

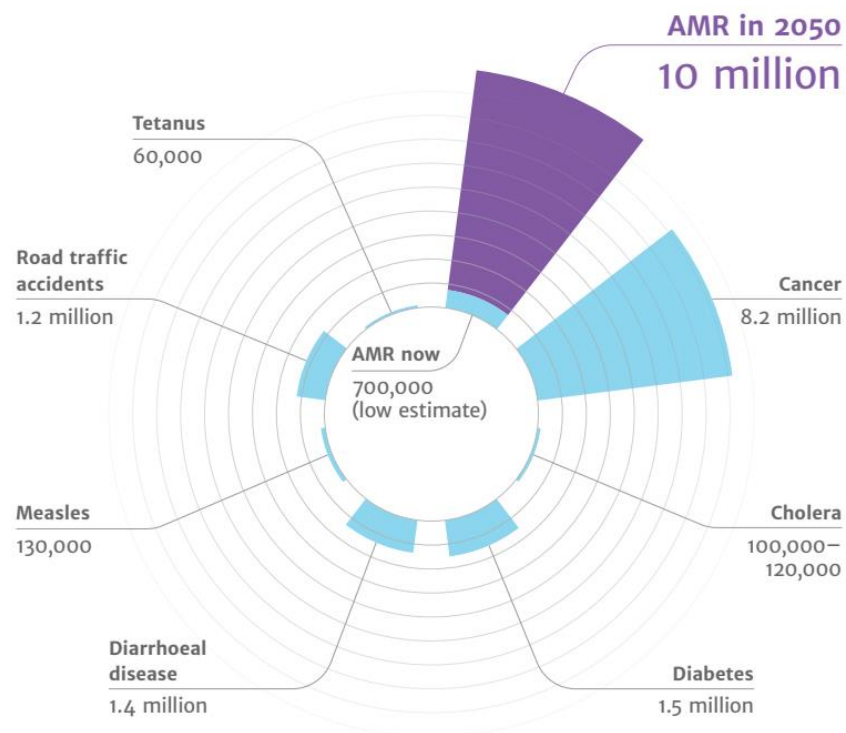
- ① 高感度バイオセンシングデバイス用の自立超薄膜の製造法
- ② マイクロ流路内の生体組織のまるごと切断方法

東京工業大学 工学院 機械系
准教授 石田忠

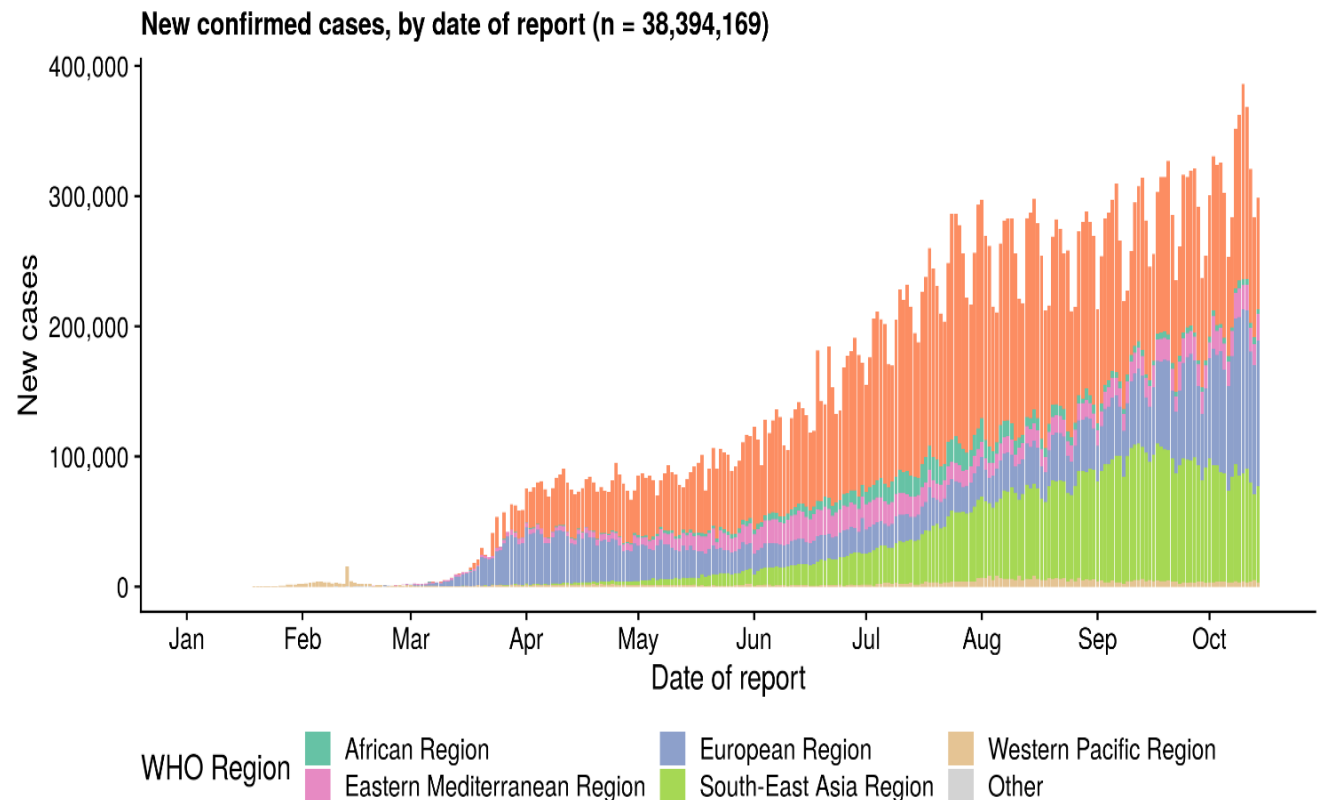
2021年11月2日

細菌やウイルス(ナノバイオ試料)による感染症

耐性菌(AMR)による死亡者数予想



新型コロナウイルスの感染者数



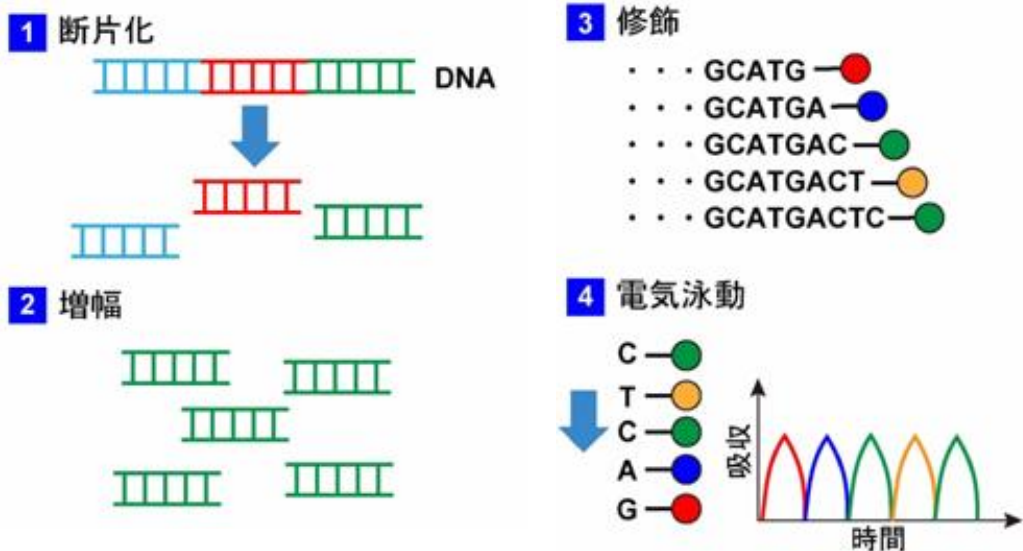
抗生物質や抗ウイルス薬のない感染症は急激なパンデミック

⇒ 殺菌方法や薬剤の開発には、ナノバイオ試料の解析や観察が必須

DNAやRNAを解析する方法

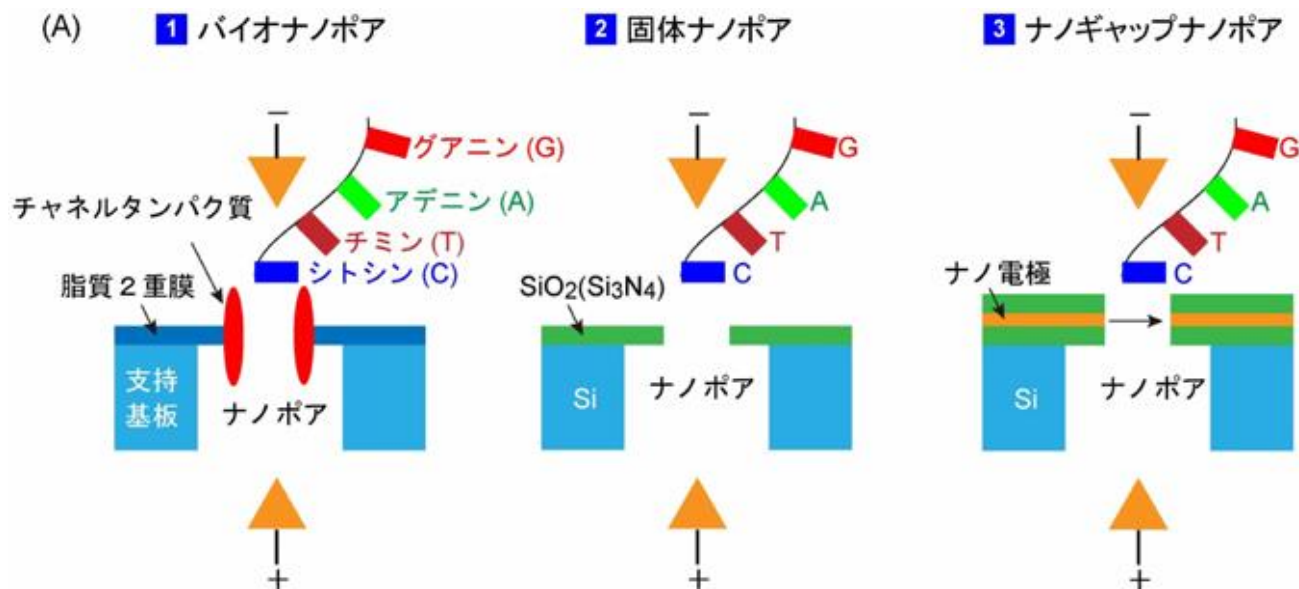
DNAシーケンサー

原理: 断片化したDNAを元に再合成されるDNAを蛍光で検出(ACGTを事前に蛍光染色)



次世代ナノポアシーケンサー

原理: ナノポアをDNAやRNAが通過する際の電流変化を計測

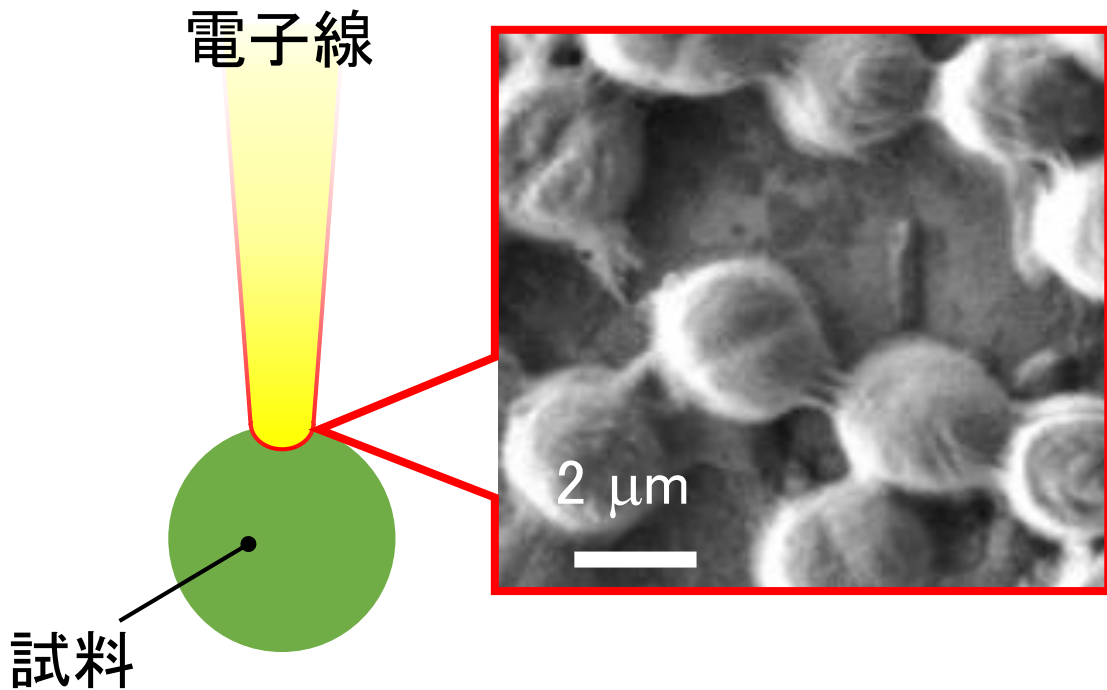


精度が課題だが、膜厚やポア径を小さくすることが求められる。

→ 自立した薄膜の作製技術が重要。

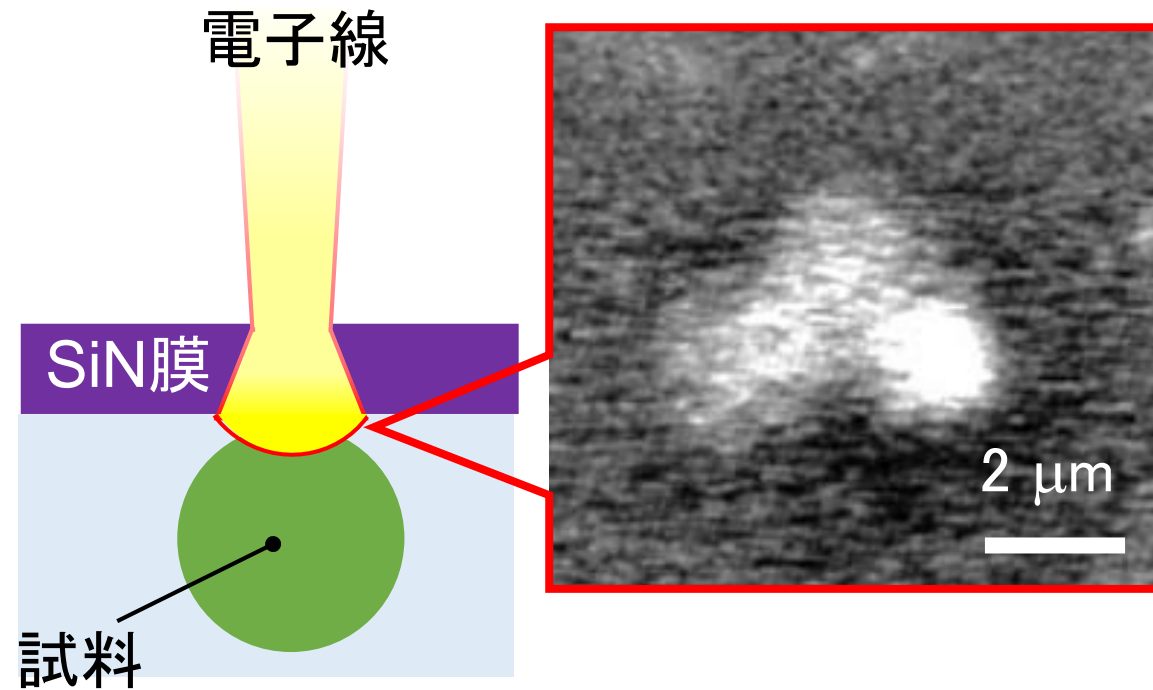
液中ナノバイオ試料の電子顕微鏡観察

真空下でのSEM観察



高分解能だが、干からびている

SiN膜越しのSEM観察

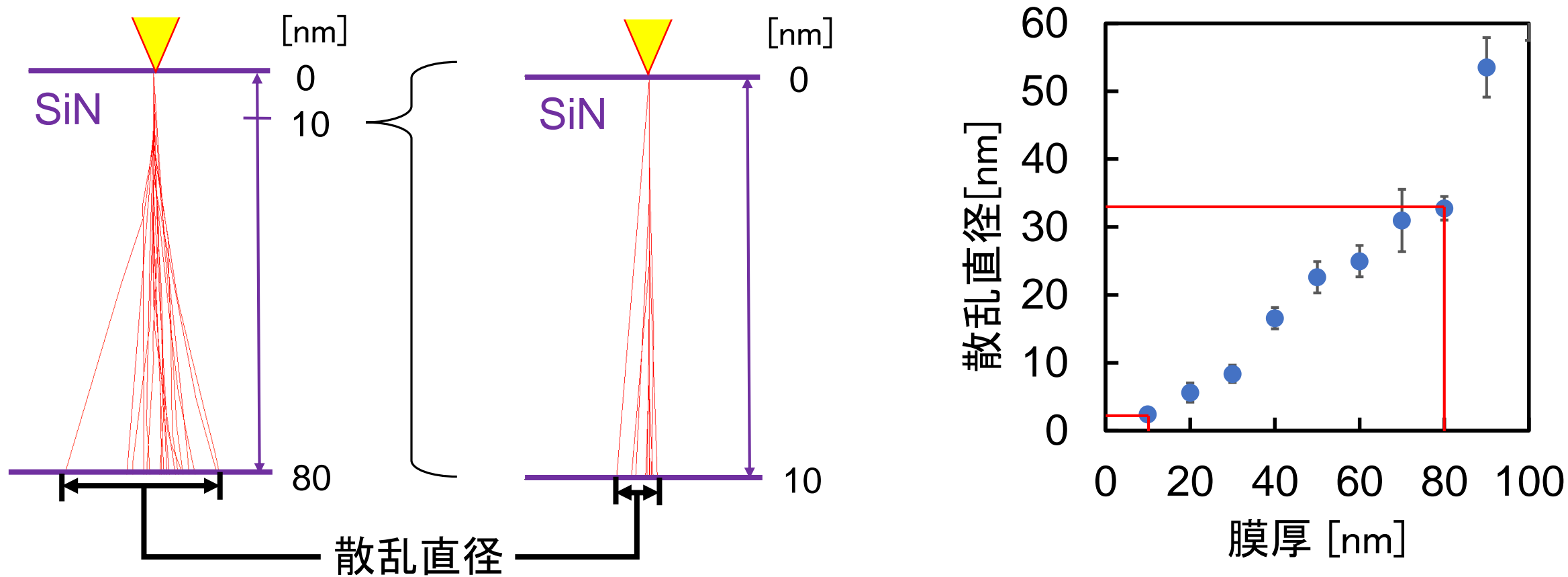


水中だが、分解能が低下

SiN膜を通る際に電子線散乱により、電子線が広がり分解能が低下

SiN膜の薄化による高分解能化

＜モンテカルロ法によるシミュレーション＞



膜厚10 nmにすれば電子線の散乱直径が2.4 nmに低減
→ 自立した薄膜の作製技術が重要

薄化によるSiN膜内の発生応力上昇

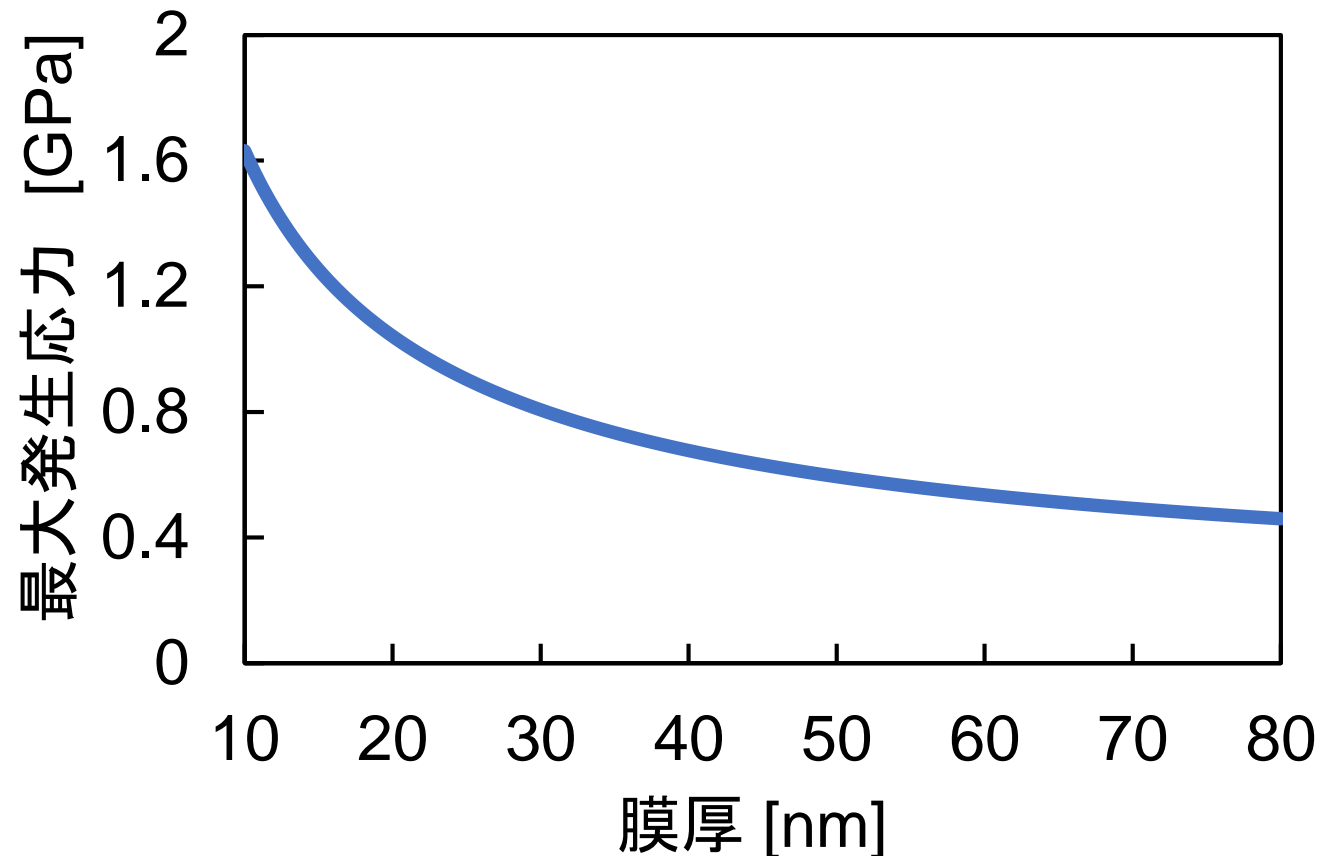
薄膜が壊れるのは
機械強度 < 最大発生応力

最大発生応力 σ (円形膜時)

$$\sigma = 0.476E \left(\frac{\delta}{r}\right)^2 + 4.40E \frac{t\delta}{r^2}$$

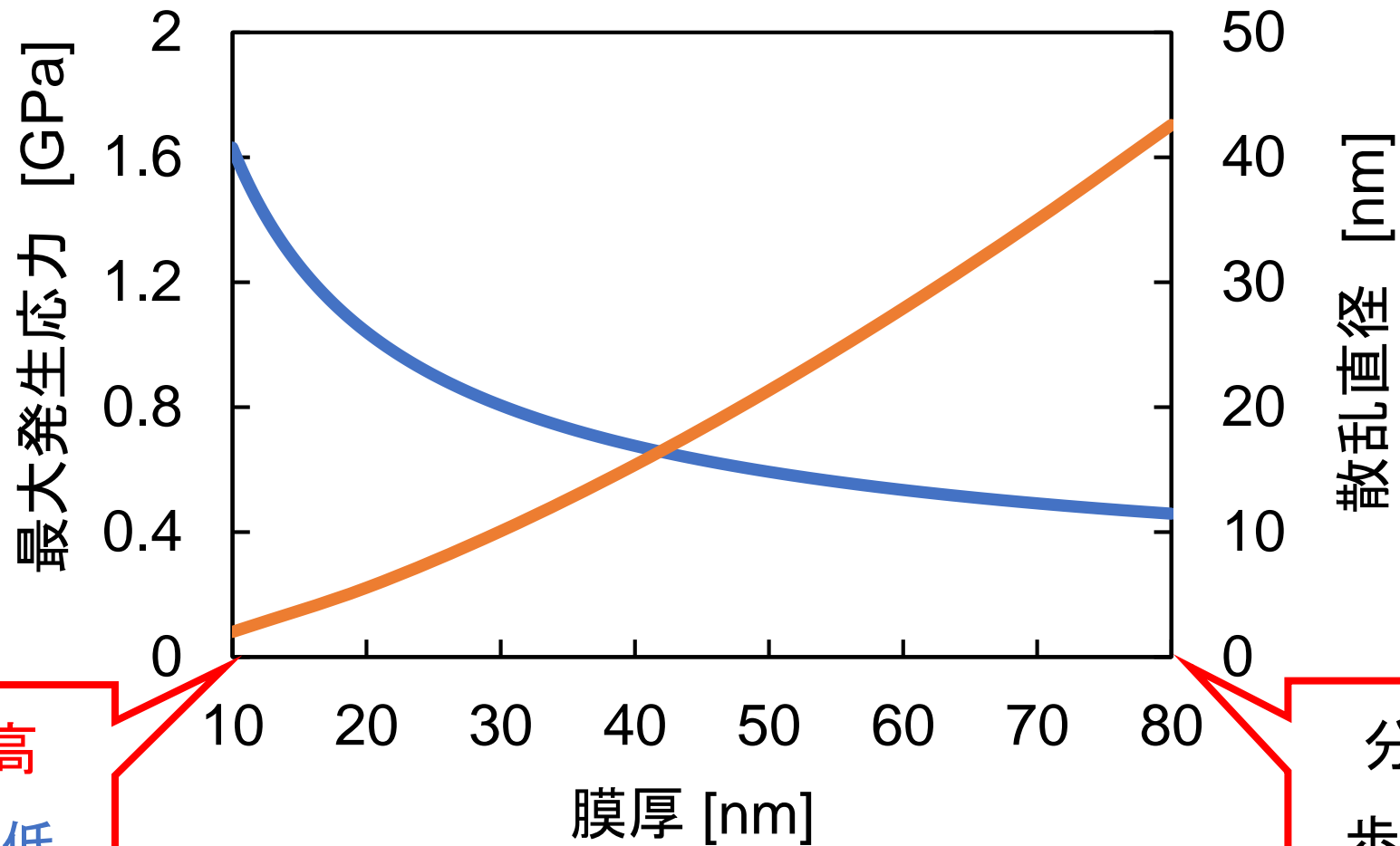
(膜厚: t , 圧力: p , ヤング率: E ,
開口径: r , たわみ: δ)

膜厚と最大発生応力の関係($r=100 \mu\text{m}$)



膜厚が薄いほど、SiN膜が破損しやすくなる。

分解能と歩留まりのトレードオフ

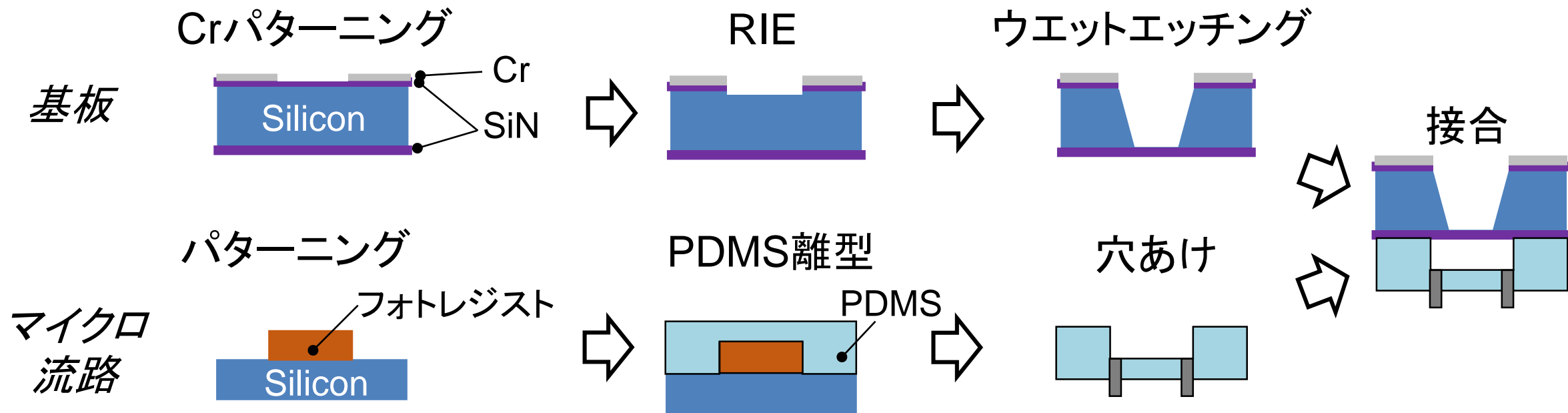


分解能: **高**
歩留まり: **低**

分解能: **低**
歩留まり: **高**

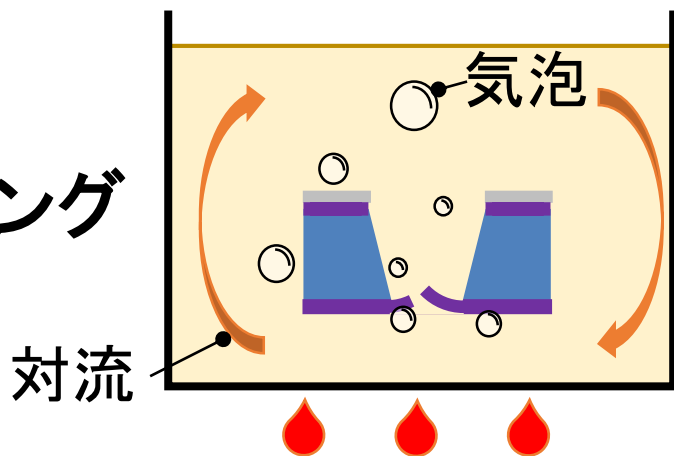
従来SiN膜の作製法では両立が困難

MEMS液体セルの従来の作製法

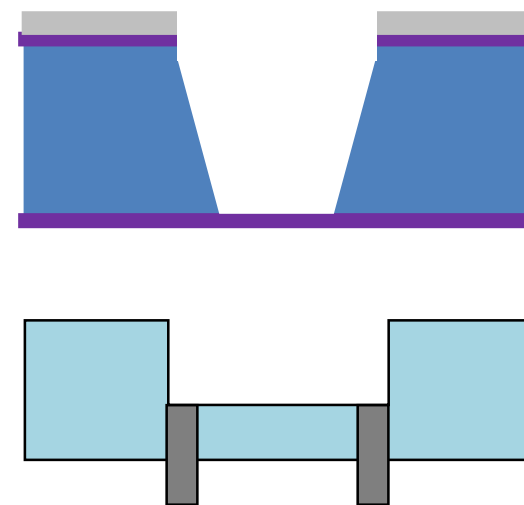


歩留まり低下の原因

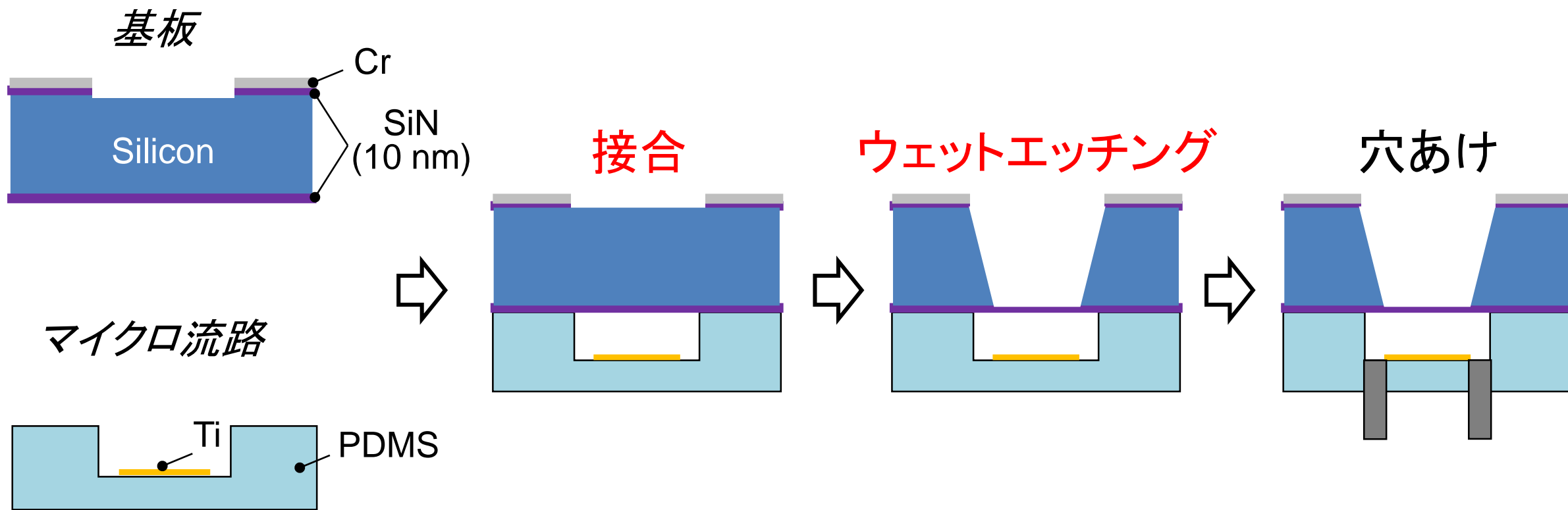
ウェットエッチング



接合



マイクロ流路をマスクとして用いた提案プロセス 9

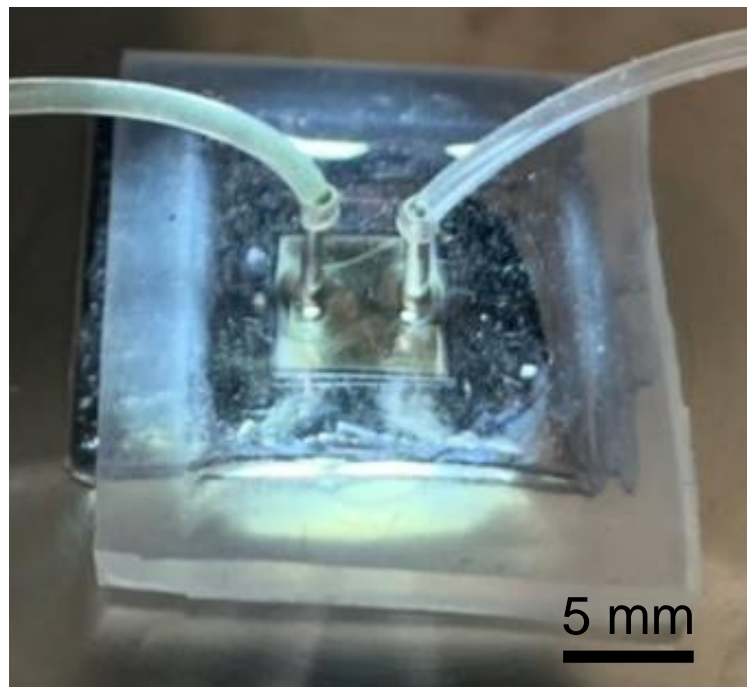


歩留まり低下を最大限回避

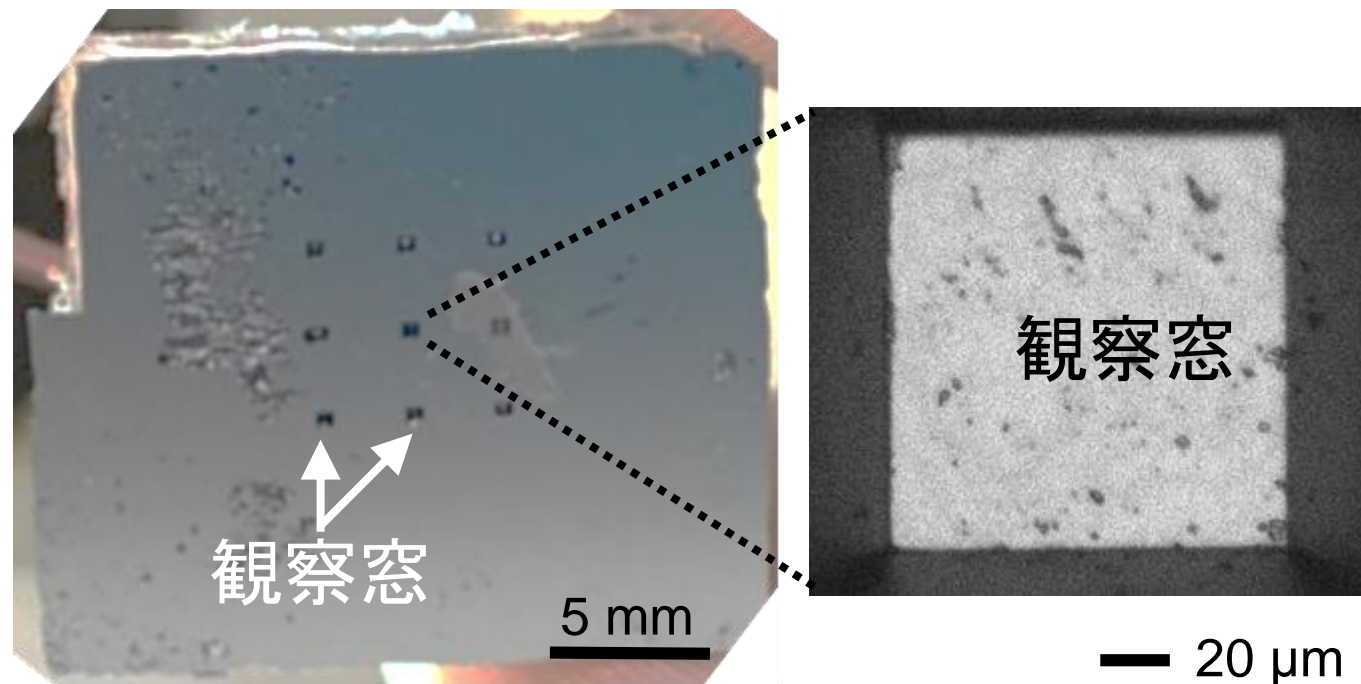
→ 膜厚10 nm以下の超薄SiN膜の作製に成功

作製した超薄SiN付MEMS液体セル

マイクロ流路面



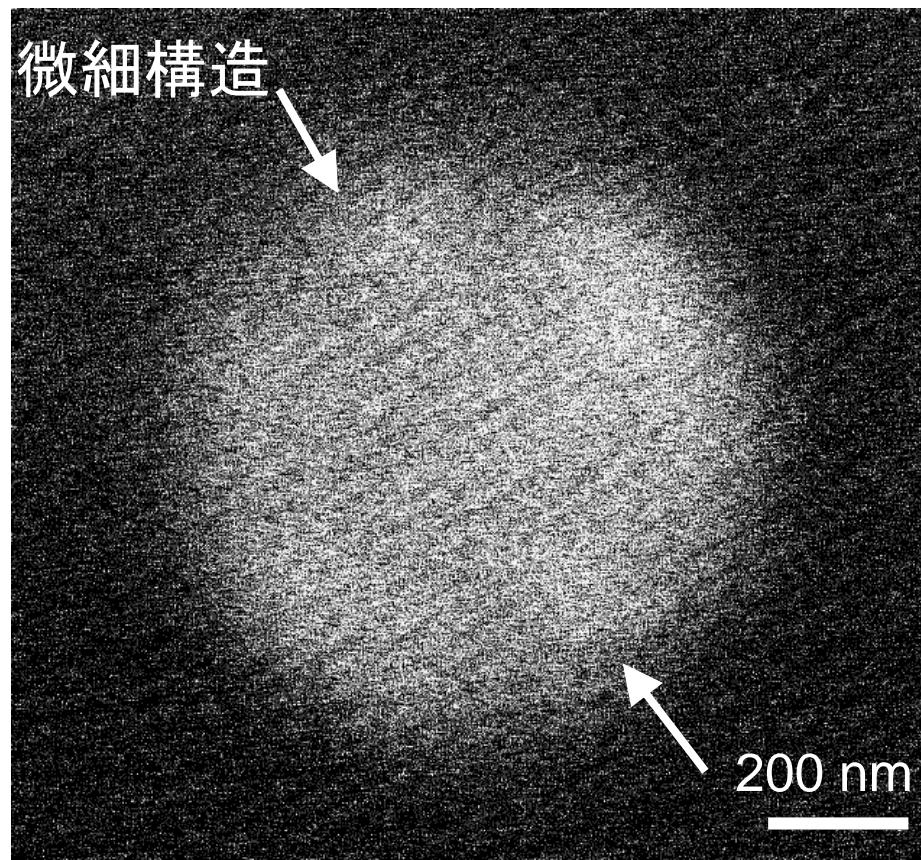
基板面



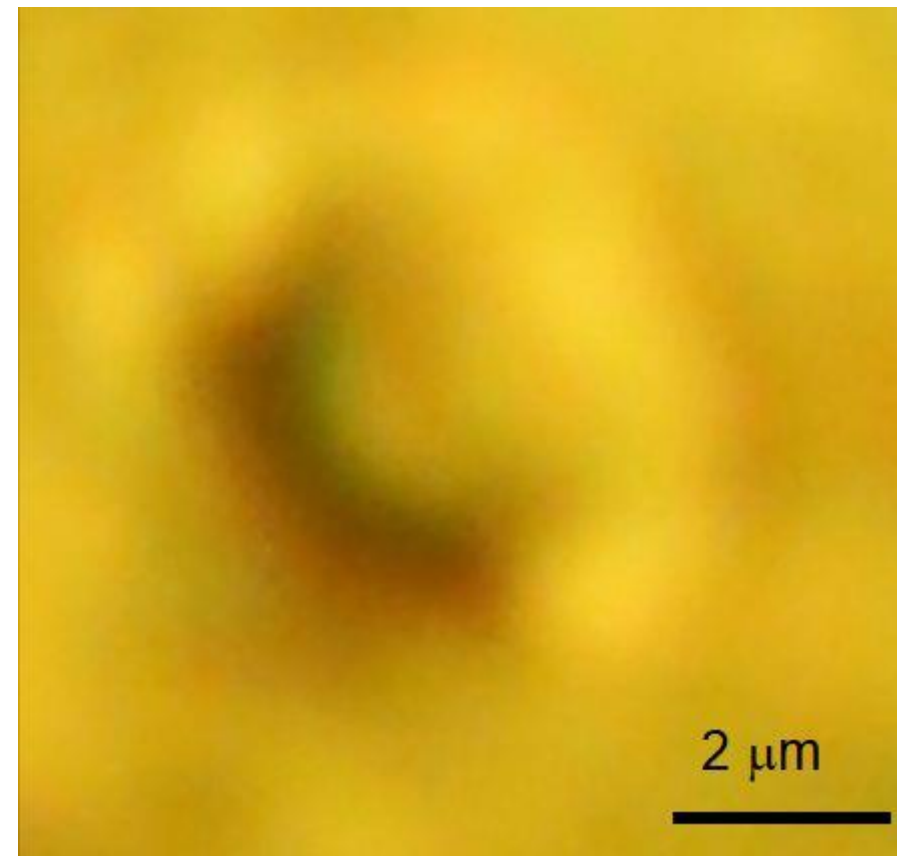
歩留まりが0/37 → **87/100**に改善

超薄SiN膜付MEMS液体セルを用いた 細菌のSEM観察(液中)

SEM像

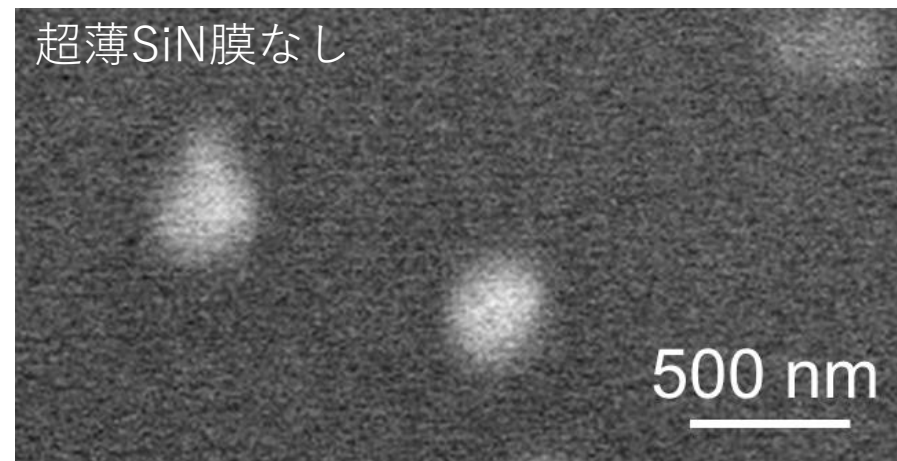
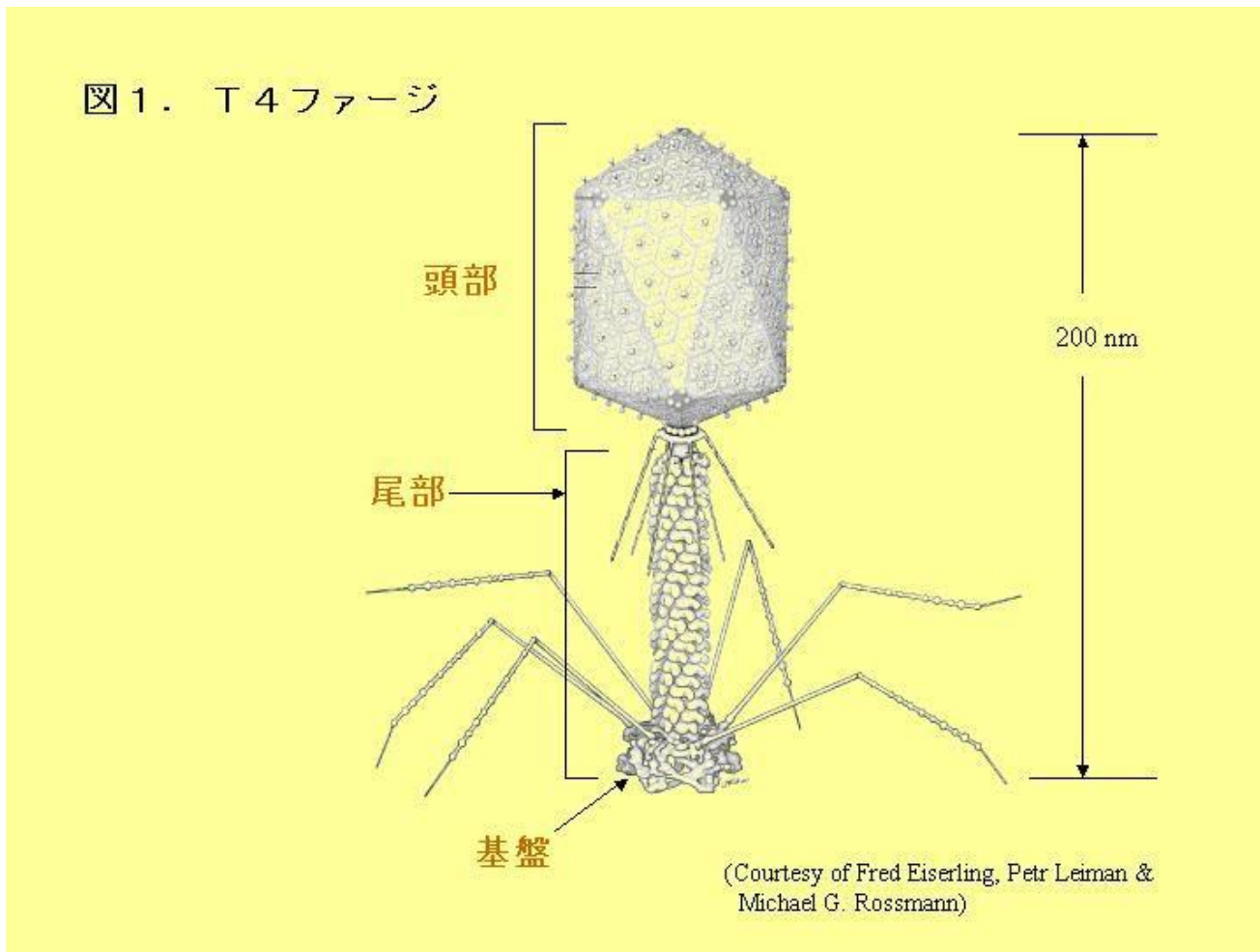


光学顕微鏡像



細菌表面に微細構造 (Zリング)の存在が示唆

超薄SiN膜越しのウイルスのSEM観察



ウイルスも観察可能。さらなる薄化で構造も可視化

まとめ

- 数nm厚の薄膜を歩留まり高く作製できる技術を開発
- 試作薄膜の性能評価
 - 電子線透過機能、流路機能、耐圧機能を実現
- 超薄SiN膜越しの大気・液中試料の観察
 - 金ナノ粒子、ウイルス、細菌

想定される用途

- 電子線透過膜越しの大気中・液中試料の高分解能観察
ウイルスや細菌を高分解能観察しながら、様々な実験と分析をし、それらにダメージを与える手法を調べる。
- 高感度次世代シーケンサー
次世代シーケンサー:ゲノム解析を高速、高感度、安価にした装置。
薄膜にナノ孔をあけて、ナノ孔を通過するDNAが出す信号を読む。
薄膜が薄いほど高感度計測可能。



これらの装置開発をしている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

発明の名称： メンブレンデバイス及びその
 製造方法

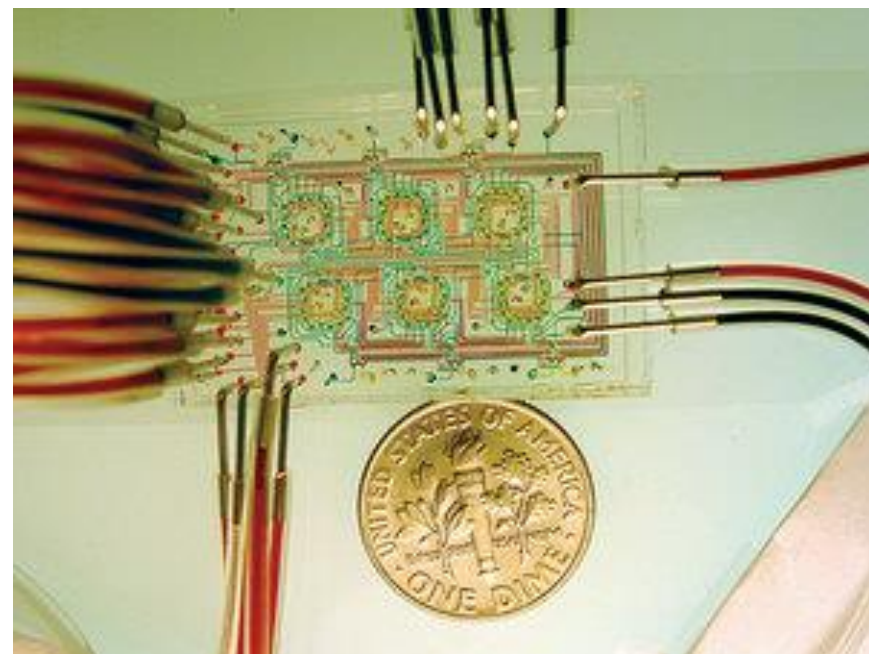
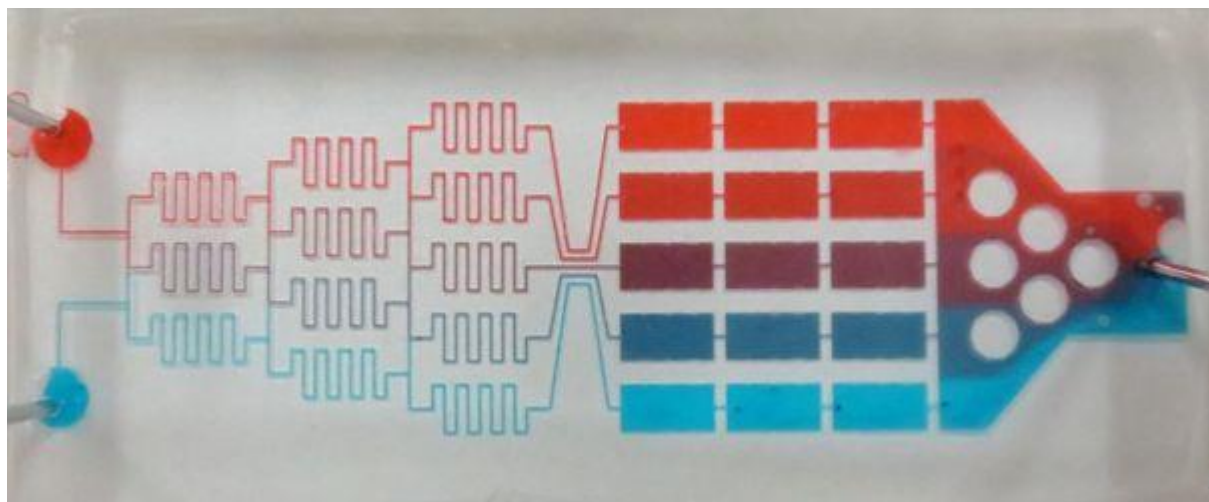
出願番号： 特願2020-055359

出願人： 東京工業大学

発明者： 石田忠、杉原晶彦

「微小流路内生体組織の割断」

幅広い生体試料を対象としたマイクロ流路技術



栄養や酸素、薬剤の濃度勾配
を形成

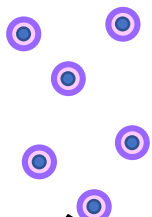
網羅的な濃度条件で検証

流体を高精度・多機能に制御&
高集積化が可能

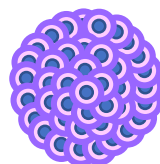
全てのステップをワンチップで

細胞、スフェロイド、組織

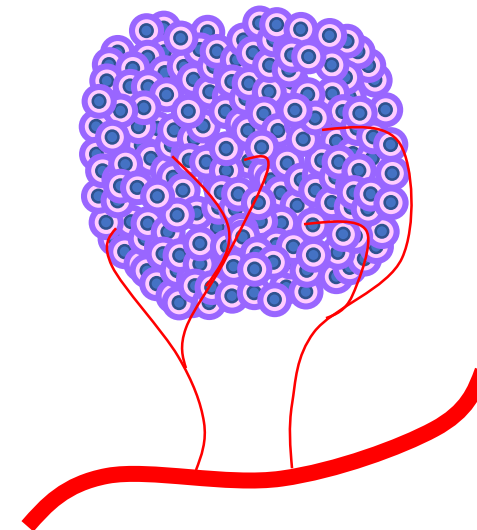
がん細胞



がん
スフェロイド



腫瘍組織



もっとも一般的。
がんの知見獲得や
抗がん剤開発に活用

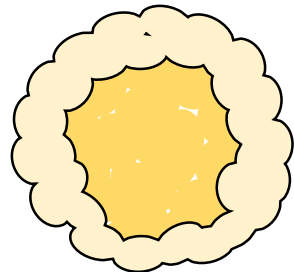
細胞と組織では全く違った結果が得られる

→ 診断では腫瘍組織を利用。内部構造を調べる必要性。

3次元生体試料内部の観察・解析手法

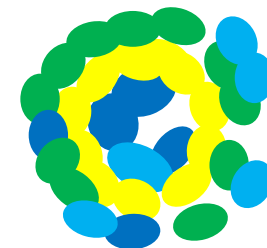
2光子法

- ・ 数百 μm の深部を観察可能
- ・ 低分解能



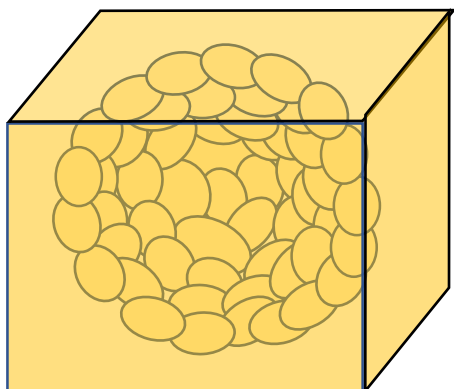
透明化法

- ・ 内部を蛍光観察可能
- ・ 形態情報を喪失
- ・ 脂質など喪失

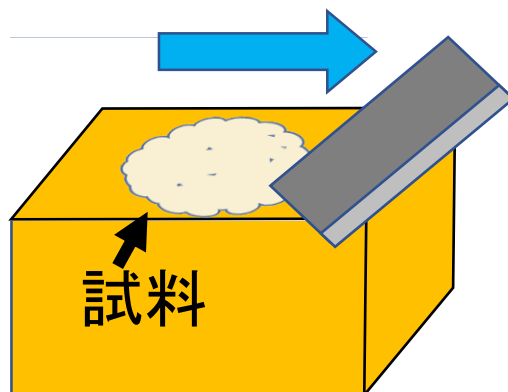


切断

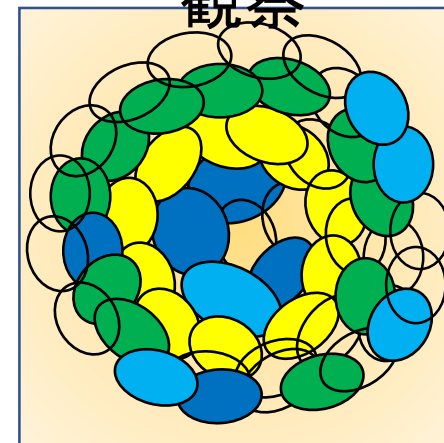
樹脂包埋



スライス



観察



3次元生体試料内部を観察し、3次元情報取得も可能

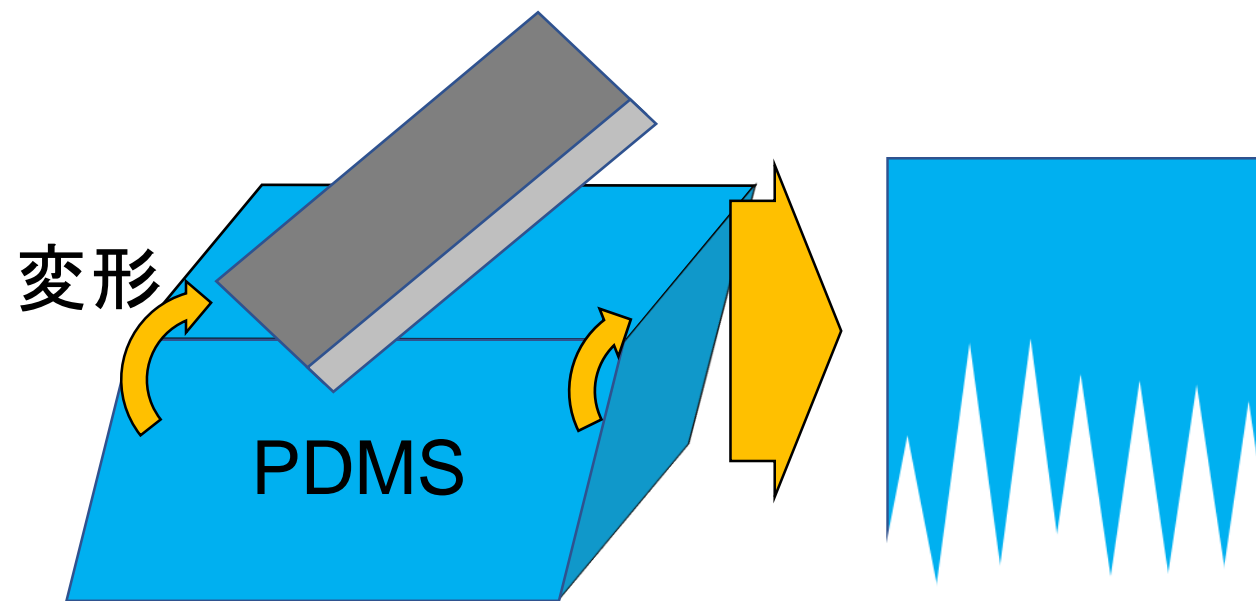
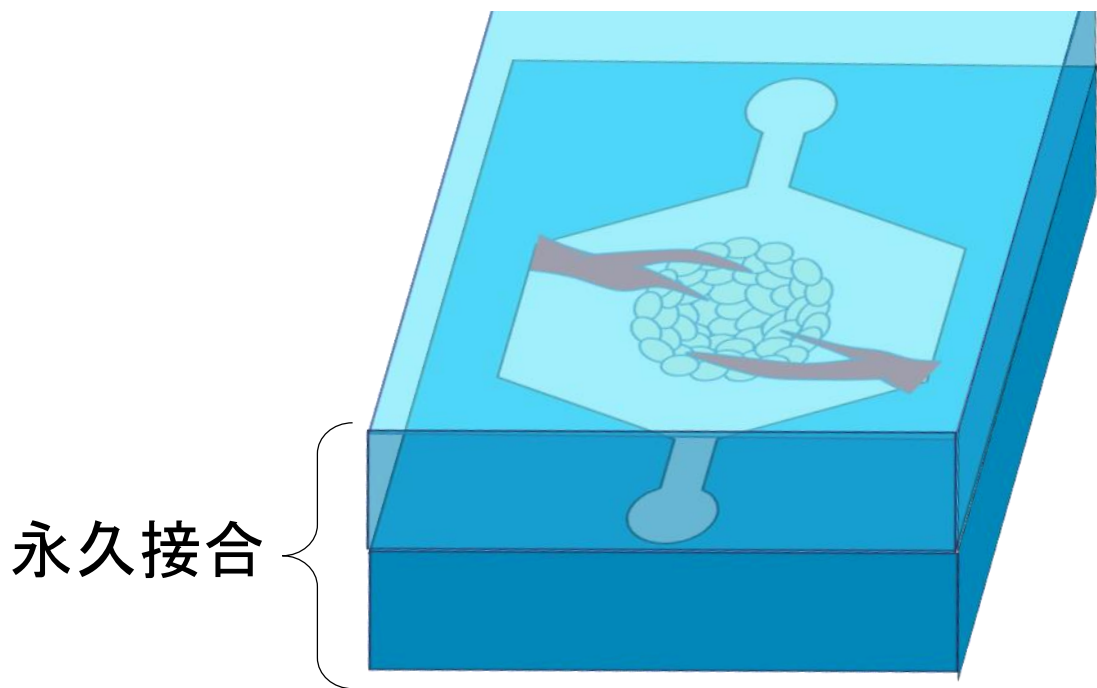
マイクロ流路デバイス内の3次元生体試料の割断

3次元生体試料の取り出し

- マイクロ流路デバイスは永久接合
- デバイスの分解が困難
- 3次元生体試料を物理的に破壊

マイクロ流路ごと割断

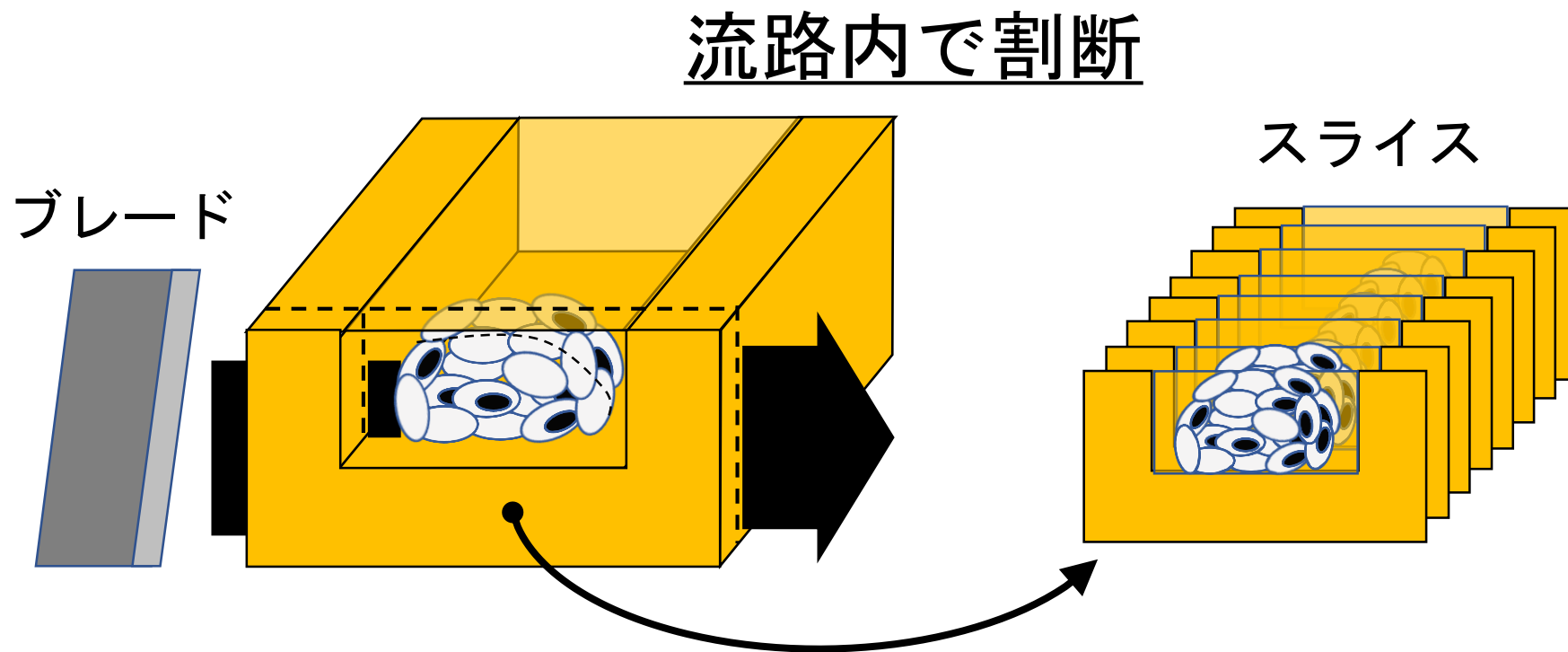
- PDMSはゴム材料
- スライス中に変形
- スライス面が平坦にならない



割断に適したマイクロ流路デバイスの開発が必要

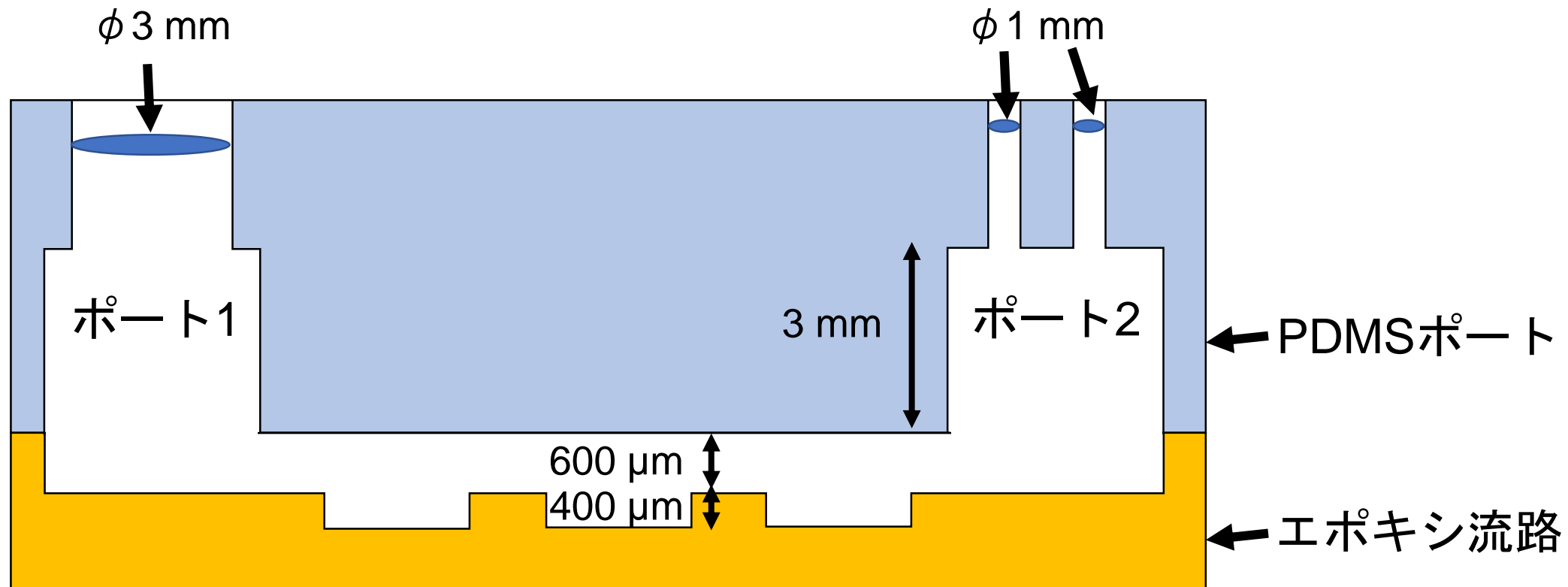
エポキシ製流路デバイスの提案

- ・ 流路材料に包埋材のエポキシを採用
- ・ エポキシはPDMS同等の光透過性
- ・ セクショニングに適した硬度
- ・ 固定、包埋を流路内で実施



マイクロ流路実験から割断まで一貫して実施可能

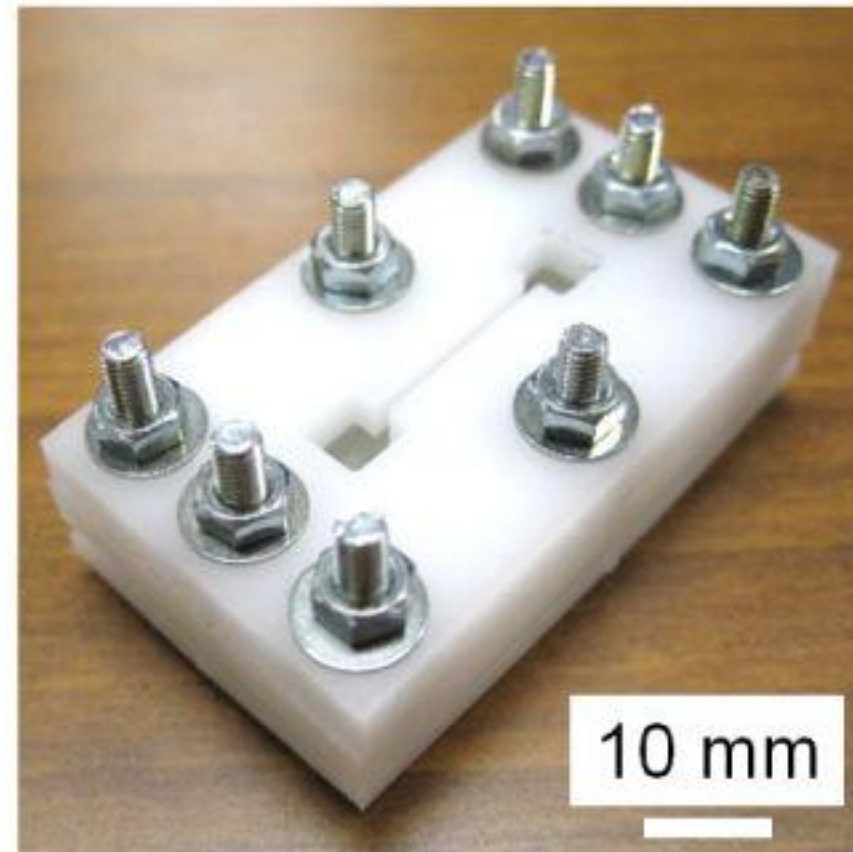
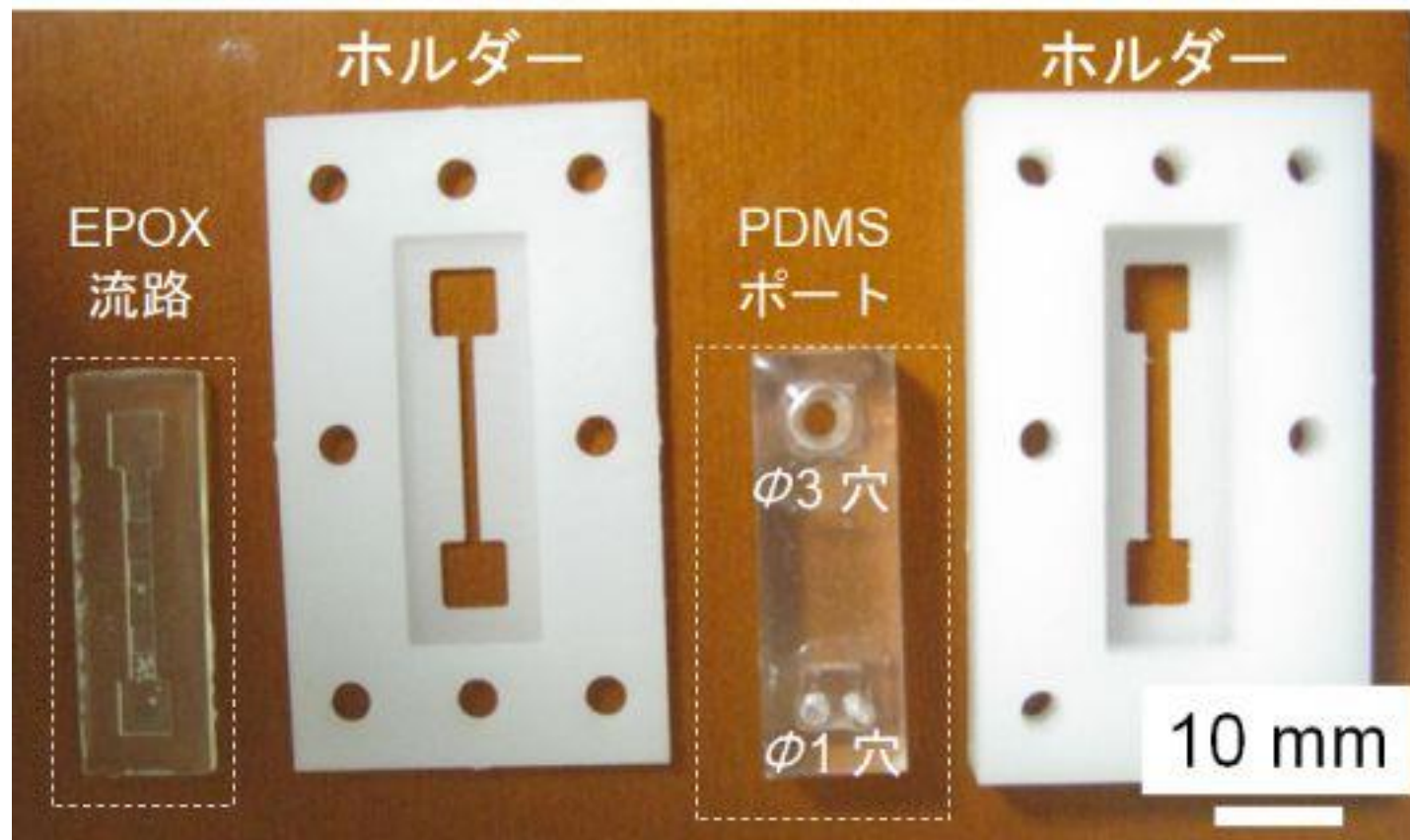
エポキシ製流路デバイスの概略図



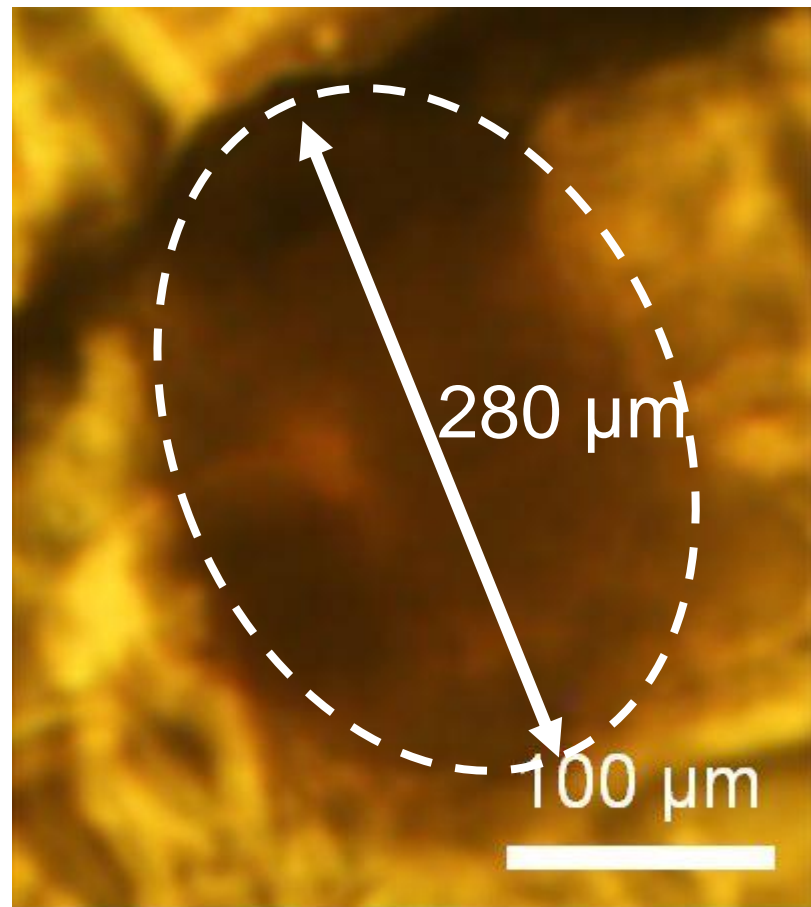
デバイス上部分をPDMSで構成

- ・ エポキシ部分に密着→流路密閉性を確保
- ・ 実験後簡単に分解→エポキシ流路と取り出し可能
- ・ チューブコネクタ等の部品を従来通り使用可能

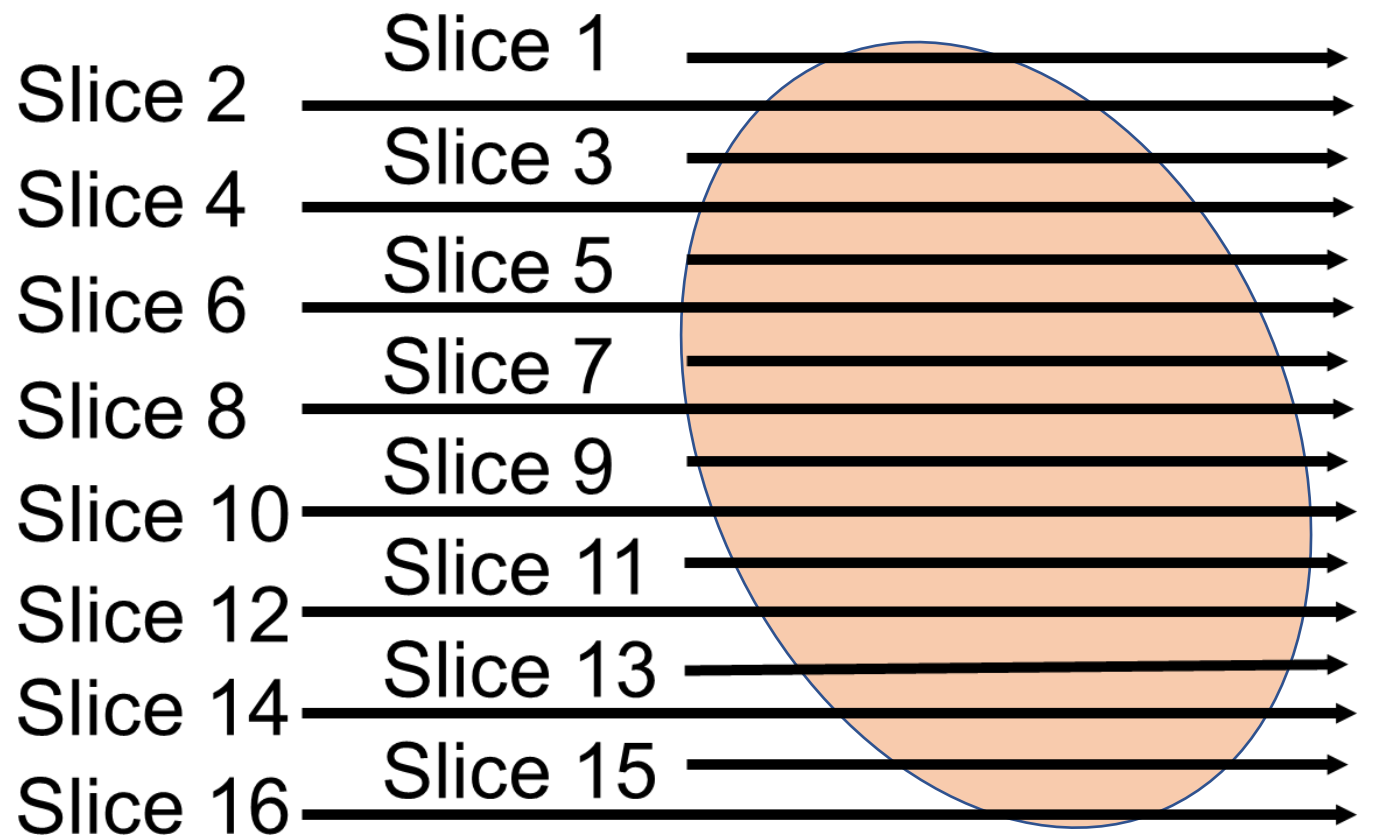
実際の部品と組み立て状態



エポキシ流路デバイスの連続切断



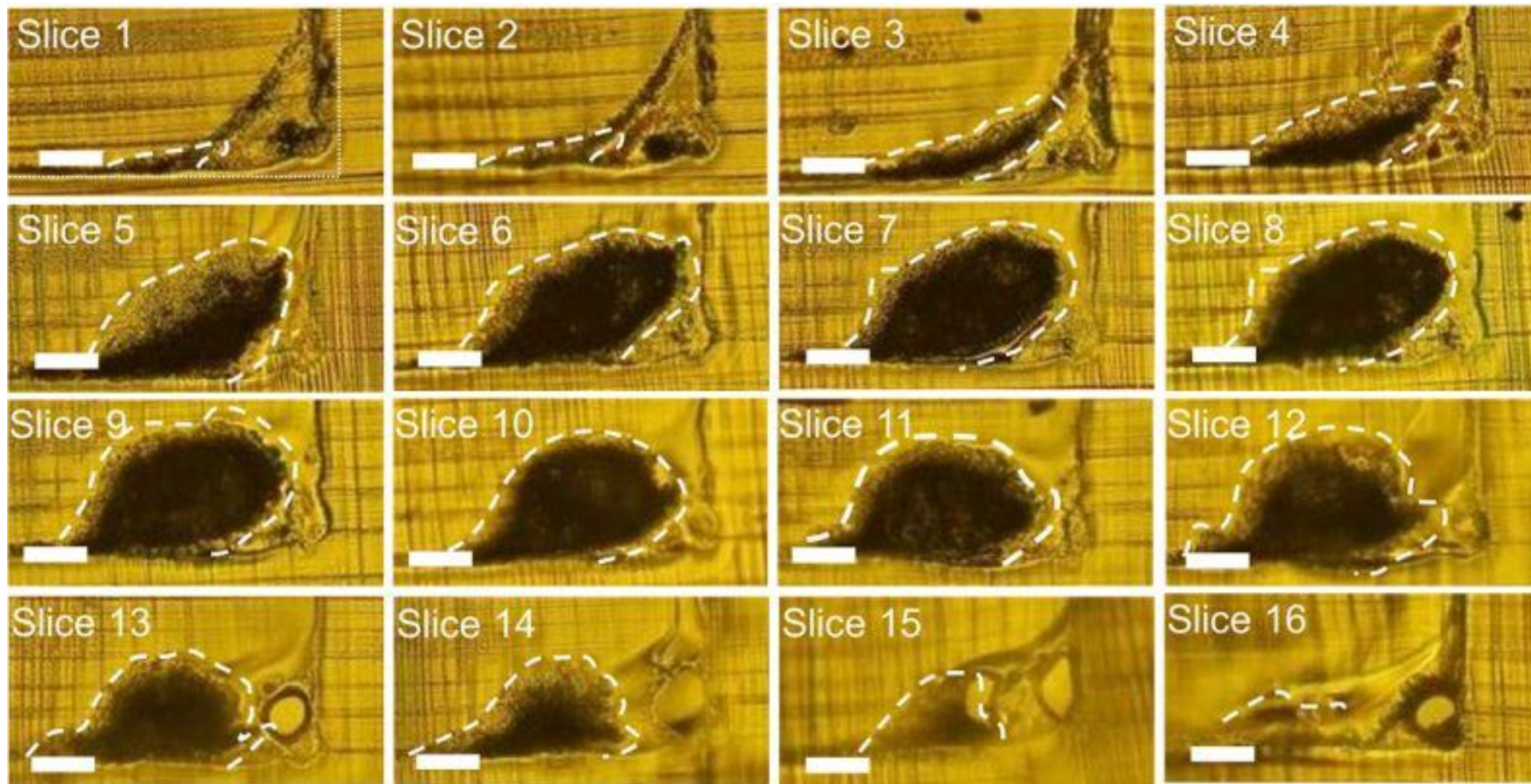
流路内で包埋した
スフェロイド



スライス厚さ : 18 μm

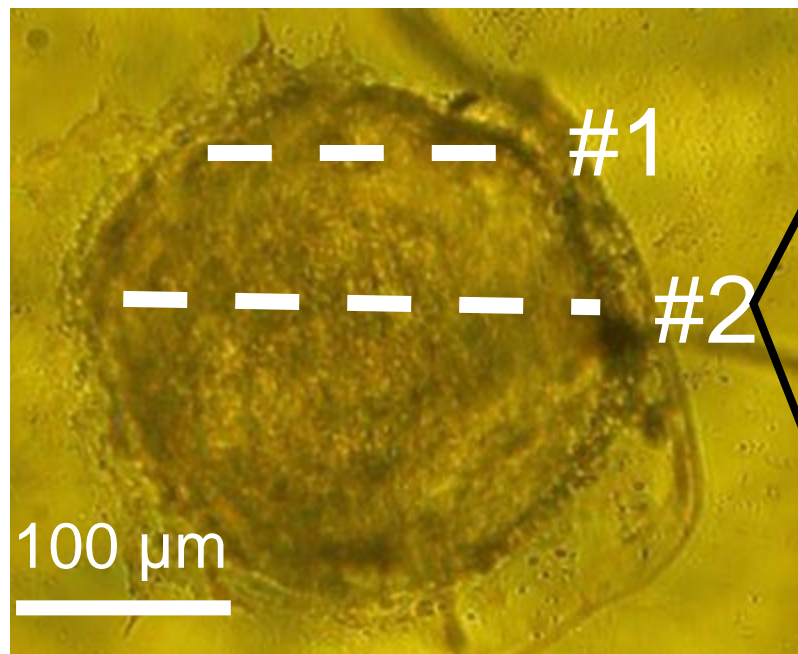
切断位置

エポキシ流路デバイスの連続切断

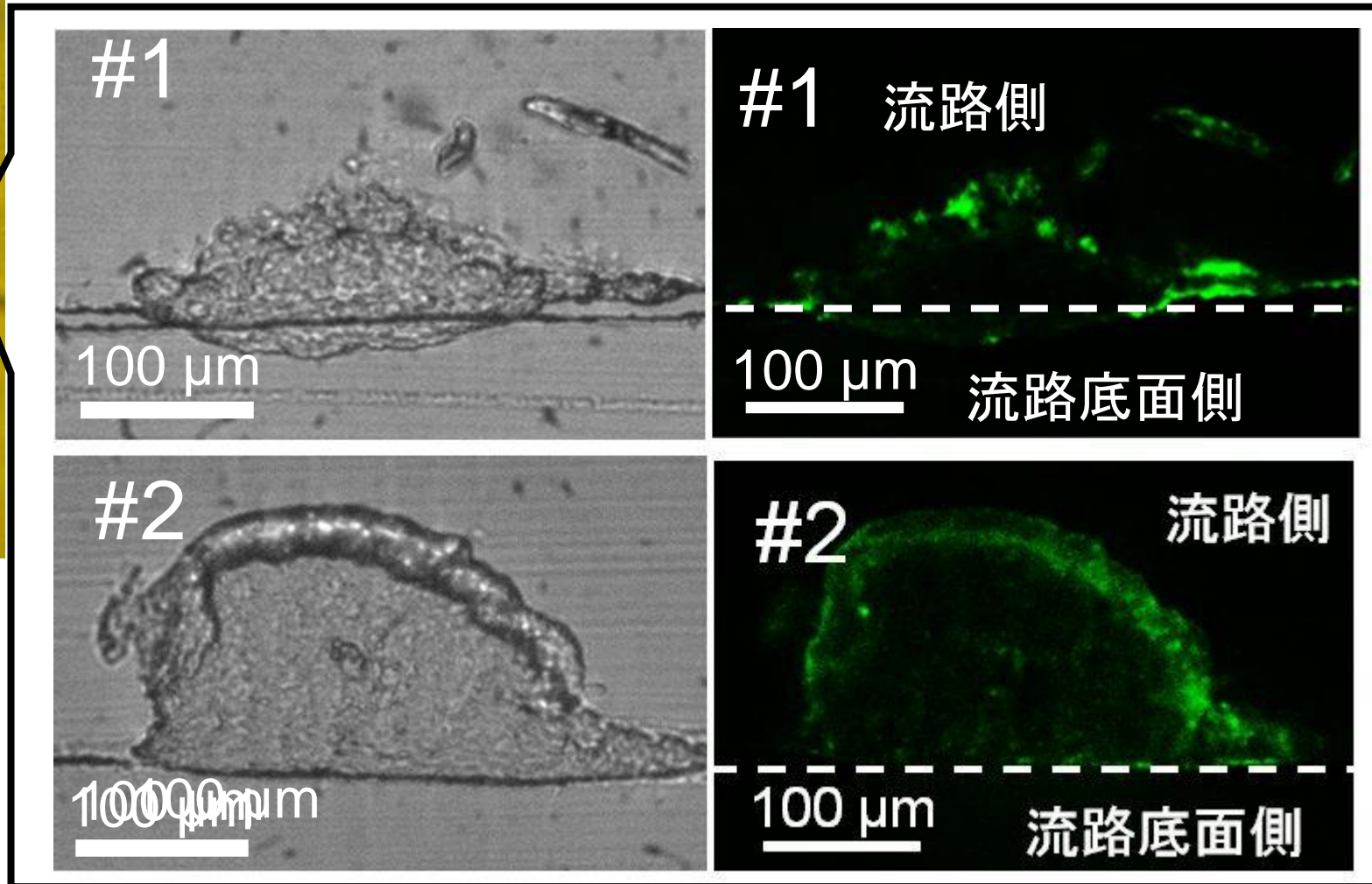


スフェロイド全体の連続した切片を取得
→ 三次元的形態を調べることが可能

スフェロイド断面の染色・観察



包埋されたスフェロイド
スライス厚さ：10 μm



スフェロイドの断面におけるタンパク質分布を取得

まとめ

マイクロ流路の中の3次元生体試料を3次元形的形態とタンパク質分布を調べることのできるマイクロ流路を開発

- ・エポキシ製のマイクロ流路

- マイクロ流路の中のスフェロイドを10 μm 刻みにスライス可能

- ・スライスしたスフェロイドの分析

- 3次元形態とタンパク質の分布を検証可能

想定される用途

- スフェロイドや組織研究のためのマイクロ流路デバイス
がん治療のための知見の獲得
効率の良い抗がん剤開発
- 臨床で取得した組織の診断デバイス
がん患者から採取した生検サンプルの高度な診断。
がん患者に効く抗がん剤の選定
→ オーダーメイド治療のための迅速かつ正確な診断
- がん以外にも様々な疾患に活用可能。



組織切断装置やその前処理技術を開発中の企業には、本技術の導入が有効と思われる

本技術に関する知的財産権

発明の名称： 包埋ブロック製造装置、包埋
ブロック製造装置の使用
方法及び包埋ブロック

出願番号： 特願2020-053672

出願人： 東京工業大学

発明者： 石田忠、栗生識

お問い合わせ先

東京工業大学 研究・産学連携本部

TEL: 03-5734-3817

FAX: 03-5734-2482

Email: sangaku@sangaku.titech.ac.jp