

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：83205

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 21 年度 ～ 平成 24 年度

課題番号：21700496

研究課題名（和文） 温度応答性高分子を用いた包接型 1 細胞アレイチップの開発

研究課題名（英文） Development of Clathrate-type single-cell array chip using thermoresponsive polymer

研究代表者

横山 義之 (YOKOYAMA YOSHIYUKI) 富山県工業技術センター

研究者番号：60416154

研究成果の概要（和文）：温度によって体積を大きく変化させる温度応答性高分子に、感光性や熱架橋性を付与し、フォトリソグラフィーや熱ナノインプリント法によって直接微細加工可能な温度応答性高分子（バイオレジスト）を開発した。さらに、バイオレジストの微細パターンが可逆的に変形する特徴を利用して、包接型 1 細胞アレイチップを作製した。このチップでは、アレイ状に配置した各ウェル内部で、1 細胞を自由に掴んだり放したりすることが可能である。

研究成果の概要（英文）：We developed Bio-resist by providing thermoresponsive polymer with photocrosslinking and thermal cross-linking capabilities. The Bio-resist can be used for micro fabrication by photolithography and thermal-nanoimprint. And small Bio-resist patterns could be changed reversibly by changing temperature. Moreover, we developed a clathrate-type single-cell array chip which consists of many arrays of Bio-resist hole patterns where small objects such as single-cells can be captured and released.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	2,900,000	890,000	3,790,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：温度応答性高分子、ゲル、細胞アレイチップ、フォトリソグラフィー、ナノインプリント、バイオレジスト、微細加工

1. 研究開始当初の背景

熱、光、pH、電気などの外部刺激に対応して、種々の特性を変化させる刺激応答性高分子は、インテリジェント（あるいはスマート）マテリアルと呼ばれ、近年、盛んに研究が行われている。その中でも、温度刺激によりその特性を変化させる温度応答性高分子は、医薬・バイオ分野をはじめとして様々な分野で大きな注目を集めている。この温度応答性高分子を 3 次元架橋させて得られる温度応答性の含水ゲルは、温度変化に伴って可逆的な膨潤と収縮を引き起こし、大量の水を吸収・放出したり、体積を大きく変化させたりする。

この温度応答性ゲルを、マイクロ～ナノメートルスケールに微細加工できれば、可逆的な体積変化や物質の放出コントロールなどの温度応答性ゲルの特徴を、種々のバイオチップ上で利用することが可能になる。

特に、近年の細胞機能の解析では、1 細胞レベルでの操作や反応の検出が行える細胞チップの開発が求められている。このチップによって、個々の細胞における代謝や免疫反応機構の解明がより一層進展するものと考えられる。微細加工した温度応答性ゲルは、このような微小な細胞 1 個を扱う細胞チップ上でのアクチュエーターとしての利用が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、温度応答性ゲルをマイクロ～ナノメートルスケールに微細加工する手法として、半導体製造用レジストのように、フォトリソグラフィ法や熱ナノインプリント法によって、直接微細加工できる温度応答性ゲルの開発を試みた。これにより、多段階の成膜やエッチングプロセスは使わずに、1回のフォトリソグラフィもしくは熱ナノインプリントプロセスで、温度応答性ゲルを直接微細パターンニングすることが可能になる。この温度応答性ゲルは、細胞を扱うバイオチップ用に開発されたレジスト材料であること、また、温度変化に伴って体積が大きく変化し、微細パターンが生きているように変形することから、「バイオレジスト」と名付けた（「レジスト」本来の意味は、下地のエッチングマスクとして使われる感光性を有する高分子であるが、近年は、「永久膜レジスト」に代表されるように、光などにより表面に微細パターン形成できる高分子を、広義にレジストと呼んでいる。本研究においては、後者（広義）の意味で用いている）。

さらに、微細加工したバイオレジストを、細胞1個を自由に掴んだり放したりできる微小なゲルアクチュエーターとして用い、数十万個の細胞を1個ずつ同時にアレイ化できる包接型1細胞アレイチップへと応用を試みた。このチップは、細胞がちょうど1個入るサイズの穴パターンを、バイオレジストを用いて基板上に多数アレイ状に形成したものである（図1）。このアレイ化技術は、細胞個々の機能を網羅的に調べるための有力な手法の一つになると考えられ、特に、抗体医薬の開発を目的とした免疫細胞の高速スクリーニングシステムへの応用が期待される。

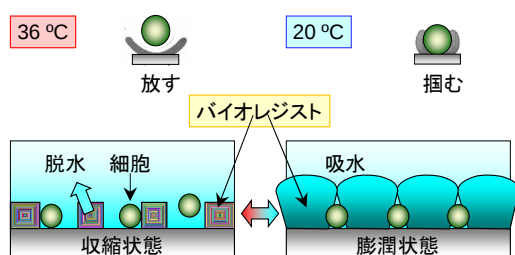


図1 微細加工可能な温度応答性ゲル(バイオレジスト)の穴パターン構造を用いた包接型1細胞アレイチップ

3. 研究の方法

(1) フォトリソグラフィ用バイオレジスト

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) に光架橋性を付与し、光でパターンニングできる温度応答性ゲル「バイオレジスト」の調製

を行った。はじめに、*N*-isopropylacrylamide と 2-hydroxyethylacrylate をラジカル共重合し、架橋サイトとして働く水酸基を有する PNIPAAm 共重合体を合成した。次に、得られた共重合体に、架橋剤として

1, 3, 4, 6-tetrakis(methoxymethyl)glycoluril と、光酸発生剤として

bis(*t*-butylsulfonyl) diazomethane を加え、1-methoxy-2-propanol に溶解し、レジスト溶液とした。続けて、バイオレジストのフォトリソグラフィーによる微細パターンニング特性と、得られた微細パターンの温度応答性の検討を行った。図2に、バイオレジストの化学組成とフォトリソグラフィプロセスを示す。

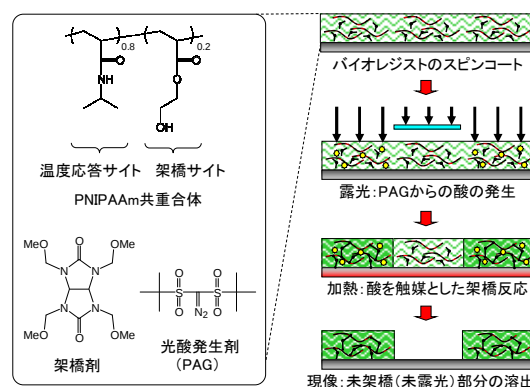


図2 フォトリソグラフィ用バイオレジスト

(2) 熱ナノインプリント用バイオレジスト

フォトリソグラフィよりも、さらに微細な加工を行うために、PNIPAAm に熱架橋性を付与し、熱ナノインプリント法によって、パターンニングできるバイオレジストの調製を行った。(1)で合成した PNIPAAm 共重合体に、架橋剤として citric acid を加え、1-methoxy-2-propanol に溶解し、レジスト溶液とした。続けて、バイオレジストの熱ナノインプリントによる微細パターンニング特性と、得られた微細パターンの温度応答性の検討を行った。図3に、バイオレジストの化学組成と熱ナノインプリントプロセスを示す。

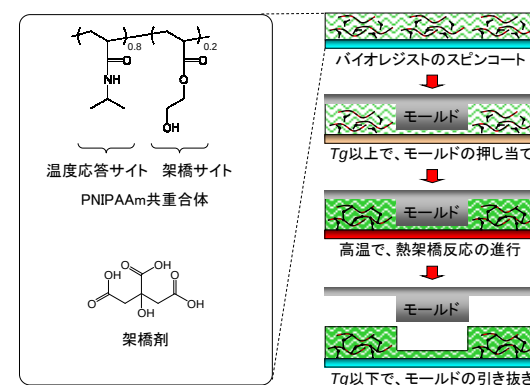


図3 熱ナノインプリント用バイオレジスト

(3)包接型 1 細胞アレイチップ

(1)で開発を行ったフォトリソグラフィ用バイオレジストや、(2)で開発を行った熱ナノインプリント用バイオレジストを用いて、温度応答性ゲルをウェル状にパターンニングし、包接型 1 細胞アレイチップを作製した。ウェルの直径は、リンパ球の直径が約 $6\mu\text{m}$ であることから、ひとまわり大きい直径 $10\mu\text{m}$ とした。また、多くの人の場合、それぞれ異なる抗体を産生する $10^7\sim 10^8$ 種類のリンパ球を持っているとされており、それらを網羅的にスクリーニングするために、なるべく多くのリンパ球を高密度にアレイ化できるチップが求められている。そこで、本研究では、 $18\text{mm}\times 8\text{mm}$ の領域に 36 万～64 万個のウェルを有する包接型 1 細胞アレイチップを作製した。また、長期間の観察や培養が行えるように、培養ディッシュタイプの細胞アレイチップも作製した。図 4 に、作製したチップ外観写真を示す。

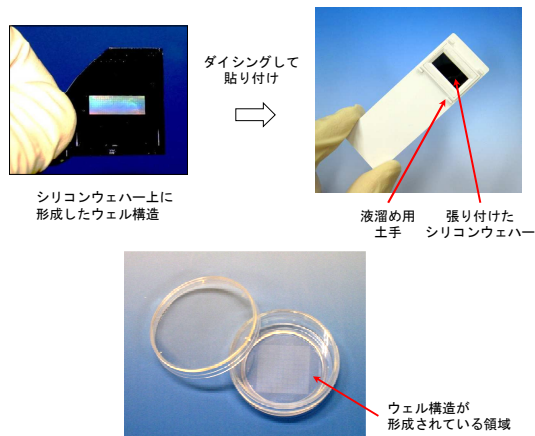


図 4 種々の包接型 1 細胞アレイチップ
(上: マイクロアレイスキャナー用、下: 培養用)

4. 研究成果

(1)バイオレジストの微細パターンニング

フォトリソグラフィ法によって形成したバイオレジストの微細パターンの SEM 像を図 5 に示す。 $10\mu\text{m}\sim 30\mu\text{m}$ の微細なパターンが良好に転写されていることが確認できた。

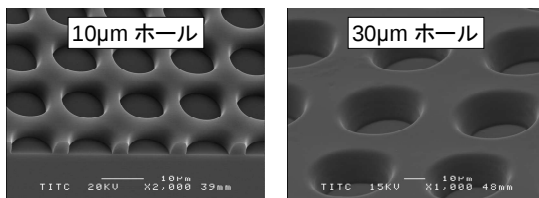


図 5 フォトリソグラフィによる微細パターン

また、熱ナノインプリント法によって形成した微細パターンの SEM 像 (の一部) を図 6 に示す。 $10\mu\text{m}\sim 50\text{nm}$ の微細なパターンが良好に転写されていることが確認できた。

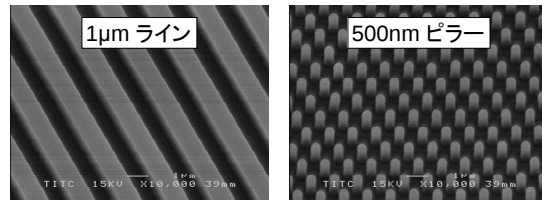


図 6 熱ナノインプリントによる微細パターン

(2)バイオレジストの温度応答性

フォトリソグラフィ法および熱ナノインプリント法によって得られたバイオレジストの微細パターン上に水を滴下し、種々の温度における微細形状の変化を観察した (図 7)。基板温度を 36°C にすると、レジストパターンは収縮し、穴パターンの直径は $10\mu\text{m}$ になった。それに対して、基板温度を 20°C にすると、レジストパターンは膨潤し、穴パターンは縦横に潰れながら完全に閉じた。潰れる際に、折れ曲がった箇所には、大きな応力が発生している。この応力集中箇所が、隣り合う穴パターン同士で重ならず、互い違いになるように協調し合うことで、規則的な縦横形状が発生したものと考えられる。また、これらの挙動は、温度変化に伴い、約 10 秒程度で、繰り返し何度も行えることがわかった。

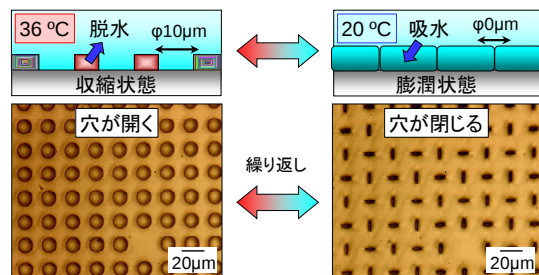


図 7 温度変化に伴うバイオレジストの微細パターンの変形
(穴パターン直径 $10\mu\text{m}$ 、フォトリソで作製)

次に、断面方向のパターン変形についても検討を行った (図 8)。基板温度を 36°C にすると、レジストパターンは収縮し、深さは $9\mu\text{m}$ になった。それに対して、基板温度を 20°C にすると、レジストパターンは大きく膨潤した。基板界面にしっかりと結合している下層部分のバイオレジストは、横方向には、あまり膨張することができず、基板界面から上方方向に離れるに従って、横方向にも大きな膨張が見られるようになった。その結果、バイオレジストは、逆テーパ形状に膨潤し、穴パターンの上部では、穴が完全に閉じているのに対し、穴パターンの下部では、空隙が存在していることがわかった。また、膨潤時のパターン厚みは、 $32\mu\text{m}$ であり、収縮時の厚み ($9\mu\text{m}$) に比べて、約 3.5 倍に膨らんでいることがわかった。

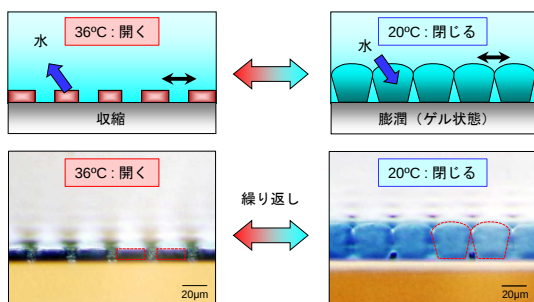


図8 温度変化に伴うバイオレジストの微細パターンの変形(穴パターン直径 10 μm 、深さ 9 μm)

次に、バイオレジスト組成中の架橋剤の含有量を変化させることで、パターンニング後のバイオレジストの架橋密度を調整し、膨潤時の体積増加率の制御を行った。図9に、フォトリソグラフィ用バイオレジストのPNIPAAm共重合体に対する架橋剤の含有量と、バイオレジスト膨潤時の体積増加率の関係を示す。ここでの体積増加率は、収縮時のレジスト膜厚を100%とした時の膨潤時のレジスト膜厚とした。

架橋剤の含有量が1.0wt%以下の場合、現象液に対して不溶化するために必要な架橋密度が得られず、パターンニングすることができなかった。架橋剤の含有量が1.5wt%以上の場合、不溶化に必要な架橋密度が得られるようになった。また、架橋剤の割合を増やすに従って、バイオレジストの架橋密度が上がり、膨潤時の体積増加率は小さくなった。パターンニングできる最低限の架橋剤含有量1.5wt%とすることで、最大の膨潤量(約360%の体積増加率)が得られることがわかった。

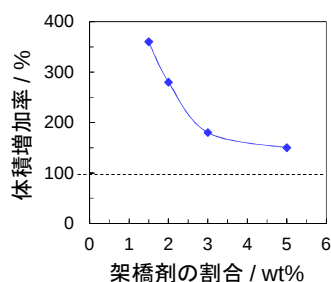


図9 架橋剤の含有率と膨潤率の関係

また、最大膨潤時のバイオレジストの柔らかさの評価を行った。膨潤時のバイオレジスト(バルク：厚み 1.525mm)へのTMAプローブ押し込み試験を行った結果、ヤング率は3.3kPaであった。これまでに、種々の細胞のヤング率が、AFMのプローブ押し込み試験により測定されており、リンパ球(T細胞)は5.3kPa、繊維芽細胞は3~5kPaと報告されている。測定手法の違いや1mm以上の厚膜で行った試験であることを考慮する必要があるが、バイオレジストの膨潤時の柔らかさは、細胞とほぼ同じ程度と考えられる。

(3) 特定箇所のパターン変形

温度変化に伴うバイオレジストのパターン変形は、これまでは基板全体の温度を制御していたため、全てのパターンが同時に変形していた。しかし、バイオレジストをマイクロポンプやバルブ、ピンセットとして利用する場合、特定の箇所だけを特定のタイミングで変形させる必要がある。そこで、レジストパターンの特定箇所をレーザー照射により局所加熱し、狙った箇所だけを変形できる局所加熱システムの構築を行った(図10)。

細胞チップへの応用を考え、用いるレーザーは、チップ上の水に吸収・遮光されず、且つ、細胞に悪影響を与えない波長として、近赤外領域の光を発振するレーザー(波長784nm)を選択した。この近赤外レーザーを、ビームエクspanderと顕微鏡の対物レンズを通すことによって、マイクロメートルレベルの任意の直径を持つ微小なスポット状に、レーザーを照射することができた。さらに、電動シャッター・電動ステージを用い、顕微鏡制御ソフトウェアを介して連動させることで、任意の場所、タイミングでレーザー照射を行うことができた。

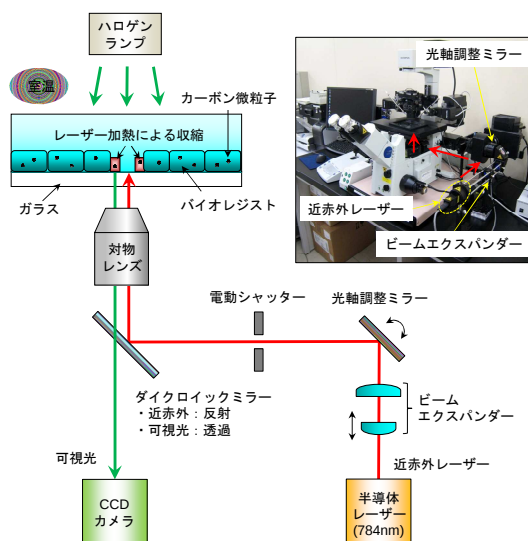


図10 レーザーによる局所加熱が行えるように構築した光学系(倒立顕微鏡への組み込み)

バイオレジストは、紫外・可視領域から近赤外領域まで吸収を持たず透明なため、近赤外レーザーを照射しても、エネルギーを吸収できず加熱することができない。そのため、近赤外光を吸収できるバイオレジストとするために、近赤外光吸収剤としてのカーボン微粒子(平均粒径 120nm)を、熱ナノインプリント用バイオレジストに分散させた。カーボン微粒子の含有量は、低出力の小型レーザーの光で充分加熱できるだけの吸収を与えることができ、また、可視光による顕微鏡観察を完全には妨げない量として、PNIPAAm共

重合体に対して 0.05wt%をバイオレジスト溶液に添加した。

熱ナノインプリント法は、光を用いてパターンニングするフォトリソグラフィー法と違い、光の透過率が低いレジストでも、問題なくパターンニングすることができる。そのため、遮光材料であるカーボン微粒子を分散させたバイオレジストでも、熱ナノインプリント法を用いることで、微細パターンを良好に転写することができた。

図 11 に、カーボン微粒子を分散させたバイオレジストの直径 $10\mu\text{m}$ (深さ $5\mu\text{m}$) の穴パターンに、近赤外レーザーをスポット照射して局所パターン変化させた結果を示す。基板全体を 36°C にすると、レジストパターンは収縮し全ての穴が開いたが、 20°C にすると、レジストパターンは膨潤し全ての穴が閉じた。次に、基板温度を 20°C に維持しながら、直径 $10\mu\text{m}$ に絞った近赤外レーザーをスポット照射すると、狙った穴 1 個のみを 1 秒以内に開くことができた。この時のレーザー出力は、約 2mW の低出力で十分であり、バイオレジスト膜中に分散しているカーボン微粒子が効率よく近赤外レーザーを吸収し、発熱体となっていることが確認できた。また、近赤外レーザーの照射を止めると、熱が周囲に急速に奪われ、1 秒以内に穴が閉じた。レーザーによる局所加熱に要する時間や、熱が急速に奪われ冷却に要する時間は、温調ステージを用いて基板全体を加熱・冷却する場合に要していた時間よりも非常に短い。そのため、1 秒以内という高速な温度応答が観察されたと考えられる。この結果から、マイクロメートルスケールに微細加工されたバイオレジストの本来の温度応答速度は、1 秒以内であることが示唆された。

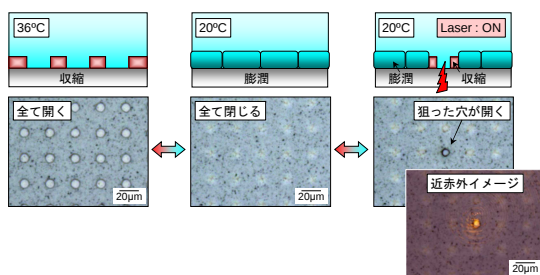


図 11 カーボン微粒子を分散させたバイオレジストの微細パターン(直径 $10\mu\text{m}$ の局所加熱による特定箇所のパターン変化

(4) 包接型 1 細胞アレイチップへの応用

擬似細胞として、直径 $6.2\mu\text{m}$ の蛍光ビーズを用いて、包接型細胞チップを用いた細胞のアレイ化実験を行った。包接型細胞チップは、フォトリソグラフィー用バイオレジストを用いて、スライドガラス上の $18\text{mm}\times 8\text{mm}$ の領域に約 36 万個のウェル構造を直接形成し

たスライドガラスタイプのものを用いた。穴の直径は、ヒト B リンパ球 (直径約 $6\mu\text{m}$) や蛍光ビーズが 1 個だけ入るように、直径 $10\mu\text{m}$ とした。ウェルの深さは、穴の開閉時に細胞が逃げ出さない深さを持ち、且つ、吸引回収が行い易い深さとして、 $6\mu\text{m}$ とした。また、細胞を掴む時に、細胞全体をしっかりと包み込み、且つ、柔らかい細胞を潰さないようにソフトに掴めるように、最も大きな膨潤量が得られるレジスト組成 (PNIPAAm 共重合体に対して、架橋剤を 1.5wt%) を用いた。

はじめに、チップ温度を 36°C に保持した状態 (穴パターンが開いている状態) で、擬似細胞 (直径 $6.2\mu\text{m}$ のポリスチレンビーズ) の懸濁液を滴下し、ビーズの自然沈降を 5 分間待った。次に、チップ温度を 20°C に下げることにより、バイオレジストを膨潤させ、それぞれの穴パターンに入ったビーズを掴んだ。その後、 20°C の水でチップを洗浄し、掴まれている余分なビーズを洗い流した。その結果、穴パターン内部のみにビーズを保持でき、アレイ化することができた (図 12)。さらに、チップ温度を 36°C に戻すと、バイオレジストは再び収縮し、ビーズを解放することができ、マイクロキャピラリーによる吸引によって、任意のビーズを再回収することができた (図 13)。

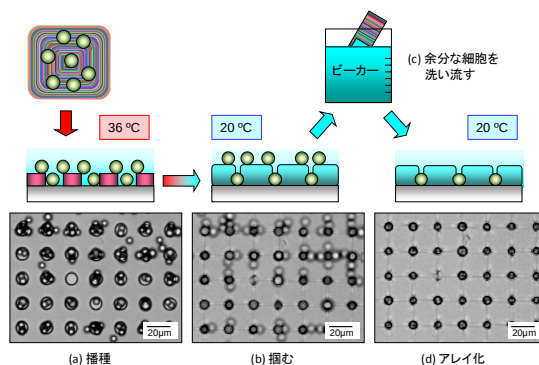


図 12 包接型 1 細胞アレイチップを用いて、蛍光ビーズのアレイ化を行った様子

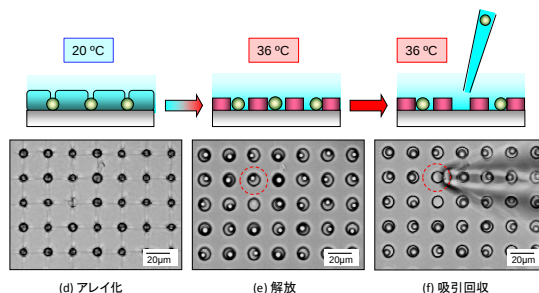


図 13 包接型 1 細胞アレイチップを用いて、アレイ化した蛍光ビーズの回収操作の様子

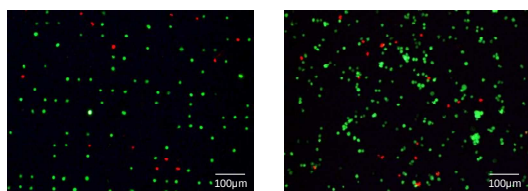
また、目的とする細胞の大きさに合わせて、バイオレジストの穴パターンサイズを変更することによって、種々の細胞 (ヒトリンパ

球、マウス 3T3 繊維芽細胞、酵母菌) を、1 細胞ずつ、さらには、数十個ずつ、分離しながら、アレイ化することができた。

包接型細胞チップを用いて細胞をアレイ化する場合、一旦、膨潤したバイオレジストによって、細胞が完全に包まれた状態になる。この操作を行った後でも、細胞が生存しているかどうかを確認するために、蛍光 2 重染色液を用いた生死判定を行った。

包接型細胞チップを用いてアレイ化した Jurkat 細胞と、比較のために、市販の 35mm 培養ディッシュ上に単純に播種した Jurkat 細胞に対して、染色操作を行った。図 14 に、両者の蛍光顕微鏡像(B 励起(励起: 460-490nm、検出: 520nm-)) を示す。包接型細胞チップを用いてアレイ化した Jurkat 細胞の多くが、黄緑色の蛍光を発しており生存していることが確認された。生細胞と死細胞の数をそれぞれカウントし、生細胞の割合を求めたところ 87%であった。市販の培養ディッシュ上に播種した Jurkat 細胞の生細胞の割合は 90%であり、 χ^2 検定の結果、両者に有意差は認められなかった。

バイオレジストの膨潤時の断面形状の観察結果から、包接型細胞チップの各ウェル底部には、細胞包接時においても大きな空隙が存在し、細胞は 1 個ずつそこにおさまっているものと考えられる。また、バイオレジストの膨潤時のヤング率の測定結果から、細胞を包み込むバイオレジスト自体が、細胞とほぼ同じ柔らかさを有していることが推測される。これらのことから、包接操作時に、膨潤したバイオレジストによって細胞が強く押し潰されることなく、生存し続けることが可能となっていると思われる。



包接型細胞チップでアレイ化した細胞 市販の培養ディッシュ上に播種した細胞

図 13 蛍光 2 重染色による生死判定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Y. Yokoyama, M. Umezaki, T. Kishioka, E. Tamiya and Y. Takamura, Micro- and nano-fabrication of stimulus-responsive polymer using nanoimprint lithography, Journal of Photopolymer Science and Technology, 査読有, Vol.24, 2011, pp.63-70, https://www.jstage.jst.go.jp/article/photopolymer/24/1/24_1_63/_article

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① International Conference on Biofabrication 2011 in TOYAMA
- ② The 28th International Conference of Photopolymer Science and Technology (ICPST-28)
- ③ ナノインプリント技術の開発とその応用 (応用物理学会 北陸・信越支部セミナー) (招待講演)
- ④ 第 6 回ナノインプリント技術研究会 (応用物理学会) (招待講演)
- ⑤ 第 56 回高分子討論会 (依頼講演)
- ⑥ 22nd International Microprocesses and Nanotechnology Conference
- ⑦ 第 70 回 応用物理学会 学術講演会

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 横山義之、他、加工技術研究会、コンバーテック、2009、64
- (2) 横山義之、他、シーエムシー出版、ナノインプリントの開発とデバイス応用、2011

〔その他〕

<http://www.itc.pref.toyama.jp/>
(所属機関 HP)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 義之 (YOKOYAMA YOSHIYUKI)
富山県工業技術センター・機械電子研究所・主任研究員
研究者番号: 60416454