

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630092

研究課題名(和文) ブラウン運動を用いた細胞内マルチパラメータ計測カプセル型センサ

研究課題名(英文) Microcapsule Sensor Using Brownian Motion for Intracellular Measurement

研究代表者

丸山 央峰 (Maruyama, Hisataka)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60377843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：微粒子のブラウン運動や偏光特性等の物理特性の環境依存性を利用して、細胞内の温度や粘度を計測するためのセンサについて研究を行った。温度感受性を有する蛍光色素を導入したナノサイズのゲルビーズを内包したマイクロカプセルを用いたブラウン運動による粘度計測を行うセンサ及びシリコンの偏光特性の温度依存性を利用したシリコンナノワイヤによるナノ温度センサの2種類について検討を行った。マイクロカプセルセンサの作製には成功したが、マイクロ流路を用いた大量生産及びブラウン運動と粘度の較正は良好な結果が得られなかったが、シリコンナノワイヤセンサの偏光特性と温度は良好な較正結果が得られ、新規温度センサの可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we studied on microsensors on physiological parameters such as temperature and viscosity for intracellular measurement. We investigated two type sensors, microcapsule sensor containing nano-sized gel-bead impregnating temperature sensitive fluorescence dye for viscosity measurement using Brownian motion and silicon nanowire sensor for temperature measurement using polarization. Although fabrication of microcapsule sensor was succeeded, calibration of Brownian motion with viscosity and mass production of the sensor were not succeeded. On the other hand, silicon nanowire sensor represents strong correlation between retardance and temperature. These results indicate the potential of silicon nanowire sensor as new temperature sensing method in micro-nano scale.

研究分野：マイクロ・ナノメカトロニクス

キーワード：マイクロ・ナノメカトロニクス

1. 研究開始当初の背景

細胞機能の解析において、細胞内外の環境変化とそれに伴う細胞の生理状態の計測（イオン濃度、温度等）もしくは物理的状態（粘度等）の計測に関する研究は盛んにおこなわれているが、特定の生細胞内部における粘度等の物理的パラメータ及び生理的パラメータの同時計測、細胞内外からの物理刺激による応答による物理的・生理的パラメータ変化の同時計測に関する研究を行っている例は少ない。

物理的パラメータ計測において、光学(画像)情報から粘度を計測する手法として、微粒子のブラウン運動から算出する手法がある。ブラウン運動は、微粒子の直径等のサイズ等と温度と粘度に依存することが知られている。ブラウン運動は温度一定の環境では粘度に依存するため、ブラウン運動の大きさから環境の粘度を計測可能である。

2. 研究の目的

細胞機能の詳細な解明を目的として、微粒子のブラウン運動の周辺環境の粘度依存性と蛍光色素の環境依存性を用いて細胞内（細胞質・核内）の局所的な物理的・生理的マルチパラメータ計測が可能なカプセル型マイクロセンサを構築する。物理的パラメータ計測には、カプセル型センサ内に封入した微粒子のブラウン運動を、温度やカルシウムイオン等の生理的パラメータはカプセルに封入した蛍光色素を用いた蛍光環境計測を用いる。

この目的を実現するため、微粒子封入型カプセルマイクロセンサの連続生産システムの構築、作製したカプセル型センサを用いた細胞内部の局所マルチパラメータ計測について研究を行い、細胞のマルチパラメータ計測デバイスを実現する。

ブラウン運動の大きさから粘度を計算する手法は古くからあるが、本手法は溶液交換可能なマイクロカプセルに閉じ込めた微粒子のブラウン運動を計測するという新しい概念を用いる。ブラウン運動する環境（カプセル内）に運動を阻害するものは存在せず、カプセルの温度を蛍光計測を用いてフィードバック制御で安定に保つことで細胞内の粘度分布を正確に計測することが可能となる。

3. 研究の方法

細胞内の局所的な物理的・生理的マルチパラメータ計測が可能なカプセル型マイクロセンサの構築を目的として下記の項目について研究を行う。

(1) 微粒子封入型カプセルマイクロセンサの連続生産システムの構築

図1に示すようなマイクロ流体チップを用いた液滴生成技術を応用し、内部に数百 nm の微粒子を内包し、殻内に蛍光色素を導入し、外部との溶液の交換が可能なマイクロカプセル型センサを作製する。

ブラウン運動において重要な拡散係数及び溶液の粘度、温度の関係は式(1)で与えられるため、この式から想定される粘度の範囲において計測を実施可能なカプセルの大きさ、微粒子の大きさ、ブラウン運動取得の高速カメラのフレームレート、等のパラメータから、センサの粘度計測の分解能や精度について検討・評価する。

$$D = \frac{kT}{6\pi \cdot \mu(T) \cdot d} \quad (1)$$

D: 拡散係数, k : ボルツマン定数, μ : 粘度, d : 直径, T : 温度

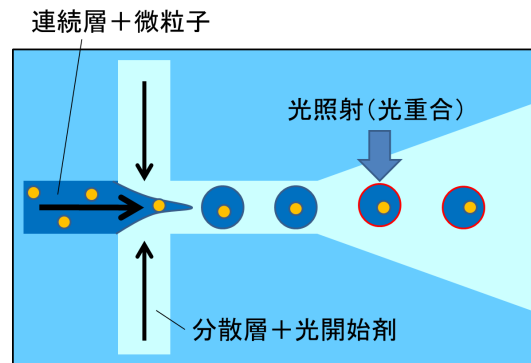


Fig. 1 Concept of mass production of microcapsule containing microparticle.

(2) 作製したカプセル型センサを用いた細胞内部の局所マルチパラメータ計測

(1)で作製したセンサを用い、図2に示すように環境の温度とカプセル内の粘度の関係を蛍光・ブラウン運動を用いて校正する。カプセルの殻内外との溶液交換についても評価する。作製したセンサを我々がこれまでに実現してきた細胞内導入法をもちいて導入し、細胞内の物理・生理的パラメータの同時計測を行う。

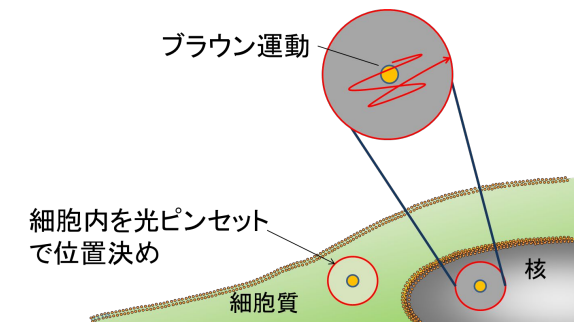


Fig. 2 Concept of intracellular measurement using microcapsule containing microparticle.

4. 研究成果

微粒子を包埋したマイクロカプセルの作製と温度校正

まず、微粒子を内包したマイクロカプセルを作製の基礎実験として、ポリエチレングリ

コール（PEG）を主成分とする光硬化性樹脂を電解質で凝集して塩析により作製したゲルビーズに、蛍光色素の Rhodamine B (ex. 540 nm, em. 580 nm) を混合したゲルビーズセンサを内包した脂質二重膜のカプセルを作製した。PEG は表面電位が中性のため、非特異吸着を起こさないため、カプセル内でのブラウン運動に有効であると考えて用いることとした。Rhodamine B は温度感受性を有する蛍光色素である。ゲルビーズはメンブレんフィルタにより 200 nm 以下のサイズに調整した。脂質二重膜のカプセルはリン脂質の DOPC と pH<6 で細胞膜との融合性を有する DOPE を 1:1 で混合した脂質を用い、バンガム法によりナノサイズのゲルビーズを内包したカプセルの作製に成功した（図 3 参照）。

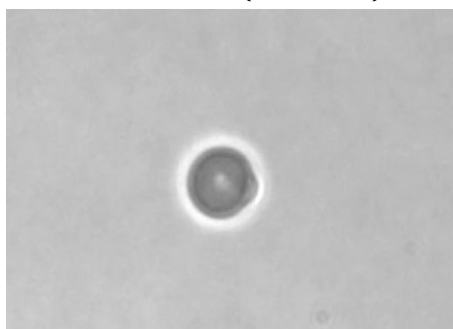


Fig. 3 Concept of intracellular measurement using microcapsule containing microparticle.

図 3 のようなマイクロカプセルをマイクロ流路を用いて大量生産を試みたが、安定してカプセルセンサを作製することは困難であった。また、カプセル内部のゲルビーズのブラウン運動と粘度の関係の較正を行う実験を行ったが、誤差が大きかったのか、相関関係を得ることはできなかった。

以上の結果よりカプセル内に内包したセンサのブラウン運動を用いた粘度センサの実現は困難であった。

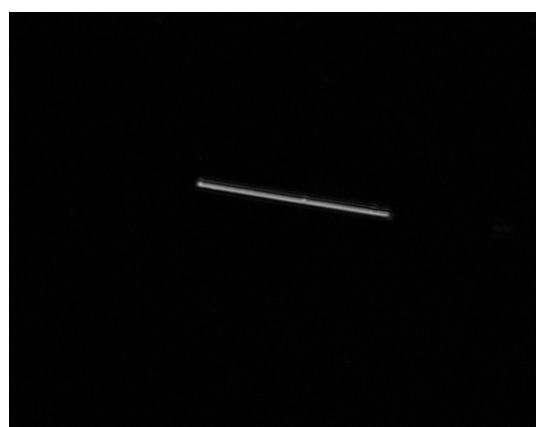
微粒子を包埋したマイクロカプセルの作製と温度較正

図 4 に示す直径 150 nm、長さ 15 μm のシリコンナノワイヤの偏光特性の温度依存性を用いた温度センサについて検討を行った。

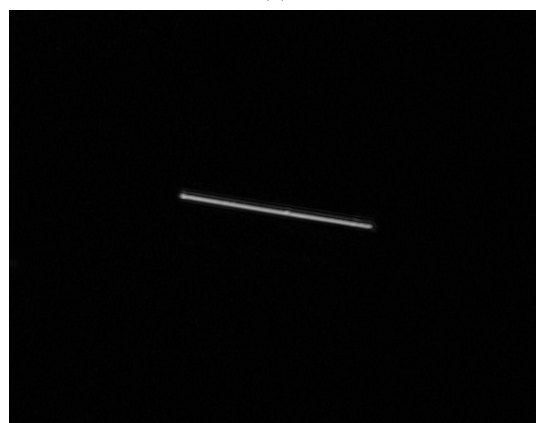
図 5 に、偏光カメラ（PI-MICRO、フォトリテック）での撮影結果を示す。



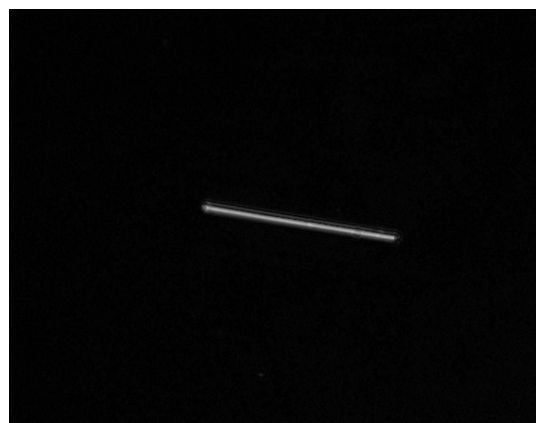
Fig. 4 Optical image of silicone nanowire.



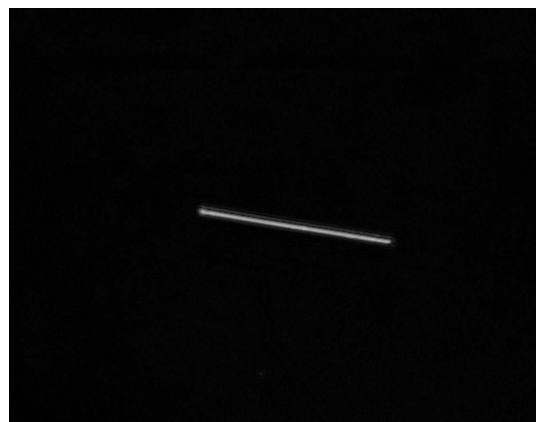
(a)



(b)



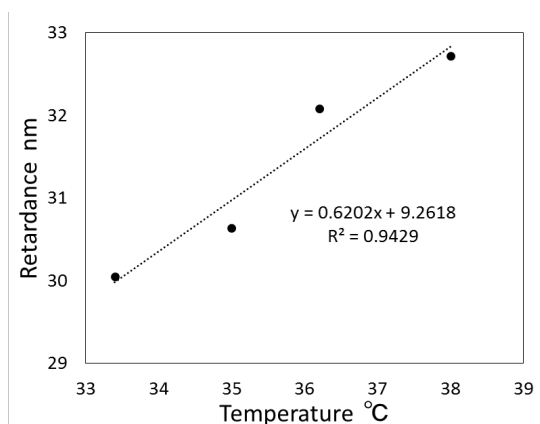
(c)



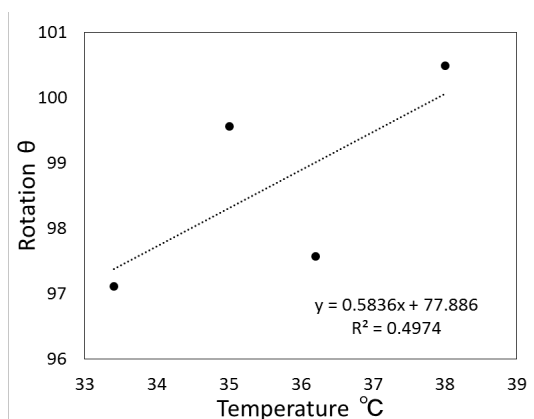
(d)

Fig. 5 Polarization image of silicon nanowire. (a) 33.4 , (b) 35.0 , (c) 36.9 , (d) 38.0

図5において、温度は顕微鏡用の細胞培養チャンバ(温度精度: ±0.3 °C)を用いておこなった。偏光画像より、図6に示すように偏光によるリターダンス(位相差)と偏光角度と温度の較正をとったところ、リターダンスについては高い線形性が得られた。また本較正実験からえられた温度精度については、誤差±1 °C程度であった。シリコンを用いた温度センサと従来から用いられてきた蛍光温度センサと比較すると、感度については同等であると考えられるが、偏光には退色が無いため長時間の計測に適している、温度計測にレーザー等の特別な光源が必要なく、顕微鏡に標準搭載されている可視光源でよい点で蛍光温度計測より優れていると考えられる。



(a)



(b)

Fig. 6 Calibration of retardance and rotation angle of polarized image with temperature. (a) Calibration of retardance. (b) Calibration of rotation angle.

本研究期間では、マイクロカプセルセンサの作製には成功したが、マイクロ流路を用いた大量生産及びブラウン運動と粘度の較正は良好な結果が得られなかったが、シリコンナノワイヤセンサの偏光特性と温度は良好な較正結果が得られ、新規温度センサの可能性を示すことができた。

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 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山央峰 (Maruyama Hisataka)
名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：
60377843

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：
なし

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：
なし