



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	シリコンチップ上での細胞培養の試み -マイクロチャンネルに対する伸展・通過挙動-
Author(s)	菊池, 裕子; Kikuchi, Hiroko E.; 久保木, 芳徳 他
Citation	ヘモレオロジー研究会誌, 1, 69-78
Issue Date	1998
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/28018
Type	journal article
File Information	Hemorheology1-69.pdf



シリコンチップ上での細胞培養の試み —マイクロチャンネルに対する伸展・通過挙動—

菊池裕子¹⁾, 久保木芳徳²⁾, 小野雅昭³⁾, 藤谷直樹⁴⁾, 菊池佑二⁵⁾

¹⁾ 北大・歯・口腔細菌、²⁾ 北大・歯・口腔生化、

³⁾ サンギ (株) 北海道研究所 (現 ファンケル (株) 食品科学研究所)

⁴⁾ 斗南病院・整形外科、

⁵⁾ 農水省・食品総合研究所・食品工学部

緒言

骨の形成は破骨細胞の作った骨の穴に骨芽細胞が入り込んで増殖分化することによって起こることが知られている (1,2)。異所性骨化症の一つである後縦靭帯骨化症では、CT スキャンで靭帯に微小な亀裂が認められ、この亀裂に入り込んだ繊維芽細胞や骨芽細胞の分泌や分化の異常・亢進が関係すると考えられている (3)。共著者の藤谷は、これまでの臨床経験からこの疾患の患者一般に止血傾向が強いことを認めており、本症の発症にヘモレオロジー、あるいは血小板の機能亢進が関係している可能性も推察される。我々は、骨芽細胞・繊維芽細胞の増殖分化に細胞周囲の微細空間構造が及ぼす影響を解明する目的で、シリコン基板に加工した微細空間構造内でこれらの細胞を培養することを検討した。これまでヘモレオロジー計測用に開発・製作されてきたマイクロチャンネルアレイは破骨細胞が作った骨の穴や溝、また靭帯の亀裂のモデルとしても有用であると思われる。本報告では、骨芽細胞および繊維芽細胞を用いて、マイクロチャンネル近傍で細胞を培養できるか、マイクロチャンネルに対して細胞がどのような伸展・通過挙動を示すか、といった基礎的検討を行った結果を記す。また、二次培養のラット骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化に及ぼす血小板の影響に関する予備的試験の結果も併せて述べる。

方法

1. シリコンチップのコラーゲンコーティング

マイクロチャンネルアレイ Bloody 5 シリーズ (チャンネル巾 6, 7, 8 μm 、チャンネル長それぞれ 20, 30, 40 μm 、チャンネル深さ 4.5 μm 、4704 本並列; 日立原町電子工業 (4)) を実験に用いた。シリコンチップに対して以下の方法で滅菌および細胞外マトリックス・コラーゲンによるコーティングを試みた。1) 十分洗浄したチップをクリーンベンチ内でホルダーにセットし、ホルダーを組み立てた後、エクステンションチューブを接続し、ホルダーおよびチューブ内を 80 %エタノールで満たした。2) オートクレーブ (120°C、15 分) により滅菌した PBS で 80 %エタノールを置換後、ホルダー全体を氷冷し、チューブを通じて氷冷した 0.1M 酢酸溶液を流し、PBS を置換した。3) その後、0.1%コラーゲン

(セルマトリックス 1-A タイプ、新田薬品) を含む 0.1 M 酢酸溶液を流し、30 分間～1 時間静置した。4) 氷冷した PBS を十分量流すことで酢酸を除去後、10 % FBS 添加 Minimum Essential Medium Alpha Medium (GIBCO BRL) 培養液で満たした。5) チューブを取り外し、ホルダーをアルミホイルでカバーした後、恒温器 (EYELA、SL-450N) に入れて 37°C に加温し、同温度に保った。

2. 骨芽細胞の調製

近交系 SPF ラット (WKAH/HK m Slc、雄、6 週令) からエーテル麻酔下に大脛骨を採取し、骨切断用ニップにて切断し、23 G 針と 1 ml シリンジを用いて骨髓液を採取した。その中の細胞をディッシュ培養し、80% コンフルエントになったものをトリプシン処理 (Sigma Trypsin-EDTA Solution; 2 分) ではがし、上記培養液に濃度 10^3-4 cells/ml で浮遊させた。また、比較のために、繊維芽細胞株 3T3-L1、骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 をディッシュ培養後、同様に浮遊液を調製した。

3. 培養・観察

マイクロピペットを用いて上記細胞浮遊液 100 μ l を上記のように準備したチップホルダーの中央の入口孔にゆっくり注入した後、細胞が到達したマイクロチャンネルアレイの部分を予め恒温器内に設置した MC-FAN 用顕微鏡ビデオカメラ装置 (サンツリー機工) および恒温器外に置いたテレビモニターを用いて観察した。また得られたビデオ画像はタイムラプスビデオカセットレコーダー (ビクター BR-S920) を用いてタイムラプス 72H モードで録画した。

4. 2 次培養した骨髓間質細胞に及ぼす血小板の影響の観察

大脛骨を採取したラットを開胸し、心臓穿刺にて 5 ml 採血し、氷冷 1% EDTA·Na、5% グルコース溶液 20 ml と混和させることで抗凝固処置した。それから 1000 rpm 10 分の遠心分離で血小板浮遊液を調製した。160~180 個の骨髓間質細胞を含む培養液 2 ml に $3 \sim 4 \times 10^5$ 個の血小板を加えた後、血小板を加えなかったものと共にディッシュ培養を 7 日間続けて変化を観察した。

結果

1. 細胞の伸展・チャンネル通過

細胞は播種後 30 分から 1 時間で基板に接着し、伸展を始めた。図 1 に、骨芽様細胞株細胞 (MC3T3-E1) 浮遊液を注入してから 3 時間 37 分後、および 5 時間 35 分後の観察を示した。細胞がマイクロチャンネルアレイ入口側のテラス部分に入り、さらにいくつかの細胞がチャンネルを通過していることが認められる。タイムラプス録画による観察では、通過しかけた細胞や完全に通過した細胞が元の場所・方向に戻って行くこともしばしば観察された。骨髓から採取した骨芽細胞、繊維芽細胞株 (3T3-L1) についても同様な伸展・通過挙動が観察された。骨芽細胞と繊維芽細胞の間で明らかな差は認められなかった。

図 2 左は播種後 8 時間の繊維芽細胞で、細胞は良く伸展しテラス部分をほぼ蔽い尽くしている。、チャンネルの中さらに出口側テラス部分にまで伸展している細胞も認められる。図 2 右はその後 12 時間経過した時の状態で、伸展していた細胞が急に動き出してテラス部分から離脱していくことが観察された。

2. 血小板の骨髄間質細胞に及ぼす影響

図 3 に血小板と一緒に加えた状態で骨髄間質細胞の培養を行った結果を示す。写真上段は開始時点、中段は 1 日経過後で、多数の血小板が骨芽細胞に付着しているように見える。下段は 5 日目のもので骨化が観察された。骨化進行は、血小板を加えていない時に比較して著しく促進されていた。

血小板の接着には血小板自身の接着能の亢進も影響すると思われる。図 4 は、後縦靭帯骨化症の患者の MC-FAN を用いた全血通過画像で、血小板凝集能の著明な亢進が認められた例である。

考察

シリコンチップをコラーゲンコーティングすることによりその上で細胞を培養できることが示された。コラーゲンは細胞外マトリックスの主要構成蛋白質であり、最近、基板上にコーティングしたコラーゲンをさらにパターニングすることにより、細胞の接着を制御でき、それによってさらに細胞の形態と機能および生存と死を制御できるという興味深い結果が示されている (5,6)。基板としてシリコン基板を用いることは目的に合わせて設計が可能な微細空間構造の導入を可能にするものであり、空間構造の役割を解明していく上で有力な手段になるものと期待される。

マイクロチャンネルに対する骨芽細胞および繊維芽細胞の伸展・通過挙動は、前述のように、それぞれの細胞の機能・役割に直接関係すると思われ、種々の条件下での定量化が望まれる。細胞のチャンネル通過は、基本的には、チャンネル入り口側のテラス部分にある細胞数とチャンネル出口側のテラス部分にある細胞数を時間経過にしたがって数えることにより定量化できると考えられるが、細胞通過数の場所による変動が大きく、また逆方向の通過も示すため、実際には容易でない。そのためまだ定量的な結果を出せる所まで到っていない。本研究では、骨芽細胞も繊維芽細胞も、6 μm 巾のマイクロチャンネルまで自発的に通過したこと、また、両細胞ともテラス部分に入ってから、より活発にラメリポディアを出すことが見られたということにとどめたい。

骨芽細胞と繊維芽細胞の挙動に明らかな差は認められなかったが、両者は類縁の細胞であり、繊維芽細胞は骨芽細胞に分化しえることから当然かもしれない。族の異なる細胞の比較が求められよう。

今回はヘモレオロジー計測用に開発されたマイクロチャンネルアレイを用いたが、独自設計・開発のマイクロチャンネルアレイが望まれる。例えば、細胞通過の観察には、テラ

ス上の空間の厚さは 4.5 μm のままで良いが、チャンネルの巾、間隔はそれぞれ 10 μm 、30 μm 程度が適当であり、また土手の高さも 15 μm 程度であればテラス部分に入る時の細胞の挙動も観察できると思われる。デッドスペースの多い複雑な構造ではコラーゲンコーティングの際の酢酸の洗い出しが難しくなるため、設計の際、考慮が必要である。今回、テラス部分で伸展していた細胞が自発的に離脱していくという興味深い現象が見られたが、栄養状態の悪化が原因かもしれない。培養液を循環できる構造の実現も重要であろう。血管内皮細胞を培養して、血液を循環させることができるようになれば、本来のヘモレオロジーの研究にも新展開を与えることができると期待される。

血小板の骨髄間質細胞の増殖分化に及ぼす影響に関する予備試験では、骨化が著しく速まることが示された。また後縦靭帯骨化症の 1 症例で血小板凝集能の亢進が認められた。これは偶然の一致かもしれないが、はじめに述べたように、藤谷はこの疾患の患者一般に止血傾向が強いことを認めており、興味深い結果と思われる。今後の検討が待たれよう。

文献

- 1) Alberts B. et al. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed. (中村桂子他監訳「細胞の分子生物学」第3版、KYOIKUSHA (1995)、pp. 1180-1187).
- 2) 久保木芳徳、藤沢隆一、水野守一：「硬組織再建の原理」(出版連絡先 北大・歯・口腔生化学、1989).
- 3) 伊藤達雄、服部孝道、山浦晶：「臨床脊椎脊髄医学」(三輪書店、1996).
- 4) 菊池佑二、門馬正人、牧野鉄也、田村正孝：細胞マイクロレオロジー測定装置 MC—FAN. *細胞* 30(7), 281-284 (1998).
- 5) Singhvi, R., Kumar, A., Lopez, G.P., Stephanopoulos, G.N., Wang, D.I.C., Ingber, D.E. Engineering of cell shape and function. *Science* 264, 696-698 (1994).
- 6) Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M., Ingber, D.E. Geometric control of cell life and death. *Science* 276, 1425-1428 (1997).

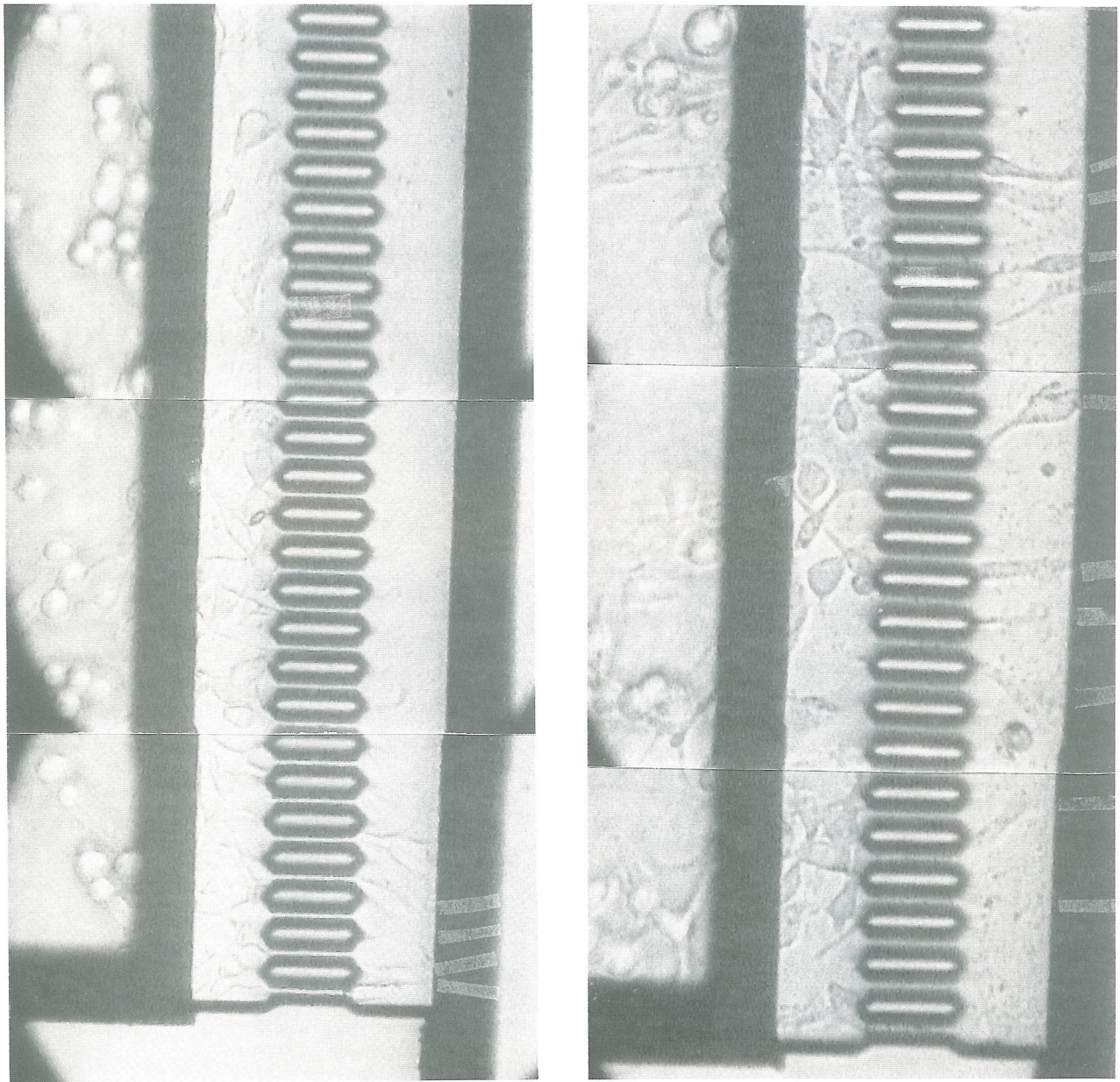


Fig. 1 骨芽細胞のマイクロチャンネル通過 (チャンネル巾 $8\mu\text{m}$; 左、採種後3時間37分 ; 右、採種後5時間35分)

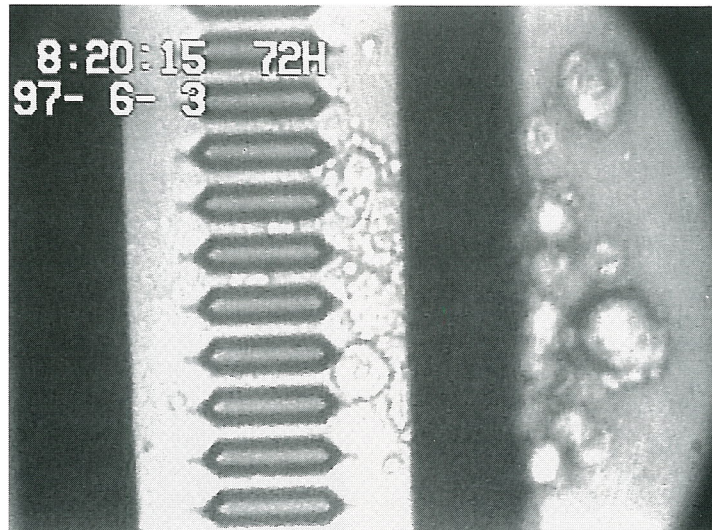
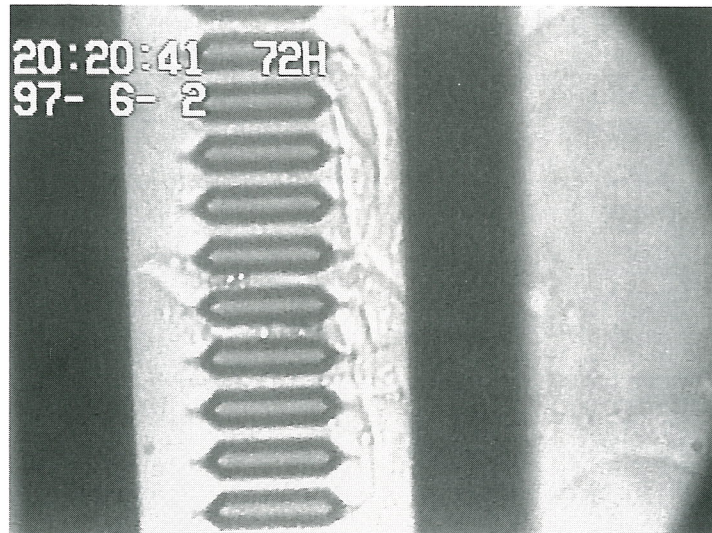


Fig. 2 マイクロチャンネルアレイに対する繊維芽細胞の伸展（上、播種後 8 時間）と離脱（下、播種後 20 時間）（チャンネル巾 8 μ m）

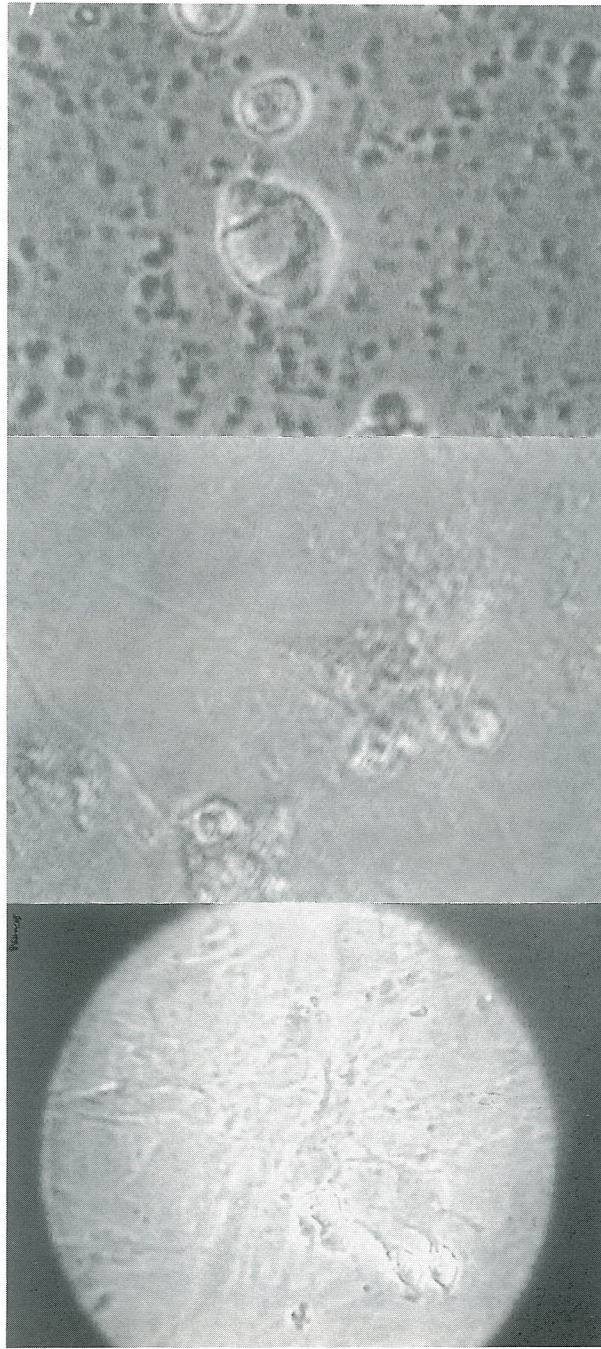


Fig. 3 骨髄間質細胞の2次培養に及ぼす血小板の影響（上段；培養開始時点：中段；培養24時間後、多数の血小板の細胞への接着が認められる：下段；培養5日経過後、骨化が認められた）

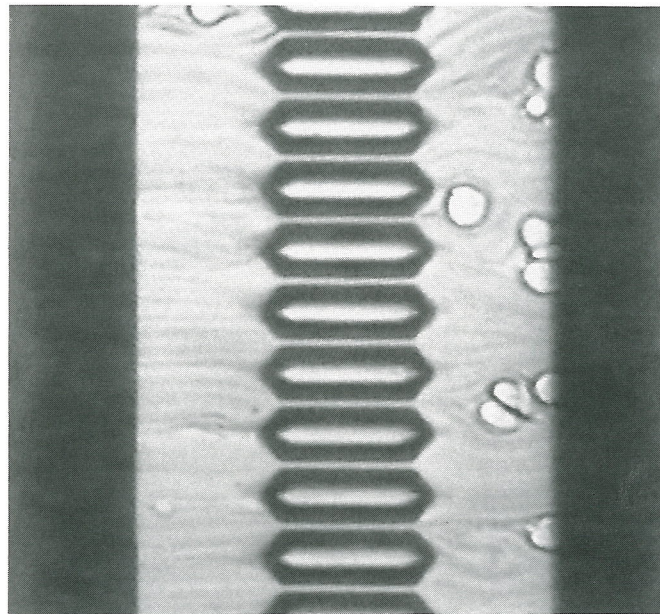
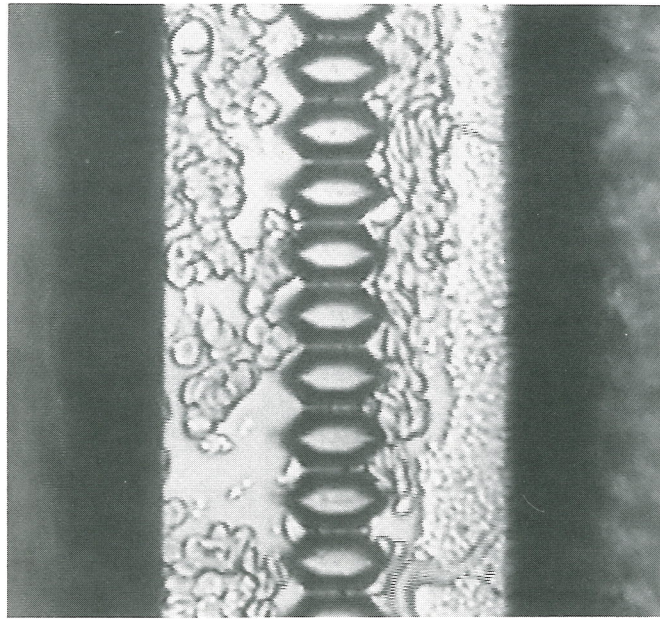


Fig. 4 後縦靱帯骨化症患者血液のMC-FAN像（上段；コントロール：下段；+EGTA5mM、流れ右から左。患者はこの半年後に症状を訴えて、手術をした）

An attempt of cell culture on a single-crystal silicon substrate: extending and transit of cells through microchannels

**Hiroko E. Kikuchi¹⁾, Yoshinori Kuboki²⁾, Masa-aki Ono³⁾, Naoki Fujiya⁴⁾,
Yuji Kikuchi⁵⁾**

¹⁾ Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Hokkaido University, N-13, W-7, Kitaku, Sapporo, 060-0813, Japan

²⁾ Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Hokkaido University, N-13, W-7, Kitaku, Sapporo, 060-0813, Japan

³⁾ Hokkaido Research Institute, Sangi Co. Ltd, 250-11, Hoshino-cho, Otaru, 047-0264, Japan

(present address, Food Science Laboratory, Fancl Corporation, Iijima 53, Sakaeku, Yokohama, 244-0842, Japan)

⁴⁾ Orthopedics, Tonan Hospital, N-1, W-6, Chuouku, Sapporo, 060-0001, Japan

⁵⁾ Food Engineering Division, National Food Research Institute, Tsukuba, 305-8642, Japan

Abstract

Etiology of ossification of posterior longitudinal ligament (OPLL) might involve anomalous growth and differentiation of osteoblast and fibroblast cells in microcracks in the ligament. We attempted to culture osteoblast and fibroblast cells in or in the vicinity of the microchannels (1,2), that might be useful also as a model of such microcracks.

Bloody 5 chips (width 6, 7, and 8 μm each with length 20, 30, and 40 μm , respectively; depth 4.5 μm ; number 4704 in parallel of one size per chip; chip dimensions 12x12 mm: Hitachi Haramachi Electronics Co., Ltd., Hitachi) were used with coating with extracellular matrix protein collagen. Cells were prepared with trypsin treatment from 80% confluent dish-cultured cells and introduced into the center well of the silicon chip through the center hole of the chip holder which was pre-filled with culture medium. The cells arriving at the channel bank were observed with a MC-FAN microscope in an oven kept at 37°C. Many cells were observed to enter into the terrace portion in front of the microchannel array and further to pass voluntarily through the microchannels. Furthermore, cells that had passed through the microchannels were often observed to pass through the microchannels in the

reverse direction. No clear difference was apparent in such behavior between osteoblast and fibroblast cells. Both cells could pass through the microchannels down to 6 μm width.

Cells extended well in the front terrace portion and covered the whole area in 8 hours, but they voluntarily detached themselves from there at about 20 hours after the start of incubation.

One of the present authors (N.F.) has recognized a relatively increased tendency for blood to clot in patients with OPLL. We, therefore, also examined effect of platelets on bone marrow-derived cells cultured in dishes. Platelets were observed to adhere to the cells and ossification appeared to be accelerated greatly in dishes with added platelets. A greatly increased aggregation of platelets was also observed by MC-FAN in a patient with OPLL. These findings might relate to the pathogenesis of the disease.

1) Y. Kikuchi, et. al., MVR 44, 226-240, (1992)

2) Y. Kikuchi, et. al., MVR 47, 126-139, (1994)