

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20246028

研究課題名（和文）

生体マイクロ波原子間力顕微鏡の開発及び細胞活性の非侵襲計測

研究課題名（英文）

Development of bio-microwave atomic force microscopy and noninvasive measurement of cell activity

研究代表者

巨 陽 (JU YANG)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：60312609

研究成果の概要（和文）：本研究は、微細加工技術により微小寸法のマイクロ波伝送導波線路の開発が可能であることに着目して、細胞内物質の導電率および誘電率を計測する独自の発想に基づき、マイクロ波の伝送、検出ができる生体計測用マイクロ波原子間力顕微鏡プローブを開発し、探針近傍の細胞における近接場マイクロ波の振幅および位相の変化を検出することによって、細胞の電気的特性の計測を可能にする独創的な生体マイクロ波原子間力顕微鏡を開発した。

研究成果の概要（英文）：A novel microscopy which is capable of investigating surface topography and electrical property of cells simultaneously on a sub-nanometer scale was developed. The microwave atomic force microscopy (M-AFM) is a combination of the principles of the scanning probe microscope and the microwave-measurement technique. The waveguide structure of the M-AFM probe allows microwave signals to propagate through the probe and emit from the tip of it. Based on the theoretical analysis and the measured amplitude and phase information of microwave signals, M-AFM can implement the quantitative characterization of the local conductivity and permittivity of cells on the sub-nanometer scale.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
2009年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2010年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
総計	37,000,000	11,100,000	48,100,000

研究分野：機械工学

科研費の分科・細目：機械材料・材料力学

キーワード：マイクロ波、原子間力顕微鏡、AFMプローブ、電気的特性、細胞計測

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療、すなわちヒト細胞を用いて、これを培養し、患部に移植する治療法が新しい有望な治療法として注目を集めている。骨髄幹細胞は、ES細胞と並んで、再生医療で最も重要な研究対象であり、遺伝子治療の手段としても有力視されている。最近では、骨髄幹細胞の増殖、分化に関する研究は盛んに行われてきて、角膜、心筋、軟骨、骨芽細胞などへの分化に成功している。しかしながら、これらの研究成果の臨床への応用は未だ実現

困難な状況にある。その重要な原因として、骨髄幹細胞の増殖、分化過程に細胞の活性評価や変異検出に関する技術が、そのニーズが非常に高いにもかかわらず、未だ確立されていない状況にある。一方、本研究の申請者らは、マイクロ波物性評価技術と、原子間力顕微鏡（AFM）表面観察技術を融合して、独創的なマイクロ波原子間力顕微鏡を開発し、個体材料の電気物性を大気中で計測することを実現した。本研究は、この革新的な技術をさらに発展させ、細胞の活性評価という緊

急性の高い課題を取り入れて、次世代の細胞計測評価技術を開発するものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、マイクロ波の応答が物質の電磁気物性値に依存する特徴を利用して、サブミクロン空間分解能を有する生体計測用マイクロ波 AFM プローブを新規開発し、細胞内物質の導電率および誘電率を同時に計測することによって、細胞の活性を定量的に評価できる技術の確立を目的とした。マイクロ波の応答は物質の誘電率、導電率、透磁率に依存するため、物質の電気的特性を高感度に測定することができる。さらに、近接場マイクロ波を用いることにより、波長によって空間分解能が制限される問題も解決できる。本研究は、MEMS 微細加工技術により微小寸法のマイクロ波伝送導波線路の開発が可能であることを利用して、マイクロ波の伝送、検出ができる生体計測用マイクロ波 AFM プローブを開発し、探針近傍の細胞における近接場マイクロ波の振幅および位相の変化を検出することによって、細胞活性の非侵襲計測を可能にする独創的なマイクロ波生体顕微計測技術を開発する。

## 3. 研究の方法

細胞の非侵襲計測を実現するため、培養液の環境中に生きたままの細胞のその場計測が必要である。本研究は、プローブの探針が液体中においても、マイクロ波の伝送および検出を実現できる生体マイクロ波 AFM プローブを開発する。さらに、液体中におけるプローブの探針先端と細胞表面の引力および斥力を高感度に計測できる細胞計測マイクロ波 AFM プローブを開発する。

また、骨髄幹細胞の増殖、分化における細胞活性の計測評価を実現するため、細胞バンクから分譲されたヒト骨髄幹細胞株を用いて、細胞の増殖培養および分化誘導を実施する。細胞の分化においては、専用の細胞分化誘導培地を用いて、骨髄幹細胞による腱線維芽細胞の分化を実現する。

さらに、マイクロ波と細胞の相互作用を解明し、骨髄幹細胞および腱線維芽細胞の導電率および誘電率の定量評価を実現し、骨髄幹細胞の増殖、分化における細胞活性の非侵襲計測技術を確立する。3年継続により、(1) 生体マイクロ波 AFM プローブの開発、(2) サブミクロンスケールのマイクロ波近接場計測、(3) 骨髄幹細胞による腱線維芽細胞の分化、(4) 単一細胞の導電率および誘電率の定量評価、なる4項目の研究を推進し、目標を達成する。

## 4. 研究成果

### (1) 生体マイクロ波 AFM プローブの開発

### ① マイクロ波 AFM プローブの設計

マイクロ波の伝送特性と、AFM プローブの形状、寸法、培養液の誘電率など各要素を考慮し、電磁波の伝送解析理論に基づき、75 GHz~110 GHz 帯域のマイクロ波を効率よく伝送できる導波線路を設計した。さらに導波線路の材質、形状、寸法、使用周波数などに基づき、マイクロ波の伝送・検出が可能になる細胞計測マイクロ波 AFM プローブの最適な構造を決定した。

### ② ガリウム砒素 AFM カンチレバーの作製

マイクロ波導波路の基板として導波損失の少ない半絶縁ガリウム砒素を用い、マイクロ波導波プローブの基本になる AFM カンチレバーの作製に成功した。

### ③ マイクロ波 AFM プローブの開発

スパッタリングによりガリウム砒素カンチレバーの上下表面に金属膜を蒸着させ、マイクロストリップライン構造の導波路を形成した。さらに集束イオンビーム加工技術を用いて、カンチレバー探針部にスリットを導入させ、マイクロ波の伝送が可能になるマイクロ波 AFM プローブの開発に成功した(図1)。

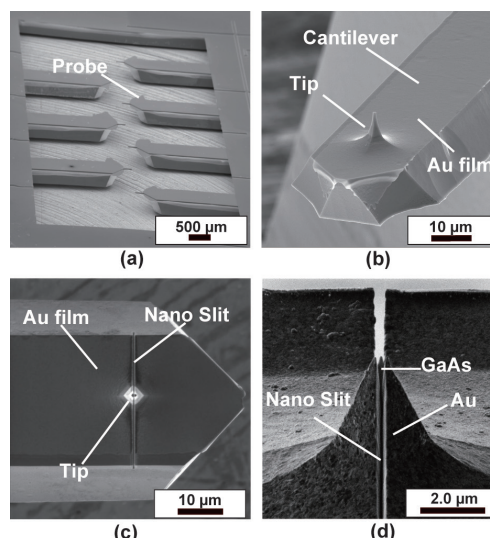


図1 開発したマイクロ波 AFM プローブ

### (2) サブミクロンスケールのマイクロ波近接場計測

#### ① 生体マイクロ波 AFM プローブの評価

原子間力顕微鏡を用いて、開発したマイクロ波 AFM プローブの表面形状計測機能を調査し、プローブのバネ定数や共振周波数、検出分解能などについて評価を行った。さらに、ネットワークアナライザを用いて、開発したマイクロ波 AFM プローブのマイクロ波導波特性を調査し、プローブのマイクロ波周波数に関する電気損失や位相変化について評価を行った(図2)。

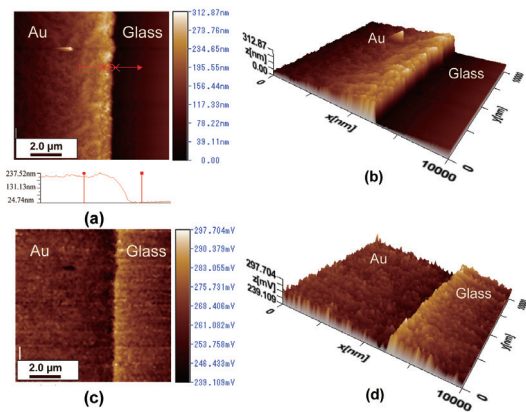


図2 マイクロ波 AFM プロブの電氣的測定機能の評価

②生体マイクロ波 AFM プロブの最適化

マイクロ波原子間力顕微鏡を用いて、マイクロ波の伝送、検出に関する各種検証実験を実施した。実験結果と理論を比較し、細胞計測マイクロ波 AFM プロブの形状、寸法などを改良し、マイクロ波 AFM プロブの探針近傍の細胞における近接場マイクロ波の振幅および位相の変化の検出感度を向上させ、マイクロ波 AFM プロブの最適化を実現した (図3)。

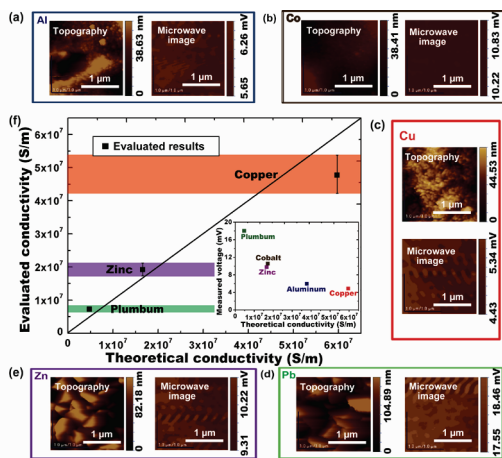


図3 マイクロ波原子間力顕微鏡による材料の電氣的特性の定量評価

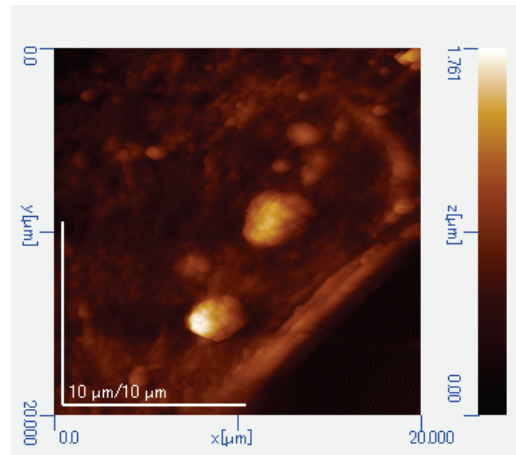
③マイクロ波近接場の計測

培養した骨髄幹細胞を用いて、細胞内 1 μm 深さ範囲における近接場マイクロ波の計測を行った。75 GHz~110 GHz 帯域のマイクロ波を掃引することにより、各周波数における近接場マイクロ波の振幅および位相の変化の高精度計測を実現した (図4)。

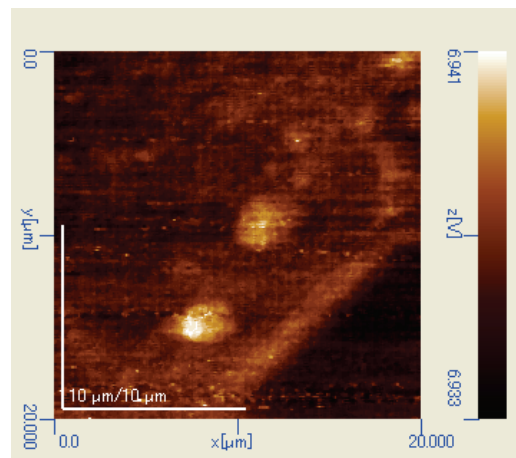
(3)骨髄幹細胞による腱線維芽細胞の分化

①骨髄幹細胞の増殖培養

凍結状態の骨髄幹細胞を解凍し、37°C、5%CO<sub>2</sub> の環境中で 10%ウシ胎児血清液を含む DMEM 培地中に培養し、各段階での培養、



(a) マイクロ波 AFM による細胞の表面形状像



(b) マイクロ波 AFM による細胞の電氣的特性像

図4 マイクロ波原子間力顕微鏡による細胞の計測

洗浄、分離を経て、活性度の高い骨髄幹細胞の増殖培養を実現した。

②骨髄幹細胞による腱線維芽細胞の分化

シリコン皿の伸展による力学的な刺激により、骨髄幹細胞の分化による腱線維芽細胞の生成を実現した。腱の線維芽細胞の検出計測は逆転写遺伝子増幅法により実現した。さらに、伸展の振幅、周波数、作用時間などの刺激条件を制御することにより、骨髄幹細胞の分化による腱線維芽細胞生成の最適化を行った (図5)。

(4)単一細胞の導電率および誘電率の定量評価

測定結果をマッピングすることにより、細胞の表面形状および電氣的特性分布をサブミクロン空間分解能で同時に計測することに成功した。さらに、単一細胞の導電率および誘電率の定量評価を実現した (図6)。



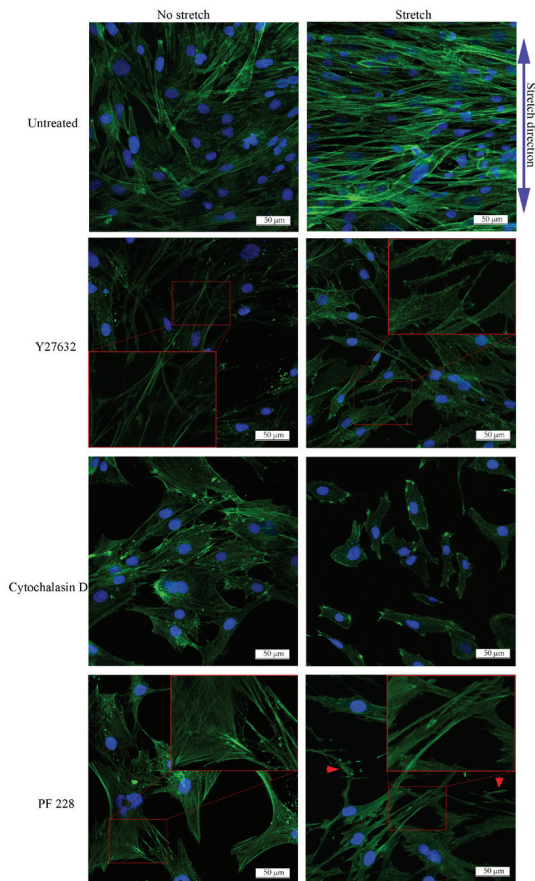


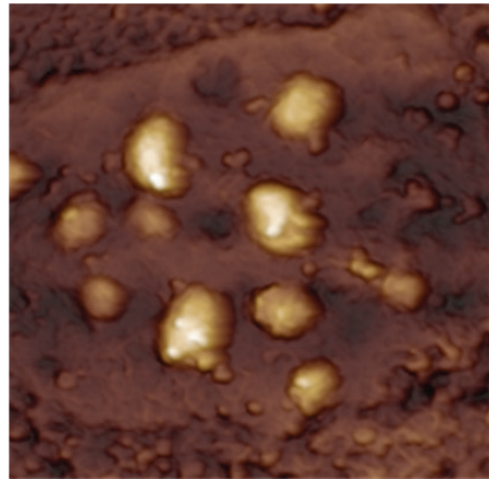
図5 骨髄幹細胞による腱線維芽細胞の分化

#### 5. 主な発表論文等

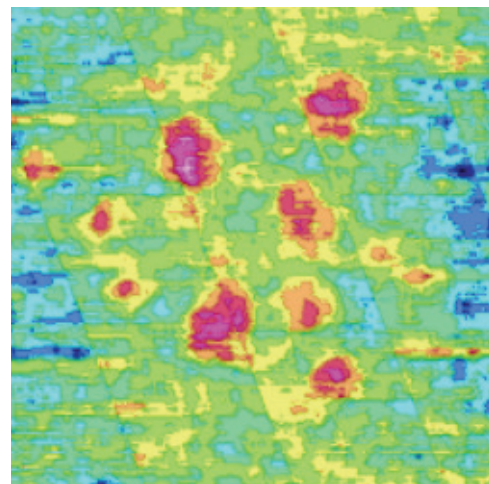
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 19 件)

- ① A. Fujimoto, L. Zhang, A. Hosoi and Y. Ju, Structure Modification of M-AFM Probe for the Measurement of Local Conductivity, *Microsystem Technologies*, 査読有, 17, 2011, 715-720, DOI: 10.1007/s00542-010-1175-9
- ② L. Zhang, Y. Ju, A. Hosoi and A. Fujimoto, Enhancement of Sensitivity for the Evaluation of Electrical Properties by Modifying the Nano Structure of Microwave AFM Probe, *Materials Science Forum*, 査読有, 675-677, 2011, 555-558, DOI:10.4028/www.scientific.net/MSF.675-677.555
- ③ L. Liu and Y. Ju, A High-efficiency Nondestructive Method for Remote Detection and Quantitative Evaluation of Pipe Wall Thinning Using Microwaves, *NDT&E International*, 査読有, 44, 2011, 106-110, DOI: 10.1016/j.ndteint.2010.10.001



(a) 単一細胞の表面形状像



(a) 単一細胞の誘電率分布像

図6 単一細胞の電気的特性の定量評価

- ④ M. Muraoka, Nanomachining by Rubbing at Ultrasonic Frequency under Controlled Shear Force, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 査読有, 11, 2011, 1986-1990, DOI http: 10.1166/jnn.2011.3519
- ⑤ M. Muraoka and S. Komatsu, Characterization of Films with Thickness less than 10 nm by Sensitivity-Enhanced Atomic Force Acoustic Microscopy, *Nanoscale Research Letters*, 査読有, 11, 2011, 1986-1990, DOI: 10.1007/s11671-010-9778-8
- ⑥ L. Zhang, Y. Ju, A. Hosoi and A. Fujimoto, Microwave Atomic Force Microscopy Imaging for Nanometer-Scale Electrical Property Characterization, *Review of Scientific Instruments*, 査読有, 81, 2010, 123708-1-4,

- DOI: 10.1063/1.3525058
- ⑦ A. Hosoi, M. Hamada, A. Fujimoto, Y. Ju, Properties of M-AFM Probe Affected by Nanostructural Metal Coatings, *Microsystem Technologies*, 査読有, 16, 2010, 1233-1237, DOI: 10.1007/s00542-009-0957-4
- ⑧ G. Song, Q. Luo, B. Xu and Y. Ju, Mechanical Stretch-induced Changes in Cell Morphology and mRNA Expression of Tendon/Ligament-associated Genes in Rat Bone-marrow Mesenchymal Stem Cells, *Molecular & Cellular Biomechanics*, 査読有, 7, 2010, 165-174, DOI: 10.3970/mcb.2010.007.165
- ⑨ G. Song, L. Yuan, Q. Luo, Y. Shi, L. Yang and Y. Ju, ERK1/2 Mediates Mechanical Stretch-induced Proliferation of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells, *IFMBE Proceedings*, 査読有, 31, 2010, 1125-1128, DOI: 10.1007/978-3-642-14515-5\_286
- ⑩ A. Hosoi and Y. Ju, Nondestructive Detection of Defects in GFRP Laminates by Microwave, *Journal of Solid Mechanics and Materials Engineering*, 査読有, 4, 2010, 1711-1721, DOI: 10.1299/jmmp.4.1711
- ⑪ L. Liu and Y. Ju, Nondestructive Measurement and High-precision Evaluation of the Electrical Conductivity of Doped GaAs Wafers Using Microwaves, *Review of Scientific Instruments*, 査読有, 81, 2010, 124701-1-4, DOI: 10.1063/1.3518038
- ⑫ M. Muraoka and S. Sanada, Displacement Amplifier for Piezoelectric Actuator Based on Honeycomb Link Mechanism, *Sensors and Actuators A: Physical*, 査読有, 157, 2010, 84-90, DOI: 10.1016/j.sna.2009.10.024
- ⑬ Y. Toku and M. Muraoka, Helical Formation of Coated Nanowires by Viscous Flow of Core Materials, *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 査読有, 2, 2010, 197-202, DOI: 10.1166/nnl.2010.1058
- ⑭ M. Muraoka, Nanomachining by Rubbing at Ultrasonic Frequency under Controlled Shear Force, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 査読有, 10, 2010, 1233-1237, DOI: 10.1166/jnn.2011.3519
- ⑮ 出水康仁, 梅原徳次, 村岡幹夫, 今井潤, 赤上陽一, 神田慎吾, 二酸化チタン含有ポリカーボネート基板へのイオンビーム照射による DNA 付着強度向上, *日本機械学会論文集 C 編*, 査読有, 76, 2010, 2142-2147, <http://ci.nii.ac.jp/naid/110007685532>
- ⑯ 巨陽, 細井厚志, マイクロ波による物性評価と欠陥検出, 非破壊検査, 査読有, 59, 2010, 227-230
- ⑰ Y. Ju, M. Hamada, T. Kobayashi and H. Soyama, A microwave Probe Nanostructure for Atomic Force Microscopy, *Microsystem Technologies*, 査読有, 15, 2009, 1195-1199, DOI 10.1007/s00542-009-0782-9
- ⑱ M. Muraoka, R. Tobe, Mechanical Characterization of Nanowires Based on Optical Diffraction Images of the Bent Shape, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 査読有, 9, 2009, 4566-4574, DOI: 10.1166/jnn.2009.1079
- ⑲ G. Song, Y. Ju and H. Soyama, Growth and Proliferation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Type I Collagen, Fibronectin and bFGF, *Materials Science and Engineering C*, 査読有, 28, 2008, 1146-1171, DOI 10.1016/j.msec.2008.04.005
- [学会発表] (計 19 件)
- ① 張嵐, 藤本紹文, 細井厚志, 巨陽, マイクロ波原子間力顕微鏡の開発, 中部地区ナノテク総合支援: ナノ材料創製加工と先端機器分析 平成 22 年度成果報告会, 2011 年 3 月 30 日, 豊田工業大学 (愛知県)
- ② 牧野孝則, 巨陽, 細井厚志, マイクロ波を伝播する M-AFM プローブの低損失導波路の構築, 日本機械学会東海学生会第 42 回学生員卒業研究発表講演会, 2011 年 3 月 13 日, 豊橋技術科学大学 (愛知県)
- ③ 鈴木敏, 渡邊早智, 巨陽, 森田康之, 力学的刺激を用いた骨髄幹細胞の分化による腱組織の構築, 日本機械学会東海学生会第 42 回学生員卒業研究発表講演会, 2011 年 3 月 13 日, 豊橋技術科学大学 (愛知県)
- ④ 渡邊早智, 徐百耀, 巨陽, 森田康之, 幹細胞の腱細胞分化に対する伸縮刺激の伸展率の違いによる影響, 日本機械学会第 23 回バイオエンジニアリング講演会, 2011 年 1 月 9 日, 熊本大学 (熊本県)
- ⑤ Y. Toku, M. Muraoka, Enhanced Bending of Coated Nanowires Using Viscous Flow of Core Material: Production of Nanoinductance, 12th International Conference on Electronics Materials and Packaging, 2010 年 10 月 26 日, Orchard Hotel, Singapore
- ⑥ 向井太一, 徐百耀, 巨陽, AFM による間葉系幹細胞の弾性的特性の定量評価, 日本機械学会 M&M2010 材料力学カンファレンス, 2010 年 10 月 11 日, 長岡技術科学大学 (滋賀県)

- ⑦ 徐百耀, 巨陽, 宋關斌, 渡邊早智, Study on the Mechanotransduction Mechanism of Tenogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells, 日本機械学会 2010 年度年次大会, 2010 年 9 月 6 日, 名古屋工業大学 (愛知県)
- ⑧ 渡邊早智, 徐百耀, 巨陽, 伸縮による間葉系幹細胞の腱細胞への分化, 日本機械学会 2010 年度年次大会, 2010 年 9 月 6 日, 名古屋工業大学 (愛知県)
- ⑨ 張嵐, 巨陽, 細井厚志, 藤本紹文, Modifying the Structure of Microwave AFM Probe for Improving the Sensitivity in the Measurement of Electrical Properties, 日本機械学会 2010 年度年次大会, 2010 年 9 月 6 日, 名古屋工業大学 (愛知県)
- ⑩ Y. Ju, Development of a Nanostructural Microwave Probe for Atomic Force Microscopy (Keynote Lecture), International Symposium on Precision Engineering and Micro/Nanotechnology 2009, 2009 年 10 月 29 日, Zhejiang University, Hangzhou, China
- ⑪ 藤本紹文, 細井厚志, 巨陽, マイクロ波原子間力顕微鏡プローブの開発および電気的特性の評価, 日本機械学会 2009 年度年次大会, 2009 年 9 月 15 日, 岩手大学 (岩手県)
- ⑫ A. Hosoi, M. Hamada, A. Fujimoto, Y. Ju, Development of a Nanostructural AFM Probe for Propagating Microwave Signals, Nanotoday 2009 conference, 2009 年 8 月 3 日, Biopolis, Singapore
- ⑬ Y. Ju, M. Hamada, A. Hosoi, A. Fujimoto, Optimization of the Tip of Microwave AFM Probe, 2009 ASME/Pacific Rim Technical Conference and Exhibition on Integration and Packaging of MEMS, NEMS, and Electronic Systems, 2009 年 7 月 19 日, San Francisco, USA
- ⑭ M. Muraoka, Inverse Analysis on Bent Shape of Nanowire in Fracture Test to Estimate the Fracture Strain, 12th International Conference on Fracture, 2009 年 7 月 12 日, Ottawa, Canada
- ⑮ M. Muraoka, T. Adachi, Formation of Helical Nanostructures by Film Deposition on Straight Nanowire, 2nd Asian Symposium on Materials & Processing, 2009 年 6 月 1 日, Penang, Malaysia
- ⑯ 藤本紹文, 細井厚志, 巨陽, マイクロ波原子間力顕微鏡に用いるマイクロ波導波プローブの開発, 日本非破壊検査協会平成 21 年度春季講演大会, 2009 年 5 月 20 日, アルカディア市ヶ谷 (東京都)
- ⑰ 藤本紹文, 細井厚志, 巨陽, マイクロ波原子間力顕微鏡に用いる GaAs プローブの開発, 日本機械学会東海支部第 58 期総

会・講演会, 2009 年 3 月 18 日, 岐阜大学 (岐阜県)

- ⑱ 濱田基弘, 細井厚志, 巨陽, GaAs を用いたマイクロ波原子間力顕微鏡プローブの開発, 日本材料学会 第 4 回マイクロマテリアルシンポジウム, 2008 年 9 月 24 日, 東京大学 (東京都)
- ⑲ 濱田基弘, 巨陽, GaAs を用いたマイクロ波 AFM プローブの開発, 日本機械学会 2008 年度年次大会, 2008 年 8 月 6 日, 横浜国立大学 (神奈川県)

[図書] (計 2 件)

- ① M. Saka, K. Sasagawa, M. Muraoka, H. Tohmyoh and Y. Ju, Springer Publishing Ltd., Metallic Micro and Nano Materials, 2011, 143-172
- ② 川嶋紘一郎, 坂上隆英, 巨陽, 共立出版, 非破壊検査工学最前線, 2009, 149-210

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 導電率測定方法および導電率測定装置  
 発明者: 巨陽, 羽木良明, 橋尾克司, 佐藤大介  
 権利者: 住友電気工業 (株), 東北大学, 名古屋大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2009-000880  
 出願年月日: 2009 年 1 月 6 日  
 国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.mech.nagoya-u.ac.jp/ju/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

巨陽 (JU YANG)  
 名古屋大学・工学研究科・教授  
 研究者番号: 60312609

### (2) 研究分担者

村岡 幹夫 (MURAOKA MIKIO)  
 秋田大学・工学資源学研究所・教授  
 研究者番号: 50190872  
 木村 英彦 (KIMURA HIDEHIKO)  
 名古屋大学・工学研究科・講師  
 研究者番号: 60345923  
 (H20)  
 細井 厚志 (HOSOI ATSUSHI)  
 名古屋大学・工学研究科・助教  
 研究者番号: 60424800  
 (H21→H22)

### (3) 連携研究者なし