

MEMS 多軸センサを用いた 細胞のトラクション力計測

鄭 宜珍

第 1 章 序論	4
1.1. 本研究の目的	4
1.2. 研究の背景	5
1.2.1. 細胞の運動とトラクション力	5
1.2.2. 基板の硬さと細胞の機能	6
1.2.3. 細胞のトラクション力に関する従来研究	7
1.2.4. 従来の研究における課題	9
1.3. 本研究で提案するトラクション力の計測方法	10
1.3.1. 提案するトラクションカセンサ手法の概要	10
1.3.2. 本研究の意義と位置付け	11
1.4. 本論文の構成	11
第 2 章 理論	13
2.1. はじめに	13
2.2. ピエゾ抵抗型カンチレバーを用いたカセンサの計測原理	13
2.2.1. ピエゾ抵抗を用いたトラクションカセンサの設計	13
2.2.2. サイドドープ	14
2.2.3. ピエゾ抵抗効果	14
2.2.4. カンチレバーの変形と抵抗値変化	16
2.2.5. 抵抗値変化の計測回路	18
2.3. 本章のまとめ	19
第 3 章 設計・製作	20
3.1. はじめに	20
3.2. 細胞の特徴	20
3.2.1. 接着斑を介して発生するトラクション力	20
3.2.2. マイクロパターン上での細胞	22
3.2.3. トラクションカセンサの要求仕様	25
3.3. トラクションカセンサの設計	26
3.3.1. 限要素法による解析	26
3.3.2. カンチレバーの変形と抵抗変化率	27
3.3.3. モーメントと抵抗変化率	29
3.3.4. カバーチップの穴の設計	30
3.3.5. 配線ビームの抵抗値による影響	30
3.3.6. 絶縁体としてのパリレン C	32
3.3.7. フレキシブル配線の設計	33

3.3.8.	トラクションカセンサの試作.....	34
3.4.	本章のまとめ.....	37
第4章	センサの基礎特性.....	38
4.1.	はじめに.....	38
4.2.	液体中での計測.....	38
4.2.1.	液体によるセンサの反応.....	38
4.2.2.	パリレンCの厚さとセンサの反応.....	41
4.2.3.	アルミ電極の酸化反応.....	43
4.3.	実験セットアップの構築.....	43
4.3.1.	実験セットアップ.....	43
4.3.2.	ホットプレートによるセンサの反応.....	44
4.3.3.	ロックインアンプ.....	47
4.4.	カセンサの評価.....	48
4.4.1.	力と抵抗変化率の関係.....	48
4.4.2.	液体培地の温度に対するセンサ反応.....	51
4.5.	本章のまとめ.....	53
第5章	トラクション力の計測.....	54
5.1.	はじめに.....	54
5.2.	センサ洗浄.....	54
5.3.	パッド間のギャップと細胞の接着.....	57
5.4.	細胞のトラクション力の計測.....	58
5.5.	本章のまとめ.....	79
第6章	結論.....	81
6.1.	結論.....	81
6.2.	今後の展望.....	82
付録	84	
付録A	ピエゾ抵抗型カンチレバーの製作プロセス.....	84
A.1	ピエゾ抵抗層を形成するためのドープレシピ.....	87
A.2	製作に使用した Deep-RIE のレシピ.....	88
付録B	マスクデザイン.....	90
付録C	本研究で使用したフレキシブル基板のデザイン.....	91
付録D	細胞培養の前処理.....	92
付録E	本研究で使用した装置・薬品リスト.....	93
E.1	装置.....	93

E.2	薬品.....	94
E.3	細胞に関連した薬品.....	95
E.4	本研究でを使用した基板・金属.....	95
参考文献		96
謝辞		102

第1章 序論

1.1. 本研究の目的

本論文は、剛性の高い基板上における細胞のトラクション力を直接計測するため、ピエゾ抵抗型カンチレバーを利用した計測手法を提案し、その有効性を検証することを目的とする。

細胞は、血球などの特殊な細胞を除いて、正常な機能を発揮するために足場となる環境(細胞外マトリックス, Extracellular Matrix: ECM)を必要としている。細胞はECMに接着し、伸展、分裂、増殖や移動を行う。さらに、ECMの特徴を感知し、自らの機能を調節するのに利用する [1-4]。例えば、微細な構造上で、細胞がその構造に沿って成長するといったことが、しばしば観察される [5-17]。また、硬度勾配のある足場上に細胞を培養すると、細胞は柔らかい方から硬い方へ移動する [9]。このように、細胞は足場の特性によって、異なる挙動を示すため、足場の特性と細胞運動の関係を定量的に評価する必要がある。以後、本論文では細胞の足場のことを基板と呼ぶ。

細胞膜の表面にある接着タンパク質を介して基板に付着している。基板と細胞の接着タンパク質が結合している場所を接着斑(Focal adhesion)と呼ぶ [18] [19]。細胞は伸展しながら、新たに接着斑を生成し、逆に、細胞が基板からはがれる際には接着斑が分解される。細胞内では、接着斑に球状アクチンから形成されたアクチン繊維が結合して、このアクチン繊維が接着斑を介して基板を引っ張る力を発揮することが知られている。この引っ張る力を細胞のトラクション力と呼ぶ。トラクション力は細胞の運動において、必ず生じる力であり、細胞の形状だけでなく機能にも重要であることが示唆されている [20] [21]。そのため、細胞が出すトラクション力は、細胞運動のみならず、細胞の生理現象全般を理解する上で重要なパラメータであるといえる。

体の中には柔らかい脳組織(相当するヤング率= 10^3 Pa)から硬い骨(10^{10} Pa)まで様々な硬さをもった環境が存在している [22-25]。また、最近、人工心臓や人工腎臓などの人工臓器の移植が増加しているが、これらの人工臓器に主に使用される材料は、ポリエチレン、ポリウレタンなどの高分子材料(ヤング

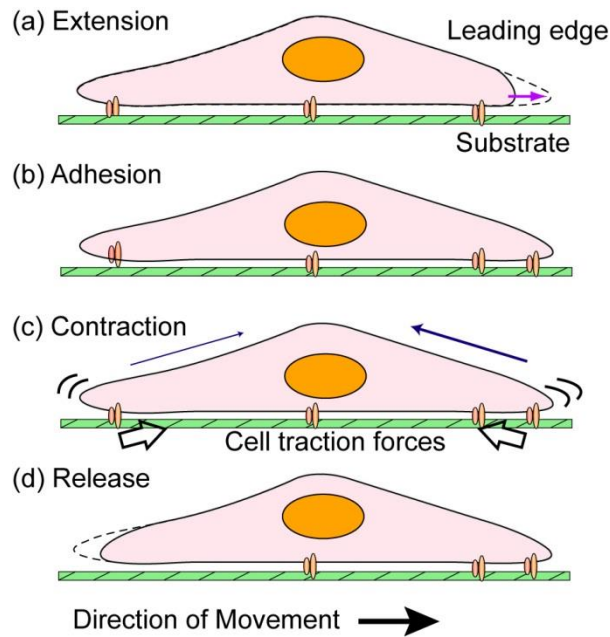


Fig. 1.1 細胞の移動時の4段階のメカニズム。(a)アクチン線維の重合により細胞先端が表面から突出する (b)細胞表面に接着タンパク質などの接着斑が形成され、基板に接着する (c)細胞骨格が収縮する(トラクション力が発生) (d)細胞後方の接着斑が分解され、基板から離れる。この過程を繰り返すことで細胞は前方へ移動する [7].

率 $=2.5 \times 10^9$ Pa) であり、生体内の組織で言えば、骨に近い硬い基板である。

従来研究では、ゲルや Polydimethylsiloxane (PDMS) 等の柔らかい基板上で細胞培養を行い、顕微鏡を用いて、細胞によって引っ張られた基板の変形を観測することで細胞のトラクション力を算出していた [26] [27]. しかし、基板の変形量が小さい硬い基板上ではトラクション力の評価が難しかった。そこで、本研究では、微小な力を計測可能なピエゾ抵抗型カンチレバーを用いて、細胞が生じるトラクション力を計測する方法を提案し、硬い基板上でのトラクション力について定量的に評価を行う。

1.2. 研究の背景

1.2.1. 細胞の運動とトラクション力

Fig. 1.1 に示すように、細胞の移動は4段階に分けることができる [7]. 細胞は自身の形状を変形させながら移動する。まず、細胞が伸展や移動を行うときに、先端部分でアクチンの重合によりアクチン繊維が伸長し、これが細胞膜を押し出して、糸状仮足(直径: 100~300 nm) や葉状仮足(厚さ: 100~200 nm) と呼ばれる構造が突出する [28] [29](**Fig. 1.1(a)**). 次に、突出した仮足が基板と結合し、結合した

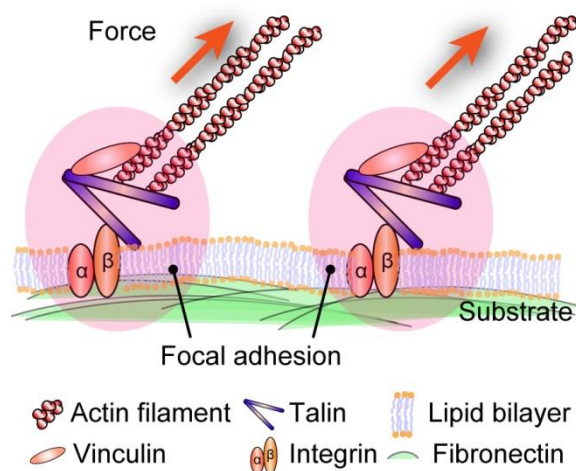


Fig. 1.2 細胞は接着タンパク質を介して基板に接着し、接着タンパク質は内部ではアクチン繊維とリンクされている [30]

部分を基点とし、細胞体が広がる(**Fig. 1.1(b)**). このときに、後方では細胞収縮がおき、基板に結合していた部分は分解され、基板から離れる(**Fig. 1.1 (c), (d)**). この過程を繰り返すことにより、細胞は移動することができる [18] [31] [32].

Fig. 1.2 に接着斑の構造を示す. 細胞表面のインテグリン α , β は基板上ではフィブロネクチンと結合し、細胞内部ではタリン (Talin), ビンキュリン (Vinculin) 等とリンクしている. このように、細胞表面のインテグリンから細胞内部のタリン, ビンキュリン等までの、基板との結合に関与している部分を接着斑 (Focal adhesion) と呼ぶ. 接着斑のサイズは $1\sim 5\ \mu\text{m}$ である. さらに、接着斑はアクチン線維とリンクしている [30] [33]. アクチン線維上で運動するミオシン分子によりアクチン線維はロープのように引っ張られ、アクチン線維の端に結合された接着斑に張力がかかり、トラクション力が発生する.

このように、アクチンとミオシンの作用から力が発生するため、ミオシン数が多い筋細胞は線維芽細胞よりトラクション力が大きい [34]. また、細胞が成長し、基板上での接着面積が大きくなるとトラクション力も増加する. 活発な運動性を持ったガン細胞のトラクション力は正常細胞のトラクション力より大きい [35]. 細胞の運動において、トラクション力は必ず発生する力であり、細胞の形や、状態などの機能を評価する上で重要な指標となっている [36].

1.2.2. 基板の硬さと細胞の機能

細胞は基板の硬さを感知することができ、それに合わせて発生する力や自らの形などを制御している [8] [21] [37]. 柔らかい基板上で細胞を培養した場合、細胞の形が丸く、発生するトラクション力が弱い. 一方、硬い基板上で同じ細胞を培養した場合、アクチン繊維が多くなるなど、細胞骨格が発達

Table 1.1 細胞が接する環境のヤング率

	脳	筋肉	血管	軟骨	骨	ポリエチレン (人工組織)	ポリスチレン (ディッシュ)	ガラス
ヤング率 [Pa]	10^3	10^4	10^6	10^7	10^{10}	2.5×10^9	$3-3.4 \times 10^9$	7×10^{10}

するため、細胞運動時に生じるトラクション力が柔らかい基板上で細胞を培養したときより大きくなることが知られている [38-40]. また、基板の硬さに応じて、未分化の iPS 細胞が神経細胞、筋肉細胞、骨細胞のような異なる種類の細胞に分化することが報告された [4]. さらに、硬さの勾配をもつ基板上で細胞を培養すると、繊維芽細胞など、多くの細胞はより硬い方へ移動する [9]. このように、基板の硬さは細胞のトラクション力や分化、移動などとも密接な関係があり [22] [35], 基板の硬さによる細胞のトラクション力を評価することは非常に重要である.

Table 1.1 に人の体や細胞実験で使われる基板のヤング率と示す [22-25]. 人の体には、柔らかい脳から硬い骨に至るまで、役割の異なる様々な器官があり、相当するヤング率は 10^3 Pa から 10^{10} Pa にも及ぶ. よって、細胞は足場の硬さを感知することでその位置にふさわしい機能を発揮しているのかもしれない. 細胞がどういう機構によって、基板の機械的特性を感知し、機能や移動方向を決めるかについてはまだ明らかにされていない.

1.2.3. 細胞のトラクション力に関する従来研究

細胞のトラクション力は 1980 年に Harris らによって発見された [41]. フレキシブルなシリコンゴムシートに細胞を培養したときに、細胞が接着した周辺ではゴムシートに皺ができることから、細胞がシートを引っ張っていることがわかった. その後、細胞のトラクション力を定量的に計測するため、マイクロサイズの直線やドットがパターンニングされた柔らかいシート上に細胞を培養し、パターンの変形を顕微鏡で観測することで、細胞の力を推定した [42-44]. しかし、この方法では局所的なトラクション力によってフィルム全体が変形してしまうため、実際に力が発生した部分に対する基板の変形の定量的な評価が困難であった. シートのヤング率は $10^4 \sim 10^6$ Pa の範囲であるが、細胞のトラクション力による基板の変形を顕微鏡で観察するためには、より柔らかい材料を使用する必要があった. この問題を解決するために、Polyacrylamide gel (PG, ヤング率=1.2-100 kPa)の中に蛍光染色した小さいビーズを埋め込み、ゲル上に細胞を培養する手法を用いた研究(Traction force microscopy: TFM)が行われた [26] [45-47]. 細胞が移動する際に、接着しているゲルを引っ張り、変形させる. このゲル内に分散していたビーズが動き、ビーズが動いた距離からトラクション力を見積もることができる. この手法を用い、最近では 3 次元的に細胞のトラクション力が計測されている. 3 次元計測から、ゲル中のビーズが垂直方向にも引っ張られていることが分かり、トラクション力は水平方向だけでなく、垂直方向にも発生していることが報告された [48-52]. しかし、ビーズはゲルの中でランダムかつ低密度で分散しているため、ビーズが一度動くと本来の位置に戻るまで時間がかかることや、柔らかいシートと同様に局所的な力によって全体が変形してしまうなどの問題がある.

Table 1.2 基板の硬さとトラクション力

Method / Material	Mechanical characteristic of the substrate	Measured force by unit area (Max.)	Cell type	Reference No. (Year)
Embedded markers /Polyacrylamide gel	6.2 kPa	10 nN/ μm^2	3T3 (Fibroblast)	[26] (1999)
Embedded markers /Polyacrylamide gel	28 kPa	2-10 nN/ μm^2	3T3 (Fibroblast)	[31] (2001)
Micro patterned Substrate /Polydimethylsiloxane	12-1000 kPa	5.5 nN/ μm^2	Human foreskin fibroblasts	[42] (2001)
Micro cantilever /Si	8×10^{-4} N/m	1.5 nN/ μm^2 3nN/接着斑	CEF (Fibroblast)	[53] (1997)
Micro pillar /Polydimethylsiloxane	32×10^{-3} N/m	4 nN/ μm^2	NIH/3T3 (Fibroblast)	[54] (2003)
Micro pillar / Polydi methylsiloxane	$1-20 \times 10^{-3}$ N/m	3.8 nN/ μm^2	Madin-Darby canine kidney(MDCK)	[55] (2005)
Micro pillar / Polydimethylsiloxane	$4-80 \times 10^{-3}$ N/m	10 nN/ μm^2	REF52 (Fibroblast)	[9] (2012)
Micro pillar / Polydimethylsiloxane	$2-90 \times 10^{-3}$ N/m	8 nN/ μm^2	Mouse embryonic fibroblasts (MEFs)	[56] (2012)

一方、細胞のトラクション力を計測する方法として、Si で製作されたマイクロカンチレバーを用いた手法がある [53]。細胞がカンチレバーの先端に接着し、引っ張ることでカンチレバーがひずむ。カンチレバー先端の変形を顕微鏡で観測することでトラクション力を推定した。しかし、この手法は顕微鏡を用いてカンチレバーの変形を観測するため、カンチレバーの変形が顕微鏡で観測できる距離より (約 100 nm) 十分大きくなるように、カンチレバーのバネ定数を小さくする必要がある。そのため、カンチレバーのサイズが大きくなり、多くのカンチレバーをアレイ化することは難しい。また、1 軸の力しか計測できないという欠点がある。

細胞内の複数の場所の力を計測する手法としては、Si や Polydimethylsiloxane (PDMS) で製作されたピラーアレイ基板を用いる手法が挙げられる [27] [35] [54-57]。ピラーアレイ上に細胞を培養すると細胞がピラーのトップに接着し、ピラーを引っ張る。ピラーの変形量を顕微鏡で観測することで細胞のトラクション力が計測できる。ピラーを用いた手法は複数のピラーを高密度で配置できることから、空間分解能が優れている。また、直径を 1~5 μm まで微小化することができる。こうした微細なピラーは約 10 nN の力で十分に变形するため、接着斑一つが発生する力を計測することも可能である [9]。さらに、ピラーの直径や高さを調整することで、ピラーのバネ定数を変え、基板の機械的特性による細胞のトラクション力を調べた報告がある [9]。しかし、ピラーアレイ上で培養した細胞は、細胞の足場がピラーの上面のみに制限されることで、細胞と基板間の接着面積が小さいため、本来の細胞が発生す

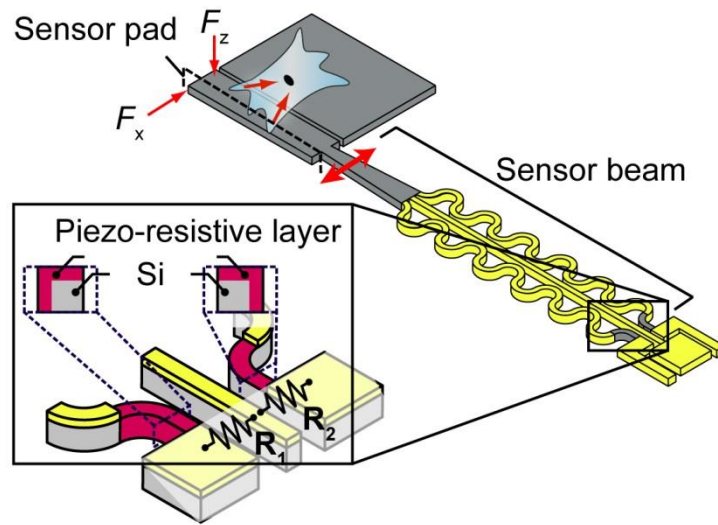


Fig. 1.3 提案するトラクション力計測方法の概略図

るトラクション力と異なる可能性がある．実際に，ピラーアレイの基板上に培養した細胞はその形状や行動が異なるという報告もある [58] [59]．

一方，直径 $1\ \mu\text{m}$ のピラー上で細胞を 14 時間培養したときに，細胞面積が平面で培養した時と同じになったことから，ピラー構造は細胞に影響を与えないという研究が報告された [57]．しかし，この研究でのピラーの高さは $2\ \mu\text{m}$ であり，使用した細胞の厚みよりも小さかった．そのため，ピラーのトップ上のみではなく，基板の底に接着して細胞が成長した可能性がある．

これまで述べた従来研究の手法，基板の機械的特性，トラクション力の大きさ，細胞の種類について **Table 1.2** に示す．まとめると，細胞のトラクション力は基板が硬くなるにつれて大きくなる傾向がある．また，PDMS や Si のような基板材料がもつ固有のヤング率より，ピラーやカンチレバーのバネ定数の方が細胞のトラクション力に与える影響が大きいと考えられる．この結果は，細胞は基板を水平方向に引っ張ることで基板の硬度を感知していることを示唆している [60]．つまり，細胞の感知機構は基板と直接結合されている接着タンパク質のみではなく，接着斑につながるアクチン線維とそれにかかる張力などが関わっている可能性もある．

1.2.4. 従来の研究における課題

細胞のトラクション力を計測・評価する手法としては，シリコンゴムシートに生じる皺の解析，TFM によるトラクション力の計測，マイクロカンチレバー，ピラーアレイ基板を用いたものがある．その他にも，Si マイクロカンチレバーを細胞の横から当てて接着させ，引っ張られたカンチレバーの変形量から細胞のトラクション力を観測する手法もある [61] [62]．PDMS を用いて製作したカンチレバー

上に細胞を接着させ、カンチレバーの変形を顕微鏡により観測し、せん断応力を求めた研究もある [63] [64]. しかし、これらの研究は力の大きさを顕微鏡で観測して評価している. 細胞のトラクション力による基板の変形が 100 nm 以下である場合は顕微鏡を用いた観測が難しいため、硬い基板上でのトラクション力の計測は困難である.

そのため、本論文では、トラクション力を計測する新たな手法としてピエゾ抵抗型カンチレバーを用いる. この手法では 1 ppm のひずみが検出可能である. 例えば、センサの長さが 1 mm のときに、1 nm の歪を検出することができる. バネ定数が 0.1 N/m の基板の変形を測定する場合、顕微鏡の観測では、100 nm の変形まで計測できるため、力の分解能は 10 nN となるが、ピエゾ抵抗型カンチレバーを用いた手法では、100 pN まで力を計測することが可能である. このように、ひずみに対する感度が大きいピエゾ抵抗効果を用いれば、硬い基板上で細胞のトラクション力を計測することができる.

1.3. 本研究で提案するトラクション力の計測方法

1.3.1. 提案するトラクションカセンサ手法の概要

本研究で提案するトラクション力の計測方法について述べる. 本研究では、ピエゾ抵抗型カンチレバーを用いた. カセンサを製作し、センサ上に細胞を培養することで力を直接計測する. 提案するトラクション力計測方法の概略図を Fig. 1.3 に示す. 一つのカセンサは細胞を培養するパッド部分と力を検出するビーム部分に分かれる. センサパッドのサイズを細胞より小さく製作することで、細胞は隣接するパッド構造にまたがって伸展する. このとき、パッド上で接着している細胞がトラクション力を発生するとビームがひずむ. ビームは表面と側面にピエゾ抵抗層が形成されているため、ひずみが加えられた場合、これらのピエゾ抵抗層の抵抗値が変化する. したがって、ピエゾ抵抗層の抵抗値変化を計測することでビームに加えられた力の大きさを検出することができる.

カセンサのパッドの上面は細胞の足場となる. パッド部分に細胞外マトリックスの一種であるフィブロネクチンをコーティングすることで、実際の細胞の足場に近い環境にすることができる. センサのパッドは従来のピラーアレイのような特殊な構造ではなく、平面構造であり、トポグラフィーによる細胞への影響が小さいことが期待される. さらに、パッド間のギャップを 3 μm と小さくしたため、細胞の足場となる接着面積を大きくとることができる.

本研究で用いるピエゾ抵抗は金属ひずみゲージに比べて 50 倍以上の高いゲージ率を持ち、表面だけではなく、側面にも形成することで、水平方向の力も高感度で計測できる. Fig. 1.3 に示すように、一つのカセンサに二つのピエゾ抵抗 R_1 および R_2 を形成した. 本研究で形成したピエゾ抵抗素子の場合、ピエゾ抵抗層の抵抗値は引張りひずみに対して減少し、圧縮ひずみに対して増大するので、例えば、パッドが上昇（降下）したときには、 R_1 , R_2 とともに増大（減少）する. 一方、パッドが根本側からみて右（左）へ動くと、 R_1 は減少（増大）し、 R_2 は増大（減少）する. 従って、このカセンサの水平、垂直方向の力に対する抵抗値変化量を特性行列として求めておけば、パッドに対して上下左右どちらの向きにどれだけの力が働いたかを算出することができる. カンチレバーのバネ定数が 0.1 N/m になる

ように設計し、硬さが従来研究の10倍のときのトラクション力を計測する。一つの接着斑(1~5 μm^2)からの力が60 nN程度であるのに対して [9], 提案する力センサの分解能は10 nN程度であるため, 細胞のトラクション力は十分に計測可能である。

1.3.2. 本研究の意義と位置付け

本研究では, 細胞を計測対象とし, MEMS(Micro Electro Mechanical Systems)プロセスにより力センサを実現したという点で工学分野と生物学分野にまたがる研究である。硬い基板上での細胞の運動及びトラクション力が定量的に評価できれば, 分化や癌細胞化といった細胞生理現象に関する理解につながるだけでなく, 様々な分野に応用できるようになると考えられる。例えば, 金属, セラミクスなどで製作された人工臓器などを生体に移植するときに, 細胞の反応を予想できる。さらに, 基板の剛性という細胞にとっての外部環境による, 細胞運動の制御方法を確立することにつながる可能性があり, 意義深いといえる。

また, 顕微鏡による観測ではなく, ピエゾ抵抗を用いて細胞の力を直接, リアルタイムで計測した点が本研究の独創的なところである。

本研究は, こうした技術的要求に応えたものであり, 細胞活動に伴う力学的信号を直接かつ定量的に計測するための基盤技術として貢献できるものと考えられる。

1.4. 本論文の構成

本論文は, 6章で構成される。以下に各章の概要を示す。

第1章 序論

本研究の目的について述べ, 本研究の背景とそれに関連する従来の研究および研究手法についてまとめる。また, 提案するトラクション力の計測方法の概要を述べ, 特色・独自性・意義を示す。

第2章 原理

本研究で製作したトラクション力センサの力検出原理について述べる。また, ピエゾ抵抗効果について述べ, 水平および垂直方向の力を計測するためのピエゾ抵抗層の側面及び表面ドープ, 抵抗値変化を検出するための計測回路, 回路を用いた温度と光の補償方法について述べる。

第3章 設計・製作

マイクロパターン上での細胞が伸展する様子を観察し, センサパッドの寸法やパッド間のギャップを決める。また, 従来研究から硬い基板上での細胞のサイズと力を予想し, 予想した力が計測できる力感度を持ったセンサを設計する。

さらに, 設計をもとにして, トラクション力を検出するためのセンサを試作する方法を述べる。

第4章 センサの基礎特性

試作したセンサの力感度などの基礎特性を評価する。生きている細胞の力をリアルタイムで計測するためにはセンサを 37°C の液体培地の中に入れる必要がある。絶縁層の厚さとセンサ特性の関係や、実験で用いたホットプレートや液体培地の影響なども評価した上で、実験方法を最適化する。さらに、ロックインアンプを利用することで、検出できる力の分解能を向上した。本研究の目的を達成するために構築した実験セットアップについて説明する。

第5章 トラクション力の計測

細胞を培養するためのセンサのコーティングなど、センサ上に細胞を培養するときの前処理などについて述べ、トラクション力を計測する。その後、計測したトラクション力について評価と考察を行う。まず、単細胞の力について述べ、次に複数細胞の力について議論を行う。また、動画を元に細胞の面積、移動の軌跡の解析を行い、トラクション力と関連付けて議論を行う。

第6章 結論

本研究によって得られた結果についてまとめ、結論及び今後の展望を述べる。

第2章 理論

2.1. はじめに

本章では、 piezo抵抗型カンチレバーを用いてトラクション力を検出する原理について述べる。シリコンの表面と側面にpiezo抵抗層を形成することで、 x 軸方向および z 軸方向のひずみに応じた抵抗変化を得ることができる。次に、材料力学を用いてカンチレバーの変形と抵抗値変化の関係について解析を行う。また、抵抗値変化を検出するための計測アンプ回路の入出力特性について述べる。

2.2. piezo抵抗型カンチレバーを用いたカセンサの計測原理

2.2.1. piezo抵抗を用いたトラクションカセンサの設計

本研究では、トラクション力を計測する手法として、piezo抵抗型カンチレバーを用いる。1.1節にコンセプト図 (Fig. 1.3) を示したように、センサは細胞を培養するパッド部分と力検出のためのpiezo抵抗層が形成されたビーム部分に分かれる。カンチレバーのパッド部分に力が加わると、ビームにひずみが生じ、このひずみに応じて、piezo抵抗型カンチレバーの抵抗が変化する [65]。よって、シリコンウェハの表面と側面にpiezo抵抗層を形成することで、 x 軸方向と z 軸方向のトラクション力が計測できる。

カンチレバーのヒンジ部分は3本のビームで構成され、真ん中のビームを電極として設ける。これによって、表面及び側面の二つの抵抗 R_1 [Ω], R_2 [Ω]から x 軸、 z 軸方向の力を区別することができる。さらに、カンチレバーの支持部分を真っ直ぐなビーム形状よりうねったスプリング形状にすることでバネ定数を低減した。また、ビームのパターンをスプリング状にすることで、プロセスの時にレジストのパターニングが基板から剥がれることを防ぐ [66]。

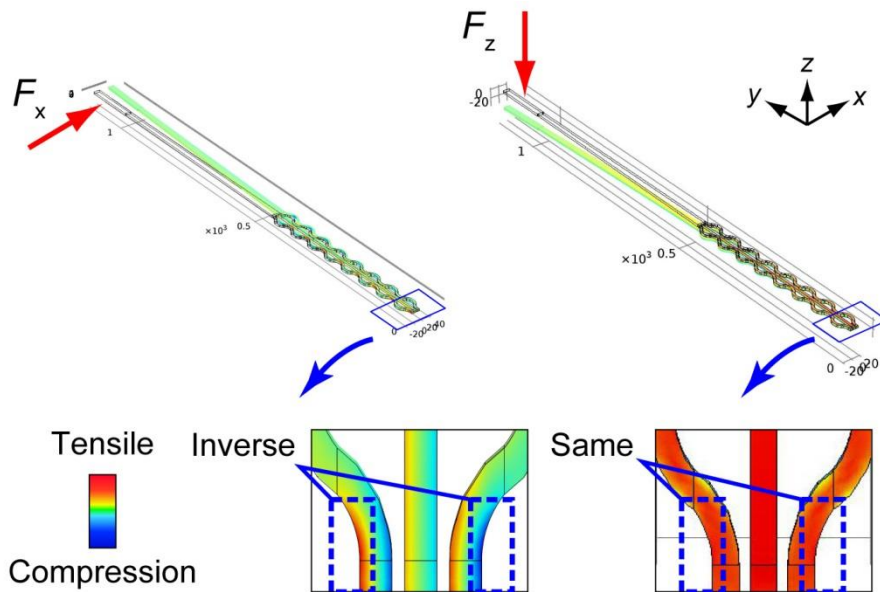


Fig. 2.1 x 軸方向と z 軸方向に力を加えた時のカンチレバー根本のひずみ分布のシミュレーション

2.2.2. サイドドーブ

本研究では Fig. 1.3 に示すように x 軸と z 軸方向の力を計測するため、カンチレバービームの表面と側面にピエゾ抵抗層を形成する [67] [68]。Fig. 2.1 は有限要素法によるひずみ解析結果である。 x 軸方向の力に対して、ひずみは側面に集中するため、ピエゾ抵抗層を側面に形成すると x 軸方向の力を計測することが可能である。また、ピエゾ抵抗は引張と圧縮のひずみに対して抵抗変化の正負が逆になる。従って、 x 軸方向に力が加えられると、 $R_1 [\Omega]$ 、 $R_2 [\Omega]$ の一方で抵抗値が増大し、他方では減少する。一方で、垂直方向に力が加えられた場合には、 $R_1 [\Omega]$ 、 $R_2 [\Omega]$ とともに抵抗値が増大あるいは減少する。そこで、 $R_1 [\Omega]$ 、 $R_2 [\Omega]$ の差を計測することで x 軸方向の変位のみを検出できる。

本研究では、熱によりリンイオンを拡散することで n タイプのピエゾ抵抗層を形成する。そこで、側面ドーブをするために SOI ウェハにあらかじめ垂直に穴を開け、不純物拡散を行う。まず、Deep-RIE (Inductive Coupled Plasma Reactive Ion Etching) を用い、異方性エッチングを行うことで、穴を垂直にエッチングする。次にウェハの洗浄後、ドーパンドを塗布することで開けた穴をドーパンド液で満たし、熱拡散することで穴の壁面にピエゾ抵抗層を形成する。

2.2.3. ピエゾ抵抗効果

ピエゾ抵抗層はシリコンに比べて電気伝導度が十分高いので、シリコンの表面にピエゾ抵抗層を形成した場合、電流はほとんどピエゾ抵抗層に流れる。電気抵抗 $R [\Omega]$ のピエゾ抵抗層に張力が加えられた時に、ひずみによって ΔR の抵抗変化が生じる。Fig. 2.2 に示すように、ピエゾ抵抗素子断面にせん断応力が加わった場合の抵抗変化率 $\Delta R/R$ は式(2.1)のように表される [69]。

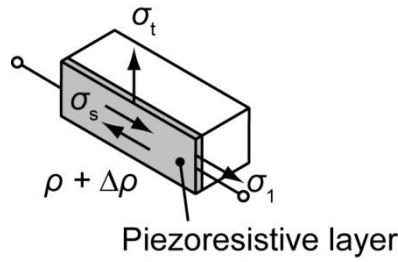


Fig. 2.2 応力によって生じたひずみと比抵抗変化

$$\frac{\Delta R}{R} = (1 + 2\nu) \cdot \varepsilon + \frac{\Delta\rho}{\rho} \quad (2.1)$$

このとき、 ε [-]はピエゾ素子の長手方向に生じたひずみ、 ν [-]は抵抗素子のポアソン比、 ρ [$\Omega \cdot \text{m}$]は比抵抗である。半導体結晶では、式 (2.1)の第2項の比抵抗変化が100から150程度となり、第1項に比べて非常に大きいため、第1項は無視できる。ひずみにより、比抵抗が変化する効果をピエゾ抵抗効果と呼ぶ。シリコンのピエゾ抵抗係数やヤング率には異方性がある。Table 2.1とTable 2.2にp型とn型シリコンの結晶方向におけるピエゾ抵抗係数とヤング率を示す [70-73]。

Fig. 2.2で示すような構造に生じる応力は長手方向の σ_l [Pa]、横手方向の σ_t [Pa]、せん断方向の σ_s [Pa]である。このとき、長手方向の比抵抗変化率は

$$\frac{\Delta\rho}{\rho} = \pi_1 \cdot \sigma_1 + \pi_t \cdot \sigma_t + \pi_s \cdot \sigma_s \quad (2.2)$$

と表される。ピエゾ抵抗係数 π_1 [Pa^{-1}]、 π_t [Pa^{-1}]、 π_s [Pa^{-1}]はそれぞれ長手方向、横手方向、せん断方向に対するものとする。本研究では、厚み $5 \mu\text{m}$ のシリコンの構造に厚みが約 100 nm 以下の非常に薄いピエゾ抵抗層を形成する。センサの形状が長く、ピエゾ抵抗層が非常に薄いため、長手方向の曲げによる応力 σ_1 が加わった場合に横手方向とせん断方向の応力はほとんど発生しないと仮定し、式 (2.2)の第2項以下は無視できるものとする。本研究ではp型のシリコンにn型のピエゾ抵抗層を形成し、プロセス加工のしやすさから $\langle 1, 1, 0 \rangle$ 方向にセンサを製作した。こうして製作されたピエゾ抵抗素子の比抵抗変化率 $\Delta\rho/\rho$ は

$$\frac{\Delta\rho}{\rho} = -31 \times 10^{-11} \cdot \sigma_1 \quad (2.3)$$

となる。ピエゾ抵抗係数の符号が負であるため、ピエゾ抵抗領域に引っ張り応力が加えられたときに抵抗値が減少する。

Table 2.1 シリコンの結晶方向とピエゾ抵抗係数

結晶方向	π_1 [Pa ⁻¹]
p-Si <1,0,0>	6.6×10^{-11}
p-Si <1,1,0>	72×10^{-11}
n-Si <1,0,0>	-102.2×10^{-11}
n-Si <1,1,0>	-31×10^{-11}

Table 2.2 シリコンの結晶方向とヤング率

結晶方向	ヤング率 [GPa]
<1,0,0>	129.5
<1,1,0>	168.0
<1,1,1>	186.5

2.2.4. カンチレバーの変形と抵抗値変化

ここでは簡略化した設計モデルを用いて、センサの先端部分に x 軸と z 軸の力が加えられたときのセンサの応答に関する考察を行う。Fig. 2.3 に x 軸方向のセンサモデル及びピエゾ抵抗領域を、Fig. 2.4 に z 軸方向のセンサモデル及びピエゾ抵抗領域を示す。カンチレバーのビームは電極を分離するため3本の足がある。 x 軸方向と z 軸方向の外力はカンチレバーの自由端からはたらくものとする。全体の長さは l [mm]、ピエゾ抵抗はカンチレバーの根本から l_1 [mm]の位置までに形成されている。カンチレバーの足の幅は w_0 [mm]、厚さは t [mm]とする。また、カンチレバーに対して Fig. 2.3 に示す x - y - z 座標系を設ける。このとき、 x 、 z 軸の2つの梁モデルに関して、ピエゾ抵抗層のひずみ $\varepsilon(x)$ [-]は

$$\varepsilon(x) = \frac{M(x)}{EI_a} \cdot H_a \quad (2.4)$$

と計算できる。 E [Pa]はヤング率、 I_a [mm⁴]と H_a [mm]は x 、 z 軸方向のそれぞれの断面2次モーメントと中立軸からの距離である。これらの梁に関して左端から x [mm]の位置でのモーメント M [mm·N]は

$$M(x) = -F(l - x) \quad (2.5)$$

で与えられる [74]。但し、 F [N]は各梁の先端に加えた力である。 x 軸方向のセンサモデルでは断面2次モーメントは加法定理により、

$$I_x = I_1 + I_2 + I_3 = \int_{-w_3}^{-w_2} y^2 t dy + \int_{-w_1}^{w_1} y^2 t dy + \int_{w_2}^{w_3} y^2 t dy \quad (0 < x < l_1) \quad (2.6)$$

のように計算される [74]。

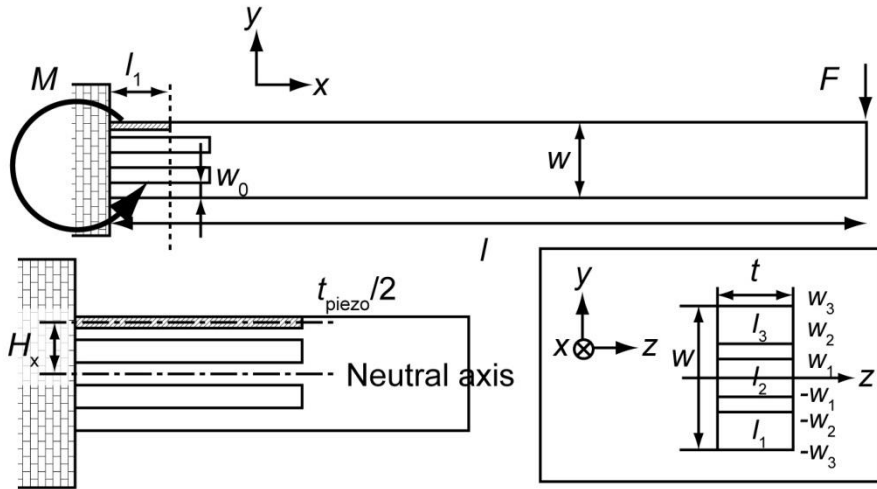


Fig. 2.3 x 軸方向のセンサのモデル

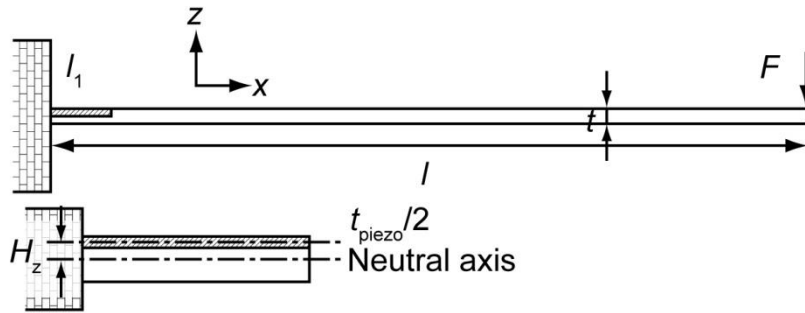


Fig. 2.4 z 軸方向のセンサのモデル

ピエゾ抵抗層はカンチレバーの幅、厚みに比べて十分に薄く、平均化ひずみを求めるため、中立軸からの距離 H_x は中立軸からピエゾ抵抗層の厚みの半分までとした。このため、 H_x は

$$H_x = \frac{(w - t_{\text{piezo}})}{2} \quad (2.7)$$

となる。

一方、z 向のセンサのモデルでは断面 2 次モーメントは

$$I_z = \frac{w_0 t^3}{4} \quad (0 < x < l_1) \quad (2.8)$$

と計算される。中立軸からの距離 H_z は

$$H_z = \frac{(t - t_{\text{piezo}})}{2} \quad (2.9)$$

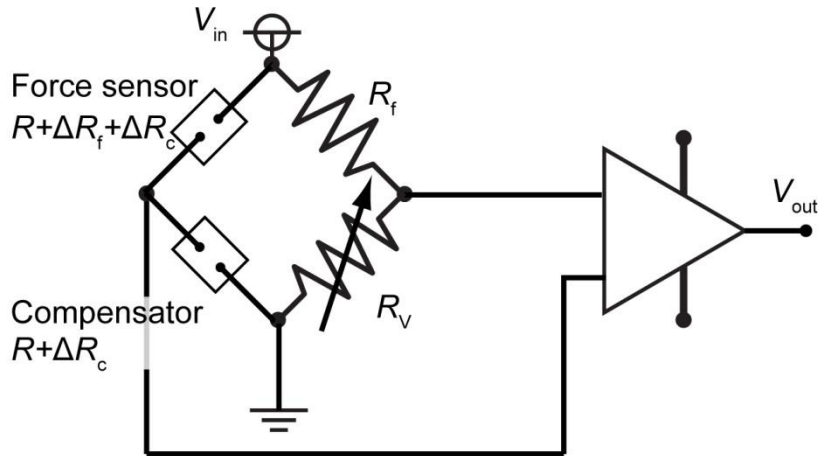


Fig. 2.5 抵抗変化を検出するための計測回路の概念図

となる。

カンチレバー先端に力 F [N]を加えたときの左端から l_1 の位置でのひずみは、式(2.4), 式(2.5), 式(2.6), 式(2.7)からに関する式をまとめると

$$\varepsilon(a) = \frac{\int_0^{l_1} \frac{F(x-l)}{EI_a} \cdot H_a dx}{l_1} \quad (2.10)$$

と書き表すことができる。よって、カンチレバーの先端に力 F [N]が加わったときの抵抗値の変化率は

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{\pi_1 H_a}{l_1} \int_0^{l_1} \frac{F(x-l)}{I_a} dx \quad (2.11)$$

と求めることができる。

2.2.5. 抵抗値変化の計測回路

次にトラクションカセンサの抵抗値変化の計測方法について述べる。Fig. 2.5 にトラクションカセンサの計測回路の概念図を示す。ホイーストブリッジ回路を用い、抵抗値の変化量を電圧の変化量に変換し、アンプ回路で出力電圧を増幅して信号を計測する。 R_f [Ω]は固定抵抗、 R_v [Ω]は可変抵抗である。ピエゾ抵抗層はひずみ以外にも光、温度などにも敏感に反応するため、式(2.12)のようにカセンサの抵抗値の変化量には力による R_f [Ω]と光、温度などの外部の影響による R_c [Ω]が含まれている。そのため、光、温度などにはカセンサと同じく反応するが、力には反応しない補償センサを製作し、ブリ

$$\Delta R_{\text{total}} = \Delta R_f + \Delta R_c \quad (2.12)$$

ブリッジ回路に組むことで R_c [Ω] を補償することにした。このとき、抵抗変化率 $\Delta R_f/R$ [-] と計測電圧 V_{out} [V] の関係式は

$$V_{\text{out}} = \frac{\frac{\Delta R_f}{R}}{2(2 + \frac{\Delta R_f + 2\Delta R_c}{R})} \cdot G \cdot V_{\text{in}} \quad (2.13)$$

と表される [75]。 G はアンプの増幅率である。また、 $(\Delta R_f + 2\Delta R_c) / R \ll 2$ であるため、電圧の変化量と抵抗値の変化量は

$$V_{\text{out}} \cong \frac{\Delta R_f}{4R} \cdot G \cdot V_{\text{in}} \quad (2.14)$$

となる。したがって、本研究ではホイーストブリッジ回路の出力から電圧変化を検出し、式(2.14)を用いて各ピエゾ抵抗の抵抗変化量を算出する。

2.3. 本章のまとめ

本章では、ピエゾ抵抗型カンチレバーを用いた力センサの計測原理について説明した。水平および垂直方向の力を計測するためのピエゾ抵抗層の表面と側面ドーブ、抵抗値変化を検出するための計測回路、温度と光に対するセンサ応答の補償方法について述べた。

第3章 設計・製作

3.1. はじめに

本章では、細胞の特徴を抽出するとともに、マイクロパターニングされたシリコン基板上で細胞が伸展する様子を確認し、センサパッドを設計する。また、硬い基板上における細胞のトラクション力を予想し、予想されるトラクション力や細胞のサイズ、シリコン基板上に培養した細胞の特徴から、力センサの要求仕様について述べる。さらに、予想される細胞の力からシミュレーションを行い、センサの寸法を決定する。これらの情報を基に、細胞を培養するパッドと力を検出するビームを持ったトラクション力センサの設計を行い、その設計に沿ってセンサを試作する。

全ての力学的シミュレーションは、有限要素法ソフトウェア COMSOL multiphysics ver.4.2a(計測エンジニアリング株式会社)を用いて行った。

3.2. 細胞の特徴

3.2.1. 接着斑を介して発生するトラクション力

本研究で計測対象とした細胞は、p53 ノックアウトマウス由来大動脈平滑筋細胞株(P53LMAC01)とウシ大動脈平滑筋細胞(Bovine aortic smooth muscle cells, BAOSMCs)である。平滑筋細胞は血管、消化管、子宮などにあり、例えば消化管においては筋収縮による消化物運搬を担っている [19]。しかし、平滑筋は横紋筋とは違いサルコメアがない。

Fig. 3.1 にシリコン基板上で2時間培養した平滑筋細胞 (P53LMAC01) を示す。基板上にまだ接着せず、骨格が形成されてない細胞は丸い形をしている(**Fig. 3.1(a)**)。これに対し、基板上に接着している細胞の幅は大体 20 μm 以上である。24時間後には細胞が細長いポリゴンの形になり、長さが 100 μm 以上に伸びるのが観察された(**Fig. 3.1(b)**)。各々の細胞の成長速度は異なるため、細胞の成長を論じるパラメータは培養時間ではなく、基板上で接着している細胞の面積とする。

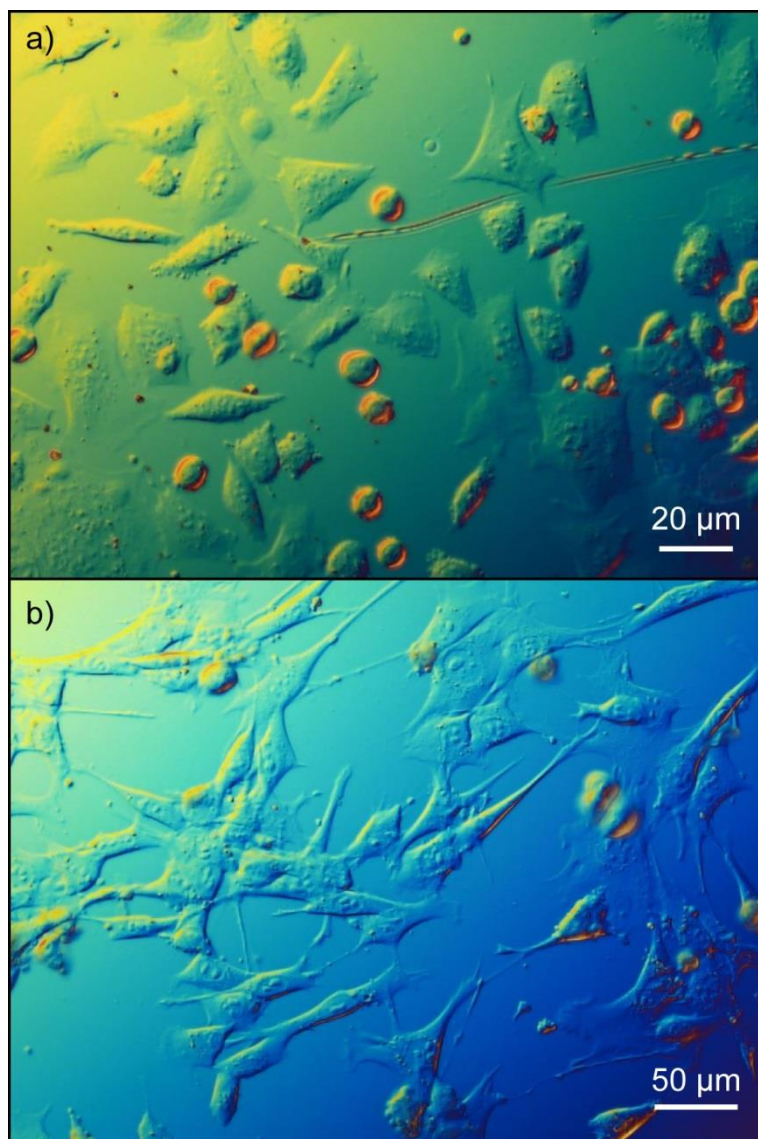


Fig. 3.1 シリコン基板上の P53LMACO1 の様子 a)基板上に培養してから 2 時間後, b)1 日後.

第 1 章で述べたように、トラクション力はアクチン線維上でのミオシン運動により生じ、アクチン線維は成熟した接着斑(Focal adhesion, FA)に結合する。接着斑が分解されるとアクチン線維とのリンクも切れ、基板に接着する前の段階に戻る。Fig. 1.2 に示すように、接着斑の中にはタリンというタンパク質が存在している。したがって、タリンの位置はアクチン線維がリンクされた接着斑の位置であり、その位置は細胞によって基板が引っ張られる際に作用点として働く。Fig. 3.2 にタリンを蛍光染色した平滑筋の写真を示す。細胞全体にタリンが分布しているが、特に細胞の境界に多く分布している。細胞の表面と基板の間には接着斑があり、細胞のトラクション力は必ず接着斑を介して発生するため、接着斑が多く分布している細胞の先端部分でトラクション力が強く発生する。そのため、細胞は境界の部分で接着基板を強く引っ張っていることが推測できる。従来研究でも細胞の境界で最も大きい力が出ていることが報告された [55]。細胞はこのように細胞膜の全面が基板に接着しているのではなく、

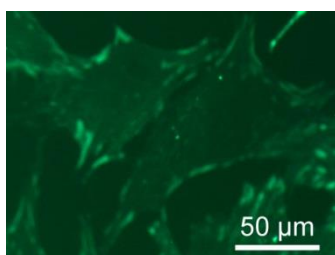


Fig. 3.2 タリンを染色した細胞の蛍光写真

細胞表面に存在する接着タンパク質を介して基板と結合している。そのため、細胞が基板に及ぼす力は各々の接着斑を介して出す力の合力であるといえる。従来研究では基板の剛性が 0.08 N/m の PDMS マイクロピラー上に線維芽細胞を培養し、一つの接着斑が基板を引っ張る力は単位面積 $1 \mu\text{m}^2$ 当たり約 10 nN であると報告している [9]。従来研究からの情報を基に、PDMS マイクロピラーより剛性が高い基板上で平滑筋細胞を培養したときに細胞が発生するトラクション力は単位面積 $1 \mu\text{m}^2$ 当たり約 10 nN より大きいことが予想できる。本章では、シリコン基板上に細胞を培養したときの細胞のサイズやマイクロパターン上での細胞の特徴を調べ、トラクション力センサの設計を行う。

3.2.2. マイクロパターン上での細胞

細胞の力が計測できるデザインを決めるために、ギャップ上での細胞の形態、成長様子などの細胞の特性について述べる。従来研究では細胞をマイクロピラー上で培養している [9]。また、細胞の糸状仮足は $5\sim 15 \mu\text{m}$ まで伸びるため、細胞は $5 \mu\text{m}$ 程度のギャップをまたぐことができると考え、マイクロパターンングした基板上に細胞を培養し、特徴を調べた。Fig. 3.3 にピラーアレイのパターンとアレイ上に培養した細胞のタリンを染色した蛍光写真を示す。二つの蛍光染色した細胞があり、一つは溝のなかに落ちている、もう一つは二つのピラーの間に引っかかり、溝をまたいで両側にあるピラーの上面に接着し伸びている。ピラーの横幅と縦幅の長さは $25 \mu\text{m}$ 、ピラー間の間隔は $20 \mu\text{m}$ である。細胞を基板上に落とすときに、幅が $50 \mu\text{m}$ 以上の大きなピラー上に落とされた場合はそのまま伸展し、隣のピラーにまたがることはなかった。細胞の大きさは約 $10\sim 20 \mu\text{m}$ であり、ピラー間の間隔が $10 \mu\text{m}$ 以下であれば、細胞が溝に落ちることなく、ピラー上で成長できることがわかった。

次に、広い平板と細いビームがあるときの細胞成長の特徴を調べる。厚さ $5 \mu\text{m}$ の SOI ウェハを用い、横、縦幅が $50 \mu\text{m}$ の広い平板を幅 $10 \mu\text{m}$ の細いビームがつないでいる橋のような構造を製作した。Fig. 3.4 に広い平板と細いビームがあるときに細胞が成長する様子を示す。細胞をシリコン基板に播種してから 15 分後の細胞の輪郭を赤い点線、40 分後はオレンジ色の点線、70 分後は黄色の点線で示した。細胞の面積は、細胞播種してから、15 分後には $837 \mu\text{m}^2$ 、40 分後に観察したときは $3235 \mu\text{m}^2$ 、70 分後には $3242 \mu\text{m}^2$ であった。最初の 40 分間は 1 分間 $60 \mu\text{m}^2$ 程度の早い速度で成長しているが、その後の増加した面積は 1 分間に $0.2 \mu\text{m}^2$ 程度であった。この実験から細胞は最初の 30 分間急激に伸展し、細いビームより広い平板の方へ伸びて行くことが分かった。細胞の伸展 (Spreading) は 2 段階に分けられる。最初に細胞が基板に接着して骨格が形成されるまでの受動的な段階と、細胞骨格が形成され、

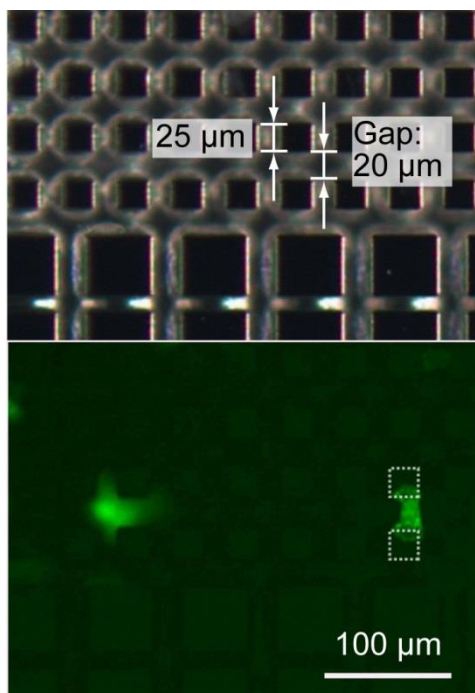


Fig. 3.3 ピラー間にまたがって伸展している細胞

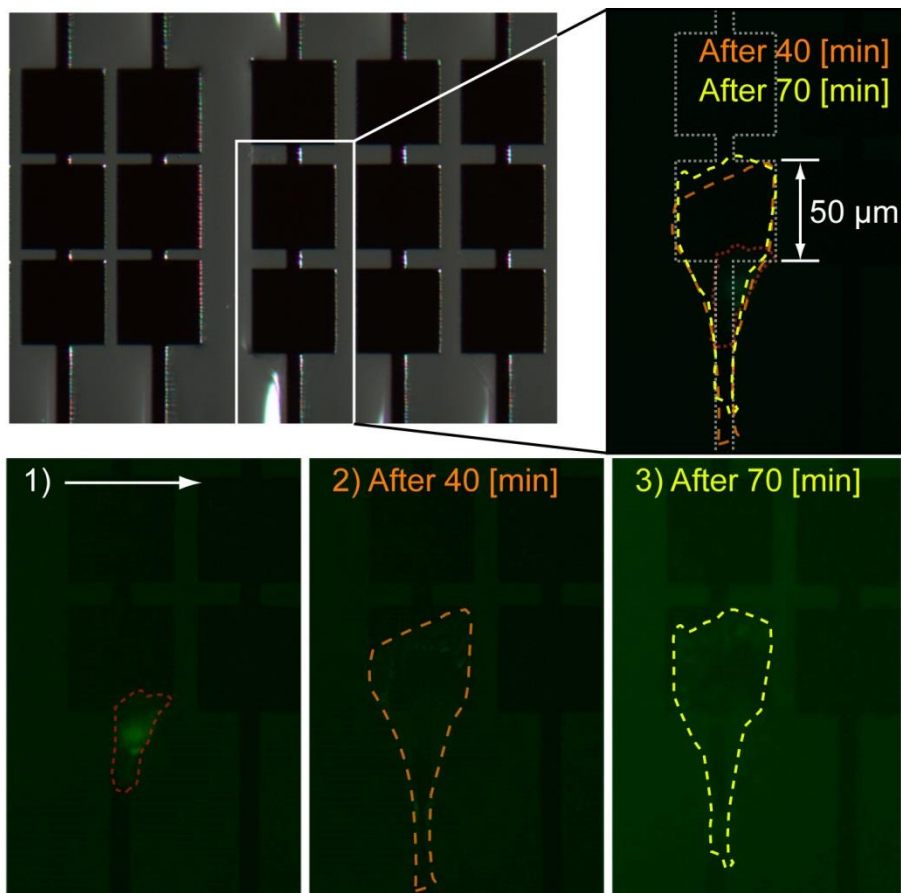


Fig. 3.4 広い平板と細長いビームがあるとき、広いところへ伸展する細胞

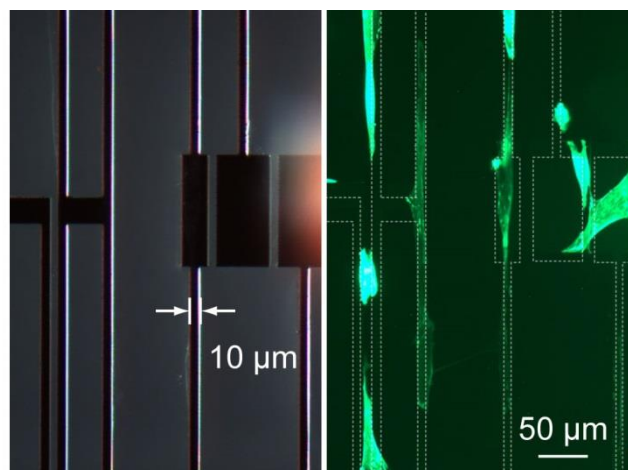


Fig. 3.5 離れた広い平板と細長いビームがあるときの細胞の伸展

細胞が移動を始める能動的な段階の2つである [76]. 最初の段階では細胞が接着し、等方的に急激に伸展するのに対して、次の段階に入ると細胞は移動しはじめる [76]. 細胞の移動は細胞の先端部の端と反対側の端が違う性質を持ち、これによって極性が生じる. そのため、細胞は球形から成長とともに細長い多角形な形状に変化する.

この実験から細胞は細い空間より広い空間を好み、広いところへ伸展することがわかった. 次に、広い平板の間に狭いギャップがある場合と、広い平板に細いビームが接続されている場合に、細胞がどのように成長するかを調べた. 観察のために、シリコンのカンチレバーと両持ち梁を製作し、それぞれの構造上で細胞を培養し、細胞が成長する様子を調べた. カンチレバーの厚さはいずれも $5\ \mu\text{m}$ であり、平板部分の大きさは $50 \times 25\ \mu\text{m}^2$ と $50 \times 100\ \mu\text{m}^2$ である. また、ビーム部分の幅を $10\ \mu\text{m}$ 、隣接する平板間のギャップを $5\ \mu\text{m}$ とした. 両持ち梁構造は $50 \times 25\ \mu\text{m}^2$ と $25 \times 100\ \mu\text{m}^2$ の2種類の構造を試作した. Fig. 3.5 に製作したデバイスと細胞を培養してから20時間後の蛍光写真を示す. 細胞はビームに沿って $400\ \mu\text{m}$ 程度伸びている. 溝をまたいで平板上に成長している細胞もあるが、これは最初からギャップのある平板に乗った場合であり、ギャップを乗り越えて、隣の平板に行くことはなかった. 次に、ビームの横幅を $10\ \mu\text{m}$ から $5\ \mu\text{m}$ に細くし、ビームのサイズが細胞のサイズの $1/2 \sim 1/4$ の場合の成長様子を調べた. 平板間の距離は $5\ \mu\text{m}$ である. Fig. 3.6 に製作したシリコンデバイスとデバイス上に細胞を培養したときの蛍光写真を示す. ビームの横幅は $5\ \mu\text{m}$ であり、核 (約 $10\ \mu\text{m}$) よりも小さいが、細胞はビームに沿って伸展した. つまり、細胞は連続した領域を好んで成長し、ギャップを避ける性質があるということがわかった. 微細構造上での細胞の特徴をまとめると、

- 1) 細胞はより広い空間に向かって伸展する.
- 2) 細胞はギャップを避けるように移動し、ギャップがなければ幅 $5\ \mu\text{m}$ 程度の細いビームに沿って伸びる.
- 3) 平板間のギャップ部分に降下すると、両側の平板上に伸展する.
- 4) 基板に付着してから最初の1時間程度に、細胞は急速に伸展する.

の4点に集約される. これらの特徴から、力センサを設計する際、細胞を培養するパッド部分を細胞より小さく設計すべきであることがわかる. また、細胞はビーム部分に付着しても成長するため、

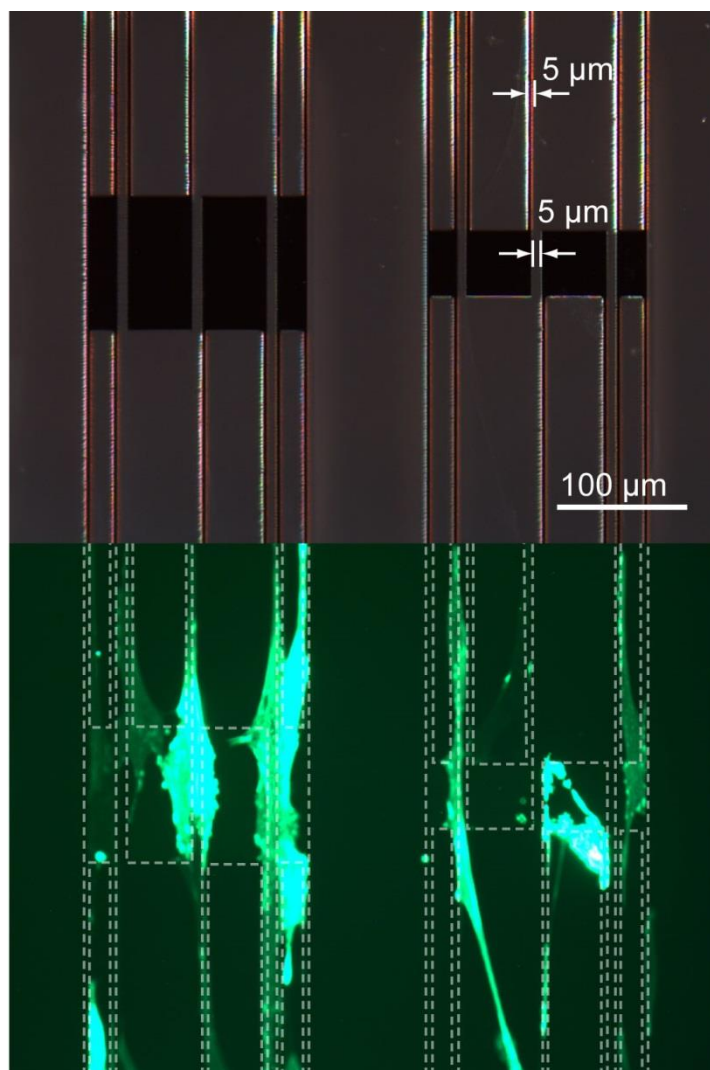


Fig. 3.6 カンチレバーと両持ち梁上での細胞の成長

パッド部分でのトラクション力を正確に計測するためには、細胞がビームに付着しないための工夫が必要となる。

3.2.3. トラクションカセンサの要求仕様

これまで述べた細胞の特徴からトラクションカセンサの要求仕様についてまとめる。浮遊している細胞のサイズは約 $10\sim 20\ \mu\text{m}$ であるため、センサのパッド間の距離は $10\ \mu\text{m}$ 以下にする必要がある。細胞は幅 $5\ \mu\text{m}$ の細いビームでもビームに沿って伸展するので、定量的な評価のためにセンサは細胞を培養するパッド部分と力検出するためのビーム部分に分ける必要がある。また、細胞をセンサ上に落とすときに細胞がビームに付着しないように、ビーム部分をカバーする必要がある。

基板の剛性が $0.08\ \text{N/m}$ のときに、大きさ $1\sim 2\ \mu\text{m}$ の接着斑一つが単位面積当たり約 $10\ \text{nN}$ 程度の力

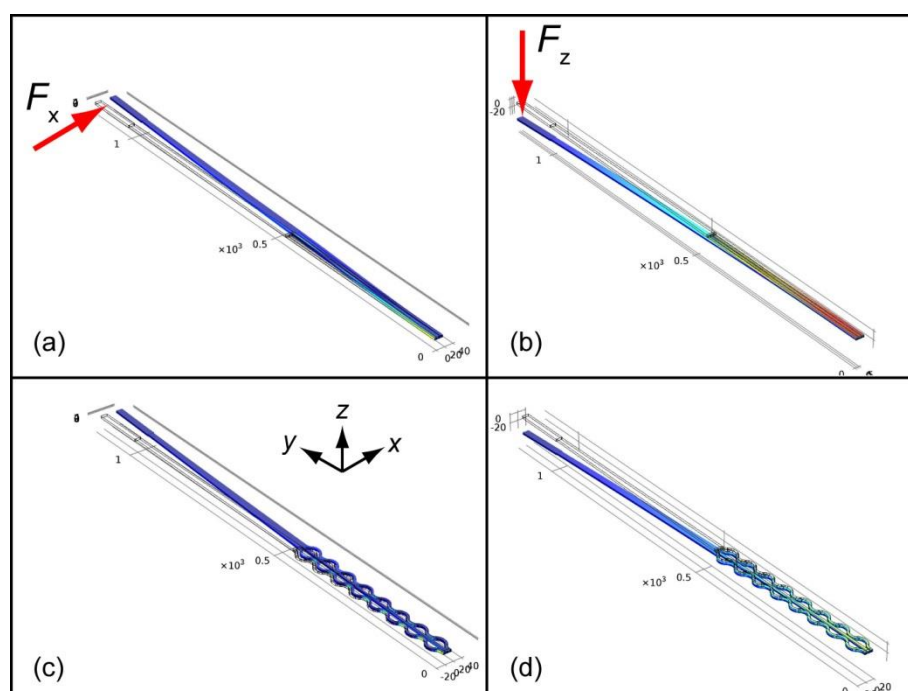


Fig. 3.7 (a)真っ直ぐな形状のビームに x 軸方向の力を与えたとき, (b) 真っ直ぐな形状のビームに z 軸方向の力を与えたとき, (c)スプリング形状のビームに x 軸方向の力を与えたとき, (d) スプリング形状のビームに z 軸方向の力を与えたときのシミュレーション

を発生する [9]ことを参考にすると, 剛性が 0.1 N/m で, $125 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$ のパッドに細胞が接着した場合に, 発生する力は数百 nN であると考えられる. これらの情報を基に 10 nN 程度の力分解能を持つトラクションカセンサを設計する.

3.3. トラクションカセンサの設計

3.3.1. 有限要素法による解析

センサの寸法は MEMS プロセスを考慮して設計した. プロセスに利用するガラスマスクの設計ファイルを有限要素法ソフトウェアに読み込み, 解析を行った. ビームの形状を変え, シミュレーションを行った(Fig. 3.7). これによって求めたビームの形状によるバネ定数 k を Table 3.1 に示す. 真っ直ぐな直線の形状をしているときとスプリング形状をしている場合のそれぞれのバネ定数である. スプリング形状のビームが直線に比べ, 2倍以上柔らかくなっている. 本研究では, ビームをスプリング形状にし, カセンサを製作する.

Table 3.1 シミュレーションから得られたバネ定数

	バネ定数	
	真っ直ぐな形状	スプリング形状
x 軸方向	0.8 N/m	0.36 N/m
z 軸方向	0.06 N/m	0.06 N/m

3.3.2. カンチレバーの変形と抵抗変化率

前節で述べた細胞の特徴と力感度を満たすように、 piezo抵抗型カンチレバーを用いたトラクション力センサの設計を行った。SOI (5/2/300 μm) 基板を用いて製作し、チップ上に複数のトラクション力センサと補償センサを並べるため、チップの大きさは 5.0 mm \times 7.0 mm \times 0.3 mm と設計した。ビーム部分をカバーするカバーチップおよびセンサチップの各パラメータと設計値を Fig. 3.8 および Table 3.2 に示す。本研究では、 $\langle 1,1,0 \rangle$ 方向にセンサを形成したため、シリコンのヤング率は 168.0 GPa となる。センサの全長は $L_{\text{total}}=1130 \mu\text{m}$ である。piezo抵抗層において生じるひずみの平均値は深さの半分の面において生じるひずみに等しいため、中立軸からの距離 H_a は中立軸からpiezo抵抗層の厚みの半分(50 nm)までの距離とした。 x 方向の力によってビームに生じるひずみに対する抵抗変化率 $\Delta R/R$ を式(2.11)から求めると

$$I_x = I_1 + I_2 + I_3 = \int_{-\frac{19}{2}}^{\frac{9}{2}} y^2 t dy + \int_{-\frac{9}{5}}^{\frac{9}{5}} y^2 t dy + \int_{\frac{9}{2}}^{\frac{19}{2}} y^2 t dy \quad (0 < x < L_1) \quad (3.1)$$

$$= 2.6 \times 10^{-21}$$

$$H_x = 9.45 \times 10^{-6} \quad (3.2)$$

$$\frac{\Delta R}{R} = 1.3 \times 10^3 F \quad (3.3)$$

$$I_z = 1.6 \times 10^{-22} \quad (0 < x < L_1) \quad (3.4)$$

$$H_z = 2.45 \times 10^{-6} \quad (3.5)$$

$$\frac{\Delta R}{R} = 5.4 \times 10^3 F \quad (3.6)$$

となる。ここで F の単位は[N]であるため、 x 軸方向の力に対する感度が $1.3 \times 10^{-6} \text{ nN}^{-1}$ であることを示す。 z 方向の抵抗変化率 $\Delta R/R$ は上記のように算出される。 z 方向の力感度は $5.4 \times 10^{-6} \text{ nN}^{-1}$ である。 $\Delta R/R$ は 1×10^{-5} まで応答を計測することが可能であるため、力分解能は 10 nN 程度である。

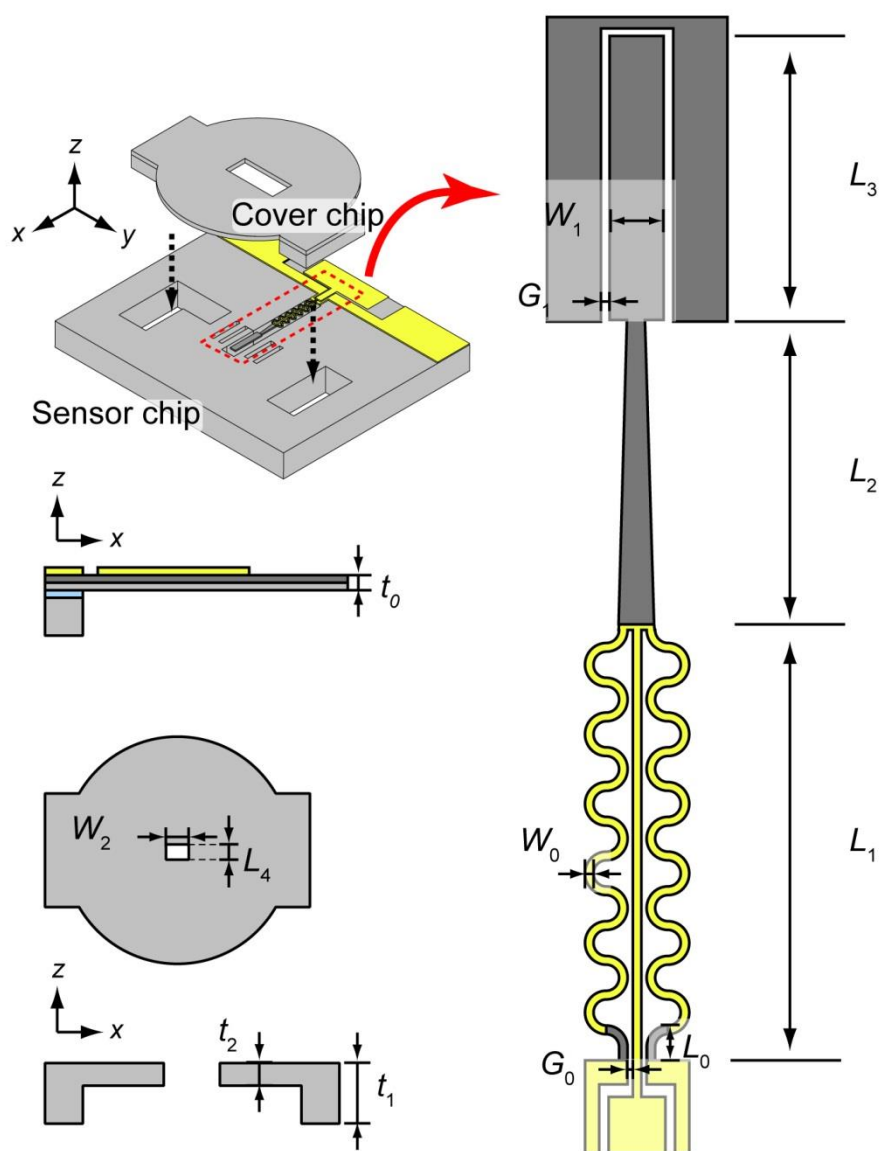


Fig. 3.8 カバーチップとトラクション力センサの各パラメータ

Table 3.2 カバーチップとセンサチップのセンサの寸法

Sensor Chip								
L_0 [μm]	L_1 [μm]	L_2 [μm]	L_3 [μm]	W_0 [μm]	W_1 [μm]	G_0 [μm]	G_1 [μm]	t_0 [μm]
22.5	455	550	125	5	15	2	4	5
Cover Chip								
L_4 [μm]			W_2 [μm]	t_1 [μm]		t_2 [μm]		
100			150	250		100		

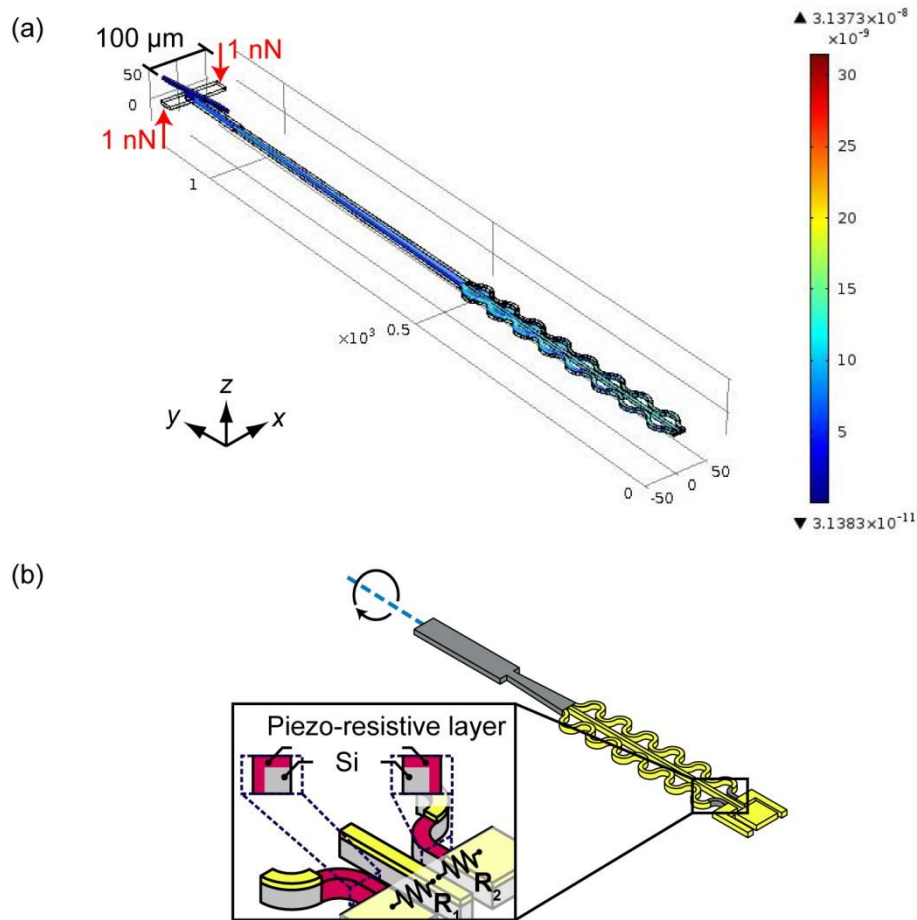


Fig. 3.9 (a) ビームに $0.1 \text{ pN}\cdot\text{m}$ のモーメントを与えたときのシミュレーション, (b) センサビームのピエゾ抵抗層

3.3.3. モーメントと抵抗変化率

Fig. 3.9 に示すように、モーメントによる二つの抵抗変化率を調べるために、COMSOL でシミュレーションを行った。細胞の長さを約 $100 \mu\text{m}$ と仮定した。 $100 \mu\text{m}$ の棒に 1 nN の力が加わると、モーメントは $0.1 \text{ pN}\cdot\text{m}$ となり、このときのひずみを計算した。ひずみ ε [-] と抵抗値変化の関係は式(3.7)のように表される [77]。ピエゾ抵抗係数 K は $\langle 1,1,0 \rangle$ 方向のピエゾ抵抗係数 ($-31 \times 10^{-11} \text{ Pa}^{-1}$) とヤング率 (168.0 GPa) から求めた -52 を用いる。

$$\frac{\Delta R}{R} = K \cdot \varepsilon \quad (3.7)$$

Table 3.3 に $0.1 \text{ pN}\cdot\text{m}$ ($1 \text{ nN} \times 100 \mu\text{m}$) のモーメントが発生したときの二つの抵抗変化率と x 軸方向へ 1 nN が加えられた時の抵抗変化率、 z 軸方向へ 1 nN が加えられた時の抵抗変化率を示す。モーメント

Table 3.3 シミュレーションから得られた抵抗変化率

	$\Delta R_1/R$	$\Delta R_2/R$
モーメント (0.1 pN·m)	-2.3×10^{-7}	2.3×10^{-7}
x 軸方向 (nN ⁻¹)	-4.6×10^{-6}	4.6×10^{-6}
z 軸方向 (nN ⁻¹)	-5.6×10^{-6}	-5.6×10^{-6}

による抵抗変化率が 1 nN の力を x 軸及び z 軸に与えたときの抵抗値変化より十分小さいため、モーメントによる影響は無視できると考えられる。

3.3.4. カバーチップの穴の設計

液体の中にデバイスチップを入れた際にカンチレバー裏の溝に空気がこもらないようにする必要があり、空気が残っている場合は液体が常温から 37 °C に上昇する際に空気が膨張してカンチレバーが浮き上がってしまう。溝の中に空気がこもらないようにできるだけ裏側の穴は大きく設計した。またカバーチップ上にも空気の出入口のために、170 μm×250 μm と 170 μm×270 μm の複数の穴を設計した。

3.3.5. 配線ビームの抵抗値による影響

Fig. 3.10 にトラクション力センサの電気回路モデルについて示す。左右のピエゾ抵抗 R_{OA} [Ω] と R_{OB} [Ω] をチャンネル 1 とチャンネル 2 のブリッジ回路に別々で組むことで、抵抗値変化を検出する。 R_f [Ω] はブリッジ回路に取り組んだ固定抵抗、 R_v [Ω] は可変抵抗であり、 R_{c1} [Ω] と R_{c2} [Ω] は補償センサの抵抗である。Fig. 3.10 に示すように、真ん中の配線ビームの抵抗値 R_o [Ω] は R_{OA} と R_{OB} に共通に含まれている。そのため、チャンネル 1 のブリッジ回路に $V_{ch1,in}$ [V] の電圧がかかった場合、チャンネル 2 にかかる電圧は R_o [Ω] にかかる電圧分だけチャンネル 1 より低くなる。

$$V_{ch2,in} = V_{ch1,in} - \frac{V}{R_o + R_c + R_A + \Delta R_A} R_o \quad (3.8)$$

この節ではチャンネル 1 の抵抗変化がチャンネル 2 に与える影響について考察する。ピエゾ抵抗層のシート抵抗は $R_{piezo}=200 \Omega/sq$ である。ピエゾ抵抗計測の配線材料として用いた金の 25 °C での抵抗率は $\rho_{Au}=2.31 \times 10^{-8}$ 、シリコンとの密着層として用いたクロムの抵抗率は $\rho_{Cr}=12.4 \times 10^{-8}$ である [78]。クロムと金の厚さはそれぞれ 4 nm と 40 nm としたため、式(3.9)よりクロムと金のシート抵抗 R_s は 31 Ω/sq, 0.58 Ω/sq となる [79]。ここで、配線となる領域のシート抵抗はピエゾ抵抗層、クロム、金の多層からなり、各々の抵抗が並列接続した場合の合成抵抗を計算すると $R_{wire}=1.76 \Omega/sq$ となる。

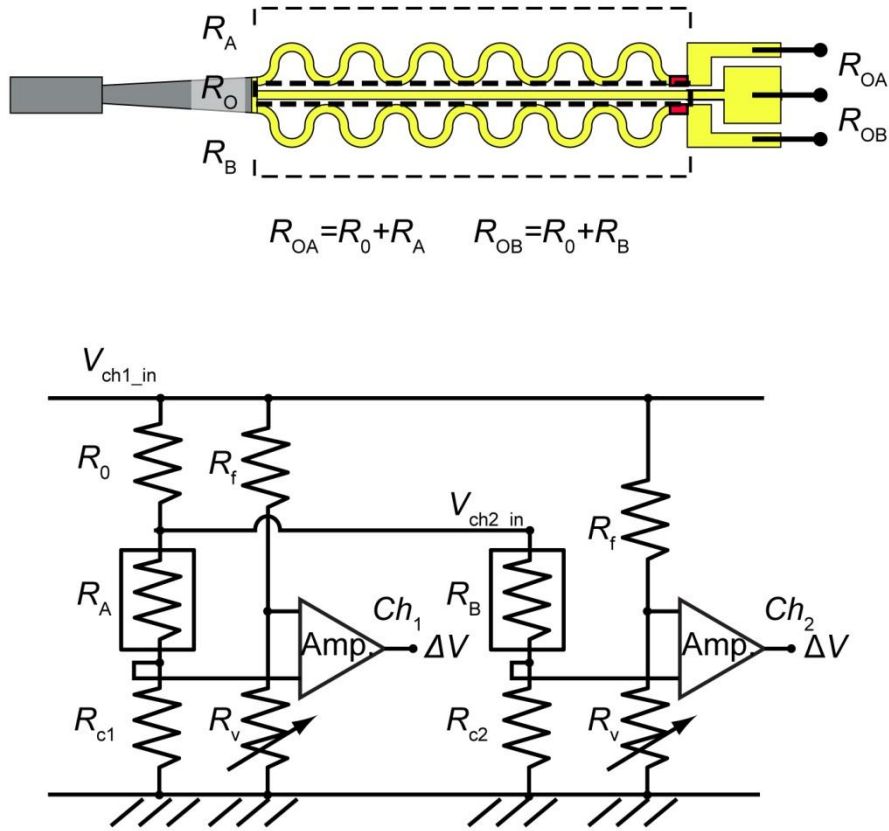


Fig. 3.10 抵抗変化を検出するための計測回路の概念図

配線用の真ん中のビームの長さが $450\ \mu\text{m}$ 、幅が $5\ \mu\text{m}$ であるとき、ビームの抵抗値は R_{wire} を用いて計算するとビームの抵抗値は約 $160\ \Omega$ である。

$$R_s = \frac{\rho}{t} \tag{3.9}$$

計算の便宜のため、 R_A の初期抵抗は $840\ \Omega$ 、 R_{c1} は $1\ \text{k}\Omega$ であると仮定する。細胞から発生する力を最大 $10\ \mu\text{N}$ と仮定し、水平方向へ力が $10\ \mu\text{N}$ 加わったときの R_{OA} [Ω] の抵抗変化率 ΔR_A [Ω] は式(3.3)により、 -0.4×10^{-2} である。 $R_0 + R_A + R_{c1} \gg \Delta R_A$ であるため、抵抗値の変化によってチャンネル 2 に与える影響は無視できる。

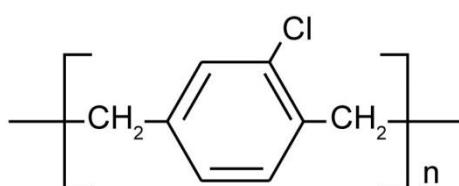


Fig. 3.11 パリレン C の化学構造

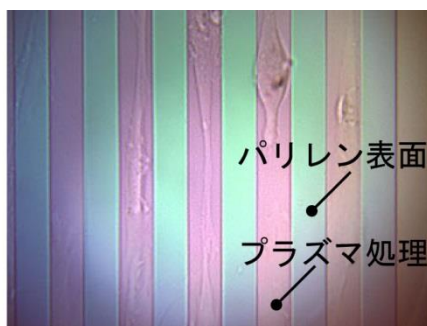


Fig. 3.12 パリレンを蒸着したシリコン基板に細胞を培養したときの様子

3.3.6. 絶縁体としてのパリレン C

37 °C の液体培地の中にセンサを入れるためには、センサを絶縁する必要がある。そのための絶縁材料として本研究ではパリレン C を用いる。Fig. 3.11 にパリレン C の化学式を示す。パリレンは生体適合性が高く、絶縁体としても多く使われている [80] [81]。パリレンは CVD (Chemical Vapor Deposition) により成膜される。細胞が基板に接着するためには基板表面の性質を制御する必要がある。Fig. 3.12 に示すように、蒸着されたパリレン膜の表面は疎水性であり、細胞が接着しにくい。一方、パリレンの表面に O₂ プラズマ処理を行うと、表面の性質が親水性へ変わり細胞が接着する。

本研究では、細胞の足場に近い環境を再現するために、パリレンの表面に Fibronectin をコーティングする。Fibronectin は糖タンパク質であり、インテグリンと結合するため、細胞がパリレン膜の表面に接着、伸展することができる [82] [83]。

パリレン C のヤング率は 2.8 GPa、絶縁耐力は 5.6×10^3 V/25 μ m である。これらの数値は日本パリレン合同会社のデータシートを参照したものである。パリレン 1 μ m をセンサに蒸着したときの x 軸方向の抵抗変化率 $\Delta R/R$ は 1.2×10^{-3} 、z 軸方向の抵抗変化率 $\Delta R/R$ は 5.3×10^{-3} となり、パリレン蒸着する前の式(3.3)と式(3.6)に比べ、大きく変化はなかった。

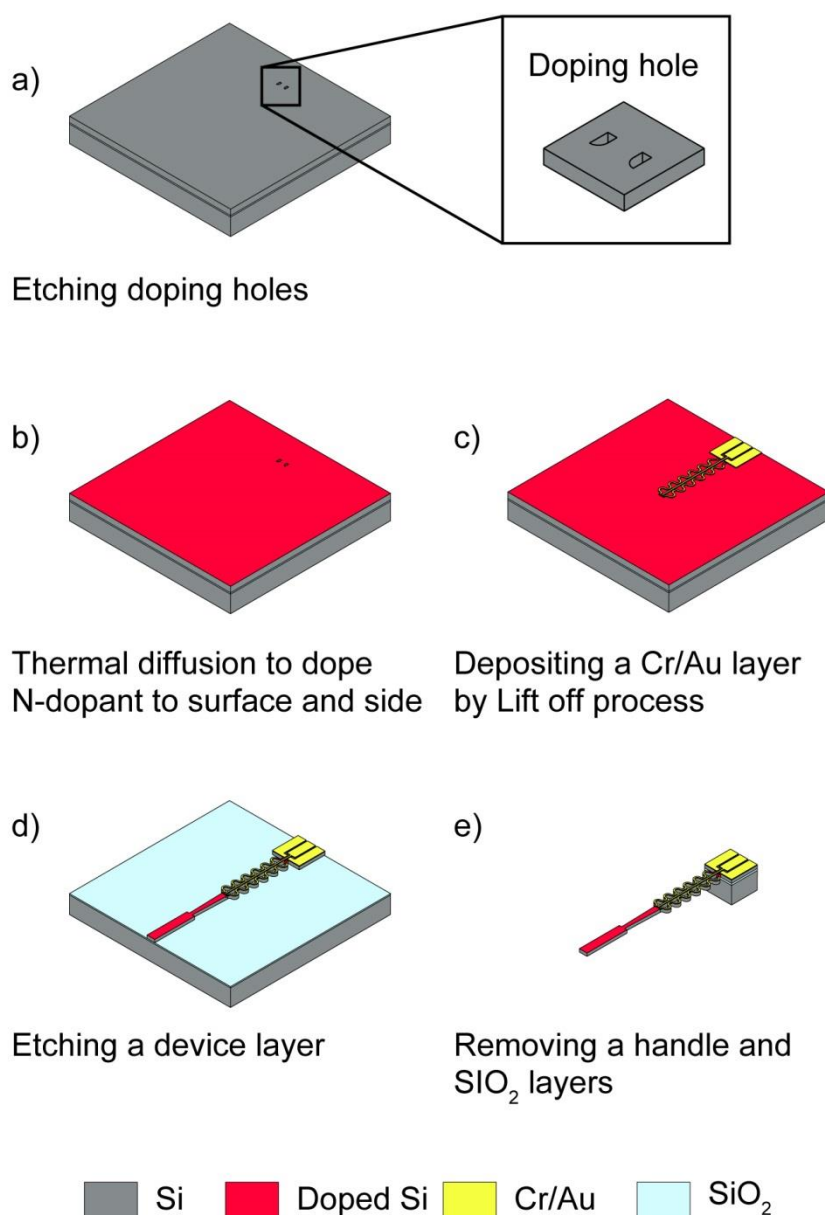


Fig. 3.13 トラクションカセンサの製作プロセス

3.3.7. フレキシブル配線の設計

本研究は液体の中で細胞の力を計測するため、基板の配線はすべて絶縁する必要がある。また、基板に毒性がないことが要求される。設計したフレキシブル配線はポリイミドが主材料である。このフレキシブル基板にパリレン膜を蒸着することで、細胞に害を与えないようにした。表面電極の材料は金である。具体的な寸法は付録Cに示す。センサと補償センサを合わせて16個の電極があるため、配

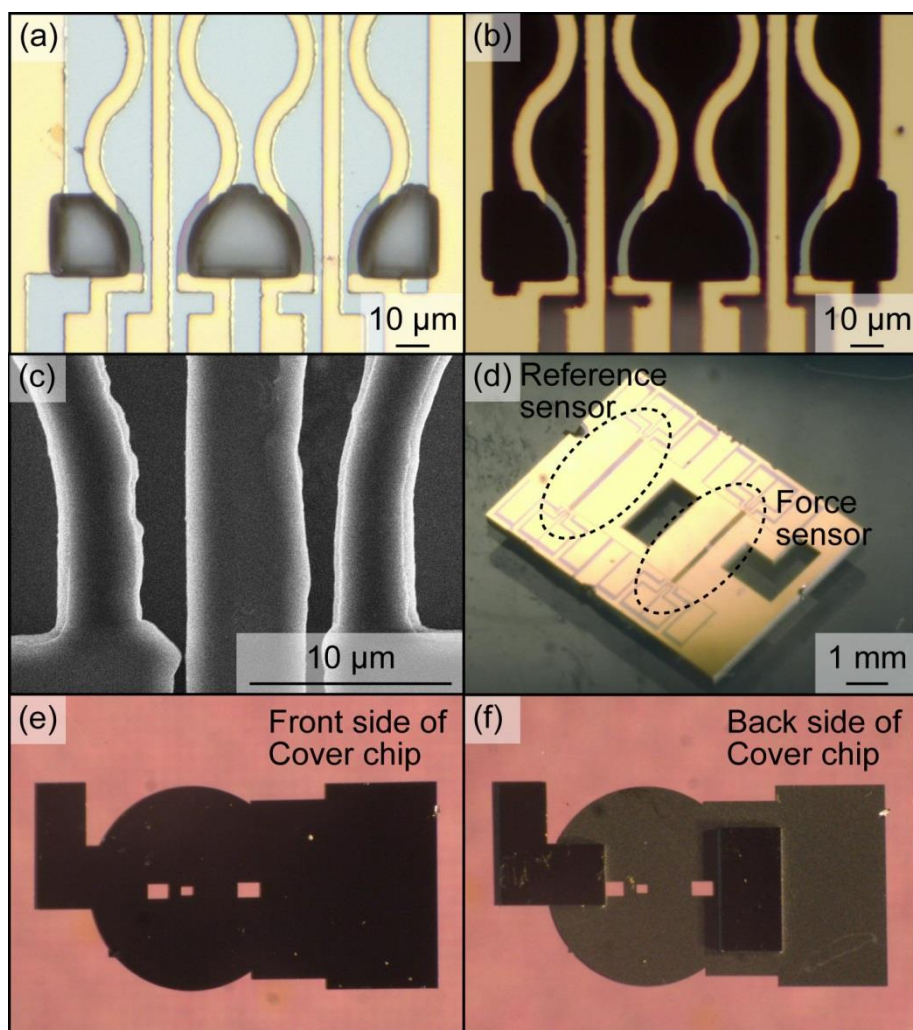


Fig. 3.14 トラクションカセンサの製作写真 (a)フォトレジストでパターニングを行ったビーム, (b)裏彫り後のビーム, (c)パリレン蒸着後のビームの SEM 写真, (d)センサチップ, (e)カバーチップの表面, (f) カバーチップの表面

線の幅, 間隔などの寸法は 18 ピンのコネクタ(FH19SC-18S-0.5SH)に合わせた. フレキシブル配線の製作は株式会社井雅に依頼した.

3.3.8. トラクションカセンサの試作

トラクションカセンサの試作にはデバイス Si 層が 5 μm , ボックスの SiO_2 層が 2 μm , ハンドリング Si 層が 300 μm の p 型 SOI 基板 (Soitec) を用いた. 始めに SOI 基板をダイシングソーで 25 mm \times 25 mm に切り出した.

Fig. 3.13 にトラクションカセンサの製作プロセスを示す. 切り出した SOI 基板を HF 溶液中で 90 秒

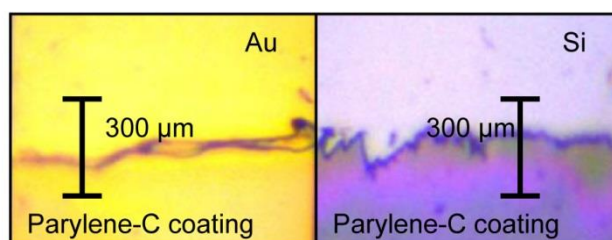


Fig. 3.15 Au と Si の表面に蒸着されたパリレン膜

以上洗浄することで自然酸化膜を除去する。次にサイドドープをするために穴を掘る。マスクパターニングのためのフォトレジストは OFPR800-23cp(東京応化工業)を用いた。穴の大きさは $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ である。デバイス Si 層のエッチングは ICP-RIE を用いたドライエッチングによって行った。レジストの洗浄後、もう一度 HF 溶液で洗浄を行う。ボックス層がなくなることを防ぐため、洗浄時間は 15 秒程度にする。その後すぐに n 型ドーパント P-59230(OCD, 東京応化)を基板の表面に塗布する。この際、穴の中がドーパント溶液で満たされるように 2 分間待ってからスピコートを行う。次に、熱酸化炉で SOI 基板表面に厚み 100 nm 程度のピエゾ抵抗層を形成した。熱酸化炉を用いた不純物の熱拡散には、[84]と同様の手法を用いた。熱拡散終了後、基板を再び HF 溶液にて 15 秒間洗浄する。センサビームの横幅が $5\ \mu\text{m}$ と小さく、ウェットエッチングでは精度の高い制御が難しい点と、Cr と Au の多層金属を加工するときのプロセスの便利さから、リフトオフプロセスを用いて配線を製作した。配線以外の部分をフォトレジスト OFPR800-100cp でパターンニングし、真空蒸着装置を用い、Cr と Au を蒸着する。その後、レジストを取り除くとレジストがなかった部分に Cr と Au が残る。Au は SiO_2 との密着性が悪いため、密着層として Cr を用いた。このとき各層の厚みは Cr が 4 nm, Au が 40 nm とした。配線形成後、デバイス Si 層のエッチングを行う。この際、穴の側面に形成されたピエゾ抵抗層がエッチングされないようにレジストでこの領域を保護する必要がある。フォトレジスト OFPR800-100cp でピエゾ抵抗層を保護した。フォトレジストは親水性の表面とは密着性が悪いため、レジストを現像するときに細長いセンサのレジストパターンが基板の表面から取れてしまうといった問題が生じる。そこで、密着性を向上するために、HMDS(ヘキサメチルジシロキサン)処理を行うことでウェハの表面を疎水性にする。本研究では OAP 溶液を用い、HMDS 処理を行った。Fig. 3.14(a)にデバイス Si 層のレジストパターンニング後の写真を示す。デバイス Si 層のエッチング・レジストの洗浄まで完了した後はピラニア洗浄 ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=3:1$) を行い、表面に残ったレジストなどをきれいに洗浄した。次に、ハンドリング層のドライエッチングを行う。ハンドリング層をエッチングするときはボックス層が割れ、アルミ皿上に基板を固定するために使用したシリコンオイルとガスが反応し、センサが汚れてしまう。それを防ぐため、フォトレジスト AZP4620 でデバイス層をコーティングした。ボックス層の SiO_2 は HF 蒸気を用い除去する。しかし、HF 溶液と SiO_2 の反応によって生成された水が蒸発するときに表面張力によってカンチレバーが側面にくっついてしまう。この問題は HF 蒸気プロセス中に生成された水がウェハに残らないようにすることで解決できる [85] [86]。そのために、ホットプレートに 45°C に加熱させ、エッチング用のディッシュ上にひっくり返しておく。Fig. 3.14 の(b), (d)に裏彫り後のビームと製作し

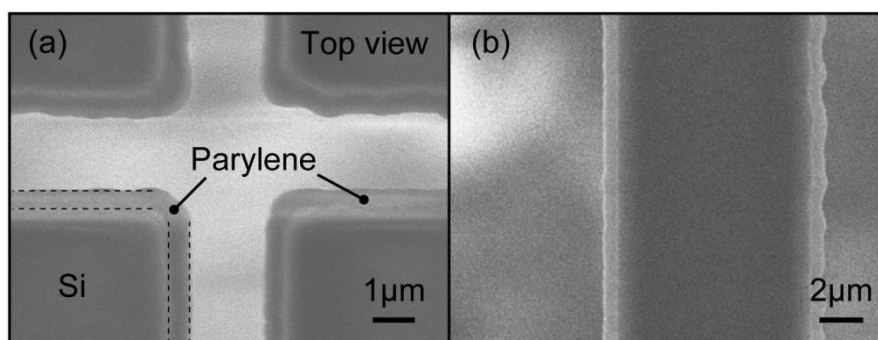


Fig. 3.16 シリコンの側面に蒸着されているパリレン膜, (a)液体培地に入れる前, (b)液体培地に入れてから 24 時間後

たセンサチップの写真を示す。カセンサ部分はハンドリング Si 層のエッチングを行い、補償センサ部分はハンドリング Si 層のエッチングをしなかった。カセンサの抵抗値は平均 1.2 kΩ であった。カバーチップは厚さ 250 μm の Si ウェハを用いて、製作した。Fig. 3.14 の(e), (f)に表から撮った写真と裏から見た写真を示す。まず、細胞を通す穴を空けるために、表面にパターンニングを行う。3つの穴があり、真ん中の穴を通して細胞がセンサパッド上に接着することとなる。穴のサイズは 100 μm×150 μm である。左右の2つの穴は、気泡を取り除くためのものである。穴が1つだけだと、カンチレバーの裏に残った気泡を液体で置換することができない。気泡が残っていると、液体培地を加温したときに、気泡が膨張してカンチレバーを押し上げてしまう。こうした不具合を解消するために、2つの穴を設けた。次に、センサチップの穴に差し込むための、つき出ている構造を作るため、ICP-RIE を用いて約 150 μm 程度 Si 層のエッチングを行った。

完成したセンサチップはフレキシブル配線上に貼り付ける。接着剤はアロンアルファ、センサチップと基板の配線はワイヤボンディングを用いた。ワイヤボンディングの配線材料はアルミである。その後、センサチップの絶縁のため、CVD 法でパリレンダイマーを 0.5 g 使用し、蒸着を行った。Au 表面上にはパリレンが蒸着されにくい [87]、単分子自己組織化膜(Self-Assembled Monolayer, SAM)を成膜することで Au の表面状態を改良した。SAM の成膜には容積 2 l のチャンバに 1-ドデカンチオール(1-dodecanethiol)溶液 0.1 ml とデバイスを入れ、1 時間経過後、取り出した。こうすることで、Au 表面が有機性になり、パリレンとの密着性が向上する。Fig. 3.14(c)にパリレンを蒸着したセンサビームの写真を示す。

触針段差系(Dektak 150, アルバック)を用いて、表面に蒸着されたパリレン膜の厚みを計測した。Fig. 3.15 に測定時に使用したデバイスの表面写真と厚みの測定時にスキャンしたラインを示す。Au と Si で 2 か所の厚みを計測して平均を出した結果、Au の表面に蒸着されたパリレンの厚みは 0.95 μm , Si の表面には 1.04 μm であった。次に、導電性金属としてパリレンの表面にタングステンに 3~5 nm 程度コーティングし、側面に蒸着されたパリレン膜を SEM で観察した。Fig. 3.16(a)にデバイス層側から見た SEM 写真を示す。SEM 写真から確認した側面に形成されているパリレン膜の厚みは 0.5 μm であった。側面の厚みが表面の半分しかないのは、この部分が貫通していないくぼみであるため、入り込むモノマーガスの量が表面に比べて少ないためと考えられる。

Fig. 3.16(b)は 37 °C の液体培地に入れてから 24 時間後のパリレン膜の写真である。液体培地から取り出し、洗浄と導電性金属コーティングを行ったものである。パリレン膜はシリコンから剥がれておらず、その厚みも液体培地に浸ける前と同じであることを SEM から確認した。

3.4. 本章のまとめ

本章では、シリコン基板上で細胞を培養したときの細胞の伸展を観察し、そこから特徴を抽出した。トラクション力を定量的に計測するために、細胞を培養するパッド部分と力を感知するピエゾ抵抗層をトラクション力センサの異なる位置に形成した。細胞のサイズは 10~20 μm であり、ギャップが 10 μm 以下であれば、キャップの中に落ちることなく伸展する。MEMS プロセスを考慮し、センサパッドのサイズは 15 μm × 125 μm 、パッド間のギャップは 4 μm と設計した。100 μm × 150 μm の穴を開けたカバッチップをセンサチップ上に乗せることで、力センサのビーム上で細胞が伸展することを防ぐ。細胞のトラクション力は 9 kPa 以上であると予想し、力センサの分解能が 10 nN となるように設計した。力センサは 37°C の液体の中に入れるため、光と温度による応答を補償する必要がある。補償センサを力センサの隣に配置し、ブリッジ回路に組み込むことで補償を行うようにした。力センサと補償センサがアレイ化されたセンサチップのサイズは 5 mm × 7 mm × 0.3 mm とした。

第4章 センサの基礎特性

4.1. はじめに

本章では、試作した力センサの基礎特性の評価を行う。まず、絶縁体で覆った力センサを純水、水道水、液体培地などに入れ、液体によるセンサの応答を評価する。また、力センサの信号に影響を与える要素として、液体培地を 37 °C に加温する時に使用するホットプレートからの電気ノイズ、液体の温度変化、液体培地中の浮遊物質、配線の材料の酸化・還元反応などを挙げられる。本章ではそれぞれの場合の抵抗変化率を計測し、センサへの影響について調べる。

次に、絶縁体で覆ったカンチレバーに力が加わったときの抵抗変化率を基に x 軸方向と z 軸方向の力と抵抗変化率を結ぶ特性行列を求める。

以上の実験から、トラクション力センサを用いた力計測が有用であることを示す。

4.2. 液体中での計測

4.2.1. 液体によるセンサの反応

実験で使用する液体培地は多くのイオンを含有している。本研究で使用した液体培地(Eagle's Minimum Essential, ATCC)中には塩化カルシウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム等が水に溶けてイオンになるため、液体培地は電解質となる。そのため、センサチップの配線を絶縁する必要がある。

また、生きた細胞を計測するために、液体培地はホットプレートにより 37 °C に加温される。しかし、力センサの配線があるため、センサを固定しているディッシュを完全に密閉することはできず、上下の温度差によって生じセンサに影響する。また、液体中の温度差が対流を生み、センサに影響することが考えられる。

本節では、厚さ 5 μm の piezo 抵抗型カンチレバーを液体培地中に入れたときに、液体培地による影響と液体の温度差及びこれによって生じる液体の対流等による影響を評価する。

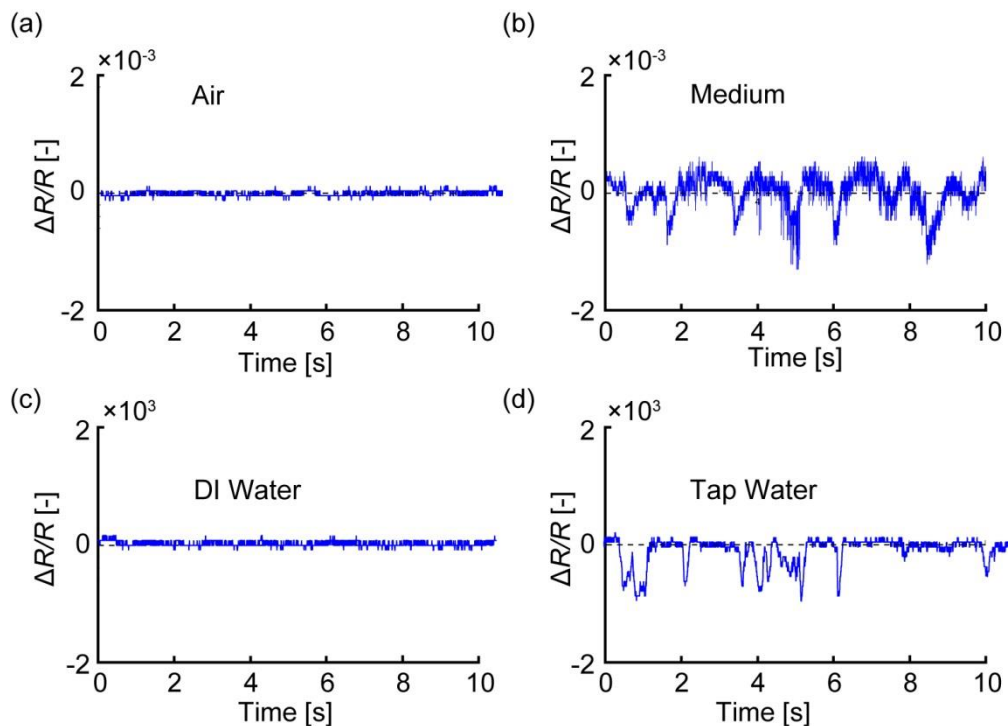


Fig. 4.1 センサに外部から刺激を与えない場合、ホットプレート上での(a)空気中での応答, (b)液体培地, (c)純水, (d)水道水に入れた時の 10 秒間のセンサ応答.

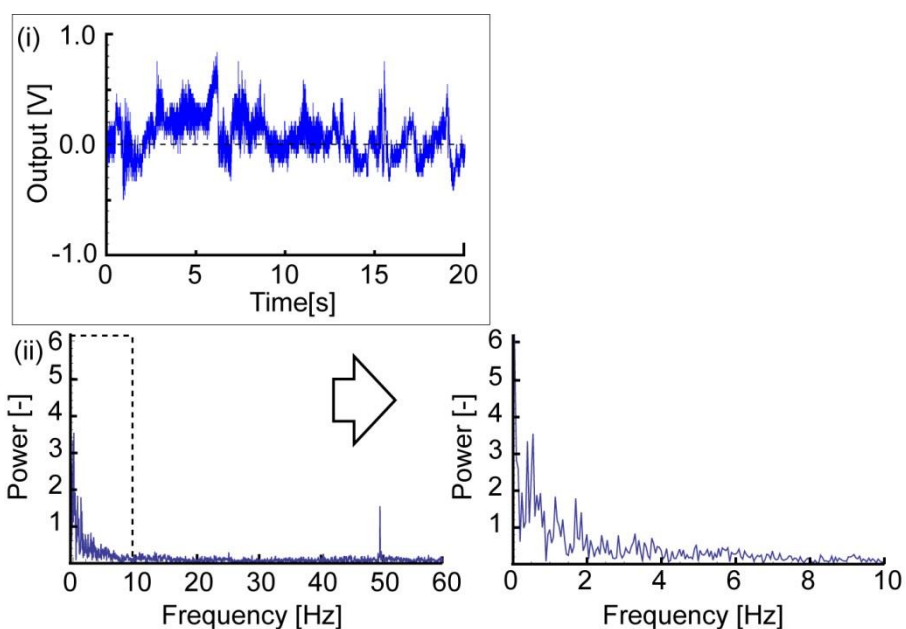


Fig. 4.2 液体培地の中で計測したセンサ応答のフーリエ変換による周波数特性 (i) フーリエ変換を行う前のセンサ応答 (ii) 50 Hz の時に相当するパワースペクトルの周波数は 2 Hz 以下の領域である

まず、空気中、純水、水道水、液体培地の底で計測したセンサ応答について述べる。液体の種類によるセンサへの影響を調べるために、同じセンサを用いて液体を順次に変えた時の信号を計測した。パリレンCを1 μm 蒸着したセンサを直径30mmのディッシュに固定した。その後、37 $^{\circ}\text{C}$ のホットプレート上で、センサの応答を計測する。液体を置換する際にはセンサが乾燥しないように数回にかけて置換を行い、温度変化が安定するまで、10~30分経過後に測定を行った。液体の量が少ないときは蒸発によるセンサの応答が激しかったため、ディッシュ中の液体量が5ml以上になるように液体を入れた。ディッシュの上にカバーガラスをかぶせることで、液体の蒸発を防いだ。さらに、温度補償センサをブリッジ回路に組むことで、温度による影響を除去した。

Fig. 4.1に空気中及び各液体の中での10秒間のセンサの応答を示す。計測回路のアンプの増幅率 G は1000である。最初に空気中から計測を始めた。まず、センサを基板に固定し、空気中でセンサの応答を測定したところ、安定した応答が得られた(**Fig. 4.1(a)**)。次に、ディッシュに液体培地で注ぎ、ホットプレートで37 $^{\circ}\text{C}$ に加温してから測定を行った結果、センサの応答が不安定となった(**Fig. 4.1(b)**)。これは、培地が電解質であるため、電流が漏れてしまい、センサの信号に影響されたと考えられる。このときのノイズレベルは、センサに200nNの力を加えた時の抵抗値変化に相当する。次に、センサを洗い流し、37 $^{\circ}\text{C}$ の純水中で計測を行うと、安定したセンサの応答が得られた(**Fig. 4.1(c)**)。最後に、**Fig. 4.1(d)**に水道水に置換したときのセンサの応答を示す。水道水中のセンサ応答は純水のとくに比べ、得られた信号は不安定であった。よって、センサは空気中、純水のように非電解質中でセンサの応答を測定したときは、安定した信号が得られたが、水道水と液体培地のような電解質の中ではセンサの応答が不安定であった。

液体培地中で計測したセンサ反応の周波数特性を解析するために、フーリエ変換を行った。**Fig. 4.2**の(i)にセンサ応答を(ii)にこの応答をフーリエ解析した結果を示す。元となるデータは20秒間計測したものである。**Fig. 4.2**(ii)のグラフは0~60Hzまでの領域と0~10Hzまでの領域を拡大した結果を表示した。50Hzのときにピークが確認できるが、このピークは計測アンプ回路の電源の周波数である。50Hzのパワースペクトルに相当するかそれ以上大きいパワースペクトルは1Hz以下で確認された。定常状態に近い1Hz以下の区間は細胞の力の周波数領域であるため、測定データから液体培地中のセンサ反応をノイズとして除去することは難しい。よって、S/N比の向上するためにロックインアンプを用いることを考えられる。

空気中で計測したセンサの応答と純水中での応答を比較し、これらの実験から、液体の対流による影響は無視できると考えられる。液体培地中で計測した場合、最初は応答が安定しているが、約1~2時間後には力刺激を与えていないにも関わらず、大きなピークが不規則に表れる。水道水でも同じ現象が確認された。液体培地と水道水の中でセンサの信号を不安定にする原因として2つのことが考えられる。一つ目に、液体の中に入っている不純物がカンチレバーセンサと物理的に接触することである。二つ目は絶縁膜が破壊され、電圧をかけると電極付近で電気反応が起きることである。そこで、液体培地中で十分に絶縁を保つことができるように、原因を調べ、対策を行う。

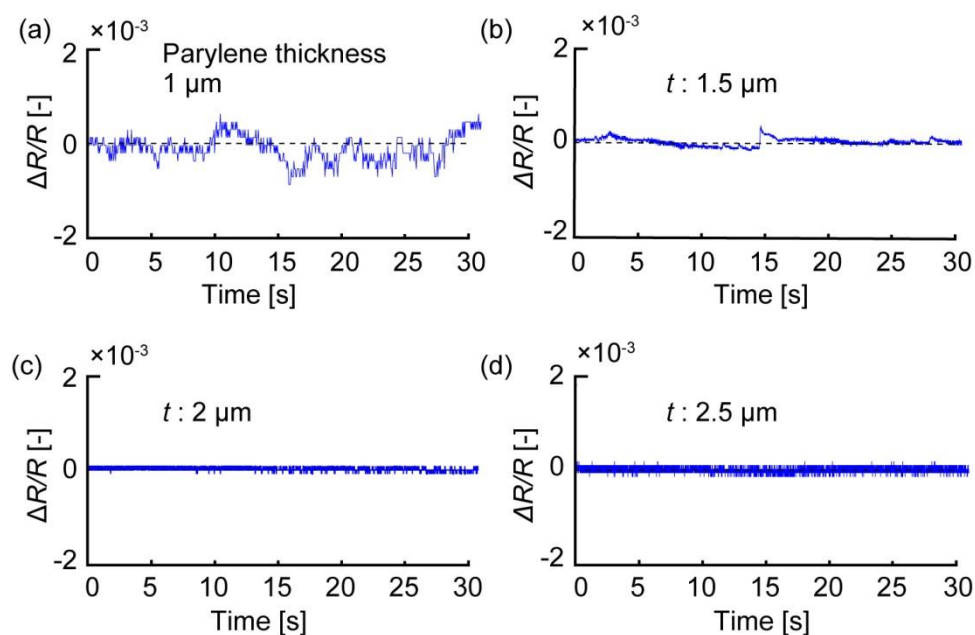


Fig. 4.3 パリレンの厚さと液体培地中でのセンサ応答.

(a) 1 μm , (b) 1.5 μm , (c) 2.0 μm , (d) 2.5 μm

4.2.2. パリレン C の厚さとセンサの反応

前節で述べたように、液体培地は電解質である。そのため、力センサの電極が完全に絶縁され、数時間液体培地の中で耐えられることが要求される。本節では、蒸着されたパリレン膜の厚みによるセンサ応答の安定性を調べる必要がある。パリレンダイマーの量を 0.5 g から 2.0 g まで変えることで、厚み 1.0~2.5 μm までのパリレン C をそれぞれセンサに蒸着し、液体培地中での各センサの反応を計測した。絶縁膜の厚みを変えたことによるセンサ応答の変化を調べるために、液体培地の中にセンサを入れてから 1 日以上放置し、センサの安定性を評価した。液体培地の温度はホットプレートを用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ に維持した。

Fig. 4.3 にパリレン膜の厚みが(a)は 1 μm , (b)は 1.5 μm , (c)は 2.0 μm , (d)は 2.5 μm の時に液体培地の中で計測した 30 秒間のセンサの応答を示す。(a), (b)の時はセンサの応答が不安定であったが、パリレン膜の厚みが 2.0 μm 以上の(c), (d)の時は安定であった。Fig. 4.4 にセンサにパリレン膜を蒸着してから時間が経過した時に 37 $^{\circ}\text{C}$ の液体培地の中で計測したセンサの応答を示す。(a)はパリレン膜の厚みが 2.0 μm の時のセンサ応答であり、(b)は 14 時間後の応答である。(c)はパリレン膜の厚みが 2.5 μm の時のセンサ応答であり、(d)は 24 時間後のセンサ応答である。時間が経過してもセンサの応答が安定であることが確認できた。この実験から絶縁膜が厚くなるとセンサの応答が安定であることがわかった。そのため、液体培地中でのセンサの不安定な応答は、培地の浮遊物質が物理的にセンサに触れるときに生じた応答ではなく、絶縁の問題であるため生じたと考えられる。

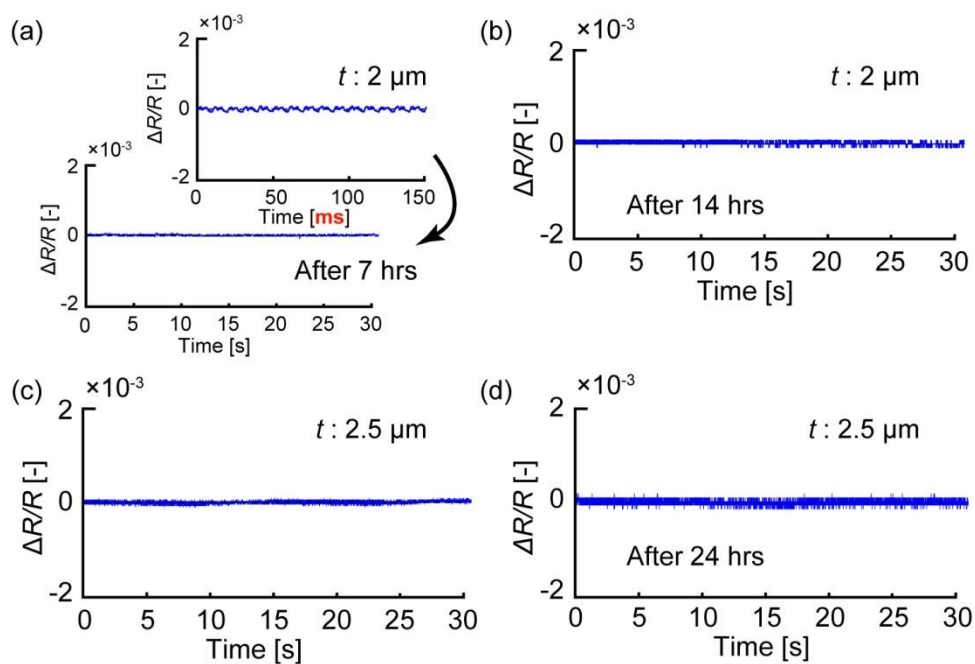


Fig. 4.4 時間の経過によるセンサ応答.

(a)パリレン膜の厚みが $2 \mu\text{m}$ の時のセンサ応答, (b) 14 時間後のセンサ応答(パリレン膜の厚み: $2 \mu\text{m}$), (c)パリレン膜の厚みが $2.5 \mu\text{m}$ の時のセンサ応答, (d) 24 時間後のセンサ応答(パリレン膜の厚み: $2.5 \mu\text{m}$)

Table 4.1 蒸着時のパリレン C のダイマー量と側面の厚み

パリレンのダイマー量 [g]	0.5	1	1.5
側面の蒸着厚み [μm]	0.5	1.3	2

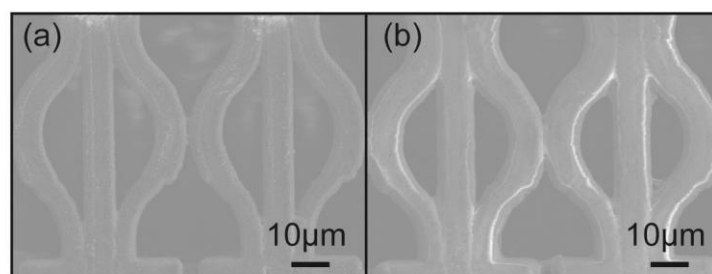


Fig. 4.5 パリレンのダイマー量とパリレン膜厚みの様子 (a)1.0 g を蒸着した時, (b)1.5 g を蒸着した時

Table 4.1 にパリレン C のダイマー量による側面の厚みを示す。膜の厚みは SEM 写真から算出した。Fig. 4.5 にパリレン膜の厚み 1.5 μm と 2.0 μm で蒸着した時のセンサの様子を示す。センサビームのギャップは 4 μm であり、パリレン膜の厚みが 2 μm の以上の時はビームがパリレンでくっついてしまう。また、パリレン膜を厚く蒸着すると力センサの感度が低下する問題がある。

4.2.3. アルミ電極の酸化反応

液体培地中でセンサ応答を計測したパリレン膜が 1 μm の時はアルミ電極の周りに白い沈殿物が確認された。その状態で、時間が経過すると抵抗が測定できないほど高くなり、配線として機能できなくなった。この白い沈殿物の原因は配線材料として使用しているアルミワイヤが液体培地の中で溶けている可能性がある。具体的には式(4.1)のようにアルミ電極が酸化し、白い沈殿物は水酸化アルミウムである可能性がある。



この問題を防ぐための対策として、アルミワイヤの部分を別に絶縁することと電気回路に交流電圧をかけることが考えられる。交流電圧を回路にかけると、アルミ電極の周りで酸化・還元反応が同時に起き、配線が溶け出す影響を減らすことができる。アルミワイヤの部分を覆うためには、粘度が高い材料を用いる必要がある。粘度が低いと毛細管現象により、電極間の穴に沿って流れてしまい、カンチレバーが絶縁材料に埋もれてしまうためである。本研究では、細胞に毒性がなく、粘度が高い材料として蜜蝋を用いてアルミ電極の周りを覆う一方、電気回路に交流電圧を流して抵抗変化率の測定を行う。

4.3. 実験セットアップの構築

4.3.1. 実験セットアップ

本研究ではシリコン基板上の細胞を観察するため、正立顕微鏡(BX51WI, オリンパス)を用いた。顕微鏡は暗室中に設置し、全ての実験は暗室の中で行った。観察に使用したレンズは液浸レンズであるため、液体培地中に入れることができる。光源はハロゲンランプである。液体培地が入ったディッシュはホットプレート上に置くことで、液体培地を 37 $^{\circ}\text{C}$ に加温・維持する。ディッシュから 15 cm 程度離れた場所に、ブリッジ回路を設置し、ブリッジ回路の出力をロックインアンプ(東陽テクニカ)に差動入力し、センサ応答をオシロスコープで記録する。

パリレンを蒸着したセンサはまず、直径が 35 mm のディッシュに両面テープを用いて固定した。接着剤の毒性が細胞に影響を与える恐れがあるので、フレキシブル基板の直下に両面テープを貼り、蜜蝋を用いて基板周りを覆うことで接着剤による影響を防いだ。

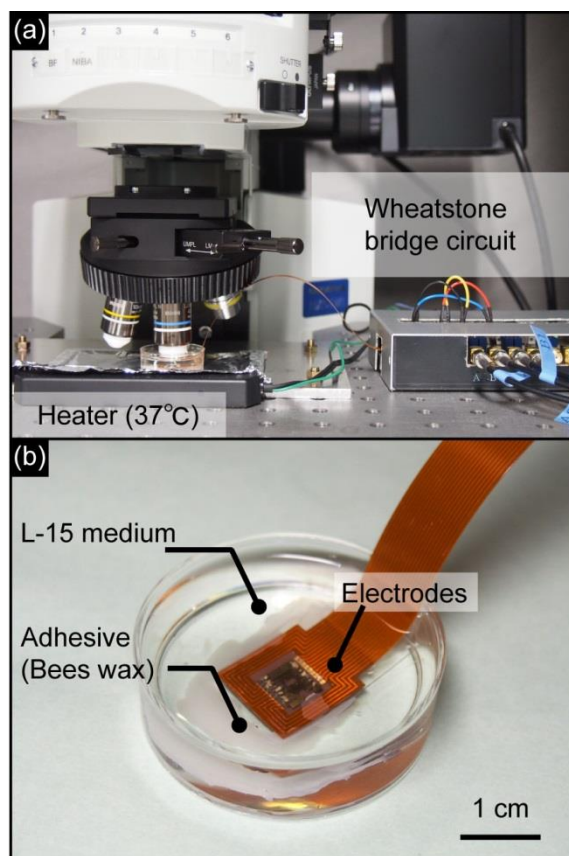


Fig. 4.6 (a) 細胞トラクション力計測のセットアップ, (b) ディッシュに固定されたセンサチップとフレキシブル基板

Fig. 4.6 に実験セットアップの写真とディッシュに固定した基板の写真を示す。実験までの前処理の流れは付録に示す。ディッシュに基板を固定した後は、カバーチップをセンサチップ上に乗せる。このときにカバーチップに擦れて、パリレンが剥がれるので、その部分には電流が流れないようにセンサチップ上の配線を配置した。

4.3.2. ホットプレートによるセンサの反応

液体培地を 37 °C に加温するには、ホットプレートを使用する。電源電圧を用いて制御するホットプレートを使用したため、ホットプレートからのノイズがピエゾ抵抗値の計測に影響を与える。力センサのひずみによるピエゾ抵抗値の変化ではなく、周辺装置の電波が電気回路に乗ってしまうのである。本研究では、3種類のホットプレートを試した。**Fig. 4.7** の(a)に A タイプ (デルタ T カルチャーディッシュ(04200415C), Biopetechs Inc) のホットプレートと力センサの応答を示す。ディッシュに電極が付いているタイプである。細胞培養のディッシュ中にセンサを固定し、純水を注いだ。このホットプレートを用いて 37 °C に加温した後、計測を行った。計測には **Fig. 2.5** で示したブリッジ回路及び計測アンプ、オシロスコープ(DL1640, YOKOGAWA)を用いた。計測アンプに供給した電圧は 1 V である。計

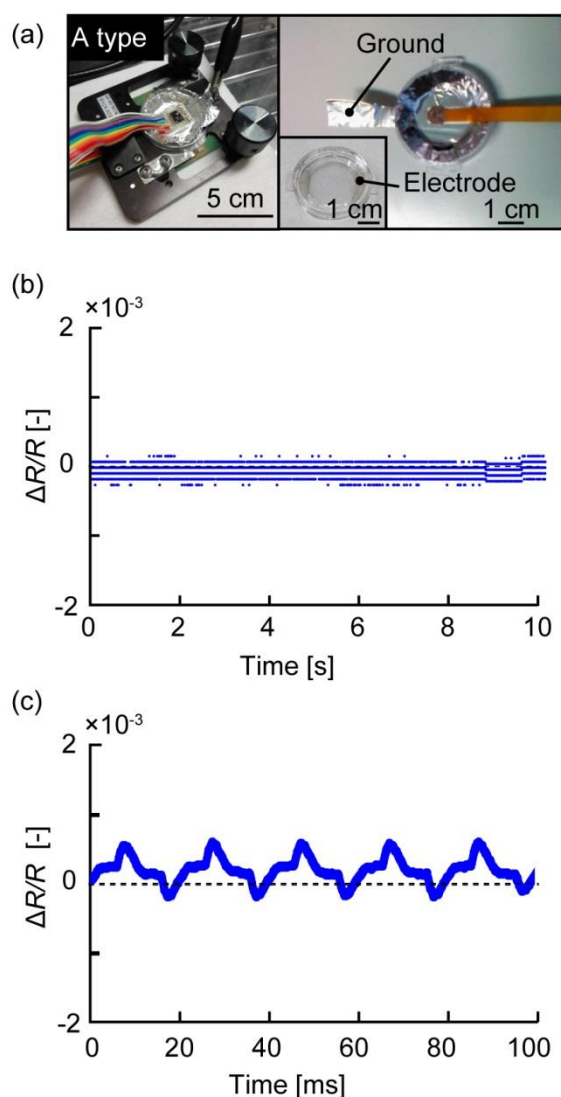


Fig. 4.7 (a)Aタイプのホットプレート(Delta T dish 04200415C, Biopetechs Inc)とアルミ箔を用いてノイズ対策を行った写真, (b)10秒間のセンサの応答, (c)0.1秒間のセンサの応答.

測アンプはAD623を用い、 G は1000に調整した。Fig. 4.7(b)に10秒間のセンサ応答を、Fig. 4.7(c)に0.1秒間のセンサ応答を示す。センサ応答は50 Hzの信号であり、ホットプレートによるノイズであることがわかる。応答の振幅は 4.0×10^{-4} [-]程度であり、力で換算すると約100 nNに相当するものである。ディッシュに電極が付いているため、センサ部と距離が近くノイズレベルが大きい可能性がある。Fig. 4.8に違う種類のホットプレートとそれぞれの力センサの応答を示す。Fig. 4.8(a)のBタイプは天板が金属となっているホットプレート(HT-1350, 日本パルス技術研究所)である。Fig. 4.8(b)のCタイプは硬質ガラスを加工した。発熱体のホットプレート(TP-NLS, 東海ヒット)である。パイレックスで覆ったセンサをディッシュに固定し、純水を入れた。純水は37°Cに加温し、温度が安定してから信号の計測を行った。B, Cタイプのホットプレートの実験でもAタイプの実験時と同様にホットプレートとセンサの

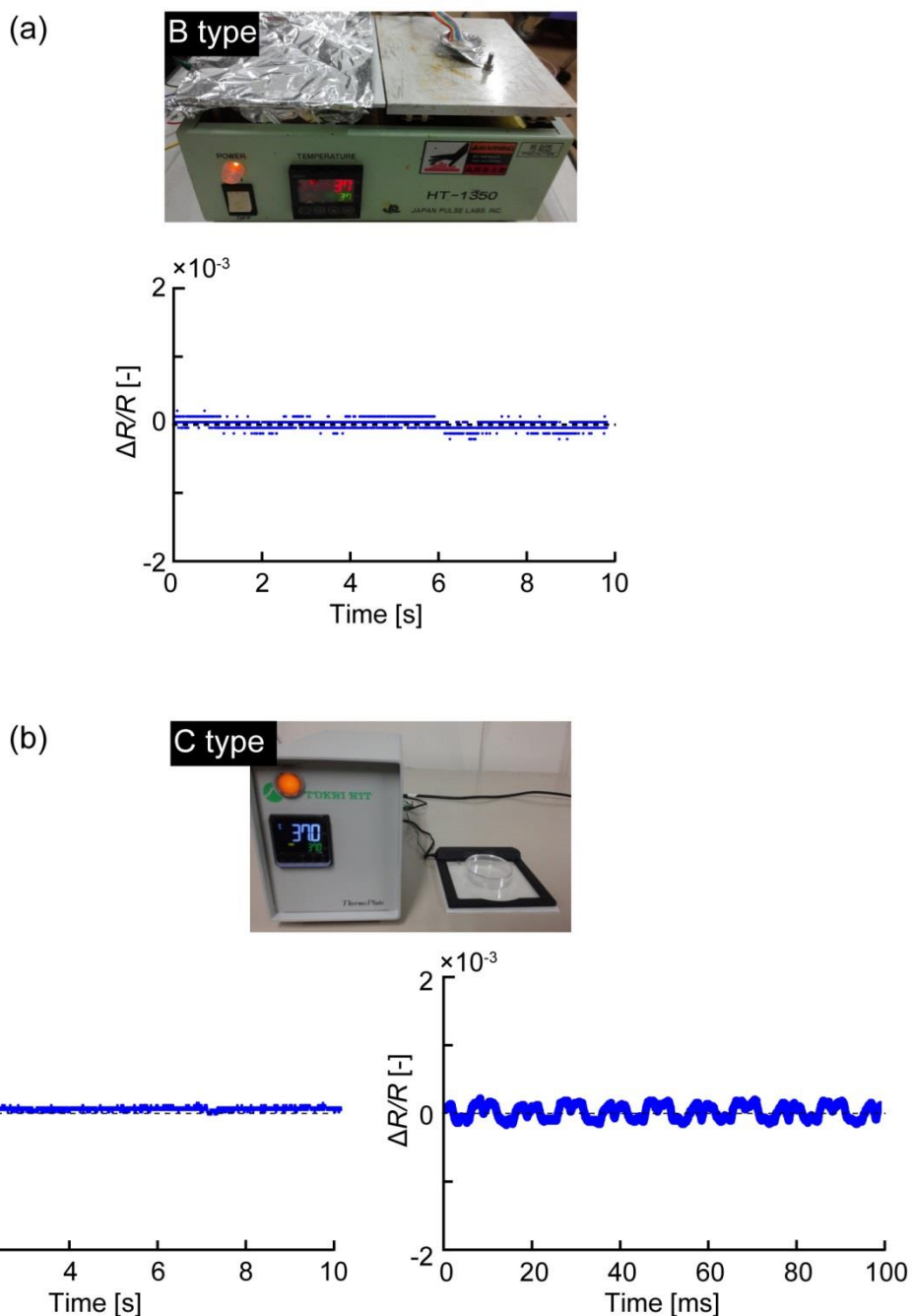


Fig. 4.8 (a) B タイプ(HT-1350, 日本パルス技術研究所)のホットプレートと力センサの出力, (b) C タイプ(HT-1350, 日本パルス技術研究所)のホットプレートと力センサの出力

間にアルミホイルをおき、接地した。B タイプのホットプレート上で計測したセンサ応答の振幅は 3.0×10^{-4} [-]程度であり、B タイプのホットプレート上で計測したセンサ応答の振幅は 2.0×10^{-4} [-]程度であった。Fig. 4.8 (a)と(b)にホットプレートによる力センサの応答を示す。横軸は時間、縦軸はセンサの

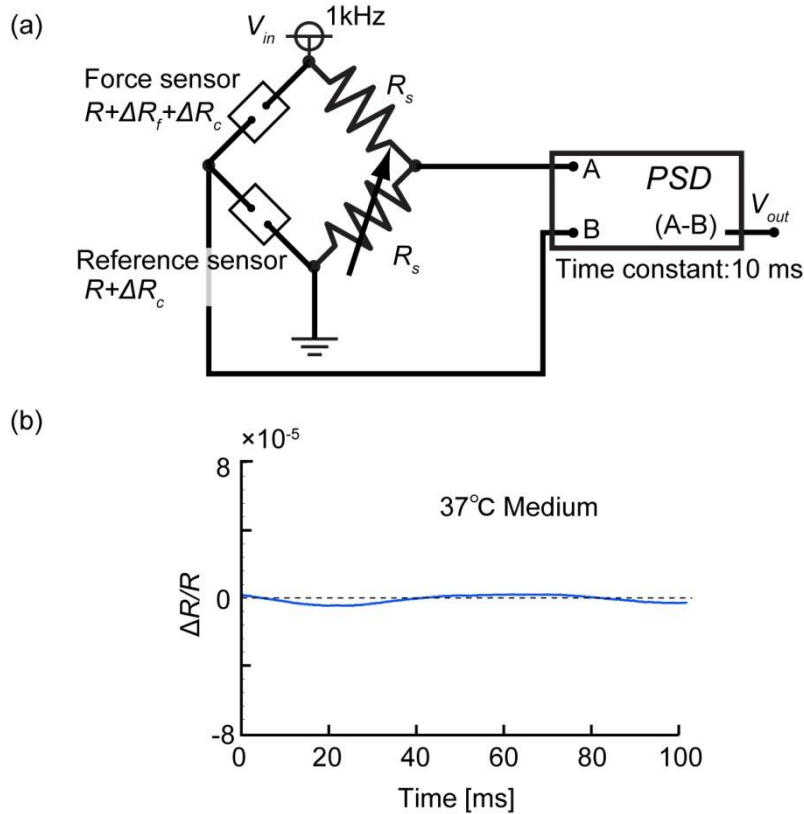


Fig. 4.9 (a)ブリッジ回路とロックインアンプ(周波数 1 kHz, 時定数 10 ms), (b)その時のセンサの応答

電圧変化を表示している. 3 種類のホットプレートの中で, C タイプのガラス基板上のホットプレートを使用したときに一番よくノイズが除去された. また, 空気中より液体の中で計測したときの方がノイズの影響はもっと大きかった. 細胞の力は数分以上かけてゆっくり変化すると考えられるので, 周波数を特定することは困難である. また, 長時間力センサの応答を計測する必要があるが, 計測装置に保存できる容量が限定されているため, 長時間計測すると計測装置の時間分解能が落ちてしまう.

このため, 計測後にノイズの周波数のみをフィルタリングすることができない. ソフトウェア, 電気回路によるフィルタリングの方法以外に, S/N 比を高めるためにはロックインアンプを用いる方法が挙げられる.

4.3.3. ロックインアンプ

これまでの実験から, 液体培地の中で細胞の力を計測するためには, S/N 比を高めること, 力感度を考慮し, 蒸着膜の厚さを $1.5 \mu\text{m}$ 以下にすること, 液体培地の中でのセンサ応答が安定であることが要求される. この要件を満足するために, 本研究では微弱信号の計測に非常に優れているロックインアンプを使用した. Fig. 4.9 はロックインアンプを含めた計測回路と液体培地の中でのセンサ応答を示す. 参照信号の周波数を測定信号と近い周波数領域である 100 mHz にしたときは, 直流を用いた計測回路の応答と同様に信号が不安定であった. そこで, ロックインアンプに用いる参照信号の周波数を 1 kHz,

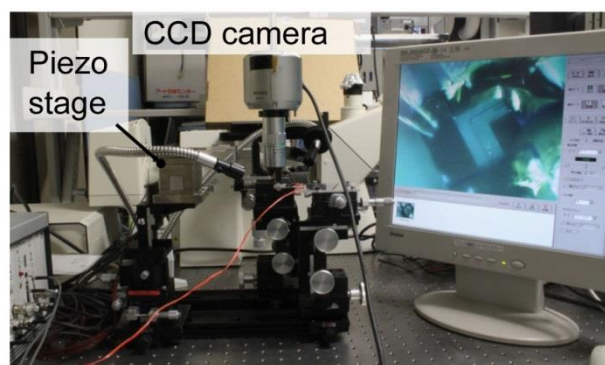


Fig. 4.10 センサに加えた力と抵抗値変化の関係を求めるためのセットアップ

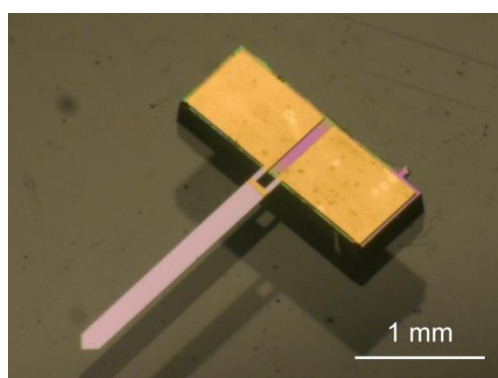


Fig. 4.11 カセンサのキャリブレーションに用いた参照用センサ

時定数は 10 ms と設定し、信号を安定化した。C タイプのホットプレートを用いた時に、直流電圧によってセンサの抵抗値変化を計測した時は、10 nN の刺激に対する S/N 比は 0.08 ($1.6 \times 10^{-5} / 2 \times 10^{-4}$)であったが、それに比べ、ロックインアンプを使用した時の S/N 比は 1 ($1.6 \times 10^{-5} / 1.6 \times 10^{-5}$)となり、10 倍以上改善された。

4.4. カセンサの評価

4.4.1. 力と抵抗変化率の関係

本節では試作したトラクション力のキャリブレーションを行うため、センサに力を加え、それに対する応答を計測する。応答から力と抵抗値変化の関係式を求める。この関係式を用いてセンサの応答からトラクション力を算出することができる。実験セットアップを Fig. 4.10 に示す。振動などが影響

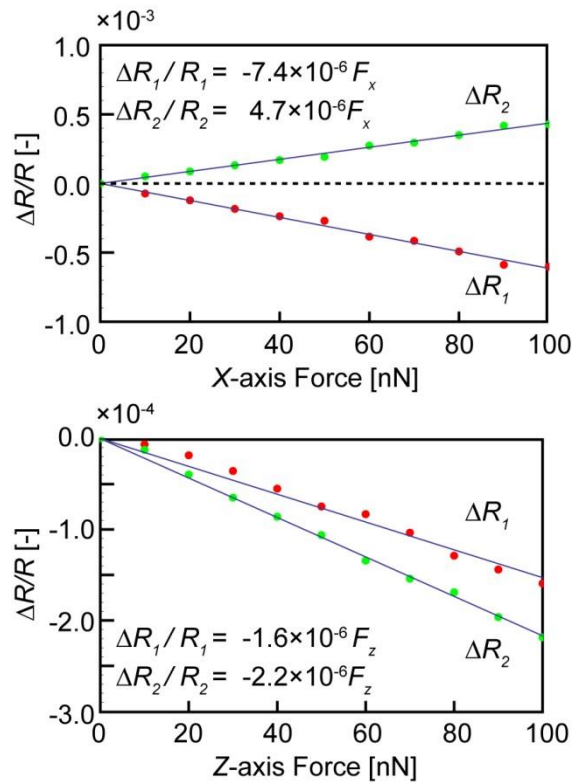


Fig. 4.12 x 軸及び z 軸の力とトラクションカセンサの抵抗変化率の関係

を与えるため、防振台にキャリブレーションのセットアップを設置する。カンチレバーに加える力はロードセルでは直接、測定できないため、参照用カンチレバーを利用した。Fig. 4.11 に参照用カンチレバーの写真を示す。参照用カンチレバーの長さは 2.0 mm、幅は 150 μm である。

まず、参照用カンチレバーの特性を求めるため、ロードセル(LVS-5GA, KYOWA)を用いて力に対する参照用カンチレバーの感度を計測した。ピエゾステージ(NC3000, 株式会社ナノコントロール)にロードセルを取り付け、向かい側にカンチレバーを固定する。固定する際は基板にネジ穴を開け、ネジで固定した。ピエゾコントローラはファンクションジェネレータを用いた電圧入力から x, y 軸方向には 20 μm , z 軸方向には 15 μm まで動かすことができる。また、ピエゾコントローラには変位センサが内蔵されているため、実際に動いた変位を出力することが可能である。ピエゾステージは粗動および微動ネジを用いて参照用カンチレバーに近づける。CCD カメラで確認しながら、参照用カンチレバーにロードセルが近づけ、ファンクションジェネレータで 300 mHz の三角波をピエゾコントローラに入力することでピエゾステージを駆動する。ピエゾコントローラの出力をオシロで確認しながら、オフセットと電圧を調整する。ロードセルをキャリブレーションするため、ロードセルのバネに小ネジを置き、アンプ(動ひずみ測定器, KYOWA)の出力応答を計測した。小ネジの重さを秤で計測し、そこからロードセルに加わった力とセンサ応答の関係を求めた。ロードセルの出力と参照用カンチレバーの応答から力と抵抗変化率を、ピエゾステージの変位出力とロードセルからバネ定数を、それぞれ求めることができる。参照用カンチレバーのバネ定数は 2.0 N/m であった。実験から求めた参照用カンチレ

$$\begin{pmatrix} \Delta R_1/R_1 \\ \Delta R_2/R_2 \end{pmatrix} = A \cdot \begin{pmatrix} F_x \\ F_z \end{pmatrix} \quad (4.2)$$

$$\begin{pmatrix} F_x \\ F_z \end{pmatrix} = A^{-1} \cdot \begin{pmatrix} \Delta R_1/R_1 \\ \Delta R_2/R_2 \end{pmatrix} \quad (4.3)$$

$$\begin{pmatrix} \Delta R_1/R_1 \\ \Delta R_2/R_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -7.4 & -1.6 \\ 4.7 & -2.2 \end{pmatrix} \times 10^{-6} \begin{pmatrix} F_x \\ F_z \end{pmatrix} \quad (4.4)$$

$$\begin{pmatrix} F_x \\ F_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -0.9 & 0.7 \\ -2.0 & -3.1 \end{pmatrix} \times 10^5 \begin{pmatrix} \Delta R_1/R_1 \\ \Delta R_2/R_2 \end{pmatrix} \quad (4.5)$$

バーの出力と力の関係は $42 \mu\text{N/V}$ であった。

その後、参照用カンチレバーを用いてトラクション力センサのキャリブレーションを行う。上記で述べた方法と同様に、ロードセルの代わりに参照用のカンチレバーをピエゾステージ側に取り付け、向かい側にはトラクション力センサをネジで固定し、キャリブレーションを行う。キャリブレーションの時に使用したトラクション力センサはパリレン C を $1.0 \mu\text{m}$ 蒸着したものである。また、参照用のカンチレバーはブリッジ回路と増幅アンプ(AD623)の計測回路を用いた。トラクション力センサの評価においては細胞実験に使うのと同じロックインアンプを用いて、計測を行った。Fig. 4.12 にトラクション力センサのキャリブレーション結果を示す。グラフから力と抵抗変化率は線形であり、 10nN の分解能を持って力検出することが可能である。 x 軸方向の力に対しては R_1 と R_2 の抵抗変化方向が逆となっている。これはひずみの引張と圧縮との違いに起因するものであり、理論と傾向が一致している。 z 軸に関しては R_1 と R_2 の抵抗変化方向が同様である。実験から求めた抵抗変化率は第3章で求めた理論値とオーダが一致しているため、妥当であるといえる。実験値の方が理論値より x 軸方向は 3~6 倍高くなり、 z 軸方向では 1/2 と低くなった。また、 z 方向では R_1 と R_2 の変化値がほぼ同等であるが、 x 方向では R_1 の抵抗値変化が R_2 の変化値より大きかった。これはプロセスのときにパターニングずれによって、ビームの幅が左右のビームで異なることが原因であると考えられる。また、 z 軸に関しては、SOI ウェハにドーパンド溶液をスピコートする際に、穴付近では溶液がはじかれてしまうため、ピエゾ抵抗層のドーパンド濃度が表面と異なる可能性がある。

求めたトラクション力センサに加わった力と抵抗変化率が線形であるため、特性行列を定義することができる。式(4.2)と式(4.3)のように、抵抗変化率と力の特性行列の逆行列を求めることで、力センサの出力から力センサに加えられた力を検出することができる。

本研究のキャリブレーションから求めた特性行列を式(4.4)に、特性行列の逆行列を式(4.5)に示す。特性行列の各要素の単位は nN である。また、本実験から求めたバネ定数は x 軸方向が 0.08 N/m 、 z 軸方向が 0.03 N/m であった。第3章で求めたシミュレーション値と比較すると x 軸方向は約 1/4、 z 軸方向は 1/2 となっている。これはセンサビーム幅がプロセスで設計値より大きく減少しているためであると考えられる。

光ヘテロダインを用いて、センサの共振周波数を求めた結果、 x 軸方向は 4.5 kHz 、 z 軸方向は 3.25 kHz であった。

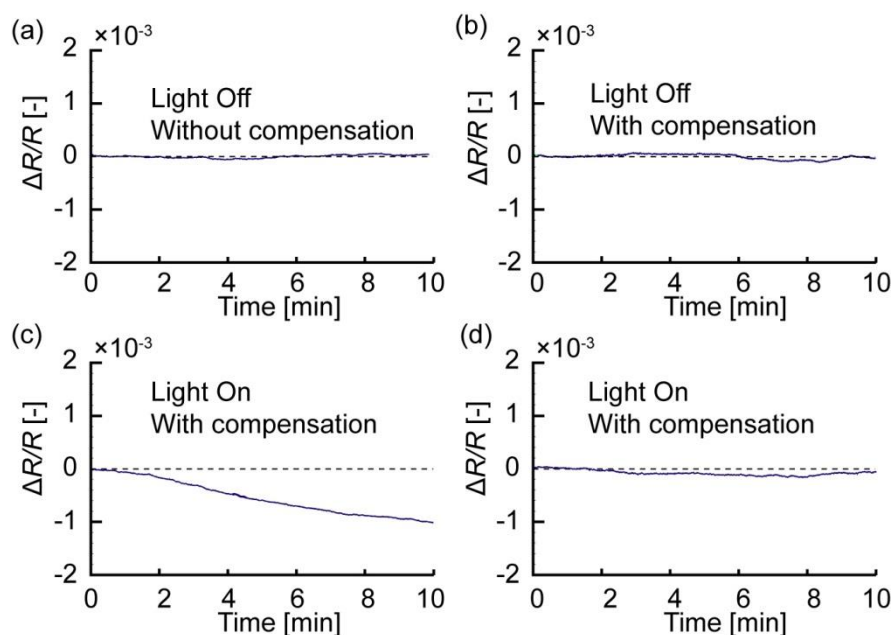


Fig. 4.13 トラクション力センサの温度補償の対処によるのセンサ応答, (a)顕微鏡の光 Off, ホットプレート On, (b)顕微鏡の光 Off, ホットプレート On, 補償あり, (c)顕微鏡の光 On, ホットプレート On, (d)顕微鏡の光 On, ホットプレート On, 補償あり

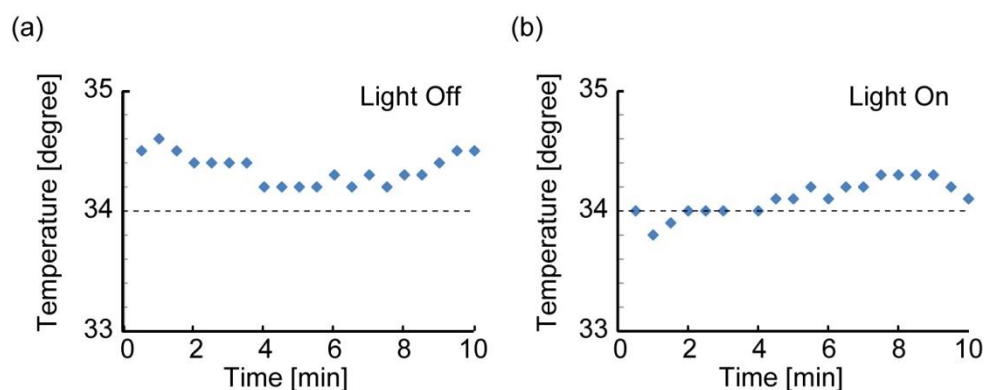


Fig. 4.14 (a)顕微鏡の光 Off, ホットプレート On の時の液体培地の温度, (b)顕微鏡の光 On, ホットプレート On の時の液体培地の温度

4.4.2. 液体培地の温度に対するセンサ反応

4.3.1 節に示した実験環境で、液体培地に温度変化を与える要因としてはホットプレートからの熱と空気中へと逃げる熱、顕微鏡の液浸レンズにより奪われる熱等が挙げられる。顕微鏡のレンズを液体培地の中に入れた時の培地の温度を温度計(TSU-7225, 株式会社チノー)で計測すると、入れる前に比

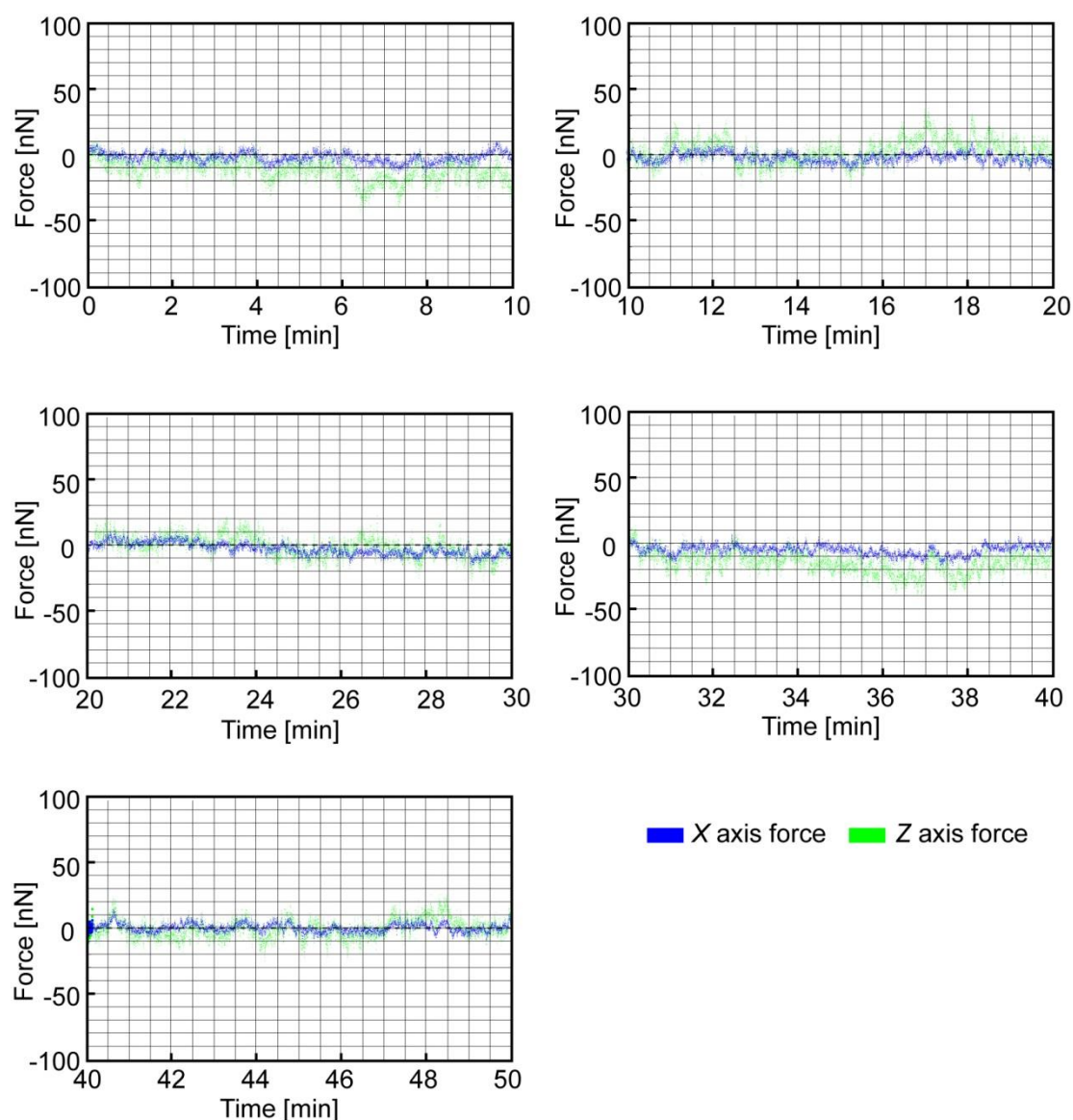


Fig. 4.15 外乱による抵抗変化率を x 軸及び z 軸方向の力に換算した時

べ、 36°C から 34°C に低下していた。本研究では、こういった温度に対する補償として、2.2.5 節で示したように、力センサと補償のセンサの光と温度に関する抵抗変化がお互いに相殺するようにブリッジ回路を組んでいる。

Fig. 4.13 に補償センサをブリッジ回路に組み込んでいない場合と補償センサをブリッジ回路に組み込んだ場合の、温度変化に対するトラクション力センサの応答を示す。実験の時は 37°C に設定されたホットプレート上にセンサを置き、溶液は液体培地を用いた。いずれも液体培地の温度が安定した後で測定した応答である。まず、**Fig. 4.13(a)** は顕微鏡の光源であるハロゲンランプが付いてない状態で、補償センサを組み込んでいない場合の力センサの抵抗変化率を示す。大きな温度変化が生じない限り、補償をしなくてもセンサの応答は変化しなかった。**Fig. 4.13(b)** は同様にハロゲンランプが付いてない状

態で、補償対処をした力センサの抵抗変化率を示す。Fig. 4.13(a)と同様、センサの応答に変化はなかった。Fig. 4.13(c)はハロゲンランプを付けた状態で、センサのみの応答を計測した結果を示す。この結果が示すように、光を入射することで、抵抗変化率が減少していることが確認された。今回のトラクションカセンサに使用した piezo 抵抗は温度が上昇すると、抵抗値も上昇する。しかし、Fig. 4.13(c)の結果ではセンサ応答は piezo 抵抗が減少する傾向を示したため、この応答はレンズを液体培地の中に入れた際に、液体培地の熱をレンズに奪われ、液体培地の温度が低下した影響であると考えられる。

Fig. 4.13(d)にハロゲンランプを付けた状態で、補償センサを回路と一緒に取り組んだセンサの応答を示す。補償センサも力センサと同様に温度変化に対して抵抗値が変化するため、お互いの抵抗変化が相殺され、応答が安定している。

Fig. 4.14 にハロゲンランプによる落射照明を行った場合と行わない場合の液体培地の計測温度を示す。ハロゲンランプをつけることによる、温度の大きな変化は見られなかった。しかし、どちらも 37°C より低かった。これはディッシュの蓋がオープンしたままであるため、空気中へと熱が逃げってしまうためだと考えられる。

Fig. 4.15 に温度によるトラクションカセンサの二つの抵抗変化率を x 軸及び z 軸方向の力に換算したグラフを示す。4.4.1 節で求めた R_1 と R_2 の変化率に特性行列の逆行列を掛け算することで力を求めた。実験は補償対処を行った力センサを液体培地に入れ、ホットプレートによる加温と顕微鏡の落射照明を行った状態で 50 分間計測した。Fig. 4.15 には計測されたセンサ信号を、10 分間ずつ区切った 5 つのグラフとして表示した。緑色は z 軸方向へ換算した力を示す。 x 軸方向では、最大 10 nN 程度変化している。 z 方向の力に換算したときは最大 20 nN 程度の力となることが確認された。細胞の力を計測する際には、この程度のノイズが含まれることを考慮して、データを解析する必要がある。

4.5. 本章のまとめ

本章では試作した力センサを用いて、実験環境においてのセンサの応答について述べた。ホットプレートからの電気ノイズや、空気中、純水、水道水、液体培地中で計測した際に生じるセンサの反応を計測した。絶縁膜として用いたパリレン厚みと液体の中でのセンサ応答の関係について調べた。計測結果より、センサの要求仕様を満足させながら絶縁できる実験環境を構築した。

第5章 トラクション力の計測

5.1. はじめに

本章では第3章で試作したトラクション力センサのパッド上に細胞を培養し、細胞が発生した力の計測について記す。はじめに、実験前の処理として細胞培養のためのセンサ洗浄手順について述べる。その後、センサ上に細胞を培養したときの様子を観察し、計測された細胞のトラクション力を評価・考察する。

5.2. センサ洗浄

細胞をセンサ上に培養するためにはまず、センサをきれいにする必要がある。4.3.1節に示したように、両面テープを用いて細胞用のディッシュに固定し、蜜蝋で覆った。Fig. 5.1に細胞をセンサチップ

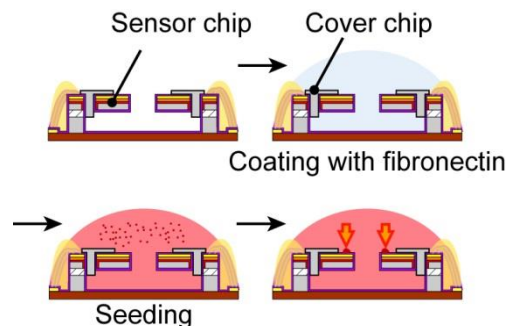


Fig. 5.1 センサチップ上に細胞を培養する前の処理

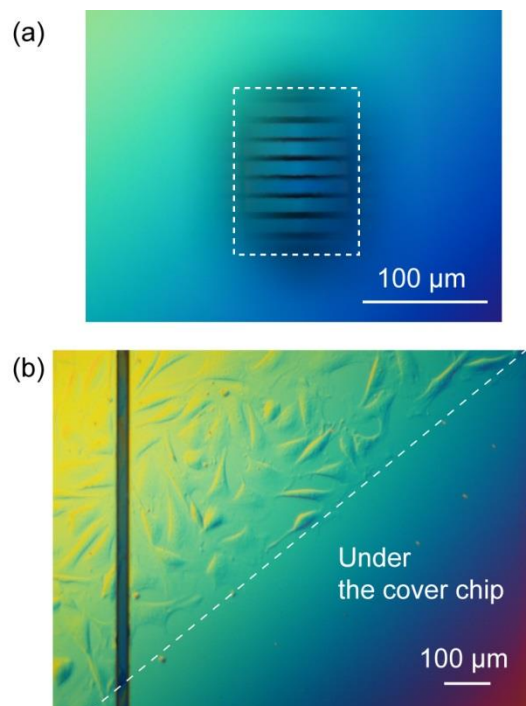


Fig. 5.2 (a) カバーチップを通して見たセンサパッドアレイの写真, (b) 細胞の播種後, カバーチップを外した後の写真

上に培養する前のプロセスを示す。センサチップ上にカバーチップを乗せ、カバーチップも少量の蜜蝋で基板に固定した。カバーチップをセンサチップの穴に差し込むだけでは液体を入れる際にカバーチップが浮かんでしまうためである。Fig. 5.2(a) にカバーチップを通して見えるセンサパッドアレイの写真を示す。この穴を通して細胞はセンサパッド上のみ接着する。

まず、センサを固定したディッシュにクリーンベンチの中で UV 灯を 5 分程度当てることで殺菌を行う。空気を抜くため、表面張力が小さい 99%のエタノールからディッシュに入れ、70%のエタノールに置換していく。エタノールを用いた洗浄後は Fibronectin のコーティングを行うために、5 ml のデスペットを用い 70%エタノールを数回かけて PBS(Phosphate buffered saline)溶液に置換する。この時にセンサが乾燥すると液体の表面張力によって隣の壁面にくっついてしまうので、溶液をすべて吸い取らず、センサを濡らした状態で溶液の置換を行うように注意する。PBS 溶液に置換した後、さらに EBSS(Earle's Balanced Salt Solution)溶液へ置換を行う。これによって、残存しているエタノールを取り除く。その後、ディッシュに 15 μ l のフィブロネクチンを添加し、常温で 1 時間待つことでセンサ表面の Fibronectin コーティングを行う。コーティングが終わるとセンサ上に細胞を播種する。細胞がセンサ上に沈み、接着するまで、1 時間待つ。その後、顕微鏡で確認して細胞がセンサ上に接着できたことを顕微鏡で確認し、ピンセットを用いてカバーチップをセンサチップから外す。Fig. 5.2(b) にカバーチップを外してからセンサチップの表面の写真を示す。カバーチップの直下には細胞が接着してないことが確認された。

実験の液体培地は CO₂ の影響を受けない Leibovitz's L-15 Medium (HEPES 25mM, pH7.4)を使用した。

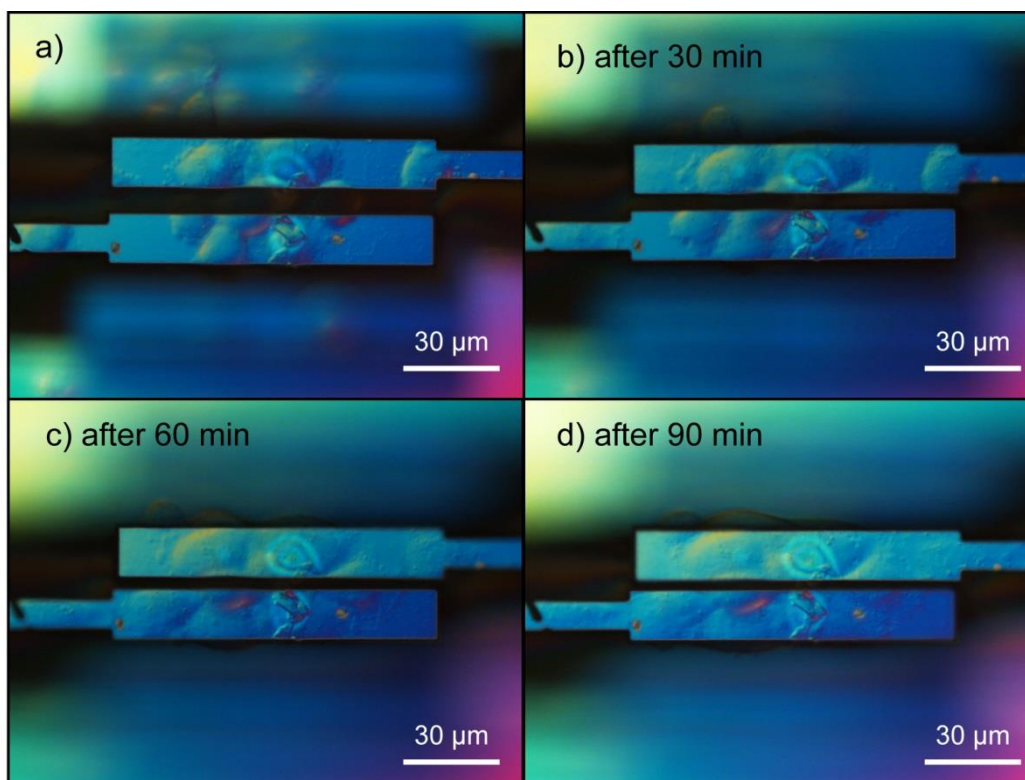


Fig. 5.3 a) センサパッド上で細胞の成長の様子, b) a)から 30 分後の写真, c) 60 分後の写真, d) 90 分後の写真

細胞を継代するときに使用する EMEM (Eagle's minimal essential medium)は CO_2 の影響を受けるため、顕微鏡の直下に長時間使用する時には CO_2 に依存しない液体培地を使用する必要がある。L-15 培地の調整方法としては粉状の HEPES を純水に溶かし、1 M の HEPES 溶液を作る。その後、オートクレーブを用いて 1M の HEPES 溶液を滅菌し、水酸化ナトリウムを用いて pH 7.4 に調整した。製造した 1 M の HEPES pH7.4 溶液を最終濃度が 20~25 mM になるように、L-15 培地(Leibovitz's L-15Medium)に加えた。その後、EMEM 培地のときと同様に FBS(Fetal bovine serum)10%と AntiBiotic1%を添加した。溶け残った HEPES がセンサに触れることを防ぐため、調整した液体培地は最後に孔径が 0.45 μm (Corning 430768 Filter System)のフィルタを通して使用した。

力センサパッド上に細胞が接着していたら、液体培地を 5 ml のピペットを用い、数回かけて新しい培地に置換した。基板上に接着していない細胞が培地の中で浮遊しているため、溶液を交換する必要があったためである。

細胞の観察には微分干渉顕微鏡を用い、細胞を確認した。微分干渉顕微鏡はコントラストを強調して物体を観察することができるため、厚みのある物体であれば、透明な細胞であっても境界を強調して観察できる。この方法は細胞染色を行わないため、細胞を生きのまま長時間観察することができる。CCD カメラ(DP80, オリンパス)を用いて、撮影を行った。

Fig. 5.3 にセンサパッド上で細胞が成長する様子を示す。8 個の細胞がセンサパッド上にあった。そ

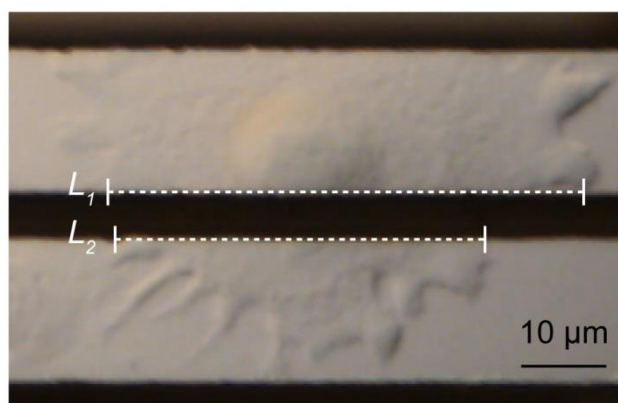


Fig. 5.4 二つのセンサパッドにかけて伸展した細胞(BAOSMCs)

Table 5.1 センサパッドに接着している細胞幅とギャップ

Number	Gap [μm]	L_1 [μm]	L_2 [μm]	$ L_1-L_2 $ [μm]	Cell total area [μm^2]
1	4	19.5	20.8	1.3	419
2	4	30	28.3	1.7	472
3	4	26.6	20.6	6.0	475
4	4	23.8	17.4	6.4	523
5	4	19.9	23.3	3.4	685
6	5	36.2	36.5	0.3	832
7	5	57.9	46.4	11.5	1967

のうち3つはパッド間にまたがっていた。Fig. 5.3の a) は観察を始めたときの写真である。Fig. 5.3の b), c), d)は30分, 60分, 90分後の細胞の様子である。30分までは細胞が急速に成長しているため、時間の経過とともに、センサパッドのギャップが狭くなっていくことが確認された。60分後から90分後までは細胞の成長速度は遅いが、2つのセンサパッド間の間隔から、お互いに引っ張り続けていることが確認された。細胞がセンサパッドアレイ上に接着し、引っ張っていることが目視でも確認されたため、センサを用いてトラクション力を十分に計測できると考えられる。

5.3. パッド間のギャップと細胞の接着

本節ではパッド間のギャップが細胞の接着に与える影響について調べた。Fig. 5.4にセンサパッド上に接着している平滑筋細胞 (BAOSMCs, Cell Applications) の様子を示す。Table 5.2にCCDカメラの画像から計測したギャップ、センサパッドに接着している細胞の幅 L_1 と L_2 、 L_1 と L_2 の差、パッド間にかかって伸展している細胞の全面積を示す。細胞の境界の長さは画像処理ソフトウェアImageJを用いてマウスで細胞の境界をクリックすることで取得した。CCDカメラの画像ではパレン膜の観察が難し

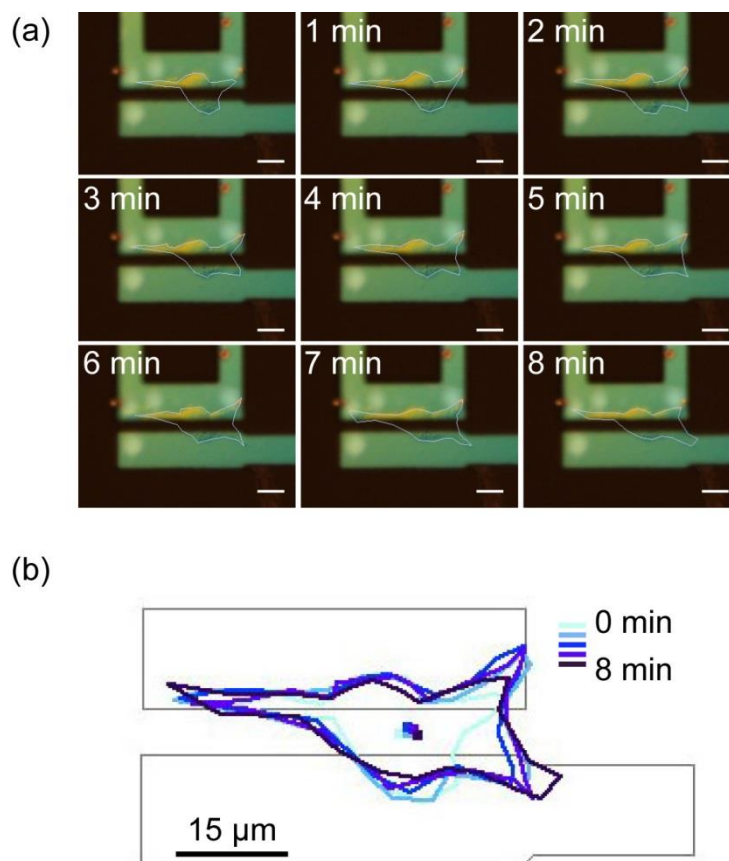


Fig. 5.5 (a) フレームと力センサ上に接着している細胞(BAOSMCs)の様子, Scale bar : 15 μm , (b) 細胞の境界と重心の動き

いが, SEM 画像から確認した結果からパリレン膜がギャップの両側面に 0.5 μm 程度蒸着されていることを確認している. このため, 実際のギャップは Table 5.3 のギャップより 1 μm を引いた分となる. また, 測定した細胞の幅から求めた割合 L_1/L_2 は 1.1 ± 0.2 であった. 細胞は最大 2000 μm^2 まで二つのパッド上で伸びることができ, 細胞が成長していることが確認されたため, パッド間のギャップは細胞の伸展に大きく影響を与えないと言える.

5.4. 細胞のトラクション力の計測

力センサ上に平滑筋細胞を培養し, 2 台のロックインアンプを用いて, 力センサの R_1 と R_2 の抵抗値変化を計測した. センサ上に培養した細胞は BAOSMCs (CAB35405, Cell Applications)である. **Fig. 5.5** にセンサ上に培養した細胞の様子を示す. 細胞のトラクション力を計測するために, カンチレバーの形状をした力センサとセンサの右側 (写真の上側) に細胞の足場となるためのフレームがある. カセ

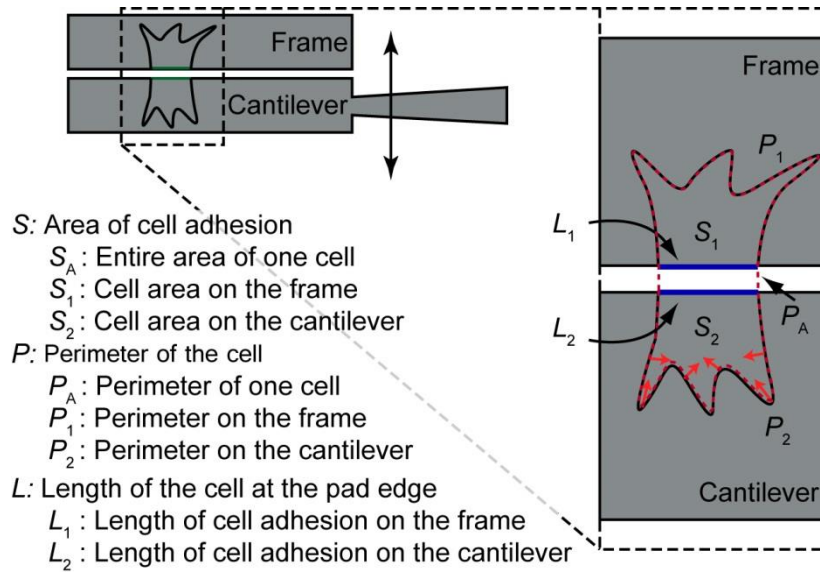


Fig. 5.6 フレームとカセンサに細胞が接着している時の面積，外周と基板に接着している細胞の幅の定義

ンサとフレームの x 軸方向のバネ定数はそれぞれ 0.2 N/m ， 300 N/m であり，フレームはカセンサに比べて十分硬い．カセンサの z 軸のバネ定数は 0.08 N/m である．フレームとカセンサ間のギャップはパリの厚みを含めて $3 \mu\text{m}$ 程度である．Fig. 5.5(a) に計測を始めてから，1 分毎の細胞の様子を写真上に白線で示した．ギャップ上ではフレーム上で細胞の境界とカセンサ上の細胞の境界をつなげた．播種直後の細胞は，球の形をしているため，細胞の長手方向と短手方向の長さの対称の比が 1 に近い．しかし，実験写真の細胞は長さが約 $52 \mu\text{m}$ ，幅が約 $20 \mu\text{m}$ であり，その比率は 2.6 であったため，フレームとカセンサ上に播種した細胞が接着，成長していると考えられる．Fig. 5.5 の(b)は画像ソフト ImageJ を使い，細胞の境界線から求めた重心を示した．薄い水色から濃い青色まで 8 分間の時間の経過による細胞の様子を示した．灰色はフレームとカセンサの境界線である．Fig. 5.5 の図から細胞が移動しているのではなく， $5 \mu\text{m}$ 以内の範囲で動いていることがわかった．

Fig. 5.6 にフレームとカセンサ上に細胞が接着している時の面積，外周と長さの定義を示す． S_A は細胞全体の面積， S_1 はフレーム側に接着している部分の面積， S_2 はカセンサ（カセンサ）側に接着している部分の面積， P_A は細胞全体の外周， P_1 はフレーム側に接着している部分の外周， P_2 はカセンサ側に接着している部分の外周， L_1 はフレーム側に接着している細胞の幅， L_2 はカセンサ側に接着している細胞の幅である．フレームとカセンサの間にある細胞の面積は S_A には含まれているが， S_1 と S_2 には含まれていない．Fig. 5.7 に時間による(a)細胞の長さ (P_A ， P_1 ， P_2 ， L_1 ， L_2)，(b)面積 (S_A ， S_1 ， S_2)，(c) x 軸方向の力，(d) z 軸方向の力を示す．最初の 2 分間で細胞の外周と面積が急激に増加した．力に関して， x 軸方向に力が増加するときはカセンサがフレームに近づく方向に力が働いて，減少するときはカセンサがフレームから遠くなる方向である．また， z 軸に関しては増加するとカセンサが浮き上がる方向であり，減少するとカセンサが下に押される方向で働くことである．細胞の面積についてはカセンサ上よりフレーム上に接着している面積がもっと大きい．細胞はフレームとカセンサの両方に接着し

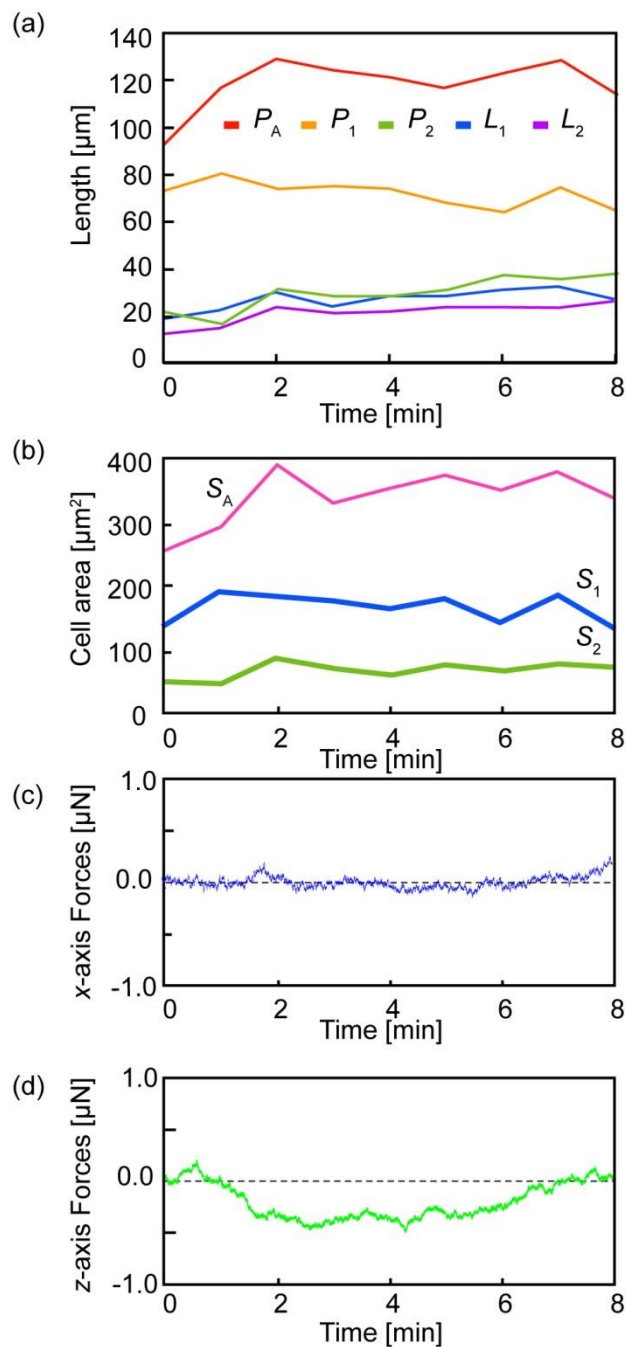


Fig. 5.7 Fig. 5.5 の細胞の(a)長さ, (b)面積, (c) x 軸方向の力変化, (d) z 軸方向の力変化

ている. 8分間で細胞の面積は $257 \mu\text{m}^2$ から $345 \mu\text{m}^2$ まで $88 \mu\text{m}^2$ 増加した. 特に最初から2分までは $257 \mu\text{m}^2$ から $398 \mu\text{m}^2$ まで面積が $139 \mu\text{m}^2$ 増加している. 力に関しては x 軸方向にはほとんど力が発生しなかった. z 軸に関しては1分から2分までのセンサを押し続ける力が発生し, 最大約 500 nN 程度まで力が発生した. 細胞が広がっていく際に, カセンサが下方方向に動いているが, これはカセンサがフレームより約 $2\sim 3 \mu\text{m}$ 程度高い位置にあるため, 細胞がセンサを引っ張っていると考えている. また, 2分から4分まではほぼ力変動がない. 4分から7分まではカセンサが浮き上がる方向で力が働いている.

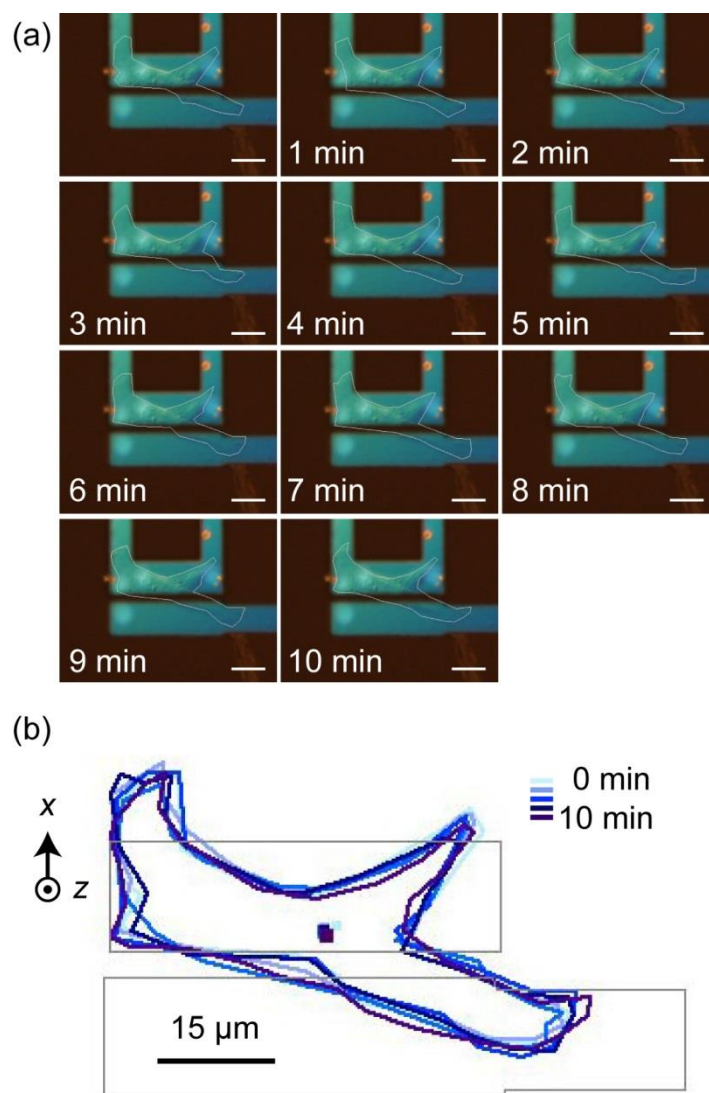


Fig. 5.8 (a) フレームと力センサ上に接着している細胞(BAOSMCs)の様子, Scale bar : 15 μm , (b) 細胞の境界と重心の動き

x 軸より z 軸のバネ定数が小さいことと、プロセスの都合により力センサの高さがフレームの位置より約 2~3 μm 高いため、力センサが引っ張られ、z 軸の方に力が発生したと考えられる。従って、x 軸方向には力が増加しない、一方、z 軸方向に力が発生してあり、細胞の面積が増加するときにトラクション力が増加したと考えられる。この時、最初の 2 分間でのデータから、単位面積当たりの力を算出すると 3.6 $\text{nN}/\mu\text{m}^2$ となる。

Fig. 5.8 に続けて計測した結果を示す。**Fig. 5.5** の実験から 5 分程度の時間が経過した。(a)に細胞の境界線をなぞった 10 分間の写真と(b)には時間による細胞の動きを色で表示した図を示す。10 分間の間、細胞の重心の位置は左下の方向に約 1.6 μm 以内の範囲で動いた。

Fig. 5.9 に **Fig. 5.8** の写真を基に解析した時間に対する(a)細胞の長さ (P_A , P_1 , P_2 , L_1 , L_2), (b)面積

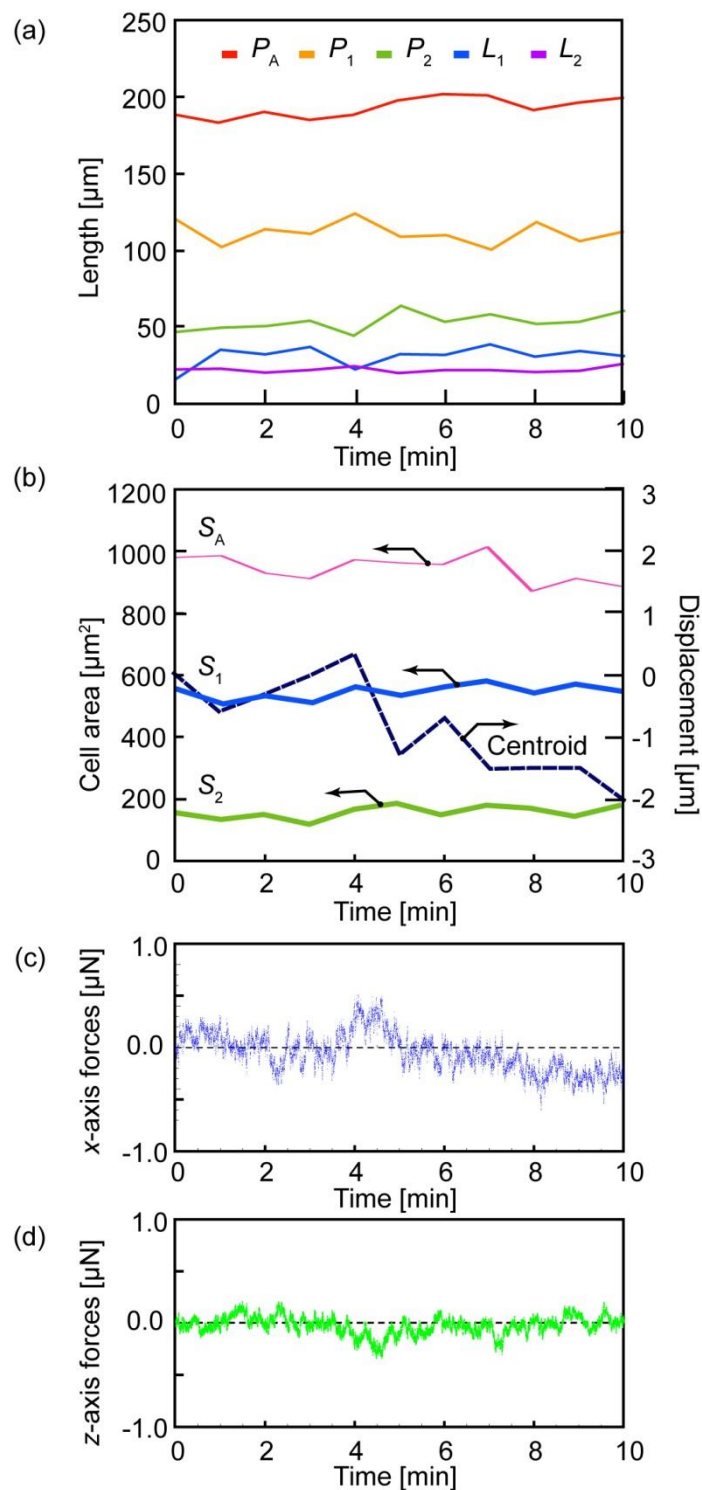


Fig. 5.9 Fig. 5.8 の細胞の(a) 長さ, (b) 面積と重心の位置, (c) x 軸方向の力変化, (d) z 軸方向の力変化

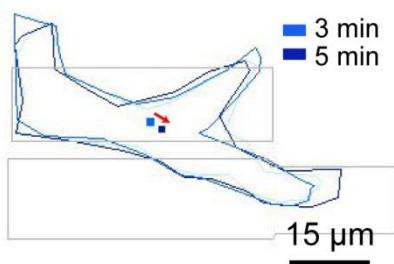


Fig. 5.10 Fig. 5.8 のグラフでの 3 分目と 5 分目の細胞の境界線と重心の位置

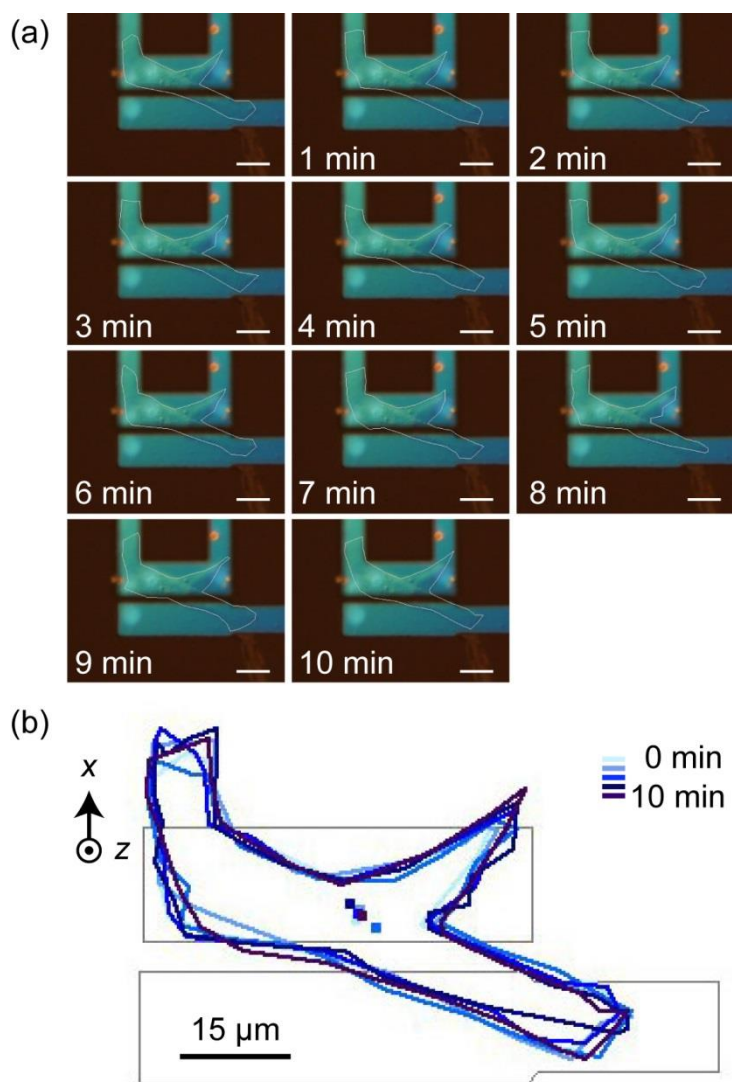


Fig. 5.11 (a) フレームと力センサ上に接着している細胞(BAOSMCs)の様子, Scale bar : 15 μm , (b) 細胞の境界と重心の動き

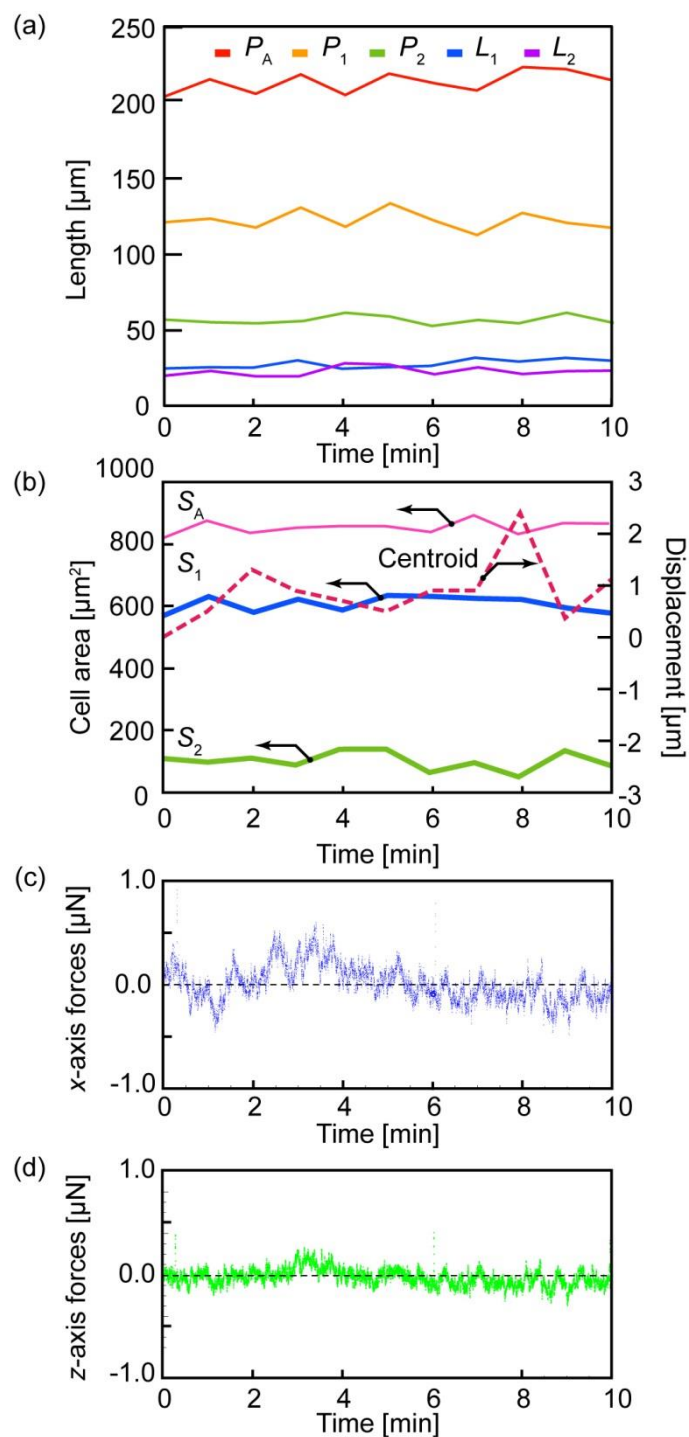


Fig. 5.12 Fig. 5.11 の細胞の(a)長さ, (b) 面積と重心の位置, (c) x 軸方向の力変化, (d) z 軸方向の力変化

(S_A , S_1 , S_2) と重心, (c) x 軸方向の力, (d) z 軸方向の力を示す. (b)のグラフで細胞の面積は実線で, x 軸方向に細胞の重心が移動した距離は点線で表示した. 細胞の重心は細胞の厚さが一定であると仮定し, 細胞の境界線から求めたものである. 力センサは x 軸方向の力のみを計測するため, 重心の x 軸方向の移動量を求めた. また, 細胞がフレーム側に動いた時を(+), 力センサ側に動いた時を(-)と定義

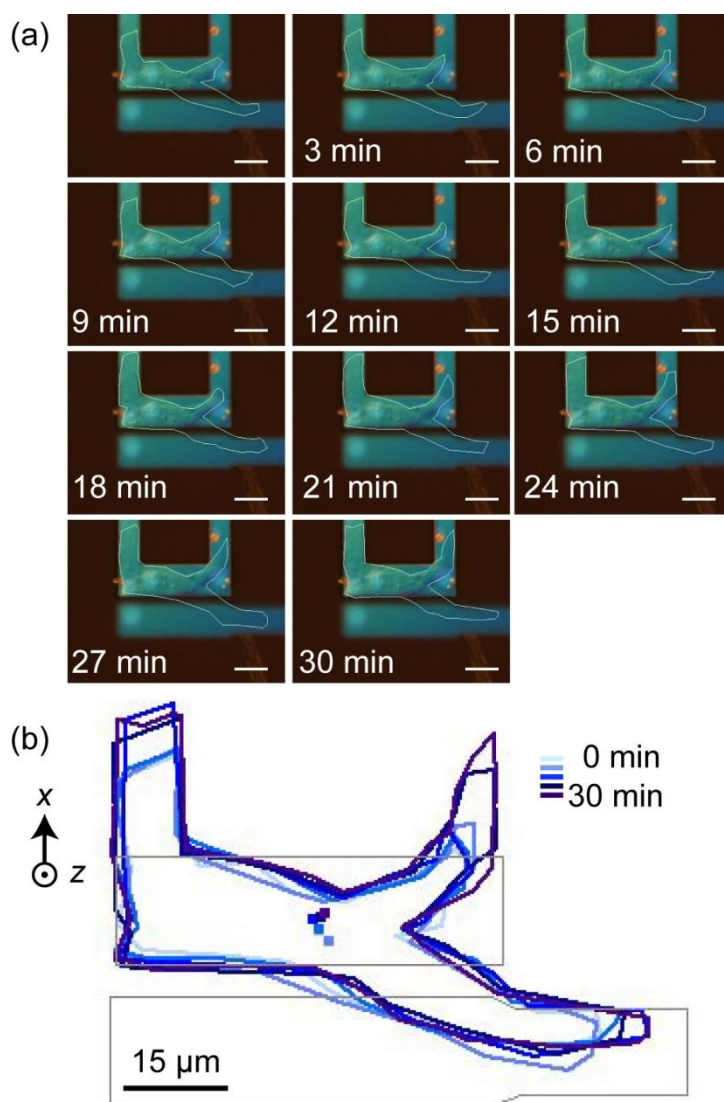


Fig. 5.13 (a) フレームと力センサ上に接着している細胞(BAOSMCs)の様子, Scale bar : 15 μm , (b) 細胞の境界と重心の動き

した.

細胞の外周とフレームと力センサに接着している細胞の幅は大きく変化は見られなかった. 細胞の面積は $200 \mu\text{m}^2$ 以内で変動した. 細胞の面積は 2 分から 4 分まで $806 \mu\text{m}^2$ から $866 \mu\text{m}^2$ まで増加し, 4 分から 5 分目では $866 \mu\text{m}^2$ から $857 \mu\text{m}^2$ と $9 \mu\text{m}^2$ 減少した. 全体的には最初に細胞の面積が $874 \mu\text{m}^2$ から 10 分後の面積 $817 \mu\text{m}^2$ まで, $57 \mu\text{m}^2$ 減少した. フレーム上に接着している細胞の面積が力センサ上に接着している面積より 5 倍以上大きく, フレーム側に接着している細胞の面積と力センサ側に接着している面積の差分は 10 分間で $35 \mu\text{m}^2$ 減少している. 一方, 細胞の重心の位置は 10 分後に約 $2 \mu\text{m}$ 程度力センサ側に移動している. これは, 細胞が減少している際に, フレーム側に接着している細胞の面積の減少分がセンサ側の面積の減少分より大きかったため, 重心の位置がセンサ側に移動したと考えられる.

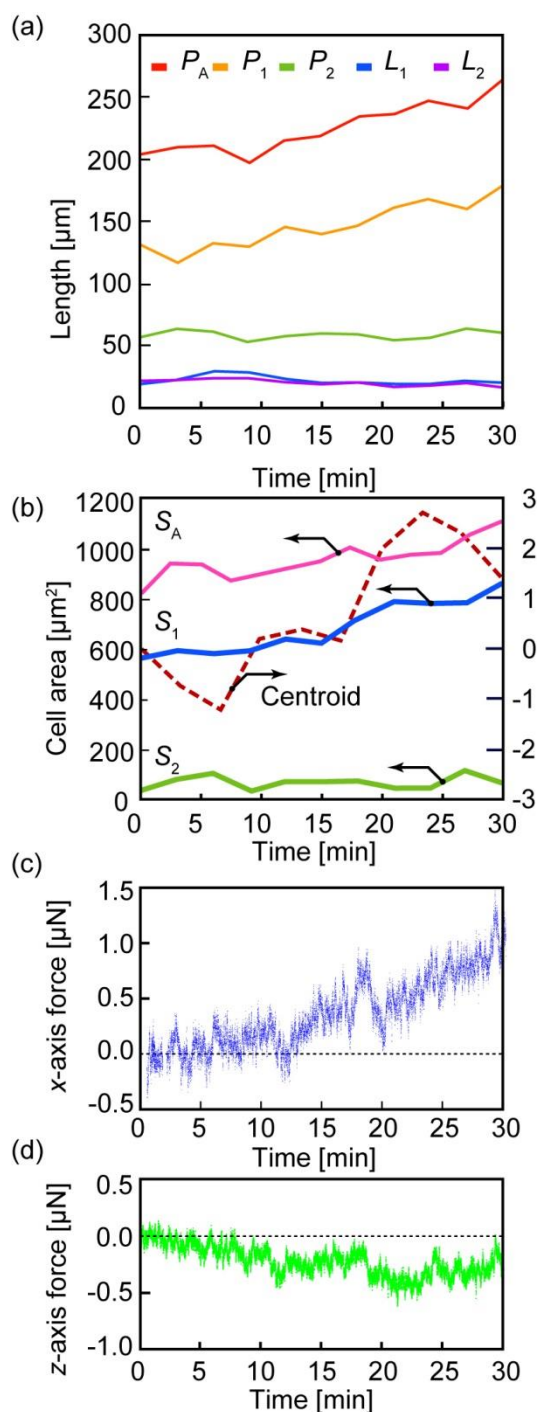


Fig. 5.14 Fig. 5.13 の細胞の(a)細胞の長さ, (b) 面積と重心の位置, (c) x 軸方向の力変化, (d) z 軸方向の力変化

力に関しては x 軸方向に 2 分から 4 分まで 400 nN の力が増加している. 4 分から 5 分には 200 nN 程度減少した. z 軸方向に関しては観測された力の大きさがノイズと同程度であった. 発生した力を細胞の増加・減少面積で割ると単位面積当たり増加・減少した力はそれぞれ $6.6 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ と $22 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ であり, 面積が減少する時の力をもっと強かった.

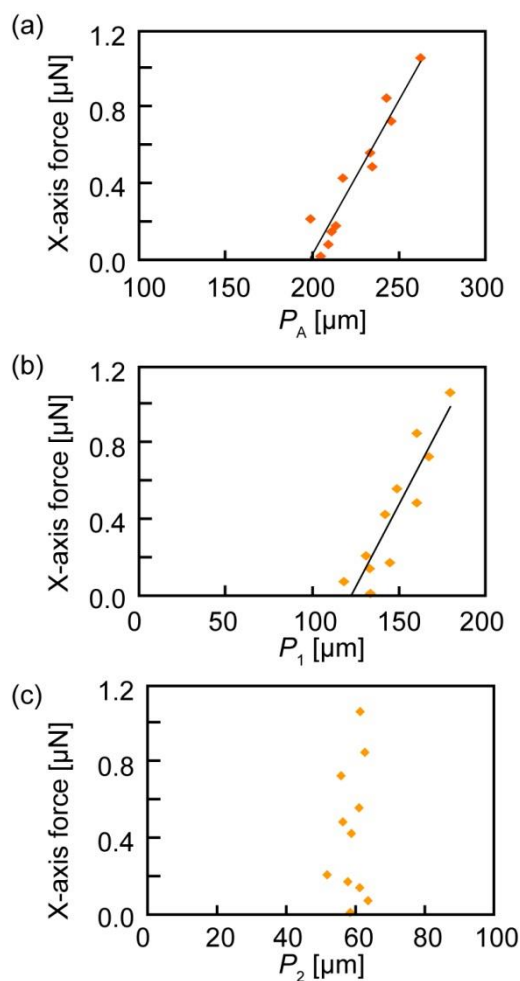


Fig. 5.15 (a)単細胞全体の外周と力の関係, (b)フレームに接着している部分の外周と力の関係, (c)力センサに接着している部分の外周と力の関係

Fig. 5.10 に Fig. 5.8 の 3 分から 5 分までの細胞の境界線と重心を示す. この間に細胞の重心は右下へ約 $2.5 \mu\text{m}$ 移動した. そこで, 細胞は x 軸方向に $-1.6 \mu\text{m}$ 程度動いている. x 軸と z 軸の合力は 4.5 分のところで一番強く, そのときの力は約 500 nN 程度であった.

これまでの結果から, 細胞の面積が減少した場合, 面積増加時と逆方向の力が働くことを確認した. この原因は細胞の面積が減少すると, 基板に結合している接着斑が分解されるため, トラクション力も弱くなるためであると考えられる.

引き続き 10 分間計測を行った結果を Fig. 5.11 に示す. (a)は細胞の境界線をなぞった 10 分間の写真, (b)は時間による細胞の動きを色で表示した図を示す. Fig. 5.11 の写真をもとに解析し, Fig. 5.12 に (a)細胞の長さ (P_A, P_1, P_2, L_1, L_2), (b)面積 (S_A, S_1, S_2) と重心位置が x 軸方向へ移動した距離, (c) x 軸方向の力, (d) z 軸方向の力を示す.

Fig. 5.12 で細胞の面積は 10 分間で $818 \mu\text{m}^2$ から $865 \mu\text{m}^2$ まで $47 \mu\text{m}^2$ 増加した. 細胞の移動については 10 分間で, 細胞の重心がフレーム側に $1 \mu\text{m}$ 程度移動した. 細胞が一番速い時は速度が $2 \mu\text{m}/\text{min}$ で

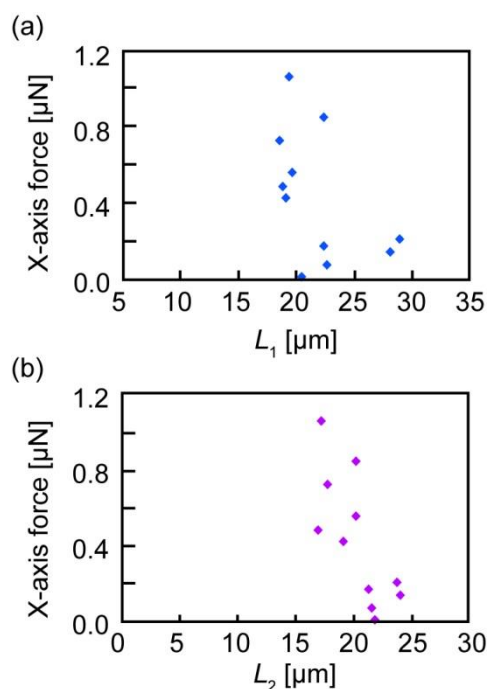


Fig. 5.16 (a)フレームに接着している部分の細胞の幅と力の関係, (b)力センサに接着している部分の細胞の幅と力の関係

あったが、それ以外の時間では $1 \mu\text{m}$ 前後重心が動いた。x 軸の力は 1 分から 3.5 分まで約 500 nN 増加している。この間細胞の面積は $26 \mu\text{m}^2$ 増加した。単位面積当たりのトラクション力は $19 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ である。z 軸の力に関しては大きな変化は見られなかった。細胞の重心の移動距離と力のグラフのピークが一致していない理由として、細胞全体の幅が左上から右下まで約 $74 \mu\text{m}$ であるため、重心が $1 \mu\text{m}$ 動いていることは比較的小さい値である。そのため、もっと長い時間で計測を行う必要がある。

引き続き、30 分間連続して細胞の移動、変形を計測した結果を **Fig. 5.13** に示す。**Fig. 5.14** に前述と同様に(a)細胞の長さ (P_A , P_1 , P_2 , L_1 , L_2), (b)面積 (S_A , S_1 , S_2) と重心位置が x 軸方向へ移動した距離, (c) x 軸方向の力, (d) z 軸方向の力を示す。30 分間の計測では細胞の面積が $832 \mu\text{m}^2$ から $1114 \mu\text{m}^2$ まで細胞の面積が $282 \mu\text{m}^2$ 程度大きくなることを確認することができた。細胞が大きく広がるときに比較的フレキシブルな力センサより固定されたフレームの方に伸びていくことが確認された。一番早く動いたときは $1.8 \mu\text{m}/\text{min}$ であり、30 分後細胞の重心位置は $1.4 \mu\text{m}$ 程度フレーム側へ移動した。細胞は硬い基板を好むため、フレーム側に伸びて行くと考えられる。力に関しては x 軸方向では 30 分間増加する傾向を示している。特に 12 分から 30 分まで x 軸の力の増加は約 $1 \mu\text{N}$ である。その間の細胞の面積変化は $942 \mu\text{m}^2$ から $1114 \mu\text{m}^2$ までとなり、 $172 \mu\text{m}^2$ 増加した。発生した単位面積あたりのトラクション力は $7 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ である。z 軸に関しては最初から 12 分まで約 300 nN 減少し、18 分まで 100 nN 増加し、18 分から 20 分まで 200 nN 減少、その後、30 分まで徐々に増加している。

これまでの結果をまとめると、細胞の面積が増加するときに細胞はトラクション力を発生している。**Fig. 5.7** では細胞の面積が $400\sim 500 \mu\text{m}^2$ であり、細胞は力センサとフレームの長手方向に体の伸ばし、x

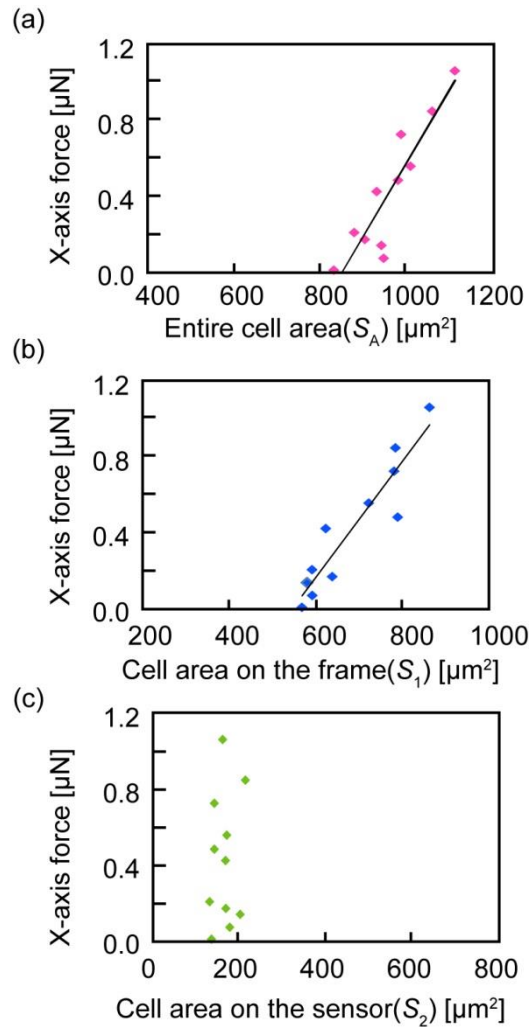


Fig. 5.17 (a)単細胞全体の面積と力の関係, (b)フレームに接着している部分の面積と力の関係, (c)力センサに接着している部分の面積と力の関係

軸にはほとんど力が発生しなかった. 一方, z 軸方向に力が増加した. これは高い位置にある力センサがフレームを側に引っ張られ, その際に z 軸方向では力センサが下方向に動いたためと考えられる. 以降の計測では z 軸方向に力がほとんど発生せず, x 軸のみ力が計測された. カンチレバーと固定されたフレームがある場合, **Fig. 5.5** の結果では 1 つの細胞のうち, フレーム上での細胞の部分面積は $136 \mu\text{m}^2$, 力センサ上での細胞の部分面積は $52 \mu\text{m}^2$ であった. フレーム上と力センサ上の部分面積の比が 2.7 である. 一方, 約 1 時間後の **Fig. 5.13** ではフレーム上が $864 \mu\text{m}^2$, 力センサ上が $164 \mu\text{m}^2$ であり, 面積比は 5.3 に増大した. よって, 細胞はカンチレバー形状の力センサよりも固定されたフレーム側へより多く伸展したといえる. この結果から, 細胞は固定された基板を好み, フレーム側により伸びていくと考えられる. また, 細胞の面積の増減と力の発生方向が一致した. 細胞の計測時間を 30 分間にしたときには力の増加を明確に確認することができた.

Fig. 5.14 のデータを用いて, **Fig. 5.15** の(a)に単細胞全体の外周と力の関係, (b)にフレームに接着し

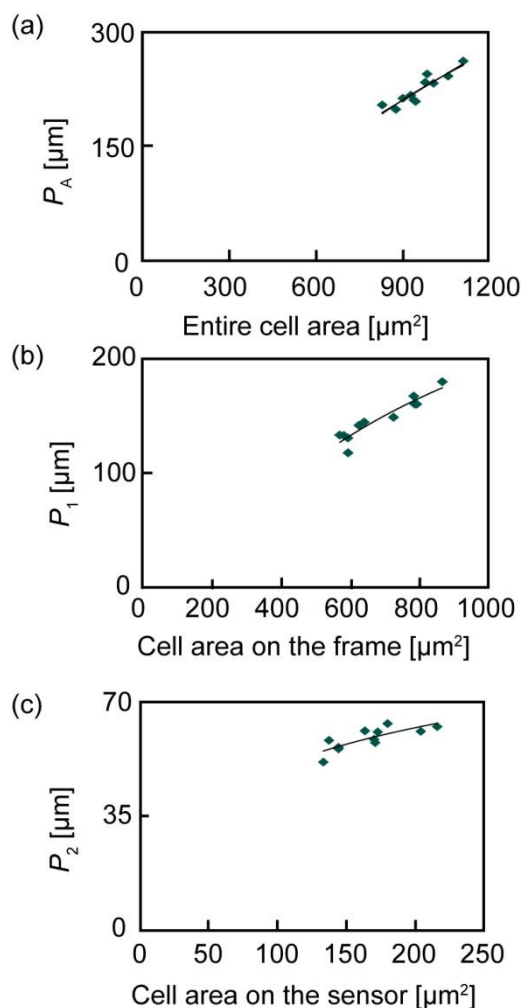


Fig. 5.18 (a)単細胞全体の面積と外周の関係, (b)フレームに接着している部分の面積と外周の関係, (c)力センサに接着している部分の面積と外周の関係

ている部分の外周と力の関係, (c)に力センサに接着している部分の外周と力の関係を示す。縦軸は細胞の外周が $205 \mu\text{m}$ から $264 \mu\text{m}$ までの力の変化量である。単細胞の外周と力が線形関係であることを示唆する。また、フレーム側に接着している細胞の外周と力の関係においても、線形関係であることが示されている。(c)については(a)と(b)に比べ、細胞が接着している面積が小さいため、外周が大きく増加していなかった。この時の単位長さ当たりの力は(a)では $16 \text{ nN}/\mu\text{m}$, (b)では $17 \text{ nN}/\mu\text{m}$ であった。

Fig. 5.16 の(a)にフレームに接着している部分の細胞の幅と力の関係, (b)に力センサに接着している部分の細胞の幅と力の関係を示す。固定フレームと力センサに接着している細胞の幅と力のグラフからは特に大きい関連性は見られなかった。

Fig. 5.17 の(a)に単細胞全体の面積と力の関係, (b)にフレームに接着している部分の面積と力の関係, (c)に力センサに接着している部分の面積と力の関係を示す。縦軸は細胞の面積が $831 \mu\text{m}^2$ から $1113 \mu\text{m}^2$ までの力の変化量である。面積についても(a)と(b)のグラフでは線形関係であることを示唆する。単位面積当たりが発生した力は(a)では $4 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$, (b)では $3 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ であった。トラクション力が長さだけで

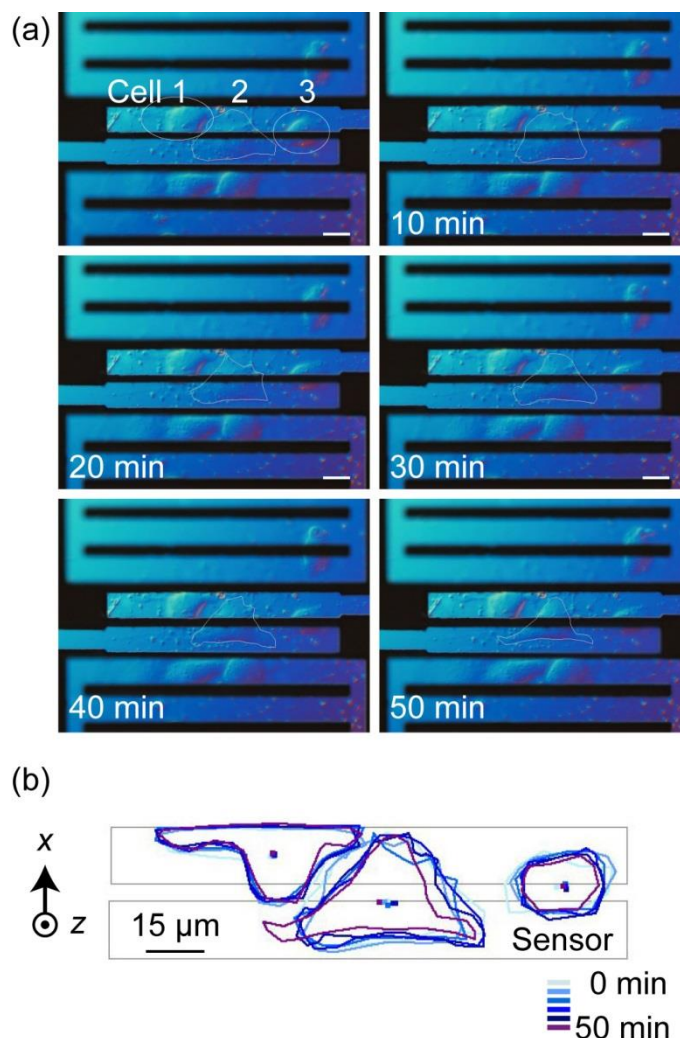


Fig. 5.19 (a) 二つの力センサ形状上で細胞(BAOSMCs)を培養した時の写真 Scale bar :15 μ m
(b)細胞の境界線と重心

なく、面積に関しても線形関係を示した。

Fig. 5.18 の(a)に単細胞全体の面積と外周の関係、(b)にフレームに接着している部分の面積と外周の関係、(c)に力センサに接着している部分の面積と外周の関係を示す。長さと同面積が線形関係を示している理由は、細胞が等方的に変形する場合には、その面積は周の長さの2乗に比例すると考えられる。しかし、今回の計測では細胞の面積の変化量が小さく、またフレームに沿って特定の方向に細胞が変形したため、面積と周りの長さとの関係が線形になったと考えられる。これが、計測されたトラクション力が面積と周の双方に対して線形な関係を示した理由であると考えられる。

Fig. 5.19 から **Fig. 5.26** までは複数細胞を計測したものである。細胞の種類は BAOSMCs である。2つのカンチレバーを並べて配置した。上はピエゾ抵抗を持たないフレームであり、ピエゾ抵抗を有する下側の構造を用いてトラクション力を計測した。2つ並んでいる上に3つの細胞がセンサの間にまた

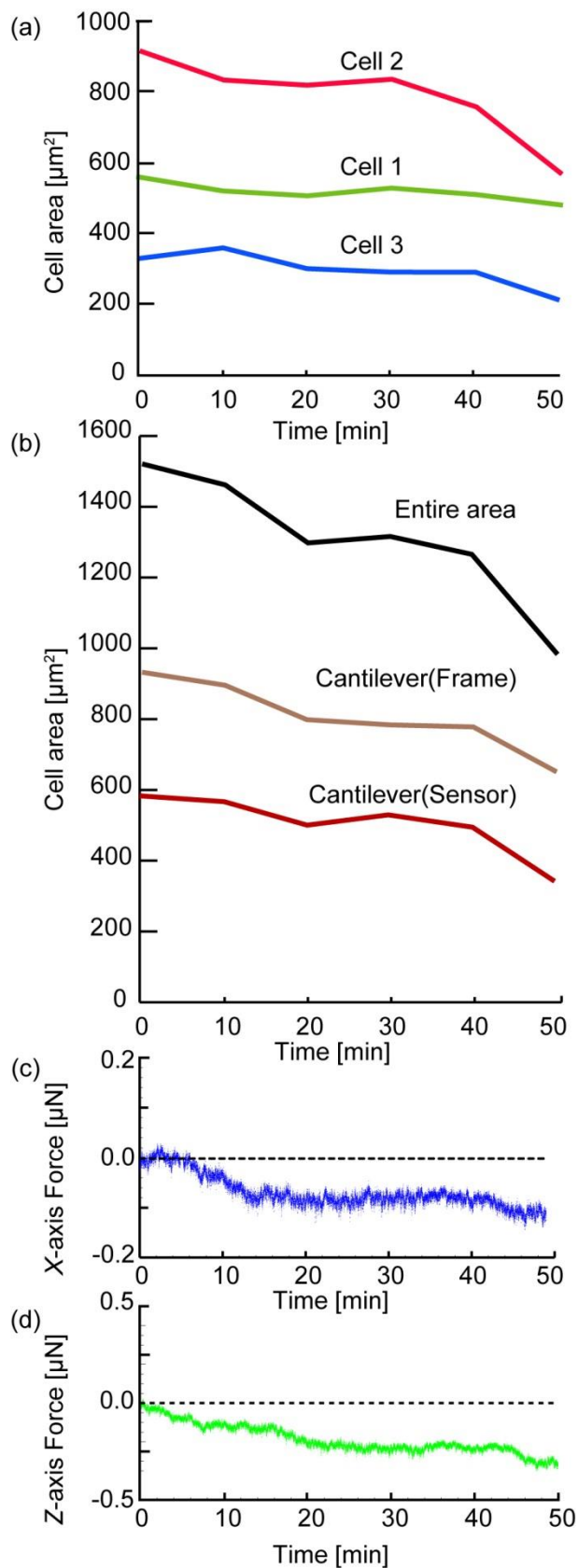


Fig. 5.20 センサ上で細胞(BAOSMCs)を培養した時に(a)それぞれ細胞の面積と(b)場所上の細胞の面積, その時に発生した(c)x 軸方向の力, (d)z 軸方向の力

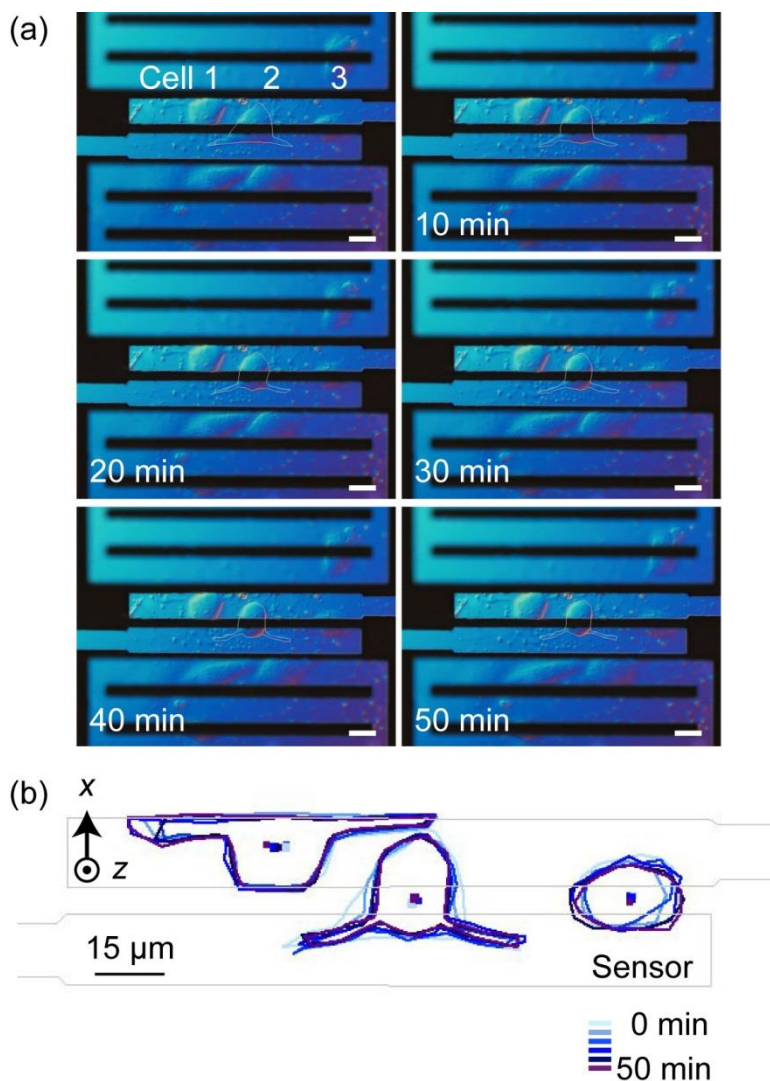


Fig. 5.21 (a) 二つの力センサ形状上で細胞(BAOSMCs)を培養した時の写真 Scale bar :15μm, (b) 細胞の境界線と重心

がって存在する。細胞の足場となる力センサの x 軸方向のバネ定数は 0.08 N/m である。 z 軸方向のバネ定数は 0.03 N/m である。計測は写真の下の方にある力センサを用いて行った。 Fig. 5.19 の(a)に 50 分間で 10 分刻みの細胞の写真を示す。 (b)には 3 つの細胞の境界線を表示した。右の 2 つの細胞は細胞の重心が力センサアレイの中にあり、真ん中の細胞の面積変化が一番大きかった。 Fig. 5.20 に(a)3 つの細胞の面積, (b)力センサ上で細胞が占める面積, フレーム上で細胞が占める面積及びその総和を示す。 (c)にその時の x 軸方向の力と(d)に z 軸の力について示す。細胞 1 の面積は $559 \mu\text{m}^2$ から $481 \mu\text{m}^2$ まで $78 \mu\text{m}^2$ 減少した。細胞 2 の面積は $916 \mu\text{m}^2$ から $568 \mu\text{m}^2$ まで $348 \mu\text{m}^2$ 程度減少した。細胞 3 の面積は $324 \mu\text{m}^2$ から $218 \mu\text{m}^2$ まで $106 \mu\text{m}^2$ 減少し、細胞 2 が最も減少した。センサ上での細胞の面積は $587 \mu\text{m}^2$ から $346 \mu\text{m}^2$ まで $241 \mu\text{m}^2$ 程度減少し、フレーム上での細胞の面積は $920 \mu\text{m}^2$ から $640 \mu\text{m}^2$ まで $280 \mu\text{m}^2$ 減少した。 x 軸方向の力は 50 分間で約 100 nN 減少している。また、 z 軸に関しては約 300 nN 程度減少

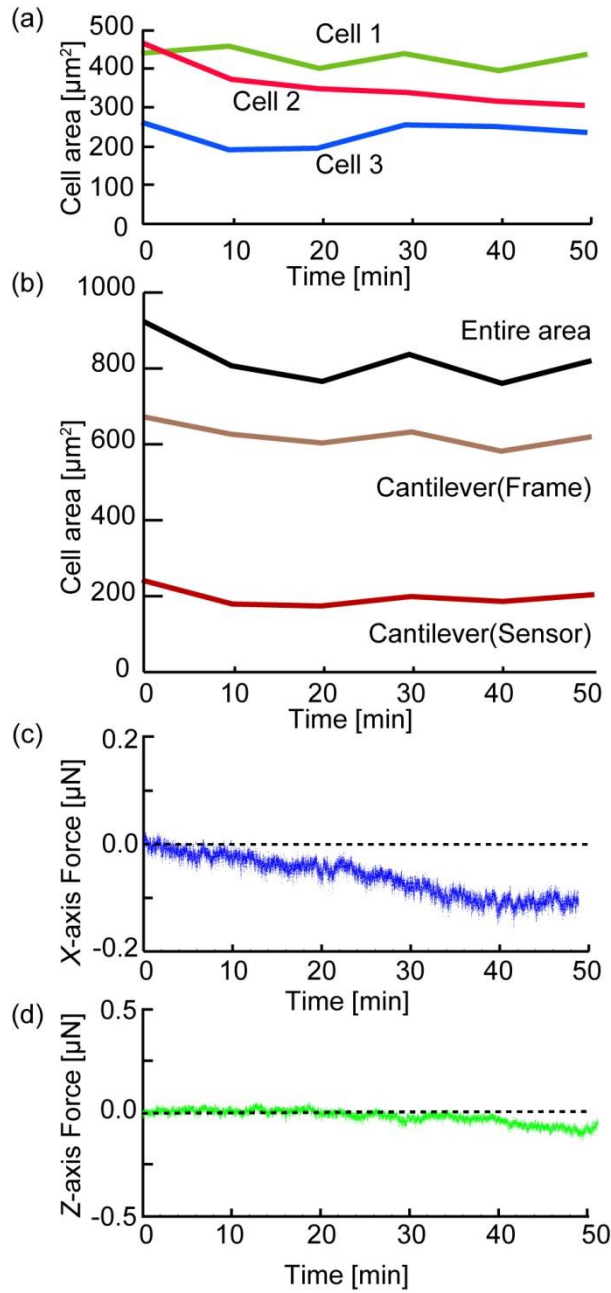


Fig. 5.22 センサ上で細胞(BAOSMCs)を培養した時に(a)それぞれ細胞の面積, (b)場所上の細胞の面積, (c)x 軸方向の力, (d)z 軸方向の力

している. 力の方向は x 軸に関しては足場となるカンチレバー (フレーム) と力センサが遠くなる方向に動いた. z 軸に関しては力センサが下方向に働いた. そのため, 細胞のトラクション力は面積が小さくなる時に x 軸で力が減少していることは基板と結合している接着面積が小さくなり, 基板を引っ張っている力が弱くなったためであると考えられる. また, この際, z 軸は力センサが押される方向に力を発生している. z 軸方向に力が発生した原因として, z 軸方向に引っ張っていた力が弱くなったため, 持ち上がっていた力センサが相対的に沈んだことが考えられる. 引き続き同じ細胞の力を同じ

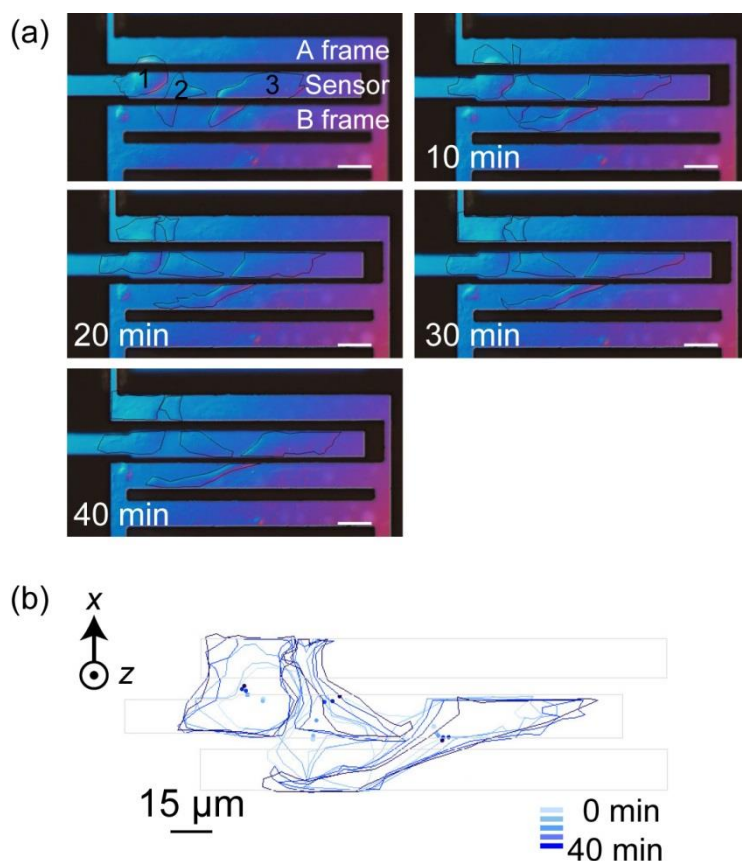


Fig. 5.23 (a)力センサの形状をした力センサと両方に固定されたフレーム上で細胞(BAOSMCs)を培養した時の写真 Scale bar :15μm, (b)細胞の境界線と重心

センサで計測した結果を **Fig. 5.21** に示す. **Fig. 5.22** に(a)3つの細胞の面積と(b)力センサ上に細胞が占める面積, フレーム上に細胞が占める面積及びその総和, その時の(c)x軸方向の力と(d)z軸の力を示す. **Fig. 5.22** より大きな面積変化は見られなかったが, 徐々に面積が減少している. 細胞1の面積は $443 \mu\text{m}^2$ から $436 \mu\text{m}^2$ まで $7 \mu\text{m}^2$ 減少した. 細胞2の面積は $464 \mu\text{m}^2$ から $308 \mu\text{m}^2$ まで $156 \mu\text{m}^2$ 程度減少した. 細胞3の面積は $263 \mu\text{m}^2$ から $237 \mu\text{m}^2$ まで $26 \mu\text{m}^2$ 減少した. センサ上での細胞の面積は $243 \mu\text{m}^2$ から $200 \mu\text{m}^2$ まで $43 \mu\text{m}^2$ 程度減少し, フレーム上は $677 \mu\text{m}^2$ から $615 \mu\text{m}^2$ まで $62 \mu\text{m}^2$ 程度減少した. x軸の力は0分から10分の間に 20 nN 程度減少し, 30分から40分の間時の面積の変化は $341 \mu\text{m}^2$ から $317 \mu\text{m}^2$ へ $24 \mu\text{m}^2$ 程度減少した. 30分から40分の間も 20 nN 程度減少している. z軸の力に関しては27分から35分まで約 100 nN 減少した.

Fig. 5.23 に力計測用の力センサと両側にフレームがあるときに細胞を培養した40分間の写真と細胞の境界線と重心を表示した絵について示す. 力センサとフレーム上で3つの細胞がある. 3つの細胞のうち, 細胞1は力センサと上側のフレームにまたがっている. 細胞2は両側にまたがっているが, 20分以降は力センサの下側からは退縮し, 上側の方に移動している. 細胞3は力センサと力センサの下側のフレームにまたがっている. 最初の写真と40分の写真を比べると, 細胞1と2は固定されているフレーム上に伸展している. 細胞3は力センサとフレームの長手方向へ伸展した. 最初の角度から細

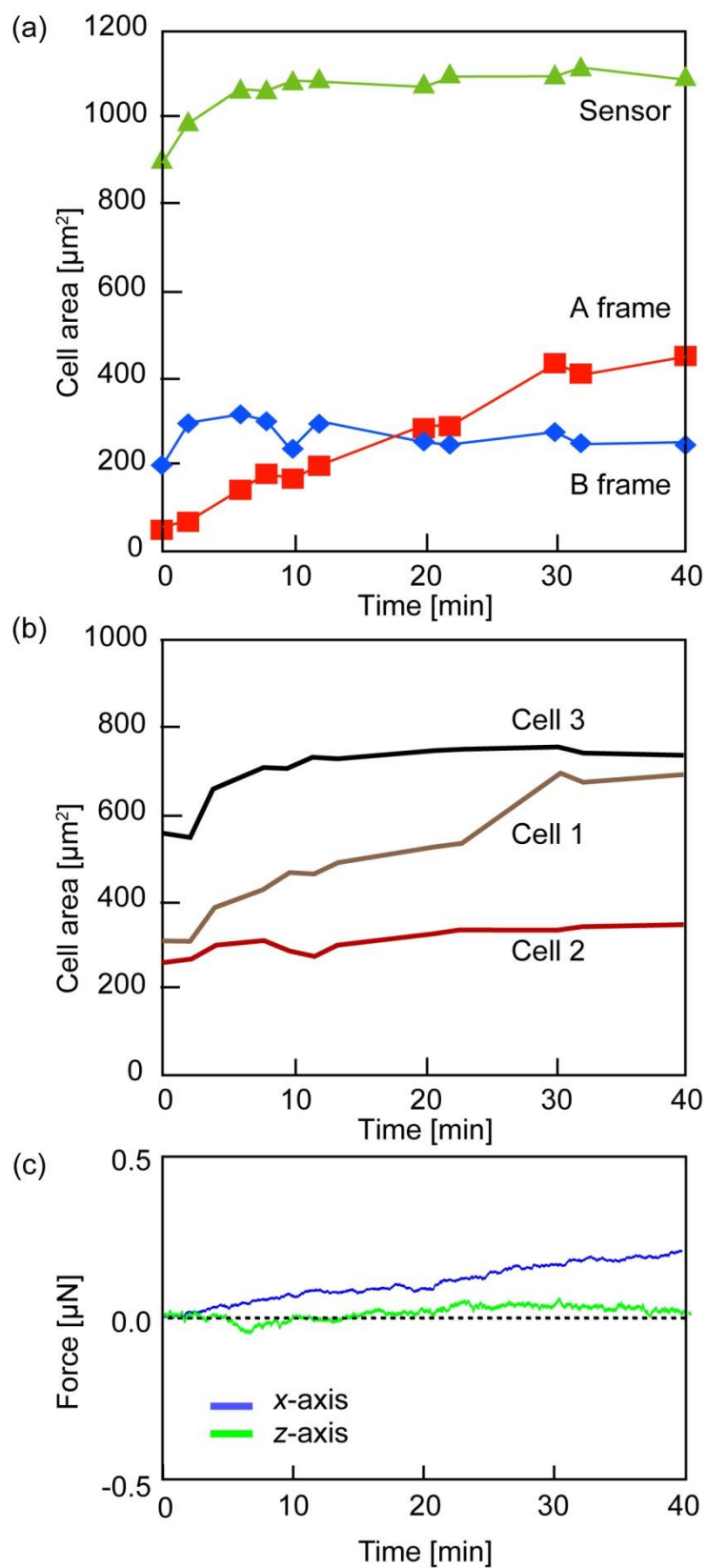


Fig. 5.24 センサ上で細胞(BAOSMCs)を培養した時に細胞の(a)場所による面積, (b)その間に発生した x 軸, (c) z 軸方向の力

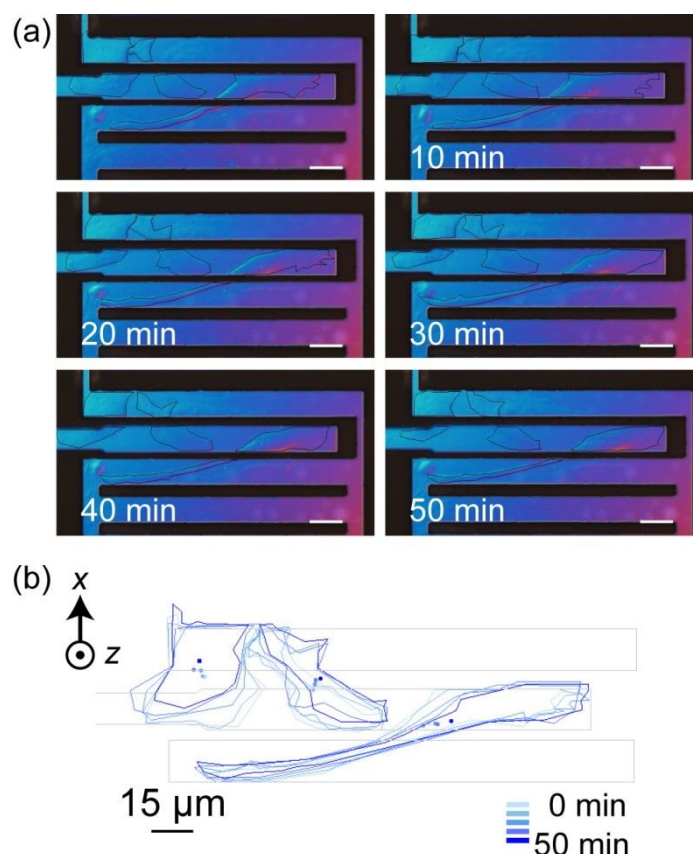


Fig. 5.25 (a)力センサの形状をした力センサと両方に固定されたフレーム上で細胞(BAOSMCs)を培養した時の写真 Scale bar :15 μm , 細胞の境界線と重心

胞の形が変わっていない。この実験から、細胞は力センサより固定されているフレーム上へより伸びること、隣に細胞がいる場合にお互い離れる方向へ行く傾向があった。Fig. 5.24 に力センサと上下の固定フレーム上での3つの細胞の面積の総合と力の変化について示す。力センサ上での細胞の面積は最初の880 μm^2 から40分後、1093 μm^2 となり、213 μm^2 増加した。下側のフレーム上での細胞の面積は210 μm^2 から243 μm^2 となり33 μm^2 増加した。上側のフレーム上では細胞の面積が51 μm^2 から449 μm^2 まで398 μm^2 増加し、一番大きな変化がみられた。力に関しては40分間でx軸方向へ約200 nN発生した。z軸に関してはほとんど力を発生していなかった。細胞がある程度伸展すると、細胞の面積が増加する際に垂直方向には力が発生していなかった。

Fig. 5.25 に続けて50分間計測した細胞の写真と境界線、重心の位置を示す。細胞1は大きさが小さくなっているが、細胞2と3は右上の方向へ移動している。Fig. 5.26 には3つの細胞の面積とx軸とz軸の力に関して示す。細胞の面積は力センサ上での細胞の面積は最初の1073 μm^2 から50分後、773 μm^2 となり、304 μm^2 減少した。下側のフレーム上での細胞の面積は436 μm^2 から425 μm^2 となり11 μm^2 減少した。上側のフレーム上では細胞の面積が207 μm^2 から159 μm^2 まで48 μm^2 減少し、全ての基板上で細胞は減少した。面積がもっとも減少した部分は力センサ上の領域である。

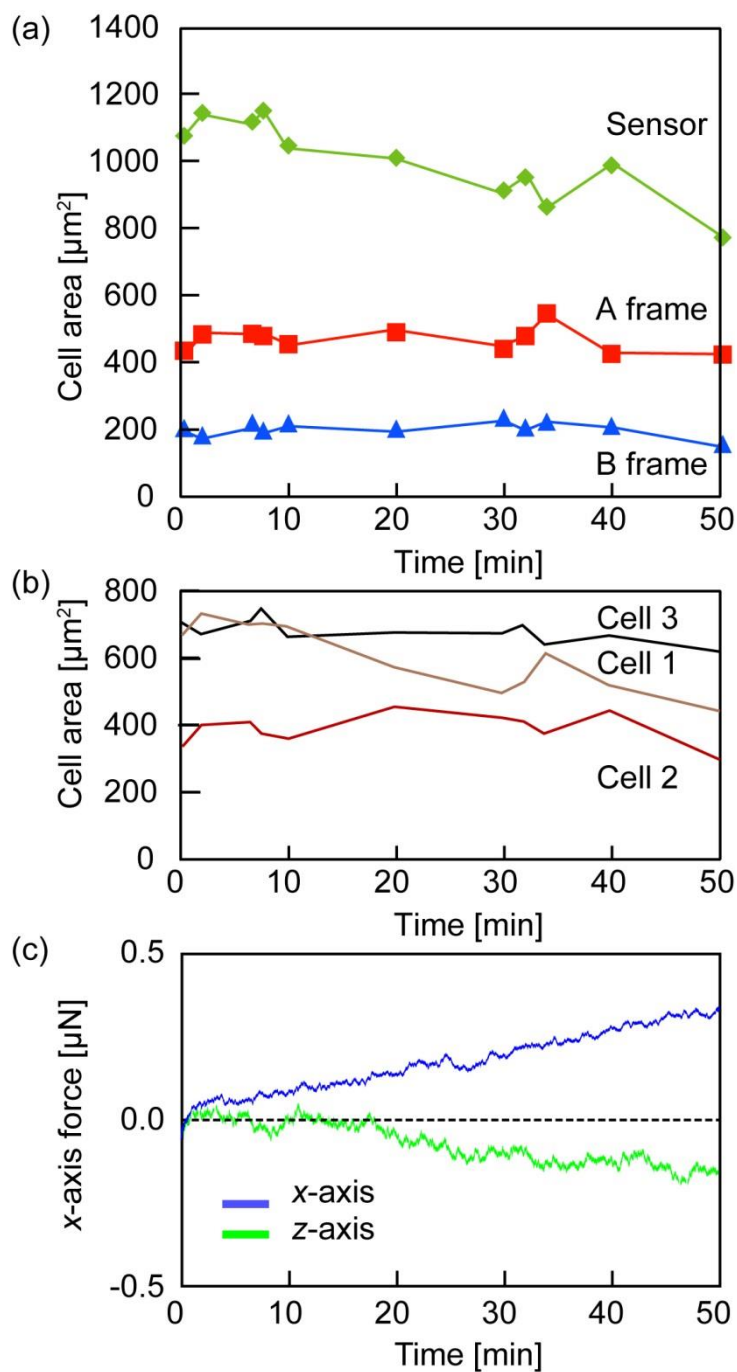


Fig. 5.26 センサ上で細胞(BAOSMCs)を培養した時に細胞の(a)場所による面積, (b)その間に発生した x 軸, (c) z 軸方向の力

力に関しては x 軸方向には力が 300 nN 程度発生し, z 軸方向には 18 分以降から 180 nN 程度発生した. 力が発生している方向について, x 軸は上側のフレームに近くなる方向であり, z 軸は力センサが下に押される方向であった. 細胞の面積が小さくなる場合, 水平方向のトラクション力は弱くなることを Fig. 5.20 から確認した. しかし, Fig. 5.25 では Fig. 5.19 と違い, 細胞の重心が上側のフレームへ

移動していることが分かる。そのため、力センサが上側に引っ張られる方向であると考えられる。z軸に関しては、この計測系では力センサがフレームより2~3 μm 程度上にあるため、細胞の移動につれ、x軸方向に力センサが引っ張られるときに、z軸方向にも引っ張られた可能性がある。

5.5. 本章のまとめ

本章では、試作した MEMS 多軸力センサ上に細胞を培養し、トラクション力の計測を行った。細胞をセンサパッド上でのみ培養するために、カバーチップを別途製作し、カバーチップを外したときはカバーチップの直下には細胞がないことを確認した。また、センサパッド上での細胞の成長を観察し、細胞が伸展することを確認した。

x軸のバネ定数が 0.2 N/m および 0.08 N/m の力センサと、固定されたフレームがある場合、**Fig. 5.5** の結果では1つの細胞のうちフレーム上にある部分の面積は 136 μm^2 、力センサ上にある部分の面積は 52 μm^2 であった。フレーム上と力センサ上の部分面積の比は約 2.7 である。しかし、約 1 時間後には、フレーム上が 864 μm^2 、力センサ上が 164 μm^2 となり、面積比が 5.3 に増大した。よって、細胞は力センサよりも固定されたフレーム側へより多く伸展したといえる。細胞の面積変化と移動距離については 10 分間の計測では明確に変化せず、30 分以上の計測では画像から移動を確認することができた。

また、単細胞のトラクション力を計測し、面積の増減による力の増減について調べた結果、細胞の面積が増加するとトラクション力も増加する傾向が得られた。細胞が収縮するときは力が減少したが、基板と結合していた接着斑が少なくなったため、トラクション力が減少したと考えられる。単位面積あたりに発生した単細胞のトラクション力は 3.6~22 nN/ μm^2 であった。

従来研究でも面積の増加によってトラクション力が増加する傾向がみられ、ヤング率が 10 Pa のゲル上で単位面積あたりに発生したトラクション力は約 0.4 nN/ μm^2 である [47]。また、バネ定数が 80 nN/m の PDMS ピラーをアレイした基板上で単位面積あたりに発生したトラクション力は約 12 nN/ μm^2 であり [9]、本研究での計測結果とオーダが一致している。しかし、これらの従来研究では異なる細胞を用いており、また、z軸方向には動かない。一方、本研究のセンサはx軸とz軸方向に変形するため、水平方向のバネ定数から基板の硬さに対する力を比較することは困難である。

カンチレバー上に複数細胞がある場合、カンチレバーとフレーム上での面積をそれぞれ求めた結果、面積が増えた方向へ細胞のトラクション力が増加した。例えば、**Fig. 5.24** の結果が示すように、下側のフレーム上で、3つの細胞の面積の増加分は 33 μm^2 であったが、上側のフレーム上での細胞の面積の増加分は 398 μm^2 であった。そのとき、トラクション力は上側のフレームの方へ約 200 nN 上昇した。ただし、カンチレバーと固定フレーム間に細胞があるときの z 軸方向の力に関しては、カンチレバーが固定フレームより 2~3 μm 高いため、トラクション力が発生していると考えられる。

次に、2つのカンチレバー上に細胞が並び、その内、1つのカンチレバーを力センサとしてトラクション力の計測を行った。細胞が小さくなるときにx軸方向とz軸方向でトラクション力が減少された。このとき、2つのカンチレバーのz軸の位置は同様であったため、z軸方向に発生した力は細胞の面積が減少することによるトラクション力の減少であると考えられる。この計測から、細胞は水平方向に

も垂直方向にもトラクション力を発生することが示唆された.

第6章 結論

6.1. 結論

本研究は、細胞のトラクション力を計測するために、MEMS 多軸センサを液体培地の中に入れ、細胞をセンサ上に培養することで、直接かつリアルタイムで細胞のトラクション力を計測する手法を提案し、センサの有用性を示した。

細胞のトラクション力を計測するため、本研究ではピエゾ抵抗効果を用いた。ピエゾ抵抗はひずみに対する感度が高いため、顕微鏡では観測できない硬い基板上で発生する力が計測できる。

生きた細胞の力を直接、リアルタイムで計測できる環境を構築するためには、液体培地を加温して37°Cに維持する必要がある。液体培地は電解質なので、電気計測の際に力センサ自体が絶縁されている必要がある。しかし、提案するトラクション力センサでは、加わった力によって発生するひずみを計測しているため、絶縁膜を厚くすると力感度が低下してしまう。こういった事情は細胞の力を電氣的に計測する上で、障害となる。本研究ではこれらの課題を解決し、ピエゾ抵抗型力センサを用いることで、基板の変形が観測し難い、硬い基板上での細胞のトラクション力の計測を可能とした。

実験対象として、本研究では基板に接着して細胞運動を行う平滑筋細胞(Bovine aortic smooth muscle cells)を用いた。力センサは細胞を培養するセンサのパッド部分とピエゾ抵抗層を形成したビーム部分に分かれる。センサのビーム部分はサイドドープを行うことにより、x軸およびz軸方向のひずみに応じたピエゾ抵抗を検出できるようにし、細胞のトラクション力を2軸方向で計測する。センサパッドのサイズは幅が15 μm、長さが125 μmである。センサパッド間のギャップは3 μmと設計した。これは、直径20 μmの細胞がセンサパッドと固定フレーム上にまたがって接着できるようにするためである。力センサの計測領域が数百 nN～数 μN、分解能が10 nNとなるように設計した。

力センサはMEMSプロセスによって試作した。試作したセンサの力に関する感度はx軸方向では R_1 が $-7.4 \times 10^{-6} \text{ nN}^{-1}$ と R_2 が $4.7 \times 10^{-6} \text{ nN}^{-1}$ となり、z軸方向では R_1 が $-1.6 \times 10^{-6} \text{ nN}^{-1}$ と R_2 が $-2.2 \times 10^{-6} \text{ nN}^{-1}$ となった。計測環境において、ピエゾ抵抗層に対する光や温度の影響やホットプレートの電源ノイズ等に対して、補償センサやロックインアンプを使用することによって、S/N比を向上させた。センサの絶縁膜としては、絶縁性とバリア性が高く、化学的にも安定しているパリレンを用いた。パリレン膜

はセンサの表面に $1\ \mu\text{m}$ 、側面に $0.5\ \mu\text{m}$ の厚みで蒸着されていることを確認した。センサはポリイミド製のフレキシブル配線にワイヤボンディングし、培養ディッシュに固定した。蜜蝋は細胞に害を与えない材料であり、配線に用いたアルミニウムが液体培地中に溶け出すことを防ぐために使用した。細胞の足場に近い環境を再現するために、細胞外マトリックスの一種であるフィブロネクチンでセンサの表面をコーティングした。まず、液体の中でセンサの応答を調べるために、純水、水道水、液体培地のそれぞれの液体の中で計測を行った。その結果、 $37\ ^\circ\text{C}$ の液体培地の中でも細胞がない時は安定した信号が計測されることを確認した。液体培地のみを $37\ ^\circ\text{C}$ に加温した状態でセンサの応答を検出し、センサ上に細胞がある場合とない場合の信号を比べることで細胞の力を計測した。

単細胞のトラクション力計測を行った結果、数百 nN のトラクション力が計測された。実験で使用した力センサの x 軸方向のバネ定数は $0.2\ \text{N/m}$ であった。細胞の面積とトラクション力との関係を解析した結果、細胞の接着面積が増加する時はトラクション力も増加し、細胞の接着面積が減少する時はトラクション力も減少することを確認した。単位面積あたりのトラクション力は $3.6\sim 22\ \text{nN}/\mu\text{m}^2$ であった。力センサの z 軸方向のバネ定数は $0.08\ \text{N/m}$ であり、 z 軸方向の力はほとんど変化しなかった。

複数の細胞が接着している場合も、細胞が接着している場所の面積をそれぞれ求めた結果、面積が増加するときにトラクション力が増大した。また、 z 軸方向の力に対して、細胞の接着面積が減少した時に約 $100\ \text{nN}$ の力が変化した。この結果から、細胞の面積の変化がトラクション力の垂直方向にも影響を与える可能性があると考えられる。

これらの計測した結果から、本研究で提案した手法を用いて細胞のトラクション力が計測されることが確認された。

6.2. 今後の展望

本論文で実現した、MEMS 多軸トラクション力センサはピエゾ抵抗型力センサを用い、硬い基板上で細胞が発生するトラクション力の電氣的計測を行った。製作したセンサは数十 nN から数十 μN までのトラクション力を計測できるものであるが、力センサの厚さなどの設計値を変えることで、数 pN までの力を計測することも可能である。また、数 kHz までの時間分解能で計測することが可能である。従って、細胞が力を発生する際の様子、細胞仮足の生成から運動までの様子、アクチン繊維上でミオシンが動くときの様子など、シミュレーションや画像解析の組み合わせでは取得できなかった情報が得られると考えられる。

試薬を用いた細胞の移動方向を制御

細胞の移動を誘導する試薬を使用し、移動方向を制御することで、移動する際に発生する力と運動方向の関係が分かると考えられる。

基板の硬さやギャップの制御

基板の硬さのような力学環境は細胞に一種のシグナルとして作用し、細胞自身の機能発現に深く関

わっている。基板の硬さやギャップの幅により、細胞が移動方向や形態、行動を決定する際の力を計測することで、移動方向を決定する際の力学機構が分かると考えられる。

細胞組織の力計測

細胞間に働く力の変化が、隣接する細胞にどのような影響を及ぼすかを調べることができる。レーザー光などで細胞にダメージを与えると、細胞群の応力バランスが崩れる。細胞群はこの応力バランスを回復するために、損傷した部分へと移動し、治癒させると考えられている。



本研究のトラクション力計測をこういった実験へ応用することによって、損傷の治癒課程で細胞群の内部応力がどのような機械的シグナルになっているかを調べることができる。細胞の機能を誘導する因子として、従来は化学的シグナルを中心に研究されてきたが、近年、トラクション力などの機械的シグナルも重要な役割を果たすものとして注目されている。生きた細胞が発生するトラクション力を定量的に計測することは、細胞の成長・移動・分化といったメカニズムの解明につながると考えられる。

付録

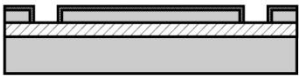
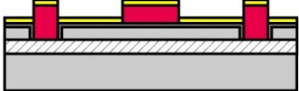
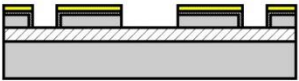
付録A ピエゾ抵抗型カンチレバーの製作プロセス

本研究で製作したピエゾ抵抗型トラクションカセンサの製作プロセスの詳細を記す。

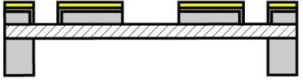

Table A.0.1 ピエゾ抵抗型カンチレバーを用いたトラクションカセンサの製作プロセス

Cross sectional view	Process		Condition
	Wafer preparing	5/2/300 μm Cleaning Remove SiO ₂ layer	25 mm × 25 mm HF dipping 2 min 1st DI water rinse 2nd DI water rinse
	Si patterning for side-wall doping (1st mask)	Photo-lithography Si etching by Deep RIE Thermal oxidation	Prebake 110 °C 2 min Spin coat OFPR 800-23cp 300 rpm 8 sec 2000 rpm 30 sec 6000 rpm 0.7 sec Mainbake 110 °C 2 min Exposure 60 mJ/cm ² Develop NMD-3 1min 1st DI water rinse 2nd DI water rinse UJDecS 1 min 45 sec IPA 5 min Acetone 5 min IPA 3 min 1100 °C 2min O ₂ 1.5 l/min

- 最初に SOI ウェハの酸化膜をきれいに除去する。
- フォトリソグラフィでメインベークしたウェハは露光する前に十分に冷やす。
- 側面ドーブを行うため、SOI ウェハのデバイス層に穴を掘る。後にこの穴の側面をドーブする。

Cross sectional view	Process		Condition
	Rapid thermal diffusion	Cleaning RTD Remove dopant	HF dipping 15 sec 1st DI water rinse 2nd DI water rinse Spin coat P-59230 700 rpm 3 sec 3000 rpm 30 sec 935 °C 40 sec N ₂ 1.5 l/min HF dipping 15 sec 1st DI water rinse 2nd DI water rinse
	(2nd mask)	Patterning by photo lithography	Prebake 110 °C 2 min Spin coat OFPR 800-100cp 300 rpm 8 sec 2000 rpm 30 sec 6000 rpm 0.7 sec Mainbake 110 °C 2 min Exposure 250 mJ/cm ² Develop NMD-3 1min 1st DI water rinse 2nd DI water rinse
	Si patterning	Photo-lithography (3rd mask) Si etching by Deep RIE	Prebake 110 °C 2 min Spin coat OFPR 800-100cp 300 rpm 8 sec 2000 rpm 30 sec 6000 rpm 0.7 sec Mainbake 110 °C 2 min Exposure 250 mJ/cm ² Develop NMD-3 1min 1st DI water rinse 2nd DI water rinse UJDecS 1 min 45 sec IPA 5 min Acetone 5 min IPA 3 min Piranha cleaning 3 min (H ₂ SO ₄ :H ₂ O ₂ = 3:1)

- d. 自然酸化膜除去後はすぐにドーパンドを塗布する。穴の中にドーパンドの液体が十分入り込むようにデバイスシリコンの表面にドーパンド溶液を落としてから2分間待ち、スピンのコーティングを行う。
- e. フォトレジストとデバイス層に形成された自然酸化膜の密着が弱く、細長いセンサのパターニングが難しかったため、レジスト塗布の前にOAP溶液を塗布することでHMDS処理を行った。

Cross sectional view	Process	Condition
	Handle layer Etching Photo-lithography (4th mask)	Prebake 110 °C 2 min Spin coat ZPN1150 500 rpm 5 sec 1500 rpm 30 sec Mainbake 90 °C 2 min Exposure 90 mJ/cm ² Postexposurebake 110 °C 90 sec Develop NMD-3 1min 1st DI water rinse 2nd DI water rinse Postbake 110 °C 5 min FAT about 30 min Acetone 15 min Acetone 1 day IPA 5 min
	SiO ₂ layer Etching	HF vapor 5 min (55°C)

- a. ハンドリングシリコン層のエッチングを行う前にピラニアを用い、表面をきれいに洗浄した。
- b. ハンドリングシリコン層のエッチングのときにボックス層である SiO₂ 層が割れてしまい、シリコンオイルとエッチングガスの反応でセンサが汚れるので、表面を AZP4620 でコーティングする。

A.1 ピエゾ抵抗層を形成するためのドープレシピ

本研究では、P型SOI基板(Device Si/Box/Handle Si layer: 5/2/300 μm)のDevice Si層の表面及び側面に
 ピエゾ抵抗層を形成するためn型不純物塗布拡散剤P-59230(OCD, 東京応化)を用いて、ドーピングを
 行った。以下にその熱拡散のレシピを示す [84].

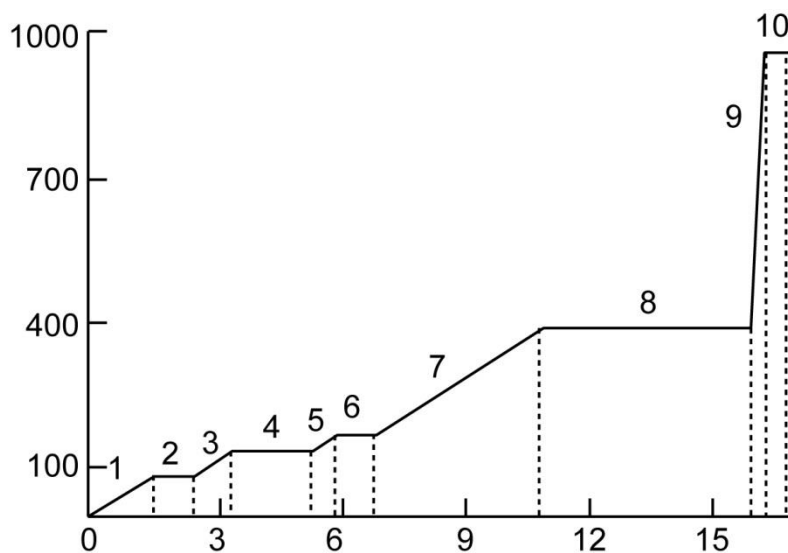


Fig. A.1 Rapid thermal diffusion における温度プロファイル

Table A.0.2 Temperature Profile Program Parameters			
Step Number	Temperature [degrees]	Time [min:sec]	PID Number
1	88	1:18	1
2	88	1:00	1
3	135	0:54	1
4	135	2:00	1
5	171	0:36	1
6	171	1:00	1
7	389	4:00	1
8	389	5:00	1
9	935	0:20	2
10	935	0:40	2

Table A.0.3 PID 制御			
PID Number	P [%]	I [S]	D [s]
1	6.2	13	1
2	6.8	6	1

A.2 製作に使用した Deep-RIE のレシピ

本研究では Deep-RIE 装置を用いて Device Si 及び Handle Si layer のエッチングを行った。Table A.0.4, Table A.0.5, Table A.0.6 にそのプロセスレシピを示す。図は FAT ddd と UJ_Decss レシピを使用したとき、それぞれの側面写真を示す。深堀エッチングによるスキヤロッピングを抑えるため、本研究では Device Si 層をエッチングする時に UJ_Decss を使用した。Handle Si 層は厚さが 300 μm であるため、エッチレートが早い FAT を使用し、最後の仕上げに FAT_weak を使用した。

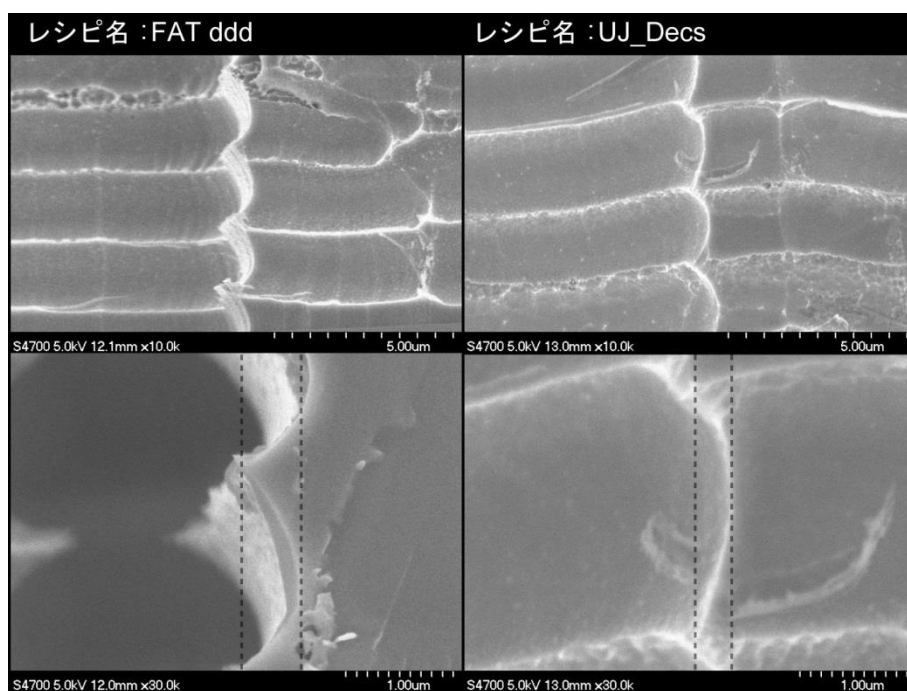


Fig. A.0.2 プロセスレシピ FATddd と UJ_Decss 使用後の Si 層のスキヤロッピング

Table A.0.4 レシピ名: UJ_Decss

	Etching	Passivation
Gas	SF ₆	C ₄ F ₈
Gas flow rate [sccm]	250	180
Process time [sec]	10	5
Platen LF [W]	40	0
Platen HF [W]	0	0
Coil RF [W]	2000	2000
Pressure [Pa:	10	3.5

Table A.0.5 レシピ名: FAT

	Etching	Passivation
Gas	SF ₆	C ₄ F ₈
Gas flow rate [sccm]	420	180
Process time [sec]	13	5
Platen LF [W]	40	0
Platen HF [W]	0	0
Coil RF [W]	2000	2000
Pressure [Pa:	10	3.5

Table A.0.6 レシピ名: FAT_Weak

	Etching	Passivation
Gas	SF ₆	C ₄ F ₈
Gas flow rate [sccm]	420	180
Process time [sec]	13	5
Platen LF [W]	40	0
Platen HF [W]	0	0
Coil RF [W]	1500	1500
Pressure [Pa:	10	3.5

付録B マスクデザイン

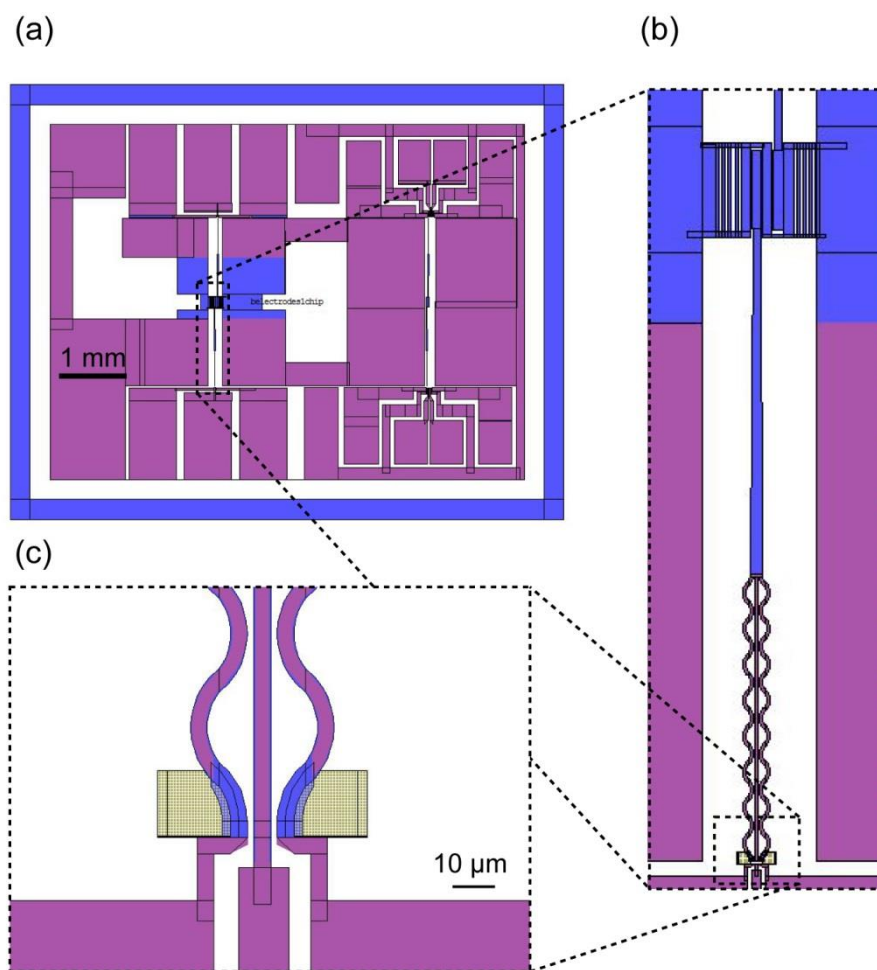


Fig. C.3 (a) トラクション力センサチップのマスクパターン (b) センサ部分の拡大図
(c) サイドドープ穴とビームの拡大図

付録C 本研究で使したフレキシブル基板のデザイン

本研究で使したフレキシブル配線を Fig.C.4 に示す。作業中にワイヤボンディングが切れることを防ぐため、補強板を厚く設計した。製作および加工は株式会社井雅に依頼した。



Fig. C.5 18 端子のフレキシブル配線の設計

付録D 細胞培養の前処理


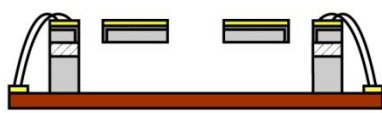
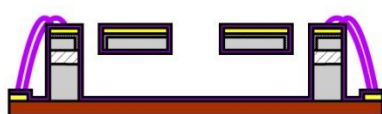
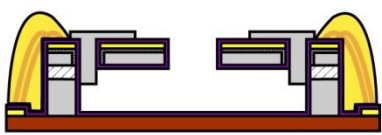
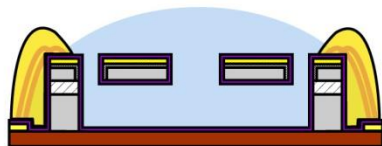
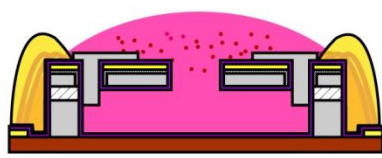
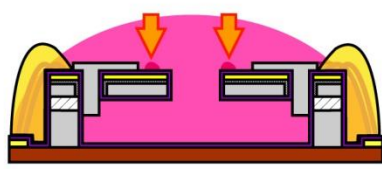
Cross sectional view	Process	Condition
	Fabricated force sensor device	Prepare the piezoresistive force sensor
	Wiring	Bonding device to flexible substrate with adhesive AI wiring with ultrasonic wire bonder
	Insulation	Deposit parylene C (thickness :1 μm) Surface changed to hydrophobic
	Fixing Cover the device	Fixing device to cell dish with bees wax Cover the force sensor device
	Washing	UV light irradiation Cleaning with 70% ethanol Washing with PBS, EBSS (3 ml) Drop out Human Plasma Fibronectin in Culture solution (30 μL)
	Culturing cells	Drop out cells in Culture solution
	Waiting	Waiting for 1 hr to settle cells down

Fig. 0.6 18 端子のフレキシブル配線の設計

付録E 本研究で使⽤した装置・薬品リスト

E.1 装置

Table E.1 本研究で使⽤した装置・危機

装置	メーカー	型番
マスク描画		
電子線描画装置	ADVANTEST Corporation	F5112+VD01
現像装置	EV Group	EBF101D
アッシング装置	SAMCO	FA1
エッチング装置	FAIRCHILD	APT1140
MEMS プロセス		
ダイシングソー	東京精密	A-WD-10A
スピンコータ	MIKASA	1H-d'
小型拡散炉	ULVAC-ROCO	SSA-P610CP
真空蒸着装置	アルバック	EX-400-T10
マスクアライナ	ユニオン光学	PEM-800
マスクアライナ 2	Karl Suss	MA6 Mask Aligner
ICP-RIE	Sumitomo Precision Products	MUC-21 HR
ワイヤボンダ	超音波工業	USW-5Z60K
ホットプレート		
パリレン	日本パリレン	PDS-2010
触針段差系	アルバック	Dektak 150
ヒートペン	ハーブ	WAX PEN No. 9100D
撮像		
デジタル一眼レフカメラ	CANON	EOS Kiss
マイクロスコープ	KEYENCE	VHX-500
走査型電子顕微鏡	HITACHI	S-4700
落射蛍光顕微鏡	Olympus	BX51WI
カンチレバー基礎特性計測		
スコープコーダ	YOKOGAWA	DL850
直流安定電源	KENWOOD	PW18-1.3AT
多軸コントローラ	株式会社ナノコントロール	NC3301-C
ファンクション ジェネレータ	Hewlett Packard	33120A
ロックインアンプ	東陽テクニカ	7270 型

ロードセル	KYOWA	LVS-5GA
動ひずみ測定器	KYOWA	DPM-913B
光ヘテロダイン 微小振動測定装置	NEOARK CORP.	MLD-221D
バイオ関連		
インキュベータ	三洋	MCO-5AC (UV)
バイオクリーンベンチ	PANASONIC	MCV-B91F-PJ
オートクレーブ	株式会社トミー精工	BS-245
卓上遠心機	KUBOTA	2420
ウォーターバス	Fisher Scientific	Isotemp 210
サーモプレート	TOKAI HIT	TP-NLS
ピペットマン	エムエス機器	P-100
培養倒立顕微鏡	ニコン	TS100
高精度温度計	株式会社チノー	MC3000

E.2 薬品

Table. E. 2 本研究で使用した薬品

薬品名	メーカー
OFPR-800LB 23cp	東京応化工業
OFPR-800LB 100cp	東京応化工業
ZPN1150-90	日本ゼオン
NMD-3 (TMAH 2.38%)	東京応化工業
OCD (P-59230)	東京応化工業
OAP	東京応化工業
アセトン (CH ₃ COCH ₃ , 99.5%)	和光純薬工業
2-プロパノール (CH ₃ CH(OH)CH ₃ , 99.7%)	和光純薬工業
エタノール(CH ₃ CH ₂ OH, 99.5%)	和光純薬工業
フッ化水素酸 (HF, 46%)	和光純薬工業
リン酸 (P ₃ PO ₄)	和光純薬工業
過酸化水素 (H ₂ O ₂)	和光純薬工業
シリコーンオイル HIVAC F-5	信越シリコーン
感光基板現像液 (DP-50)	サンハヤト
塩化鉄第2 H-200A	サン隼人
瞬間接着剤 (アロンアルファ)	東亜合成
1-dodecanethiol	和光純薬工業

蜜蝋	-
カナダバルサム	和光純薬工業

E.3 細胞に関連した薬品

薬品名	型番	メーカー
Phosphate buffered saline (PBS)	Lot RNBC6510	SIGMA
Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)	14155-063	Gibco
Bovine Smooth Muscle Cell Basal Medium	Cat No. B310-450	Cell application, INC.
Fetal Bovine Serum (FBS)	16000-036	Invitrogen
Antibiotic-Antimycotic (100X)	15240-096	Invitrogen
Human Plasma Fibronectin Purified Protein	Lot. 2186322	MILLPORE
Trypsin-EDTA solution (10×)	T4174	SIGMA
Leibovitz's L-15 Medium	21083-027	Invitrogen
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	GB70	(株)同仁化学研究所
塩酸 (HCL)	080-01066	(株)和光純薬工業
水酸化ナトリウム (NaOH)	192-02175	(株)和光純薬工業

E.4 本研究で使用した基板・金属

基板・金属名	型番	メーカー	用途
SOI 基板	G6P-020-01	Soitec Asia	差圧センサチップの製作
EB 描画マスク	ST-TLR6-TQZ-5009(5T)EBR9 HS31	凸版印刷	差圧センサパターンへのフォトリソグラフィ
Cr	-	田中貴金属	真空蒸着用ターゲット
Au 板	純度 99.999%	田中貴金属	真空蒸着用ターゲット
Al ワイヤ	純度99.99%, $\phi = 30 \mu\text{m}$	田中貴金属	ワイヤボンディング

参考文献

- [1] T. Yeung, et al., "Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion," *Cell Motility and the Cytoskeleton*, vol.60, pp. 24-34, 2005.
- [2] R. Shinhvi, et al., "Engineering cell shape and function," *Science*, vol. 264, pp. 696-698, 1994.
- [3] J-C. Kuo, "Mechanotransduction at focal adhesions: integrating cytoskeletal mechanics in migrating cells," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 17, no. 6, pp. 704-712, 2013.
- [4] A. J. Engler, et al., "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification," *Cell*, vol. 126, pp. 677-689, August 25, 2006.
- [5] R. J. Pelham, et al., "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility," *PNAS*, vol. 94, pp. 13661-13665, 1997.
- [6] J. P. Butler, et al., "Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings," *the American Physiological Society*, vol. 282, pp. C595-C605, 2002.
- [7] MP. Sheetz, D. P. Felsenfeld, and C. G. Galbraith, "Cell migration: regulation of force on extracellular matrix-integrin complexes," *trends in CELL BIOLOGY*, vol. 8, pp.51-54, February 1998.
- [8] A. D. Bershadsky, et al., "Adhesion-dependent cell mechanosensitivity," *Annual review of cell and developmental biology*, vol. 19, pp. 677-695, 2003.
- [9] L. Trichet, et al., "Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness," *PNAS*, vol. 109, no. 18, pp. 6933-6938, May 1 2012.
- [10] C. S. Charest, et al., "Geometric Control of Cell Life and Death," *Science*, vol. 276, pp. 1425-1428, May 30 1997.
- [11] J. L. Charest, et al., "Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model chemistries," *Biomaterials*, vol. 28, no. 13, pp. 2202-2210, 2007.
- [12] P. Clark, et al., "Topographical control of cell behaviour: II. Multiple grooved substrata," *Development*, vol. 108, pp. 635-64, 1990.
- [13] S. Kidambi, et al., "Cell adhesion on polyelectrolyte multilayer coated polydimethylsiloxane surfaces with varying topographies," *Tissue engineering*, vol.13, no. 8, pp. 2105-2117, 2007.

- [14] M. Lam, et al., "Reversible on-demand cell alignment using reconfigurable microtopography," *Biomaterials*, vol.29, no. 11, pp. 1705-1712, 2008.
- [15] E. Martinez, et al., "Effects of artificial micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour," *Annals of Anatomy*, vol.191, no. 1, pp. 126-13, May 24 2009.
- [16] N. Alves, et al., "Controlling cell behavior through the design of polymer surfaces," *Small*, vol. 6, no. 20, pp. 2208-2220, 2010.
- [17] C. I. Bettinger, et al., "Engineering Substrate Topography at the Micro- and Nanoscale to Control Cell Function," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, pp.5406-5415, 2009.
- [18] 川端和重, 新宮弘子, "細胞の形と細胞骨格," サイエンス社, 2011.
- [19] B. Alberts, et al., "Molecular Biology of the Cell 5E: Reference Edition," Garland Science, 2008.
- [20] M. Ghibaudo et al., "Traction forces and rigidity sensing regulate cell functions," *Soft Matter*, vol 4, pp. 1836-1843, 2008.
- [21] T. Pompe, et al., "Friction-controlled traction force in cell adhesion," *Biophysical Journal*, vol. 101, pp. 1863-1870, Oct 2011.
- [22] A. J. Engler, et al., "Microtissue Elasticity: Measurements by Atomic Force Microscopy and Its Influence on Cell Differentiation," *Methods in cell biology*, vol. 83, 2007.
- [23] J. Zhou and Y. C. Fung, "The degree of nonlinearity and anisotropy of blood vessel elasticity," *PNAS*, Vol. 94, pp. 14255-14260, 1997.
- [24] M. Stolz, et al., "Dynamic Elastic Modulus of Porcine Articular Cartilage Determined at Two Different Levels of Tissue Organization by Indentation-Type Atomic Force Microscopy," *Biophysical Journal*, vol. 86, pp. 3269-3283, May 2004.
- [25] J. Y. Rho, et al., "Young's modulus of trabecular and cortical bone material; Ultrasonic and microtensile measurements," *J. biomechanics*, Vol. 26, No. 2, pp. 111-119, 1993.
- [26] M. Dembo and Y. Wang, "Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts," *Biophysical Journal*, vol. 76, no. 4, pp. 2307-2316, 1999.
- [27] A. Saez, et al., "Traction forces exerted by epithelial cell," *J. Phys.: Condens. Matter*, vol. 22, 194119, 2010.
- [28] P. K. Mattila and P. Lappalainen, "Filopodia: molecular architecture," *Nature reviews*, vol. 9, pp. 446-454, June 2008.
- [29] H. Kress, et al., "Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity," *PNAS*, vol. 104, no 28, pp. 11633-11638, 2007.
- [30] C. Lawson and D. D. Schlaepfer, "Integrin adhesions: Who's on first? What's on second? Connections between FAK and talin," *Cell Adhesion & Migration*, vol. 6, no. 4, pp. 302-306, July/August 2012.
- [31] S. Munevar, et al., "Distinct roles of frontal and rear cell-substrate adhesions in fibroblast migration," *Molecular biology of the cell*, vol. 12, no. 12, pp. 3947-3954, 2001.

- [32] R. Ananthakrishnan and A. Ehrliche, "The forces behind cell movement," *Int. J. Biol. Sci.*, pp. 303-317, 2007.
- [33] M. L. Gardel, et al., "Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 26, pp. 315-333, 2010.
- [34] 大日方 昂, "細胞の形とうごき (5) 細胞の運動と制御," サイエンス社, 2006.
- [35] Z. Li, et al., "Quantifying the traction force of a single cell by aligned silicon nanowire array," *Nano letters*, vo. 9, no. 10, pp.3575-80, 2009.
- [36] A. D. Rape, et al., "The regulation of traction force in relation to cell shape and focal adhesions," *Biomaterials*, vol. 32, 2011.
- [37] J. P. Califano and C. A. Reinhart-king, "Substrate Stiffness and Cell Area Predict Cellular Traction Stresses," *Cellular and Molecular Bioengineering*, Vol. 3, No. 1, March 2010.
- [38] C-M. Lo, et al., "Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrat," *Biophysical Journal*, vol. 79, pp. 144-152, July 2000.
- [39] A. Zemel, et al., "Optimal matrix rigidity for stress-fibre polarization in stem cells," *Nature Physics*, vol. 6, pp. 468-473, June 2010.
- [40] M. Prager-Khoutorsky, "Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing," *Nature cell biology*, vol 13, no 12, pp.1457-65, 2011.
- [41] AK. Harris, P. Wild and D. Stopak, "Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion," *Science*, vol. 208, no. 4440, pp. 177-179, April 11 1980.
- [42] N. Balaban, et al., "Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates," *Nature cell biology*, vol. 3, no. 5, pp. 466-472, 2001.
- [43] M. Dembo, et al., "Imaging the Traction Stresses Exerted by Locomoting Cells with the elastic substratum method," *Biophysical Journal*, vol. 70, pp. 2008-2022, April 1996.
- [44] K. Burton and D. L. Taylor, "Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata," *Nature*, vol. 385, no. 330, pp. 450-454, 1997.
- [45] A. R. Asthagiri, et al., "Computational Methods in cell biology," Elsevier, pp.139-193, 2012.
- [46] N. J. Sniadecki, et al., "Magnetic microposts as an approach to apply forces," *PNAS*, vol. 104, no. 37, pp. 14553-14558, September 11 2007.
- [47] IM. Tolić-Nørrelykke and N. Wang, "Traction in smooth muscle cells varies with cell spreading," *Journal of Biomechanics*, vol. 38, no. 7, pp. 1405-1412, July 2005.
- [48] W. R. Legant, et al., "Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices," *Nature methods*, vol. 7, pp. 969-971, 2010.
- [49] S. A. Maskarinec, "Quantifying cellular traction forces in three dimensions," *PNAS*, 22108-22113, vol. 106, no. 52, Dec 29, 2009.

- [50] S. S. Hur, et al., "Live cells exert 3-dimensional traction forces on their substrata," *Cellular and Molecular Bioengineering*, pp. 425-436, Vol. 2, No. 3, 2009.
- [51] P. Hersen and B. Ladoux, "Push it, pull it," *Nature*, pp. 340-341, vol. 470, , Feb 17, 2011.
- [52] H. Delano-Ayari and J. P. Rieu, "4D traction force microscopy reveals asymmetric cortical forces in migrating Dictyostelium cells," *Physical review letters*, PRL 105, 248103, 2010.
- [53] C. G. Galbraith and M. P. Sheetz, "A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces," *PNAS*, vol. 94, pp. 9114-9118, August 1997.
- [54] J. L. Tan, et al., "Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force," *PNAS*, vol. 100, no. 4, pp. 1484-1489, Febraury 18 2003.
- [55] O. D. Roure, et al., "Force mapping in epithelial cell migration," *PNAS*, vol. 102, no. 7, pp. 2390-2395, Feb 15 2005.
- [56] S. Ghassemi, et al., "Cells test substrate rigidity by local contractions on submicrometer pillars," *PNAS*, vol. 109, no. 14, pp. 5328-5333, Apr 3 2012.
- [57] M. T. Yang, et al., "Geometric considerations of micro- to nanoscale elastomeric post arrays to study cellular traction forces," *Advanced materials*, vol. 19, pp. 3119-3123, 2007.
- [58] W. T. Su, et al., "The geometric pattern of a pillared substrate influences the cell-process distribution and shapes of fibroblasts," *Micron*, vol. 37, pp. 699-706, 2006.
- [59] M. Clark, et al., "Substrate topography induces a crossover from 2D to 3D behavior in fibroblast migration," *Biophysical Journal*, vol. 97, no.1, pp. 357-368, 2009.
- [60] T. Kobayashi and M. Sokabe, "Sensing substrate rigidity by mechanosensitive ion channels with stress fibers and focal adhesions," *Current Opinion in Cell Biology*, No. 22, pp. 669-676, 2010.
- [61] S. Yang and T. Saif, "Reversible and repeatable linear local cell force response under large stretches," *Experimental Cell Research*, vol. 305, pp. 42-50, 2005.
- [62] S. Yang, et al., "MEMS based force sensors for the study of indentation response of single living cells," *Sensors and Actuators A*, vol. 135, pp. 16-22, 2007.
- [63] J. Park, et al., "Fabrication of complex 3D polymer structures for cell-polymer hybrid systems," *J. Micromech. Microeng.*, vol. 16, pp. 1614-1619, 2006.
- [64] J. Park, et al., "Real-Time Measurement of the Contractile Forces of Self-Organized Cardiomyocytes on Hybrid Biopolymer Microcantilevers," *Anal. Chem*, vol. 77, pp. 6571-6580, 2005.
- [65] J. C. Greenwood, "Silicon in Mechanical Sensors," *Journal of Physics E-Scientific Instruments*, vol. 21, pp. 1114-1128, 1988.
- [66] H. Takahashi, et al., "Micro Force Plate Array For Measurement Of Ground Reaction Force Of Insect Running," *MEMS '13*, pp. 59-62, Taipei, Taiwan, 20-24 January, 2013.
- [67] T. Kan, et al., "Design of a piezoresistive triaxial force sensor probe using the sidewall doping method,"

- Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 23, no. 3, article no. 035027, 2013.
- [68] H. Takahashi, et al., "A triaxial tactile sensor without crosstalk using pairs of piezoresistive beams with sidewall doping," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 199, pp. 43-48, 2013.
- [69] 江刺正喜, 藤田博之, 五十嵐伊勢美 杉山 進, "マイクロマシーニングとマイクロメカトロニクス," 培風館, 1992.
- [70] C. S. Smith, "Piezoresistance Effect in Germanium and Silicon," *American Physical Society*, vol 94, no. 1, pp.42-49, April, 1954.
- [71] Mark J. Madou, "Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization," CRC Press, Second Edition, pp. 198, 1997.
- [72] Y. Kanda, "A Graphical Representation of the Piezoresistance Coefficients in Silicon," *IEEE TRANSACTIONS ON ELECTRON DEVICES*, vol. ED-29, no. 1, January 1982.
- [73] J. J. Wortman and R. A. Evans, "Young's Modulus, Shear Modulus, and Poisson's Ratio in Silicon and Germanium," *JOURNAL OF APPLIED PHYSICS*, vol. 36, no. 1, January 1965.
- [74] 富田佳宏, 仲町英治, 中井善一, 上田整, "機械工学入門シリーズ2 材料の力学," 朝倉書店, 2001.
- [75] U. G. Jung, et al., "A photoresponse-compensated parallel piezoresistive cantilever for cellular force measurements," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 23, no. 4, article no. 045015, 2013.
- [76] J. L. McGrath, "Cell Spreading: The Power to Simplify," *Current Biology*, vol. 17, no. 10, 2007.
- [77] "機械工学事典," 日本機械学会, 2011.
- [78] 青山 雄一郎, "サイドウォールドーピングを用いた ピエゾ抵抗型三軸力センサの研究," 東京大学大学院情報理工学系研究科修士論文, 2011.
- [79] B. V. Zeghbroeck, "Principle of Semiconductor devices," University of Colorado, 2.9 Mobility - Resistivity - Sheet Resistance, 1997.
- [80] D. Feili, et al., "Flexible organic field effect transistors for biomedical microimplants using polyimide and parylene C as substrate and insulator layers," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol.16, no. 8, pp. 1555-1561, 2006.
- [81] C. Loeb, et al., "Parylene as a chronically stable, reproducible microelectrode insulator," *IEEE transactions on bio-medical engineering*, vol. 24, no. 2, pp. 121-128, Mar 1997.
- [82] T. Chang, et al., "Cell and Protein Compatibility of Parylene-C Surfaces," *Langmuir*, vol.23, no. 23, pp. 11718-11725, 2007.
- [83] L. Wei, et al., "Human fibroblast attachment on fibrous parylene-C thin-film substratesTransition," *Chem. Mater*, vol. 30, pp. 1252-1259, 2010.
- [84] ゲル ムラト, "Force Sensing Piezoresistive Probes for Biophysical Manipulation," 東京大学大学院情報理工学系研究科博士論文, 2004.
- [85] M. Wong, et al., "Wafer Temperature Dependence of the Vapor-Phase HF Oxide Etch," *J. Electrochem. Soc*,

- vol. 140, no. 1, pp. 205-208, January 1993.
- [86] 高畑 智之, "ロッド挿入法による アクティブフォトニック結晶," 東京大学大学院情報理工学系研究科博士論文, 2007.
- [87] K. M. Vaeth, et al., "Transition Metals for Selective Chemical Vapor Deposition of Parylene-Based Polymers," Chem. Mater, vol. 12, no. 5, pp. 1305-1313, 2000.
- [88] K. D. Costa, "Imaging and probing cell mechanical properties with the atomic force microscope.," Methods in molecular biology, vol. 319, pp. 331-361, 2006.
- [89] K. Kuribayashi-Shigetomi, et al., "Cell origami: self-folding of three-dimensional cell-laden microstructures driven by cell traction force," vol. 7, no. 12, e51085, 2012.
- [90] A. M. Malek, et al., "Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in," Journal of Cell Science, vol, 109, pp. 713-726, 1996.
- [91] 山本 尚武, 中村 隆夫, "生体電気計測," 日本生体医工学会, 2011.

謝辞

本論文の内容は、2011年から2014年にかけて東京大学大学院情報理工学系研究科知能機械情報学専攻下山・松本・高畑研究室で行なった研究をまとめたものであります。指導教員である下山勲教授には、研究の方法、そして研究への姿勢に関して非常に丁寧かつ温かなご指導を頂きました。研究テーマの選定から自分がやりたいことを主体的に進めるように、また、先端の技術を利用して自由に研究できるような環境を常に用意してくださいました。日頃から研究の進み具合を気にかけていただき、優しい言葉で私を励ましてくださいました。下山先生に会えたおかげで研究を好きに進めることができました。言葉に表すことができないほど、心から深く感謝しております。

松本潔特任教授には、電子回路の基礎から実際の作りまで、研究の大事なポイントで多くのご指導を頂きました。高畑智之講師には研究を円滑に行うための様々なサポートと共に、研究内容に関するアドバイスを多く頂きました。常に最先端の環境にて研究を行うことができたのも、これら先生方のご尽力によるものであります。

博士論文審査にて副査をお勤めいただきました、東京大学大学院情報理工学系研究科知能機械情報学専攻の中村仁彦教授、同大学工学系研究科電気系工学専攻の藤田博之教授、同大学工学系研究科先端学際工学専攻の神崎亮平教授、同大学生産技術研究所の竹内昌治准教授には、論文をまとめるにあたり大変有益なご助言を頂きました。大変感謝しております。

東京大学大学院数理科学研究科理学部数学科の金井雅彦教授には日頃から大変お世話になりました。研究の進み方や研究者のあり方についていつも相談させて頂きました。多くの話題について先生とお話することで、研究生活を楽しく過ごすことができました。いつも優しくお話を聞いて下さって、心から感謝しております。

東京大学生産技術研究所マイクロメカトロニクス国際研究センター竹内昌治研究室の尾上弘晃助教には修士頃から細胞に関して説明をしていただき、繊維細胞から筋細胞の選定にアドバイスを頂きました。お忙しいにも関わらず、いつもメールでのご相談に乗っていただき、大変感謝しております。

北海道大学大学院情報科学研究科・生命人間情報科学専攻の研究員の繁富(栗林)香織さんには細胞に害を与えない接着剤を探していた時に、北海道から直接、蜜蝋とグリースを郵送で送って頂きました。お陰様でセンサ上に細胞を培養させることが可能となりました。

早稲田大学の理工学術院基幹理工学部機械科学・航空学科の岩瀬英治講師には修士1年の時に研究の進め方、実験の進め方について沢山のご助言を頂きました。お陰様でその時の成果を論文にまとめることができました。

東京農工大学工学研究院先端機械システム部門の許允禎准教授には研究室の生活から進路などについてアドバイスを頂きました。

東京電機大学工学部機械工学科の桑名健太助教には下山研に所属した修士 1 年からお世話になり、細胞の研究にテーマを変えたときからも沢山アドバイスを頂きました。細胞のことをよく知らず、研究を進めるにあたっての苦しみを理解していただきました。

静岡県工業技術研究所の沼津工業技術支援センター機械電子科の研究員の細野美奈子さんとは下山研に同時期にいたことを嬉しく思っています。女性が少ない研究室で細野さんにいろいろ頼りました。研究に対する価値観、女性研究者としての考えなど色々とお話することができ、とても力になりました。修士論文を執筆する時は細野さんに修士論文の書き方を教わり、添削をして頂きました。お陰様で、まとめることができました。ありがとうございました。

下山・松本・高畑研究室の秘書の土肥史和さん、渡邊守絵さんには研究を遂行するにあたって多くのお力添えを頂きました。技術補佐員の寺田玲子さんには細胞の世話から細胞チームが順調に実験できるようにして頂きました。仲村隆氏にはロックインアンプの製作において大変お世話になりました。

市川保正助教には気さくに話しかけていただき、いつも緊張している肩の力を抜く助けをしていただきました。とても力になりました。中井亮仁特任助教には、フレキシブル配線的设计・発注など実用的なアドバイスを頂きました。菅哲朗特任助教には、修論のテーマを決める時に多くのご助言を頂きました。論文の書き方や研究の進め方など多くのアドバイスを頂きました。竹井裕介特任助教には親身に研究の相談に乗っていただき、優しい言葉で励まして頂きました。野田聖太郎特任助教にはいつも丁寧に相談して頂きました。昼夜を問わず実験室やクリーンルームで実験する姿から大変刺激を受けました。この論文を添削していただき、お陰様でまとめることができました。ありがとうございました。グエンビンキェム特任助教には適切かつ鋭いアドバイスを頂きました。パリレンコーティングと関連して多くのアドバイスを頂きました。高橋英俊特任助教には修士 1 年からピエゾ抵抗型カンチレバーのプロセスを教えて頂き、5 年間、論文の書き方や研究の進め方について沢山の有意義なご助言を頂きました。研究が進まない時も相談に乗ってくださいました。心から感謝しております。

研究員の安食嘉晴氏には光補償カンチレバーの論文を執筆するに当たって多くのご助言を頂きました。特任研究員の平山佳代子さんには細胞のことについて色々教えて頂きました。また、博士論文の日本語も添削して頂きました。博士課程の磯崎瑛宏氏には研究を進めることにあたって多くのご助言を頂きました。よく相談相手になって頂き、助かりました。感謝します。同期の稲葉亮君、グエンミンジュン君には修士課程から博士課程まで沢山お世話になりました。稲葉亮君はいつも相談相手になっていただき、丁寧な説明をして頂きました。グエンミンジュン君には最初に研究室になれるまで気楽に声をかけて頂きました。それぞれ研究テーマは違うが、熱心に研究している仲間がいてとても嬉しく、感謝します。社会人博士課程でいる中窪亨氏には会社のお話と研究に対するアドバイスを頂きました。博士課程の塚越拓哉氏には論文の日本語を何度も添削して頂きました。実験室の引っ越しなどがあり、お忙しい時期にお世話になりました。

Ph.D の玉成錫氏と Ph.D の柳光鉉氏は研究の進め方や進路の相談に乗って頂きました。詰まっている時は励ましを頂きました。金恵恵さんには言葉に表せないほど、お世話になりました。研究に対する愛情を見せて頂きました。人文学についてはあんまり知識のない私に、色々教えてくださいました。

また、いつも相談相手になって頂き、暖かい言葉で励ましてくださいました。心から深く感謝いたします。朴鉉美さんは日本に留学を来た10年前から今まで仲良く、お互いの相談相手となり、大きな力になりました。手を繋いで同じ道を歩んでいる友達がいることにとっても嬉しく有り難いです。お陰様で私はいま、ここで、論文をまとめることができましたと思います。10年間相変わらず、私のお話を聞いて頂き、心から深く感謝しています。

I would like to sincerely thank my parents for their love and support. This work would never have been finished without them. They have encouraged me through every step in my life. I do respect them and I wish to dedicate this PhD thesis to my family.

その他にも研究室内外の多くの職員の方、多くの先輩・後輩達、そして家族に支えられて研究を進めることができました。これらの多くの方々に深く感謝し、本論文の結びとします。ありがとうございました。