

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

#### A Study on Micro Patterning Method

#### Using Electrically Controlled Nano-particle Deposition

(静電気力を利用したナノパーティクルによるマイクロパターニング手法に関する研究)

氏名 金 俊完

最近その発展速度が速いバイオチップ、ディスプレイ、半導体デバイスなど様々な分野で必要としているバイオ材料、有機高分子材料などのマイクロパターニングは金属薄膜等無機材料とフォトリソグラフィやエッチングによる方法では困難であり以下の条件を満たす新しいマイクロパターニング技術の開発が求められている。

#### (1) ドライパターニングプロセス

ドライプロセスなので乾燥した微粒子による一様・均一なパターンが可能である。また、高速乾燥による生体高分子の活性にも有利である。

#### (2) 低温・低熱プロセス

熱で失活・分解するサンプルでもパターニング可能である。

#### (3) ダイレクト・パターニングプロセス

このプロセスはエッチングなどのプロセスがなくバイオ材料との適合性がある。

#### (4) 高分解能プロセス

集積度を高められるようにナノ・マイクロメータの分解能が得られるパターニング技術が必要である。

今まで **Micro Spotting**、**Inkjet Printing**、**Screen Printing**、**Micro Contact Printing** などの方法がバイオ材料、有機高分子材料などのマイクロパターニング法として開発・研究されているが、これらは全てウェットプロセスであり前述した条件を完全に満たす方法ではない。今までの手法の欠点を解決する方法について研究を行い、新たな手法を開発するのが本論文の目的であり、静電気力を利用したナノパーティクルによるマイクロパターニング手法に関する研究を行った。

本論文でのドライ・マイクロパターニング法の概念は大きく分けて 1) 微小液滴の生成、2) 静電気力で誘導しながら乾燥、3) ステンシルマスクでドライパターン、これら 3 つの要素で構成されている。この概念を実現する方法として **Electrospray Deposition (ESD)**法と **Surface Acoustic Wave Atomizer and Electrostatic Deposition (SAW-ED)**法を提案した。

**ESD** 法はキャピラリの溶液に高電圧でかけてキャピラリ先端から微小液滴を生成し乾燥したパーティクルを基板上に静電気力で誘導してステンシルマスクの穴を通してパター

ニングする方法である。溶液を供給するキャピラリと対向電極の間に数 kV の高電圧を印加するとキャピラリ先端に正・負イオンの分離が起こり、先端部から高度に帯電した液滴が生成される。この液滴の電荷密度が一定限界を超えると液滴中の過剰電荷によるクーロン反発力が表面張力により液滴を維持している力を超えるため分裂が生じる。生成された微小液滴は乾燥すると電荷同士の密度が高くなり、より小さい液滴化してより早く乾燥する。ESD での微小液滴の直径は数ミクロン以下であり 1 ミリ秒以下で完全乾燥すると考えられるので基板でのパターンニングはドライになる。ESD パーティクルの粒径が非常に小さいため活性を維持出来ると共に均一なパターンが出来るのでバイオ材料、有機高分子材料などの固定化に有効であるとの報告がなされているが、1)最高分解能が数百ミクロンであり、2)電気伝導率が低い溶液のみスプレー可能である問題点を抱えていた。その問題点を解決する考案が本論文の特異性である。

ESD 法の分解能を改善するためにシリコン MEMS 技術を利用することになった。ESD ではパターンニングする際に用いるマスクの形状により、自由な形状に形成することができる。従来のアブレッシブジェットで製作した石英ガラスのステンシルマスクでは分解能を 100 ミクロン以下にするのは非常に困難であった。分解能を高めるためシリコン MEMS 技術を利用して最高分解能 2 ミクロン幅、4 ミクロンピッチのシリコンナイトライド材のステンシルマスクを作成して直径 50 ナノメートルのビーズ溶液(0.1% solid)を ESD した結果 2 ミクロンの分解能のパターンを蛍光顕微鏡で観察することが出来た。パターンのナノ構造を FE-SEM で観察した結果 100-200 ナノメートルサイズのクラスターになっておりステンシルマスクの穴をナノメートルサイズにする事が出来ればナノパターンも可能であると考えられる。また濃度を低くすることによりクラスターのサイズはより細くなるのでナノパターンの可能性は高くなる。

もう一つ ESD の問題点である使用可能な溶液の制限を減らすために帯電した溶液を弾性表面波振動により微粒化して噴霧し、静電気力とステンシルマスクにより捕集を行うドライパターンニング手法である SAW-ED を開発した。一般にタンパク質は導電性の高いバッファー溶液にて安定なのに対し、ESD は原理上低電気伝導率のもののみ微粒化可能である。そこで溶液の電気伝導率を下げるため、微粒化の前に脱塩プロセスを必要とするが、その途上でタンパク質が変性してしまう可能性がある短所がある。ESD と違って SAW-ED の場合、振動によって霧化を行うため溶液の電気伝導率に依存せずスプレー可能なので ESD 不可能であるものをパターンニングする事が出来る利点がある。SAW-ED は一般の超音波霧化器に比べ駆動周波数が約 10MHz と高いため、波長が短くなり直径 10 $\mu$ m 以下の微小な液滴の霧化が可能である。これによりタンパク質の高速乾燥が可能となり、乾燥過程での変性を防ぐことができる。また弾性表面波によるタンパク質の霧化は、煩雑なプロセスを必要とせず時間当たりの噴霧量も多いため容易かつ液面全体で霧化するため高速生成が可能であり、液体表面に力を集束するために供給するタンパク質溶液に深さを必要とせず少量でも噴霧が可能であるという特徴がある。ノズルがないためインクジェット、ESD のように

詰まる可能性もない。

このような特徴をもっている SAW-ED を利用して ESD の前処理である脱塩プロセスで失活する Luciferase を SAW-ED し基板上に固定化された Luciferase を反応液で溶かしてその発光を測定し活性を調べた結果、失活しやすい Luciferase が SAW-ED では活性を維持しながら固定化可能であった。その活性度は 9.25 %であり高くはないが、常温で実験したら 1 時間で活性度が 10 %以下になる弱いタンパク質なので SAW-ED が生物活性に関しては有効であると判断できる。

また SAW-ED を利用して免疫測定用抗体アレーを製作してその実用性を検討した。同じ濃度の Anti-mouse IgG と BSA を一つのチップ上に SAW-ED でパターンニングして FITC 標識された mouse IgG 溶液でインキュベーションしてその蛍光を測定した結果、BSA では蛍光が観察されず Anti-mouse mouse IgG だけ反応していたので mouse IgG は BSA との非特異的反応は行われなかったことが証明できた。SAW-ED での抗体アレーの交差反応を調べるために 4 種類の動物由来の IgG ( mouse, human, guinea pig, bovine) を SAW-ED で一つのチップ上にパターンニングして HRP 標識された各 IgG 溶液でインキュベーションした結果、それぞれ対応する抗原、抗体のみ発光が観察され反応していることが明らかになった。これらのことから SAW-ED で製作した抗体チップは特異的結合能力を保持していると判断できる。また固定化された Anti-mouse IgG と FITC 標識された mouse IgG を用いて 1 ng/ml 濃度の mouse IgG を蛍光を検出することが出来た。プロテインチップ分野での SAW-ED は活性度が高いと共に均一なスポットを形成出来るのでその実用性は高いと判断できる。

SAW-ED の物理的性能評価として捕集効率を調べた。捕集効率の定量方法として Bradford 法を採択した。濃い BSA 溶液を用いると溶液の粘性が高まり、微粒化の阻害や基板への固着を引き起こすため捕集効率は低下する。だが噴霧された微粒子の粒径は濃度によらず一定で、粘性の影響をほとんど受けていないといえる。バースト周波数との関係を調べた結果、高周波では 1 サイクルあたりの波数が減少するためか捕集効率が若干下がったが、ほとんど影響はなかった。高い Duty 比の交流電圧で振動子駆動を行うと、捕集効率は向上し、噴霧所要時間は短縮された。しかし 10%を超える Duty 比では一定時間あたりの噴霧量が増加し、ウェットな状態でデポジットされてしまった。また捕集部印加電圧を高めると電界が強まり、粒子の吸引力も高くなる。そのため高電圧の印加や吸引力を高めるよう電界のかけ方を改善することで捕集効率の向上が見込める。

基本実験条件での捕集効率は約 2%なのに対し、捕集部印加電圧 18kV、Duty 比 10%に変更することで捕集効率を約 8%まで向上させることに成功した。しかし、この捕集効率は実用化するには低い値であるといえる。そこでコリメータ電極付加による効率向上を図ってみた。Duty 比 10%では未乾燥なものの約 33%の捕集効率が達成された。乾燥捕集ができたものでは、Duty 比 2%、捕集部印加電圧 18kV の条件で捕集効率約 13%を達成できた。これらの実験からコリメータ電極付加は有効な手段であるといえる。

本論文ではドライパターニング技術である ESD、SAW-ED を提案してシリコン MEMS 技術を利用して製作したステンシルマスクにより他の方法では困難な生体高分子材料の超微細マイクロパターニングが可能であることを示した。SAW-ED 法の捕集効率、サイズ・分布の均一性、デポジション速度、生物活性など、物理・化学的な性能評価を行った。これらの結果より、本論文にて提案した手法は生体高分子、有機物質等の微細パターニング等に広く利用できる有用な技術であると考えられる。