

(19)日本国特許庁 ( J P )

# (12) 公開特許公報 ( A )

(11)特許出願公開番号

## 特開2000 - 23657

( P 2 0 0 0 - 2 3 6 5 7 A )

(43)公開日 平成12年1月25日(2000.1.25)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup> (参考)
C12M 1/00		C12M 1/00	A 4B024 Z 4B029
C12N 5/10 15/09		G01N 1/00 C12N 5/00	K 4B065 B
G01N 1/00	101		C

審査請求 有 請求項の数11 O L (全12頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10 - 193931

(22)出願日 平成10年7月9日(1998.7.9)

特許法第30条第1項適用申請有り 1998年1月23日~25日 日本機械学会・バイオ エンジニアリング部門主催の「日本機械学会100周年記念第10回バイオエンジニアリング講演会」において文書をもって発表

(71)出願人 591031360

農林水産省食品総合研究所長  
茨城県つくば市観音台2丁目1-2

(72)発明者 菊池 佑二

茨城県竜ヶ崎市久保台4-1-10-2-506

(72)発明者 全 教錫

東京都世田谷区上祖師谷4-24-1 祖師谷留学生会館C-106

(72)発明者 年吉 洋

神奈川県中郡二宮町中里2-16-36

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

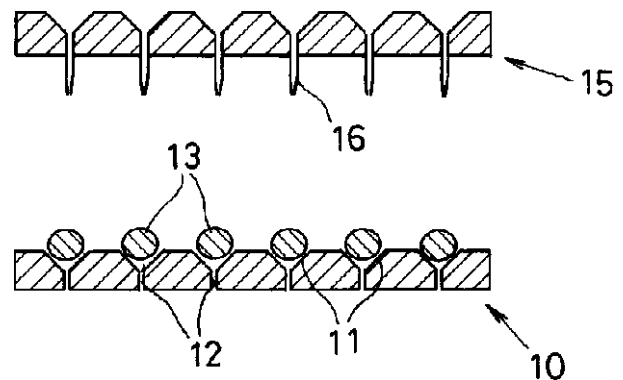
最終頁に続く

(54)【発明の名称】マイクロキャピラリーアレイ、その製造方法、及び物質注入装置

(57)【要約】

【課題】 細胞を個別にかつ正確にハンドリングすることのできる操作ツールを提供する。

【解決手段】 マイクロチャンパーアレイ10と、マイクロキャピラリーアレイ15を用いる。マイクロチャンパー11は表面から窪んだピットとピットの底部に連通する連通孔12からなり、各チャンパー11に細胞13を一個ずつ負圧吸引固定する。マイクロキャピラリーアレイ15は、マイクロチャンパー11の配列と同じ配列でアレイ状に並べて形成された外形1~2μm程度の先端を有する多数のマイクロキャピラリー16を備え、そのマイクロキャピラリー16を用いて、マイクロチャンパー11に保持されたすべての細胞13に対してDNA注入を一括して行なう。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 外径 2 ~ 10  $\mu\text{m}$  の複数の中空キャピラリーが、基板を貫通し、前記基板の一方の表面から突出して設けられていることを特徴とするマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 2】 基板表面に形成される薄膜材質からなる複数の中空キャピラリーが、前記基板を貫通し、前記基板の一方の表面から突出して設けられていることを特徴とするマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 3】 前記基板はシリコン基板であり、前記薄膜材質は酸化シリコン又は窒化シリコンであることを特徴とする請求項 2 記載のマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 4】 前記中空キャピラリーの先端部は、最先端部以外の部分で外部と連通していることを特徴とする請求項 1、2 又は 3 記載のマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 5】 基板の一方の表面から内部に向かって細穴を加工する工程と、前記穴の内壁に薄膜を形成する工程と、前記穴を加工した表面と反対側の表面から前記基板をエッチングして前記細穴の内壁に形成した薄膜からなる中空構造を露出させる工程と、前記薄膜からなる中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とするマイクロキャピラリーの作製方法。

【請求項 6】 前記先端部を開口させる工程は、前記中空構造の最先端部を残して開口させることを特徴とする請求項 5 記載のマイクロキャピラリーの作製方法。

【請求項 7】 基板の一方の表面から内部に向かって所定の配列で複数の細穴を加工する工程と、前記複数の細穴の内壁に薄膜を形成する工程と、前記細穴を加工した表面と反対側の表面から前記基板をエッチングして前記細穴の内壁に形成した薄膜からなる複数の中空構造を露出させる工程と、前記薄膜からなる複数の中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とするマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 8】 前記先端部を開口させる工程は、前記中空構造の最先端部を残して開口させることを特徴とする請求項 7 記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 9】 前記複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程は集束イオンビーム加工によって行うことを特徴とする請求項 7 又は 8 記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 10】 前記複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程は ICP・RIE 加工によって行うことを特徴とする請求項 7 又は 8 記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 11】 前記基板はシリコン基板であり、前記

薄膜は酸化シリコン又は窒化シリコンからなることを特徴とする請求項 5 ~ 10 のいずれか 1 項記載のマイクロキャピラリーアレイの作成方法。

【請求項 12】 複数の細胞を所定のピッチ配列で保持する細胞保持手段と、

先端が基板から突出した外径 2 ~ 10  $\mu\text{m}$  の複数の中空キャピラリーを前記所定のピッチ配列で備えるマイクロキャピラリーアレイと、

前記マイクロキャピラリーアレイに物質を吸入あるいは吐出させるための手段と、

前記細胞保持手段と前記マイクロキャピラリーアレイとを相対的に駆動する手段とを含むことを特徴とする物質注入装置。

【請求項 13】 複数の細胞を所定のピッチで保持するステップと、

前記所定のピッチで配列されたマイクロキャピラリーアレイに物質を吸引するステップと、

前記物質を吸引したマイクロキャピラリーアレイの先端を各キャピラリーに対応する細胞に突き刺すステップと、

20 キャピラリー中の物質を細胞に注入するステップとを含むことを特徴とする物質注入方法。

【請求項 14】 複数の細胞を所定のピッチで保持するステップと、

前記所定のピッチで配列されたマイクロキャピラリーアレイの先端を各キャピラリーに対応する細胞に突き刺すステップと、

キャピラリーを突き刺された細胞中の物質をキャピラリー中に吸引するステップと、

30 キャピラリー中に吸引された物質を他の細胞に注入するステップとを含むことを特徴とする物質注入方法。

【請求項 15】 請求項 13 又は 14 記載の方法によって物質を注入された細胞及びその細胞から分裂増殖した細胞。

【請求項 16】 請求項 13 又は 14 記載の方法によって物質を注入された細胞から分裂増殖して得られた成体。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

40 【発明の属する技術分野】本発明は、細胞に遺伝子等を注入するのに使用されるマイクロインジェクションアレイシステムと、それに使用されるマイクロキャピラリーアレイ及びその製造方法に関する。

【0002】

50 【従来の技術】近年、生物学、医学、薬学、生化学、遺伝子工学などを基礎として急速に進歩しつつあるいわゆるバイオテクノロジーの研究と開発は、日進月歩のスピードで進んでおり、組織や細胞レベルでの研究から DNA レベルでの生物機能の解明へと進展している。なかでも、将来バイオテクノロジーの応用面で中核技術と目さ

れている遺伝子組換えDNA技術は、当初の微生物を対象とした医薬品生産から発展し、農作物、家畜などの高等動植物の改良、食品素材や化学品の生産、遺伝子治療、さらには動物複製（cloning）など広範多岐にわたった研究開発が進められている。このようなバイオテクノロジーの研究では、細胞、核、染色体、DNA、タンパクなどの生体高分子のハンドリングに対するニーズが高く、また生物の持っている優れた機能を工学的にあるいは産業的に応用しようとする試みも数多くなされている。

【0003】細胞にDNA等の物質を注入する方法としては、電ポレーション法、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法、膜融合法などが知られている。電ポレーション法は、細胞に電場パルスをかけてその細胞を一時的に透過性にする方法である。パーティクルガン法は、DNA等の物質を付着させた金属粒子を加速して細胞に当て、細胞内に打ち込む方法、マイクロインジェクション法は細胞にマイクロキャピラリーを刺入してDNA等の物質を注入する方法、膜融合法は物質を封入したリポソーム等をポリエチレングリコール等の化学物質を用いて細胞膜に融合させ細胞と一体化させる方法である。細胞は数 $\mu\text{m}$ から数十 $\mu\text{m}$ とマイクロメータサイズの大きさを持つので、これらの微細な対象を上手に扱うには、対象にあわせて微細なツールが必要となる。細胞に遺伝子を注入するツールとしては、上記の方法が用いられている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】バイオテクノロジーの研究に当たっては細胞に遺伝子を注入することから作業が始まるが、現在まで、多数の細胞に効率よく遺伝子を注入することの出来る方法あるいはツールは開発されていない。前述の電ポレーション法は、細胞を個別のではなく集団として扱って注入を行う方法であるため、細胞の無駄遣いが多く、また遺伝子導入操作の効率が非常に悪いという問題があった。パーティクルガン法も同様である。マイクロインジェクション法は確実に遺伝子導入を行える方法ではあるが、一回に一個の細胞にしか遺伝子導入ができないので遺伝子導入操作の効率が非常に悪いという問題があった。

【0005】本発明は、このように細胞を個別にかつ正確にハンドリングできる操作ツールや操作技術が確立されていない現状に鑑みてなされたもので、細胞を個別にかつ正確にハンドリングすることのできる操作ツールを提供することを目的とする。本発明は、また、個別操作の特性を保持した上で大量の細胞を処理することのできる処理方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、半導体デバイスの製造などに用いられている微細加工技術を利用して微細キャピラリーをアレイ化することにより、細胞の個

別的な操作と同時に多くの細胞を対象として遺伝子導入操作の一括処理が可能なマイクロインジェクションアレイシステムを開発し、遺伝子導入作業の効率向上を図るものである。

【0007】図1は、本発明のマイクロインジェクションアレイシステムによる遺伝子注入法の概念図である。本発明のマイクロインジェクションアレイシステムは、マイクロチャンバーアレイ10とマイクロキャピラリーアレイ15を備える。マイクロチャンバーアレイ10は、一個一個の細胞13を個別に保持することのできる多数のマイクロチャンバー11を備える。マイクロチャンバー11は表面から窪んだピットとピットの底部に連通する連通孔12からなり、ピットの大きさを細胞13の直径より少し小さめに作れば、一個の細胞だけの捕捉が可能となる。細胞捕捉の時は、マイクロチャンバー11の上に細胞が入った浮遊液を流し、そして連通孔12を介して背後からピットに陰圧をかけてやると一つのチャンバー11に一個の細胞13が負圧吸引固定される。マイクロチャンバーをアレイ化することにより、多くの細胞を一括してアレイ状に配列、固定することができる。

【0008】マイクロキャピラリーアレイ15は、マイクロチャンバー11の配列と同じ配列でアレイ状に並べて形成された外径2~10 $\mu\text{m}$ 程度の先端を有する多数のマイクロキャピラリー16を備え、そのマイクロキャピラリー16を用いて、マイクロチャンバー11に保持されたすべての細胞13に対してDNA等の物質注入を一括して行なう。本発明によるマイクロキャピラリーアレイは、外径2~10 $\mu\text{m}$ の複数の中空キャピラリーが、基板を貫通し、基板の一方の表面から突出して設けられていることを特徴とする。

【0009】本発明によるマイクロキャピラリーアレイは、また、基板表面に形成される薄膜材質からなる複数の中空キャピラリーが、基板を貫通し、基板の一方の表面から突出して設けられていることを特徴とする。基板はシリコン基板とすることができ、薄膜材質は酸化シリコン又は窒化シリコンとすることができる。中空キャピラリーの先端部は、最先端部以外の部分で外部と連通しているのが好ましい。

【0010】本発明によるマイクロキャピラリーの作製方法は、基板の一方の表面から内部に向かって細穴を加工する工程と、穴の内壁に薄膜を形成する工程と、穴を加工した表面と反対側の表面から基板をエッチングして細穴の内壁に形成した薄膜からなる中空構造を露出させる工程と、薄膜からなる中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とする。先端部を開口させる工程では、中空構造の最先端部を残して開口させるのが好ましい。

【0011】本発明によるマイクロキャピラリーアレイの作製方法は、また、基板の一方の表面から内部に向か

って所定の配列で複数の細穴を加工する工程と、複数の細穴の内壁に薄膜を形成する工程と、細穴を加工した表面と反対側の表面から基板をエッチングして細穴の内壁に形成した薄膜からなる複数の中空構造を露出させる工程と、薄膜からなる複数の中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とする。先端部を開口させる工程では、中空構造の最先端部を残して開口させるのが好ましい。複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程は集束イオンビーム加工、あるいは ICP・RIE 加工によって行うことができる。

【0012】基板はシリコン基板とすることができ、薄膜は酸化シリコン又は窒化シリコンで形成することができる。薄膜は、蒸着等の方法で形成した金属薄膜としてもよい。本発明による物質注入装置は、複数の細胞を所定のピッチ配列で保持する細胞保持手段と、先端が基板から突出した外径 2 ~ 10  $\mu\text{m}$  の複数の中空キャピラリーを前記所定のピッチ配列で備えるマイクロキャピラリーアレイと、マイクロキャピラリーアレイに物質を吸入あるいは吐出させるための手段と、細胞保持手段と前記マイクロキャピラリーアレイとを相対的に駆動する手段とを含むことを特徴とする。

【0013】また、本発明による物質注入方法は、複数の細胞を所定のピッチで保持するステップと、前記所定のピッチで配列されたマイクロキャピラリーアレイに物質を吸引するステップと、物質を吸引したマイクロキャピラリーアレイの先端を各キャピラリーに対応する細胞に突き刺すステップと、キャピラリー中の物質を細胞に注入するステップとを含むことを特徴とする。

【0014】本発明による物質注入方法は、また、複数の細胞を所定のピッチで保持するステップと、前記所定のピッチで配列されたマイクロキャピラリーアレイの先端を各キャピラリーに対応する細胞に突き刺すステップと、キャピラリーを突き刺された細胞中の物質をキャピラリー中に吸引するステップと、キャピラリー中に吸引された物質を他の細胞に注入するステップとを含むことを特徴とする。本発明は、また、前述の方法によって物質を注入された細胞及びその細胞から分裂増殖した細胞である。本発明は、また、前述の方法によって物質を注入された細胞から分裂増殖して得られた成体である。

【0015】本発明の物質注入装置あるいは物質注入方法は、細胞に DNA や蛋白質等の生体高分子、標識用の蛍光色素等を注入するために利用することができ、動植物の人工的改良・育種に利用することができる。本発明によると、遺伝子導入機構のアレイ化により、多くの細胞を対象とした遺伝子導入操作が可能となり、作業効率や DNA 導入効率を大幅に向上することができる。また、本発明の遺伝子注入法は、直接注入方式であるため、他の方式と比べ遺伝子導入を確実に行うことができる。

【0016】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。最初に、図 2 ~ 図 4 を用いてマイクロキャピラリーアレイの作製方法について説明する。図 2 は、マイクロキャピラリーが形成されるシリコン基板の加工工程を示すものである。図 2 ( a ) のように、例えば厚さ 200 ~ 400  $\mu\text{m}$  程度のシリコン基板 20 を用意し、それに図 2 ( b ) に示すように、2 ~ 10  $\mu\text{m}$  程度の外径を有し、50  $\mu\text{m}$  以上の深さを有する多数の穴 21 を格子状に整列させて形成する。この穴 21 を形成する工程は、例えば集束イオンビーム ( Focused Ion Beam : FIB ) を用いた加工によって、あるいは高密度プラズマエッチング ( Inductively Coupled Plasma Reactive Ion Etching : ICP - RIE ) によって行うことができる。

【0017】FIB による加工は、シリコン基板 20 を精密ステージでステップ的に移動させながら穴 21 を 1 個ずつ開けるため、加工に時間を要するものの、穴の先端部が尖った構造を形成することができる。その結果、後述の工程を経て、先端部の曲率半径が約 0 . 1  $\mu\text{m}$  と鋭く尖ったマイクロキャピラリーを作製することができる。遺伝子導入用のキャピラリー構造としては当然ながら先端部が鋭く尖った方が望ましい。

【0018】また、ICP - RIE による加工は、シリコン基板表面に塗布したフォトリソグラフィ工程によって穴のパターンを形成し、そのフォトリソグラフィをマスクとして反応性イオンの高密度プラズマによるエッチングで穴を形成するものである。ICP - RIE 法は、短時間の処理で多数の穴を一度に形成することができるが、FIB 加工のように穴の先端を細くすることができない。

【0019】穴を形成したシリコン基板 20 に対して、その後、熱酸化、ヘビードープ、気相堆積法、スパッタリング等の方法を用いて薄膜形成を行う。例えば、図 2 ( c ) に示すように、全面を酸化させて、穴 21 の内壁部分も含めて酸化シリコン (  $\text{SiO}_2$  ) 膜 22 で覆う。基板表面及び穴 21 の内壁への酸化シリコン膜 22 の形成は、例えば酸素雰囲気中でシリコン基板を 1150 程度に加熱することで行うことができる。1 時間の加熱で 0 . 2  $\mu\text{m}$  程度の厚さの酸化膜が形成され、10 時間の加熱で 1  $\mu\text{m}$  程度の厚さの酸化膜を形成することができる。最終的に形成されるマイクロキャピラリーの強度を確保するためには、酸化シリコン膜 22 の膜厚は 1  $\mu\text{m}$  程度とする必要がある。酸化シリコン膜に代えて窒化シリコン膜を形成する場合には、低圧気相堆積法 ( LPCVD ) で  $\text{SiH}_4$  とアンモニアを混合して 800 で反応させることにより形成することができる。

【0020】次に、図 3 に示すように、ガラス基板を加工する。図 3 ( a ) に示すように、厚さ 0 . 5 mm 程度のガラス基板 30 を用意する。そのガラス基板 30 をクロム・金をレジストとしてフッ酸中でエッチングするこ

とにより、図 3 ( b ) に示すように、片面に周縁部 3 1 を残して凹部 3 2 を形成して、皿状に加工する。更に、図 3 ( c ) に示すように、ガラス基板 3 0 の中心付近に、ドリルあるいは超音波加工によって凹部 3 2 から基板の反対側の面まで連通する貫通孔 3 3 を形成する。

【 0 0 2 1 】次に、図 4 に示すように、図 2 の工程で作製したシリコン基板 2 0 と、図 3 の工程で作製したガラス基板 3 0 とを接合し、更に加工してマイクロキャピラリーアレイを作製する。まず、図 4 ( a ) に示すように、図 2 の工程で作製したシリコン基板 2 0 の穴 2 1 が開口している側の面と、図 3 の工程で作製したガラス基板 3 0 の凹部 3 2 が形成された側の面を合わせ、陽極接合する。次に、図 4 ( b ) に示すように、シリコン基板 2 0 を、穴 2 1 が開口している側と反対側の面 2 4 から TMAH が薄く含まれている有機アルカリ溶液を用いて大きくエッチングする。酸化シリコンあるいは窒化シリコンはエッチングされないので、図示するように、酸化シリコンあるいは窒化シリコンからなる中空針を基板から突出させることができる。しかしながら、酸化シリコンあるいは窒化シリコン膜も少しずつエッチングされてしまうので、酸化シリコンあるいは窒化シリコン膜 2 2 に対する保護膜が必要である。シリコン基板 2 0 の穴 2 1 が開口している側の面に接合したガラス基板 3 0 は、この保護膜の役割を果たす。また、エッチング後、シリコン基板 2 0 の厚さが非常に薄くなるので、シリコン基板 2 0 の保持の面からもガラス基板 3 0 は必要である。

【 0 0 2 2 】こうして、シリコン基板 2 0 から多数の酸化シリコンあるいは窒化シリコン膜製の袋状中空針 2 5 が突出した状態となる。ただし、この段階では袋状中空針 2 5 は有底であり、上面のみが開放している。なお、シリコンをエッチングしていく間に酸化シリコンあるいは窒化シリコン膜 2 2 も次第に薄くなっていくので、中空針 2 5 の長さを十分に確保するためには、図 2 ( c ) の工程で形成する酸化シリコンあるいは窒化シリコン膜 2 2 を充分厚くしておかなければならない。

【 0 0 2 3 】酸化シリコンあるいは窒化シリコン以外の薄膜を用いる場合も同様であり、薄膜材質に比べてシリコンのエッチング速度が十分に速くなる条件でエッチングを行う。それによって、薄膜材質からなる中空針を基板から突出させて形成することができる。酸化シリコンあるいは窒化シリコン以外の薄膜としては、例えば蒸着によって形成した金属薄膜などがある。続いて、図 4 ( c ) に示すように、袋状中空針 2 5 の先端付近に穴 2 6 を開けて軸方向に連通するキャピラリー 2 7 とする。この袋状中空針 2 5 の穴開け加工について、次に説明する。この穴開け加工の方法としては、FIB加工あるいはRIE加工を利用することができる。

【 0 0 2 4 】図 5 は、FIB加工によって袋状中空針に穴を開ける方法の説明図である。FIB加工装置は、試料に対して弱いイオンビームを走査することで試料から

放出される二次電子を検出して走査イオン顕微鏡 ( S I M ) 像を観察することができる。S I M 像によって袋状中空針 5 0 を観察しながら、所定の位置で照射する F I B 5 1 を強くして、図 5 ( a ) に示すように袋状中空針 2 5 の先端付近に穴 5 2 を開ける。この方法によると、図示したように袋状中空針 5 0 の先端位置を外して側面に穴 5 2 を開けることができる。そのため、図 5 ( b ) に模式的に示すように、中空針 5 0 の先端部の鋭さを維持することができ、細胞に刺しやすいマイクロキャピラリー 5 5 を形成することができる。

【 0 0 2 5 】図 6 は、R I E 加工によって袋状中空針に穴を開ける方法の説明図である。この場合には、まず図 6 ( a ) に示すように、シリコン基板 2 0 の酸化シリコン膜 2 2 からなる袋状中空針 2 5 が突出している側に、袋状中空針 2 5 が埋まるまでレジスト 6 3 を塗布する。次いで、図 6 ( b ) に示すように、レジスト 6 3 を塗布したシリコン基板 2 0 を電極 6 6 , 6 7 間に配置して、R I E でレジスト 6 5 をエッチングしていく。袋状中空針 2 5 の先端が出ると、レジスト 6 3 とともに袋状中空針 2 5 の先端もエッチングする。レジスト層 6 3 の厚さを計測しながらエッチングしていき、袋状中空針 2 5 の先端に穴が開いた段階でエッチングを停止する。こうして図 6 ( c ) に断面模式図を示し、図 6 ( d ) に模式的に斜視図を示すように、先端に穴 6 2 が開いて、軸方向に連通したマイクロキャピラリー 6 5 を形成することができる。R I E 加工によると、多数の袋状中空針 2 5 に一度に穴を開けることができる利点がある。

【 0 0 2 6 】以上のようにして、マイクロキャピラリーアレイが作製される。このマイクロキャピラリーアレイは、マイクロチャンバーアレイと対で用いられる。マイクロチャンバーアレイは、遺伝子導入操作の際に対象細胞が逃げないように特定の場所に保持する微細ツールである。以下に、マイクロチャンバーアレイの作製方法を説明する。

【 0 0 2 7 】図 7 は、マイクロチャンバーアレイの作製方法の一例を説明する工程図である。まず、図 7 ( a ) に示すように、厚さ約 1 0 0  $\mu\text{m}$  の石英基板 7 0 を用意し、表面及び裏面に金属レジスト層 7 1 a , 7 1 b を形成する。表面側のレジスト層 7 1 a はフォトリソグラフィ工程により、マイクロキャピラリーアレイの配列ピッチと同じピッチで直径 1 0  $\mu\text{m}$  程度の円形領域のレジストを除去しておく。このレジスト層 7 1 a , 7 1 b が形成された石英基板 7 0 をフッ酸で図 7 ( b ) に示すように異方性エッチングする。異方性エッチング終了後、レジスト層 7 1 a , 7 1 b を除去すると、図 7 ( c ) に示すように、マイクロキャピラリーアレイの配列ピッチと同じピッチでテーパ状の貫通孔 ( マイクロチャンバー ) 7 2 が形成された石英基板が得られる。

【 0 0 2 8 】次に、図 7 ( d ) に示すように、このテーパ状の貫通孔 7 2 が形成された石英基板 7 0 に、図 3 に

示したのと同様の工程で作製された凹部 75 及び貫通孔 76 を有する下地ガラス基板 74 を接着する。その後、図 7 ( e ) に示すように、下地ガラス基板 74 の下面にガラスもしくは透明プラスチック材料からなるポンプ接続部材 77 を接着する。ポンプ接続部材 77 は、下地ガラス基板 74 の貫通孔 76 を図示しないポンプに連通させるためのものであり、貫通孔 76 に連通する流路 78 と、側面にその流路 78 に接続する接続部 79 を有する板状の部材である。接続部 79 とポンプの間をチューブ 90 で接続して吸引することにより、図 7 ( e ) に模式的に示すように、細胞 91 を 1 個ずつ石英基板 70 のテーパ状の貫通孔 72 の中に吸引して保持することができる。部材 74 と部材 77 は別体とせず、一体化した 1 つの部材としても良い。マイクロチャンバーアレイの基板として石英基板 70 を用いると、石英基板は透明であるため、後述のように基板の下面から倒立顕微鏡を用いた位置決めが可能となり、位置合わせが容易になるという利点がある。

【 0029 】図 8 は、マイクロチャンバーアレイの作製方法の他の例を説明する工程図である。この例では、基板として図 8 ( a ) に示すように、( 100 ) 方位の単結晶シリコン基板 80 を用いる。このシリコン基板 80 の表面及び裏面にレジスト層 81 a , 81 b を形成する。表面側のレジスト層 81 a はフォトリソグラフィーの工程により、マイクロキャピラリーアレイの配列ピッチと同じピッチで直径 20  $\mu\text{m}$  角程度の角形領域のレジストを除去しておく。このレジスト層 81 a , 81 b を形成したシリコン基板 80 を KOH 溶液に浸漬して、図 8 ( b ) に示すように異方性エッチングする。異方性エッチング終了後、レジスト層 81 a , 81 b を除去すると、図 8 ( c ) に示すように、マイクロキャピラリーアレイの配列ピッチと同じピッチでテーパ状のピット 82 が形成されたシリコン基板 80 が得られる。

【 0030 】次に、表面側にテーパ状のピット 82 が形成されたシリコン基板 80 の裏面側にレジスト層を形成し、テーパ状のピット 82 の真下に相当する部分のレジスト層を直径 2 ~ 5  $\mu\text{m}$  程度除去する。そして、このレジスト層をマスクとして IPC - RIE で加工することにより、図 8 ( d ) に示すように、シリコン基板 80 の裏面から表面のテーパ状のピット 82 に至る基板貫通孔 83 を形成する。

【 0031 】続いて、図 8 ( e ) に示すように、貫通孔 83 が形成されたシリコン基板 80 に、図 3 に示したのと同様の工程で作製された凹部 85 及び貫通孔 86 を有する下地ガラス基板 84 を陽極接合法により接着する。更に、下地ガラス基板 84 の下面にガラスもしくは透明プラスチック材料からなるポンプ接続部材 87 を接着する。ポンプ接続部材 87 は、下地ガラス基板 84 の貫通孔 86 を外部のポンプに連通させるためのものであり、貫通孔 86 に連通する流路 88 を有し、側面にその流路

88 に連通する接続部 89 を有する板状の部材である。接続部 89 とポンプの間をチューブ 90 で接続して吸引することにより、図 8 ( e ) に模式的に示すように、細胞 93 を 1 個ずつシリコン基板 80 のテーパ状のピット 82 の中に吸引して保持することができる。部材 84 と部材 87 は別体とせず、一体化した一つの部材としても良い。

【 0032 】マイクロチャンバーアレイの基板としてシリコン基板 80 を用いた場合には、細胞 93 を保持するテーパ状のピット 82 に接続する貫通孔 83 の径を小さくできるため、小さな細胞でも保持することができるという利点がある。

【 0033 】図 9 は、本発明によるマイクロインジェクションアレイシステムの一例の全体構成図である。このシステムは、石英基板によって構成されたマイクロチャンバーアレイ 100 と DNA 容器 150 を載置して 2 次元方向に移動可能な透明 XY ステージ 110、XY ステージ 110 上でマイクロキャピラリーアレイ 120 を上下方向 ( Z 方向 ) に移動操作可能なマニピュレータ 130 を備える。マイクロチャンバーアレイ 100 は圧電アクチュエータ 160 上に配置されている。マイクロチャンバーアレイ 100 にはチューブ 111 を介してポンプ 112 が接続されており、マイクロキャピラリーアレイ 120 にはチューブ 121 を介してシリンジ 122 が接続されている。XY ステージ 110 の下方には、位置合わせのための倒立顕微鏡 140 が配置されている。図 9 に示したマイクロインジェクションアレイシステムを用いた細胞への DNA 注入操作は、以下の手順に従って行われる。

【 0034 】(1) マイクロチャンバーアレイ上に細胞浮遊液を流し、ポンプ 112 によって負圧をかけて各チャンバーに細胞 115 を 1 個ずつ吸引固定する。固定されなかった細胞は流し去る。

(2) XY ステージ 110 を移動して DNA 容器 150 をマイクロキャピラリーアレイ 120 の下方に位置決めする。

(3) マニピュレータ 130 を操作してマイクロキャピラリーアレイ 120 を下方に移動し、DNA 容器 150 の溶液中に浸漬する。

【 0035 】(4) シリンジ 122 を操作してマイクロキャピラリーアレイ 120 に DNA 容器 150 中の DNA 溶液を吸引する。DNA 溶液は個々のキャピラリーの内部に吸引される。DNA 容器中の DNA 濃度を適度に調整することにより、全てのマイクロキャピラリーに DNA が吸引されるようにすることは十分可能である。

(5) マニピュレータ 130 を操作してマイクロキャピラリーアレイ 120 を上方に移動し、XY ステージ 110 を移動してマイクロキャピラリーアレイ 120 の下方にマイクロチャンバーアレイ 100 を位置づける。

(6) 倒立顕微鏡 140 を用いて XY ステージ 110 の下

方からマイクロチャンバーアレイ 100 とマイクロキャピラリーアレイ 120 を観察しながら XY ステージ 110 を微動させて両者を正確に位置合わせする。

【0036】(7) マニピュレータ 130 を操作してマイクロキャピラリーアレイ 120 を下方に移動し、マイクロキャピラリーアレイ 120 の先端をマイクロチャンバーアレイ 100 に保持されている個々の細胞 115 に突き刺す。このとき、マイクロチャンバーアレイ 100 を載せている圧電アクチュエータ 160 を駆動してマイクロチャンバーアレイ 100 に吸着されている細胞 115 を振動させることで、細胞にマイクロキャピラリーを刺す操作が容易になる。

(8) マイクロチャンバーアレイ 100 に吸着されている各細胞 115 にマイクロキャピラリー 120 のマイクロキャピラリーが突き刺さっている状態でシリンジ 122 を操作して、マイクロキャピラリー中の DNA を細胞 115 に注入する。

【0037】(9) マニピュレータ 130 を操作してマイクロキャピラリーアレイ 120 を上方に移動し、XY ステージ 110 を例えば図 10 に矢印で示す方向に移動して、マイクロチャンバーアレイ 100 の別のブロックの新しい細胞をマイクロキャピラリーアレイ 120 の下方に位置づける。

(10) 前記(6)から(9)の操作を繰り返し、必要に応じて DNA 容器 150 から DNA を補充しながら、マイクロチャンバーアレイ 100 に吸着されている全ての細胞に対して DNA 注入操作を行う。

(11) すべての細胞に DNA 注入を行った後、ポンプ 112 を逆転駆動することでマイクロチャンバーアレイに正圧を与えて細胞の吸引固定を解除し、DNA が注入された細胞を回収する。このような操作により、大量の細胞に対して個々に確実に DNA を注入することができる。

【0038】また、マイクロチャンバーアレイ 100 に保持した細胞 115 にマイクロキャピラリーを突き刺し、細胞内の核を含む物質を吸引した後、マイクロチャンバーアレイ 110 に他の細胞を保持し、マイクロキャピラリーを突き刺してキャピラリー中に吸引した物質を注入することで、核を含む物質を細胞間で移植することができる。その際、1つのマイクロチャンバーアレイ 100 で細胞を交換しながら作業を行うこともできるが、図 9 の DNA 容器 150 の代わりに XY ステージ 110 上にもう一つのマイクロチャンバーアレイを置いて上記の手順で作業を行えば、作業効率を高めることができる。

【0039】なお、図 9 に示した例では、マイクロチャンバーアレイ 100 とマイクロキャピラリーアレイ 120 の位置決めを、透明な XY ステージ 110 の下方から倒立顕微鏡 140 を用いて行った。しかし、マイクロチャンバーアレイとマイクロキャピラリーアレイの位置決め方法は倒立顕微鏡を用いた方法だけに限定されるもの

ではない。例えば、図 11 に示すように、マイクロチャンバーアレイ 100 のブロック 101 毎に位置合わせマーク 102 を設けておき、マイクロキャピラリーアレイ側に設置された正立顕微鏡で位置合わせマーク 102 を確認することで両者の位置合わせを行うこともできる。あるいは、送り精度の高い XY ステージを用いることで、マイクロチャンバーアレイとマイクロキャピラリーアレイ位置合わせを顕微鏡による確認を必要とせずに行うことも可能である。

10 【0040】また、図 9 に示したシステムでは、マイクロキャピラリーアレイ中 120 のキャピラリーの数をマイクロチャンバーアレイ 100 中のチャンバー数より少なく設定し、マイクロキャピラリーアレイ 120 に対してマイクロチャンバーアレイ 100 を相対的に移動させながら、マイクロチャンバーアレイのブロック毎に順番に DNA を注入した。しかし、マイクロキャピラリーアレイ中のキャピラリーの数とマイクロチャンバーアレイ中のチャンバー数とを等しく設定すると、一度の操作でマイクロチャンバーアレイに保持された全ての細胞に DNA を注入することができる。

20 【0041】また、図 9 に示したシステムでは、マイクロチャンバーアレイ 100 を X, Y 方向に移動させ、マイクロキャピラリーアレイ 120 を上下方向 (Z 方向) に駆動するようにしたが、マイクロチャンバーアレイ 100 は固定とし、マイクロキャピラリーアレイ 120 を上下方向と共に X, Y 方向にも移動可能とすることで、マイクロチャンバーアレイ 100 に吸引固定されたすべての細胞に DNA 注入を行うことも勿論可能である。

30 【0042】300 μm 間隔、50 × 50 配列のマイクロキャピラリーアレイ、マイクロチャンバーアレイを組み込んだ本発明による装置で、ポプラプロトプラストを用いた実験では、細胞 1 個の捕捉率は 30%、蛍光色素を用いた注入試験では注入率は 30% であった。従って、一度の操作で約 200 個の細胞に物質を注入することができた。所用時間は約 1 分である。従来のマイクロインジェクション法では、ほぼ同じ時間で 1 個の細胞への注入処理を行うのが限度であるから、本発明によって処理効率が従来法に比較して約 200 倍向上したことになる。

40 【0043】

【発明の効果】本発明によると、細胞に物質を注入するためのマイクロキャピラリーアレイを作製することが可能になり、そのマイクロキャピラリーアレイを用いることにより大量の細胞に対して個々に確実に物質を導入することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

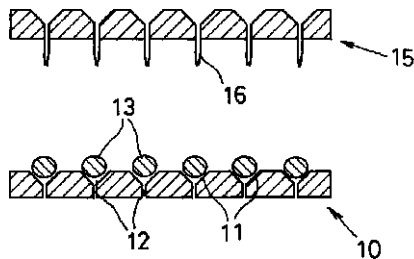
【図 1】本発明のマイクロインジェクションアレイシステムによる遺伝子注入法の概念図。

【図 2】マイクロキャピラリーが形成されるシリコン基板の加工工程を示す図。

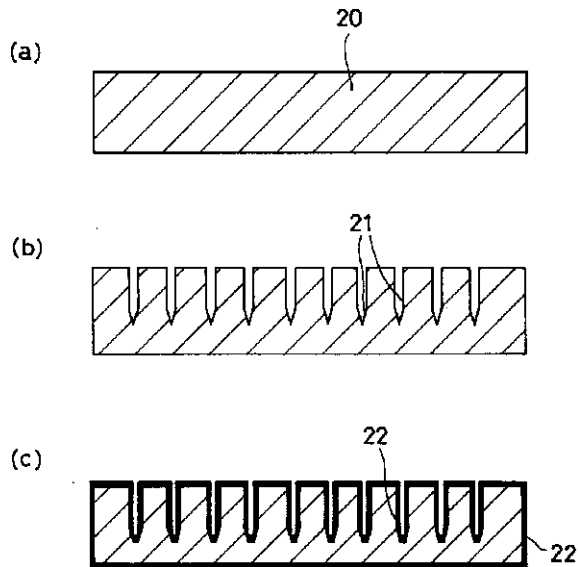
【図3】ガラス基板加工工程の説明図。  
 【図4】シリコン基板とガラス基板を接合してマイクロキャピラリーアレイを作製する工程の説明図。  
 【図5】FIB加工によって中空針に穴を開ける方法の説明図。  
 【図6】RIE加工によって中空針に穴を開ける方法の説明図。  
 【図7】マイクロチャンバーアレイの作製方法の一例を説明する工程図。  
 【図8】マイクロチャンバーアレイの作製方法の他の例を説明する工程図。  
 【図9】本発明のマイクロインジェクションアレイシステムによる遺伝子注入操作を説明する概念図。  
 【図10】マイクロキャピラリーアレイとマイクロチャンバーアレイの位置関係を説明する図。  
 【図11】マイクロキャピラリーアレイとマイクロチャンバーアレイの位置合わせ方法の一例を説明する図。  
 【符号の説明】  
 10...マイクロチャンバーアレイ、11...マイクロチャンパー、12...連通孔、13...細胞、15...マイクロキャピラリーアレイ、16...マイクロキャピラリー、20

...シリコン基板、21...穴、22...酸化シリコン膜、25...袋状中空針、26...穴、27...キャピラリー、30...ガラス基板、31...周縁部、32...凹部、33...貫通孔、50...袋状中空針、51...FIB、52...穴、55...マイクロキャピラリー、62...穴、63...レジスト、65...マイクロキャピラリー、66、67...電極、70...石英基板、71a、71b...レジスト層、72...テーパ状の貫通孔、74...下地ガラス基板、75...凹部、76...貫通孔、77...ポンプ接続部材、78...流路、79...接続部、80...単結晶シリコン基板、81a、81b...レジスト層、82...テーパ状のピット、83...貫通孔、84...下地ガラス基板、85...凹部、86...貫通孔、87...ポンプ接続部材、88...流路、89...接続部、90...チューブ、91...細胞、93...細胞、100...マイクロチャンバーアレイ、101...ブロック、102...位置合わせマーク、110...XYステージ、111...チューブ、112...ポンプ、115...細胞、120...マイクロキャピラリーアレイ、121...チューブ、122...シリンジ、130...マニピュレータ、140...倒立顕微鏡、150...DNA容器、160...圧電アクチュエータ

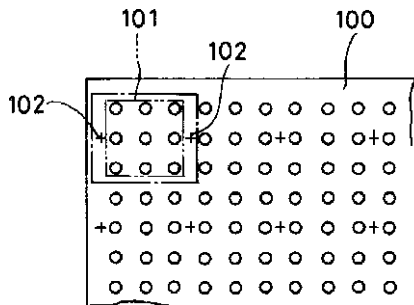
【図1】



【図2】

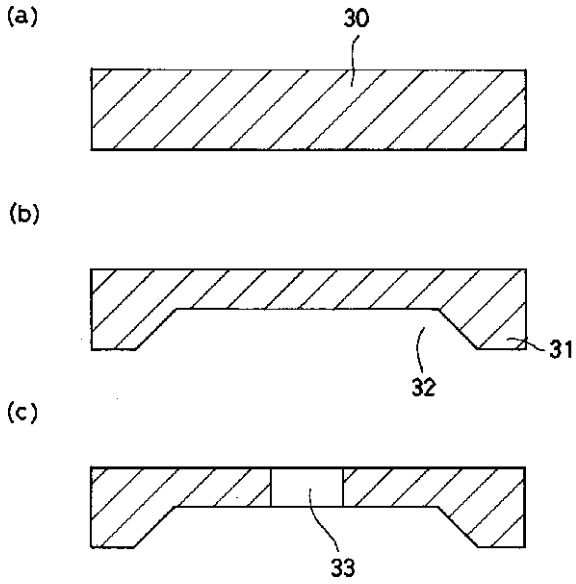


【図11】

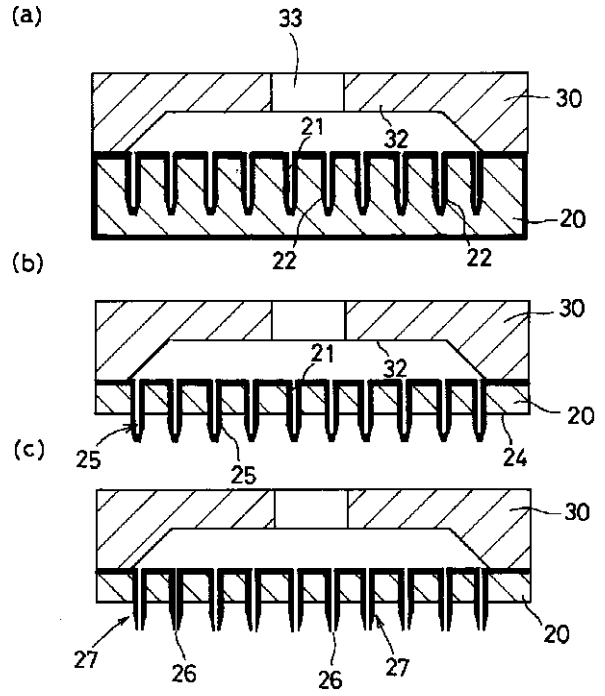




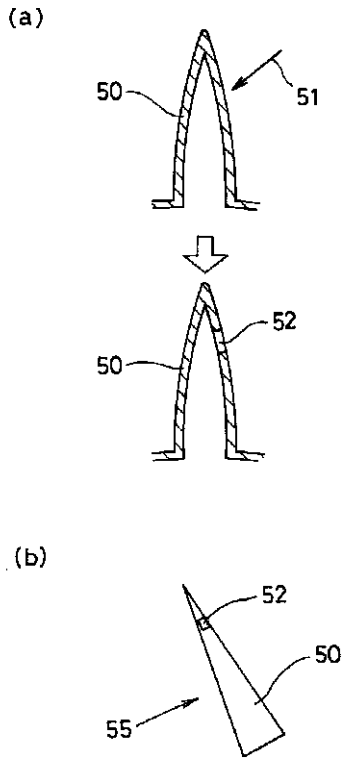
【 図 3 】



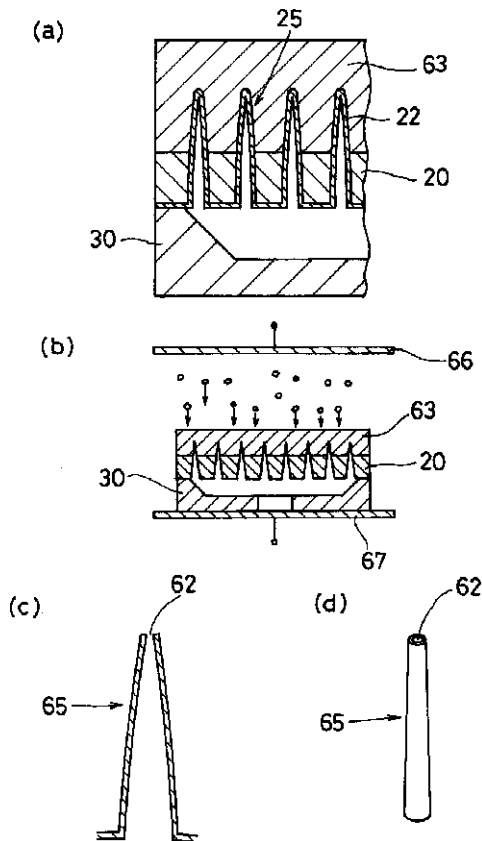
【 図 4 】



【 図 5 】

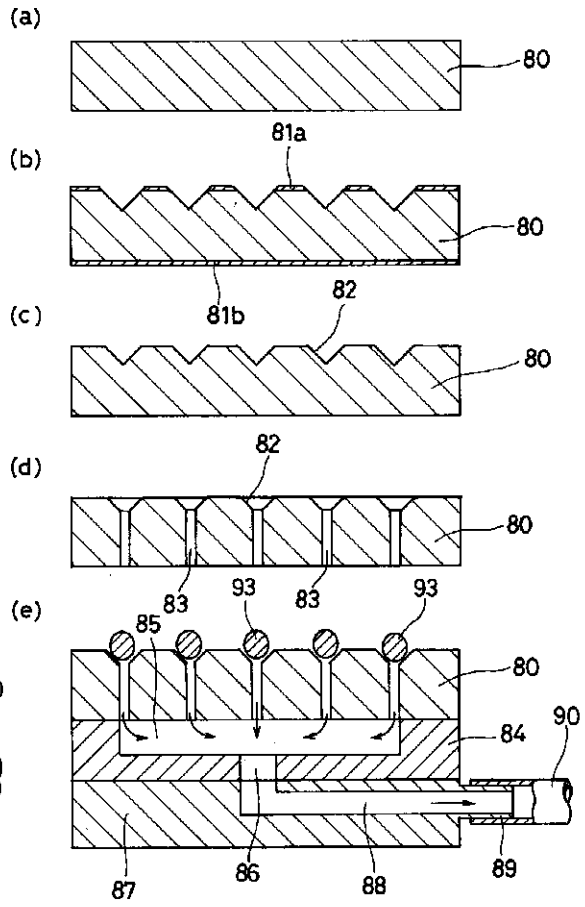
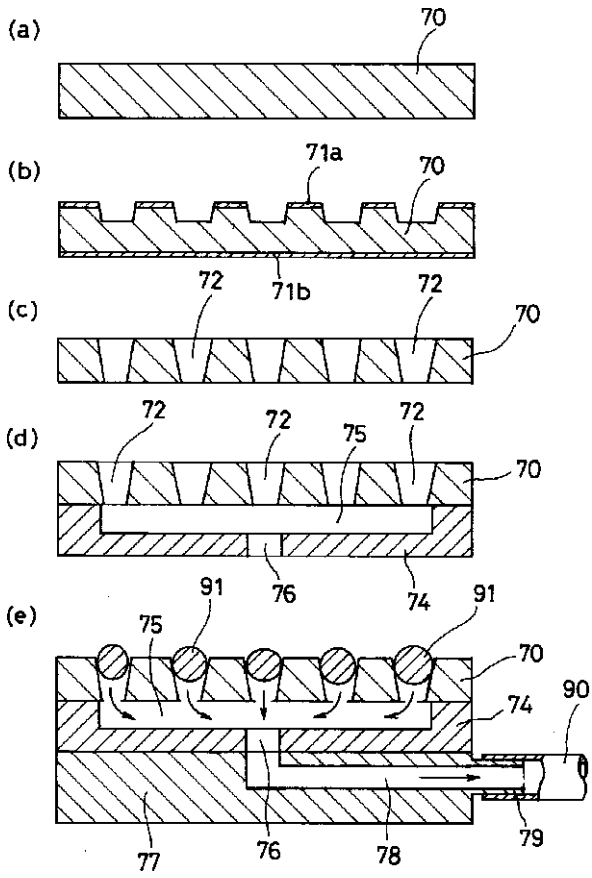


【 図 6 】



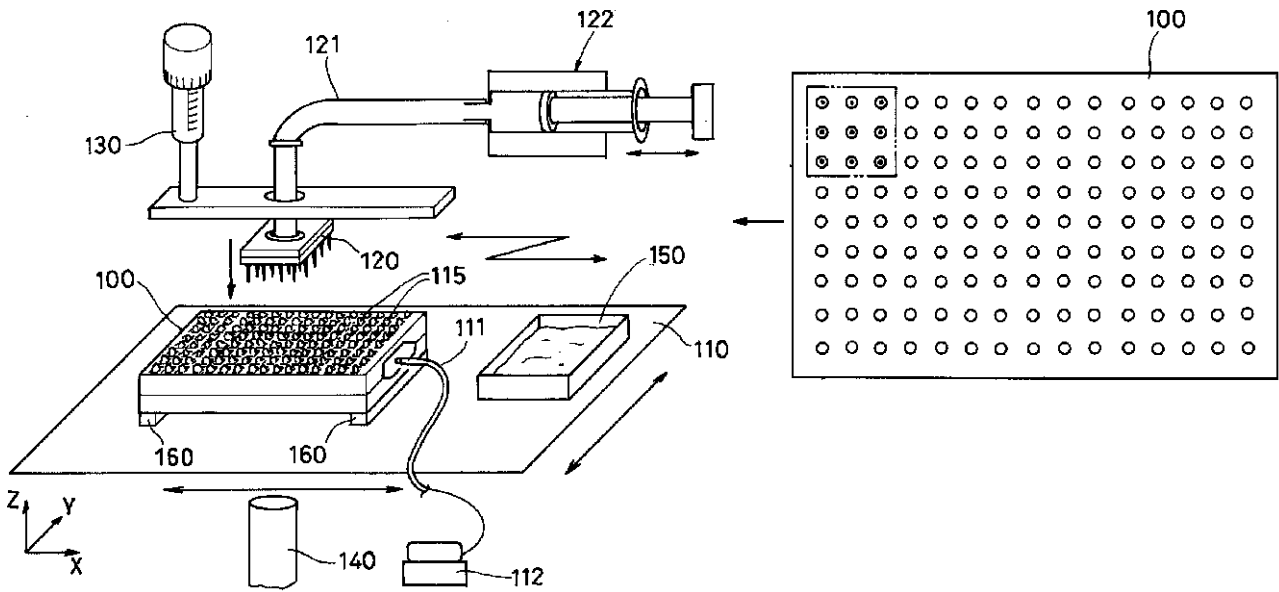
【 図 7 】

【 図 8 】



【 図 9 】

【 図 10 】



## 【手続補正書】

【提出日】平成 11 年 5 月 28 日 ( 1999 . 5 . 28 )

## 【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 外径 2 ~ 10  $\mu\text{m}$  の複数の中空キャピラリーが、基板を貫通し、前記基板の一方の表面から突出して設けられていることを特徴とするマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 2】 基板表面に形成される薄膜材質からなる複数の中空キャピラリーが、前記基板を貫通し、前記基板の一方の表面から突出して設けられていることを特徴とするマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 3】 前記基板はシリコン基板であり、前記薄膜材質は酸化シリコン又は窒化シリコンであることを特徴とする請求項 2 記載のマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 4】 前記中空キャピラリーの先端部は、最先端部以外の部分で外部と連通していることを特徴とする請求項 1、2 又は 3 記載のマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 5】 基板の一方の表面から内部に向かって細穴を加工する工程と、前記穴の内壁に薄膜を形成する工程と、前記穴を加工した表面と反対側の表面から前記基板をエッチングして前記細穴の内壁に形成した薄膜からなる中空構造を露出させる工程と、前記薄膜からなる中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とするマイクロキャピラリーの作製方法。

【請求項 6】 前記先端部を開口させる工程は、前記中空構造の最先端部を残して開口させることを特徴とする請求項 5 記載のマイクロキャピラリーの作製方法。

【請求項 7】 基板の一方の表面から内部に向かって所定の配列で複数の細穴を加工する工程と、前記複数の細穴の内壁に薄膜を形成する工程と、前記細穴を加工した表面と反対側の表面から前記基板をエッチングして前記細穴の内壁に形成した薄膜からなる複数の中空構造を露出させる工程と、前記薄膜からなる複数の中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とするマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 8】 前記先端部を開口させる工程は、前記中空構造の最先端部を残して開口させることを特徴とする請求項 7 記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 9】 前記複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程は集束イオンビーム加工によって行うことを特徴とする請求項 7 又は 8 記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 10】 前記複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程は ICP・RIE 加工によって行うことを特徴とする請求項 7 又は 8 記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 11】 前記基板はシリコン基板であり、前記薄膜は酸化シリコン又は窒化シリコンからなることを特徴とする請求項 5 ~ 10 のいずれか 1 項記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 12】 複数の細胞を所定のピッチ配列で保持する細胞保持手段と、先端が基板から突出した外径 2 ~ 10  $\mu\text{m}$  の複数の中空キャピラリーを前記所定のピッチ配列で備えるマイクロキャピラリーアレイと、前記マイクロキャピラリーアレイに物質を吸入あるいは吐出させるための手段と、前記細胞保持手段と前記マイクロキャピラリーアレイとを相対的に駆動する手段とを含むことを特徴とする物質注入装置。

【請求項 13】 複数の細胞を所定のピッチで保持するステップと、前記所定のピッチで配列されたマイクロキャピラリーアレイに物質を吸引するステップと、前記物質を吸引したマイクロキャピラリーアレイの先端を各キャピラリーに対応する細胞に突き刺すステップと、キャピラリー中の物質を細胞に注入するステップとを含むことを特徴とする物質注入方法。

【請求項 14】 複数の細胞を所定のピッチで保持するステップと、前記所定のピッチで配列されたマイクロキャピラリーアレイの先端を各キャピラリーに対応する細胞に突き刺すステップと、キャピラリーを突き刺された細胞中の物質をキャピラリー中に吸引するステップと、キャピラリー中に吸引された物質を他の細胞に注入するステップとを含むことを特徴とする物質注入方法。

## 【手続補正書】

【提出日】平成 11 年 9 月 29 日 ( 1999 . 9 . 29 )

## 【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】外径 2 ~ 10  $\mu\text{m}$  の薄膜材質からなる複数の中空キャピラリーが、基板を貫通し、前記基板の一方の表面から突出して 2 次元アレイ状に設けられていることを特徴とするマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 2】前記基板はシリコン基板であり、前記薄膜材質は酸化シリコン又は窒化シリコンであることを特徴とする請求項 1 記載のマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 3】前記中空キャピラリーの先端部は、最先端部以外の部分で外部と連通していることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のマイクロキャピラリーアレイ。

【請求項 4】基板の一方の表面から内部に向かって細穴を加工する工程と、前記穴の内壁に薄膜を形成する工程と、前記穴を加工した表面と反対側の表面から前記基板をエッチングして前記細穴の内壁に形成した薄膜からなる中空構造を露出させる工程と、前記薄膜からなる中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とするマイクロキャピラリーの作製方法。

【請求項 5】前記先端部を開口させる工程は、前記中空構造の最先端部を残して開口させることを特徴とする請求項 4 記載のマイクロキャピラリーの作製方法。

【請求項 6】基板の一方の表面から内部に向かって所定の配列で複数の細穴を加工する工程と、前記複数の細穴の内壁に薄膜を形成する工程と、

前記細穴を加工した表面と反対側の表面から前記基板をエッチングして前記細穴の内壁に形成した薄膜からなる複数の中空構造を露出させる工程と、前記薄膜からなる複数の中空構造の先端部を開口させる工程とを含むことを特徴とするマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 7】前記先端部を開口させる工程は、前記中空構造の最先端部を残して開口させることを特徴とする請求項 6 記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 8】前記複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程は集束イオンビーム加工によって行うことを特徴とする請求項 6 又は 7 記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 9】前記複数の細穴を加工する工程及び中空構造の先端部を開口させる工程は ICP・RIE 加工によって行うことを特徴とする請求項 6 又は 7 記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 10】前記基板はシリコン基板であり、前記薄膜は酸化シリコン又は窒化シリコンからなることを特徴とする請求項 4 ~ 9 のいずれか 1 項記載のマイクロキャピラリーアレイの作製方法。

【請求項 11】複数の細胞を所定のピッチ配列で 2 次元アレイ状に保持する細胞保持手段と、先端が基板から突出した外径 2 ~ 10  $\mu\text{m}$  の薄膜材質からなる複数の中空キャピラリーを前記所定のピッチ配列で 2 次元アレイ状に備えるマイクロキャピラリーアレイと、前記マイクロキャピラリーアレイに物質を吸入あるいは吐出させるための手段と、前記細胞保持手段と前記マイクロキャピラリーアレイとを相対的に駆動する手段とを含むことを特徴とする物質注入装置。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

識別記号

F I

テ-マコード (参考)

C 1 2 N 15/00

A

(72) 発明者 藤田 博之

東京都豊島区千川一丁目 9 - 14

F ターム (参考) 4B024 AA19 AA20 CA01 CA11 DA01  
DA02 GA12 GA17 GA18 HA20  
4B029 AA23 AA25 BB11 BB12 BB20  
CC03 CC08  
4B065 AA87X AA87Y AB01 AB10  
BA04 BD50 CA53 CA60