

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4742973号
(P4742973)

(45) 発行日 平成23年8月10日(2011.8.10)

(24) 登録日 平成23年5月20日(2011.5.20)

(51) Int.Cl.

F 1

G 01 N 27/327 (2006.01)

G 01 N 27/30 351

G 01 N 27/416 (2006.01)

G 01 N 27/46 341 M

C 12 M 1/34 (2006.01)

C 12 M 1/34 A

請求項の数 7 (全 11 頁)

(21) 出願番号

特願2006-125516 (P2006-125516)

(22) 出願日

平成18年4月28日 (2006.4.28)

(65) 公開番号

特開2007-298351 (P2007-298351A)

(43) 公開日

平成19年11月15日 (2007.11.15)

審査請求日

平成21年4月7日 (2009.4.7)

(73) 特許権者 000005821

パナソニック株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(74) 代理人 100109667

弁理士 内藤 浩樹

(74) 代理人 100109151

弁理士 永野 大介

(74) 代理人 100120156

弁理士 藤井 兼太郎

(72) 発明者 大島 章義

大阪府門真市大字門真1006番地 パナソニックエレクトロニクスバイス株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞電気生理測定デバイスおよびこれの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基板と、

この基板の上部に設けた第一の貯留槽と、

前記基板の下部に設けた第二の貯留槽と、

前記第一の貯留槽および前記第二の貯留槽との電位差を検出するためそれぞれに設けられた測定電極とを備え、

前記基板は、

この基板の上面に設けた凹部と、

この凹部の底部から開口し前記基板の下面まで繋がる貫通孔とを有し、

この貫通孔の開口部は、

前記凹部の内部に向けて上方に突出した突出部を備え、

この突出部は、

その先端から湾曲して外方へ下降する前記凹部の内壁と、

前記貫通孔の内壁とで形成され、

前記突出部の先端は、前記基板上面より下方にある細胞電気生理測定デバイス。

【請求項 2】

前記突出部の先端は、

上方に丸みを帯びた湾曲面で形成されている請求項 1 に記載の細胞電気生理測定デバイス。
。

【請求項 3】

前記貫通孔は、

前記基板に対して垂直な円柱構造、

または前記開口部から前記基板の下面に向けて口径が広がるテーオ構造である請求項 1 または 2 に記載の細胞電気生理測定デバイス。

【請求項 4】

前記基板はシリコンからなり、

この基板表面は絶縁膜で被覆されている請求項 1 から 3 のいずれか一つに記載の細胞電気生理測定デバイス。

【請求項 5】

基板の上面から下面に向けてドライエッティングで貫通孔を形成し、

次にこの貫通孔の内壁に保護膜を形成し、

その後前記基板上において、前記貫通孔の外郭に環状のエッティングホールを有するマスクを形成し、

このマスク上方からドライエッティングで凹部を形成する工程からなり、

前記凹部を形成するドライエッティング工程は、

前記凹部の内壁と前記貫通孔の内壁とが繋がるようにドライエッティングし、前記貫通孔の開口部に前記凹部の内部に向けて上方に突出する突出部を形成する細胞電気生理測定デバイスの製造方法。

【請求項 6】

前記貫通孔内壁に保護膜を形成する工程において、

前記貫通孔の内壁にはポリマー膜または SiO_2 のいずれかを形成する請求項 5 に記載の細胞電気生理測定デバイスの製造方法。

【請求項 7】

前記凹部を形成するドライエッティング工程において、

エッティングガスに CF_4 または SF_6 または XeF_2 または ClF_3 または NF_3 またはこれらの混合ガスのいずれかを用いる請求項 5 または 6 に記載の細胞電気生理測定デバイスの製造方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、薬剤に対する細胞の反応、或いは細胞が発する電気生理現象によって生じる電気化学的变化を測定するために用いられる細胞電気生理測定デバイスと、この細胞電気生理測定デバイスの製造方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

図 1 3 に示すように、従来開示されている細胞電気生理測定デバイス 1 は、基板 2 と、この基板 2 の上部に設けた第一の貯留槽 3 と、基板 2 の下部に設けた第二の貯留槽 4 と、第一の貯留槽 3 および前記第二の貯留槽 4 にそれぞれ接続された第一の測定電極 5 および第二の測定電極 6 とを備えている。そして基板 2 は、上面に設けた凹部 7 と、この凹部 7 から基板 2 の下面まで繋がる貫通孔 8 とを有している。

【0003】

そしてこの細胞電気生理測定デバイス 1 は、第一の貯留槽 3 に被験体細胞 9 を包含する培養液 10a を注入し、貫通孔 8 の上方から加圧、あるいは下方から減圧することで培養液 10a を吸引し、被験体細胞 9 を凹部 7 に捕捉することができる。そして例えばこの被験体細胞 9 の上から薬剤を投与し、第一の貯留槽 3 の培養液 10a と第二の貯留槽 4 の培養液 10b との電位差を第一の測定電極 5 および第 2 の測定電極 6 で測定し、検出装置 11 を用いて比較・分析することで被験体細胞 9 の薬理反応を判断することができる。

【0004】

なお、この出願の発明に関する先行技術文献情報としては、特許文献 1 や非特許文献 1

10

20

30

40

50

などが知られている。

【特許文献 1】特開 2004-69309 号公報

【非特許文献 1】T. Lehnert et al, Micro Total Analysis Systems 2002, pp.28-30 (2004)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上記従来の構成では、細胞電気生理測定デバイス 1 の測定精度が低いという問題があった。

【0006】

これは被験体細胞 9 と貫通孔 8 の開口部 8a との密着性が低く、被験体細胞 9 を境とした第一の貯留槽 3 と第二の貯留槽 4 との間の電気的絶縁性が十分に確保されていない為であった。そしてその結果、測定精度が低下するのであった。

【0007】

そこで本発明は、上記課題を解決し、細胞電気生理測定デバイス 1 における測定精度を高めることを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

この目的を達成するために本発明は、被験体細胞と密着させる貫通孔の開口部には、凹部の内部に向けて上方に突出した突出部を備え、この突出部は、その先端から湾曲して外方へ下降する凹部の内壁と、貫通孔の内壁とで形成されるものとした。

【発明の効果】

【0009】

この構成により本発明は、被験体細胞と貫通孔開口部との密着性を高めることができる。

【0010】

それは、前述の突出部によって被験体細胞と貫通孔開口部との接触面積が増大し、かつこの突出部が被験体細胞へ食い込み、接触抵抗が大きくなるためである。そしてその結果、細胞電気生理測定デバイスの測定精度を向上させることができるのである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

(実施の形態 1)

以下、本実施の形態における細胞電気生理測定デバイスの構成を説明する。

【0012】

図 1 の断面図に示すように、本実施の形態の細胞電気生理測定デバイス 12 は、基板 13 と、この基板 13 の上部に設けられた、第一の貯留槽 14 を有するウェル 15 と、基板 13 の下部に設けられた、第二の貯留槽 16 を有するプレート 17 と、第一の貯留槽 14 内に設けられた第一の測定電極 18 と、第二の貯留槽 16 内であって、基板 13 の下面に設けられた第二の測定電極 19 と、これらの第一の測定電極 18 および第二の測定電極 19 により得られた電位を比較検出する検出装置 20 とを備えている。

【0013】

なお、第一の貯留槽 14 は培養液 21a を貯留するためのものであり、第二の貯留槽 16 は培養液 21b を貯留するためのものである。また第一の測定電極 18 と第二の測定電極 19 とは、培養液 21a と培養液 21b との電位差を検出するためのものである。

【0014】

そして基板 13 は、その上面に、被験体細胞 22 を捕捉保持する凹部 23 と、この凹部 23 の底部から基板 13 下面までをつなぐ貫通孔 24 とを有し、この貫通孔 24 の開口部 24a は、凹部 23 の内部に向けて上方に突出した突出部 24b を有している。そしてこの突出部 24b は、その先端から湾曲して斜め外方へ下降する凹部 23 の内壁と、この凹部 23 の内壁と連続する貫通孔 24 の内壁とで形成されている。本実施の形態では、図 2

10

20

30

40

50

に示すように、貫通孔 24 は基板 13 に対し垂直な円柱構造に形成し、突出部 24b は、その先端が鋭利なものではなく、上方に向かって丸みを帯びた湾曲面で形成されたものとした。また、突出部 24b の先端を、基板 13 上面より下方に形成し、凹部 23 に適切に被験体細胞（図 1 の 22）を捕捉できるようにしている。

【0015】

なお、図 3 の基板 13 の斜視図に示すように、本実施の形態における細胞電気生理測定デバイス 12 は、基板 13 に前述の凹部 23 および貫通孔 24 を複数個形成している。また、基板 13 としては単結晶シリコンを用い、この基板 13 の表面にはシリコン酸化物からなる絶縁膜（図 11 の 30）を形成している。

【0016】

さらに、被験体細胞（図 1 の 22）としては哺乳類細胞を用いた。この場合、代表的な培養液 21a としては、 K^+ イオンが 155 mM、 Na^+ イオンが 12 mM 程度、 Cl^- イオンが 4.2 mM 程度添加された電解液、培養液 21b としては K^+ イオンが 4 mM 程度、 Na^+ イオンが 145 mM 程度、 Cl^- イオンが 123 mM 程度添加された電解液が挙げられる。

【0017】

次に、本発明の細胞電気生理測定デバイス 12 の動作について説明する。

【0018】

図 1 に示すように、まず、第一の貯留槽 14 を、被験体細胞 22 を包含する第一の培養液 21a で満たし、第一の貯留槽 14 側から加圧（あるいは第二の貯留槽 16 側から減圧）して第一の培養液 21a を貫通孔 24 の第二の貯留槽 16 側へ流動させる。

【0019】

するとこの第一の培養液 21a の流動に伴い、被験体細胞 22 が凹部 23 に捕捉される。この捕捉された被験体細胞 22 によって、第一の培養液 21a と第二の培養液 21b とが電気的に分離される。

【0020】

次に第二の貯留槽 16 側から吸引、もしくは薬剤（例えばナイスタチンなど）を投入することで被験体細胞 22 の第二の貯留槽 16 側の細胞膜に微細小孔を形成する。

【0021】

その後第一の貯留槽 14 側から被験体細胞 22 に対して刺激となりうる行為を施す。この刺激の種類としては、例えば化学薬品、毒薬などの化学的刺激に加え、機械的変位、光、熱、電気、電磁波などの物理的刺激が挙げられる。

【0022】

ここで被験体細胞 22 がこれらの刺激に対して反応を示せば被験体細胞 22 の細胞膜内に存在するイオンチャネルが活性または拮抗し、このイオンチャネルを介してイオンの移動量が変化するため、この被験体細胞 22 を通過した第二の培養液 21b の電位に変化が生じることになる。

【0023】

この電位を第一の測定電極 18 と第二の測定電極 19 で検出し、検出装置 20 で比較・分析することで、薬剤が被験体細胞 22 に対して有効性を有するかどうかなどを判断するのである。

【0024】

このとき、被験体細胞 22 が高い密着性を持って貫通孔 24 の開口部 24a および凹部 23 に接触保持されることで低いバックグラウンドノイズで被験体細胞 22 の電気生理現象を測定することが可能となる。

【0025】

次に、本実施の形態における細胞電気生理測定デバイス 12 の製造方法を説明する。

【0026】

まず図 4 に示すように、基板 13 の上面にフォトリソグラフィーによりレジストマスク 26 を形成する。このレジストマスク 26 には、所望の貫通孔 24 の開口部 24a と略同

形状のマスクホール 27 を形成しておく。

【0027】

次に図5に示すように基板13をドライエッティングして貫通孔24を形成する。この時のエッティングガスとしては、エッティングを促進するガス（以下エッティングガスという）とエッティングを抑制するガスと（以下抑制ガスという）とを交互に用いる。

【0028】

エッティングガスとしてはSF₆、CF₄、XeF₂などがある。また、抑制ガスとしてはCHF₃、C₄F₈などが挙げられる。

【0029】

これらのエッティングガスにより基板13を少しエッティングし、その後抑制ガスによりシリコン面に保護膜を形成するステップを繰り返すことで、基板13の上面に対して垂直方向のみのエッティングが可能となる。

【0030】

そして図6に示すように、貫通孔24を形成後、抑制ガスを吹き付け、貫通孔24側壁にポリマーからなる保護膜25を形成し、レジストマスク26を除去する。なお、この保護膜25を形成するその他の方法として、貫通孔24を形成し、レジストマスク26を除去した後に熱酸化法、CVD法、スパッタリング法等の成膜方法を用いて酸化物からなる保護膜25を形成する方法がある。この後者の方法では、後述する凹部23を形成する工程で利用するレジストマスク（図7の28）のエッティングホール（図7の29）に沿って基板13の上面に成膜された保護膜25をエッティングする必要がある。この際、エッティングには上面のみのエッティングが可能なドライエッティングが有効となる。

【0031】

なおこの保護膜25によって、後の凹部23形成の際のドライエッティングの影響を受けず、貫通孔24の形状を保つことができる。

【0032】

次に図7に示すように、基板13に貫通孔24の開口部24aの外郭に環状のマスクホール29を有する新たなレジストマスク28を形成し、SF₆またはCF₄またはXeF₂またはC₄F₈またはNF₃またはこれらの混合ガスのいずれかを用いたエッティングガスでSiのドライエッティングを施す。

【0033】

すると図8に示すように、環状のマスクホール29の部分を中心に等方的にエッティングが進み、凹部23が形成される。

【0034】

このとき、図9に示すように、貫通孔24の内壁と凹部23の内壁とが連結し、突出部24bの先端が基板13の上面より下方になるまでエッティングを施した後、レジストマスク28を除去する。この時同時に保護膜25も除去され、図10に示すように、貫通孔24の開口部24aには凹部23内方に向かって上方に突出した突出部24bを形成することが出来る。

【0035】

さらにその後、図11に示すように、熱酸化法、CVD法、スパッタリング法等の成膜方法を用いることで構造体表面にシリコン酸化物からなる絶縁膜30を形成する。この絶縁膜30は、その他シリコン窒化物膜などによって形成してもよい。この絶縁膜30が成膜されることで突出部24bの先端は丸みを帯びた湾曲面で形成される。

【0036】

その他突出部24bの先端を上記のような湾曲面で形成するには、ドライエッティングあるいはウェットエッティング加工や、不活性ガスによるアニール処理で鋭利なエッジ部分を丸くする方法がある。

【0037】

本実施の形態における効果を以下に説明する。

【0038】

10

20

30

40

50

まず、本実施の形態では、細胞電気生理測定デバイス 1 2 の測定精度を高めることができるが出来る。

【0039】

これは、図 1 に示すように、貫通孔 2 4 の開口部 2 4 a には、凹部 2 3 の内方に向けて上方に突出した突出部 2 4 b があり、この突出部 2 4 b は、その先端から湾曲して外方へ下降する凹部 2 3 の内壁と、貫通孔 2 4 の内壁とで形成されていることに由来する。

【0040】

すなわち、突出部 2 4 b は上記構成によってなだらかに湾曲する傾斜面で凹部 2 3 と一体となっていることから、被験体細胞 2 2 は、この凹部 2 3 内壁の湾曲面に沿って、隙間が極力ないよう密着することができ、被験体細胞 2 2 と貫通孔 2 4 の開口部 2 4 a との当接面積を増すことができるためである。

【0041】

さらにこの突出部 2 4 b が被験体細胞 2 2 を吸引する方向と逆向きに形成されていることから、吸引の際に接触抵抗が増し、突出部 2 4 b が被験体細胞 2 2 に食い込むような形となる。

【0042】

そしてこのような当接面積の増大と食い込みにより、貫通孔 2 4 開口部と被験体細胞 2 2 との密着性が増し、この結果測定精度を向上させることができるのである。

【0043】

また、本実施の形態では、図 2 に示すように突出部 2 4 b の先端を、上方に向けて丸みを帯びた湾曲面で構成したことから、被験体細胞 2 2 が突出部 2 4 b に食い込んだ際も、被験体細胞 2 2 の細胞膜の破損を抑制することができる。

【0044】

さらに図 1 1 に示すように、凹部 2 3 および貫通孔 2 4 の内壁を含む基板 1 3 表面全体をシリコン酸化物からなる絶縁膜 3 0 で被覆したことにより、微細加工に適したシリコン基板 1 3 を用いつつ、基板 1 3 上面と下面との間の絶縁性を確保することができる。そしてこのシリコン酸化物膜は同時に親水性を有することから、貫通孔 2 4 の開口部 2 4 a 近傍において被験体細胞 2 2 の密着性をさらに向上させることができる。

【0045】

また、貫通孔 2 4 内壁も親水性の高いシリコン酸化物膜で被覆することで貫通孔 2 4 内部における流路抵抗が低減され、吸引ポンプなどによる吸引効率が向上し、被験体細胞 2 2 が貫通孔 2 4 の開口部 2 4 a 近傍および凹部 2 3 に密着し易くなる。

【0046】

なお、本実施の形態では絶縁膜 3 0 としてシリコン酸化物を用いたが、他の酸化膜、窒化膜など親水性を有する絶縁膜 3 0 を用いれば上記と同様の効果を得られる。

【0047】

(実施の形態 2)

本実施の形態と実施の形態 1 との違いは、図 1 2 に示すように貫通孔 3 1 の形状を、貫通孔 3 1 の開口部 3 1 a から基板 1 3 下面に向けて広がったテーパ構造にしたことである。

【0048】

これにより貫通孔 3 1 の開口部 3 1 a から基板 1 3 下面に行くにつれて培養液 2 1 b の流束密度が徐々に減少するため、安定して培養液 2 1 b を吸引することができる。そしてその結果、被験体細胞 2 2 を貫通孔 3 1 の開口部 3 1 a に的確に吸引することができる。

【0049】

なお、本実施の形態における貫通孔 3 1 は、この貫通孔 3 1 を形成するドライエッチング工程において、エッチングを促進するガス（エッチングガス）とエッチングを抑制するガス（抑制ガス）の割合を、エッチングが進むに従って（貫通孔 3 1 の下部に行くに従つて）、エッチングガスの割合を増やせばよい。

【産業上の利用可能性】

10

20

30

40

50

【0050】

本発明の細胞電気生理測定デバイスは、細胞の薬剤に対する反応、或いは細胞が発する電気生理現象によって生じる電気化学的变化を、高精度で測定するのに有用である。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】本発明の細胞電気生理測定デバイスの断面図

【図2】本発明の細胞電気生理測定デバイスの要部拡大模式断面図

【図3】本発明の細胞電気生理測定デバイスの斜視図

【図4】本発明の細胞電気生理測定デバイスの製造工程を示す断面図

【図5】同断面図

10

【図6】同断面図

【図7】同断面図

【図8】同断面図

【図9】同断面図

【図10】同断面図

【図11】同断面図

【図12】本発明の細胞電気生理測定デバイスの要部断面図

【図13】従来の細胞電気生理測定デバイスの断面図

【符号の説明】

【0052】

20

1 細胞電気生理測定デバイス

2 基板

3 第一の貯留槽

4 第二の貯留槽

5 第一の測定電極

6 第二の測定電極

7 凹部

8 貫通孔

8 a 開口部

9 被験体細胞

30

10 a 培養液

10 b 培養液

11 検出装置

12 細胞電気生理測定デバイス

13 基板

14 第一の貯留槽

15 ウエル

16 第二の貯留槽

17 プレート

18 第一の測定電極

40

19 第二の測定電極

20 検出装置

21 a 第一の培養液

21 b 第二の培養液

22 被験体細胞

23 凹部

24 貫通孔

24 a 開口部

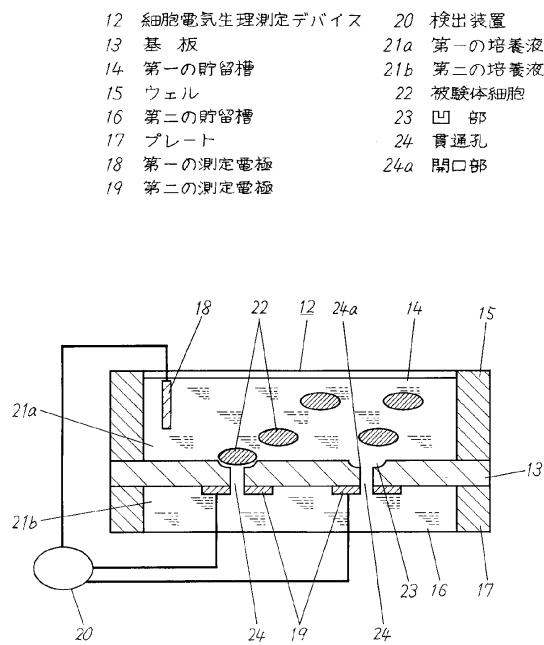
24 b 突出部

25 保護膜

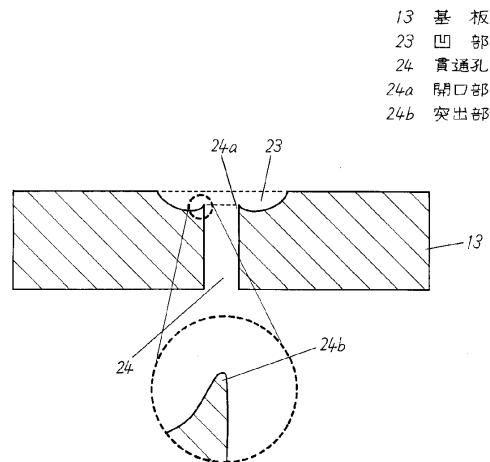
50

2 6 レジストマスク
 2 7 マスクホール
 2 8 レジストマスク
 2 9 マスクホール
 3 0 絶縁膜
 3 1 貫通孔
 3 1 a 開口部

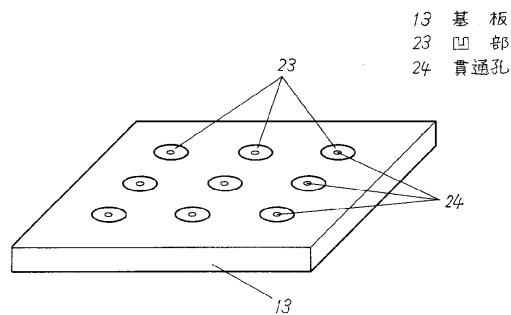
【図1】



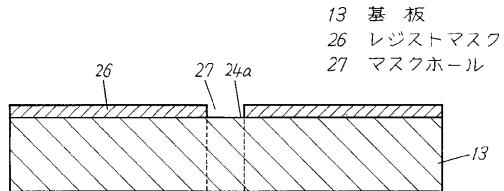
【図2】



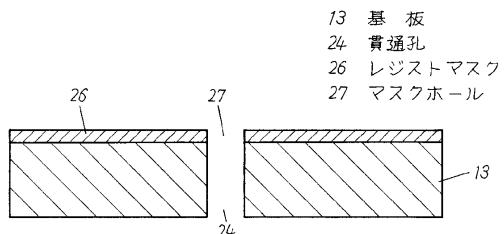
【図3】



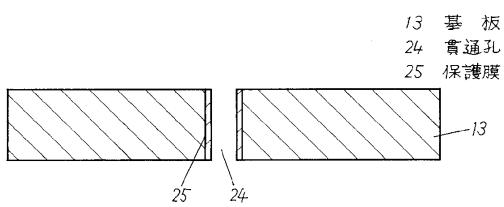
【図4】



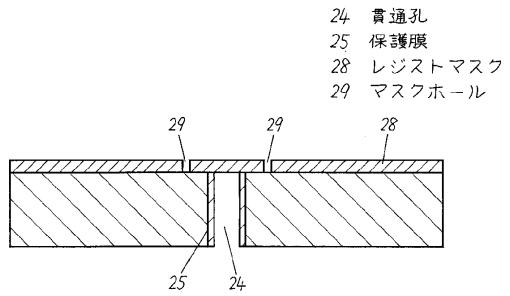
【図5】



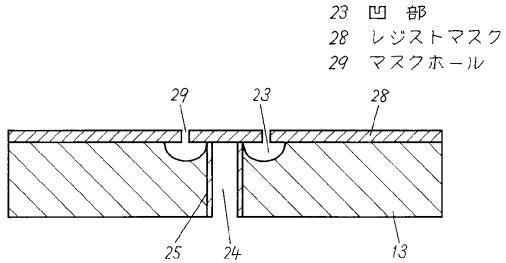
【図6】



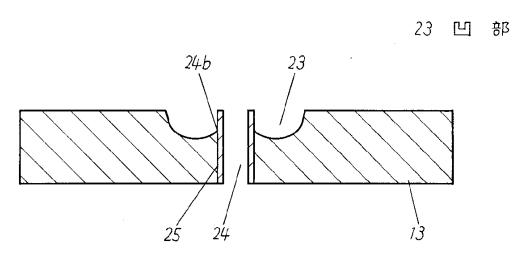
【図7】



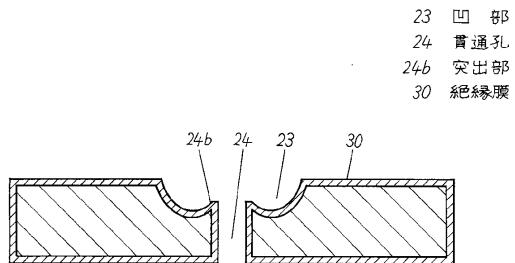
【図8】



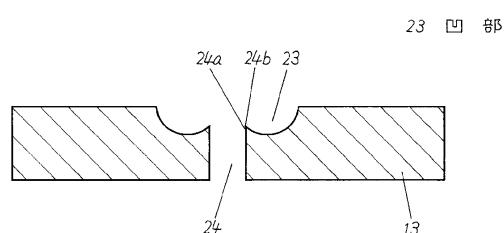
【図9】



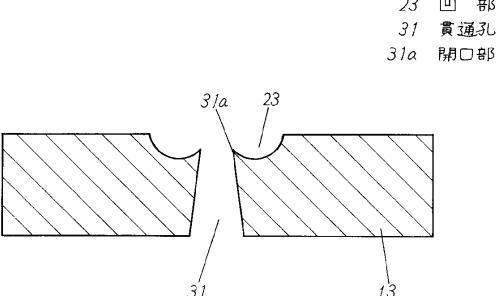
【図11】



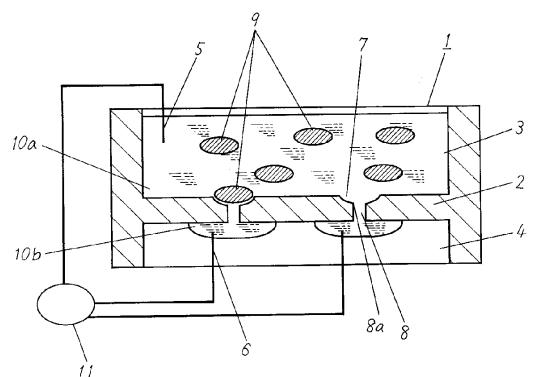
【図10】



【図12】



【図 1 3】



フロントページの続き

(72)発明者 中谷 将也

大阪府門真市大字門真1006番地 パナソニックエレクトロニクス株式会社内

(72)発明者 平岡 聰一郎

大阪府門真市大字門真1006番地 パナソニックエレクトロニクス株式会社内

(72)発明者 牛尾 浩司

大阪府門真市大字門真1006番地 パナソニックエレクトロニクス株式会社内

審査官 柏木 一浩

(56)参考文献 特表2005-539242 (JP, A)

国際公開第2005/116242 (WO, A1)

特開2005-156234 (JP, A)

特開2005-265758 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 01 N 27/327

C 12 M 1/34

G 01 N 27/416