

生体材料の微細パターン形成とその応用に関する研究

電子技術課 横山義之 牧村めぐみ

北陸先端科学技術大学院大学 民谷栄一 富山県新世紀産業機構 山村昌平

1. 緒 言

近年、DNAチップに代表されるように、一つのチップ上に、DNAやタンパク質(抗体・酵素)、細胞などの生体材料を配列・集積化したデバイス(バイオチップ)が注目を集めている。生体個々が有する多様な生命現象(遺伝、免疫応答、神経伝達等)を理解する上で、これらのバイオチップを用いた網羅的な同時計測法は、きわめて有効な解析手段になると期待されている。

また、生体の失われた組織(皮膚、肝細胞、神経)を人工的に基板上で培養し再生を目指す再生医療工学も同時に大きな脚光を浴び始めている。細胞を数 μm オーダーで配列、集積化することによって、成長・増殖を任意に制御できれば、より高度な細胞集団(組織体)の再生も可能になると期待される。

本研究では、*N*-イソプロピルアクリルアミドポリマー(NIPAAm)の温度応答性に注目し、検討を行った。NIPAAmは、 32°C を境にして疎水性から親水性へと極性が大きく変化し、生体材料の接着・非接着を制御することができる。そこで、NIPAAmをリソグラフィー技術によって微細パターンニングする技術を開発し、さらに、NIPAAmへの生体材料の接着・非接着作用を利用して、間接的に生体材料を微細パターンニングすることを試みた。

2. 実験方法

2. 1. 架橋可能なNIPAAmポリマーの合成

N-イソプロピルアクリルアミドモノマーとヒドロキシエチルアクリレートモノマーを80:20のモル比でラジカル共重合し、水酸基を有するNIPAAm共重合体を合成した。NIPAAm共重合体と、2つのエポキシ基を有する架橋剤、架橋触媒とを100:20:0.2の重量比でジASETンアルコールに溶解し、塗布溶液を作製した。調整した溶液組成を図1に示す。

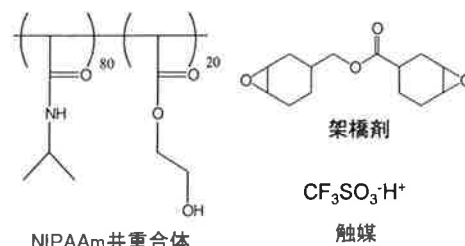


図1 : NIPAAm溶液組成

2. 2. NIPAAmシートの作製

ガラス基板を O_2 プラズマで洗浄し、さらに末端にエポキシ基を有するトリメトキシシランで表面処理を行った。次に、NIPAAm塗布溶液をスピコートし、膜厚 500nm のNIPAAmシートを作製した。 120°C で5分間加熱処理を行い、膜内部および膜-基板間で架橋反応を進行させた。これにより、水や有機溶剤(レジスト溶剤)に対し不溶化したNIPAAmシートを得た。

2. 3. レジスト重ね塗りによるパターンニング

フォトレジスト(OFPR-800:東京応化)を膜厚 $2\mu\text{m}$ となるようにNIPAAmシート上にスピコートし、重ね塗りをを行った。次に、フォトリソグラフィーによって、レジスト層に細胞サイズの微細な穴を多数作製し、そこからNIPAAmを露出させた。

2. 4. 感光性を有するNIPAAmの開発

NIPAAm共重合体と、架橋剤、光酸発生剤(光が当たった領域でのみ超強酸が発生し、架橋反応を触媒する試薬)を100:20:5の重量比でジASETンアルコールに溶かし、感光性を有するNIPAAm塗布溶液を作製した。

3. 結果及び考察

3. 1. 合成したNIPAAm共重合体の特性

合成したNIPAAm共重合体の温度応答性を検討した。NIPAAm共重合体、及びNIPAAmホモポリマーの種々の温度における水に対する溶解性を分光光度計を用いて測定した(濁度測定)。 32°C 以上で急激に不溶化し相転移を示すホモポリマーに対して、共重合体は、若干高い3

4℃付近で相転移を示すものの、温度応答性は充分維持していることがわかった。

3. 2. NIPAAmシートの熱架橋反応

NIPAAmシートの熱架橋反応を赤外分光法により確認した。図2に、加熱処理前・後の赤外吸収スペクトルを示す。加熱処理によって、エポキシ基に帰属されるピークが減少し、架橋反応が加熱によって進行していることが確認できた。

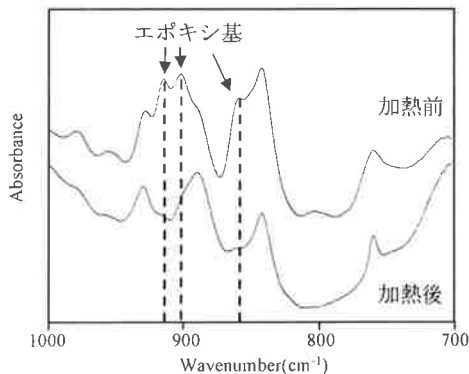


図2：加熱前・後の赤外吸収スペクトル

3. 3. NIPAAmへの細胞の接着・剥離

NIPAAmシート上に重ね塗りをしたレジストに、直径20μmの微細な穴を形成し、そこからNIPAAmを露出させた。このチップを用いて、細胞（リンパ球）の接着、剥離の制御を試みた（図3）。チップ温度を高温（35℃）に保持すると、NIPAAm表面が露出している穴の領域に、細胞を接着させることができた。また、チップ温度を低温（20℃）に保持すると、細胞は剥離し始め、簡単な洗浄で全て洗い流すことができた。

次に、細胞とほぼ同じサイズ（直径8μm）の穴を有するチップを作製し、細胞の接着を試みると、直径8μmのNIPAAmの領域に、それぞれ1個ずつの細胞を個別に固定することができた。

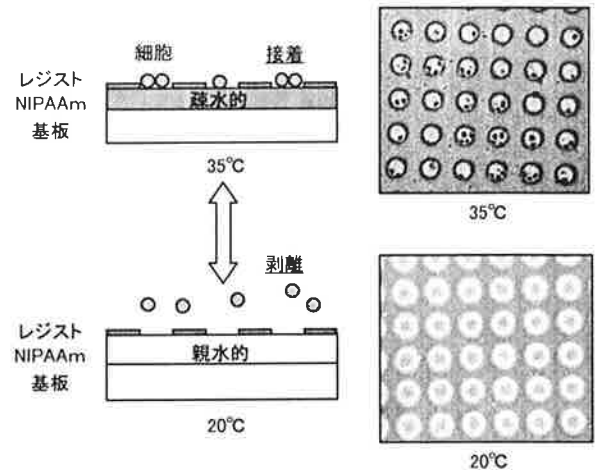


図3：NIPAAm部への細胞の接着・剥離

3. 4. NIPAAmの直接パターンニング

レジスト重ね塗り工程を省くために、直接フォトリソパターニングが可能なNIPAAmの開発を試みた。細胞の顕微鏡観察時の妨げにならないように400～600nmの光に対して透明で、蛍光を発しないように設計した。水銀ランプによる露光実験において1μmの微細パターンを解像し、高いリソ特性を有していることがわかった（図4）。

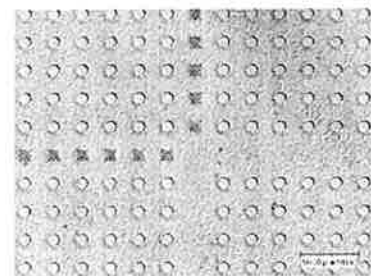


図4：NIPAAmの直接パターンニング

4. まとめ

生体材料の接着・非接着を温度で制御できる高分子を、リソグラフィ技術によって基板上にパターンニングする手法を開発した。細胞サイズにNIPAAmをパターンニングしたチップを用いて、細胞を間接的にパターンニングすることができた。

キーワード：温度応答性ポリマー、NIPAAm、細胞チップ、レジスト、生体材料

Fabrication of Micro-pattern of Biomaterials using Thermo-responsive Polymer

Yoshiyuki YOKOYAMA, Megumi MAKIMURA, Eiichi TAMIYA, and Shohei YAMAMURA

A NIPAAm copolymer that is cross-linked by heat after the spin-coat was developed. The cells' attachment and detachment even from the NIPAAm film cross-linked on the substrate was controlled by changing the temperature. The attachment and detachment of a certain number of cells was controlled on the chip that was multi-coated with resist and had holes of 20 micrometers. Moreover, micrometer patterns of NIPAAm were made on the chips by using the newly developed NIPAAm based resist, directly.