

フィラメント加熱式プラーによるガラスピペット作製パラメータの探索

三井大虎¹, 高見知秀^{*2}

Exploring the Parameters for fabricating Glass Pipettes with Filament-Type Puller

Taiga Mitsui¹ and Tomohide TAKAMI^{*1}

Abstract

Micropipettes or nanopipettes fabricated with a filament-type puller are used in various fields such as nanomaterials science as well as cell engineering. In this study, we explored how the diameter and shape of a pipette tip can be controlled by setting parameters for fabricating pipettes with the puller. Sutter Instruments, a company that provides heated pullers, offers parameters up to three-step pull, and we show a four-step pull parameter that is not available in their Cookbook manual. It is expected that the exploration of such multi-stage pulling parameters will provide clues to explore the parameters to fabricate pipettes with more complex shapes, such as theta-pipettes that are divided into two parts in a glass tube, and multi-channel pipettes.

Keywords: micropipette, nanopipette, puller

1. 序論

本論文は2020年度ナノ化学研究室卒業論文¹⁾を元に作成したものである。ピペットは元来、一定量の液体を移送・吸注入するために使われてきた²⁾。特に、先端内径がマイクロスケールのピペット（マイクロピペット）または1 μm 未満のピペット（ナノピペット）は、低侵襲性手術への活用ツールとして注目されている³⁾。近年では、ナノピペットを走査型イオン伝導顕微鏡（SICM）と組み合わせることで、特定の細胞一個への液体の移送や吸注入が行えるようになっただけでなく、ピペットから供給する物質によるナノ構造作製^{4), 5)}も行われるようになった⁶⁾。

ピペットの先端径を測定する最も汎用な方法として、走査型電子顕微鏡（SEM）による観察がある。昨年度当研究室の小野は、ピペットをSEM観察するために試料土台の作製や観察前の試料調整法について探索して、ピペット先端を良い条件でSEM観察するなど一定の成果を上げることができた⁷⁾。しかしこのようなSEMによる評価法は、観察のためにピペットを先端近くで折る必要があり、通常は金属などを蒸着してチャージアップを避けるなど観察前の試料調整のため破壊的な観察的な測定である⁷⁾。近年では、本研究でも実際に用いたように、

低加速度の電子顕微鏡により導電性がないピペットも観察が可能になっているが、それでも観察後のピペットを上記に示す用途に用いることは困難である。

一方、ピペットの先端径を正確かつ非破壊的に決定する手法に、ピペットを作製しているSutter社によって開発された気泡圧測定法（Bubble Pressure Measurement Method）がある⁸⁾。この手法は、ピペットの先端を液体に浸した状態で入口管側から圧縮した気体を導入して、ピペット先端から出てくる気泡の径で判断する、という方法である。しかし、先端が1 μm 未満のナノピペットの場合には、2気圧以上の圧縮した気体を導入することになって危険が伴い、簡便かつ安全な手法とは言えない。

ところで、ピペットにはテーパーと呼ばれる、管から先端にかけて細くなっていく部分がある。そしてテーパー長とは、ピペットの先端に向かって細くなっていく箇所から先端までの長さのことである。テーパー長が長いピペットは細胞の一番遠い核まで届くため、核インジェクションなどの核に直接化学物質を注入することができる用途として使用されている⁹⁾。それに対しテーパー長が短いピペットは長いものより耐久性があることが利点で、テーパー長に耐久性があるピペットを使用した顕微鏡や細胞付着、パッチクランプ法などの細胞レベルでニューロンの電氣的活動を研究する用途として使用

^{*1}生命化学科2020年度卒業生。本論文は卒業論文[1]を元に作成。

^{*2}工学院大学教育推進機構基礎・教養科教授

されている⁸⁾。Eppendorf 社が提供している商品 Femtotip[®]で採用されているように、テーパー長の長短はそれぞれの用途に合わせて使用されている¹⁰⁾。

昨年度当研究室では、フィラメント加熱式プラーで作製したナノピペットについて、作製パラメータをひとつに絞って先端観察方法の確立を行ってきた⁷⁾。一方プラー製造元の Sutter 社が提供している文献⁹⁾には、主に $1\mu\text{m}$ 以上のマイクロピペットについてのパラメータが記載されており、ナノピペットについては得られる内径やテーパー長について数値による詳細は示されていない。

そこで本研究では、パラメータの数値を変えて作製したナノピペットの評価を行い、内径とシャンク長の制御と、再現性のあるパラメータの探索を行った。

2. 実験

2.1 実験装置プラー

ナノピペットを作製したプラーについて以下に説明する。ナノピペットは図 1 に示したフィラメント加熱式プラー (Sutter P-97/IVF) で作製した。

図 2 の上図に示した写真の中心部にフィラメント (素材: タンタル) が設置されており、このフィラメント部分にナノピペットの原料となる硼珪酸ガラス製細管 (ナリシゲ GD-1, 外径 1mm, 内径 0.6mm, 長さ 90mm) を挿入し、フィラメントで加熱する。フィラメントを加熱することでキャピラリーを軟化させた状態において、機械的に左右に引き延ばすことで切断する。(図 2 下) ガラス細管は真ん中で切断されるので、1 回の切断でナノピペットは 2 本作製される。



図 1 本研究で用いたフィラメント加熱式プラー (Sutter P-97/IVF)



図 2 ピペット作製時の様子を示す写真 (左) とその模式説明図 (右)。(上) 加熱時, (下) 切断時

次にピペット作製時のプラーの設定項目について説明する。以下の設定項目に任意の数値を入力しピペットを作製している。

1. HEAT: フィラメントに供給される電流の大きさ (数値は摂氏温度とほぼ同等) 例) HEAT 700 \approx 700 $^{\circ}\text{C}$
2. PULL: キャピラリーを左右に引っ張る力の大きさの相対値
3. VELOCITY: PULL の力に達するまでの力の増加速度の相対値
4. DELAY: 加熱終了からキャピラリーを引っ張り始めるまでの時間 (数値は ms と同等) 例) DELAY 250=250ms

但しそれぞれの値は、あくまで相対値であり、数値をそのまま SI 単位系に置き換えることはできない。

また、数値設定の際に作製の工程を変える 1 段引きと多段引きがある。この 1 段引きと多段引きでは、上記の 1 から 4 の設定項目を 1 回のみ行うか、数回繰り返してからキャピラリーを切断するか、という違いがある。すなわち、1 段引きは 1 回分だけ設定して切断するのに対し、多段引きは複数回分設定して切断することになる。最大で 8 回分設定することができるようにはなっているが 3 段引き以上での作製は困難かつ不安定とされており、Sutter Instruments 社のマニュアル⁹⁾にも 3 段引き以上については言及されていない。

表 1 に 1 段引き、表 2 に 3 段引きのパラメータの具体例を示す。これらのパラメータの違いによってナノピペットの先端形状やテーパー長を制御することができる。

表 1 1 段引きパラメータの例

HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
742	30	55	250

表2 3段引きパラメータの例

	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1段目	742	0	20	250
2段目	732	0	30	250
3段目	732	30	40	250

2.2 プログラム 92

プログラム 92 とは、ブラーにあらかじめ記憶されているピペット作製プログラムであり、昨年度の先行研究⁷⁾においてはこの1つに絞って先端観測方法の確立を行っていたプログラムでもある。このパラメータを表3に示す。

表3 プログラム 92 のパラメータ

	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1段目	742	0	30	250
2段目	732	0	40	250
3段目	732	25	55	250

本研究では、このプログラム 92 のパラメータを基軸としてナノピペットの作製パラメータを変えていき、先端内径およびテーパー長が制御できるだけでなく、安定した再現性のあるピペットを提供できるパラメータの探索を行った。

2.3 本研究で使ったガラス管の補足説明

ピペット作製に使ったガラス細管（キャピラリー）には、「フィラメント」と呼ばれる直径 0.1mm の細いガラス線が入っている。このガラス線フィラメントは、毛管現象を利用してガラス細管内に液体が浸透するのを助ける役割をしている。

2.4 電子顕微鏡によるピペット先端の観察

作製したガラスピペットの先端は、東北大学産学連携先端材料研究開発センターにある電界放出型走査電子顕微鏡（JEOL JSM-7800F）で観察して先端内径を計測した。加速電圧 1.0kV で試料と対物レンズ部分との距離（working distance）を 3mm とした。汎用の電子顕微鏡（SEM）観察では、このような鋭利なガラス先端を観察することは金属蒸着をして試料に導電性を持たせないとチャージアップによって観察は困難となるが⁷⁾、この低加速電子顕微鏡を用いることで、金属スパッタなどでコーティングすることなく観察することができた。

2.5 テーパー長の観察方法と測定方法

本研究では作製したナノピペットを iPhone のカメラで写真を撮影して、その画像を PowerPoint 上で解析することでテーパー長を求めた。計算方法は以下の通りである。

$$\text{テーパー長} = \frac{\text{実際の細管の外径}[1.0\text{mm}] \times \text{PowerPoint 上でのテーパー長の相対値}}{\text{PowerPoint 上での外径の相対値}}$$

解析例を図3に示す。この解析例で求められたテーパー長は $1.0 \times 10.98 / 1.72 = 6.383 \Rightarrow 6.4\text{mm}$ と求められた。

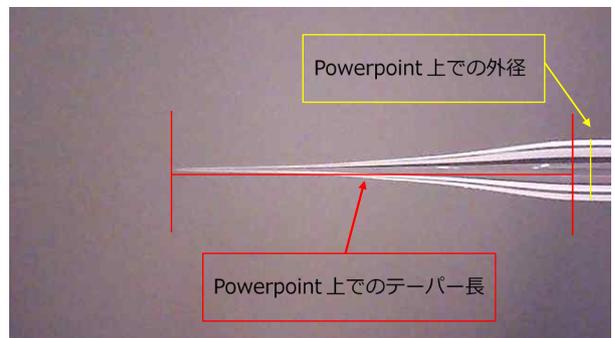


図3 テーパー長測定方法

3. 結果及び考察

3.1 3段引きパラメータ

まず、本研究で用いたピペット作製パラメータのうち、SEM 観察とテーパー長を測定した 3 段引きパラメータを表4に示す。各パラメータ HEAT, PULL, VELOCITY, DELAY の意味については第2章 2.1 節に記載した。

表4 本研究で用いた3段引きパラメータ

(1)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1段目	732	0	30	250
2段目	722	0	40	250
3段目	722	30	55	250

(2)(3)(4)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1段目	762	0	30	250
2段目	752	0	40	250
3段目	752	30	55	250

(5)(6)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	742	0	30	250
2 段目	732	0	40	250
3 段目	722	35	55	250

(7)(8)(9)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	742	0	30	230
2 段目	732	0	40	230
3 段目	732	60	55	230

(10)(11)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	752	0	30	250
2 段目	742	0	40	250
3 段目	742	25	55	250

(12)(13)(14) (15)(16)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	742	0	30	250
2 段目	732	0	40	250
3 段目	732	30	55	250

(17)(18) (19)(20)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	742	0	30	240
2 段目	732	0	40	240
3 段目	732	25	55	240

(21)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	742	0	30	250
2 段目	732	0	40	250
3 段目	732	35	55	250

(22)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	742	0	30	240
2 段目	732	0	40	240
3 段目	732	25	55	240

(23)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	742	0	40	250
2 段目	732	0	50	250
3 段目	732	25	65	250

3.2 4 段引きパラメータ

次に本研究で探索した 4 段引きパラメータを表 5 に示す。

表 5 本研究で用いた 4 段引きパラメータ

(24)(25) (26)(27)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	727	0	10	230
2 段目	717	0	20	230
3 段目	717	0	30	230
4 段目	707	30	40	230

(28)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	727	0	10	230
2 段目	717	0	20	230
3 段目	717	0	30	230
4 段目	707	35	40	230

(29)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	730	0	10	230
2 段目	720	0	20	230
3 段目	720	0	30	230
4 段目	710	40	40	230

(30)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	760	0	40	230
2 段目	750	0	20	230
3 段目	750	0	20	230
4 段目	740	35	20	230

(31)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	750	0	40	230
2 段目	740	0	30	230
3 段目	740	0	20	230
4 段目	730	35	20	230

(32)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	750	0	40	230
2 段目	740	0	30	230
3 段目	740	0	20	230
4 段目	730	40	20	230

3.3 3段引きパラメータ (テーパー長のみ測定)

最後にテーパー長のみを測定した3段引きパラメータを表6に示す。

表6 本研究で用いた3段引きパラメータ (テーパー長のみ測定)

(33)(34) (35)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1段目	752	0	30	250
2段目	742	0	40	250
3段目	742	30	55	250

(36)(37) (38)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1段目	772	0	30	250
2段目	762	0	40	250
3段目	762	30	55	250

(39)(40) (41)	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1段目	782	0	30	250
2段目	772	0	40	250
3段目	772	30	55	250

3.4 3段引きパラメータで作製したピペットのSEM像

まず表4の(1)で示したパラメータで作製したピペットのSEM像を図4に示す。このパラメータでは先行研究⁷⁾で用いられたプログラム92(表3)において加熱温度(HEAT)を10℃下げて最後のPULLの値を25から30に上げた。

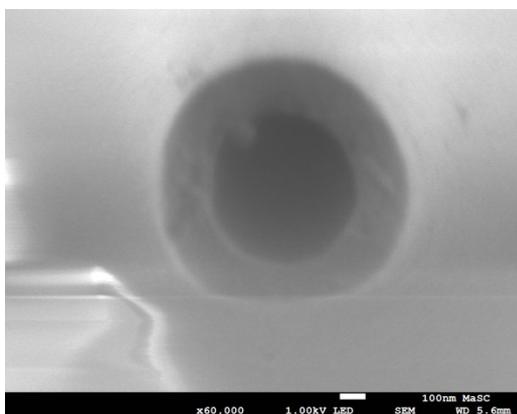


図4 表4の(1)で示したパラメータで作製したピペットのSEM像

このSEM像から求めた先端内径は583nmであり、先行研究⁷⁾で得られたピペットと同等な値であった。こ

のことから、HEATやPULLの値をこの程度変化させても作製されたピペットはあまり変わらないことがわかった。なお、先端の内部で10時の方向にある突起は、実験の章の2.3節で示した「フィラメント」つまりガラス線であり、ガラス線フィラメントが先端まで途切れなく続いていることが示唆された。

次に、表4の(2)(3)(4)で示したパラメータで作製したピペットのSEM像とテーパー長を計測した写真を図5に示す。

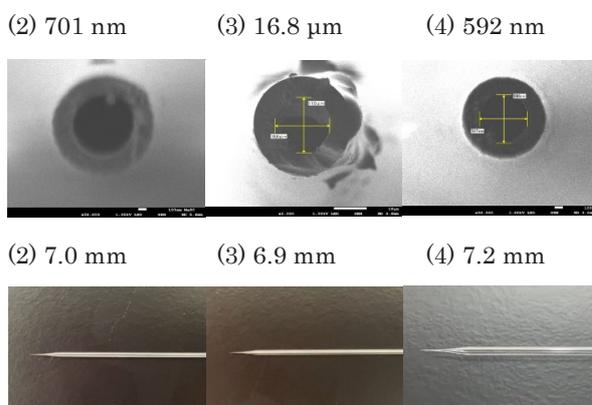
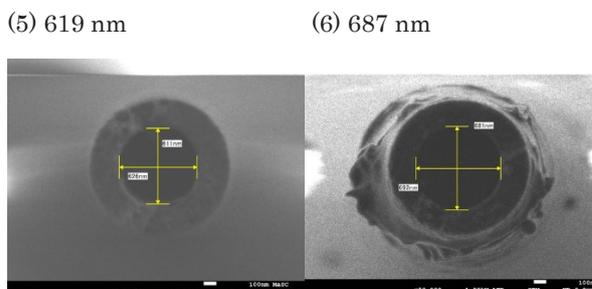


図5 表4の(2)(3)(4)で示したパラメータで作製したピペットのSEM像(上)と写真(下)。SEM像から求めた先端内径と、写真から求めたテーパー長をそれぞれ図の上に示した。

この作製パラメータでは、HEAT値をプログラム92から20℃上げた。その結果、作製されたピペットの確度は下がり、特に(3)で示したように先端が熔融したことで安定した作製パラメータになっていないことがわかった。つまり、HEAT値を上げ過ぎると作製条件が不安定になることがわかった。

次に、プログラム92からPULLの値を25から35、そして60に上げたときの結果を図6に示す。



(7) 800 nm (8) 573 nm (9) 670 nm

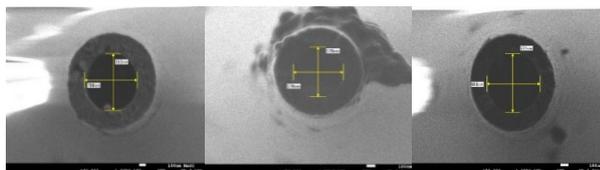


図 6 表 4 の(5)~(9)で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像. 各 SEM 像から求めた先端内径をそれぞれ図の上に示した.

先端の形状を見ると, 安定したピペット作製になっていないことが示唆された. このことから, PULL 値を上げ過ぎた場合も作製条件が不安定になることがわかった.

(1)のパラメータにおいて, HEAT 値を 10°C 下げても結果が変わらないことが示唆されたが, 逆に HEAT 値を 10°C 上げたパラメータ(10)(11)で作製した結果を図 7 に示す.

(10) 579 nm (11) 585 nm

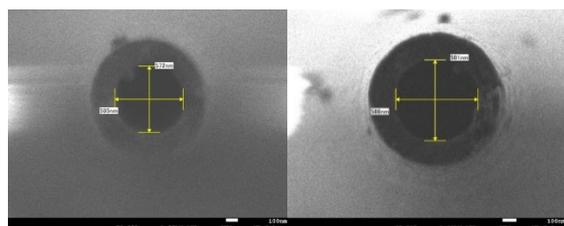
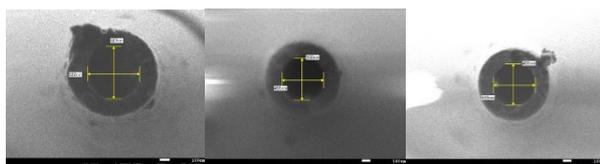


図 7 表 3.1 の(10)(11)で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像. 各 SEM 像から求めた先端内径をそれぞれ図の上に示した.

やはり HEAT 値を 10°C 上げた程度では結果はあまり変わらないことがわかった.

今度は, ピペット作製の安定性つまり確度を確認するために, プログラム 92 からあまり変化していないパラメータ, すなわち PULL を 25 から 30 に変えた同一パラメータで作製を行った結果を図 8 に示す.

(12) 499 nm (13) 495 nm (14) 570 nm



(12) 6.5 mm (13) 6.5 mm (14) 6.9 mm



(15) 525 nm (16) 707 nm

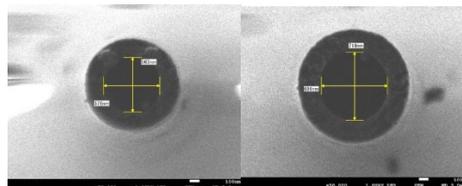
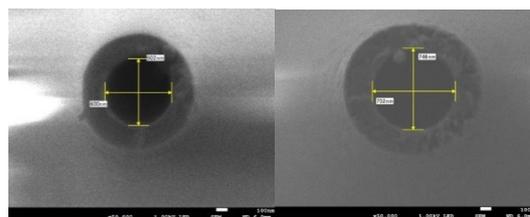


図 8 表 4 の(12)~(16)で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像(上)と, (12)~(14)で示したパラメータで作製したピペット写真(下).

(16)で示した結果のみ先端内径が 700 nm を超える結果になったが, 大体において安定したピペット作製が実現していることがわかった.

DELAY をプログラム 92 で 250 から 240 に変えたときのパラメータ(17)(18)(19)(20)での結果を図 9 に示す.

(17) 601 nm (18) 749 nm



(19) 629 nm (20) 541 nm

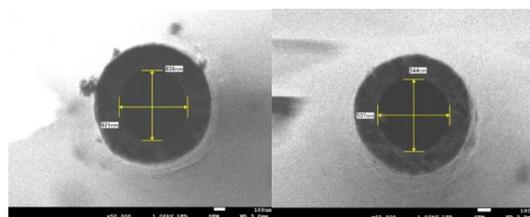


図 9 表 4 の(17)~(20)で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像

DELAY 値を下げると, 先端内径が増加する傾向にあることがわかった. つまり, ピペットを加熱してから引っ張るまでの時間を遅らせると, ピペットが硬くなることでより大きな径において切断されることがわかった.

PULL 値をプログラム 92 で 25 から 35 に変えたときのパラメータ(21)での結果を図 10 に示す.

(21) 658 nm

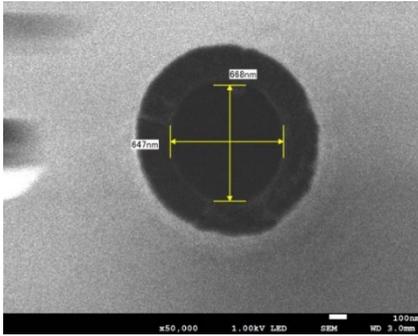


図 10 表 4 の(21)で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像

この結果から、PULL 値を増加させると、より大きな径において切断が起こることもわかった。

図 9 に示したパラメータ(17)~(20)と同一のパラメータ(22)で、異なる日に再度作製したときの結果を図 3.8 に示す。

(22) 560 nm

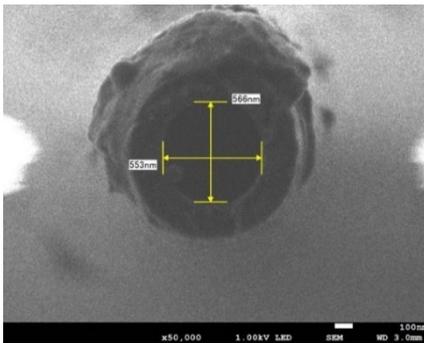


図 11 表 4 の(22)で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像

単純に DELAY 値を下げると、先端内径が増加する傾向にある一方で、ピペットの切断の確度も悪くなっていることが示唆された。

VELOCITY 値をプログラム 92 で 10 ずつ上げたときのパラメータ(23)での結果を図 12 に示す。

(23) 716 nm

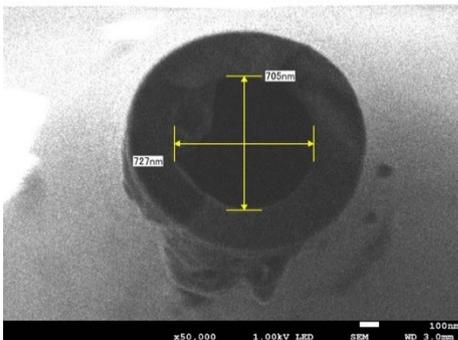


図 12 表 4 の(23)で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像

これは予想された結果ではあるが、VELOCITY 値つまり引っ張る力の設定値 PULL に到達するまでの速さを上げると、径が大きな状態で切断が起こる、ということがわかった。

以上の 3 段引きの結果をまとめると次のようになる。

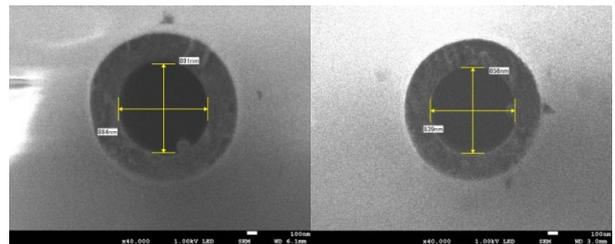
- 1) HEAT 値をガラスの熔融設定値(これを RAMP 値という)から変えると、作製されるピペットの確度(再現度)が下がる。従って、ピペットの作製においては、HEAT 値は RAMP 値からあまりずれた値にしない方が、作製の確度を保つために必要だと考えられる。
- 2) PULL 値を上げるとピペットの先端内径は大きくなるが、上げ過ぎると作製条件が不安定になる。
- 3) VELOCITY 値を上げるとピペットの先端内径は大きくなるが、この値をどこまで上げると確度が下がるかについては今後の検討課題である。
- 4) DELAY 値の場合は、下げることで先端内径は大きくなるが、ピペットの切断の確度も悪くなる。

以上の結果を踏まえて、4 段引きのパラメータの探索を行った。その結果を次の節に示す。

3.5 4 段引きパラメータで作製したピペット

表 5 の(24)~(27)で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像を図 13 に示す。

(24) 888 nm (25) 849 nm



(26) 842 nm (27) 849 nm

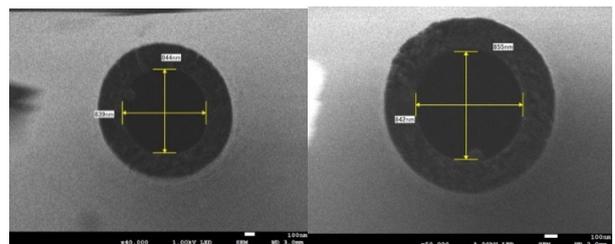


図 13 表 5 の(24)~(27)で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像

このパラメータを得るまでは、4 段引きを設定してもピペットが 3 段までに切断されてしまい、4 段引きを実現することができなかった。前節での結果を踏まえてパラメータの検討を行うことにより本パラメータを得ることができた。

この 4 段引きパラメータでは、HEAT 値を先行研究⁷⁾で用いられたプログラム 92 (表 13) での値から 20°C 下げ、VELOCITY 値も各段ごとに 10 ずつ上げていく設定として、DELAY の値も 20 下げた設定とした。このような設定値にすることにより、ピペット作製マニュアル⁸⁾では示されていない 4 段引きを実現することができた。また、本パラメータを用いると、プログラム 92 よりも 300nm ほど大きな先端内径のピペットを確度よく作製することが出来るようになった。これが、本研究で最も重要な成果である。

この 3.5 節でこれから示していくパラメータは、結果としてうまくいかなかった 4 段引きのパラメータである。まず 4 段目の PULL の値を 30 から 35 に変えたときの結果を図 14 に示す。

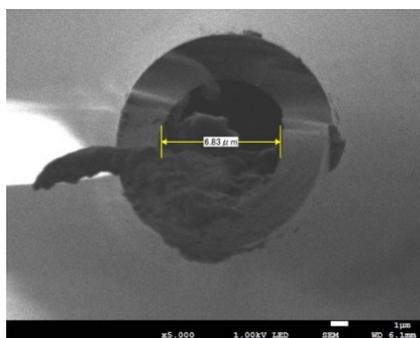
(28) 6.83 μm 

図 14 表 5 の(28)で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像

この 4 段引きでは、PULL の値を 5 変えるだけでもこのような失敗となる。

最初の 4 段引き成功パラメータに対して、HEAT 値が 3 大きく PULL 値が更に 5 大きくしたときでの失敗結果を図 15 に示す。

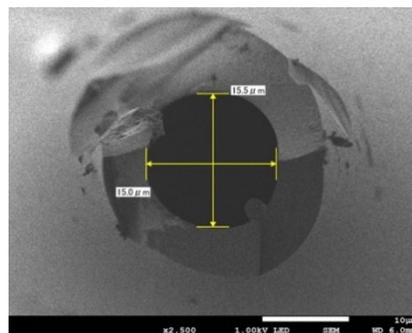
(29) 15.3 μm 

図 15 表 5 の(29)で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像

このように、4 段引きでは、PULL を大きくすると失敗となる。

一方、1 μm に近い先端内径で先端断面が清浄になるパラメータも見出したが、このパラメータの確度については検討していない (図 16)。

(30) 976 nm

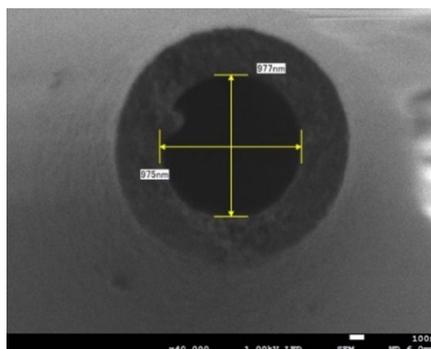


図 16 表 5 の(30)で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像

また次に示す 2 種類のパラメータでの 4 段引きを行ったところ、断面の平坦性は良くない結果となった。(図 17)

(31) 1.03 μm

(32) 933 nm

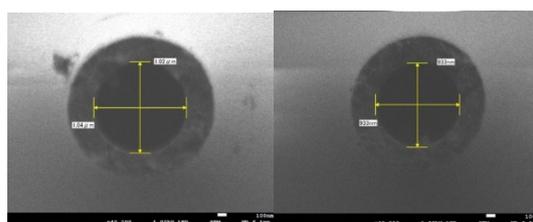


図 17 表 3.2 の(31) (左) および(32) (右) で示したパラメータで作製したピペットの SEM 像

3.6 3 段引きパラメータで作製したピペットのテーパー長の加熱温度依存性

最後にこの節では、3 段引きパラメータで作製したピペットのテーパー長について、他のパラメータを固定して HEAT 値のみを変えていったときにどのように変化するかを調べた。

ピペット作製マニュアル⁹⁾によると、1 段目より後では HEAT 値を RAMP 値から 10℃引いた値としたほうが精度のよいピペットが得られるとしている。そこで本研究ではこのマニュアルの指示に倣い、1 段目の HEAT 値に対して 2 段目と 3 段目の HEAT 値は 10 だけ小さい値とした。以下の図 3.15~3.17 にその測定結果を示す。

(33) 6.8 mm (34) 6.9 mm (35) 7.0 mm



図 18 表 6 の(33)~(35)で示したパラメータで作製したピペットの写真。実験の 2.5 節で示した解析法で計測したテーパー長を各写真の上に示した。

(36) 7.1 mm (37) 7.0 mm (38) 7.2 mm



図 19 表 6 の(36)~(38)で示したパラメータで作製したピペットの写真。実験の 2.5 節で示した解析法で計測したテーパー長を各写真の上に示した。

(39) 7.0 mm (40) 7.2 mm (41) 7.2 mm



図 20 表 6 の(39)~(41)で示したパラメータで作製したピペットの写真。実験の 2.5 節で示した解析法で計測したテーパー長を各写真の上に示した。

これまでに示してきたピペット写真の解析から、テーパー長の HEAT 値依存性がわかった。その結果を図 21 に示す。

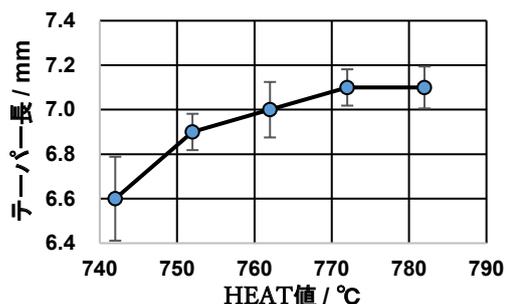


図 21 テーパー長の加熱温度依存性

加熱温度 (HEAT 値) を上げると、得られるナノピペットのテーパー長は長くなる傾向が得られた。なお、HEAT 値が 785 を超える設定はブラー装置の加熱フィラメントが破損する危険性があるため行わなかった。また、HEAT 値が 740 以下になると細管が十分に加熱されずガラス細管が柔らかくならないため作製できなかった。

3.7 考察

得られる先端内径の安定性は加熱温度に依存していて、3 段引きでは 742℃の時に安定したが、20℃上げた 762℃では非常に不安定な結果となり、得られた結果に大きな違いが生じた。Sutter 社のマニュアル⁹⁾には HEAT 値を上げると先端内径はより小さくなると言及されているが、温度を上げ過ぎるとホウ珪酸ガラスの軟化点である 730℃を大きく超えるために望んだ結果にはならない。逆に軟化点より低過ぎる値を設定すると、先端内径の作製条件が不安定となり、焼ききれなかったりする結果となる。このことから 3 段引きでは、HEAT 値として軟化点に近い 742 が最適な加熱温度であると考えられる。

次に 4 段引きについて考察する。ブラーでナノピペットを作製するにあたって、一般に 4 段引き以上は困難かつ不安定な結果が得られていたため、4 段引きについては Sutter 社のマニュアル⁹⁾では言及されていない。本研究でも様々な 4 段引きの条件を試したが、4 段目の工程に入る前に細管が焼き切れてしまい安定したピペットどころかピペットすら作製できないのが現状であった。その中において、4 段引きに成功かつ 845±5nm で安定したパラメータを得ることができた。この 4 段引きパラメータが得られた理由として、HEAT が低いと細管が焼き切れないという問題を VELOCITY と DELAY を下げることで解決することができ、低い温度でもしっかり細管を焼き切ることができたためだと考えられる。この 4 段引きパラメータを応用することで、従来では作製困難

であり, Sutter 社のマニュアル⁹⁾でも示されていない「多重チャンネルピペット」, 例えば 2 つに分かれた「 θ (シータ) ピペット」¹⁰⁾を安定に作製するパラメータを探索する鍵が得られた, と考えられる。

一方で, 先端内径のばらつきには加熱温度の影響だけでなく, 細管に付着したゴミや油, 湿度が影響する可能性も考えられる。しかし湿度などの影響を実証するには膨大な量の実験データが必要になってくるため, これらの要因については今後調査する余地があると考えている。

テーパー長については HEAT 値を上げると長くなる傾向にあるが, 予想していたよりも大きな差はなく, また 770°C 以上では変化しないことから, 3 段引きでは先端内径を維持しながらこれ以上テーパー長を長くすることは困難だと考えられる。このことから引張る回数が多い 4 段引きの方が 3 段引きよりテーパー長は長くなると期待される。これらもまた今後調査する余地があると考えている。

4. 結論

本研究により下記の表 7 [505±20nm (3 段引き)] と表 8 [845±5nm (4 段引き)] の, それぞれ再現性の良いナノピペット作製パラメータを得ることができた。

表 7 505±20nm で安定した 3 段引きパラメータ

	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	742	0	30	250
2 段目	732	0	40	250
3 段目	722	30	55	250

表 8 845±5nm で安定した 4 段引きパラメータ

	HEAT	PULL	VELOCITY	DELAY
1 段目	727	0	10	230
2 段目	717	0	20	230
3 段目	717	0	30	230
4 段目	707	30	40	230

また, テーパー長の制御には加熱温度が依存していて, 温度が上がるとテーパー長は長くなるが, 770°C 以上になると変化しない。

そして先端内径やテーパー長だけでなく, 作製されるナノピペットの再現性に各パラメータがどのように係るかもわかった。

5. 謝辞

本研究で示した SEM 像は, 東北大学多元物質科学研究所技術室の真柄英之様に観察と計測をお願いしました。この研究は「物質・デバイス領域共同研究拠点」の共同研究プログラム(課題番号 20201168)の助成を受けたものです。基盤共同研究の共同研究者である東北大学多元物質科学研究所の虻川匡司教授と小川修一助教に感謝いたします。

参考文献

- 1) 三井大虎, 工学院大学先進工学部生命化学科 2020 年度ナノ化学研究室卒業論文, 2021.
- 2) 高見知秀, 表面化学, 第 36 巻 第 12 号, 1, 2015.
- 3) H. Matsuoka, M. Saito, and H. Funabashi, Embryonic Stem Cells - Basic Biology to Bioengineering (Ed. M. S. Kallos), InTech, p.149, 2011.
- 4) F. Iwata, S. Nagami, Y. Sumiya, and A. Sasaki, Nano-technology 18, 105301, 2007.
- 5) S. Ito and F. Iwata, Jpn. J. Appl. Phys. 50, 08LB15, 2011.
- 6) T. Takami, T. Kawai, and B. H. Park, Nano Convergence 1, 17, 2013.
- 7) 小野菜奈美, 2019 年度工学院大学先進工学部生命化学科卒業論文, 2020.
- 8) S. Mittman, D. G. Flaming, D. R. Copenhagen, and J. H. Belgum, J. Neurosci. Meth., 22, p.161, 1987
- 9) A. Oesterle, "p.1000 & p.97 Pipette Cookbook", Rev.E (Sutter Instruments, 2009, Novato CA).
- 10) Eppendorf®, Femtotip (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).
- 11) 櫻井 智史, 山崎晃資, 牛木辰男, 岩田 太, 2015 年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集, K02, p.619, 2015.