

## MEMS センサによる少数細胞の代謝熱モニタリング\*

中別府 修<sup>†</sup> 坂寄 純一<sup>‡</sup>

## Cell Metabolism Monitoring with MEMS Sensor\*

Osamu NAKABEPPU<sup>†</sup> and Junichi SAKAYORI<sup>‡</sup>

## Abstract

Cells and living tissue slightly but always generate metabolic heat as long as they are alive. Thus, biological activity can be measured through the observation of metabolic heat, which has been developed as “bio-calorimetry”. On the other hand, further improvements in thermal sensing ability can be expected with use of the MEMS (Micro Electro Mechanical System) technology. The purpose of this study is to develop the monitoring technique of the metabolic heat of cells in as small number as possible with the MEMS technology. If the monitoring technique of metabolism of a few cells or even a single cell is made available, it plays very important rolls in bio- and medical- engineering, pharmaceutical sciences, and so on. In this study, a bio-calorimeter with a MEMS thermopile sensor was made, and its performance and metabolism monitoring of Yeast were tested. The thermopile sensor consisted of 350 thin film thermocouples of Cr and Ni strips of 20  $\mu\text{m}$  width on a 150  $\mu\text{m}$  thick glass plate. The thermopile sensor composed a calorimetric cell as a bottom plate with thick aluminum frame. The calorimetric cell was placed in a triple thermostatic chamber which employs a proportional control with a Peltier device and PID control with heater. The calorimeter showed a sensitivity of 0.62 V/W under the condition of including culture solution, time constant of the calorimetric cell of 90 sec, and a noise equivalent power of 60 nW, which corresponds to metabolic heat of  $3 \times 10^3$  cells of Yeast. In the growth experiments of Yeast, growth thermograms for  $10^5 \sim 10^7$  cells can be measured with reasonable generation times. It was demonstrated that the detectable number of Yeast cells of the MEMS calorimeter is much smaller than that for the traditional bio-calorimeter.

**Key Words:** MEMS, Metabolism, Calorimeter, Yeast, Growth thermogram

## 1 緒言

生体組織や細胞は生命活動を行う限り、代謝によって僅かながら発熱する。このため、代謝熱量を測ることで、細胞の活性を観察することができる。従来より、この手法はバイオカロリメトリ[1]として、細胞や微生物の活性、増殖速度、食品腐敗、薬剤の抗微生物、殺菌効果、環境汚染物質の生態学的評価等を調べる手法として発展してきた。しかし、従来のバイオカロリメトリでは、細胞数 10<sup>6</sup> 個以上の試料の平均的な挙動を調べているため、分子論的な記述が要求される今日の生化学研究では、特異性に優れた高感度な電氣的、光学的、化学的計測手法に対する補助的な手段としての色彩が強い状況にある。

ただし、熱量センサの大幅な高感度化、熱量計測

技術の高度化が成し遂げられ、10 pW レベルの熱量分解能が得られると、少数または単一細胞の代謝熱が観察可能となり、その有用性は飛躍的に向上する。種々の細胞は平均的に 0.1~60 pW/Cell 程度の微小な発熱を行っており、これに対応する超高感度熱量計測技術が実現すると、細胞の一生に渡る生理状態の詳細な観察、細胞の正常活動範囲内での薬剤やアレルギー等の刺激に対する応答試験、代謝活性が非常に高くなっているがん細胞をはじめとする病態細胞の検出や臨床診断への応用が可能となり、医学や薬学、生命工学への幅広い貢献が期待される。

超高感度熱量計測技術の実現には、微細加工技術で作られる MEMS(Micro Electro Mechanical Systems) が有望であり、薄膜等の高熱抵抗構造とサーモパイル等の高集積性を利用した研究が近年報告されるよ

\* 受付日: 2006 年 3 月 13 日, 第 43 回日本伝熱シンポジウムより受付, 担当エディター: 長坂 雄次

<sup>†</sup> 明治大学理工学部 (〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1)

<sup>‡</sup> 東京工業大学大学院理工学研究科 (〒152-8552 東京都目黒区大岡山 2-12-2)

うになってきた。例えば, Johannessen ら[2]は, 厚さ 800 nm の  $\text{Si}_3\text{N}_4$  膜上に Ni-Au のサーモパイルを形成し, 約 2 V/W の高感度熱量計計測能力により, サーモパイル上の 10 個の褐色脂肪細胞の薬剤に対する代謝応答を 10 nW レベルで検出できること等を報告している。Zhang ら[3]は, 厚さ 2  $\mu\text{m}$  の  $\text{Si}_3\text{N}_4$ - $\text{SiO}_2$ - $\text{Si}_3\text{N}_4$  膜上に poly Si-Au のサーモパイルを形成し, 0.94 V/W の熱量計測感度を持つフロー式熱量計を開発し, グルコースや尿素等の微量な酵素触媒反応を熱的に計測可能なことを示している。Higuera-Guisset ら[4]は, シリコン薄膜上に Al-Si のサーモパイルを形成し, 計測部面積 25  $\text{mm}^2$ , 容積 0.6  $\text{cm}^3$  の PTFE 製反応室を持つ差動型熱量計を製作し, 熱量計測感度 0.39 V/W と大腸菌 (*Escherichia. coli*) の増殖特性を報告している。また, 中別府[5]は, 培養液中の細胞の 10 pW レベルの代謝熱をモニタする方法として, 低熱伝導性ガス中にブリッジ流路構造とサーモパイルを組合せた MEMS センサを設置し, 理想的なアンプ・フィルターを用いる方法を考案している。

本研究は, これらを背景に, MEMS 技術により熱量計測感度を向上させ, 可能な限り少数の細胞の代謝を熱的にモニタリングする技術開発を目的としている。著者らは, これまで, サーモパイル型熱量センサを微細加工技術により試作し, 多重恒温槽内で酵母菌を用いた増殖過程の観察実験[6]を行い, センサや熱量計装置に必要なノウハウと, 生体試料の取り扱い方法を学んできた。本論文では, これまで得た知見をまとめて報告する。

## 2 実験装置・方法

### 2.1 サーモパイル型熱量センサ

試作したサーモパイル型熱量センサを図 1 に示す。センサは, 基板にカバーガラス (硼珪酸ガラス, 22 mm $\times$ 22 mm,  $t = 0.15$  mm) を用い, 中央部分に線幅 40  $\mu\text{m}$  の熱量校正用ヒータを, その両側に, 線幅 20  $\mu\text{m}$  の薄膜熱電対を 175 対ずつ, 計 350 対直列に接続したサーモパイルをリフトオフ法により形成した。ヒータは Cr, サーモパイルは Cr と Ni で構成されている。なお, 本論文で報告する結果は, サーモパイルの片側が断線し, 他方の 175 対の熱電対のみを使用したセンサで得られたものである。

### 2.2 多重恒温槽を用いた熱量計

サーモパイルセンサを試料セルに接着し, 試料セルを, 断熱材を貼ったアルミニウムケースを 3 重にした恒温槽に設置し, 熱量計を構成する (図 2)。試料セルは, 14 mm $\times$ 15.8 mm の矩形穴をあけたアルミニウムブロックの底面にサーモパイルの参照接点部がアルミニウムブロック上に配置されるようにセンサを接着し, センサ上には, 細胞懸濁液がサーモ

パイルの計測接点上に位置するように, 中央部を囲むプラスチック板の仕切りを設置し試料室を設けた。この構造により, 試料室内で発熱が生じるとセンサ中央部と周辺部に温度差が生じ, 熱起電力信号として出力される。

また, 細胞懸濁液や酵母が発酵する際に生成するエタノールの蒸発を防ぐため, 流動パラフィン (和光純薬工業, 密度 0.795 ~ 0.830 g/ml) を懸濁液上に満たし, 発生した  $\text{CO}_2$  等の放出を防止するため, ビニルシートで覆いをしている。蒸発に伴う熱量移動は検出しようとする代謝熱量に比べ格段に大きく, 本研究では閉鎖系での実験が必要となっている。

恒温槽内の温度制御は, 試料セルと最も内側のアルミニウムケースは白金測温体とペルチェ素子で加熱・冷却の比例制御を, 他の 2 つのケースは白金測温体とヒータで PID 制御を行った。外側ケースは 250 $\times$ 250 $\times$ 100 mm とコンパクトなものとした。

サーモパイルの熱起電力は, ゲイン 100 倍, 入力帯域 17 Hz の自作 DC アンプ (アナログデバイス社, AD620) 1 台または 2 台の直列接続で増幅し, データロガー (Agilent 社, 34970A) を介して PC で記録する。起電力から発熱量への換算は, 後述の熱量計測感度を用いる。各部の温度は, T 型熱電対と同データロガーで記録する。

### 2.3 試料

生体試料としては, 安全性が高く, 標準的なデータが得やすい酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) を選び,

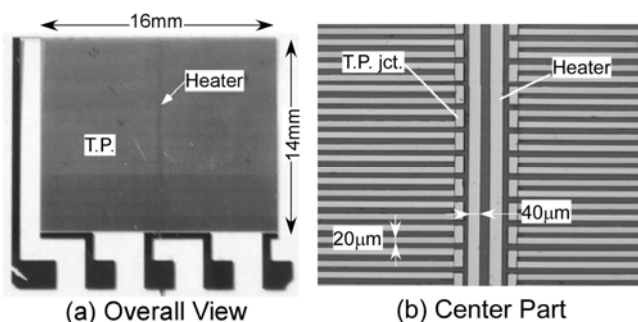


Fig. 1 MEMS thermopile sensor for metabolism monitor

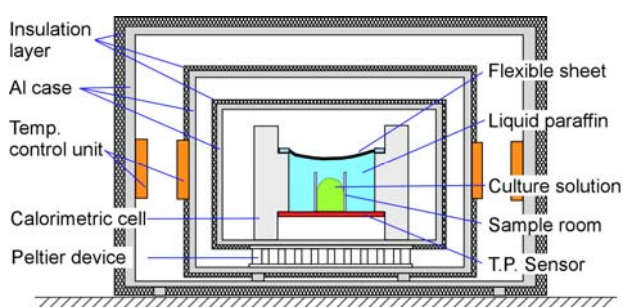


Fig. 2 Metabolism calorimeter with the MEMS thermopile sensor

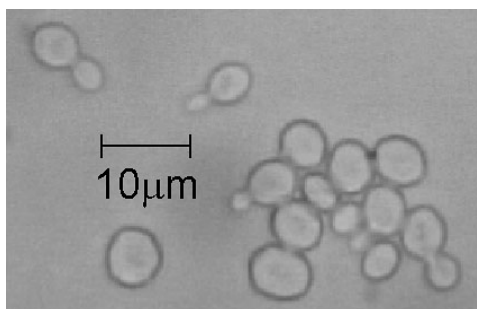


Fig. 3 Micrograph of yeast fungus

図3に示すパン酵母（ドライイースト，日清製粉）を用いた．培養液には，酵母・カビ用培養液（BBL社，M-Green Yeast and Mold Broth）と3 wt%の砂糖（スクロース）水溶液を用いた．

## 2.4 実験方法

実験は，所定の試料を熱量計へ入れ，代謝熱と各部の温度を計測するバッチ方式で行う．手順としては，まず，恒温槽の温度調節機能を動作させたまま，ケースを開け，試料セル内に流動パラフィンを適量満たす．次に，3 wt%の砂糖（スクロース）水溶液 100 ml にドライイースト 1 粒（体積  $\sim 0.1 \text{ mm}^3$ ）を溶かし，その溶液 0.2 ml を試料室内に入れる．菌 1 個の体積を  $100 \mu\text{m}^3$  と考えると，この操作で 2000 個程度の細胞が試料室に投入されることになる．次いで，培養液 0.2 ml を試料室へ入れ，アルミニウムケースを閉じて静置する．各部の温度，代謝熱量の計測は，上記手順と同時に開始しておき，装置各部に異常がないことを確認しながら準備し，計測を継続する．

## 3 実験結果と考察

### 3.1 熱量センサの性能

サーモパイル式熱量センサの感度をセンサ中央の較正用ヒータによる発熱量と熱起電力から求めた．図4に，試料セルを空にした場合と，流動パラフィンを満たした場合の結果を示す．セル内にパラフィンを充填すると熱コンダクタンスが増加し，熱量感度が低下するものの，熱量感度は  $1.24 \text{ V/W}$  と良好なものであった．ここで，ヒータによる中央部での局所発熱と試料セル内での均一発熱では，温度分布に違いがあり，1次元熱伝導による単純評価では感度は  $1/2$  まで低下する．正確には，本実験では試料室内の発熱に対する感度が必要となるが，詳細は未検討なため，計測値の  $1/2$ ，すなわち  $0.62 \text{ V/W}$  を本センサの熱量感度として採用する．

センサ信号に含まれるノイズと試料セル内の時定数を感度校正実験データから評価した．図5に，較正ヒータのステップ加熱に対するセンサ信号の

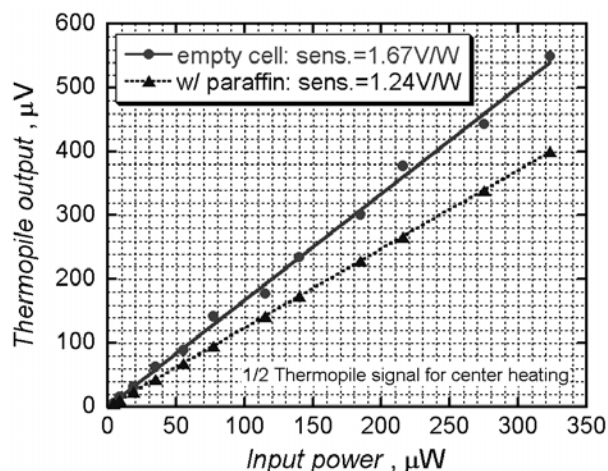


Fig. 4 Sensitivity of the 1/2 thermopile sensor for local heating by the center heater

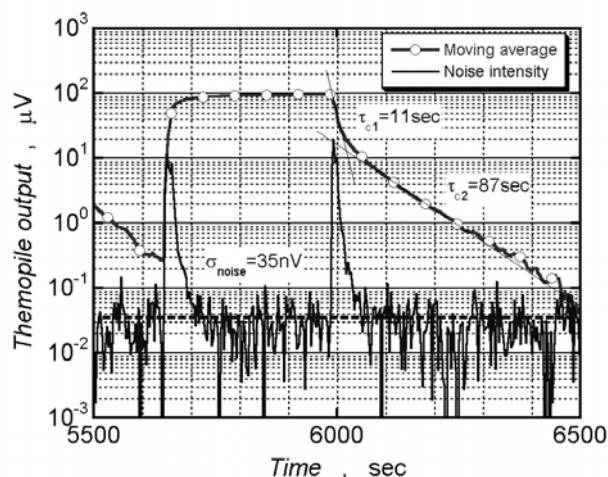


Fig. 5 Evaluation of noise and time constant of the thermopile sensor in calorimetric cell

30秒間の移動平均とノイズ強度を示す．加熱の立上りと立下り部でノイズ強度が大きいのはサンプリング周期が3秒と大きいためであり，他の領域でのノイズ強度からその標準偏差は  $35 \text{ nV}$  となった．これより，ノイズ等価電力 (NEP, Noise Equivalent Power) は約  $60 \text{ nW}$  と評価された．酵母菌の平均的な代謝熱量は  $20 \text{ pW/Cell}$  [8] であり，この NEP は  $3 \times 10^3$  個程度の酵母の活動を検出可能なことに対応する．

時定数に関しては，加熱停止後のセンサ信号の減衰から，センサのガラス基板内で温度が均一化するための約  $11 \text{ sec}$  の時定数 ( $\tau_{c1}$ ) と試料セル内の液体温度が低下するための約  $87 \text{ sec}$  の時定数 ( $\tau_{c2}$ ) が観察された．細胞懸濁液の発熱を調べるには，後者の時定数が重要であり，本試料セルは細胞の代謝熱量を  $90 \text{ sec}$  程度の十分速い時間分解能で調べる性能を持つことが分かった．

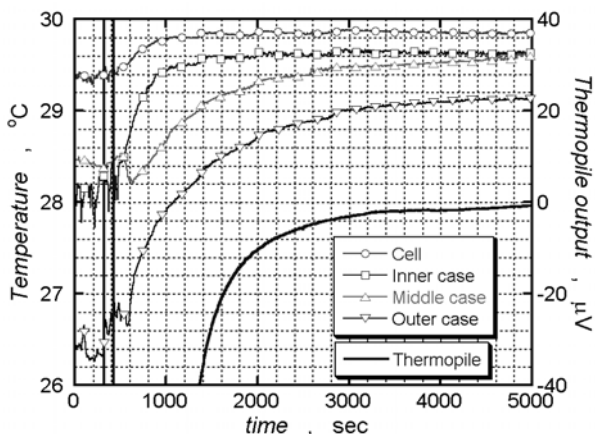


Fig. 6 Settling phase of the calorimeter after sample setting operation

### 3.2 恒温槽特性

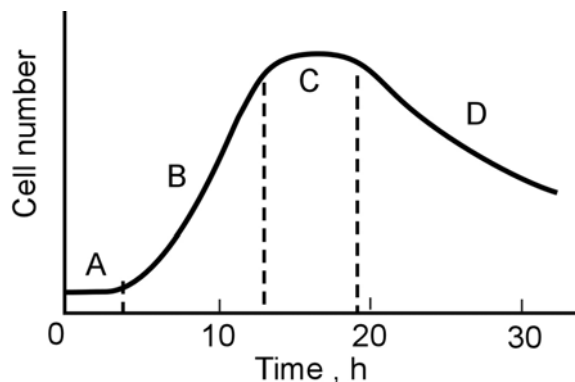
図6に、実験手順開始から、装置が定常状態へ達する過程の各部の温度変化、およびサーモパイル信号を示す。時間約 600 sec でケースが閉じられ、そこから定常状態へ推移している。これより、各部の時定数は、試料セルおよび内側ケースが 280 sec, 中間ケースが 890 sec, 外側ケースが 930 sec と算定された。また、装置が定常に達し、サーモパイル信号が数  $\mu\text{W}$  レベルで安定するまでに実質的に2時間程度を要しており、分析スループット向上の意味で、装置時定数の短縮が求められると考えられる。

さらに、本装置では、室内のエアコンにより 900 ~ 1000 秒周期で生じていた 1.2 Kp-p (p-p は peak to peak) の室温の変動が、外側ケース内壁では 50 mKp-p, 中間ケース内壁では 10 mKp-p, 内側ケース内では検出不能な程度に減衰し、サーモパイル信号のノイズには 2 nWp-p レベルの同周期の成分が含まれていた。サーモパイル信号のノイズ強度は前述のように 60 nW レベルであり、本恒温槽により、室温変動の影響は十分抑制されていることが分かった。

### 3.3 代謝熱モニタリング実験

図7に一般的な細菌の増殖曲線[7]を示す。細菌の増殖は一般的に誘導期という準備期間を経て、細胞数に比例した増殖速度を持ち、指数関数的に増殖が進む対数増殖期に入る。その後、栄養源や酸素の枯渇、代謝生成物の蓄積、細胞密度の増加が進むと増殖速度は遅くなり停止し、定常期に入る。ここでは増殖が停止しても細胞が死んでいる訳ではなく、定常期が続くと細胞が徐々に死んでいく死滅期(減衰期)へと推移していく。

対数増殖期では、細胞種やその活性を特徴づける代表時間として、1つの細胞が分裂し2つの細胞になるまでの世代時間  $\tau$  が得られる。下記のように、細胞数  $N$  は増殖速度定数  $\mu$  と時間  $t$ , 初期細胞数  $N_0$



A: Induction phase, B: Logarithmic growth phase  
C: Stationary phase, D: Death phase

Fig. 7 Typical growth curve of microbe

で記述され、世代時間  $\tau$  が導出される。

$$N = N_0 \exp(\mu t) \tag{1}$$

$$\tau = \ln 2 / \mu \tag{2}$$

図8に、試料セル温度 33.8 °C, サーモパイル信号を増幅率 100 倍の DC アンプ 1 台で増幅して得られた酵母菌の代謝熱曲線を示す。図中の温度データは、室温変動の影響が外側ケースには現れているが、試料セルでは十分減衰していることを改めて示している。代謝熱曲線は一般に増殖サーモグラムと呼ばれ、細胞の代謝熱量が一定と仮定すると細胞数変化を示す増殖曲線と一致するものとなる。一般的な増殖曲線と比べると、計測開始から約5時間までが誘導期、5~14時間が対数増殖期となり、その後16.5時間で発熱ピークを迎え、代謝量が減少する死滅期へ移行するように見られる。この傾向は、Antoceら[8]の酵母菌の増殖サーモグラムと同様であるが、図7と比較し、定常期が不鮮明である。後述するように、増殖期および死滅期は共に指数関数的な挙動を示すため、この間が定常期に当たると考えられるが、定常期の曲線の差異は細胞1個当りの代謝熱量が一定とする仮定に注意が必要なことを示すと考えられる。また、代謝熱量の減衰期に酵母菌が死滅しているか休眠状態かは不明なため、高感度熱量計測が実現した後は、細胞数と発熱量の関係を同時に測る工夫が求められる。

図9には図8の結果を対数表示した酵母菌の増殖サーモグラム、および計測信号に含まれる RMS ノイズを示す。酵母菌の平均的な代謝熱量 20 pW/Cell から換算した菌数も表示している。増殖サーモグラムには、初期酵母菌数が  $4 \times 10^5$  個程度、5~12時間までの間に世代時間 123 min となる対数増殖を示し、 $10^7$  個の酵母菌数に対応する 200  $\mu\text{W}$  の最大発熱量を記録し、その後、20時間以降に一定の割合で減衰し、 $10^5$  個の酵母菌数に対応する熱量まで計測できている様子が示されている。また、ノイズは 300 nV のレ

ベルであり、酵母菌  $10^4$  個の代謝熱量に対応する。

図 10 には、試料セル温度を  $29.8^\circ\text{C}$  とし、サーモパイル信号を DC アンプ 2 台で増幅して計測した増殖サーモグラムと RMS ノイズを示す。この計測では、装置が定常に達するより早く対数増殖が生じており、開始後 2~9 時間に世代時間約 85 min の対数増殖期が見られる。最大発熱量は図 9 の結果と同様であり、開始、終了時の熱量レベルは酵母菌数  $10^5$  個オーダーに対応している。ノイズは、DC アンプの増設により S/N 比が向上し、60 nW レベルまで低下しており、潜在的に酵母菌  $3 \times 10^3$  個レベルの代謝熱量に対応する熱量分解能が示された。ただし、代謝熱モニタリングが実証された細胞数は  $10^5 \sim 10^7$  個レベルであり、今後、極少数の初期細胞から計測を開始し、長周期のドリフトを抑え、細胞数  $10^3$  個レベルの代謝熱をモニタ可能なことを実証する必要がある。

また、一般的な酵母菌の世代時間は生育条件により  $80 \sim 120 \text{ min}$  [8], 生育至適温度が  $30^\circ\text{C}$  [9] であり、本研究で増殖期に得られた世代時間  $85 \text{ min @ } 29.8^\circ\text{C}$ ,  $123 \text{ min @ } 33.4^\circ\text{C}$  は妥当な結果と言える。さらに、死滅期の代謝熱量の指数関数的な減衰も捉えられており、細胞数、培養液中の糖分や代謝物の同時計測等と組合せた、総合的な解析法への発展も期待される。

#### 4 結 言

MEMS 技術で製作したサーモパイル型熱量センサを用い、培養液中の細胞の代謝熱を恒温槽内で計測する熱量計を試作し、その性能評価、および酵母菌の代謝モニタリング実験を行った。性能評価としては、熱量計は感度が  $0.62 \text{ V/W}$ , NEP が  $60 \text{ nW}$  と酵母菌  $3 \times 10^3$  個の代謝熱を計測可能な高い性能を持つこと、試料セル内時定数が  $90 \text{ sec}$  程度と代謝計測に十分な応答速度を持つこと、恒温槽により室温変動の影響が十分抑制されていることが示された。酵母菌の代謝熱モニタリング実験では、菌数  $10^5 \sim 10^7$  個に対応する増殖サーモグラムが得られ、従来よりも少数な細胞の代謝熱を計測できることが実証された。今後、細胞数  $10^3$  個レベルの代謝熱モニタリング性能を実証し、より少ない細胞数の代謝熱モニタリング技術を追求する予定である。

#### 謝 辞

本研究では、東京工業大学メカノマイクロプロセス室の協力によりサーモパイルセンサを開発した。また、本研究は科学研究費補助金（萌芽研究）(No.18651055) の助成を受けて実施した。記して謝意を表す。

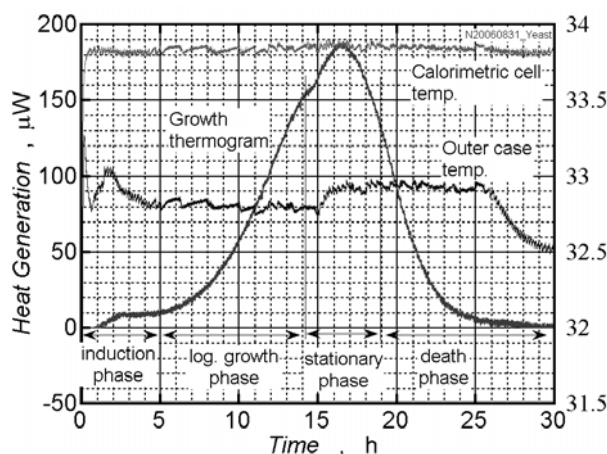


Fig. 8 Growth thermogram in linear plot of yeast at  $33.8^\circ\text{C}$  taken through the single DC amplifier

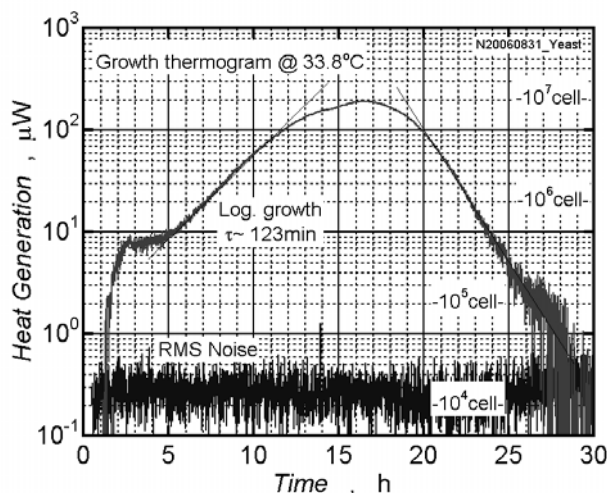


Fig. 9 Growth thermogram in single logarithmic plot of yeast at  $33.8^\circ\text{C}$

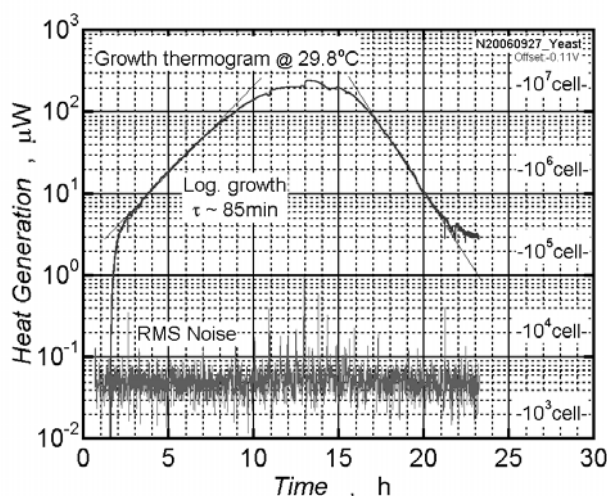


Fig. 10 Growth thermogram of yeast at  $29.8^\circ\text{C}$  taken through the two DC amplifiers

### 参考文献

- [1] 高橋克忠 (日本化学会編), “第5版実験化学講座 6 温度・熱, 圧力”, 丸善 (2005), 321-329.
- [2] Johannessen, E. *et al.*, “Micromachined nanocalorimetric sensor for ultra-low-volume cell-based assays”, *Analytical Chemistry*, Vol.74 (2002), 2190-2197.
- [3] Zhang, Y., *et al.*, “Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels”, *Biosensor and Bioelectronics* 19 (2004), 1733-1743.
- [4] Higuera-Guisset, J., *et al.*, “Calorimetry of microbial growth using a thermopile based microreactor”, *Thermochimica Acta* 427 (2005), 187-191.
- [5] 中別府修, “微小熱量測定装置および微小熱量測定方法”, 特許出願 2006-106482 (2006).
- [6] 中別府修, 他, “MEMS センサによる少数細胞の代謝熱モニタリング”, *第43回日本伝熱シンポジウム講演論文集 I* (2006), 47-48.
- [7] 古賀邦正, “微生物のコロニー増殖と熱測定”, *熱測定*, 31 (3) (2004), 117-124.
- [8] Antoce, O. A., *et al.*, “Heat effect for a single cell of *Saccharomyces cerevisiae* determined using a classic and a new procedure”, *熱測定*, 24 (3) (1997), 111-117.
- [9] 水野貴之, “細胞工学別冊 目で見える実験ノートシリーズ バイオ実験イラストレイテッド7, 使おう酵母 できる Two Hybrid”, 秀潤社 (2003), 9-45.