

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 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22740365

研究課題名（和文）

大気圧低温プラズマを用いたタンパク質膜パターンニング技術の開発

研究課題名（英文）

Development of the techniques for the protein patterning by atmospheric pressure plasmas

研究代表者

安藤 あゆみ (ANDO AYUMI)

大阪大学・大学院工学研究科・特任研究員

研究者番号：60452471

研究成果の概要（和文）：本研究では、大気圧低温プラズマとステンシルマスクを用いることで、シリコン基板上へ細胞外マトリックス（ECM）タンパク質膜を数十 μm ～数百 μm のサイズにパターンニングすることが可能であることを示した。また、パターンニング後の ECM タンパク質膜に沿って神経モデル細胞が増殖することも確認され、将来的には大面積の神経細胞ネットワーク形成のためのパターンニング技術として応用の可能性があることを確認した。

研究成果の概要（英文）： Extracellular matrices (ECMs) patterns of many tens or hundreds micrometers in size have been formed on silicon substrates with the use of low-temperature atmospheric-pressure plasma (APP) jets with metal stencil masks in this research. Neuronal model cells were shown to grow on the ECM patterned by APP jets, so that the patterning technique by low-temperature APPs for ECM layers provides a simple mean of arranging neuron cells on a relatively large area of a silicon surface.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：プラズマ科学

科研費の分科・細目：プラズマ科学 ・プラズマ科学

キーワード：プラズマ、大気圧プラズマ、細胞外マトリックス、マイクロパターンニング、バイオチップ、ラジカル

1. 研究開始当初の背景

バイオセンサーや神経デバイス回路の開発において、細胞を基板表面へ所望の形に配列する技術が必要とされる。その主な物として、細胞の足場となる細胞外マトリックス（ECM）タンパク質等の機能性高分子を所望の形にパターンニングし、その上で細胞を培養、配列する方法が用いられている。タンパク質のマイクロパターンニング技術としては、マイ

クロコンタクトプリンティング法やインクジェットプリンティング法、化学修飾などの幾つかの方法が現在までに開発され利用されている。しかしこれらの方法は、扱うタンパク質溶液の液滴のサイズや粘度に制限があったり、大面積パターンニングを行うには非常に手間がかかるなど、様々な問題点がある。近年、さらに大面積での加工や微細加工など、より高度な加工が可能な ECM タンパク質のマ

マイクロパターニング技術の開発が求められている。また、研究代表者は過去の実験結果から、大気圧低温プラズマ照射によって、基板表面にコーティングしたECMタンパク膜の一部が脱離する結果を得ている。これらのことから、より簡便に、広範囲のマイクロパターニングを可能とする新しい方法として、大気圧低温プラズマを利用することを提案した。最終的には、大気圧プラズマによってパターニングされたECMタンパクによって、大面積の脳神経細胞パターンをシリコン基板上に形成することを目標とする。

大気圧低温プラズマは気体温度が室温程度でありタンパク質などの生体物質に熱によるダメージを与え難い反面、電子温度が高くラジカル等の活性種が生成されることから反応性が高く、タンパク質膜に直接作用させてパターニングを行う事が可能である。また装置も安価であるため、パターニング技術が確立できれば、より簡便にパターニングが行えるようになると予想される。

2. 研究の目的

本研究では、大気圧低温プラズマを用いた、シリコン基板上へのECMタンパク膜のパターニング技術確立することを目的とする。そのために、下記の3つの項目について研究を行う。

- (1) ECMタンパク質膜のパターニングが可能な、大気圧低温プラズマの照射条件（プラズマ形状、照射時間、照射距離、ガス流量）の最適化
- (2) 大気圧低温プラズマを用いたパターニング技術を実用化するための装置の開発、改良
- (3) 大気圧低温プラズマによって、タンパク質がパターン化される原理（有効な活性種の特定、タンパク質の構造変化等）の解明

3. 研究の方法

(1) パターニング条件の最適化

本研究ではECMタンパク質膜をスピニングによってシリコン基板上にコーティング

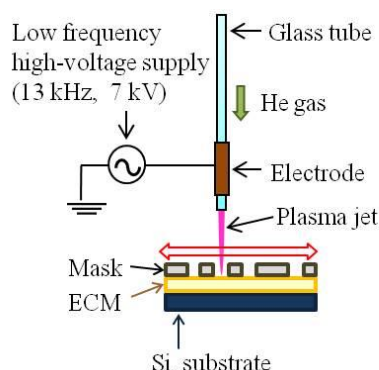


図1 実験装置概略図

した物を所望のパターニング形状の型を持つステンレス製のステンシルマスクで覆い、その上からプラズマを照射してECMタンパク質膜のパターニングを行った(図1)。プラズマ源には低周波大気圧プラズマジェット(LFプラズマジェット)を用いた。放電ガスにはヘリウムを用いた。

実験ではまず、蛍光標識を付けたECMタンパク質についてパターニングを行い、出来たパターンの蛍光顕微鏡観察を繰り返しながら、プラズマ照射条件(放電電圧、ガス流量、照射距離、照射時間)について最適化を行った。次に、パターニング後のECMタンパク質膜上に細胞を播種し、細胞の接着、増殖の様子を観察することで、基板上に細胞配列が成されるかを確認した。

(2) プラズマ照射後のECMタンパク質膜の観察

パターニング実験と並行して、大気圧低温プラズマ(LFプラズマジェット)照射後のタンパク質膜表面の変化を、原子間力顕微鏡(AFM)および、赤外分光法(FT-IR)によって観察した。また、照射時のプラズマの発光分光による観察も行った。

4. 研究成果

(1) LFプラズマジェットによるECMタンパク質膜のパターニング

本研究では、サンプルに用いるECMタンパク質膜と細胞の組合せとして、フィブロネクチンとHEK293(ヒト胎児腎細胞)の組合せ、及び、ポリエルリシン(PLL)をと神経細胞のモデル細胞であるPC12細胞(ラットの副腎髄質由来の褐色細胞腫)の組合せを用いた。また、ステンシルマスクには、100~200 μm 幅の複数のスリットを持つマスクと、100 μm 径の穴を100 μm 間隔で複数開けたマスクの2種類を用いた。

フィブロネクチンのパターニングでは、放電電圧7 kV、ガス流量4.0 L、照射距離50 mmの条件で15秒間プラズマ照射を行った時に、15 mm 角のシリコン基板上にマスクの型に沿った形でフィブロネクチンのパターンが形成されることが、蛍光顕微鏡観察から分かった(図2左)。また、パターニング後のフィブロネクチン上でHEK293細胞を培養したところ、パターンに沿って接着、増殖することが確認された(図2右)。

同様に、PLLに対しても、放電電圧7 kV、ガス流量4.5 L、照射距離50 mmの条件で15秒間プラズマ照射を行った時に、マスクの型に沿ったスリット状のパターンが観察された。また、100 μm の穴を持つマスクを使用した場合にも、照射条件を最適化することによって、マスクの型に沿ってパターンができることが確認できた(図3左)。パターニング

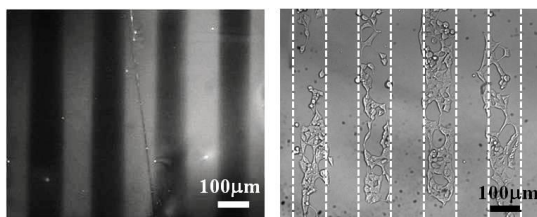


図 2 蛍光顕微鏡で観察されたフィブロネクチンのパターン（左）とその上で接着・増殖した HEK293 細胞の様子（右）

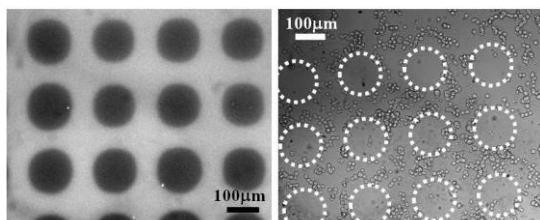


図 3 蛍光顕微鏡で観察された PLL のパターン（左）とその上で接着・増殖した PC12 細胞の様子（右）

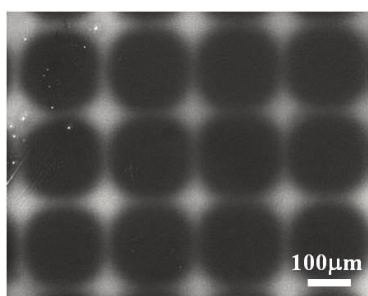


図 4 プラズマのアンダーエッジによって形成された PLL のパターン

後の PLL 上でも PC12 細胞がパターンに従って接着増殖する様子が確認された(図 3 右)。さらに、プラズマによるアンダーエッジによって、数十ミクロンサイズのパターンも形成可能であることが分かった (図 4)。

以上の結果から、大気圧低温プラズマによって ECM タンパク質膜のパターニング形成が可能であることあり、神経モデル細胞の接着実験の結果から、神経細胞ネットワーク形成にこの技術が応用できることを示した。

(2) プラズマ照射後の ECM タンパク質膜の観察

本研究では、シリコン基板にコーティングしたフィブロネクチンに 120 秒間プラズマ照射した時の表面の様子を AFM で観察し、照射前の様子と比較した。その結果、照射後の表面のラフネスがシリコン基板表面のラフネスの値に非常に近い値になることが分かつ

た。また、プラズマ照射後のフィブロネクチン表面を赤外分光法 (FT-IR) で分光観察した結果、タンパク質の持つ 2 次構造由来のスペクトルが、スペクトルの形は変わらないものの、プラズマ照射時間に伴って減少し、照射時間が 60 秒を超えると観察されなくなることが分かった。これらの結果から、プラズマ照射によってフィブロネクチンが基板表面から剥離していると予想された。

また、プラズマ照射時のプラズマの発光計測より、酸素由来のスペクトルが観察されたことから、ECM タンパク質膜パターニングには、酸素原子や酸素由来のラジカルが関係していることが示唆される。

プラズマによるタンパク質膜パターニング法の研究は過去にも行われているが、本研究の様に、大気圧中でタンパク質膜そのものにプラズマを作用させる例は殆どない。本研究で提案した方法を利用した場合、簡便に尚且つ短時間でタンパク質膜をパターニングできることが分かった。本研究の結果は、後述の論文や学会で公表し、2011 年 12 月には、Plasma Conference 2011 (PLASMA 2011)において招待講演も行った。

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 6 件)

- ① Ayumi Ando, Toshifumi Asano, Tsuneo Urisu and Satoshi Hamaguchi, Micro-patterning formation of extracellular-matrix (ECM) layers, Europhysics news, 43 (3), 13, 2012.
URL :http://www.europhysicsnews.org/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=108&Itemid=308 (査読有)
- ② Ayumi Ando, Toshifumi Asano, Md. Abu Sayed, Ryugo Tero, Katsuhisa Kitano, Tsuneo Urisu and Satoshi Hamaguchi, "Extracellular Matrix Patterning for Cell Alignment by Atmospheric Pressure Plasma Jets", Japanese Journal of Applied Physics, 51, 036201, 2012.
DOI: 10.1143/JJAP.51.036201. (査読有)
- ③ Ayumi Ando, Hidetaka Uno, Toshifumi Asano, Tsuneo Urisu and Satoshi Hamaguchi, "Arrangement of PC12 cells on a silicon chip via extracellular matrix (ECM) layer patterning by atmospheric pressure plasmas", Plasma and Fusion Research, 6, 1306155, 2011.
DOI: 10.1585/pfr.6.1306155. (査読有)
- ④ Ayumi Ando, Toshifumi Asano, Tsuneo Urisu and Satoshi Hamaguchi, "Micro pattern formation of extracellular-matrix

(ECM) layers by atmospheric-pressure plasmas and cell culture on the patterned ECMs”, Journal of Physics D: Applied Physics, 44, 482002, 2011.

DOI: 10.1088/0022-3727/44/48/482002. (査読有)

- ⑤ Ayumi Ando, Toshifumi Asano, Hidetaka Uno, Ryugo Tero, Katsuhisa Kitano, Tsuneo Urisu and Satoshi Hamaguchi, “Patterning of an extracellular matrix (ECM) layer on silicon by atmospheric-pressure plasmas for living neuron network chip fabrication”, Proceedings of the 20th International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC 20), Paper No. MED07, Philadelphia (USA), 2011.

URL: http://ispc20.plasmainstitute.org/my_ispc/papers/72.pdf (査読無)

- ⑥ Ayumi Ando, Md. Abu Sayed, Toshifumi Asano, Ryugo Tero, Katsuhisa Kitano, Tsuneo Urisu and Satoshi Hamaguchi “Protein patterning by atmospheric-pressure plasmas”, Proceedings of 4th International Symposium on Atomic Technology (ISAT-4), Journal of Physics; Conference Series, No.232, 012019, 2010.

DOI: 10.1088/1742-6596/232/1/012019. (査読有)

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① Ayumi Ando, Hidetaka Uno, Tsuneo Urisu and Satoshi Hamaguchi, “Arrangement of PC12 cells on extracellular matrix (ECM) layers patterned by atmospheric pressure plasmas,” The 8th EU-Japan Joint Symposium on Plasma Processing (JSPP2012), Jan. 17, 2012, Todaiji Culture Center, Todaiji Temple, Nara, Japan, Book of abstracts P33.
- ② Ayumi Ando, Toshifumi Asano, Hidetaka Uno, Ryugo Tero, Katsuhisa Kitano, Tsuneo Urisu and Satoshi Hamaguchi, “Extracellular matrix (ECM) patterning by atmospheric-pressure plasmas for arranging neuronal cells on silicon substrates, Plasma Conference 2011 (PLASMA 2011), Nov. 25, 2011, Ishikawa Ongakudo, Kanazawa, Japan, 25B05. (招待講演)
- ③ Ayumi Ando, Toshifumi Asano, Hidetaka Uno, Ryugo Tero, Katsuhisa Kitano, Tsuneo Urisu and Satoshi Hamaguchi, “Patterning of an extracellular matrix (ECM) layer on silicon by atmospheric-pressure plasmas for living neuron network chip fabrication,” The 20th International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC 20), Jul. 28, 2011, Loews Hotel, Philadelphia, USA, MED07.

- ④ 安藤あゆみ, 宇野秀隆, 浅野豪文, 手老龍吾, 北野勝久, 宇理須恒雄, 浜口智志, 「大気圧低温プラズマによる神経細胞ネットワーク用細胞外マトリックスパターニング技術の開発」第 58 回応用物理学関係連合講演会, 第 58 回応用物理学関係連合講演会予稿集, 2011 年 3 月, 26p-CF-6.

- ⑤ 安藤あゆみ, 浅野豪文, 手老龍吾, 北野勝久, 宇理須恒雄, 浜口智志, 「大気圧プラズマによる神経細胞ネットワークチップ用細胞外マトリックスパターニング」第 27 回プラズマ・核融合学会年会, 2010 年 12 月 1 日, 北海道大学, 01aB01.

- ⑥ Ayumi Ando, Toshifumi Asano, Ryugo Tero, Katsuhisa Kitano, Tsuneo Urisu and Satoshi Hamaguchi, “Extracellular matrix patterning by atmospheric pressure plasma jets”, 7th International Conference on Reactive Plasmas, 28th Symposium on Plasma Processing and 63rd Gaseous Electronics Conference (ICRP-7/SPP-28/GEC-63), Oct. 2010, Maison de la chimie, Paris, France, KWP.00034.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 あゆみ (ANDO AYUMI)

大阪大学・大学院工学研究科・特任研究員

研究者番号: 60452471