

課題番号 : F-16-WS-0017
利用形態 : 技術代行
利用課題名(日本語) : 微小流路を活用したバクテリアの培養システムの構築
Program Title (English) : Establishment of microfluidics system for culturing bacteria.
利用者名(日本語) : 石原潤一
Username (English) : J. Ishihara
所属名(日本語) : 早稲田大学大学院先進理工学研究科
Affiliation (English) : Faculty of Science and Engineering, Waseda University.

1. 概要(Summary)

バクテリア(大腸菌)の分裂や遺伝子発現を、顕微鏡下で長期にわたって観察するため、幅 $1\text{-}2\ \mu\text{m}$ ×高さ $1\text{-}2\ \mu\text{m}$ 程度の微小流路(growth channel)を作製し、そこに大腸菌を閉じ込めて培養液を流し続ける培養システムを構築したいと考えている(Fig.1)。このようなシステムは、以下の2工程によって実現される:①自身がデザインした流路を凸構造として基板に実装する「鋳型作製」、②流路構造をPDMS樹脂にモールドイングし、プラズマ照射によってガラス基板に接合する「デバイス作製」。利用者は、①の工程でgrowth channelを実装するため、フォトレジストを使用したフォトリソグラフィ技術を援用しようと考えている。しかし、SU-8系のフォトレジストを利用したプロトコルでは、大腸菌を一細胞だけ閉じ込められるほどの流路幅と高さを安定的に実装できなかった。

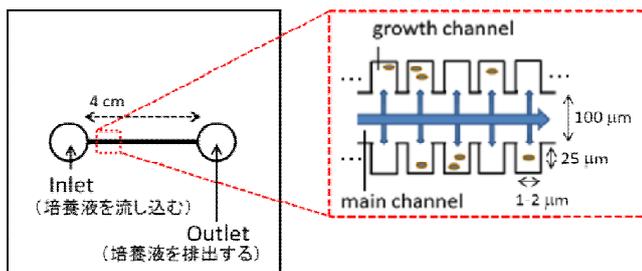


Fig.1 Device for long term observation of bacterial growth

そこで、利用者は、前回の技術相談(2016年4月19日)を踏まえ、フォトレジストの種類をAZP5214-Eに変更し、さらに実際にデバイスを作製することで、作製プロセスの検討を行った。なお、今回は、growth channelの幅 $1\text{-}2\ \mu\text{m}$ ×高さ $1\text{-}2\ \mu\text{m}$ を実現できるかに重点を置いたため、main channelの高さを変更しなかった。

2. 実験(Experimental)

【利用した主な装置】

両面マスクアライナー、
表面極微細構造測定装置

【実験方法】

まず、スピンドーターに設置したシリコン基板にOAPを塗布し、スピンドーターを $3000\ \text{rpm}/\text{min} \times 30\ \text{sec}$ 回転させることで、OAPをシリコン基板の上に塗り広げた。そのままAZP5214-Eを塗布し、スピンドーターを $3000\ \text{rpm}/\text{min} \times 30\ \text{sec}$ 回転させることで、AZP5214-Eを塗り広げた。その後、このレジスト付き基板を 100°C で3分間温め、引き続き室温内で20分間静置した。

基板上的フォトレジストに流路デザインを転写するため、(デザインが描かれた)フォトマスクをUV露光装置にセットし、レジスト面に紫外線を0.4秒間照射した(「露光」)。その後、 120°C で3分間温め(「反転bake」)、引き続き室温内で20分間静置した。

さらに、UV露光装置を使用し、基板のレジスト面全体に紫外線を100秒間照射した(「全面露光」)。最後に、流路部分以外のレジストを落とすため(「現像」)、AZ400Kを純水で5倍希釈した現像液を用意し、目視しながら余分なレジストを洗い流した。

以上の作製プロセスにより、鋳型を4枚作製した。

3. 結果と考察(Results and Discussion)

この流路のデザインには、目標とする幅 $1\ \mu\text{m}$ のgrowth channel以外にも、(この幅を実現できなかったと考える)幅2、3、4 mmのgrowth channelがそれぞれ50本ずつ描かれている。作製された鋳型でのgrowth channel幅を計測すると、狙ったサイズ幅がそれぞれ実装されていることを確認した。さらに、触針式膜厚計tencorを使用してgrowth channel(とmain channel)

の高さを計測すると、平面的に $1.55\ \mu\text{m}$ となっていることを確認した。以上のことから、今回の最も重要なポイントであった **growth channel** の幅 ($1\text{--}2\ \mu\text{m}$) と高さ ($1\ \mu\text{m}$) を実装できたと評価できる。また、それを安定的に作製するプロセスも検討できたと評価できる。

次に、この鋳型に PDMS 樹脂を流し込み、それを硬化させてガラス基板に接合させたとき、**growth channel** の流路幅が精確に実装されるか確かめた (PDMS を硬化させることで、流路の幅が変化する(太くなる)ことを懸念したため)。その結果、すべての **growth channel** の幅がほぼ予定通りのサイズ (誤差は $\pm 0.05\%$) で実装されていることがわかった (Fig.2に、幅 $4\ \mu\text{m}$ および $1\ \mu\text{m}$ の **growth channel** と、それに交差する **main channel** を示す)。このことから、前述の①と②の工程を組み合わせることで、幅 $1\text{--}2\ \mu\text{m}$ × 高さ $1\text{--}2\ \mu\text{m}$ の **growth channel** をもつデバイスを作製できることを示した。

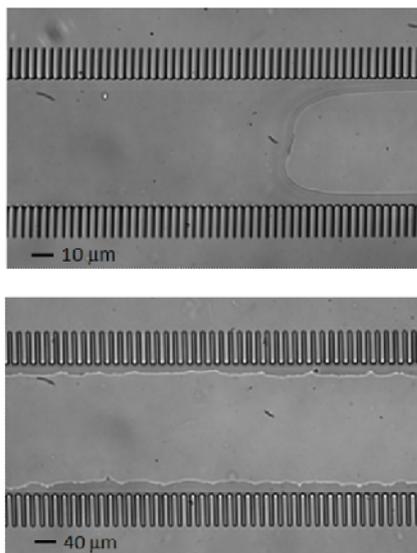


Fig.2 Micrographs of channels of $1\ \mu\text{m}$ (up) and $4\ \mu\text{m}$ (down).

しかし、デバイスの Inlet (Fig.1) から大腸菌培養液を導入しようとしても、Outlet から培養液が排出されなかった。このことから、**growth channel** のみならず、**main channel** にも培養液が流れなかったと判断される。その原因として、PDMS をガラス基板に接合するとき、Inlet と Outlet を指で軽く押しつけるため、**main channel** の高さが低くて潰れてしまう可能性が考えられる。今後、**main channel** の高さを $10\text{--}30\ \mu\text{m}$ 程度に設定し、流路の高さを 2 段階にしたデバイスを作製する必要がある。

4. その他・特記事項 (Others)

なし。

5. 論文・学会発表 (Publication/Presentation)

なし。

6. 関連特許 (Patent)

なし。