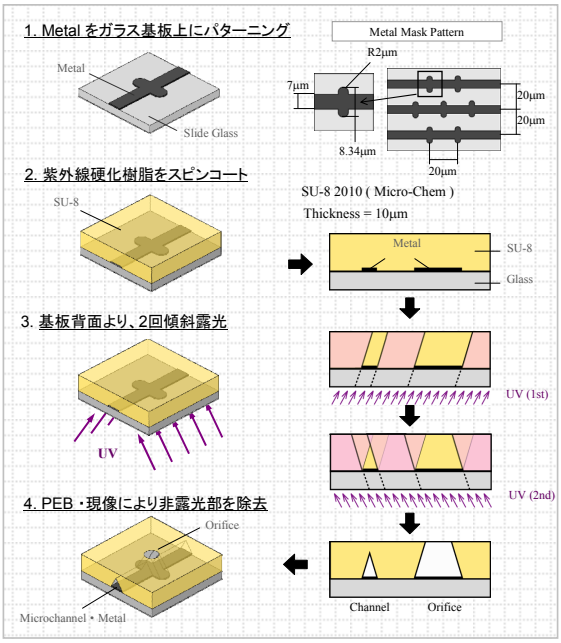
香川大学・工学部・知能機械システム工学科

Single－Mask回転傾斜リソグラフィ と バイオ応用

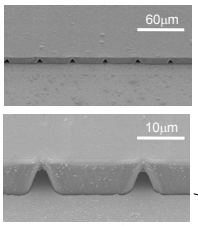
鈴 木 孝 明　suzuki@eng.kagawa-u.ac.jp

細胞診断や細胞再生医療へ向けた，単一細胞レベルの機能測定から多細胞レベルの組織再構成までを可能とするナノバイオプラットホームを構築する方法と，プロトタイプを用いた有効性の検証を行っている。独自に開発したSingle－Mask傾斜リソグラフィを用いて，光硬化性樹脂を複数の方向から露光することにより，複雑な多階層構造を簡単に作製できる。これまでに，多数細胞の配列固定アレイ，局所電場集中を用いた物質導入，染色体伸長チップなどへの有効性を示している。

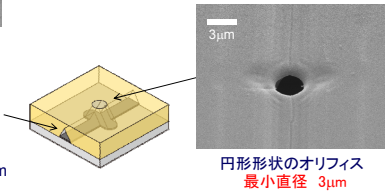
Single－Mask回転傾斜リソグラフィ



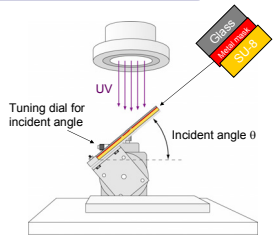
- 簡易なプロセス（ボンディング・アライメントが不要）
- オリフィス・流路・電極一体構造が一度のレジストコートで作製可能
- 特殊な設備や材料は不要（i線光源と市販レジスト）

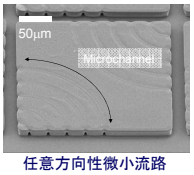


微小流路
最小幅：3～7μm，最長：8mm
（aspect ratio 1:1000）

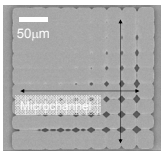


円形形状のオリフィス
最小直径　3μm

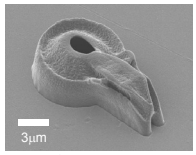




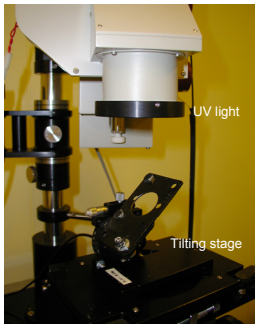
任意方向性微小流路



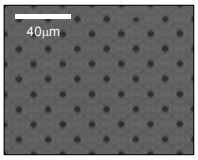
任意方向性流路分岐



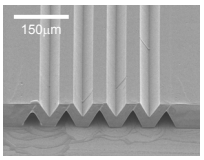
流路付き中空突起



傾斜露光システム



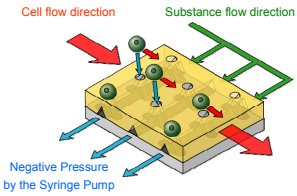
オリフィスアレイ



マイクロチャネルアレイ

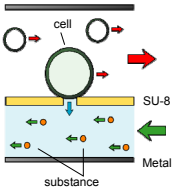
細胞機能計測アレイデバイス

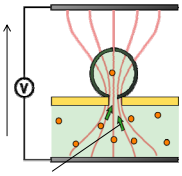
基礎：細胞間相互作用の機能測定，多細胞レベルの組織再構成
応用：再生医療向け細胞ポテンシー計測，細胞内物質導入法，臨床用細胞診断



細胞の固定

上部流路中の細胞は，シリンジポンプの負圧により，絶縁用のレジスト（SU-8）層の上に高密度に配置されたオリフィスに固定される。

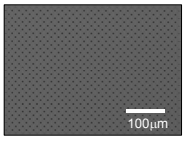




Substance diffuses into the cell through pore caused by electric field

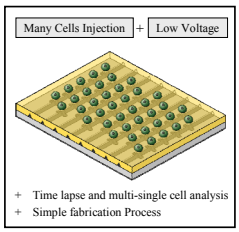
Electroporation（電気穿孔法）

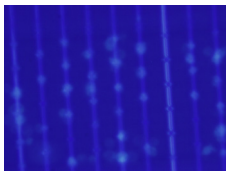
固定した細胞へパルス電圧を印加することによりElectroporation（細胞へのパルス電圧の印加によって細胞膜に一時的な孔をあけ、外部からの物質導入を行う手法）を行う。



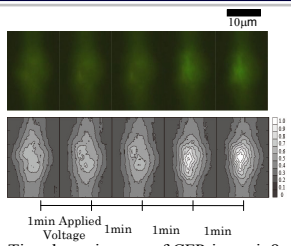
オリフィスアレイ

- 大量細胞の配置操作技術
- 低電圧物質導入法





Immobilized cell image
- ANS stain（WU）-



Time lapse images of CFP-importinβ entering the cell

核膜透過性のimportinβに蛍光タグCFPを付与したタンパク（CFP-importinβ）をElectropratioにによって細胞内へ導入した。パルス電圧(1Hz 1V 1msec)を1分間印加後，CFP-importinβの核内蓄積を示す緑色への蛍光を観測した。

Importinβ・・・核輸送専用の運搬体タンパク質であり，生細胞膜に対する透過性はない

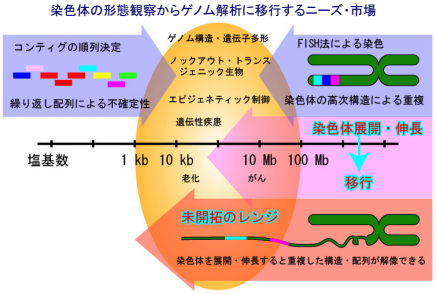
Applying Voltage : 1Hz 2V 1msec 1min

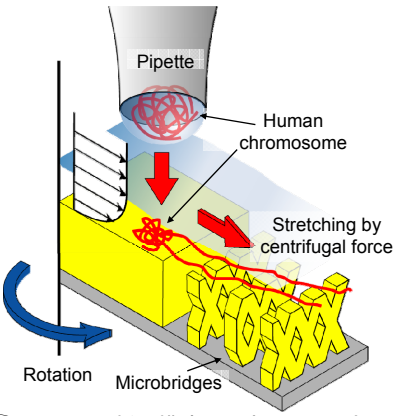
染色体伸長・固定デバイス

DNA伸長技術（Fluorescent In Situ Hybridization・遺伝子欠失診・染色体形成原理の解明）

ゲノム解析の空白地帯を埋める

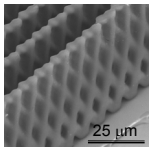
染色体の形態観察からゲノム解析に移行するニーズ・市場



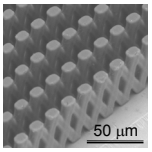


マイクロ橋脚構造上に遠心力で固定

- 多量のサンプルを同時操作可能
- 区画化構造上に懸架固定
- アクセス容易構造による標識の高効率化

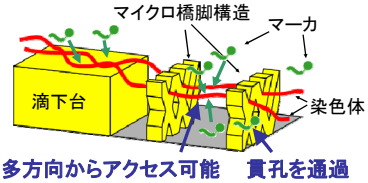


5 μm Micro bridges



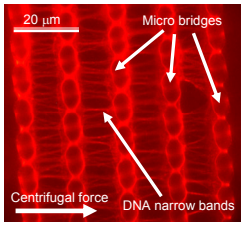
10 μm Micro bridges

マイクロ橋脚構造が持つV溝構造によりDNAを区画化して配置する

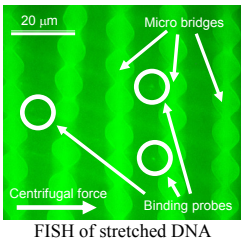


多方向からアクセス可能　貫孔を通過

DNAが懸架された状態になっており，橋脚構造には多数の孔構造が形成されるため，マーカが容易に通過することでマッピング効率を改善



Stretched DNA on microbridges



FISH of stretched DNA on microbridges