

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25630094

研究課題名(和文) 焦点接着斑を介した単一細胞との力学的な双方向マイクロインターフェースデバイス

研究課題名(英文) Mechanical interactive micro interface device with the single cell through the focus desmosome.

研究代表者

南 和幸(MINAMI, Kazuyuki)

山口大学・創成科学研究科・教授

研究者番号：00229759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞に伸展刺激を与えると共に細胞の牽引力を測定できるマイクロデバイスの実現性を明らかにするため、ビーズなどのマイクロマーカーを配列したシリコンチャンバーを備えた細胞伸展デバイスの製作プロセスを考案し、試作のための加工プロセスの開発を行った。ビーズ配列プロセスにおいては、基板とビーズの表面処理法の妥当性を確認し、ある程度のビーズ配列に成功したが、ビーズの凝集を確実に解消するプロセスの確立が必要であることが分かった。また、配列したビーズを包埋したシリコンチャンバー製作プロセスを開発し、ビーズを包埋したシリコンチャンバーの製作が可能であることも確認した。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the feasibility of the micro device which can give a cell extension stimulation and can measure the traction force of the cell, the fabrication process of the cell extension device having the silicone chamber embedding arranged beads as a micro marker was devised, and the fabrication processes were developed for trial manufacture. In the beads arrangement process, the validity of the surface treatment methods of beads and substrate are identified, and it succeeded in some beads arrangement. However, it was seen that the establishment of the process to surely break off the cohesion of beads was necessary. In addition, the fabrication process of silicone chamber that embedded the arranged beads was developed, and it was confirmed that the fabrication of the silicone chamber that embedded beads was possible.

研究分野：微小機械学

キーワード：バイオメカニクス バイオMEMS 微小構造体 マイクロマシニング

1. 研究開始当初の背景

(1)細胞は周囲の変形や力学的刺激を、接着斑を通して感知し、それに対応して様々な応答をしていると考えられている。周囲の環境に対する細胞応答の解明は、純粋に生物学的な細胞機能の理解という視点からだけではなく、医学的には再生医療における細胞から組織・臓器を再構築するための手法の開発、工学的には生体を真似たバイオメテックな機械、あるいは細胞そのものを用いたバイオセンサや細胞と機械を協働させたシステムの実現などの視点からも切望されている課題である。

(2)これまで変形可能なフィルム上に、さらに変形が容易なシリコンゴム製の微小柱の2次元配列上で細胞を培養し、微小柱の傾きから接着斑に発生する細胞の牽引力を測定する試みが盛んに行われている。しかし、人為的に限定された接着場所にしか接着できないため、自然な状態において細胞が持っている本来の応答を測定できない問題がある。

(3)本研究代表者らは、伸展刺激を受ける細胞のリアルタイムその場観察を可能とする細胞伸展マイクロデバイスを開発し、このデバイスを用いて伸展変形を受ける単一細胞の変形挙動を詳細に観察できることを示した。しかし、細胞が応答した時の牽引力を測定することは出来なかった。国内外の研究では、リアルタイムで単一細胞に力学的刺激を与えながら連続観察できるデバイスは本申請者らが開発したデバイスのみであるので、このデバイスを基にした新たな測定用デバイスを開発することが力学的刺激と力学的応答(牽引力)をリアルタイムで同時に測定する手法を実現する唯一の可能性であるため、本研究課題を計画した。

2. 研究の目的

本研究課題の最終目標は、細胞の焦点接着斑を介した周囲の力学場の感知・応答特性の評価、さらには細胞と細胞外システム間における双方向の力学的情報伝達を実現するマイクロインターフェースデバイスを提供することであり、本研究では細胞の力学的な応答等を計測できる新規なマイクロインターフェースデバイス(以下マイクロデバイス)を提案・設計し、微細加工技術の開発、試作評価により、提案するマイクロデバイスの実現可能性、有用性および実用化に向けた今後の課題を明らかにすることを目的とした。マイクロデバイスは以下の特徴を有する。

- (1)細胞の自然な接着状態における焦点接着斑に発生する細胞の牽引力をリアルタイムで測定可能
- (2)(1)と同時に接着斑間に力学的刺激=相対変位(接着している足場の変形、ひずみに相当)を付与可能
- (3)培養中の単一細胞を光学顕微鏡下におい

てリアルタイムで連続観察評価可能

3. 研究の方法

(1)マイクロデバイスの構造設計とプロセス設計

マイクロデバイスの基本的な設計方針を決定し、マイクロデバイス全体の全体設計と微細加工プロセスの設計を行う。構造設計にはFEM解析なども用いる。適切なデバイス構造と微細加工プロセスを選定すると共に、新たに開発すべき微細加工プロセスなどの課題を明らかにする。

(2)微小マーカーの創成・配列固定を行う微細加工プロセスの開発

微小マーカーにはパターンニングした厚膜レジスト、マイクロビーズなどを用いる。マイクロビーズの配列には、フォトリソグラフィによる活性分子のパターンニングとそれと反応する微粒子によるセルフアライメント、セルフボンディング(化学結合)を利用する。

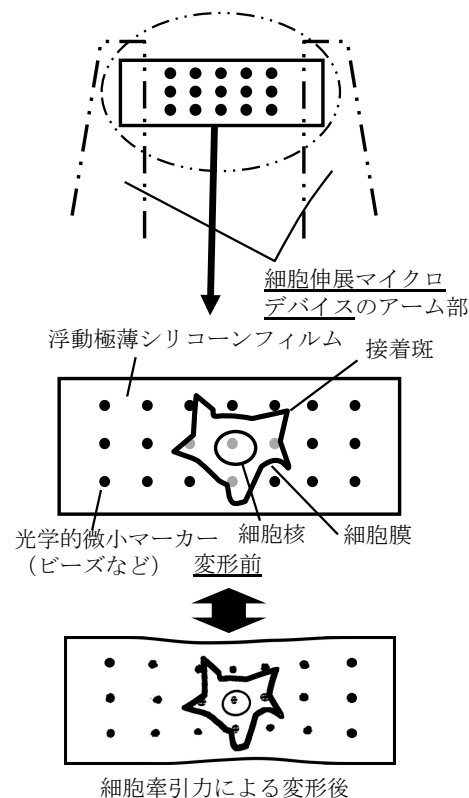
(3)極薄シリコンゴムの微細加工プロセスの開発

固定された微小マーカー上への極薄シリコンゴムフィルムの形成プロセス、およびシリコンゴム微細パターン加工プロセスの開発を行う。極薄フィルムの製作には、キャスト法法の適用を検討する。

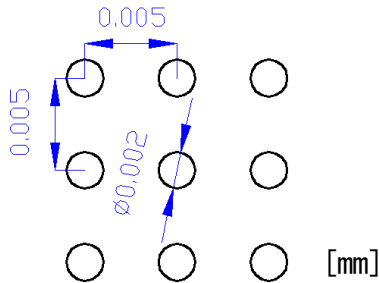
4. 研究成果

(1)マイクロデバイスの構造設計とプロセス設計

設計するマイクロデバイスのイメージ図を下図に示す。



細胞伸展マイクロデバイスにさらに新規な微小マーカー付きシリコンゴムフィルムを組み込んだものである。浮動状態にある極薄シリコンゴムフィルム(厚さ1~5 $\mu\text{m}$ )構造体中に、光学的な微小マーカー(屈折率の異なる、あるいは蛍光を発するビーズなど、直径1~5 $\mu\text{m}$ )を規則正しく密な間隔で配置したものである。下図にマーカー配列用のパターンの一部を示す。

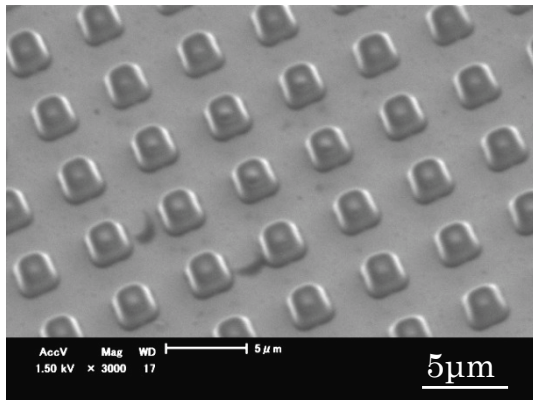


マーカー同士は5 $\mu\text{m}$ 間隔で配列されており、1つのマーカーの大きさは2 $\mu\text{m}$ 程度とした。1つのシリコンチャンバーにつき、61行 $\times$ 221列=13481個の微小マーカーを内包させる。基本的な製作プロセスとして、マーカーの配列、マーカーを埋め込んだシリコンチャンバーの製作、そして細胞伸展デバイスの構造体の製作の順で製作していくこととした。

(2)微小マーカーの創成・配列固定を行う微細加工プロセスの開発

①フォトレジストを微小マーカーに用いた場合

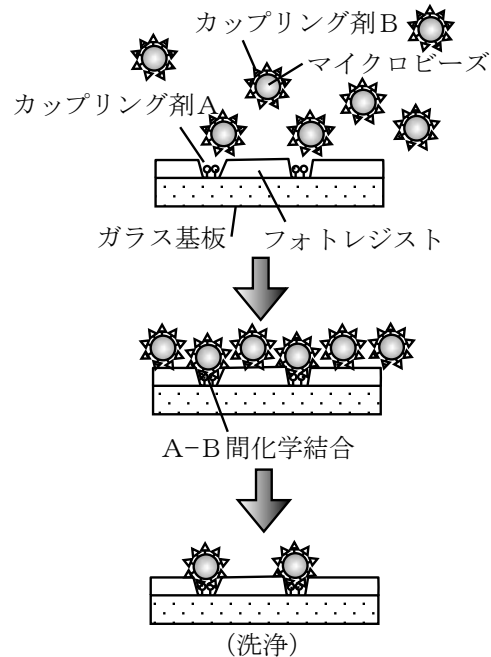
厚膜レジストであるSU-8を微小マーカーに用いた。SU-8は紫外線を吸収し、蛍光を発するためマーカー材料として利用できる。SU-8の露光には上記の微小マーカー配列用パターンを用い、レジスト厚さは5 $\mu\text{m}$ とした、従って直径2 $\mu\text{m}$ 、高さ5 $\mu\text{m}$ の円柱列が形成されることになる。下図に製作したSU-8製マーカーの走査型電子顕微鏡写真を示す。



このマーカーをシリコンチャンバー内に包埋することはできたが、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、蛍光強度が低く、鮮明なマーカー像を得る事が出来なかった。したがって、SU-8レジストはマーカー材料としては不十分であることが分かった。

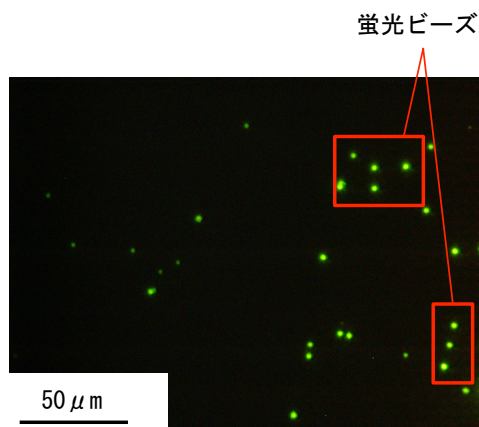
②マイクロビーズを微小マーカーに用いた場合

下図にマイクロビーズを配列させるプロセスの概念図を示す。



ガラス基板上のフォトレジストに前述のパターンを形成する。円の開口部の底のガラス面にカップリング剤Aを結合させ、一方のマイクロビーズにはカップリング剤Bを結合させ、両カップリング剤を化学的に結合させることにより、前述の配列用パターン円の円形部にマイクロビーズを固定する。

配列実験はホウケイ酸ガラスビーズ(直径2 $\mu\text{m}$ )と蛍光シリカビーズ(直径1.5 $\mu\text{m}$ )を用いて行った。ビーズ同士の凝縮により均一にまんべんなく配列させることは出来なかったが、所定の位置にビーズを配列させることの出来ることが分かった。下図に配列した蛍光シリカビーズの蛍光顕微鏡観察像を示す。



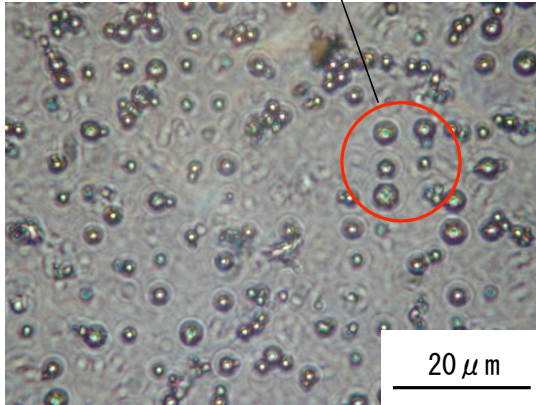
赤枠で囲っているビーズが所定の位置への配列が確認できたビーズである。蛍光強度は十分で、微小マーカーとして使用できることが確認できた。

ホウケイ酸ガラスビーズに関しても、同様の配列実験結果が得られた。

(3) 極薄シリコンゴムの微細加工プロセスの開発

レジストでシリコンチャンバー形状のモールド枠を作り、そこにシリコン液をキャストすることにより、シリコンチャンバーを製作した。下図にホウケイ酸ガラスビーズを包埋したシリコンチャンバーの光学顕微鏡写真を示す。

配列したガラスビーズ



配列したガラスビーズがそのままの状態です。シリコンチャンバーに包埋出来たことがわかる。シリコンチャンバーの厚さ測定の結果、厚さは  $4\mu\text{m}$  であり、高解像の光学顕微鏡観察の行える薄膜が得られた。

(4) まとめ

一部であるがビーズを所定の位置に配列させることが出来たので、製作プロセスの基本的な考え方は正しいことが確認できた。しかし、実験技術上の問題として、ビーズの凝集を十分に改善させる必要がある。物理的に凝集を壊す方法が有効であることが推測されたので、今後は凝集の破壊方法を改善することにより、このデバイスを完成させることが可能と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 福岡 諒、中原 佐、南 和幸、細胞牽引力測定のための微小マーカー付細胞培養マイクロチャンバーの試作、日本機械学会中国四国支部第 54 期総会・講演会 講演論文集 No. 165-1 (CD-ROM)、査読無、講演番号 1013、愛媛大学城北キャンパス (愛媛県松山市)、2016 年 3 月 9 日。

② 宮崎裕考、佐藤克也、中島雄太、南 和幸、細胞牽引力の測定のためのシリコン製マイクロチャンバーの開発、日本機械学会中

国四国支部第 53 期総会・講演会 講演論文集 No. 155-1 (CD-ROM)、査読無、講演番号 708、近畿大学工学部 (広島県東広島市)、2015 年 3 月 6 日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 和幸 (MINAMI, Kazuyuki)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授  
研究者番号：00229759

(2) 研究分担者

佐藤 克也 (SATO, Katsuya)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部・講師  
研究者番号：10403651

中島 雄太 (NAKASHIMA, Yuta)

山口大学・大学院理工学研究科・助教  
研究者番号：70574341

中原 佐 (NAKAHARA, Tasuku)

山口大学・大学院創成科学研究科・助教  
研究者番号：00756968