



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とマイクロピットにおける繊維芽細胞および骨芽細胞の挙動-
Author(s)	菊池, 裕子; Kikuchi, Hiroko E.; 菊池, 佑二 他
Citation	日本ヘモレオロジー学会誌, 2, 97-108
Issue Date	1999
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/28020
Type	journal article
File Information	Hemorheology2-97.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とマイクロピットにおける 繊維芽細胞および骨芽細胞の挙動—

菊池裕子¹、菊池佑二²、久保木芳徳³

- 1) 北海道大学歯学部口腔細菌学講座
- 2) 農林水産省食品総合研究所食品工学部
- 3) 北海道大学歯学部口腔生化学講座

抄録

組織を構成する細胞は細胞外マトリックスに接着して初めて生存が可能である。さらに、細胞外マトリックスの幾何学的形状が細胞の増殖・分化の制御に本質的な役割を果たしており、それによって組織の正常な形態が維持されることが近年明らかにされてきた。この細胞外マトリックスの幾何学的形状の意味について解明を進め、望ましい形状を人為的に与えることができれば、組織細胞の培養技術は大きく進展するものと思われる。そこで、我々は、細胞外マトリックス蛋白質であるコラーゲンでコーティングしたシリコン単結晶基板表面の微細加工構造空間内で細胞を培養することを検討した。ガラス基板で閉じられたマイクロチャンネルアレイと開放状態のマイクロピットアレイを用いた結果、以下のことが示された。

1. シリコン基板とガラス基板に挟まれた高さ（間隔）40 μm のスペース（ウェル部）内よりも高さ 4.5 μm のスペース（テラス部）内で繊維芽細胞の伸展が著しく速まった。
2. 栄養条件・環境条件の劣化した上記スペース内から細胞は自発的に脱出した。
3. 深さ 10 μm のマイクロピットアレイ上で骨芽細胞様細胞を4日間培養した結果、一辺が 100-200 μm の正方形のピットのアレイで最も高い細胞数に達した。
4. マイクロピットあたりの細胞数では、一辺が 50-100 μm の正方形のピットのアレイで最も高く、90%以上の細胞がピット内に集中した。
5. 細胞の形態学的変化からマイクロピット内で骨化が速まると思われた。

緒言

我々は、血液細胞のレオロジーの研究に微細加工チャンネルアレイが有用であることを報告してきた¹⁻⁵⁾。マイクロチャンネルは毛細血管のモデルとして役立ち、その三次元的精密度と可視性という特徴から毛細血管血流を支配する諸因子を定量化することを可能にした。我々は、また、イースト細胞の細胞壁の堅さ、細胞同士の接着力が細胞周期の時期によって変化することをマイクロチャンネルを通過させることにより示した⁶⁾。これらの細胞は元々浮遊細胞である。

一方、組織を構成する細胞は細胞外マトリックス（ECM）に接着しており、この ECM との接着がそれらの増殖、機能、生存にとって不可欠な条件であることが示されている⁷⁻¹⁵⁾。さらに、細胞外マトリックスの幾何学的形状（ジオメトリー）が細胞の増殖・分化の制御に本質的な役割を果たしており、それによって組織の正常な形態が維持されることが近年明らかにされてきた⁷⁻¹⁵⁾。特に、Chen らはフォトリソグラフィを用いて接着分子の平面的パターンニングを行い、細胞の形態と生存の人為的制御に成功している^{11,12)}。この細胞外マ

トリックスの幾何学的形状の意味についてさらに解明を進め、特に立体的パターンニングにより望ましい形状を人為的に与えることが出来れば、組織細胞の培養技術は大きく進展するものと期待される。

本研究の目的は、“細胞にとってジオメトリーとは何か”をさらに解明していく上で、微細加工されたシリコン単結晶基板表面の構造の有用性を示すことである。ここでは、マイクロチャンネルアレイと新たに作製したマイクロピットアレイを用いて、ECM 蛋白質コラーゲンでコーティング後、繊維芽細胞およびラット骨髄由来細胞の培養を行い、微細加工構造空間の及ぼす影響を検討した。

方法

(a) マイクロチャンネルアレイ

Bloody 5-8 (日立原町電子工業) のマイクロチャンネルアレイを使用した。チップサイズ 12 x 12 mm、チャンネル幅 8 μm 、長さ 40 μm 、深さ 4.5 μm 、4704 本並列である。チップは血液測定用のホルダーにセットして使用した。

(b) マイクロピットアレイ

直径、または一辺の長さが 25、50、100、200、400、600 μm で深さが 10 μm の円と正方形のピットのアレイをシリコン単結晶基板の (100) 面に、ドライエッチングで 8 μm 、次にウェットエッチングで残り 2 μm をエッチングすることにより作製した。各チップ (12 x 12 mm 角) 内では同一サイズのピットとした。チップ内のピットの総面積と残りの部分の総面積が等しくなるようにデザインした。また比較のため、ネガレジストを用いて作製した反転パターンすなわちマイクロメサアレイと何も加工していない平板の 12 mm 角シリコン基板を用意した。さらに、正方形のピットを辺の 1/3 巾の溝で相互に連通させたものとその反転パターンも製作した。

(c) ECM コラーゲンコーティング

マイクロチャンネルアレイについては、前報¹⁴⁾に詳細を記した。

マイクロピットアレイ、マイクロメサアレイ、平板は、オートクレーブ可能なカップに入れて滅菌し、その容器内で無菌操作によって 0.1% コラーゲン (Cell matrix 1-A type, 新田薬品) を含む氷冷 0.1M 酢酸溶液に 30 間分浸けてコラーゲンコーティングした。

(d) 細胞の調製

前報¹⁴⁾に記したが、簡略に述べると、凍結保存状態の繊維芽株細胞 (3T3-L1) を解凍し、培養液で洗浄後、CO₂ インキュベーターでディッシュ培養を行い、80% コンフルエントになった状態でトリプシン-EDTA 処理 (Sigma 1 x solution ; 2分) により細胞を剥がし、培養液中に 1 x 10⁴ cells/ml の濃度で浮遊させた。また、ラット (ウイスター、♂、6 週令) 大腿骨より採取した骨髄間質細胞を同様に培養し、80% コンフルエントになった状態で剥がし、同じく 1 x 10⁴ cells/ml の濃度の細胞浮遊液を調製した。

(e) マイクロチャンネルアレイでの細胞培養

方法は前報¹⁴⁾に記した。細胞の挙動を顕微鏡-CCD カメラ-タイムラプスビデオレコーダーのシステムを用いて細胞注入後 24 時間観察記録した。

(f) マイクロピットアレイでの細胞培養

コーティング済みのチップを pH 7.0 の PBS および培養液でリンス後、35 mm ϕ の培養用ディッシュ (コーニング) 内に置いた。細胞懸濁液 (1 x 10⁴/ml) 2 ml を各ディッシュに加え、CO₂ インキュベーターで培養した。セッティングを図 1 に模式的に示した。スパーサーディスクをチップ上の細胞の顕微鏡観察のために用いた。培養は 3 日ごとに培養液を取り換えて最長 29 日まで続けた。マイクロメサアレイおよび平板上の培養も同様に行っ

た。

(g)細胞数の計数

チップをPBSで穏やかに洗い、次に、トリプシン-EDTA処理によりそれぞれのチップから細胞を剥がし、トリプシン液と共に4 ml メディウム中に移し、遠心(3,000 rpm, 5分)によって集めた。細胞を100 μ lの培養液に再浮遊した後、Burker-Turk 計数盤を用いて計数した。

結果

1) マイクロチャンネルアレイに対する繊維芽細胞の伸展挙動

Bloody 5-8 マイクロチャンネルアレイに対する細胞の挙動の観察例を図2に示した。播種によりテラス部分に入った細胞は直ちに伸展挙動を開始したが、その手前のウェル部分にある細胞は1時間経過しても球状のままであり、2時間経過後初めて伸展挙動が見られるようになった。6, 7時間後にはテラス部分を完全に蔽うまでに伸展が見られ、繊維芽細胞に特徴的な形態を示した。さらに時間が経過すると、細胞周辺部が波立つようになり、次第にその動きが激しくなってテラス部分から脱出していくことが見られた。

2) マイクロピットアレイ内での培養細胞の分布

細胞は播種後30分から1時間で基板に接着し、伸展を開始した。この伸展の速度は、上記のマイクロチャンネルアレイチップのウェル部にある繊維芽細胞の伸展より速いように思われた。

培養9日目の顕微鏡画像の例を図3と図4に示した。細胞は正方形のピットの場合も円形のピットの場合もピット内により多く分布した。マイクロメサアレイでは細胞はメサ周囲により多く分布した。すなわち、細胞は窪んだ部分に入り易いことが示された。

正方形ピットについて培養4日目で数えたピット内にある細胞数と総細胞数の比を図5に示した。横軸は、ピットの面積を対数で取った。600 μ mのピットの場合、顕微鏡視野にマークとなるものがなくなるため数えることが困難であり、図には含まれていない。均等に分布している場合この比は50%になるはずであるが、いずれのサイズのピットの場合でも50%を上回った。特に、50 μ mのサイズのピットでは、殆どの細胞がピット内にあることが示された。

3) マイクロピットアレイ内での培養細胞の増殖率

正方形のピットについて培養4日目で数えた総細胞数とピットサイズの間係を図6に示した。塗りつぶした縦棒は顕微鏡的に数えた結果であり、白抜きの結果は細胞をトリプシン処理ではがして計数盤で数えたものである。600 μ mのピットについては計数盤で数えた結果のみを示した。顕微鏡的に数えた結果と計数盤で数えた結果に若干の食い違いがあるが、ピットサイズが50 μ mから200 μ mで細胞の増殖が速いことが示された。

4) マイクロピットアレイ内での培養細胞の骨化速度

培養9日目で敷石状の細胞のクラスター、磷酸カルシウムの沈着と思われる多数の微粒子の出現等、骨化と認められる特徴が観察された。この形態学的特徴から、平板に比べて、ピット内特に一辺または直径が25~50 μ mのピット内で細胞の骨化が速いように見えた。29日目になるとピット内でも平板上でも差が無くなるように見えた。培養9日目と29日目の細胞の観察例を図7に示した。

考察

本研究によりまず示されたことは、微細加工したシリコン基板表面の構造を ECM コラーゲンでコーティングすることにより、その中で細胞を長期間培養できたことである。細胞自身がコラーゲンを分泌するため、事前のコーティングは不要とも考えられるが、付着・伸展が十分でなく剥がれやすいことが試験的に示された。

繊維芽細胞と骨髄由来細胞を比較すると、後者の方が付着・伸展が速くより接着性が高いと推定されたが、用いた細胞の活性の差による可能性もあり、さらに検討が必要である。

マイクロチャンネルアレイのような閉構造では培養液の循環系が不可欠である。環境条件・栄養条件の悪化により、一旦は完全に付着・伸展した細胞が、そのまま壊死するのではなく、自発的に脱出していくことが見られたことは興味深い結果と思われる。

骨芽細胞は破骨細胞の作った骨の穴に入り骨化を行うことが知られている。これまでの ECM ジオメトリーの研究においても骨誘導は最も多く用いられてきた方法ないし材料である。共著者の久保木ら^{9,10)}は、多孔質のハイドロキシアパタイトのブロックを埋め込む実験で、300~400 μm の孔が最も効率的に骨を誘導することを示した。ここでの実験では 50~200 μm のピット内で骨髄由来細胞の増殖・分化が速まることが示唆されたが、深い孔構造と浅いピット構造による差と推定される。また、ここで用いた深さ 10 μm のピットでは、ピット内外の環境・栄養条件に大きな差はないと思われ、細胞が認識したピットの条件は純粋に幾何学的なものと推定される。このピットの認識が骨芽細胞に固有な性質かどうかはさらに検討しなければならない。

正方形のピットと円形のピットで細胞に及ぼす影響に差があるかどうかは今回の測定では明らかにならなかった。しかし、ピットサイズによっては、細胞の体積に比して接着面積、誘導される形状に差があり、何らかの違いが出てくるはずである。

微細加工技術を用いることにより、いくつかの制約はあるものの、デザインされた空間構造を創製でき、種々の細胞に対するジオメトリー効果を検討できる。また、正確に規定された空間構造内では細胞の挙動の定量化も比較的容易である。

一般に、*in vitro* または *in vivo* において細胞を増殖させ、分化させるための細胞支持体には、1) 表面のテクスチャー、2) 接着分子、3) 立体幾何的構造、の最適性が求められる。少なくとも *in vitro* の細胞培養において微細加工表面構造を有するシリコン単結晶基板は極めて有用な細胞支持体になるものと期待される。

最適の支持体の設計は、今後、大量培養や代用組織・人工臓器の設計上、欠かすことのできない新分野になり得ると思われる。例えば、動物細胞の増殖、分化を効率的に行うことができれば、医療面、産業面で大きな効果がもたらされよう。医療面での例として、患者本人の細胞を採取してこれを速やかに増殖させることにより、免疫反応を生じない代用組織・人工臓器が可能となる。代用組織・人工臓器としては、人工皮膚、人工肝臓、人工脾臓などが考えられる。また、癌の免疫療法に必要なリンパ球の大量培養にも適用できよう。さらに、人工歯根、人工骨など生体内に埋め込まれる人工材料の表面に同様の微細加工を施すことにより、生体内での細胞増殖が活発に行われ、生体親和性に優れた人工材料とすることもできよう。産業面では、サイトカイン、成長因子、リコンビナント蛋白質など、バイオテクノロジーの手法を活用して細胞から得られる有用物質を生産するバイオリアクターにおいて、細胞増殖速度を高め、効率良い生産を可能としよう。

今後、微細加工技術による表面構造の有用性をさらに示していきたいと考えている。

参考文献

1. Kikuchi, Y. et al. *Microvasc. Res.* 44, 226-240, 1992.
2. Kikuchi, Y. et al. *Microvasc. Res.* 47, 126-139, 1994.
3. Kikuchi, Y. et al. *Microvasc. Res.* 47, 222-231, 1994.
4. Kikuchi, Y. *Microvasc. Res.* 50, 288-300, 1995.
5. Kikuchi, Y. et al. *SPIE* 2978, 165-171, 1997.
6. Kikuchi, H. E. et al. *SPIE* 3258, 188-194, 1998.
7. Reddi, A. H. and Huggeins, C. B. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 27, 634-637, 1973.
8. Sampath, T. K. and Reddi, A. H. *J. Cell. Biol.* 98, 2192-2197, 1984.
9. Kuboki, Y. et al., *Connect. Tissue Res.* 32, 219-226, 1995.
10. Tsuruga, E. et al. *J. Biochem.* 121, 317-324, 1997.
11. Singhvi, R. et al. *Science* 264, 696-698, 1994.
12. Chen. C. S. et al. *Science* 276, 1425-1428, 1997.
13. den Braber, E. T. et al. *J. Biomed, Mater. Res.* 40, 291-300, 1998.
14. 菊池裕子、久保木芳徳、小野雅昭、藤谷直樹、菊池佑二 ヘモレオロジー研究会誌 1, 69-78, 1998.
15. Kikuchi, H. E. et al. *SPIE* 3606, 150-157, 1999.

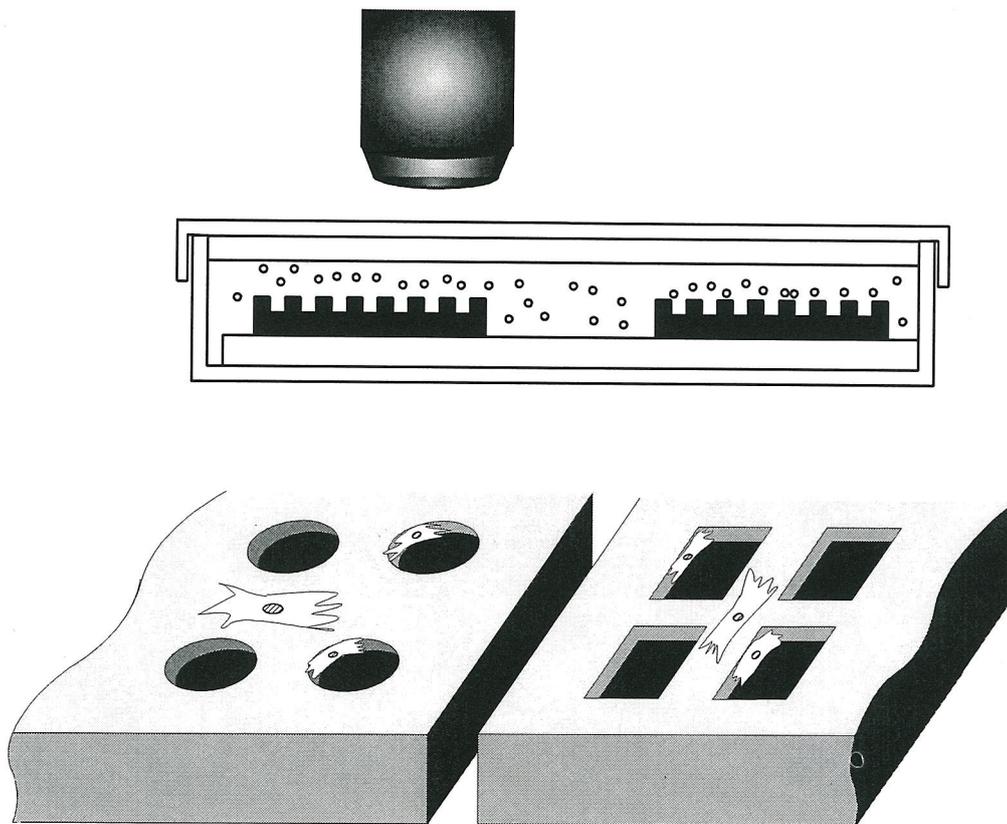


図1 マイクロピットアレイ上での細胞培養の模式図

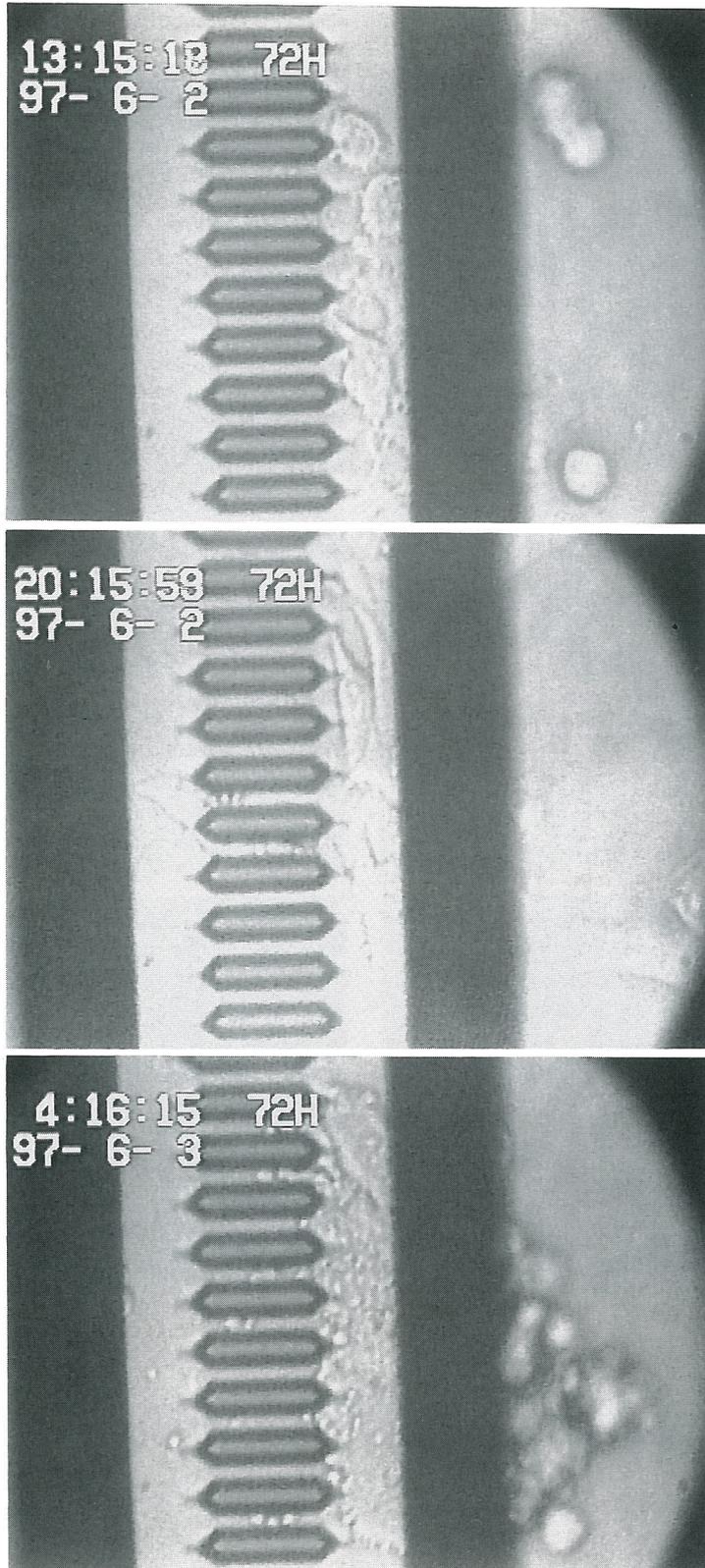


図2 マイクロチャンネルアレイ入口テラス部における繊維芽細胞の伸展・離脱挙動（上から播種後1時間、8時間、16時間）

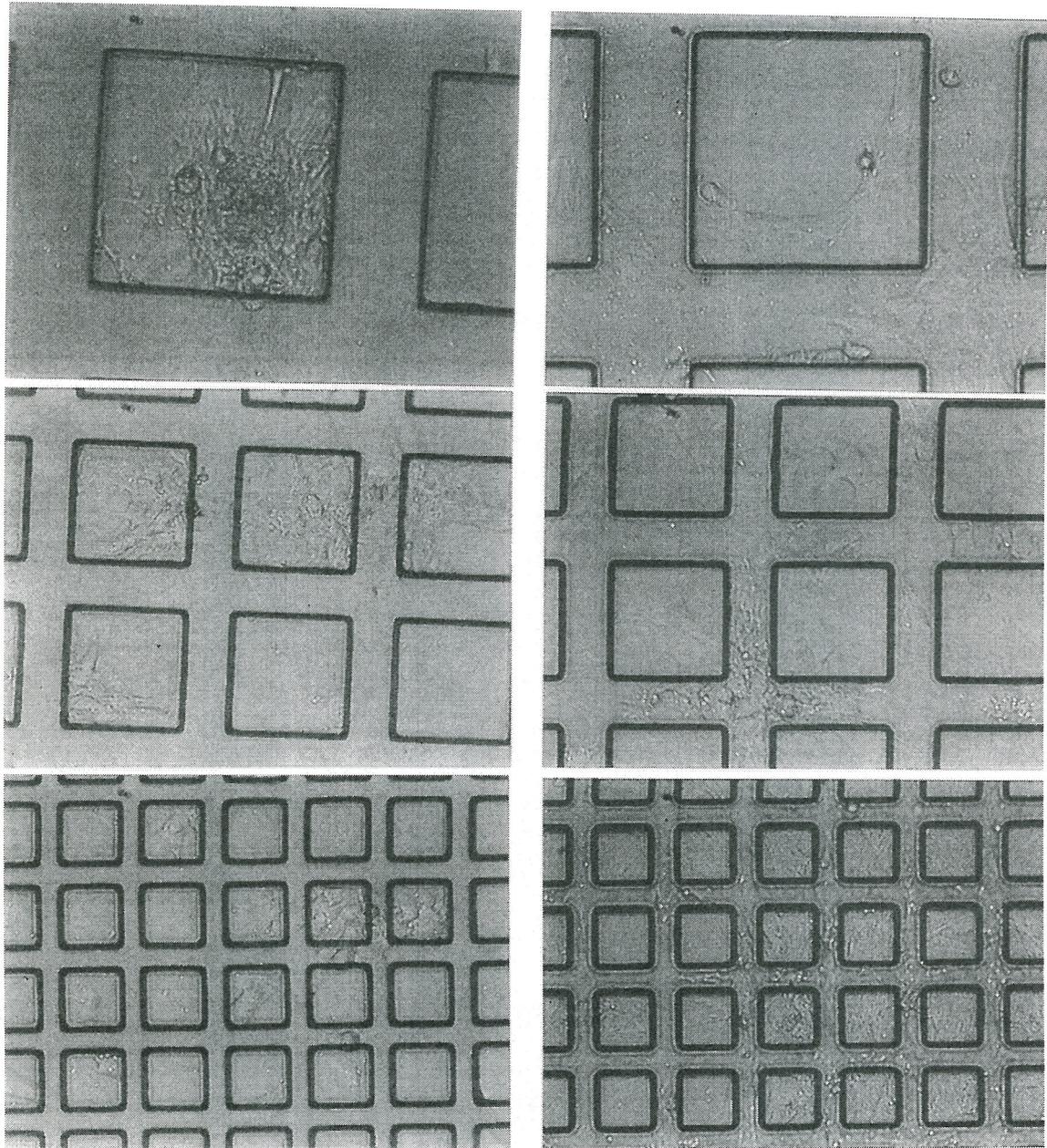


図3 サイズ 200 μm 、100 μm 、50 μm の正方形ピットアレイ（左側）およびその反転パターン内での培養細胞（培養9日目）

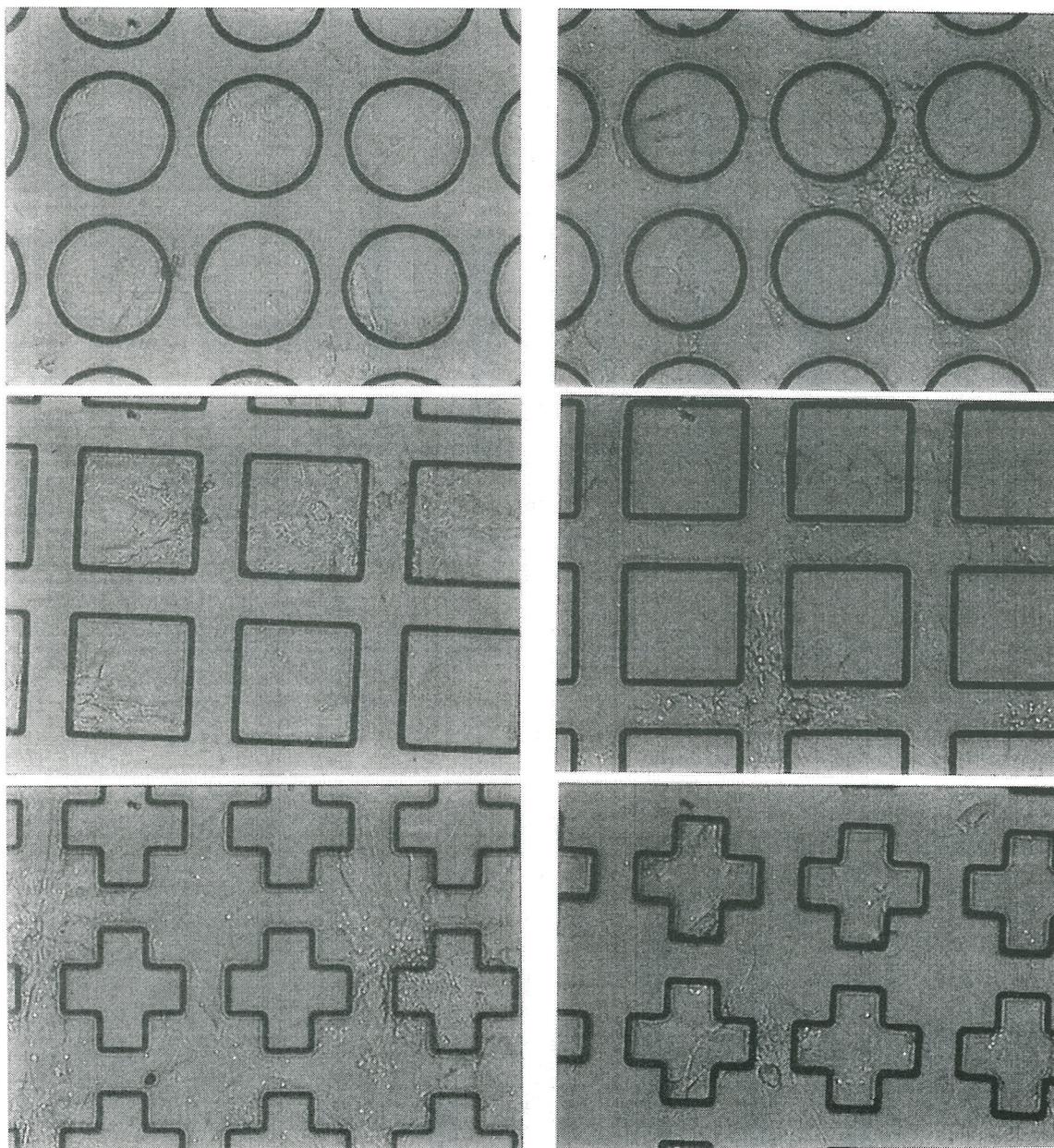


図4 サイズ 100 μm のマイクロピットアレイ (左側) およびその反転パターン (右側) 上での培養細胞の分布 (培養9日目).

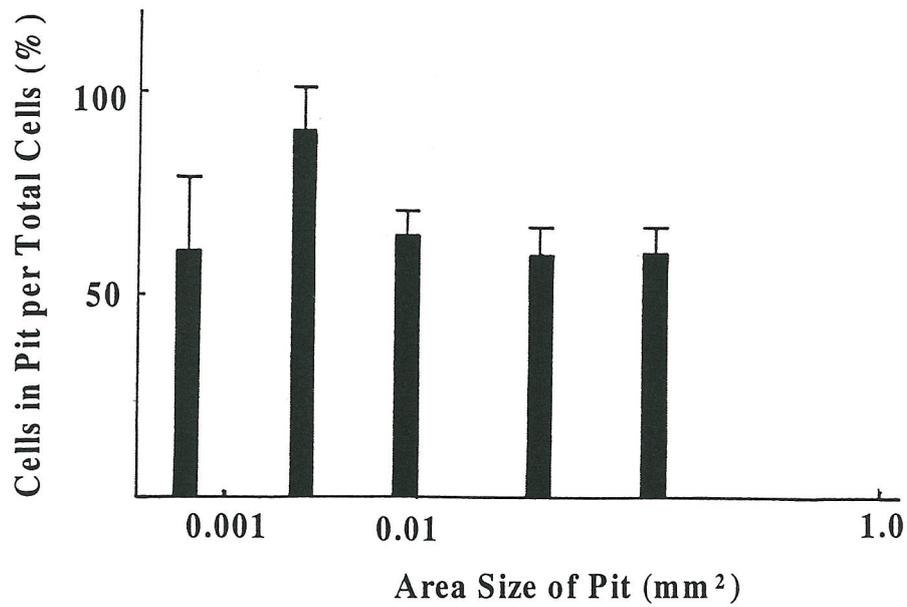


図5 培養4日目におけるピット内の細胞数と基板上的細胞総数の比

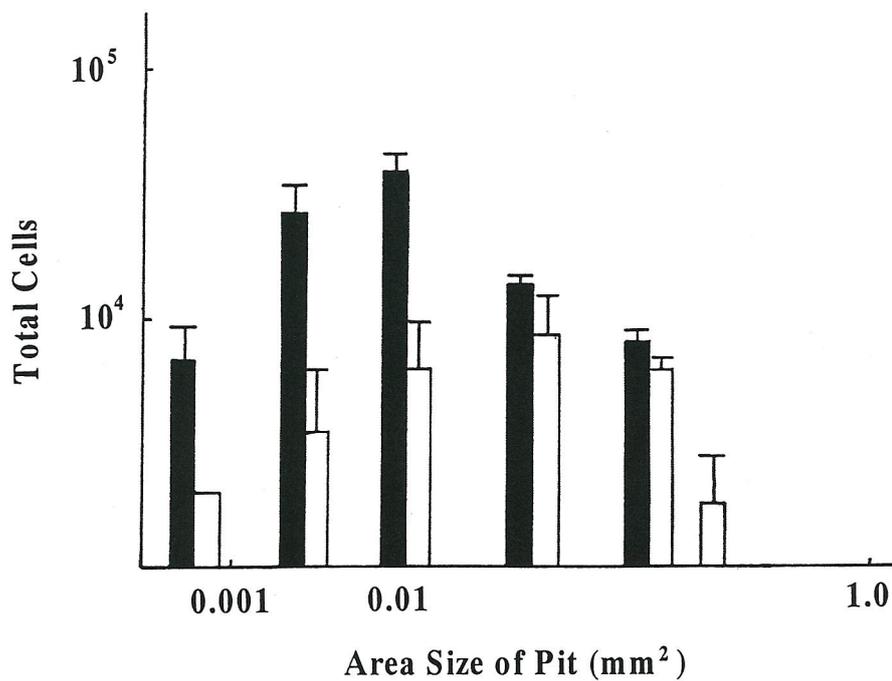


図6 培養4日目におけるマイクロピットアレイを加工した基板上的細胞総数（塗りつぶした棒；顕微鏡的に計数した結果、白抜き棒；基板から剥がして計数盤で計数した結果）

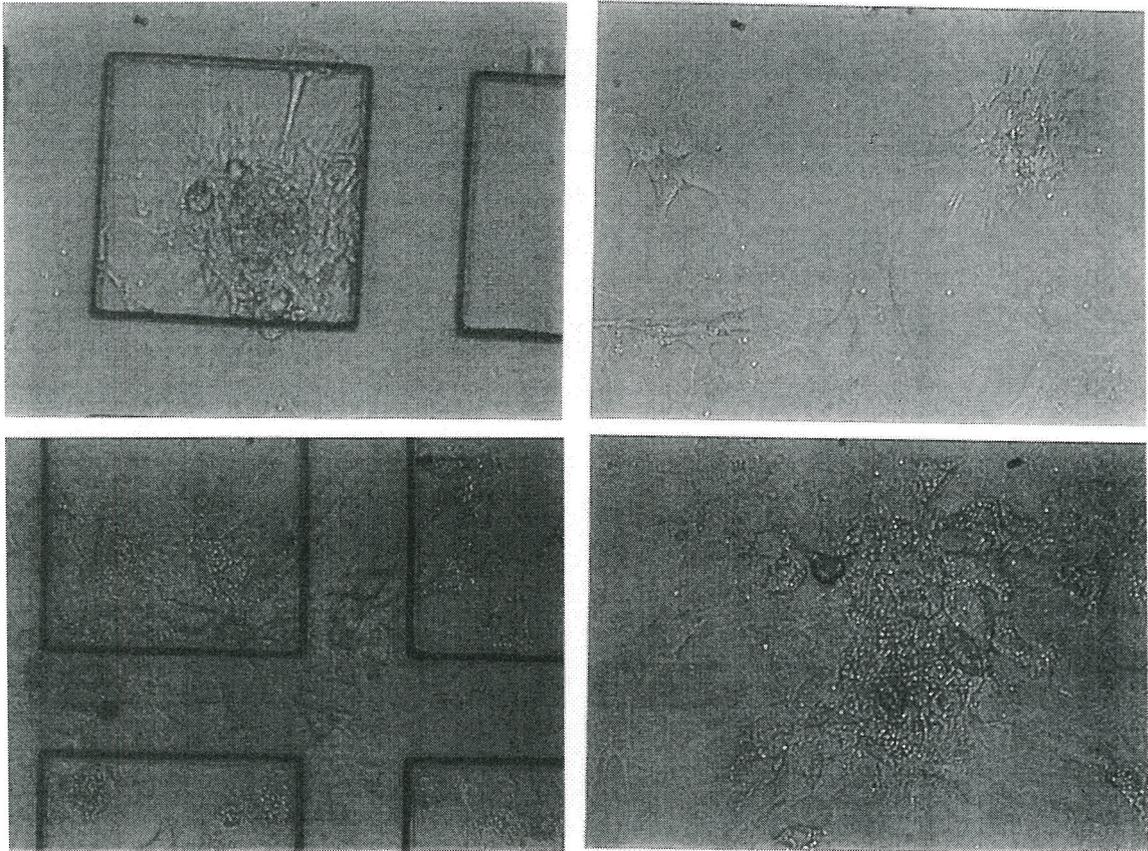


図7 ピット内および平板上の培養細胞. 上段培養9日目、下段培養29日目

An attempt to culture cells on a single-crystal silicon substrate:
Stretching and growth of fibroblast and osteoblast-like cells
in a microchannel array and micropit array

Hiroko E. Kikuchi¹, Yuji Kikuchi², and Yoshinori Kuboki³

- 1) Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Hokkaido University, Sapporo, 060-0813
- 2) Food Engineering Division, National Food Research Institute, Tsukuba, 305-8642
- 3) Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Hokkaido University, Sapporo, 060-0813

Abstract

Tissue cells adhere to extracellular matrix (ECM) and this attachment to ECM is known to play an essential role in their growth, function, and even survival. Recently, the geometry of ECM has been shown to play an additional role in the regulation for cells to proliferate and differentiate so that normal morphologies of tissues can be formed or maintained. The aim of the present study is to show usefulness of structures microfabricated in the surface of a single crystal silicon substrate to further elucidate the role of ECM geometry. Fibroblast and bone marrow-derived cells were cultured in a microchannel array and micropit array both coated with ECM protein collagen. Fibroblast cells showed more rapid stretching in the terrace area, i.e., a space having 4.5 μm height than in the well, i.e., a space having 40 μm height. Cells fully stretched in the terrace area voluntarily detached themselves from there when nutrient supply and environmental conditions became worse. Bone marrow-derived cells appeared to voluntarily enter into the pits and showed an increased growth rate particularly in 100-200 μm square pits.