

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18694

研究課題名（和文）サブnW級分解能をもつ単一細胞熱分析プラットフォームの構築

研究課題名（英文）Development of a single-cell thermal analysis platform with sub-nW resolution

研究代表者

矢吹 智英（Yabuki, Tomohide）

九州工業大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：70734143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ガラス細管の加熱延伸によるマイクロチャネル形成とマイクロチャネル側面への薄膜サーミスタの成膜によるMEMS技術を用いない簡便な方法で加工でき、106K/Wオーダーの極めて高い熱抵抗をもつ高感度な熱量計（自立マイクロチャネル型ナノカロリメータ）を開発した。自作の真空多重恒温槽の内部に設置したナノカロリメータを用いて、単細胞生物であるゾウリムシ、一匹の発熱量の計測に成功した。また、ナノDTAによりサブマイクロジュールレベルの相転移熱量を正確に計測できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞状態の診断や細胞機能の理解のために、単一細胞熱分析が一つの有効な技術と考えられる中で、本研究を通じて、単一細胞の代謝熱を計測できるセンサ構造、計測システムを構築できたことは意義深い。今後、センサのさらなる高感度化により、個体差や状態変化を熱的に検出できる技術の開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：We developed a highly sensitive calorimeter (freestanding microchannel type nanocalorimeter) with extremely high thermal resistance on the order of 10 K/W. The developed nanocalorimeter can be fabricated by two simple processes without using costly MEMS fabrication techniques: heat-drawing a glass capillary to form the microchannel part and depositing a chromium nitride thin film thermistor on the side surface of the microchannel. Using the nanocalorimeter installed inside a self-built vacuum thermostatic chamber, we succeeded in measuring the metabolic heat of a single paramecium. We also demonstrated that the nano-DTA using the developed nanocalorimeter can accurately measure phase transition heat at the sub-micro joule level.

研究分野：熱工学

キーワード：バイオカロリメトリ ナノカロリメータ 単一細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞状態の変化(ガン化, ウイルス感染など)や, 薬剤や環境温度変化などの外部刺激に対応した細胞の代謝熱量変化を単一細胞レベルで計測したり, 細胞内タンパク質の相転移過程を観察することは, 細胞機能のより深い理解につながり, 将来的な新規診断, 治療技術の開発に寄与する. しかしながら, 要求される感度が極めて高いため, 単一細胞から発せられる熱量や極微量のタンパク質の相転移熱量を計測できる熱分析技術は確立されていない.

### 2. 研究の目的

二つの研究目的を掲げて研究を行ってきた. 一つ目は, 単一細胞の代謝熱を計測するための計測技術の開発で, 二つ目は, 極微量タンパク質の相転移熱量を計測するための熱分析技術の開発である.

### 3. 研究の方法

図 1 に本研究で開発した自立マイクロチャンネル型ナノカロリメータを示す. このナノカロリメータは, ガラスキャピラリの加熱延伸によるマイクロチャンネル構造の形成と, マイクロチャンネル構造側面への薄膜サーミスタの成膜の二つにより簡便に作製できる特徴をもつ. 加熱延伸によってチャンネル壁を薄肉化することは, サーミスタが位置する計測部の有効熱容量を小さくして応答性を高めるとともに, 計測部と周囲環境の間の熱抵抗を高めて計測感度を高める効果を持つ. MEMS 技術で作製される一般的なナノカロリメータでは, 低熱容量かつ高熱抵抗の  $1\ \mu\text{m}$  オーダの膜厚の自立膜構造を作製するのに高コストな RIE プロセスを必要とする. 一方, 本センサでは, ガラスキャピラリの加熱延伸によって簡便に低熱容量, 高熱抵抗の構造を実現している. 加工前のガラスキャピラリのサイズや加熱延伸条件を変更することで, テストセクションのサイズや肉厚をサンプルサイズに合わせて変更することも可能である. また, マイクロチャンネルの内部の計測部にサンプルを挿入して熱分析を行うため, 液体サンプルを分析する場合に生じる蒸発による誤差を抑制できる特徴もある. 次に, 単細胞動物であるゾウリムシの発熱量を計測する実験と, インジウム微粒子の DTA 実験を通じて微小な相転移熱量を計測する実験の二つについて説明する.

ゾウリムシの発熱量計測: 自作の真空恒温槽内に設置したマイクロチャンネル型ナノカロリメータの内部に挿入したゾウリムシ一匹の発熱量を計測した(図 2). 自作の真空恒温槽は内部の多重構造とペルチェ素子と測温抵抗体を用いたフィードバック温度制御により内部の温度を安定化しており, 結果的に, 温度ドリフトを  $0.03\text{mK}/\text{min}$  の極めて小さな値に抑えている. 実験では, 温度を安定化させた状態で, 外部からシリジポンプによりゾウリムシが入った水をナノカロリメータ内に導入し, 自ら遊泳して移動する過程でサーミスタ部を通過する際の温度上昇を計測し, あらかじめ計測した熱抵抗を用いて温度上昇量を発熱量に変換した.

インジウム微粒子の融解熱計測: 微量タンパク質の相転移熱量の計測にさきがけて, 融点や融解潜熱が既知のインジウム微粒子の融解熱量を計測し, 開発したナノカロリメータが正しく熱分析を行えるか確認した. 相転移熱量を計測する熱分析法としてナノ DTA を採用した. サーミスタはサンプル温度を測るだけでなく, ジュール発熱させることでヒータとしても動作する. 直線的な温度変化を実現するために, ジュール発熱量を時間に対して直線的に変化するようにフィードバック制御した. 加熱, 冷却過程でサーミスタの抵抗値をモニタリングすることでサンプル温度を計測した. 本研究では, 融点以上に加熱したシリコンオイルの内部に入れることで融解させたインジウム片を, 超音波ホモジナイザーで微粒化して, 融点以下に冷やすことで球形に近いインジウム微粒子を得た. 微粒子がほぼ球形であるため, 顕微鏡下での体積計測を通じた融解熱の見積もりが比較的正確に行うことができる.

### 4. 研究成果

4.1. ナノカロリメータの熱抵抗 サーミスタの自己発熱量に対する温度上昇量を計測することでサーミスタと周囲環境の間の熱抵抗を評価した. ある発熱に対して, 大きな温度上昇が得られることが高感度な計測につながるため, センサがより高い熱抵抗を持つことが好ましい. 結果として, 大気中で, 比較的大きなセンサでも  $10^4\text{K}/\text{W}$ , 細径化, 薄肉化したセンサでは  $10^5\text{K}/\text{W}$  オーダの高い熱抵抗が得られ, MEMS 技術で作製されたセンサに匹敵するか, それを上回る熱抵抗が実現できていることが確認できた. さらに, マイクロチャンネル構造の利点として内部を大気圧に保ちながら周囲環境を真空にして対流による熱損失を低減することが可能であり, 真空環境下では  $10^6\text{K}/\text{W}$  オーダの極めて高い熱抵抗が実現できた.

4.2. ゾウリムシの発熱量計測 図 3 は, マイクロチャンネル部を遊泳する単一のゾウリムシがサーミスタ部を通過していく過程に計測した温度変化を示している. 計測に用いたセンサは熱抵抗が,  $1.7 \times 10^5\text{K}/\text{W}$  であるため,  $1\text{mK}$  の温度上昇が  $6\text{nW}$  の発熱に対応している. 結果として, ゾウリムシがサーミスタを通過する際に有意な温度上昇が確認でき, ゾウリムシがサーミスタから十分離れたところに位置する時刻の温度に対して,  $1.3\text{mK}$  の温度上昇が生じている. 温度上昇

量を、熱抵抗を用いて発熱量に換算すると単一のゾウリムシの発熱量は  $8\text{nW}$  と求めた。本研究を通じて、単細胞生物の発熱量の計測に成功した。今後は、サーミスタの高感度化などによる性能向上でサブ  $\text{nW}$  以下の熱量計測分解能の達成し、動物の熱産生を担う褐色脂肪細胞の発熱量計測を試みる。

4.3. ナノ DTA によるインジウム微粒子の融解熱計測 図 4 が直径  $72\mu\text{m}$  のインジウム微粒子の融解時の熱流を計測した結果であり  $2.7\text{K}/\text{min} \sim 4940\text{K}/\text{min}$  の幅広い温度走査速度条件において、融解時の負の熱流ピークが明瞭に観察できる。図 5 は、熱流を積分して得られる融解熱量を温度走査速度に対して示した結果であり、体積計算で見積もった融解熱量と良好な一致が得られていることがわかる。図 6, 7 は、直径  $16.5\mu\text{m}$  で一つ目の試料よりも二桁小さな融解熱を持つサンプルの計測結果である。温度走査速度は、 $19\text{K}/\text{min} \sim 9230\text{K}/\text{min}$  である。結果として、温度走査速度が小さくなると融解に伴って生じる熱流が小さくなるため体積から見積もった熱量との差が大きくなる傾向はあるものの、サブマイクロジュールレベルの熱量が幅広い温度走査速度で正確に測れることが確かめられた。インジウム微粒子の融解熱計測を通じて、極微量の相転移熱量が計測できることが確かめられたため、今後は、本技術を用いて、微量タンパク質の相転移過程の詳細な観察を行っていく。

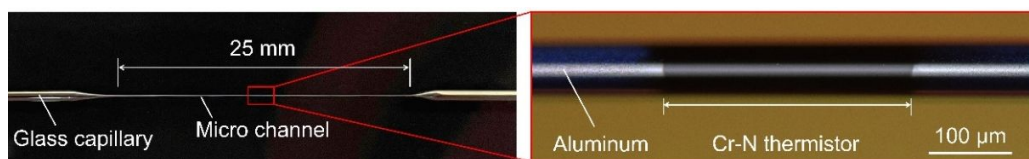


図 1 開発した自立マイクロチャンネル型ナノカロリメータ

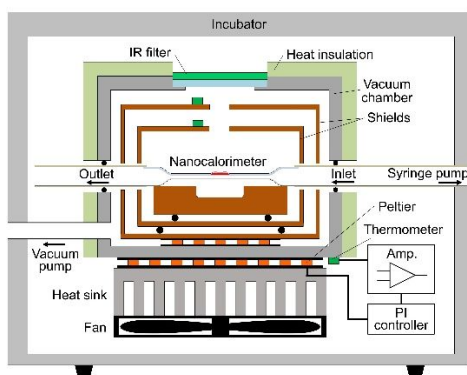


図 2 開発したバイオカロリメータ

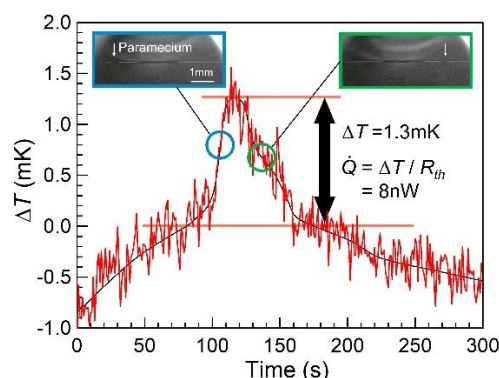


図 3 ゾウリムシの代謝熱計測

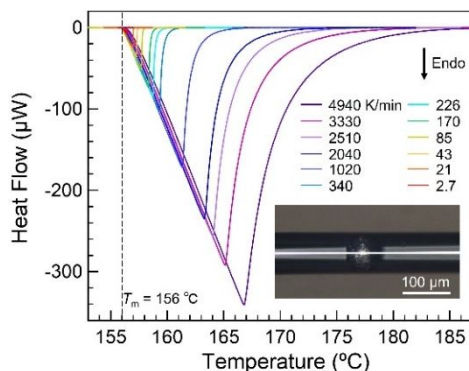


図 4 各走査速度の DTA 曲線 (試料 1)

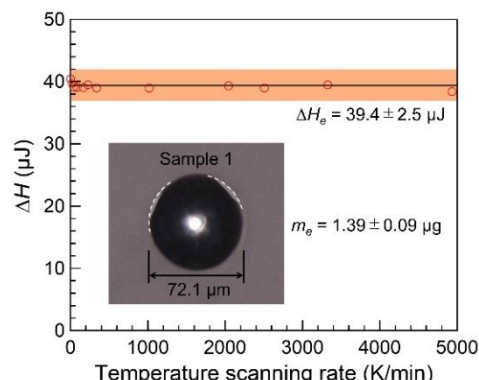


図 5 計測した融解熱量 (試料 1)

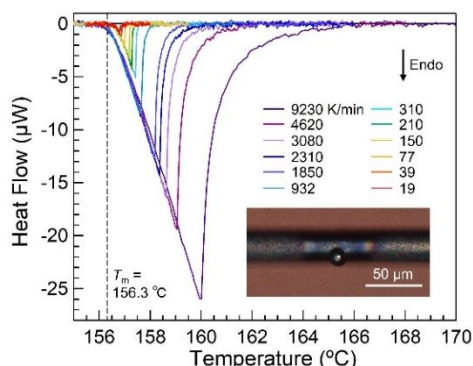


図 6 各走査速度の DTA 曲線 (試料 2)

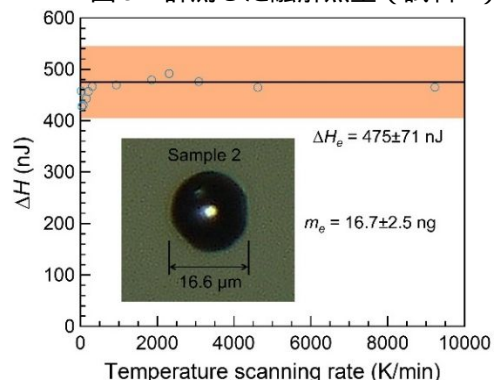


図 7 計測した融解熱量 (試料 2)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 梅野 隼, 焦一航, 福田海斗, 宮崎康次, 矢吹智英
2. 発表標題 単一細胞熱分析のための自立マイクロチャンネル型バイオカロリメータの開発
3. 学会等名 日本機械学会 第12回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅野 隼, 焦一航, 福田海斗, 宮崎康次, 矢吹智英
2. 発表標題 自立マイクロチャンネル型バイオカロリメータの作製と性能評価
3. 学会等名 日本機械学会九州支部 第75期総会・講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅野 隼, 焦一航, 福田海斗, 宮崎康次, 矢吹智英
2. 発表標題 自立マイクロチャンネル型バイオカロリメータを用いた単一細胞熱分析の研究
3. 学会等名 第59回日本伝熱シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ren Umeno, Yihang Jiao, Kaito Fukuda, Koji Miyazaki, Tomohide Yabuki
2. 発表標題 Development of single-cell bio-calorimeter with free-standing microchannel structure
3. 学会等名 The 13th Asian Thermophysical Properties Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅野錬, 焦一航, 矢吹智英
2. 発表標題 単一細胞熱分析のための自立チャネル型ナノカロリメータの開発
3. 学会等名 第13回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------