

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510141

研究課題名(和文)半導体プロセスによる極狭スリット細胞分離マイクロ流路形成と単一細胞分離構造の融合

研究課題名(英文)Fabrication of single cell isolation structure and very narrow slit cell separation microchannel by semiconductor processing

研究代表者

松谷 晃宏 (Matsutani, Akihiro)

東京工業大学・技術部・技術職員

研究者番号：40397047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞研究においては一細胞毎の分析が必須である。本研究では半導体プロセスを用いてサブミクロンサイズのピラー構造をマトリックス状に製作し単一細胞操作の実現を目指した。新開発のAr/F2気相エッチングプロセスによりSiの極狭スリット気液分離の2段マイクロ流路を製作し大腸菌の輸送に成功した。大腸菌と酵母の単一分離とサイズ分離を同時に実現し、培養にも成功した。Arプラズマを用いてマイクロレンズアレイを製作し、レーザー光の集光を観測し細胞搬送のための光ピンセット機能の基礎を確認した。本研究により細胞分離マイクロ流路形成と単一細胞分離構造の融合への基礎技術が確立され、単一細胞分析技術への応用が広く期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, Si-based microchannels without cover plates were fabricated by the Ar/F2 vapor etching process. We succeeded in the transport of E. coli cells in the microchannel. We also fabricated Si-based two-step microchannels without top cover plates by Ar/F2 vapor etching and Cl2-ICP etching processes. We think that the development of cell research, drug discovery, and rapid response measurement such as in food poisoning can be expected by shortening the analysis time using the proposed techniques.

We propose a size sieving microbial cell separation apparatus consist of multipillar microenclosures. Single cells of Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae were separately captured in smaller and larger microenclosures just by dropping mixtures. Moreover, we succeeded in making multipillar microenclosures on surface emitting laser wafers.

In this research, basic technologies on single cell isolation and cell separation using microchannel and microenclosure were established.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロバイオシステム 半導体プロセス技術

1. 研究開始当初の背景

近年、単一の細胞を操作する技術開発の要求が増加している。これは、同一の培養液中においても細胞は不均一であるためである。コロニーを形成させて分析する従来の生化学的技術では集団の分析となるため、多くの細胞から得られた平均値のみが情報として観測されることになる。単一の細胞の操作技術には、これまでレーザートラップによる光ピンセットを用いた単一細胞の分離や、単一細胞アレイを利用した遺伝子発現解析があり広く用いられている。しかし、これらの方法は $10\ \mu\text{m}$ 以上の真核細胞にのみ適用されており、 $1\ \mu\text{m}$ 程度のさらに小さいサイズの細菌細胞に対しての分離頻度は効率のよいものではなかった。また、従来から用いられている細胞分離のためのマイクロウェルの配列構造は、ウェル中の液体の循環には必ずしも適当な構造ではなく、液体中に溶解している物質の供給・循環に優れた構造を備え、大腸菌のような $1\ \mu\text{m}$ 程度の大きさの細菌の単一細胞分離技術の開発が求められていた。

この問題を解決するために、研究代表者らはこれまでに、2次元配列されたマイクロピラーを囲いとして用い、大腸菌の単一細胞をこの微小サイズの囲い中に捕獲することに成功した (A. Matsutani and A. Takada; Jpn. J. Appl. Phys. **49** (2010) 127201)。マイクロ囲いのサイズと大腸菌の捕獲頻度の関係は、マイクロ囲いの幅が $4\ \mu\text{m}$ のときに大腸菌単一細胞の捕獲頻度が 50% となり、マイクロ囲いのサイズを最適化することにより、さまざまな細菌の単一細胞を分離することが可能になると考えられ、本方法はニューロンと半導体回路の融合や細菌の単一細胞分析への応用が期待されている。

しかしながら、単一細胞の分離には成功したものの、マイクロ流路などの他の要素技術との融合は未着手であり、 $\mu\text{-TAS}$ として利用するには、(1) 単一細胞分離構造への細胞導入のための流路技術、(2) 単一細胞分離構造を利用した大きさ毎の細胞分離技術、(3) 単一細胞の輸送の技術課題が残されている。

従来のマイクロ流路は2次元的な流路であり、細胞の大きさ毎の分離を流路の幅やフィルター機能で行うことが一般的であるが、流路の垂直方向を利用した3次元的な分離は開発途上である。細胞の大きさ毎に単一分離する技術は、とくに大腸菌サイズの細菌細胞では未開発である。また、細胞の輸送については、単一細胞分離構造と融合させた技術は開発途上である。

本研究でこのような課題の解決のための基盤を確立することにより、細胞のマトリックス分析やコンビナトリアル分析により細胞工学、薬学分野での研究効率の向上が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 単一細胞分離構造への細胞導入のための流路技術については、気体と液体を分離でき、細胞を大きさ毎に分離できる極狭スリット構造マイクロ流路を Ar/F₂ エッチングを用いて形成することを目標とした。
- (2) 単一細胞分離構造からの細胞取り出し技術については、2次元マイクロピラーアレイ構造を用いた細胞のサイズ毎の単一細胞分離を目標とした。
- (3) 単一細胞の輸送技術については、マイクロレンズアレイ構造の製作を目標とした。

3. 研究の方法

細菌のサイズはミクロンオーダーであるが、細胞にストレスを加えることなく分析などができるような単一細胞操作技術の開発が重要である。

本研究では、リソグラフィやドライエッチングなどの半導体プロセスを用いて、(サブ)ミクロンサイズのマイクロピラー構造を任意のマトリックス状に並べ、単一細胞操作の基礎的実験を行いその実現を目指す。とくに気液分離の極狭スリットマイクロ流路の形成には Ar/F₂ 気相エッチングのプロセスを新しい半導体プロセス技術として開発する。また、2次元マイクロピラーアレイ構造を用いた細胞のサイズ毎の単一細胞分離の研究では、研究代表者らが開発した図1に示すような構造を応用する。使用する細胞は主に大腸菌および酵母とし、各種顕微鏡を用いて細菌の分布状況や表面状態を観察して評価する。単一細胞輸送にはマイクロレンズと半導体レーザを用いてレーザートラップの技術を用いた実験を行い、細菌細胞の輸送技術確立の基礎とする。

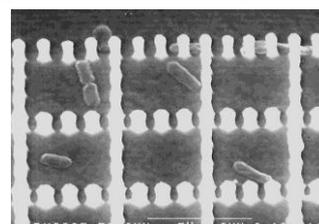
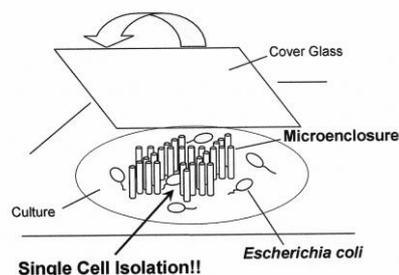


図1 研究代表者らが開発したマイクロピラー囲いによる単一細胞分離の概念図と単一分離された大腸菌

4. 研究成果

(1) 単一細胞分離構造への細胞導入のための流路技術

本研究では、リソグラフィやドライエッチングなどの半導体プロセスを駆使することにより、ミクロンサイズのマイクロ流路を製作し、単一細胞操作の基礎的実験を行いその実現を目指した。とくに気液分離の極狭スリットマイクロ流路の形成には、 Ar/F_2 気相エッチングのプロセスを新しい半導体プロセス技術として開発した。大腸菌を細胞として用い、顕微鏡により観察して考察した。図2に本研究で提案した Ar/F_2 気相エッチングプロセスの原理と本プロセスにより製作された Si マイクロ流路の電子顕微鏡写真を示す。 Si は、常温で気相の F_2 と反応するため、プラズマを用いることなく Si をエッチングすることができる。 Si 基板上に電子線レジストでサブミクロンのスリットを設けておけば、スリットから気相の F_2 が入り込み Si をエッチングすることができる。また、気相エッチングのため、原理上、表面張力の影響を考慮しなくてもよく、写真に示すような $1\ \mu\text{m}$ 程度の幅のマイクロ流路をセルフアライメントで製作することができた。

図3に本研究で提案した Ar/F_2 気相エッチングプロセスで製作した Si マイクロ流路による大腸菌の輸送の結果を示す。輸送に必要な力は毛管力を利用した。上部にスリットのある流路でも大腸菌の懸濁液を流路内に閉じ込めることができ、大腸菌細胞の輸送に有効であることがわかった。

図4 (a)および4 (b)に、本研究で提案した Ar/F_2 気相エッチングプロセスと反応性イオンエッチングを用いて製作した2段階マイクロ流路と大腸菌の輸送例を示す。図4 (a)に Ar/F_2 気相エッチングおよび Cl_2 を用いた誘導結合プラズマ (ICP) エッチングにより製作した二段階のマイクロチャンネルのSEM像を示す。エッチング条件は、 Cl_2 を $2\ \text{sccm}$ の流量、ICP/バイアスのRF電力を $300\ \text{W}/20\ \text{W}$ 、およびプロセス圧力を $1\ \text{Pa}$ とした。基板温度は 90°C とした。マイクロ流路の上部は幅 $2\ \mu\text{m}$ であり、マイクロ流路の下側部分の幅及び深さは、それぞれ 0.7 及び $0.5\ \mu\text{m}$ であった。製作した本研究で提案したマイクロ流路の構造のエッチングされた表面は平滑であった。図4 (b)に、二段階のマイクロ流路内に大腸菌細胞の懸濁液を通過させた後のSEM像を示す。懸濁液及び大腸菌細胞の流れは、上部のマイクロ流路のみに観察された。また、マイクロ流路の下部は液体のみで満たされていることが分かった。

これらの結果から、細菌細胞のサイズ分離および輸送が本研究で提案した2段階のマイクロ流路を用いて実現できることが示された。

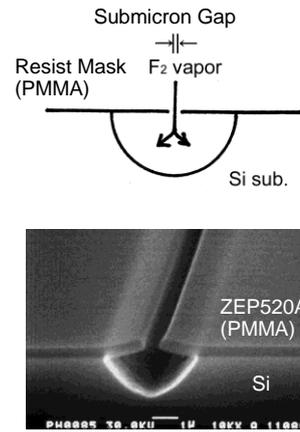


図2 本研究で提案した Ar/F_2 気相エッチングプロセスの原理と本プロセスにより製作された Si マイクロ流路の電子顕微鏡写真

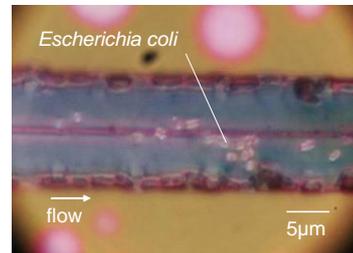
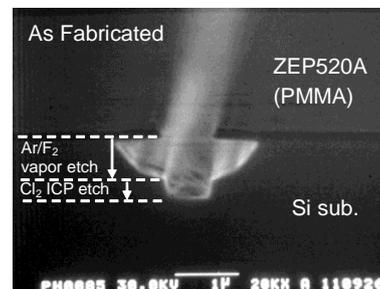
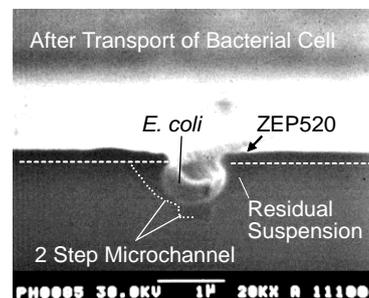


図3 本研究で提案した Ar/F_2 気相エッチングプロセスで製作した Si マイクロ流路による大腸菌の輸送



(a)



(b)

図4 本研究で提案した Ar/F_2 気相エッチングプロセスと反応性イオンエッチングを用いて製作した2段階マイクロ流路と大腸菌の輸送例

(2) 2次元マイクロピラーアレイ構造を用いた細胞のサイズ毎の単一細胞分離

マイクロ罫アレイのチップを用いて、大きさの異なる大腸菌と酵母について単一細胞分離とサイズ分離に成功した。具体的には、単一細胞分離構造からの細胞取り出し技術として、これまでに大腸菌細胞の単一分離に成功しているマイクロピラー罫構造を応用し、大きさの異なる罫構造を並列に多数配置して、様々な大きさの細胞が混入している培養液についても大きさ毎の単一細胞分離が可能となる最適配置について、細菌密度、細胞懸濁液流れ等を考慮した実験を行った。サイズ分離の原理は図5に示すように、マイクロピラーの間隔と捕獲領域の関係を考慮した2次元罫構造を製作し、これに異なるサイズの細菌細胞を含んだ液体を滴下することでサイズ分離を実現するという方法である。本研究では、図6に示すように、電子ビームリソグラフィとドライエッチング技術を用いて製作したチップにより、大きさの異なる大腸菌と酵母のサイズ分離と単一分離を同時に両立させることに成功した。

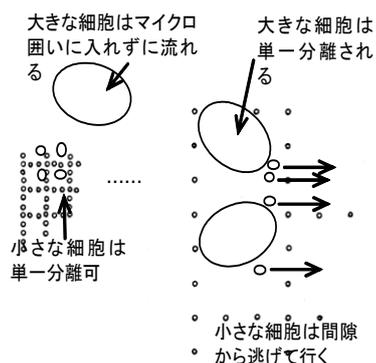


図5 本研究で提案した細菌細胞のサイズ分離の原理

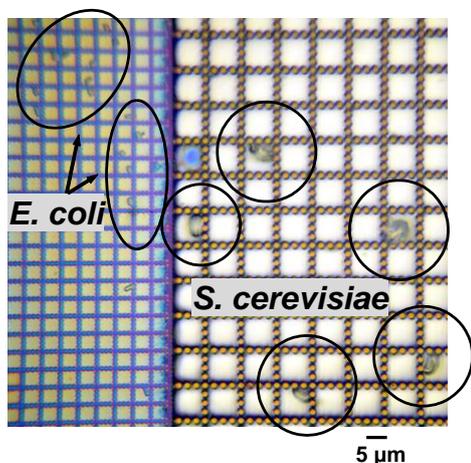


図6 大腸菌と酵母の分離用に設計製作したバイオチップによる細菌細胞の単一分離とサイズの同時分離

(3) 単一細胞の輸送のためのマイクロレンズアレイの製作

単一細胞の輸送技術については、マイクロピラーアレイ構造上での細胞輸送と上記単一細胞分離構造との融合チップの製作を目標としたプロセス技術の開発を行うこととした。細胞輸送はマイクロピラーをアレイ状に敷き詰めた平面上で行うことを想定し、裏面からのレーザー光の集光スポットに細胞をトラップし光ピンセットの機能をもたせることを想定した。石英マイクロレンズのドライエッチングにより加工を行った。これには、Arプラズマを用いたドライエッチングを用いた。マイクロレンズアレイの光学特性については半導体レーザーの光を集光することで評価し、約10 μmの焦点距離のレンズが製作できたことを確認した。酵母細胞のトラップを試みたが、光量不足のためトラップは困難であった。しかしながら、アレイ状の集光スポットを確認することができたことから、集光条件の最適化により細胞のトラップと輸送が可能となると考えられる。

以上の結果から、本研究では単一細胞分離とその輸送に関する課題の解決のための基盤技術を示すことができた。本研究で確立した技術の最適化により、細胞のマトリックス分析やコンビナトリアル分析により細胞工学、薬学分野での研究効率の向上が可能になるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

① A. Matsutani, and A. Takada, Fabrication of Silicon Microchannel for Transport of Bacterial Cells by Ar/F₂ Vapor Etching Process, Jpn. J. Appl. Phys. 査読有 52 (2013) 047001.

DOI: org/10.7567/JJAP.52.047001

② A. Matsutani and A. Takada, Microfabrication of Si and GaAs by Plasma Etching Process Using Bacterial Cells as an Etching Mask Material, Jpn. J. Appl. Phys. 査読有 51 (2012) 087001.

DOI: org/10.1143/JJAP.51.087001

[学会発表] (計14件)

① 松谷晃宏, 高田綾子, “InP基板上に製作したマイクロ罫を用いた出芽酵母の培養”, 第28回化学とマイクロ・ナノシステム学会, 3P07 (2013年12月6日, イーグレ姫路)

② 松谷晃宏, 高田綾子, マイクロ牧場アレイを用いた出芽酵母の培養, 2013年 第74回応用物理学会秋季学術講演会, 16p-A2-4, (2013年9月16日, 同志社大学)

③松谷晃宏, 高田綾子, Ar/F₂気相エッチングにより製作したSiマイクロ流路を用いた大腸菌細胞の輸送, 第4回集積化MEMS技術研究ワークショップ, P1, (2013年7月27日, 大阪府立大学)

④松谷晃宏, 高田綾子, マイクロピラー構造を用いた大腸菌と酵母の単一細胞分離とサイズ分離”, 2013年第60回応用物理学会春季学術講演会, 27p-B6-10 (2013年3月27日, 神奈川工科大学)

⑤A. Matsutani and A. Takada, Single-Cell Isolation and Sizing of Microorganisms by Microenclosure Array with Multipillar Structure, MNC2012, 1P-7-83, Kobe Japan (2012年11月1日, 神戸メリケンパークオリエンタルホテル)

⑥A. Matsutani and A. Takada, Microfabrication of Single-Cell Isolation Structure on Vertical Cavity Surface Emitting Laser Wafer, 第29回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, SPLN-10, (2012年10月23日, 北九州国際会議場)

⑦A. Matsutani, H. Ohtsuki and A. Takada, Microfabrication of Si based Microchannel for Transport of Bacterial Cells by Ar/F₂ Vapor Etching and Cl₂ Inductively Coupled Plasma Etching, 11th APCPST, 2-P83, Kyoto, Japan (2012年10月3日, 京都大学)

⑧松谷晃宏, 高田綾子, 半導体プロセスを用いた細胞サイズ分離用マイクロピラー構造の製作, 2012年秋季第73回応用物理学会学術講演会, 12p-PB3-3, (2012年9月12日, 愛媛大学・松山大学)

⑨A. Matsutani and A. Takada, Single-Cell Isolation of Bacteria Using Microenclosure and Its Applications, RSC Tokyo Conference, A001, Makuhari, Japan (2012年9月6日, 幕張メッセ)

⑩松谷晃宏, 高田綾子, Ar/F₂ 気相エッチングによる細菌細胞輸送用 Si マイクロ流路の形成, 2012年春季第59回応用物理学関係連合講演会, 18a-GP1-2, (2012年3月18日, 早稲田大学)

⑪松谷晃宏, 高田綾子, 低圧プラズマプロセスによる細菌細胞の分解と細菌細胞を用いた半導体のドライエッチング, 電気学会プラズマ/パルスパワー合同研究会, PST-11-72, PPT-11-73 (2011) pp. 5-8 (2011年12月15日, 東京工業大学)

⑫A. Matsutani and A. Takada, Dry Etching of *Escherichia coli* by O₂⁻, Ar⁻, Air⁻, and H₂O⁻ Plasma, Plasma Conference 2011 (PLASMA2011), 23P004-0, (2011年11月23日, 石川県立音楽堂)

⑬A. Matsutani and A. Takada, Fabrication of Si based Microchannel by Ar/F₂ Vapor Etching and Plasma Etching, Plasma Conference 2011 (PLASMA2011), 23P005-0, (2011年11月23日, 石川県立音楽堂)

⑭松谷晃宏, 高田綾子, Ar/F₂ 気相エッチングによる極微小径 Si マイクロ流路の形成, 第24回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2P12, (2011年11月2日, 大阪府立大学)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松谷 晃宏 (MATSUTANI, Akihiro)
東京工業大学・技術部・技術職員
研究者番号: 40397047

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高田 綾子 (TAKADA, Ayako)
東京工業大学・技術部・技術職員
研究者番号: 20401565