

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650097

研究課題名（和文） 細胞接着制御機能を実装した革新的バイオチップの開発

研究課題名（英文） Development of innovative biochip for controlling cell adhesion

研究代表者

大橋 俊朗(OHASHI TOSHIRO)

北海道大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：30270812

研究成果の概要（和文）：本研究では細胞の接着制御を磁気マイクロビーズによって行う細胞培養チップを開発することを目的とした。ガラス表面に微細加工技術により円形断面の微小孔を形成し、基質底面に永久磁石を配置することで磁気マイクロビーズを円形孔の中に收容するものである。磁気マイクロビーズは予めフィブロネクチンをコーティングした。細胞を導入して 24 時間後、細胞は捕捉された磁気マイクロビーズにのみ接着しそれ以外の領域には接着していないことが確認された。

研究成果の概要（英文）：This paper presents development of a technique to control cell adhesion using an array of magnetic microbeads. Using MEMS techniques, we fabricated an array of microholes (3 μm in diameter and 2 μm in depth) on the surface of a glass substrate, to trap magnetic microbeads (2.8 μm in diameter) in the microholes. The magnetic microbeads were coated with fibronectin prior to the loading. A permanent magnet was placed under the substrate and was used to trap microbeads into the microholes. After 24 hours incubation, it was observed that cells attached only to the magnetic microbeads, but not to the other parts of the glass surface.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	480,000	3,280,000

研究分野：バイオメカニクス

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：バイオチップ、細胞接着制御、微小流路、細胞診断、バイオ MEMS

1. 研究開始当初の背景

細胞接着性の制御において、例えば米国ハーバード大学の Prof. Chen らはマイクロコンタクトプリンティング法により培養基質表面に細胞接着領域を化学的に形成し細胞接着位置を制御した。また、東京女子医大の岡

野教授らは温度応答性高分子ポリマーを用いて細胞をシート単位で操作する技術を開発した。しかしながら、いずれの方法も細胞のポジショニングおよびリプレイスメントを同一基質で行うことはできない。近年、米国ハーバード大学の Prof. Ingber らはナノス

ケールで加工した基質表面に磁気マイクロビーズを補足させ細胞接着性を制御することに成功したが、磁気マイクロビーズの配置間隔を制御できるまでには至っていない。申請者らはこれまでに細胞の力学応答現象を中心に研究を展開してきた。このような中、細胞の接着性制御は各種細胞診断技術において重要な基盤技術であり、スウェーデン王立工科大学の Prof. Andersson-Svahn ら（研究協力者）との共同研究として新しい細胞培養チップの開発が可能であるとの認識で一致し本研究課題の申請に至った。

2. 研究の目的

近年、がん細胞などの細胞診断技術において高効率・高機能バイオチップの開発が盛んに行われている。ここで求められる基盤技術の中で細胞を任意の場所に配置できること（ポジショニング）、新しい細胞に入れ替えること（リプレースメント）、が簡便にできることは重要な技術である（図1）。これまでにいくつかの技術報告があるが、上記要求の両者を同時に満たすものは見られない。そこで、本研究課題では細胞のポジショニングおよびリプレースメントが簡便に行える革新的な細胞培養チップを開発することを目的とする。細胞を接着させるためのマイクロビーズを空間的にマイクロスケールで予め配置して細胞のポジショニングを行おうというものである。マイクロビーズは基質に一時的に補足されているのみで離脱可能なため細胞のリプレースメントも容易に実現できる。

3. 研究の方法

(1) 細胞接着制御基質の作製：作製したデバイスの概要を図2(a)に示す。このデバイスは、ガラス基板および試薬送液のための微小流路を持つ Polydimethylsiloxane (PDMS,

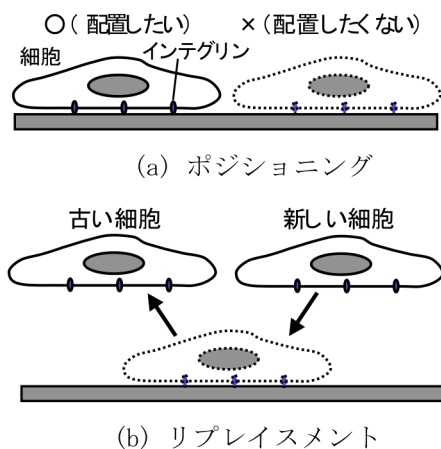


図1 細胞のポジショニングとリプレースメント

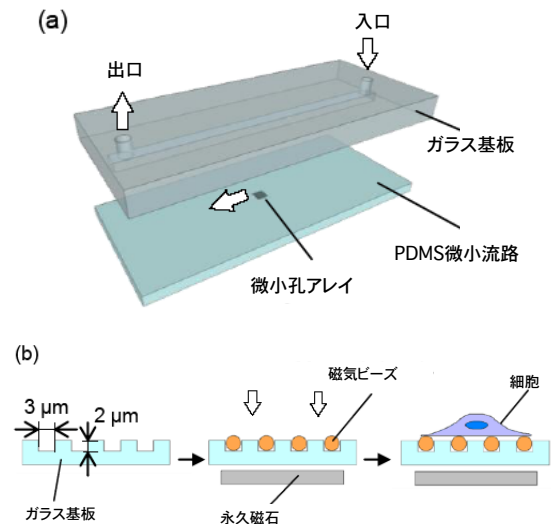


図2(a)細胞接着制御デバイス。(b)磁気マイクロビーズ補足および細胞接着の原理。

Sylgard184, Dow corning, USA) 基板により構成される。磁気マイクロビーズ（直径 $2.8 \mu\text{m}$, COMPEL UMC3F, Bangs Laboratories, Inc, USA) を細胞接着の足場としてガラス基板表面に固定するために、ガラス基板表面に微小孔を作製した。本デバイスにおける磁気マイクロビーズの捕捉および細胞接着のメカニズムを図2(b)に示す。反応性イオンエッチングによりガラス基板表面に直径 $3 \mu\text{m}$ 、深さ $2 \mu\text{m}$ の微小孔を作製し、ガラス基板底部に設置した磁石の磁力を用いて磁気マイクロビーズを捕捉した。

エッチング用フォトマスクの作製手順を以下に示す。実験に用いる磁気マイクロビーズの直径に合わせて作製した、直径 $3 \mu\text{m}$ の微小孔を中心間距離 $8 \mu\text{m}$ で配置したパターンを、フェムト秒レーザー描画装置 (Ultrafast Fiber Laser TC1550, Menlo Systems, Germany) を用いてガラス基板に塗布したポジ型フォトレジスト (PMER) 上に描画した。この基板を現像してレーザー照射部のレジストを除去し、その上にスパッタリングを施して、基板の上にクロム膜を製膜した。そして、レジストとその上に製膜されたクロム膜をリフトオフによって取り除いた。以上によりパターン転写用フォトマスクを作製した。別のガラス基板にレジスト PMER をスピコートした後、で作製したフォトマスクを用いて UV 露光を行なった。現像した後にスパッタリングを行い、基板にクロムを製膜した。最後に再度リフトオフを行い、丸形凹パターンを持つエッチング用フォトマスクを作製した。

続いて、反応性イオンエッチングの手順をします。はじめに、ガラス基板（合成石英研磨版，英興株式会社，日本）にエッチング用

のレジストマスクを形成するため、フォトリジスト PMER をスピコートした。次に、先に作製したフォトマスクを介して UV 露光を行い、現像してレジストマスクを作製した。ガラス基板のエッチングには、ドライエッチング装置 (NLD500, ULVAC, Japan) を用いた。エッチングの後、ガラス基板上に残存しているレジストマスクを取り除くため、基板の超音波洗浄をアセトン中で行った。

(2) マイクロチャンネルデバイス作製：幅 1.35 mm, 長さ 70.9 mm, 高さ 200 μm の微小凸部をもつ鋳型をアルミ合金で作製した。PDMS 主剤と硬化剤を 10:1 の割合で混合し脱気したものを鋳型に流し込み, 100 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間加熱固化を行った。冷却の後, 鋳型から剥離することで微小溝付 PDMS 基板を作製した。作製した PDMS 基板およびガラス基板の接合面にプラズマ照射 (BD-20, Electro-Technic Product, Inc, USA) を施して表面改質を行い, 両基板を熱圧着した。

(3) 細胞培養実験：本実験には試料としてウシ大動脈血管内皮細胞を, 培地には DMEM+10%FBS (Gibco, Japan) を用いた。磁気マイクロビーズの存在する領域以外への細胞の接着を阻害する目的で, 微小流路内部を界面活性剤 (Pluronic F-127, Sigma, Japan) を用いてコーティングした。磁気マイクロビーズを作製したデバイスに導入するために, ビーズの懸濁液をシリンジポンプ (legato 200, KD Scientific, US) を用いて送液した。磁気マイクロビーズには, 細胞接着のためにあらかじめ細胞外基質 (ECM) のひとつであるフィブロネクチンをコーティングした。デバイス底面に磁石を設置し, 磁気マイクロビーズが磁力によって微小孔に捕捉されたことを確認した。続いて, 細胞懸濁液をシリンジポンプを用いてデバイス内へ送液し, 細胞接着の様子を観察した。

4. 研究成果

本研究では, 微細加工技術を用いてガラス基板表面に微小孔を作製し, PDMS で作製した流路を接合させることでマイクロフルイディクスデバイスを作製した。流路内に磁気マイクロビーズを送液し, ガラス基板底面から磁力を作用させることで磁気マイクロビーズの微小孔への捕捉を行うことに成功した。捕捉した磁気マイクロビーズの蛍光画像を図 3(a) に示す。磁気マイクロビーズの微小孔への捕捉率は 30% 程度であった。なお, 微小孔に捕捉されなかった磁気マイクロビーズは培地を流して排出した。細胞導入から 24 時間後に取得した顕微鏡画像を図 3(b) に示す。細胞は捕捉された磁気マイクロビーズにのみ接着し, それ以外の領域には接着していないことが確認された。これより, 細胞の磁気マイクロビーズへの選択的接着が, 磁気マイ

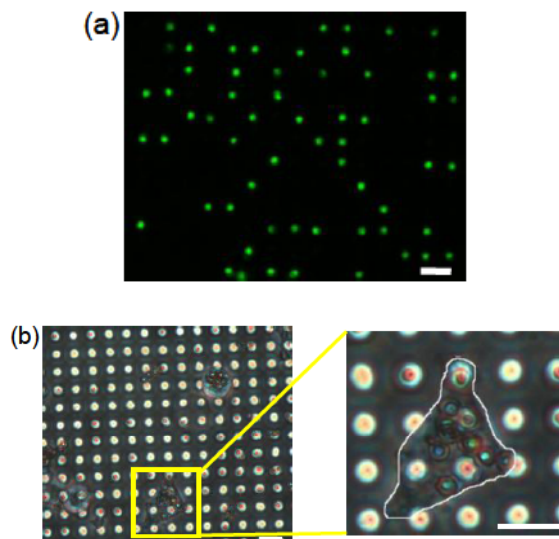


図 3(a) 磁気マイクロビーズの蛍光画像. (b) 細胞が磁気マイクロビーズに接着している様子.

クロビーズのフィブロネクチンコーティングにより可能であることが分かった。Poltera は, シリコン製の微小突起の先端に磁気マイクロビーズを捕捉し細胞の足場とすることで細胞の接着および培養を行ったが, 微小突起が不規則に作製されたため磁気マイクロビーズの捕捉に規則性はみられなかった。一方, 本研究では, 磁気マイクロビーズの位置制御を行うことができ, その点において本研究に新規性があると考えられる。今後, 磁気マイクロビーズの捕捉率を向上し, 細胞の接着位置制御および培養をより効率的に行うことを目指し, 微小孔の直径・深さを変更して捕捉率への影響を検討する。

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 仁井田 優作, 大橋 俊朗, 磁気ビーズ配列による新規細胞接着制御基質の開発, 日本機械学会 2011 年度年次大会, 2011 年 9 月 13 日, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京.
- ② 大橋 俊朗, 流れ負荷内皮細胞の力学環境計測, 第 58 回レオロジー討論会, 2010 年 10 月 4 日, 仙台国際センター, 仙台.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 俊朗 (OHASHI TOSHIRO)
北海道大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：30270812

(2) 研究分担者

前田 英次郎 (MAEDA EIJIRO)
北海道大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号：20581614