

解 説

# マイクロナノセンサを用いた細胞の温度計測

猪股 直生

東北大学大学院工学研究科

(受取日: 2023年7月22日, 受理日: 2023年9月15日)

## Temperature Measurements of Cells using Micro/nanosensor

Naoki Inomata

Graduate School of Engineering, Tohoku University

(Received July 22, 2023; Accepted Sep. 15, 2023)

The fundamental principles of cells have not been clarified; however, we can follow biological phenomena inside cells by the temperature changes resulting from always-occurred intercellular biochemical reactions. The temperature sensing techniques for single cells are powerful tools for this purpose. This paper introduces micro/nano-temperature sensors using nanoparticle thermometers and microfabricated sensors, unique temperature signals from cells observed using microfabricated sensors, and evaluations of cellular thermophysical properties. Especially, the microfabricated thermometers and their applications to single-cell analysis are focused. These sensors, which have the advantages of high resolutions on temperature and time, could achieve the dynamic measurements of cellular temperature changes, then observed the periodic pulse heating, the temperature fluctuation and its frequency spectra, and temperature increase in local heating. Moreover, we obtained the cellular thermal conductivity and specific heat capacity via the dynamic temperature measurements in local heating. These thermophysical properties significantly depended on the surrounding temperature and frequency of local heating. These results show that cells have unknown functions and phenomena, and continuous developments of sensing technologies have important roles in clarifying the fundamental principles of cells.

Keywords: temperature sensor, microfabrication, microsystem, high sensitivity, cell

### 1. はじめに

本題に入る前にまず、細胞の発熱や温度を測ることの意義について説明する。「発熱」と聞いて、どのような場面を思い浮かべるだろうか。多くの人々の場合、風邪をひいた時など体調不良時の発熱であろう。これは体内に入り込んだ異物への免疫反応の結果として体温が上昇したもので、生体の恒常性維持機構の一つである。恒常性は免疫のみでなく、体温、血圧、創傷の修復など生体機能全般に及ぶ。体温は体調不調時に高くなるのみでなく、通常時においても恒常性が発揮されている。哺乳類に代表される内温性動物は、外部環境がどのようであっても体温が厳密な範囲内に保たれている。

そもそも、一般的に「温度」は「熱」の結果である。直接計測をすることが難しい「熱」は、直接計測が可能な「温度」を介して計測または推定される。生体や細胞にとって温度は結果のみならず、トリガーとしての役割も果たす。我々の行動も意識的無意識的問わず、外部温度に大きく影響される。暑ければ汗をかき、寒ければ震えるような身体的な応答のみでなく、気温によって快不快を感じる等、心的にも影響を受ける。温度は、細胞規模から身体規模まで生体に対して様々な影響を与え、その応答や生理機能を決定づける重要なパラメータである。そのため、温度を軸とした生命現象の統合的理解を目指す「温度生物学」という学術分野が近年認知されている。生体の外部因子に対する

応答、情動や体調不良の原因を突き詰めると、生体を構成する最小単位のシステムである細胞にたどり着く。生体が一つのシステムとして成立しているのと同様に、細胞も外部環境の影響を受けて、一つのシステムとして応答する。そのため、生体システムの完全な解明には細胞の根本的な理解が欠かせない。細胞内では、生化学反応の吸発熱の結果として温度変化が生じる。温度が全てというわけではなく、もちろん他のパラメータの影響も考慮すべきであるが、生化学反応が細胞活動の主な律速であるとすれば、その生化学反応の結果としての温度や熱を計測することを介して細胞の応答をモニタリングすることは妥当である。細胞の熱・温度現象を解明することは、生体の根本的理解に直結するといっても過言ではない。近年、計測技術の発達に伴い単一細胞の温度計測が可能になり、様々な知見が得られている。しかし、細胞の熱的特性に関して明らかになっていないことも多く、熱伝導率や比熱といった基本的な物性でさえも未だに明らかになっていない。特に、 $10^5$ 問題が代表的である。これは、細胞一つの温度変化の実験値は $0.1\sim$ 数 $^{\circ}\text{C}$ であるが、細胞一つ当たりの発熱量の実験値である数  $\text{pW}\sim$ 数  $\text{nW}$  から予想される温度変化を計算すると $10^{-5}\text{^{\circ}\text{C}}$ 程度になり、温度変化の実験値と計算値の間に $10^5\text{^{\circ}\text{C}}$ の差が生じる問題で、長年議論が続いている。<sup>1-3)</sup>

本稿では、細胞レベルでの熱・温度現象の理解や解明のために活躍する単一細胞の温度計測技術と、近年観測された細胞の熱的な挙動や熱物性の評価を紹介する。本稿で取

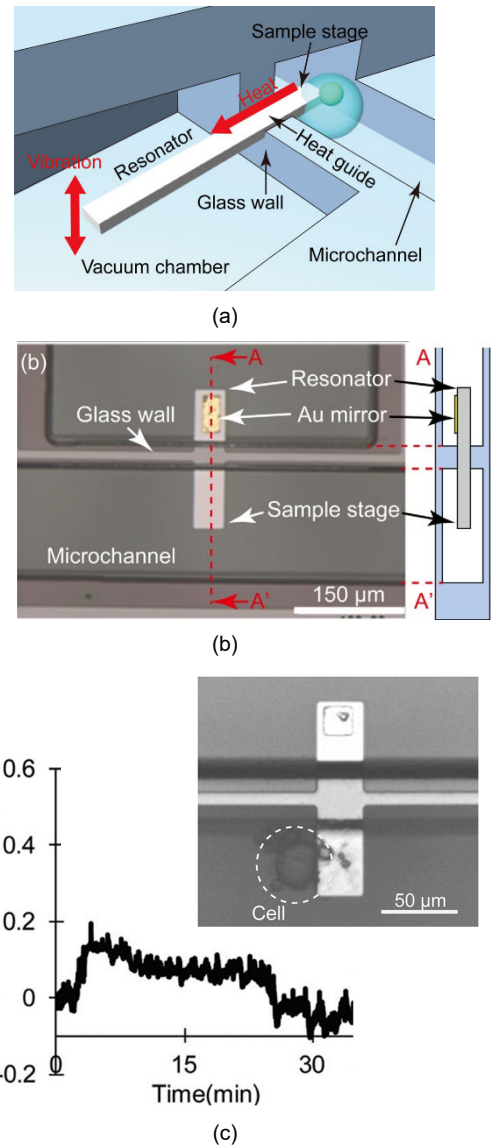
り上げるセンサは「ナノ粒子温度センサ」と「微細加工技術を用いて作製された温度センサ」に大別される。各々特徴があるが、共通点は「センサのサイズが小さいこと」である。細胞一つの温度を計測するためのセンサは、計測対象に対して十分サイズが小さい必要がある。細胞のサイズは種類によって異なり、小さいものは数  $\mu\text{m}$  から、大きいもので  $100 \mu\text{m}$  程度である。計測対象に対してセンサのサイズが大きい場合、熱容量の関係で計測対象の温度を計測することは難しい。例えば、雨粒一つの温度を体温計で測ることはできない。センサである体温計の熱容量が雨粒のそれよりも圧倒的に大きいため、本来計測したい雨粒の温度は体温計の温度と同じになってしまう。センサのサイズが小さければ熱容量も小さくなり、微小な計測対象の温度計測が可能になる。センサの熱容量が小さければ、測定対象の微小は温度変化に対応できる。つまり、センサは高感度になり、温度分解能も向上する。

## 2. ナノ粒子を用いた細胞の温度計測技術

2010年代前半、蛍光ポリマーのナノ粒子を生きた細胞内に取り込ませ、細胞内の温度分布を可視化する手法が発表された。<sup>4)</sup> これを機に単一細胞の温度計測に関する研究が急激に進んだ。この蛍光性ポリマーは、温度感受部、親水部、蛍光部で構成されており、蛍光部の特性はその周囲の水分子の有無に依存する。低温時はポリマー構造内に水分子が入り込んでいるため、ポリマーの蛍光は弱い。一方、温度が高くなると、温度感受部の疎水作用によってポリマーの構造が小さく丸くなり、内部の水分子が少なくなる。その結果、蛍光部は強い蛍光特性を示すようになる。粒子の直径は約  $200 \text{ nm}$  であり、細胞内部の温度を満遍なく可視化することが可能である。この細胞内温度マッピングの結果より、細胞内の温度分布が一様ではなく、特に核内の温度が細胞質より高温であること、細胞内で局所的に温度が高い箇所があること等が報告された。このセンサの温度分解能は  $0.18 \text{ }^\circ\text{C}$ 、応答時間は  $2\sim3$  秒である。蛍光ポリマーの他にも、有機化合物（蛍光色素）、蛍光タンパク質、無機物粒子（量子ドットやナノダイヤモンド）が細胞内部の温度計測に用いられる。<sup>5)</sup> ナノ粒子の違いはあるが、計測原理は蛍光特性やフォトルミネッセンス特性の温度依存性を用いた光学的な計測原理である。温度分解能は  $0.1\sim0.7 \text{ }^\circ\text{C}$ 、応答時間は早いもので数十  $\text{ms}$  秒オーダーである。この光学的な手法は光子の蓄積を計測原理としているため、温度分解能と時間分解能がトレードオフの関係にあり、それらの両立はいずれの蛍光ナノ粒子を用いても非常に困難である。

## 3. 微細加工技術で作製したセンサを用いた細胞の温度計測技術

蛍光ナノ粒子温度センサを用いた細胞の温度計測が発表された時期は2010年代前半であるが、それよりも前から微細加工技術で作製したセンサを用いた単一細胞の温度計測は行われていた。<sup>6,7)</sup> 作製方法や計測系の容易さ、温度分解能の観点から、電気的なセンサである熱電対やサーミスタが多用される。これらのセンサを計測対象の細胞に接することで細胞の温度を計測する。前章の蛍光ナノ粒子温度センサとは異なり、満遍なく設置することはできず、センサと細胞が接した部分の温度のみを計測することしかできないが、高い温度分解能と速い応答速度が特徴である。 $\text{Si}_3\text{N}_4$  薄膜上に作製した  $\text{Ni}$  と  $\text{Au}$  の熱電対アレーを用いて、マウス肝細胞1個を過酸化水素水で溶解させた時の温度変化を計測した報告がある。<sup>6)</sup> このデバイスの温度分解能と応答速度は各々  $0.125 \text{ m}^\circ\text{C}$ 、 $12 \text{ ms}$  秒であった。ナノニードル



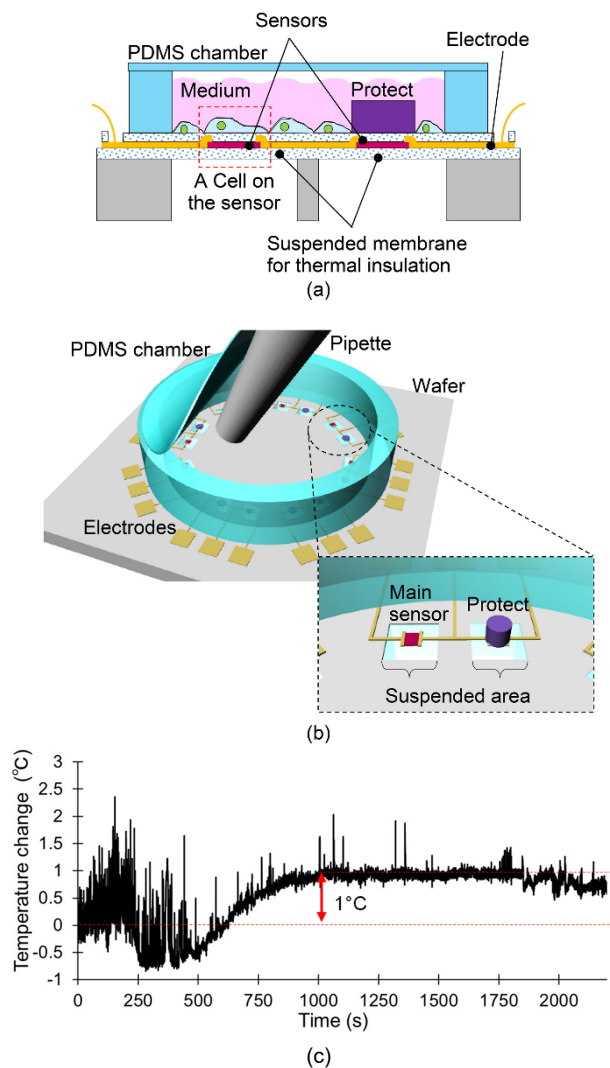
**Fig.1** Schematics of the mechanical resonant thermal sensor packaged in a microfluidic chip (a),<sup>8)</sup> optical microscope image of the fabricated device (b),<sup>8)</sup> and the result of cellular temperature monitoring with stimulating (c).<sup>8)</sup> The inset in (c) shows a single cell attached to the sensor.

型の熱電対を細胞に突き刺して、細胞内部の温度を計測した報告もある。<sup>7)</sup> 先端直径  $500 \text{ nm}$  ほどのナノニードル表面にタングステンと白金の熱電対を形成し、ヒト腫瘍細胞に刺して、薬液刺激前後での細胞の温度変化を計測した。温度分解能は  $0.1 \text{ }^\circ\text{C}$  となっている。

電気的手法の他、機械振動子（片持ち梁や両持ち梁）の共振を用いて温度を計測するセンサもある。共振温度センサは構造体の機械的な共振周波数の温度依存性を計測原理としており、センサとなる構造体の温度によって、その共振周波数が変化する。電気的手法（熱電対やサーミスタ）と比較して作製工程が複雑であり、2次元平面上では利用できないが、温度分解能が優れている。ただし、機械振動を用いて温度を計測しており、振動減衰を生じさせないために真空中で使用する必要がある。共振温度センサに必須の真空環境と、細胞が生きるために必須の溶液環境は本来相容れない。しかし、我々は共振温度センサの高い温度分解能を活かして、細胞の温度計測を行った。<sup>8)</sup> マイクロ流体チップ中に、細胞を流すマイクロ流路と共振温度センサを設ける真空領域を形成してセンサ（片持ち梁）を溶液中か

ら隔離し、かつその周囲を真空中に維持した。流路と真空領域は隔てられているが、流路に突き出した細胞捕捉用ステージと真空領域中の温度センサはつながっており、ステージ上の細胞からの発熱をセンサに伝達する。センサは真空中にあるので、振動減衰なく、さらに真空による断熱効果により、高感度で温度変化を検出できる (Figs.1(a), 1(b))。そのデバイスを用いて、脱共役剤による薬液刺激した褐色脂肪細胞の温度を計測したところ、緩やかに温度が 0.1 °C 上昇し、発熱は 20 分間続いた (Fig.1(c))。これはバルク計測、蛍光温度センサ、先の熱電対アレーセンサで観測されている発熱現象と同様のもので、<sup>4,5,7,10)</sup> このデバイスが細胞からの発熱を観測できていることを証明している。このセンサデバイスの温度分解能は 1.6 m°C、応答速度は 0.1 秒以下であった。なお、真空領域とマイクロ流路を隔てる壁面への熱の逃げは壁の厚さに依存し、本測定で用いた壁厚 10 μm で伝熱効率は 57% であった。<sup>8)</sup> ほぼ同程度のサイズの両持ち梁を用いると、温度分解能は 79 μ°C まで向上する。<sup>11)</sup>

マイクロ流路を用いて細胞を操作する場合、計測対象は細胞懸濁液、つまり浮遊細胞が主となる。しかし本来細胞が単一で存在することは稀で、多くは細胞同士が密に隣り合った状態であり、これは培養状態の細胞に近い。そのため、浮遊薄膜上のサーミスタを複数、その上面にポリマーによる培養チャンバを設けることで、センサアレー上にて

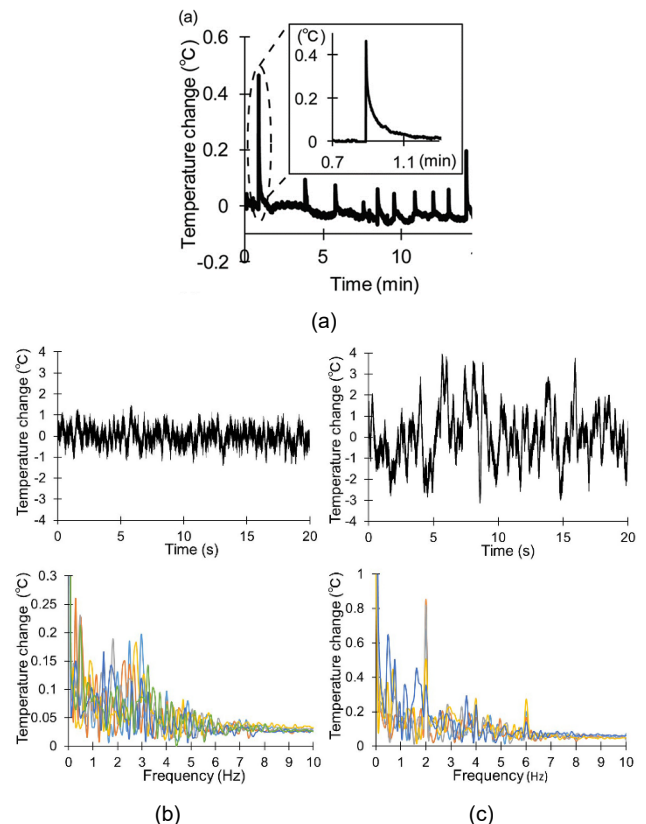


**Fig.2** Schematics of the VO<sub>2</sub> micro-thermistor device from the side view (a) and overall view (b),<sup>12)</sup> and detected temperature change in the FCCP-stimulated COS7 cell (c).<sup>12)</sup>

細胞培養を可能にしたデバイスを作製して、細胞の温度変化の計測を行った。<sup>12)</sup> 浮遊薄膜構造による断熱は真空環境と比較すると効果は低減するが、サーミスタとして酸化バナジウム (VO<sub>2</sub>) を用いた (Figs.2(a),2(b))。サーミスタの材料として一般的である Pt (抵抗温度係数:0.4 %/°C) よりも大きい温度係数-1.65 %/°Cを有しており、このデバイスの温度分解能は 1.3 m°Cであった。計測に用いた細胞は COS7 細胞で、前章の蛍光温度センサでも用いられる細胞である。細胞をディッシュに培養するプロトコルと同様の手順でセンサアレー上に細胞を培養し、細胞の温度を計測した。本デバイスでは、細胞の操作や捕捉機構はなく、培養の結果偶発的にセンサ上に位置した細胞を計測対象とした。測定前に光学顕微鏡で細胞の位置を確認し、細胞1つがのったセンサを計測に用いた。脱共役剤で薬液刺激した場合、緩やかに、最終的に 1°C 温度が上昇した (Fig.2(c))。この緩やかな温度上昇は従来の報告と同様で、デバイスが細胞一つの発熱を捉えられていることがわかる。

#### 4. 微細加工温度センサで観えた細胞の温度信号

微細加工温度センサの場合、前述の通り薬液刺激に代表される既知の熱産生現象を計測することが多い。微小センサの動作確認は容易ではなく、既知の発熱現象の再現性による動作確認が最も容易で確実なためである。ここでは、薬液刺激による応答とは異なる細胞の温度信号を紹介する。まず、前述の機械共振を用いた温度センサを用いた褐色脂肪細胞の温度計測において、薬液刺激をしない状態での細胞の温度を、100 m 秒のサンプリング時間でモニタリングしたところ、時折急峻な温度上昇を観測した (Fig.3(a))。これは、従来の計測手法 (バルク計測、蛍光温度センサ) で



**Fig.3** Temperature changes in a series of pulses observed from a non-stimulated BFC (a),<sup>8)</sup> temperature change as function of time (top) and frequency (bottom) of a COS7 cell at 25 °C (b) and 37 °C (c).<sup>12)</sup> The colored lines in (b)(c) mean the results in different samples.

も確認されていない現象であった。この現象は立ちあがりから定常状態に戻るまで 0.3 秒程度であり、蛍光ナノ粒子温度センサの応答速度では検知できていなかったものと思われる。なお、この急峻な熱現象は、共振温度センサを PN ダイオードサーミスタに置き換えた同様の計測デバイスを用いた場合でも観測されており、<sup>13)</sup> 褐色脂肪細胞由来の信号であると言える。しかし、この現象の原因や由来は未だ明らかにできていない。

また、前述の VO<sub>2</sub> サーミスタを用いた COS7 細胞の温度計測において、細胞の薬液刺激しない状態での温度変化を、25 °C と 37 °C の環境温度で各々計測（サンプリング時間：0.2 m 秒）した結果を Figs.3(b), 3(c) 上方に示す。25 °C 時の温度揺らぎに対して、37 °C の温度揺らぎは大きい。いずれの場合も平均をとれば約 ±0 °C の温度変化であり、時間分解能が充分でない温度センサで計測しても、この温度揺らぎは得られない。この計測はいわば自己発熱による温度変化を観測したものであり、37 °C の方が 25 °C の時よりも活発な発熱活動が生じていることになる。この時間ドメイン信号を、高速フーリエ変換を用いて周波数ドメイン信号にしたものが Figs.3(b), 3(c) 下方である。いずれの環境温度の場合も特に 5 Hz 以下の周波数帯域の強度が大きくなっていった。更に、環境温度が 37 °C の場合、同帯域の信号強度が全体的に大きくなり、特異的に強度が大きい周波数も散見された。これは細胞の自己発熱信号がある周波数成分を有していることを意味する。細胞の発熱現象の主な要因は生化学反応であることから推測するに、細胞内で発生している生化学反応に周期性があり、それが観測された可能性を示唆している。

### 5. 細胞の熱物性評価

マイクロサーミスタを用いた細胞の温度計測と集光赤外線レーザーによる細胞の局所加熱を組み合わせることで、細胞の熱物性を求めることが可能になる。<sup>14,15)</sup> 熱伝導率の定義式は、

$$\text{熱伝導率 } \alpha \left( \frac{\text{W}}{\text{mK}} \right) = \frac{\text{入力熱 } W(\text{W}) \cdot \text{長さ } L(\text{m})}{\text{温度変化 } \Delta T(\text{K}) \cdot \text{断面積 } A(\text{m}^2)} \quad (1)$$

と表すことができる。 $\Delta T$  は定常状態での飽和温度上昇値であり、静的な細胞の温度計測でも求めることができる。一方、熱伝導率または比熱と計測対象の次元から各々熱抵抗と熱容量を得ることができる(式(2)(3))。

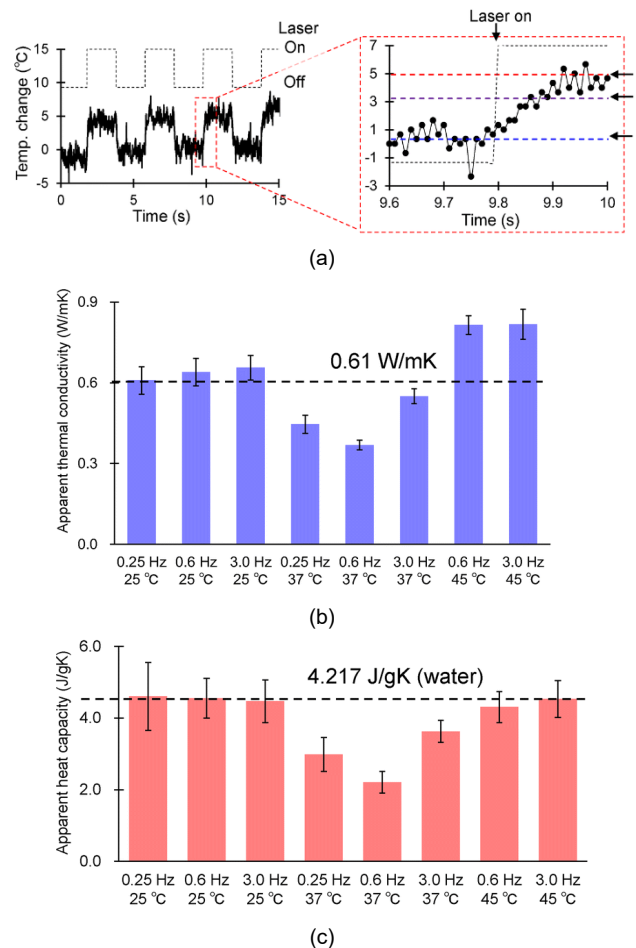
$$\text{熱抵抗 } R \left( \frac{\text{K}}{\text{W}} \right) = \frac{\text{長さ } L}{\text{熱伝導率 } \alpha \cdot \text{断面積 } A} \quad (2)$$

$$\text{熱容量 } C \left( \frac{\text{J}}{\text{K}} \right) = \text{比熱 } c_p \cdot \text{密度 } \rho \cdot \text{体積 } V \quad (3)$$

さらに熱抵抗と比熱を乗じることで時定数となる(式(4))。

$$\text{時定数 } \tau(\text{s}) = \text{熱抵抗 } R \left( \frac{\text{K}}{\text{W}} \right) \cdot \text{熱容量 } C \left( \frac{\text{J}}{\text{K}} \right) \quad (4)$$

時定数は静的な温度計測では得られず、動的な温度計測、つまり優れた時間分解能での温度計測が必要になる。環境温度を変えると細胞一つの温度上昇に必要な時定数よりもゆっくりとした温度変化になるため、細胞の熱的な時定数を得るには細胞一つを瞬間的に加熱する必要がある。そこで用いたのが集光 IR レーザである。赤外線は水によく吸収され、主に水で構成される（とされている）細胞も同様である。なお、短時間での加熱の場合、センサ構成材料と水の熱物性の違いから、センサの方が水より応答が速いため、周囲の水へ熱が拡散する前に挙動を検知することができる。本計測デバイスは石英基板上に設けたマイクロサーミ



**Fig.4** Measured temperature change in the COS7 cell at a surrounding temperature of 37 °C under local irradiation with the IR laser at 0.25 Hz (a),<sup>14)</sup> and variation of thermal properties of the cells with changing the surrounding temperature and laser irradiation frequency: thermal conductivities(b) and heat capacities (c).<sup>14)</sup> the red, purple, and blue dot-lines mean the saturated temperature, temperature for time constant, and base temperature, respectively.

スタ上に乗った COS7 細胞に対し、対物レンズを通して集光した IR レーザを基板下方から照射できるよう作製された。細胞が接着している基板下方から IR レーザを照射することで、培養液を介して吸収されることなく、細胞を加熱することができる。光学チョッパーを用いて機械的に IR レーザの on/off を行った。計測例として、環境温度 37 °C、細胞への IR レーザ照射周波数 0.25 Hz における細胞の温度変化と一部の拡大を Fig.4(a) に示す。飽和温度上昇値とそれに至るまでの温度変化が動的に観測できていることがわかる。これらの実験結果をもとに熱伝導率と比熱を計算することができる。細胞の熱挙動を追うには遅くとも 100 m 秒以下のサンプリング時間が必要であり、今回は 10 m 秒とした。細胞の熱物性は、環境温度 25, 37, 45 °C、レーザーによる局所加熱周期 0.25, 0.6, 3.0 Hz の条件下で COS7 細胞の温度応答を計測し、算出した。その結果を Figs.4(b), 4(c) に示す。環境温度が 25 °C の場合、IR レーザ照射周波数に関わらず、熱伝導率と比熱は 0.6 W m<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>、4.2 J g<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> となった。37 °C の場合、それらの値は照射周波数によって異なるものの、いずれの場合も水 (0.61 W m<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) よりも小さい値になった。45 °C では、比熱は 4 J g<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> と水 (4.2 J g<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) と同程度の値になった一方で、熱伝導率は 0.75 W m<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> となった。

環境温度 37 °C にて、細胞の熱伝導率が水よりも小さく

なったことは、従来研究でも同様の結果が示されている。<sup>16-19)</sup> 細胞の構成成分は水 65 %、タンパク質と脂質が各 15 %程度とされている。一般的に、タンパク質と脂質は水よりも熱伝導率が小さいため、それらの混合物である細胞の熱伝導率が水よりも小さくなることは妥当であると言える。IR レーザ照射周波数による違いは従来研究で報告はない。この理由を考える。ここで Fig.3(c)の 37 °Cにおける細胞自身の発熱による温度信号の周波数スペクトルに着目すると、信号強度の大きい周波数が確認できる。<sup>12)</sup> この周波数の時、細胞内で熱に関わる何かしらの現象が発生しており、それが細胞の熱伝導率に影響を与えたと推測している。細胞内にて特定の周期で発生している生体的な反応を意図的に誘発することによって発現した現象や高分子が熱を散乱するナノ境界として熱の移動を妨げたと考えている。しかし、断熱機構が働くのであれば、比熱の値は大きくなるはずであるが、25 °C時や水の比熱の値よりも小さくなった。一方、本来起こるべき細胞の生体反応に対して外部加熱による熱的な補償が影響を与える程度については評価できていないことを留意する必要がある。

環境温度 25 °Cにおいて、細胞の熱物性は水と同程度であった。前述の通り、細胞は水、タンパク質、脂質の混合物である。水と同程度の熱物性になったということは、水以外の物質の影響が極端に小さくなったことを意味するが、それらが 25 °Cで分解された、消滅したとは考えられない。一方、細胞の熱計測において、化学固定という方法を用いて熱的に不活性（いわば死んだ状態）の細胞の状態を作り出すことがある。化学固定は細胞内の分子を固定して、細胞の外形は保ったまま、本来の細胞の機能を失わせた状態である。そして、この化学固定により熱的に不活性になった細胞熱伝導率が水のもと同程度になったという報告がある。<sup>17,19)</sup> これは、細胞の中身の存在はそのままでも、分解や消失せずとも、不活性状態の細胞の熱伝導率が水と同程度になったということである。つまり、細胞内の水分の影響が支配的になって水と同程度の熱伝導率になったわけではなく、様々な事由が重なった結果、水と同程度の値になったと考えている。これまで熱的に不活性にするには化学固定が主流な方法であったが、今回の結果、環境温度 25 °Cでの熱物性が水と同じになった結果は、細胞内を不自然な状態にしてしまう化学固定を用いずとも温度を下げるだけで熱的に不活性な状態を得られることを示唆している。

45 °Cという環境温度は細胞にとって生存が危ぶまれる温度であり、熱伝導率を上げることでスムーズな放熱を図る機構が働いたと予想される。同様の結果と考察は文献(15)でも行われている。式(4)より、比熱が一定でも熱伝導率が大きくなれば時定数が小さくなる、つまり放熱されやすくなるので、Fig.4 の 45 °Cにおける熱伝導率と比熱の結果は熱的に妥当である。併せて、比熱の値も小さくなれば、より効率的な放熱が期待できたが、それは確認されなかった。

しかし、これらの原因を解明するには、細胞内部の解析、特に含有物質の割合や配置に関する解析が必要になるため、細胞内部のリアルタイム成分分析など別の手法による検討が必要である。

## 5. まとめ

本稿では、単一細胞の温度計測に使用される計測技術を、微細加工技術を用いて作製されたマイクロ温度センサを中心に紹介した。なお、ナノ粒子による温度計測手法と微細加工温度センサのどちらが優れているというわけではなく、各々長所が各々の短所をカバーするような特徴を持っている。現状では、動的な温度計測と言う視点ではマ

クロ温度センサに利があり、従来からの主流な手法であるナノ粒子法では報告のない細胞の温度信号の観測に成功している。なお、細胞一つの比熱が明らかになったのは、これが初めてである。以上のように、細胞の原理解明以前に、熱的温度的現象に限らず、観測できていない未知の現象があることが予測できる。センシング技術の絶え間ない発展が必要であることは間違いない。

## 謝 辞

研究の一部は、JSPS 科研費 JP20H02588 および JST さきあげ JPMJPR22E1 の助成を受けたものである。

## 文 献

- 1) G. Baffou, H. Rigneault, D. Marguet, and L. Jullien, *Nat. Methods* **11**(9), 899-901 (2014).
- 2) M. Suzuki, V. Zeeb, S. Arai, K. Oyama, and S. Ishiwata, *Nat. Methods* **12**(9), 802-803 (2015).
- 3) S. Uchiyama, C. Gota, T. Tsuji, and N. Inada, *Chem. Commun.* **53**, 10976-10992 (2017).
- 4) K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, and S. Uchiyama, *Nat. Commun.* **3**, 705 (2012).
- 5) K. Okabe, R. Sakaguchi, B. Shi, and S. Kiyonaka, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **470**, 717-731 (2018).
- 6) E. A. Johannessen, J. M. R. Weaver, L. Bourova, P. Svoboda, P. H. Cobbold, and J. M. Cooper, *Anal. Chem.* **74**(9), 2190-2197 (2002).
- 7) C. Wang, R. Xu, W. Tian, X. Jiang, Z. Cui, M. Wang, H. Sun, K. Fang, and N. Gu, *Cell Research* **21**, 1517-1519 (2011).
- 8) N. Inomata, M. Toda, M. Sato, A. Ishijima, and T. Ono, *Appl. Phys. Lett.* **100**(15), 154104 (2012).
- 9) B. Pettersson, *Eur. J. Biochem.* **72**, 235 (1977).
- 10) T. Yahata and A. Kuroshima, *Jpn. J. Physiol.* **32**, 303 (1982).
- 11) N. Inomata, M. Toda, and T. Ono, *Lab Chip*. **16**, 3597-3603 (2016).
- 12) N. Inomata, R. Inaoka, K. Okabe, T. Funatsu, and T. Ono, *Sensing and Bio-Sensing Research* **27**, 100309 (2020).
- 13) T. Yamada, N. Inomata, and T. Ono, *Jpn. J. Appl. Phys.* **55**(2), 027001 (2016).
- 14) N. Inomata, T. Miyamoto, K. Okabe, and T. Ono, *Lab Chip* **23**, 2411-2420 (2023).
- 15) N. Inomata, T. Miyamoto, K. Okabe, and T. Ono, *The papers of Technical Meeting on Sensors and Micromachines* **2023**, 33-36 (2023).
- 16) S. Sotoma, C. Zhong, J. C. Y. Kah, H. Yamashita, T. Plakhotnik, Y. Harada, M. Suzuki, *Science Advances* **7**(3), eabd7888 (2021).
- 17) P. Song, H. Gao, Z. Gao, J. Liu, R. Zhang, B. Kang, J.-J. Xu, and H.-Y. Chen, *Chem* **7**, 1569-1587 (2021).
- 18) R. T. ElAfandy, A. F. AbuElela, P. Mishra, B. Janjua, H. M. Oubei, U. Büttner, M. A. Majid, T. K. Ng, J. S. Merzaban, and B. S. Ooi, *Small* **13**(7), 1603080 (2017).
- 19) B. K. Park, N. Yi, J. Park, and D. Kim, *Appl. Phys. Lett.* **102**, 203702 (2013).



猪股 直生  
Naoki Inomata  
inomata.n@tohoku.ac.jp