

## スンプ法によるセルロイド製単一細胞分離チップの製作

○松谷晃宏 東京工業大学 技術部マイクロプロセス部門

高田綾子 東京工業大学 技術部バイオ部門

### 1. はじめに

単細胞解析技術は、細胞の機能を明らかにすることや医療アプリケーションに必要とされる技術である。従来の生化学的技術、すなわちバルク分析は、多数の細胞から得られた平均値のみを提供することができる。我々はこれまで、多くのマイクロピラーからなる構造を持つマイクロ囲いアレイを用いて細菌の単一細胞分離を行った[1]。この構造は、細胞の位置決めを可能にするものである。従って、このマイクロ囲い構造を用いることにより、個々の細胞を同定しながら細胞解析を行うことができる。我々は、以前の研究で、このマイクロ囲い構造が酸素プラズマによる大腸菌細胞のサイズ変化を測定するために使用できることを実証した[2]。

しかしながら、このマイクロ囲いは、電子ビーム(EB)リソグラフィおよびドライエッチングのような半導体プロセス技術によって GaAs 及び InP のような半導体基板上に製作していた。微生物分析の分野へのマイクロ囲いの応用のためには、マイクロ囲いアレイ構造のより単純な製作プロセスが必要である。

我々は、Suzuki's universal micro-printing (スンプ, SUMP)法[3-5]を簡単なマイクロ囲いの製作方法に応用できるのではないかと着目とした。スンプ法は、セルロイドプレート上にサンプルのレプリカを形成する技術である。この方法は 1930 年に発明されたが、現在のナノインプリント技術と非常によく似ている。スンプ法はまた、ポリ(ジメチルシロキサン)(PDMS)を使用するレプリカ製造プロセスにも類似している。しかし PDMS のプロセスにおいては、脱泡および硬化が必要であり、これには長い時間がかかる。一方、スンプ法では、脱泡および硬化の工程が不要であり、処理時間が非常に短い。したがって、スンプ法による製造のスループットは非常に高いということになる。我々は、石英製のナノインプリントテストモールドを用いてスンプ法により 200nm パターンをセルロイドプレートに転写し、スンプ法の精度が非常に良いということも確認している。図 1 は著者の松谷が、40 年前にスンプ法により製作したムラサキツユクサの気孔の標本の光学顕微鏡画像を示す。スンプ法で作製した試料は耐久性に優れていることが分かる。従って、マイクロ囲いアレイチップを形成するための顕微鏡的に精密なレプリカ成形方法として、スンプ法を用いることができると考えられる。

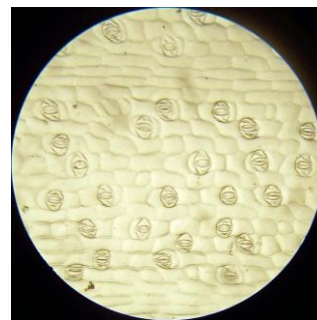


図 1 40 年前にスンプ法により製作されたムラサキツユクサの気孔の標本の光学顕微鏡画像[7]。

本稿では、スンプ法で形成されたマイクロ囲いを用いた酵母細胞の単一細胞分離を報告する。

### 2. スンプ法によるセルロイドマイクロ囲いの製作

図 2 に、スンプ法を用いたマイクロ囲いアレイの製作のプロセスフローを示す。モールド材料として Si(100)基板を用いた。まず、Cr 膜をスパッタ成膜した後、図 2(a)に示すように、リソグラフィによりフォトリソにマイクロ囲いアレイパターンを形成した。1つの微小囲いのサイズは、2 $\mu\text{m}$ のスペースと直径2 $\mu\text{m}$ のピラーからなる8 $\times$ 8 $\mu\text{m}^2$ とした。次に、図 2(b)に示すように、CF<sub>4</sub>プラズマを用いた反応性イオンエッチング(RIE, Samco RIE-1)により、マイクロ囲いをエッチングした[6]。CF<sub>4</sub>の流量は 25sccm, プロセス圧力は 0.1Torr, RF パワーは 100W とした。エッチング深さは約 2 $\mu\text{m}$ であった。図2(c)は、上述の方法によって製造されたモールドの写真を示す。図2(d)に示すように、薄いプラスチックプレート(セルロイド, スンププレート B)に酢酸アミルを滴下し、表面をわずかに溶解させた。図2(e)に示すように、マ

マイクロ囲いアレイのモールドをプラスチックプレートに圧入し、マイクロ囲い構造のレプリカを形成した。圧力測定フィルム (Fujifilm, Prescale) を用いて測定したこのスンププロセスの圧力は 0.25MPa であった。3 分間乾燥させた後、図 2(f) および 2(g) に示すように、マイクロ囲いモールドをピンセットで取り外す。最後に、セルロイド板をスライドガラス上に載せ、酵母細胞懸濁液を、図 2(h) に示すように、セルロイドマイクロ囲いアレイに滴下する。

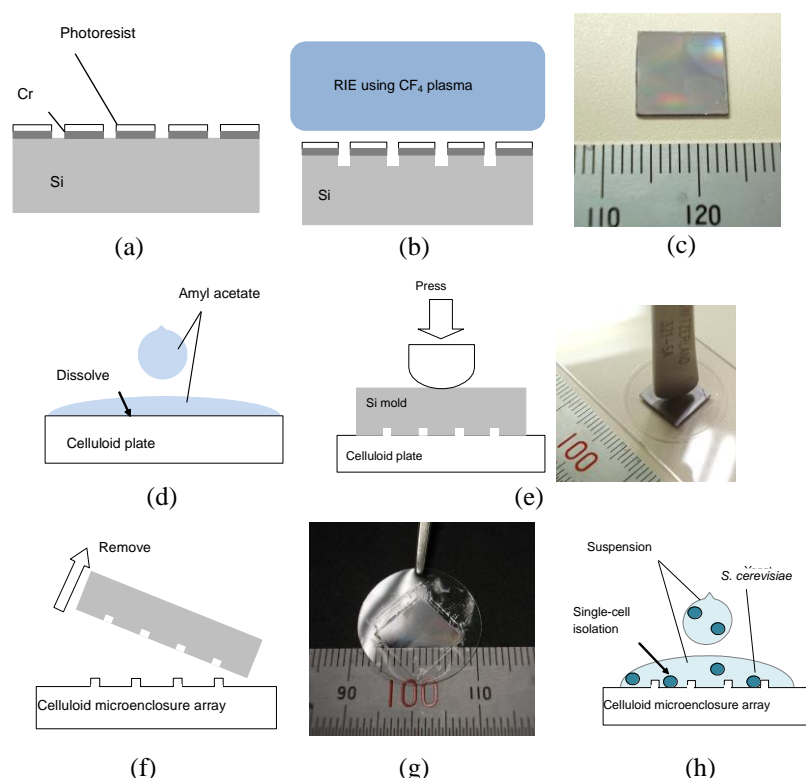


図 2 スンプ法を用いたマイクロ囲いアレイの製作のプロセスフロー[7].

### 3. セルロイドマイクロ囲いによる単一細胞分離

図 3 に、スンプ法によって形成されたマイクロ囲いアレイによって単一細胞分離された酵母細胞の光学顕微鏡画像を示す。酵母細胞の濃度は  $1 \times 10^4$  細胞/ml である。懸濁液を滴下する前に、マイクロ囲いの表面を酸素プラズマで親水化した。これらの結果から、スンプ法によって形成されたプラスチックマイクロ囲いアレイを用いて酵母細胞の単一細胞分離が達成されたことが実証された。

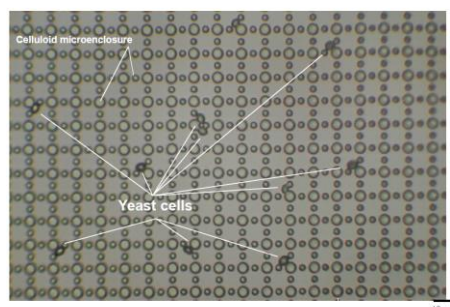


図 3 スンプ法によって形成されたマイクロ囲いアレイによって単一細胞分離された酵母細胞の光学顕微鏡像[7].

### 4. まとめ

スンプ法により形成されたセルロイドマイクロ囲いアレイを用いて、酵母細胞の単一細胞捕獲を実証した。我々は、この簡単な技術が単一細胞トラップと細菌細胞の解析に非常に有用なものと考えている。

本研究は JSPS 科研費 26390037 の助成を受けた。なお、本稿の科学的な内容は筆者らの投稿論文[7]に基づいている。

### References

- [1] A. Matsutani and A. Takada: Jpn. J. Appl. Phys. **49** (2010) 127201.
- [2] A. Matsutani and A. Takada: Jpn. J. Appl. Phys. **51** (2012) 087001.
- [3] 鈴木純一, 特許第 88353 号 (1930).
- [4] 鈴木純一, 応用物理 **5** (1936) 279.
- [5] H. R. Bullock: Trans. Am. Microsc. Soc. **79** (1960) 167.
- [6] A. Matsutani F. Koyama, and K. Iga: Jpn. J. Appl. Phys. **30** (1991) 428.
- [7] A. Matsutani and A. Takada: Sensors and Materials, **30** (2018) 149.