

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760251

研究課題名（和文）

脳、神経細胞内、電気・化学ナノスケール解析プローブアレイデバイスの開発

研究課題名（英文）Intra/extracellular nanoprobe arrays for electrical and chemical nanoscale measurements of neurons

研究代表者

河野 剛士（KAWANO TAKESHI）

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70452216

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、脳・生体組織内のナノスケール局所領域電氣的・化学(薬学)的解析ツールを目指した、集積化ナノプローブアレイデバイスを開発した。製作したデバイスの応用として生体組織の深部細胞内への薬液投与を提案し、これをナノプローブアレイを用いたナノ粒子の電氣的吸着と擬似生体サンプルへのナノ粒子注入により実証した。更に、ナノプローブアレイによる細胞への DNA 導入を提案し、これまでに、培養した HEK293 細胞に対し改変 YFP (yellow fluorescent protein) を滴下、ナノ先鋭化プローブを細胞に対し刺入を行うことで DNA の局所的導入に成功している。本研究で開発したナノプローブデバイスはこれらの応用以外にも、電氣的細胞内プローブとしての応用もあり、脳・神経科学の分野での今後の貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

We developed out-of-plane, high aspect ratio, nanoscale electrode tipped microwire arrays for applications to penetrating, multisite, nanoscale biological sensors. A nanoscale tipped wire is formed with isotropic silicon etching to the tip of a vapor-liquid-solid grown silicon microwire. After coating the wire with a metal, only the nanotip section can be exposed from the surrounding outer shell (e.g., silicon dioxide and parylene) by three-dimensional integration processes. As a device application, we demonstrate the trapping of polystyrene nanoparticles in a solution using a fabricated gold-nanotip wire array. Moreover, these trapped nanoparticles can be injected into a soft material (gelatin), demonstrating a multi-site wide-area batch depth injection of nanoparticles. Also, we demonstrated multipoint/batch and localized DNA transfers into individual human embryonic kidney cells (HEK293) with plasmid containing yellow fluorescent protein (YFP) gene. Deep area electrical nanoscale measurements for thick samples such as brain slices as well as cortices would also be possible by using the nanotip microwire arrays, promising a powerful device for the future of neuroscience.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・電子デバイス・電子機器

キーワード：ナノプローブ、細胞内電極、細胞内プローブ、ドラッグデリバリーシステム、集積回路、MEMS、vapor-liquid-solid 成長法、脳・神経科学

1. 研究開始当初の背景

脳科学、神経科学の分野において、脳・神経系を解析する計測技術の開発が必至である。電氣的計測においては、生体組織内複数ニューロン（神経細胞）の活動電位を同時に計測することが求められる。既存の微小電極は、最小でも直径が数十 μm であり、細胞外電極として用いられる。“細胞外”という理由から、1) 計測電位の減衰（細胞内では数十 mV に達するが細胞外では数十 μV 程度）、2) 電極位置の変化による細胞電位の変化、3) 近接細胞からの信号混入等の課題が残る。

一方、細胞内電極は古くからガラス電極が用いられている。近年では、MEMSを代表とする微細加工技術を用いた細胞内電極製作の研究報告がある。但し、これらの欠点は、単一プローブ直径が $500\text{nm}\sim 1\mu\text{m}$ であり、直径が $5\mu\text{m}\sim$ 程度の細胞体においては侵襲度（細胞損傷）が大きく、長期計測に不向きであった。

2. 研究の目的

これまでに実現されていない、脳・生体組織内のナノスケール局所領域電氣的・化学(薬学)的解析を目指した、先端直径 $10\text{nm}\sim 50\text{nm}$ 細胞内刺入型プローブアレイデバイスを新規に提案・開発する。AFM（原子間力顕微鏡）を代表とするナノプローブに対し、提案するプローブは長さ $100\mu\text{m}$ 以上のマイクロプローブ（直径 $\sim 5\mu\text{m}$ ）アレイの先端にナノプローブが形成される為、測定対象（脳・生体組織）の深部における局所計測・解析が可能となる。更に、提案するナノプローブはマイクロエレクトロニクス（IC、MEMS）により集積化することが可能で、同一チップ上に各種信号処理回路やMEMSデバイスも搭載できる。

3. 研究の方法

本研究課題では、**1. ナノプローブ集積化プロセスの確立**、**2. ナノプローブ機能化**、**2. 細胞刺入試験**、**4. IC・MEMSシステム集積化**の各実験項目に取り組むことで本研究を推進する。

4. 研究成果

これまでの研究実施期間で実施した代表的な事項に関して記述する。

- (1) **ナノプローブ集積化プロセスの確立:** ナノプローブ集積化プロセスを確立した。Si基板上IC、MEMSプロセス後に、選択的にマイクロプローブを選択 vapor-liquid-solid (VLS) 成長で製作し、その後、フォトリソスト・スプレー法によるプローブ全体保護、先端を酸素ガスエッチングで露出、プローブ先端Siエッチ

ングによりナノプローブ化を実現した（図1）。

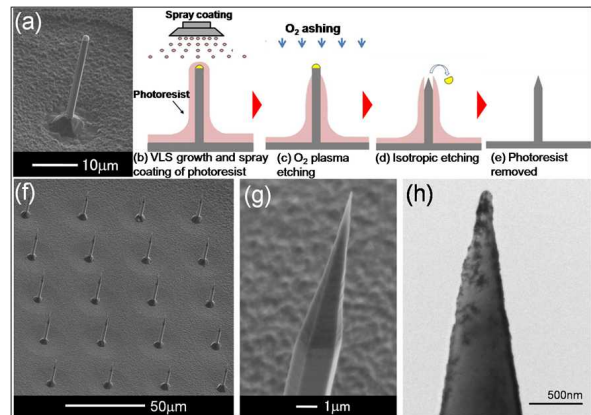


図1 ナノプローブ製作プロセス。

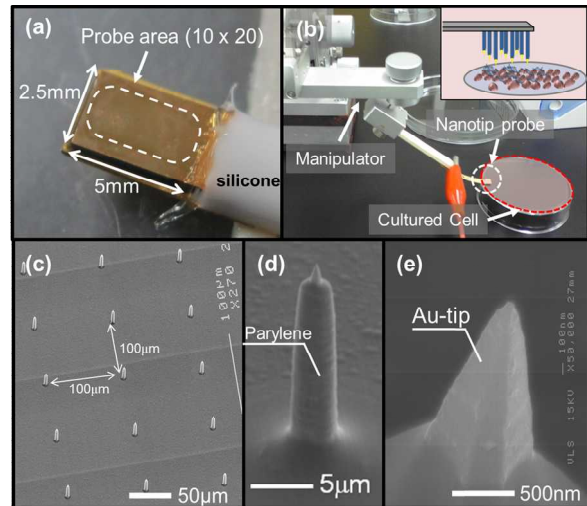


図2 集積化ナノプローブアレイ電極。

- (2) **ナノプローブ先端形状制御:** 細胞内刺入用プローブとして先端ナノプローブの先鋭化角度制御を実施した。先鋭化には溶液（ $\text{HF}+\text{HNO}_3$ ）によるSi等方性エッチングを用いており、その溶液混合比をパラメータとすることで、プローブ先端角度（ $11^\circ\sim 38^\circ$ ）が制御できることを明らかにした。先端局率半径は最小で 40nm を実現した。この局率半径は、追加のSi熱酸化とSiエッチングにより更に減少できる。
- (3) **ナノプローブ細胞刺入試験:** 擬似サンプル（Gelatin）を用いたナノプローブ刺入試験をとおして、ナノプローブの刺入が可能であることを確認した。加えて、プローブ刺入を有限要素法で解析し、先鋭化ナノプローブの細胞刺入の優位性（圧力集中、局所性）も定量的に評価した。
- (4) **ナノプローブ機能化:** ナノプローブの電氣的機能化を実現した。ナノプローブ側

壁には絶縁膜（酸化膜、Parylene）を形成、先端は、細胞適合性・細胞内電極を考慮した金属電極を形成した（白金、金）（図2）。プローブの電気的特性は、溶液中Dielectrophoresis 法によるpolystyreneナノ粒子の吸着で評価した。

- (5) **刺入試験**：Gelatinを用いたナノプローブの刺入試験を実施した。先のpolystyreneナノ粒子をプローブ先端に吸着させた後、ナノプローブアレイをGelatinに刺入したところ、ナノプローブの長さと同程度のGelatinの深さ位置(20 μ m)にナノ粒子が注入できていることを共焦点顕微鏡で確認できた（図3）。また、Gelatin中に注入されたナノ粒子はプローブアレイと同等の間隔（100 μ m）を示した。
- (6) **培養細胞内DNA導入ナノプローブ**：ナノプローブアレイを用いた各種細胞へのDNA導入に成功した。これまでに、培養したHEK293細胞に対し改変YFP（yellow fluorescent protein）を滴下、ナノ先鋭化プローブを細胞に対し刺入を行うことでDNAの局所的導入に成功している（図4-6）。
- (7) **脳切片サンプル内細胞刺入**：上記の培養細胞サンプルに加えて、高アスペクト比のプローブ形状の特徴を生かし、深さを有する脳切片サンプルに対しても深部細胞内へのDNA導入を実施し、その可能性を示した。

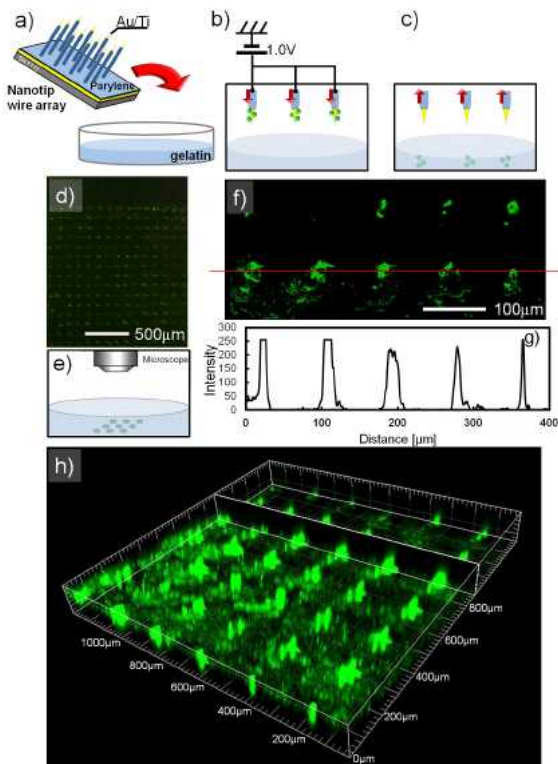


図3 擬似生体サンプル（Gelatin）深部へのナノ粒子注入試験。

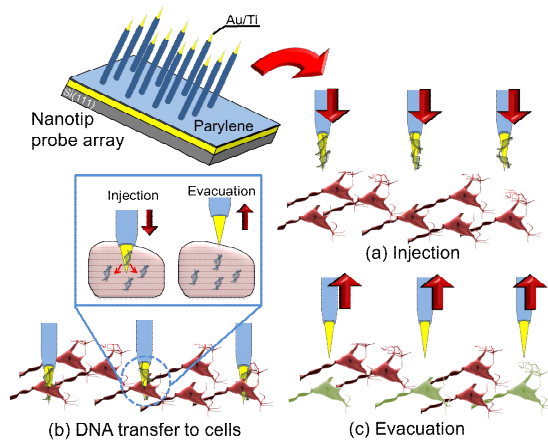


図4 細胞内DNA導入の概念図。

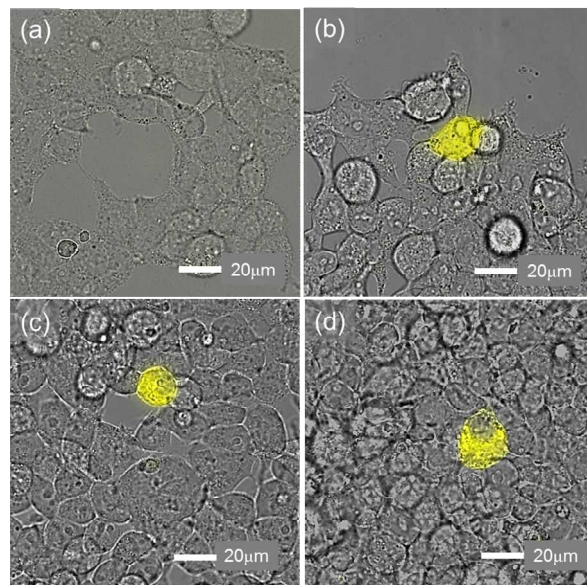


図5 細胞内DNA導入試験. a) DNA導入無しの細胞, b-d)DNAを導入した細胞.

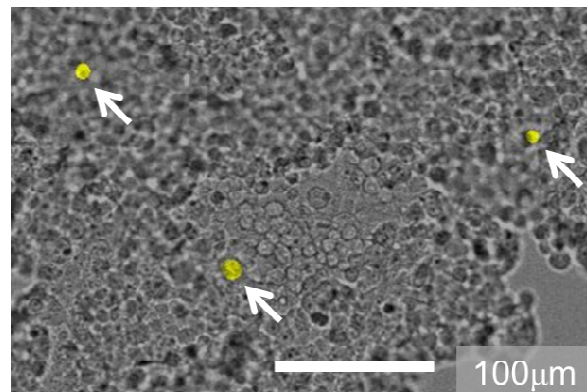


図6 多点DNA導入細胞の確認.

- (8) **集積回路、MEMSシステム集積化**：電氣的記録・刺激、化学的薬液搬送用の機能化ナノプローブ用として、各種回路・シ

ステム (増幅器) を同一Siチップ上に集積化した。VLSプローブ成長にはSi(111)基板を必要とするため、Si(100)/BOX/Si(111)構造のSOI基板を用いたプロセスを開発した。Siプローブ形成後においても、MOSFET/(100)が正常に動作する事を確認した。

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 6 件)

- (1) Akihiro Okugawa, Kotaro Mayumi, Akihito Ikedo, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, “Heterogeneously Integrated Vapor-liquid-solid Grown Silicon Probes/(111) and Silicon MOSFETs/(100),” IEEE Electron Device Letters, Vol. 32, No. 5, 2011 (pp. 683-685).
- (2) Akihito Ikedo, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, “Out-of-plane High-density Piezoresistive Silicon Microwire/p-n Diode Array for Force- and Temperature-Sensitive Artificial Whisker Sensors,” Journal of Micromechanics and Microengineering, Vol. 21, No. 3, 2011 (035007).
- (3) Tetsuhiro Harimoto, Kuniharu Takei, Takeshi Kawano, Akito Ishihara, Takahiro Kawashima, Hidekazu Kaneko, Makoto Ishida and Shiro Usui “Enlarged Gold-tipped Silicon Microprobe Arrays and Signal Compensation for Multi-site Electroretinogram Recordings in the Isolated Carp Retina,” Biosensors and Bioelectronics, Vol. 26, No. 5, 2011(pp. 2368-2375).
- (4) Akihiro Goryu, Akihito Ikedo, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, “Nanoscale Sharpening Tips of Vapor-liquid-solid Grown Silicon Microwire Arrays,” Nanotechnology, Vol. 21, No. 12, 2010 (125302).
- (5) Takeshi Kawano, Tetsuhiro Harimoto, Akito Ishihara, Kuniharu Takei, Takahiro Kawashima, Shiro Usui and Makoto Ishida, “Electrical Interfacing between Neurons and Electronics via Verticallyintegrated Sub-4 Micron-diameter Silicon Probe Arrays Fabricated by Vapor Vapor-liquid-solid Growth,” Biosensors and Bioelectronics, Vol. 25, No. 7, 2010 (pp. 1809-1815).
- (6) Kuniharu Takei, Takeshi Kawano, Takahiro Kawashima, Kazuaki Sawada, Hidekazu Kaneko and Makoto Ishida, “Microtube-based Electrode Arrays for Low Invasive Extracellular Recording with a High Signal-to-noise Ratio,” Biomedical Microdevices, Vol. 12, No. 1, 2010 (pp.

41-48).

[学会発表] (計 24 件)

主要学会論文以下 8 件

- (1) Akihiro Goryu, Rika Numano, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, “Nanoprobe Array for Gene Transfer into Individual Cells,” 2012 MRS Spring Meeting, San Francisco, USA, April 2012.
- (2) Tatsuya Imashioya, Akifumi Fujishiro, Hirohito Sawahata, Haruo Toda, Akihito Ikedo, Makoto Ishida, Isao Hasegawa and Takeshi Kawano, “Hybrid Penetrating- and Planer-Microelectrode Array for Simultaneous Recording of ECoG and Intracortical Neural Activity,” 2012 MRS Spring Meeting, San Francisco, USA, April 2012.
- (3) Shota Yamagiwa, Akifumi Fujishiro, Akihito Ikedo, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, “Layer-by-layer Nanoassembly of Iridium Oxide/Platinum-black for Low Impedance, High Charge Injecting Microelectrode Applications,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems (IEEE-MEMS) Conference 2012, Paris, France, January 2012.
- (4) Shogo Morita, Akifumi Fujishiro, Akihito Ikedo, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, “Fabrication of Force Sensitive Penetrating Electrical Neuroprobe Arrays,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems (IEEE-MEMS) Conference 2012, Paris, France, January 2012.
- (5) Akihiro Goryu, Akihito Ikedo, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, “Electrical Catching and Transfer of Nanoparticles via Nanotip Silicon Probe Arrays,” 16th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers '11), Beijing, China, June 2011.
- (6) Akihito Ikedo, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, “Temperature Sensitive Microwire Arrays for Artificial Whisker Electronics,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems (IEEE-MEMS) Conference 2011, Cancun, Mexico, January 2011.
- (7) Akifumi Fujishiro, Hidekazu Kaneko, Takahiro Kawashima, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, “A Penetrating Micro-scale Diameter Probe Array for in-vivo Neuron Spike Recordings,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems (IEEE-MEMS) Conference 2011, Cancun, Mexico, January 2011.
- (8) Masahiro Sakata, Akihiro Goryu, Akihito Ikedo, Tetsuhiro Harimoto, Makoto Ishida and Takeshi Kawano, “A Vertical

Micro-scale Light Guiding Silicon Dioxide
Tube Array for Optical Neurostimulator,”
IEEE Micro Electro Mechanical Systems
(IEEE-MEMS) Conference 2011, Cancun,
Mexico, January 2011.

[その他]

ホームページ等

<http://www.int.ee.tut.ac.jp/icg/member/~takekawano>

(ICG グループ) <http://int.ee.tut.ac.jp/icg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 剛士 (KAWANO TAKESHI)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・准
教授

研究者番号：70452216

(2) 研究協力者

沼野 利佳 (NUMANO RIKA)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端
融合研究所・特任准教授

研究者番号：30462716

(3) 連携研究者

()

研究者番号：