[A16] 細胞レベルの熱計測技術

機械制御工学専攻　山田研究室
0233012　今井友香

１．緒言

細胞は通常の代謝による発熱の他に物理的･化学的刺激により比較的大きな熱を発生させるものも存在することが知られている。現在様々な細胞の測定・観察技術が進展しつつあるが、生体の基本的な状態量である温度に関する測定技術は確立しておらず、細胞のリアルタイム熱計測の実現は、生理学的メカニズムの解明及び細胞診断、動物実験の代替技術などへの貢献が期待される。

単一細胞レベルの温度計測に関しては、赤外線検出装置を用いた方法、温度感受性蛍光物質による観察などの非接触型の測定方法が研究されてきたが、前者は、細胞表面からの赤外線が培養液に吸収され十分な検出強度が得られないという問題、後者は生体への毒性、さらに退色により定量的な計測が短時間に限られるといった問題があり、両者とも実用化までは至っていない。一方、各種センサによる接触型の測定法では、微小かつ瞬間的な温度変動に対応するために温度センサ部は極微小で熱容量が小さく、温度分解能が高い必要があるが、近年の微細加工技術の発展に伴い、このような要求を満足する極微小なセンサの作製の可能性が拓かれつつある。

そこで、本研究では、接触型センサとして熱電対の原理に基づく細胞レベルのリアルタイム熱計測のための微小センサプローブの作製に取り組んだ。プローブのベースにはマイクロピペットを用いることで、細胞への接触･刺入などの操作を可能とし、薬剤などの細胞内への投与を温度測定と同時に行えることを目指した。

２．微小熱電対プローブの基本構造と原理

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を形成することにより温度センサとして機能するものである。金属薄膜 A、電気絶縁膜、金属薄膜 B が層状構造になっており、先端部のみで２つの金属が接触し、熱電対となる(図 1)。

マイクロピペットは細胞工学や細胞生物学、医療などの分野で、DNA、各種タンパク質を細胞内に注入するマイクロインジェクション法の注入針としてよく用いられる。ベースにマイクロピペットを用いる利点の１つは、その作製条件を変えることにより先端径のサイズを簡単に変更できることである。さらに、ピペット本来のインジェクション機能と併用することにより、測定細胞内へ薬剤の注入が可能となったり、材質や形状によっては光プローブとして機能し、光刺激･光計測との併用が可能となることが利点として挙げられる。以上のように細胞操作と温度測定を１つのプローブで同時に行うことができるため、操作性の向上と細胞へのダメージの軽減ができると考えている。

３．微小熱電対プローブ作製方法

まず、マイクロピペット製作器(PC-10, Narishige)を使用し、直径 1mm のガラス管から先端径が約 1μm程度のマイクロピペットを作製する。ガラス管は、金属薄膜の密着性を向上させる目的で、アセトンに十分浸漬させることで表面の汚れなどを除去する前処理を行ったものを用いた。

次に、ガラスマイクロピペットの表面に金属薄膜と電気絶縁膜を積層する手順を以下に示す(図 2)。

(1) <u>金属薄膜A</u>：スパッタ装置により金属薄膜 A をガラス表面に 50nm 程度堆積させる。ただし、金属薄膜 A が白金(Pt)の場合などは、ガラスへの密着性を高めるために始めにチタン(Ti)、クロム(Cr)またはタンタル(Ta)を堆積させる場合もある。
(2) <u>中間絶縁膜</u>：絶縁物質を 100nm 程度スパッタ、もしくは CVD 法などを用いて製膜する。
(3) <u>先端部加工</u>：先端部で金属薄膜 A、B を接合させるためには金属薄膜 A を先端部のみ露出させる必要がある。そのためマイクロ領域で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 1μm 切り落とし、金属薄膜 A 面を露出させた。
(4) <u>金属薄膜 B</u>：金属薄膜Ｂをスパッタによって 50nm 程度堆積させる。
(5) <u>最外絶縁膜</u>：外部との絶縁のために絶縁膜をスパッタ、CVD 法などを用いて製膜し、プローブ全体をコーティングする。

熱電対は２種の金属薄膜の接合部が温度検出部となるため、そのサイズが空間分解能を決定し、また応答性を左右する。ここでは、手順(3)において先端を切断することにより金属薄膜Ａ面を露出させ、手順(4)の金属薄膜Ｂと接合させ熱電対として機能させる方法を選択した。即ち理想的には、先端直径 1μm 程度のリング状の断面に金属薄膜Ａ－Ｂ接合部が形成されていることになる。

各種材料の選択および具体的な製膜方法は以下で述べる。

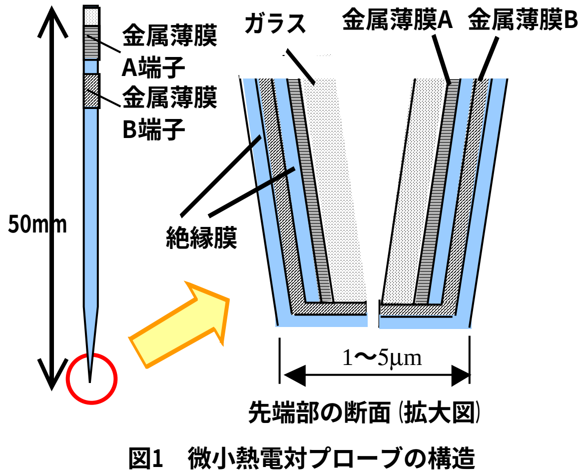

図1　微小熱電対プローブの構造

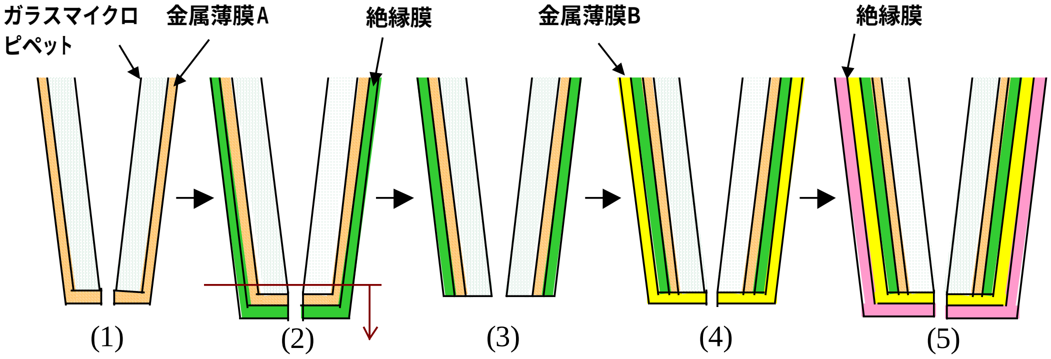

図2　微小熱電対プローブの作製手順

４．金属薄膜の選択とその製膜

２つの金属を選択する基準として、金属薄膜 A と金属薄膜 B との組み合わせの熱起電力が大きいことの他に、一般に金属薄膜の製膜時には真空チャンバ内の温度変動があることから熱膨張率[1]がガラスや絶縁体と大きく異ならないことが重要である。ガラスマイクロピペットには、マイクロインジェクションなどで一般的に使用されている、比較的耐熱性があり強度もあるパイレックスガラス素材を本研究では用いることにした。このガラスと各金属の室温レベルでの熱膨張を比較したところ、どの金属薄膜を用いても密着性を大きく損なうことはないと判断した。また、現段階では金属薄膜の製膜にはスパッタ法を用いていることから、スパッタ法で製膜しやすい金属を選ぶ必要があった。これらの条件を金属薄膜の選択の判断材料とし、Pt, Ag, Cu, Al,を選択した。

スパッタは慶應義塾大学理工学部谷下研究室の協力を得て、図 3 のような回転式スパッタ装置(SVC-700, サンユー電子製)を用いて行うことにした。DC モーターで保持したマイクロピペットを回転させ、プローブの円周方向に、より均一な膜を作製できる構造になっている。また、Ta などはヒーターで加熱しながら製膜することで膜の密着性を向上させることができる。

上記の回転式スパッタ装置では、プローブの根元のようにターゲットからの距離がある部分では相対的に膜が薄い傾向がみられたものの、プローブ間での膜厚の差はほとんどなかった。

平行して本学電子物性工学科橋本研究室のスパッタ装置も使用した。この装置はプローブを立てて設置できるタイプである。金属原子の回り込みが大きいためか、マイクロピペットの表面には先端から根元まで良質な金属薄膜が製膜された。

使用する装置、金属種によって製膜時間などの条件や製膜後の表面状態は異なるが、Pt、Al は比較的よく製膜された。Pt に対しては、場合によっては金属薄膜を製膜する前にガラスマイクロピペットとの密着性を上げるために Ti、Ta などを 10nm 程度堆積させてから製膜を行った。そのため、ガラスマイクロピペットとの密着性では Pt が最も良く、Cu も密着性は良いものの、表面状態が光沢のある良質なプローブを作製することが困難であった。本プローブを作製する際、まずは目視および光学顕微鏡で表面状態を確認することが重要である。鏡面的な表面状態でないものは、その上に絶縁膜を製膜してもうまく絶縁できないため、さまざまな条件で作製し表面状態が良質なものを作製することが必要であることが分かった。

製膜後、金属薄膜の膜厚の測定を行った。ガラスマイク

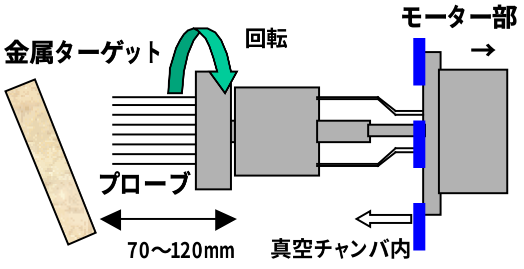

図3　回転式スパッタ装置

ロピペットは円柱形状をしていて膜厚の正確な測定が困難なため、金属をガラス平板に製膜したものを触針式表面形状測定器(DEKTAK, アルバック) で膜厚を測定することで推定した。ガラスはシリコンに比べ表面に凹凸があり、ガラス上の金属薄膜にも多少その影響が確認された。

以上の検討により、金属薄膜 A には Pt, Al が今回は適当であると考えた。Pt は不活性でもあるため、製膜後の保管や洗浄などの扱いにおいても有利であった。

最終的に微小熱電対プローブの作製では、金属薄膜に Pt とコンスタンタン(Cu：54, Ni：46wt%)、または Al とコンスタンタンを用いて作製することにした。その理由として、コンスタンタンは Pt との組み合わせで熱起電力が大きいことがあげられる。Cu とコンスタンタンの組み合わせは一般的であるが、プローブの表面状態の問題に加え後述する DLC 膜の上には Cu を製膜することは困難であるという報告から、Cu とコンスタンタンの組み合わせで微小熱電対プローブを作製することは可能でないと判断した。

５．SiO_2 絶縁膜の製膜

金属薄膜 A をスパッタしたガラスマイクロピペットの上に、本学知能機械工学科青山研究室の協力を得て SiO_2 絶縁膜を高周波スパッタ装置(RFS-200, アルバック)を用いて製膜した。この装置はターゲットまでの高さが 40mm 程度と狭くマイクロピペットを立てたままスパッタすることが不可能であり、マイクロピペットを様々な角度に傾けて置き製膜するなど工夫したものの、本プローブは 3 次元構造をしているため、プローブ全体に渡って良質で均一な膜を製膜することが難しかった。

熱電対プローブとして機能するためには２種の金属同士を完全に絶縁できなければならない。そこで、絶縁膜として SiO_2 膜が機能しているか評価をするために絶縁試験を行った。絶縁試験に用いるプローブはガラスマイクロピペットに金属薄膜 A(Al)と電気絶縁膜(SiO_2)をつけ、FIB 加工をせず金属薄膜 B(Cu)を製膜し、先端部での２種の金属の接触がないプローブを使用した。絶縁膜はスパッタ時間を調整し、３種類の厚さのものを用いた。絶縁試験は根元部分の金属薄膜 A(Al)端子部分と金属薄膜 B(Cu)端子部分に金属板、またはテスターのセンサ部を直接当て通電するかどうかを検査した。その結果、厚さによらず絶縁されないプローブも数多く存在した。絶縁されていない原因として、SiO_2 膜のクラックなどなんらかの形で絶縁破壊が起きていると考えられる。作製したプローブの表面を見てみると、中には先端部が透明で平滑でない膜や時間が経つと変色したりするものもあり、装置特有の問題か他の原因があると考えられた。しかし、最も重要な課題は極微小な先端径を持つ、針型の３次元構造プローブに、最先端まで均一な SiO_2 膜をスパッタで形成させることと思われ、今後、装置、作成条件の検討をしていく必要がある。

SiO_2 以外の絶縁膜についても検討した。炭素系材料、TiO_2、Al_2O_3 などが考えられるが、この中で炭素系材料の特徴としては、高硬度であること、CVD 法・スパッタなど様々な方法で成膜可能であることなどが挙げられ、それぞれの方法によって得られる膜の特性も様々であり、近年注目されている。特に CVD 法は３次元形状に対して均一な膜厚での成膜が可能であり、本プローブの作製には適していると考えられる。塗布系の有機材料については角田ら[2]がポリイミドのディップコーティングを試したが、膜厚を均一にするのが困難であり、ピペットの穴を塞いでしまうといった問題があった。しかし、マイクロデバイスの作製において近年用いられることが多いパリレンなどの有機材料も成膜方法によっては期待できるといえる。また、半導体分野で研究が盛んな高誘電体などの次世代材料についても注目して、今後さらに絶縁素材を検討していくことが重要である。

６．DLC 絶縁膜の製膜

SiO_2 膜以外の絶縁膜を検討した結果、炭素系材料である Diamond-Like Carbon (DLC)膜[5]を用いることにした。その利点としては、電気絶縁性が高いこと、高硬度であること、CVD 装置などにより比較的容易に製膜可能であることなどが挙げられる。すなわち、絶縁と同時にプローブの高強度化も期待できる。

DLC 薄膜の製膜にはイオンビーム蒸着法、スパッタ法、レーザーを用いた方法などがあるが[3],[4]、本研究では本学電子工学科奥山研究室の協力を得てプラズマ CVD 法を用いた。前述したように、プラズマ CVD 法は本プローブのような３次元形状の製膜に適している手法と考えられる。

表１　DLC と SiO_2 の物性[6]

	DLC	SiO_2
密度 g/cm^3	1.7～1.8	2.0～2.2
ヌーブ硬度 kg/mm^2 or ビッカース Hv	1500～9100 1000～8000	650
電気抵抗率Ω･cm	10^9～10^{14}	10^{16}
比誘電率	3～5	4
熱伝導率 W/cmK	0.2	1.5
熱膨張率 10^{-6} K^{-1}		0.4-0.55

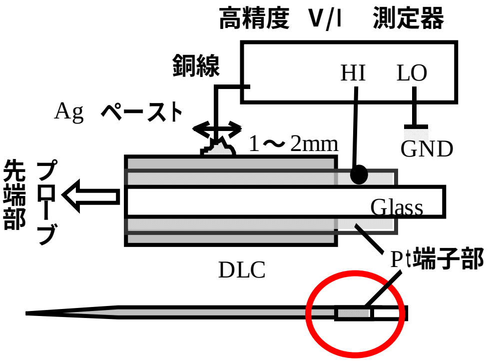

図４　抵抗測定装置

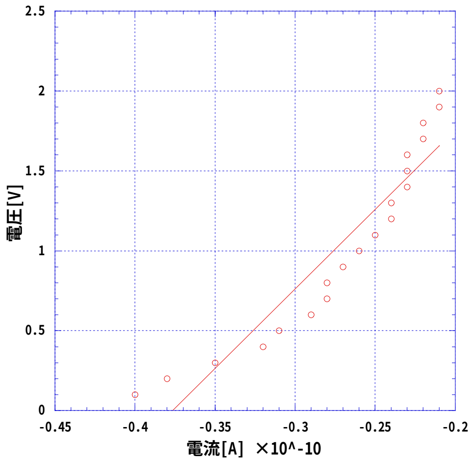

図５　抵抗測定結果

DLC 膜が絶縁膜として機能しているかどうかを調べるために抵抗測定を行った(図 4)。抵抗測定に用いたプローブはガラスマイクロピペットに Pt をスパッタした後、プラズマ CVD 装置を用いて DLC を製膜したプローブを用いた。

体積抵抗を測定した結果、図 5 のようになり、抵抗率は 1.8×10^{14}Ω･cm となった。DLC の電気抵抗率は 10^9～10^{14}Ω･cm であるので、ほぼ妥当な値が得られ、DLC 膜は絶縁膜として機能することが確認された。図 5 の実験結果のばらつきは測定器の変動と、読み取り誤差が大きく出たことが主な原因だと考えられる。本来 DLC 膜は平滑で光沢があり、目視で表面状態がよくないプローブは抵抗値も低く、ここでもプローブ作製時における表面状態の観察が重要であることがわかった。

７．FIB 装置での先端部の微細加工

金属薄膜Ａの上に DLC 膜を製膜したプローブの先端部を、東京大学大規模集積システム設計教育研究センター(略称 VDEC)が所有する FIB 装置を用いて加工した。プローブは金属薄膜 A として Pt、もしくは Al をスパッタした上に電気絶縁膜として DLC 膜をプラズマ CVD 装置で製膜したプローブを用いた。

FIB 装置はビームが安定するまでの時間や機械的な操作に要する時間があるものの、先端部切断にかかる加工時間はこの場合１、２分程度で済む。

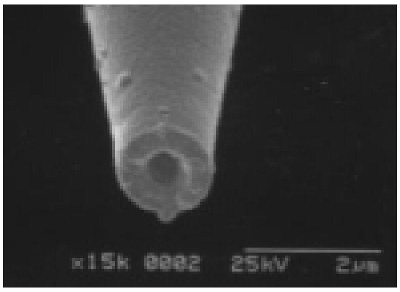

図 6 プローブの SEM 画像

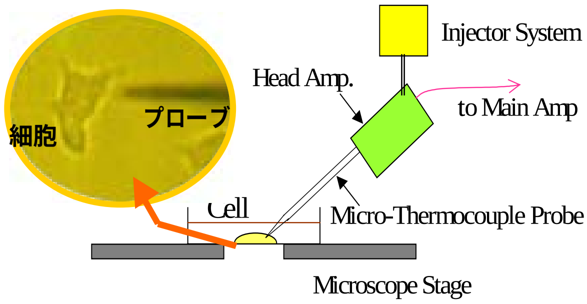

図 7　測定装置概念図

切断後のプローブの表面状態を、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。図 6 のプローブの先端部の SEM 画像より、FIB を使った微小熱電対プローブの作製方法では、プローブの先端の穴が保たれていることが確認できる。また先端径は約 1 μm であり、細胞種にもよるが、本プローブは単一細胞を測定するプローブとしては十分な接触もしくは刺入できる先端径で作製できたといえる。

８．微小熱電対プローブを用いた細胞熱計測の展望

プローブの熱電対としての性能を評価するためには、校正試験、すなわち熱起電力を測定する必要がある。プローブに発生する熱起電力は数μV/K レベルと極微少なことが考えられるため、プローブ近傍にプリアンプを設置し、さらにそこからの信号をメインアンプで増幅する工夫が考えられる。

例えば、過去の試作プローブにおいては、プローブ先端を温度制御された液体に浸し、参照温度記録用の熱電対を用いて、熱起電力が記録された。この場合、Pt と Au の熱電対プローブであったが、bulk の熱起電力よりも小さい値が得られ、これは薄膜であるためと考えられた。今後、現在作製中のプローブも熱起電力測定を行い、実際の細胞測定に先立ち個々のプローブの特性を調べる必要がある。

実際の細胞への測定装置の概念を図 7 に示す。細胞へのアプローチを行うマニピュレータや、細胞内へのインジェクション装置は従来のパッチクランプ法で用いられる測定システムがそのまま活用できると考えている。

また、測定する細胞は、生体反応で発生する熱量が大きいものが最初の測定としては興味深い対象と考えられる。測定に使用する細胞は遺伝子組み換え技術によって改良された細胞を使用することも有用であるが、自然にある細胞の中で発生熱量が大きいと言われている褐色脂肪細胞[7]に注目した。褐色脂肪細胞は哺乳動物での代謝的熱産生を担う特殊な細胞である。熱産生はエネルギー消費の１成分であるので、この機能不全はエネルギー消費の現象、さらには肥満を誘発するとされ、多くの研究がなされてきた。褐色脂肪細胞は、肩甲間や腋窩部、腎周囲に限局して存在する褐色脂肪組織の主な構成細胞であり、直径 20～40μmの細胞で、脂肪滴は多くの小滴に分かれた多房性構造となっている。脂肪滴に近接して多数のミトコンドリアが存在し、さらにその内膜には発熱に関わる特殊なタンパク質(CPU-1)が多量に存在する。このタンパク質が活性化されると酸化基質の化学エネルギーは ATP 合成に利用されず、熱へと変換されるという特徴をもつ。また癌細胞も発熱量が大きく、細胞診断への応用という面からも測定対象として興味深い。

これらの細胞を本プローブでリアルタイムに温度変動を測定することが可能となれば、これまで文献により報告されている時間的に平均化された発熱量なども時間変動とともに細胞レベルで推定できる。

９．結言

本研究は細胞の熱反応に焦点を当て、単一細胞の熱を測定できる接触型の微小センサプローブの作製に取り組んだ。その過程で得た結論を以下に記す。

●熱電対に用いる金属薄膜は、製膜時にチャンバ内の温度変動があることから熱膨張率がガラスや絶縁体と大きく異ならないことと、金属薄膜 B との組み合わせで熱起電力が大きいことを考慮し、選択することが重要である。また、製膜方法はスパッタを用いているため、スパッタ装置のターゲットとしての利用し易さ、マイクロピペットとの密着力についても考慮し検討した結果、金属薄膜 A には Pt、もしくは Al を用い、金属薄膜 B にはコンスタンタンを用いることとした。

●絶縁膜として、SiO_2 膜と DLC 膜を採用し、それらの絶縁試験、抵抗測定を行った。このうち、DLC 膜はプラズマ CVD 法で製膜されるため、３次元構造体であり微細な形状の本プローブの表面に比較的均質に製膜された。DLC 膜は $10^{14}\Omega$cm 程度の高い抵抗率となり、絶縁膜として十分機能していることが確かめられた。また、高強度であるため、微細な先端をもつプローブの強化という利点も期待される。

●上記の薄膜の積層においては、下層膜の表面状態が上層膜の製膜状況に大きく影響する。そのため、まずベースのガラスにおいては前処理を行った。また、ガラスと金属薄膜 A との密着性を向上させるため、Ti もしくは Ta の薄膜を介在させた。プローブ全体に渡って、良質な金属薄膜を製膜させるために、サンプル回転型のスパッタ装置の使用、およびその際のプローブ設置角度などの工夫を行った。

●金属薄膜 A と B を最先端部のみで接合させるためには、最先端部の絶縁膜を除去し、金属薄膜 A を露出させる必要があった。その手法を検討した結果、FIB 法により、先端部を約 1μm 切り落とす方法が有効であった。

＜参考文献＞

[1] 日本機械学会編：伝熱工学資料 改定第 4 版　丸善 (1986)
[2] 角田直人:生体微小領域熱計測のための熱電対ﾌﾟﾛｰﾌﾞの試作, 伝熱シンポジウム講演論文集(2001)
[3] 麻蒔立男：薄膜作製の基礎　日刊工業新聞社(1999)
[4] 麻蒔立男:超微細化工の基礎　日刊工業新聞社(1999)
[5] 鈴木秀人,池永勝編:事例で学ぶ DLC 製膜技術　日刊工業新聞社(2003)
[6] 長田義仁編：低温プラズマ材料化学 産業図書(1994)
[7] 斎藤昌之,入江由希子：Molecular Medicine,Vol.36 No.3, 264-270 (1999)