

[B21]細胞レベルの温度測定のためのセンサプローブの開発

知能機械工学科 山田研究室

0124019

土谷 遊

1 緒言

細胞の中には、外部からの物理的刺激や化学的刺激によって比較的大きな発熱を示すものがある。これらの細胞の生化学反応に伴う熱現象を測定することができれば、代謝における段階的な生化学の反応、培養・移植組織への評価、癌細胞などの異常な細胞の発熱反応の検出、細胞の凍結・解凍などのモニタリングなどに応用できることが期待される。代謝などのメカニズムを知る上での有用な知見が得られる可能性がある。しかし、単一細胞レベルでの温度測定の実績はない。一方、近年、研究の進んできた半導体分野での微細加工技術や製膜技術を用いることにより、単一細胞よりも十分小さなセンサ部分を有する微小温度センサプローブの開発の可能性が示された。本研究では、これらのセンサプローブの改善を行い、培養した褐色脂肪細胞の温度測定を試みた。

2 微小熱電対の作成

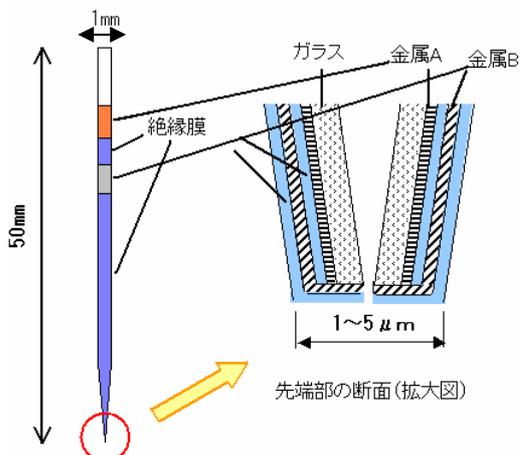


図1 微小熱電対プローブの構造

本研究で提案する微小熱電対プローブはガラスマイクロピペットの上に熱電対回路を形成することにより温度センサとして機能させるものである。図1に示すように、金属薄膜 A、絶縁膜、金属薄膜 B の層状構造になっており、先端部のみで金属 A と B が接触し、熱電対となる。

マイクロピペットは細胞工学、医療などの分野で、特定のタンパク質や DNA を細胞内に注入するインジェクションなど一般的に用いられる。ベースにマイクロピペットを用いる利点は、作製が比較的容易で、先端径のサイズも変

更が可能である。また、温度測定と同時にインジェクションなどの操作を行えるということである。

以下に本研究での具体的な作成手順を述べる。

(1) **Ni 薄膜**: スパッタリング装置により Ni をガラス表面に 50nm 程度堆積させる。(2) **絶縁膜**: Diamond-like carbon(DLC)絶縁膜(50nm)をプラズマ CVD 法を用いて製膜する。(3) **先端部加工**: 先端部で 2 種の金属を接合させるためには先端部のみで Ni を露出させる必要がある。そのため先端部の絶縁膜を除去する技術が必要であるが、ここでは Focused Ion Beam (FIB) 装置を用いて、先端を断面に平行に約 1 μ m 切り落とし、Ni 面を露出させた。(4) **コンスタンタン薄膜**: コンスタンタンをスパッタリングによって 50nm 程度堆積させる。(5) **外部絶縁コーティング**: 外部との電気絶縁のために(3)と同様に DLC 絶縁膜を製膜する。

3 DLC 膜の抵抗測定

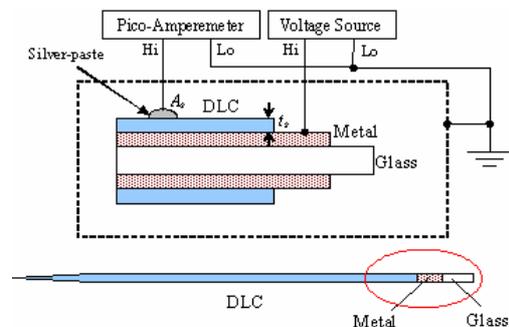


図2 抵抗測定方法の概略図

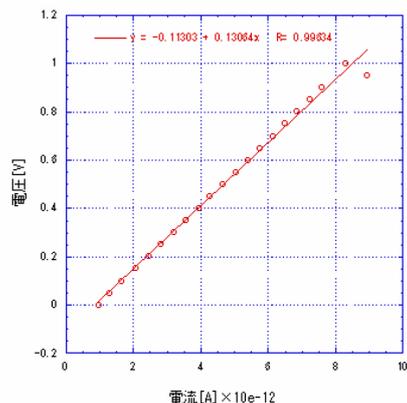


図3 マイクロピペット上の DLC 抵抗測定

DLC膜が層間絶縁膜として機能するか確認するために、抵抗測定を行った。図2にしめすように、DLC膜の表面に銀ペーストを付着させることで、膜圧方向の抵抗値を測定した。抵抗は 1.36×10^{11} となり、体積抵抗率は、 5.89×10^{14} ・cmである。一般的に、DLCの体積抵抗率は $10^9 \sim 10^{14}$ ・cmオーダーであることが知られ、本プローブ上のDLC膜の抵抗は妥当な値となったといえる。

4 熱起電力評価

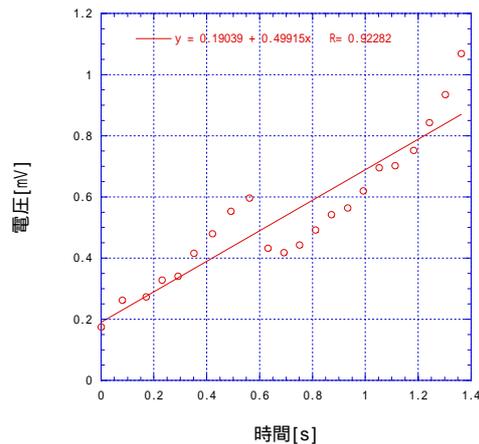


図4 微小熱電対プローブの熱起電力

作製した微小熱電対プローブの先端を白金線ヒータから10mmの距離に設置し、熱起電力変化の測定を行った。図4より白金線ヒータによるプローブ先端の加熱に伴い、プローブの熱起電力の増加が示された。この結果より、プローブは熱電対としての機能を有することが示唆されたが、温度変化量に対する起電力(mV/K)はこの実験からは推定できなかった。今後、新たな校正装置による詳細な熱起電力測定を行っていききたい。

5 細胞の温度計測

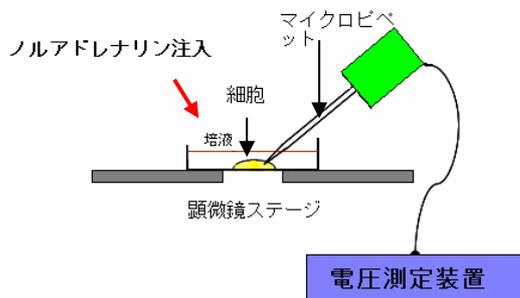


図5 細胞温度計測システム

細胞の温度変化を測定するために、図5の計測システムをセットアップした。培養液中の細胞に微小熱電対プローブを接触もしくは刺入させ、温度変化による熱起電力変化を測定するシステムである。また、測定システム全体は、シールドBOXに囲まれており、主要な装置もノイズ対策が施されている

本研究では、脂肪酸の酸化時に分解、発熱することが知られている褐色脂肪細胞を測定対象として用いた(図6)。

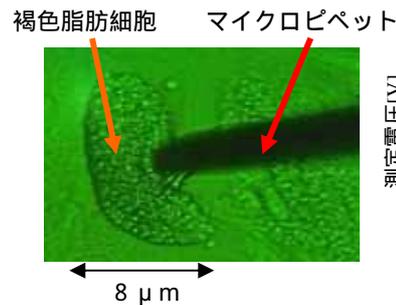


図6 褐色脂肪細胞にプローブをアプローチ

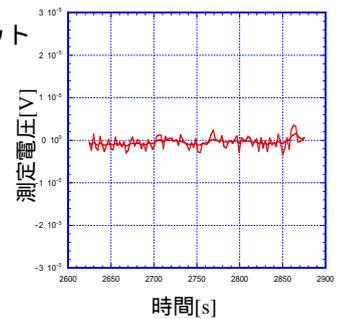


図7 測定した熱起電力の変化

褐色脂肪細胞は、カテコラミンの膜受容により、脂肪酸の酸化分解中での一連の反応を活性化させる[5]。そこで、ノルアドレナリンを投与し、発熱を測定することを目的とした。図7は測定した熱起電力の一例であるが、有意な電圧変化は確認することができなかった。この理由としては、プローブ自体の能力の問題も考えられるが、想定していた発熱量よりも実際の発熱量は下回った可能性も考えられる。また、発熱する反応時間は不明なため、今後はこれよりも長時間のモニタリングをする必要があるかもしれない。

6 結言

本研究では、微小熱電対プローブの作製とこれを用いた細胞の温度測定を行った。プローブはガラスマイクロピペットをベースに、Ni薄膜、電気絶縁のためのDLC膜、コンスタタン薄膜の層状構造とした。表面状態が決まる要因は製膜時間やマイクロピペットにかかる電圧などがある。DLC膜は、抵抗測定により絶縁膜として十分な性能だとわかった。培養した褐色脂肪細胞の温度計測を行ったが、現段階では、有意なデータを取得できなかった。今後の課題としては、DLC絶縁膜のより均質な安定した製膜と先端部分の金属膜の接合の向上によるプローブの改善と、細胞の熱計測システムによる熱起電力変化を測定することである。

参考文献

- [1]角田直人 他：細胞熱計測のための微小熱電対プローブの開発、バイオエンジニアリング講習会(2003)
- [2]今井友香：細胞レベルの熱計測技術(2004),平成15年度修士論文
- [3]渡邊まゆ マイクロピペットへのDLCコーティング技術の開発(2004),平成15年度卒業論文
- [4]斉藤 昌之 入江 由紀子 Molecular Medicine,36(3),pp264-270(1999)