

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32619

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630091

研究課題名(和文) 大気圧・液中下での高精度高速加工・パターニング技術の新展開

研究課題名(英文) High accuracy and high speed processing and patterning technology under atmospheric pressure and under water condition

研究代表者

山西 陽子 (Yamanishi, Yoko)

芝浦工業大学・工学部・准教授

研究者番号：50384029

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)：本課題では代表者が発明した「指向性電界誘起マイクロナノバブル列による加工」のシーズを活用し、大気圧・液中下においてポリマー・生体組織等を低侵襲・高精度に三次元加工し、同時に気泡の気液界面に封入した試薬や遺伝子を導入する新しいパターニング技術の実用化を目指すことを目標に研究を行い、ポリマーへの蛍光試薬のパターニングのみならず生体試料(アフリカツメガエルの卵母細胞)への蛍光試薬パターニングにも成功し、研究目標を達成した。今後はより高精度、複雑な2次元遺伝子パターニングを行うことを目標に研究を続けていく。

研究成果の概要(英文)：For the present study, novel patterning technology for polymer and biological materials have been developed successfully, which is based on the the author's patent "Processing by electrically-induced directional bubbles". This precise and minimally-intrusive patterning has been carried out under atmospheric pressure and under water condition. During this project, we succeeded in patterning fluorescent solution to not only polymer material but also live Xenopus oocyte. For the future study, we continue to develop complicated two-dimensional and high-accuracy gene patterning to bio-materials.

研究分野：機械知能学

キーワード：バイオMEMS 機械知能学 マイクロTAS

### 1. 研究開始当初の背景

医療あるいはバイオ産業など生物分野では、ウェットな環境下で狙った位置の加工や遺伝子導入及び悪性細胞の局所的な死滅処理等の技術の発展が喫緊の課題となっている。このような微細加工には、電子ビーム加工装置などが利用されてきたが、大型で高額、真空中での使用になること、加工に時間がかかることなどの問題があり、加工対象の範囲を狭めてしまう等の課題があった。研究代表者はこれまで JST さきがけ研究において市販電気メスの電流増幅回路を応用し細胞スケールに照準を合わせ、対象物に対する加工の度合いに応じた出力調整を行い、マイクロ電極先端に設けたバブルリザーバとよばれる空隙を利用した指向性を有する単分散一列の気泡列の生成に成功し、それによって数 $\mu\text{m}$  オーダーの卵子の加工や生体膜やポリマー膜の加工に成功し特許を出願している(特許第 5526345 号)。本研究では大気圧液中下の微小領域における高精度パターンニング加工技術と試薬等の導入技術を確認する。この加工と導入を同時に行う技術は他に例がなく、この技術を用いることで大気圧液中下の構造物に高精度パターンニングを行ない・試薬や IC タグ等を打ち込むことが可能となる。

### 2. 研究の目的

本課題では代表者が発明した「指向性電界誘起マイクロナノバブル列による加工」のシーズを活用し、大気圧・液中下においてポリマー・生体組織等を低侵襲・高精度に三次元加工し、同時に気泡の気液界面に封入した試薬や遺伝子を導入する新しいパターンニング技術の実用化を目指す。さらに狙った位置の気泡のみの圧壊より、数十 nm~数 $\mu\text{m}$  の加工精度とインジェクションを同時に行うことを目標とする。具体的には特許申請済の特殊構造を有するガラス電極に試薬を供給できる機構を作り誘電泳動により気泡の軌道を制御し高精度パターンニングを行う。さらに圧電素子を電極に取り付けることで疎密波を発生させ、一列に発生している気泡のうち波が重なった箇所の一つのみ圧壊し、キャビテーション現象による革新的低侵襲加工技術の開発を行うものとする。

### 3. 研究の方法

上記研究目的を達成すべく「指向性電界誘起マイクロナノバブル列による加工」技術を基本としてまず取り組んだのは、低侵襲細胞加工技術の構築である。

従来先端に空隙構造を有するガラス電極の先端部を工夫して、先端のガラス管を肉厚に丸める加工をマイクロフォーシによって行うことにより、出口オリフィス径が  $10\mu\text{m}$  から  $2\sim 4\mu\text{m}$  程度まで小さくすることに成功し、さらに従来であればそのような小さい径であると、高周波電圧をかければ吹き飛んでいたものが、強靱な構造となり、気泡発射

時の衝撃に耐えられるようになった(図 1)。この構造のメスを使用してウシ卵子を穿孔した結果穿孔径が数 $\mu\text{m}$  オーダーと従来の  $1/10$  程度まで抑えることに成功した(図 2)。また、この先端肉厚形状のプロブから発生する気泡キャビテーションについてハイスピードカメラで撮影したところマイクロジェットを確認し低侵襲加工のメカニズムの一端を捉えることもできた(図 3)。

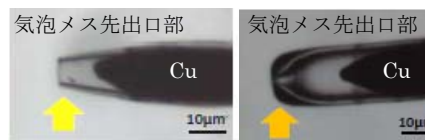


図 1. 低侵襲インジェクションのためのメス先端構造の工夫

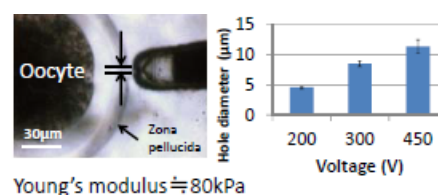


図 2. ウシ卵子の穿孔径の低侵襲化。

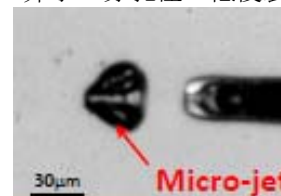


図 3. キャビテーション時のマイクロジェットの画像(1,000,000fps)。

次に取り組んだ研究は高精度パターンニング技術の構築である。軌道制御は当初は誘電泳動等による制御を行う予定であったが、電界誘起部の電界が予想以上に大きく、発射される気泡の速度も大きかったことより、軌道応答について思った以上の高精度制御を達成することが困難であった。そこで、シンプルに発生する気泡の指向性を用いてマイクロマニピュレータで軌道を  $1\mu\text{m}$  オーダーで制御することに成功し(図 4)、ポリマーやアフリカツメカエルなどの生体組織に試薬をパターンニングすることに成功した。

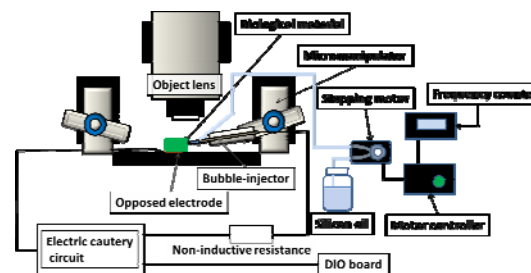


図 4. マイクロマニピュレータを用いた電界誘起気泡の生体組織へのパターンニングプラットフォーム

#### 4. 研究成果

本研究課題における成果として、様々な硬さの対象物に、液中、空気中問わず低侵襲かつ局所的に試薬導入可能なインジェクションデバイスとして、針なし気泡注射器を作製することに成功し、その穿孔径を評価した。ウシ卵子の透明帯には直径 4  $\mu\text{m}$ -11  $\mu\text{m}$  程度の穿孔能力を示した。

また、アフリカツメガエル卵母細胞へ文字列をパターンニングすることにも図 5 に示すように成功し、単一点だけでなく、連続的に 2 次元パターンをインジェクションできることにも成功した。

アフリカツメガエル卵子へのインジェクションは通常ガラスキャピラリーを用いて行うマイクロインジェクション法を用いるが [1]、オペレーターには高い技術力が求められ、また細胞にガラス管を突き刺すためにガラス管が折れたり、詰まったりするという課題があった。針なし気泡注射器は細胞内に直接針を刺さないためこのような問題はなく、よりユーザーにとって使いやすいデバイスと成り得る。針なし気泡注射器の局所試薬導入能力と低侵襲性のデモンストレーションとして、アフリカツメガエル卵母細胞の動物極側に文字列として「SIT」の文字をパターンニングした。インジェクション部分の孔の大きさは数  $\mu\text{m}$ ~30 $\mu\text{m}$  程度であった。図 5 (a) にパターンニング前の卵母細胞を、(b) にパターンニングされたアフリカツメガエル卵母細胞を示す。図 6 は導入した 2 次元パターンの蛍光試薬が光っている画像を捉えたものである。本技術は、遺伝子導入などの分野への貢献を目指し、今後は更なる低侵襲化、導入効率の向上を行い、実用化へ向けて開発を進めていく。

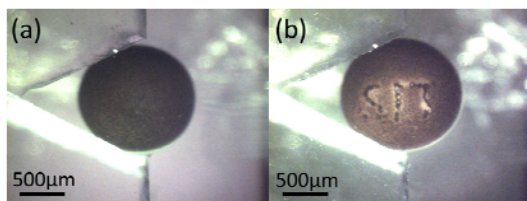


図 5. (a)PDMS のプラットフォームに把持したアフリカツメガエルの卵子(b)電界誘起気泡によって表面に描かれたパターン。

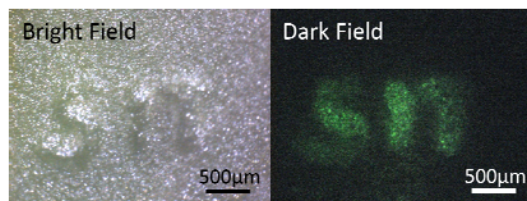


図 6. ツメカエル卵子に描かれたパターンを明視野と暗視野で観察した写真。

#### <引用文献>

[1] Trendelenburg, F. M., et al., “DNA injections into Xenopus embryos: fate of injected DNA in relation to formation of embryonic nuclei,” J. Embryol. exp. Morph. 97 Supplement, pp. 243-255, 1986.

#### 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)

①山西 陽子, 電界誘起気泡メスと機能性界面, 生体の科学, Vol. 65, 2014, p. 510-511.

②山西 陽子, 電界・プラズマを利用したマイクロバブル射出による細胞加工, 日本機械学会誌, Vol. 117, 2014, p. 28-31.

③山西 陽子, 電界誘起気泡による針なし注射器, 自動車技術, Vol. 69, 2015, p. 86-87.

[学会発表] (計 5 件)

①Yoko Yamanishi, “Emerging Functions of Electrically-induced Bubble Knife”, 水素先端世界フォーラム 2015 (HYDROGENIUS 研究シンポジウム), 2015 年 2 月 4 日, 九州大学伊都キャンパス.

②山西陽子, “電界誘起気泡による機能創発”, No14-173 バイオロボティクス 特別講演会, 日本機械学会, 2015 年 2 月 23 日, 信州大学繊維学部.

③山西陽子, “電界・プラズマを利用したマイクロバブル射出による機能創発”, 第 7 回超音波とマイクロバブルの相互作用に関するシンポジウム, 2014 年 12 月 19 日, 横浜国大.

④山西陽子, “電界誘起気泡メスによる機能創発”, 日本機械学会熱工学部門, 熱工学カンファレンス, 2014 年 11 月 8 日, 芝浦工大豊洲キャンパス.

⑤Yoko Yamanishi, “Emergent Functions of Electrically-Induced Bubbles”, IUMRS-ICA2014, 2014 年 8 月 24 日, 福岡大学.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

①名称: 気泡噴出部材、気液噴出部材、局所アブレーション装置及び局所インジェクション装置

発明者: 山西 陽子, 高橋和基, 小見 駿

権利者: JST

種類：特許  
番号：特願 2014-201440  
出願年月日：2014 年 11 月 07 日  
国内外の別：国内

②名称：有機結晶加工用チップ、有機結晶回転装置及び有機結晶加工装置  
発明者：山西 陽子，高澤 曹，周 澤道  
権利者：JST  
種類：特許  
番号：特願 2014-213243  
出願年月日：2014 年 10 月 17 日  
国内外の別：国内

③名称：気泡噴出チップ、局所アブレーション装置及び局所アブレーション方法、並びにインジェクション装置及びインジェクション方法  
発明者：山西 陽子，濱野洋平，神林 卓也  
権利者：JST  
種類：特許  
番号：特願 2014-201440  
出願年月日：2014 年 9 月 30 日  
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sic.shibaura-it.ac.jp/~yoko/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山西 陽子 (YAMANISHI, Yoko)

芝浦工業大学工学部機械工学科・准教授

研究者番号：50384029

(2) 研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号：