

博士学位論文

神経細胞の分化を誘導する  
マイクロ流体システムの構築

中島雄太

# 目次

第1章	序論	5
1.1	研究の背景	5
1.1.1	再生医療における幹細胞の分化	5
1.1.2	バイオニック医療における神経細胞の軸索誘導	7
1.2	研究の目的と意義	10
1.3	従来の研究	13
1.4	論文の構成	16
第2章	薬剤放出用ナノホールと放出制御用マイクロバルブの製作 および評価	17
2.1	緒言	17
2.2	薬剤放出用ナノホール	19
2.2.1	ナノホールの構成	19
2.2.2	ナノホールの製作	20
2.2.3	ナノホールからの蛍光色素放出実験	23
2.3	薬剤放出制御用マイクロバルブ	29
2.3.1	マイクロバルブの構成	30
2.3.2	マイクロバルブの開閉原理	35
2.3.3	マイクロバルブの製作	36
2.3.4	マイクロバルブの開閉実験	41
2.3.5	マイクロバルブの連続開閉駆動	47
2.4	培地を使ったバルブの開閉動作を実現するマイクロバルブ	53
2.4.1	培地を使った場合のバルブ開閉実験	53
2.4.2	培地のハンドリングが可能なマイクロバルブ	55
2.4.3	培地ハンドリング用バルブの開閉動作評価	56
2.4.4	培地ハンドリング用バルブの連続駆動評価	60
2.5	結言	65

第 3 章	薬剤放出制御デバイスの製作および評価 .....	67
3.1	緒言 .....	67
3.2	蛍光強度と濃度の関係 .....	68
3.3	薬剤放出制御デバイス .....	71
3.3.2	薬剤放出制御デバイスの構成 .....	71
3.3.3	薬剤放出制御デバイスの製作 .....	73
3.3.4	蛍光色素放出制御実験 .....	75
3.3.5	バルブ開閉による放出制御 .....	77
3.3.6	放出される蛍光色素の濃度制御 .....	80
3.4	Coventor Ware <sup>TM</sup> による放出制御シミュレーション .....	87
3.4.2	Coventor Ware <sup>TM</sup> の概要 .....	87
3.4.3	デバイスのモデル化と境界条件 .....	88
3.4.4	放出シミュレーションと実験値との比較 .....	91
3.5	結言 .....	95
第 4 章	構築したデバイスによる細胞の分化誘導 .....	96
4.1	緒言 .....	96
4.2	デバイス上での細胞刺激のための基礎実験 .....	99
4.2.1	顕微鏡下での軸索伸長 .....	99
4.2.2	培養チャンバ内での細胞培養 .....	100
4.3	NGF による PC12 細胞の分化誘導 .....	102
4.3.1	PC12 細胞への刺激実験 .....	103
4.3.2	ナノホールからの NGF 放出による細胞分化誘導 .....	105
4.3.3	バルブの開閉による培養細胞の分化誘導 .....	107
4.4	結言 .....	115
第 5 章	結論 .....	116
5.1	結論 .....	116
5.2	今後の課題 .....	119
参考文献	.....	120
付録	.....	128
A:	ナノホールの製作プロセスの詳細 .....	128
B:	Cytop 膜を使ったマイクロバルブの製作プロセス .....	130
C:	SAM 膜を使ったマイクロバルブの製作プロセス .....	133
D:	神経成長因子放出制御デバイスの製作プロセス .....	135
E:	神経成長因子放出制御デバイスの製作プロセス (Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> 膜付 SOI 基板の場合)	

.....	139
F: アクアミカ（NP110 10 %, AZ corp.）の塗布条件.....	143
G: 神経成長因子（NGF）の物性と様々な成長・分化因子 .....	143
H: 細胞周期制御プロトコール .....	146
研究業績.....	147
A: 学術論文 .....	147
B: 国際学会 .....	147
C: 国内学会 .....	148
D: 受賞歴 .....	149
謝辞.....	150

# 第1章 序論

## 1.1 研究の背景

事故や病気によって損なわれた生体の細胞，組織，器官の再生や，その機能を回復させることを目的とした医療技術が注目されており，これまでの技術では治療が望めず回復が困難とされてきた病気や機能障害，機能不全に陥った生体組織・臓器を回復に導く手段になると期待されている．また，生体の失った機能を代行する装置と生体とを結びつけることによって，失った機能を代替的に回復させる医療への期待も大きい．このような医療形態は再生医療やバイオニック医療と呼ばれている．本研究では，これらの医療の発展に貢献できる技術の構築を目指しており，微小なデバイスを構築し，そのデバイス上で培養した細胞に対して化学的な刺激を与えることによって，薬剤刺激に対する細胞の反応や分化挙動，軸索の伸長挙動を観測し把握する．これにより，細胞の分化あるいは軸索の伸長誘導のための刺激方法を検討することで，再生医療における幹細胞の分化誘導やバイオニック医療における軸索の伸長誘導を実現できる技術への応用が期待できる．

### 1.1.1 再生医療における幹細胞の分化

再生医療とは，人工的に培養した自分自身の細胞，あるいは動物の細胞に対して外から何らかの刺激を与えることによって，その細胞のもつ能力を発揮させて失った臓器や組織を作り直したり，欠損，傷害された生体組織を再生あるいは荒廃した臓器機能を回復させたりする医療のことである[91][92]．この医療を実現する中で，最も注目されている技術の一つは幹細胞の分化誘導である．幹細胞とは，Fig.1.1 に示すように，様々な細胞系譜に分化する能力（多様性）と多様性を維持したまま分化する能力（自己複製能力）を兼ね備えた未分化の細胞であり，組織の発生・修復・維持に重要な役割を果たす細胞のこと[6]をいう．幹細胞を使い種々の機能細胞へと分化誘導する研究が行われており，糖尿病治療のためのインスリン産生細胞を作り出す[21]ことや ES 幹細胞から神経幹細胞さらにニューロンやグリア細胞を作り出す

[41]ことなどに成功しているが、現段階では、幹細胞の遺伝子発現のパターンやそのメカニズムなどのさまざまな特性は明らかになっておらず、幹細胞を目的の細胞へと分化させる技術の完成にはほど遠い状況である。

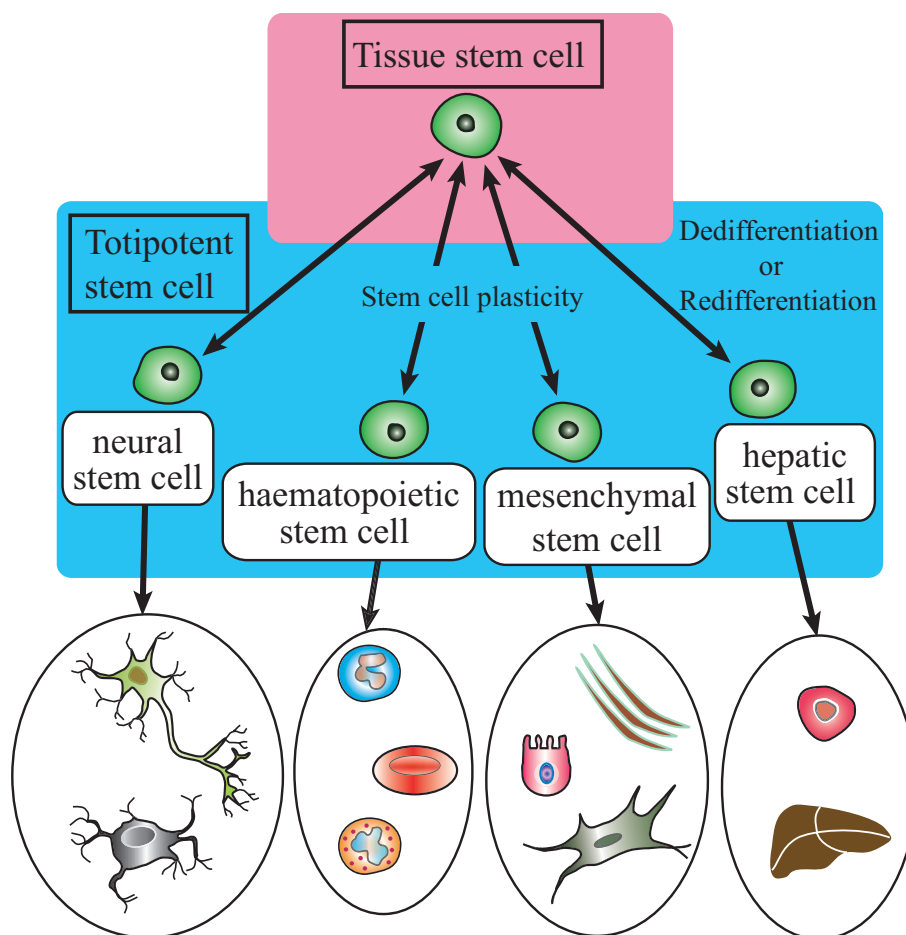


Fig.1.1 幹細胞の分化

また、幹細胞は大きく分けて2種類あり、ひとつは胚性幹細胞（ES細胞）のように固体を形成する全ての細胞に分化可能な全能性幹細胞である。もうひとつは、ある特定の組織・臓器を構成する細胞に局限した多分化能をもつ臓器特異的幹細胞（体性幹細胞、組織幹細胞とも呼ばれる）である。ES細胞から神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞へと分化し、さらに神経や血管、皮膚、目、耳、骨、筋肉などの身体の組織や臓器を形づくるさまざまな個別の細胞を作り出すことができる。

特に、神経幹細胞や肝幹細胞は生体外での培養が可能[23][24]なことから再生医療への応用が期待されている。これら全ての幹細胞を治療に使う場合、機能の異常や損傷を起こした再生させたい身体組織に幹細胞を注入し、その周囲の環境からの刺激によって特定の細胞に分化させることが理想的であるが、幹細胞は多様性であるため周囲の刺激によって特定の機能を有する細胞に分化させることは現在の技術では困難であり、実現されていない。幹細胞を早期に医療へと応用する意味でも、分化の特性や刺激に対する反応や挙動を把握することが極めて重要である。

これまでは身体の一部あるいはその機能が失われた場合、臓器移植や人工臓器が主な治療法であり、最近では皮膚や骨の分野において、組織移植などの再生医療が実用化されており臨床応用されている。しかし、その他の分野での組織や機能の再生・回復技術は確立されておらず、幹細胞の分化誘導・増殖制御技術の確立が期待されている。

### 1.1.2 バイオニック医療における神経細胞の軸索誘導

バイオニック医療とは、義手や人工関節、人工心臓などの生体機能代行装置を脳や神経と神経インタフェースデバイスを介して接続し、神経系からの信号により直接制御したり装置からの信号を神経に伝えたりすることによって、生体の失われた機能を代替的に回復させる人工機器と生体とを融合させるような医療のことである。神経インタフェースとは、生体の中枢神経系と末梢神経系あるいは人工機器とを融合させるデバイスのことであり、このデバイスによって神経の活動電位を検出する研究が盛んに行われている[26][27]。特に、マイクロマシン技術を使って構築するデバイスは製作に再現性があり、1つの基板上に複数の電極やヒータやポンプなどの様々な要素を同時に製作できる利点があるため、多用されている。

現在までにマイクロマシン技術を用いて製作された神経インタフェースの主な電極として、神経再生電極が挙げられる。この電極は、神経再生[93]を利用したものであり、切断した神経と神経の間に電極を挟んで再生させるものである。このデバイスは、神経の再生後にデバイスと神経が一体化するため体内に埋め込むという点で優れている。しかし、神経を一度切断した際、再生には数ヶ月を要する点や切断した神経束内にある神経のうちのごく一部しか再生できず神経に大きなダメージを与えてしまう点などの問題が存在する。したがって、神経に大きなダメージを与えることなく、マイクロデバイスによって人工的に望みの電極まで神経軸索を誘導することができれば、多数の神経と電極とを確実に接続することができ、生体からの信号を正確に計測することが可能となるため、生体と生体機能代行装置とを真に結びつける神経再生電極の実現に近づく。

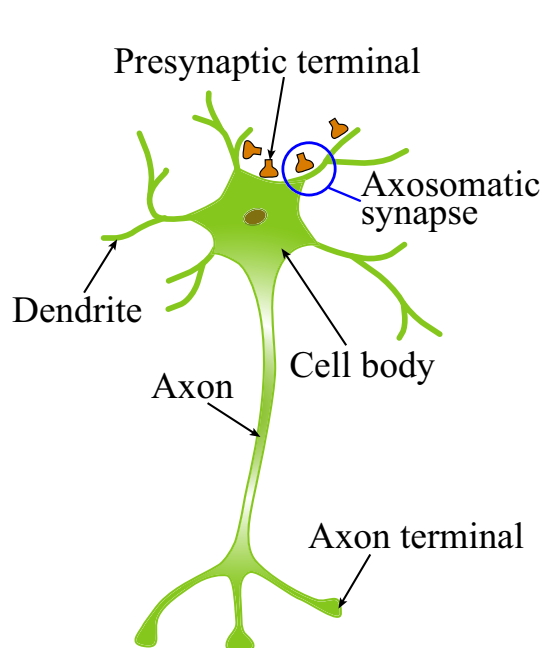


Fig.1.2 神経細胞

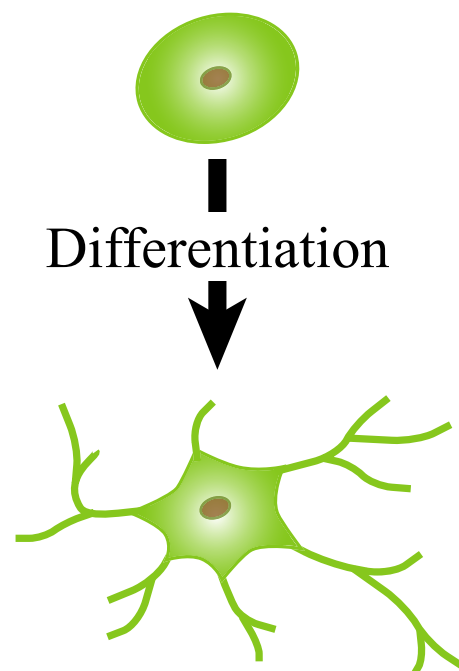


Fig.1.3 神経成長因子を投与した場合の軸索伸長

神経細胞の特徴は、Fig.1.2 に示すように、細胞核をもつ細胞体（Cell body）と細胞体から枝のような突起部分の樹状突起（Dendrite）、細胞体から 1 本長く伸びる軸索（Axon）が存在していることであり、一般的な細胞体の直径は数 $\mu\text{m}$ ～100  $\mu\text{m}$  程度である。したがって、細胞一つ一つの操作や細胞の寸法に合わせた電極あるいは構造物を構築するのに、サブミクロン以下の加工を可能とするマイクロマシン技術は有用である。また、細胞体から伸びる軸索は神経細胞と神経細胞を結ぶケーブルのようなものであり、相手側の神経細胞の樹状突起に近いところで末端部分が多数の細かい枝にわかれ、他の神経細胞体や樹状突起、効果器（筋や腺）に接続する[10][11][12]。このように神経軸索末端が他の神経細胞体と接続している部分はシナプスと呼ばれ、シナプス結合した部分で神経細胞間の情報のやり取りを行っている。細胞体から樹状突起や軸索を伸ばすためには、神経成長因子（Nerve growth factor, NGF）などの伸長や増殖を促進させる物質が必要であり、培養細胞においては NGF を投与することによって Fig.1.3 に示すように球状の細胞体が扁平・肥大化し軸索を伸長させる。実際に神経同士がネットワークを形成する場合には、ある任意の神経細胞が NGF を分泌すると、その神経とシナプス結合するべく別の神経がそれを認識し、NGF 濃度の高い方向に軸索を伸長させ NGF を分泌した神経までたどり着くこと



によってシナプス結合が構築される[15]. このようなことが神経細胞で同時に選択的になされることによって複雑な神経系が形成されていくと考えられている. 現時点では, 神経系の形成メカニズムは正確にわかっておらず, 刺激を与えられた細胞の挙動観察や刺激を受けた細胞が放出する神経伝達物質の計測などによって神経系の形成メカニズムを解明できる可能性がある. また, 神経にダメージを与えずに神経電位を計測するための神経電極と神経軸索とを確実に接続する技術も構築されておらず, 神経と電極を非侵襲で確実に接続する技術の開発が求められている. これらの点で, 軸索の伸長を人工的に誘導する技術の構築は必要である.

## 1.2 研究の目的と意義

本研究の目的は、半導体加工技術を中心としたマイクロマシン技術を駆使して、培養細胞に対して精密な化学的刺激を与えることができるマイクロシステムを実現することである。すなわち、構築したシステム上で細胞を培養し、細胞への化学的な刺激を制御することによって細胞の分化や成長、軸索の伸長を誘導することができるマイクロ流体システムの構築を目的とする。本研究で構築するマイクロ流体システムは、細胞に対して微量の薬剤を放出するための微小孔、薬剤の放出を精密に制御するためのマイクロバルブ、細胞を培養するためのチャンバから構成される。本論文では、まず最初に、これらの要素それぞれを独立して製作し、システムの構成要素として使用可能であることを実証する。その後、全ての要素を同一基板上にシステム化したデバイスを構築し、デバイスの特性や薬剤放出の制御性を評価する。さらにデバイス上に細胞を培養し、細胞に対して化学的な刺激を与えることによって、刺激に対する細胞の反応や挙動を観測・評価する。

マイクロマシン技術 (Micro Electro Mechanical Systems , MEMS) における加工精度はサブミクロンから数ミクロンであり、これは一般的な細胞単体よりも小さく、神経線維の直径と同程度であるため、寸法面ではマイクロマシン技術を利用して細胞の培養や刺激、あるいは計測を行うシステムの構築は可能である。マイクロマシン技術とは、半導体加工プロセス技術や微細加工装置などによる微細加工技術を用いて微小機械要素を製作する技術である。この技術を駆使することにより、流路やバルブなどのさまざまな機械的要素を容易に微小化でき、多機能を集積することができる。また、半導体集積回路と同じように、エッチングやリソグラフィなどのバッチプロセスで製作するため、組み立てが不要であり再現性良く製作することができる。さらには、電子回路やセンサなどの電気的要素も集積可能なため、将来的にシステムを拡張することも可能である。

本研究では、この技術を使って細胞を培養するためのチャンバと細胞に刺激を与えるための  $1\text{ }\mu\text{m}$  以下の微小孔、微小孔から放出する薬剤を制御するマイクロバルブ、薬剤を導入するためのマイクロチャネルをそれぞれ極近傍にシステム化したデバイスを構築する。これによって、細胞への薬剤刺激を精密に制御することが可能になる。幹細胞を特定の機能を有する細胞へと分化させるためには、幹細胞に適切なタイミングで化学物質を与える必要がある[7]、どのタイミングで刺激を行えば、どんな遺伝子を発現するのかを解明し、その特性などを明らかにすることが重要である。したがって、幹細胞を特定の細胞に分化させる点やその特性を探索する点で、細胞に対して精密に刺激することができるマイクロシステムの構築は重要である。

また、薬剤を放出するための微小孔は細胞体から伸びる軸索末端の典型的な直径寸法よりも小さい  $1\text{ }\mu\text{m}$  以下のものであり、細胞体や神経軸索が微小孔を通ることが

できない。神経細胞から伸びる軸索は、神経成長因子（Nerve Growth Factor, NGF）というタンパク質の濃度勾配に従って伸長する[18]ため、微小孔からの NGF 放出を精密に制御し人工的に濃度勾配を形成すれば、軸索を微小孔の方向へ誘導することができ、神経再生電極[28]の電極の周りに薬剤の放出を精密に制御できるシステムを集積すれば、神経系と生体機能代行装置とを確実に結びつけるの神経再生電極の実現へ大きく貢献でき、バイオニック医療の発展へ寄与することができると考えられる。

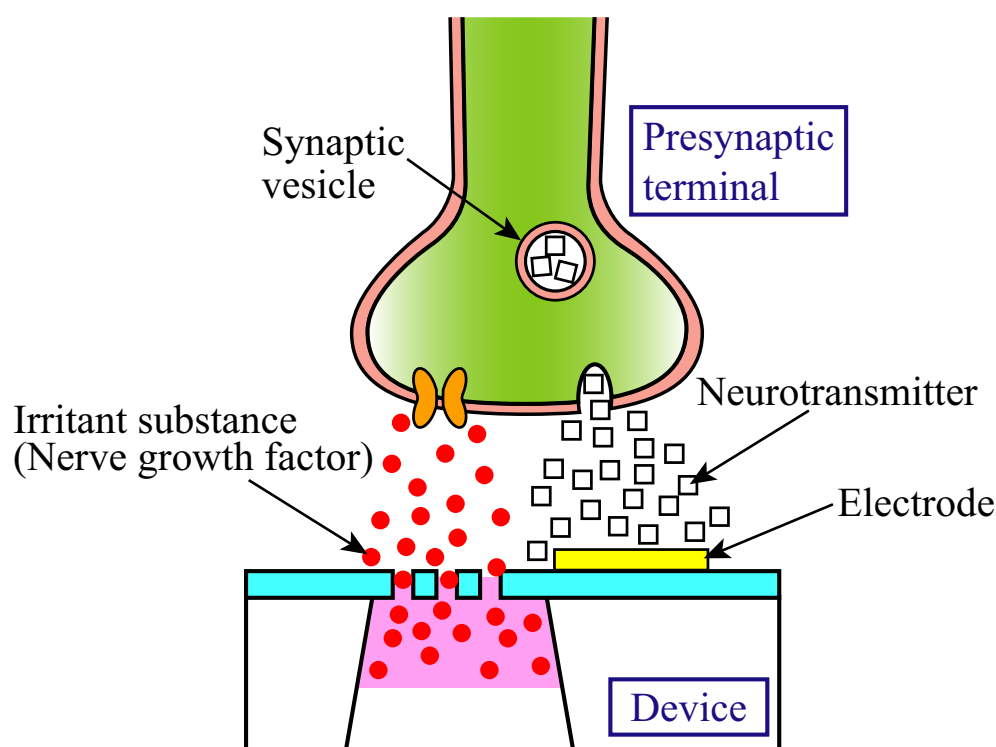


Fig.1.4 細胞とデバイスとの擬似的なシナプス結合

このように、バルブと直径  $1\ \mu\text{m}$  以下の微小孔を極近傍に構築し、薬剤放出のタイミングを精密に制御できるデバイスを構築した例は過去に無く、細胞に対して直接刺激を行う手法とその刺激の制御性の点で大きな意義を持つ。また、デバイスの薬剤放出用微小孔の近傍に細胞の反応や機能の発現を計測する電極などのシステムを集積できれば、細胞の反応を計測しながら動的な刺激を与えること可能となり、単に刺激に対する細胞の挙動を観察するだけではなく、デバイス上での細胞治療技術

や幹細胞の分化や機能発現のメカニズムを解明する技術，さらには神経インタフェースデバイスの構築など，様々な医療の実現に幅広く応用できる技術になり得る．さらに，電極周辺に誘導した軸索とデバイスとを Fig.1.4 のように擬似的にシナプス結合させることができれば，デバイスからの薬剤刺激に対して細胞から放出される伝達物質の種類や量を測定することも可能となり，正常な細胞の反応と機能の異常や障害を持つ細胞の反応とを比較・検討することができ，アルツハイマー型痴呆症やパーキンソン病などの神経系に起因する病気の解明に貢献できるツールへと応用可能であると考えられる．

### 1.3 従来の研究

本節では、本研究に関連する従来の研究を紹介する。本研究では、マイクロマシン技術を使って培養細胞に対して化学的な刺激を精密に与えることができるマイクロ流体デバイスを構築する。そのため、デバイスは細胞に対して薬剤を放出する微小孔、薬剤の放出を制御するマイクロバルブ、薬剤を導入するマイクロチャネル、細胞を培養する培養チャンバから構成されるものである。細胞に対して化学的な刺激を精密に与えるためには、これらのそれぞれの要素を互いに近接させて構築する必要がある。また、幹細胞の分化誘導や神経細胞から伸びる軸索の伸長誘導を目指しているため、薬剤を放出するための微小孔は直径寸法が  $1\text{ }\mu\text{m}$  以下である必要がある。そして、細胞に刺激を与える薬剤として培地やたんぱく質などの生体物質を使用するため、バルブの駆動には電圧源や熱源などの駆動源を必要としないものが求められる。さらに、集積化のためには微小化が可能で機械的な可動部の無い簡単な構造のバルブが必要である。

これまでに、マイクロマシン技術を使って微小孔やマイクロバルブ、マイクロチャネル、マイクロポンプなどを一枚の基板上に集積化し、 $\mu\text{TAS}$  (Micro Total Analysis Systems) [72], 薬液の運搬や投与を行う DDS (Drug Delivery Systems) [87], 細胞や DNA の運搬, 分類[73]の他にもプリンタヘッド[89]への応用を目指す研究例が存在する。これらの流体デバイスで用いられるポンプやバルブは、シリコンを主としたダイアフラムやオリフィスを形成したもの[81]や、ピエゾ素子やバイモルフなどのアクチュエータを用いて動作させるもの[83][84][88]がある。これらのポンプやバルブは、流量を大きくでき高い圧力に耐えることができるという利点があるが、駆動のためには大きな電圧が必要であり、可動部があるため寸法を小さくすることに制限がある。したがって、本研究のバルブに使用することはできない。また、微量の液体を制御する可動部の無いマイクロバルブやマイクロポンプに関しては、ヒータにより液体中に気泡を作り出し、その体積変化を利用して駆動するもの[44], 電気泳動によるポンプ[82], 空気圧を利用したポンプ[79]などがある。これらのデバイスは可動部が無く集積化も可能であるが、本研究では細胞や NGF, コラーゲンなどの生体分子を使用するため、ヒータを使用して温度を上げるものは悪影響を及ぼす可能性があり、気泡の利用によつてのコンタミの可能性、電気泳動を利用する場合、数  $100\text{ V}$  ～数  $\text{kV}$  の高電圧が必要であるため絶縁破壊などの可能性があるため、本研究で構築するバルブへの応用は難しい。その他にも、疎水性材料と空気の圧力を利用して微量の薬液を単一細胞に噴射するもの[41]や微量の液体の放出を制御するもの[43], これらは微小な液体の制御をするものであるが、バルブを開いた後に拡散を利用する本研究のバルブとは性質が異なる。本研究では、材料の表面張力を利用して液体の移動を制御し、注入側と放出側の液体間の濃度差を利用し薬剤を拡散させるものであ

る．これまでに表面張力を使ったバルブは数多く報告されている[61][62][65][66]が，本研究のように表面張力と拡散を組み合わせたバルブは過去にも研究例がなく， $\mu$ TAS への応用など微小流体の取り扱い技術に対して貢献できると考えられる．

また，微小孔を用いた研究としては，水素やメタノールなどを用いた燃料電池が発生するガスを微小孔から放出させるもの[55][56][57]や微小孔から液体を放出することにより微小液滴を作り出すもの[58]，微小孔の開いたノズルをアレイ状に配置することによりバイオアッセイなどのパターンニングに使用するもの[59][60]などがある．さらに，微小孔を利用して細胞をトラップするマイクロデバイスとしては，Si や  $\text{SiO}_2$ ，PDMS などに微小孔を製作しパッチクランプに応用するもの[49][50]やマイクロチャネル内のある部分に活動電位などを計測するための電極を作り，微小貫通孔から負圧を印加することによって電極部に細胞をトラップするもの[51][52][53]，Si 薄膜に貫通孔を設け，免疫測定のためにサンプルをふるいにかけるもの[54]などがある．これらの微小孔の全ては，数十～数  $\mu\text{m}$  の微小孔であり，培養細胞に対して微量の薬剤で刺激するためには十分な形状ではない．

一方，培養細胞の成長や軸索の伸長の制御，培養細胞への刺激制御，幹細胞の分化誘導，神経の活動電位の計測，デバイス上での神経ネットワークの形成，体内への埋め込み型デバイスの構築など，再生医療やバイオニック医療，あるいは神経系の発生のメカニズムや神経ネットワークの解明を目指したさまざまな研究・開発が盛んに行われている[25][26][27][28][29][30][31]．例えば，微小孔を通じて細胞に化学物質などを放出するマイクロデバイスとしては，細胞に対して神経伝達物質を放出する微小孔とその微小孔に神経伝達物質を供給するための流路を構築し，微小孔付近に培養した細胞を刺激するもの[45]や細胞をトラップするためのチャンバの底面に微小な貫通孔を設け，トラップした細胞に対して遺伝子を注入するもの[46]，チャネルから流した微量の試薬を，チャンバ内に培養した細胞に微小孔を通して投与するもの[47]，流路内に培養チャンバを構築し，培養チャンバの真上に薬剤を放出する微小孔を構築して細胞を刺激するもの[48]がある．また，ガラスや Si の基板上で培養細胞から伸びる軸索をある一定の方向に伸長させる研究としては，基板上に微小な流路を形成し軸索の伸長する方向をその流路内のみに制限する方法[32][33][34]がある．また，コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞接着因子を PDMS (Polydimethylsiloxane) スタンプを使ったソフトリソグラフィによってパターンニングすることにより接着因子が存在する部分にのみ細胞を接着・成長させる方法[35][36][38][39]，親水性・疎水性の表面を形成し細胞の接着性の差を利用して細胞の接着面を制御する方法，細胞の接着や形態変化に表面形状が影響を及ぼすことを利用した方法[40]などがある．これらの全ての方法は静的に細胞の成長や軸索の伸長を制御するものであり，デバイスを製作した時点で細胞の分化や伸長方向が決まってしまうため，細胞の反応に基づく動的な刺激を行うことができない．そして，細胞

を培養するチャンバとバルブ、薬剤放出孔が十分に近くに構築されていないため、薬剤の放出を精密に制御することができない。本研究で構築するデバイスのように極近傍に培養チャンバや放出孔、マイクロバルブが製作されており、直径  $1\text{ }\mu\text{m}$  以下の微小孔を通じて細胞を直接刺激できるデバイスはない。

さらに、幹細胞を特定の細胞へ分化誘導する研究は、ES 幹細胞と神経幹細胞などの臓器特異的幹細胞とを同じディッシュの中で共培養する研究が盛んに行われている。例えば、神経幹細胞はニューロンやアストロサイト、オリゴデンドロサイトに自己分化する[19][20]。この特性を利用し、ES 幹細胞と神経幹細胞（ニューロスフェア）を共培養し ES 細胞と神経幹細胞が結合したりネットワークを組んだりすることによって ES 幹細胞を神経幹細胞へ分化させ、さらにはニューロンやアストロサイト、オリゴデンドロサイトへと誘導するものがある[41]。この方法で実際に特定の細胞へと分化することが可能であるが、共培養した ES 幹細胞を全て目的の細胞へと分化誘導することはできない。また、ガラス基板上に構築したマイクロチャンバ内にヒト間葉幹細胞を培養し、圧力を加えることによって間葉幹細胞の分化誘導を行った研究もある[63]。この研究は外部からの圧力によって力学的な刺激による間葉幹細胞の分化の違いを調べたものである。実際の体内で細胞は、力学的な刺激と化学的な刺激の両刺激を受けて分化を行っているため、力学的なアプローチも必要であるが、化学的なアプローチを基にして特定の細胞への分化のメカニズムの解明を目指す本研究との立場は異なる。

## 1.4 論文の構成

本論文は5章から構成される。以下に各章の概要を紹介する。

### 第1章

本研究の背景，本研究の目的と意義，および，本研究に関連する従来の研究について述べた。

### 第2章

培養細胞への刺激を制御するためのマイクロ流体デバイスの基盤要素となる薬剤を放出するための微小孔（ナノホール）と薬剤の放出を制御するためのマイクロバルブを個々に製作し動作確認実験と評価を行う。これらのデバイスの製作方法や評価実験の結果，考察について述べる。

### 第3章

第2章で構築したナノホールとマイクロバルブを同一基板上システム化し，薬剤の放出を精密に制御できるデバイスを構築する。このデバイスは薬剤の放出孔と放出制御バルブ，細胞培養面が極近傍に構築されており，薬剤の放出を精密に制御することができる。このデバイスの製作方法や評価実験の結果，考察について述べる。

### 第4章

構築したデバイス上にPC12細胞を培養し，バルブを開閉しナノホール・アレイから神経成長因子（Nerve Growth Factor, NGF）を放出することによって刺激を行う。PC12細胞が刺激を受けた際の挙動や軸索の伸長について議論する。

### 第5章

本研究の結論をまとめ，今後の課題および展望について述べる。



## 第2章 薬剤放出用ナノホールと 放出制御用マイクロバルブの 製作および評価

### 2.1 緒言

本章では，神経細胞の分化を誘導するデバイスを実現するために必要な各要素について述べる．その要素とは，薬剤を放出するためのナノホールと放出を制御するためのマイクロバルブである．これら 2 つの要素はフォトリソグラフィやエッチングなどのマイクロマシン技術を駆使して製作される．本研究では，主に基板をエッチングして構造を形成する，いわゆるトップダウン形式によってデバイスの製作を行う．このため，エッチングを含めた製作プロセスが簡便であり，多用されている Si 基板を使用する．トップダウン形式の加工法では，基板となる材料やエッチングの方法によって形成される形状をコントロールすることができる．エッチングの方法としては，ウェットエッチングとドライエッチングの 2 つに大別される．

ウェットエッチングは液体中でエッチングを行うものであり，基板の露出した面がほぼ同じ速度でエッチングされる等方性エッチングと表面の結晶方向によってエッチング速度が大きく異なる結晶異方性エッチングがある．等方性エッチングはマスクの下側がエッチングされるサイドエッチングが起これば都合な場合があるが，犠牲層エッチングなどのプロセスを行うことが可能である．異方性エッチングは，表面から V 字型あるいは垂直の溝を作ることができ，サイドエッチングを少なくできる．また，マスクの耐久性も良く，深いエッチングを行う際に適している[1]．本研究では，細胞培養チャンバとして利用するダイアフラム構造の製作や，マイクロチャネルを製作するため，深いエッチングが可能でサイドエッチングが少ない結晶異方性ウェットエッチングを利用する．また，基板材料には n 型 Si 基板で結晶面  $\langle 100 \rangle$  面のものを使用する．

一方，ドライエッチングは，気体中でエッチングを行うものであり，反応性ガス

のプラズマ中でイオンなどが基板材料と反応し、反応生成物が気体となって除去される等方性エッチングや加速したイオンを表面に照射してエッチングするイオンエッチングなどがある。ドライエッチングはマスクの耐久性が小さいため深いエッチングに適さないが、パターン形状に依らず表面から垂直な形状のエッチングや局所的なエッチングが可能であるため、微小孔を製作する際に利用する。

次に、シリコン基板をエッチングする際の保護膜としては  $\text{SiO}_2$  膜を使用する。 $\text{SiO}_2$  膜の成膜方法はスパッタリング装置でプラズマ放電し加速された Ar イオンがターゲットに衝突することによってはじき出されたターゲットの原子を基板表面に堆積させて成膜するもの、あるいはプラズマ CVD 装置で化学的な反応を起こすことにより成膜するもの (Chemical Vapor Deposition)、シリコン基板を酸素中や水蒸気中で高温に加熱し、表面に均一な厚さの熱酸化膜を成膜するものなどがある。熱酸化で成膜される  $\text{SiO}_2$  膜は、基板の Si 原子が酸素と反応してできるため、Si の表面は元の Si 表面から基板側に酸化膜の厚さの 45 %程度分だけ入り込む[1]。したがって、熱酸化で成膜した  $\text{SiO}_2$  膜の膜質が最もよく、ウェットエッチングの際の保護膜として最も優れている。以上の点より本研究では保護膜として熱酸化による  $\text{SiO}_2$  膜を使用した。

## 2.2 薬剤放出用ナノホール

培養細胞に対して薬剤を放出するためのサブミクロンサイズの微小孔を基板内に構築した。この微小孔をナノホールと呼ぶ。ナノホールは  $\text{SiO}_2$  の自律膜を部分的にエッチングすることによって製作されており、微量の薬剤を放出することが可能である。以下にナノホールの構成と製作プロセス、放出実験の結果を示す。

### 2.2.1 ナノホールの構成

神経軸索末端の典型的な直径寸法は  $0.5 \sim 4 \mu\text{m}$  であり[15]，デバイス上で細胞に化学的な刺激を与えることによって神経細胞の分化誘導や軸索の伸長誘導を行うためには，薬剤を放出するための放出サイトの寸法を神経軸索末端よりも小さなものにする必要がある。そこで，マイクロマシン技術を駆使したシリコンの異方性エッチングと集束イオンビーム装置（Focused Ion Beam, FIB）による微細加工によって，神経軸索末端よりも小さなナノホールを構築した。ナノホールをアレイ状に配置したナノホール・アレイを SEM（SHIMADZU Co., SS-550）で観察した写真を Fig.2.1 に，その拡大写真を Fig.2.2 に示す。写真のように同形状のナノホールがアレイ状に整列していることが確認できる。これらのナノホールの径は，縦，横，深さそれぞれ 500 nm である。

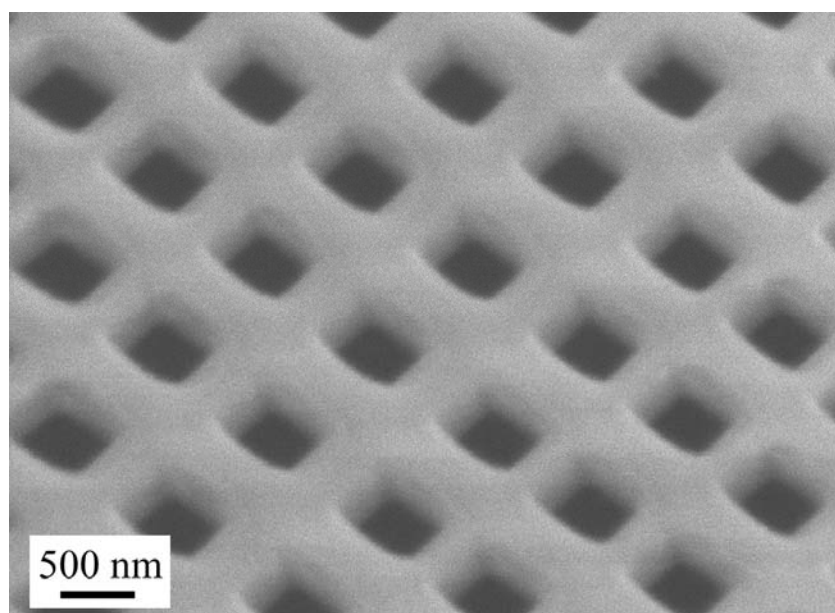


Fig.2.1 ナノホール・アレイの SEM 写真

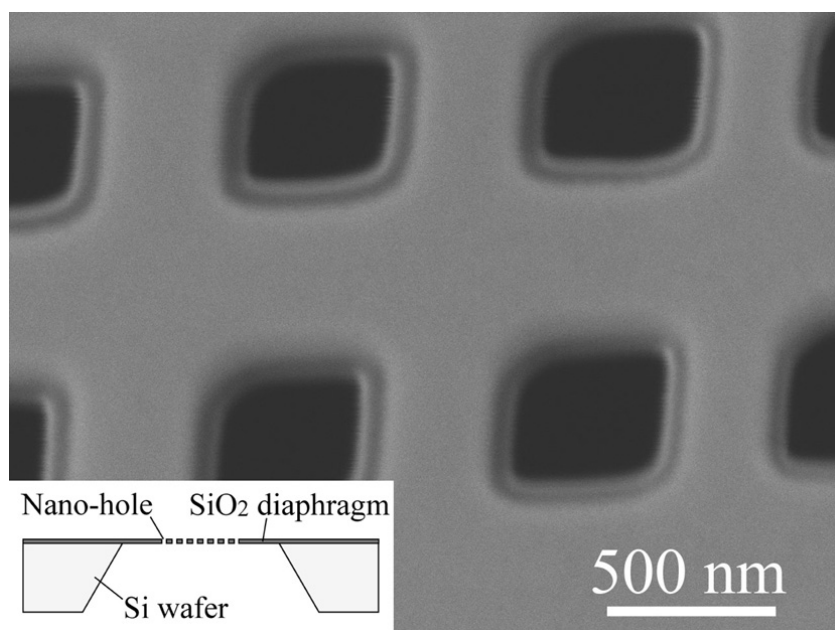


Fig.2.2 ナノホールの様子

### 2.2.2 ナノホールの製作

シリコン基板の熱酸化と結晶異方性エッチングにより、厚さ 300 nm の  $\text{SiO}_2$  の自律膜みのダイアフラム構造を形成した。そのダイアフラム面に集束イオンビーム (Focused Ion Beam, FIB) を照射することによって  $\text{SiO}_2$  膜を部分的にエッチングし、ナノホールを製作した。FIB によるエッチングを連続的に行うことによってナノホール・アレイを構築した。FIB とは  $\text{Ga}^+$  などのイオンを集束させて照射することにより、サンプルをエッチングまたはサンプルに薄膜を成膜するものである。このようなイオンビームを使った加工を行うと、マスクを使わずに直接パターンの形成ができるため、リソグラフィ工程などではできない加工が可能である[2]。また、二次電子像を観測して加工位置の検出や加工状態のその場観察が可能であり、観察しながらのエッチングや成膜などの加工を行うことができる。この特徴から、ULSI やリソグラフィマスクの検査、補修、パターンの変更や透過電子顕微鏡観測用の試料製作などの、検査・診断ツールとして重用されている。FIB 装置 (Seiko Instruments Inc., JFIB-2300) の外観を Fig.2.3 に、資料を乗せるステージ周辺の写真を Fig.2.4 に示す。

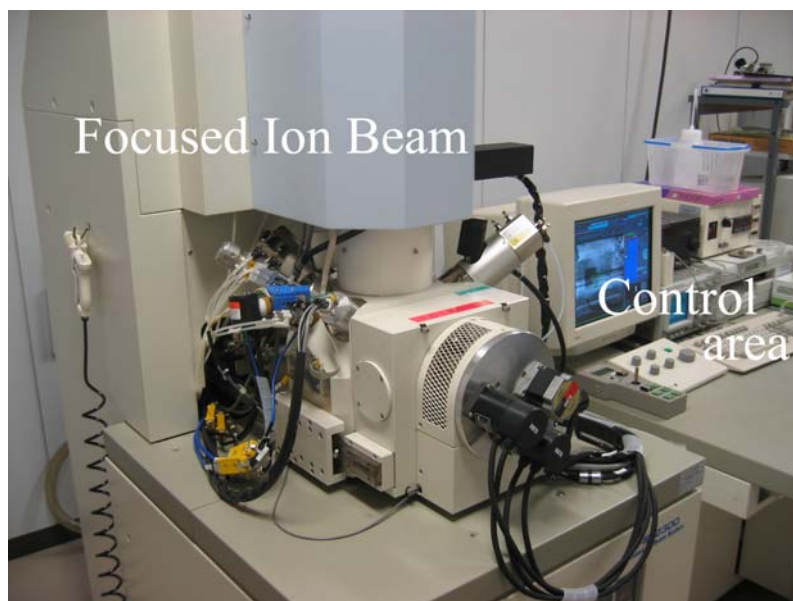


Fig.2.3 FIB 装置の外観 (Seiko Instruments Inc., JFIB-2300)

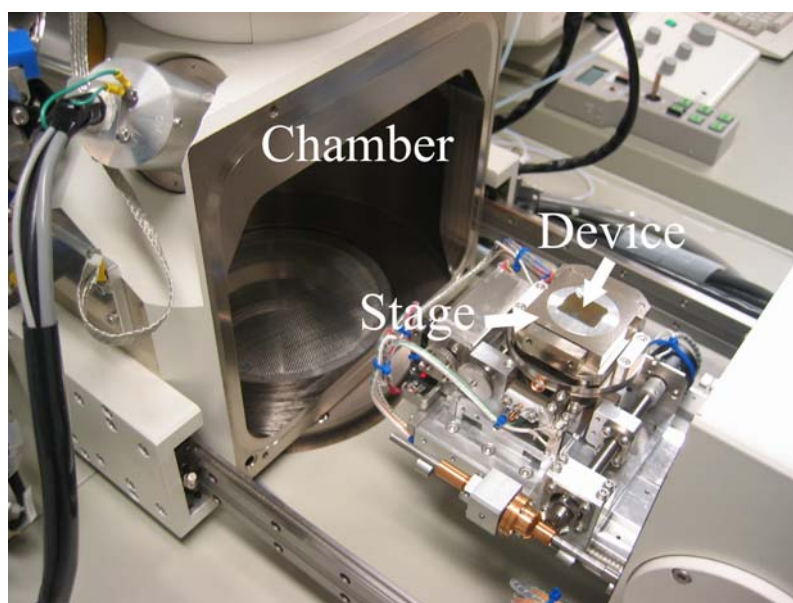


Fig.2.4 FIB 装置のステージ周辺

次に，ナノホール・アレイの製作プロセスを Fig.2.5 に示す．また，詳細は付録に記す．厚さ  $250\text{ }\mu\text{m}$  のシリコン基板をあらかじめ  $1100^{\circ}\text{C}$  に熱した熱酸化炉中（住友精密工業, IX-200, Fig.2.6）に設置する．炉の雰囲気は酸素  $1\text{ L/min}$ ，アンモニア  $120\text{ cc/min}$

が常に流されている状態であり, その状態を 3 時間保持することにより, 厚さ 300 nm の  $\text{SiO}_2$  膜を成膜する (a). 両面の  $\text{SiO}_2$  膜上にスピンのコータ (MIKASA CO., LTD, 1H-D7) を使ってネガレジスト (ZPN-1150 90cp) をコーティングし (b), 両面マスクアライナ装置 (PEM-800, Union, Fig.2.7) で紫外線を照射し露光する. その後, NMD-3 (パラメータを書く) で現像して基板の鏡面側にパターンを描く (c). 次に, レジストをマスクとしてフッ酸中にフッ化水素アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{HF}_2$ , 15.1 %) to フッ化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{F}$ , 26 %) が含有したバッファードフッ酸 (BHF) に浸すことにより  $\text{SiO}_2$  膜を除去する (d). アセトンとエタノールでレジストを除去し,  $\text{SiO}_2$  膜をマスクにして TMAH (水酸化テトラメチルアンモニウム) で結晶異方性エッチングを行い,  $\text{SiO}_2$  の自律膜のみのダイアフラム構造を構築する (e). さらに, FIB でガリウムイオン・ビームを集束させ, ビーム径 65 nm, プローブ電流 320 pA で 30 sec 程度照射することにより,  $\text{SiO}_2$  自律膜を部分的にエッチングする (f). これにより, 内径 100~500 nm のナノホールを構築することができる. この加工を連続的に行うことによりナノホール・アレイを製作する. FIB の最小口径は 2 nm であるため, 理論的にはそれと同程度のエッチングまで可能である.

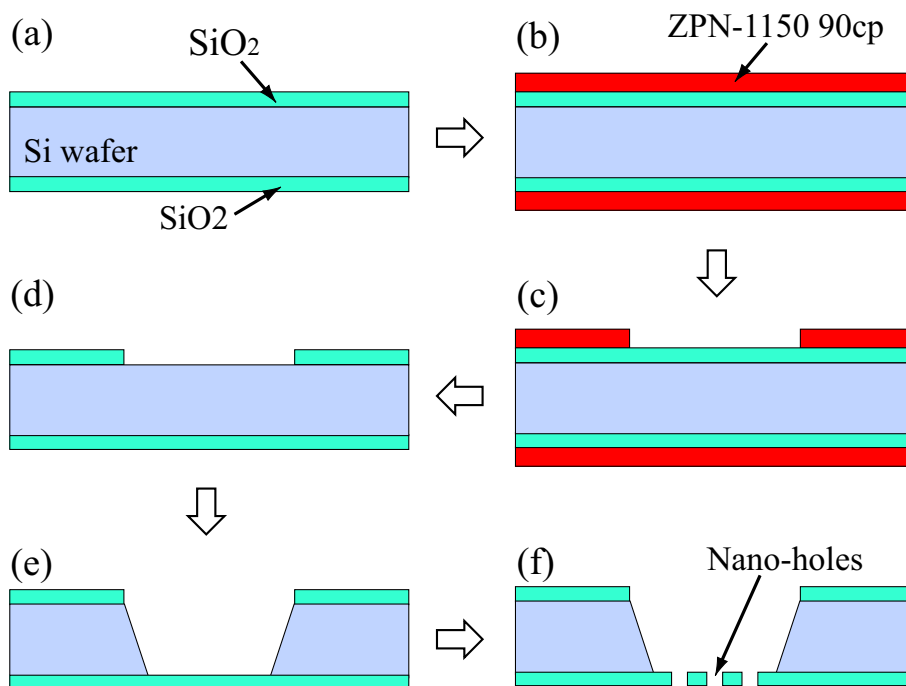


Fig.2.5 ナノホール・アレイの製作プロセス

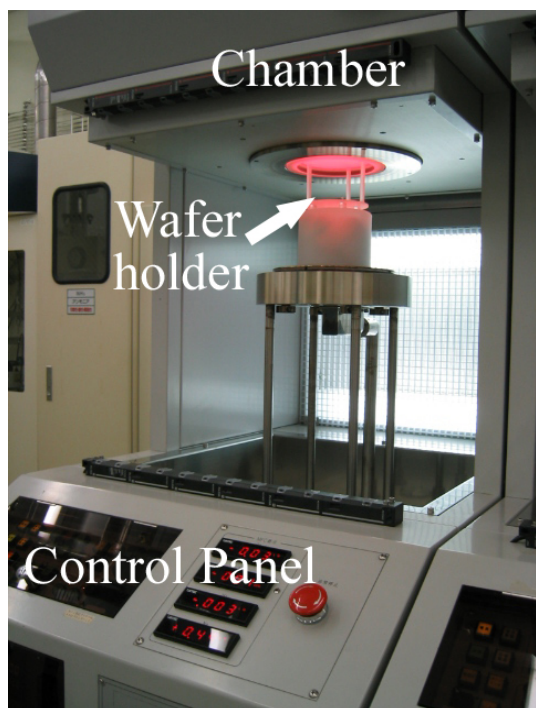


Fig.2.6 熱酸化炉（住友精密工業，IX-200）



Fig.2.7 両面マスクアライナ装置（PEM-800, Union）

### 2.2.3 ナノホールからの蛍光色素放出実験

本実験では製作したナノホール・アレイが化学物質放出サイトとして機能し，放出物質の空間的な濃度勾配を作り出すことができるかどうかを蛍光観察により確認した．観察には蛍光倒立顕微鏡を使用し，ダイアフラムに溜めた蛍光溶液がナノホールを通じて放出してくる様子を観察した．蛍光色素を使った観察を行うことによって，ナノホール・アレイから蛍光色素が放出する様子を捉えることができるだけでなく，放出の様子を蛍光色素の蛍光強度として捉えることができるため，放出の様子を定量的に評価できる．

ここで，蛍光色素は Rhodamine B（Molecular Probes, Inc. R-648）を使用した．この色素は主にミトコンドリアの染色などに用いられる色素である．Table2.1 に Rhodamine B の特性を示す．また，以下に実験手順を説明する．また，実験の概略図を Fig.2.8 に，装置の構成を Fig.2.9 示す．

- (1) 蛍光色素を超純水に溶かした蛍光溶液を調製する．
- (2) プーラー（NARISHIGE, PC-10）で熱と荷重をかけることにより先端径が数  $\mu\text{m}$  の先のとがったガラスピペットを製作する．



- (3) シリンジポンプ (NARISHIGE, IM-9B) とタイゴンチューブ (SAINT-GOBAIN, R-3603) を接続し、チューブの先端に製作したガラスピペットを接続する。
- (4) シリンジポンプとチューブを超純水で満たし、ガラスピペットの先端のみに蛍光色素を注入する。
- (5) シャーレ内にデバイスを支えるためのシリコン基板を設置し、その上にナノホール・アレイを構築したシリコン基板を固定する。デバイスとシャーレの間を超純水で満たす。
- (6) ガラスピペットをマイクロマニピレータ (NARISHIGE, MWS-2) にセットする。CCD カメラ (HIROX, MX1060Z) の映像を見ながらマイクロマニピレータを操作し、マニピレータにセットしたガラスピペットを蛍光溶液の注入場所へ移動させる。
- (7) シリンジポンプを操作し、ガラスピペットから蛍光色素を微量だけ注入する。
- (8) あらかじめ満たしておいた超純水と蛍光溶液が接触することによりナノホールから拡散放出する様子を蛍光倒立顕微鏡 (Nikon, TE2000-U) で観察する。蛍光色素の発光は微弱であり、自然光によっても励起されて劣化するため、暗幕の中で観察を行う。

実験初期の段階では、上記 (5) のようにデバイスとシャーレの間を超純水で満たさずに観察を行おうとしていたが、ナノホールの径が 100 nm～500 nm 程度であるため、表面張力の影響で液体がナノホール・アレイを通して放出してくることは無かった。そのため、デバイスとシャーレの間に超純水を溜めることによって、ダイアフラム内に注入された蛍光溶液と超純水が接触し、拡散によって蛍光色素を放出することに成功した。

Table2.1 Rhodamine B の特性

項目	物性値
製品名称	Rhodamine B, hexyl ester, perchlorate
分子式	$C_{34}H_{43}ClN_2O_7$
分子量	627.18
吸光波長	556 nm
蛍光波長	578 nm



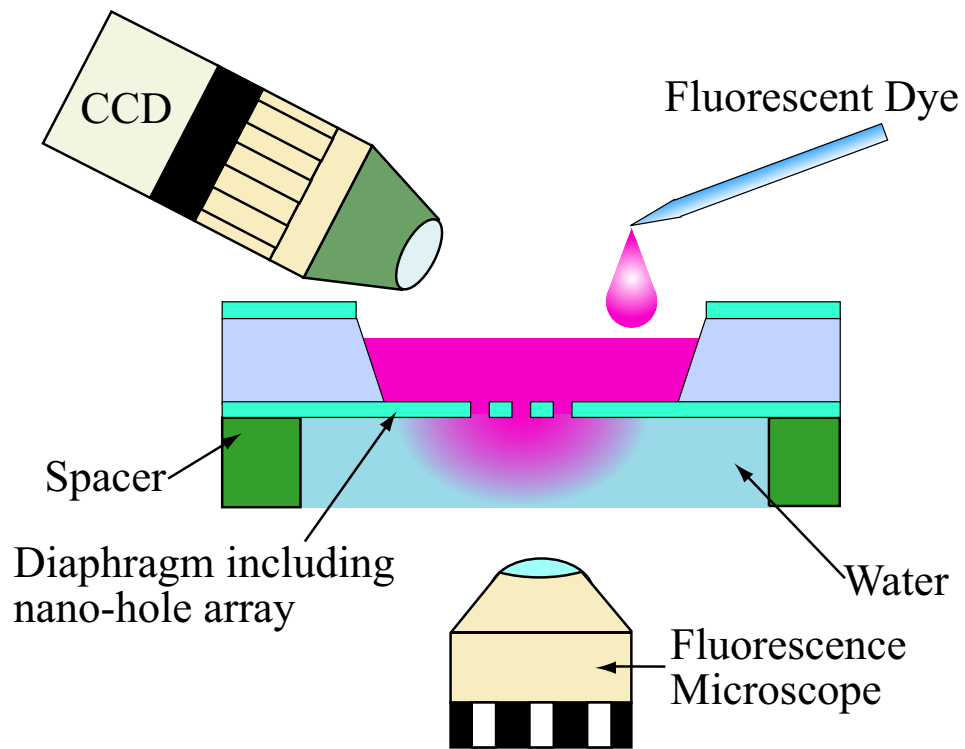


Fig.2.8 蛍光色素拡散放出実験

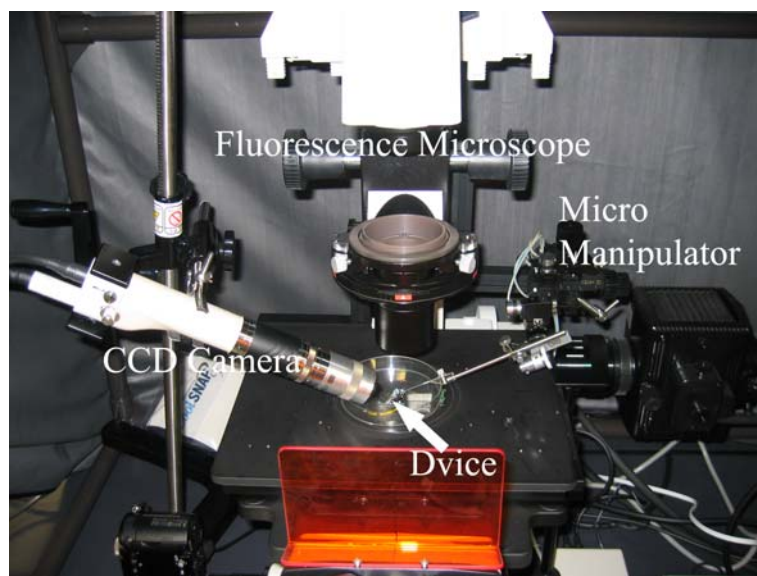


Fig.2.9 蛍光色素放出実験の装置構成

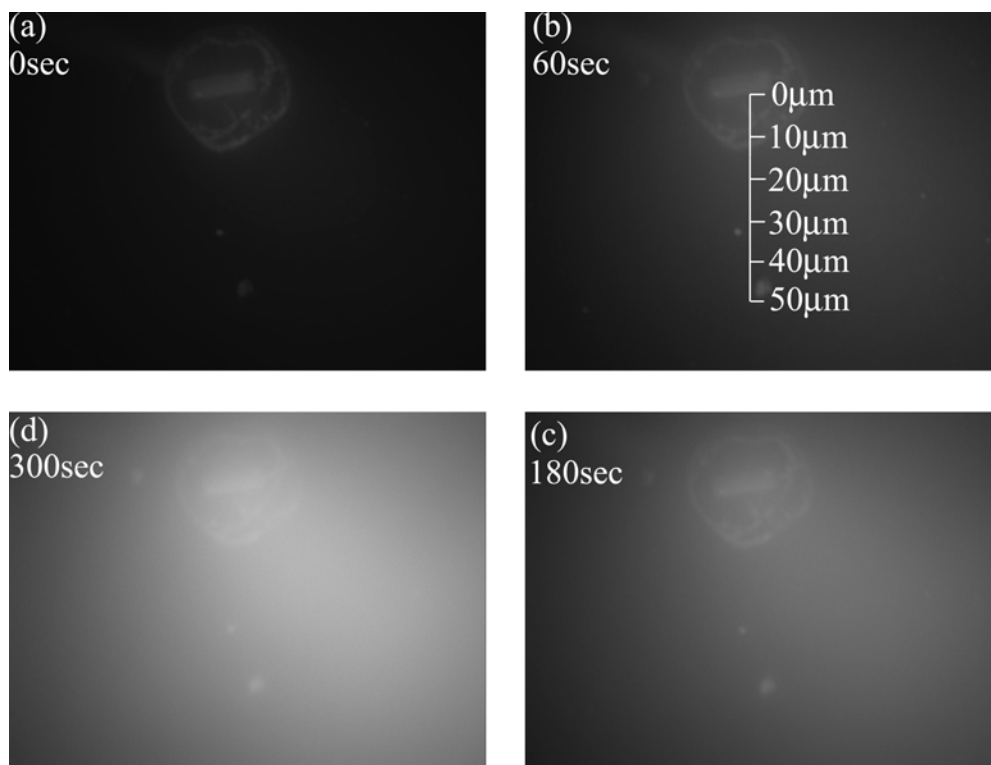


Fig.2.10 蛍光溶液の拡散放出

蛍光溶液がナノホール・アレイから超純水に拡散放出する様子を蛍光倒立顕微鏡で観察した。この放出の様子を Fig.2.10 に示す。ここで、画像上での明るさの変化を定量的に評価するために、蛍光強度を蛍光画像解析システム（MITANI CO., Lumina Vision）を使って数値化した。計測範囲は  $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$  の範囲である。

蛍光溶液を注入した直後には蛍光色素の拡散を確認することはほとんどできないが、60 秒後にはナノホール・アレイの周辺が少し明るくなっている。その後、180 秒～300 秒と時間の経過と共にナノホール・アレイを中心に徐々に拡散が大きくなり、300 秒後にはナノホール・アレイの周りだけでなく辺り一面が白くなり、蛍光色素が拡散していることがわかる。

この拡散の様子を定量的に評価するために蛍光強度を数値化し、Fig.2.10 (b) に示す  $0 \sim 50\ \mu\text{m}$  の点での蛍光強度の空間的な分布を計測した。この結果を Fig.2.11 に示す。蛍光強度はナノホール・アレイの極近くで最大値をとり、ナノホール・アレイから距離が離れるにつれて徐々に小さくなる。蛍光強度の大きさは、ナノホールの中心から  $30\ \mu\text{m}$  の場所では  $0\ \mu\text{m}$  の場所の 7 割程度となり、 $50\ \mu\text{m}$  の場所では 5 割程度となる。

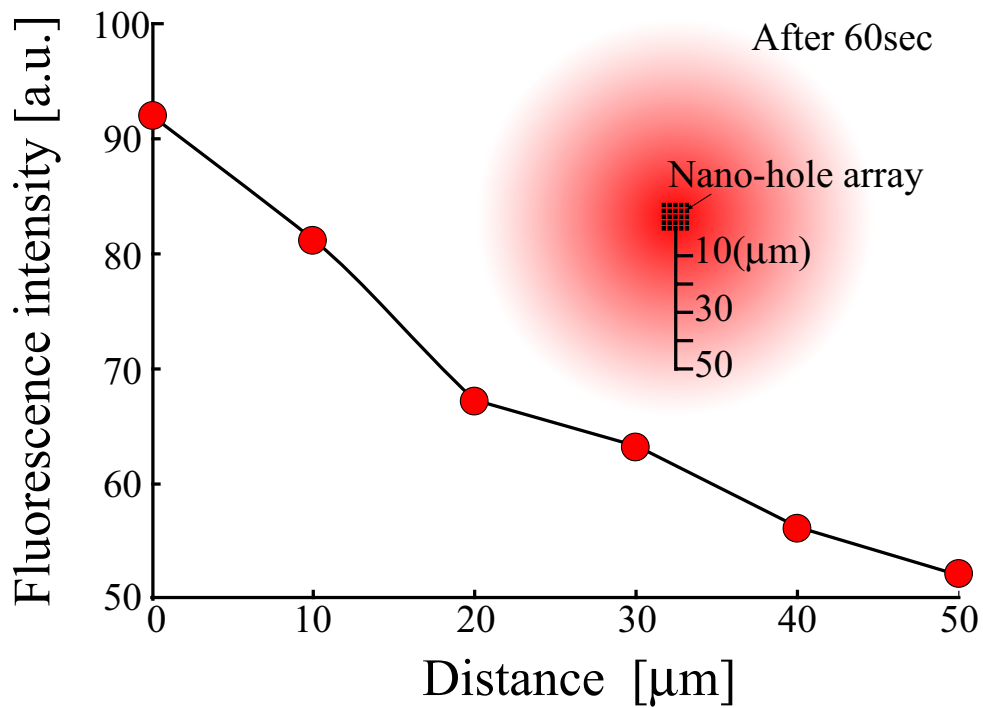


Fig.2.11 ナノホール・アレイからの距離と蛍光強度の関係

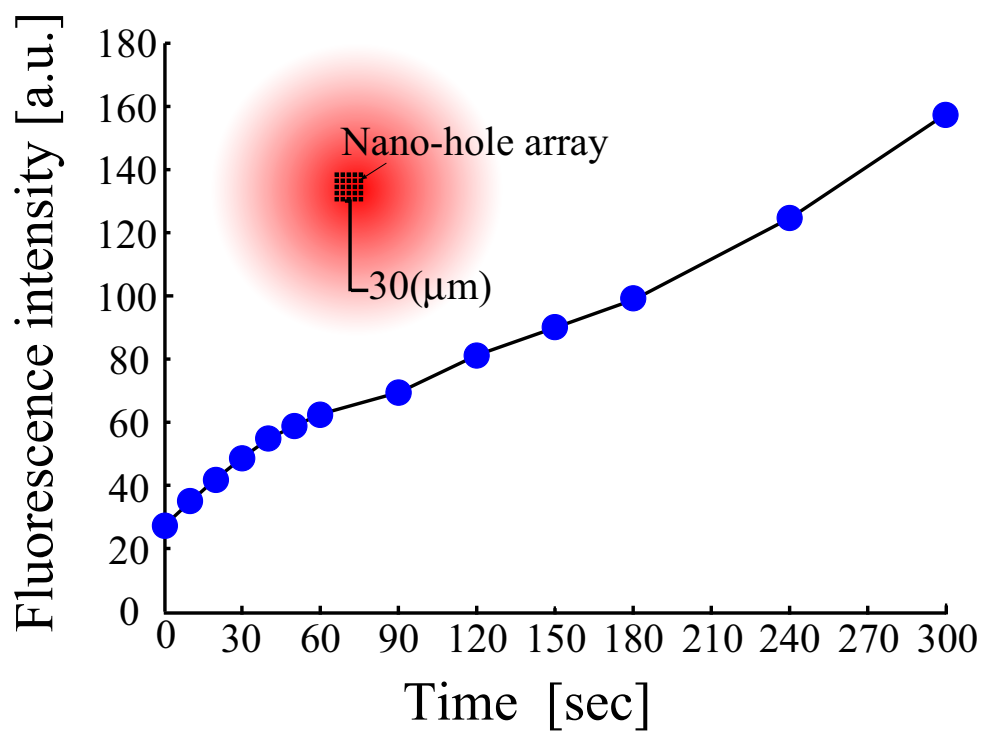


Fig.2.12 経過時間と蛍光強度の関係

また、ナノホール・アレイからの距離 30  $\mu\text{m}$  の場所における、蛍光溶液を注入してから経過時間と蛍光強度の関係を Fig.2.12 に示す. 蛍光溶液を注入した直後の蛍光強度は小さいが、時間が経過するにつれて次第に大きくなる. その大きさは、30 秒後に 2 倍程度になり、180 秒後には 4 倍程度、300 秒後には 8 倍程度の蛍光強度になる. これらの結果より、ダイアフラム内に注入された蛍光溶液とあらかじめ放出側に満たされた超純水が接触することによって、表面張力の影響を受けずに蛍光色素を拡散により放出することができることを確認した.

## 2.3 薬剤放出制御用マイクロバルブ

前節では，培養細胞に対して化学的な刺激を行うための薬剤を放出するナノホールを構築しその有効性を評価したが，ナノホールだけでは薬剤を常に放出してしまい細胞への刺激を制御することができない．そのため，ナノホールへ供給する薬剤を制御するためのマイクロバルブを構築した．このマイクロバルブはチャンネル表面の濡れ性の違いを利用して動作するものであるため，機械的な可動部の無い簡単な構造のバルブであり，微少量の液体の放出を制御することができる．

表面の濡れ性を表す尺度として一般に固体表面と液体との接触角（Contact angle）が用いられている．接触角とは，Fig.2.13 に示すように，気中（通常は空気中）において固体表面にある液体に対し，3 相の接触点から引いた液滴の接線と固体表面とが成す液体側の角度のことである．接触角と固液界面張力 $\gamma_{sl}$ ，気液界面張力 $\gamma_{lg}$ ，気固界面張力 $\gamma_{gs}$ の間にはヤングの式（2.1）が成り立ち，これらの力が互いに作用し合うため常に釣り合った状態である．

$$\gamma_{sl} - \gamma_{gs} + \gamma_{lg} \cos \theta = 0 \quad (2.1)$$

この接触角が大きければ固体表面は液体をはじきやすく，小さければ固体表面は液体をなじませやすい．一般的には，接触角が  $90^\circ$  未満の場合を親水性， $90^\circ$  以上の場合を疎水性と呼んでいる．上述した，表面の濡れ性を利用したマイクロバルブの構成と製作プロセス，バルブ開閉動作などの基礎実験の結果を以下に示す．

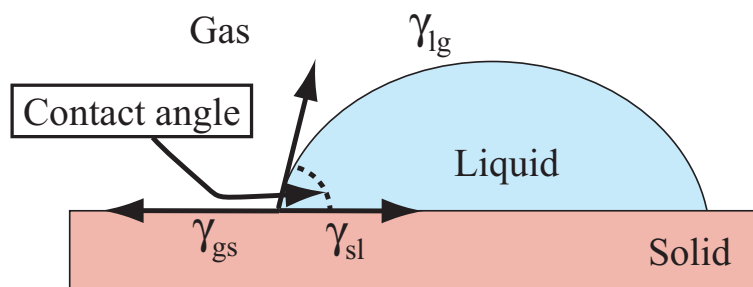


Fig.2.13 液滴の接触角

### 2.3.1 マイクロバルブの構成

本研究で構築するマイクロバルブは Fig.2.14 に示すように、T 字型のマイクロチャンネル内に液体がなじむ親水面と液体をはじく疎水面のパターンによって構成されており、T 字の交差した部分がバルブとなる。このマイクロチャンネルをシリコン樹脂で封止し液体を注入すると、親水面と疎水面の表面張力の違いによってバルブの開閉を行うことができる。構築したマイクロバルブの SEM 写真を Fig.2.15 に示す。マイクロチャンネルの幅は約 60  $\mu\text{m}$  で深さは 10  $\mu\text{m}$  であり、2 本のチャンネルの交差した部分にマイクロバルブを構築した。このデバイスはマイクロマシン技術を使って加工しているため、加工時の相性が良い材料を選ぶ必要がある。そこで、大きな親水性を示し、細胞との親和性も良好であり、マイクロの加工でも良く使用されている  $\text{SiO}_2$  を親水面に使用した。また、疎水性の面には 2 種類材料を使用した。1 つは旭硝子製の Cytop (ASAHI GLASS Co., LTD., CTL-809M) を使用し、もう 1 つは SAM 膜 (Self-assembled monolayer) を使用した。

Cytop は既存のフッ素樹脂と全く異なるアモルファスフッ素樹脂であり、パーフルオロ溶媒に溶解が可能でサブミクロンの薄膜コーティングをすることが可能である。また、本来のフッ素樹脂の特性である撥水撥油性や溶融成形性、耐薬品性、耐熱性を併せもっており、半導体保護膜や光ファイバー、撥水撥油コート、エッチングの保護膜として使用されているものである。Cytop の基本的な特性を Table2.2 に示す。

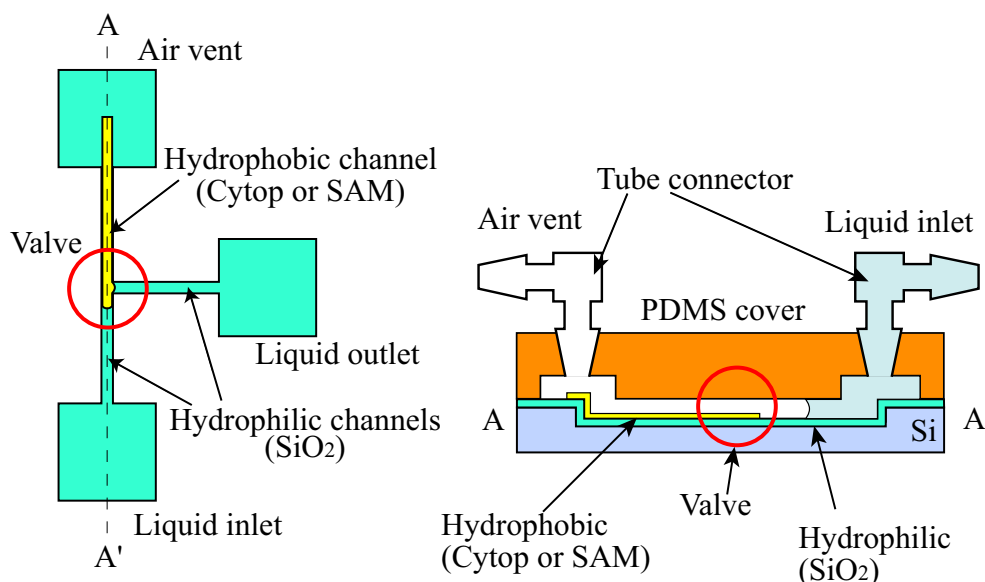


Fig.2.14 マイクロバルブ構造

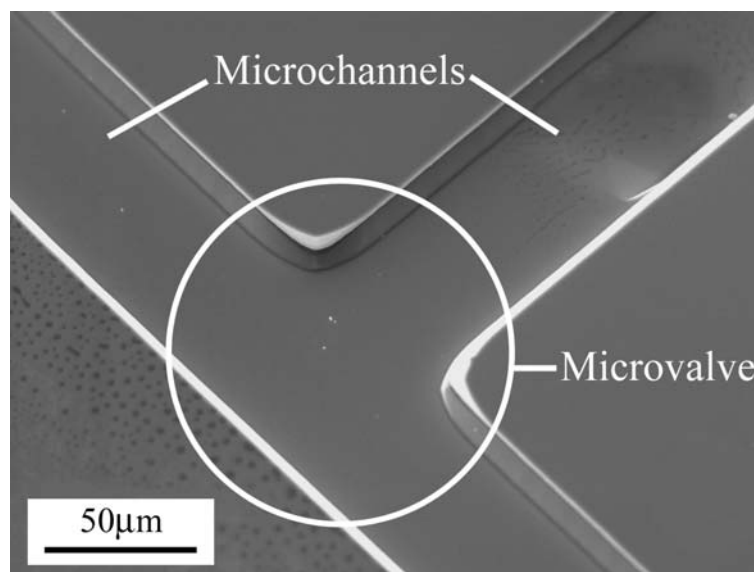


Fig.2.15 構築したマイクロバルブの SEM 写真

Table2.2 Cytop の特性

Density	2.03 g/cm <sup>3</sup> (25℃)
Viscosity	320 cps (25℃)
Melting pint	None
Glass transition temperature	108 °C
Decomposition temperature	400 °C
Contact angle	110 °C (25℃)
Critical contact angle	19 mN/m (25℃)

SAM には、チオール系やシラン系のものがありチオール系のものは Au や Ag などの金属表面に、シラン系のものは酸化物やマイカ上に自己組織的に単分子膜を形成するものである。また、先端の官能基によって親水性・疎水性を選ぶことができる材料である。例えば、ヒドロキシ基やカルボキシル基、アミノ基などは親水性を示し、アルキル基やフェニル基は疎水性を示す。本バルブを構築する際に使用する SAM は 1-octadecanethiol である。Fig.2.16 に 1-octadecanethiol を Au 上に成膜した際の模式図を示す。1-octadecanethiol はチオール系の SAM 膜であり、先端の官能基にはアルキル基を持つため疎水性を示すものである。したがって、超純水を滴下すると図の

ように半円上の液滴を形成する.

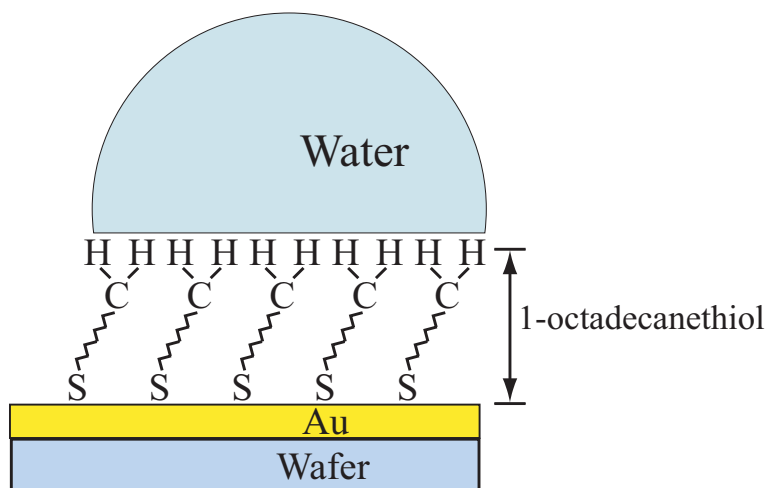


Fig.2.16 1-octadecanethiol の模式図

親水性面  $\text{SiO}_2$  膜上に超純水を滴下した際の様子を Fig.2.17 に、疎水性面の Cytop 膜上と SAM 膜上に超純水を滴下した際の様子をそれぞれ Fig.2.18, Fig.2.19 に示す.  $\text{SiO}_2$  膜上に超純水を滴下すると、液体が表面になじみ濡れ広がった. 逆に, Cytop 膜上や SAM 膜上に超純水を滴下すると、液体が球状になり基板上をコロコロと転がる. そこで、表面の濡れ性を具体的に示すために、それぞれの膜上での接触角を測定した. 接触角の測定方法は、Fig.2.20 に示すように液体を基板上に滴下し、横から撮影して接線の角度を計測すればよい. しかし、撮影された画像から直接接線を引き角度を読み取るのは困難である. そこで、重力の影響による変形が無く液滴の表面形状が球の一部とみなせる場合、Fig.2.20 のように液滴の高さを  $h$ 、液滴の直径を  $d$  とすると接触角  $\theta$  は、

$$\theta = 2 \arctan \left( \frac{2h}{d} \right) \quad (2.2)$$

で求められる.



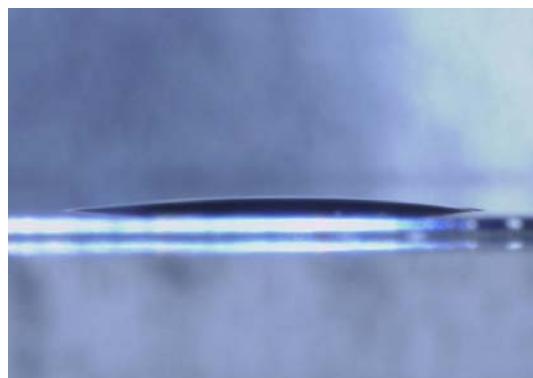


Fig.2.17 SiO<sub>2</sub> 膜上での液滴の様子

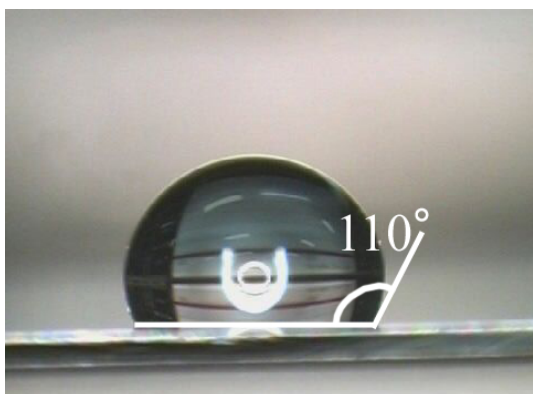


Fig.2.18 Cytop 膜上での液滴の様子

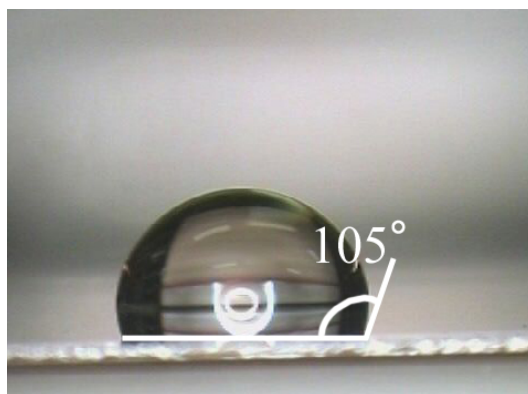


Fig.2.19 SAM 膜上での液滴の様子

実際に接触角の測定は、Fig.2.21 に示す装置を使って行った．基板上にマイクロピペット（GILSON，ピペットマン P タイプ，P-10）で液滴を静かに置き，CCD カメラ（HIROX，KH-2200MD2）で撮影しモニタに表示する．撮影した画像から液滴の高さ  $h$  と直径  $d$  を計測し，(2.2) 式で計算した．その結果，SiO<sub>2</sub> 膜上での超純水の接触角は約 3° であり，Cytop 膜上での接触角は 110° 程度，SAM 膜上での接触角は 105° 程度であった．このように，親水性面である SiO<sub>2</sub> 膜と疎水性面である Cytop 膜，SAM 膜との間には大きな接触角の差があり，表面張力の違いを利用したバルブの構築に有用である．

次いで，構築したマイクロ流路に液体を流すために，シリコーン樹脂（Poly dimethyl siloxane，PDMS）を使って流路のふたとなるカバーを製作する．PDMS カバーには液体を注入するためのコネクタが埋め込まれており，コネクタの下には液体を溜める

ためのチャンバを設けた．外部から注入された液体は，チャンバに溜まった後，スムーズに流路内に流れる．Fig.2.14 の左図で，T 字型のチャネルの先端に四角形で示している部分がチャンバである．PDMS とは，一般的にモールドイングによって微小構造を形成する際に利用される．硬化後は，ヤング率が非常に高く柔軟性があり，シリコン基板やガラス基板などのフラットな表面に対する自己接着性があるため，流路のカバー材料として使いやすい材料である．PDMS の基本的な特性を Table2.3 に示す．

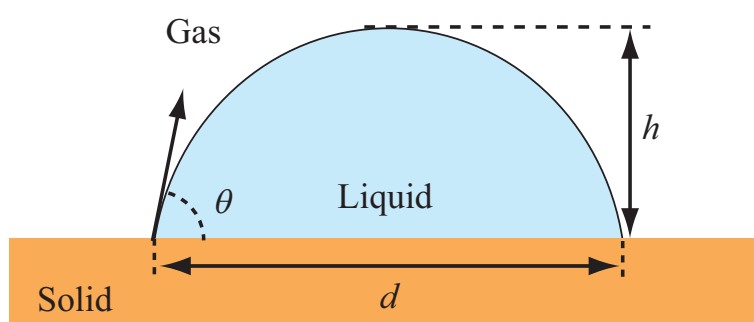


Fig.2.20 接触角の測定

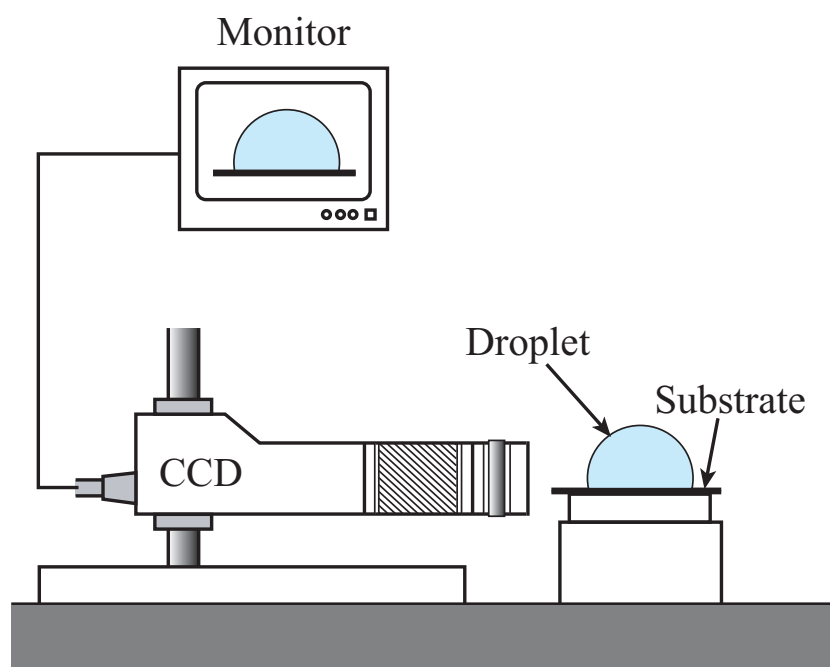


Fig.2.21 接触角測定の実験系

Table2.3 PDMS の基本的な特性

Appearance	Transparent
Specific gravity	1.03
Viscosity	3900 cps (25℃)
Melting point	-65 °C
Tensile strength	6.20 MPa
Elongation	100 %
Tear strength	2.6 kN/m

### 2.3.2 マイクロバルブの開閉原理

マイクロバルブの動作原理を Fig.2.22 に示す. 注入側のコネクタを通してデバイスに液体を注入すると, チャンネル表面は親水性の面であるため毛細管現象により液体がチャンネル内にはわずかな圧力で自動的に浸入する. 浸入した液体はバルブ部分 (親水性面と疎水性面の境界面) まで到達すると, 疎水性面にはじかれてそれ以上浸入ができなくなる. この際, 注入側からの液体と放出側にあらかじめ溜めておいた液体は空気によって分断されている. この状態がバルブを閉めた状態である.

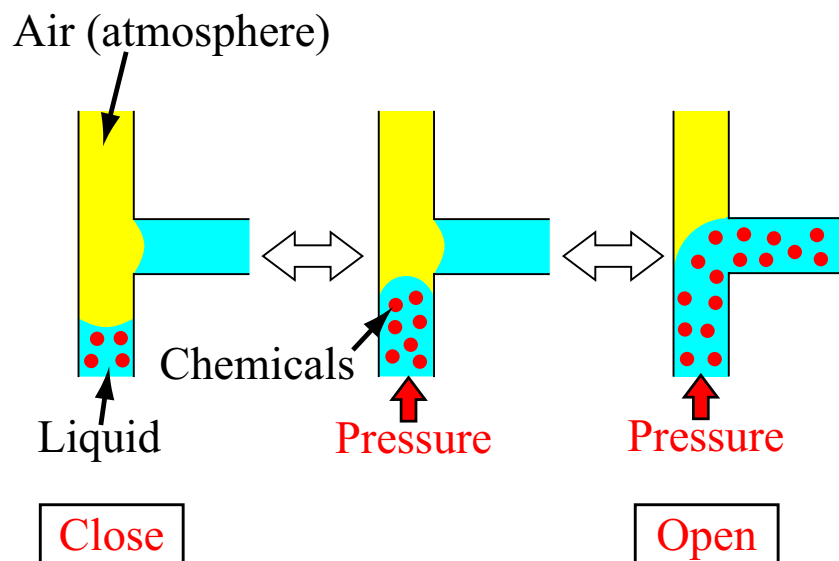


Fig.2.22 マイクロバルブの動作原理

注入側から圧力を加えると、液体はある圧力以上で表面張力差を乗り越え、疎水性のチャネル内へ浸入する。一度表面張力差を乗り越えた液体に対して圧力を印加し続けることによって疎水性チャネル内を進み、放出側の液体と接触する。この状態がバルブを開いた状態である。例えば、あらかじめ注入側の液体のみに神経成長因子（NGF）などの薬剤を混入しておけば、注入側と放出側の液体中に濃度差が発生し、放出側の液体に薬剤が拡散する仕組みである。

### 2.3.3 マイクロバルブの製作

ここでは、疎水性材料として Cytop または疎水性 SAM (1-octadecanethiol) を使用した 2 種類のバルブの製作プロセスについて述べる。まず、シリコン基板の熱酸化と結晶異方性エッチングにより、幅 60  $\mu\text{m}$ 、深さ 10  $\mu\text{m}$  のマイクロチャネルを作製した。その後、スパッタリングによる親水性面 ( $\text{SiO}_2$ ) の成膜とフォトリソグラフィによる疎水性面部 (Cytop または疎水性 SAM) のパターンニングによって、マイクロチャネル内にバルブ部を製作した。Cytop 膜を使ったバルブの製作プロセスを Fig.2.23 に、SAM 膜を使ったバルブの製作プロセスを Fig.2.24 に示す。また、加工条件などの詳細は付録に記す。

#### ①疎水性材料に Cytop 膜を使用したマイクロバルブ

はじめに、厚さ 300  $\mu\text{m}$  のシリコン基板を 1100 $^{\circ}\text{C}$  の熱酸化炉中に設置し、炉の中に酸素 1 L/min, アンモニア 120 cc/min を注入して 3 時間保持することにより、厚さ 300 nm の  $\text{SiO}_2$  膜を成膜する (a)。この基板にフォトレジスト (ZPN-1150 90cp) をスピンコーティングし、露光・現像することによりチャネルのパターンニングをする。レジストをマスクとして BHF に浸すことにより  $\text{SiO}_2$  膜を除去する (b)。次に、 $\text{SiO}_2$  膜をマスクにした TMAH による結晶異方性エッチングでマイクロチャネルを製作し (c)、スパッタリング装置 (ULVAC, SH-250-T04, Fig.2.25) で基板表面全体に厚さ 150 nm 程度の  $\text{SiO}_2$  膜を成膜する (d)。その後、Cytop と厚膜ポジレジスト (AZ P4620) を基板表面全体にコーティングし、露光・現像することによりバルブ部のみにパターンニングする (e)。最後に、厚膜ポジレジストをマスクにしてプラズマエッチング装置 (SAMCO INTERNATIONAL, INC., MODEL FA-1) を使って、バルブ部以外の疎水性材料を除去し、マイクロバルブを製作する (f)。

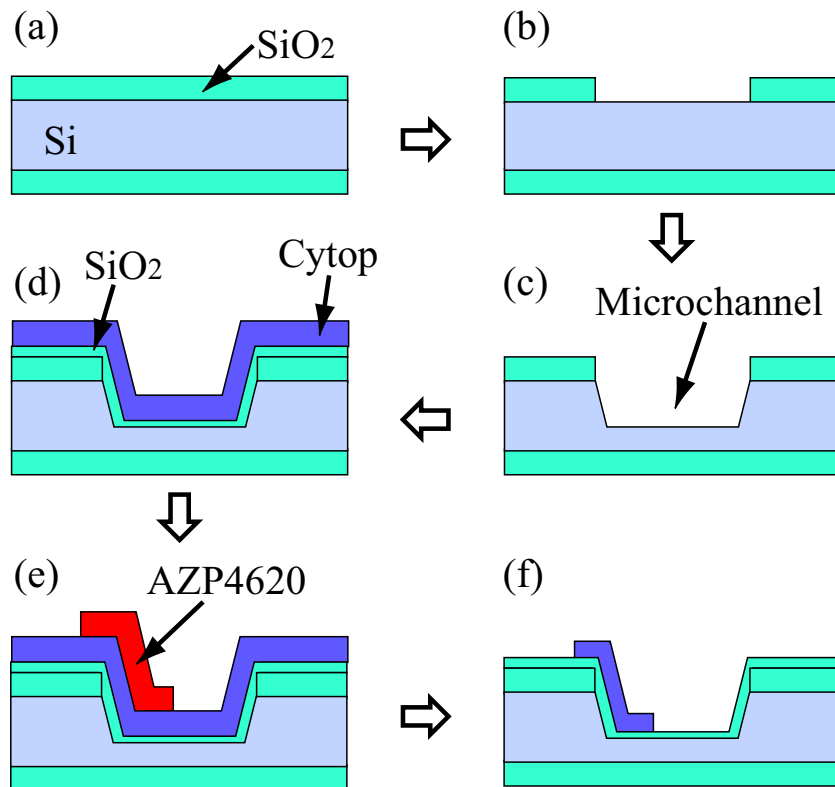


Fig.2.23 Cytop 膜を使ったバルブの製作プロセス

## ②疎水性材料に SAM 膜 (1-octadecanethiol) を使用したマイクロバルブ

チャネルを構築し、スパッタリングによる  $\text{SiO}_2$  膜の成膜までは①Cytop 膜を使用したマイクロバルブのプロセスと同様である。その後、厚膜ポジレジストを基板表面全体にコーティングし、露光・現像することによりバルブ部のみレジストを除去する (c)。この状態で真空蒸着装置 (ULVAC 機工, VPC-260) による Au/Cr の成膜と、リフトオフプロセスによってバルブ部のみ Au/Cr をパターンニングする (d)。最後に、Au の表面に疎水性 SAM を自己組織的に成膜させることによってマイクロバルブを製作する (f)。

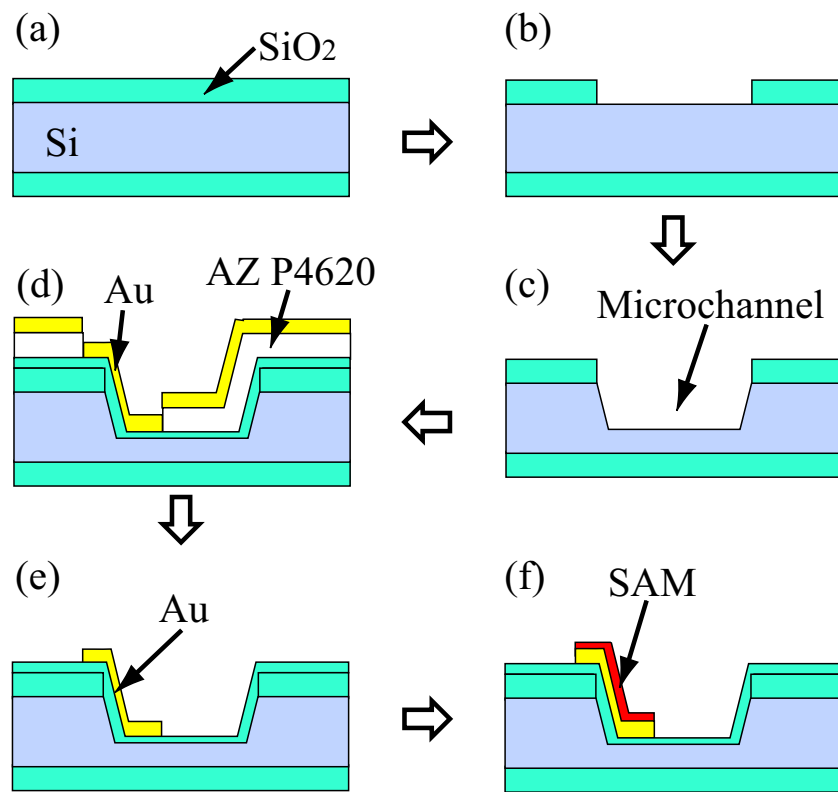


Fig.2.24 SAM 膜 (1-octadecanethiol) を使ったバルブの製作プロセス



Fig.2.25 スパッタリング装置 (ULVAC, SH-250-T04)

次に、マイクロチャネル内に液体を流すためにチャネルにかぶせてふたの役割を果たす PDMS カバーの製作プロセスを Fig.2.26 示す。まず、シリコン基板に SU-8 (Kayaku Microchem Co., Ltd., SU-8 3050) をスピンコーティングし (b), 露光・現像・ベイクによって液体を溜めるためのチャンバの鋳型を製作する (c)。SU-8 の上にコネクタを立てるための土台であるリベットを接着させる (d)。その後、リベットにコネクタを差し込み (e), 硬化剤を混ぜた PDMS を流し込み, 60°Cの電気炉内で 60 分間熱を加えて硬化させる (f)。PDMS が固まると基板から取り外し (g), PDMS に残ったリベットを引き抜くことで PDMS カバーを製作する (h)。SU-8 はフォトレジストの一種であり, 高アスペクト比の構造物を作ることができる材料である。 $\mu$ TAS や MEMS の分野でよく使われており, PDMS の鋳型を作る材料としても利用されている。

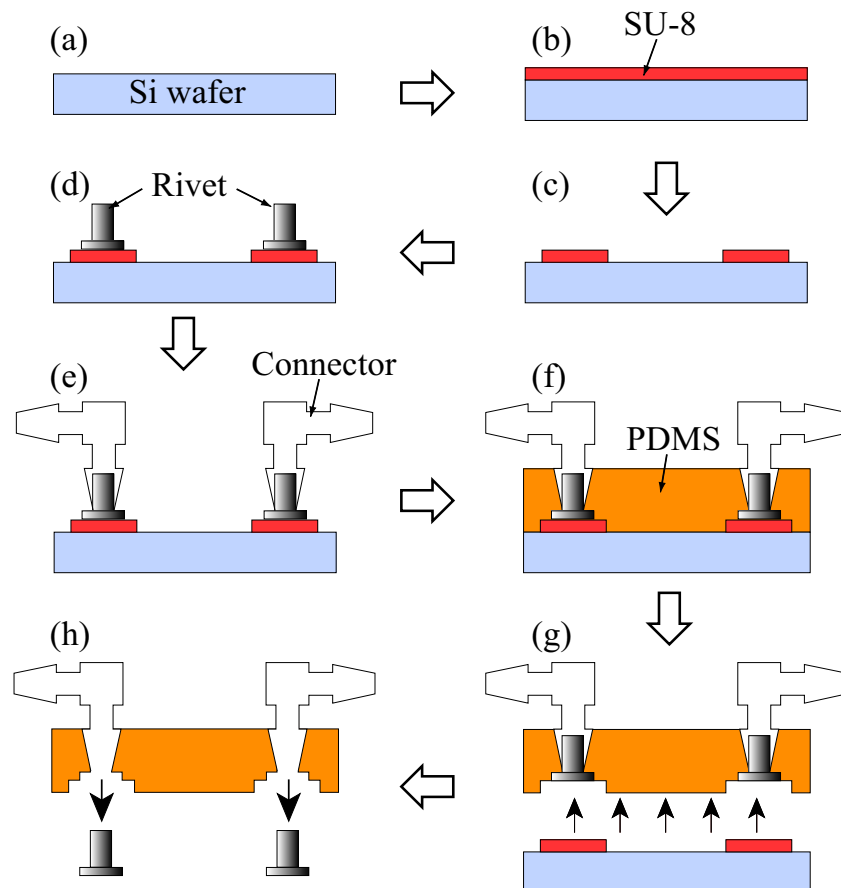


Fig.2.26 PDMS カバーの製作プロセス

マイクロバルブを製作したシリコン基板と PDMS カバーを接着させることによりデバイスの完成となる。しかし、これらを接着させる前に構築したデバイスの表面の洗浄処理を行う必要がある。これは、マイクロバルブを製作するまでに多くのプロセスを踏んでおり、プロセスの途中でゴミやホコリ、油脂や化学的な成分などが接着しており、基板全体の親水・疎水性材料表面が良好な状態でない可能性があるからである。このため、特に液体が流れるチャネル内の親水性面は表面処理を行い良好な親水性にする必要がある。親水化する方法として、基板を KOH（水酸化カリウム）などのアルカリ性溶液に 1～3 分程度浸すことにより、シリコン基板上の  $\text{SiO}_2$  膜は良好な親水面となる。この際、疎水性材料である Cytop や疎水性 SAM もアルカリ溶液に浸かってしまうが、これらは酸やアルカリに侵されにくいため親水性になることは無く、表面の汚染物が洗浄されるため、良好な疎水性面を得ることができる。

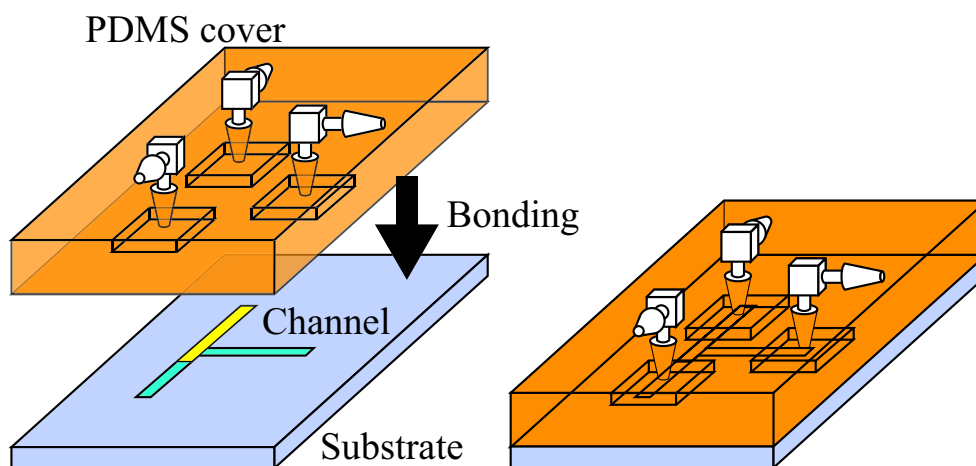


Fig.2.27 基板と PDMS の接着



Fig.2.28 接着した基板と PDMS



表面の洗浄処理終了後に PDMS と基板を接着させる。PDMS は自己接着性があるため特殊な接合方法は必要なく、単に基板と接触させるだけで簡単に接着させることができる。しかし、基板表面や PDMS 表面が油脂やホコリなどで汚れていれば接着しにくく、表面状態が接着に大きな影響を及ぼすため注意が必要である。シリコン基板と PDMS を自己接着性だけでなく、より強固に接着させたい場合にはパーマネントボンディングという方法がある。これは、PDMS 表面に O<sub>2</sub> プラズマ (75 W, 26 ml/min, 15 sec) をかけ、PDMS とシリコン基板をそれぞれ KOH (2 min, 5 min) に浸漬した後に、電気炉 (140 °C, 1 h) で熱することによって強固に接着させる方法である。PDMS とシリコン基板を接着させる際の位置あわせは、PDMS カバーに構築した 5 mm 程度のチャンバを使うため、最低 5 mm 程度の位置あわせを行えばよい。このため、位置あわせは顕微鏡を用いることなく簡単に行うことができる。基板と PDMS の接着の様子と実際に接着させたデバイスの写真を Fig.2.27 と Fig.2.28 に示す。

#### 2.3.4 マイクロバルブの開閉実験

本実験では、製作した 2 種類のマイクロバルブの開閉動作を評価・比較するために 2 種類の実験を行った。1 つ目は実験用の液体として超純水を使った場合であり、2 つ目は実験用の液体として Cytop 膜・SAM 膜に対して様々な接触角を持つ液体を使った場合である。実験手順を以下に説明する。また、実験の概略図を Fig.2.29 に、装置構成を Fig.2.30 に示す。

- (1) シリンジポンプとチューブを接続し、これらを超純水で満たす。このときチューブ内に空気が入らないように注意する。
- (2) 超純水で満たしたチューブを構築したデバイスの注入側と放出側のコネクタに接続する。
- (3) 水などを満たしていない空のチューブを Air vent 側のコネクタに接続する。
- (4) 実体顕微鏡 (Nikon, SMZ1500) で観察しながら放出側と注入側のシリンジポンプを操作し、チャンネル内に液体をゆっくりと浸入させる。このとき、チューブ自体に圧力がかかるため圧力を抜きながら浸入させる必要がある。この操作をしなければ PDMS とコネクタの接合部が壊れる可能性があるので注意が必要である。
- (5) 注入側から印加される圧力で PDMS が剥離する場合は、Air vent 側のチューブから空気を吸引して超純水をチャンネル内へ浸入させる。
- (6) 超純水がチャンネル内を進みバルブ部に達するのが確認できたら、シリンジポンプの操作をやめる。

- (7) 注入側のシリンジポンプを取り外し、大気開放することによってデバイスやチューブ全体に溜まった圧力を取り除く。このとき、チューブ内の液柱の高さ  $h$  (Fig.2.29) が印加圧力になるため液柱を高く上げすぎないように気をつける。
- (8) 液柱を上下に変位させることによって圧力を印加しバルブの開閉を行う。

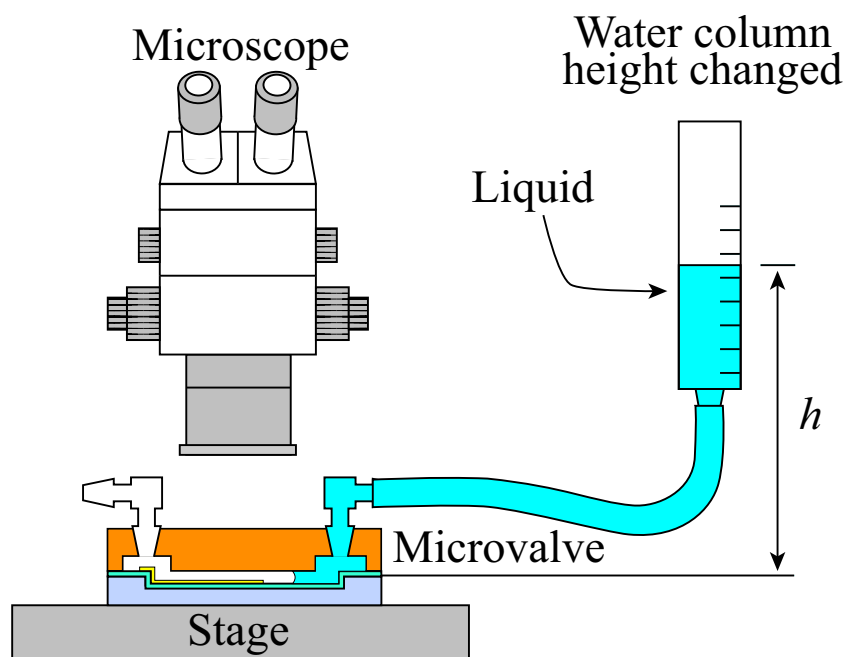


Fig.2.29 マイクロバルブ動作確認実験

液柱を上下に変位させ注入側のチャンネルに任意の陽圧と陰圧を印加することによってバルブの開閉を行った。疎水性面に **Cytop** 膜を使った際のバルブ開閉の様子を Fig.2.31 に示す。チャンネル内に液体を注入すると毛細管現象によってチャンネルの親水性面を自動的に浸入する。液体が親水性面と疎水性面の境界線上まで浸入すると疎水性面にはじかれて液体の浸入は停止する。この状態がバルブ開閉の初期状態であり、初期状態では注入側の液体と放出側の液体は空気で分断されている (a)。注入側のチャンネルに圧力を印加すると、疎水性面ではじかれていた液体が疎水性面を乗り越えて放出側の液体と接触し、バルブが開く (b, c)。その後、負の圧力を印加すると液体が再び空気に分断されてバルブが閉じる (d)。このように、陽圧と陰圧の印加を繰り返すことによってバルブを繰り返し動作させることができる。

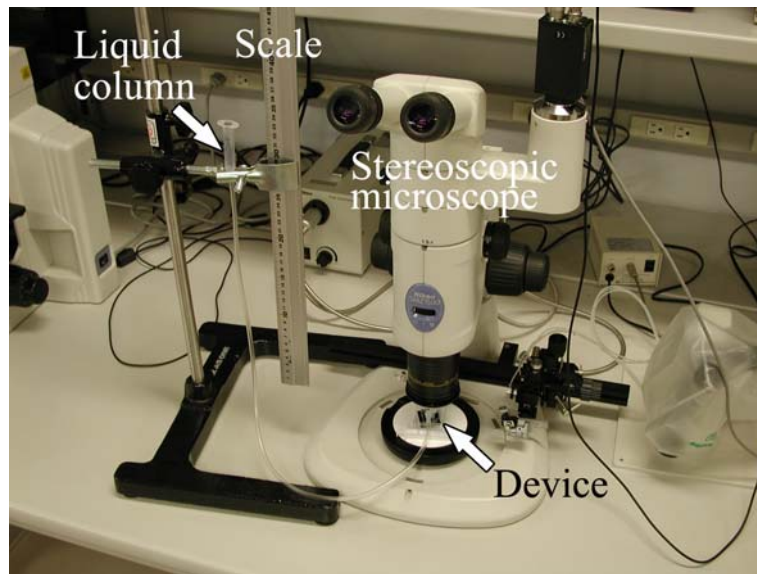


Fig.2.30 マイクロバルブ動作確認実験の装置構成

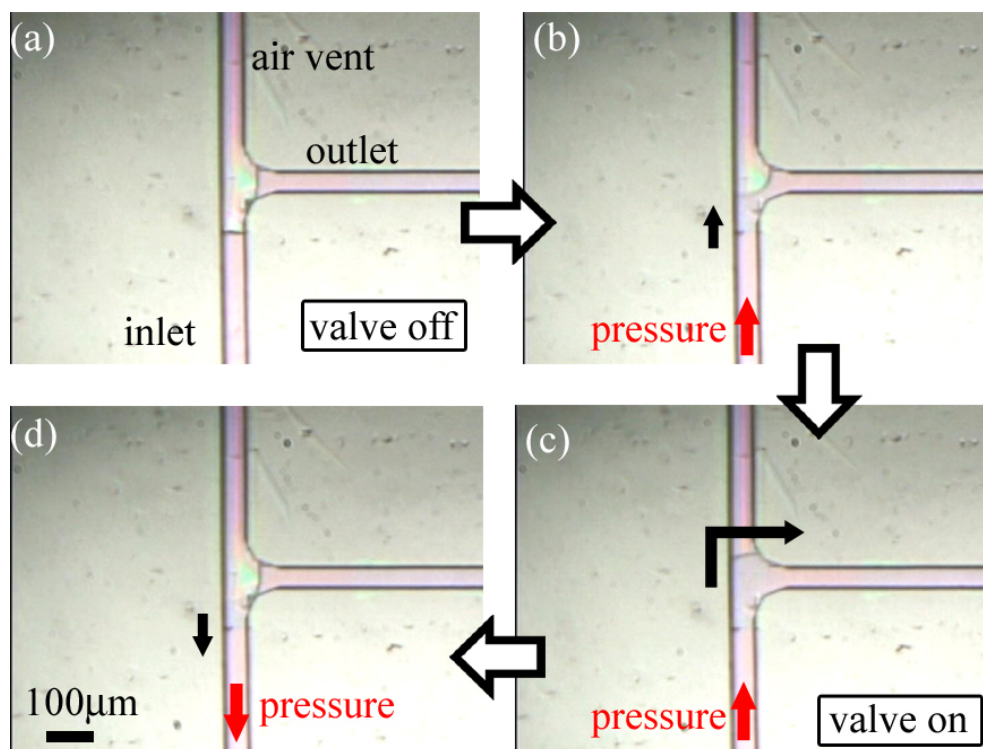


Fig.2.31 疎水性面に Cytop 膜を使った場合のバルブ開閉の様子

また、疎水性面に SAM 膜を使った際のバルブ開閉の様子を Fig.2.32 に示す. SAM 膜を使ったバルブの場合も Cytop 膜を使ったバルブの場合と同様に, はじめは空気によって注入側・放出側それぞれの液体に分断されている (a) が, 注入側の液体に圧力を印加すると注入側・放出側の両液体が接触し, バルブが開く (b, c). その後, 負の圧力を印加することによってバルブが閉じる (d). SAM 膜を使ったバルブも Cytop 膜を使ったバルブと同様に, 圧力の印加によってバルブの開閉を行うことができ, これらの動作を繰り返し行うことでバルブを連続的に開閉することができる.

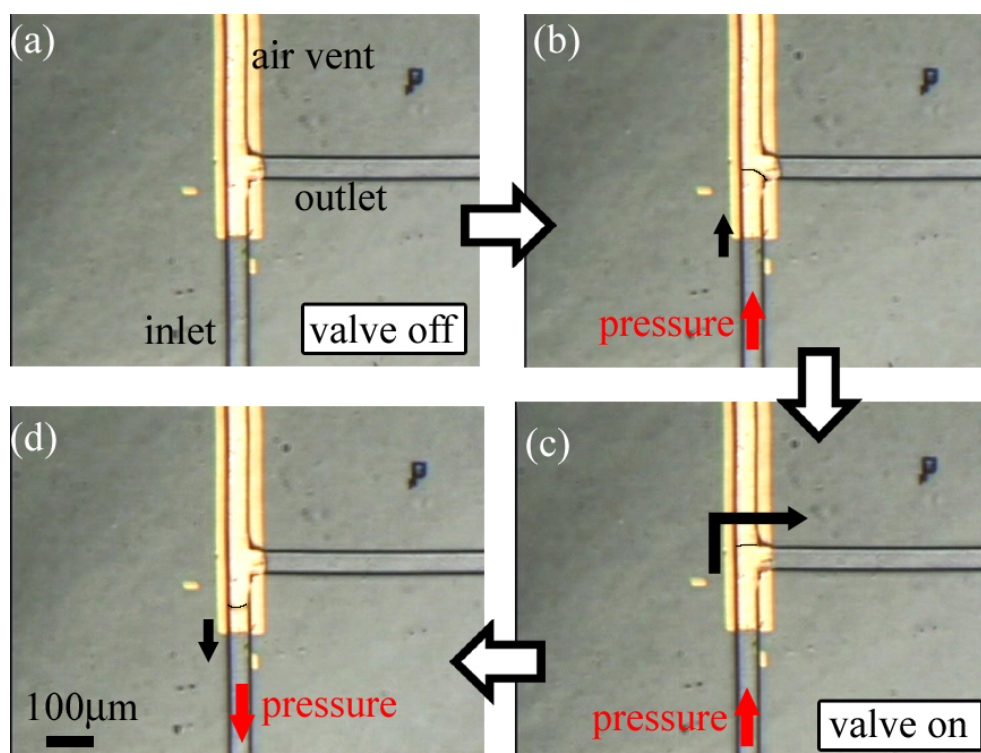


Fig.2.32 疎水性面に SAM 膜を使った場合のバルブ開閉の様子

次に, 疎水性面に Cytop 膜と SAM 膜を使用した 2 種類のバルブに注入する液体として超純水を使用した場合の印加圧力とスイッチング時間の関係を Fig.2.33 に示す. スwitching 時間とはバルブが閉じた状態から開いた状態になるまでの時間 (Switching time) のことを示す. Cytop バルブと SAM バルブは共に 6 kPa 以上の圧力を印加することによって動作し, 印加圧力を大きくするにつれてスイッチング時間は減少する. Cytop バルブの場合, 6 kPa の圧力を印加すれば 40 秒程度でバルブが開き, 7 kPa の圧力を印加すれば 10 秒程度でバルブが開く. SAM バルブの場合, 6 kPa

の圧力を印加すると 30 秒程度でバルブが開き、7 kPa の圧力を印加すれば 5 秒程度でバルブが開く。したがって、数秒以内でバルブを開きたければ Cytop・SAM の両バルブとも 7 kPa 以上の圧力を印加することによって達成できる。これまでに他の研究者が提案してきた外部圧力を使って駆動するバルブは、バルブを開閉させるためには最低でも 30～40 kPa の圧力が必要であった[42][43]。このことから本バルブは従来の外部圧力を使用して駆動するマイクロバルブよりも低い圧力で駆動することができる。

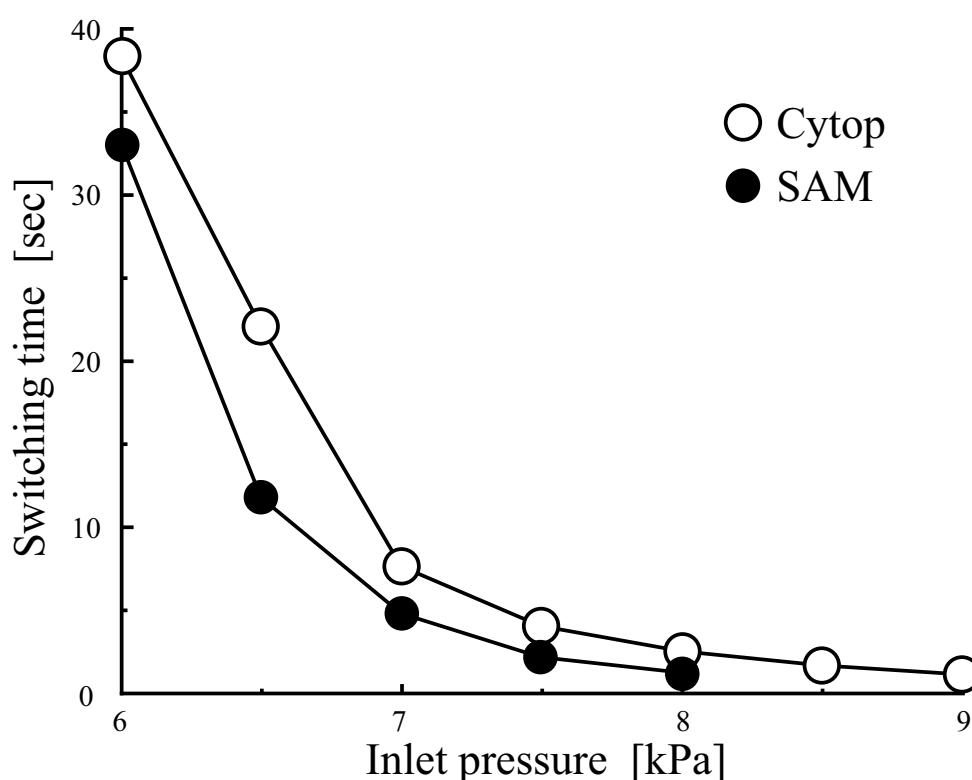


Fig.2.33 印加圧力とスイッチング時間の関係

また、疎水性面上での接触角の違う液体を使ってマイクロバルブのスイッチング時間を計測した。バルブスイッチング実験に使った液体は、超純水とエタノールを混合したものであり、比粘土と動粘土が約 2 倍、3 倍になるように調製した。この液体の詳細を Table2.4 に示し、印加圧力とスイッチング時間の関係を Fig.2.34 に示す。デバイス表面と液体との接触角が小さくなればなるほど、マイクロバルブが開くの

に必要な印加圧力は低くなる。これは、接触角が低いということは液体がその表面になじみやすくなっていることであり、液体が疎水性面からはじかれにくくなったため、簡単に疎水面を乗り越えることができるようになったものだと考えられる。また、SAM 膜を使ったバルブの方が Cytop 膜を使ったバルブよりも低い圧力で開くことができた。これは、SAM 膜と Cytop 膜の膜厚の違いが関係しているものと考えられる。SAM 膜と Cytop 膜の膜厚はそれぞれ約 10 nm と約 100 nm であり、SAM 膜の厚さは Cytop 膜の厚さの約 1/10 である。注入側の流路に圧力を印加し液体が動き出した際、膜厚が薄い疎水面の方が乗り越えやすいため、SAM 膜を使ったバルブの方が用意にバルブを開くことができたものと考えられる。これらの実験の結果、液体の接触角と疎水面のチャネルの材料がバルブの特性に大きく影響を及ぼすことを示す。

Table2.4 バルブ開閉実験で使用する液体の物性

Liquids		Contact angle [degree]		Specific Viscosity [ $\eta / \eta_0$ ]	Kinetic Viscosity [ $\text{m}^2 / \text{s}$ ]
Water [%]	Ethanol [%]	Cytop	SAM		
100	0	110	105	1.000	1.004
82	18	96	90	2.015	2.078
58	42	75	56	2.846	3.063

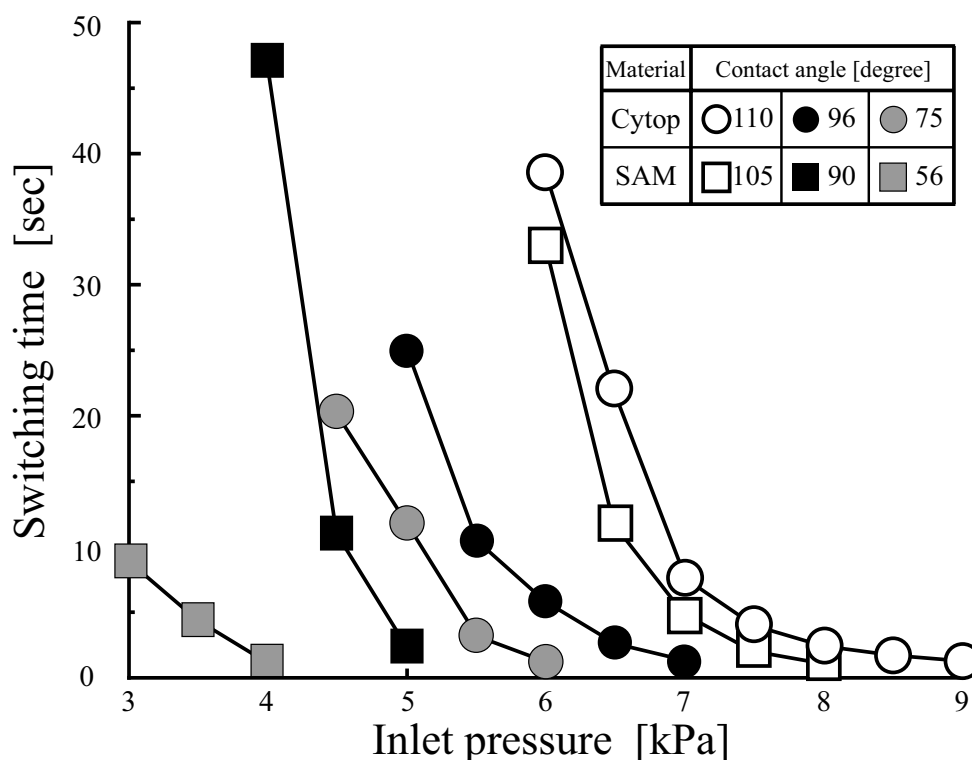


Fig.2.34 接触角の異なる液体を使った場合のスitchング時間と印加圧力の関係

### 2.3.5 マイクロバルブの連続開閉駆動

親水性面と疎水性面を利用したマイクロバルブが圧力を印加することによって駆動することが確認できたので、その開閉を連続的に行うことができるかどうかを確認するための実験を行った。連続的に開閉を繰り返すためには、陽圧を印加する動作と陰圧を印加する動作を繰り返し行う必要がある。これまでの実験では液柱を上下に変位させることによって圧力を印加していたが、連続的に開閉を繰り返す実験を行うシステムとしては現実的ではない。そこで、マイクロインジェクタ（NARISHIGE, IM-300）を使って圧力を印加することによってバルブを連続開閉させた。この際、マイクロインジェクタのみでは陽圧と陰圧を連続的に切り替えることができないため、ファンクションジェネレータ（Agilent Technology, 33120A）が出力する周波数を電子回路に通し、電子回路から出力される信号をマイクロインジェクタに入力することによって、印加する陽圧と陰圧の制御を行った。この実験で使用する電子回路とその設計図、キーとコードの対応表をそれぞれ Fig.2.35 と Fig.2.36, Table2.5 に示す。

電子回路は OR（TC74HC32AP, Toshiba）と NOT（TC74HC04AP, Toshiba）のロジ

ック IC とスイッチから成るものである．スイッチを「ON」にした状態で，ファンクションジェネレータから 5 V の電圧が印加されると陽圧を印加する信号をマイクロインジェクタに発信し，スイッチを「ON」にした状態で，ファンクションジェネレータから 0 V の電圧が印加されると陰圧を印加する信号をマイクロインジェクタに発信する．そして，スイッチを「OFF」にした場合はマイクロインジェクタを待機させる信号を発信する．この回路を使うことによってバルブの連続開閉を制御することができる．

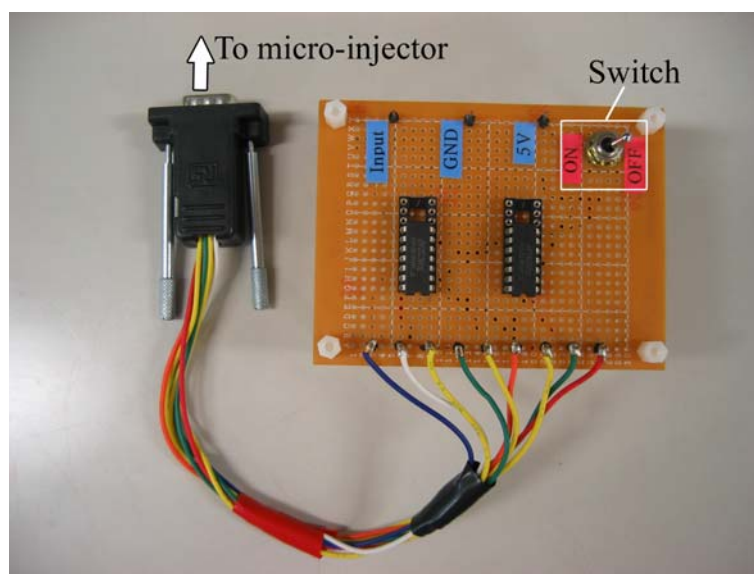


Fig.2.35 バルブ開閉用電子回路の写真

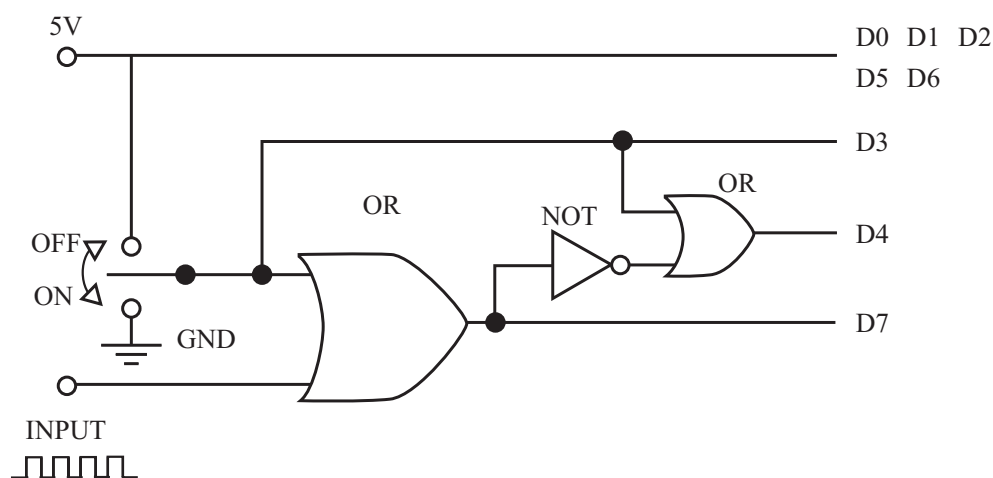


Fig.2.36 バルブ開閉用電子回路図



Table2.5 キーとコードの対応表

状態	9 D7	4 D6	8 D5	3 D4	7 D3	2 D2	6 D1	1 D0
陽圧	Hi	Hi	Hi	Low	Low	Hi	Hi	Hi
陰圧	Low	Hi	Hi	Hi	Low	Hi	Hi	Hi
待機時	Hi	Hi	Hi	Hi	Hi	Hi	Hi	Hi

注：Hi = 5 [V], Low = 0 [V]

次に、実験手順を以下に説明し、実験の概略図を Fig.2.37 に、装置構成を Fig.2.38 に示す。

- (1) ～ (7) までの手順は 2.3.4 のバルブ動作実験の手順と同様である。
- (8) マイクロインジェクタの印加圧力を設定する。マイクロインジェクタの表示は[kPa]ではなく[Psi]なので注意する。  
(1 Psi  $\simeq$  6.9 kPa)
- (9) 電子回路とファンクションジェネレータをマイクロインジェクタに接続し、マイクロインジェクタに入力するパルスを設定する。
- (10) ファンクションジェネレータから出力される周波数を電子回路を介してマイクロインジェクタに入力することによって、ファンクションジェネレータからの周波数に同期させてマイクロインジェクタからの印加圧力（陽圧，陰圧）を切り替える。

マイクロインジェクタを使ってバルブを連続開閉させた際の印加圧力とスイッチング時間の関係を Fig.2.39 に示す。マイクロインジェクタによって圧力を印加した際も液柱を上下に変位させて圧力を印加した場合と同様に印加圧力が大きくなるにつれて、バルブスイッチング時間が短くなることが確認できた。また、液柱を上下に変位させて圧力を印加する場合よりもマイクロインジェクタによって圧力を印加する場合のほうが低い圧力でバルブを動作させることができるということがわかった。これは、液柱を使う場合は液柱を任意の高さまで上げるまでの間に圧力が少しずつ印加されるのに対し、マイクロインジェクタの場合は任意の圧力が瞬時に印加されるからだと考えられる。さらに、バルブの開閉を 1 秒以内で高速に行いたい場合には Cytop バルブ，SAM バルブ共に 6 kPa 以上の圧力を印加することによって実現できる。この結果は 5 つのデバイスに対して実験を行ったものであり、図中のエラーバーを見るとわかるように再現性良くバルブの開閉を行うことができることを確認した。

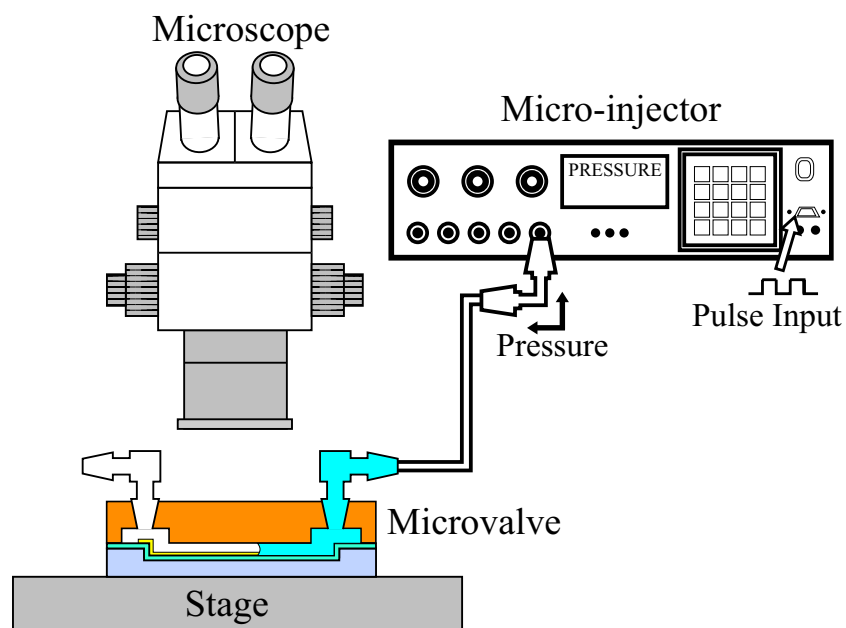


Fig.2.37 バルブ連続駆動実験の概略図

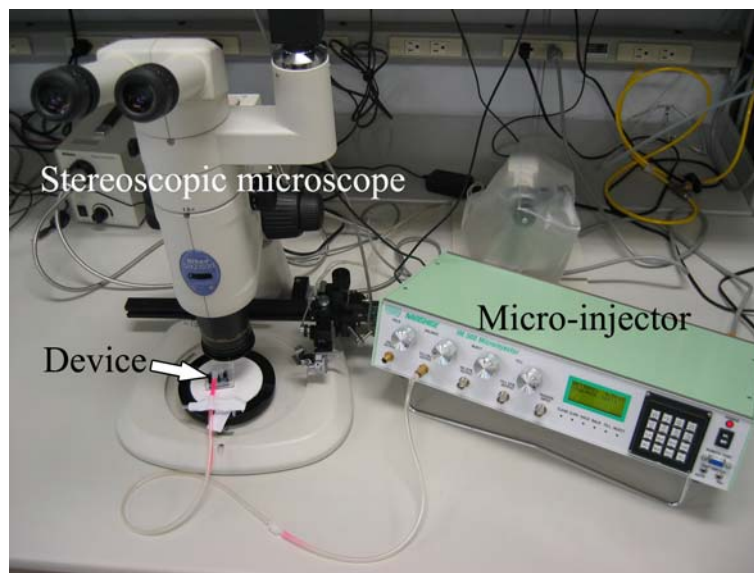


Fig.2.38 バルブ連続駆動実験の装置構成

Fig.2.40 に Cytos バルブの開閉周波数と開閉に必要な印加圧力の関係を示す。開閉周波数を速くすると大きな印加圧力が必要になり、開閉周波数が 0.2 Hz から 0.8 Hz

であれば 5 kPa 程度の印加圧力で連続開閉をすることができる。しかし、開閉周波数が 0.8 Hz を超えると開閉に必要な印加圧力が急激に大きくなり、開閉周波数が 1 Hz の場合は 10 kPa 程度、1.2 Hz の場合は 15 kPa 程度の印加圧力が必要である。次に、SAM バルブの開閉周波数と開閉に必要な印加圧力の関係を Fig.2.41 に示す。SAM バルブを使った場合も Cytop バルブの場合と同様にバルブを連続で駆動させるためには、開閉周波数を速くすると大きな印加圧力が必要になる。例えば、開閉周波数が 0.2 Hz から 1.0 Hz の場合は 5 kPa 程度の印加圧力でバルブの連続開閉を行うことができるが、開閉周波数が 1.0 Hz を超えると開閉に必要な印加圧力が急激に大きくなり、1.2 Hz の場合は 15 kPa 程度、1.4 Hz の場合は 20 kPa 程度の印加圧力が必要である。これらのように、バルブを繰り返し動作させる場合、バルブの開閉周波数が速くなるとバルブを開くために必要な圧力が大きくなる原因は、超純水が開閉の速さに追従しにくくなるため、大きな圧力を印加することによって超純水を強制的に高速で動作させる必要があるものだと考えられる。以上の結果より、構築した Cytop バルブ、SAM バルブ共に開閉周期と印加圧力の関係を考慮すれば、高速・低速の繰り返し動作が可能である。例えば、1 Hz で開閉を繰り返したい場合、Cytop バルブの場合は 10 kPa 以上、SAM バルブの場合は 6 kPa 以上の印加圧力で実現できる。

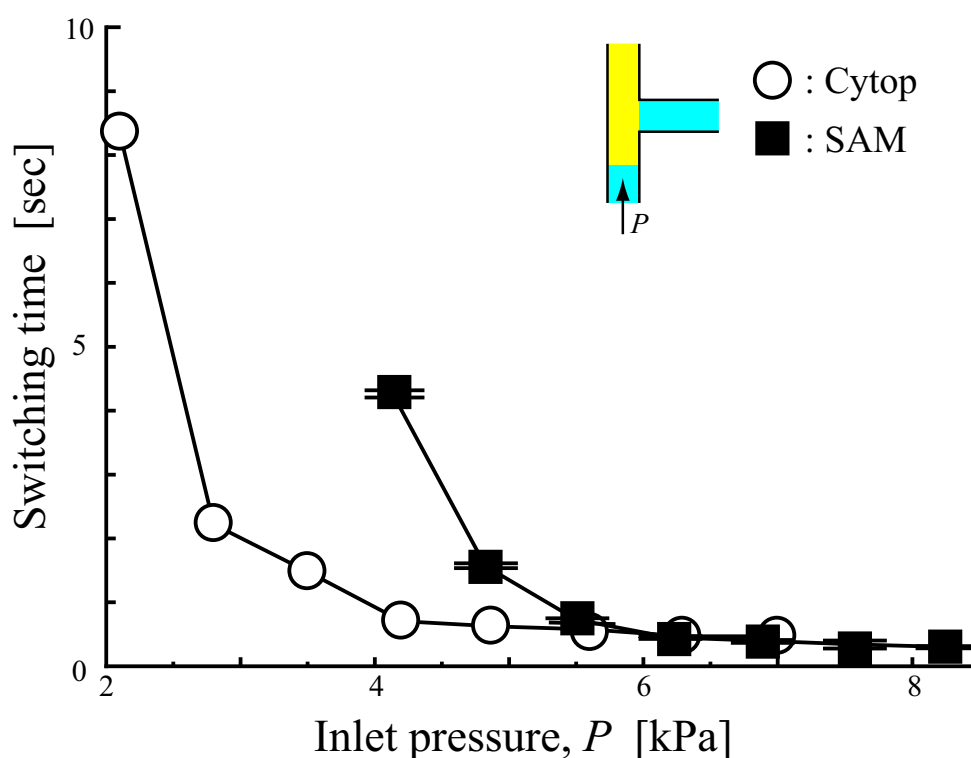


Fig.2.39 マイクロインジェクタを使った場合の  
印加圧力とスイッチング時間の関係

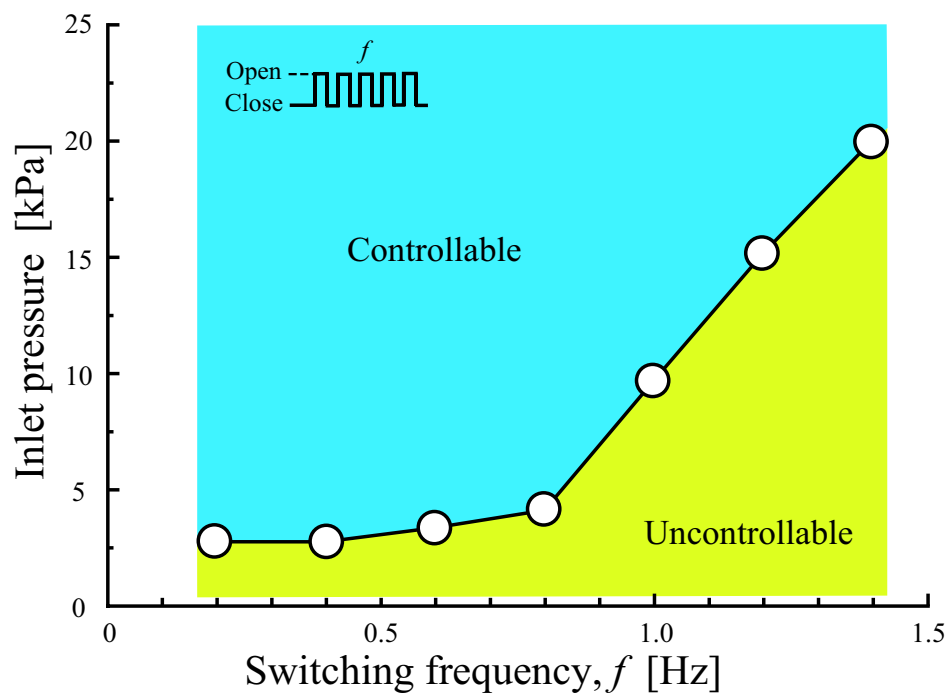


Fig.2.40 バルブ開閉周波数とバルブが開く最小印加圧力 (Cytop バルブの場合)

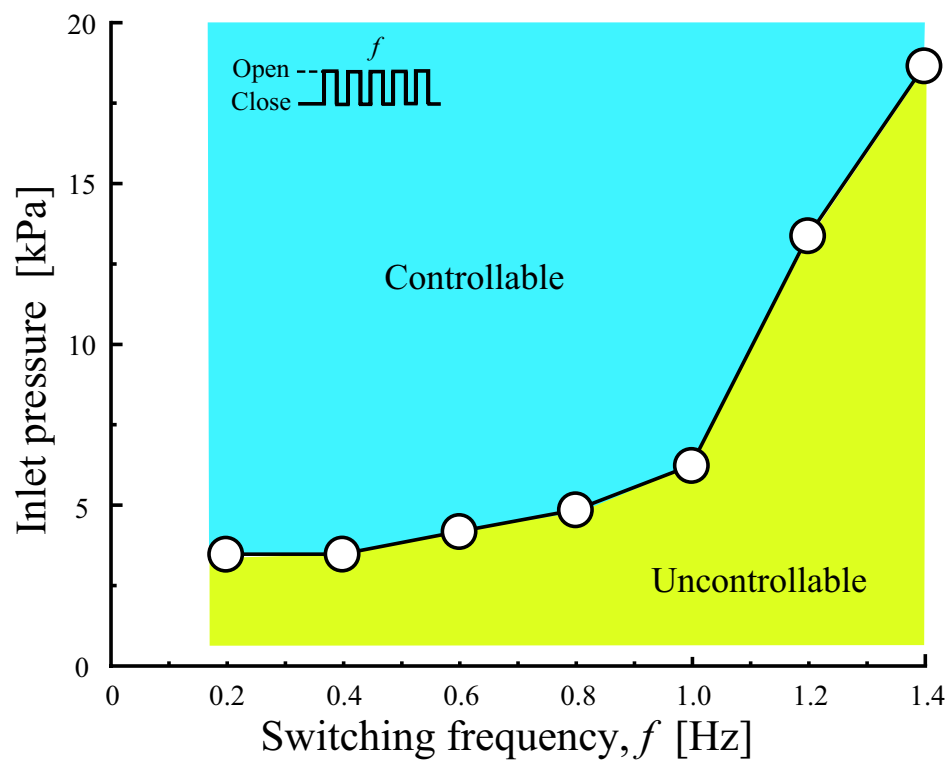


Fig.2.41 バルブ開閉周波数とバルブが開く最小印加圧力 (SAM バルブの場合)

## 2.4 培地を使ったバルブの開閉動作を実現するマイクロバルブ

本研究の目的は、細胞に対して化学的な刺激を与えることができるデバイスを構築することである。2.3 節ではマイクロバルブの駆動についての評価をし、親水性面と疎水性面を使ったバルブを制御することに成功した。しかし、実際に細胞を培養して薬剤によって刺激を行う場合、細胞を培養するための培地や細胞を刺激するための薬剤などを使ったバルブの開閉動作が必要である。そこで、本節ではバルブ内に流す液体として培地を使った場合のバルブの駆動について評価・検討を行う。

### 2.4.1 培地を使った場合のバルブ開閉実験

ここで行う実験の手順は、2.3.4 の Fig.2.29 に示したものと同様であるため省略する。2.3.4 では注入する液体として超純水を使っていたところを培地（RPMI1640, SIGMA-ALDRICH Corp.）に変更し開閉実験を行った。疎水性面に Cytos 膜を使った場合の結果を Fig.2.42 に、疎水性面に SAM 膜を使った場合の結果を Fig.2.43 に示す。Cytos 膜を使ったバルブの場合、初期状態では疎水性面で培地をはじくことができおり、空気によって注入側と放出側の液体を分断しバルブを閉じることができている (a)。しかし、一度注入側から圧力を印加しバルブを開くと (b)、その後は負の圧力を印加しても培地はまったく動かず、再びバルブを閉じることができなかった (c)。SAM 膜を使ったバルブの場合も初期状態ではバルブを閉じることができおり (a)、注入側に圧力を印加して数回のバルブ開閉動作はできたが、数回開閉を繰り返すと負の圧力を印加しても液体を分断することが困難であった (c)。このように、培地を使った場合に疎水性面から液体が離れずバルブ動作ができなくなる。これは培地が放出側のチャンネルに浸入すると同時にエアーベント側のチャンネルにも浸入し、培地に含まれるペプチドやアミノ酸などの成分が疎水性面上に吸着することが原因であると考えられる。このような現象は疎水性相互作用と呼ばれており水中で疎水性化合物どうしが吸着する作用である。この実験結果から、培地を使った場合、Cytos 膜を使ったバルブよりも SAM 膜を使ったバルブの方が数回ではあるがバルブの動作を行うことができたため、Cytos 面よりも SAM 面の方が表面に培地の成分を吸着しにくいことが示唆された。また、T 字の形状のバルブではエアーベント側のチャンネルに培地が浸入し、培地の成分の疎水面への吸着が大きくなるため、開閉動作を行うことが困難であることが示唆された。したがって、実際に培地を使ってバルブ動作をさせる場合は、疎水性面として SAM 膜を使用し、バルブのエアーベント側のチャンネルに液体が入りにくいような構造のバルブを設計することによってバルブの開閉が実現できるものと考えられる。

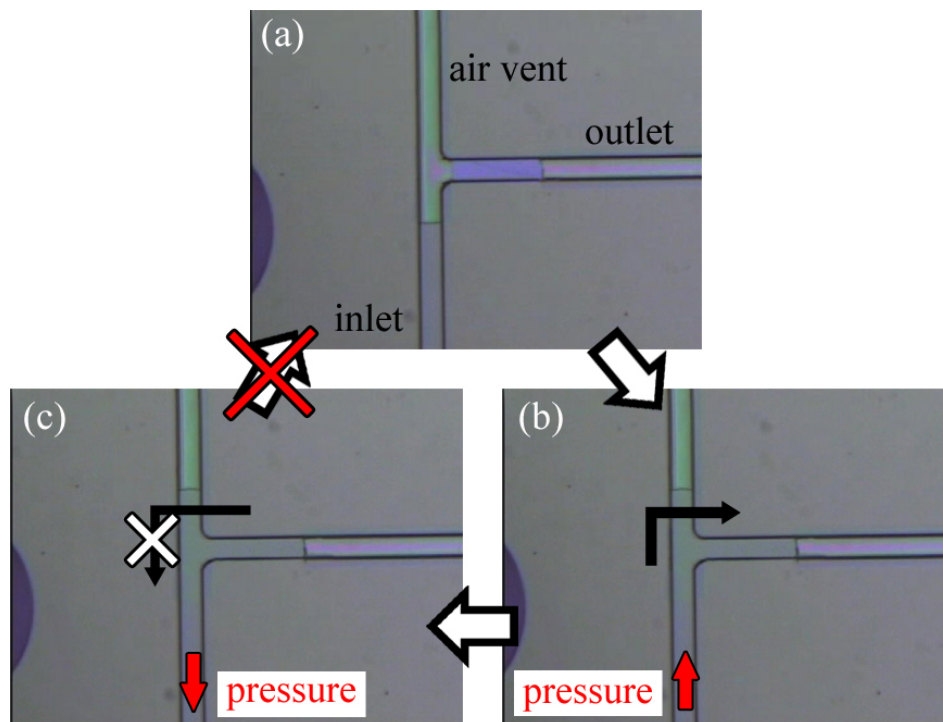


Fig.2.42 培地を使った場合の Cytop バルブの動作

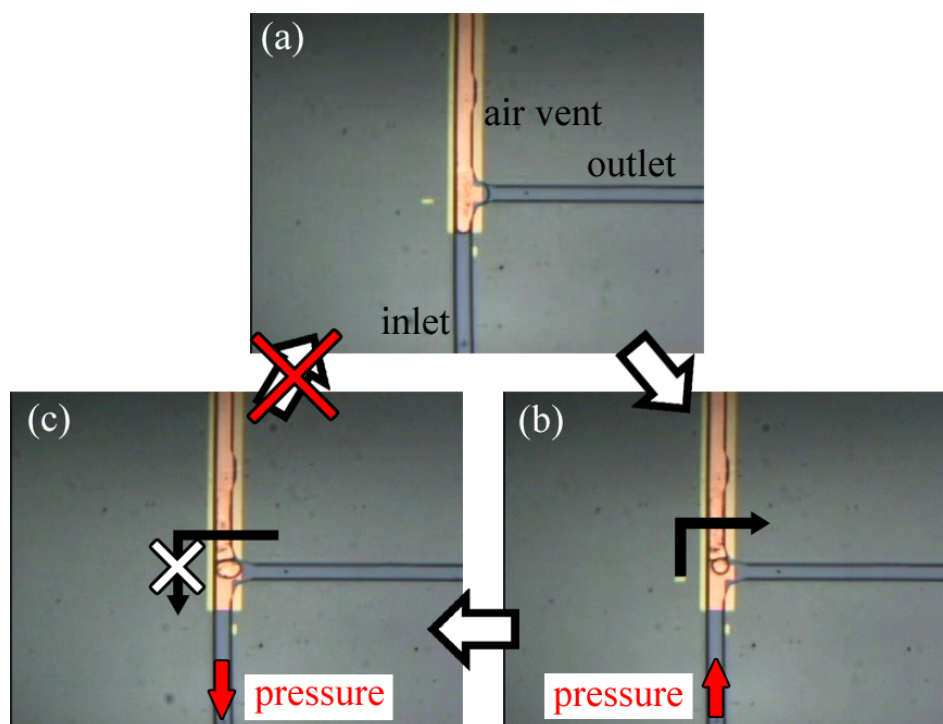


Fig.2.43 培地を使った場合の SAM バルブの動作

#### 2.4.2 培地のハンドリングが可能なマイクロバルブ

上述したように、チャンネル内を流す液体として培地を使用した場合、水中で疎水性化合物どうしが吸着する疎水性相互作用の影響でバルブの開閉を制御することができないという問題が明らかになった。この問題を解決するために、これまでに構築してきた T 字型のチャンネル構造を変更した 2 種類のバルブを構築した。構築したバルブの写真を Fig.2.44 と Fig.2.45 に示す。

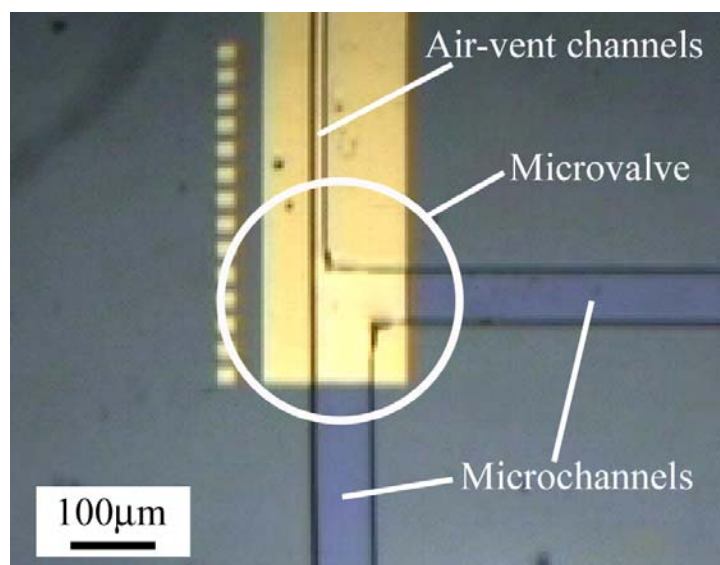


Fig.2.44 液体の浸入を防ぐエアークベントチャンネルを 1 本構築したマイクロバルブ

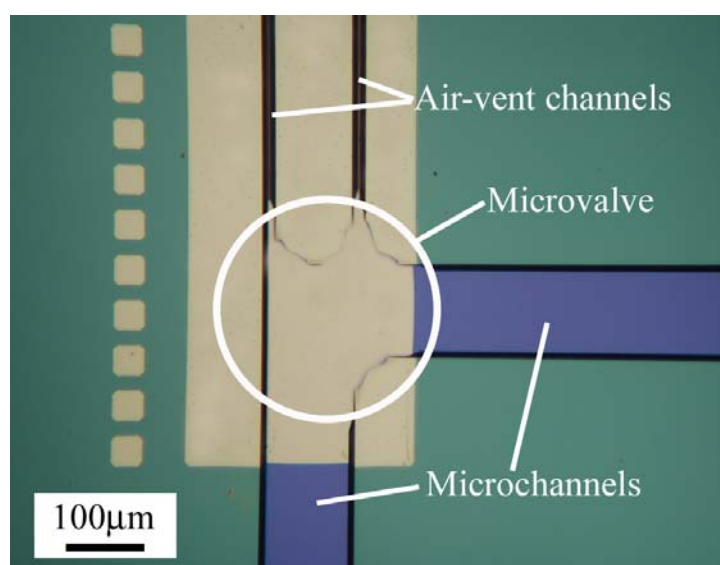


Fig.2.45 液体の浸入を防ぐエアークベントチャンネルを 2 本構築したマイクロバルブ

これらのデバイスは液体を注入するチャネルと液体を放出するチャネル，エアーベント用のチャネルから成り，注入側と放出側のチャネル幅は約 100  $\mu\text{m}$ ，チャネル深さは 10  $\mu\text{m}$  である．また，エアーベント用のチャネルは，幅 10  $\mu\text{m}$  程度の細いチャネルを構築した．エアーベントチャネルは十分に細く設計されており，チャネル表面は疎水性面であるため，表面張力によって液体の浸入を防ぐことができる．このため，T 字のバルブのようにエアーベントチャネルまで培地が浸入せず，疎水性面と培地が接着する面積を最低限に抑えることができる．バルブの開閉原理や製作プロセスはそれぞれ 2.3 節の Fig.2.22 と Fig.2.24 に示したものと同様である．

### 2.4.3 培地ハンドリング用バルブの開閉動作評価

まず，構築した 2 種類のバルブを使って，チャネルに超純水を注入した際のバルブの開閉動作を評価した．まず初めに，開閉動作を行う場合に T 字バルブと同様の動作をすることができるかどうかを確認した．Fig.2.44 に示すエアーベントチャネルが 1 本のバルブを用いた場合のバルブ開閉の様子を Fig.2.46 に示す．チャネル内に超純水を注入すると，毛細管現象によってバルブ部まで自動的に浸入する (a)．注入側から圧力を印加すると，疎水面ではじかれていた培地が疎水面を乗り越えてチャネル内を進み始める (b) が，エアーベントチャネルがチャネルの左隅の 1 本しかないため，液体の浸入と共にチャネル内の右側の空気が逃げ場を失い，放出側のチャネル内へと入り込む (c)．放出側のチャネルに入り込んだ空気が超純水の浸入を妨げ，印加圧力をかけ続けてもバルブを開くことができなかった (d)．

次に，Fig.2.45 に示すエアーベントチャネルが 2 本のバルブを用いた場合のバルブの開閉動作を Fig.2.47 に示す．チャネル内に超純水を注入すると毛細管現象によってチャネルの親水面を自動的に浸入し，親水性面と疎水性面の境界面で浸入は停止する (a)．注入側のチャネルに圧力を印加すると，超純水が疎水面を乗り越えて (b) 放出側の液体と接触し，バルブが開く (c)．その後，負の圧力を印加することによって，注入側と放出側の接触した液体が再び空気で分断され，バルブが閉じる (d)．このように，エアーベントチャネルが 1 本のデバイスは構造上空気が抜けにくく，バルブの動作を行うことができなかった．したがって，エアーベントチャネルが 1 本のバルブは培地のハンドリングバルブだけでなく，超純水を使ったバルブにも使用することはできない．一方，エアーベントチャネルが 2 本のデバイスは，T 字型のバルブと同様に超純水を使ったバルブの開閉動作ができたため，引き続きバルブの特性を検討する．また，今後は，エアーベントチャネルが 2 本のデバイスのことを培地ハンドリング用バルブと呼ぶ．



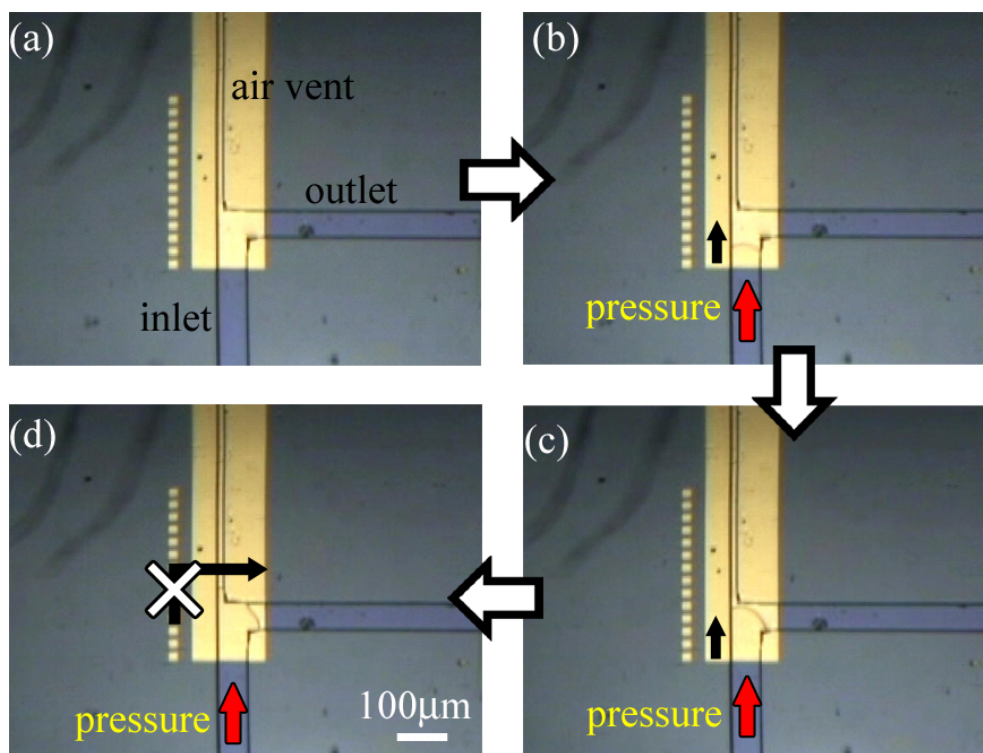


Fig.2.46 エアーベントチャンネルが1本のバルブを使ったバルブの動作

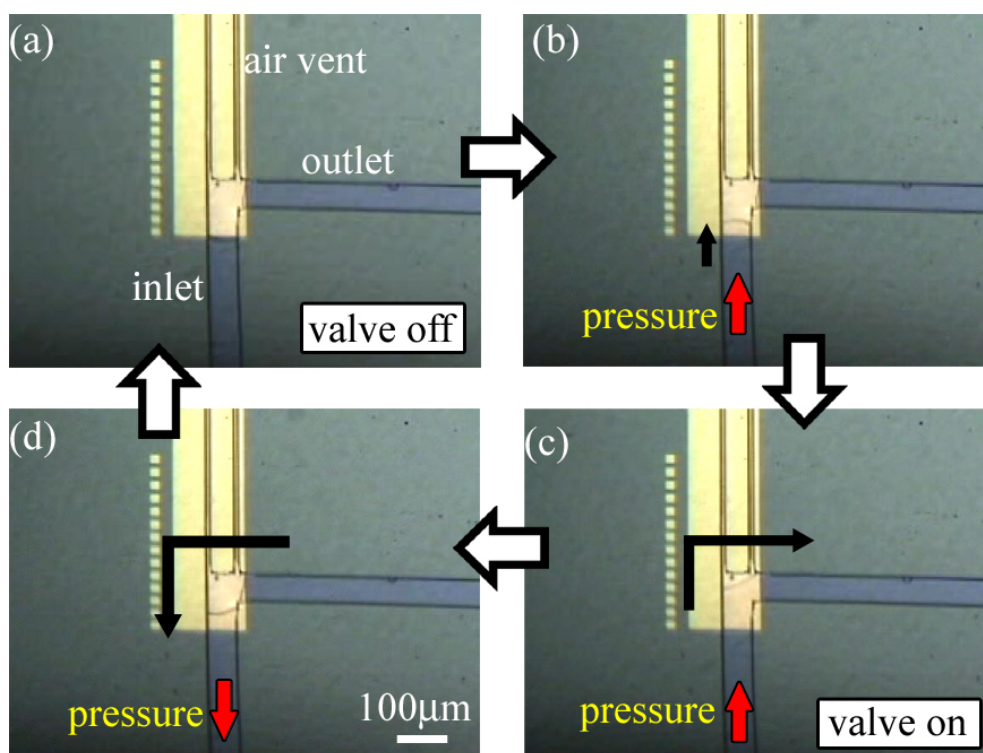


Fig.2.47 エアーベントチャンネルが2本のバルブを使ったバルブの動作

Fig.2.48 に、T 字バルブと培地ハンドリング用バルブのスイッチング時間と印加圧力の関係の比較を示す。これは、5 つのデバイスに対して実験を行った結果である。培地ハンドリング用バルブは、これまで T 字バルブで行ってきた実験と同様に印加圧力が大きくなるにつれてバルブ開閉のスイッチング時間が短くなり、5 kPa 程度の圧力を印加すると 2 秒程度でスイッチングを行うことができ、6 kPa 程度の圧力を印加すると 1 秒程度でスイッチングを行うことができる。したがって、1 秒以内でバルブの開閉を行うためには 6 kPa 以上の圧力を印加すればよい。また、培地ハンドリング用バルブと T 字バルブの印加圧力とスイッチング時間の関係を比較すると、4 kPa 程度の圧力を印加した際のスイッチング時間が 2 秒程度遅くなるものの、それ以上の印加圧力の場合はほぼ同じ動作を示すことが明らかになった。そして、このバルブも再現性良く動作することが確認できた。

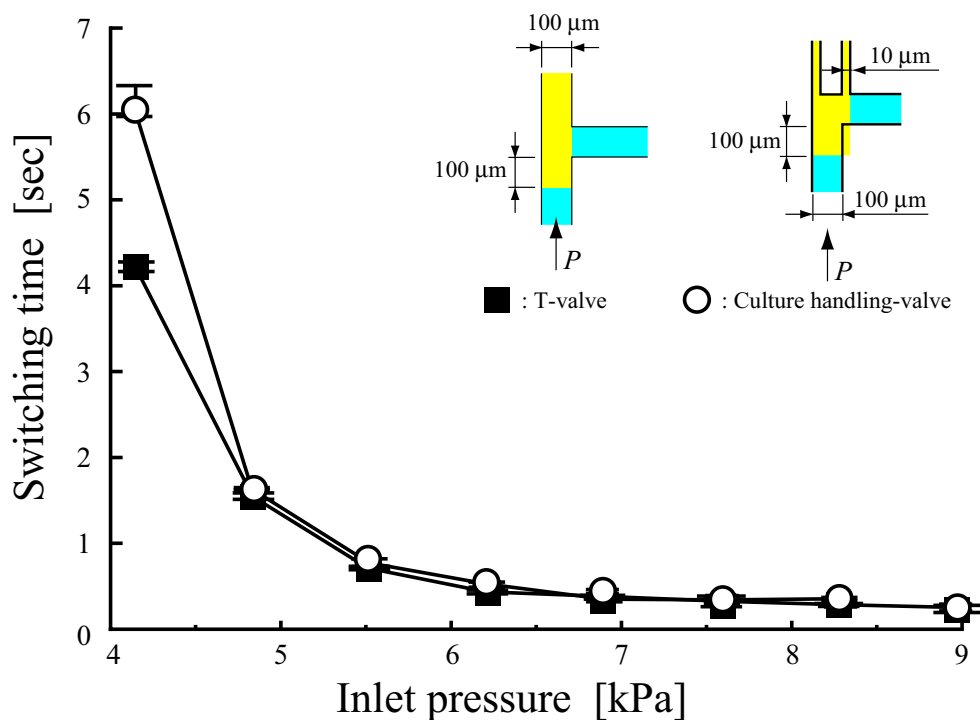


Fig.2.48 T 字バルブと培地ハンドリングバルブの比較  
(超純水を使った場合)

次に、バルブに培地を注入し培地を使った場合にも開閉動作が可能であるかどうかの評価を行った。Fig.2.49 に培地を使った開閉動作の様子を示す。注入側のチャネ

ルに培地を注入すると、培地は毛細管現象によってチャンネル内の親水性面上に侵入し、親水性面と疎水性面の境界面まで浸入すると疎水面にはじかれてその場に停止する (a)．注入側のチャンネルから圧力を印加すると、培地が疎水性面を乗り越えて (b) 放出側の培地と接触しバルブが開く (c)．バルブが開いた後、注入側のチャンネルから負の圧力を印加すると注入側と放出側の液体が空気によって再び分断され、バルブが閉じる (d)．このように、培地ハンドリング用バルブを用いると、培地を使った場合でもバルブの開閉をすることができ、この動作を繰り返し行うことによってバルブを連続的に開閉させることにも成功した．

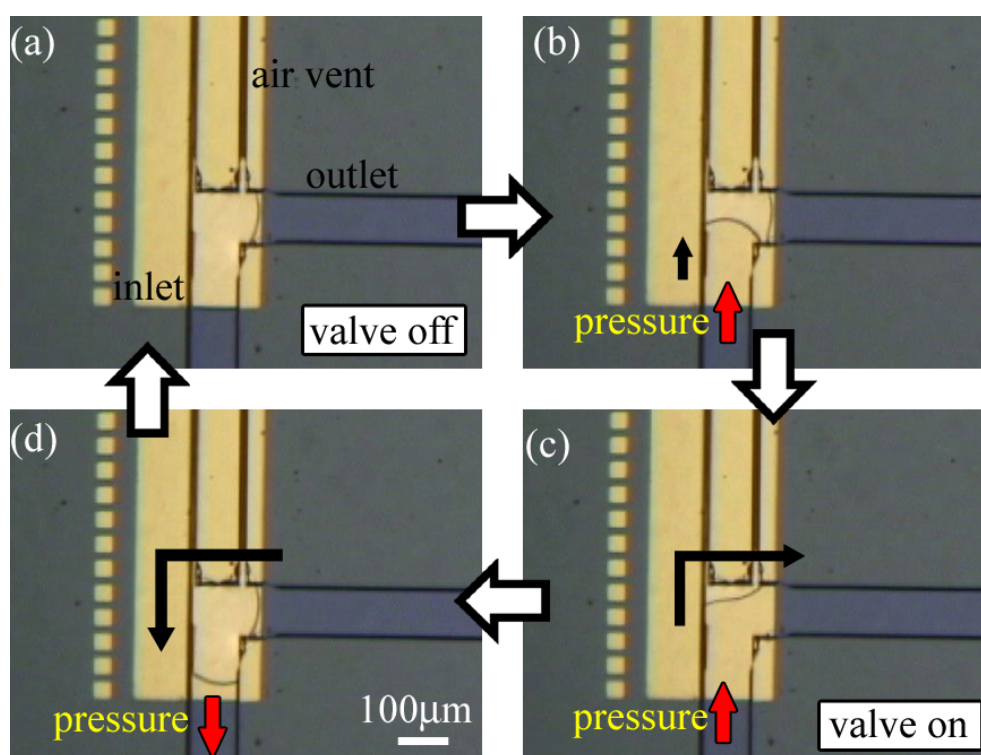


Fig.2.49 培地ハンドリング用マイクロバルブの動作

培地ハンドリング用バルブを用いることによって培地の開閉を行うことができたため、培地を使った際のスイッチング時間と印加圧力の関係を調べた． Fig.2.50 にその結果を示す．このグラフに示す結果は 5 つのデバイスを使って実験を行ったものである．この結果も超純水を使った場合と同様に印加圧力を大きくするにつれて、バルブ開閉のスイッチング時間が短くなる．すなわち、2 kPa の圧力を印加すると 2 秒程度でスイッチングを行い、4 kPa 程度の圧力を印加すると 1 秒程度でスイッチン

グを行うことができる。したがって、1 秒以内でバルブの開閉を行いたい場合は 4 kPa 以上の圧力を印加すれば実現できることが確認できた。また、これらの結果から、超純水を使ったバルブの開閉よりも培地を使ったバルブの開閉のほうが低い印加圧力で開閉を行うことができるということがわかった。これは、培地内に含まれるアミノ酸などの成分が疎水性相互作用により疎水性面に吸着しようとする作用が働くためだと考えられる。もし、バルブの開閉を長時間行う場合は、疎水性面に吸着する培地内の成分がバルブの開閉に影響を及ぼし、バルブの開閉ができなくなることが懸念される。以上の結果、新しく構築した培地ハンドリング用バルブを使うことによって、培地を使つてのバルブ開閉動作を行うことが可能であるが、培地内の成分が疎水性表面に吸着していることが考えられるため、バルブの連続開閉実験とバルブの耐久試験を行い検討する必要があると考えられる。

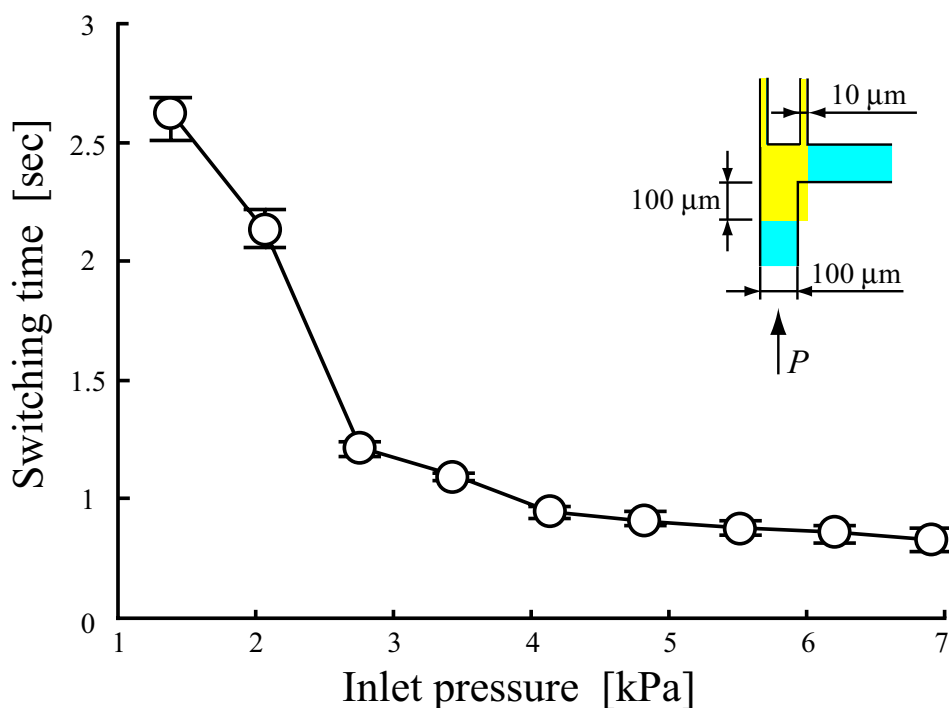


Fig.2.50 培地ハンドリングバルブの印加圧力とスイッチング時間の関係  
(培地を使った場合)

#### 2.4.4 培地ハンドリング用バルブの連続駆動評価

新しく構築した培地ハンドリング用バルブを使うことによって、チャンネル内に注

入する液体として培地を使った場合でもバルブの開閉を行うことができた。しかし、疎水性表面に培地内の成分が吸着するため、バルブの開閉動作に影響を及ぼし連続開閉駆動や長時間駆動ができなくなる可能性がある。そこで、ここでは培地を使った場合のバルブの連続開閉駆動や耐久性について評価する。実験の方法は 2.3.5 で示した方法と同様であり、Fig.2.35, Fig.2.36 に示す電子回路を用いてパルスを入力することによってバルブの開閉制御を行った。

Fig.2.51 に培地を使った場合のバルブの開閉周波数と開閉に必要な最低の印加圧力の関係を示す。バルブの開閉周波数を大きくするにつれて開閉に必要な印加圧力が大きくなるが、開閉周波数が 0.2 Hz から 1.0 Hz の間では、5 kPa 程度の印加圧力で連続開閉することができる。しかし、開閉周波数が 1.0 Hz を超えると開閉に必要な印加圧力は急激に大きくなり、1.2 Hz の場合は 15 kPa 程度、1.4 Hz の場合は 20 kPa 程度の印加圧力が必要である。この結果は、Fig.2.51 中の破線で示すように超純水を使ったバルブの連続開閉動作とほぼ同じ結果になった。よって、培地ハンドリング用のバルブを使うことで、培地を使った場合でも超純水を使った場合と同様にバルブの連続開閉を行うことができる。

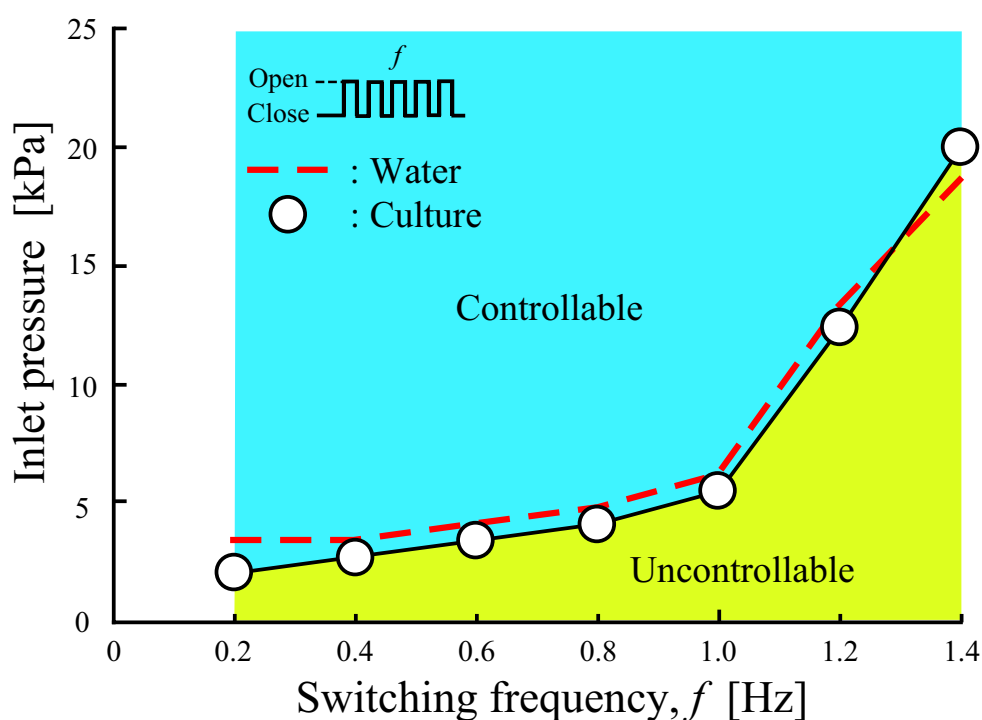


Fig.2.51 バルブ開閉周波数とバルブを開くための圧力  
(培地を使った場合)



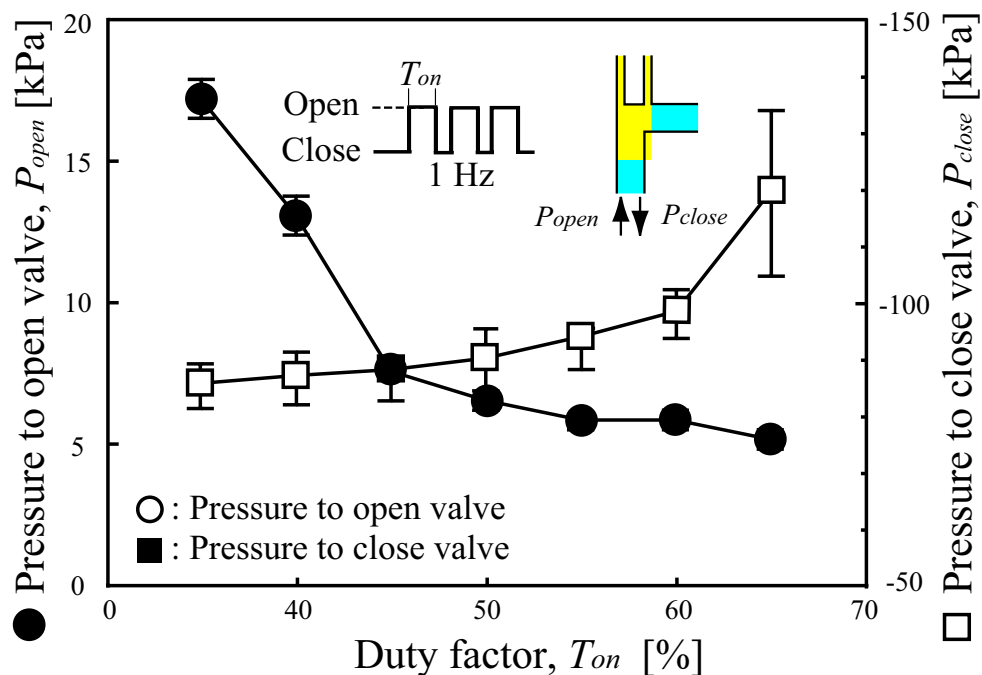


Fig.2.52 バルブを 1 Hz で開閉した際の Duty 比とバルブ開・閉圧力の関係

次に、バルブの開閉周波数を 1 Hz にし、開閉の Duty 比を変化させた場合にバルブを開閉するのに必要な印加圧力を求めた。その結果を Fig.2.52 に示す。このグラフは左右に軸をとっており、左側の軸がバルブを開くために必要な印加圧力で右側の軸がバルブを閉じるために必要な印加圧力である。1 Hz でバルブを開閉する際に  $T_{on}$  が閉める割合を小さくする（バルブを開く時間を短くする）と、バルブを開くのに必要な印加圧力が高くなり、 $T_{on}$  が閉める割合を大きくする（バルブを開く時間を長くする）と、バルブを開くのに必要な印加圧力が低くなる。具体的には、 $T_{on}$  が 30% の場合はバルブを開くのに 17 kPa 程度の印加圧力が必要なのに対して、 $T_{on}$  が 50 から 65% の場合は 5 kPa 程度でバルブは開く。これまでの実験で Duty 比を変化させずにバルブの開閉を行った場合（ $T_{on}$  が 50% の場合）、バルブを開くために必要な印加圧力は 5 kPa 程度であったため、Duty 比を変化させてバルブを開く時間を長くしてもバルブを開くために必要な印加圧力は飛躍的に低くならないことがわかった。また、バルブを閉じる際の印加圧力は、 $T_{on}$  が閉める割合を小さくする（バルブを閉じる時間を長くする）と、バルブを閉じるのに必要な印加圧力が低くなり、 $T_{on}$  が閉める割合を大きくする（バルブを閉じる時間を短くする）と、バルブを閉じるのに必要な印加圧力が高くなる。具体的には、 $T_{on}$  が 30% から 50% の場合はバルブを閉じ

るのに-90 kPa程度の印加圧力が必要なのに対して、 $T_{on}$ が60%の場合は-100 kPa, 65%の場合は-120 kPa程度の印加圧力が必要である。バルブを閉じる場合も、これまでの実験（ $T_{on}$ が50%の場合）では-90 kPa程度でバルブを閉じることができていたが、Duty比を制御することによってバルブを閉じる時間を長くしてもバルブを閉じるために必要な印加圧力が低くなることはなかった。しかし、この実験の結果、バルブ開閉のタイミングやスピードは開閉周波数を制御すると共に、Duty比の制御によっても制御することができるとことがわかった。

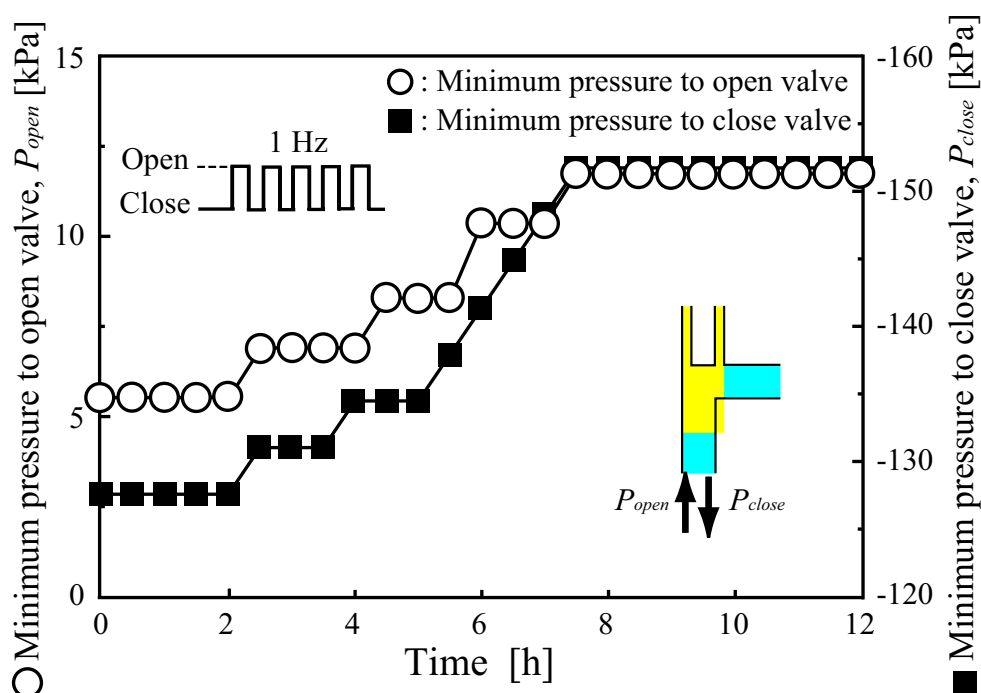


Fig.2.53 培地ハンドリングバルブの耐久試験

最後に、構築したバルブを繰り返し開閉させた場合にどれだけの間、連続して駆動することができるかどうかを確認した。Fig.2.53に培地を使った場合のバルブの耐久試験の結果を示す。このグラフには左右に軸があり、左側の軸がバルブを開くために必要な最低の印加圧力で右側の軸がバルブを閉じるために必要な最低の印加圧力である。耐久試験の初期値はバルブを開くための印加圧力が5 kPa程度でバルブを閉じるための印加圧力が-125 kPaである。耐久試験を始めて2時間までは初期設定のまま開閉を繰り返し行うことができたが、その後は時間の経過と共にバルブを開くために必要な印加圧力と閉じるために必要な印加圧力は徐々に高くなり、実験開

始から7時間を超えるとバルブを開くための印加圧力が12 kPa程度、閉じるための印加圧力が-150 kPa程度で一定になった。結果的に、12時間(43200サイクル)バルブを連続して開閉駆動させることができた。時間の経過と共にバルブを「開」「閉」するための両印加圧力が高くなったのは、バルブの開閉を行うにつれて培地中の成分が疎水性相互作用によって疎水性面上に少しずつ吸着しており、疎水性面上で培地が切断されにくくなったために、高い圧力を印加して強制的に切断する必要があるものだと考えられる。また、超純水を使って同じようにバルブの耐久試験を行った結果、バルブを開くための印加圧力が7 kPa、バルブを閉じるための印加圧力が-97 kPaで24時間連続してバルブを開閉させ続けることができた。この実験は1 Hzでバルブを開閉させていたため、86400サイクル以上の開閉が可能であった。これらの結果、超純水を使った場合のバルブの開閉では疎水性面上にアミノ酸などの吸着が無いために長時間安定して駆動させることができるものと考えられる。また、培地を使った場合は、疎水性面上に培地内の成分が吸着するため、微小な凹凸構造流路表面に製作し、液体と流路表面とが接触する面積を少なくする構造や MPC (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) ポリマーや PEG (Polyethylene glycol) など疎水性面上にさまざまな成分が吸着しにくいような構造や材料を使うことによって長時間安定して開閉を行うことができるのではないかと考えられる。



## 2.5 結言

本章では神経細胞の分化を誘導するデバイスを実現するために必要な、薬剤を放出するためのナノホールと放出を制御するためのマイクロバルブの 2 つの要素をそれぞれ構築し、その特性について評価した。これまでの実験によって得られた結果を以下に記す。

### 薬剤放出用ナノホール

1. ナノホールから蛍光溶液を放出した場合、計測エリアにおいて平面的な濃度分布を作り出すことができた。
2. ナノホール上に液体を置いても表面張力の影響により、ナノホールから液体が出てくることはない。
3. ナノホールの上面と下面に液体を満たし、その液体同士を接触させることによって拡散を利用して薬剤を放出することができる。

### T 字マイクロバルブ（液柱を上下に変位させることによって圧力を印加する場合）

#### [超純水を使った場合]

1. 疎水性面に Cytop 膜を使った場合でも疎水性 SAM 膜を使った場合でもバルブを開閉することができる。
2. バルブの開閉を行うためには、6 kPa 以上の圧力を印加する必要があり、数秒以内でバルブを開閉したい場合は 7 kPa 以上の圧力を印加することで実現できる。
3. デバイス表面と液体との接触角が小さくなると、マイクロバルブが開くのに必要な印加圧力は低くなる。
4. SAM 膜を使ったバルブの方が Cytop 膜を使ったバルブよりも低い圧力で開くことができる。

#### [培地を使った場合]

1. バルブの開閉動作を行うことはできない。

### T 字マイクロバルブ（マイクロインジェクタによって圧力を印加する場合）

#### [超純水を使った場合]

1. マイクロインジェクタによって圧力を印加する場合のほうが液柱を上下に変位させて圧力を印加する場合よりも低い印加圧力でバルブを動作させることができる。
2. 1 秒以内に高速にバルブの開閉を行いたい場合、Cytop バルブ、SAM バルブ共に 6 kPa 以上の圧力を印加することによって実現できる。

3. バルブを繰り返し開閉させる場合、バルブの開閉周波数が高くなるとバルブを開くために必要な印加圧力も高くなる。
4. Cytop バルブ, SAM バルブ共に開閉周波数と印加圧力の関係を考慮すれば、高速・低速の繰り返し動作を制御することができる。
5. 構築したバルブは再現性良く動作することができる。

[培地を使った場合]

1. バルブの開閉を行うことができない。

#### 培地ハンドリング用マイクロバルブ

[超純水を使った場合]

1. 4 kPa 以上の圧力を印加するとバルブを開くことができ、1 秒以内でバルブを開きたい場合は 5.5 kPa 以上の圧力を印加することによって実現できる。
2. バルブを開くための印加圧力が 7 kPa, バルブを閉じるための印加圧力が 97 kPa で 24 時間 (86400 サイクル) 以上連続して開閉を行うことができる。

[培地を使った場合]

1. Cytop 表面よりも SAM 表面のほうが培地内に含まれるアミノ酸などの成分を吸着しにくい。
2. エアーベント側のチャネルを十分細くすることによって培地を使った場合のバルブ動作が可能になる。
3. 1 秒以内でバルブの開閉を行うためには 4 kPa 以上の圧力を印加することによって実現できる。
4. 培地を使った場合のほうが超純水を使った場合よりも低い印加圧力で開閉を行うことができる。
5. バルブ開閉のタイミングやスピードは開閉周波数を制御すると共に、Duty 比の制御によっても制御することができる。
6. バルブの開閉を繰り返すと、バルブを開くために必要な印加圧力と閉じるために必要な印加圧力は時間の経過と共に高くなる。
7. バルブ開閉に必要な印加圧力を制御すれば、12 時間 (43200 サイクル) バルブを連続して開閉駆動させることができる。

# 第3章 薬剤放出制御デバイスの製作 および評価

## 3.1 緒言

第2章では、薬剤放出用のナノホール・アレイ（2.2節）と放出制御用のマイクロバルブ（2.3, 2.4節）を個別に構築し、これらの動作実験や特性評価に成功した。しかし、個別にデバイスを構築しただけでは、バルブの開閉によってナノホールからの薬剤放出を制御することができない。そこで、本章ではナノホールとマイクロバルブ、培養チャンバを同一基板上にシステム化し、薬剤の放出を制御し培養細胞に対して精密な刺激を行うことができるデバイスについて述べる。

デバイスの構築を始める前に、材料を選定する必要がある。つまり、ナノホールとマイクロバルブの製作プロセスが異なるため、今までと同様の製作プロセスでは2つの要素を同一基板上に構築するのは技術的に困難である。しかし、ナノホールとマイクロバルブは共にシリコン基板と  $\text{SiO}_2$  膜で構成されるデバイスであり、材料や加工方法はほぼ同一のものである。そこで、デバイスの基となる材料として SOI (Silicon on Insulator) 基板を使用した。SOI 基板とは、絶縁膜状に形成した単結晶シリコンを基板とした半導体であり、主にトランジスタの材料として使われているものである。本研究では、絶縁層である  $\text{SiO}_2$  膜 (500 nm) をデバイスシリコン (10  $\mu\text{m}$ ) とハンドルシリコン (350  $\mu\text{m}$ ) で挟んだ構造の SOI 基板を使用し、SOI 基板を両面から加工することによって薬剤放出制御デバイスを構築する。

また、バルブの開閉によるナノホール・アレイからの放出を評価するために、薬剤の代わりに蛍光色素を使って実験を行う。この際、ナノホール・アレイ周辺で計測した蛍光強度を蛍光色素の濃度として扱う。したがって、あらかじめ蛍光強度と蛍光色素の濃度の関係を調べておく必要がある。次の 3.2 節で蛍光強度と濃度の関係を調べ、その後デバイスの評価実験を行う。

### 3.2 蛍光強度と濃度の関係

蛍光強度と蛍光色素の濃度の関係は、一般的に線形的な関係があるといわれており、化学の分野などで蛍光色素を使った評価方法は多く用いられている。本研究でも蛍光強度と濃度の関係が線形的であるということを前提に実験を行ってきたが、実際に濃度の議論をする前に蛍光強度との濃度の関係を調べておくと共に、その関係を示す蛍光標準曲線を求める必要がある。蛍光標準曲線を求めることによって、バルブの開閉で得られた蛍光強度を濃度として評価することができる。そこで、ここでは、蛍光標準曲線を求めるために 1 ng/ml から 10000 ng/ml までの 13 種類の濃度の蛍光溶液を準備し、それらの蛍光強度をそれぞれ計測した。蛍光色素が発光する蛍光強度を計測する際、カメラの露光時間の増減や取り込み画素数、対物レンズの倍率によって蛍光強度の値が変化する。このため、再現性の取れるグラフを得るためには露光時間や取り込み画素数、対物レンズの倍率の条件を一定にしておく必要がある。今回の実験では、露光時間が 250 msec、取り込み画素数が 16 ビット、対物レンズが 40 倍である。この実験によって得られた蛍光強度と実験に使った蛍光色素の濃度との関係を表すことによって、蛍光標準曲線を求める。実験方法を Fig.3.1 に示し、実験手順を以下に示す。

- (1) 蛍光濃度が 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 500, 1000, 2000, 4000, 5000, 10000 ng/ml の 13 種類の蛍光溶液を作る。
- (2) 蛍光顕微鏡の上にガラス基板を置く。
- (3) 蛍光顕微鏡の露光時間を 250 msec に設定する。
- (4) マイクロピペッター (GILSON, ピペットマン, P-10) を使って 100  $\mu$ l の溶液をガラス基板上に置く。
- (5) 蛍光顕微鏡で蛍光強度を計測する。

この手順で実験を行った結果を Fig.3.2 に示す。蛍光濃度が 2000 ng/ml 以上の濃度の場合は、計測できる範囲を超え蛍光強度増加しなくなった。しかし、1 ng/ml から 1000 ng/ml までの範囲ではほぼ線形のグラフを得ることができた。本研究では、100 ng/ml～1000 ng/ml の濃度の蛍光溶液を使用することを考えており、その際にナノホール・アレイから放出される蛍光溶液の濃度は 500 ng/ml 以下であると考えられる。そこで、Fig.3.3 に 1 ng/ml から 500 ng/ml までの線形領域のグラフを示す。この領域でも蛍光溶液の濃度と蛍光強度の関係は線形であることが確認できた。線形領域では未知試料の蛍光強度から濃度を推測することができるため、この濃度領域で実験を行うことによって蛍光強度を濃度として評価することができる。また、一般に蛍光強度を計測する場合は、濃度が高くなりすぎるとクエンチング (quenching) という現象により蛍光強度が低下するが、今回の実験ではこの現象は見られなかった。

これは、10000 ng/ml という濃度はクエンチング現象が起こるほど十分に濃い濃度ではないということが理由だと考えられる。また、この実験で得られた蛍光色素の濃度と蛍光強度の関係のグラフは原点を通らないグラフになった。これは、励起光を照射した際、蛍光色素のみが発光するのではなく様々な材料（例えば、シリコン基板やガラス基板、シャーレなど）も微量ながら発光している。この材料自体の発光が計測値に影響することが原点を通らない直線になる原因であると考えられる。この実験の結果を基に、グラフが線形となる領域での蛍光標準曲線を求めた。その結果、蛍光標準曲線は

$$y = 5.04x + b \quad (3.1)$$

で表される。ここで、 $y$  は蛍光強度、 $x$  は濃度[ng/ml]、 $b$  は自家発光の蛍光強度である。この式を使うことによって、蛍光強度を濃度に変換することができる。

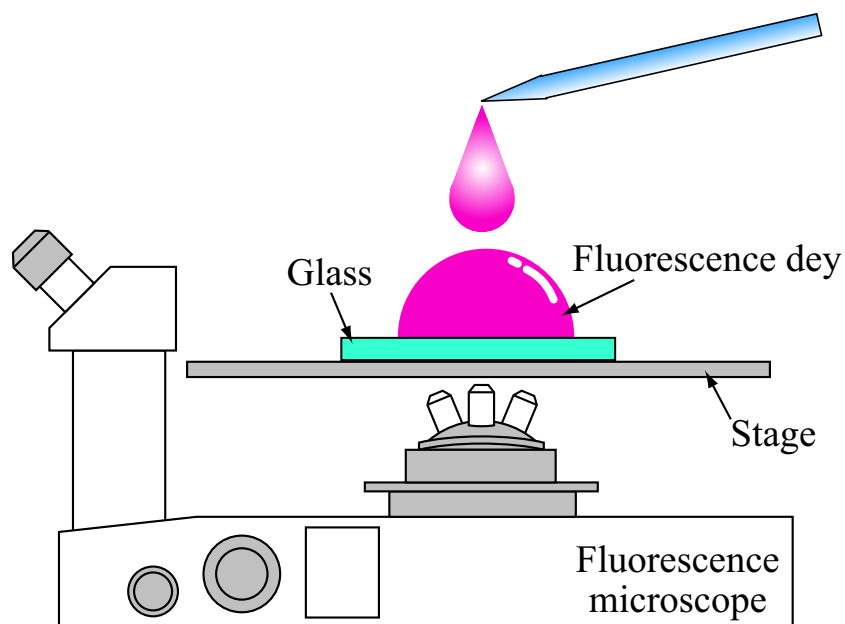


Fig.3.1 蛍光標準曲線計測実験

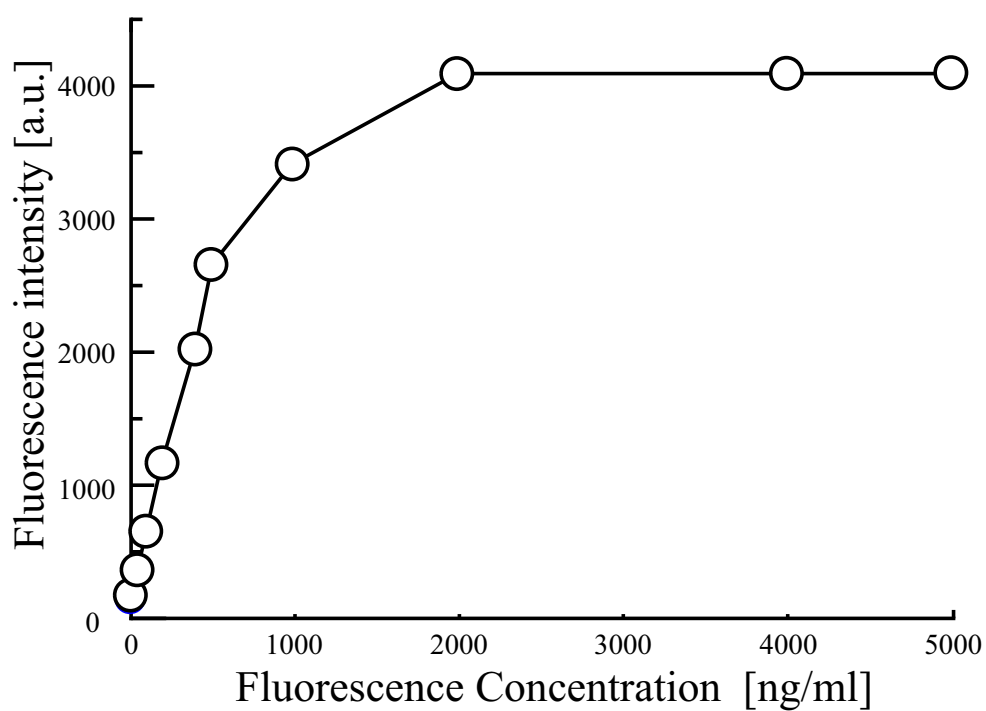


Fig.3.2 蛍光標準曲線 (1 ng/ml~10000 ng/ml)

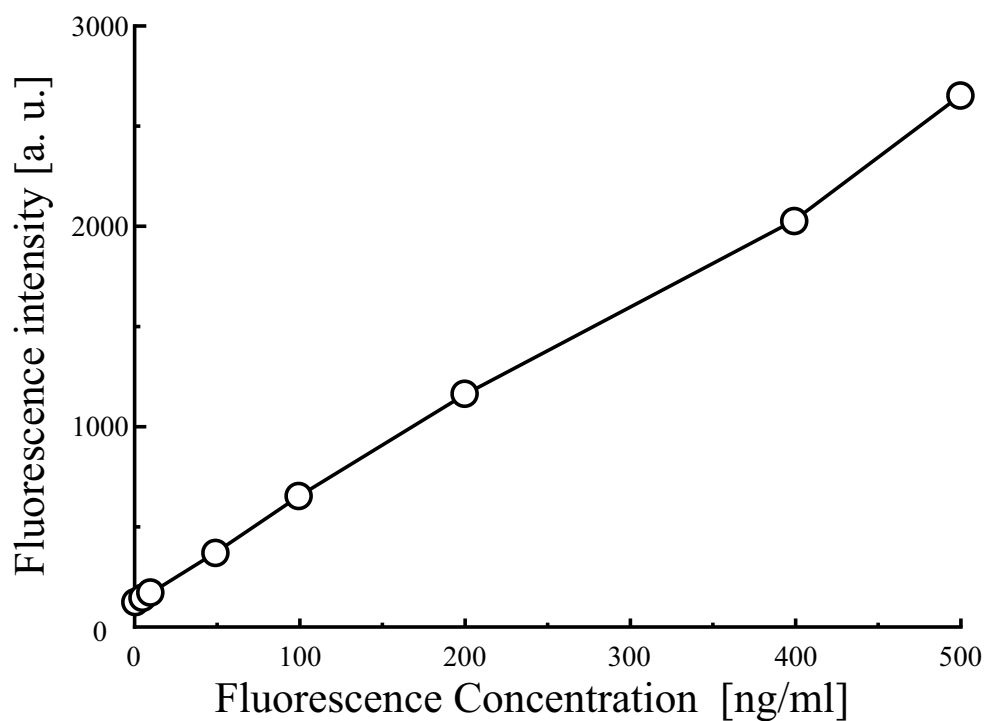
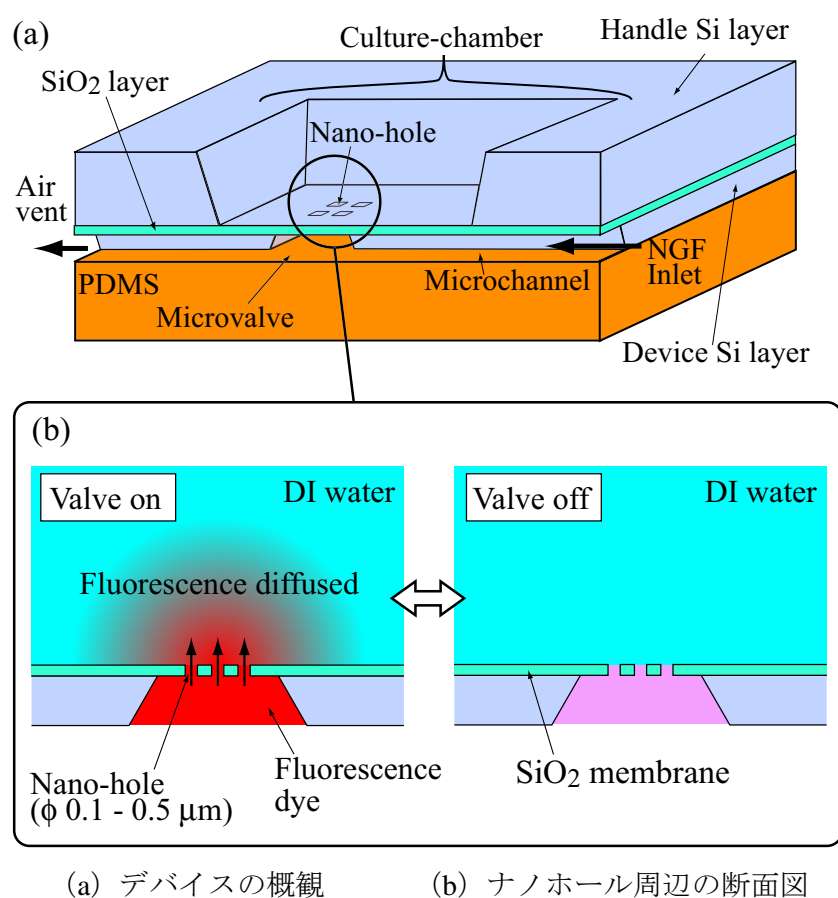


Fig.3.3 蛍光標準曲線 (1 ng/ml~500 ng/ml)

### 3.3 薬剤放出制御デバイス

ナノホール・アレイ，マイクロバルブ，培養チャンバを同一基板上にシステム化した薬剤放出制御デバイスを構築した．これらの各要素はそれぞれ極近傍に構築されており，ナノホール・アレイからの薬剤放出をマイクロバルブが精密に制御し，ナノホール・アレイから放出された薬剤で細胞を直接刺激することができる構造である．ここでは，製作したデバイスの構成や製作プロセス，特性について述べる．



(a) デバイスの概観

(b) ナノホール周辺の断面図

Fig.3.4 デバイスの概要

#### 3.3.2 薬剤放出制御デバイスの構成

薬剤放出制御デバイスの概略図を Fig.3.4 (a) に示す．このデバイスは 2.2 節で構築したナノホール・アレイと 2.4 節で構築したマイクロバルブを同一基板上にシステ

ム化したものであり、異方性エッチングなどのマイクロマシニング技術を駆使した SOI 基板の両面加工によって構築された。ハンドルシリコンをエッチングすることにより細胞を培養するための培養チャンバを構築し、そのチャンバの直下（デバイスシリコン）にはマイクロバルブを含むマイクロチャネルを構築した。培養チャンバとマイクロチャネルは、厚さ 500 nm の  $\text{SiO}_2$  膜で隔てられており、その  $\text{SiO}_2$  膜をエッチングして製作した内径 500 nm のナノホール・アレイのみでつながっている。そのため、バルブの開閉によってナノホールに供した薬剤をチャネル側から培養チャンバ側へナノホールを通して放出することができる。また、培養チャンバ内のナノホール・アレイの近傍に細胞を培養することができるため、ナノホール・アレイから放出された薬剤を細胞に直接作用させることができる。マイクロバルブは、チャネル内に構築されており、バルブの動作原理や構造などは 2.3 節と 2.4 節で示した通りである。Fig.3.4 (b) にナノホール周辺の断面図を示す。左側の図がバルブを開いた状態で、右側の図がバルブを閉じた状態を表している。バルブを開くと薬剤がチャネル側からナノホール・アレイへ供給されて培養チャンバへ放出される。そして、バルブを閉じると薬剤は供給されなくなり、ナノホール・アレイから放出されなくなる。このようにバルブの開閉によって薬剤の放出を精密に制御することができる。Fig.3.5 に製作したデバイスの SEM 写真を示し、Fig.3.6 に培養チャンバ側から撮影した培養チャンバやナノホール・アレイの写真を示す。チャネルの幅は 100  $\mu\text{m}$  程度であり、深さは 10  $\mu\text{m}$ 、培養チャンバの培養面は 200  $\mu\text{m}$  x 200  $\mu\text{m}$  の面積である。

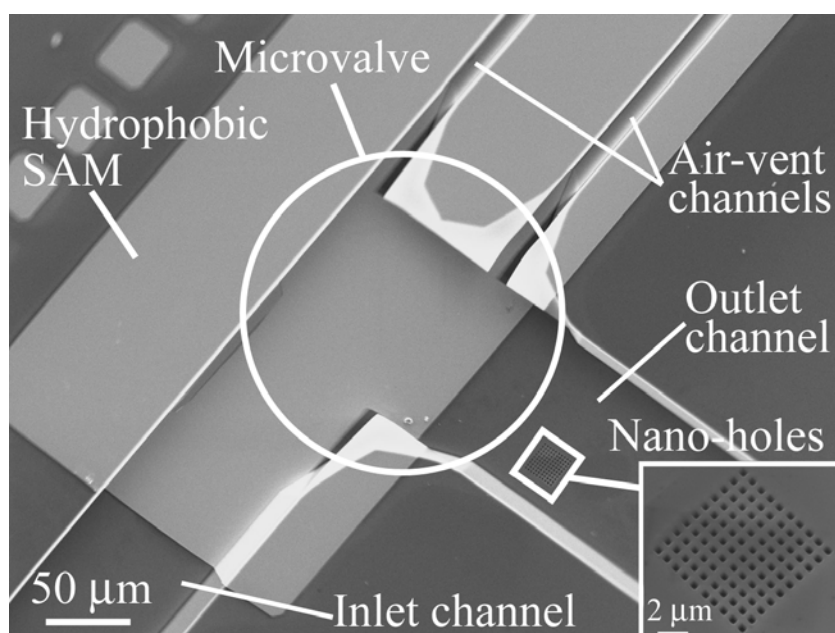


Fig.3.5 薬剤放出制御デバイスのマイクロバルブ側 SEM 写真



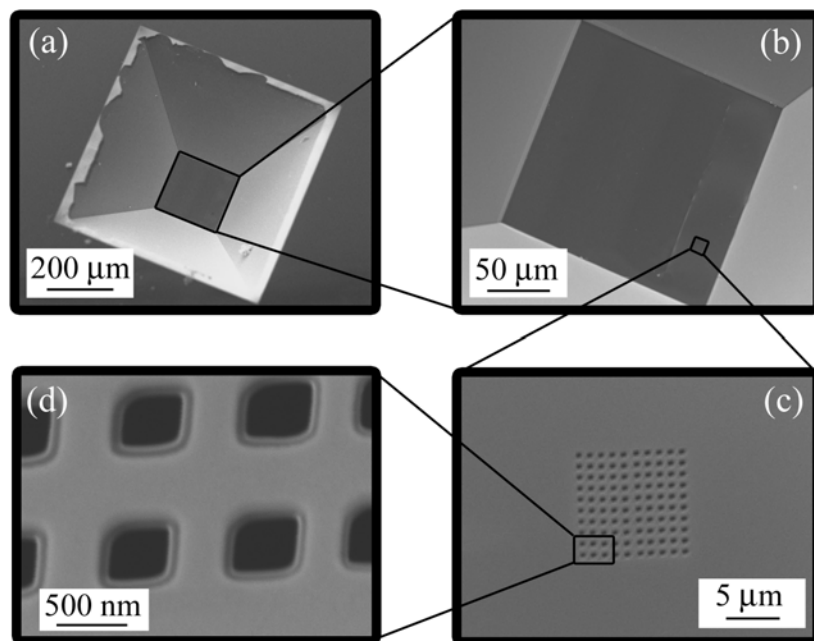


Fig.3.6 薬剤放出制御デバイスの培養チャンバ側写真

### 3.3.3 薬剤放出制御デバイスの製作

SOI 基板の熱酸化と結晶異方性エッチングを主としたマイクロマシン技術により基板の両面を微細加工し、細胞を培養するためのチャンバ（培養エリア  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$  程度）と幅  $100\ \mu\text{m}$  程度、深さ  $10\ \mu\text{m}$  のマイクロチャンネルを製作した。マイクロチャンネル内には親水性面と疎水性面を利用したマイクロバルブも構築した。さらに、集束イオンビーム（Focused Ion Beam, FIB）で  $\text{SiO}_2$  膜を部分的にエッチングすることによってナノホール・アレイを製作し、チャンネルと培養チャンバを貫通させた。デバイスの製作プロセスを Fig.3.7 に示す。また、製作プロセスの詳細と窒化膜付 SOI 基板の加工方法については付録に記す。

SOI 基板（ハンドルシリコン： $350\ \mu\text{m}$ ／ $\text{SiO}_2$  膜： $500\ \text{nm}$ ／デバイスシリコン： $10\ \mu\text{m}$ ）を  $1100^\circ\text{C}$  の熱酸化炉中に設置し、炉の中に酸素  $1\ \text{L}/\text{min}$ 、アンモニア  $120\ \text{cc}/\text{min}$  を注入して 3 時間保持することにより、厚さ  $300\ \text{nm}$  の熱酸化膜を成膜する (a)。両面にネガレジスト（ZPN-1150 90cp）をコーティングし、露光・現像を行うことにより培養チャンバのパターンを描画する。レジストをマスクにして BHF で熱酸化膜を除去し、レジストをアセトン、エタノールで除去する (b)。残った熱酸化膜をマスクにして TMAH による結晶異方性エッチングを行い、ハンドルシリコンに培養チャンバを製作する (c)。次に、デバイスシリコン側の加工を行う。ハンドルシリコン側の

加工と同様に両面にネガレジストをコーティングし，紫外線露光用両面マスクアライナを使用して両面の位置あわせを行い，露光・現像することによりチャンネルのパターンを描画する．レジストをマスクにして BHF で熱酸化膜を除去し，レジストをアセトン，エタノールで除去する (d)．残った熱酸化膜をマスクにして TMAH を使って結晶異方性エッチングを行い，マイクロチャンネルを製作する (e)．

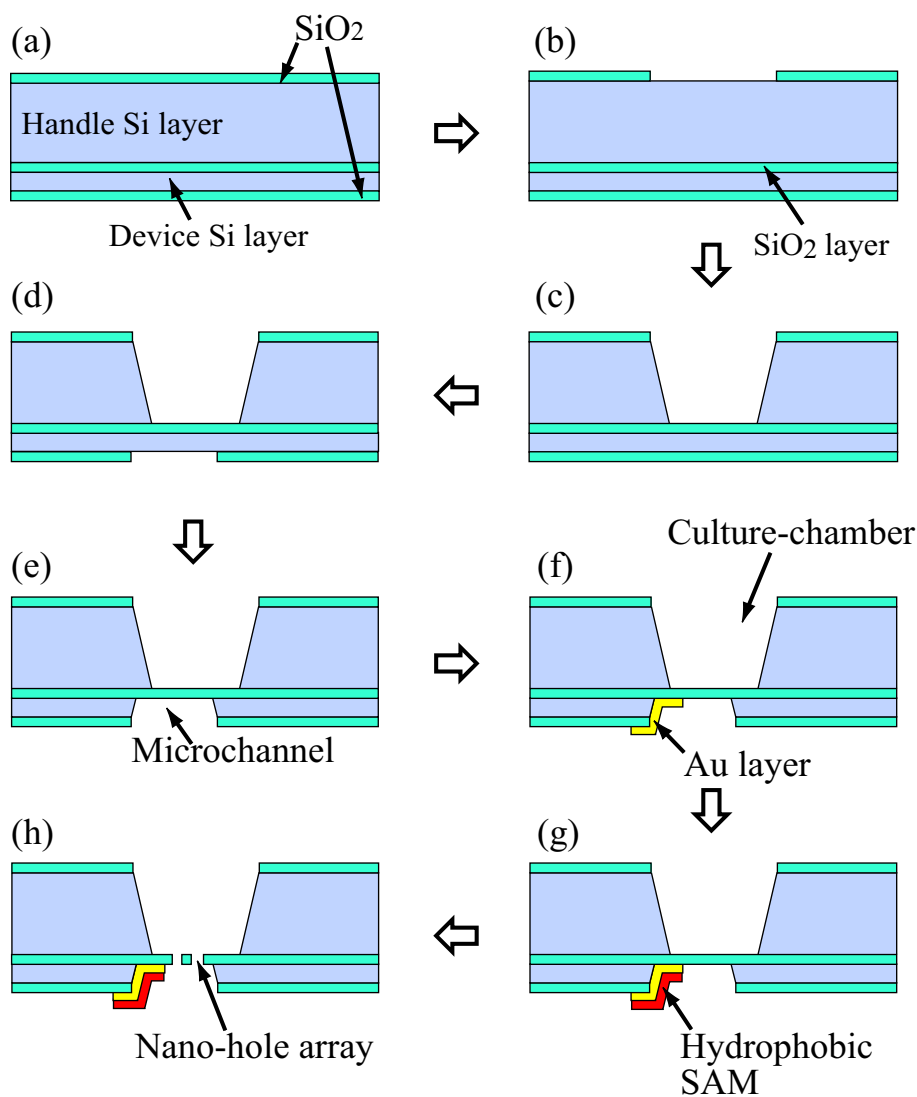


Fig.3.7 薬剤放出制御デバイスの製作プロセス

厚膜ポジレジスト (AZ P4620) をデバイスシリコン表面全体にコーティングし，露光・現像することによりバルブ部のみレジストを除去する．この状態で真空蒸着装

置 (ULVAC 機工, VPC-260) による Au/Cr の成膜と, リフトオフプロセスによってバルブ部のみに Au/Cr をパターンニングする (f). Au の表面に疎水性 SAM を自己組織的に成膜させることによってマイクロバルブを製作する (g). 最後に, マイクロチャンネルと培養チャンバで挟まれた SiO<sub>2</sub> の自律膜部分にガリウムイオン・ビームを集束させ, SiO<sub>2</sub> 膜を部分的にエッチングすることにより, 500 nm の径のナノホールを構築する (h). ナノホールを複数個製作することによってナノホール・アレイを構築する. 本デバイスも PDMS カバーでチャンネル部を覆うが, 製作プロセスは第 2.3.3 節の Fig.2.26 と同様である.

### 3.3.4 蛍光色素放出制御実験

バルブの開閉によるナノホールからの薬剤放出を評価するために, 薬剤の代わりに蛍光色素 (Rhodamine B, Molecular Probes, Inc. R-648) をマイクロチャンネル内に注入し, ナノホール・アレイに微量の蛍光色素を供給した. この際に, ナノホールから放出される蛍光色素の拡散放出の様子を蛍光倒立顕微鏡で観察・評価した. 実験の概略図を Fig.3.8 に示し, 装置構成を Fig.3.9 に示す. また, 以下に実験手順を示す. この実験により, 薬剤をナノホールから放出させる場合に, バルブの開閉によって放出を制御することができ, 濃度制御を行うことができることを確認する.

- (1) デバイスのチャンネル側を PDMS カバーで覆い, チャンバを超純水で満たす.
- (2) ディッシュの中にデバイスを支えるスペーサーを置き, その上に製作したデバイスを固定する.
- (3) ディッシュとスペーサーとの間に超純水を満たす. このとき, 培養チャンバ内に空気が入りやすいので空気が入らないように注意する.
- (4) 蛍光色素を超純水に溶かし溶液を作る.
- (5) マイクロシリンジとチューブを接続し超純水で満たす. また, 同じものをもう一つ用意し, これにはチューブの先端のみに蛍光色素を満たす.
- (6) 超純水で満たしたチューブをチャンネルの放出側のコネクタと接続し, 先端に蛍光色素を満たしたチューブをチャンネルの注入側のコネクタと接続する.
- (7) マイクロシリンジポンプを操作し, 放出側のチャンネル内に超純水を, 注入側のチャンネル内に蛍光色素を順に浸入させる. この際, チューブ内に圧力が溜まるため, 圧を抜きながらゆっくりと浸入させる必要がある. また, 浸入した液体はバルブ部 (疎水性面) ではじかれるため, バルブは閉じた状態である.
- (8) 注入側のマイクロシリンジポンプを取り外し, チューブ内に溜まった圧力を大気開放する.

- (9) チューブをマイクロインジェクタと接続し、バルブ開閉のための圧力を印加することによって、あらかじめ満たしておいた超純水と蛍光溶液が接触し、ナノホールから蛍光色素を拡散放出する。この様子を蛍光倒立顕微鏡で観察する。

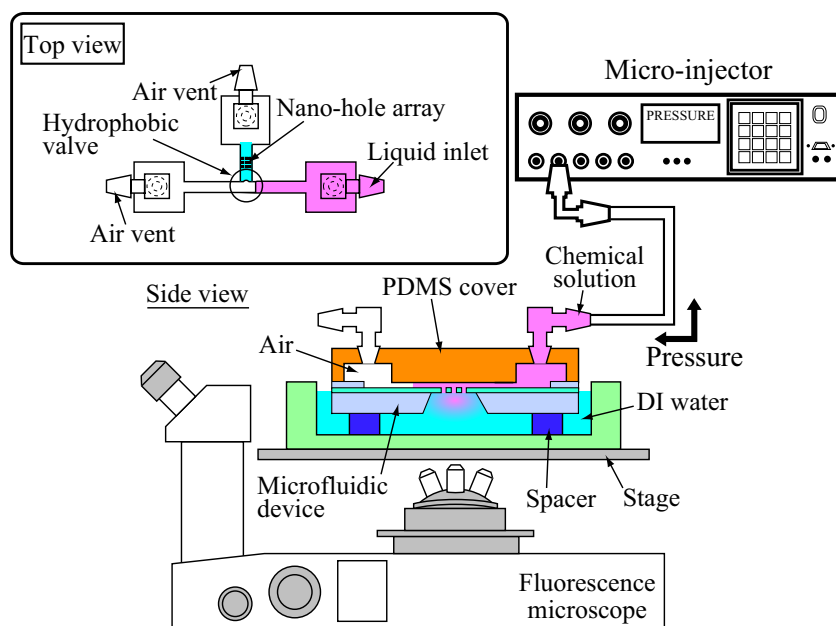


Fig.3.8 蛍光色素放出実験の概略図

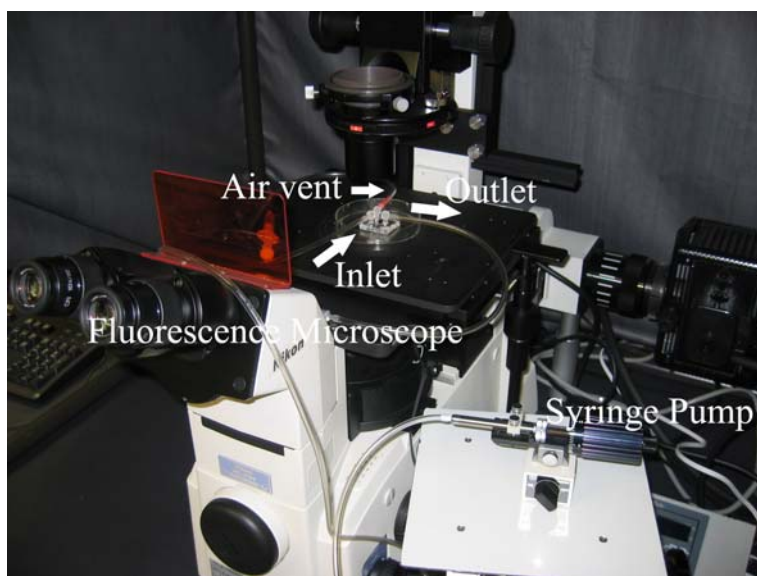


Fig.3.9 蛍光色素放出制御実験の装置構成

### 3.3.5 バルブ開閉による放出制御

マイクロインジェクタを使って圧力を印加することによってバルブの開閉を行った。この際の蛍光強度の変化の様子を Fig.3.10 に示す。蛍光強度はナノホール・アレイの中心から 20  $\mu\text{m}$  程度離れた、20  $\mu\text{m}$   $\times$  20  $\mu\text{m}$  の領域における平均値である。バルブを開くと同時に蛍光強度は上昇し、バルブを閉めると同時に蛍光強度は下降し始める。この結果から、ナノホール・アレイからの薬剤放出はバルブを開閉することによって制御できることを確認した。また、バルブを開いた後、150 秒までの間で蛍光強度が一定に見えるのは、計測領域一帯の蛍光濃度が高くなりすぎたために計測範囲を超え、蛍光強度の値が頭打ちになっているものだと考えられる。そして、蛍光強度の値が頭打ちになっているにもかかわらず、蛍光強度が安定していないのは  $\text{SiO}_2$  の自律膜上に流体が流れることや圧力が加わることによって  $\text{SiO}_2$  の自律膜が振動しているためだと考えられる。

次に、バルブの開閉を繰り返し行った際の蛍光強度の変化の様子を Fig.3.11 に示す。バルブを繰り返し開閉した際も Fig.3.10 の場合と同様に、バルブを開くと蛍光強度は上昇し、バルブを閉じると蛍光強度は下降する。グラフに示すように、バルブの開閉を繰り返すと、蛍光強度の上昇・下降を繰り返し制御することができる。また、10 秒間隔、20 秒間隔、30 秒間隔の 3 種類の周期でバルブの開閉を行った際の蛍光色素の放出の様子を Fig.3.12 に示す。これまでの結果と同様に、蛍光強度はバルブを開くと上昇し、バルブを閉じると下降する。さらに、蛍光強度の大きさはバルブの開閉周期に大きく依存することがわかった。すなわち、バルブの開閉周期が 20 秒間隔（周期：40 秒）の場合の蛍光強度は、10 秒間隔（周期：20 秒）の場合の 2 倍程度の蛍光強度になり、30 秒間隔（周期：60 秒）の場合は、10 秒間隔の場合の 4 倍程度の蛍光強度を示す。これらの結果から、製作したデバイスではバルブを開閉することによってナノホールから放出する薬剤の濃度を制御することが可能である。また、バルブを繰り返し開閉することにより、濃度勾配を作り出すことができる可能性があると考えられる。

さらに、バルブを開き続けた時間と蛍光強度の関係を Fig.3.13 に示す。バルブを開き続ける時間が 0 秒から 25 秒程度において、バルブの開口時間と蛍光強度の間には線形に近い関係が得られた。また、バルブの開口時間が 30 秒を超えた場合でも蛍光強度の増加が緩やかになり飽和状態に近づき 30 秒以下の場合の傾きよりも小さな傾きになるが、線形的に蛍光強度が大きくなることがわかった。したがって、バルブを数秒間開いた後に連続してバルブの開閉を行えば、ナノホールから任意の距離だけ離れた領域の濃度を制御することできるものと考えられる。

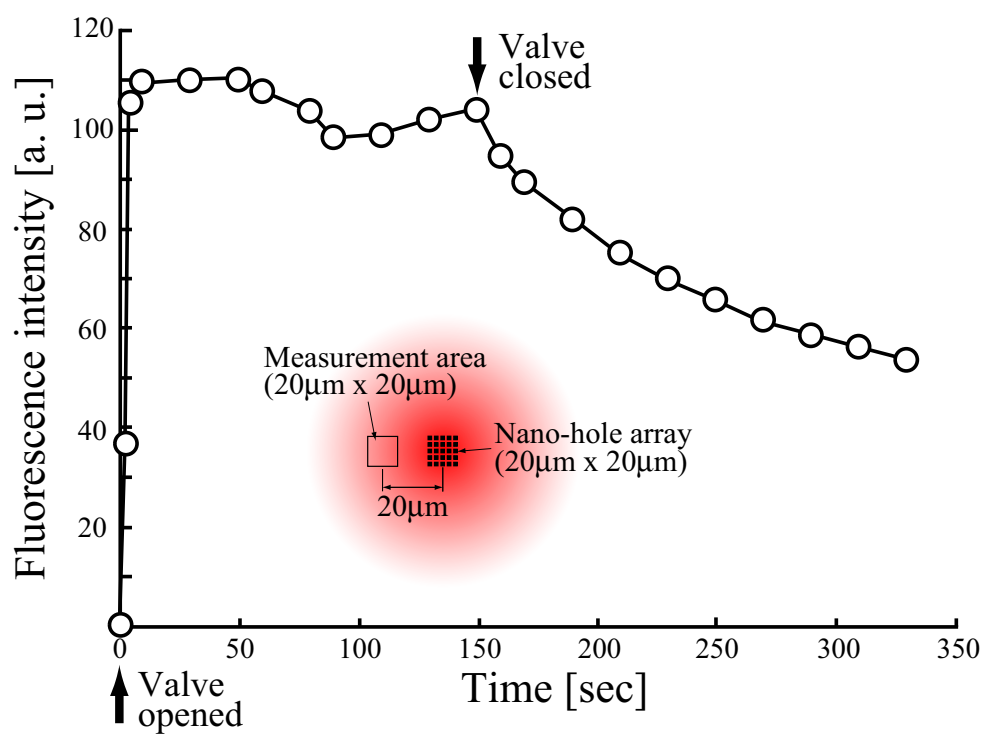


Fig.3.10 バルブ開閉による蛍光強度の変化

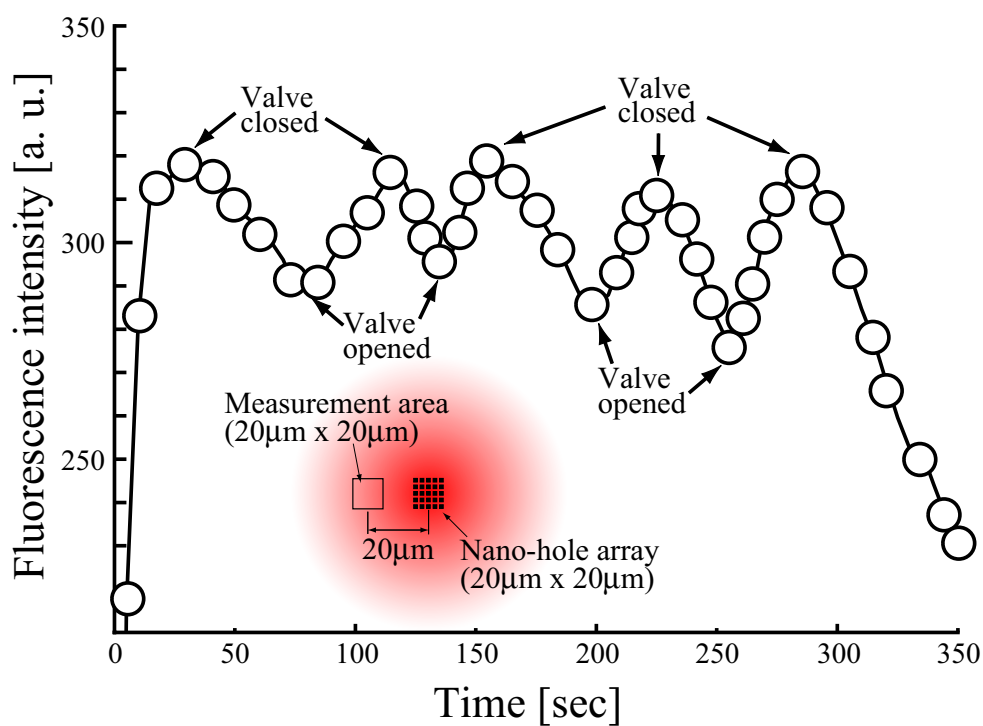


Fig.3.11 バルブの繰り返し開閉による蛍光強度変化

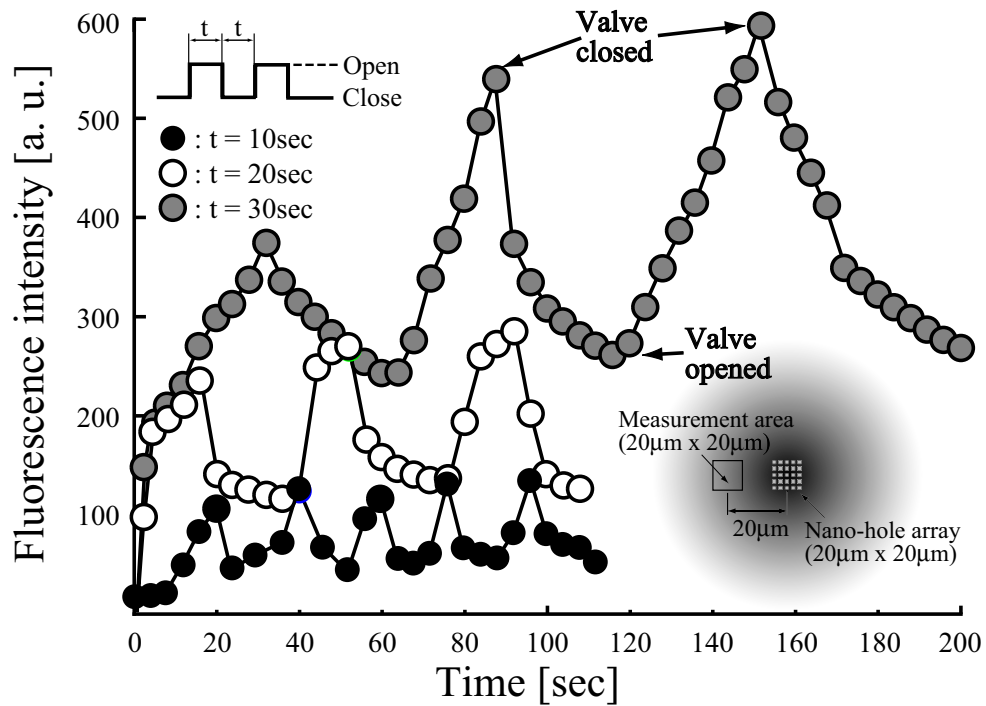


Fig.3.12 バルブの開閉による蛍光色素の放出制御

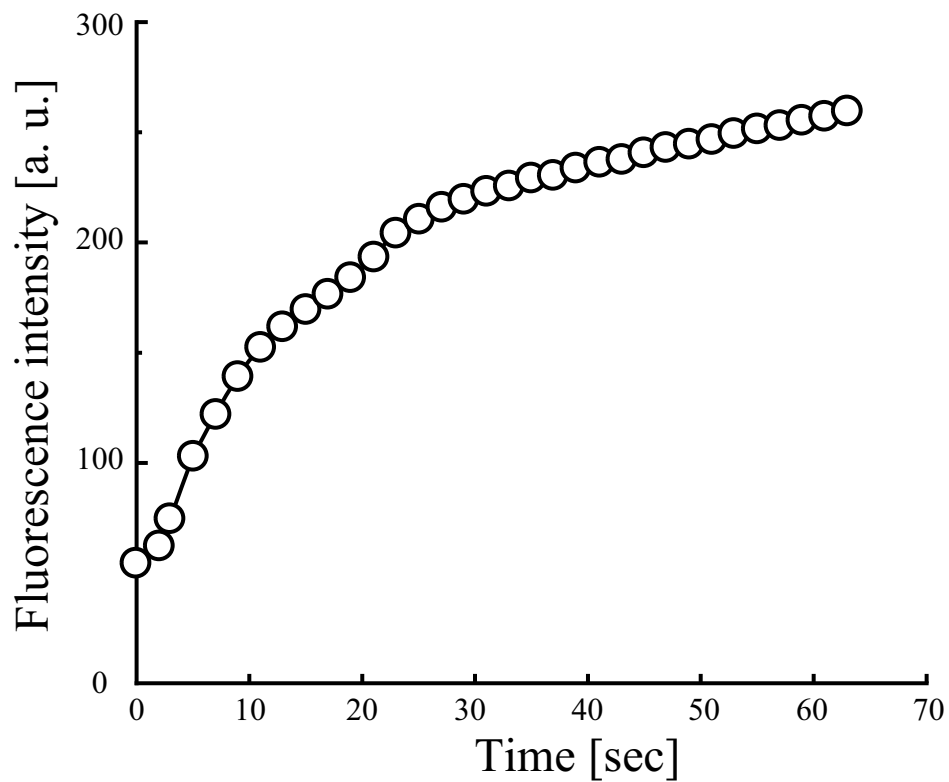


Fig.3.13 バルブの開口時間とナノホールからの距離  $20\mu\text{m}$  の場所の濃度

### 3.3.6 放出される蛍光色素の濃度制御

任意の領域における蛍光濃度を一定に保つために、バルブを一定時間開きナノホール・アレイから蛍光色素を放出させた後、バルブを 1 Hz で連続開閉した。この実験の概略図を Fig.3.14 に示し、その実験装置の構成を Fig.3.15 に示す。また、実験手順を以下に示す。

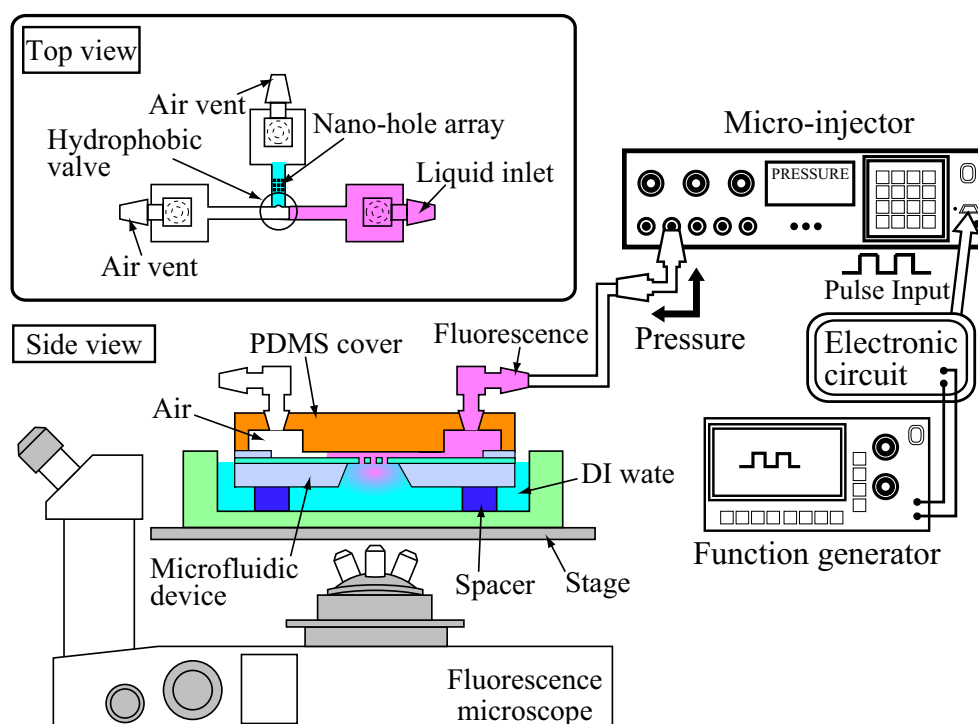


Fig.3.14 実験の概略図

- (1) ～ (3) までの手順は 3.3.4 に示す方法と同様である。
- (4) 蛍光色素を超純水に溶かし溶液を作る。今回は、濃度についての議論も行うので、蛍光色素の濃度が 100 ng/ml になるように蛍光溶液を作る。
- (5) マイクロシリンジとチューブを接続し超純水で満たす。また、同じものをもう一つ用意し、これにはチューブの先端のみに蛍光色素を満たす。
- (6) 超純水で満たしたチューブをチャンネルの放出側のコネクタと接続し、マイクロシリンジポンプを操作して放出側のチャンネル内に超純水を満たす。
- (7) ファンクションジェネレータ (Agilent Technology, 33120A) の設定を行い、



電子回路と接続する。その後、電子回路とマイクロインジェクタを接続し、入力信号に間違いが無いかを確かめる。

- (8) 先端に蛍光色素を満たしたチューブをチャネルの注入側のコネクタと接続し、マイクロシリンジポンプの操作によって、注入側のチャネル内に蛍光色素を順に浸入させる。この際、チューブ内に圧力が溜まるため、圧を抜きながらゆっくりと浸入させる必要がある。また、浸入した液体はバルブ部（疎水性面）ではじかれるため、バルブは閉じた状態である。
- (9) 注入側のマイクロシリンジポンプを取り外し、チューブ内に溜まった圧力を大気開放する。
- (10) マイクロシリンジポンプを取り外したチューブをマイクロインジェクタと接続する。
- (11) スイッチを入れ、電子回路を通してファンクションジェネレータからの信号をマイクロインジェクタに入力すると設定したバルブ開閉周期で圧力を印加する。
- (12) 印加された圧力によって、蛍光溶液がバルブの疎水面を乗り越えて、あらかじめ満たしておいた超純水と蛍光溶液が接触し、ナノホールから蛍光色素を拡散放出する。この様子を蛍光倒立顕微鏡で観察する。

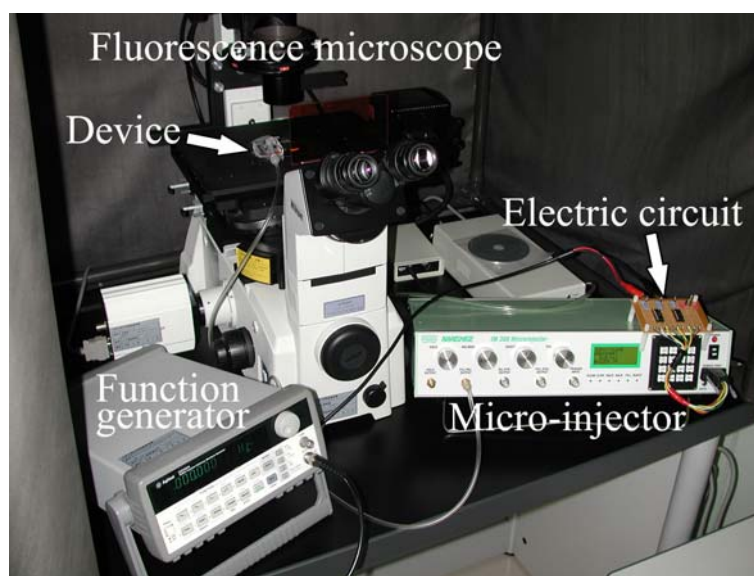


Fig.3.15 実験装置の構成

バルブを 10 秒～30 秒開いた後に、1 Hz で連続開閉した際の実験結果を Fig.3.16

に示す．バルブを 20 秒間開いた後に 1 Hz で開閉を繰り返した場合は，ナノホール・アレイから 20  $\mu\text{m}$  離れた計測エリアの濃度をほぼ一定に保つことができた．しかし，バルブを 10 秒間開いた後に開閉を繰り返した場合は，時間の経過と共に蛍光強度が徐々に上昇していき濃度を一定に保つことができなかった．同様に，30 秒間バルブを開いた後に 1 Hz で開閉を繰り返した場合は，時間の経過と共に蛍光強度が下降し濃度を一定に保つことができなかった．このように，バルブを開いた時間が 10 秒間と 30 秒間の場合，1 Hz でバルブを開閉すると濃度を一定に保つことができなかった．しかし，バルブ開閉の Duty 比を制御することによって濃度を一定に保ち続けることができる可能性がある．Duty 比とは，一般に矩形波の 1 周期と High パルス側の比率のことを言うが，この実験では 1 Hz のパルスを入力し，High パルス側でバルブを開いているため，1 秒間にバルブを開く比率のことを指す．例えば，この実験で 10 秒間バルブを開いた場合は，1 秒間の間にバルブを開いている比率が大きかったために蛍光強度が上昇したが，バルブを開く比率を 50 % よりも小さくすることによって濃度を一定に保つことができると考えられる．また，バルブを 10 秒間開いた場合と 30 秒間開いた場合の蛍光強度は，20 秒間バルブを開いた際の蛍光強度の値に徐々に近づいていることが見て取れる．したがって，1 Hz，Duty 比が 50 % でバルブの開閉を繰り返した場合，ナノホール・アレイから 20  $\mu\text{m}$  離れた計測エリアの濃度は，最終的に 20 秒間バルブを開いた後に開閉を繰り返した場合の濃度と同じ濃度になるものと考えられる．

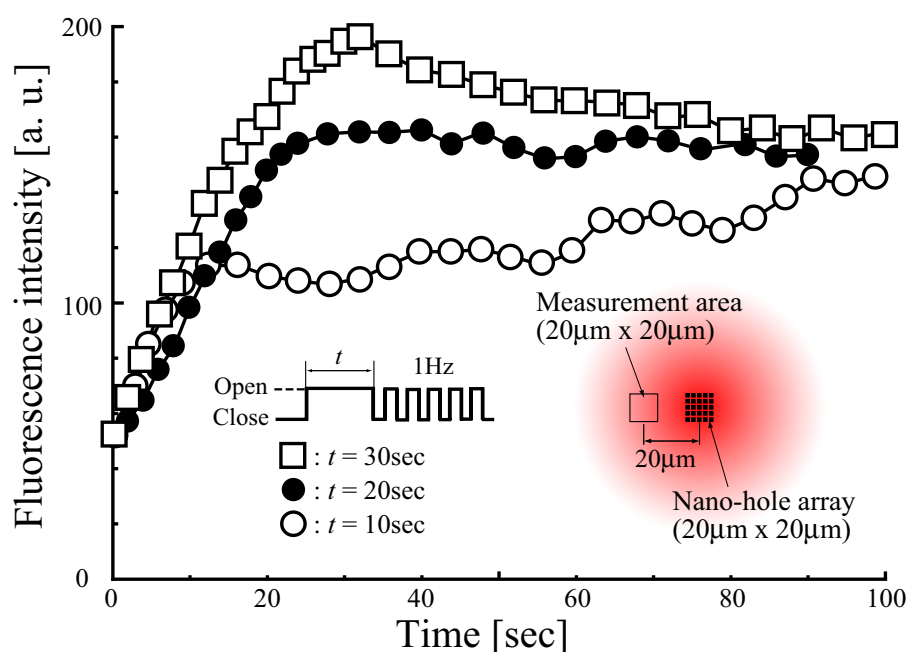


Fig.3.16 1 Hz でのバルブ開閉による蛍光強度の遷移

この実験から、同じタイミングでバルブの開閉を行っても任意のエリアの濃度を一定に保つことができないということがわかった。そこで、バルブを一定時間開き、その後の開閉周波数を 1 Hz にしたまま Duty 比を制御することによって濃度制御を試みた。その結果を Fig.3.17 に示す。バルブを 5 秒間開き、ナノホール・アレイから蛍光色素を放出させた後にバルブの開閉周波数 1 Hz, Duty 比 35 % で開閉を行うと、ナノホール・アレイから 20  $\mu\text{m}$  離れた計測エリアの濃度をほぼ一定に保つことができた。また、同様に 10 秒間バルブを開いた場合は Duty 比を 40 % に、20 秒間バルブを開いた場合は Duty 比を 50 %、25 秒間バルブを開いた場合は Duty 比を 55 %、30 秒間バルブを開いた場合は Duty 比を 60 % にそれぞれ制御することによってナノホール・アレイから 20  $\mu\text{m}$  離れた計測エリアの濃度をほぼ一定に保つことに成功した。

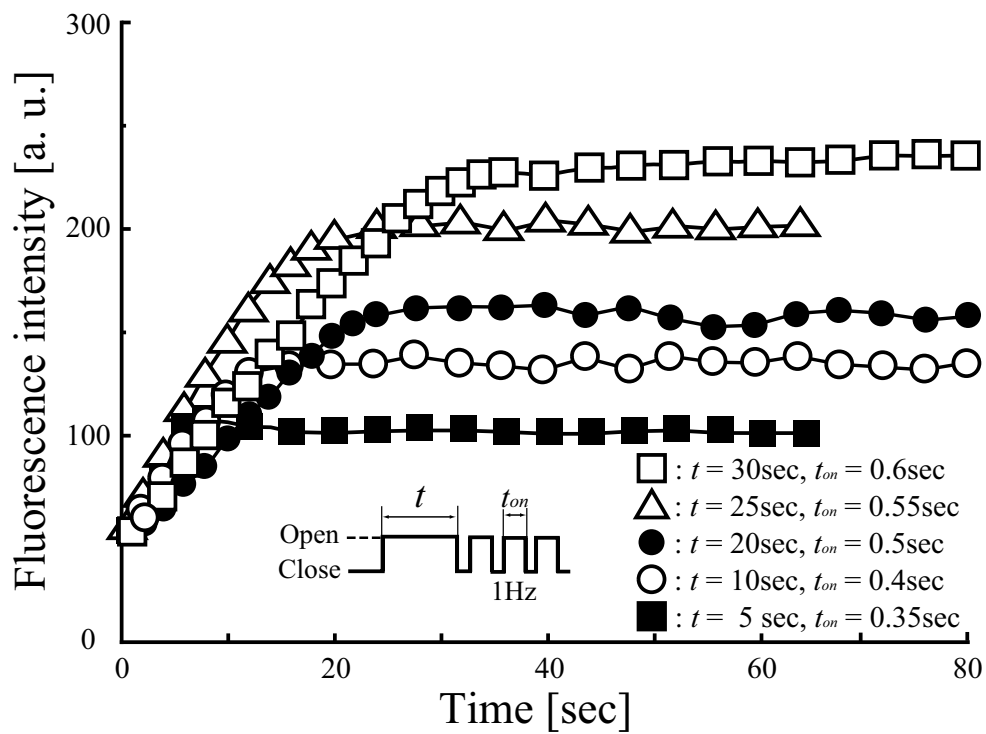


Fig.3.17 バルブの開閉制御による濃度制御

次に、Fig.3.17 に示すグラフ中で、蛍光強度がほぼ一定になった部分をそれぞれ平均した。そして、それぞれの平均蛍光強度を蛍光標準曲線（式 3.1）から実際の蛍光

色素の濃度を算出した。バルブを開いていた時間と蛍光強度、蛍光色素の濃度の関係を Table3.1 に示す。蛍光の原液濃度が 100 ng/ml で 5 秒間バルブを開いた場合は約 11 ng/ml の蛍光色素が放出されており、原液濃度の約 10 % 程度の濃度に希釈されていることが確認できた。また、20 秒間バルブを開いた場合は約 20 % の濃度に、30 秒間バルブを開いた場合には約 35 % の濃度になることがわかった。例えば、高濃度の薬剤をナノホールから放出したい場合は、原液の濃度を上げれば実現できると考えられる。さらに、バルブ開閉の Duty 比と蛍光色素濃度の関係を Fig.3.18 に示す。表に示された通り、Duty 比の制御によりバルブを開く時間が長くなれば濃度が上昇し、バルブを開く時間が短くなれば濃度が下降する。この結果、バルブ開閉の Duty 比と濃度の関係は線形に近い関係があることがわかった。ただし、このグラフが線形的になるためには、Fig.3.13 に示すバルブの開口時間と蛍光強度の関係より、バルブを開いている時間が 25 秒程度以下の場合であり、30 秒以上バルブを開き続けると培養チャンバ側の蛍光色素の増加がゆるやかになるため、傾きが小さくなり Duty 比と濃度の関係はこのような線形的な関係にはならなくなると考えられる。

Table3.1 蛍光強度と蛍光色素濃度

蛍光溶液の原液濃度：100 ng/ml

バルブを開いた時間 [sec]	蛍光強度	蛍光色素濃度 [ng/ml]
5	104	10.5
10	127	14.0
15	134	16.4
20	163	22.3
25	211	29.6
30	229	35.9

蛍光色素の空間的な濃度勾配を評価するために、バルブを 10 秒間開いた場合について、ナノホールから 20  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  離れたエリアの濃度を計測した結果を Fig.3.19 に示す。開閉周波数を 1 Hz, Duty 比を 35 % でバルブを開閉することによって、ナノホールからの距離が 20  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  の全てのエリアにおいて濃度を一定に保つことができた。また、この際のナノホールからの距離と蛍光強度の関係を Fig.3.20 に示す。グラフの通り、ナノホールからの距離と蛍光強度の関係は直線的であり、大きな濃度勾配を形成することができた。これらの実験の結果、10 秒間バルブを開いた後にバルブの開閉周波数を 1 Hz にし、Duty 比を 35 % にすることによ

って空間的な濃度勾配が時間的に変化しないような濃度の場を作ることができた.

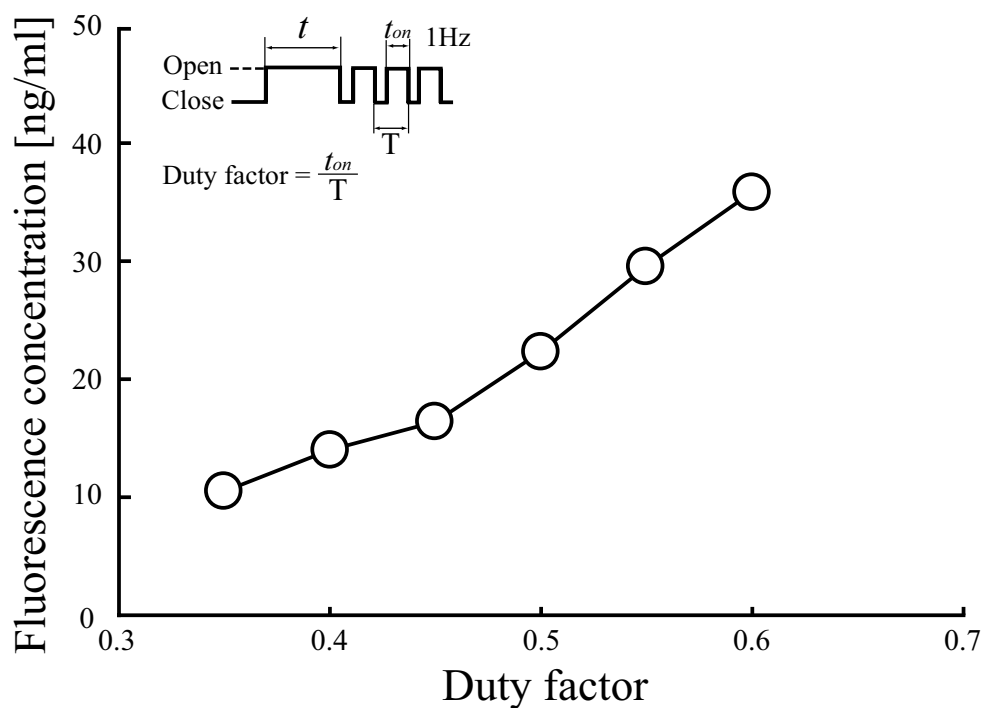


Fig.3.18 開閉周期と濃度の関係

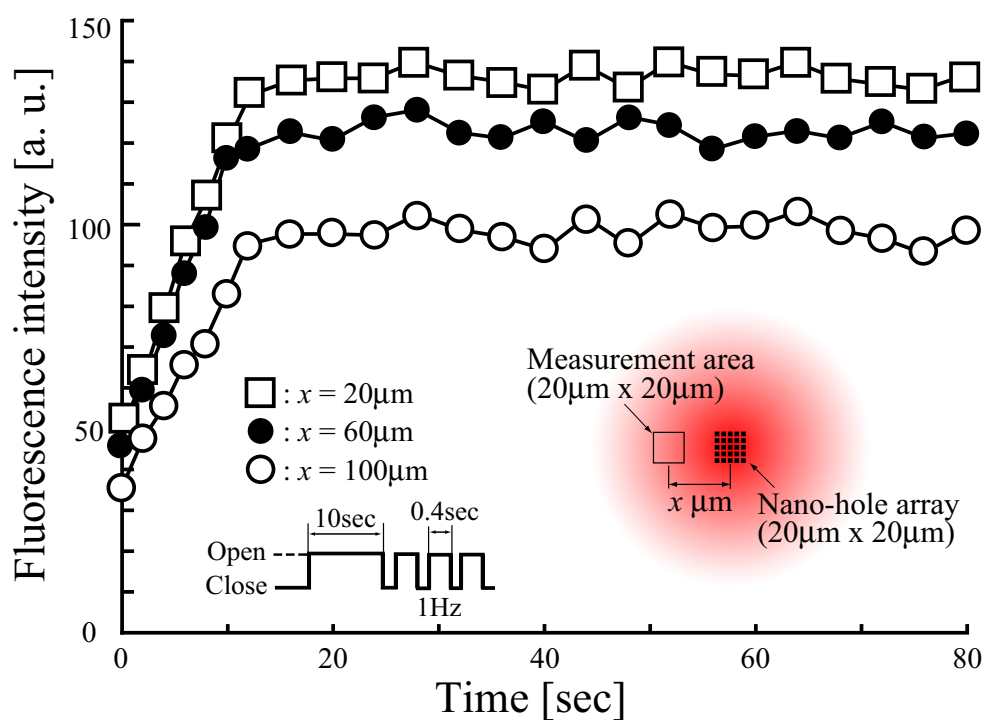


Fig.3.19 ナノホールからの距離と蛍光強度の関係 (パルスを 10 秒間開いた場合)

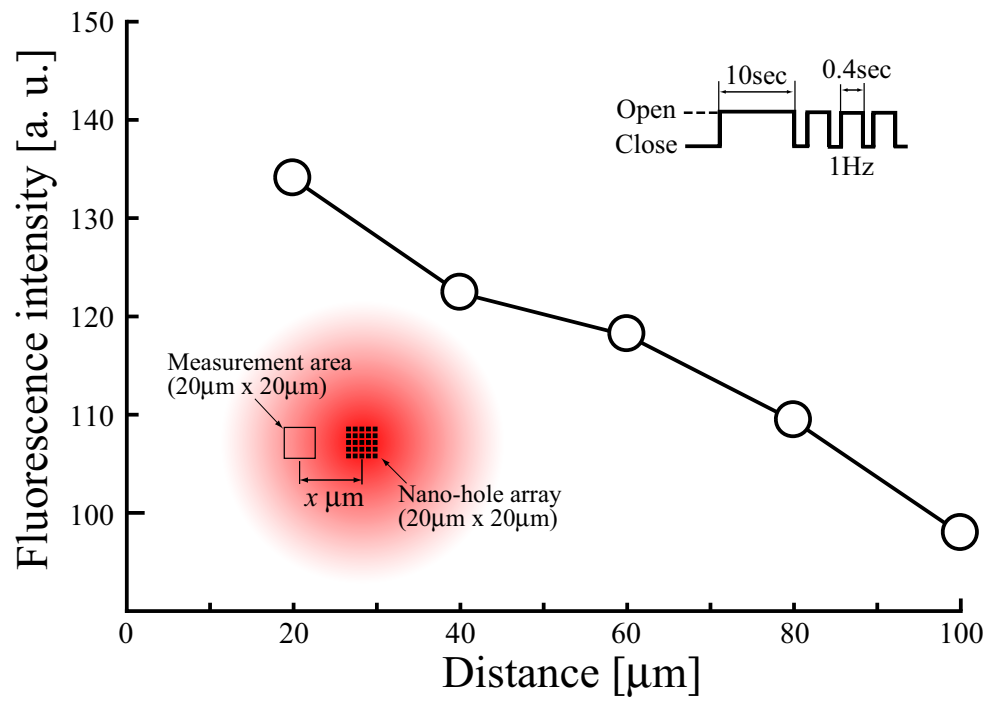


Fig.3.20 ナノホール周辺の濃度勾配（バルブを 10 秒間開いた場合）

### 3.4 Coventor Ware<sup>TM</sup>による放出制御シミュレーション

これまでに示してきたように、本研究では濃度の異なる 2 つの液体を接触させることによって発生する濃度勾配を利用して薬剤の放出を行った。そして、薬剤の代わりに蛍光色素を使って放出制御や濃度制御について評価を行った結果、バルブの開閉によって蛍光色素の放出や濃度の制御を精密に行うことができるということを確認した。今後は、実際にデバイス上に細胞を培養し放出物質としては蛍光色素ではなく細胞の成長を促す作用を持つ神経成長因子（NGF）をナノホールから放出させて細胞を刺激する。しかし、前述したように、本デバイスは 2 つの液体の濃度の違いを利用した拡散放出を利用しているため、薬剤の放出は液体固有の拡散係数に大きく依存する。そこで、本節では、マイクロデバイスを用いた流体解析を行う場合によく利用されている Coventor Ware<sup>TM</sup>を使って、デバイスの簡易的なモデルを作り、濃度制御の条件や濃度分布などを解析する。その解析結果と実験値とを比較・検討することによって培養実験への指針を得る。

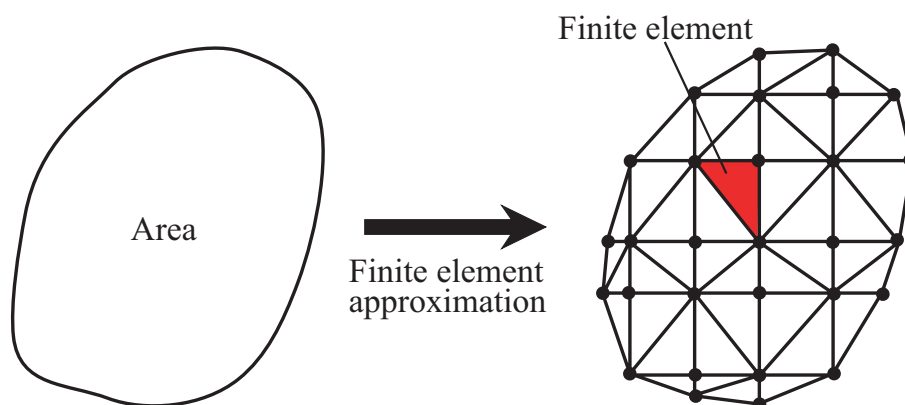


Fig.3.21 有限要素法（2次元の場合）

#### 3.4.2 Coventor Ware<sup>TM</sup>の概要

Coventor Ware は、MEMS デバイスの統合的な設計・解析システムであり、生成、モデリング、解析、インテグレーションを実行する 4 つのツールで構成されている [94]。このソフトは MEMS や Micro Fluidics の分野で世界的によく使用されている。本研究ではデバイスの設計やレイアウトなどのモデリングを行う Designer とモデルに対して有限要素法（Finite Element Method, FEM）や境界要素法（Boundary Element

Method, BEM) をベースとした解析を行う Analyzer を使用した。有限要素法とは、数値解析のひとつであるが、Fig.3.21 に示すように、変形に対して無限の自由度をもつ物体を有限の自由度を持つ要素の集合体と近似し、この集合体に対して成立する方程式（連立 1 次方程式）を解く方法であるため、原理的にはどのような形状のもので扱うことができる。つまり、有限要素法とは物理的に厳密な支配方程式を有限要素という概念により近似的な方程式に置き換えて数学的に厳密に解く方法である[95]。また、有限要素法は、数学的には変微分方程式の変分法に基づく解析手法を基礎としているため、偏微分方程式で記述される現象である流体の解析に対して適用することができる。

### 3.4.3 デバイスのモデル化と境界条件

シミュレーションを行うために Fig.3.4 に示すデバイスをモデル化する。このシミュレーションの目的は、バルブの開閉によって制御された薬剤がナノホールを通過して培養チャンバに放出される際の濃度の変化を求めることが目的である。したがって、デバイスを忠実にモデル化するのではなくバルブ、ナノホール、培養チャンバを簡易的にモデル化した。モデルの概略図を Fig.3.22 に示す。培養チャンバは、幅 200  $\mu\text{m}$ 、深さ 20  $\mu\text{m}$  の大きさであり、培養チャンバの直下に幅 100  $\mu\text{m}$ 、深さ 10  $\mu\text{m}$  のチャンネルを設計した。培養チャンバとチャンネルは幅 500 nm、深さ 500 nm の大きさのナノホールのみでつながっており、ナノホールは 100 個設計されている。薬剤はチャンネルの底面のバルブが開閉することによって注入される。すなわち、バルブを開いた場合はチャンネルの底面から 100 ng/ml の濃度の薬剤が放出され、バルブを閉じた場合は 0 ng/ml の薬剤が放出されるように設定した。この設定によってバルブの開閉を擬似的に再現した。バルブが開いてチャンネル内に注入された薬剤は、ナノホールを通過して培養チャンバ側に放出される。培養チャンバの全ての側面と上面は開放された状態になっている。

次に、メッシュの設定について述べる。メッシュの設定方法は、Manhattan bricks と Extruded bricks がある。Manhattan bricks は、X, Y, Z 軸それぞれに分割数を設定することができ、軸に平行な四角形のメッシュを生成できる。したがって、X, Y, Z 軸に平行な線で構成されたモデルに対してのみメッシュを生成することができる。Extruded bricks は、XY 面と Z 軸に対して分割数を設定し XY 面に四角形要素を作り生成する。この場合、軸に平行でない線で構成されたモデルに対してでもメッシュを生成することができ、よりサイズの細かいメッシュ分割が可能である。しかし、モデルの最小構成要素にその半分のサイズのメッシュを生成するため、周辺のメッシュサイズとの差が大きくなり、正確な計算結果を得ることができない可能性がある。解析モデルのデバイスは、ナノホールとそれ以外の構成要素のサイズに大きな



差があるため、その傾向が顕著となり得る。そこで、本研究では **Manhattan bricks** を使ってメッシュを設定した。モデル全体のメッシュ像を Fig.3.23 に示す。これはチャンネル内やチャンバ内の液体を表示した図であり、その液体に直接メッシュを入れて解析を行う。また、ナノホール周辺のメッシュ像を Fig.3.24 に示す。この場合、モデルの最小構成要素に対し同じサイズのメッシュを生成するため、**Extruded bricks** の場合よりもナノホールとそれ以外の部分とのサイズの差が小さくなり、正確な計算結果を得ることができる。今回のモデルの最小のメッシュのサイズは、ナノホールのサイズの  $0.5\mu\text{m}$  である。また、メッシュの設定と同時にノードを設定する。ノードとは、シミュレーションにおいて時間ごとに値が格納される点のことであり、今回のシミュレーションでは薬剤の濃度が格納される。ノードの設定には、**Linear** と **Parabolic** の 2 種類がある。**Linear** はメッシュの頂点のみにノードをとる方法であり、ひとつのメッシュに対して 8 点のノードを持つ。一方、**Parabolic** は各頂点とその中点にノードをとるものであり、ひとつのメッシュに対して、20 点のノードを持つ。今回のシミュレーションの目的は、薬剤の濃度変化の様子を簡易的に評価することであるため、計算速度の向上なども考慮し、**Linear** を使うことにした。

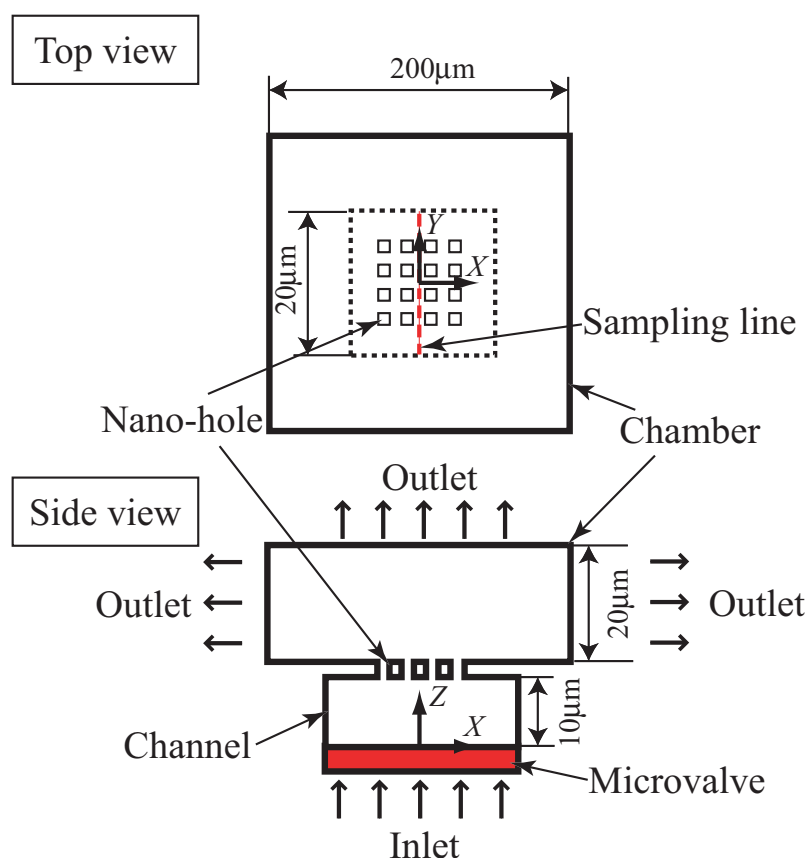


Fig.3.22 シミュレーションモデルの概略図

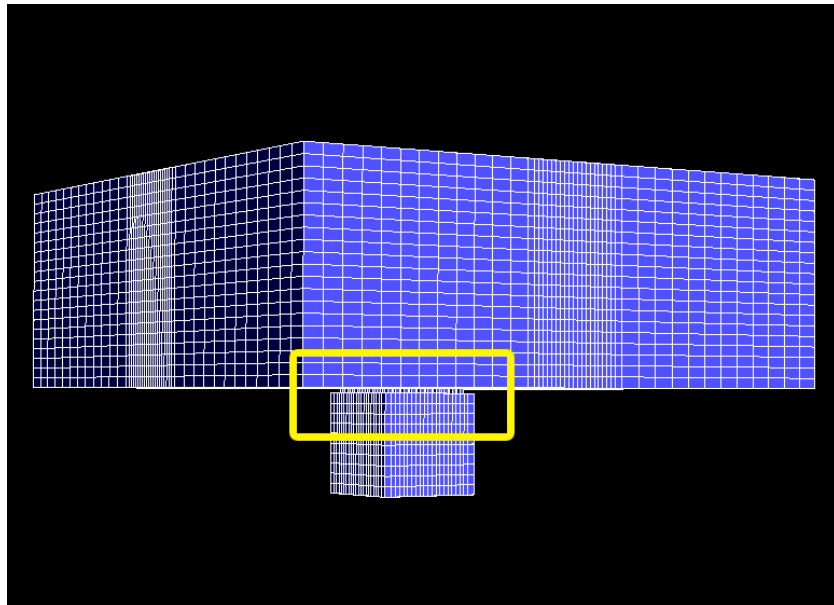


Fig.3.23 メッシュモデル

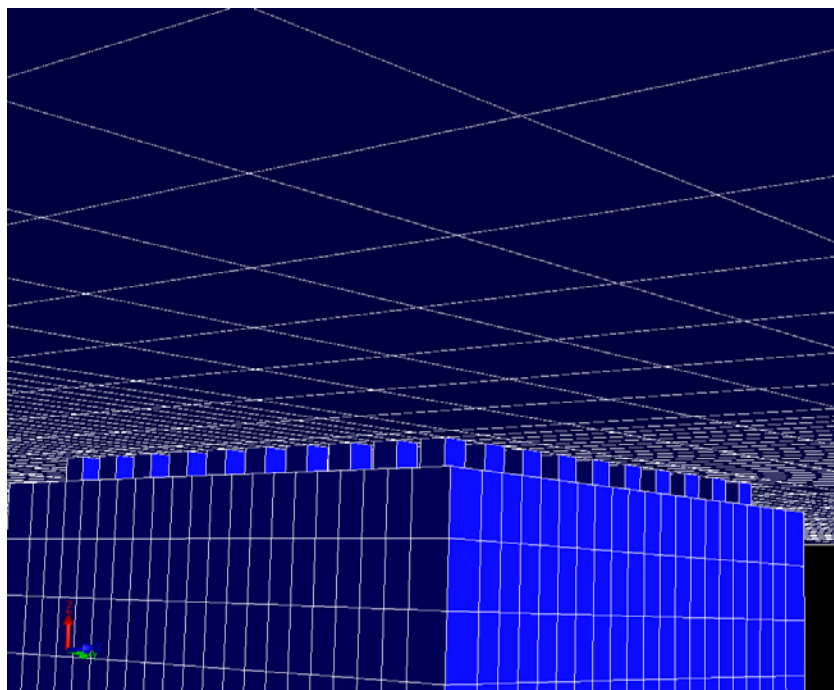


Fig.3.24 ナノホール周辺のメッシュ像 (Fig.3.23 の拡大図)

#### 3.4.4 放出シミュレーションと実験値との比較

これまでに設計したモデル，境界条件の下で放出シミュレーションを行う．シミュレーションを行う際に物性値や解析条件を設定する必要がある．特に，本シミュレーションはバルブの開閉によって制御された薬剤の拡散放出の評価を行うため，薬剤の拡散係数が必要なパラメータとなる．拡散係数とは，ある溶液の拡散のしやすさを表す使用であり，一般に分子サイズが小さい溶質ほど拡散速度が大きくなる．拡散係数と分子サイズは溶質の分子量から推定することができる．以下に拡散係数を推定する式 (3.1) と分子サイズを推定する式 (3.2) を示す．

$$D = 9.87 \times 10^{-5} (MW)^{-0.440} \quad (3.1)$$

$$\sigma = 0.1506 (MW)^{0.3371} \quad (3.2)$$

ここで， $D$  は溶質の拡散係数 [ $\text{cm}^2/\text{sec}$ ]， $MW$  は溶質の分子量， $\sigma$  は溶質の分子径 [ $\text{nm}$ ] である．蛍光実験で使った Rhodamine B 分子量から拡散係数と分子径を算出した結果を Table3.2 に示す．

Table3.2 Rhodamine B の物性値

項目	物性値
分子量	627.18
拡散係数 [ $\text{cm}^2/\text{sec}$ ]	$5.8 \times 10^{-6}$
分子径 [ $\text{nm}$ ]	1.3

上記のように計算で得た拡散係数を用いて放出シミュレーションを行った．そして，シミュレーションで得た結果と実験で得た結果を比較することによってシミュレーションの妥当性を評価する．まず，バルブを 10 秒間開き，その後 1 Hz, Duty

比 35 %で連続開閉を行うという条件に設定した。Fig.3.25 にナノホールから薬剤が放出している様子を示し、結果を Fig.3.26 に示す。実線はシミュレーションの結果を表し、丸は実験の結果を示す。シミュレーションを行う際のモデルは簡易的なものだったのにも関わらず、バルブを開き薬剤を放出している際の傾きやバルブを連続で開閉した際の濃度など、シミュレーション値と実験値がほぼ一致する結果になった。次に、バルブを 20 秒間開き、その後 1 Hz, Duty 比 50 %で連続開閉させた場合と、バルブを 30 秒間開き、その後 1 Hz, Duty 比 60 %で連続開閉させた場合の結果をそれぞれ Fig.3.27 と Fig.3.28 に示す。これらも、同様に薬剤を放出している際の濃度の傾きや、バルブを連続して開閉した際に一定になる濃度など、シミュレーション値と実験値がほぼ一致した。これらの結果から、本節で設計したモデルを使い、シミュレーションを行うことによって実際のデバイス上での薬剤の濃度を予測することができる。したがって、実際にデバイス上で細胞を培養し薬剤で刺激を行う場合、あらかじめシミュレーションを行うことによって薬剤の濃度を一定に保つためのバルブ開閉の条件や細胞を刺激するための薬剤の濃度設定など、実験の指針を得ることができる。

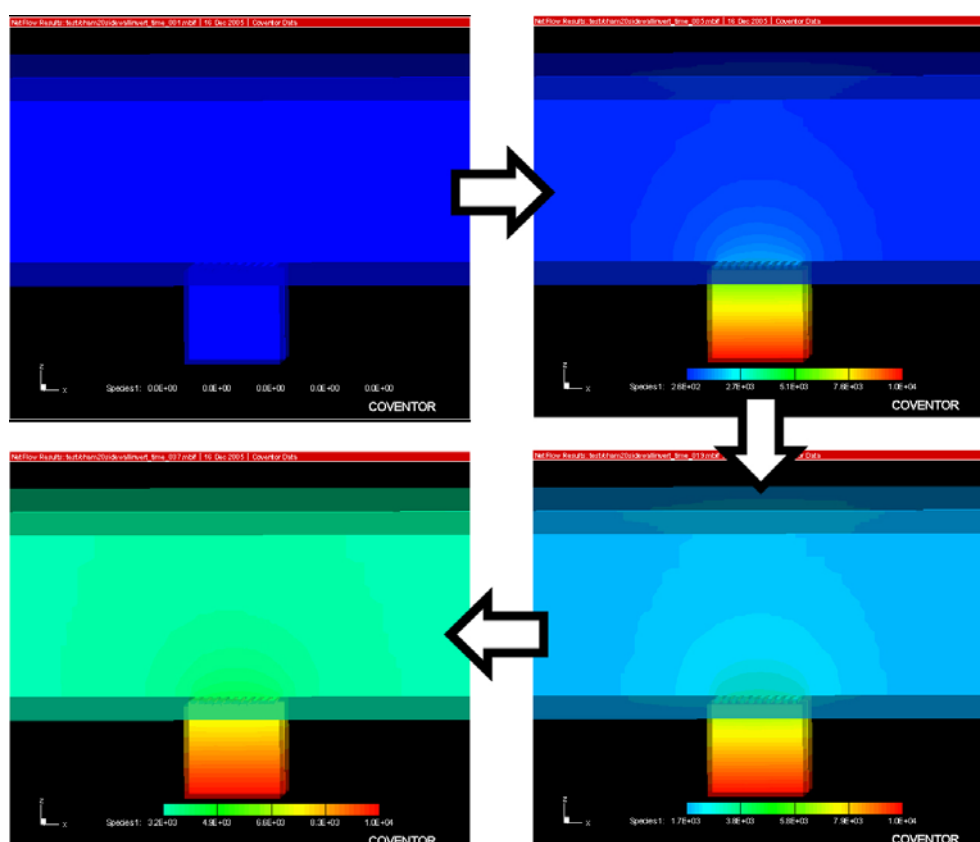


Fig.3.25 ナノホールからの薬剤放出の様子

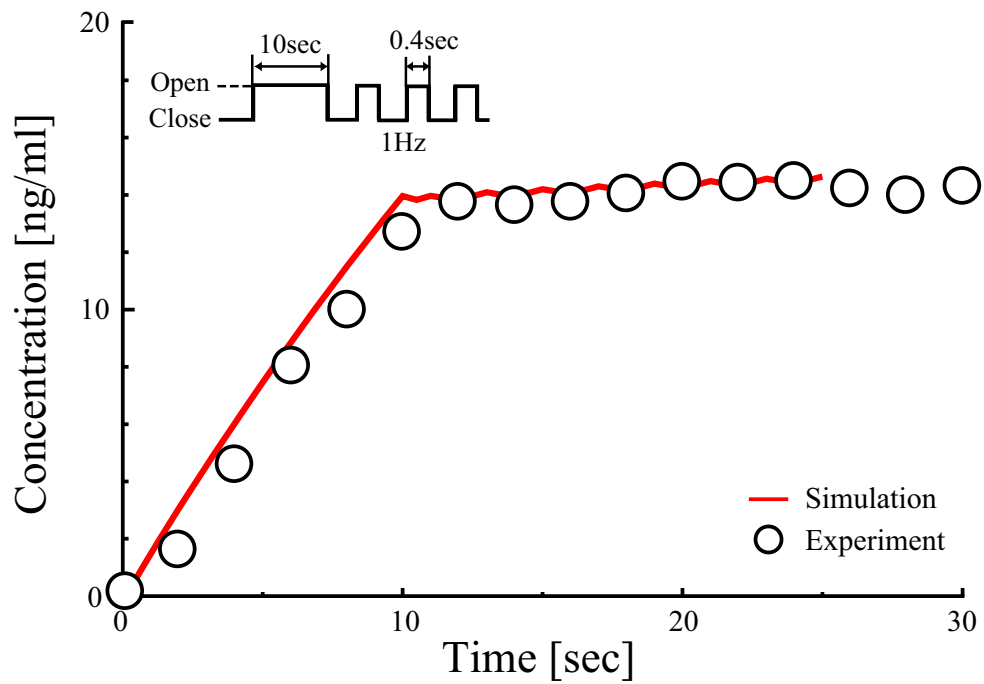


Fig.3.26 10 秒間バルブを開いた後に連続開閉した場合のシミュレーション値と実験値の比較

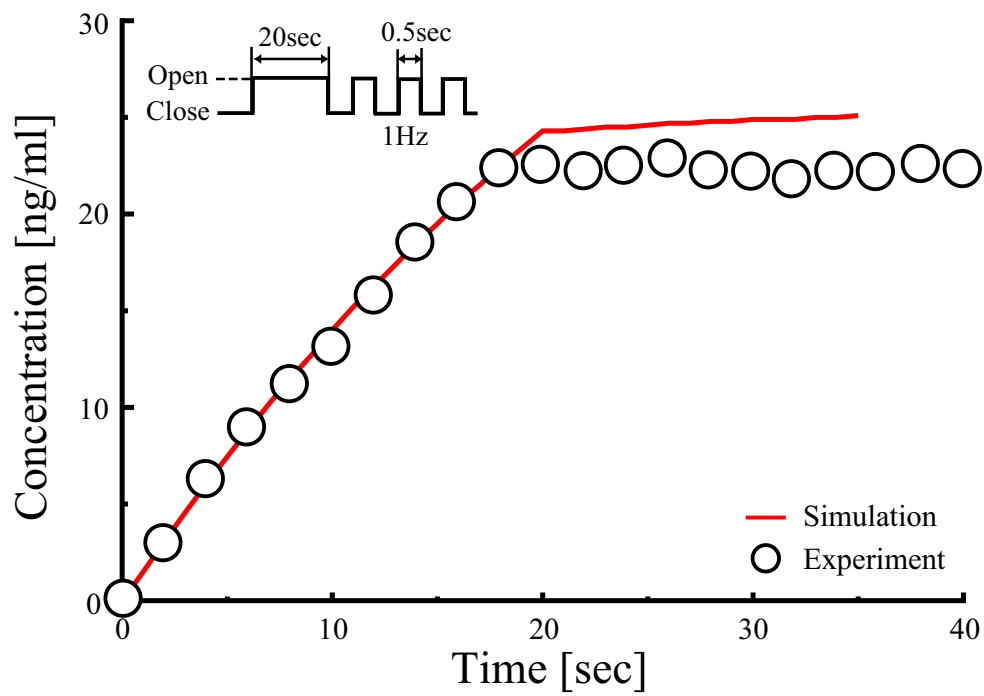


Fig.3.27 20 秒間バルブを開いた後に連続開閉した場合のシミュレーション値と実験値の比較

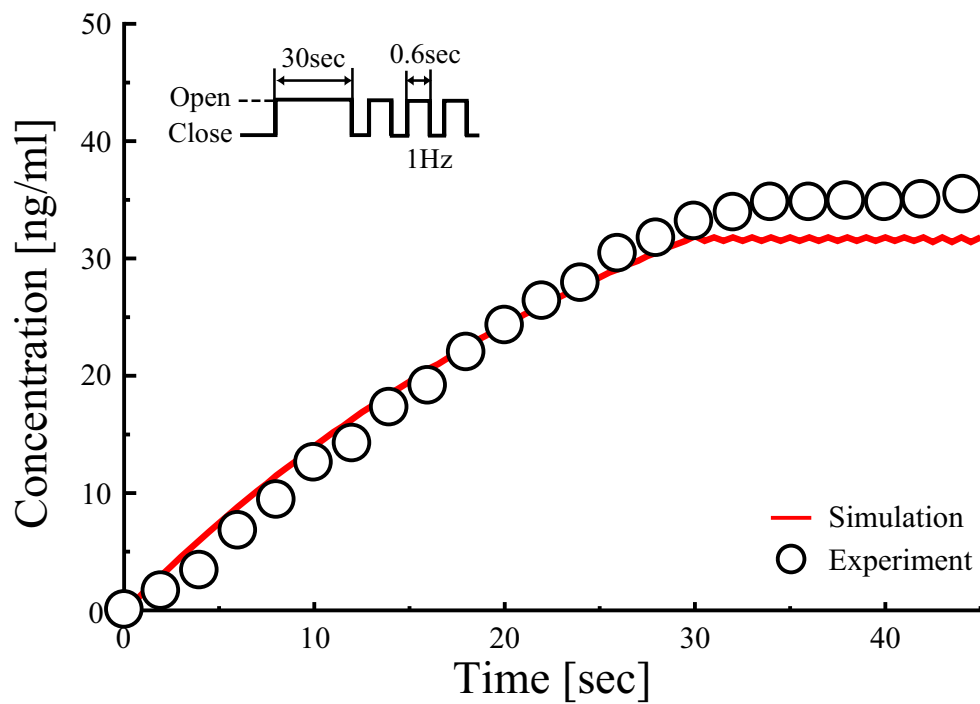


Fig.3.28 30 秒間バルブを開いた後に連続開閉した場合のシミュレーション値と実験値の比較

### 3.5 結言

本章では，培養細胞に対して精密な化学刺激を行うための薬剤放出制御デバイスの製作し，このデバイスを評価するために蛍光色素を使った実験とシミュレーションを使った解析を行った．以下に本章で得られた結果をまとめる．

1. 蛍光色素の濃度が 1 ng/ml から 500 ng/ml までの範囲で，蛍光強度と濃度とは線形的な関係であり，蛍光強度を濃度として評価することができる．
2. SOI 基板を使うことによって培養チャンバの直下に薬剤導入用のチャンネルと放出制御用のマイクロバルブを構築することができる．
3. バルブとナノホールが極近くに構築されているため，バルブの開閉で薬剤の放出を精密に制御することができる．
4. バルブを開閉によってナノホールから放出する薬剤の放出を制御することができる．
5. バルブを繰り返し開閉することにより，濃度勾配を作り出すことができる可能性がある．
6. バルブの開閉の Duty 比を制御することによって，ナノホールから任意の距離だけ離れた領域の薬剤濃度を一定に保つことができる．
7. バルブの連続開閉によって濃度を一定に保つことによって，バルブを開いた時間に関係なく空間的な濃度勾配が時間的に変化しないような濃度の場を作ることができる．
8. 薬剤の拡散係数を求め，Coventor Ware<sup>TM</sup> を使ってシミュレーションすることによって，バルブ開閉の条件や濃度設計のための指針を得ることができる．

## 第4章 構築したデバイスによる 細胞の分化誘導

### 4.1 緒言

第 3 章で薬剤放出制御用のマイクロ流体デバイスを構築し、薬剤放出の制御性などの評価を行った。構築したデバイスはバブルの開閉によって薬剤放出を精密に制御することができるため、実際にデバイス上で細胞を刺激することを試みる。この実験では、放出する薬剤として神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF) を使用する。NGF とは神経栄養因子と呼ばれるペプチドの一種であり、神経細胞の分化や軸索伸長および神経細胞自身の生存・維持に大きく関与するものである[18]。また、NGF の濃度勾配に従って軸索が伸張するということは神経生理学の分野でも良く知られた事実である。NGF を神経細胞に対して投与すると細胞の形態が変形し、分化・軸索の伸長を行う。この様子を観察することによって刺激制御デバイスの評価を行う。

本研究では PC12 細胞を使い実験を行う。PC12 細胞とはラットの副腎髄質褐色細胞腫より単離した細胞である。この細胞の特徴として、均一で多量の細胞を容易に得ることができることや NGF を投与することによって神経細胞と同じように分化し軸索を伸長すること、幹細胞などの他の細胞に比べ培養が容易にできることなどがあげられる。また、PC12 細胞は株化細胞と呼ばれる細胞である。株化細胞とは、無制限に増殖を繰り返す、何代もの時間を経ても性質が変化しない細胞のことである。以上のことから、PC12 細胞は NGF の分子機構作用を探る研究に欠かせないものとなっている[16][17]。

ここで、PC12 細胞に対して NGF を投与した際の PC12 細胞の分化の様子を倒立培養顕微鏡 (Nikon, TS100) で観察した。一般的に、PC12 細胞は NGF の濃度が 50 ng/ml から 100 ng/ml 程度で分化するといわれており、この実験では 100 ng/ml の NGF を投与した。この様子を Fig.4.1 に示す。培養開始直後の細胞は球状であり、球状を保ったままデバイスの底面に接着する。NGF を投与した 2 日目には細胞体が肥大化し、



突起を形成した細胞が多く見られた. そして, 3 日目にはほとんどの細胞が軸索を伸長させており, 4 日目には十分に軸索を伸ばしまわりの細胞とネットワークを張り巡らせているように見える.

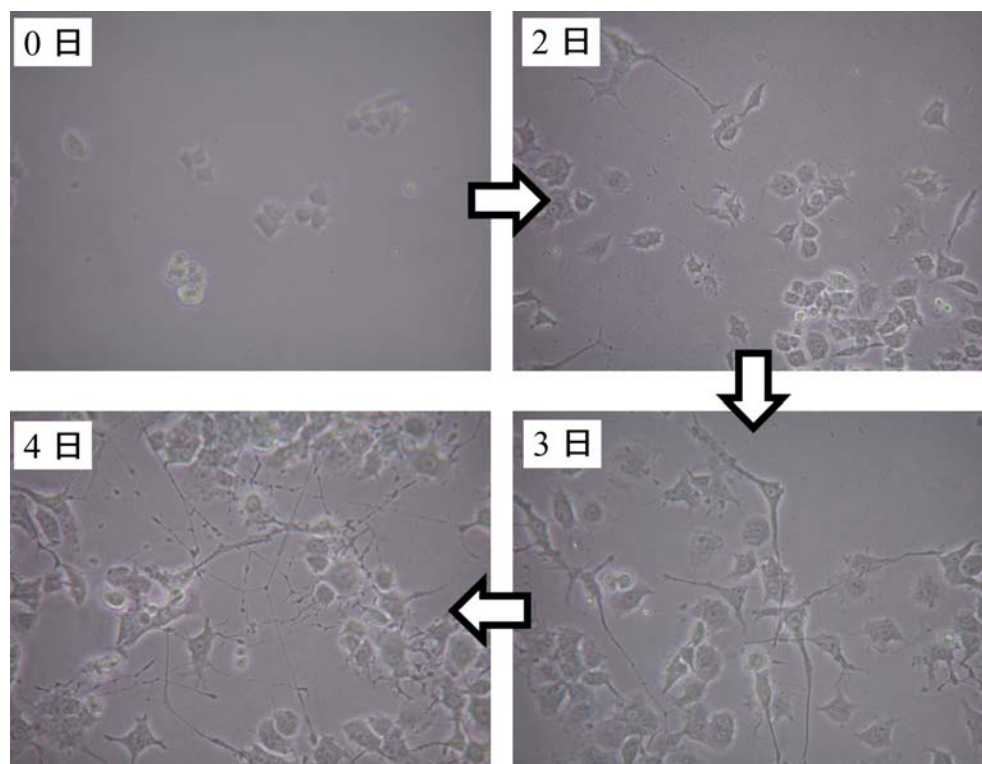


Fig.4.1 PC12 細胞の分化の様子

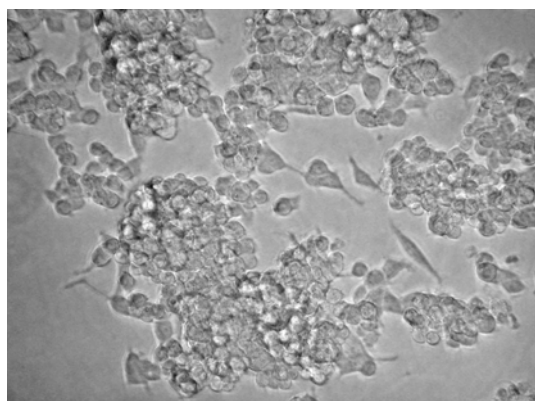


Fig.4.2 NGF 濃度 10 ng/ml の培地で培養された細胞

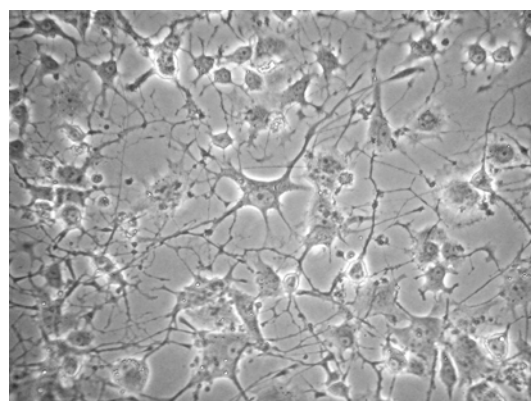


Fig.4.3 NGF 濃度 100 ng/ml の培地で培養された細胞

また、培養ディッシュ内に細胞を播種し NGF の濃度が 10 ng/ml と 100 ng/ml の場合において、軸索の伸長の様子を 7 日間観察した。NGF 濃度が 10 ng/ml の培地内で培養された細胞の様子を Fig.4.2 に示し、NGF 濃度が 100 ng/ml の培地内で培養された細胞の様子を Fig.4.3 に示す。NGF の濃度が 10 ng/ml の場合は、細胞体がディッシュ表面に接着しており、いくつかの細胞は扁平化しているが、軸索を伸長させた細胞を観測することはできなかった。一方、NGF の濃度が 100 ng/ml の培地内で培養された細胞は、全ての細胞が扁平・肥大化しディッシュ内の一面に軸索を張り巡らせている様子が観察できた。これらのように、PC12 細胞は培養を開始し、NGF を投与するとその刺激によって軸索を伸長させる。また、NGF の濃度の違いによって軸索の伸長を制御することができるものと考えられる。そこで、本研究では、培養チャンバに培養した細胞をバルブの開閉によって刺激した際、時間の経過と共に変化する細胞の形態を観測することによって評価する。

## 4.2 デバイス上での細胞刺激のための基礎実験

実際にデバイス上に細胞を培養し、薬剤によって刺激を与えるためには、顕微鏡下での培養と観察が可能であるかどうか、構築したデバイス上での培養が可能であるかどうかを調べる必要がある。そのために、顕微鏡下での培養と培養チャンバ内での培養を行い、その結果を基に刺激実験を行う。以下にそれぞれの実験について記す。

### 4.2.1 顕微鏡下での軸索伸長

通常、PC12 細胞は温度を 37 °C、CO<sub>2</sub> 濃度を 5 %程度に保った CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養される。しかし、本研究では細胞への刺激実験を行う場合、デバイス上に播種された細胞を観察しながら培養を行うため、顕微鏡下の温度を 37 °Cに保つことはできるが CO<sub>2</sub> 濃度を一定に保つことができない。このため、顕微鏡下の CO<sub>2</sub> 濃度を一定に保たない環境において、細胞培養と軸索伸長をさせることが可能であることを確認する必要がある。そこで、顕微鏡下に設置したホットプレートで温度を 37 °C程度に保ち、数時間観察することによって細胞の形態変化の様子を観察した。

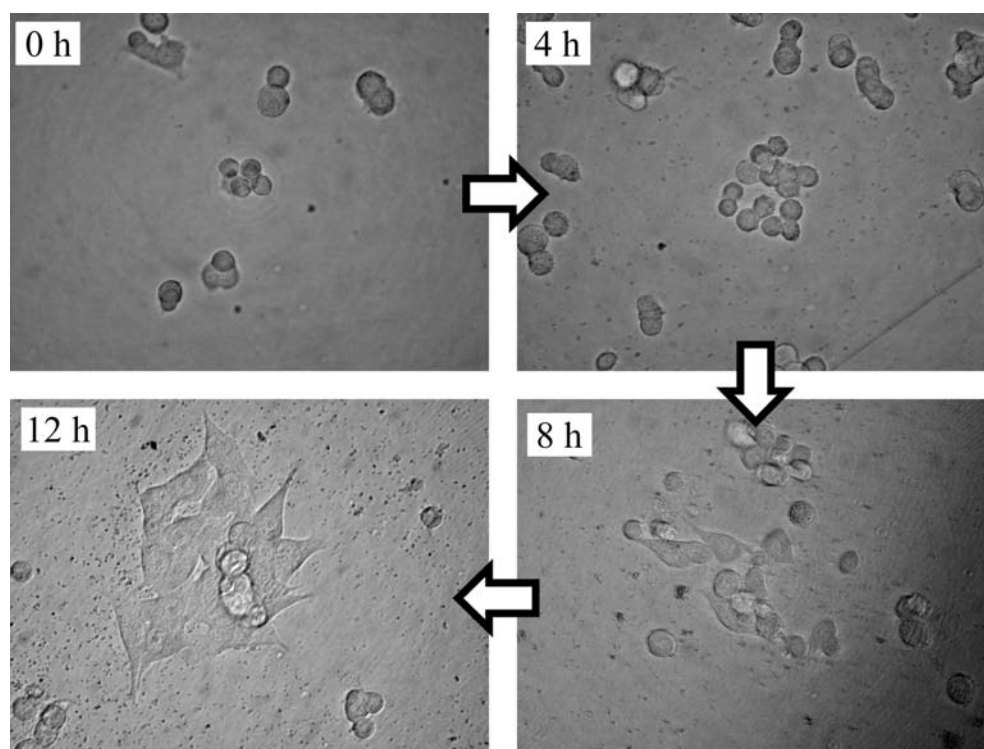


Fig.4.4 顕微鏡下での軸索伸長の様子

Fig.4.4 に顕微鏡下での細胞分化の様子を示す。PC12 細胞は 10 %ウシ胎児血清と 100 ng/ml の NGF を含む培地 (RPMI1640, SIGMA-ALDRICH) 内で培養された。培養を開始した直後の細胞は球体であり、その形状のまま底面に接着した状態である。培養開始から 4 時間が経過すると、細胞分裂が起こっており細胞の数が増えた。また、小さな突起を形成し始める細胞が現れた。さらに、培養開始から 8 時間後には細胞体が肥大化を始め、突起の部分が伸び始め、12 時間後にはさらに肥大化し、細胞体から軸索が伸長する様子を観察することができた。この結果から、12 時間程度の培養であれば CO<sub>2</sub> 濃度を一定に保たなくても温度を 37 °C に保ちながら培養することで細胞を分化させることができるということがわかった。

#### 4.2.2 培養チャンバ内での細胞培養

構築した薬剤放出制御デバイスは、製作の際に様々な薬品に浸されることによってエッチングされ、構造を形成していく。特に、細胞培養チャンバに製作された薬剤を放出するためのナノホールは FIB 装置を使ってガリウムイオンを集束させ、それを基板に照射することによって構築したものである。このため、ナノホールの周辺にはガリウムイオンが堆積している可能性があり、ガリウムイオンの影響で細胞がうまく成長・分化しないことや、軸索を伸長させない可能性があると考えられる。また、細胞の成長や軸索伸長は表面形状に大きく依存するため、培養チャンバ内で培養できることを確認する必要がある。そこで、ガリウムイオンによる影響を軽減するために培養チャンバ内にコラーゲン (Becton, Dickinson and Corp.) を塗布することによって細胞の接着が容易に行えるようにし、ナノホール上で培養できるかどうかを培養倒立顕微鏡で観察した。この培養の様子を Fig.4.5 に示す。写真中のライン状で白く光った部分の真下にはマイクロチャネルが構築されており、このマイクロチャネル中にナノホール・アレイを構築している。PC12 細胞は 10 %ウシ胎児血清と 100 ng/ml の NGF を含む培地 (RPMI1640, SIGMA-ALDRICH) 内で培養されており、培養 1 日目にはダイアフラム構造中に球状の細胞がまばらに接着している。培養開始から 3 日目には、球状の細胞が扁平・肥大化し分化を始める様子が伺える。4 日目には、チャンバ内の細胞のほとんどすべてが分化し軸索を伸長させており、四方八方の広い範囲に軸索を張り巡らせている。また、細胞分裂も行っており、チャンバ内の細胞が増加している。さらに 5 日目には、細胞が分裂し増加しすぎているため、細胞の分化の様子を観察することが困難となった。この結果から、ナノホールを構築した培養チャンバ中でも培養チャンバ内にコラーゲンを塗布することによって細胞を培養することが可能であり、細胞を分化させて軸索を伸長させることができる。ここで、この実験では培養チャンバ内に細胞が分裂しすぎており、細胞の

分化の様子や軸索の伸長方向を確認することが困難であった．このため，培養チャンバ内に導入する細胞の数を減らす必要があり，細胞数を 10～30 個/ml にすることによって長時間の培養実験を行っても観察が容易になる考えられる．

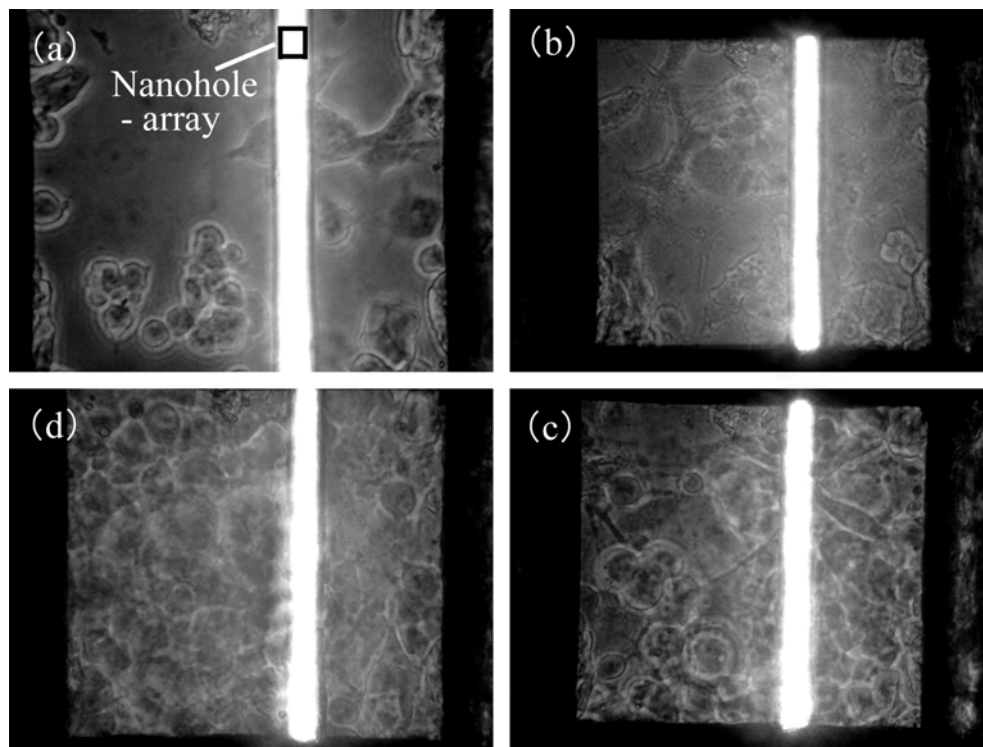


Fig.4.5 培養チャンバ内で細胞培養

### 4.3 NGF による PC12 細胞の分化誘導

構築した薬剤放出制御デバイスの培養チャンバに PC12 細胞を培養し、PC12 細胞の分化誘導を行う。つまり、バルブ開閉によって制御された NGF をナノホールから放出することで、培養チャンバ内に培養された PC12 細胞を刺激する。刺激された細胞の形態変化や分化の仕方を顕微鏡で観察することにより、評価を行う。

デバイス上での刺激実験に使われる PC12 細胞は、デバイス上に培養する前に以下に示すような手順で培養される。まず、PC12 細胞をウシ胎児血清と NGF を含む培地（ウシ胎児血清：10%，NGF 濃度：100 ng/ml）培養ディッシュ内に播種し、温度が 37℃で CO<sub>2</sub> 濃度が 5 %の CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 3 日間培養する。これにより、細胞は分化を始め NGF 刺激に対する反応が敏感になる。次に、これらの細胞をピペッティングによって集め、構築されたデバイスの NGF を含まない培地で満たされている培養チャンバ内に播種し、温度が 37℃で CO<sub>2</sub> 濃度が 5 %の CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 30 分間培養する。最後に、デバイスのナノホールから放出された NGF によって細胞を化学的に刺激する。

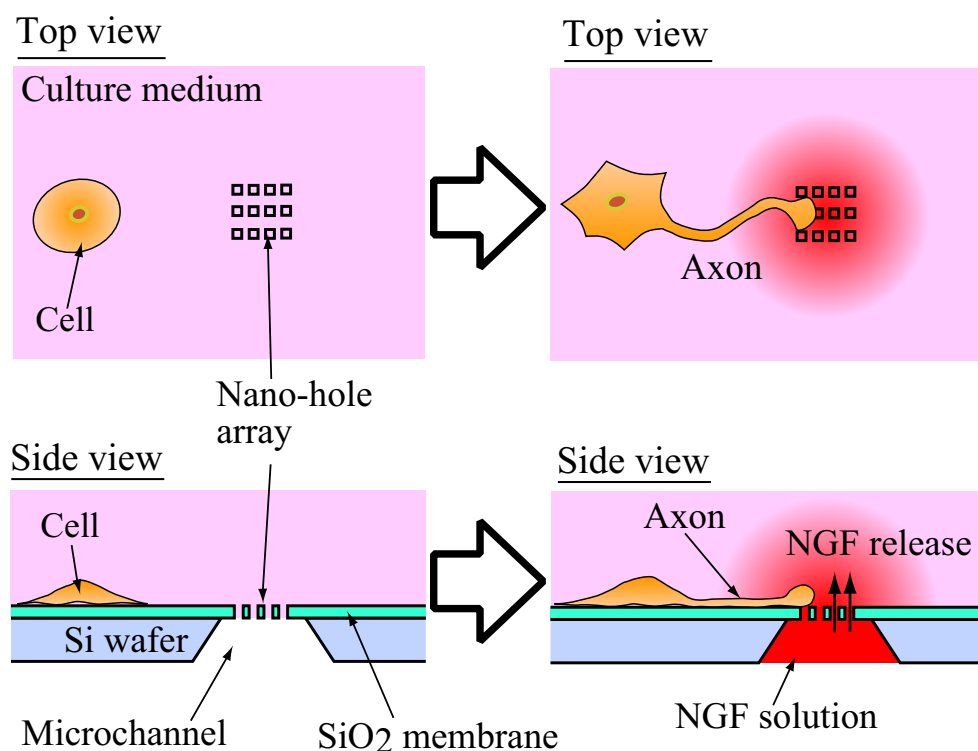


Fig.4.6 デバイス上での培養細胞刺激

Fig.4.6 に構築したデバイス上で、細胞を化学的に刺激する場合の概要図を示す。デバイスの培養チャンバ内にて播種された PC12 細胞は、すぐにチャンバの表面に接着する。ナノホール・アレイから NGF を放出する前、接着した細胞は球形である。バルブを開きナノホール・アレイから NGF を放出すると、細胞は NGF に刺激されて分化を始める。その後、細胞体から伸びる軸索は NGF の濃度勾配に従ってナノホール・アレイの方向に伸長する。また、NGF の放出をバルブのスイッチングによって制御した場合、細胞の分化を制御することができると考えられる。ナノホールまで伸長してきた軸索がナノホールを通してマイクロチャネル内に浸入するのを防ぐために、軸索末端の直径寸法よりも小さな径のナノホールを構築した。

#### 4.3.1 PC12 細胞への刺激実験

ここでは、構築したデバイスを使って細胞の分化を誘導できるかどうかを調べる。Fig.4.7 に細胞誘導実験の概要を示す。ナノホール・アレイから放出される NGF の刺激によって成長する細胞の様子をデバイスの培養チャンバ側から培養顕微鏡で観察した。初期状態では、注入側の NGF を含む培地と放出側 NGF を含まない培地はバルブが閉じているため、空気によって隔てられている。注入側のチャンネルに陽圧を印加すると、注入側の液体はバルブの疎水面を乗り越えて放出側の液体と接触しバルブが開く。その後、NGF は放出側の液体に拡散し、ナノホール・アレイを通して培養チャンバ内へと放出される。したがって、培養チャンバに培養された PC12 細胞はナノホールを通して放出された NGF によって刺激される。ここでは、構築したデバイスを使って、2 種類の実験を試みた。一方は、実験中常にバルブを開いたままにしておき、NGF による刺激を制御していない場合である。他方は、バルブの開閉を定期的に行い、NGF による培養細胞への刺激を制御した場合である。実験系は Fig.3.14 に示すものと同じであるが、Fig.3.14 の水のところを培地に、蛍光色素のところを NGF にそれぞれ置き換えた。以下に実験の手順を示す。

- (1) 上述したように PC12 細胞を準備する。
- (2) 培養チャンバにコラーゲンを塗布する。
- (2) NGF と培地を混ぜ合わせて細胞を刺激するための溶液を調整する。この溶液の NGF の濃度が 1000 ng/ml になるように調製する。
- (2) 準備した細胞を構築したデバイスの培養チャンバに入れ、インキュベータの中で 30 分間培養する。この際、チャンバ内に細胞が入り過ぎないように注意する。
- (3) インキュベータからデバイスを取り出し、スぺーサーの上にデバイスを置く。この際、培養チャンバ内に空気が入りやすいので空気が入らないように十分

に注意する必要がある。もし、空気が入ればこの時点で実験ができなくなるので細心の注意を払うこと。

- (4) 顕微鏡上にホットプレートを準備し、ホットプレートの温度を 37℃に設定する。また、ホットプレート上に実験用デバイスを配置する。
- (5) マイクロシリンジとチューブを接続しチューブの先端のみを細胞刺激用の NGF 入り培地で満たす。また、同じものをもう一つ用意し、これにはチューブ内を 10 %ウシ胎児血清を含む培地で満たす。
- (6) 10 %ウシ胎児血清を含む培地で満たしたチューブをチャンネルの放出側のコネクタと接続し、マイクロシリンジポンプを操作して放出側のチャンネル内を満たす。
- (7) ファンクションジェネレータの設定を行い、電子回路と接続する。その後、電子回路とマイクロインジェクタを接続し、入力信号に間違いが無いかを確かめる。
- (8) 先端に NGF を含む培地を満たしたチューブをチャンネルの注入側のコネクタと接続し、マイクロシリンジポンプの操作によって、注入側のチャンネル内に NGF 入り培地を浸入させる。この際、チューブ内に圧力が溜まるため、圧を抜きながらゆっくりと浸入させる必要がある。また、浸入した液体はバルブ部（疎水性面）ではじかれるため、バルブは閉じた状態である。
- (9) 注入側のマイクロシリンジポンプを取り外し、チューブ内に溜まった圧力を大気開放する。
- (10) マイクロシリンジポンプを取り外したチューブをマイクロインジェクタと接続する。
- (11) スイッチを入れ、電子回路を通してファンクションジェネレータからの信号をマイクロインジェクタに入力すると設定したバルブ開閉周期で圧力を印加する。
- (12) 印加された圧力によって、液体がバルブの疎水面を乗り越えてバルブが開き、あらかじめ満たしておいた培地と NGF 入り培地が接触する。NGF のどの勾配によってナノホールから NGF を拡散放出する。この様子を倒立顕微鏡で観察する。



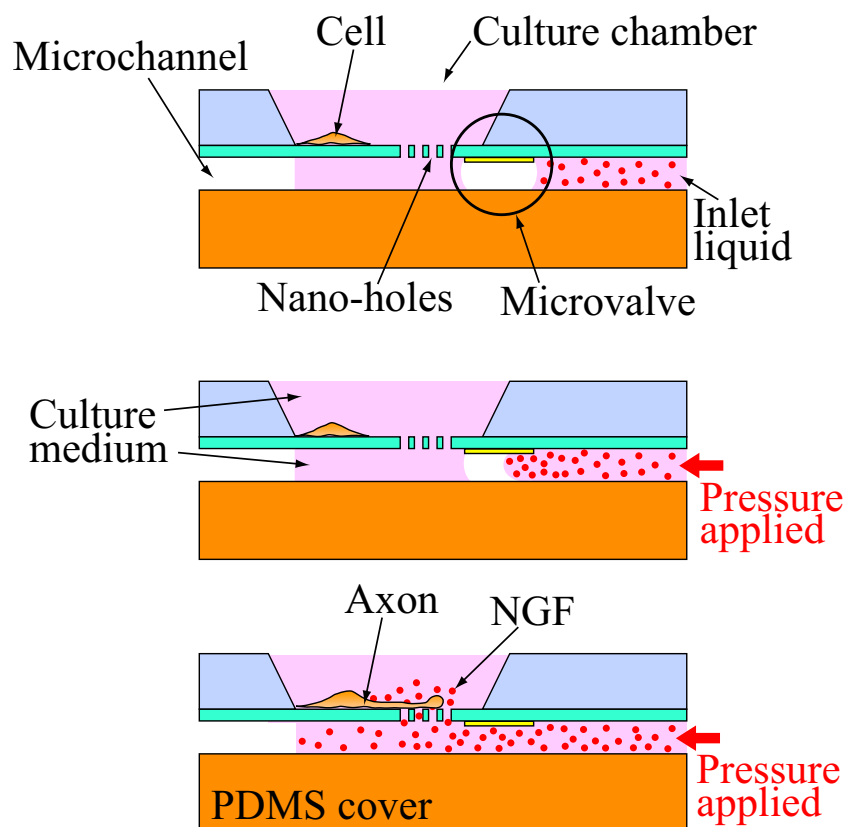


Fig.4.7 細胞刺激実験の概要

#### 4.3.2 ナノホールからの NGF 放出による細胞分化誘導

構築した刺激制御デバイス上で PC12 細胞から伸びる軸索の伸長誘導実験を行った。PC12 細胞はデバイスの培養チャンバ内に培養されており、ナノホール・アレイから放出される NGF 刺激によって軸索を伸長させる。この実験の際、マイクロバルブは常に開いた状態であり 1000 ng/ml の濃度の NGF は常に放出されている。細胞体から伸びる軸索の伸長の様子を Fig.4.8 に示す。培養チャンバに細胞を播種するとまもなく細胞は培養チャンバの表面に吸着した。しかし、NGF による刺激を開始してから 4 時間後でも細胞は分化を始めず、球形のままである。刺激開始から 6 時間後、ナノホール・アレイの最も近くに位置する接着した細胞は扁平・肥大化し分化を始めた。さらに刺激を開始してから 8 時間後、細胞体から軸索が伸長し、その軸索は NGF の濃度勾配にしたがってナノホール・アレイの方向に伸長した。この結果、構築したデバイス上で細胞を培養しナノホール・アレイから NGF を放出することによって細胞の分化や軸索の伸長を誘導することができることが示唆された。

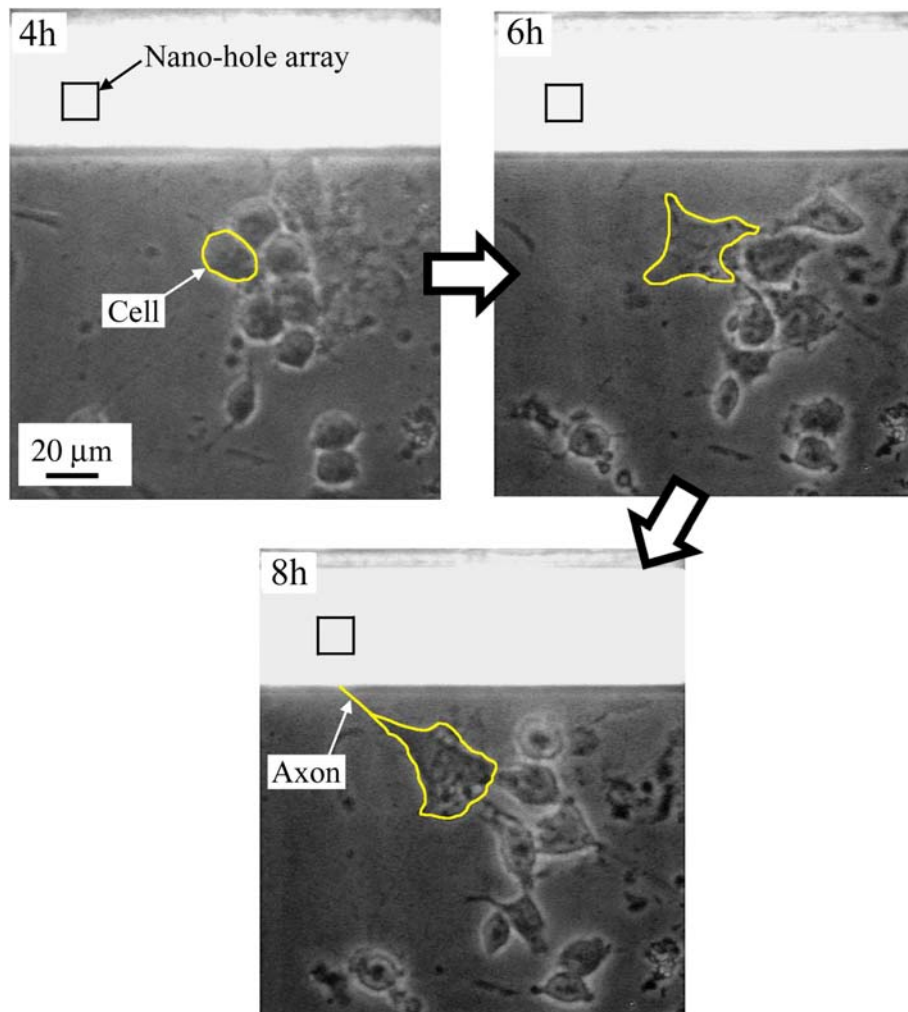


Fig.4.8 ナノホールから NGF を放出し続けた場合の軸索誘導

Fig.4.9 に NGF 刺激による軸索の伸長長さの遷移を示す. ナノホール・アレイから NGF の放出を行い細胞への刺激を開始すると, 軸索は時間の経過と共に徐々に伸長を始め, 4 時間以上経過すると伸長するスピードが速くなる. しかし, 軸索の末端がナノホール・アレイまで到達した後, その細胞は時間の経過と共に急激に収縮した. これは, ナノホール・アレイまで到達した軸索がその場で他の細胞とシナプス結合できなかったことが原因であると考えられる. したがって, ナノホールからの NGF の放出量を変化や刺激の仕方の変更, シナプス結合を行う際に細胞が分泌するタンパク質であるカドヘリン (カテニン系) やニューロリギン (ニューレキシン系)などをナノホール・アレイの周辺にコーティングすることによって, 軸索が収縮せず

に軸索とシナプス結合ができるようになるのではないかと考えられる。また，もしデバイスと神経細胞とで擬似的なシナプス結合が実現できれば，細胞とデバイス間で神経伝達物質による情報伝達を実現できると考えられ，神経伝達物質を起因とする病気の解明や治療法の確立に貢献できると考えられる。

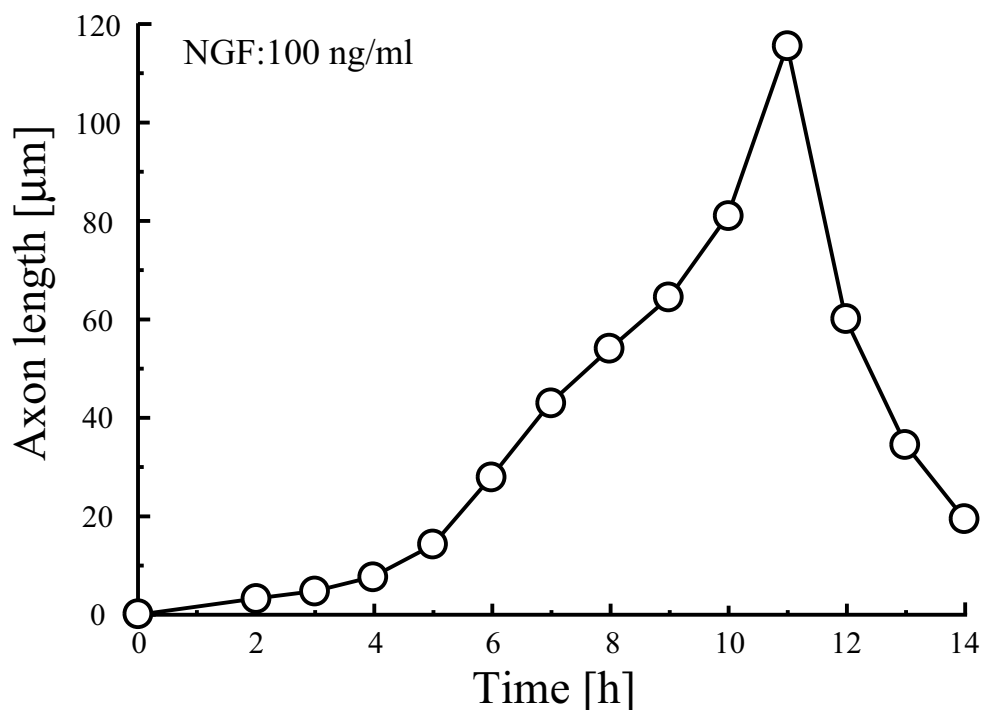


Fig.4.9 軸索伸長長さの遷移

#### 4.3.3 バルブの開閉による培養細胞の分化誘導

培養チャンバ内に PC12 細胞を培養しバルブの開閉によってナノホールを通して放出する NGF を制御することによって細胞への化学刺激を制御した。 Fig.4.10 に NGF による細胞の分化誘導の遷移を示す。この実験は，バルブの開閉周期が 1Hz であり開閉の Duty 比を 65 %にした。写真の左下の PC12 細胞は，培養チャンバに播種されるとすぐにチャンバ表面に接着した。そして，NGF による刺激を開始してから 2 時間が経過すると，細胞体が扁平・肥大化し軸索を伸長させた。また，4 時間後に観察した際はさらに軸索を伸長させており，ナノホール・アレイの方向に向かって軸索を伸長させている様子が確認できる。一方，右側の細胞はチャンバに播種した後にすぐにチャンバ表面に接着せず，NGF による刺激を開始してから 2 時間後にはチャンバ表面に接着したが，分化をする様子は観察できなかった。しかし，チャ

ンバ表面に接着してから2時間後には細胞体が扁平・肥大化しており、ナノホール・アレイの方向に向かって軸索を伸長させた。以上の結果、構築したマイクロ流体デバイスを使うことによって培養神経細胞の分化や軸索の伸長を誘導することができる。

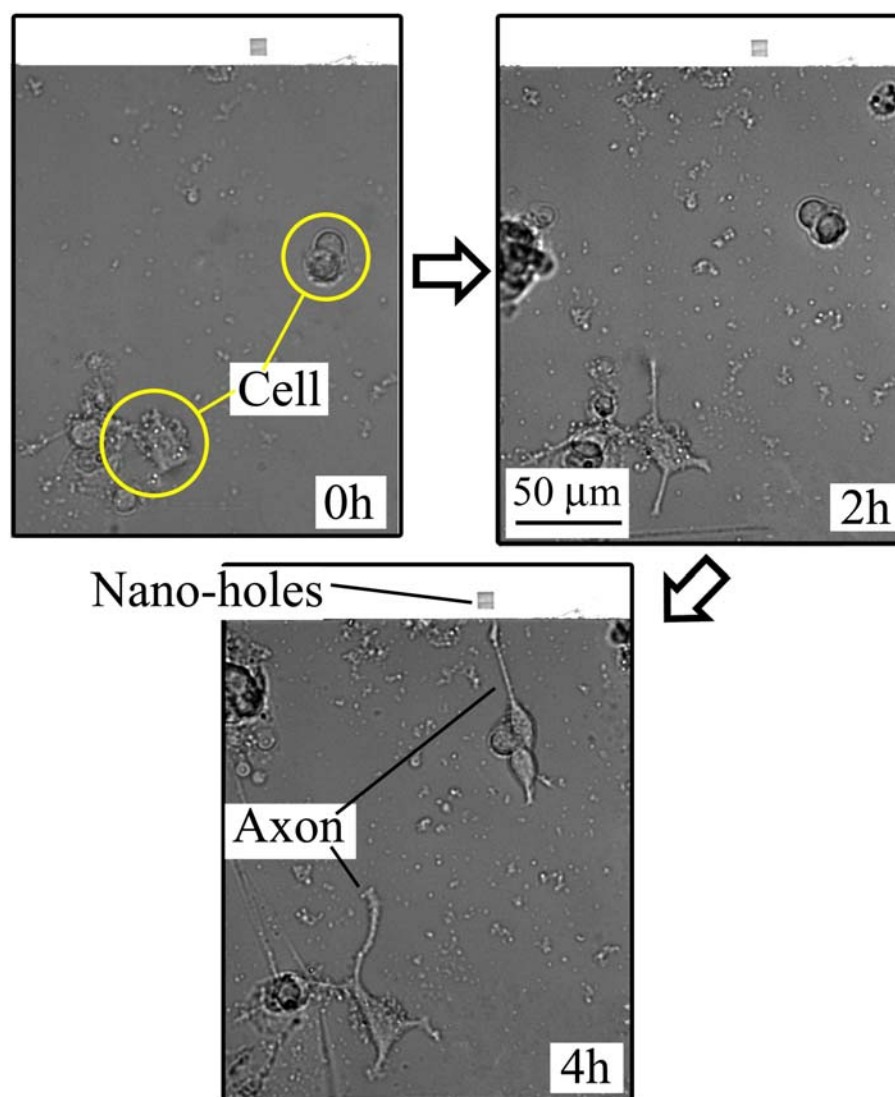


Fig.4.10 バルブ開閉制御による培養細胞の分化誘導

次に、NGF 刺激の条件による PC12 細胞の成長の依存性を調べるために、さまざまな実験を行った。まずは、2種類の異なる周期でバルブの開閉を行うことによって細胞を刺激した。Fig.4.11 に細胞体の変化の様子を示す。ここで、本実験では変形し

た後の細胞体の大きさを初期状態の細胞の大きさを正規化した。また、この実験では3種類の条件によって実験を行った。それぞれの条件は、以下の通りである。

- ① バルブ開閉周期が15分間隔であり、ナノホール・アレイから200  $\mu\text{m}$  離れた場所に接着した細胞に対して刺激を行った実験。
- ② バルブの開閉周期が30分間隔であり、ナノホール・アレイから40  $\mu\text{m}$  離れた場所に接着した細胞に対して刺激を行った実験。
- ③ バルブの開閉周期は②の条件と同様に30分間隔であり、ナノホール・アレイから160  $\mu\text{m}$  離れた場所に接着した細胞に対して刺激を行った実験。

①の実験の場合、バルブを開閉し細胞に対して刺激を与えると、時間の経過と共に細胞体が徐々に扁平・肥大化し、4.5時間後には細胞体が分化を始めた。②の実験の場合、バルブを開閉しナノホール・アレイから40  $\mu\text{m}$  離れた場所の細胞を刺激すると、細胞体は扁平・肥大化せずに初期の大きさを常に保ち続けた。③の実験の場合、ナノホール・アレイから160  $\mu\text{m}$  離れた場所の細胞を刺激すると、時間の経過と共に細胞体は徐々に小さくなった。結果的にこの実験では、15分間隔でバルブの開閉を行った場合だけ、細胞体が分化を始めた。これらの結果は、標的となる細胞とナノホール・アレイとの距離を考慮し、バルブの開閉間隔を制御することによって細胞の成長を制御することができるということを示唆した。しかし、バルブの開閉間隔が30分より長くなるとNGF刺激を使っても細胞の成長を誘導することができなかった。これは、細胞が分化・成長するためには、ある一定量以上の刺激を受け続けなければならないということが考えられる。

また、ナノホール・アレイからそれぞれ70  $\mu\text{m}$ , 120  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  離れた距離に培養された細胞に対して刺激を行った場合の細胞体の変形の様子をFig.4.12に示す。マイクロバルブは0.5秒間隔（開閉Duty比50%）で開閉を行った。ナノホール・アレイからの距離が70  $\mu\text{m}$  の細胞の場合、バルブの開閉によりNGF刺激を開始してから3時間程度までは初期の形状を保ったままであるが、その後は徐々に細胞体が扁平・肥大化を始め刺激開始から6時間後には分化を始めた。しかし、ナノホール・アレイからの距離が120  $\mu\text{m}$  の細胞の場合、NGF刺激を行っても細胞体は扁平・肥大化せずに常に初期状態を維持したままであった。また、ナノホール・アレイから200  $\mu\text{m}$  の距離の細胞は、刺激を行った3時間後くらいまでは初期状態とほぼ同様の大きさを保っていたが、その後は時間の経過と共に徐々に収縮していった。これは、ナノホール・アレイから200  $\mu\text{m}$  離れた領域では細胞を分化させるために必要なNGF濃度が得られていないということが考えられる。この結果、ナノホール・アレイからの距離が70~120  $\mu\text{m}$  の間で細胞が分化するかないかの境界線があると考えられる。また、1 Hzでバルブを開閉することによってNGFの濃度勾配が空間的に形成されるため、培養細胞の成長や分化はナノホール・アレイからの距離に依存すると考

えられる。

さらに、ナノホール・アレイから  $120\ \mu\text{m}$  離れた距離にある細胞に対して NGF で刺激を行った。この際、バルブ開閉の Duty 比を 50 % (バルブを開く時間が 0.5 秒) と 60 % (バルブを開く時間が 0.6 秒) の 2 種類で NGF の放出制御を行った。Fig.4.13 にバルブ開閉の Duty 比に依存する細胞の大きさの変遷を示す。Duty 比が 60 % の場合、NGF による刺激を開始するとその後 2 時間程度細胞体が扁平・肥大化し、刺激開始から 2 時間が経過すると細胞体は分化を始めた。一方、Duty 比が 50 % の場合、NGF による刺激を開始しても細胞体は扁平・肥大化せずに常に初期の大きさを保ち続けた。したがって、Duty 比を大きくする (バルブを開く時間を長くする) ことによって細胞の分化を加速させるものと考えられる。

これらの実験の結果、構築したデバイスのマイクロバルブの開閉周波数や Duty 比を制御しナノホール・アレイから放出する NGF の濃度を変化させることによって、細胞の分化や成長の挙動を変化させることに成功した。また、細胞体から伸びる軸索は NGF の濃度勾配に従ってナノホール・アレイの方向に伸長してくるため、ナノホール・アレイとマイクロバルブの組み合わせを同一基板上にアレイ化することによって細胞体から伸びる軸索の伸長を任意の方向に導くことができると考えられる。

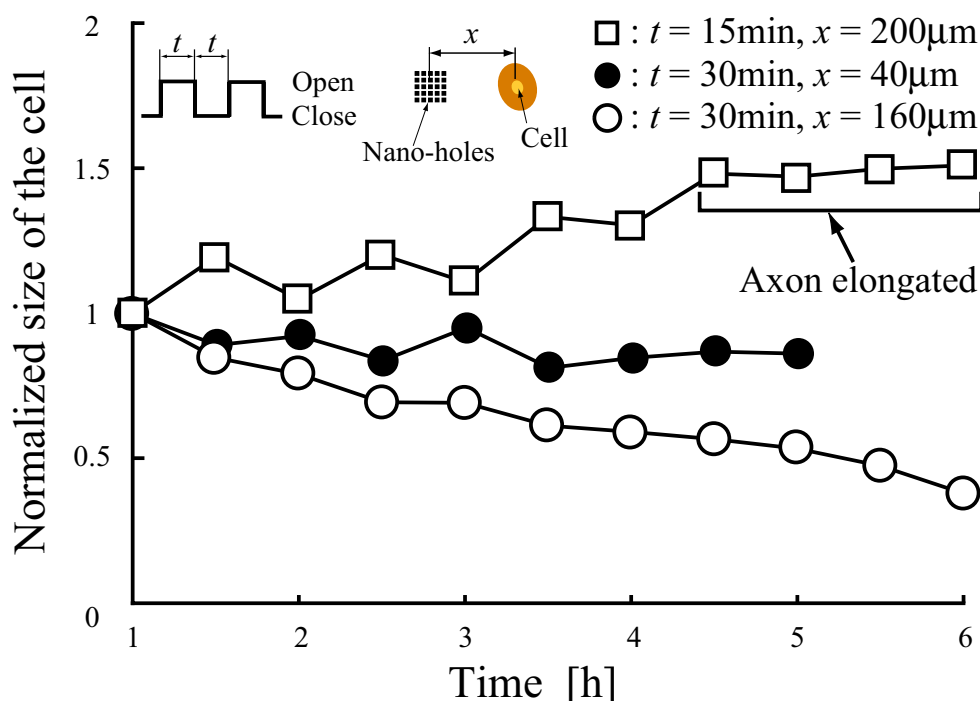


Fig.4.11 バルブの開閉制御による細胞体の形状変化

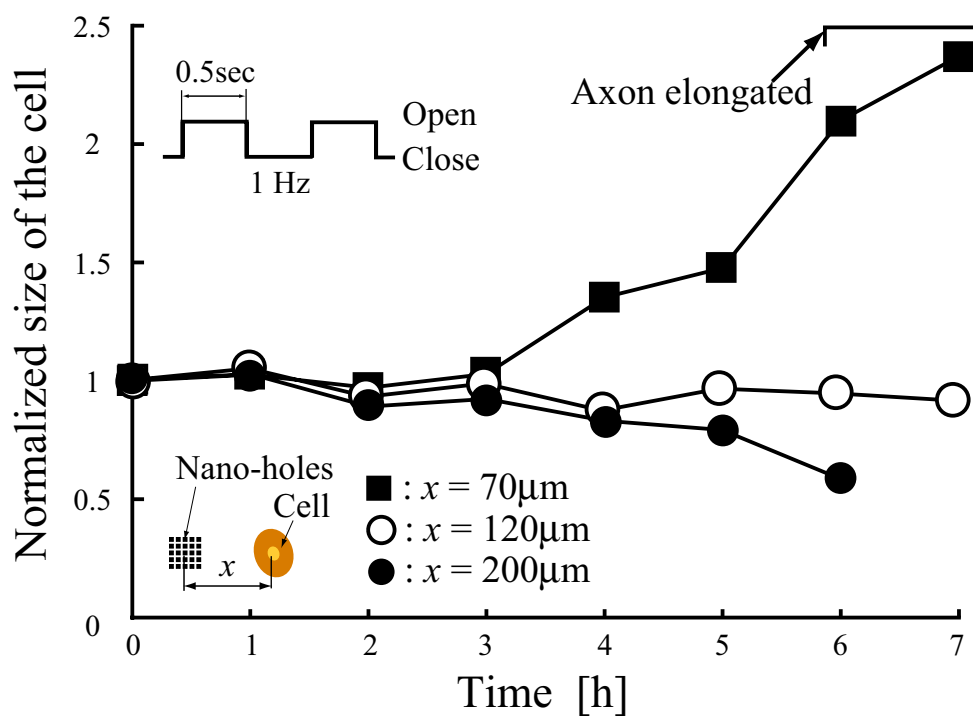


Fig.4.12 ナノホール・アレイからの距離による細胞体の形状変化

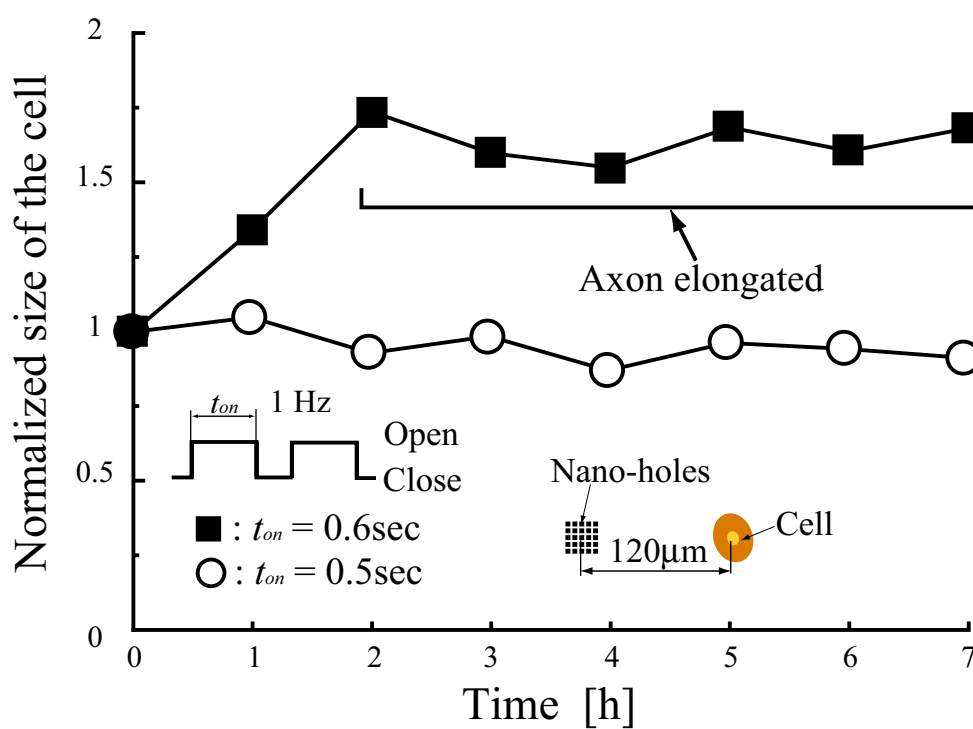


Fig.4.13 バルブ開閉の Duty 比に依存する細胞体の形状

続けて、バルブ開閉の Duty 比を制御しナノホール・アレイからの NGF 放出を制御した際、細胞体から伸びる軸索の長さを計測した。Fig.4.12 における、ナノホール・アレイから 70  $\mu\text{m}$  の距離に培養された細胞の軸索伸長の遷移を Fig.4.14 に示す。この細胞はバルブ開閉周期 1 Hz, Duty 比 50 %で刺激され、NGF 刺激を受け始めて 3 時間経過しても細胞体は変化せず球形を保っていた。しかし、4 時間程度経過すると細胞が扁平・肥大化し徐々に分化をはじめ 6 時間後には 8  $\mu\text{m}$  程度、7 時間後には 15  $\mu\text{m}$  程度の軸索を伸長させた。つまり、細胞がすぐに軸索を伸長させるほど NGF の濃度が高くなく、刺激を開始してから 4 時間程度小さな刺激を受け続けた細胞が軸索を伸長させたものだと考えられる。

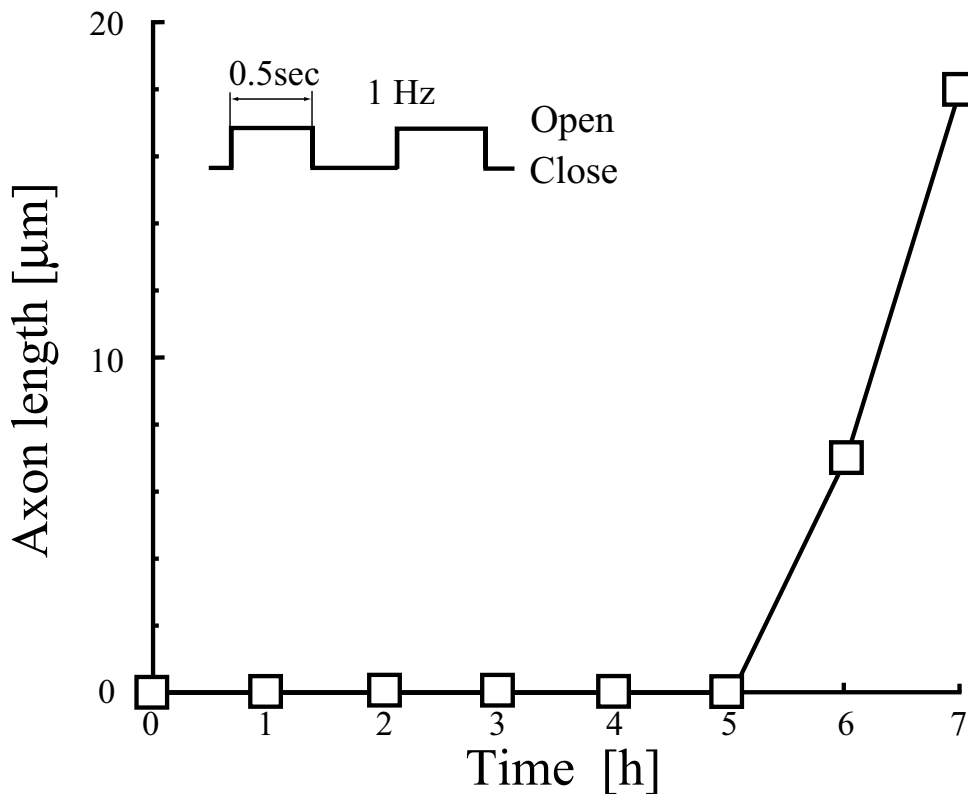


Fig.4.14 バルブの開閉を 1 Hz, Duty 比 50 %で行った際の軸索伸長

次に、Fig.4.13 において、バルブ開閉の周波数 1 Hz, Duty 比 60 %で刺激された細胞の軸索伸長の遷移を Fig.4.15 に示す。NGF 刺激を行って 1 時間後には細胞体が扁平・肥大化し分化をはじめ、2 時間後には軸索を 5  $\mu\text{m}$  程度伸長させた。その後、軸



索は時間の経過と共に徐々に伸長し 4 時間後には 10  $\mu\text{m}$  程度、7 時間後には 25  $\mu\text{m}$  程度に伸長した。

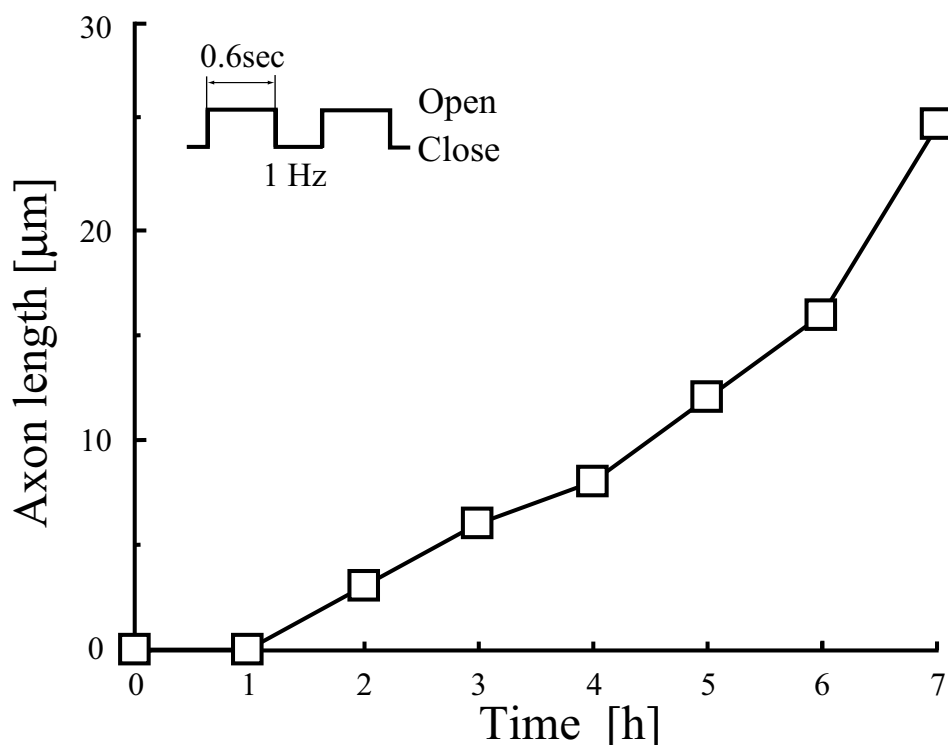


Fig.4.15 バルブの開閉を 1 Hz, Duty 比 60 %で行った際の軸索伸長

また、ナノホール・アレイから 120  $\mu\text{m}$  の距離に培養された細胞に対して、バルブの開閉を 1 Hz, Duty 比 65 %で行った際の軸索伸長のグラフを Fig.4.16 に示す。この場合、NGF 刺激を開始するとすぐに細胞体が扁平・肥大化しはじめ、刺激を開始して 1 時間後には軸索を 15  $\mu\text{m}$  程度伸長させた。そして、時間の経過と共に徐々に軸索を伸長させ、2 時間後には 30  $\mu\text{m}$  程度、5 時間後には 50  $\mu\text{m}$  程度の軸索を伸長させた。これらの結果から、細胞体から伸びる軸索の伸長のしやすさは、NGF の濃度や放出量に影響を受けると考えられる。ただし、これらのグラフをみるとわかるように、軸索の伸長速度はそれぞれの実験で異なる。これは、細胞自体に個体差があるため、伸長のしやすい細胞やしにくい細胞があるのではないかと考えられる。また、細胞には細胞周期が存在し、分化や分裂を起こす周期や分化や分裂を起こすための準備の周期などが存在する。この細胞周期を制御し、NGF による刺激実験を行うことによって個体差が生じにくい条件下で実験ができると考えられる。細胞周期とは、Fig.4.17 に示すように遺伝情報を含めた細胞内構造成分を 2 倍にし、それを 2 つの細胞に分配し増殖するプロセスのことである。細胞周期のなかで、細胞が分裂

する時期を M 期 (mitosis), DNA を合成する時期を S 期 (synthesis) と呼び, M 期から S 期までの時期を G1 期, S 期から M 期までの時期を G2 期と呼ぶ[22].

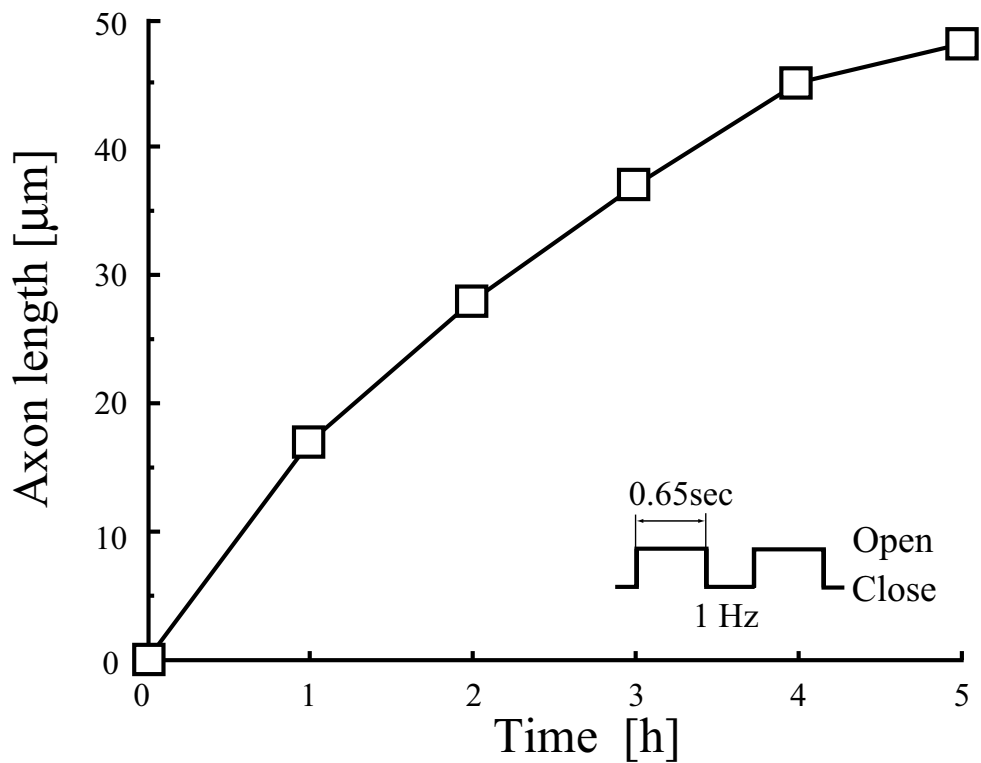


Fig.4.16 バルブの開閉を 1 Hz, Duty 比 65 %で行った際の軸索伸長

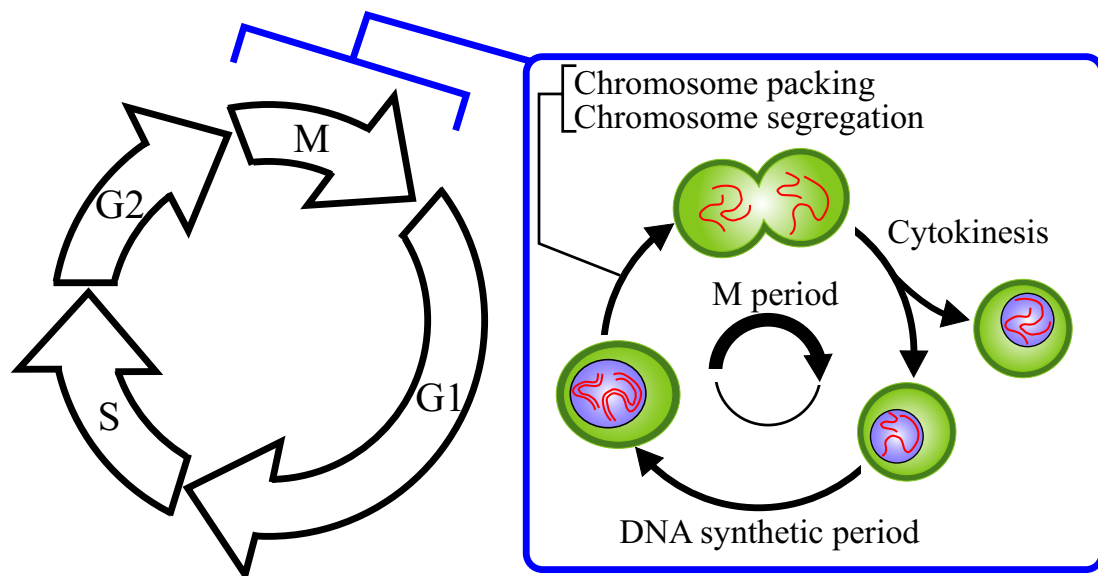


Fig.4.17 細胞周期

## 4.4 結言

本章では、NGF を含む培地を使いシリコン基板上で PC12 細胞を培養し、顕微鏡下での培養や構築したデバイス内での培養が可能であることを確認した。また、構築したデバイスの培養チャンバ内に PC12 細胞を培養し、バルブの開閉を制御することによってナノホール・アレイからの NGF 刺激を調整し細胞を刺激した。本章で得られた結果を以下にまとめる。

1. 12 時間程度の培養であれば、CO<sub>2</sub> 濃度を一定に保たなくても温度を 37 °C に保ちながら培養することで細胞を分化させることができる。
2. ナノホールを構築した培養チャンバ中でも培養チャンバ表面にコラーゲンを塗布することによって細胞を培養することが可能であり、細胞を分化させて軸索を伸長させることができる。
3. 培養チャンバ内に導入する細胞の数は 10~30 個/ml 位が適量である。
4. ナノホール・アレイから NGF を放出し続けた場合、細胞体から伸びる軸索は NGF の濃度勾配にしたがってナノホール・アレイの方向に伸長するが、ナノホール・アレイに到着すると軸索は収縮する。
5. 15 分以下の間隔でバルブの開閉を行った場合、細胞体を分化させることができるが、30 分より長くなると細胞が成長するために必要な十分な NGF 刺激を与えることができず、細胞の成長を誘導することはできない。
6. 1 Hz でバルブを開閉することによって NGF の濃度勾配が空間的に形成され、培養細胞の分化はナノホール・アレイからの距離に依存する。
7. バルブ開閉の Duty 比を大きくし、1 周期におけるバルブを開く時間を長くすることによって、より速く分化させることができる。
8. 細胞の分化や成長は NGF の濃度に依存し、構築したデバイスのマイクロバルブの開閉周波数や Duty 比を変化させることによって、分化や成長を制御可能である。
9. 細胞の成長には個体差があると考えられるため、細胞周期を制御するなどして実験の条件を整える必要がある。
10. 多数のマイクロバルブとそれに 1 対 1 で対応するナノホール・アレイを同一基板上にアレイ化したデバイスを構築することによって細胞体から伸びる軸索の伸長を 2 次元的に誘導することができる可能性がある。

## 第5章 結論

### 5.1 結論

神経細胞の分化や軸索の伸長・成長を誘導することを目的として、培養細胞への化学刺激を精密に制御できるマイクロ流体デバイスを構築した。このデバイスは薬剤を放出するためのナノホール・アレイと薬剤の放出を制御するためのマイクロバルブ、細胞を培養するための培養チャンバが同一基板上にシステム化されたものである。このデバイスは、SOI 基板を両面から加工することによって実現され、細胞培養チャンバの直下にマイクロチャネルを製作したため、チャネル内に構築されたバルブとナノホール・アレイ、培養チャンバを同一基板上の極近傍へのシステム化が可能である。

以上のマイクロ流体デバイスを構成するための要素としてナノホールとマイクロバルブ、細胞培養チャンバの 3 つが挙げられる。以下にこれらの要素の必要な特性を示す。

- (1) 薬剤放出用ナノホールは、培養細胞に対して薬剤を放出するための孔である。このため、微量な薬剤放出と細胞への局所的かつ精密な刺激を実現するためには、細胞体から伸びる軸索末端の直径寸法よりも小さな径（内径 100～500 nm）であることが必要であり、マイクロマシン技術と FIB 加工を駆使することで製作可能である。
- (2) マイクロバルブは、ナノホール・アレイや培養チャンバの極近傍に構築されるため、機械的な可動部の無い簡単な構造で、開閉動作を行う場合に細胞や培地内のたんぱく質に悪影響を及ぼす可能性のある熱的あるいは電気的な駆動源を必要としないバルブであることが必要である。このバルブは、マイクロチャネル表面を親水面・疎水面にパターニングし表面エネルギーの違いを利用することによって実現される。本バルブは、注入側から印加する圧力を操作することにより、バルブの開閉を制御することができる。
- (3) 細胞培養チャンバは、細胞の接着と分化や軸索の伸長が可能な表面であること

が必要である。これは、培養チャンバ表面へのコラーゲンのコーティングと顕微鏡下での温度制御により実現される。

次に、構築したデバイスを使ってバルブの諸特性や薬剤放出の制御性などを調べた。その結果、デバイスの構成要素全てを極近傍に構築することによって、チャンネルから導入された薬剤はナノホール・アレイからの放出をバルブの開閉によって精密に制御され、培養チャンバ内に培養された細胞を刺激することができることを明らかにした。以下にマイクロ流体デバイスの薬剤放出制御に関する具体的な結果を示す。

- (1) 流路内に流す液体に超純水を使った際、Cyttop 膜と SAM 膜のどちらの疎水性面を使った場合でも 6 kPa 以上の圧力を印加することによって 1 秒以内で高速に開閉することができる。また、流路に流す液体に培地を使った際は、エアーベント側のチャンネルを十分に細くし、Cyttop 膜よりもタンパク質などの吸着を妨げやすい SAM 膜を疎水面に使用することによってバルブの開閉を行うことができる。この際、4 kPa 以上の圧力を印加すれば 1 秒以内でバルブを高速に開閉させることができる。
- (2) バルブの開閉周波数を高くすると、開閉のスピードに液体が追従しにくくなるためバルブを開くために必要な印加圧力が高くなる。例えば、培地を使った場合、バルブ開閉周波数が 1 Hz であればバルブを開くために必要な印加圧力は 5 kPa であるが、開閉周波数が 1.4 Hz であればバルブを開くために必要な印加圧力は 20 kPa である。
- (3) バルブ開閉のタイミングは開閉周波数と Duty 比を制御することによってコントロールできる。
- (4) 超純水を使った場合、バルブを開くための印加圧力 7 kPa、閉じるための印加圧力-97 kPa で 24 時間 (86400 サイクル) 以上連続して動作することができる。また、培地を使った場合は、バルブの開閉に必要な印加圧力時間の経過と共に徐々に上げていけば、12 時間 (43200 サイクル) バルブを連続して開閉させることができる。
- (5) バルブ開閉の Duty 比を制御することによって、ナノホールから任意の距離だけ離れた領域の薬剤濃度を一定に保つことができ、バルブを開いた時間に関係なく空間的な濃度勾配が時間的に変化しない濃度場を作ることができる。

また、構築したデバイスの培養チャンバ内に PC12 細胞を培養し、刺激に対する細

胞の挙動や分化の様子を観察した．この実験から得られた結果や展望などを以下に示す．

- (1) NGF をナノホール・アレイから放出し続けた際，細胞体から伸びる軸索は NGF の濃度勾配にしたがって伸長するが，ナノホール・アレイにたどり着きシナプス結合ができなければ軸索を収縮させる．
- (2) 細胞の分化や軸索の伸長は NGF の濃度に依存するため，バルブの開閉周波数やその Duty 比，細胞とナノホール・アレイとの距離に依存する．したがって，構築したデバイスは幹細胞を目的の細胞へ分化誘導するためのツールや軸索を目的の電極へ誘導するデバイス，さらには細胞分化のメカニズムを解明できるツールに成り得る．

上記のように，本研究では刺激の与え方によって細胞の反応や挙動が変化するという事を明らかにした．現段階では，細胞には個体差がありどのような刺激を与えれば，どのような反応を示すということを断言することは難しいが，本研究での結果は細胞治療や幹細胞の分化，神経生理などの研究に応用することができる大きな第一歩になったと考えている．

## 5.2 今後の課題

本研究で構築したマイクロ流体デバイスは幹細胞を目的の細胞へと分化誘導するためのツールや細胞の分化や機能発現のメカニズムを解明するツール，神経インタフェースデバイスの実現に大きく貢献できるデバイスに成り得る．これらのようなツールに応用するための今後の課題を以下に列挙する．

- (1) 細胞の分化や成長などには個体差が存在するため，細胞周期を制御し同周期の細胞を使った実験による分化誘導の評価．
- (2) 神経幹細胞や肝幹細胞などの生体外での培養他比較的容易である臓器特異的幹細胞を使つての分化誘導．
- (3) ナノホール・アレイの周辺にカドヘリンやニューログリンなどシナプス結合を行う際に必要なタンパク質などをコーティングし，デバイスと神経細胞との間で擬似的なシナプス結合の構築．
- (4) ナノホール・アレイ近傍への細胞の反応を電氣的あるいは電気化学的に計測する電極の構築とその評価．

# 参考文献

## MEMS 全般

- [1] 江刺正喜, 藤田博之, 五十嵐伊勢美, 杉山進, “マイクロマシーニングとマイクロメカトロニクス,” 培風館, 1992.
- [2] マイクロマシン技術総覧編集委員会編集 “マイクロマシン技術総覧,” 産業技術サービスセンター, 2003.
- [3] 江刺正喜 “マイクロマシン,” 産業技術サービスセンター, 2002.
- [4] Miko Elwenspoek, Hinri V. Jansen, “シリコンマイクロ加工の基礎,” シュプリンガー・フェアラーク東京, 2001.
- [5] 川合知二, “ナノテクノロジーのすべて,” 工業調査会, 2001.

## 細胞, 幹細胞など

- [6] 中内啓光, “幹細胞を利用した再生医療,” バイオサイエンスとインダストリー, Vol. 60, No. 4, pp. 243-244, 2002.
- [7] Robert Lanze, Nadia Rosenthal, “The Stem Cell Challenge,” Scientific American, June, 2004.
- [8] 柳田充弘, 西田栄介, 野田亮, “分子生物学,” 東京化学同人, 1999
- [9] 松村道一, “ニューロサイエンス入門,” サイエンス社, 1995.
- [10] 伊藤薫, “脳と神経の生物学,” 培風館, 1996.
- [11] 遠藤益, “細胞生物学,” 丸善株式会社, 1998.
- [12] Roger A. Barker, Stephen Barasi, Michael J. Neal, “Neuroscience at a Glance,” Blackwell Science Ltd., 1999
- [13] 貴邑富久子, 根来英雄, “シンプル生理学,” 南江堂, 2001.
- [14] Fred Delcomyn, “Foundations of Neurobiology,” W.H.Freeman and Company
- [15] 小林春雄, “神経情報生物学入門,” オーム社, 1990.
- [16] 日本組織培養学会編集, “組織細胞の技術 基礎編,” 朝倉書店, 1982.
- [17] 松本元, 大津展之, “神経細胞の細胞生物学特性,” 培風館, 1992.
- [18] R. W. Gundersen and J. N. Barrett, “Neuronal Chemotaxis: Chick Dorsal-Root Axons



- Turn Toward High Concentrations of Nerve Growth Factor,” *Science*, Vol. 206, pp. 1079-1080, 1979.
- [19] Reynolds, B. A., Weiss, S. *Science* 255, pp. 1707-1710, 1992.
  - [20] Gage, F. H., *Science* 287, pp. 1433-1438, 2000.
  - [21] Nadya Lumelsky, Olivier Blondel, Pascal Laeng, Ivan Velasco, Rea Ravin, and Ron Mcky, “Differentiation of embryonic stem cells to insulin- secreting structures similar to pancreatic islets,” *Science*, 292, pp. 1389-1394, 2004.
  - [22] 東京大学教養学部理工系生命科学教科書編集委員会, “生命科学,” 羊土社, 2006.
  - [23] Brent A. Reynolds, Wolfram Tetzlaff, and Samuel Weiss, “A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes,” *The Journal of Neuroscience*, 12 (11), pp. 4565-4574, 1992.
  - [24] Atsushi Suzuki, Yun-wen Zheng, Shin Kaneko, Masafumi Onodera, Katashi Fukao, Hiromitsu Nakauchi, and Hideki Taniguchi, “Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver,” *The Journal of Cell Biology*, Volume 156, Number 1, pp. 173-184, 2002.

#### 細胞成長誘導・神経電極・細胞刺激など

- [25] Marks, A. F., “Bullfrog nerve regeneration into porou implants,” *Anatomical Rec.*, Vol. 163, pp. 226, 1969.
- [26] 鈴木隆文, “神経再生電極,” *Clinical Engineering*, Vol. 12, No. 1, 2001.
- [27] Akio Kawana and Yasuhiko Jimbo, “Neurointerface – Interfaces of Neuronal Networks to Electrical Circuit-,” *IEEE Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest*, pp. 14-20, 1999.
- [28] Edell, D. J., “A Peripheral Nerve Information Transducer for Amputees: Long-Term Multichannel Recordings from Rabbit Peripheral Nerves,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. BME-33, No. 2, pp. 203-214, 1986.
- [29] 川名明夫, “培養神経細胞による人為的神経回路網の掲載,” *応用物理*, Vol. 61, No. 10, pp. 1031-1034, 1992.
- [30] J. Ji and K. D. Wise, “An implantable CMOS analog signal processor for multiplexed microelectrode recording arrays,” *IEEE Solid-State Sensor and Actuator Workshop*, pp. 107-110, 1990.
- [31] R. A. Normann, P. K. Campbell and K. E. Jones, “Micromachined silicon based electrode arrays for electrical stimulation of or recording from cerebral cortex,” *IEEE Micro Electro Mechanical Systems*, pp. 247-252, 1991.
- [32] Laurent Griscorn, Patrick Degenaar, Bruno LePioufle, Eiichi Tamiya, Hiroyuki Fujita,

- “Techniques for patterning and guidance of primary culture neurons on micro-electrode arrays,” *Sensors and Actuators B83*, pp.15-21, 2002.
- [33] F. Morin, M. Denoual, L. Griscom, B. LePioufle, H. Fujita, and E. Tamiya, “Controlling Cell Development by Microfluidic Techniques: a Step Towards Whole-Cell Biosensors with Defined Biological Features,” *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems Symposium*, Vol. 1, pp. 515-517, 2002.
- [34] Hiroyuki Moriguchi, Kazunori Takahashi, Tomoyuki Kaneko and Kenji Yasuda, “On-Chip Agarose Microchamber (AMC) Array Cell-Cultivation System for Topographical Control of Neural Network,” *Micro Total Analysis Systems 2002*, Volume 1, pp. 13-15, 2003.
- [35] Song Li, Sangeeta Bhatia, Ying-Li Hu, Yan-Ting Shiu, Yi-Shunichi Usami and Shu Chien, “Effects of Morphological Patterning on Endothelial Cell Migration,” *Biorheology* 38, pp. 101-108, 2001.
- [36] Ravi S. Kane, Shuichi Takayama, Emanuele Ostuni, Donald E. Ingber, and George M. Whitesides, “Patterning Proteins and Cells Using Soft Lithography,” *Biomaterials*, 20, pp. 2363-2376, 1999.
- [37] Hirokazu Kaji, Matsuhiko Nishizawa, Tomokazu Matsue, “Development of Novel Bioassay System Using Micropatterned Mammalian Cell,” *Micro Total Analysis Systems 2002*, Volume 2, pp. 814-816, 2002.
- [38] Hirokazu Kaji, Yuki Takii, Matsuhiko Nishizawa, Tomokazu Matsue, “Pharmacological characterization of micropatterned cardiac myocytes,” *Biomaterials* 24, pp. 4239-4244, 2003.
- [39] Takayama S, Ostuni E, LeDuc P, Naruse K, Ingber DE, Whitesides GM, “Subcellular positioning of small molecules,” *Nature* 411, pp. 1016, 2001 .
- [40] A. Brock et al. “Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing,” *Langmuir*, Vol. 19, No. 5, pp. 1611-1617, 2003.
- [41] Takeo Kato, Katsuya Okawa, Munetada Haruyama, Kazuhiro Shiraishi, Momoko Yashimoto, Masako Nagato, Minoru Shibata, Tomohiro Kumada, Yasunari Yamanaka, Haruo Hattori, and Tatsutoshi Nakahata, “A Neurosphere-derived Factor, Cystatin C, Supports Differentiation of ES Cells into Neural Stem Cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Volume 103, No. 15, pp. 6019-6024, 2006.
- [42] Kwang-Seok Yun, Sang-II Lee, Gyun Min Lee, and Euisik Yoon, “Design and Fabrication of Micro/Nano-Fluidic Chip Performing Single-Cell Positioning and Nanoliter Drug Injection for Single-Cell Analysis,” *Micro Total Analysis Systems 2002*, Volume 2, pp. 652-654, 2002.

- [43] Nae Yoon Lee, Masumi Yamada, and Minoru Seki, "Improved Sample Injection Method Adapting Hydrophobic Passive Valve Systems for Microfluidic Devices," *Micro Total Analysis Systems 2002*, Volume 2, pp. 667-669, 2002.
- [44] Michael J. DeBar and Dorian Liepmann, "Fabrication and Performance Testing of a Steady Thermocapillary Pump with No Moving Parts," *IEEE Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest*, pp. 109-112, 2002.
- [45] Mark C. Peterman, Neville Z. Mehenti, Kalayaan V. Bilbal, Christina J. Lee, Theodore Leng, Jaan Noolandi, Stacey F. Bent, Mark S. Blumenkranz, and Harvey A. Fishman, "The Aartificial Synapse Chip: A Flexible Retinal Interface Based on Directed Retinal Cell Growth and Neurotransmitter Stimulation," *Artificial Organs*, 27(11), pp. 975-985, 2003.
- [46] A. Tixier, Y. Mita, B. Le Pioufle, P. Surbled, Y. Murakami, E. Tamiya, H. Fujita, "Realisation of a Cell Manipulation Bio-Microsystem using Shadow mask techniques," *Micro Total Analysis Systems 2000*, pp. 123-126, 2000.
- [47] Masaki Kanai, Hirohisa Abe, Tatsuya Munaka, Yoichi Fujiyama, Daisuke Uchida, Asako Yamayoshi, Hiroaki Nakanishi, Akira Murakami and Shuichi Shoji, "Integrated Micro Chamber For Living Cell Analysis With Negligible Dead Volume Sample Injector," *IEEE Transducers '03*, pp. 288-291, 2003.
- [48] S. Koster, A. Blau, C. Ziegler, J.-C. Roulet, N. F. de Rooij, and E. Verpoorte, "Dispensing System for Localized Stimulation of Neural Cell Networks," *Micro Total Analysis Systems 2003*, Volume 1, pp. 93-96, 2003.
- [49] T. F. Kosar, N. L. Stucky, C. Chen, K. J. Kim and A. Folch, "Nanohole Arrays for Parallel Patchclampinf and Focal Delivery of Biochemical Factors to Cells," *Micro Total Analysis Systems 2003*, Volume 1, pp. 25-28, 2003.
- [50] T. Lehnetr, R. Netzer, U. Bischoff and M. A. M. Gijs, "SiO<sub>2</sub> Nozzle Array-Based Patch-Clamp Microsystem," *Micro Total Analysis Systems 2002*, Volume 1, pp. 28-30, 2002.
- [51] Agnes Tixier-Mita, Yoshio Mita, Katell Cozic, Marie Frenea, Bruno Le Pioufle and Hiroyuki Fujita, "To Place Cell As an Array Using Aspiration Technique," *Micro Total Analysis Systems 2002*, Volume 2, pp. 888-889, 2002.
- [52] F. Greve, J. Lichtenberg, H. Hall, A. Hierlemann, H. Baltes, "Physical Immobilization and Polymeric Microchannel Networks to Achieve Defined Neuronal Network Structures," *7<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems*, pp. 327-330, 2003.
- [53] Masato Tanabe, Jiro Makinodan, Kengo Suzuki, Yoshiyuki Hosokawa, Satoshi Konishi, Nobuhiko Ozaki and Hiroaki Oka, "Decvelopment of Micro Channel Array

- With Detecting Electrodes for Electrophysiological Biomedical Sensor,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems, pp. 407-410, 2003.
- [54] Robert B. Darling, Eva Aw, and Mimi Mar, “A Microbead Sieve and Polarographic Detection Cell for Immunoassays Wite a Modular Microfluidic Interconnect,” Micro Total Analysis Systems 2000, pp. 517-520, 2000.
  - [55] De-Sheng Meng, Joonwon Kim and Chang-Jin “CJ” Kim, “A Distributed Gas Breather for Micro Direct Methanol Fuel Cell (mDMFC),” IEEE Micro Electro Mechanical Systems, pp. 534-537, 2003.
  - [56] Kyong-Bok Min, Shuji Tanaka and Masayoshi Esashi, “Silicon-Based Micro-Polymer Electrolyte Fuel Cells,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems, pp. 379-382, 2003.
  - [57] Kien B. Lam, Mu Chiao, and Liwei Lin, “A Micro Photosynthetic Electrochemical Cell,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems, pp. 391-394, 2003.
  - [58] Bas de Heij, Chris Steinert, Hermann Sandmaier, Roland Zengerle, “A Tunable and Highly-parallel Picoliter-Dispenser Based on Direct Liquid Displacement,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems, pp.706-709, 2002.
  - [59] Kee Suk Ryu, Zhifang Fan, Chang Liu, “Microfabrication Process for High-density Micro Pipette Array and Matching Multi-Well Plate with Mixers,” Micro Total Analysis Systems 2002, Volume 1, pp. 157-159, 2002.
  - [60] Shih-Chang Lin, Yi-Chin. Tsai, Fan-Gang Tseng, Haimei Huang, and Ching-Chang Chieng, “Protein Microarray Patterned by a Surface-Tension-Driven Stamping System with Discrete Dispensing Channels,” Micro Total Analysis Systems 2002, Volume 2, pp. 679-681, 2002.
  - [61] Lung-Jieh Yang, Tze-Jung Yao, Yu-Lin Huang, Yong Xu and Yu-Chong Tai, “Marching Velocity of Capillary Menisci in Microchannels,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest, pp. 93-96, 2002.
  - [62] Benedict S. Gallardo, Vinay K. Gupta, Franklin D. Eagerton, Lana I. Jong, Vincent S. Craig, Rahul R. Shah, Nicholas L. Abbott, “Electrochemical Principles for Active Control of Liquids on Submillimeter Scales,” Science, Vol. 283, pp. 57-60, 1999.
  - [63] Woo-Young Sim, Sin-Wook Park, Sang-Sik Yang, Sang-Hyug Park, and Byoung-Hyun Min, “A Pneumatic Micro Cell Stimulator for The Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs),” Micro Total Analysis Systems 2006, Volume 2, pp. 1543-1545, 2006.

μTAS・マイクロバルブ・マイクロポンプ・マイクロチャネル

- [64] S.Kamisuki, M.Fujii, T.Takekoshi, C.Tezuka and M.Atobe, “A High Resolution,

- Electrostatically driven Commercial Inkjet Head,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems, pp. 793-798, 2000.
- [65] A. Van Den Berg and P. Bergveld, “Micro Total Analysis Systems,” Kluwer Academic Publishers, 1995.
  - [66] D. Jed Harrison and Albert Van Den Berg, “Micro Total Analysis Systems ’98,” Kluwer Academic Publishers, 1998.
  - [67] A. Van Den Berg, W. Olthuis and P. Bergveld, “Micro Total Analysis Systems 2000,” Kluwer Academic Publishers, 2000.
  - [68] J. Michael Ramsey and Albert van den Berg, “Micro Total Analysis Systems 2001,” Kluwer Academic Publishers, 2001.
  - [69] Yoshinobu Baba, Shuichi Shoji and Albert van den Berg, “Micro Total Analysis Systems 2002,” Kluwer Academic Publishers, 2002.
  - [70] Chin-Ming Ho, “Fluidics -The Link Between Micro and Nano Sciences and Technologies-,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest, pp. 375-384, 2001.
  - [71] Kyoseok Chun, Gen Hashiguchi, Hiroshi Toshiyoshi and Hiroyuki Fujita, “An Array of Hollow Microcapillaries for The Controlled Injection of Genetic Materials into Animal/Plant Cells,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest, pp. 406-411, 1999.
  - [72] S. W. Lee, H. Yowanto and Y. C. Tai, “A Micro Cell Lysis Device,” Proceedings of IEEE Micro Electro Mechanical Systems, pp. 443-447, 1998.
  - [73] Ok Chan Jeong and Sang Sik Yang, “Fabrication of a Thermopneumatic Micropump with Aluminum Flap Valves,” Journal of the Korean Physical Society, Vol. 37, No. 6, pp. 873-877, 2000.
  - [74] Antonio Baldi, Yuandong Gu, Paul E. Loftness, Ronald A. Siegel, Babak Ziaie, “A Hydrogel-Actuated Smart Microvalve with a Porous Diffusion Barrier Back-Plate for Active Flow Control,” IEEE Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest, pp. 105-108, 2002.
  - [75] David Juncker, Heinz Schmid, Andre Bernard, Isabelle Caelen, Bruno Michel, Nico de Rooij and Emmanuel Delemarche, “Soft and Rigid Two-Level Microfluidic Networks for Patterning Surfaces,” Journal of Micromechanics and Microengineering, Vol. 11, No. 5, pp. 532-541, 2001.
  - [76] Koide, Y. Sasaki, Y. Yoshimura, R. Miyake, T. Terayama, “Micromachined Dispenser with High Resolution,” T.IEE Japan, Vol. 122-E, No. 9, 2001.
  - [77] Kazuo Hosokawa and Ryutaro Maeda, “Low-Cost Technology for High-Density Microvalve Arrays Using Polydimethylsiloxane (PDMS),” IEEE Micro Electro

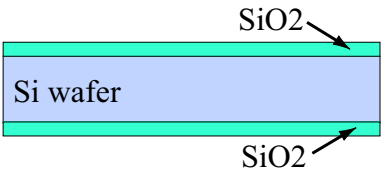
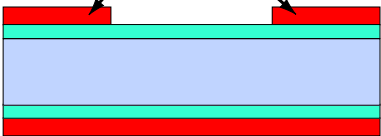
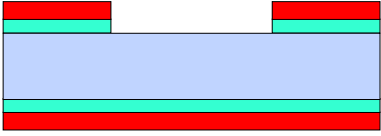

- Mechanical Systems Technical Digest, pp. 531-534, 2001.
- [78] Deniz Armani, Chang Liu and Narayan Aluru, "Re-Configurable Fluid circuits by PDMS Elastomer Micromachining," IEEE Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest, pp. 222-227, 1999.
  - [79] Jun Shinohara, Masayuki Suda, Kazuyoshi Furuta, Toshihiko Sakuhara, "A High Pressure-Resistance Micropump Using Active and Normally-Closed Valves," Proceedings of IEEE Micro Electro Mechanical Systems, pp. 86-91, 2000.
  - [80] Daniel Laser, Shuhuai Yao, Chuan-Hua Chen, James Mikkelsen, Jr., Kenneth Goodson, Juan Santiago and Thomas Kenny, "A Micromachined Silicon Low-Voltage Parallel-Plate Electrokinetic Pump," Transducers'01, pp. 920-923, 2001.
  - [81] S. Kluge, G. Neumayer, U. Schaber, M. Wackerle, M. Maichl, P. Post, M. Weinmann, R. Wanner, "Pneumatic Silicon Microvalves with Piezoelectric Actuation," Transducers'01, pp. 924-927, 2001.
  - [82] R. Linnemann, P. Woias, C.-D. Senfft and J. A. Ditterich, "A Self-Priming and Bubble-Tolerant Piezoelectric Silicon Micropump for Liquids and Gases," Proceedings of IEEE Micro Electro Mechanical Systems, pp. 532-537, 1998.
  - [83] Xuan-Qi Wang, Qiao-Lin, Yu-Chong Tai, "A Parylene Micro Check Valve," IEEE Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest, pp. 177-182, 1999.
  - [84] Jun Xie, Xing Yang, Xuan-Qi Wang and Yu-Chong Tai, "Surface Micromachined Leakage Proof Parylene Check Valve," IEEE Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest, pp. 539-542, 2001.
  - [85] Dider Maillefer, Harald van Lintel, Gilles Rey-Mermet and Roland Hirschi, "A High-Performance Silicon Micropump for an Implantable Drug Delivery System," IEEE Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest, pp. 541-546, 1999.
  - [86] Ellis Meng, Xuan-Qi Wang, Howen Mak and Yu-Chong Tai, "A Check-Valved Silicon Diaphragm Pump," Proceedings of IEEE Micro Electro Mechanical Systems, pp. 62-67, 2000.
  - [87] S. Kamisuki, T. Hagata, C. Tezuka, Y. Nose, M. Fujii and M. Atobe, "A Low Power, Small, Electrostatically-Driven Commercial Inkjet Head," Proceedings of IEEE Micro Electro Mechanical Systems, pp. 63-68, 1998.
  - [88] Kazuhiro Yoshida, Masaaki Kkuchi, Jung-Ho Park and Shinichi Yokota, "A Micro ER Valve Fabricated by Micromachining," IEEE Micro Electro Mechanical Systems Technical Digest, pp. 467-470, 2001.
  - [89] Xing Yang, Charles Grosjean, Yu-Chong Tai and Chih-Ming Ho, "A MEMS Thermopneumatic Silicon Membrane Valve," Proceedings of IEEE Micro Electro Mechanical Systems, pp. 114-118, 1997.

## その他


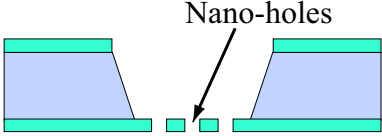
- [90] 高橋清, 佐々木昭夫, “アドバンストセンサハンドブック,” 培風館, 1994.
- [91] 室田誠逸, “再生医学・再生医療,” 東京化学同人, 2002.
- [92] 田畑泰彦, “再生医療の実際,” 羊土社, 2003.
- [93] 筏義人, “再生医学ー失った体はとりもどせるか,” 羊土社, 1998.
- [94] “Coventor Manual,” 2003.
- [95] 三好俊郎, “有限要素法入門,” 培風館, 1999.

# 付録



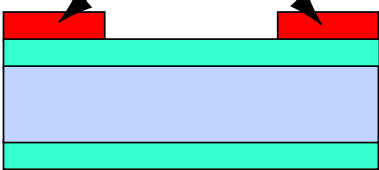
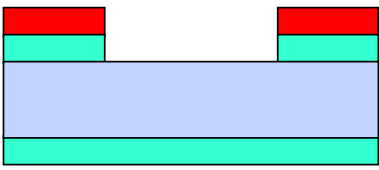

## A: ナノホールの製作プロセスの詳細

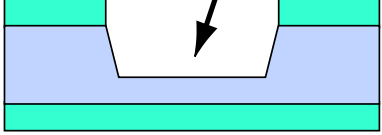
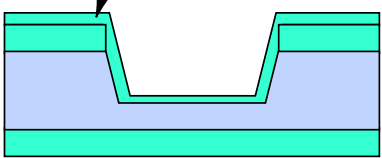
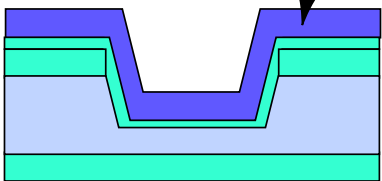
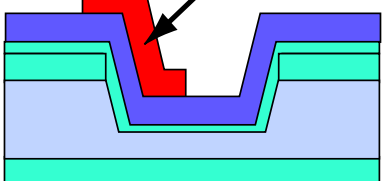
	プロセス	条件・備考
	単結晶 n 型シリコン基板を準備し，加工を始める前にBHFに浸し表面処理を行う．	SiO <sub>2</sub> 膜エッチング BHF：3 min
<p>Thermal oxidation</p> 	シリコン基板を熱酸化することにより，両面に熱酸化膜（SiO <sub>2</sub> 膜）を成膜する．この SiO <sub>2</sub> 膜は Si 異方性エッチングの際の保護膜となる．	酸化炉：1100 °C，3 時間 NH <sub>3</sub> 流量：120 cc/min O <sub>2</sub> 流量：1 L/min 膜厚：約 300 nm
<p>Resist coating</p> 	ZPN-1150 90CP (ネガ型フォトレジスト) をスピナーでコーティングし，露光・現像することによりパターンニングする．	両面マスクアライナ ベイク：110 °C 2 min スピコート： 300 rpm 8 sec 4000 rpm 20 sec ベイク：90 °C 90 sec 露光：4 sec ベイク：110 °C 30 sec 現像：NMD-3 90 sec
<p>SiO<sub>2</sub> etching</p> 	フォトレジストをマスクにして BHF により SiO <sub>2</sub> 膜をエッチングする．	SiO <sub>2</sub> 膜エッチング BHF：8 min
<p>Resist removing</p> 	アセトン，エタノールによりフォトレジストを除去する．	レジストエッチング アセトン，エタノール 超音波洗浄器

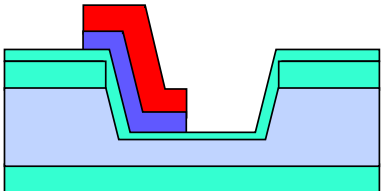
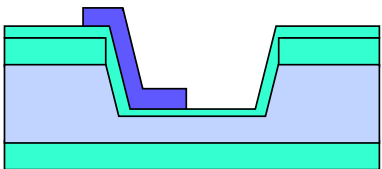


<p>Si anisotropic etching</p> 	<p>SiO<sub>2</sub> 膜をマスクにして、水酸化テトラメチルアンモニウム（TMAH）でシリコン基板の結晶異方性エッチングを行う。</p>	<p>チャンバ製作 Si 結晶異方性エッチング TMAH : 80 °C 7 h 程度</p>
<p>SiO<sub>2</sub> etching (Focused Ion Beam)</p> 	<p>集束イオンビーム装置（FIB）でガリウムイオンを集束させて SiO<sub>2</sub> 膜を部分的にエッチングし，ナノホールを構築する。</p>	<p>電流 : Lo, Cur 口径 (Aperture) : 2 視野 : 12 μm</p>

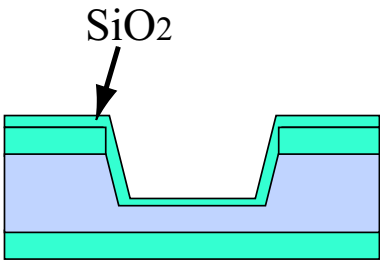
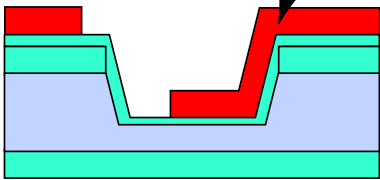
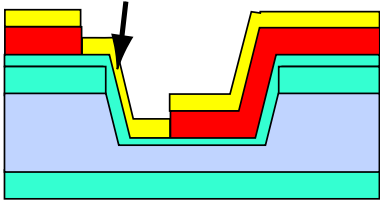
## B: Cytop 膜を使ったマイクロバルブの製作プロセス

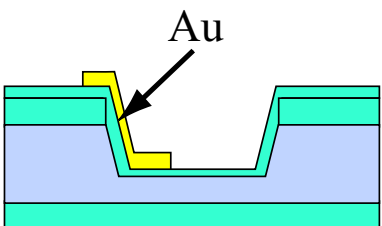
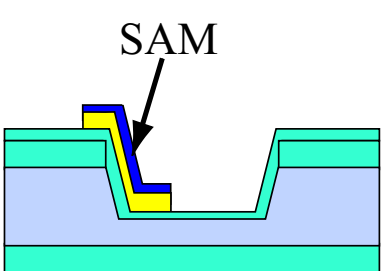
	プロセス	条件・備考
	単結晶 n 型シリコン基板を準備し，加工を始める前に BHF に浸し表面処理を行う．	SiO <sub>2</sub> 膜エッチング BHF : 3 min
<p>Thermal Oxidation</p> 	シリコン基板を熱酸化することにより，両面に熱酸化膜（SiO <sub>2</sub> 膜）を成膜する．この SiO <sub>2</sub> 膜は Si 異方性エッチングの際の保護膜となる．	酸化炉 : 1100 °C, 3 時間 NH <sub>3</sub> 流量 : 120 cc/min O <sub>2</sub> 流量 : 1 L/min 膜厚 : 約 300 nm
<p>Resist coating</p> 	ZPN-1150 90CP (ネガ型フォトレジスト) をスピncer コータでコーティングし，チャンネルをパターンニングする．	両面マスクアライナ ベイク : 110 °C 2 min スピncer コート : 300 rpm 8 sec 4000 rpm 20 sec ベイク : 90 °C 90 sec 露光 : 4 sec ベイク : 110 °C 30 sec 現像 : NMD-3 90 sec
<p>SiO<sub>2</sub> etching</p> 	フォトレジストをマスクにして BHF により SiO <sub>2</sub> 膜をエッチングする．	SiO <sub>2</sub> エッチング Buffered HF : 8 min
<p>Resist removing</p> 	アセトン，エタノールによりフォトレジストを除去する．	レジストエッチング アセトン，エタノール 超音波洗浄器

<p>Si anisotropic etching</p> <p>Microchannel</p> 	<p>SiO<sub>2</sub> 膜をマスクにして、水酸化テトラメチルアンモニウムでシリコン基板の結晶異方性エッチングを行う。</p>	<p>チャンネル製作</p> <p>Si 結晶異方性エッチング</p> <p>TMAH : 80 °C 15 min</p>
<p>SiO<sub>2</sub> sputtering (Hydrophilic material)</p> <p>SiO<sub>2</sub></p> 	<p>シリコン基板の表面に親水性材料である SiO<sub>2</sub> 膜をスパッタによって成膜する。</p>	<p>SiO<sub>2</sub> スパッタ</p> <p>静止 100 w 20 min</p> <p>膜厚 : 約 150 nm</p>
<p>Cytop coating (Hydrophobic material)</p> <p>Cytop</p> 	<p>SiO<sub>2</sub> 膜上に疎水性材料である Cytop をスピンのコータでコーティングする。</p>	<p>Cytop コーティング</p> <p>ベイク : 110 °C 2 min</p> <p>スピコート :</p> <p>500 rpm 10 sec</p> <p>3000rpm 20 sec</p> <p>ベイク : 85 °C 30 min</p> <p>180 °C 30 min</p>
<p>Resist coating</p> <p>AZP4620</p> 	<p>AZ P4620 (ポジ型フォトリソレジスト) をコーティングし、疎水部をパターンニングする。</p>	<p>AZP4620 コーティング</p> <p>ベイク : 110 °C 2 min</p> <p>スピコート :</p> <p>500 rpm 5 sec</p> <p>3000 rpm 30 sec</p> <p>ベイク : 110 °C 4 min</p> <p>露光 : 30 sec</p> <p>現像 : AZK400</p>

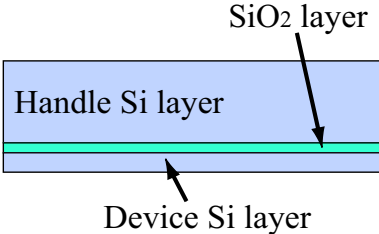
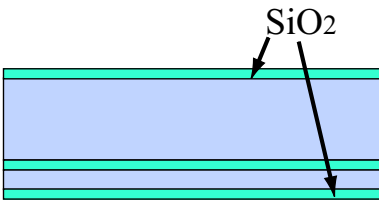
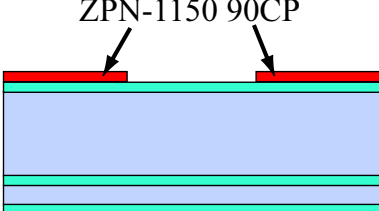
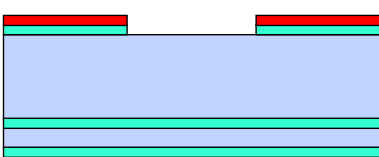
<p>Cytop etching</p> 	<p>フォトリジストをマスクにして、O<sub>2</sub>プラズマにより Cytop をエッチングする.</p>	<p>Cytop エッチング O<sub>2</sub> 流量 : 5 ml/min O<sub>2</sub> プラズマ : 50 W 2 min</p>
<p>Resist removing</p> 	<p>アセトン, エタノールによりフォトリジストを除去する.</p>	<p>レジストエッチング アセトン, エタノール</p>

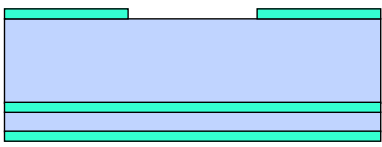
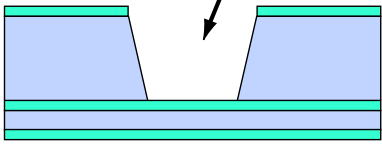
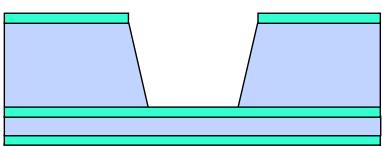
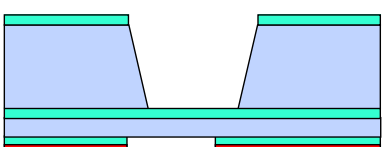
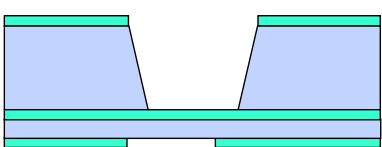
# C: SAM 膜を使ったマイクロバルブの製作プロセス

	プロセス	条件・備考
<p>流路の製作までは上記の Cytop 膜を使ったマイクロバルブの製作プロセスと同様である.</p>		
<p>SiO<sub>2</sub> sputtering (Hydrophilic material)</p> 	<p>シリコン基板の表面に親水性材料である SiO<sub>2</sub> 膜をスパッタによって成膜する.</p>	<p>SiO<sub>2</sub> スパッタ            静止 100 w 20 min            膜厚：約 150 nm</p>
<p>Resist coating (Hydrophobic material)</p> 	<p>AZ P4620 (ポジ型フォトリソレジスト) をコーティングし、疎水部をパターンニングする.</p>	<p>AZP4620 コーティング            ベイク：110 °C 2 min            スピンコート：                500 rpm 5 sec                3000 rpm 30 sec            ベイク：110 °C 4 min            露光：30 sec            現像：AZK400</p>
<p>Au layer create</p> 	<p>真空蒸着装置を使ってデバイス表面に Au を蒸着する.</p>	<p>Au 成膜</p>

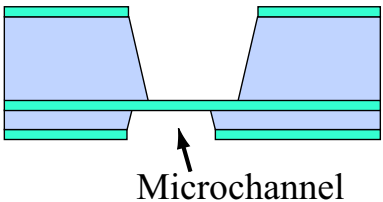
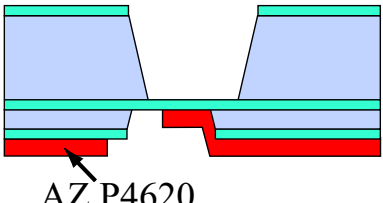
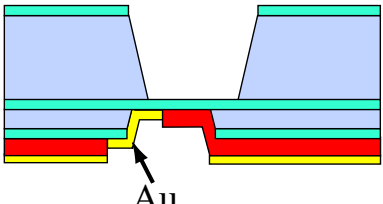
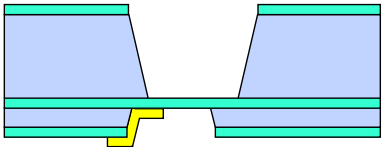
<p>Lift off</p> 	<p>フォトレジストをアセトン, エタノールで除去し, バルブ部のみの Au を残す.</p>	<p>リフトオフプロセス</p>
<p>SAM create</p> 	<p>1-octadecanethiol 溶液に浸すことによって Au 膜上に SAM 膜を成膜する.</p>	<p>SAM 膜成膜 1-octadecanethiol に 1 日程度浸す</p>

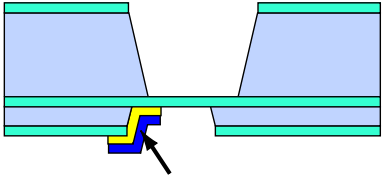
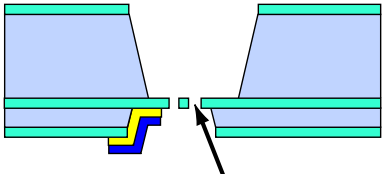
# D: 神経成長因子放出制御デバイスの製作プロセス

	プロセス	条件・備考
	SOI 基板を準備し，加工を始める前に BHF に浸し表面処理を行う．	SiO <sub>2</sub> 膜エッチング BHF : 3 min
<p>Thermal oxidation</p> 	SOI 基板を熱酸化することにより，基板の両面に熱酸化膜（SiO <sub>2</sub> 膜）を成膜する．この SiO <sub>2</sub> 膜は Si 異方性エッチングの際の保護膜となる．	酸化炉 : 1100 °C, 3 時間 NH <sub>3</sub> 流量 : 120 cc/min O <sub>2</sub> 流量 : 1 L/min 膜厚 : 約 300 nm
<p>Resist coating</p> 	ZPN-1150 90CP (ネガ型フォトレジスト) をスピンドーターでコーティングし，培養チャンバをパターンニングする．	両面マスクアライナ ベイク : 110 °C 2 min スピンドット : 300 rpm 8 sec 4000 rpm 20 sec ベイク : 90 °C 90 sec 露光 : 5 sec ベイク : 110 °C 30 sec 現像 : NMD-3 90 sec
<p>SiO<sub>2</sub> etching</p> 	フォトレジストをマスクにして BHF により SiO <sub>2</sub> 膜をエッチングする．	SiO <sub>2</sub> エッチング BHF : 20 min

<p>Resist removing</p> 	<p>アセトン，エタノールによりフォトリジストを除去する．</p>	<p>レジストエッチング アセトン，エタノール 超音波洗浄器</p>
<p>Si anisotropic etching</p> 	<p>SiO<sub>2</sub> 膜をマスクにして，水酸化テトラメチルアンモニウム（TMAH）でシリコン基板の結晶異方性エッチングを行う．</p>	<p>培養チャンバ製作 Si 結晶異方性エッチング TMAH：80 °C 7 h 程度</p>
<p>Resist coating</p> 	<p>ZPN-1150 90CP(ネガ型フォトリジスト) をスピナーでコーティングし，チャンネルをパターンニングする．</p>	<p>両面マスクアライナ ベイク：110 °C 2 min スピコート： 300 rpm 8 sec 4000 rpm 20 sec ベイク：90 °C 90 sec 露光：5 sec ベイク：110 °C 30 sec 現像：NMD-3 90 sec</p>
<p>SiO<sub>2</sub> etching</p> 	<p>フォトリジストをマスクにして BHF により SiO<sub>2</sub> 膜をエッチングする．</p>	<p>SiO<sub>2</sub> エッチング BHF：7 min</p>
<p>Resist removing</p> 	<p>アセトン，エタノールによりフォトリジストを除去する．</p>	<p>レジストエッチング アセトン，エタノール 超音波洗浄器は絶対に使用しないこと！</p>

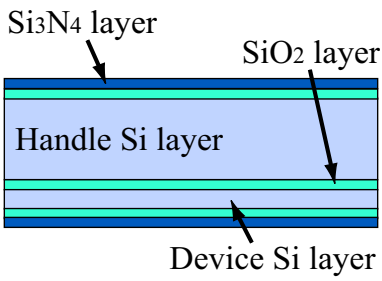
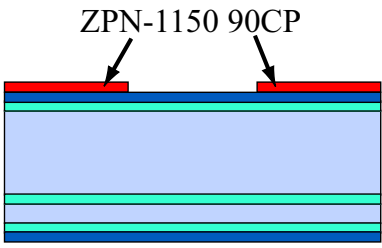
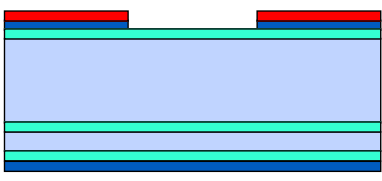
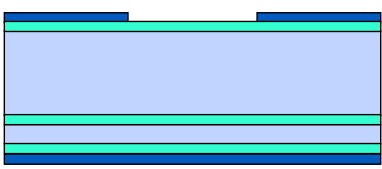


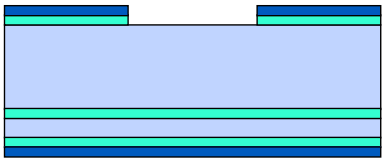
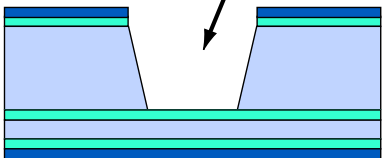
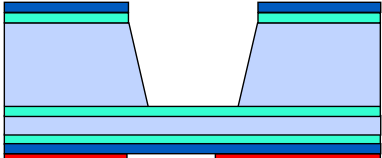
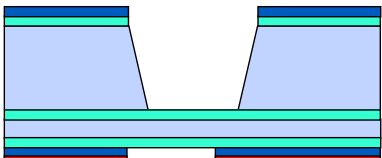
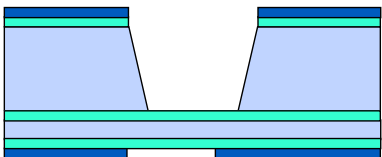
<p>Si anisotropic etching</p>  <p>Microchannel</p>	<p>SiO<sub>2</sub> 膜をマスクにして、TMAH 水でシリコン基板の結晶異方性エッチングを行う。</p>	<p>チャネル製作 Si 結晶異方性エッチング TMAH : 80 °C 15min 程度</p>
<p>Resist coating</p>  <p>AZ P4620</p>	<p>SiO<sub>2</sub> 膜上に（ポジ型フォトレジスト）をコーティングし，疎水部をパターニングする．</p>	<p>AZP4620 コーティング ベイク : 110 °C 2 min スピコート : 500 rpm 5 sec 3000 rpm 30 sec ベイク : 110 °C 4 min 露光 : 30 sec 現像 : AZK400</p>
<p>Au</p>  <p>Au</p>	<p>真空蒸着装置でチャネル側表面に Au を成膜する．</p>	<p>Au 成膜</p>
<p>Resist removing</p> 	<p>レジストをアセトン，エタノールで除去しリフトオフをする．</p>	<p>リフトオフ</p>

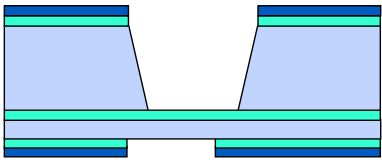
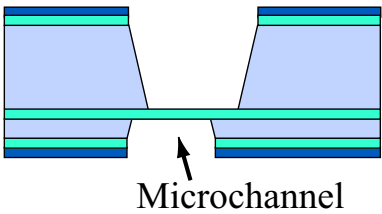
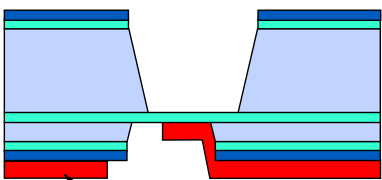
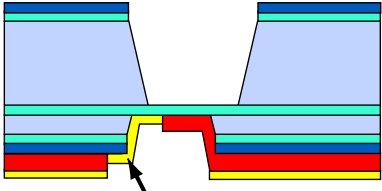
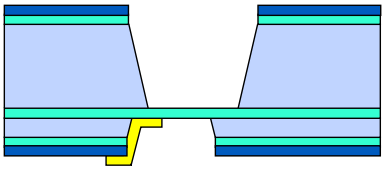
<p style="text-align: center;">SAM</p>  <p style="text-align: center;">Hydrophobic SAM</p>	<p>1-octadecanethiol 溶液に浸すことによって Au 膜上に SAM 膜を成膜する.</p>	<p>SAM 膜成膜 1-octadecanethiol に 1 日程度浸す</p>
<p style="text-align: center;">FIB etching</p>  <p style="text-align: center;">Nano-hole array</p>	<p>FIB 装置でガリウムイオンを集束させて SiO<sub>2</sub> 膜を部分的にエッチングする.</p>	<p>電流 : Lo, Cur 口径 (Aperture) : 2 視野 : 12 μm</p>

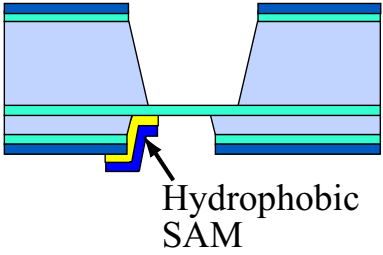
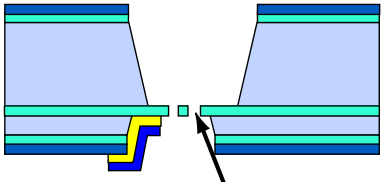
# E: 神経成長因子放出制御デバイスの製作プロセス (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 膜付 SOI 基板の場合)

Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 膜を両面に成膜した SOI 基板を使うことによって，長時間のウェットエッチング処理などへの耐性が強くなり，加工後のデバイスがきれいにできる．この SOI 基板を使った際の製作プロセスを以下に示す．

	プロセス	条件・備考
	SOI 基板を準備し，加工を始める前に BHF に浸し表面処理を行う．	SiO <sub>2</sub> 膜エッチング BHF : 3 min
<p>Resist coating</p> 	ZPN-1150 90CP (ネガ型フォトレジスト) をスピナーでコーティングし，培養チャンバをパターンニングする．	両面マスクアライナ ベイク : 110 °C 2 min スピコート : 300 rpm 8 sec 4000 rpm 20 sec ベイク : 90 °C 90 sec 露光 : 7 sec ベイク : 110 °C 30 sec 現像 : NMD-3 90 sec
<p>Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> etching</p> 	プラズマエッチング装置で Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub> 膜をエッチングする．	プラズマエッチング装置 CF <sub>4</sub> ガス : 50 ml/min 5 min
<p>Resist removing</p> 	アセトン，エタノールによりフォトレジストを除去する．	レジストエッチング アセトン，エタノール 超音波洗浄器

<p>SiO<sub>2</sub> etching</p> 	<p>フォトリジストをマスクにして BHF により SiO<sub>2</sub> 膜をエッチングする.</p>	<p>SiO<sub>2</sub> エッチング BHF : 10 min</p>
<p>Si anisotropic etching</p>  <p>Culture-chamber</p>	<p>SiO<sub>2</sub> 膜をマスクにして、水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH) でシリコン基板の結晶異方性エッチングを行う.</p>	<p>培養チャンバ製作 Si 結晶異方性エッチング TMAH : 80 °C 7 h 程度 エッチングレート : 50 μm/h</p>
<p>Resist coating</p> 	<p>ZPN-1150 90CP (ネガ型フォトリジスト) をスピンドーターでコーティングし、チャンネルをパターンニングする.</p>	<p>両面マスクアライナ ベイク : 110 °C 2 min スピンドット : 300 rpm 8 sec 4000 rpm 20 sec ベイク : 90 °C 90 sec 露光 : 7 sec ベイク : 110 °C 30 sec 現像 : NMD-3 90 sec</p>
<p>Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> etching</p> 	<p>プラズマエッチング装置で Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> 膜をエッチングする.</p>	<p>プラズマエッチング装置 CF<sub>4</sub> ガス : 50 ml/min 5 min</p>
<p>Resist removing</p> 	<p>アセトン, エタノールによりフォトリジストを除去する.</p>	<p>レジストエッチング アセトン, エタノール 超音波洗浄器は絶対に使用しないこと !</p>

<p>SiO<sub>2</sub> etching</p> 	<p>フォトレジストをマスクにして BHF により SiO<sub>2</sub> 膜をエッチングする.</p>	<p>SiO<sub>2</sub> エッチング BHF : 7 min</p>
<p>Si anisotropic etching</p>  <p>Microchannel</p>	<p>SiO<sub>2</sub> 膜をマスクにして, TMAH 水でシリコン基板の結晶異方性エッチングを行う.</p>	<p>チャネル製作 Si 結晶異方性エッチング TMAH : 80 °C 20 min 程度</p>
<p>Resist coating</p>  <p>AZ P4620</p>	<p>SiO<sub>2</sub> 膜上に (ポジ型フォトレジスト) をコーティングし, 疎水部をパターンニングする.</p>	<p>AZP4620 コーティング ベイク : 110 °C 2 min スピncコート : 500 rpm 5 sec 3000 rpm 30 sec ベイク : 110 °C 4 min 露光 : 30 sec 現像 : AZ K400</p>
<p>Au</p>  <p>Au</p>	<p>真空蒸着装置でチャネル側表面に Au を成膜する.</p>	<p>Au 成膜</p>
<p>Resist removing</p> 	<p>レジストをアセトン, エタノールで除去しリフトオフをする.</p>	<p>リフトオフ</p>

<p style="text-align: center;">SAM</p>  <p style="text-align: center;">Hydrophobic SAM</p>	<p>1-octadecanethiol 溶液に 浸すことによって Au 膜 上に SAM 膜を成膜する.</p>	<p>SAM 膜成膜 1-octadecanethiol に 1 日程 度浸す</p>
<p style="text-align: center;">FIB etching</p>  <p style="text-align: center;">Nano-hole array</p>	<p>FIB 装置でガリウムイオ ンを集束させて SiO<sub>2</sub>膜を 部分的にエッチングす る.</p>	<p>電流 : Lo, Cur 口径 (Aperture) : 2 視野 : 12 <math>\mu</math>m</p>

## F: アクアミカ（NP110 10 %, AZ corp.）の塗布条件

アクアミカとはPerhydropolysilazaneが大気中の水分と反応してシリカガラスに転化するすることを利用した材料であり，デバイス表面にコーティングするとスパッタやプラズマ CVD で成膜下 SiO<sub>2</sub> 膜よりも上質な膜を形成することができる．以下にアクアミカの成分表とコーティングの回転数と膜厚の関係を示す．

Table アクアミカの成分

成分	化学式	含有率 [%]
混合キシレン	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	90.0
ポリ（ペルヒドロシラザン）	-(SiH <sub>2</sub> -NH) <sub>n</sub> -	10.0

Table アクアミカの膜厚

回転数 [rpm]	焼結温度 [°C]	焼結時間 [h]	平均膜厚 [nm]
100	200	2	310
500	200	2	360
800	200	2	340
1000	200	2	260

## G: 神経成長因子（NGF）の物性と様々な成長・分化因子

Table 神経成長因子（Nerve Growth Factor, NGF）の物性値

項目	物性値
分子量	26518
拡散係数 [cm <sup>2</sup> /sec]	1.116 x 10 <sup>-6</sup>
分子径 [nm]	4.7

NGF 以外にも細胞の成長や分化を促す様々な物質が存在する．以下に成長因子・分化因子の一覧を示す．

Table 成長因子・分化因子の一覧

作用	因子	標的細胞
増殖・分化の促進	インスリン	血清培養では，主として B, T 細胞を含むリンパ球系の細胞で用いられる．
	デキサメタゾン	繊維芽細胞株由来細胞
	ハイドロコルチゾン	無血清培養では，がん細胞をはじめ，幅広く用いられる．
	アルドステロン	前立腺由来細胞など
	テストステロン	生殖器，脳下垂体由来細胞
	IL (インターロイキン) -1~8	個々の因子の作用は異なるが，広く免疫担当細胞の増殖，分化に寄与．リンパ球系細胞，造血系幹細胞などで利用される．
	SCF (幹細胞増殖因子)	血液幹細胞
	EPO (エリスロポイエチン)	赤血球幹細胞
	IFN (インターフェロン)- $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	リンパ球系の多くの細胞
	LIF (白血病阻害因子)	血球系がん細胞
	CSF (コロニー刺激因子)	リンパ球系の細胞
栄養成分の細胞への運搬	トランスフェリン	広範囲の細胞 (無血清培養など)
	ラクトフェリン	ハイブリドーマやリンパ球由来細胞株
	リポタンパク	角膜・血管内皮細胞など
	アルブミン	広範囲の細胞 (無血清培養など)
増殖促進	HGF (肝細胞増殖因子)	肝細胞
	PDGF (血小板由来増殖因子)	中胚葉由来の多くの細胞



増殖促進	TGF- $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (形質転換成長因子)	形質転換細胞など
	FGF (繊維芽細胞増殖因子)	繊維芽細胞一般
	NGF (神経細胞成長因子)	神経細胞
	IGF (インスリン様増殖因子)	リンパ球系の細胞
	KGF (ケラチノサイト増殖因子)	表皮角化細胞
接着および 進展促進	接着因子 ファイブロネクチン ラミニン ビトロネクチン	がん細胞や内皮細胞，繊維芽細胞，上皮細胞などの接着細胞 特に，ファイブロネクチンは接着だけでなく，進展も促進するため，細胞機能の解析に有用
培養環境の 安定化	ビタミン C, E 類 (酸化防止)	がん細胞 (肺, 乳)
	レシチン (細胞膜保護)	細胞種に依存せず幅広く作用
	エタノールアミン (細胞膜保護)	無血清培養時のリンパ球系のハイブリドーマの培養など
	ホスファジチルコリン プロスタグランジン	
	ピルビン酸 (細胞機能維持および発現)	がん細胞株関連
	亜セレン酸ナトリウム (細胞機能維持および発現)	無血清培養におけるハイブリドーマなど
	メルカプトエタノール (細胞機能維持および発現)	マスト細胞株など
	オレイン酸, 亜鉛, 鉄, マンガン (細胞機能維持および発現)	
	スーパーオキシドジスムターゼ (解毒作用)	角膜細胞など

標的細胞の項目で特に記述がなければほとんどの動物細胞培養で利用可能である

## H: 細胞周期制御プロトコール

第 4 章の最後に細胞周期について述べたが，細胞周期を制御するためのプロトコールを以下に示す．細胞周期を制御するためには細胞周期同調剤である Colcemid (Demecolcine) という薬品を使用する．Demecolcine は微小管を脱重合し，微小管形成を抑制する働きをもち，適切な希釈によって分裂中期の紡錘糸系を不活性化する作用を持つものである．この薬剤を 400 ng/ml の濃度で使用することによって細胞周期を M 期で停止させることができる．

1.  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  程度の細胞を 2 日間培養する (表面にはコラーゲンを塗布する)．
2. 培地を吸引し，弱った細胞や死んだ細胞を取り除く．
3. Colcemid (Demecolcine) が入った培地を入れ 2 時間培養する．
4. 軽く懸濁し，浮いた細胞と弱った細胞を取り除き，普通の培地を入れて 10 分間培養する．
5. Demecolcine 入りの培地と交換し 3 時間培養する．
6. 普通の培地と交換した後，軽く懸濁し M 期の細胞を収集する．  
(M 期の細胞は分裂する直前であり，細胞体が基板表面から浮いた状態になっている．このため，軽く懸濁することによってこの細胞を剥ぎ取ることができる．)
7. 遠心管に細胞を入れ遠心分離 (1500 rpm, 5 min) する．この際にウェル内にコラーゲンをコートしておく．
8. 上澄み液を取り除き，培地を入れて懸濁し再び同様の条件で遠心分離する．
9. 培地を交換し軽く懸濁し，ウェルに細胞を播種する．

ウェル内に播種された細胞のほとんど全ては M 期の細胞である．

# 研究業績

## A: 学術論文

1. “Fabrication of a Microfluidic Device for Axonal Guidance”  
Yuta Nakashima and Takashi Yasuda  
Journal of Robotics and Mechatronics, Vol. 17, No. 2, 2005.
2. “Cell Differentiation Guidance Using Chemical Stimulation Controlled by a Microfluidic Device”  
Yuta Nakashima and Takashi Yasuda  
Sensors and Actuators A (投稿中)

## B: 国際学会

1. “Microfluidic Device for Axonal Elongation Control”  
Yuta Nakashima and Takashi Yasuda  
Transducers’05 Digest of Technical Papers, pp. 1741-1744, Seoul, Korea, June 5, 2005.  
Accept: 49 %
2. “Controllable Chemical Stimulation for Cell Differentiation Guidance Using a Microfluidic Device”  
Yuta Nakashima and Takashi Yasuda  
Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology  
CD-ROM Program Number: 98-BMFS-A0504, pp 1-4, Singapor, June 28, 2006.  
Accept: 68 %
3. “Cell Growth Control Using Chemical Stimulation Regulated by Microvalve Switching”  
Yuta Nakashima and Takashi Yasuda  
Proceedings of  $\mu$ TAS 2006 Conference, pp. 440-442, Tokyo, Nov. 5, 2006.  
Accept: 61 %

## C: 国内学会

1. “神経軸索成長制御のためのマイクロ流体デバイス”  
中島雄太, 安田隆  
電気学会 医用・生体工学研究会資料, pp. 11-14, 2004.
2. “ナノホールとマイクロバルブを用いた神経軸索伸長制御用”  
マイクロ流体デバイス  
中島雄太, 安田隆  
第9回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 講演要旨集, pp. 62, 2004.
3. “神経細胞成長制御のためのマイクロ流体デバイスの構築”  
中島雄太, 安田隆  
ロボティクス・メカトロニクス講演会 '04 講演論文集, 2A1-H-29(1)-2A1-H-29(2),  
2004.
4. “ナノホールとマイクロバルブを用いた神経軸索誘導マイクロ流体デバイス”  
中島雄太, 安田隆  
日本機械学会 2004 年度年次大会講演論文集, Vol. 5, pp. 173-174, 2004.
5. “Fabrication of a Microfluidic Device for Axonal Guidance”  
Yuta Nakashima and Takashi Yasuda  
Proceedings of The 21<sup>st</sup> Sensor Symposium 2004, pp. 405-408, 2004.
6. “マイクロ流体デバイスによる神経軸索の伸長誘導”  
中島雄太, 安田隆  
第17回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp. 49-50, 2005.
7. “マイクロ流体デバイスによる細胞分化誘導のための化学刺激制御”  
中島雄太, 安田隆  
第18回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp. 31-32, 2006.

8. “ナノホールを通じた神経成長因子放出制御による細胞分化誘導”

中島雄太, 安田隆

第 45 回日本生体医工学会大会第 44 巻特別号, pp. 646, 2006.

#### D: 受賞歴

1. 日本機械学会フェロー賞 若手優秀講演 受賞, 2004 年 (0.2 %)
2. Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology (APCOT2006)  
Best Student Paper Award 受賞, 2006 年 (2 %)

# 謝辞

本研究を遂行するに当たり、多くの方々から助言や協力をいただいた。特に指導教官である安田隆助教授には研究の進め方やものの考え方など研究全般にわたって多くのご指導をいただいた。また、研究に必要な装置や道具をそろえていただき、不自由なく整った環境の中で研究を進めることができただけでなく、その成果を発表する場として多くの学会にも参加させていただいた。

九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻の金藤敬一教授，早瀬修二教授，北九州市立大学国際環境工学部の中澤浩二助教授には，論文をまとめるにあたり大変有益なご助言をいただいた。

九州工業大学大学院生命体工学研究科の宮崎康次助教授，博士後期課程2年の木原正裕氏には集束イオンビーム装置の使い方や調整法・管理法などを丁寧に教えていただいた。

東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターからは，本研究で欠かすことのできないPC12細胞を無償で提供していただいた。

財団法人ファジイシステム研究所の安藤秀幸氏には，マスクを製作するための電子描画装置や熱酸化炉などの装置の使い方を指導していただき，半導体加工に関する様々なアドバイスをいただいた。

研究室の同輩である河本祐樹氏には，マイクロアクチュエータについて教えていただき，ワードなどのソフトウェアの使い方なども教えていただいた。博士後期課程の石塚勝敏氏と博士前期課程の篠原和行氏には研究に対する様々な議論に付き合っていただき，研究室内のシステム管理などにも尽力していただいた。博士前期課程の大門克也氏と山見徹成氏には電子回路の設計・製作など電気・電子関連のことを教えていただいた。山中誠氏には細胞や化学に関する初歩から丁寧に教えていただき，実験に使用する細胞の管理をしていただいた。國本悠司氏，原田祥平氏，矢野英嗣氏には研究室の企画から雑用まで，研究室の環境をよくすることに尽力していただいた。

その他，本研究を遂行するにあたり多くの方々の励ましとご助言をいただいた。ここに深く感謝し，厚く御礼を申し上げる。