「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」 平成18年度採択研究代表者 H22 年度 実績報告

中山 喜萬

大阪大学大学院工学研究科・教授

カーボンナノチューブを用いた単一生体分子ダイナミクスの計測

§1. 研究実施の概要

生体反応は、分子の構造変化や相互作用、エネルギー移動を伴って進行する。これを分子レベルで解明するために、本研究は、カーボンナノチューブ(CNT)の優れた電気機械的性質を利用して変位と熱流の検知デバイスを開発し、数ミリ秒の時間分解能でゼプトグラム精度の質量と pN 精度の2次元力、10⁻¹⁹J 精度の熱量を計測する技術を構築することを目的としている。

H21 年度に引き続き、質量および力計測については、1)CNT 先端への部位特異的なタンパク 質結合とその評価技術、2)液中で質量・力計測を行うための CNT アームの作製技術、3)CNT ア ームの振動および変位を光学的、電気的に検出する技術、4)タンパク質操作用プラットホームを 導入した分子プローブ顕微鏡のオペレーション技術の開発を行った。

また、熱量計測については、5)熱量計測に適した CNT の調整と CNT の熱伝導性を含む物性 評価、6)被測定位置に CNT 先端をアプローチさせるために、水溶液中で CNT を可視化する技 術、7)バイメタルカンチレバーによる水溶液中での熱量計測評価技術と褐色脂肪細胞反応の熱 量計測、8)真空封入型バイメタルカンチレバー系による時間・空間分解能の高い熱量計測システ ムの構築に取り組んできた。

その結果、液中で、10 ゼプトグラム程度の質量感度、10pN 程度の力感度、10⁻¹⁵J程度の熱感 度で計測が可能であることを見いだし、実際に生体材料へ適用する段階に入ってきた。今後、23 年度前半終了まで目標値の達成を目指す。後半は、下記課題を仕上げて本プロジェクトを終了す る。

・「誰でも使いやすい質量センサ、カセンサ」という観点で、確実に使ってもらえるデバイスの開発(生命科学研究者の皆様にテストしてもらえるようなデバイス)

・「aJ の熱量の計測に向けて、さらなる分解能の向上」

§2. 研究実施体制

(1)「中山」グループ

①研究分担グループ長:中山喜萬(大阪大学大学院工学研究科、教授)②研究項目

- ・ CNT 先端への部位特異的タンパク質結合技術の確立
- CNT アームの研究開発
- ・ 分子反応検出プローブ顕微鏡の開発
- 一分子力計測
- ・ CNT アームの供給

(2)「秋田」グループ

①研究分担グループ長:秋田成司(大阪府立大学工学研究科、教授)②研究項目

- ・ 質量・力計測デバイス開発
 - 1) 片持ちばりタイプデバイスの作成と高性能化、液中計測
 - 2) 両持ちばりデバイスによる液中質量計測
 - 3) 液中光学的 CNT 振動検出システム構築と高感度化・高速化
- (3)「物材研」グループ

21年度より吉村Gへ統合

(4)「吉村」グループ

①研究分担グループ長:吉村成弘(京都大学大学院生命科学研究科、准教授)②研究項目

- ・ 部位特異的タンパク質付加技術の確立
- ・ 質量変化の計測
- 1分子力計測

(5)「石島」グループ

①研究分担グループ長:石島秋彦(東北大学多元物質科学研究所、教授)②研究項目

・熱量計測デバイス開発

1) CNT の蛍光修飾、熱伝導性の評価

- 2) ナノプローブの作製・評価とナノ計測システムの構築
- 3)細胞の熱産生計測

§3. 研究実施内容

1. CNT 先端への部位特異的タンパク質付加技術の確立(中山 G、吉村 G)

1-1. タンパク質操作用プラットホームの開発(中山G)

前年度までに作製したマイクロ流路を有するプラットホームを用いて、今年度は流体中での CNT 先端へのタンパク質結合を検証した。幅 1mm 高さ 100µm の流路内において、流路出口に CNT アームを設置し、EDC/NHS 溶液を流した後 Qdot ストレプトアビジン溶液に置換して送液した。マ イカ基板上のビオチン化 BSA との力計測により、二層流を安定して形成する流速(2ml/h)におい て CNT 先端への Qdot ストレプトアビジンの捕捉を確認した。以前測定した、静止溶液中で同タン パク質を捕捉した後と同程度の力が計測されたことから、流体中での CNT アーム先端化学修飾な らびにタンパク質捕捉を実証した。さらに、プラットホームへ容易に CNT シートを組み込むために、 従来用いてきたエポキシ樹脂に替わり PDMS を用いて CNT シートを作製した。作製した CNT シ ートはエポキシ樹脂使用時と同様のタンパク質固定能を示し、非特異的に吸着したタンパク質も同 様の操作で除去できた。これによって、CNT シートを直接マイクロ流路へ貼りつけることができ、よ り容易にプラットホームが作製可能となった。

1-2. CNT アーム先端へのタンパク質の部位特異的付加と原子間力顕微鏡による力計測(吉村G、中山G)

部位特異的タンパク質付加技術の確立

アーク放電により合成した CNT を走査型電子顕微鏡(SEM)チャンバ内でシリコン片のエッジに 並べて電子線照射により固定し、CNT カートリッジを製作した。TxRed-Tween20 を用いて(昨年 度確立済み)9)それらの CNTを蛍光ラベルした後、staudinger 反応を用いて(昨年度確立済み) 部位特異的にカルモジュリンを捕捉した。このカルモジュリンは 80 番目のアミノ酸にアジドチロシン を含む(昨年度に確立済み)。このカートリッジを蛍光顕微鏡下で観察し、蛍光シグナルにより CNT を確認後、蛍光タンパク質(ECFP)を融合したカルモジュリンペプチドを含む溶液を流し込 んだ(図1上段)。このとき、カルシウムを含む溶液を用いると CNT 先端に ECFP のシグナルが観 察された(図1下段左)。この状態からさらにチャンバ内の溶液をカルシウム不含のバッファーに置 換すると、CNT 先端の ECFP シグナルは消失した(図1下段右)。このことは、カートリッジ上の CNT 先端に結合させたタンパク質(カルモジュリン)が正しく機能していることを示す。

原子間力顕微鏡による力計測

昨年度は、部位特異的にアジド基を導入したタンパク質(importin a)を CNT アーム先端に捕捉し、マイカ基板上に展開したタンパク質(importin 8)との相互作用力を計測したが、非特異的な相互作用力の検出割合が高かった。本年度は、基板側のタンパク質を方向制御するために、これまでに開発してきた CNT シートを担持基板として力計測に用いた。CNT シート表面に突出したCNT 先端にビオチン化した importin 8 をストレプトアビジンを介して固定した。シート表面に非特異的に吸着したタンパク質は界面活性剤 Triton X-100を用いて洗浄し、除去した。一方、CNT アーム先端へは importin a を、importin 8 との結合部位を顕わにするようにあるいは隠すように部



図 1. カートリッジ上の CNT への部位特異的タンパク質付加と機能検証。(上段) カートリッジ上のナノチュー ブを蛍光ラベルし、アジド基を有するカルモジュリンを結合させる。その後、蛍光ラベルしたカルモジュリン基質 タンパク質をカルシウム存在下、非存在下で反応させ、ナノチューブ先端への結合を蛍光顕微鏡で観察する。 (下段) カルシウム存在下ではナノチューブ(赤)と同じ位置に見えていた基質タンパク質(青)が、カルシウム非 存在下では消失している。

位特異的に捕捉した。原子間力顕微鏡(AFM)のフォースカーブ計測の結果、図2に示すように、 結合部位を隠した場合(b)では 10.9 pN、結合部位を顕わにした場合(a)は 43.0 pN と、検出され た力の大きさに差異が見られた。この結果は、CNT シートを用いることにより非特異的な相互作用 の検出を低減できたとともに、CNT アーム先端への部位特異的なタンパク質の捕捉に成功し、一 分子レベルの相互作用力を明らかにしたことを示している。

2. CNT アームの研究開発(中山 G)

今年度は質量・力計測デバイスに組み込むための CNT アーム作製技術の開発に取り組んだ。 CNT アーム先端へのタンパク質結合による質量変化、および CNT アーム先端に結合したタンパ ク質と他のタンパク質との間の力を、それぞれ CNT の振動数の変化、CNT のたわみ量の変化か ら光学式に検出することを目的とし、CNT をカンチレバーの Si チップ先端方向に垂直に取り付け た CNT アームを作製した。 CNT の取り付け角度および位置を一定にするために、Si チップ先端 を集束イオンビーム(FIB)法によりエッチング加工した。現在このような形状の CNT アームを項目



図 2. CNT アームを用いて計測し た importin α と importin β と の相互作用力のヒストグラム。CNT アーム先端に importin α , CNT シートの CNT 先端に importin β を部位特異的に捕捉し、フォース カーブモードにより測定した。(a)、 (b)はそれぞれ importin α の結 合部位を顕わに、また隠して捕捉 した場合。 3および項目6の質量・力計測に提供し計測を行っている。

さらに昨年度に引き続き CNT アームの加工方法を検討した。液中で振動検出可能な直径 10nm 程度の多層 CNT の先端へタンパク質 1 分子だけを捕捉するために直径 1nm 程度の CNT を接合させる加工過程において、得られた新たな知見として、作製するアームに対して同程度以 上の長さの中空 CNT を突き合わせて通電加熱する必要があることを見いだし、これにより CNT ア ームの長さ制御が可能となった。また、昨年度に引き続き TEM 内電場共振計測法による CNT ア ームの機械強度評価を行い、先端加工後も 800~1000 程度の高い Q 値を持つことを確認した。 また加工前後の共振周波数変化から、CNT 先端のゼプトグラム単位の質量変化が検出可能であ るという確証を得た。

3. 質量・力計測デバイス開発(秋田G)

水溶液中における CNT 片持ちばりの変位および振動を電気的に検出する系と光学的に検出 する系についてその構築と高感度化・高速化について検討した。また、多層 CNT の機械振動に ついての基礎物性についても検討した(業績原著論文 1, 3)。

3-1. 片持ちばりタイプデバイスの作成と高性能化、液中計測

CNTアームをゲートとする CNT 電界効果トランジスタ(FET)構造を構築した。ゲート電圧を負に 強くすると、ゲート・チャネル間の静電気力が増し、CNT 片持ちはりの実効的な質量が増え、共振 周波数が減少することを確認した。溶液中での検討はこれからの課題である。

3-2. 両持ちばりデバイスによる液中質量計測

単層 CNT をチャネルとする CNTFET 両持ちはりデバイスにおいて、純水中において、ゲートバイアスを増加することでゲート・チャネル間の静電気力により張力が増し、共振周波数が高くなることを確認した。

3-3. 液中光学的 CNT 振動検出システム構築と高感度化・高速化(業績原著論文 2, 4)

光学式において画像処理による方法で水中の CNT 振動の検出に成功した(業績原著論文 2)。 さらなる高感度化のため図3に示す系を開発した。CNT からの散乱光を 50 倍の対物レンズを通し 有効径 3µm の光ファイバーで受ける。CNT の微小変位は光ファイバーに入射する光量の変化と

して検出する。CNT 振動の計測は、光変調ヘテロ ダイン方式による周波数検出法とロックイン検出を 用い位相検波 (PLL)により計測する系とした。レー ザーの強度変調周波数を $f + \Delta f$ とすると、CNT は Δf で振動しているように見える。CNT が共振してい る場合には、参照信号と観測信号は同位相となる。 共振周波数が変化すると位相にずれが生じるが、こ のずれを CNT を加振している発信器にフィードバッ クし周波数を調整し、位相差をゼロに戻す。これに



図 3. 光学的変位·振動測定計

より、常に CNT は共振条件で励振される自励発振が実現し、高精度共振周波数計測が容易に実時間で行えるようになった。この系により、真空中および大気中において、300ms の時定数で CNT 共振器の 2ppm の周波数測定精度を実現した。CNT の質量から換算した質量測定精度は 50~100zg に相当しており、タンパク質 1 分子計測へ適用できることを示した(業績原著論文 4)。 また、同じ方法が液中でも適応可能であることを示した。さらに、CNT の光学的変位計測により液 中において 4 pN の分解能で静的な力計測が可能なことを示した(論文投稿中)。

S/Nの向上のためにCNTを従来の圧電振動子で振動させるのではなく、異なる波長のレーザー 光照射により熱弾性振動を誘起させた。圧電振動子の場合、CNTだけでなくその他の領域も振動 するが新しい方法では CNT のみが振動するため、大気中の測定では重畳する寄生スペクトルが 1/10に抑圧された。今後、液中での励振が課題である。

4. 分子反応検出プローブ顕微鏡の開発(中山G、秋田G)

研究項目1、2で開発した CNT シートおよびアームを用いてタンパク質(importin a-importin 8)間の力計測を行い、項目1-2に記述した通り、タンパク質間の特異的な相互作用力を検出でき、 さらに一分子レベル力計測に成功した。現在、項目3の CNT-FET を導入した力・質量計測を行う ために、CNT-FET による液中での CNT 振動検出について取り組んでいる。また、効率良く力・質 量計測を行うために、CNT アームを液中から出すことなくタンパク質を CNT 先端に捕捉可能なプ ラットホームをデザインした。これにより分子反応検出プローブ顕微鏡に装着した CNT アーム先端 を、反応場にアプローチさせることが可能となる。現在までに、流体中での CNT 先端へのタンパク 質捕捉(1-3)および PDMS 製 CNT シート(1-1)によるタンパク質の特異的な結合が確認できて おり、一分子レベルの力・質量計測に適用する段階である。

5. 質量変化の計測(吉村G)

図4に示す検出システムを構築し、溶液中での CNT の振動を光学的に検出するデバイスを作成した。CVD 法で作製した CNTを SEM チャンバ内でカートリッジに取り付け、電子ビームで固定



図4. CNT 振動の光学的検出デバイス。 カートリッジに取り付けたナノチューブにレ ーザを照射し、そのシグナル強度(反射光 や蛍光)の変化を計測する。



した。この CNT をすでに報告した手法を用 いて TxRed で蛍光ラベルし、倒立型蛍光 顕微鏡のステージ上にセットした。ステージ には励振用ピエゾを搭載したカートリッジホ ルダを設置し、これを用いて CNT を振動さ せた。1Hz から 1MHz の電圧を印加し、そ の際の蛍光シグナルを高感度ビデオカメラ で撮影した。得られた画像を元に CNT から の蛍光シグナル量を定量し、周波数に対し てプロットした。代表的な結果を図5に示す。



図5. カートリッジ上の CNT (蛍光ラベル済)に 10kHzから1000kHzまでの周波数 を変化させなが ら与えた時の CNT の振動。

その結果、700-1000kHzの範囲にピークが確認された(Q値は15-60)。タンパク質の質量変化を 検出するにはさらなるQ値の上昇が必要であり、現在そのためのシステム改良に取り組んでいる。

6. 一分子力計測(吉村G、中山G)

CNTをカンチレバーのSiチップ先端方向に垂直に取り付けたCNTアーム(研究項目2)を利用 した電気式一分子力計測に取り組んでいる。CNT をチャネルに持つ電界効果トランジスタ(FET) を液中で利用するために、秋田 G によりCNT チャネルを SU8 保護膜で覆う改善が施された。こ れにより、CNT チャネルを損傷することなく計測が可能となった。現在、秋田 G の協力のもと CNT-FET の動作確認を行っており、溶液中でCNT アームをゲートとして、CNT チャネルに近づ けることによりドレイン電流が変化したことを確認している。

7. 熱量計測デバイス開発(石島G)

7.1-1 液中 fJ の熱感度を持つバイメタル型センサ

より高感度な熱量センサを開発するため、サブミクロンの 最小加工寸法をもつバイメタル振動型の熱量センサを作製 する方法を開発し、そのプロトタイプを試作した(図 6)。高 感度化のために振動体を極めて小さく作り、熱容量を小さく するため、電子ビーム描画装置を用いて、幅が 200nm~1 µm の微小な振動型センサを作製した。このタイプのセンサ を溶液中に浸し、9.4MHzの共振周波数において、約5nm の振動振幅で振動させることができ、熱量センサとして約 4.5fJの熱分解能が期待できることを示した。



図 6. Au/SiN バイメタルに CNT を取り付けたセンサ

しかしながら、図6のセンサを用いて、実際に熱計測をするまでにはなかなか至らなかった。その 理由は、1)液中におけるダンピングによるQ値の低下、2)自然対流による振動の不規則応答、3) 低い振動振幅に伴う自励発振の困難さ、により、溶液中でセンサの振動の変化をとらえても、計測 したい発熱体の発熱量を決定することができないという課題が大きく存在していたからである。

7.1-2 真空封止の伝熱型センサの開発

nJレベルを越えた、さらに高感度の熱センサを実現 するためには、振動型センサが望ましいことが分かっ てきており、先に述べた振動型熱センサの3つの問題 点を克服するために、図 7 に示すように、伝熱性の低 い封止膜を用いて空間を仕切り、振動子を熱パイプと して真空中へ熱を輸送し、真空中に突き出した振動子 で温度変化を測る方法に取り組んでいる。振動子を真 空の空間に置くことにで、10,000 を越えるQ値が期待 され、対流の影響も無く、上述の問題点は全て解決で きると期待できる。

真空封止した振動型熱センサプローブの作製にお いて、図8に示すようなSi振動体をフォトレジストに埋 め込まれた状態でプロセスを進め、プローブ構造がで きた後に、上に微細な穴をあけ、その微細孔から超臨 界 CO2を用いたレジストのエッチングプロセスを施し、 その後、CVD 法により緻密薄膜を用いて振動体を真 空封止する計画である。

上のようなプロセスを実行するためにはまず、超臨 界 CO₂を用いたレジストエッチングプロセスの有用性 を確認しなければならない。参考とするのは、1997 年 の南朴木らの報告によるジエチレングリコールモノメチ ルエーテルを添加した超臨界 CO₂によるレジストのエッ チングである。添加剤の要求事項である①レジストの溶 解能力、②超臨界 CO₂との相溶性、③安全性(低毒性、 高引火点)を満たしているため、有望な添加剤といえ る。







図8. 振動体真空封止プロセス



図 9. 犠牲層除去のためのエッチングプロセス結果.

図 10 のように長い2層構造変位型のカンチレバーを作製し、PDMS(幅約 125µm)を用いて仕 切られた空間を作り、間を貫いたカンチレバーを設置し、片側に出力8mWのレーザーを照射し、



図 10. バイメタル型カンチレバーを用いての伝熱実験の構図(左)と結果(右)



図11. Siカンチレバーを用いた伝熱実験の図(左・中)と加熱レーザーを用いたロックインアンプ計測結果(右)



図 12. 細胞を中央でトラップする両持ちはり流路のデバイス構図(左)、流路部分の構造(中、右、この後、Si を等 方エッチングにより流路を形成する)

反対側の変位をCCD画像で評価する熱輸送技術の原理検証を行った。その結果、反対側のカン チレバーの先端に 13µm の確かな変位が確認できた。本実験の結果、熱輸送方式を使っての熱 計測が可能であることがわかった⁸⁾。

図 11 のように振動形のシリコンカンチレバーをガラス基板上に貼り合わせ、ガラスにより仕切ら れた空間で熱を伝えるデバイスを作製し、片側に数 mW の強度変調が可能なレーザーを照射し、 反対側の振動応答をレーザードップラー計測した。ロックインアンプを用いて振動応答を調べたと ころ、レーザー加熱をすればロックすることから、片側の加熱で反対側のカンチレバーが加振され ていると考えられた。従って、振動系においても伝熱型が利用できる可能性があるといえる。

7.1-3 細胞の代謝活性計測のための両持ちはり構造デバイスの開発

図 12 のように細胞の酸素消費や発熱挙動を調べるための窒化シリコンを主に用いた両持ちはり 構造のデバイスを作製している。はりの中央は細胞がちょうど通り抜けられないような構造をしてお り、数細胞を固定できるようになっている。現在は、流路の外枠(SiO₂(180nm)/SiN(700nm) /SiO₂(180nm))を堆積するところまで終了しており、後は XeF₂ ガスを用いた Si の等方性エッチン グにより、流路を形成する予定である。本デバイスは、細胞の発熱に関しておよその見積りとして、 1nWあたり約 8ppmの共振周波数の変化で計測できる見積りである(4.8MHzの共振周波数に対 して約 40Hz の変化)。

7.1-4 水中における CNT の熱伝導性の評価

CNT とバイメタル型カンチレバー先端に取り付けるための SEM 内マニピュレーションシステムの拡張を行った。従来は3自由度のマニピュレータ2台、z軸1自由度のマニピュレータ取り付けステージ、5自由度の試料ステージから構成される計12自由度の操作システムであった。作製し

た 12 自由度ナノマニピュレーションシステムにより、図 6 に示した小野グループが作製したセンサ先端への取り 付けも実現している。今年度は図 13 に示すようにマニピ ュレータ取り付けステージに x-y 軸の 2 自由度を増やす 改良を加えることで、CNT の操作及びカンチレバーへの 設置の作業性を向上させた。CNT とカンチレバーの固 定には CNT とカンチレバーの接合部に EBID によりカ ーボンを堆積させている。今後は熱伝導性のよい金属材 料の堆積、及び短時間での固定が可能な真空用接着材 等の材料による CNT とバイメタル型カンチレバーの接合 部の評価を行い、熱計測に適した固定法を検討する。

昨年度に本マニピュレーションシステムを用いて、微細 加工により作製したマイクロヒータ及び 4 端子電極を有す る基板上に単一 CNT を設置して水中における伝導性評 価デバイスを作製し評価を行ってきたが、基板への熱の散 逸の影響が計測での課題であった。

CNTからの熱の散逸の影響を抑制するため、図14に



図 13 SEM内操作システム



図 14. 温度計測ゲルビーズを用いた CNTの熱伝導性評価システム

示すように CNT 両端にハイドロゲルのビーズを付着させ、 CNT 一端へのレーザー加熱後のCNT 他端の温度と環境の温度差と入力熱量から熱伝導率を評価する系の構築を行っている。 CNT 両 端の温度に固定するゲルビーズには、温度感受性の量子ドットを導入し蛍光強度変化から CNT 両端の温度を計測する。蛍光強度の検出は高分解能の CCD や顕微鏡に接続可能な分光光度計 を用いることで約 0.05℃以下の分解能で、精度は±0.5℃で検出可能である。このゲルビーズに 約 30mW の近赤外レーザーを照射することで、レーザスポット径の範囲で約 44℃温度が上昇する ことを確認した. CNTの長さや直径はヒートシンクに固定する際のSEM内操作時に実測が可能で あり、本手法によるCNTの熱伝導率計測のための準備

7.2-3 光学顕微鏡下における CNT の可視化

は整っている。

昨年度までは主にピレン誘導体を用いた CNT の可視 化技術の開発を行ってきた。その結果、CNT の蛍光修 飾が可能であることがわかり、光学顕微鏡下における可 視化が実現できた。しかし CNT からの蛍光強度は比較 的弱く、水中における操作を念頭に置いた場合、課題を 残していた。そこで今年度は当初の予定通り、界面活性 剤である Tween20 を用いた蛍光修飾法を京都大学吉 村グループとの連携によって新たに開発した。プロトコル の最適化を行った結果、右図に示すように非常に明るい



図 15. 水中における CNT の暗視野像 (a,c)と蛍光像(b,d)

CNT の蛍光標識に成功した(図 15)。蛍光標識率は 95%と非常に高く、CNT の直径、長さに依存しないことが明らかになった。

7.2-4 CNTと生体分子の相互作用の検証

CNT 表面と生体分子の相互作用を実験的に検証するために、CNT 側面にミオシン分子を吸着 させ、その活性をアクチンフィラメントの滑り運動から評価した。

CNT にミオシン分子を添加し、過剰なミオシン分子を除去した後、ガラス上に CNTーミオシンを 配置した。その後アクチンフィラメントを添加すると CNT 上を滑り運動するアクチンフィラメントが観

察された(図 16)。このときの滑り速度は CNT を用いない場 合と同等であったため、ミオシン分子の活性を保ったまま CNT 上でアクトミオシン滑り運動を再構成することに成功した。 この結果は、CNT のタンパク質の親和性を間接的に示すも のであり、タンパク質1分子の熱計測を行う際に重要な知見と 言える(業績原著論文 7)。

7.2-5 CNTの自作

熱量計測用の CNT は一般的に用いられるものとは違い、結晶性の良さ、十分な長さ(数〜十数 µm)、分離性の良さ、などの条件が必要となる.結晶性の良さでは CVD 法ではなく、アーク放電法が有利であるが、短い CNT となってしまう.今までに当グループではアーク放電法による条件設定により、数 µmの CNT の作製に成功している.今後、さらなる条件検討により、10µmレベルの CNT の製作を目指す.

actin filaments

7.2-6 CNT、CNTT の溶液中における物性計測

溶液中における CNT、カーボンナノテストチューブ

図 16. CNT 上を滑り運動するアク チンフィラメント

(CNTT)の物理計測として、水溶液中における拡散運動を計測した。拡散運動はCNTの長軸、短軸、回転方向に分離し、各成分を理論値と比較検討を行った。その結果、高粘度水溶液において、 回転拡散運動は理論値をよく再現するものの、長軸、短軸方向の拡散運動が従来の理論では説 明がつかないことが明らかになった。この実験を行った溶液粘度は生体内(細胞内)と同程度の粘 性溶液(水の10倍程度)であり、熱量計測時における振動型センサを用いた場合に導入する実験 補正項の必要性を示唆するものである(業績原著論文5)。この現象はこれまでの流体論では説明 できないため、現在、新たな理論モデル構築も視野に入れ、理論的考察を継続している。

7.2-7 CNT 熱伝導の評価

水中において水平配向した CNT シートの熱伝導評価を行った。本年度は特に電気的検出を重 点的に行った。そのために、ガラス基板に5µmの金電極を作製し、金電極上にシート状に配向し た CNT を架橋させた(図 17)。このと き、シート状 CNT を金電極に密着さ せるため、アルコールに含浸させた後、 大気中において 50℃程度の低温でア ニールした。その結果、水中において も比較的安定に測定を行うことが可能 となった。このようにして得られた CNT シートの電気抵抗を水中において測 定した結果、温度に依存して電気抵 抗が変化することが明らかになった。さ らに、CNT シートの電気抵抗変化は 温度に対して速やかに応答し(図 17 下)、熱源として用いたレーザー照射



図 17 ガラス上にパターニングした金電極に架橋した CNT シ ート(上図)とレーザー照射時における電気抵抗変化(下図)

のタイミングに同期して変調(減少)することが明らかになった。しかし、熱源からの距離(レーザー スポットからの距離)に対して定量的なデータは得られていないこと、速やかに応答を追従できるだ けの測定ができなかった等問題点がある。そこで、今後の課題として以下のことを重点的に実施す る予定である。

① 定量的な測定を目的とした測定システムの改善

② 速やかな電気抵抗変化に追従可能な測定プログラムの構築

③ 1 本の CNT を対象とした電気抵抗測定

④ CNT の蛍光強度変化と電気抵抗の関係について

①は測定機器の選定や電極形状の改善を行う。

②については現在プログラムの構築を行っている。

③は昨年度までに開発した誘電泳動による CNT 操作技術を用いて、金電極に架橋した CNT を 対象に実施予定である。

④は昨年度実施した CNT の熱的性質を蛍光強度変化から算出する方法と組み合わせる。本年 度実施した電気抵抗測定を同時に測定する系を構築することで、熱伝導率を実験的に算出するこ とが可能となる。

7.2-8 細胞の発熱計測のためのバイメタル型センサ

一方で、具体的に熱計測システムを構築してみようということで、図 18 に示すような構想で、実際に細胞の熱を計測するデバイスを作製した。

液中で褐色脂肪細胞(発熱量>nJ)単一の熱計測が 可能な変位型のカンチレバーセンサの作製に取り組ん だ。長さが 500µm ~1mm で、厚さが 250 nm~300 nm の超薄型のバイメタル構造にし、変位型としては極



図 18 カンチレバー近傍の細胞の発する 熱を吸い取り温度を計測する構想図 限まで薄く、大きな変位を得るため長くあり つつ可能なレベルまで熱容量を下げたプロ ーブを作製した。熱感度は溶液中では計算 上では nJ であり、褐色脂肪細胞などの発 熱細胞のモニタリングには十分応用できる。 変位を計測するためのミラー部はレーザー 光による発熱の影響を下げるため、熱的に 分離するなど、工夫してある。

この変位型熱センサを用い、褐色脂肪細胞が産生する熱量の測定を行った。ポリプロピレンに付着させた複数個の細胞を、固定した長さ750µmのカンチレバーに近づけ、カンチレバー先端の変位を顕微鏡で直



図 19. 細胞の産生熱検知によるカンチレバーの変位

接観察した(図19)。カンチレバーは、熱を検知すると+y方向へ変位するよう設置した。ノルエピネ フリン刺激により発熱している細胞をカンチレバーに近づけたところ、約130nmの変位が計測され た(図19、赤のトレース)。その後細胞を遠ざけると、カンチレバーの初期位置への復元が観察され た。カンチレバーから環境への熱の逃げがないモデルに基づくと、この変位はカンチレバーが約 11nWの熱量を受けていることに相当する。この値は、昨年度に行った、105 オーダーの細胞から 見積もった発熱量(約 10nW/個)とも合致している。今後、より長い変位型熱センサや、現在作製 中の真空封止型および真空暴露型伝熱センサを用いることで、より発熱量の小さい細胞の熱計測 や、細胞内の局所的熱計測が可能となる。細胞を用いた様々な産生熱計測を行う見通しが立っ た。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

秋田 G

- S. Fukami, T. Arie, and S. Akita, "Temperature Dependence of Cantilevered Carbon Nanotube Oscillation", Japanese Journal of Applied Physics, 49, pp.06GK02-06GK02-4, 2010 (DOI: 10.1143/JJAP.49.06GK02).
- S. Sawano, T. Arie, and S. Akita, "Carbon Nanotube Resonator in Liquid", Nano Letter, 10, pp.3395-3398, 2010 (DOI: 10.1021/nl101292b).

- S. Sawaya, T. Arie, and S. Akita, "Diameter-dependent dissipation of vibration energy of cantilevered multiwall carbon nanotubes", Nanotechnology, 22, No.16, pp.165702, 2011 (DOI: 10.1088/0957-4484/22/16/165702).
- A. Yoshinaka, T. Arie, and S. Akita, "Sustained Mechanical Self-Oscillation of Carbon Nanotube Cantilever by Phase Locked Loop with Opto-Mechanical Heterodyne", Applied Physics Letter, 98, pp.133103, 2011 (DOI: 10.1063/1.3572031).

吉村 G

5) Shige H. Yoshimura, S. Khan, H. Maruyama, Y. Nakayama and K. Takeyasu, "Fluorescence labeling of carbon nanotubes and visualization of a nanotube-protein hybrid under fluorescence microscope", Biomacromolecules, **12**, No.4, pp.1200-1204, 2011 (DOI: 10.1021/bm101491s)

石島 G

- 6) A. Ishijima, H. Fukuoka, and Y. Inoue, "Verification of Single-Molecule Imaging and Single-Molecule Measurements", Journal of Robotics and Mechatronics, 5, pp.568-578, 2010 (DOI なし).
- 7) K. Okuro, K. Kinbara, K. Takeda, Y. Inoue, A. Ishijima, and T. Aida, "Adhesion Effects of a Guanidinium Ion Appended Dendritic "Molecular Glue" on the ATP-Driven Sliding Motion of Actomyosin", Angew Chem Int Ed Engl. 49, pp.3030-3033, 2010 (DOI: 10.1002/anie.200906139).
- M. Toda, T. Ono, F. Liu, and I. Voiculescu, "Evaluation of bimaterial cantilever beam for heat sensing at atmospheric pressure", Review of Scientific Instruments 81, pp.055104, 2010 (DOI: 10.1063/1.3397320).
- M. Toda, N. Inomata, T. Ono, "Ultra-high sensitive bimorph cantilever manipulated by focused laser", IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines, (in press).

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)