

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26706023

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

研究課題名(英文)Development for early detection of apoptosis by high sensitive miniature magnetic resonance force measurement system

研究代表者

戸田 雅也(Toda, Masaya)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40509890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞といった液中試料の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するために、振動型力センサとしては、先端に直径が $8.2\mu\text{m}$ の微小磁石(NeFeB)を取り付けた高感度磁気力センサを作製した。真空用サンプルチャンバとしては、厚さ $178\text{nm}$ の超薄膜窓を有する細胞を流すための真空中マイクロ流路型チャンバを開発した。また、プローブ形状先端にNVセンターを有するダイヤモンド薄膜を設置することに成功し、高周波電磁波を用いて、NVセンターから発する蛍光強度変化を観測することに成功し、作製したNVセンターを有するダイヤモンドプローブが磁気共鳴計測に応用出来るセンサであることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：To develop the flowcytometry technique based on magnetic resonance force measurement method, 1. Fabrication of high sensitive cantilever force sensor, 2, fabrication of microchamber with thin Si window for magnetic resonance force detection in high vacuum, 3, fabrication of diamond probe with NV color center have been done in this research project.

研究分野：マイクロシステム

キーワード：カンチレバー 磁気共鳴 マイクロ流路

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の死に至るプロセスには、主に事故的なネクローシスとプログラム化されたアポトーシスに分けられており、分子生物学的には特に後者に対する研究が盛んに行われている。アポトーシス機構の異常に関連する病気には、ガン、エイズ、ウィルス感染など様々揚げられるが、例えば、ガン細胞においては、アポトーシス機構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機構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、アポトーシス発現を検出することは、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。

### 2. 研究の目的

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センサの作製と、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。

### 3. 研究の方法

アポトーシスを起こした細胞は、細胞形状の変化に加え、細胞核の DNA が断片化するので、標識ヌクレオチドを用いて光学的に染色したり、壊れた細胞壁を試薬で染色したり、光学顕微鏡によって細胞数を数える方法が一般的である。一方、初期段階で細胞表面微絨毛が消失することから、電子顕微鏡を用いてアポトーシス細胞を見分けることができる。しかし、真空環境下での観察のため、細胞を樹脂で固めるなど、生きたままの観察が難しい。また、近年は DNA の断片化に至る前に細胞内のミトコンドリア膜電位が低下するなどが明らかにされており、新たな検出技術として期待されているが、膜電位検出方

法など技術的な面で課題がある。

細胞内で酸化されて安定化するラベル剤を投与し、そのラベル剤の濃度計測から活性酸素量を見積もり、細胞内のミトコンドリア活性度を調べることができる。吸光材、蛍光材による化学発光計測による評価が一般的に行われているが、細胞の生き様を観察する迅速な計測法としては不向きである。また、ラベル剤には少なからず細胞毒性がある。そこで、計測する側の感度を極限まで上げ、直接細胞内の活性酸素濃度を計測できるような高感度磁気共鳴力センサの開発と真空動作する磁気共鳴力計測法でフローサイトメトリーができるようなマイクロ流路の開発を行う。

### 4. 研究成果

振動型力センサとしては、図 1 に示すような先端に直径が  $8.2\mu\text{m}$  の微小磁石 (NeFeB) を取り付け、約  $1.89\text{kHz}$  の共振周波数、 $2300$  の Q 値をもつ高感度力センサを作製した。カンチレバーの構造は、幅  $330\text{nm}$ 、長さ  $72\mu\text{m}$  でカンチレバー中央部には変位計測のためのミラーが作り込んである。バネ定数は、 $5.7 \times 10^{-4}\text{N/m}$  であり、 $220\text{nm}$  薄膜サンプルからの共鳴計測信号を得て、 $1.3 \times 10^{-16}\text{N}$  の微小力を検出した。得られたラジカル密度は  $4.1 \times 10^{18}$  spins/cm<sup>3</sup> であると見積もられた。

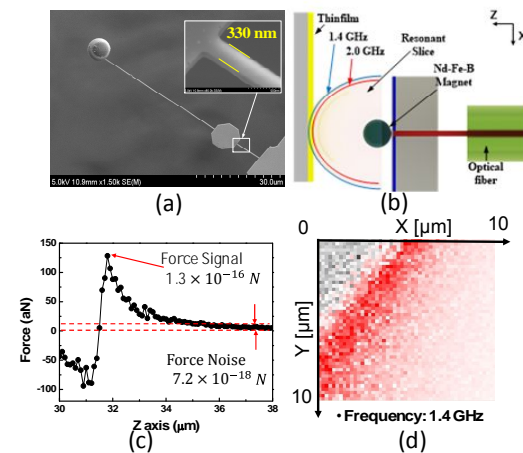


図 1 微小磁石を有する高感度 Si ナノワイヤー振動子

また、図 2 に示すような、厚さ  $178\text{nm}$  の超薄膜窓を有する細胞を流すための真空中マイクロ流路型チャンパーを開発した。実際にデバイスを真空環境の走査型電子顕微鏡装置内に導入し性能を評価した。ここで、大気圧環境から真空環境にあるチャンパーへ、少ないリークで送液可能なセットアップを構築し、作製したチャンパーに液体を導入可能でありまた細胞の観察に適用できることを確認した。また作製したチャンパーは電子顕微鏡の計測において、 $15\text{kV}$  以上の加速電圧を 1 次包子に与えることで 2 次電子によるチャンパー内部の観察がはっきり行えることがわかった。そして本セ

ットアップにより、液体を流体チャンバーへ導入した状態で、 $7.5 \times 10^{-4}$  Pa まで真空に引けることを確認した。高真空下でマイクロ流路内の液中の試料を観察することに成功しており、生きたままの細胞を進級環境に導入し、薄膜窓を有するマイクロ流路が磁気共鳴力計測のために応用出来ることを示せた。

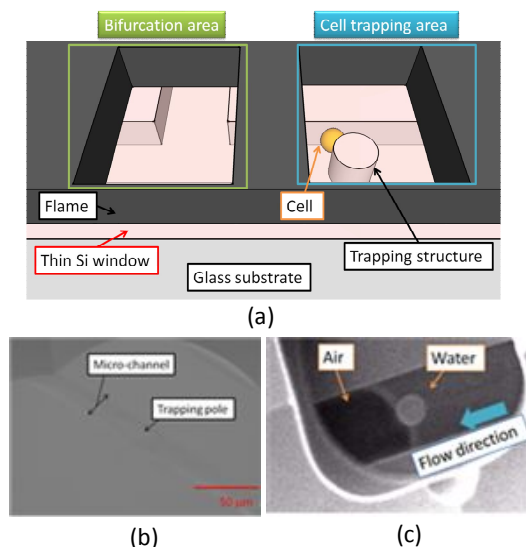


図 2 SEM images of the fabricated micro fluidic chamber at acceleration voltages of (a) 5 kV, (b) 30 kV

NV を有するダイヤモンドの走査プローブは、生きた細胞内の健康状態をモニターすることに繋がる活性酸素濃度を高感度に計測できる有力なツールになると考えられる。そこで、ダイヤモンドを用いた走査型の NV を有する走査プローブの作製を実施、検証した。ダイヤモンドは、大面積で成膜することが困難な上、加工することが難しいという課題がある。そこで、ダイヤモンド成長のための核付けを部分的に施すことにより、エッチングなどの加工プロセスを省いた加工プロセスを提案し、ダイヤモンド薄膜をプラズマ化学気相成長法によって、シリコン表面の部分的に成長させることで選択的に成膜させることに成功した。NV は結晶の欠陥であり、ダイヤモンド成膜中に窒素ガスを成長チャンバーに導入することによる含有量を制御した。ダイヤモンド薄膜中の NV センターが実際に含まれているかどうかは、蛍光計測によって確認することができた。図 3 のように、ダイヤモンド先端に有するシリコンプローブを形成するために、 $\text{XeF}_2$  ガスによるシリコンの等方性エッチングプロセスを用いたが、この際、NV センターが不活性になることがわかった。この際、昇温加熱によるアニールプロセスによって、NV センターが再活性化されることを確認した。この NV センターを有する薄膜ダイヤモンドプローブは、磁気共鳴顕微鏡の走査プローブとして利用でき

る。

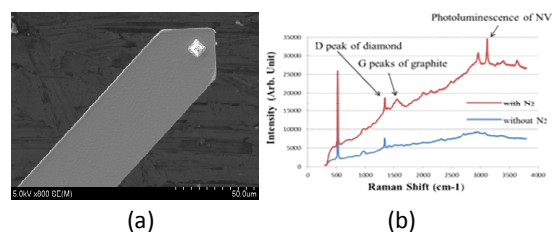


図 3 Fabricated Si probe with a diamond tip

次世代の高感度なカンチレバー型磁気プローブとして、ダイヤモンドの NV センターを用いた磁気共鳴計測法が期待されており、NV センターを有する薄膜ダイヤモンドプローブに着目し、プラズマ励起化学気相成膜法を用いたダイヤモンド成膜・加工を行い、それをプローブ先端に設置することで、磁気共鳴計測に用いることができるダイヤモンドプローブの作製を行い、その性能を評価した。NV センターの存在は、ラマン分光法により確認し、ダイヤモンド加工プロセスにある  $\text{XeF}_2$  エッチングのプロセス後には、不活性になってしまう NV センターをその後のアニール処理により再活性化させることができることを突き止めた。また、プローブ形状先端に NV センターを有するダイヤモンド薄膜を設置することに成功し、高周波電磁波を用いて、NV センターから発する蛍光強度変化を観測することに成功し、作製した NV センターを有するダイヤモンドプローブが磁気共鳴計測に応用出来るセンサであること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 11 件)

Gaopeng Xue, Masaya Toda, and Takahito Ono, Assembled Comb-drive XYZ-microstage with DPPH Sample for the 3D Scanning of Magnetic Resonance Force Microscope, Proceedings of the IEEE International Conference on Nanotechnology 16, 査読有、2016, pp.980-981

DOI:10.1109/nano.2016.7751422

Yuya Mochimaru, Masaya Toda and Takahito Ono, Fabrication and evaluation of CVD diamond resonators, Proceedings of the IEEE International Conference on Nanotechnology 16, 査読有、2016, pp.676-677

DOI:10.1109/nano.2016.7751555

Minjie Zhu, Masaya Toda, and Takahito Ono, Scanning Probe with Nitrogen Vacancy Centers in Diamond Particle for Magnetic Resonance Imaging, Proceedings of the IEEE International Conference on Nanotechnology 16, 査読有、2016, pp.210-213

DOI:10.1109/nano.2016.7751404  
Gaopeng Xue, Masaya Toda, Takahito Ono, Comb-Drive XYZ-microstage With Large Displacements Based on Chip-Level Microassembly, Journal of Microelectromechanical Systems 25、査読有、2016、pp.989-998  
DOI:10.1109/jmems.2016.2607233  
Minjie Zhu, Masaya Toda, Takahito Ono, Fabrication of Assembled Scanning Probe with Nitrogen Vacancy Centers in Diamond Particle, IEEE Transactions on Nanotechnology PP、査読有、2016、pp.1-6  
DOI:10.1109/tnano.2016.2640191  
Ioana Voiculescu, Fei Liu, Takahito Ono, Masaya Toda, Investigation of bimaterial cantilever beam for heat sensing in liquid, Sensors and Actuators, A: Physical 242、査読有、2016、pp.58-66  
DOI:10.1016/j.sna.2015.11.030  
Yong-Jun Seo, Masaya Toda and Takahito Ono, Si nanowire probe with Nd-Fe-B magnet for attonewton-scale force detection, Journal of Micromechanics and Microengineering 25、査読有、2015、pp.045015-1-045015-5  
DOI:10.1088/0960-1317/25/4/045015  
Hideki Hayashi, Masaya Toda, and Takahito Ono, MICRO FLUIDIC CHAMBER WITH THIN SI WINDOWS FOR OBSERVATION OF BIOLOGICAL SAMPLES IN VACUUM, Proceedings of the IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems 15、査読有、2015、pp.344-347  
DOI:10.1109/MEMSYS.2015.7050959  
Gaopeng Xue, Masaya Toda, and Takahito Ono, ASSEMBLED COMB-DRIVE XYZ-MICROSTAGE WITH LARGE DISPLACEMENTS FOR LOW TEMPERATURE MEASUREMENT SYSTEMS, Proceedings of the IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems 15、査読有、2015、pp.14-17  
DOI:10.1109/MEMSYS.2015.7050874  
Yong-Jun Seo, Masaya Toda, Yusuke Kawai, Takahito Ono, Fabrication of Silicon Nanowire Probe with Magnet for Magnetic Resonance Force Microscopy, IEEE Transactions on Sensors and Micromachines 134、査読有、2014、pp.166-167  
DOI:10.1541/ieejsmas.134.166  
Yongjun Seo, Masaya Toda, Yusuke Kawai, Takahito Ono, Ultrasensitive Si nanowire probe for magnetic resonance detection, Proceedings of the IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems 14、査読有、2014、pp.151-154  
DOI:10.1109/MEMSYS.2014.6765596

〔学会発表〕(計 12件)

Yuya Mochimaru, Masaya Toda and Takahito Ono, Fabrication and evaluation of CVD diamond resonators, IEEE International Conference on Nanotechnology 2016年8月22日-25日、仙台

Gaopeng Xue, Masaya Toda, and Takahito Ono, Assembled Comb-drive XYZ-microstage with DPPH Sample for the 3D Scanning of Magnetic Resonance Force Microscope, IEEE International Conference on Nanotechnology 2016年8月22日-25日、仙台、仙台国際センター

Minjie Zhu, Masaya Toda, and Takahito Ono, Scanning Probe with Nitrogen Vacancy Centers in Diamond Particle for Magnetic Resonance Imaging, IEEE International Conference on Nanotechnology 2016年8月22日-25日、仙台、仙台国際センター

Nurasyikin Mohd, Naoki Inomata, Nguyen Van Toan, Takahito Ono and Masaya Toda, Packaging Technique of Micro Cantilever for Magnetic Force Sensing, International Workshop on Nanomechanical Sensors 2016年6月22日-24日、オランダ、Delft

Xue Gaopeng, Masaya Toda, Nurasyikin Mohd, Zhonglie An, Nguyen Van Toan, Takahito Ono, Magnetic field sensor based on vacuum packaged cantilever with a mounted magnet, 第33回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム 2016年10月24日-26日、平戸

持丸 裕矢, 戸田 雅也, 小野 崇人, CVDダイヤモンド振動子の作製と評価、日本機械学会東北支部 第51期講演会 2016年3月11日、仙台、東北大学

Minjie Zhu, Masaya Toda and Takahito Ono, Probe with Nitrogen Vacancy in Diamond Thin Film for Magnetic Resonance Imaging, The 6th Japan-China-Korea MEMS/NEMS Conference 2015年9月23日-25日、中国、Xi'an

朱 敏杰, 戸田 雅也, 小野 崇人, 磁気共鳴イメージングのための NV センターを有するダイヤモンドプローブ、第32回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム 2015年10月28日-30日、新潟、朱鷺メッセ

アルスラン セナ ノア, 戸田雅也, 小野 崇人, Electrochemical Biosensor for Single Cell Impedance Spectroscopy, 日本機械学会東北支部 第50期講演会 2015年3月13日、仙台、東北大学

Masaya Toda, Ioana Voiculescu, Fei Liu, Takahito Ono, CALIBRATION STUDY OF BIMATERIAL CANTILEVER BEAM NANOCALORIMETER USED IN LIQUID APPLICATIONS, 11st International Workshop on Nanomechanical Sensing 2014年4月30日-5月2日、Spain, Madrid

Gaopeng Xue, Masaya Toda, Takahito Ono,  
Assembled comb-drive XYZ-microstage  
integrated with capacitive displacement  
sensor for low temperature measurement  
systems、第31回「センサ・マイクロマシン  
と応用システム」シンポジウム 2014年10月  
20日-22日、島根、くにびきメッセ

林秀樹, 戸田雅也, 小野崇人, 真空中細胞  
観察のための薄膜Si窓を有するマイクロチ  
ヤネル型チャンバー、第31回「センサ・マ  
イクロマシンと応用システム」シンポジウム  
2014年10月20日-22日、島根、くにびきメ  
ッセ

〔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) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし