

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22241033

研究課題名(和文) 単一細胞の力刺激反応計測のためのMEMSカンチレバー

研究課題名(英文) A MEMS cantilever for stimulus response measurements of single cells

研究代表者

下山 勲 (Shimoyama, Isao)

東京大学・情報理工学(系)研究科・教授

研究者番号：60154332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 26,000,000円、(間接経費) 7,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞に対して力学的刺激を定量的に再現性よく加えることが可能な3軸ピエゾ抵抗型MEMSカンチレバーの研究開発を行った。カンチレバーはSOI基板上で製作され、カンチレバーの表面及び梁の側面にピエゾ抵抗層を形成することで、3方向の歪みを同時に検出可能となるよう設計した。3軸方向それぞれに対して、1 μ N以下の分解能で力を独立して計測可能なデバイスを実現した。

研究成果の概要(英文)：In this project, a triaxial MEMS force sensing cantilever was studied. The sensor is equipped with a piezoresistor for force sensing at the root of the cantilever so that a quantitative mechanical stimuli could be applied to biological cells. The MEMS cantilever was made from an SOI wafer. A piezoresistive layer was formed by thermal diffusion on the surface of either cantilever root or the sidewall of the beam structure so that the corresponding three dimensional forces can be detected simultaneously. The resolution of the measurable force was as small as 1 μ N for all the three directional forces, and the triaxial force could be independently measured with the device.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学

キーワード：マイクロセンサー

1. 研究開始当初の背景

細胞は、周囲の環境からの多様な刺激を読み取り、その刺激入力に対応して運動や状態変化などの出力を発現する複雑なシステムである。従来の研究においてシステムへの刺激入力として想定されてきたのは、主にイオンやタンパク質などの化学物質による刺激であり、化学刺激に対する反応回路の計測を通じて、細胞の機能解明がなされてきた。

一方で、最近の研究により、力刺激入力が細胞の運動や状態変化といった機能発現に大きく関与していることが明らかになった。力刺激入力は生体の機能や仕組みに対して大きな役割を果たしているが、単一細胞レベルでの細胞膜に垂直方向の力、および細胞膜方向のせん断力による力刺激によって生じる化学反応回路系の機能には未解明な部分が多く、これを解明することは、生命科学や医療・福祉など幅広い分野に大きな波及効果を持つ、重要な研究課題であると考えられてきた。

この解明のためには、精度よくリアルタイムに力を計測しながら、定量的に細胞へ力刺激を与えるデバイスが必要となる。従来、細胞に力刺激を与える手法としては、細いガラス管の先端部に細胞を固定して引っ張り力を与え、その際のガラス管のたわみ量を光学的に求め、力を算出する方法が存在した。しかし、ガラス管の変形を顕微鏡下で精度よく観測することは難しく、定量的に計測結果を評価することができなかった。さらに画像解析を経て力を算出するため、実験中の力刺激量をリアルタイムに見積もることが困難であった。また AFM やレーザーピンセットを用いた力刺激・計測手法も存在するが、AFM は基板上に固定された物体形状を計測する装置であり、細胞に多様な角度からアプローチすることが難しいという制限を持っていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、微小な力学的刺激に対する細胞の化学反応回路の活動メカニズムを解析するため、単一細胞の全体あるいは一部に対して、図1に示すような、力学的刺激を定量的に再現性よく加えることが可能な3軸ピエゾ抵抗型 MEMS カンチレバーの実現を目標とした。

この研究を実施する上で最も重要なのは、定量的な力刺激入力を行う機能である。申請者らはこの機能を、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術を用いたピエゾ抵抗素子の形成によって実現する。ピエゾ抵抗型 MEMS カンチレバーは、シリコン片持ち梁構造の根元部分にピエゾ抵抗素子を形成することによって、片持ち梁構造の先端部分に作用する力や変位を、抵抗値の変化として検出する力センサである。

細胞への力刺激の入力は、MEMS カンチレバー本体を移動ステージに接続し、カンチレ

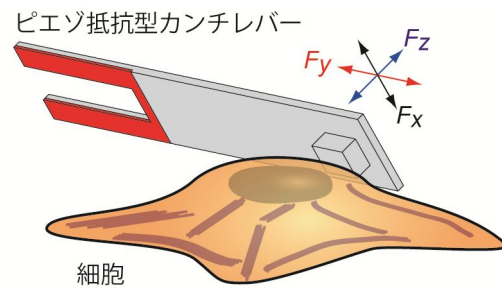


図1 細胞への力学的刺激

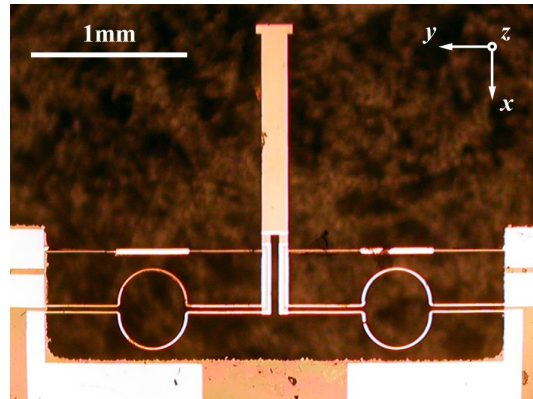


図2 試作した3軸ピエゾ抵抗型カンチレバーを用いた力センサの写真。

バー先端部を細胞に対して接触させることで行う。このとき、細胞に作用している力の大きさは MEMS カンチレバーに反作用としてかかる力の大きさと等しいので、ピエゾ抵抗素子の抵抗変化を検出することで、細胞への力刺激の定量的な把握が可能となる。細胞に与える力刺激は、100 pN ~ 100 nN の範囲の微小力を加えることを目標とした。

また、細胞への力刺激を蛍光顕微鏡下で行う場合、ピエゾ抵抗素子への蛍光励起光の入射がノイズ源となることから、高い力分解能を蛍光計測下で実現するために、MEMS カンチレバーへの遮光要素の研究を行う。

3. 研究の方法

単一細胞に対して定量的な力刺激を入力するためのピエゾ抵抗型 MEMS カンチレバーを実現するためには、3軸力の分離計測法の確立が必須の課題となる。

本研究ではセンサ形状として、中心にプローブを1本配置し、カンチレバーの片側の端から左右に梁を伸ばした構造を設計・製作する。梁の表面及び側面に選択的にピエゾ抵抗層を形成することで、歪により生じる抵抗値の変化でカンチレバーの3軸方向に加わる力を計測する。

具体的な取り組みとして以下について研究を遂行する。

3軸力カンチレバーの設計・試作及び、性能評価セットアップの構築。(2)顕微鏡下での使用のための、光ノイズのキャンセリング方法及び、培養した細胞へのデバイス適用。

4. 研究成果

(1) 細胞への力刺激のための MEMS カンチレバーを用いた 3 軸力センサの設計・製作を行い、性能を評価した。センサの形状として中心にカンチレバーを 1 本配置し、カンチレバーの片側の端から左右に 3 本ずつ梁を伸ばした構造となっている。カンチレバーは SOI(Silicon on Insulator)基板上で製作され、カンチレバーの表面及び梁の側面に piezo 抵抗層を形成することで、3 方向の歪みを同時に検出可能となるよう設計した。カンチレバーの表面の抵抗値の変化でカンチレバーの z 軸方向の変位を計測し、梁の側面の抵抗値の変化でカンチレバーの x 軸及び y 軸方向の変位を計測することができる。このときカンチレバーの各方向へのバネ定数はそれぞれ 1.0 ~ 10 N/m 程度になるように設計した。カンチレバーの x, y, z 方向に対して、計測レンジ 0 ~ 80 μ N において、1 μ N 以下の分解能で 3 軸の力をそれぞれ独立して計測できることを示した。

(2) piezo 抵抗型 MEMS カンチレバーの感度を向上させるための不純物拡散層の解析に取り組んだ。カンチレバーの板厚を薄くすることで、バネ定数は下がり、力入力に対する感度が向上する。これまで、われわれが製作した最も薄いカンチレバーの厚みは 300 nm であったが、さらにスケールを小さくし、50 nm の厚さのカンチレバーを試作した。ファーストにおける拡散条件を変えることで、ドーピング深さを浅くすることに取り組んだ。ドーピング条件を変えたシリコンウェハの深さ方向ドーピング濃度を SIMS (Secondary Ion microprobe Mass Spectroscopy) 法で解析し、拡散温度 935 °C、拡散時間 1 秒の条件下で、37 nm 厚の piezo 抵抗層を形成可能であることを確認した。

(3) MEMS カンチレバーの光応答性についても取り組んだ。メインのカンチレバーの横に、同じ構成の piezo 抵抗素子を製作し、両者の差分を取ることで光に対する応答をキャンセルすることができることを確認した。また、力計測に必要な場所以外の piezo 抵抗層を金属マスクして電氣的に短絡・遮光し、励起光が照射することの影響が少なくなるように試みた。また、ドーピング層が表面にあるシリコン基板の IV 特性を評価することにより、光応答の原因が当初考えていた PN 接合によるフォトダイオードの起電力によるものではなく、キャリアの増加によるドーピング層の抵抗率の減少によるものとの解析結果を得た。

(4) 培養細胞への適用のため、MEMS カンチレバーを構成したシリコン基板上への長時間培養を行うことで適応性評価を行った。カンチレバーをそのまま培養液中につけると、電氣的に短絡してしまうので、生体適合性を有するパリレンフィルムで表面をコートし

絶縁性を確保した。カンチレバーセンサ表面は、細胞接着のために細胞培養前にフィブロネクチンでコートした。この結果、センサ基板表面でフィブロプラスト細胞が問題なく長時間培養できることを確認した。また、培養時間 1 時間、実験時間 30 分の計 1 時間 30 分程度の力計測実験の結果、細胞の移動にともなう力とみられる 3 μ N 程度の力を計測できた。

研究期間では、細胞への力刺激にターゲットを絞って研究を推進してきたが、この期間に実現したセンサ構造は、細胞だけにとどまらず、ショウジョウバエの羽ばたき運動時に翼に発生する力の計測、人の運動等のライフサイエンスなど幅広い場面での力計測が可能になると考えられる。本研究をより発展させることで、生物の新たな力計測の確立が実現できると考えられ、平成 25 年度から、発展的な研究課題として、特別推進研究「MEMS 多軸力センサを用いた生物の運動計測」をスタートさせた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Hidetoshi Takahashi, Kiyoshi Matsumoto and Isao Shimoyama, “Differential pressure distribution measurement for the development of insect-sized wings,” *Measurement Science and Technology*, vol. 24, no. 5, article no. 055304, 2013.
doi:10.1088/0957-0233/24/5/055304 (査読あり)

Uijin G. Jung, Kenta Kuwana, Yoshiharu Ajiki, Hidetoshi Takahashi, Tetsuo Kan, Yusuke Takei, Kentaro Noda, Eiji Iwase, Kiyoshi Matsumoto and Isao Shimoyama, “A photoresponse - compensated parallel piezoresistive cantilever for cellular force measurements,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 23, no. 5, article no. 045015, 2013.
doi:10.1088/0960-1317/23/4/045015 (査読あり)

Tetsuo Kan, Hidetoshi Takahashi, Nguyen Binh-Khiem, Yuichiro Aoyama, Yusuke Takei, Kentaro Noda, Kiyoshi Matsumoto and Isao Shimoyama, “Design of a piezoresistive triaxial force sensor probe using the sidewall doping method,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 23, no. 3, article no. 035027, 2013.
doi:10.1088/0960-1317/23/3/035027 (査読あり)

[学会発表](計 8 件)

Koki Azuma, Hidetoshi Takahashi, Tetsuo Kan, Jun Tanimura, Kei Ito, Kiyoshi

Matsumoto and Isao Shimoyama, "Quantitative evaluation of the influence of dopaminergic neuron on flapping locomotion," *The 26th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2013)*, Taipei, Taiwan, Jan. 20-24, 2013.

Uijin G. Jung, Hidetoshi Takahashi, Tetsuo Kan, Kiyoshi Matsumoto and Isao Shimoyama, "A piezoresistive cellular traction force sensor," *The 26th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2013)*, Taipei, Taiwan, Jan. 20-24, 2013.

Takanori Usami, Akihito Nakai, Kiyoshi Matsumoto and Isao Shimoyama, "50nm-thick piezo-resistive cantilever," *The 7th Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS2012)*, Kyoto, Japan, March 5 - 8, 2012

Koki Azuma, Hidetoshi Takahashi, Tetsuo Kan, Kiyoshi Matsumoto and Isao Shimoyama, "Triaxial force sensor with strain concentration notch beam for measurement of insect flight force," *The 25th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2012)*, Paris, France, Jan. 29 - Feb. 2, 2012.

菅哲朗, 高橋英俊, 青山雄一郎, 竹井裕介, 野田堅太郎, 松本潔, 下山勲, "サイドワールドローピングを用いたピエゾ抵抗型三軸力センサ," 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, 東京, Sep. 26 - 27, 2011.

Uijin Jung, Tetsuo Kan, Kenta Kuwana, Kiyoshi Matsumoto and Isao Shimoyama, "Si nano-pillars for measuring traction force exerted by filopodia," *The 16th IEEE International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers '11)*, Beijing, China, June 5 - 9, 2011.

Hidetoshi Takahashi, Kiyoshi Matsumoto and Isao Shimoyama, "Differential pressure distribution measurement of a free-flying butterfly wing," *The 16th IEEE International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers '11)*, Beijing, China, June 5 - 9, 2011.

Kazuharu Ohsawa, Hidetoshi Takahashi,

Kentaro Noda, Tetsuo Kan, Kiyoshi Matsumoto and Isao Shimoyama, "A Gas Sensor Based on Viscosity Change of Ionic Liquid," *The 24th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2011)*, Cancun, Mexico, Jan. 23 - 27, 2011.

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.leopard.t.u-tokyo.ac.jp/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下山 勲 (SHIMOYAMA, Isao)
東京大学・大学院情報理工学系研究科・教授
研究者番号：60154332

(2) 連携研究者

松本 潔 (MATSUMOTO, Kiyoshi)
東京大学・IRT 研究機構・特任教授
研究者番号：10282675

菅 哲朗 (KAN, Tetsuo)
東京大学・大学院情報理工学系研究科・助教
研究者番号：30504815

竹井 裕介 (TAKEI, Yusuke)
東京大学・大学院情報理工学系研究科・特任助教
研究者番号：00513011

野田 堅太郎 (NODA, Kentaro)
東京大学・大学院情報理工学系研究科・特任助教
研究者番号：00547482

高橋 英俊 (TAKAHASHI, Hidetoshi)
東京大学・IRT 研究機構・特任研究員
研究者番号：90625485