

平成22年 5月30日現在

研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2007年度～2009年度
 課題番号：19686014
 研究課題名（和文） シリコン基板一体型多孔質層の応用 ―細胞操作への展開―
 研究課題名（英文） Application of Monolithic Porous Layer on SiWafer
 –Toward Cell Manipulation for Biotechnology–
 研究代表者
 早瀬 仁則（東京理科大学・理工学部・准教授）
 研究者番号：70293058

研究成果の概要（和文）：

シリコン基板上に背面まで貫通した多孔質部を部分的に形成することにより、細胞等の微小物体の吸引固定を可能にした。細胞の培養液には、代謝による生成物等が含まれるため、多孔質部の目詰まりが生じやすいが、培養液が多孔質部を透過する際の圧力損失等を測定した結果、吸引固定が十分可能であることが予想され、実際に吸引固定を実証した。さらに、吸引固定後、吸引力を調整することにより、細胞破砕が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Through-chip porous area array was made on a Si chip and cellular array was demonstrated by vacuum suction on the through-chip porous areas. It was expected that the porous area was easily blocked by some substances contained in a cultivation medium. Then the pressure drop through the porous area was measured and it was found that enough suctional fluidic volume can be obtained with a fresh filtrated cultivation medium. Cell immobilization was demonstrated and it was found that cell fragmentation could be induced after the immobilization by applying strong suction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	15,300,000	4,590,000	19,890,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	20,400,000	6,120,000	26,520,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学 生産工学・加工学

キーワード：MEMS, 多孔質シリコン

1. 研究開始当初の背景

MEMS 研究の発展と共に、機械的要素を微細化するだけでなく、 μ TAS に代表されるように、化学反応を制御するマイクロデ

バイスの研究開発が世界的に活発化していた。筆者らは化学反応を制御すべく、シリコン基板に貫通した多孔質層を一体成形してきた。この多孔質内部に貴金属等を堆積して、

電気化学反応を生じさせたりしていた。このシリコン基板上に貫通した多孔質層を形成する技術の新たな展開として、細胞を取り扱うことについて検討したいと考えた。バイオテクノロジー研究では、細胞を一つ一つ管理して、その場で観察出来るようなツールが望まれていた。シリコンウェハ上に部分的に貫通した数十 nm スケールの多孔質部を多数形成し、この部分に微小物体を吸引固定できれば、細胞のアレイが形成できると考えた。さらに、多孔質を特長とした新しい細胞操作・計測手法を開発することを計画した。

2. 研究の目的

バイオテクノロジー研究では、細胞を一つ一つ管理して、その場で観察出来るようなツールが望まれている。本研究では下記の応用を進め細胞操作を試みる。

(1) 吸引による細胞の整列固定

実際の細胞は、粘度の高い液体中で取扱う。そこで、実際の培養液による目づまりを考慮し、適した貫通多孔質部の孔径、厚さ等の条件を求める。

(2) その場観察

デバイス表面側にカバーを設け、薬液の蒸発を抑制し、光学顕微鏡による観察を容易にする。

(3) 薬品投与

デバイスの背面にも流路構造を製作し、背面から薬品を投与する。多孔質層は流量抵抗が大きいため、極微量の制御も容易であると見込まれる。

(4) 電気刺激

細胞に電気刺激を与えると、ある種のたんぱく質の生成を活発化したり抑制したりすることが知られている。多孔質シリコンの金属多孔質化あるいは周辺に電極形成を行いカバー部には透明電極を形成し、個々の細胞に電気刺激を加えられる構造を製作する。

(5) 細胞膜破壊

印加電圧を大きくすると、細胞膜が破壊することが知られている。細胞膜破壊後、背面からの吸引を行うことにより、多孔質部分に細胞内物質の保持を試みる。

(6) 光学計測

たんぱく質などの化学成分を検出するには、吸光スペクトルが良く利用される。多孔質シリコン部分は、熱酸化により石英化することにより、紫外域まで透明性がある。試料が小さいため、困難が予想されるが、吸光解析による個々の細胞の生成物検出の可能性を探る。

上記の機能を実現するデバイスを開発することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

シリコン単結晶は、ふっ酸溶液中において陽極酸化することにより、多孔質になることが知られている。孔の口径等は、シリコンの不純物ドーブ量によりある程度コントロールできる。そこで、フォトリソグラフィー等の微細加工技術を用いて、図1に示す吸引固定デバイスを製作した。

ウェットエッチングによりシリコン基板にエッチングピットを形成し、エッチングピット側から陽極酸化を行う。陽極酸化による多孔質化は、表面の法線方向にほぼ一様な速度で進行する。したがって、エッチングピット底面から背面まで貫通した多孔質層が形成される。エッチングピットの形状を変えることにより、貫通多孔質領域である吸引部の形状を変えることが可能である。また、エッチングピットを整列配置することで吸引部が整列形成される。エッチングピット側である背面からポンプで吸引することにより、細胞の整列固定を試みた。

吸引固定において、多孔質領域を透過する流量が重要である。そこで、流量を計測し吸引固定が可能かを議論した。さらに、カバーガラスに形成する流路構造を設計し、効率的に細胞を捕捉できるようにすることを検討した。

多孔質部で吸引することで、多孔質部に細胞内物質を捕獲することが期待できる。そこで、細胞破碎を検討するが、電気的刺激と、吸引力の調整による方法の2通りを考えた。電気刺激を行うために、多孔質シリコン層を金属化する手法を検討した。すでに、行っている多孔質白金化のほかに、金、パラジウム、ルテニウム等の多孔質貴金属層の形成手法を開発し、貫通多孔質層形成を試みた。また、吸引固定後、吸引力を増加させることにより、細胞破碎し、破碎後の様子を電子顕微鏡等により観察した。

研究上、細胞を頻繁に用いる。新たに細胞培養設備を整え、浮遊性細胞である Jurkat 細胞(ヒト白血病細胞)を培養し、実験に用いた。

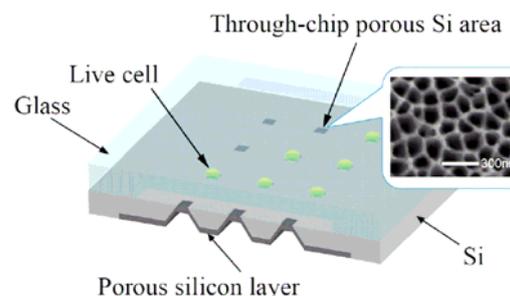


図1 吸引固定デバイスの概略図

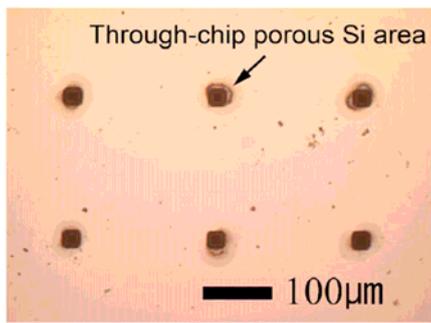
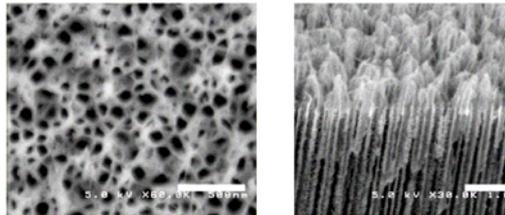
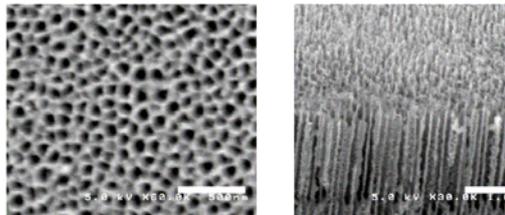


図2 製作したデバイスの光学顕微鏡像



(a) プラズマエッチング過多状態



(b) 適度のプラズマエッチング

図3 多孔質部の電子顕微鏡写真

(左：上部から、右：断面を斜め上から観察)

4. 研究成果

(1) デバイスチップの製作

図2に製作した貫通多孔質部分を有する吸引デバイスチップの光学顕微鏡写真を示す。背面から多孔質化が表層に達するまで陽極酸化を行った。ただし、完全に多孔質化を表層にまで均一に到達させることはできず、 $1\mu\text{m}$ 以下の多孔質化されない層を残し、この層をプラズマエッチングにより除去して貫通層を完成させた。吸引実験では、結果に大きなバラツキが見られた。一要因として、多孔質部表面の形状が、図3に示すようにプラズマエッチングにより大きく変化してしまうことが確認された。こうした細かな点の改善により、純水中に分散させたポリスチレンビーズの吸引固定は確実に出来るようになり、デバイスの基幹部製作技術を確立した。

(2) 細胞培養液の使用

細胞は純水に浸すと破裂するため、培養液を用いて吸引固定を行う必要がある。そこで、多くの物質を含む培養液を用いても、十分な吸引力を発現出来るかを検討するために、多

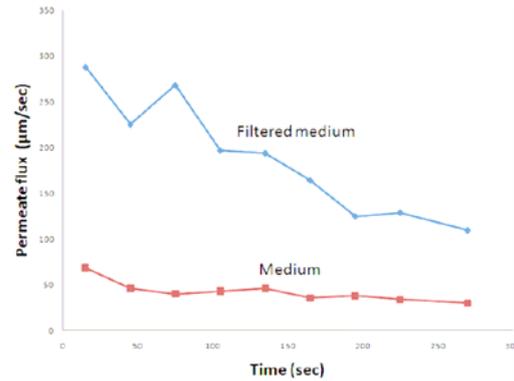


図4 多孔質部における流速変化

孔質層を透過する際の培養液の流速を計測

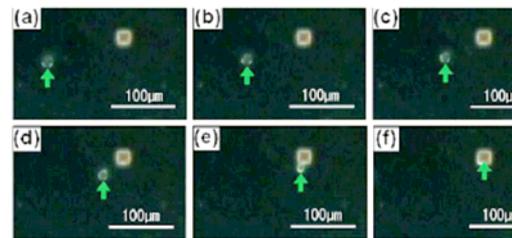


図5 吸引実験結果

した。図4に、1気圧の圧力差を与え厚さ $15\mu\text{m}$ の貫通多孔質を透過した際の培養液の吸引部表面における流速の時間変化を示す。200nm目のフィルターでろ過したものと、そのままの培養液では流速に大きな変化が見られた。純水では、 $800\mu\text{m/s}$ 程度になるため、流速は大幅に低下している。用いた培養液の動粘度はウベローデ管で測定したところ、フィルターろ過の有無にかかわらず 23°C において $0.96\text{mm}^2/\text{s}$ と純水($0.94\text{mm}^2/\text{s}$)ほとんど変わらなかった。多孔質の口径は 70nm 程度であり、流速の低下要因は培養液の成分の目詰まりであることが予想される。200nm目のフィルターで培養液をろ過しても、培養細胞の増加率・生存率測定では影響は見られなかった。フィルターろ過を行った培養液では $100\mu\text{m/s}$ 以上の流速が見込まれ、吸引固定には十分であることが分かった。

(3) 吸引固定実験

上記の予備的研究から、吸引固定デバイスにより細胞吸引が可能である見込みが得られたため、実際の細胞を用いて吸引を行った。図5に結果の一例を示すが、細胞が吸引されていく様子は観察されたものの、多孔質部において消失してしまった。すなわち、細胞が破壊されて吸い込まれてしまった。多孔質層は、図3に示すように、独立した縦穴構造を有している。このため、開口部が塞がれると、流体の圧力損失がなくなり、チップ表裏の圧力差が直接細胞膜にかかってしまう。このために、細胞膜が破れたと考えられた。そこで、クロムをスパッタ堆積したところ、図6に示

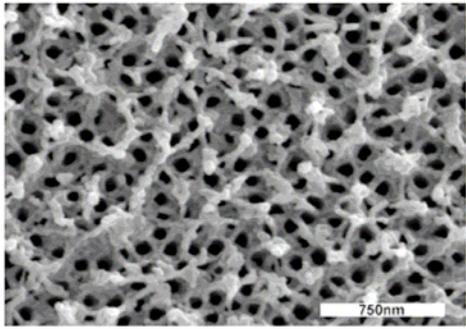


図6 多孔質部における流速変化

すように表層にネット状の構造を形成することが出来た。この構造を用いて吸引実験を行ったところ、細胞を破壊せずに捕捉することが出来た。この方法以外にも、等方性のエッチングにより孔壁への穴形成等を試みているが、現時点では有効な結果は得られていない。

(4) 細胞破碎実験

前節に示したように、本デバイスでは細胞を破碎出来ることが示された。培養中の細胞を、任意のタイミングで細胞を破碎し、内容物を捕捉することは研究上有効な手法と考えられる。そこで、破碎の制御性に関して検討した。培養液を用いた場合は、目詰まりの影響から再現性が得られず、制御するに至らなかった。そこで、培養液の代わりに、生理食塩水中に細胞を分散させ、細胞を吸引固定し、任意のタイミングで破碎することを試みた。生理食塩水の場合、目詰まりが生じにくく、吸引のためのチップ表裏の差圧を小さくすることができる。このため、前節のクロムによる表面処理を行わなくても、細胞を破壊せずに吸引固定することが可能であった。そこで、吸引固定後、差圧を大きくしたところ、細胞が多孔質部に吸い込まれていく様子が観察できた。図7は、緑色蛍光たんぱく質(GFP)生成遺伝子を組み込んだ Jurkat 細胞を吸引破碎後、純水でリンスしたのち乾燥させたデバイスを観察した様子である。細胞の内容物である GFP が多孔質部に保持されていることを示している。すなわち、細胞を任意のタイミングで破碎し、内容物を多孔質部に捕捉できることが実証された。

(5) 多孔質貴金属層

前節に示したように、多孔質部に細胞内容物を捕捉できることを示した。捕捉物の選択性を上げるために、多孔質孔壁を化学修飾しやすい材質にすることが望まれる。表面就職には、チオール結合が良く用いられる。そこで、多孔質部をチオール結合に適した金等の貴金属へ改質する方法を検討した。白金へ改質する方法はすでに開発していたので、新たに金に改質することを試みた。塩化金溶液で

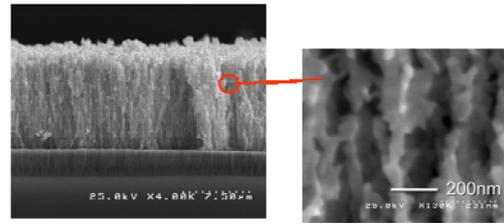


図8 多孔質シリコンを多孔質金に改質

した多孔質層断面の電子顕微鏡像

は多孔質構造が得られず、エチレンジアミンとの錯イオン溶液により置換めつきを行うことで、図8に示すような多孔質金構造がえられることを見出した。

(6) 今後の展望

細胞を貫通した多孔質部分に吸引整列固定し、細胞アレイを構築することを目指し、おおよそ実証することが出来た。さらに、光学測定を試みる予定であったが、多孔質層を熱酸化により透明化するプロセスの開発が間に合わず、検討することが出来なかった。低温による熱酸化により、基板のゆがみが軽減できる知見が得られてきたことから、この件については、今後も研究を続ける予定である。また、研究開始時には想定していなかった吸引制御による細胞破碎および内容物保持を実証することが出来た。シリコンチップ上であれば、バイオテクノロジー分野ではあまり使用されていない電子顕微鏡等の真空系の測定機器利用が容易となる。まだ初歩的検討しか出来ていないが、任意タイミングの細胞内物質をシリコンチップ上に捕捉できたことは、極めて有望な手法と考えられる。

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3件)

M. Hayase, T. Matsuzaka, J. G. A. Brito-Neto, Formation of Porous Noble Metal Layer by Displacement Reactions with Porous Silicon, ECS Transactions, 査読無, 16(3), 2008, pp. 231-235

早瀬仁則, 加藤厚子, 内海敦. 貫通多孔質シリコン層を用いた微小物体吸引デバイスの開発, 精密工学会誌, 査読有, 74(10), 2008, pp.1056-1061

J. G. A. Brito-Neto, K. Kondo, M. Hayase. Porous Gold Structures Templated by Porous Silicon, Journal of The Electrochemical Society, 査読有, 155(1), 2008, D78-D82

〔学会発表〕（計 4 件）

T. Matsuzaka, J. Shimanuki, T. Ishiguro, M. Hayase, Formation of Through-Chip Porous Noble Metal Layers on Silicon Substrates, 216th Meeting of the Electrochemical Society, 2009.11.6, Austria

松坂 拓, 島貫純一, 早瀬仁則, シリコン基板上への貫通した多孔質貴金属層の形成, 2009 年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2009.9.10, 神戸大学

V. N. Tondare, N. Ozawa, M. Hayase, Porous Silicon Based Microfluidic Device for Bio-applications, 2008 年度精密工学会秋季大会学術講演会, 2008.9.18, 東北大学

K. Kato, A. Uchiumi and M. Hayase, A novel device for fixing small objects using through-pore porous silicon, TRANSDUCES 2007, 2007.6.14, France

〔図書〕（計 1 件）

早瀬 仁則(監修：福田敏男・新井史人)、シーエムシー出版、細胞分離・操作技術の最前線、2008 年、252-263

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早瀬 仁則

(東京理科大学・理工学部・准教授)

研究者番号：70293058