

the cooling rate in the resistance spot welding is very large, which is almost similar to laser welding. Increasing cooling rate would reduce δ -ferrite content [17, 18]. It should be noted that the formation of ferrite was suppressed due to large cooling rate on resistance spot welding. Austenitic stainless steels are better adapted to medical implants because it will hardly affect a magnetic resonance image scanning (MRI). Therefore, the resistance spot welding is suitable for welding of stainless steels that are developed for medical implants.

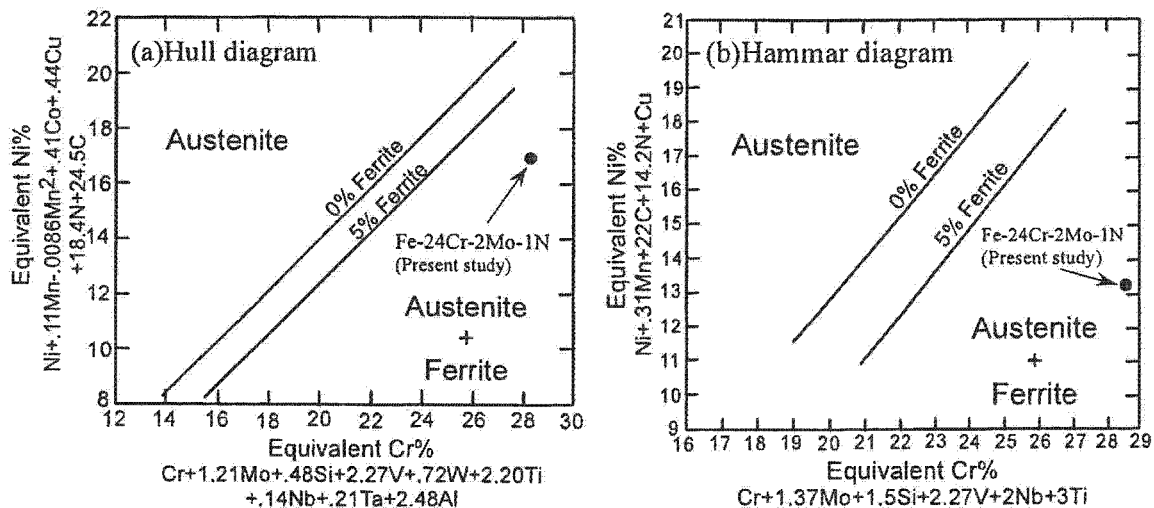


Fig.7 Plots of the nickel free stainless steel used in this study; (a) Hull's diagram and (b) Hammar's diagram [15, 16].

Summary

The resistance weldability of 200 μm -thick sheet nickel free stainless steel in micro-resistance spot welding was studied. Major findings from this study can be summarized as follows:

1. Welding current and weld time affect joint strength and nugget diameter. Shear force corresponded to nugget size except for welds with surface flash and electrode sticking. A weld lobe was proposed.
2. The microstructure of nugget represented austenitic cellular dendrite or cellular structure with a little δ -ferrite. The δ -ferrite content is smaller than that predicted by some Schaeffler diagrams because of rapid solidification on resistance spot welding.

Acknowledgements

This research was partially supported by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Grant-in-Aid for Scientific Research (C).

References

- [1] Y. Okazaki, Y. Ito, K. Kyo and T. Tateishi: Mater. Sci. Eng. A, Vol.213 (1996), p.138.
- [2] Y. Okazaki, S. Rao, T. Tateishi and Y. Ito: Mater. Sci. Eng. A, Vol.A243 (1998), p.250.
- [3] M. Niinomi: Sci. Technol. Adv. Mater., Vol.4 (2003), p.445.

-
- [4] M. Niinomi, T. Hattori, K. Morikawa, S. Niwa, T. Kasuga, A. Suzuki and H. Fukui: *Mater. Trans.*, Vol.43 (2002), p.2970.
- [5] D. Kuroda, T. Hanawa, T. Hibar, S. Kuroda and M. Kobayashi: *Mater. Trans.*, Vol.45 (2004), p.112.
- [6] D. Kuroda, S. Takemoto, T. Hanawa and K. Asami: *Mater. Trans.*, Vol.44 (2003), p.2664.
- [7] D. Kuroda, S. Hiromoto, T. Hanawa and Y. Katada: *Mater. Trans.*, Vol.43 (2002), p.3100.
- [8] K. Nishimoto: *J. Jpn. Weld. Soc.*, Vol.66 (1997), p.24 (Japanese).
- [9] Y. Arata and F. Matsuda: *J. High Temper. Soc.* Vol.1 (1975), p.160 (Japanese).
- [10] K. Uenishi, M. Seki, M. Takatsugu, T. Kunimasa, K.F. Kobayashi, T Ikeda and A. Tsuboi: *Mater. Trans.* Vol.43 (2002), p.3083.
- [11] K. J. Ely and Y. Zhou: *Sci. Technol. Weld. Join.*, Vol6 (2001), p.63.
- [12] J.E. Gould, *Weld. J. Welding Research Supplement*, Vol.66 (1987), p.1s.
- [13] D. W. Dickinson, J.E. Franklin and A. Stanya: *Weld. J. Welding Research Supplement*, Vol.59 (1980), p.170s.
- [14] D. Browne, C. Newton, D. Boomer: *Advanced Technologies & Processes, IBEC'95*, (1995), p.100.
- [15] F.C. Hull: *Weld. J. Welding Research Supplement*, Vol.52 (1973), p.193s.
- [16] Ö. Hammar and U. Svensson: *Solidification and Casting of Metals*, The Metals Society, London, (1979), pp.401.
- [17] S.A. David, J. M. Vitek and T.L. Hebble: *Weld. J. Welding Research Supplement*, Vol.66 (1987), p.289s.
- [18] K. Nishimoto, H. Mori and Y. Nakao: *ISIJ Int.*, Vol.35 (1995), p.1265.

Ni フリーステンレス鋼

(「金属」Vol.77 (2007), No.2 別刷)

鈴鹿工業高等専門学校

黒田 大介

Ni フリーステンレス鋼

黒田 大介

はじめに

ニッケル(Ni)フリーステンレス鋼とは高濃度窒素オーステナイト(γ)型ステンレス鋼の1つであり、ステンレス鋼の耐食性向上に必要なNiを排除し、かわりに窒素(N)で耐食性および力学的特性を改善した合金鋼である。種々の高濃度窒素ステンレス鋼はもともと低温、腐食などの過酷な環境下で使用される構造用材料として研究・開発されてきた鋼種であり、比較的高濃度のNiならびに少量のNを含んでいる。しかし、ある濃度以上のNを固溶させることによりNiを添加しなくても γ 相が安定化され、強度および耐食性が飛躍的に向上する。一般に、金属材料の強度を増加させると延性および靱性は低下するが、Nを添加したステンレス鋼では延性および靱性を損なうことなく強度を増加させることができる。すなわち、金属アレルギー性および発癌性^{1)~7)}が問題視されているNiのかわりに無害なNをステンレス鋼に固溶させることにより、優れた特性を有する新しい生体用金属材料として使用することができる。ちなみに、ステンレス鋼だけでなくNiを含まない生体用Co-Cr-Mo合金⁸⁾、生体用形状記憶合金^{9)~11)}も新しく開発されており、力学的信頼性だけでなく生物学的安全性、省資源化の観点からもNiフリー化に関する研究が精力的に進められている。

本稿では、ステンレス鋼へのNの添加方法、生体用として開発されたNiフリーステンレス鋼の特性

と問題点について、筆者の研究成果の一部も交えて紹介する。

ステンレス鋼へのNの添加方法

NはNi、炭素(C)、コバルト(Co)、銅(Cu)、マンガン(Mn)と同様に γ 形成元素である¹²⁾。ステンレス鋼に含まれるクロム(Cr)量に応じてNを適量固溶させることにより、高温相である γ 相を室温でも残留させることができる。また、Nは侵入型の固溶強化元素であり、 γ 型ステンレス鋼に対する実用的な固溶強化元素の中で最も大きな強化作用をもつ¹³⁾。これまでに、Nを固溶させたステンレス鋼の強度および耐食性が多くの研究者らによって報告されている^{14)~21)}。

ステンレス鋼にNを添加する方法として、加圧ESR(Electro Slag Remelting)溶解法²¹⁾、加圧誘導溶解法²²⁾、固相窒素吸収法²³⁾²⁴⁾、メカニカルアロイング法²⁵⁾などがある。これらの方法を用いることにより、通常の大気圧溶解法では得ることのできない高濃度のNを含むステンレス鋼を製造することができる。加圧ESR溶解法、加圧誘導溶解法およびメカニカルアロイング法では、あらかじめ窒化物(FeCrN, Cr₂N)の形で原料に高濃度の窒素源を含有させておき、それらを溶解あるいは固化成形して過飽和のNをステンレス鋼に添加する。N₂ガス圧下(~4MPa)での加圧溶解法により最大1.5mass%(以下、%)のNを含むNiフリーステンレス鋼²²⁾²⁶⁾が試作されている。加圧ESR溶解法

では、凝固時における窒素ブローの発生、鋳塊のSi, C, Mn量の増加に起因する靱性および耐食性の低下がしばしば問題となっている。これらの問題を解決するために開発されたのが加圧誘導溶解法である。また、メカニカルアロイング法では、1%のNを含むNiフリーステンレス鋼²⁵⁾²⁷⁾ および5.8%ものNを含む高濃度窒素高硬度ステンレス鋼²⁸⁾が製造されている。

一方、固相窒素吸収法は、鋼が γ 相に変態する高温域で N_2 ガスと材料を接触させ、材料の表面からN原子を固相中に拡散固溶させる方法である。高濃度のCrを含むフェライト(α)型ステンレス鋼を窒素吸収素材(出発材)とすることで、溶製法のような特殊な設備を使用しなくても安定な γ 相を有するNiフリーステンレス鋼を製造することができる。固相窒素吸収処理装置の概略図を図1に示す。N吸収前の α 型ステンレス鋼の状態に製品形状に加工し、その後にNを製品全体に拡散固溶させることにより簡便かつ低コストでNiフリーステンレス鋼製品を製造することができる。ただし、処理温度を低くした場合にはNの固溶限が小さくなり、耐食性および力学的特性の低下要因となる窒化物が析出するため、固相窒素吸収処理は1423K以上の温度で行う必要がある。また、 N_2 ガス圧を高くすることで固溶限よりも高濃度のNを吸収させることもできるが、この場合にも窒化物が析出するため α 型ステンレス鋼の合金組成と処理圧力に注意が必要である。図2にFe-Cr-N系合金の1473Kにおける垂直断面状態図²⁹⁾を示す。また、図中の破線は0.1MPaでの固相窒素吸収法により材料中に吸収される平衡窒素濃度である²⁴⁾。平衡窒

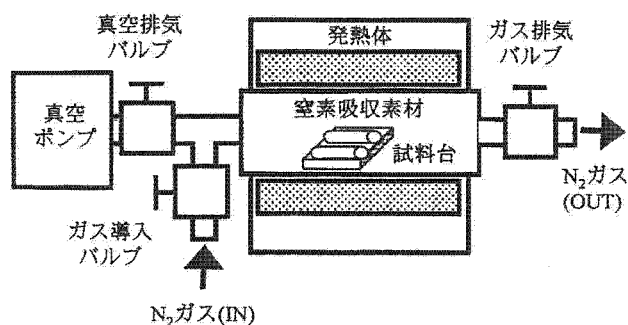


図1 固相窒素吸収処理装置の概略図

素濃度はCr量の増加とともに増加するが、Cr量が20%以下の合金では冷却中にマルテンサイト(α')への相変態が生じ、目的とする γ 相を残留させることができない²⁴⁾。したがって、固相窒素吸収法により γ 単相組織のNiフリーステンレス鋼を製造するためには、Cr量が20%以上の α 型ステンレス鋼を出発材とし、さらに平衡窒素濃度が1%程度になるように処理条件を選定する必要がある。また、生成した γ 相を室温まで残留させるために、処理後は材料を速やかに水冷する必要がある。なお、固相窒素吸収法は材料中にNを拡散固溶させる方法であり、表面硬化を目的として相変態点以下の低温で材料表面に窒化物を析出させる窒化処理とは全く異なる技術である。

上記いずれの方法でもNiフリーステンレス鋼を製造することが可能である。しかし、後述するように、溶製法により製造した鋳塊からの小型製品の製造が困難であること、固相窒素吸収法で製品全体にNを拡散固溶させるためには長時間の処理が必要であることなど、Niフリーステンレス鋼製品の製造には種々の問題がある。したがって、目的とする製品の形状、サイズ、特性などに応じて適切な製造法を選択する必要がある。近年、カテーテルによる血管拡張、小型のクリップ術具を用いた動脈瘤の閉塞などに代表される低侵襲治療技術の発展にともない医療用デバイスの小型化が望まれており、固相窒素吸収法を利用したNiフリーステンレス鋼製の医療用デバイスの製造が注目されている。

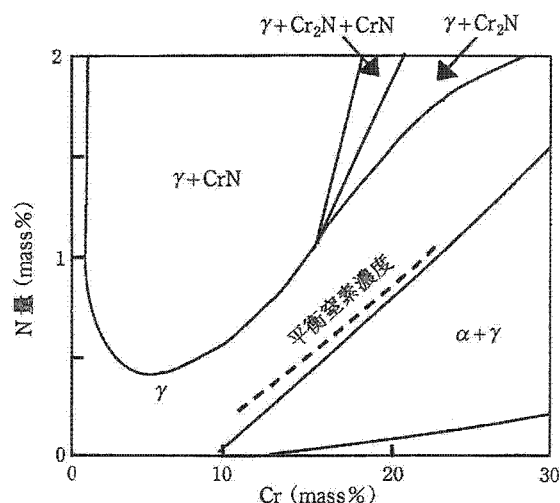


図2 Fe-Cr-N系合金の1473Kにおける垂直断面状態図

また、既存の金属系生体材料である316L鋼にNを固溶させ、さらなる特性改善を試みる研究も行われており、Niフリーステンレス鋼だけでなく既存のγ型ステンレス鋼の耐食性改善にも固相窒素吸収法が有効であることが明らかになっている³⁰⁾³¹⁾。

生体用Niフリーステンレス鋼の特性と問題点

生体用として開発されたNiフリーステンレス鋼の合金組成とその特性を表1に示す。大きく分類してFe-Cr-N系合金、Fe-Cr-Mo-N系合金、Fe-Cr-Mn-Mo-N系合金がある。溶解法により製造されるNiフリーステンレス鋼については、Nの添加量が少なくてもγ相を安定化できるようにγ形成元素であるMnが多く添加されている。しかし、MnについてもNiと同様に金属アレルギー性が問題視されているため、Mnを排除した合金設計が望ましい。

溶解法で製造したNiフリーステンレス鋼

Fe-(19-23)Cr-(21-24)Mn-(0.5-1.5)Mo-(0.85-1.10)N³²⁾ および Fe-18Cr-18Mn-2Mo-0.9N³³⁾ は、それぞれアメリカのCarpenter社およびドイツのVSG Energie-und Schmiedetechnik社によって生体用として開発された合金であり、Fe-(19-23)Cr-(21-24)Mn-(0.5-1.5)Mo-(0.85-1.10)NについてはBioDure[®]108という商品名で既に販売されている。また、スイスおよび我が国において、Fe-(15-18)Cr-

(10-12)Mn-(3-6)Mo-0.9N³⁴⁾、Fe-23Cr-2Mo-1.4N³⁵⁾ および Fe-21Cr-8Mn-4Mo-1.2N²²⁾ が開発されている。いずれの合金においても、1000MPa程度の強度と40%以上の破断伸びが得られている。冷間加工した一部の合金については2000MPa以上の高い強度が得られているが、加工によりα'への応力誘起変態が生じるため、延性および耐食性は著しく低下し、さらに磁性を帯びようになる。磁気共鳴画像(MRI)などの高度診断技術の普及にともない、強磁場環境下においても磁化しない医療用デバイスが求められており、Niフリーステンレス鋼についてもα'への応力誘起変態を抑制する必要がある。近年開発されたFe-21Cr-8Mn-4Mo-1.2Nでは70%もの強加工を施しても安定なγ相が維持され、さらに2500MPa以上の強度が得られることが明らかになっている²²⁾。延性および靱性のバランスに注意すれば、高強度および高硬度を有する生体用Niフリーステンレス鋼としての展開が期待できる。Fe-18Cr-18Mn-2Mo-0.9Nについても非磁性であることが確認されており、これら合金では動脈瘤を閉塞するためのクリップ術具への適用が試みられている。また、Nはステンレス鋼の加工硬化能を向上させる効果があり、製品加工の際に材料の硬さを著しく増加させるため、成形加工の際には非常に多くの焼きなまし作業が必要になる。この問題が、Niフリーステンレス鋼製品の生産性を低下させる1つの要因である。

疑似生体環境中(0.9%NaCl, 310K)で分極試験

表1 種々の方法で製造した生体用Niフリーステンレス鋼の特性

	合金組成 (mass%)	引張強さ (MPa)	破断伸び (%)	孔食発生*2	備考
ESR溶解法	Fe-(19-23)Cr-(21-24)Mn-(0.5-1.5)Mo-(0.85-1.10)N (BioDure [®] 108)	931~2206	49~3	無	冷間加工材 加工率~80%
加圧ESR溶解法	Fe-18Cr-18Mn-2Mo-0.9N	500~2100*1	—	無	冷間加工材 加工率~50%
	Fe-(15-18)Cr-(10-12)Mn-(3-6)Mo-0.9N	981~1110	53~70	無	
	Fe-23Cr-2Mo-1.4N	~1260	~55	無	
加圧誘導溶解法	Fe-21Cr-8Mn-4Mo-1.2N	~1145	~57	無	冷間加工率70%で 引張強さ2500MPa
窒素雰囲気焼結法	Fe-23Cr-1N (焼結体)	~774	~8	—	
固相窒素吸収法	Fe-24Cr-2Mo-1N (線材φ1mm)	~1167	~65	無	
	Fe-24Cr-1N (棒材φ9mm)	~1032	~46	無	

*1: Fe-18Cr-18Mn-2Mo-0.9Nの引張強さの値は、0.2%耐力値で表記。*2: 種々の濃度のNaCl溶液中での評価

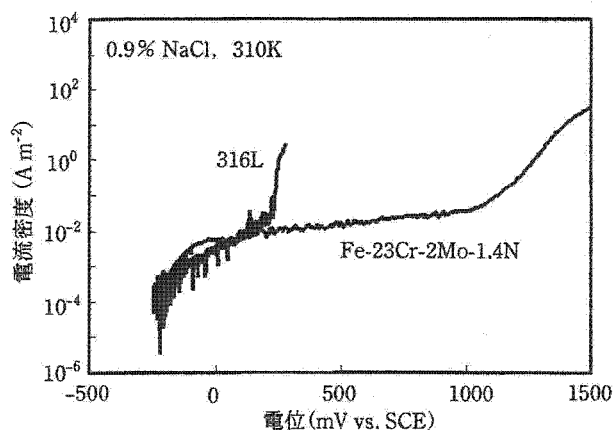


図3 疑似生体環境中で分極試験した316L鋼およびFe-23Cr-2Mo-1.4Nの分極曲線

した Fe-23Cr-2Mo-1.4N の分極曲線³⁶⁾を 図 3 に示す。比較材である 316L 鋼では、およそ 250mV vs. SCE の電位付近で孔食発生による電流密度の急激な増加が認められたが、Fe-23Cr-2Mo-1.4N では 1000mV vs. SCE 以上の電位においても孔食の発生は認められなかった。本合金においては、細胞培養液などを用いた分極試験においても優れた耐孔食性が確認されている³⁶⁾。また、303K に調整した 3.5% NaCl 溶液中で分極試験した Fe-21Cr-8Mn-4Mo-1.2N においても、900mV vs. SCE 以下の電位では孔食は発生しないことが確認されている²²⁾。他の合金についても、優れた耐食性が確認されている。高濃度窒素ステンレス鋼では、表面酸化皮膜と下地金属(母材)との界面近傍に N が濃化することが明らかになっており¹⁹⁾³⁷⁾、生成されたアンモニウムイオンによる pH 低下の抑制¹⁹⁾、硝酸イオンによる母材溶解の抑制³⁸⁾などが耐食性改善機構として報告されている。

一方、固相窒素吸収法により製造される Ni フリーステンレス鋼では、Mn などの他の γ 形成元素を含まないシンプルな合金組成となっている。これは、N の固溶限の大きな γ 相に多くの N を直接吸収させることができるためである。ただし、 γ 相の安定性を高くするために、いずれの合金においても Cr 量は 20% 以上となっている。Mo と N を複合添加することにより耐食性が改善されるため¹⁸⁾³⁹⁾、Mo を添加した Fe-Cr-Mo-N 系合金も開発されている。表 1 に示すように、焼結体、棒材および線材のい

れにおいても 1% 程度の N が吸収されており、金属系生体材料として必要な強度および延性が得られている。窒素吸収焼結法により製造された Fe-23Cr-1N の強度と延性のバランスは固相窒素吸収法により製造された他の合金よりもやや低くなっているが、真空焼結後に固相窒素吸収した Fe-24Cr-2Mo の焼結体において 1055MPa の引張強さと 29% の破断伸びが得られている⁴⁰⁾。延性は低くなるものの、焼結体においても固相窒素吸収法は力学的特性改善に有効である。

固相窒素吸収法で製造した Ni フリーステンレス鋼

前述したように、固相窒素吸収法では材料表面から内部に向けて N 原子が拡散固溶し、材料表面から $\alpha \rightarrow \gamma$ 相変態が生じる。0.1MPa の N_2 ガス雰囲気中で 1473K の固相窒素吸収処理を施した Fe-24Cr のミクロ組織と処理時間の関係を 図 4 に示す。N を含まない状態の Fe-24Cr は α 型ステンレス鋼であるため処理前のミクロ組織は α 単相であるが、処理時間の増加とともに γ 相の領域が材料内部に向けて拡大していることがわかる。また、0.1MPa の N_2 ガス雰囲気中で 1473K の固相窒素吸収処理を施した Fe-24Cr-2Mo の材料表面から内部に向けてのピッカース硬さ分布と処理時間の関係を 図 5 に示す。固相窒素吸収処理によりピッカース硬さの増加が認められ、処理時間の増加とともに γ 相領域が材料内部に向けて拡大していることがわかる。しかし、材料表面から内部に向けてピッカース硬さが減少していることから、固溶 N 量についても材料表面から内部に向けて傾斜的に減少していると考えられる。これは、固相窒素吸収処理が不十分な場合には、N 濃度の低い中心部において安定な γ 相が得られないことを示唆しており、医療用デバイスとして使用するためには長時間の処理により中心部まで完全に N を拡散固溶させなければならない。筆者らの研究では、1473K、0.1MPa の条件で Fe-24Cr-2Mo の線材、薄板材などを中心部まで完全に γ 単相組織にするためには、直径 (ϕ) 1mm の線材では 7.2ks、 ϕ 4mm の棒材では 129.6ks、厚さ (t) 0.25mm の薄板材では 2.7ks、外径

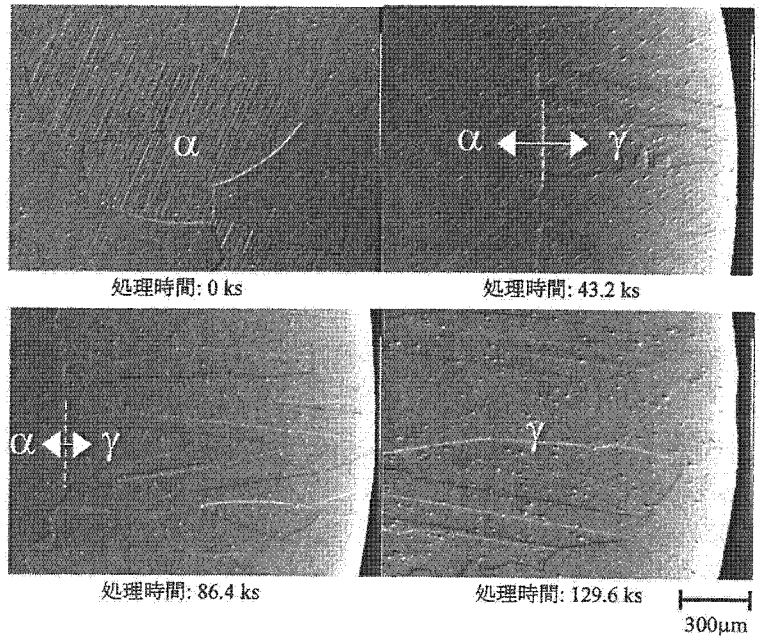


図4 0.1MPaのN₂ガス雰囲気中で1473Kの固相窒素吸収処理を施したFe-24Crのマイクロ組織と処理時間の関係

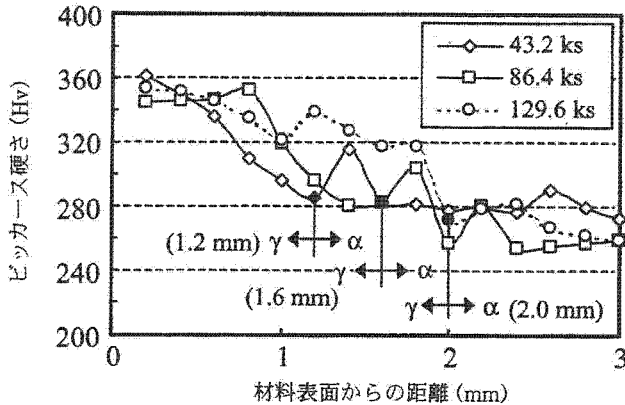


図5 0.1MPaのN₂ガス雰囲気中で1473Kの固相窒素吸収処理を施したFe-24Cr-2Moの材料表面から内部に向けてのピッカース硬さ分布と処理時間の関係

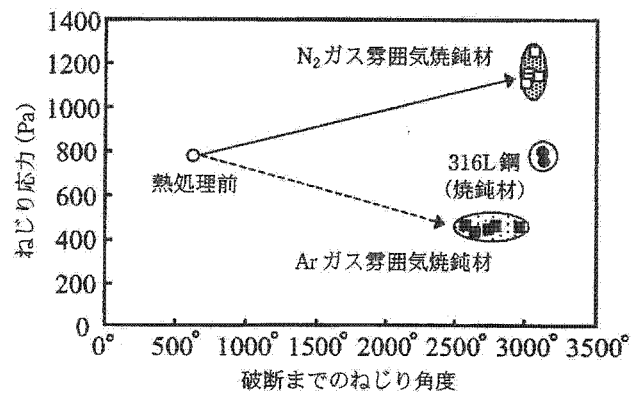


図6 0.1MPaのN₂ガス雰囲気中およびArガス雰囲気中で1473Kの熱処理を施したFe-24Cr-2Moの線材(φ1mm)および316L鋼焼鈍材(φ1mm)のねじり特性の比較

0.35mm, 内径0.27mmの細管(肉厚0.04mm)では1.8ksの処理時間が必要であることが明らかになっている。また、同じ条件で304鋼の線材, 板材などを中心部まで完全にγ単相組織にするための処理時間が計算されており³⁰⁾, φ1mmの線材では7.2ks, t1mmの板材では14.4ksの処理が必要である。しかしながら, 304鋼の計算結果からも明らかのように, 材料寸法(直径, 板厚など)と処理時間の間には必ずしも直線的な比例関係は成立しないため, 種々の計算パラメータやそれらの時間依存性の解析が望まれている。

0.1MPaのN₂ガス雰囲気中およびArガス雰囲気中で1473Kの熱処理を施したFe-24Cr-2Moの線材

(φ1mm)および316L鋼焼鈍材(φ1mm)のねじり特性の比較を図6に示す。なお, 比較材として使用した316L鋼は, 医療用として販売されている胸骨針ワイヤーである。処理前の冷間加工ままのFe-24Cr-2Moのねじり応力は316L鋼とほぼ同等であるが, 破断までのねじり角度は316L鋼の1/6程度である。この冷間加工まま材をN₂ガス雰囲気中で焼鈍(固相窒素吸収処理)することによりねじり特性が改善され, 316L鋼と同等のねじり角と316L鋼の約1.5倍のねじり応力が得られた。一方, Arガス雰囲気中で焼鈍したFe-24Cr-2Moの線材では, ねじり角度は316L鋼と同じレベルまで増加するが, ねじり応力は316L鋼の約1/2の値である。Fe-

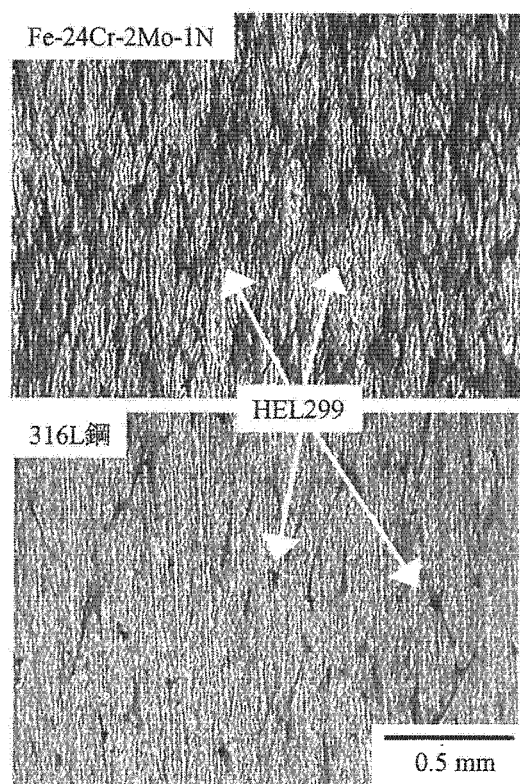


図7 HEL299を7日間培養後の試料表面の光学顕微鏡写真

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場合がある。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, 埜 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
— 一気持ちが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の鋳塊を高周波真空溶解炉により溶製した。得られた鋳塊を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。

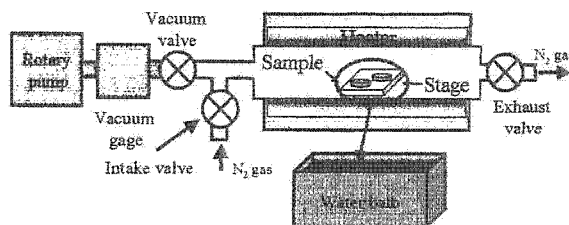


図1 窒素吸収処理装置の概略図

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

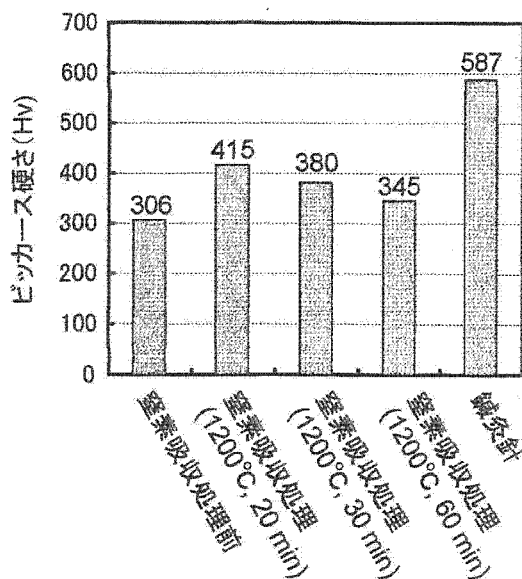


図2 窒素吸収処理前後のFe-24Cr-2Moの細管ならびに304鋼製鍼灸針の硬さ比較

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。

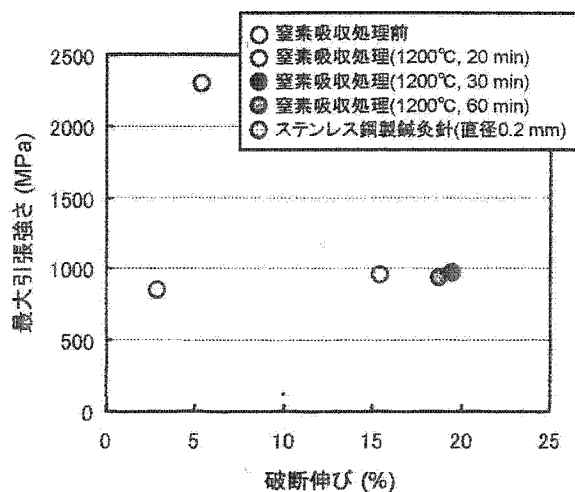


図3 窒素吸収処理前後のFe-24Cr-2Moの細管ならびに304鋼製鍼灸針の引張特性の比較

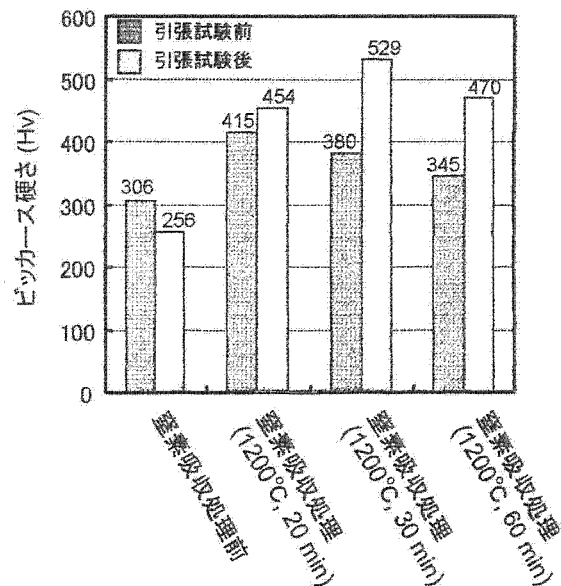


図4 窒素吸収処理前後のFe-24Cr-2Moの細管の引張試験によるビッカース硬さ変化

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, Nagoya University², JST³, O.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 4 μ m、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 DNA (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。

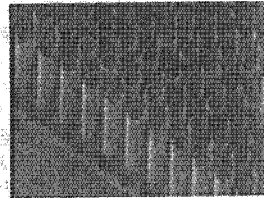


図 1 矩形配列のナノピラー

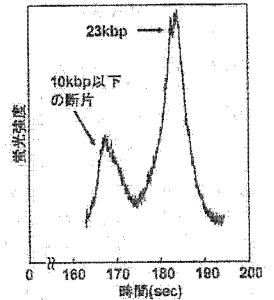


図 2 矩形ナノピラーによる DNA サイズ分離

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。ボツ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パターニングした。ウイルス DNA を精製して取り出すため、と電位が酸で正、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

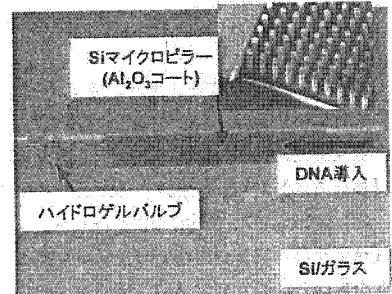


図:マイクロピラーおよびハイドロゲルバルブ

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 Scienc,

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 ($\mu_{in\ pillars}$) and that in pillar-free regions ($\mu_{in\ pillar-free}$). The relative mobility (μ) of DNA, $\mu_{in\ pillars} / \mu_{in\ pillar-free}$, 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.

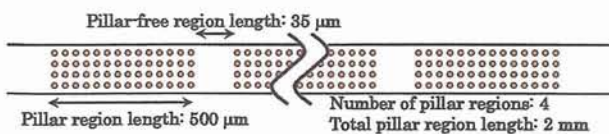


Fig. 1. Dimension of nano-pillar regions.

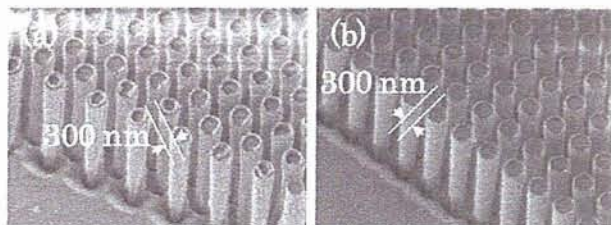


Fig. 2. Nano-pillars with tilted allocation (a) and nano-pillars with square allocation (b). The gaps between pillars are 300 nm.

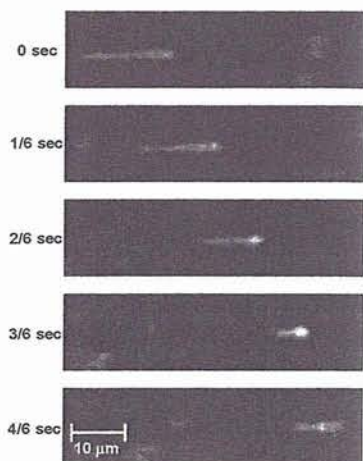


Fig. 3. Single molecule behavior of DNA (166 kbp) in nano-pillars with square allocation.

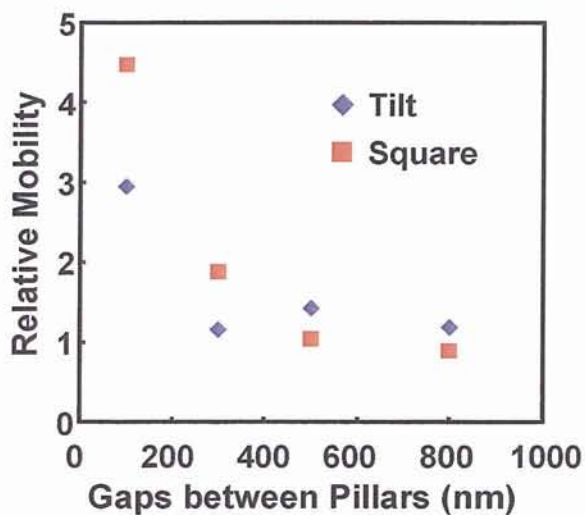


Fig. 5. Relative Mobility of DNA.

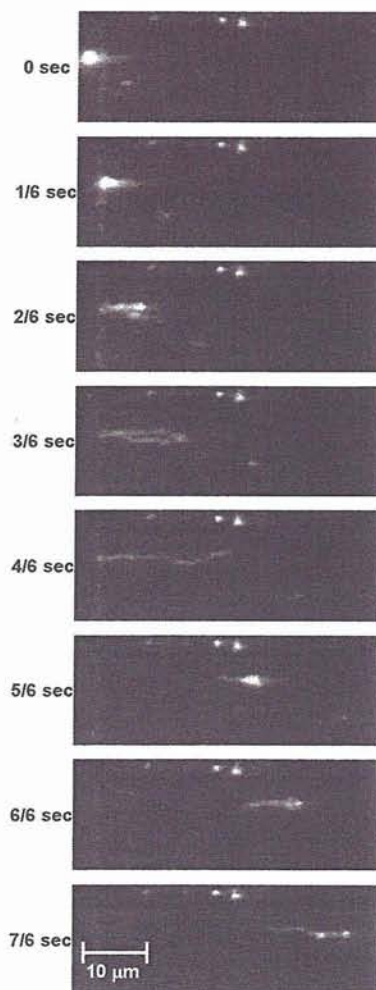


Fig. 4. Single molecule behavior of DNA (166 kbp) in nano-pillars with tilt allocation.

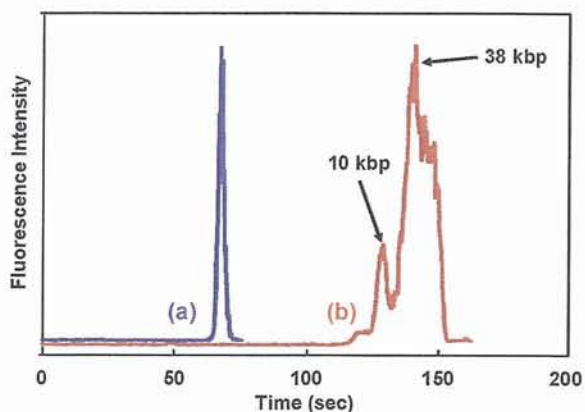


Fig. 6. Electropherograms in square (a) and tilt (b) nano-pillars for 10 kbp and 38 kbp. Intensity of fluorescence stained DNA fragments was observed after DNA fragments traveled 2-mm pillar regions.

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 lyses 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. Horiike, 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.

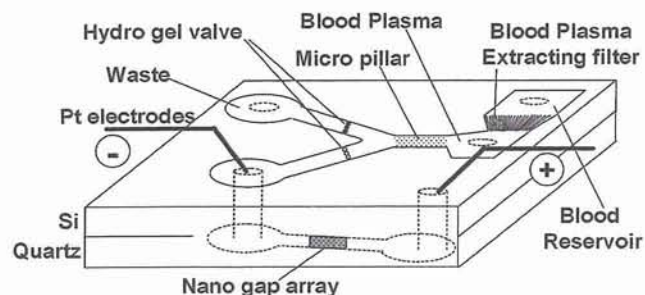


Fig. 1 A model of the DNA purification and detection device to be developed.

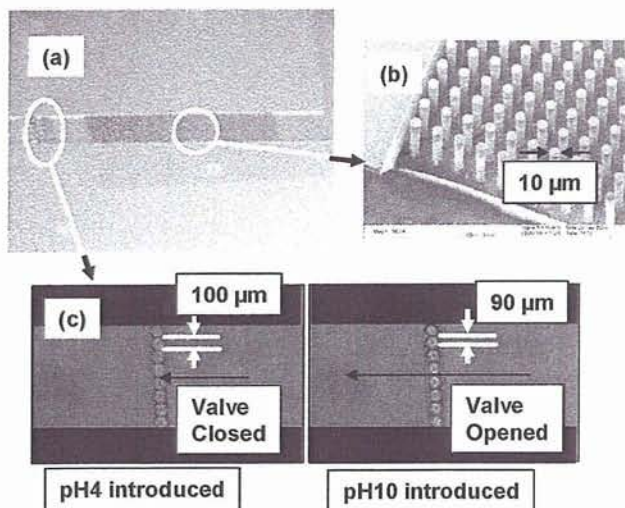


Fig. 2 Microscopic images of DNA purification device by using micro pillars and hydro gel valve.

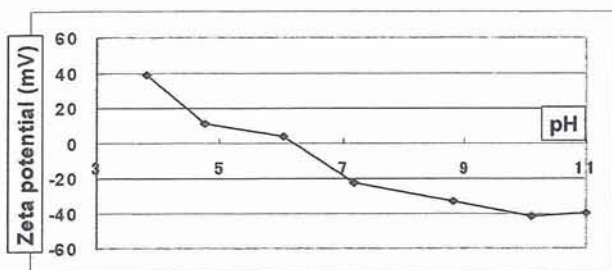


Fig. 3 pH dependence of the zeta potential of Al₂O₃.

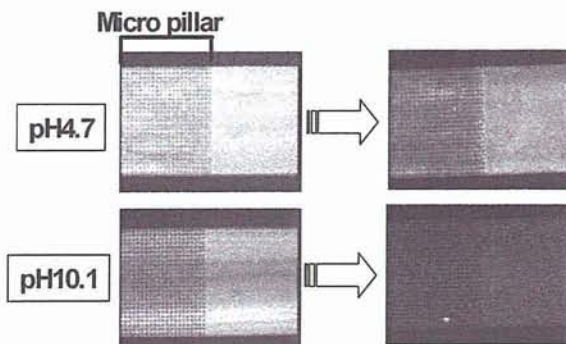


Fig. 4 Variation of the fluorescence images before and after introduction of DNA solution.

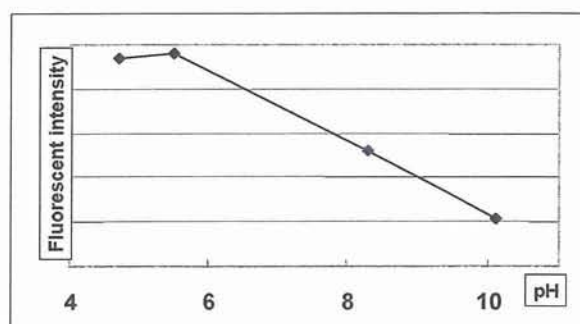


Fig. 5 pH dependence of the fluorescence intensity in micro pillars.

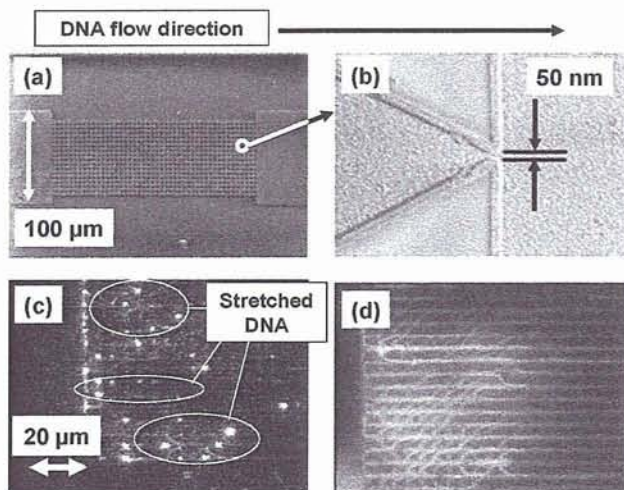


Fig. 6 Microscopic images of DNA detection device by using nano gap array.