光応答性ポリマー材料表面の in situ 局所制御

須丸 公雄*, 金森 敏幸*

* (独)産業技術総合研究所 バイオニクス研究センター (〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1-1 つくば中央第 5)

In Situ Control of Photo-Responsive Polymer Surface

Kimio SUMARU* and Toshiyuki KANAMORI*

*Research Center of Advanced Bionics, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 5 th, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8565)

Keywords : Photo-Responsive Polymer, Light Irradiation, Cell Patterning, Hydrogel

1. はじめに

光照射によって化学構造が変化し、それにともないその性質も変化する分子材料はフォトクロミック材料と呼ばれ、特に可逆的な変化を示すものとしては、スピロピラン類、アゾベンゼン類、ジアリールエテン類などが知られている¹⁾。局所的・遠隔的・即時的に作用させることのできる光によって制御できることから、これらの応用に関する研究がさまざまな分野で盛んに行われ、その一部は CD-R や DVD-R などの光記録媒体としてすでに広く実用化されている。また、ポリマー材料をこうしたフォトクロミック材料で修飾し、その物性に光応答性を付与する試みも古くからなされ、数々の興味深い研究結果が報告されている^{2),3)}。本稿では、光応答性ポリマー材料の表面物性に関する最近の研究動向について、細胞接着性および表面形状の光制御を目指した筆者らの試みを中心に概説する。

2. 基材表面の細胞接着性

動物細胞は浮遊性と足場依存性の 2 つに大別され、そのほとんどは組織や器官を構成する足場依存性細胞で占められている。生体内 (*in vivo*) においてこれらは、何らかの「足場」に接着した状態でのみ細胞固有の機能を発現し、これらを生体外 (*in vitro*) で生存させるためには、培養ディッシュなどの細胞接着性に富む基材の上で培養する必要がある。その培養基材としては、一般的にポリスチレンやポリオレフィンなどのポリマー材料が用いられるが、多くの場合、必要な細胞接着性を得るために、コロナ放電やタンパクコートなど、何らかの表面処理を施したものが用いられる。また、ポリエチレングリコール (PEG) やポリアクリル酸といった水和性の高いポリマーを担持させると、細胞の接着が強く阻害されることが知られている。東京女子医大の岡野らは、温度変化に応答してその水和性が著しく変化する感温性ポリマーからなるゲルを表面に担持した培養基材を開発し、この上で培養された足場依存性細胞を傷めることなく回収する技術を確立した⁴⁾。この技術は再生医療の現場において実際に臨床応用さ

れ、さらに近年、この技術に基づいて設立されたベンチャー企業によって感温性培養基材が上市⁵⁾、刺激応答性ポリマーをバイオ分野に応用した好例として注目されている。

このように、基材表面の細胞接着性とその水和性に大きく依存することは、細胞を用いたこれまでのさまざまな研究によって明らかになっている。上に述べたとおり、光照射によって物性変化を示すポリマーに関する研究は以前からなされており、ポリマー材料の表面の親水性・疎水性を光で制御する試みについても、少数ながら研究報告がなされている⁶⁾。このような状況において筆者らは、光応答性ポリマーの特性を、生きた細胞の接着性をその場で制御する技術に応用することを目指し研究を進め、いくつかの光応答性培養表面の開発に成功している。それらの中から以下では、培養環境下で光照射するだけで、細胞接着阻害性を解除することが可能な光追記型培養表面について、最近的研究成果を紹介させていただく。

3. 光追記型培養表面

この培養基材は、細胞接着阻害性を有する PEG (上述) を、ニトロスピロピランで修飾された光応答性ポリマー (pNSp-MMA) を介して表面に固定化したものである (図 1)。ニトロスピロピランはフォトクロミック分子材料の一つであり、波長 365 nm の紫外光照射によって水和性の高い構造に変化することが知られている。水や培地の中でこの基材に光を照射すると、光応答性ポリマーの水和性が増加して膨潤、基材表面に担持されていた PEG が解放されることにより、細胞が接着できるようになる^{7),8)}。この基材表面に細胞分散液を導入すると、先に照射した領域に選択的に細胞が接着、引き続き培養することで細胞は照射域の範囲内で増殖する。何らかのパターンに沿って局所的に光照射を行えば、そのパターンに沿って細胞が配置され、いわゆる細胞パターンニングを簡便に行うことができる。PEG の細胞毒性はかなり低く、細胞融合などを行う場合に高濃度で添加されても、あまり細胞活性を損ねないことが知られている上、基材表面に担持されている PEG は極めて微量で、光照射によって培地中に移行

図1 光追記型培養表面における細胞接着阻害の光解除

したわずかな PEG も、細胞播種前に洗い流すことで取り除かれる。また、さらなる化学的な処理が不要なので、すでに細胞がパターンに沿って培養されている状態においても、これらの細胞にほとんどダメージを与えることなく、あとから光照射を行うことにより細胞接着領域を追加すること(光追記)が可能である。

培養環境中で細胞接着が自在に制御できるこうした利点を最大限に利用するためには、顕微鏡観察しながら視野の任意の領域に光照射する手段が必要となる。そこで筆者らは、エンジニアリング・システム(株)と共同で、パソコンによって制御可能なパターン照射ユニットと CCD ユニットの倒立型生物顕微鏡の光学系に組み込み、微小パターン照射システムを独自に開発した^{9),10)}。微小パターン照射ユニットは水銀ランプを光源とし、DMD 方式で所定のパターンを投影、顕微鏡の対物レンズを通じて、ミクロンスケールの精度で任意のパターンを観察する対象に照射する。また、CCD ユニットの撮影領域と照射ユニットの照射領域をプログラム上で対応させることにより、パソコンのモニタに映し出された観察像の上でマウスを用いて照射したい領域を自由に指定し、ステージ上に置かれたサンプルの対応する個所に光照射することもできる。図2は、この微小パターン照射システムを用いて、予め幅 $80\mu\text{m}$ の線状パターンで照射した光追記型培養表面に、MDCK(イヌ腎臓由来)細胞を播種し、数時間培養してから非接着の細胞を除去、さらに半日程度培養した後の細胞の様子を示している。局所的な光照射によって細胞が接着可能になった領域は、強い細胞接着阻害性を示す PEG で囲まれており、接着している細胞はその後数日間培養した後もそこに安定に閉じこめられることが確認された。

さて、足場依存性細胞と一口に言っても、その形状、大きさ、接着性はまさに千差万別で、1種類の光追記型培養基材を用いて、それらの接着性を同様に光制御することは難しい。しかし、この培養基材の細胞接着性は、基材上に担持させる PEG の量および分子量を変えることにより、容易にチューニングすることが可能で、扱う細胞に応じて適当なものを用いれば、たいいていの足場依存性細胞をこの方法でパターンニングすることができる。筆者らによるこれまでの検討の結果、上述の MDCK に加えて、研究室で保有するすべての足場依存性細胞(CHO, HeLa, HepG 2, MEF, 3 T 3)に、同様の光追記型培養表面による細胞接着制御が適用できることを

図2 光追記型培養表面上にパターンニングされた MDCK 細胞

確認している。また、このような細胞パターンニングは、足場依存性細胞の特性を解析する手段として、以前から盛んに検討されているが、従来技術では細胞播種後にパターンを変更することが原理的に不可能であるのに対し、この手法では、細胞接着領域を培養環境下で自在に追加することが可能なので、この操作を繰り返すことにより、複数種類の細胞を任意のパターンに配列して共培養する系を、容易に構築することができる。このことを示すデモンストレーションとして筆者らは、予め染め分けた CHO-K 1 細胞を、この培養基材と前節で述べた光照射装置を用い、異なる細胞をそれぞれ異なるパターンに沿って配列させて、これまでにない共培養系が実現できることを初めて実証した^{11),12)}。細胞と細胞、あるいは細胞と基材の間の相互作用が、生体組織としての細胞の機能発現において非常に重要であるが、こうした共培養系の構築は、細胞培養の環境をより生体内の環境に近づけうる有効な手段であると考えられる。

4. 材料形状の光応答

ポリマー材料の表面物性に加えて、その形状を光で制御する研究も盛んに行われている。とくにフォトニック材料の研究分野においては、アゾベンゼンを含むポリマー薄膜(常温で固体)の表面形状が光照射によって変化する現象が、材料表面の形状を任意制御する要素技術として注目されている。強度や偏光状態にサブミクロンスケールの分布を有する光を照射すると、その分布に沿った凹凸レリーフが薄膜表面に形成されるこの現象は、1995年に発見されて以来^{13),14)}、現在もさまざまな応用に向けて盛んに研究が行われている^{15),16)}。その形成メカニズムの全容はまだ明らかになっていないが、フォトクロミック色素であるアゾベンゼンの光異性化にともなう構造や分子間相互作用の変化、ポリマーの熱運動といった分子レベルで物質移動が起こる素過程によることが推察されている。こうしたサブミクロンスケール形状変化においては、分子レベルの物質移動が重要な役割を果たしうることが、こうした素過程に基づく物質移動は非常に遅く、現実的な制御時間(数分以内)の間に、数 μm 以上のマクロな形状変化をもたらすためには、光によってバルク的な体積変化が引き起こされる必要がある。

筆者らは、感温性ポリマーであるポリ(*N*-イソプロピルア

クリルアミド)を、フォトクロミック分子であるスピロピランで修飾して調製した光応答性ポリマーが、酸性水溶液中において顕著な光応答性脱水を示すことを見出した^{17),18)}。酸性水溶液中暗所下において、スピロピラン残基のほぼすべてが開環化・プロトン化し、鮮やかな黄色を呈する一方で、波長 436 nm の青色光を照射すると色素残基がプロトン解離をともなって閉環化して無色となる。30°C前後の温度では、スピロピラン残基のこの構造変化がポリマーネットワーク全体の脱水和を誘起、色素導入率がモノマー分率でわずか 1 mol%程度であるにもかかわらず、顕著な相分離が引き起こされるのである。さらにこのポリマーからなるハイドロゲルを調製、酸性水溶液中で膨潤させた状態のゲルに青色光を照射すると、25°Cから 30°Cの温度範囲では素早く収縮すること、その後暗所下で放置すると徐々に元の状態に戻り、同様の光応答収縮を繰り返し行えることが、これまでの我々の研究によって確認されている(図 3)^{8),19),20)}。これほど素早く顕著な体積変化を可視光照射によって可逆的に誘起できるハイドロゲルはこれまでに報告例がなく、マクロな形状変化を光で誘起できる特性を活用したさまざまな応用が期待されている。

5. ゲル表面の 3 次元形状の光自在制御

そこで筆者らは、このポリマーからなる厚さ 250 μm のゲルシートを、メタクリル基を表面に有するガラス基板上で in situ 重合することにより調製した。ゲルシートの片面はガラス基板の表面に固定されているため、酸性暗所下で膨潤させたシートの局所領域に光照射を行うと、その部分のみでゲルシートの高さが減少することが期待される(図 4)。微小パターン光照射装置を用いて、所定のパターンで光照射を行った結果、わずか 1 秒程度の光照射によって、シート表面に明瞭な凹凸レリーフ像が刻まれることが確認された(図 5)²²⁾。光照射域におけるゲルシートの厚さの経時変化を調べたところ、光照射直後にゲルは収縮を開始、数分の間にゲルシートの厚さが元の約半分にまで減少することが明らかになった。その後 10 分程度収縮状態を安定に保持した後、照射によって異性化したスピロピランが熱的に元の開環プロト

ン化体に戻るのにもない、約 2 時間かけて元の厚さまで回復した²¹⁾。収縮状態の領域に対して適当なインターバルで光照射を繰り返すか、連続的に照射し続けるか(この場合は強度はかなり低くてよい)することで、その状態を永続的に保持することが可能である。また、回復後のゲル表面に再びパターン光を照射することにより、全く異なる形状を刻むこともできる。 μm レベルの精度で明確に刻まれ、照射後安定に保持される凹凸形状は、ゲルシートの収縮が単なる光熱変

図 4 光応答性ゲルシート厚さの光照射による局所制御を示す模式図

図 3 光応答性ポリマーからなる架橋ハイドロゲルの構造と光応答収縮を示す模式図

図 5 パターン光照射によって光応答性ゲルシート表面に形成した微小レリーフ

図6 多階調パターン光照射による微小レリーフの形成過程

換(「ヒートモード」)による熱的相転移に基づくものではなく、スピロピランの光異性化に基づく純粋な「フォトンモード」のプロセスであることを明らかに示している。

さらに3次元形状の自在制御性を実証するために、多階調の光照射による表面形状の制御も行った。その結果を図6に示す。まず、酸性水溶液中暗所下で膨潤させたゲルシートに対して、所定のパターンに沿って光照射を行うと、上述の通り照射域で局所的に収縮が生じた(図6上)。その後別のパターンに沿って光照射を行うことによって、合計3通りのエネルギー密度で照射された領域をゲルシート上に形成、3階調の高さからなるレリーフ像が形成できることが確認された(図6下)。照射回数を増やす、あるいは、多階調の強度分布を有するパターンの照射を行うことで、さらに精密な形状制御を行うことが可能である。現在、こうした材料形状の局所制御性を利用して、細胞などの微小な対象の独立・並列的操作、マイクロ流体システム中における物質移動の自在制御など²²⁾への応用についても研究を進めている。

6. おわりに

昨今、細胞工学の急速な伸展にともなって細胞操作のニーズがますます多様化し、新たな細胞操作技術に対するニーズがにわかに高まっている²³⁾。また、反応・分析装置をチップ上に構築し、集積化によってシステムを小型化することに加え、 μm スケールの微小な系に固有の化学プロセスの有用性

を積極的に活用する試みが、盛んになされている^{24),25)}。上述の通り、光は対象に対して局所的・遠隔的・即時的に作用させることができる唯一の制御手段であり、これによって物性が制御される機能性表面は、細胞や微粒子、マイクロバルブといった多数の微小な対象を独立かつ並列的に制御する上で、重要な要素技術となることが大いに期待される。

謝 辞

本研究は、科学技術振興機構(JST)大学発ベンチャー創出推進事業(平成17年度採択課題)および平成17年度NEDO産業技術研究助成事業の助成を受けて行われた。

(2007-7-2 受理)

文 献

- 1) 入江正浩; 高分子, **47**, 449 (1998).
- 2) M. Irie, M. and D. Kungwachakun; *Macromolecules* **19**, 2476 (1986).
- 3) R. Kroger, H. Menzel and M. L. Hallensleben; *Macromol. Chem. Phys.* **195**, 2291 (1994).
- 4) 岡野光夫, 大和雅之; 日経サイエンス, **33**, 43 (2003).
- 5) <http://www.cellseed.com>
- 6) H. Akiyama and N. Tamaoki; *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, **42**, 5200 (2004).
- 7) Y. Tada, K. Sumaru, M. Kameda, K. Ohi, T. Takagi, T. Kanamori and Y. Yoshimi; *J. Appl. Polym. Sci.*, **100**, 495 (2006).
- 8) 須丸公雄; ケミカルエンジニアリング, **51**, 378 (2006).
- 9) 須丸公雄; 医学のあゆみ, **218**, 129 (2006).
- 10) K. Sumaru, J. Edahiro, Y. Ooshima, T. Kanamori and T. Shinbo; *Biosens. Bioelectron.*, **22**, (9), 2356 (2007).
- 11) 須丸公雄, 金森敏幸; 動物実験代替のためのバイオマテリアル開発(酒井康行編), シーエムシー出版, 印刷中.
- 12) 須丸公雄, 金森敏幸; レーザー研究, 印刷中.
- 13) P. Rochon, E. Batalla and A. Natansohn; *Appl. Phys. Lett.*, **66**, 136 (1995).
- 14) D. Y. Kim, S. K. Tripathy, L. Li and J. Kumar; *Appl. Phys. Lett.*, **66**, 1166 (1995).
- 15) N. Zettsu, T. Fukuda, H. Matsuda and T. Seki; *Appl. Phys. Lett.*, **83**, 4960 (2003).
- 16) C.-D. Keum, T. Ikawa, M. Tsuchimori and O. Watanabe; *Macromolecules*, **36**, 4916 (2003).
- 17) K. Sumaru, M. Kameda, T. Kanamori and T. Shinbo; *Macromolecules*, **37**, 4949 (2004).
- 18) K. Sumaru, M. Kameda, T. Kanamori and T. Shinbo; *Macromolecules*, **37**, 7854 (2004).
- 19) K. Sumaru, K. Ohi, T. Takagi, T. Kanamori and T. Shinbo; *Langmuir* **22**, 4353 (2006).
- 20) 須丸公雄; 膜, **30**, (3) 132 (2005).
- 21) A. Szilagyi, K. Sumaru, S. Sugiura, T. Takagi, T. Shinbo, M. Zrinyi and T. Kanamori; *Chem. Mater.*, **19**, 2730 (2007).
- 22) S. Sugiura, K. Sumaru, K. Ohi, K. Hiroki, T. Takagi and T. Kanamori; *Sens. Actuators A*, in press.
- 23) 岡野栄之, 阿形清和; 細胞工学, **19**, 368 (2000).
- 24) 北森武彦, 庄子習一, 馬場延信, 藤田博之; マイクロ化学チップの技術と応用(丸善, 2004)
- 25) T. Thorsen, S. J. Maerkl and S. R. Quake; *Science*, **298**, 580 (2002).