

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510126

研究課題名(和文) ガウシアン形状振動子を用いた単一細胞レベル極限センシング

研究課題名(英文) A Gaussian Shaped Resonator for Sensing Single Cell

研究代表者

安部 隆 (Abe, Takashi)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00333857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：単一細胞レベルのセンシングを目指して微小質量を検出可能な水晶センサの高感度化を目指した。シミュレーションを参考にした振動子の微細加工で振動分布を増幅し質量検出の増幅に成功した。質量への応答の線形性もあり、単一細胞よりもはるかに微小な質量検出が可能になった。本研究成果は、細胞機能の研究のみならず、微小材料の評価への使用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to improve the sensitivity of quartz crystal sensor for sensing single cell. The enhancement of mass sensitivity was realized by shaping the resonator based on the simulation results. As the result, the mass sensitivity was improved at least one order of magnitude and the responses show a linear relationship between mass changes and frequency changes. The developed method is expected to be used for evaluation of nanomaterials in addition to measurements of single cell.

研究分野：ナノ・マイクロ科学

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：水晶振動子微小天秤 単一細胞 ナノ計測

### 1. 研究開始当初の背景

近年、水晶振動子微小天秤 (QCM) を高感度化、または多機能化させるための挑戦的な研究が行われている。例えば、MEMS 技術を用いて小型化、集積化した QCM アレイ (安部ら *Sen Actuators A*, 2001)、電界方向を横電界とし片面の電極を不要とした QCM (Vetelino, J.F., *IEEE Trans. UFFC*, 2004) などがある。申請者らの研究の特長は、MEMS 加工技術を用いた QCM である点と、従来型 QCM で不可能な測定を実演してきた点にある。前者の研究例として、レンズ形状振動子でなく振幅の強度分布に従う板厚分布を有するガウシアン形状振動子が理想的形状であることを Q 値と有限要素法による解析の両面から実証した研究があげられる (安部ら *Sen. Actuators A*, 2010)。後者の研究例としては、紫外線照射下で光触媒反応のリアルタイム計測に成功した研究があげられる (安部ら *J. Micromech. Microeng.*, 2009)。本研究では、従来の分光計測技術では不可能な色素でない界面活性剤の分解の計測を示した。このように、申請者らはナノテク技術である MEMS 加工技術を巧みに利用し QCM 法の限界に挑戦してきた。

現在、バイオ分野では単一細胞計測が再注目を集めている。単一細胞レベルでの生理学的現象の完全理解を目指した野心的な試みがされている。細胞集団を研究すると多くの研究者は細胞の個性や細胞間相互作用の重要性に気づかされる。自然と単一細胞レベルでの計測が不可欠になってくる。

ここで、QCM 法では単一細胞の接着性変化などの物性変化の計測は不可能ではないかと考えられている。これは、細胞集団を用いた研究で、接着性変化による周波数変化が質量の絶対値で想定される変化よりも小さいことが分かっているためである。申請者らは、ナノテク QCM を用いて単一細胞の質量 (HeLa 細胞で 1 ng) よりはるかに微量である 10 pg の変化の計測に成功しており、この問いへの答えを見いだすことができる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者の得意とする水晶 MEMS 技術を用いて、1 細胞の質量及び粘弾性変化をリアルタイム計測可能なナノテク QCM を開発することである。振動損失を極限まで低減したガウシアン形状振動子を用いて現在の最高感度の 100 倍以上の質量検出能に相当する 0.1 pg 程度の質量変化を水溶液中で検出可能なナノテク QCM を完成させる。さらに、このナノテク QCM

を用いて、細胞刺激のための環境制御が容易な微小流路中で単一細胞の物性変化を追跡するためのシステムを構築し、薬剤分子または異種細胞との相互作用研究などの学術研究に資することを旨とする。

### 3. 研究の方法

本研究は以下の 3 つのステップで進めた。

- 1) 振動子の小型化および形状の改善による質量検出限界の追求
- 2) MEMS 加工による質量検出感度の増幅
- 3) 単一細胞モデル検出のための測定システムの構築

### 4. 研究成果

以下に、上記のステップごとの主たる研究成果をまとめた。

- 1) 有限要素法 (ANSYS) による解析の結果、振動子の振幅分布は、各軸の結晶方向に対して、4:3 (X:Y) で楕円形状に分布していることが分かっている。図 1 に示す 4:3 の楕円となるように水晶板を MEMS 加工技術で立体的に加工し性能の改善ができないか試みた。また、電極形状についても同様の比となるようにした。図 1 に改善前後におけるスペクトルの比較結果を示す。性能の指標である Q 値を約 30 % 向上させることに成功した。電極形状による寄与は 8 % であることもわかった (参考: 学会発表 3)。

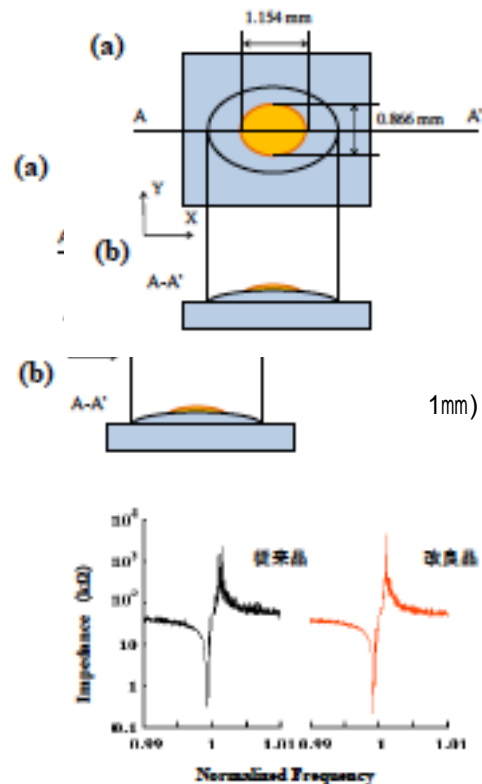


図2 楕円形状振動子のスペクトル例

本研究では、さらに、両面に加工をした場合の効果についても検討をおこなった(参考:学会発表4)。

図3は、両面加工(A)、片面加工(B)および加工なし(C)の振動子のインピーダンススペクトルを比較したものである。主振動における先鋭さが改善し、Q値がさらに向上していることが示された。ただし、他の振動モードとの結合を示す副振動(スプリアス)の低減の点では、片面加工だけでも十分であることがわかった。その他に、電極直径とMEMS加工部の比についても実験で最適値50%の値を得た。それ以外の条件の25、75および100%では、大きなスプリアスがみられ、Q値も大幅に低い値となった。

以上、振幅分布に着目して振動子の安定性の改善を目指し、最低質量検出能の改善を目指した。Q値と周波数の安定性を示す3(=ばらつきの標準偏差の3倍)との関係は逆比例であり、Q値が2倍改善すれば、半分の質量まで検出可能になる。大幅な改善はできなかったが、形状による効果を実際の数値で示すことができた。

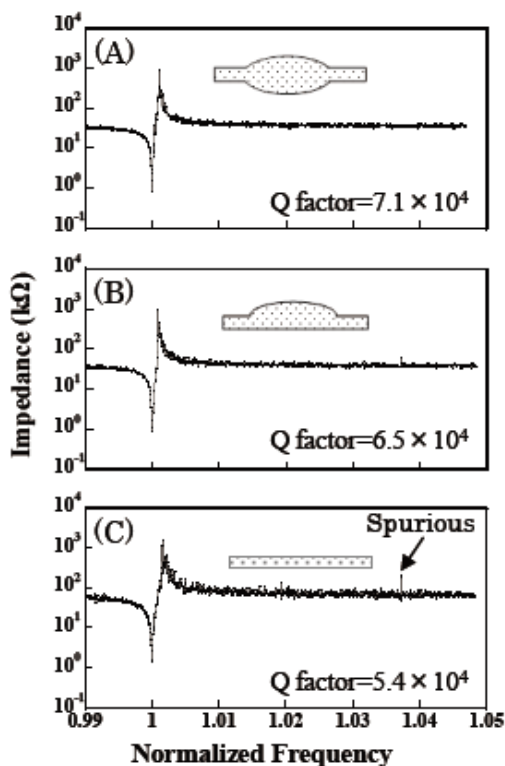


図3 加工形状によるインピーダンススペクトルの違い

2) 次に、MEMS加工による質量検出感度の増幅効果について実際に微粒子モデルを作製し調べた。図4に示すように、有限要素法による解析では、振動子中央部の振幅が著しく増大し、質量変化に対して敏感になると予測されている。実際に、微粒子モデルをフォトリソグラフィで作製し、質量負荷を与えた時の周波数変化を測定した。

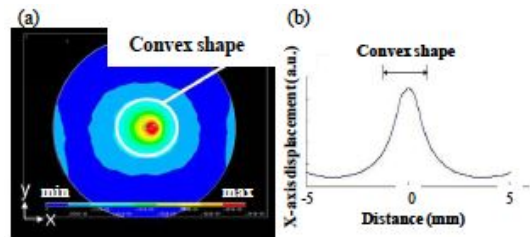


図4 有限要素による解析結果例

図5にX軸方向に微粒子モデルの質量負荷(約18ng)を与えた時の周波数変化を示す。MEMS加工したものと加工なしの場合で比較した。図中の点線はSauerbreyの式(理論式)で与えられる周波数変化である。加工なしの場合においても、中央部の応答値が高くなることが示されている。一方、MEMS加工した振動子の場合、中央部の応答が理論値の3倍以上に大幅に増幅された。

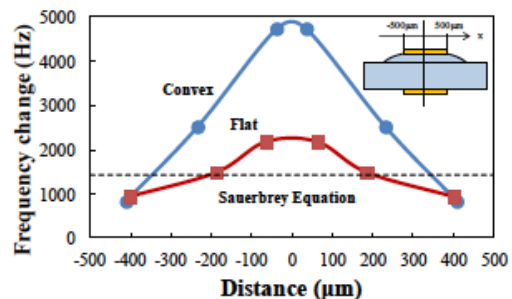


図5 振動子の加工による質量検出感度の増幅結果例

本研究では、さらに、質量負荷への応答の線形性についても測定をした。図6にMEMS加工QCMの中心部における質量変化に対する周波数応答の例を示す。負荷の増加に伴い線形からわずかに外れることが分かったが、校正すれば、質量センサとして使用できることが分かった(学会発表5)。今後、材料や微粒子形状への応答差などが興味深い課題である。

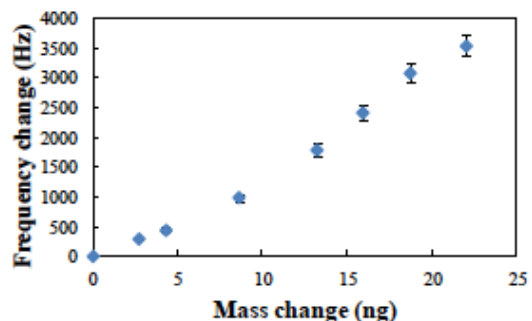


図6 微粒子モデルを用いたMEMS加工したQCMへの質量負荷試験結果

MEMS 加工 QCM の周波数安定性も評価を行い、3 の値は、約 0.15 Hz であった。最低質量検出能は、0.54 pg となった。目標値までまだ不足しているが、一桁以上(20 倍以上)の高感度化に成功した。本成果は、ナノスケールの材料評価用センサとして期待される。

興味深い結果が得られたため、さらなる改善のために立体形状の検討が望まれるが、高額な加工装置のポンプ(TMP)故障が 3 回発生し予算額を大きく上回ったために中断を余儀なくされた。今後、修理費を確保した上でさらに検討する予定である。

3) 開発したセンサを微小流路に集積化した単一細胞の測定システムを構築するために、実際に微小流路とセンサからなるシステムを作製し評価した。具体的には、マシンナブルなセラミックスに、センサを固定し、PDMS 流路で蓋をし測定をした。送液のための入口および出口はセラミックス基板に作製することで操作性を改善した。壁と導入した薬剤や細胞モデルとの相互作用の低減のためにブロッキング剤(BSA)を導入し、電極部のブロッキング剤は電気分解で除去する手法を採用した。

予備実験として、図 7 に示すように自己組織化膜(SAM)を QCM 上に導入し、その応答を評価した。その結果、100 Hz の周波数変化(1.2 ng)の応答を示した。SAM の金表面への密度から理論的に計算される予測値 1.16 pg とほぼ一致した。

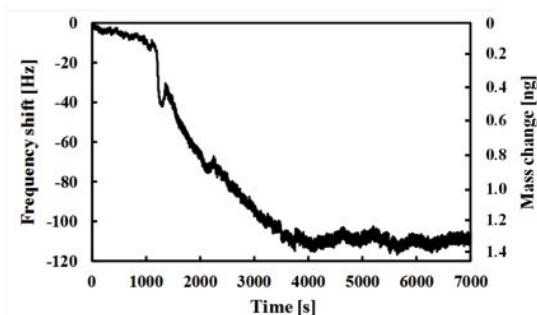


図 7 作製した計測システムでのナノ薄膜の吸着挙動の測定(室温下)

現在、本システム上で、QCM センサ上の中央部の BSA を電気化学的に除去する条件の検討と単一細胞モデルであるリポソームの導入試験の実施の準備を進めている。除去の様子をモニタリングすることには成功している。しかし、加工装置の故障でセンサの供給が中断しており、修理費の確保ができた上で、次のステップである本物の単一細胞での試験に進む予定である。

## 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 1 件)

- (1) Takashi Abe, Yousuke Itasaka, "A fabrication method of high-Q quartz crystal resonator using double-layered etching mask for DRIE", Sensors and Actuators A, vol.188, pp.503-506, 2012 (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 渡邊 将、気谷裕樹、寒川雅之、安部隆 "楕円形状 AT カット水晶振動子の形状最適化"、第 30 回「センサ・マイクロマシン応用システム」シンポジウム、2013 年 11 月 5 日-7 日、仙台
- (2) 気谷裕樹、渡邊 将、寒川雅之、安部隆 "微細加工 QCM を用いた単一微粒子計測技術の開発"、第 30 回「センサ・マイクロマシン応用システム」シンポジウム、2013 年 11 月 5 日-7 日、仙台
- (3) Yuuki Yamada, Takashi Abe, "A simple method to fabricate 3D microstructures using gray-scale lithography and dry etching"、2011 年 11 月 11 日、京都
- (4) 柳澤真規、安部隆 "結晶異方性を考慮した水晶振動子の形状最適化"、第 28 回「センサ・マイクロマシン応用システム」シンポジウム、2011 年 9 月 26 日-27 日、東京
- (5) 山田悠貴、安部隆 "立体モデルを縮小可能なグレイスケールリソグラフィ法" 第 28 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム、2011 年 9 月 26 日-27 日、東京
- (6) Takashi Abe, Yousuke Itasaka, "A DRY ETCHING METHOD USING DOUBLE-LAYERED MASK FOR MODULATING SHAPE OF DEEP-ETCHED QUARTZ SURFACE"、Tech. Digest of Transducers ' 2011、2011 年 6 月 5 日-8 日、北京

〔その他〕

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 隆 (Abe Takashi)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00333857