

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656140

研究課題名（和文） 超微細 U 字管の創製と極限流体計測

研究課題名（英文） Development of U-shaped Microchannel for High Precise Fluid Measurement

研究代表者

新宅 博文 (SHINTAKU HIROFUMI)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：80448050

研究成果の概要（和文）：本研究では、ネガ型フォトリソとグレースケールリソグラフィを用いた微細加工技術を開発した。そして、加工技術の応用例として厚み変化を有する微小振動梁アレイを製作し、広帯域で機能する音響センサを提案した。また、本加工技術により製作できるポア構造を利用して電場集中を誘導し、低電圧の細胞の電気穿孔法を可能とし、高精度の電流計測から局所電場計測を可能にした。

研究成果の概要（英文）：We have developed a microfabrication technique for three dimensional structures using grayscale lithography and a negative photoresist. In this project, we demonstrated fabrication of micro beam array with non-uniform thicknesses for wide range frequency selectivity. We also applied the technique to develop a microdevice for low voltage electroporation using field focusing and demonstrated the measurement of local electric field exerted to the cells on the microdevice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：流体力学

科研費の分科・細目：マイクロ流

キーワード：流体計測，マイクロ流体，MEMS，微小流路，生体計測

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまで MEMS 技術を利用した流体デバイスを開発を行ってきた。その開発過程において、露光技術にクレイスケールマスクおよびネガ型フォトリソを導入することにより、一対の微小ホアと連結流路から成る特殊構造を比較的容易に製作できることを見出した。本特殊構造は、流体計測に用いられる U 字管と類似した構造を有しており、この MEMS-U を利用することで、Stokes 近似を基礎とした新しい極限流体計測原理の開発を目指した。

2. 研究の目的

本申請では、マイクロ・ナノ U 字管(以下、MEMS-U と記す)の創製と、これによる超微

細流体計測技術を提案した。MEMS-U は一対の微小ホア(縦穴)とそれらの連結流路から構成されており、当研究グループでは世界に先駆けてその大量生産ノウハウを確立した。この萌芽的基盤技術を発展させ、MEMS-U のさらなる高精度・高集積化を実現し、マイクロ・ナノスケール流動場の局所的な流速および電場の多点同時計測法を考案した。

以下では、MEMS-U の製作技術の深化を目的として実施した構造物の機械的・電気的特性について評価を行った結果について報告する。

3. 研究の方法

(1) 製作方法の検討

超微細 U 字管の製作技術であるネカタイプ型フォトリソグラフィを用いたクレイスケールリソグラフィの有効性について詳細に検討を行った。一般にネガティブ型のフォトリソグラフィは光透過性が高く、グレースケールリソグラフィには適さない。そこで、比較的透過性の低い短波長の UV 光を積極的に利用するため、中心波長 330 nm、幅 80 nm のバンドパスフィルタ (330WB80, OMEGA Optical) を UV 露光装置に導入した。これにより、レジスト表面から基板に向けて露光量の勾配を生じさせるようにした。ネガティブ型のフォトリソグラフィは露光および熱処理により現像液に対して不溶性になる材料であり、本方法を用いた露光により表面付近のフォトリソグラフィを不溶性にする一方で、基板付近のそれを溶解性のまま保持できる。これにより、フォトマスクを適切に設計することで一度の露光によりフォトリソグラフィ内部にマイクロ流路を製作することが可能である。また、同時にマイクロ流路表面にポア (孔) を製作することも可能であり、本構造を利用した様々な応用が期待される。ここではまず、本方法で製作できる構造の機械的特性を系統的に調査するために、様々な厚みを有する両持ち梁構造を製作した。

梁構造を製作するためのグレースケールマスクはガラス基板上に蒸着した非一様な厚みを有する金属薄膜を利用して製作した。ここでは、長さ 750 μm から 1500 μm および幅 100 μm ~ 600 μm の範囲で変化する 64 本の梁を 1.5 mm \times 30 mm の領域に集積化した構造を設計した。各梁に対応するグレースケールパターンは異なる光透過性を有しており、短い梁より長い梁に向けて 70 % ~ 13 % の範囲で変化する。また、比較のため全ての梁に対応する光透過性が 16 % 一定のグレースケールマスクも同時に製作した。

製作したグレースケールマスクを用いてデバイスの試作を行った。ここでは SU-8 3050 (MicroChem) を用いた。スピコートによりシリコン基板上に 500 rpm 5 s および 800 rpm 30 s の条件で 200 μm の SU-8 を製膜した。その後 95 $^{\circ}\text{C}$ で 60 min 間熱処理を施した。露光は前述のグレースケールマスクを介して 150 kJ/m^2 の条件で行った。その後、65 $^{\circ}\text{C}$ 1 min および 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min の条件で熱処理を施し、50 min 間 SU-8 developer (MicroChem) で現像した。

製作した梁の機械的特性について検討するため、共振周波数の計測を行った。ここでは、正弦波状の音波を印可し、それに対する振動振幅の応答を計測した。計測には Laser Doppler 振動計を用いた。ただし、計測に先立って、レーザー光の反射率を高めることを目的として梁表面には厚さ数 nm の Al 薄膜を蒸

着した。Al 薄膜の厚みは梁の厚みと比較して十分に薄く、それが振動特性に及ぼす影響は無視できる程度に小さいと考えられる。

(2) ポア構造を利用した細胞の電気穿孔法と電場計測法の開発

次に、開発した製作法に基づき、細胞の電気穿孔を目的としたマイクロテ・ハ・イスの開発を行った。ここでは、マイクロ流路とマイクロポア (孔) から成る構造を製作した。細胞を固定することを目的として、5 μm から 10 μm の直径を有するマイクロポアを製作した。マイクロポア用のパターンはグレースケールパターン上に光を透過しない円形のパターンを設けたものである。フォトリソグラフィの条件は基本的に前述と同様である。製作したマイクロデバイスを用いた細胞の培養系を構築し、マイクロポアを介してハ・ルス電圧を印可した際のイオン電流を計測した。具体的には製作したマイクロデバイス上面に細胞培養用の微小チャンバを設置し、マイクロポア上面側と下面側の両者を培養液で満たした。そして両者に電極を設置し、電極間に電圧を印可した。ここでは、幅 1 ms の双極性の矩形波を用い、1 秒間に 1 回ずつ合計 60 回矩形波を与えた。矩形波はファンクションシンセサイザ (NF Corp) を用いて発生させ、これをアンプ (NF Corp) で増幅させることで 0.5 ~ 7 V の信号を得た。また、電圧印可に伴う pH 変化を抑えるために、双極性の矩形波を用いた。電圧印可時には 10 Ω の抵抗をマイクロデバイスに対して直列に接続し、抵抗における電圧降下から、マイクロポアを通過する電流値の計測を行った。

実験に先立って、マイクロデバイス上には、HeLa, NIH3T3 あるいは Smooth muscle cell を培養した。細胞は 10 % FBS および 1% penicillin-streptomycin (Wako) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) を用いて 5 % CO_2 環境下で培養した。電気穿孔の可否については電気穿孔の直前に培養溶液中に溶解させた 10 mM の YO-PRO-1 (Life Technologies Japan) の蛍光を用いて評価した。YO-PRO-1 は細胞膜に対して非透過性であるが、電気穿孔により細胞膜の分子透過性が上昇すると、YO-PRO-1 が細胞内部に導入される。YO-PRO-1 は DNA と結合することにより、強い蛍光を示すため、細胞内部からの蛍光は膜穿孔により YO-PRO-1 が細胞内に導入されたことを意味する。ここでは、細胞からの蛍光輝度値が電圧印可前から比較して 10 % 以上の上昇を示した場合に電気穿孔に成功したと判断した。蛍光像の観察には倒立型光学顕微鏡 (Olympus) を用い、CCD カメラ (Olympus) によって撮影を行った。

4. 研究の成果

(1) 製作した梁構造の機械的特性の評価

まず、フォトマスクの光透過性と製作される梁構造の厚さの関係について検討した。製作した梁構造を Scanning Electron Microscope により観察し、その厚みを評価した。製作した 64 本の梁は $2.99\mu\text{m}$ から $142\mu\text{m}$ の範囲の厚みを有しており、一度のリソグラフィにより約 47 倍の厚み変化を与えられることが分かった。ただし、厚みの増加に伴い梁の固定端付近のコントラストが低下することも明らかになった。

次に製作した梁の振動特性を計測した。まず梁の軸方向に対する振動振幅の分布を計測した。振動振幅の分布から梁は主に曲げ振動をしていることが分かった。次に一次モードの共振周波数を計測した結果、64 本の梁を通して 11.5 kHz から 290 kHz の範囲で変化することが分かった。また、厚さ $18\mu\text{m}$ 一定で製作した梁と比較すると 10.9 倍の周波数帯域を有していることが分かった。Euler-Bernoulli 梁を仮定すると曲げ振動の共振周波数の帯域は厚さ変化により厚み一様の梁と比較して約 47 倍の拡大が期待されるが、実験結果ではそれを下回り 10.9 倍の拡大が得られた。この原因は、製作時に生じる梁内部の残留応力であると考えられる。本原因について、定量的に評価するために両持ち梁に加えて片持ち梁構造を製作した。片持ち梁構造は両持ち梁構造と比較して軸方向の拘束が無い場合、軸方向の残留応力が生じにくいと考えられる。ここでは、片持ち梁内部には残留応力が生じないと仮定し、片持ち梁の測定値から構造内部の音速を算出し、その値と、両持ち梁と片持ち梁の共振周波数の比較から残留応力を推算した。得られた残留応力は引張りであり厚み $13\mu\text{m}$ から $36.2\mu\text{m}$ の範囲において 5.74 MPa から 17.0 MPa で増加することが分かった。さらに、得られた残留応力を考慮して前述の両持ち梁における共振周波数を Rayleigh 法により再度評価すると、約 $80\mu\text{m}$ 以下の厚さの両持ち梁における共振周波数の予測精度が大幅に向上した。このことから、 $80\mu\text{m}$ 以下の厚みの両持ち梁において、引張りの残留応力の影響が顕著であることが分かった。以上より、MEMS-U の設計に不可欠な機械的物性が得られた。

これらに加えて、微小振動梁の振動特性を液体中において検討した。液体中で ν は主に周囲流体の付加質量の影響により共振周波数が ν 低下することから分かった。また、粘度の異なる液体を使用した実験から、粘性により振動の Q 値が ν 減少することも明らかになった。本結果から Q 値の変化から粘性および共振周波数の変化から質量を計測することが可能であると考えられる。これらの成果について纏めた論文を英文ジャーナルへ投稿中である。

(2) 電気穿孔法の評価と局所電場計測法

マイクロポアを介して矩形の電圧を印可し、マイクロデバイス上に培養した細胞の電気穿孔を行った。蛍光観察の結果からここで用いた 3 種いずれの細胞についても数 V 程度の印可電圧により電気穿孔が行えることが分かった。電気穿孔に必要な印可電圧が比較的低いことから、マイクロポアにイオン電流が集中していることが分かった。本結果は製作した構造が十分な絶縁性を有しており、構造内部に欠陥が少ないことを意味している。

次に、マイクロテ・ハ・イスの電気特性を定量的に評価するため、等価回路モデルを提案した。等価回路モデルはマイクロポアにおける抵抗と電極表面の電気二重層におけるコンデンサが直列に繋がったものである。マイクロポアにおける抵抗は、マイクロポアの断面積、深さおよび溶液の抵抗率から算出した。様々な寸法および集積率で設計したマイクロポアを用いた系統的な実験から、ここで提案した等価回路モデルの妥当性を示した。また、本検討からもグレースケールリソグラフィで製作した構造が電氣的に絶縁性を示すことが確認できた。電流の測定結果と等価回路モデルの比較から、マイクロポアにおける電流密度を算出し、電流密度と溶液の電気伝導率からマイクロポアにおける局所電場を推算した。電気穿孔に成功した条件における電場は 1 kV/m ~ 100 kV/m であり、これらの測定値は、先行研究で報告されている値とほぼ同等である。ただし、本研究ではやや低い電場から電気穿孔に成功しており、これは先行研究において主に印可電圧と電極間距離を元に電場を推算しているのに対して、本研究では電流値を元に電場を算出している点に原因があると考えられる。印可電圧と電極間距離を基準に電場を定義した場合、電極表面において生じる過電圧分の誤差を生じ、電場の推定値として高い値になる。一方で電流値を基準に決定する本方法は、電場の評価において過電圧の影響を受けにくいと考えると考えられる。

これらの成果については、2 件の英文ジャーナルとして掲載されており、既に高い評価を得ている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Hirofumi Shintaku, Kazumi Hakamada, Hiroshi Fujimoto, Takeshi Nagata, Jun Miyake, and Satoyuki Kawano,

Measurement of Local Electric Field in Microdevices for Low-Voltage Electroporation of Adherent Cells, *Microsystem Technologies* (2013). (April 27th 2013), 査読あり

- (2) Kazumi Hakamada, Hirofumi Shintaku, Takeshi Nagata, Hiroshi Fujimoto, Satoyuki Kawano, and Jun Miyake, Development of Microfabricated Device for Low-Voltage Electroporation of Adherent Cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 115, Issue 3 (2013), pp. 314-319. (November 15th 2012), 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

- (1) Takayuki Kobayashi, Kazuki Zusho, Hirofumi Shintaku, and Satoyuki Kawano, Development of Acoustic Resonator with Non-Uniform Thickness and Mechanical Property for Wide Frequency Range, 2012 ASME-ISPS /JSME-IIP Joint International Conference on Micromechatronics for Information and Precision Equipment MIPE2012, Santa Clara, California, USA, 19th July (2012)
- (2) 永田雄志, 袴田和巳, 新宅博文, 藤本博志, 川野 聡恭, 三宅淳, 金-ITO 微小電極上培養細胞への電気穿孔による物質送達最適化の検討, 日本機械学会 関西支部 第87期定時総会講演会, 吹田市, 2012年3月17日.
- (3) Takayuki Kobayashi, Hirofumi Shintaku and Satoyuki Kawano, Development of Non-uniform Thick Micro Beam Array for Acoustic Resonators with Wide Frequency Range, International Workshop on Micro/Nano-Engineering, Kyoto, Japan, 17th December (2011)
- (4) 小林誉幸, 新宅博文, 川野聡恭, 厚み変化を有する微小振動梁アレイのグレイスケールリソグラフィによる製作, 日本機械学会 第3回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 東京, 2011年9月26日.
- (5) 新宅博文, 川野聡恭, 広帯域 MEMS 人工基底膜の振動特性, 日本機械学会 2011年度年次大会, 東京, 2011年9月14日.
- (6) Hirofumi Shintaku and Satoyuki Kawano, Development of Bionic Auditory Membrane with Non-Uniform Thickness for Acoustic Sensor with Wide-Range Frequency Selectivity, Proceedings of ASME-JSME-KSME Joint Fluids Engineering Conference 2011, Hamamatsu, Japan, 26th July (2011)

〔その他〕

- (1) 2012年3月 藤本博志 Best Presentation Awards 日本機械学会 関西学生会
- (2) 2011年9月 小林誉幸 日本機械学会 若手優秀講演フェロー賞 日本機械学会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新宅博文 (SHINTAKU HIROFUMI)
京都大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 80448050

(2) 研究分担者

川野聡恭 (KAWANO SATOYUKI)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授
研究者番号: 00250837
辞退: 平成24年7月31日
土井健太郎 (DOI KENTARO)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授
研究者番号: 20378798
辞退: 平成24年7月31日

(3) 連携研究者

日比野浩 (HIBINO HIROSHI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号 70314317