408 細胞電気信号計測用ナノ電極の形成

Fabrication of nano-electrodes for electrophysiological biosensor

○牧之段 次郎 (立命館大)
小西 聡 (立命館大)

鈴木 健悟 (立命館大)
中島 雄太 (九工大)

小椋 俊介 (立命館大)
安田 隆 (九工大)

Jiro MAKINODAN, Kengo SUZUKI, Shunsuke OGURA and Satoshi KONISHI,
Ritsumeikan University, 1-1-1 Noji-higashi, Kusatsu, Shiga,
Yuta NAKASHIMA and Takashi YASUDA,
Kyushu Institute of Technology, 2-4 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu

Key Words : cell, FIB (Focused Ion Beams), nano electrodes

1 はじめに

近年 MEMS 分野における微小構造の形成技術の発展に伴い、MEMS 技術のバイオ工学分野への応用が加速している。細胞の生体活動の観察を行うデバイスの研究もその一つである。細胞が生体活動の際に発するイオン電流を計測することは、生体のメカニズムを解明するうえで重要である。従来の細胞電気信号の計測にはパッチクランプ法が用いられてきた。パッチクランプ法においては、一つの細胞に対し一本のピペット電極を刺入して計測を行っている。また、現在 MEMS 技術を用いた細胞電気信号計測用デバイスの研究が多数行われている。多数の細胞から発せられる電気信号を一つの電気信号に合成して計測するタイプや一つの細胞から発せられる電気信号を計測するタイプが見られる。⁽¹⁾

これに対して、本研究では電極パターンをさらに微細化してさらに詳細な細胞内での電気信号の観察を日指したデバイスの研究を行っている。例えば細胞内の信号分布測定が挙げられる。観察対象である細胞の大きさは数 μm ～数十 μm であり、それらの細胞内での電気信号の発生の分布を観察するためには、計測に用いる検出電極のサイズは大きなもので数 μm 、小さなものでは数百 nm である必要がある。MEMS 技術のパターニングで一般的に用いられるフォトリソグラフィでの最小加工パターンサイズは 1 μm 程度であり、nm オーダーのパターニングは困難である。そこで本研究では、検出電極のパターニング手法として nm オーダーの加工が可能な集束イオンビーム加工 (Focused Ion Beams: 以下 FIB と表記) ⁽²⁾を採用することにした。

本稿では FIB を援用した微細構造を取り入れた細胞電気信号計測用ナノ電極の形成に関する現状について報告する。

2 細胞電気信号計測用デバイスの検出原理

本研究で開発を行っている細胞電気信号計測用デバイスを用いた細胞観察では、デバイス表面で培養した細胞をデバイス裏面から陰圧をかけることによりチャンネル穴に吸引固定する。その際に細胞とチャンネル穴を非常に高い抵抗で密着させる (ギガシール) ことにより、電氣的に他の領域と隔絶する。このことにより、細胞表面全体にあるイオンチャンネルのうち、チャンネル穴内に含まれているイオンチャンネルから流れるイオン電流だけをデバイス上に形成した電極により検出することができる。

3 細胞電気信号計測用ナノ電極の形成

FIB はイオン源に高電圧をかけてイオンビームを発生させて試料に照射することにより nm オーダーのスパッタエッチングおよびスパッタ蒸着を行うことができる。FIB によるスパッタエッチングでは Si、SiO₂ などのシリコン材料や Al、Au などの金属、さらにフォトリソグレイとといった様々な試料をエッチングできる。また、W や C などのデポガスを試料に吹き付けつつイオンビームを照射することにより、これらの材料を成膜することができる。本研究では、細胞電気信号計測用ナノ電極の形成に FIB を援用したリフトオフ・プロセスを用いることにより、生体適合性を満たした Au を用いたナノ電極を形成する。

以下に FIB を援用したナノ電極の形成プロセスを述べる。(Figure 1)

- ① フォトリソグラフィにより μm オーダーのレジストのパターニングを行う
- ② FIB によりレジストをエッチングすることにより、nm オーダーのレジストのパターニングを行う
- ③ 真空蒸着により Cr/Au を成膜する
- ④ リフトオフ・プロセスにより、ナノ電極および電極配線部を形成する

Figure 1 : Fabrication Process of Nano-Electrodes.

上記のナノ電極形成プロセスによりナノ電極を形成した。(Figure 2)電極検出部は幅 500nm で形成した。数 μm の細胞における細胞内の電気信号の発生を分布を観察するには数百 nm の検出電極の形成が望まれるが、この条件を満たしたサイズの検出電極を形成できた。

Figure 2 : Nano-Electrodes

4 細胞電気信号計測用デバイス

細胞電気信号計測用デバイスには、細胞を吸引固定するためのチャンネル穴、細胞の発する電気信号を計測するための検出電極、さらにデバイスが細胞に直接触れるために使用材料には生体適合性が求められる。また、細胞内の電気信号発生を分布を観察するためには各電極が絶縁されて電気的に独立している必要がある。しかし、形成したナノ電極により細胞電気信号が検出できることを確認するため、デバイスの試作段階として複数のナノ電極を並列配置することにより細胞電気信号を計測する。

細胞を観察するには、細胞吸引時に細胞がチャンネル穴を通り抜けるのを防ぐ必要がある。10 μm 程度の細胞の観察を視野に入れ、チャンネル穴の直径を 5 μm とする。また、基板部は表面を SiO_2 膜で覆うことにより生体適合性および絶縁性を得ることが出来る。

チャンネル穴の周囲に複数の幅数百 nm のナノ電極を並列配置することにより、チャンネル穴に吸引固定した細胞の電気信号を計測する。FIB を援用したリフトオフ・プロセスにより、生体適合性を満たす Au を用いたナノ電極を形成する。

細胞電気信号測定時に電極が培養液にさらされるとノイズの影響を大きく受けるため、検出部分以外の電極を絶縁膜により覆う必要がある。被電極絶縁膜には高温でベイクすることで生体適合性を満たす住友ベークライト株式会社の CRC-8300 を用いる。

以下にナノ電極を備えた細胞電気信号計測用デバイスの製作プロセスの概要を示す。(Figure 3)

- ① 基板表面に Al マスクを用いた ICP によりチャンネル穴を形成する (a)
- ② 基板裏面に Al マスクを用いた ICP により吸引用貫通孔を形成する (b)
- ③ 熱酸化により絶縁膜を形成する (c)
- ④ リフトオフ・プロセスにより検出電極を形成する (d),(e),(f),(g)
- ⑤ フォトリソグラフィーにより電極を覆う絶縁膜を形成する (h)

(a) Vapor deposition, Photolithography, Al Etching, ICP-RIE
(b) Vapor deposition, Photolithography, Al Etching, ICP-RIE
(c) Thermal oxidation (d) Photolithography (e) FIB
(f) Vapor deposition (g) Lift-off (g) Photolithography

Figure 3 : Fabrication Process.

5 まとめ

細胞電気信号計測用電極の微細化を進め、細胞電気信号のさらに詳細な計測を目指している研究の現状について報告を行った。FIB を援用した細胞電気信号計測用ナノ電極の形成を行い、電極幅 500nm のナノ電極を形成した。これにより FIB を援用したリフトオフ・プロセスの可能性を示すとともに、細胞内の独立した部分での電気信号の計測が期待でき、さらには細胞内での電気信号発生を分布の観察が可能になると期待される。今後は、検討した製作プロセスでのデバイスの製作および評価実験を行っていく。

参考文献

- [1] Masato Tanabe et.al, "Development of Micro Channel Array with Detecting Electrodes for Electrophysiological Biomedical Sensor", Micro Electro Mechanical Systems 2003, 407-410
- [2] Gierak J et.al, "Nano-fabrication with focused ion beams", MICROELECTRONIC ENGINEERING 57-8: 865-875 SEP 2001.