大きな値を得ることができた。

(3)デバイスの作製

微細加工技術を用いてデバイスを作製した。デバイスの光学顕微鏡写真を図 2 に示す。

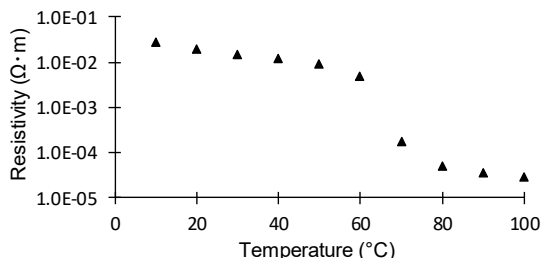


図 1. VO₂ 薄膜の温度に対する電気抵抗変化

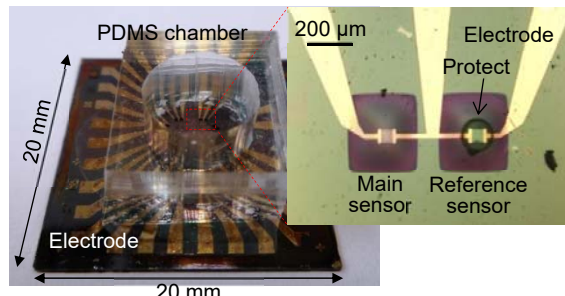
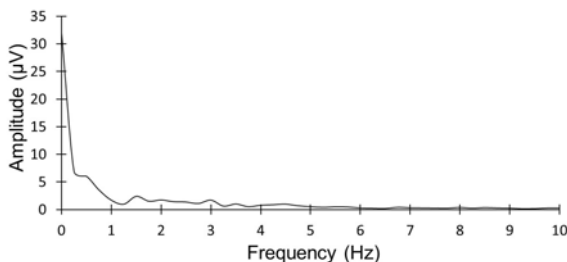


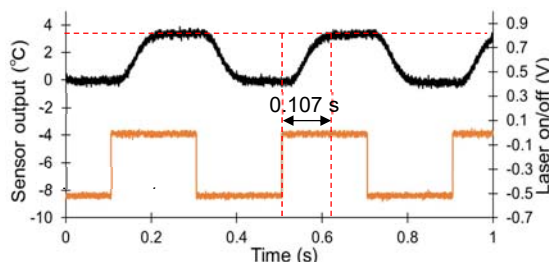
図 2. 作製したデバイスの光学顕微鏡写真

(4)デバイスの特性評価

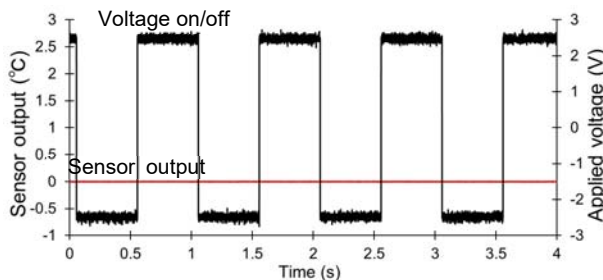
デバイスの評価として、電気ノイズ(図 3(a))をもとにした温度分解能が 1.1m°C であること、応答速度が 0.11 秒以下であること(図 3(b))、センサが電圧には応答せず温度にのみ応答すること(図 3(c))を確認した。



(a) ノイズの周波数特性



(b) レーザによるセンサ部局所加熱時の応答



(c) センサ付近への電圧入力にたいする応答

図 3. 作製したデバイスの各種特性評価

(5) デバイスを用いた細胞の温度計測

脱共役剤である FCCP 溶液による薬液刺激を行った際の細胞の温度信号を観察した結果、細胞の温度はゆっくりと上昇し、最終的に 1°C 程度上昇したところでしばらくの間その状態を維持した(図 4)。これは従来観察されている既知の発熱現象であり、作製したデバイスが細胞 1 つの温度信号を捉えていることを示している。また、薬液刺激を行わない状態で周辺環境温度室温(25°C)と 37°C における細胞の温度信号の違いを比較した結果、後者の方が得られた温度信号の揺らぎが大きかった(図 5)。これは細胞が活発に活動しているためだと考えられる。

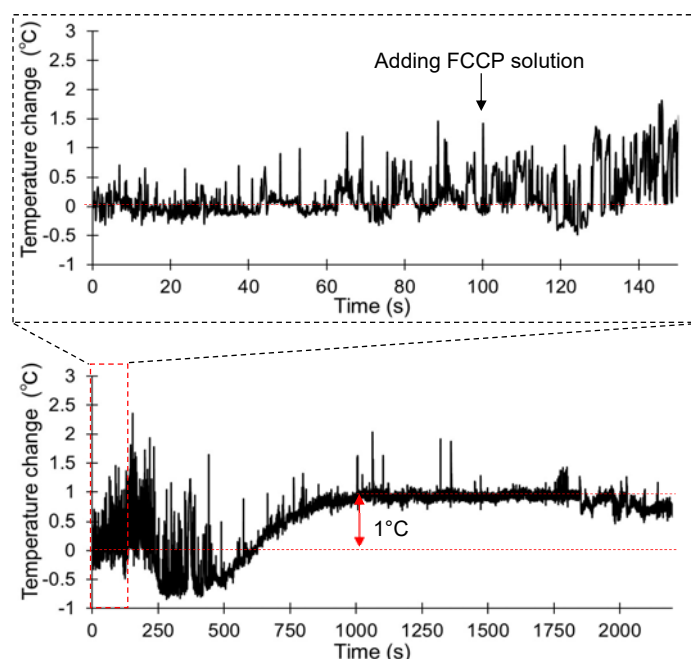


図 4. 作製したデバイスを用いた COS7 の温度計測(FCCP 刺激時)

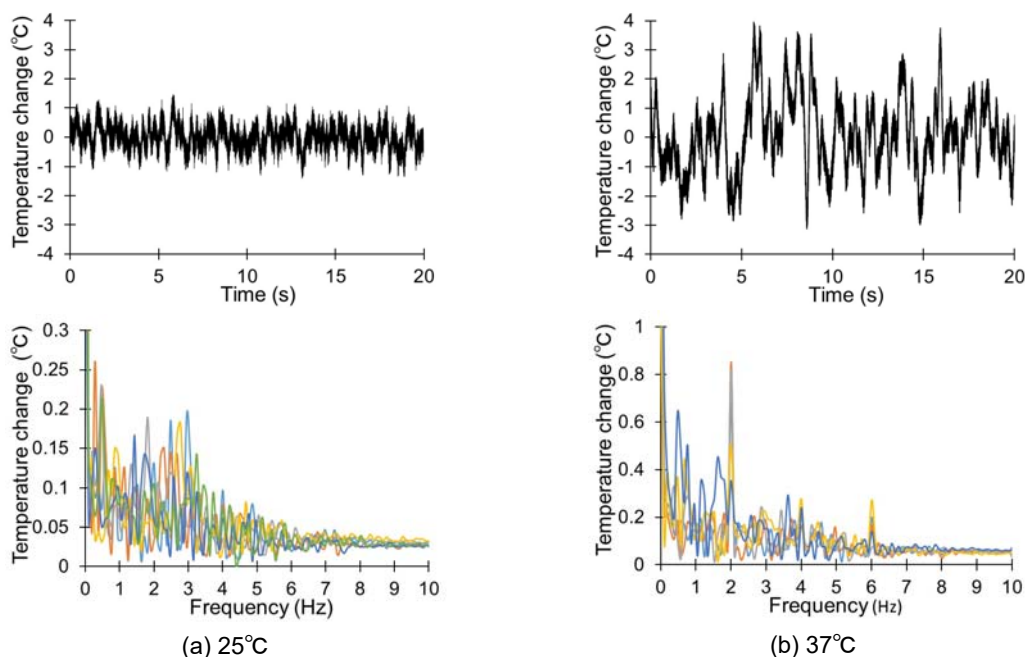


図 5. 計測した COS7 の温度信号(上)と周波数解析(下)

(参考)新原理の温度センサ①：イオン液体熱電対

コンセプト図とそれをもとに作製したデバイスの光学顕微鏡像を図 6 に、デバイスの特性評価の結果を図 7 に示す。PEG-NaOH のゼーベック係数は-11mV/K、ヨウ素系溶液は+0.53 mV/K であり、理論上この値の差分値がデバイスのゼーベック係数の絶対値となる。測定したデバイスのゼーベック係数は 10.6mV/K なので、理論値と合致する。また、温度検知部をレーザーで局所加熱した際のデバイスの応答時間を評価した結果、2.06 秒であった。

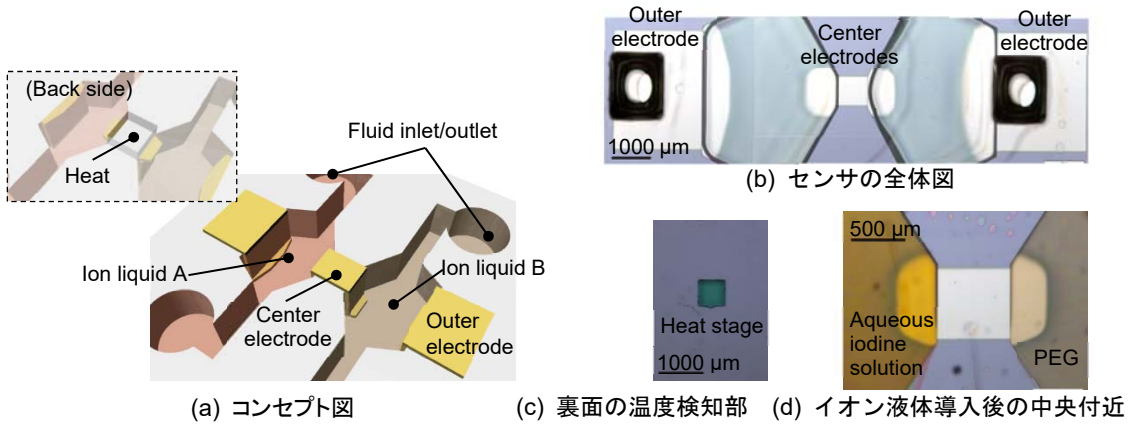


図 6. イオン液体熱電対デバイス

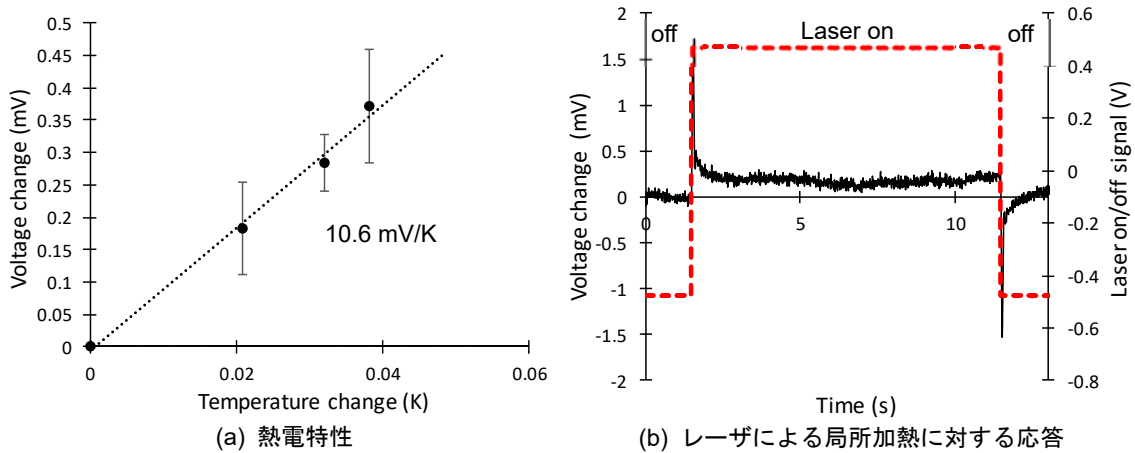


図 7. イオン液体熱電対デバイスの特性評価

(参考)新原理の温度センサ②：磁気浮上温度センサ

反磁性体磁気浮上温度センサシステムを図 8(a)に示す。反磁性体(カーボン)の温度に対する磁気浮上高さを計測したところ、大気中： $-1.49\mu\text{m}/^\circ\text{C}$ 、真空中： $1.55\mu\text{m}/^\circ\text{C}$ となった。符号の違いはあるが、絶対値はほぼ同程度の値となった。今回使用したカーボンは直径 8mm、厚さ $25\mu\text{m}$ であり、このスケールでは熱の逃げは大気中でも真空中でも大差なかったと結論づけられる。ポリスチレン小片($1\times 1\times 0.3\text{ mm}$)の示差熱分析の結果を図 8(b)に示す。ガラス転移点である 65°C で参照信号とは異なる挙動を示した。これにより、反磁性体磁気浮上温度センサを用いた示差熱分析に成功したと言える。

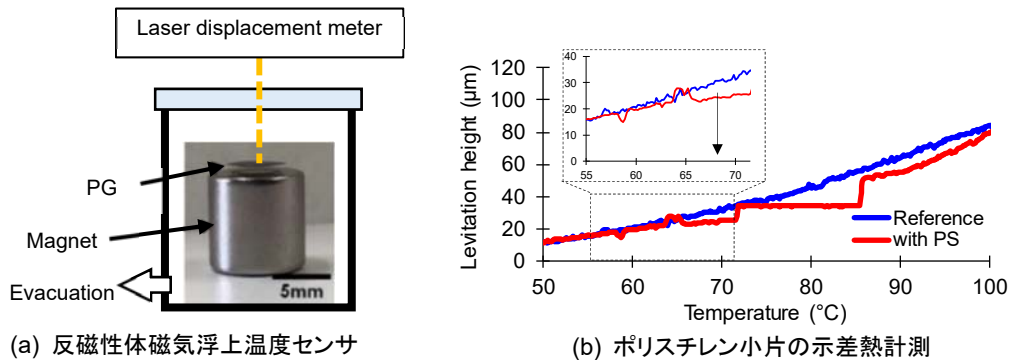


図 8. 反磁性体磁気浮上温度センサシステム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inomata Naoki, Van Toan Nguyen, Ono Takahito	4. 巻 12
2. 論文標題 Piezoresistive property of an aluminum-doped zinc oxide thin film deposited via atomic-layer deposition for microelectromechanical system/nanoelectromechanical system applications	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 IEEJ TRANSACTIONS ON ELECTRICAL AND ELECTRONIC ENGINEERING	6. 最初と最後の頁 S120 ~ S124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tee.22570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Naoki Inomata, Nguyen Van Toan, Masaya Toda, and Takahito Ono	4. 巻 2
2. 論文標題 Evaluation of Piezoresistive Property of Vanadium Oxide Thin Film Deposited by Sputtering	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 IEEE Sensors Letters	6. 最初と最後の頁 2500204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/LSENS.2018.2791530	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inomata Naoki, Kamakura Kentaro, Van Toan Nguyen, Ono Takahito	4. 巻 14
2. 論文標題 Fabrication of on chip vacuum pump using a silicon nanostructure by metal assisted chemical etching	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering	6. 最初と最後の頁 954 ~ 958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tee.22887	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inomata Naoki, Van Toan Nguyen, Ono Takahito	4. 巻 3
2. 論文標題 Liquid Thermocouple Using Thermoelectric Ionic Liquids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IEEE Sensors Letters	6. 最初と最後の頁 1 ~ 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/LSENS.2019.2912418	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inomata Naoki, Inomata Eiji, Ono Takahito	4. 巻 15
2. 論文標題 Diamagnetic Levitation Thermometer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering	6. 最初と最後の頁 773 ~ 774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tee.23115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inomata Naoki, Inaoka Ryohei, Okabe Kohki, Funatsu Takashi, Ono Takahito	4. 巻 27
2. 論文標題 Short-term temperature change detections and frequency signals in single cultured cells using a microfabricated thermistor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensing and Bio-Sensing Research	6. 最初と最後の頁 100309 ~ 100309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sbsr.2019.100309	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 猪股 直生, 小野 崇人
2. 発表標題 酸化バナジウム薄膜のピエゾ抵抗評価と圧力センサ応用
3. 学会等名 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoki Inomata, Nguyen Van Toan, Masaya Toda, and Takahito Ono
2. 発表標題 Evaluation of Piezoresistive Property of Vanadium Oxide Thin Film
3. 学会等名 The 31st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪股 直生, 鎌倉 健太郎, Nguyen Van Toan, 小野 崇人
2. 発表標題 金属触媒シリコンエッチングによるナノポーラス構造を用いたマイクロヌーセンポンプ
3. 学会等名 第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪股 直生, 猪股 映史, 小野 崇人
2. 発表標題 磁気浮上を用いた温度センサ
3. 学会等名 第10回集積化MEMS技術研究ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲岡 凌平, 猪股 直生, 小野 崇人, 岡部 弘基, 船津 高志
2. 発表標題 単一培養細胞の熱挙動観察のための高感度温度センシングデバイス
3. 学会等名 第 36 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----