

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19300161

研究課題名（和文） 神経幹細胞の分化誘導のための微量薬剤放出制御デバイスの構築

研究課題名（英文） Development of Chemical Release Controlling Devices
for Differentiation Induction of Neural Stem Cells

研究代表者

安田 隆 (YASUDA TAKASHI)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：80270883

研究代表者の専門分野：バイオ MEMS

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：マイクロ流体デバイス、マイクロ流路、微小孔、マイクロバルブ、
神経幹細胞、分化誘導

1. 研究計画の概要

本研究の目的は、半導体加工を中心とした MEMS 技術を駆使して、培養細胞に対して局所的な薬剤放出を可能とし、培養チャンバの 2 次元平面上において所望の薬剤濃度分布を形成し得るマイクロ流体デバイスを構築して、これを神経幹細胞の分化誘導技術へ応用することである。具体的には、デバイスの培養チャンバの底面に薬剤放出用の微小孔を多数構築し、その直下に形成したマイクロ流路より微小孔を通じて培養チャンバへ薬剤放出を行う。その際に、マイクロ流路内の流体制御により、培養面内での薬剤放出制御と神経幹細胞及び分化後の細胞への化学的刺激制御を行う。

2. 研究の進捗状況

(1) SOI 基板を両面より微細加工することにより、培養チャンバ直下に内径 500nm の微小孔とマイクロバルブを 2 個×2 個アレイ化し、4 個の独立した薬剤放出サイトを有するマイクロ流体デバイスを構築した。マイクロバルブは、親水性と疎水性の表面張力の違いを利用したものであり、外部圧力により開閉する。この 4 個のマイクロバルブを個別開閉するために、4 個の液体入力用ポートと 1 個の共通の空気入力用ポートに印加する外部圧力の制御方法を実験により導いた。さらに、マイクロバルブの開閉により蛍光色素を微小孔から培養チャンバ内に拡散放出させ、薬剤濃

度分布の時間的及び空間的な変化を評価した。

(2) 培養チャンバ直下に構築したマイクロ流路中に 3 層流から成るシースフローを形成し、各層の流量を制御することにより、チャンバ底面の微小孔アレイからの薬剤放出の時間と位置を制御することが可能なマイクロ流体デバイスを構築した。培養チャンバはシリコン製であり、その底面を厚さ 1 μ m の窒化シリコン薄膜で製作し、内径 2 μ m の微小孔を 24 個×24 個形成した。刺激薬液を両脇からバッファー液で挟んだシースフローを形成すれば、刺激薬液が流れる位置や幅を制御することができる。蛍光色素を用いた実験により、シースフロー形成と薬剤放出の特性評価を行った。

(3) 培養チャンバ表面を細胞非接着面とし神経幹細胞を未分化状態で培養するために、チャンバ表面にポリエチレングリコールを修飾する技術を確立した。実際に神経幹細胞を培養チャンバ内に播種する実験により、細胞がチャンバ表面に接着して分化を起こすことなく、球状の凝集塊であるニューロスフェアを形成することを確認した。さらに、分化誘導因子である牛胎児血清をマイクロ流路から導入することにより、微小孔を通じたニューロスフェアへの薬剤刺激を実施し、血清濃度の違いにより分化速度に違いが現れることを確認した。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(理由)

当初からの目的である、培養細胞に対して局所的な薬剤放出を可能とし、培養チャンバの2次元平面上において所望の薬剤濃度分布を形成し得るマイクロ流体デバイスを構築することには、すでに成功した。また、実際にデバイス上に神経幹細胞を播種して、基礎的な薬剤刺激実験と分化誘導実験を行った。局所的な薬剤刺激制御と分化誘導との相関を求める実験に未着手であるが、これも今年度を実施し、デバイスの有効性を実証するデータを取得する計画である。以上より、本研究はおおむね順調に進展しているものと自己評価する。

4. 今後の研究の推進方策

最初に、これまで実現したデバイスの最適化と詳細な評価を実施する。具体的には、細胞培養ウェルとマイクロ流路の寸法や配置の最適化、蛍光色素を用いた微小孔からの薬剤放出の評価実験、ウェル内での単一ニューロスフェア形成法の確立、分化誘導因子である牛胎児血清による刺激実験を実施する。

次に、ニューロスフェアに対する局所的な薬剤刺激制御による分化誘導実験を実施し、薬剤刺激条件と分化誘導との相関を求め、開発したデバイス及び手法の有効性を実証する。

5. 代表的な研究成果

(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3件)

- ① Takashi Yasuda, Katsutoshi Ishizuka, and Mika Ezoe, A Superhydrophobic Microvalve for Manipulating Microliquids Containing Biological Molecules, IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering, Vol. 3, pp. 290-296, 2008, 査読有
- ② Yuta Nakashima and Takashi Yasuda, Cell Differentiation Guidance Using Chemical Stimulation Controlled by a Microfluidic Device, Sensors and Actuators A, Vol. 139, pp. 252-258, 2007, 査読有

[学会発表] (計17件)

- ① Yuta Nakashima, Naoki Mimaruru, Tatsuhiko Tsujihashi, Tomoko Tamura, Kanji Yahiro,

and Takashi Yasuda, Chemical Stimulation of Neurospheres through Microholes Opened in Microwell Bottoms, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2009), Jeju, Korea, November 3, 2009.

- ② Takashi Yasuda, Tetsunari Yamami, and Hidetsugu Yano, Pressure-driven Microvalve Array for Controlling Chemical Release to Cultured Cells, The 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2007), Paris, October 9, 2007.

[図書] (計3件)

- ① 安田隆, マイクロ流体デバイスによる培養細胞への薬剤投与制御, シーエムシー出版, 細胞分離・操作技術の最前線, pp. 354-361, 2008.