

※課題番号 : F-12-NM-0051  
※支援課題名 (日本語) : 細胞機能を制御する三次元培養基材の作製  
※Program Title (in English) : Fabrication of three-dimensional scaffold for controlling of cell functions  
※利用者名 (日本語) : 角南 寛  
※Username (in English) : Hiroshi Sunami  
※所属名 (日本語) : 北海道大学・科学技術振興機構さきがけ  
※Affiliation (in English) : Hokkaido University・JST PRESTO

※概要 (Summary) :

生体内で細胞は三次元的に接着している。この三次元的な細胞接着を生体外に再現すべく、さまざまな三次元パターン基材が研究された。これまでに細胞がパターン基材の形状に沿って接着伸展することおよび、細胞の形態や代謝機能、増殖能などがパターン基材の形状に左右されることが報告されている。我々はパターン基材の三次元的な形が細胞接着点および細胞骨格の発現に多大な影響を及ぼし、それによって細胞機能 (分化、増殖、運動、代謝) が調節される過程を新たに明らかにした。今回はその研究に用いた各種パターン基材の作製について報告する。

※実験 (Experimental) :

900 nm の熱酸化皮膜付きのシリコン基板 (10 mm x 10 mm) 上に HMDS (東京応化工業(株))および G 線レジスト OFPR-5000LB (東京応化工業(株))をスピコートした (1000 rpm, 5 sec→4000 rpm, 45 sec)。スピコート後の HMDS と OFPR-5000LB を併せた膜厚は 2  $\mu\text{m}$  であった。プリベーク (110  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min) 後、露光装置 MA-20(ミカサ(株))にクオーツフォトマスク(日本フィルルコン (株)、東洋精密工業(株))とレジスト膜がコートされたシリコン基板をセットし、露光した (1.5 sec)。クオーツフォトマスクには鱗、市松、網目、角通し、格子、放射、縞、 $\bigcirc\triangle\square$ 、波、扇、連鱗といった模様がクロムによって描かれている。露光後のシリコン基板を現像液 NMD-3(東京応化工業(株))に浸漬し現像した。光学顕微鏡により、レジスト膜パターンのチェックを行った。シリコン基板上にレジスト膜パターンが作製されていることが確認された。ポストベーク (130  $^{\circ}\text{C}$ , 20 min) を行った後、シリコン基板のレジスト膜で覆われていない部分の  $\text{SiO}_2$  を反応性イオンエッチング装置 RIE-10NRV (サムコ(株))を用いて除去した。FE-SEM JSM-6700FT (日本電子(株))によって  $\text{SiO}_2$  が除去できていることを確認後、RIE-10NRV (サムコ(株))を用いて  $\text{O}_2$  クリーニング(50 sccm, 3 Pa, 3 min)、アセトン中で 30 sec 超音波洗浄してレ

ジスト膜を完全に除去した。

ICP ドライエッチング装置 (MUC-21(住友精密工業(株)、SPM-200(住友精密工業(株))により Si をエッチングした ( $\text{SF}_6$ , 50 sccm,  $\text{C}_4\text{H}_8$ , 50 sccm, 500 W, 22 min, 4.7 Pa)。マスクとして用いた  $\text{SiO}_2$  を HF で除去した。FE-SEM JSM-6700FT (日本電子(株)) によってシリコン基板の断面を観察したところ、深さ 23  $\mu\text{m}$  の深さであることが分かった。

カラーレーザー3D 顕微鏡 VK-9700(KEYENCE CO., Japan)を用いて、得られた三次元パターンの形状の観察を行った。この時、150 倍の対物レンズを用いて Real Peak Detection (RPD) を行いながら高精度モードで観察した。

【利用した主な装置】

- ・シリコン深掘りエッチング装置
- ・走査電子顕微鏡
- ・多目的ドライエッチング装置

※結果と考察 (Results and Discussion) :

カラーレーザー3D 顕微鏡観察により、鱗、市松、網目、角通し、格子、放射、縞、 $\bigcirc\triangle\square$ 、波、扇、連鱗といった三次元パターンが作製されたことが確認された。これらの三次元パターンの形状像を形態分析し、空孔率と単位面積当たりの総エッジ長 (エッジ密度) を求めた。パターンの形態分析は、各パターンとも 71.0  $\mu\text{m}$  x 94.6  $\mu\text{m}$  ( $6.72 \times 10^{-9} \text{ m}^2$ ) の範囲で行われた。一種類の三次元パターンについて、5 枚の異なる基板上のものを同様に形態分析し、パターン毎の平均値、標準偏差を求めた。求められた、空孔率とエッジ密度の実測値を設計図通りの理論値と比較した。これを見ると、空孔率およびエッジ密度は設計段階の理論値に近い値となっていることが分かった。よって、ほぼ設計図通りの、鱗、市松、網目、角通し、格子、放射、縞、 $\bigcirc\triangle\square$ 、波、扇、連鱗といった三次元パターンが作製されたことが分かった。ただし、設計図では空孔率 50.0 %であるが、実測値では若干孔が小さくなり、約 49 %の空孔率になっている。この傾向はパターンサイズの小さなものほど顕著であった。空孔率が低下した原因としては、フォトマスクを利用した露光方法や、レジスト膜の厚み、露光機の特性などにより、若干孔が小さくなったためと考えられる。エッジ密度に関しても、パターンサイズの小さいモノほど理

論値より小さくなる傾向が見られたが、同様の原因  
であると考えられる。

この表面を細胞が接着しやすいように  
RIE-10NRV (サムコ株) を用いて O<sub>2</sub> クリーニング  
(50 sccm, 3 Pa, 8 min) した。その結果、水に対する  
濡れ性が大きく向上し、細胞の増殖も速くなること  
が分かった。

共同研究者等 (Coauthor) :

光武 進(北海道大学)、五十嵐 靖之 (北海道大学)