

課題番号 : F-17-FA-0012  
利用形態 : 機器利用  
利用課題名(日本語) : 細胞解析用微小孔アレイデバイスの開発  
Program Title(English) : Development of microhole array devices for cell analysis  
利用者名(日本語) : 善明祐介, 櫻田一步, 森迫勇, 安田隆  
Username(English) : Y. Zenmyo, K. Sakurada, I. Morisako, T. Yasuda  
所属名(日本語) : 九州工業大学大学院生命体工学研究科  
Affiliation(English) : Kyushu Institute of Technology  
キーワード/Keyword : 窒化シリコン、プラズマ CVD、微小孔、細胞解析、成膜・膜堆積、膜加工・エッチング

## 1. 概要(Summary)

半導体加工技術を利用して多数の微小孔を有する窒化シリコン(SiN)製の自立膜を形成し、このSiN膜を細胞培養面とする細胞解析用デバイスを製作した。このデバイスを利用して、単一ニューロンの長期培養技術及び細胞外ベシクル(小胞)の生成分離技術を構築した。

## 2. 実験(Experimental)

### 【利用した主な装置】

プラズマ CVD 装置、リアクティブ・イオン・エッチャー、電子線描画装置、膜厚測定器、超純水製造装置、ドラフトチャンバー(塩ビ)、ドラフトチャンバー(SUS)

### 【実験方法】

以下の手順でデバイスを製作した。まず、シリコン基板の両面にプラズマ CVD により SiN 膜を成膜した。その際に、SiN 膜の内部応力及び屈折率が所望の値になるように、各種反応ガスの流量、チャンバ圧力、ステージ温度等の成膜条件を設定した。次に、両面マスクアライナまたはマスクレス露光装置を用いたパターンニング、及びプラズマエッチング装置またはリアクティブ・イオン・エッチャーを用いた SiN エッチングにより、基板表面の SiN 膜に孔径 0.5~7.5  $\mu\text{m}$  の多数の微小孔をアレイ状に形成した。そして、同様のパターンニング及び SiN エッチングにより、基板の裏面にウェットエッチング用の窓を形成し、TMAH 溶液を用いたシリコンの結晶異方性エッチングにより SiN 製の自立膜構造を形成した。

## 3. 結果と考察(Results and Discussion)

SEM 観察により微小孔の寸法及び形状の評価、及び微小孔アレイと SiN 自立膜の配置のずれの評価などを行い、所望の精度で構造形成がなされていることを確認した。次に、SiN 自立膜の裏面にコラーゲンを、表面にラミニンをコートした後に、コラーゲン・コート面に多数のアストロサイトを、ラミニン・コート面に単一のニューロンを培

養し、微小孔アレイを通じた細胞間コミュニケーションによりニューロンが 1 か月以上の長期に渡って高い活性を維持することができることを実証した。さらに、SiN 自立膜上にヒトリンパ球細胞を播種し、酪酸ナトリウムによる薬剤刺激を用いて細胞からベシクルを生成し、微小孔を通じてベシクルを SiN 自立膜裏面に取り出すことに成功した。微小孔径の違いがベシクルの数量や直径に与える影響を評価し、ベシクルの生成と分離を可能とするデバイス技術を構築した。

## 4. その他・特記事項(Others)

本研究の一部は、日本学術振興会 科学研究費補助金 JP16H03171 及び経済産業省 戦略的基盤技術高度化支援事業の支援により実施された。

## 5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

- (1) 善明祐介, 森迫勇, 安田隆, SiN 多孔膜を有するマイクロウェルを用いたオータプスニューロンの長期培養, 第 34 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム論文集, 31pm3-PS-96, 2017.
- (2) 櫻田一步, 安田隆, 微小孔アレイデバイスを用いたヒトリンパ球細胞からの細胞外ベシクル生成分離, 日本機械学会 第 8 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム講演論文集, 31am3-PN-21, 2017.
- (3) 善明祐介, 森迫勇, 安田隆, SiN 多孔膜を用いたオータプスニューロンとアストロサイト群の長期共培養, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 36 回研究会(36th CHEMINAS)講演要旨集, p. 7, 2017.

## 6. 関連特許(Patent)

- (1) 安田隆, 山中誠, 森迫勇, 細胞培養シート、およびその製造方法、並びにこれを用いた細胞培養容器, 特許第 6124051 号, 平成 29 年 4 月 14 日.