

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 8 月 24 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750158

研究課題名(和文)細胞機能制御のためのマイクロ細胞加振デバイスの開発

研究課題名(英文)Development of cell-vibration microdevice with piezoelectric thin film

## 研究代表者

川島 貴弘(Kawashima, Takahiro)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50378270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、圧電駆動型マイクロ細胞加振デバイスの作製プロセスの検討を行い、駆動性能の評価を行い、有用性を示した。さらに、細胞を高効率にSiNダイアフラム上にトラップするために誘電泳動を利用した細胞配列についての検討を行い、細胞を配置可能であることを示した。また、細胞の増殖・分化などの細胞活動に必要な基盤となることから、細胞への加振の効果検証の基礎として、REF(ラット線維芽)細胞を用いた基板の表面材料への接着性の評価を行った結果、基板表面材料に依存した接着を示すことがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have been developing a cell-vibration microdevice with piezoelectric thin film for screening and optimization of the influencing factors of mechanical vibratory stimuli to cells. The microdevice was fabricated by the proposed fabrication process. Moreover, a cell arrangement method using dielectrophoresis was adopted to trap cells on the microdevice. The study revealed that the method was effective to trap cells. Finally, cell culture experiments were executed in order to evaluate cell adhesion on substrates. As a result, it was found that the surface material of the microdevice was important to cell behavior.

研究分野：BioMEMS

キーワード：細胞機能制御 機械的振動刺激 圧電アクチュエータ BioMEMS

### 1. 研究開始当初の背景

先天的あるいは事故や疾患により後天的に失われた組織や器官・臓器の再生を目指す再生医療が次世代の医療技術として世界的に注目を集めている。しかしながら、従来の細胞の増殖・分化といった細胞機能の制御法では、由来が問題となる液性因子や合成高分子などを使用しているため狂牛病などのリスクをとまなっている。さらには、培養に長時間を要するため、培養期間の短縮化(スループットの向上)が求められている。そのため、採取した細胞を目的に応じて安全かつ確実に細胞機能制御を実現する技術が必須となる。そうした中で、細胞へのナノメートルオーダの微小な機械的振動刺激が細胞の接着・増殖・分化誘導の促進や遺伝子導入に有効であるとの知見がえられており、細胞への微小な機械的振動刺激によって、確実な増殖・分化誘導が促進できれば、再生医療で必要とされる安全な細胞機能制御技術を確立できることになるが、ナノメートルオーダの微小な機械的振動刺激(振幅や周波数)が細胞機能にどのように影響するかの詳細については未解明であるため、その影響をスクリーニングするためのデバイス開発が必須となる。

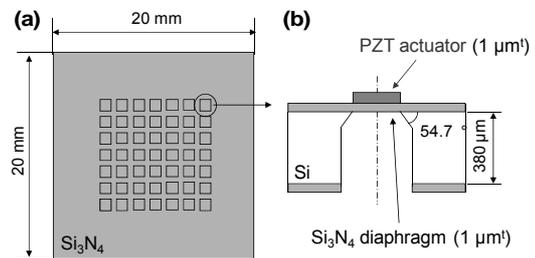
### 2. 研究の目的

本研究は、細胞への微小な機械的振動刺激をアレイにて付与することで振動条件をスクリーニングし、細胞機能制御技術の確立を可能とするマイクロ細胞加振デバイスの開発を目指す。このため、シリコン(Si)基板上面部を窒化シリコン(SiN)膜のダイアフラムとし、さらにアクチュエータとしてPZT圧電薄膜を集積化する。細胞への機械的振動刺激は、PZT圧電薄膜を伸縮させてダイアフラムを上下に振動させることで、細胞を直接加振し実現される。なお、本デバイスは、基板表側の平面に細胞を培養する構造とする。本デバイスで実現する機械的振動条件は、先行研究から、振幅: ~100 nm, 周波数: ~10kHzと設定する。また、個々のPZTアクチュエータは独立して制御可能となるため、複数の振動条件(振幅や周波数)を1つのチップ上で実現できる。本研究では、こうした基礎実験を背景として、細胞の増殖・分化誘導を促進する機械的振動条件の影響を網羅的に解析するデバイスの開発を行う。

### 3. 研究の方法

提案するシステムの概略図を図1に示す。これは、MEMS(Microelectromechanical Systems)技術により、シリコン(Si)基板の裏面からSi深堀りエッチング(DRIE)および結晶異方性ウェットエッチングによって一括して微小孔を複数形成し、その上面部の窒化シリコン(SiN)膜をダイアフラムとし、さらにアクチュエータとしてPZT圧電薄膜(膜厚1 μm)を集積化するものである。本研

究においてキーデバイスとなるマイクロ細胞加振デバイスの作製方法は以下のとおりである。まず、シリコン(Si)基板の両面にSiN膜を形成し(膜厚1 μm)、フォトリソグラフィと反応性イオンエッチング(RIE)、およびSiの深堀りエッチング(DRIE)により裏面に微小孔を形成する。次に、裏面から結晶異方性ウェットエッチングを用いてSiN膜を露出することによってPZTアクチュエータ下部にSiNダイアフラム部が形成でき、デバイスの基本構造が実現される。本研究では、デバイス作製プロセスの検討を行い、駆動性能の評価を行った。さらに、細胞を高効率にSiNダイアフラム上にトラップするために誘電泳動を利用した細胞配列についての検討を行った。また、細胞の増殖・分化などの細胞活動に必要な基盤となることから、細胞への加振の効果検証の基礎として、REF(ラット線維芽)細胞を用いた基板の表面材料への接着性の評価を行った。

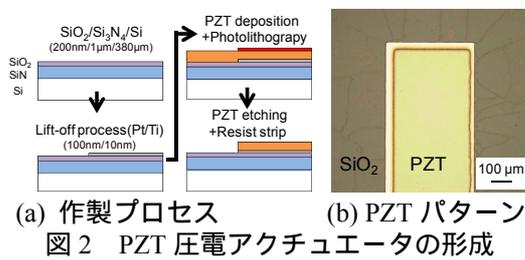


(a) デバイス概要 (b) PZT アクチュエータ  
図1 圧電駆動型マイクロ細胞加振デバイス

### 4. 研究成果

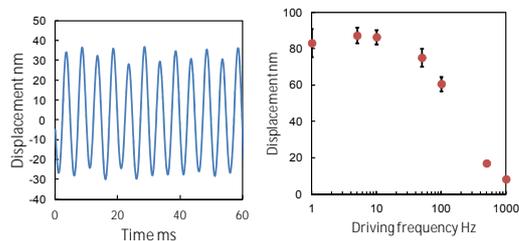
#### 4.1 デバイス作製プロセスの検討

PZTアクチュエータの形成プロセスについて検討を行った。図2(a)に提案するプロセスを示す。SiN膜を成膜下Si基板上にスパッタ法によって中間層(密着層)として膜厚200 nmのSiO<sub>2</sub>膜を形成し、下部電極としてPt/Ti(膜厚100nm/10nm)をリフトオフ法によってパターニングする。その後、密着性向上のためのアニール(650 °C, 1.5 min)を行い、ゾル-ゲル法を用いてPZT圧電薄膜(膜厚1 μm)を形成する。次に、レジストをマスクとし、HF/HNO<sub>3</sub>溶液によってPZT圧電薄膜のパターニングを行う。図(b)にPZT膜のパターニング結果を示す。SiO<sub>2</sub>膜が露出した領域のPZT膜にはクラックの発生が認められたが、Pt/Ti電極上には均一なPZT膜(膜厚540nm)の形成が実現できた。そこで、裏面SiN膜のパターニングおよびDRIEを用いることで裏面に微小孔を形成した。次に、KOHを用いた結晶異方性ウェットエッチングによって、PZTアクチュエータをダイアフラム上に形成した。エッチング条件の最適化を行った結果、253.9±5.8 μm角のダイアフラムを形成可能であることがわかり、本作製プロセスがデバイス形成に有効であることを確認した。



#### 4.2 デバイスの駆動特性

作製した圧電駆動型マイクロ細胞加振デバイスの駆動特性を評価した。図 3(a)に印加電圧を交流 10 Vpp, 周波数 100 Hz としたときの変位量の測定結果を示す。ダイヤフラムの変位量は、レーザー変位計によって測定した。図から、変位量はおよそ  $60 \pm 2 \text{ nm}$  となることがわかった。また、図(b)に周波数応答特性を示す。図のように、駆動周波数の上昇とともに変位量が著しく減少する結果となった。この原因としては、今回作製した PZT 圧電薄膜の膜厚が薄かったことが要因と考えられ、さらなるデバイス作製プロセスの最適化が必要ではあるが、提案するデバイス作製プロセスにて、細胞へのナノオーダーの機械的振動刺激を付与可能であることがわかった。

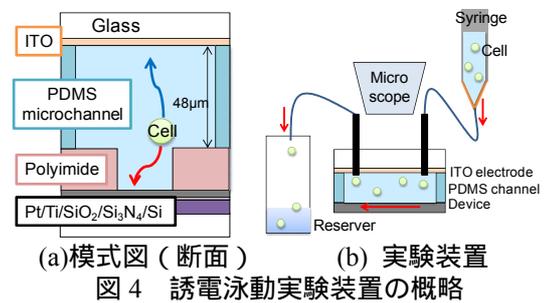


(a) 時間応答 (100Hz) (b) 周波数応答  
図 3 デバイスの駆動特性 (印加電圧 10Vpp)

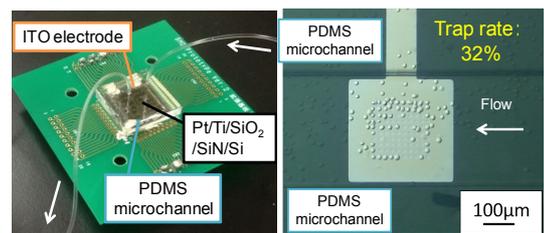
#### 4.3 誘電泳動を利用した細胞配列実験

細胞に機械的ナノ振動刺激を与えるためには、PZT アクチュエータ上の所定の位置に細胞を規則的に配置する必要がある。そこで、誘電泳動を利用した高効率細胞配列技術の検討を行った。図 4 に実験装置の概略図を示す。PZT アクチュエータを想定し、 $\text{SiO}_2/\text{SiN}/\text{Si}$  基板上に、電極として Pt/Ti を  $350 \mu\text{m}$  角の大きさにパターンニングしたものと、ガラス基板上に透明電極である ITO 膜 (200 nm) を成膜した基板を対向させて設置した。また、細胞の効率的な供給を図るために、PDMS 流路 (幅  $350 \mu\text{m}$ , 高さ  $48 \mu\text{m}$ ) を一体化したデバイスを作製した。なお、Pt 電極表面には、絶縁膜としてポリイミドのパターンニングを行った。また、厚さ  $0.4 \mu\text{m}$  のポリイミド膜を直径  $10 \mu\text{m}$  の円形パターンとしてアレイ状 ( $10 \times 10$ , ピッチ  $20 \mu\text{m}$ ) に開口し、電界集中が起こるようにした。細胞配列実験に使用した装置の外観を図 5(a)に示す。実験には、HeLa 細胞をスクロス ( $8.5 \text{ w/v\%}$ ) とグルコース ( $0.3 \text{ w/v\%}$ ) を純水に溶解した低導電率

バッファに懸濁 ( $1.0 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ ) して使用した。また、リザーバーと流路の液面高さの差を利用して静水圧を調整することで、流速  $14.0 \pm 2.5 \mu\text{m/s}$  で PDMS 流路内に細胞懸濁液を導入し、ポリイミド円形開口部へ細胞を供給した。誘電泳動実験は、電極間に正弦波交流電圧 (電圧 20 Vpp, 周波数 100, 500, 1000 kHz の 3 条件) を印加し、ポリイミド開口部に細胞が移動する正の誘電泳動を利用した細胞配列を試みた。実験の結果、周波数 100 kHz 以上では正の誘電泳動となり、細胞が流路に沿って流れている場合でも捕獲が可能であった。図(b)に周波数 500 kHz での結果を示す。細胞捕獲率は、電圧印加から 60s 後で 32%, 10min 後で 96%となり、ほぼ全ての円形パターンに細胞を捕獲できた。しかし、細胞のダメージを極力軽減するため、短時間で捕獲する必要があり、捕獲条件の最適化が今後の検討課題である。



(a) 模式図 (断面) (b) 実験装置  
図 4 誘電泳動実験装置の概略

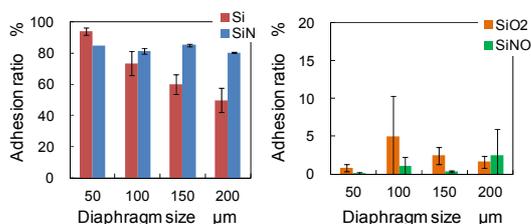


(a) セットアップ外観 (b) 実験結果 (500kHz)  
図 5 誘電泳動を利用した細胞捕獲実験

#### 4.4 細胞接着性の評価

細胞の接着は、細胞の増殖・分化などの細胞活動の維持に必要な基盤となることから、細胞への加振の効果を検証する基礎として、REF (ラット胎児線維芽) 細胞を用いて基板の表面材料への接着性の評価を行った。作製した基板は Si, SiN,  $\text{SiO}_2$ , SiON の 4 種類で、 $20 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$  の基板上にダイヤフラムを模したサイズの異なる 50, 100, 150, 200mm 角のパターンをフォトリソグラフィおよび RIE を用いて形成した。培地として DMEM+10%FBS を使用し、細胞懸濁液の細胞濃度は  $1.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$  とした。実験では、基板を細胞懸濁液で満たしたシャーレに投入し、48h 培養を行った後、固定化・脱水処理を行い光学顕微鏡にて、パターン部に接着している細胞の観察を行った。パターン部の接着率の算出には、画像処理ソフトを用いてパターン部を切り取り、細胞接着部を黒、未

接着部を白に2値化し、接着部の割合を算出した。結果を図6に示す。(a)のSi, SiN基板をみると、REF細胞のSiN表面に対する接着率は、ダイアフラムサイズに依存せず、80%以上と高い値となった。一方、Si表面に対しては、50%以上の接着率を示したがダイアフラムサイズに依存する結果となり、Si表面への接着性は、SiNと比較して低いと考えられる。(b)のSiO<sub>2</sub>, SiON基板の場合、接着率は5%以下となり、酸化させた基板にはREF細胞は極めて接着しにくいということがわかった。今後、細胞加振実験の評価を進めていくにあたり、デバイス表面への細胞接着のし易さも考慮したデバイス設計が必要であることがわかった。



(a) Si, SiN 基板 (b) SiO<sub>2</sub>, SiON 基板  
図6 細胞接着性の評価

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 小林功治, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行, オンチップ細胞機能制御のための圧電駆動型マイクロ細胞培養デバイスの開発(第4報): 機械的ナノ振動刺激による細胞応答の基礎的検討, 2015年度精密工学会春季大会学術講演会, pp. 727-728, 2015年3月17日, 東洋大学(東京).

(2) Genki Umegaki, Yoshitaka Ishihara, Moeto Nagai, Takahiro Kawashima, Takayuki Shibata, "Development of Cell Culture Microdevice for Regulation of Cell Functions Based on Nanomechanical Stimulation", Extended abstract of 24th 2013 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2013), pp. 211-214, 2013年11月12日, 名古屋大学(愛知).

(3) Genki Umegaki, Yoshitaka Ishihara, Moeto Nagai, Takahiro Kawashima, Takayuki Shibata, "Fabrication and Characterization of Cell Culture Microdevice for Nanomechanical Stimulation of Living Cells", Abstract of The Irago (Interdisciplinary Research and Global Outlook) Conference 2013, p. 33, 2013年10月25日, 伊良湖シーパーク&スパホテル(愛知).

(4) 梅垣彦希, 石原祥貴, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行, 「オンチップ細胞機能制御のための圧電駆動型マイクロ細胞培養デバイスの開発(第3報): 誘電泳動を利用した高効率細胞配列技術の検討」, 2014年度精密工学会春季大会学術講演会, pp. 461-462, 2014年3月18日, 東京大学(東京).

(5) 梅垣彦希, 石原祥貴, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行, 増澤 徹, 木村 剛, 岸田晶夫, オンチップ細胞機能制御のための圧電駆動型マイクロ細胞培養デバイスの開発(第2報): 誘電泳動による細胞操作の基礎的検討, 2013年度精密工学会秋季大会学術講演会, pp. 893-894, 2013年9月12日, 関西大学(大阪).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://mems.me.tut.ac.jp/research.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 貴弘 (KAWASHIMA TAKAHIRO)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 50378270

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし