

機関番号：13904
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20300156
 研究課題名（和文） セルパターニングのための超並列オンチップ細胞操作システムの開発
 研究課題名（英文） Development of On-Chip Cell Manipulation System Capable of
 Massively Parallel Patterning of Single Cells

研究代表者
 柴田 隆行（SHIBATA TAKAYUKI）
 豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：10235575

研究成果の概要（和文）：

将来の医療・医薬分野の発展には、生体組織の構築・機能発現の最も基本的な単位となる細胞の機能を明らかにすることが極めて重要な課題となっている。このためには、単一細胞の挙動解析や細胞間のネットワーク機能解析を実現するための高精度な細胞操作技術の確立が必要となる。本研究では、細胞を所望の 3 次元空間へ超並列・超高速に配列制御（セルパターニング）するための“超並列オンチップ細胞操作システム”の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：

A good understanding of extensive cellular knowledge is a prerequisite to enabling innovative technological advances in the field of highly-advanced medical treatment and drug discovery, because biological cells are the structural and functional units of all known living organisms. Cell patterning that enables *in vitro* patterned cell culture is one of the key technologies for addressing fundamental issues related to single cell analysis and cellular network analysis. Therefore, this research focused on the development of a novel cell patterning technique based on a micromanipulator array integrated with microvalves capable of massively parallel trapping and manipulation of single living cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：MEMS，精密加工学

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：マイクロマニピュレータアレイ，セルパターニング，細胞操作，細胞機能解析，マイクロニードル，MEMS，ナノバイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

人が健康で安心して暮らせる社会こそが人類共通の願いであり、特に、他国に先駆けて少子高齢化社会が到来する我が国において

は、“健康寿命の延伸”と“生活の質（Quality of Life, QOL）の向上”が極めて重要な課題となっている。このためには、疾患の早期診断と適切な治療法の提供、将来の疾患リスク

を予測した予防医療への転換、画期的な新薬および診断技術の開発などが必要不可欠となる。このような“健康・安心な理想社会”の実現には、生体組織の構築・機能発現の最も基本的な単位となる“細胞の機能”を明らかにするための技術開発を行い、将来の医療分野・医薬分野の発展に寄与することが極めて重要な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロチップ上での高精度な細胞操作ならびに高度な細胞ネットワーク機能解析を実現するために、細胞を所望の3次元空間へ超並列・超高速に配列制御（セルパターンニング）するための“超並列オンチップ細胞操作システム”の開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、半導体製造技術を応用したMEMS (Microelectromechanical system) 技術によって、①高精度かつ超並列に細胞を操作するための“細胞操作マイクロマニピュレータアレイ”の開発、②細胞を高効率に捕獲・配列するための細胞操作実験、さらに、③セルパターンニングに適した“マイクロ細胞培養チップ”の開発と“細胞ネットワーク機能解析”に関する基礎研究を行い、提案する“超並列オンチップ細胞操作システム”の有効性を検討した。

4. 研究成果

(1) MEMS 技術をベースとして、細胞操作マイクロマニピュレータアレイとして利用するための吸盤型マイクロニードルアレイの作製プロセスを開発した。シリコン (Si) の深堀エッチング (DRIE) の際に、ノッチング現象を積極的に利用することで、中空構造を有する SiO₂ 製マイクロニードルの先端部に吸盤形状をもつ特殊な微小構造体を一体形成する技術を確立した。図1にその一例を示す。先端部分は傘のように開いたユニークな形状となっている。図の例では、傘の直径が 16 μ m、先端部の内径が 4 μ m (肉厚 1 μ m)、根元部分の外径が 12 μ m となっており、長さ 70 μ m の構造体がピッチ 20 μ m でアレイ状に均一に形成されており、わずか 1cm 角の領域に 25 万個のニードルが一括形成プロセスによって作製されている。考案した MEMS 技術によれば、吸盤型マイクロニードルの寸法 (傘の直径、内径、外径、肉厚、長さ) やピッチは、作製条件を変更することで任意に制御可能である。また、個々のニードルは中空構造であるため、外部にシリンジポンプ (または真空ポンプ) を接続することで、細胞 (通常、直径 10~20 μ m 程度) を吸引・捕獲することが可能となる。

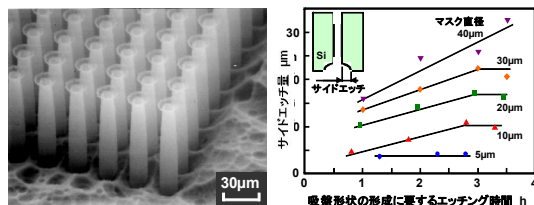


図1 吸盤型マイクロニードルアレイ

(2) 細胞を模擬したポリマー微粒子 (平均粒径 10 μ m) の捕獲実験を行い、作製した吸盤型マイクロニードルアレイ (53 \times 53 アレイ) を用いることで、約 93% (標準偏差 6.4%) の高い確率で微粒子の捕獲が可能であることを実証した (図2)。また、ポリマー微粒子の捕獲過程の動的観察から、捕獲される微粒子の軌跡は数値流体解析 (CFD) によって求められた流線とよい一致を示すことがわかった。さらに、吸盤型マイクロニードルアレイを用いた HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌由来の細胞) の捕獲・脱離実験を行い、単一細胞レベルの生細胞の捕獲と脱離が可能であることを実証した。

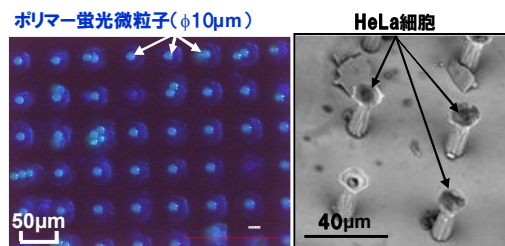


図2 微粒子および細胞の捕獲実験

(3) 吸盤型マイクロニードルアレイ (4 \times 4 アレイ) を用いた生細胞の捕獲・脱離過程の動的観察を行った。図3に作製した実験装置の概略図を示す。細胞操作に用いたマイクロ細胞培養チップは、スライドガラス上にシリコーン樹脂 (PDMS) を用いて作製し、細胞を捕獲するための領域 (細胞保存チャンバー) と細胞のパターン培養を行うための領域 (細胞培養チャンバー) に区分されている。両チャンバーの容量はいずれも約 2.6mL とした。さらに、細胞培養チャンバー内には、フォトリソグラフィによって SU-8 (厚膜ネガ型フォトリソレジスト) 製のピラー構造 (直径 7 μ m, 高さ 24 μ m, ピッチ 23 μ m) を形成したカバーガラスを配置した。また、吸盤型マイクロニードルアレイは、流路を形成したアクリル製治具に PDMS を介してエポキシ系接着剤によって固定した。さらに、アクリル製治具にテフロンチューブを介してマイクロシリンジポンプを接続することで、細胞の捕獲 (吸引) と脱離 (吐出) を行った。HeLa 細胞の捕獲・脱離過程の観察結果 (図4) から、吸引流量の増加は、細胞の捕獲速度 (単位時間当たりに捕獲される細胞の個数) ならびに捕獲率 (ニードル本数に対する捕獲細胞数の

比)の向上と同時に、ニードル内部に細胞が侵入する不具合を生じる要因ともなった。細胞の吸引力は細胞-ニードル間距離に反比例し、細胞の捕獲効率を向上させるためには、ニードル先端から距離 100 μm 以内の空間に細胞の存在確率を高めることで対処できることがわかった(図5)。また、吸盤型マイクロニードルアレイによって捕獲した細胞をSU-8ピラー構造上(細胞培養チャンバー)に脱離することで、ピラー間に細胞の配置が可能であることを実証した。

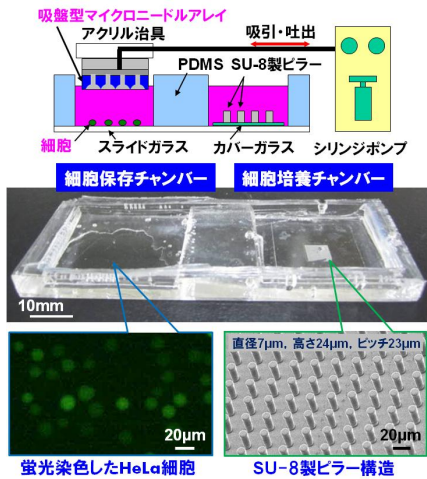


図3 細胞の捕獲・脱離実験装置

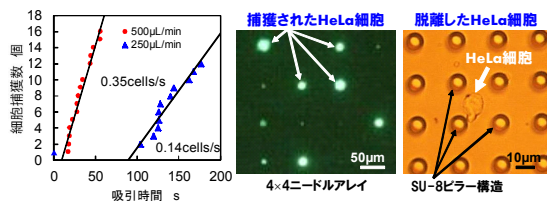


図4 HeLa細胞の捕獲・脱離実験結果

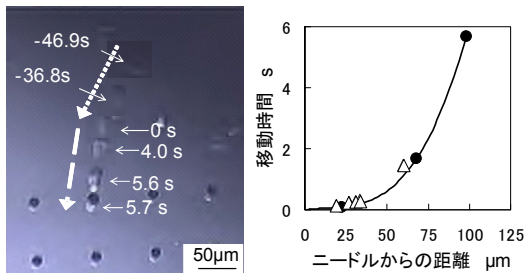


図5 吸盤型マイクロニードルの細胞吸引過程

(4) セルパターンニングを行うためには、細胞の捕獲(吸引)の有無を制御するバルブを個々のニードルに一体形成する技術の確立が必要となる。そこで、酸化チタン(TiO_2)の光誘起超親水化現象を利用してマイクロ流路表面の濡れ性(親水性・疎水性)を変化させ、表面張力に依存するラプラス圧の差によって流体の流れを制御する“光駆動型表面機能制御マイクロバルブ”の動作原理を

実験的に検証した。まず、種々の TiO_2 膜の形成方法(ナノ粒子スピン塗布法、ゾルゲル法、陽極酸化法)を検討した結果、陽極酸化法で形成した TiO_2 膜が最も良好な光誘起超親水化現象を示すことがわかった(図6)。また、陽極酸化時の電流波形からTi膜の陽極酸化終点が判定できることがわかった。さらに、 TiO_2 膜表面の疎水化方法を検討した結果、ヘキサメチルジシラザン(HMDS)で処理した場合に接触角 65° 程度の疎水化が可能であり、かつ紫外線照射(波長365nm)によって超親水表面に回復することがわかった。そこで、PDMS製のマイクロ流路(幅15 μm 、高さ9 μm)と TiO_2 膜を形成したSi基板とを組み合わせたマイクロバルブを試作した。その結果、紫外線照射(波長365nm, 2mW/cm², 10min)によってバルブのOPEN動作が行えることを実証した(図7)。しかし、紫外線照射条件やPDMS組成などの最適化を試みたが、本方法によるバルブのCLOSE動作は困難であることがわかった。

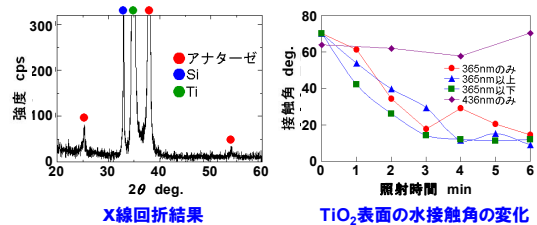


図6 TiO_2 膜の結晶構造と光誘起超親水化現象

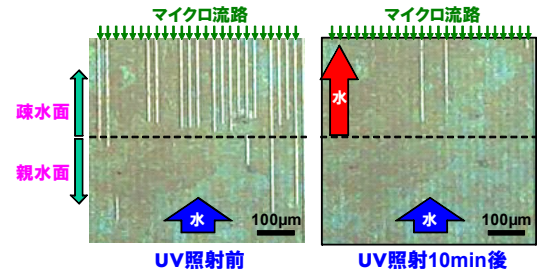


図7 光駆動型表面機能制御マイクロバルブ

(5) 吸盤型マイクロニードルアレイを用いた細胞捕獲実験の結果から、吸引流量の増加は細胞の捕獲効率の向上と同時に、ニードル内部に細胞が侵入する要因ともなった。そこで、ニードル内部への細胞の侵入を抑制し、単一細胞レベルのパターンニングを行うために、外部の空圧制御によって開閉できるPDMSメンブレン構造を利用した“空気圧駆動型マイクロバルブアレイ”を作製し、吸盤型マイクロニードルアレイと一体形成することで、“細胞操作用マイクロマニピュレータアレイ”を試作した(図8)。空圧バルブの構造は、液体の吸引・吐出(細胞の捕獲・脱離)を行うための主流路とバルブの開閉動作のための空気圧を導入する制御用流路の2層構造となっている。制御用流路(青色部)

に空気圧を加えることで PDMS メンブレンが変形し、主流路（赤色部）の流れを塞ぐ構造となっている。主流路は、SU-8 でパターンニングした構造体をモールド（型）とし、PDMS（厚さ 46 μm ）をスピコートによって塗布することで作製した。流路の高さは 30 μm 、幅は 250 μm とした。制御用流路についても同様な方法で作製し、流路の高さ 30 μm 、幅 250 μm とし、PDMS 厚さは約 5mm とした。さらに、吸盤型マイクロニードルアレイとマイクロバルブアレイを一体化（張り合わせ）することで、細胞操作マイクロマニピュレータアレイを試作した。各々の層間の接合は、PDMS 表面をコロナ放電によって処理することで永久接着した。その結果、任意のニードルでの吸引・吐出の ON/OFF 動作が可能となった（図 9）。さらに、細胞の捕獲・脱離実験を行い、その有効性を確認した。

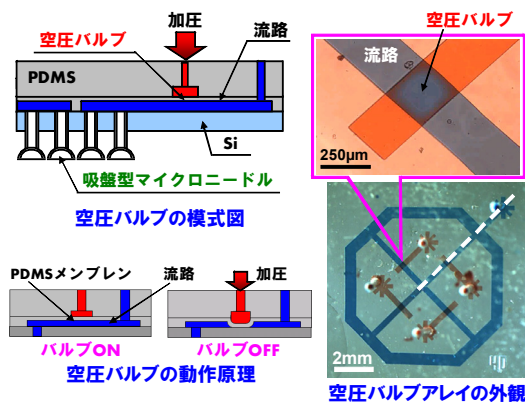


図 8 細胞操作マイクロマニピュレータアレイ

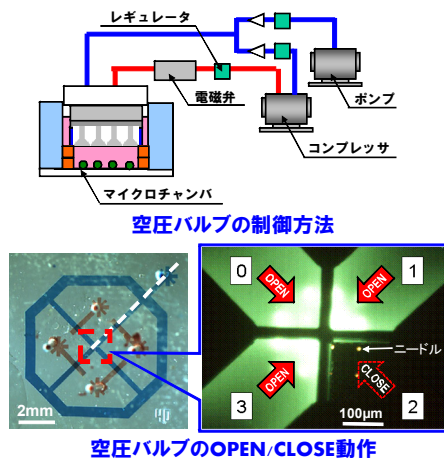


図 9 真空バルブの動作実験

(6) 細胞ネットワーク機能解析に関する基礎的検討を行った。Si 基板上に支柱構造体（SU-8 ピラー）をアレイ化することによって細胞を空間的に配置できる“マイクロ細胞培養チップ”を用いて、細胞培養実験（HeLa 細胞）を行った。その結果、単離された細胞と比較して複数の細胞が隣接して存在する方が、細胞の伸展が促進されること

がわかった（図 10）。このように、円柱構造体で空間を仕切ることによって、細胞の基板への接着・非接着を問わずにパターンニングでき、かつ培養時間の経過とともに細胞の移動が起こらないようにすることができる。さらに、円柱構造体に隙間を設けることで、細胞同士の間での接着や細胞間の情報伝達機能が妨げられないようになっている。

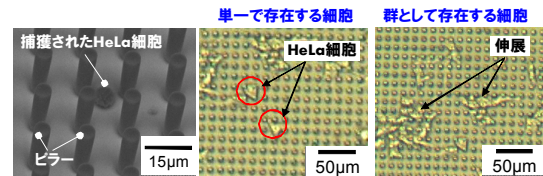


図 10 HeLa 細胞の培養実験（培養時間：24h）

(7) 以上の結果から、本提案技術によって、単一細胞レベルの分解能を有した超並列操作による高精度なセルパターンニングの実現性を示すことができた。本研究で開発した細胞操作システムは、①単一細胞の挙動解析（増殖、分化、伸展、ストレス応答、バイアビリティなど）、②2次元および3次元空間に配置制御した細胞群のコミュニティサイズ（隣接する細胞数の違いによる影響も含む）と細胞機能との相関関係、③異種細胞間（例えば、平滑筋細胞と血管内皮細胞）の細胞間相互作用など、高度な細胞ネットワーク機能解析を実現するための強力なツールとなり得る。さらに、④高精度な遺伝子導入による高度な診断・治療、⑤再生医療における培養細胞の品質保証（バリデーション）技術、⑥3次元細胞パターンニングによる組織・器官などの構築技術、⑦医薬品開発における細胞を使った薬効のスクリーニング技術など、その応用も多岐に渡り、将来のナノ医療、ナノバイオ、ゲノム創薬などの最先端分野の飛躍的な発展の一助となることが期待できる。

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 2 件）

- ① T. Kawashima, T. Kimura, T. Okada, T. Shibata, M. Nomura, A. Kishida, Feasibility Study on Cellular Network Analysis with Patterned Cell Culture Microdevice, Microelectron. Eng., 査読有, 87, 2010, 704-707.
- ② T. Shibata, S. Yamanaka, N. Kato, T. Kawashima, M. Nomura, T. Mineta, E. Makino, Fabrication of Micro-manipulator Array for Cell Patterning, Microelectron. Eng., 査読有, 86, 2009, 1439-1442.

〔学会発表〕(計10件)

- ① 森川廣基, 大原清孝, 永井萌土, 川島貴弘, 柴田隆行, セルパターニングのための細胞操作用マイクロマニピュレータアレイの開発(第3報) —生細胞の捕獲・脱離挙動の基礎的検討—, 精密工学会春季大会学術講演会, 2011年3月14日, 東洋大学(東京都)
- ② 柴田隆行, ライフ・イノベーション創出を支援する超並列オンチップ細胞機能解析システム, 日本生体医工学会「医用アクチュエーション研究会」, 2010年12月7日, 産業技術総合研究所(東京都)
- ③ T. Kawashima, T. Kimura, T. Okada, T. Shibata, M. Nomura, A. Kishida, Feasibility Study on Cellular Network Analysis with Patterned Cell Culture Microdevice, The 35th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE 2009), 2009年9月29日, ICC Ghent (Belgium)
- ④ 柴田隆行, 川島貴弘, 細胞操作用MEMSと医用アクチュエーション, 電気学会産業応用部門大会, 2009年8月31日, 三重大学(三重県)
- ⑤ 川島貴弘, 木村 剛, 新町拓也, Siti Intan Suraya, 岡田隆志, 柴田隆行, 岸田晶夫, 細胞ネットワーク機能解析のためのマイクロ空間細胞配列デバイスの開発—細胞パターニングの基礎的検討—, 日本生体医工学会大会, 2009年4月24日, タワーホール船堀(東京都)
- ⑥ 山中信司, 森川廣基, 柴田隆行, 川島貴弘, 峯田 貴, 牧野英司, セルパターニングのための細胞操作用マイクロマニピュレータアレイの開発(第2報) —吸盤型マイクロニードルの微粒子捕獲性能—, 精密工学会春季大会学術講演会, 2009年3月13日, 中央大学(東京都)
- ⑦ T. Shibata, N. Kato, T. Kawashima, Novel MEMS Devices for Massively Parallel Manipulation and Analysis of Single Cells, International Symposium on LifeChips (LifeChips 2009), 2009年1月9日, The University of California, Irvine (USA)
- ⑧ 新町拓也, 岡田隆志, Siti Intan Suraya, 川島貴弘, 柴田隆行, 木村 剛, 岸田晶夫, 細胞ネットワーク機能解析のためのマイクロ空間細胞配列デバイスの開発—細胞配列の可能性の検討—, 日本機械学会生産加工・工作機械部門講演会, 2008年11月21日, 長良川国際会議場(岐阜県)
- ⑨ T. Shibata, S. Yamanaka, N. Kato, T. Kawashima, M. Nomura, T. Mineta, E. Makino, Fabrication of Micro-manipulator Array for Cell Patterning,

The 34th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE 2008), 2008年9月17日, Hilton Athens Hotel (Greece)

- ⑩ T. Kawashima, T. Shinmachi, T. Shibata, M. Nomura, T. Kimura, A. Kishida, T. Mineta, E. Makino, Fabrication of Spatial Cell Patterning Device for Cellular Network Analysis,, The 34th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE 2008), 2008年9月16日, Hilton Athens Hotel (Greece)

〔その他〕

ホームページ等

<http://pm.pse.tut.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 隆行 (SHIBATA TAKAYUKI)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 10235575

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岸田 晶夫 (KISHIDA AKIO)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号: 60224929

川島 貴弘 (KAWASHIMA TAKAHIRO)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 50378270

永井 萌土 (NAGAI MOETO)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 00580557