

図7 HEL299を7日間培養後の試料表面の光学顕微鏡写真

24Cr-2Moのねじり特性の向上には、固溶したNによる加工硬化能の増加が寄与している。この結果からも、固相窒素吸収法の有効性が理解できる。

固相窒素吸収したFe-24Cr-2Moの線材(φ1mm)を生後12週齢のウイスター系ラットの左側大腿骨および腹部皮下組織に埋入し、生体組織適合性を評価した結果、腐食生成物を生じずに優れた骨伝導性を有することが確認されている⁴¹⁾。また、ヒト正常線維芽細胞(HEL299)を用いた細胞適合性評価では、図7に示すように固相窒素吸収したFe-24Cr-2Moは316L鋼よりも優れた細胞適合性を示すことも確認されている⁴²⁾。

固相窒素吸収法の問題点

以上のように、固相窒素吸収法により製造されたNiフリーステンレス鋼は金属系生体材料として優れた特性を有している。しかしながら、Nを拡散固溶させるためには1473K近傍の高温域で材料をN₂ガス雰囲気焼鈍する必要があるため結晶粒粗大化は避けられない。316L鋼の線材について線径(D)、結晶粒径(d)と力学的特性の関係が検討され

ており、 $D/d < 5$ の条件を満たした場合に力学的特性が著しく低下することが報告されている⁴³⁾。これらの問題を解決するために、高ひずみ加工によるN吸収前のα型ステンレス鋼の結晶粒微細化、材料中に均一分散させた窒化物あるいは酸化物による“ピン止め効果”を利用した結晶粒粗大化の抑制などが試みられている。メカニカルアロイング法により、平均粒径2μmのγ組織を有する高濃度窒素ステンレス鋼が製造されている²⁵⁾。筆者らの研究においても、固相窒素吸収した焼結体のマイクロ組織は、同条件で処理したバルク材よりも小さくなることが明らかになっており、製造法を工夫することにより結晶粒粗大化を抑制しつつNiフリーステンレス鋼製品を製造できると考えられる。

目的とする製品のサイズが小さい場合には、短時間の処理で結晶粒粗大化をある程度抑制しつつ強度および耐食性を向上させることができるが、極端に肉厚の異なる部位が混在する製品では均一な強度および耐食性を確保することは難しい。また、高温域からの冷却により製品にゆがみが生じるため、処理後に形状の矯正が必要となる場合もある。固相窒素吸収法により製造したNiフリーステンレス鋼のγ相の安定度は溶製法により製造した材料よりも低いため、処理後にひずみや応力を付与した場合にはγ→α'の応力誘起変態が生じて強度、耐食性などが著しく低下する可能性がある。したがって、固相窒素吸収処理後に塑性変形、切削、研磨などを必要としない製品製造プロセスの構築も重要である。

おわりに

以上、Niフリーステンレス鋼の製造法およびその特性改善にNが重要であることを紹介した。しかしながら、Nは気体元素であるため、特殊な設備あるいは高温下での化学熱処理などを用いない限りステンレス鋼に添加することは困難である。リサイクル性、資源量などを考慮すると、Nは非常に魅力的な元素であり、多くの可能性を秘めている。今後もNを利用した金属材料の高機能化研究

を行い、1人でも多くの人の生活を豊かにすることが、材料研究者としての筆者の使命であると考えている。

なお、本稿で紹介した一部の研究成果については、物質・材料研究機構における研究ならびに企業との共同研究により得られたものであり、ご協力頂いた多くの方々に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) J. Menzel, W. Kirschner and G. Stein: *ISIJ Int.*, **36** (1996), 893-900.
- 2) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: *IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 74, Surgical Implants and Other Foreign Bodies*, (International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, 1999), pp.241-242.
- 3) E. Yano: *Toxicology Today*, (Kimpodo, Tokyo, 1994) pp.119-128.
- 4) A. Yamamoto, Y. Kohyama and T. Hanawa: *J. Biomed. Mater. Res.* **59** (2001), 176-183.
- 5) A. Yamamoto, R. Honma and M. Sumita: *J. Biomed. Mater. Res.* **39** (1998), 331-340.
- 6) L. W. Chang, L. Magos and T. Suzuki: *Toxicology of Metals*, (CRC Press, New York, 1996), p.827-828.
- 7) 井上昌幸, 中山秀夫: *科と金属アレルギー*, デンタルダイヤモンド社, 東京, (1993), pp.44-49.
- 8) A. Chiba, K. Kumagai, H. Takeda and N. Nomura: *Mater. Sci. Forum*, **475-479** (2005), 2317-2322.
- 9) K. Nitta, S. Watanabe, N. Masahashi, H. Hosoda and S. Hanada: *Structural Biomaterials for 21st Century*, eds. By M. Niinomi, T. Okabe, E. M. Taleff, D. R. Lesure and H. E. Lippard, (TMS 2001), pp.25-34.
- 10) H. Hosoda, Y. Ohmatsu and S. Miyazaki: *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* **26** (2001), 235-237.
- 11) H. Hosoda, N. Hosoda and S. Miyazaki: *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, **26** (2001), 243-246.
- 12) ステンレス協会: *ステンレス鋼便覧*, 日刊工業新聞社, 東京, (2003), pp.5-6.
- 13) K. J. Irvine, D. T. Liewellyn and F. B. Pickering: *J. Iron Steel Inst.*, **199** (1961), 153-175.
- 14) 今井勇之進: *鋼の物性と窒素*, アグネ技術センター, 東京, (1994), pp.77-83.
- 15) 増本 健, 今井勇之進: *日本金属学会誌*, **33** (1969), 1364-1371.
- 16) 遅沢浩一郎: *熱処理*, **36** (1996), 206-212.
- 17) 藤原和雄: *鉄と鋼*, **71** (1985), 794-799.
- 18) 相良雅之, 片田康行, 小玉俊明, 水流 徹: *日本金属学会誌*, **67** (2003), 67-73.
- 19) M. Sagara, Y. Katada and T. Kodama: *ISIJ Int.*, **45** (2003), 714-719.
- 20) Y. Katada, M. Sagara, Y. Kobayashi and T. Kodama: *Mater. and Manuf. Proc.*, **19** (2004), 19-30.
- 21) 片田康行, 相良雅之: *ふえらむ*, **9** (2004), 18-20.
- 22) 成田修二, 濱野修次, 清水哲也: *電気製鋼*, **77** (2006), 171-178.
- 23) 宮川大海, 岡本正三: *鉄と鋼*, **46** (1960), 1466-1474.
- 24) 片岡公太, 土山聡宏, 後藤秀人, 高木節雄: *粉末および粉末冶金*, **46** (1999), 1249-1255.
- 25) 高木節雄: *ふえらむ*, **7** (2002), 14-15.
- 26) 片田康行: *ふえらむ*, **7** (2002), 12-13.
- 27) 土山聡宏, 高木節雄: *ふえらむ*, **7** (2002), 16-17.
- 28) 土山聡宏, 高木節雄: *ふえらむ*, **9** (2004), 31-33.
- 29) S. Hertzman and M. Jarl: *Met. Trans. A*, **18A** (1987), 1754-1752.
- 30) 土山聡宏, 高木節雄: *電気製鋼*, **77** (2006), 163-169.
- 31) 仲西知憲, 光安廣倫, 岩本幸英, 土山聡宏, 高木節雄: *材料とプロセス*, **18** (2005), 1350.
- 32) R. C. Gebeau and R. S. Brown: *Adv. Mater. Process*, **159** (2001), 46-48.
- 33) J. Menzel, W. Kirschner and G. Stein: *ISIJ Int.*, **36** (1996), 893-900.
- 34) P. J. Uggowitzer, R. Magdowski and M. O. Speidel: *ISIJ Int.*, **36** (1996), 901-908.
- 35) 片田康行: *まてりあ*, **6** (2006), 444-450.
- 36) D. Kuroda, S. Hiromoto, T. Hanawa, and Y. Katada: *Mater. Trans.*, **43** (2002), 3100-3104.
- 37) D. Kuroda, T. Hanawa, S. Hiromoto, Y. Koatada and K. Asami: *Mater. Trans.*, **43** (2002), 3093-3099.
- 38) H. Baba, T. Kobama and Y. Katada: *Corros. Sci.*, **44** (2002), 2393-2407.
- 39) R. C. Newman and T. Shahrabi: *Corros. Sci.*, **27** (1987), 827-838.
- 40) 黒田大介, 織田直樹, 塙 夫: *第27回日本バイオマテリアル学会大会予稿集*, (2005), p.120.
- 41) 黒田大介: *バイオマテリアル*, **23** (2005), 96-106.
- 42) A. Yamamoto, Y. Kohyama, D. Kuroda and T. Hanawa: *Mater. Sci. & Eng. C*, **C24** (2004), 737-743.
- 43) 福丸大志郎, 飛鷹秀幸, 土山聡宏, 高木節雄: *鉄と鋼*, **91** (2005), 828-833.

(くろだ・だいすけ/鈴鹿工業高等専門学校)

日本高専学会第 12 回年会講演会

講演論文集

今、あらためて問う 震災復興とものづくり
— 気持ちは通じる高専間連携および地域連携 —

期 日: 2006 年 8 月 19 日(土) ~ 8 月 20 日(日)

会 場: 神戸研究学園都市・ユニティ

主 催: 日本高専学会

共 催: 神戸市立工業高等専門学校

協 賛: 神戸市立工業高等専門学校同窓会「六神会」

後 援: 神戸商工会議所、神戸市民防災総合センター、NPO ワット神戸、
NPOCS 神戸、神戸市機械金属工業会、神戸市産業振興財団、
西神工業会、ユニティ、サンテレビジョン

日 本 高 専 学 会

窒素により高剛性化した無痛針の機械的特性

○ 黒田大介（鈴鹿高専）、檜原高明（㈱神戸工業試験場、物質・材料研究機構）、

黒田秀治（㈱神戸工業試験場、物質・材料研究機構）、

藤原昌樹（㈱神戸工業試験場、物質・材料研究機構）、堀池靖浩（物質・材料研究機構）

1. はじめに

我が国の高齢化率は年々増加しており、この30年間で総人口中に占める高齢者人口の割合が20%を突破している。また、少子化の進行も社会の高齢化を促進する要因となっており、既に65歳以上の高齢者人口は0～14歳の年少者人口を上回っている。2020年には高齢化率が26.9%になると予測されており、「高齢者の世紀」が間もなく到来する。高齢者らが元気に快適な社会生活を営むためには福祉・医療制度の充実も必要であるが、生活習慣病などの疾患を予防することも大切である。そこで、健康状態を簡便・迅速に診断できるバイオセンシング技術の開発が急務となっている。

筆者らは、微量血液を自ら採取して在宅で分析・診断できる安価かつ使い捨て可能な「微量血液分析在宅診断チップ」の開発を行っている。血液の採取には直径100 μm 程度の無痛針と呼ばれる金属製の針（細管）が使用される。無痛針の素材として316L鋼が主に使用されているが、近年では316L鋼に含まれるNiが金属アレルギーの原因物質として問題視されている。また、Niは限りある地下資源であり、安価かつ使い捨て可能な診断チップを開発するという観点からも極力排除する必要がある。

そこで、より安価かつ安全に使用できる無痛針の開発を目的として、金属アレルギー性や毒性が報告されておらず、さらに大気中に大量に存在するNにより機械的特性を改善できる新しい合金およびその製造技術の開発を試みた。また、試作した直径350 μm の細管の機械的特性を評価し、新合金の無痛針への適用可能性を検討した。

2. 実験方法

2.1 供試材および窒素吸収処理

Nを含む無痛針の素材として、Fe-24Cr-2Mo (mass%)を設計した。また、目的とする寸法、形状加工後に試料表面から拡散によりNを吸収させて力学的強度や耐食性を改善する製造技術を開発した。重量20kgのFe-24Cr-2Moの铸塊を高周波真空溶解炉により溶製した。得られた铸塊を900 $^{\circ}\text{C}$ および1000 $^{\circ}\text{C}$ の温度にて最大荷重300tonのプレス加工機により鍛造し、直径40mmの丸棒材を作製した。次いで、旋盤により表面酸

化皮膜（黒皮）を除去し、直径38mmの丸棒材に加工した。さらに、最大荷重18tonのスウェーjing加工機により冷間鍛造し、直径30mm、長さ500mmの丸棒材を作製した。得られた丸棒材にガンドリル加工を施しパイプ形状とし、焼鈍温度900 $^{\circ}\text{C}$ にて細管加工を行い、外径350 μm 、内径270 μm の細管を作製した。

窒素吸収処理は、Fe-24Cr-2Moの細管をアセトンにて脱脂、洗浄後、図1に示す窒素吸収処理装置によりN₂ガス雰囲気中にて1200 $^{\circ}\text{C}$ で20min、30min、60min保持した後に氷水中にて急冷することにより行った。

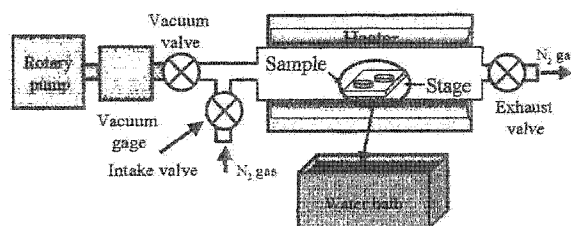


図1 窒素吸収処理装置の概略図

2.2 力学的特性評価

N吸収させたFe-24Cr-2Moの細管の引張特性は、容量1kNのインストロン型引張試験機により評価した。引張試験片の長さは30mmとし、標点間距離は10mmとした。なお、試験片の断面積が非常に小さいため破断荷重の検出には100Nのロードセルを使用し、引張速度は0.5mm/min一定とした。それぞれの処理に対して5回の引張試験を行い、それらの平均値により引張特性を評価した。種々の処理を行った細管を熱可塑性樹脂に包埋し、マイクロビッカース硬さ試験機により硬さを測定した。付加荷重を100gとし、荷重保持時間は15sとした。それぞれの処理に対して10点の硬さ測定を行い、それらの平均値により硬さを評価した。また、比較として304鋼製の鍼灸針（直径0.2mm）の引張特性および硬さについても同様に評価した。

3. 実験結果

3.1 硬さ特性

窒素吸収処理前後のFe-24Cr-2Moの細管ならびに304鋼製鍼灸針のビッカース硬さを図2に示す。細管に窒素吸収処理を施すことによりビッカース硬さは増加し、20minの窒素吸収処理試料においてHv415の高

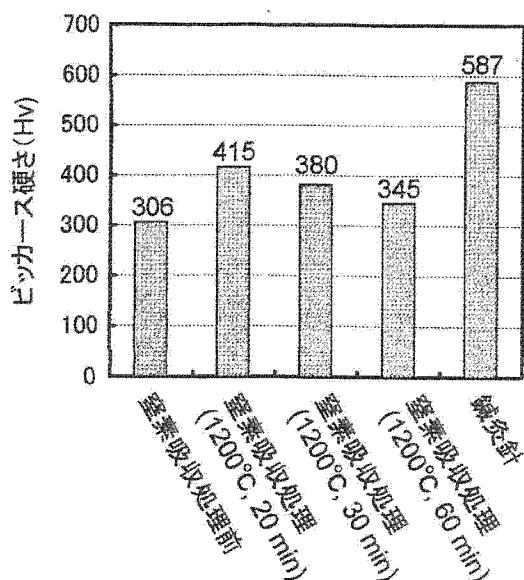


図2 窒素吸収処理前後の Fe-24Cr-2Mo の細管ならびに 304 鋼製鍼灸針の硬さ比較

いビッカース硬さが得られた。しかし、ビッカース硬さは窒素吸収処理時間の増加に伴い減少する傾向が認められた。これは、1200°Cでの熱処理による加工ひずみの減少および結晶粒の粗大化が原因であると考えられる。一方、304 鋼製鍼灸針においては Hv 587 の高いビッカース硬さが得られた。通常、焼鈍状態でのオーステナイト型ステンレス鋼のビッカース硬さは Hv 350 程度であるため、比較材として使用した鍼灸針は冷間鍛造により加工硬化されていると考えられる。また、鍼灸針においては磁性が確認されており、このことから応力誘起マルテンサイト変態を利用して高硬度化されていると考えられる。本研究では、比較材として使用した鍼灸針のビッカース硬さを無痛針として使用可能な硬さの基準とした。

3.2 引張特性

図3に窒素吸収処理前後の Fe-24Cr-2Mo の細管ならびに 304 鋼製鍼灸針の最大引張強さと破断伸びの関係を示す。窒素吸収処理前の細管の最大引張強さおよび破断伸びはそれぞれ 858 MPa および 3%であったが、1200°Cで 30 min の窒素吸収処理を施すことにより最大引張強さおよび破断伸びはそれぞれ977 MPa および 19.5%まで増加した。また、Fe-24Cr-2Mo の細管では窒素吸収処理前後において直径が変化しており、窒素吸収処理した細管においてわずかな直径の減少が認められた。これは、窒素吸収処理により Fe-24Cr-2Mo の細管の加工硬化能が向上していることを示唆している。一方、304 鋼製鍼灸針においては 2303 MPa もの高い最大引張強さが得られたが、その破断伸びは 5%程度の低い値であった。

ビッカース硬さ測定および引張試験の結果から、Fe-24Cr-2Mo を無痛針の素材として使用するためには、

最大引張強さおよび破断伸びをそれぞれ 1000 MPa および 10%以上に維持しつつビッカース硬さを Hv 600 程度まで増加させる必要があると考えられる。

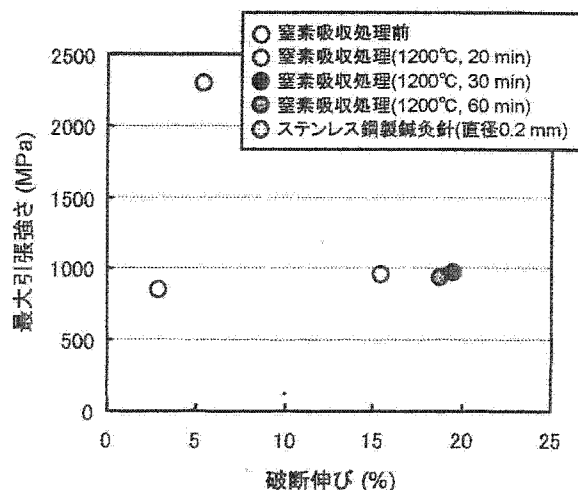


図3 窒素吸収処理前後の Fe-24Cr-2Mo の細管ならびに 304 鋼製鍼灸針の引張特性の比較

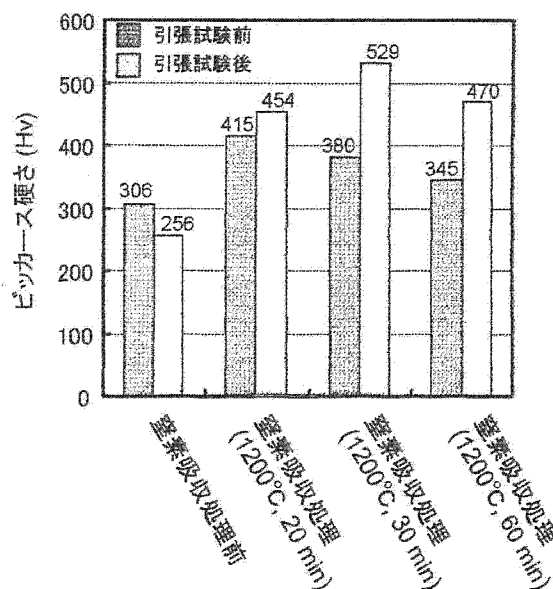


図4 窒素吸収処理前後の Fe-24Cr-2Mo の細管の引張試験によるビッカース硬さ変化

窒素吸収処理前後の Fe-24Cr-2Mo の細管のビッカース硬さ変化を図4に示す。窒素吸収処理した細管において引張試験によるビッカース硬さの増加が認められ、1200°Cで 30 min の窒素吸収処理を行った試料において Hv 529 の高いビッカース硬さが得られた。この試料の破断伸びから計算した加工ひずみは約 20%である。なお、1200°Cで 30 min の窒素吸収処理を行った試料では、図3に示したように良好な引張特性が得られている。したがって、1200°Cで 30 min の窒素吸収処理後に 20%以上の加工ひずみを導入することにより無痛針として使用可能な特性を Fe-24Cr-2Mo の細管に付与できると考えられる。

2006年 (平成18年) 秋 季

第 67 回応用物理学会学術講演会
講 演 予 稿 集

Extended Abstracts (The 67th Autumn Meeting, 2006);
The Japan Society of Applied Physics

No. 3

- 3 光
Optics
- 4 量子エレクトロニクス
Quantum Electronics
- 5 光エレクトロニクス
Optoelectronics
- 10 有機分子・バイオエレクトロニクス
Organic Molecules and Bioelectronics
- 12 半導体B (探索的材料・物性・デバイス)
Semiconductors B (Exploratory Materials/
Physics/Devices)
- 合同セッションE: 「スピントロニクス・ナノマグネティクス」
Spintronics and Nanomagnetism
- 合同セッションF: 「カーボンナノチューブの基礎と応用」
Physics and Applications of Carbon Nanotubes
- 合同セッションG: 「量子情報の基礎と応用」
Fundamentals and Applications of Quantum
Information Technology



期 日：2006年8月29日 (火)～9月1日 (金)

会 場：立 命 館 大 学 (びわこ・くさつキャンパス)

31p-P13-27

矩形配列ナノピラーによる DNA 慣性半径に基づく DNA サイズ分離効果

DNA Size Separation Based on Gyration Radius of DNA Employing Nano-Pillars with Square Allocation

物材機構¹, 名古屋大学², 科学技術振興機構³, ○小川涼¹, 加地範匡², 若尾創², 橋岡真義¹, 馬場嘉信^{2,3}, 堀池靖浩¹, NIMS¹, Nagoya University², JST³, ○Ryo Ogawa¹, Noritada Kaji², Sou Wakao², Shingi Hashioka¹, Yoshinobu Baba^{2,3}, Yasuhiro Horiike¹
OGAWA.Ryo@nims.go.jp

【緒言】本研究では、石英ナノピラーを流路に作成し、ナノピラーによる分子篩効果により、従来までのゲル電気泳動では実現できない、DNA 高速・高性能サイズ分離を目的としている。

【実験】半導体微細加工技術を応用し、直径 500nm、高さ 4μm、ピラー間隔 300nm の矩形配列のナノピラー (図 1) を作成した。このナノピラー領域中に制限酵素を用い消化したλDNA (23 kbp 断片および 10 kbp 以下の断片) を電気泳動させ、蛍光顕微鏡により、電気泳動された DNA の蛍光輝度を測定し、ナノピラー領域における DNA のサイズ分離効果を検討した。

【結果】DNA の電気泳動結果を図 2 に示す。矩形ナノピラーはピラー間隔よりも慣性半径が小さい DNA 断片 (10kbp 以下) とピラー間隔よりも慣性半径が大きい DNA (23kbp) を分子篩効果によりサイズ分離できることが明らかとなった。

本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金若手(B) (17750078, 2005) により行われた。

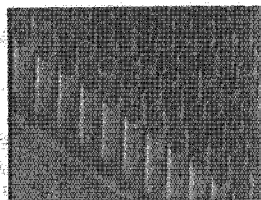


図 1 矩形配列のナノピラー

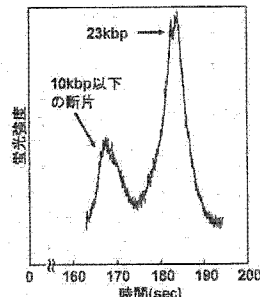


図 2 矩形ナノピラーによる DNA サイズ分離

31p-P13-28

マイクロピラーおよびハイドロゲルバルブを利用した DNA 前処理チップの作製

Fabrication of DNA pre-treatment chip utilizing micro pillar and hydro gel valve

(独)物質材料研究機構 橋岡真義, 小川 涼, 堀池靖浩

National Institute for materials science, Shingi Hashioka, Ryo Ogawa and Yasuhiro Horiike
HASHIOKA.Shingi@nims.go.jp

はじめに：我々は前回、ウイルス破砕後 DNA を抽出・精製し、感染症診断をワンチップで行なうための要素技術開発として、マイクロピラー上における DNA の固定・溶離およびハイドロゲルバルブ開閉の pH 応答性について報告した。¹⁾ 本報告では、両者を流路内に併設し、DNA 固定・閉じ込め、DNA 溶離・開放の pH 応答性について検討した結果を示す。

実験および結果：マイクロピラーおよびハイドロゲルバルブの光学顕微鏡像を右図に示す。ボッシュ法によりマイクロピラーを有する流路を Si 基板に形成し、ピラー上に Al₂O₃ 膜をコートした後、陽極接合によりガラスと貼り合わせ、ゲル材料を注入して紫外線露光によりバスターニングした。ウイルス DNA を精製して取り出すため、電位が酸で正、塩基で負に変化する Al₂O₃ 膜つきマイクロピラーに DNA を吸着させ、洗浄液の導入・排出を繰り返して洗浄する。チップに pH を 4 程度に調製した TBE バッファー液と共に T4 DNA を、回転させて導入し、蛍光観察を行ったところ、ハイドロゲルバルブを閉鎖させることで、DNA 溶液の閉じ込めが可能であることが確認できた。

謝辞：本研究は、文部省科研費若手研究(B) 18710114 の助成によって行われました。本研究に関して貴重なアドバイスをいただいた宮原裕二氏(物材機構)に感謝します。 1)平成 18 年春季第 53 回応用物理学関係連合講演会予稿集第 3 分冊 p. 1388

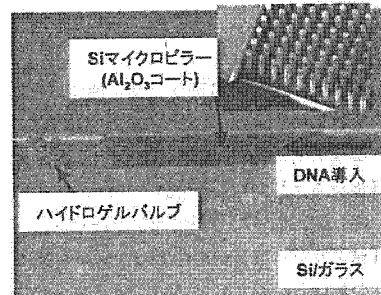


図:マイクロピラーおよびハイドロゲルバルブ

Extended Abstracts of
the 2006 International Conference on
SOLID STATE DEVICES AND MATERIALS

YOKOHAMA, 2006

Sponsored by
THE JAPAN SOCIETY OF APPLIED PHYSICS

C-7-2

DNA Size Separation Employing Quartz Nano-Pillars with Different Allocations

Ryo Ogawa¹, Noritada Kaji², Shingi Hashioka¹, Yoshinobu Baba^{2,3}, and Yasuhiro Horiike¹

¹National Institute for Materials Science,
1-1, Namiki, Tsukuba 305-0044, Japan

Phone: +81-29-851-3354 (ext.8335) E-mail: OGAWA.Ryo@nims.go.jp

²Nagoya University, Department of Applied Chemistry,
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya City, 464-8603, Japan

³Health Technology Research Center, AIST, Japan

1. Introduction

Fast DNA sequencing is necessary for the tailor made therapy and the genomics drug discovery in the near future. To realize the goal, the speed of DNA separation should be improved over 10^9 times than the present. Recently a channel filled by nano-pillars of 500 nm diameter and 500 nm spacing instead of an usual gel enabled us to achieve electrophoresis separation in 25 sec for λ DNA (48.5 kbp) and T4 DNA (165.6 kbp), and furthermore the tandem arrangement of nano-pillars regions allowed to separate smaller DNA of 10 kbp [1].

This report shows single molecule behavior of DNA in pillars, and reveals an important indication of DNA separation mechanism by applying different allocations of nano-pillars for DNA electrophoresis.

2. EXPERIMENTAL

The fabrication method of nano-pillars was reported already by our group [1]. Briefly, 500 nm-diameter holes pattern was delineated by a EB lithography on a posi-type resist spin-coated on a quartz plate. Ni was electroplated at holes and then after resist removal, pillars were fabricated by a dry etching using Ni mask. The diameter and the height of the nano-pillar were 500 nm and 4 μ m, respectively. Four pillar regions that the length of each regions was 500 μ m (the total pillar region length was 2 mm) were lined up in a channel via 35 μ m pillar-free spacing as shown in Fig. 1.

For acquiring the electrophoresis behaviour of single molecule DNA in nano-pillars, T4 DNA with 166 kbp was stained with intercalating fluorescence dye of YOYO-1 and the behavior within nano-pillars was observed by a fluorescence microscope, where the applied electric field was 25 V/cm. Electrophoresis separation of 38 and 10 kbp DNA fragments (obtained by digesting λ DNA by Apal) was investigated by cross-injection into the nano-pillar regions, where the applied electric field for electrophoresis was 50 V/cm. The fluorescence intensity was observed at a point where was 2000 μ m distant from the entrance to the pillar region.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The allocations of pillars were fabricated at square and tilt types, shown in Fig. 2. A center-to-center distance between pillars was 800 nm. That is, the gap between the

500-nm pillars is 300 nm.

Series of photographs showed conformation changes of DNA in pillars with square (Fig. 3) and tilt allocations (Fig. 4). In square allocation, DNA repeated the cycles of extending and shrinking, and moved straight without the disturbance of pillars. In the case of the tilt allocation, however, DNA is hooked over pillars and repeated the cycles of hooking, extending and shrinking, and did not move straight. Based on the single molecule observation, we compared the relative mobility of DNA in pillars ($\mu_{\text{in pillars}}$) and that in pillar-free regions ($\mu_{\text{in pillar-free}}$). The relative mobility (μ) of DNA, $\mu_{\text{in pillars}} / \mu_{\text{in pillar-free}}$, is shown in Fig. 5. The smaller gap is, the relative mobility is higher. When the gap between pillars is 100 nm, the mobility in square allocation is extremely higher than that in tilt allocation.

We expected that the high speed DNA separation was obtained employing nano-pillar with 100-nm gap, because the electric field in pillars becomes strong when the gap between pillars is small. But we did not clearly observe the DNA size separation in both of square allocation and tilt allocation. Opposed to our expectation, it was considered that the excessive speed hindered nano-pillars from separating DNA by size. Therefore, we employed the nano-pillar with the gap of 300 nm. As shown in Fig. 6, the tilt allocation separated DNA fragments by their size, but the square allocation did not separate DNA fragments.

4. CONCLUSIONS

We considered that the nano-pillars separate DNA according to the sieving effect. Our result indicates that nano-pillars with tilt allocation show the good sieving effect, comparing with square allocation. Considering a distinctive behavior that is shown in nano-pillars in tilt allocation, one of the reasons why nano-pillars have sieving effect is that DNA repeats the cycles of hooking, extending and shrinking in nano-pillars. It is concluded that allocation of nano-pillars is an important factor for the fast DNA size separation.

Acknowledgements

This research was partially supported by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Grant-in-Aid for Young Scientists (B), 17750078, 2006.

References

[1] N. Kaji et al., *Anal.Chem.*, **76**(1) (2004), pp.15-22.

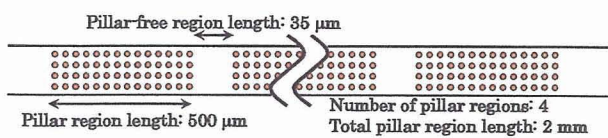


Fig. 1. Dimension of nano-pillar regions.

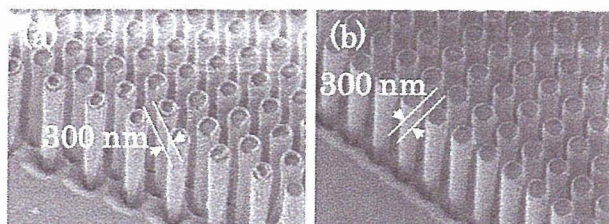


Fig. 2. Nano-pillars with tilted allocation (a) and nano-pillars with square allocation (b). The gaps between pillars are 300 nm.

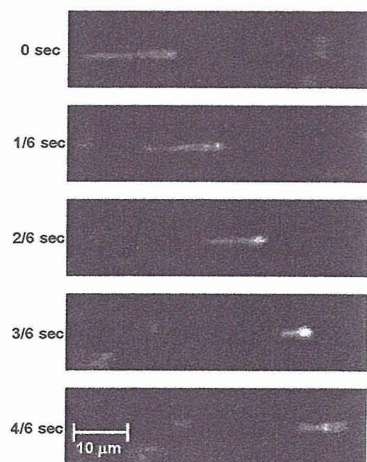


Fig. 3. Single molecule behavior of DNA (166 kbp) in nano-pillars with square allocation.

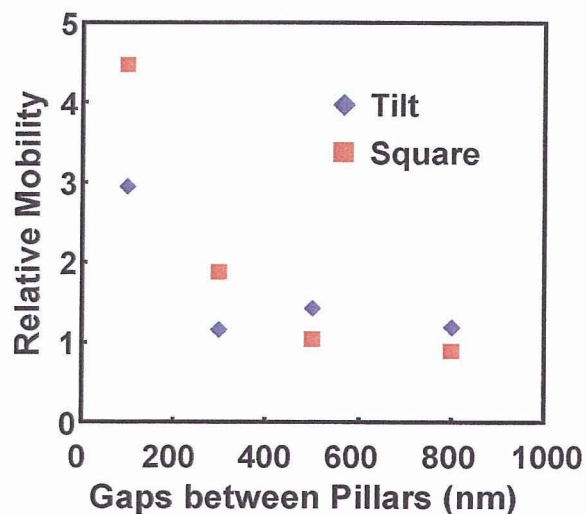


Fig. 5. Relative Mobility of DNA.

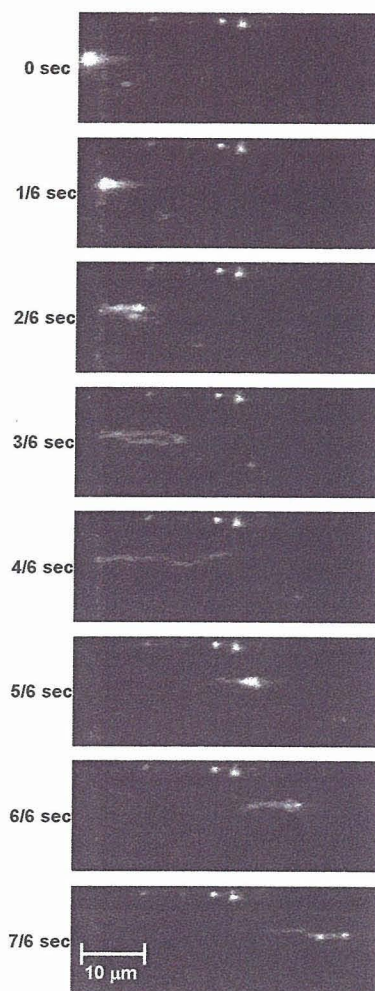


Fig. 4. Single molecule behavior of DNA (166 kbp) in nano-pillars with tilt allocation.

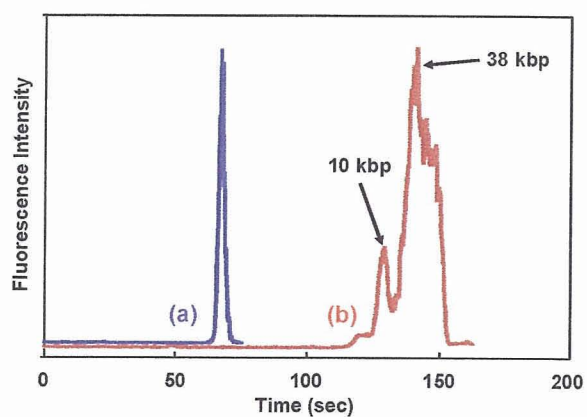


Fig. 6. Electropherograms in square (a) and tilt (b) nano-pillars for 10 kbp and 38 kbp. Intensity of fluorescence stained DNA fragments was observed after DNA fragments traveled 2-mm pillar regions.

C-7-3

Integrated DNA Purification and Detection Device for Diagnosis of Infection Diseases

Shingi Hashioka¹, Ryo Ogawa¹, Hiroki Ogawa², and Yasuhiro Horiike¹

¹National Institute for Materials Science, Nanotech-driven Materials Research for Information Technology

1-1, Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0047, Japan

Phone: +81-29-851-4652 E-mail: HASHIOKA.Shingi@nims.go.jp

²Adbic Incorporation

2-1-6 Sengen, Tsukuba, Ibaraki 305-0047, Japan

1. Introduction

This paper reports the development of a diagnosis chip of infection diseases originated from viruses. To realize quick and safety detection of a specific virus, extraction of nucleic acid is a key technology. Especially, DNA purification and trapping are important. These processes should be done in continuous micro channels in a chip. We reported a new DNA stretching method by using simple micro channel structure equipped with nano gap array and then detection of target DNA by hybridization of probe DNA [1]. In addition to the nano gap array device, we have attempted to contain DNA purification tool consisting of alumina (Al_2O_3) coated micro pillars and a hydrogel valve, whose functions is changed by pH of washing solutions.

2. Experiments and Results

Figure 1 shows a model of the DNA purification and detection chip to be developed, in which DNA is extracted from lysates of viruses in plasma separated from whole blood and washed. After washing, DNA is trapped and detected in nano gap array.

The purification device shown in Fig. 2 (a) was studied. Fig. 2 (b) shows Si micro pillars (60 μm height, 10 μm diameter, 10 μm pitch), which was fabricated by a Si deep etching. To purify DNA extracted from virus with solution such as Chaotropic salt, DNA has to be immobilized to the pillars for flow of a washing solution. To immobilize DNA with a negative charge to the pillars, coating of Al_2O_3 on the Si pillar surface was investigated. Al_2O_3 was coated by the atomic layer deposition (ALD). Deposition rate of the about 0.1 nm was obtained by one cycle which consists of exposure of H_2O_2 at 1×10^{-4} Torr and 1 sec. and after interval of 2 sec., exposure of $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$ at 1×10^{-4} Torr and 1 sec.

Figure 3 shows pH dependence of the zeta potential of Al_2O_3 surface where thickness was 40 nm by repeating 400 cycles. The zeta potential was measured using ELS-6000 (Ohtsuka electronics). The zeta potentials vary from positive values at acidic solution to negative values at alkaline solution via zero zeta potential around pH=6.

Next, a glass layer was anodic-bonded on the Si substrate containing Al_2O_3 -coated micro pillars. T4 DNA (166 kbps, length; about 50 μm) stained by YOYO-1 and was diluted by TBE buffer with various pH. These solutions were then introduced into the channel using centrifugal force. Figure 4 shows variations of the fluorescence images before and

after introduction of the solution. When DNA solution with pH=4.7 was introduced, much DNA was remained even after removal, whereas most of DNA with pH=10.1 was removed after rotation.

Figure 5 shows pH dependence of the fluorescent intensity for the experiment performed in Fig. 4. The great decrease in fluorescent intensity from acid to alkaline condition demonstrates satisfactory control of immobilization and extraction of DNA. Since the purification tool needs a valve, which controls the flow of the washing solution, we also have developed a pH sensitive hydro gel valve reported by D. J. Beebe et al [2] as shown in Fig. 2(c). The combination of the Al_2O_3 coated pillars and hydro gel valve will perform the purification procedure, which DNA immobilized at acid condition is washed by closing the valve and the purified DNA is transferred to the nano gap array as changing the pH from neutral to alkaline conditions.

Figure 6 shows microscopic images of a DNA detection device, nano gap array, which is an analysis stage for our final goal. The 816 triangle shaped channels in an area of $85 \times 240 \mu\text{m}^2$, in which depth, maximum and minimum widths were 140 nm, 5 μm and 50 nm, respectively, were fabricated on a quartz plate by an EB lithography and reactive ion etching processes. T4 DNA was introduced into the channel by electrophoresis using applied voltages of 50-100 V. Fig. 6(c) shows a fluorescence image of a number of DNA trapped with stretching in nano gap array. A length of these DNA fixed with stretching exceeds 20 μm in the channel. Subsequently, probe DNA was introduced from the reservoir into the nano gap array to hybridize the trapped DNA. A sequence of probe DNA is designed from parts of a sequence of Bacteriophage T4 gene. Fig. 6 (d) shows a fluorescent image, when probe DNA is introduced after trapping of T4 DNA. Intensive luminescence was seen in the channels.

3. Conclusions

The fundamental experiment for novel one-chip DNA purification technique by using the micro pillars and the hydro gel valve was performed. Additionally, Simple and quick purification and detection of target DNA by hybridization in nano gap channel array was demonstrated. Those chip systems will allow us to analyze DNA from the virus lysis quickly, easily and safety in the near future.

Acknowledgements

We would like to appreciate helpful advices of Dr. Yuji Miyahara in NIMS. This research was partially supported by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Grant-in-Aid for Young Scientists (B), 18710114, 2006.

References

[1] S. Hashioka, R. Ogawa, A. Oki, Y. Miyahara and Y. Horike, Proc. Micro Total Analysis Systems '05 (2005)730.
 [2] D. J. Bebee, J. S. Moore, J. M. Bauer, Q. Yu, R. H. Liu, C. Devadoss and B-H. Jo, Nature (2000) 588.

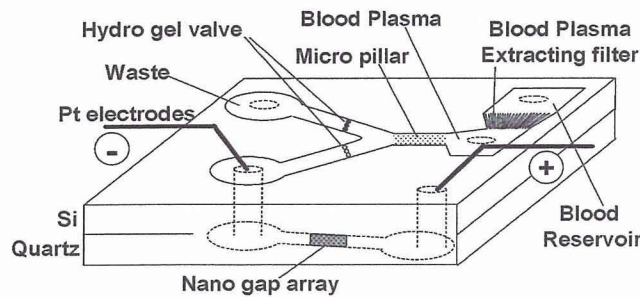


Fig. 1 A model of the DNA purification and detection device to be developed.

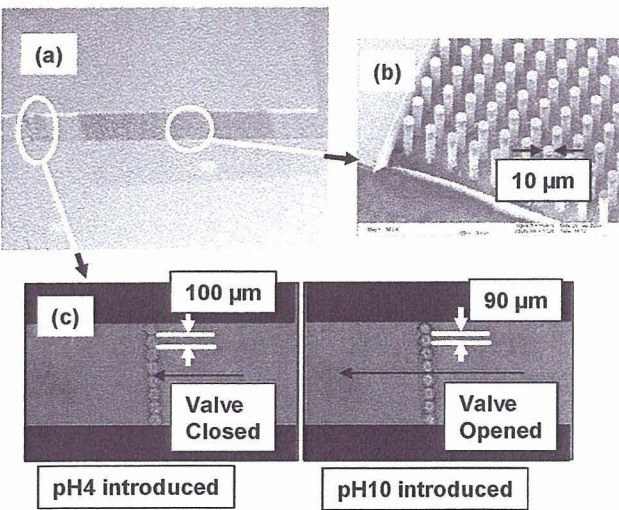


Fig. 2 Microscopic images of DNA purification device by using micro pillars and hydro gel valve.

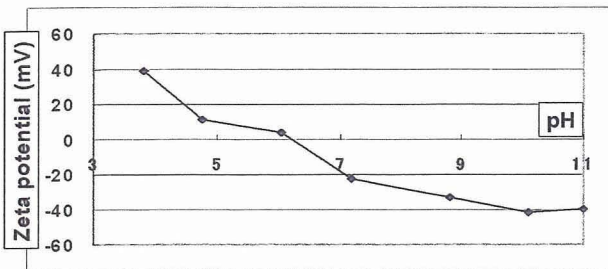


Fig. 3 pH dependence of the zeta potential of Al₂O₃.

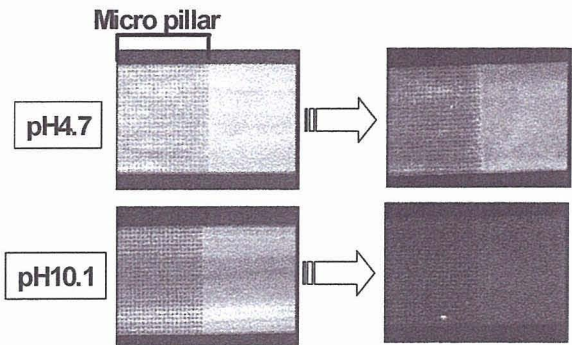


Fig. 4 Variation of the fluorescence images before and after introduction of DNA solution.

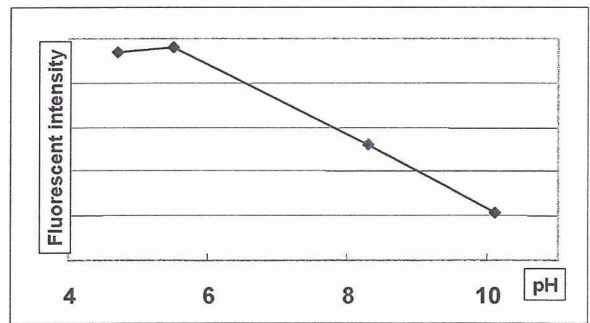


Fig. 5 pH dependence of the fluorescence intensity in micro pillars.

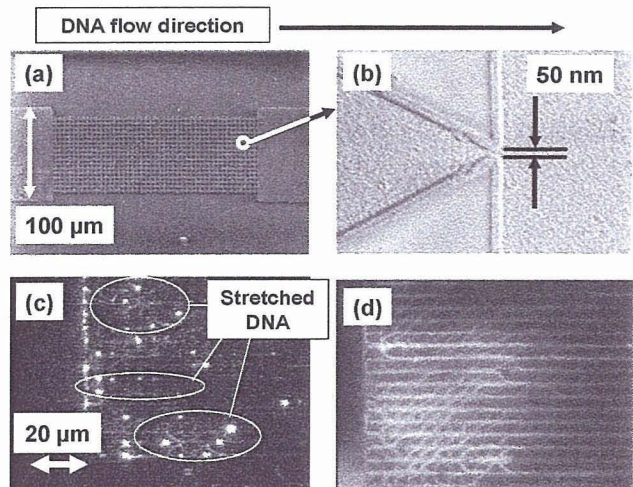


Fig. 6 Microscopic images of DNA detection device by using nano gap array.

Micro Total Analysis Systems 2006

Proceedings of μ TAS 2006 Conference

Volume 1

Tenth International Conference on Miniaturized
Systems for Chemistry and Life Sciences

November 5-9, 2006

Tokyo, Japan

Editors:

Takehiko Kitamori

Hiroyuki Fujita

Shinji Hasebe

μ TAS 2006



TOKYO

CALORIMETRIC MEASUREMENT CLINICAL CHIP FOR HOME MEDICAL DIAGNOSIS

Yasuhiro Horiike¹, Hiroko Koda¹, S.-H.Chang¹, Ryo Ogawa¹,
Shingi Hashioka¹, Masao Nagai² and Hiroki Ogawa²

¹National Institute for Materials Science, Japan

²Adbic Incorp., Japan

Abstract

A calorimetric measurement chip system was developed using the centrifugal force, which enabled us to separate of blood collected by a painless needle, meter and mix both plasma and reagents. The chip function was confirmed for observation of curing course of hyperlipemia.

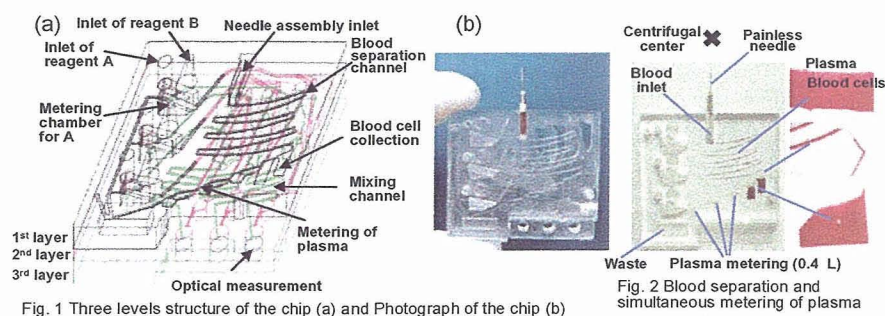
Key words; clinical chip, calorimetric measurement, centrifugal force, blood collection, toreharose

1. Introduction

A calorimetric measurement chip system has been developed to prevent life style related diseases at home [1]. The system aims at the following functions; (1) electronic collection of whole blood of 6 μ L using a painless needle, (2) a chip operation using only centrifugal force, (3) simultaneous separation and metering of the blood, (4) mixing of 50~100 of reagents : 1 of plasma and (5) development of freeze-dried reagents for long-term preservation.

2. Chip Operation

The chip structure consisting of three layers and the actual chip are shown in Fig. 1(a) and (b). As shown in Fig. 2, rapid acceleration until reaching to a stationary rotation at a 1st layer separates plasma upward and blood cells downward in a zigzag



channel. Then, blood cells are first captured at a final channel, and plasma passes over blood cells, thus falling into three metering chambers with a volume of 0.4 μL . Figure 3 (a-d) shows a series of photographs which demonstrate these metering, transport and mixing processes of plasma and reagents A (18 μL) and B (6 μL), where colored inks were used for the observation. The reagent A introduced to the 1st inlet in (a) is metered by the centrifugal force together with plasma in (b). After rotating the chip at 90 degrees, centrifugal force transports both reagent A and plasma to the 2nd layer and shaking serves mixing/ reaction of them at five min. At the same time, the reagent B introduced to the 2nd inlet is transported to the 3rd layer by passing through the 2nd layer and is metered by centrifugal force. Finally, the reagent A and plasma mixture in the 2nd layer and the reagent B in the 3rd layer are mixed employing a zigzag channel (see Fig. 4), whose inner wall has protuberances, causing turbulence. Figure 5 (a-d) shows a series of the mixing progress of two solutions with and without fluorescent dye. A special feature of the zigzag channel is that an outside flow in an upper channel undergoes turbulence in presence of protuberances and in turn an inside flow in a lower channel undergoes turbulence. Repeating of the process accomplished the well mixing.

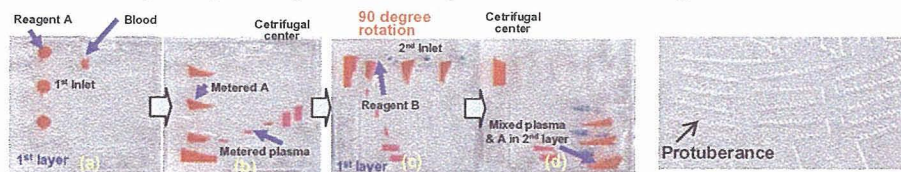


Fig. 3 Metering and mixing processes of reagent A/plasma and reagent B.

Fig. 4 Mixing zigzag channel.

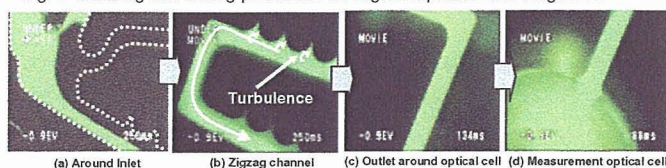


Fig. 5 Mixing process at zigzag channel. At (b), outside flow in an upper channel undergoes turbulence and inside flow in an lower channel undergoes turbulence.

3. Measurement

For practical use of the chip, long-term preservation of reagents was also studied. After A and B reagents A and B for triglyceride (Wako Junyaku) were added to toreharose at 10 weight % and were freeze-dried. As shown in Fig. 6, any decay was not observed even after one month.

Since a researcher in our laboratory suffered from abnormal high triglyceride level, course of the values were measured by taking a tablet of Mevalotin of a lipid-lowering agent (Sankyo Pharmacy) for about 4 months as shown in Fig. 7 employing the present chip, which was

introduced by blood collected using both visualization of blood vessel with NIR and detection of vessel position due to potential measurement between an arm surface and vessel

(see Fig. 8)[2] and freeze-dried triglyceride reagents+10% trehalose (see Fig. 9) recovered by purified water. We confirmed gradual decrease of the value.

4. Conclusions

This chip allows us to test representative items of triglyceride, total-cholesterol and HDL. The capability is expected to prevent life style related diseases.

References

- [1] A. Oki, et. Al., Jpn. Appl. Phys., 42 (2003), pp.3722-3727.
 [2] H. Ogawa, et. al., M. A. Northrup, et. al. (Eds.) *Micro TAS 2003*, (2003) pp. 741-744.

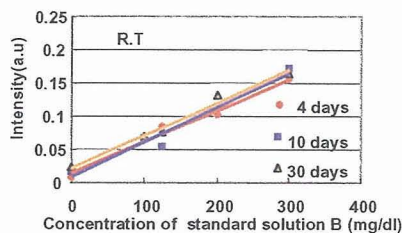


Fig. 6 Day-dependent decay characteristics of Triglyceride reagent B + 10% Trehalose

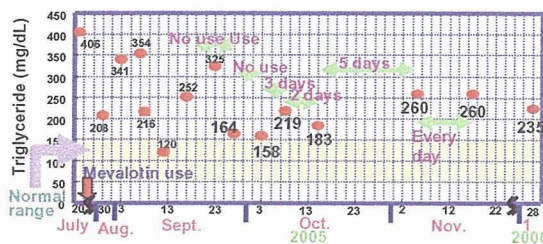


Fig. 7 Day-dependent triglyceride level by use of "Mevalotin", which is a lipid-lowering agent made by Sankyo Pharmacy

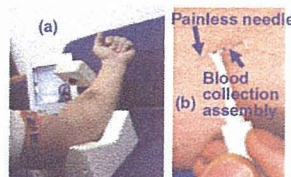


Fig. 8 (a) Monitoring of position of blood vessel by NIR irradiation, (b) Blood collection using needle

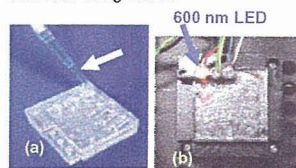
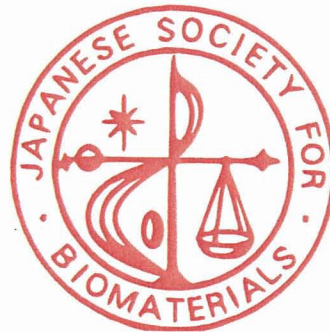


Fig. 9 (a) Introduction of freeze-dried reagent recovered to solution, (b) Actual measurement

第28回

日本バイオマテリアル学会大会

予稿集



JSB

■ 2006年11月27日～28日

■ アルカディア市ヶ谷（私学会館）

第28回大会長 岡野光夫

ナノ構造体を用いた DNA サイズ分離機序の解明

○ 小川涼¹、加地範匡²、若尾創²、橋岡真義¹、
馬場嘉信^{2,3}、堀池靖浩¹

¹ (独) 物質・材料研究機構、² 名古屋大学、³ (独) 産業総合技術研究所

1. 緒言

2003年にヒトゲノムの完全解読後、個々人の症状に合わせたテーラメード医療・ゲノム創薬の実現が期待されている。その実現には DNA 塩基配列の読み取りが $10^8 \sim 10^9$ オーダーで高速化される必要があり、そのためには、DNA をサイズにより高速・高性能に分離する技術の開発が強く求められている。本研究では、DNA サイズ分離の高速化、高性能化を目指し、ナノスケールの石英製の柱 (ナノピラー) をマイクロチャンネル中に作製し、それを利用し高精度・高速 DNA サイズ分離を実現するとともに、矩形に配列したナノピラーによる DNA サイズ分離機序を明らかにした。

2. 実験

石英基板上に電子線レジストを塗布し、電子ビーム描画装置を用い、直径 500 nm の孔を空け、その中に Ni を通電メッキした。この Ni をマスクとして、プラズマエッチングを行うことで、直径 500 nm、高さ 4 μm のナノピラーを作成した。ナノピラー配列は図 1 のような矩形配列とし、ナノピラー間隔は 100 nm および 300 nm とした。この矩形配列ナノピラーを配したマイクロチャンネル中にて、蛍光色素により染色した DNA 断片 (1 kbp、10 kbp、38 kbp) を電気泳動し、ナノピラーによる DNA サイズ分離効果を検討した。ナノピラー領域の全長は 2 mm であり、ナノピラー領域が終了した場所を観測地点とし、蛍光顕微鏡にて蛍光輝度の経時変化を測定した。

3. 結果と考察

DNA 電気泳動の結果、ナノピラー間隔 100 nm の場合、1 kbp の断片と 10 kbp 以上の断片に分離され、ナノピラー間隔 300 nm の場合には、10 kbp 以下の断片と 38 kbp の断片に分離されることが明らかとなった (図 2)。DNA の慣性半径を $\sqrt{bL}/\sqrt{6}$ (b: Kuhn's Length, L: contour length) より求めた場合、1 kbp、10 kbp、38 kbp の断片の慣性半径は、それぞれ、78 nm、245 nm、478 nm となる。図 2 の分離結果とこの慣性半径を比較すると、ピラー間隔より小さい慣性半径の DNA 断片とピラー間隔よりも大きい慣性半径の DNA 断片をサイズに基づき分離していることが明らかとなった。矩形配列のナノピラーは分子篩い効果を発揮し、ピラー領域内において、ピラー間隔よりも小さい慣性半径を持つ DNA の電気泳動速度が、ピラー半径よりも大きな慣性半径を持つ DNA の電気泳動速度よりも大きくなり、DNA がサイズにより分離されると考えられる。様々なピラー間隔の矩形配列ナノピラーをマイクロチャンネルに配置することで、サイズに基づき DNA を高速かつ精密に分離できるデバイスを実現できることが期待される。

謝辞

本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金：若手研究(B)(6822, 17750078, 2005)により行われた。

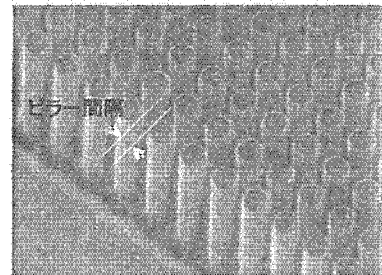


図 1 石英ナノピラー。上図写真は、直径 500nm、高さ 4μm、ピラー間隔 300nm。

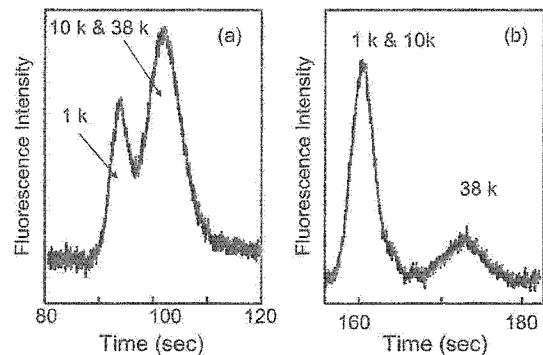


図 2 電気泳動図。ピラー間隔 100 nm (a) およびピラー間隔 300 nm (b) の矩形配列ナノピラーによる DNA サイズ分離結果。

Mechanism of DNA Size Separation employing Nano-Structures

Ryo OGAWA¹, Noritada KAJI², Sou WAKAO², Shingi HASHIOKA¹,

Yoshinobu BABA^{2,3}, and Yasuhiro HORIIKE¹

¹National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Ibaraki, 305-0044, Japan

² Department of Applied Chemistry, Nagoya University, Japan

³Health Technology Research Center, AIST, Japan

TEL:+81-29-851-3354 (ext.8335), FAX:+81-29-860-4652, E-mail: OGAWA.Ryo@nims.go.jp

DNA ワンチップ診断のための前処理デバイスの作製

○ 橋岡真義、小川涼、堀池靖浩

物質・材料研究機構 情報通信材料研究領域

1. 緒言

血漿中のウイルスから DNA を抽出し、ナノギャップアレイ¹⁾を用いた感染症診断をワンチップで行なうため、マイクロピラーによる DNA の固定・溶離およびゲルバルブ開閉の pH 応答性を利用した DNA 前処理デバイスを作製し、その機能を検討した。我々はすでに、ナノギャップアレイを用いた DNA の伸長固定に成功し、ナノギャップアレイ中でのプローブ DNA を用いたハイブリ検出も確認した。全血からウイルス DNA 検出までをワンチップで行うためには、これに加えて、ナノギャップアレイ上流において DNA を清浄化する前処理デバイスが必要である。今回、前処理チップ作製および DNA を用いた固定・脱離試験結果について報告する。

2. 実験

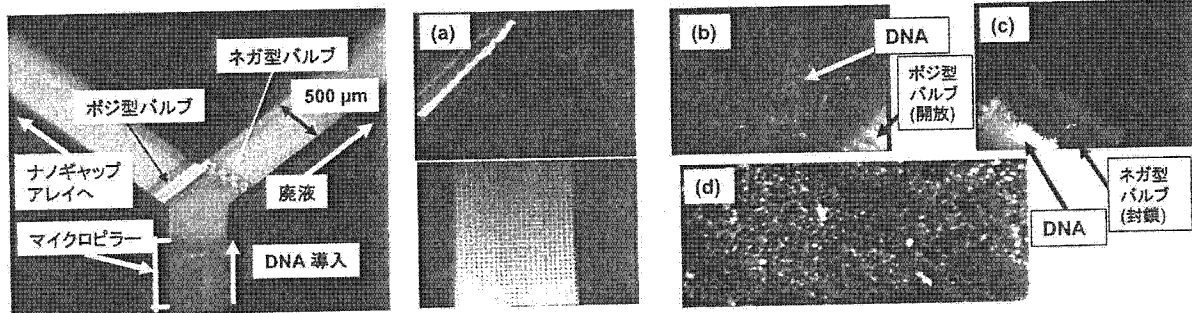


図1. DNA 前処理デバイス 図2.(a)マイクロピラー上に固定された DNA (b)開放したバルブから出る DNA (c)バルブに封鎖された DNA (d)デバイスから抽出された DNA

Bosch エッチング法により、Si 基板中にマイクロ流路を作製した。図1は、作製したマイクロ流路の顕微鏡像を示している。アルミナコートしたマイクロピラーおよび pH 応答性ハイドロゲルバルブ²⁾が流路内に形成されている。アルミナは酸性で正の、アルカリ性で負のゼータ電位を示すため、負の電荷を有する DNA の着脱が pH の変化によって可能である。一方、ハイドロゲルには酸性で膨張・アルカリ性で収縮するタイプ(ポジ型)と酸性で収縮・アルカリ性で膨張するタイプ(ネガ型)がある。これらの機能を利用して、マイクロ流路内で DNA の洗浄を行う。洗浄中(酸性)は DNA がピラー上に固定され、かつポジ型バルブは閉じて診断ユニットであるナノギャップアレイに洗浄の廃液が流れ込まないようにし、ネガ型バルブは開いて廃液を排出する。洗浄後、溶離液(アルカリ性)を導入すると、DNA はピラーから脱離し、ポジ型バルブは開いて DNA をナノギャップアレイに送り、ネガ型バルブは閉じる。このチップに pH を 4 程度に調製した TBE バッファー液と共に T4 DNA を、回転させて導入し、さらに 0.02M NaOH 溶液を導入して、DNA の固定・脱離の蛍光観察を行った。

3. 結果及び考察

図 2(a)は、DNA 導入後のマイクロピラー付近およびゲルバルブ付近の蛍光顕微鏡像を示している。図から、DNA がマイクロピラー上に固定されていることが確認され、この際、ポジ型バルブが閉鎖し、ネガ型バルブが開放状態であることが確認されている。NaOH 溶液を導入すると、ピラーに固定されていた DNA は脱離し、図 2(b)-(c)に示すように、バルブ付近に流入し、ポジ型バルブは開放して DNA を通し、ポジ型バルブは閉鎖して DNA を閉じ込めている。図 2(d)はこれらの工程を介して抽出された DNA であり、これをナノギャップアレイに導入することにより、連続的に診断を行うことが期待できる。

謝辞

本研究は、文部省科研費若手研究(B) 18710114 の助成によって行われました。本研究に関して貴重なアドバイスをいただいた宮原裕二氏(NIMS)に感謝します。

1) S. Hashioka et al., Proc. of μ TAS 2005 (2005)730. 2) D. J. Beebe et. al, Nature 404 (2000) 588.

Fabrication of pre-treatment device for one chip DNA diagnosis

Shingi Hashioka, Ryo Ogawa, and Yasuhiro Horiike

National Inst. for Materials Science, Nanotech-driven Materials Research for Information Technology, 1-1, Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0047, Japan

Phone & FAX: +81-29-851-4652 E-mail: HASHIOKA.Shingi@nims.go.jp

Proceedings of UT Symposium on NanoBio Integration

NANOBIO-TOKYO 2006

December 4-7, 2006 TOKYO, JAPAN

Venue: Hongo Campus, The University of Tokyo



Extended Abstracts

Organized by
Center for NanoBio Integration
The University of Tokyo

and
Promotion of Novel Interdisciplinary Fields based on
Nanotechnology and Materials (MEXT)

