



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	微細加工空間構造内での培養細胞の増殖・分化：デザインされた異方性空間を与える培養基板の開発
Author(s)	菊池，佑二；菊池，裕子；高橋，正行 他
Citation	再生医療, 5(3), 64-73
Issue Date	2006-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/30107
Type	journal article
File Information	saisei5-3.pdf



微細加工空間構造内での培養細胞の増殖・分化 —デザインされた異方性空間を与える培養基板の開発—

*Cell proliferation and differentiation in microfabricated spaces:
Development of culture plates having designed anisotropic spaces for cells*

Keywords

細胞培養基板
人工細胞外マトリックス幾何学
微細加工技術
マイクロピットアレイ→用語解説 108 頁
マイクロチャンネルアレイ

菊池 佑二¹⁾ 菊池 裕子²⁾ 高橋 正行³⁾
矢澤 道生⁴⁾ 西 泰治⁵⁾ 久保木 芳徳⁶⁾

- 1) 株式会社菊池マイクロテクノロジー研究所
- 2) 北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座
- 3) 北海道大学大学院理学研究院化学部門
- 4) 北海道大学大学院先端生命科学研究所先端細胞機能科学分野
- 5) 株式会社クラレ新事業開発本部プロジェクト推進部ライフサイエンス関連事業グループ
- 6) 北海道大学名誉教授

Summary

Tissue cells appear to proliferate and differentiate guided by the extracellular matrix (ECM). It is discussed that the geometry of ECM would be of prime importance for the tissue formation among the many factors involved in the cell-ECM interactions and hence that the geometry property of ECM should be incorporated into an artificial ECM if it is to be implanted to regenerate the tissue. Meanwhile, we created microchannel arrays in the surface of a single-crystal silicon substrate using the advanced microfabrication processes and showed them useful as a model of capillaries *in vivo* for studies of hemorheology related to capillary circulation. In the present report, our efforts are reviewed that have been made to culture cells in variously designed microspaces that were similarly formed in the surface of a silicon substrate or, recently, of an acrylic resin substrate in order to study more clearly "what is the geometry?" for cells. Micropit arrays were a preferably adopted design. Osteoblast-like cells preferentially entered into the micropits, particularly of size 50 μm (w) $\times$ 50 μm (w), and showed there a faster proliferation and ossification. In contrast, fibroblast cells preferentially proliferated outside the pits and aligned along the lattice-like path surrounding the pits.

はじめに

止まることのない微細化・集積度の増大を達成し続けてきた半導体微細加工技術をエレクトロニクス以外の分野に応用する研究が近年活発である¹⁾²⁾。その中で我々は、微細加工されたシリコン単結晶基板表面の溝や窪みをそのまま空間構造として、すなわち、マイクロチャンネルやマイクロスペースとして用いる独自の応用を開発し、流体特に血液のレオロジーの研究に用いてきた^{3)~6)}。ミクロンサイズのチャンネルおよびスペースでは壁との接触面で働く力がバルク内の力と拮抗する大きさになるためと思われるが、血液細胞の接着性や凝集性のおそらくわずかな違いによっても血液細胞の集団の流れにドラスティックといってよいほどの大きな差が生じることを見出した。また、同一サイズのマイクロチャンネルのアレイから水中に押し出された油が極

Kikuchi, Yuji¹⁾ / Kikuchi, Hiroko²⁾ / Takahashi, Masayuki³⁾ / Yazawa, Michio⁴⁾ / Nishi, Taiji⁵⁾ / Kuboki, Yoshinori⁶⁾

1) Kikuchi Micro-Technology Laboratory Co. Ltd.

2) Department of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dentistry, Hokkaido University

3) Division of Chemistry, Graduate School of Science, Hokkaido University

4) Division of Cellular Life Science, Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University

5) Life Science Devices & Materials, Project Promotion Dept., New Business Development Div., Kuraray Co. Ltd.

6) Emeritus Professor, Hokkaido University

E-mail: ykikuchi@wine.ocn.ne.jp

めて均一度の高い(粒子径の分散が小さい)エマルジョンを形成するという予想しなかった効果も観察された⁷⁾。

一方、組織細胞の増殖・分化さらに組織形成においても、壁あるいは細胞外マトリックスECMとの接触面で働く力と細胞内で働く力の対等的・拮抗的關係がおそらく極めて重要になると推定される。その接触面ないし接着面での事象に対して近年、物理的、化学的、生化学的な研究が活発に行われてきているが、その幾何学に焦点を当てた研究はまだ少ない。久保木らは再生医療において人工的なextracellular matrix (ECM)の幾何学こそ組織再生を導く上で最重要ポイントであるとの認識から「人工ECMの幾何学」を提唱している⁸⁾。

増殖・分化時には物質の輸送を含めて細胞内の反応特に合成反応の系の空間的方向性(異方性)が特に重要になるであろうが、その反応系の立体幾何学に細胞周囲の空間の立体幾何学が強く影響することは当然予想される。また、細胞が直接認識できないであろう大きさの空間の幾何学は生理活性物質の三次元的濃度勾配の形成を通して細胞内の反応系に影響を及ぼすことが推定される。接着斑と細胞内骨格蛋白質の重要な役割の1つに細胞外から細胞内への立体幾何学の伝達があるのかもしれない。

本稿の筆者らはそれぞれ別々の仕事をしてきたが、今からみると必然性を感じられるほどの偶然的関係から、微細加工基板表面の細胞サイズ以上の微

細加工パターンが培養細胞の増殖・分化に及ぼす影響を研究するグループを形成することになった⁹⁾。この微細加工パターンは、用いた基板が人工ECMになり得るかどうかは別にして、久保木らが想定した幾何学そのものといっておそらく間違いのないであろう。

ここでは、微細加工基板の開発を中心にやって行ってきた筆者からみた研究の経緯とこれまでの研究の成果を紹介し、微細加工基板が上記のような仮説の検証に役立つことを論じたい。

シリコン単結晶基板表面に 加工された毛細血管モデル： マイクロチャネルアレイ

血液細胞は浮遊状態で生存できる例外的な細胞であるが、それぞれ機能を発揮する時には非接着性から接着性へと変化する。赤血球はその表面の血漿蛋白質吸着層により接着性がほぼ完全に抑制された状態で、すなわち毛細血管の通過性を最優先にした状態で、酸素輸送の機能を果たしている¹⁰⁾。浮遊状態で120日もの寿命を有することはおそらく驚くべきことであるが、吸着した血漿蛋白質がECMの役割を果たしていると推定される。血小板は巨核球の断片であるが、断片化しても接着性の制御が保たれていることは注目すべきことであろう。

溶血を起こさない限り毛細血管において赤血球が流路障害を起こすことはあり得ないと思われるが、接着性の発現が必須の白血球と血小板はしばしば流路障害の原因になる。さらに、この

毛細血管の流路障害から周囲の組織の壊死に至ることも決してまれではないと推測される。局所のことであるから、我々はそれを自覚し得ないが、線維化した微小な瘢痕が加齢と共に蓄積し、次第に組織の機能が低下することになる。このような変化が老化や生活習慣病の本態を構成していると考えられる^{11) 12)}。

いくつかの悪条件が重なって組織の機能不全にまで陥れば、今のところ再生医療以外に救う手立てはない。したがって、再生医療を必要とする最大の原因は毛細血管の流路障害にあるといつてよいわけである。

活性化した白血球および血小板による流路障害を研究する目的で開発されたのが筆者らのマイクロチャネルアレイ^{3) 4)}である。その開発の経緯は割愛せざるを得ないが、赤血球変形能の測定¹³⁾や白血球の走化性の測定に用いられてきたニュークリポアフィルターに替わる精密フィルターを製作する試みからマイクロチャネルアレイの開発に至ったことは述べておきたい。

日立製作所の微細加工技術研究グループと共同研究を始めた(1988年)頃のエッチング技術では、基板に微小な貫通孔を開けるのが困難であった。そのため、多数の並列な微小な溝を加工した基板表面全体をガラス基板で漏れのないように覆うことにより溝の列を流路の列に変換した構造をフィルターの代替物とした。しかし、これが怪我の功名となった。基板表面に展開された流路はその全域が同時に顕微鏡

焦点面内に入るため、流れの全域での顕微鏡同時観察が可能になった。従来のフィルターの構造では物が顕微鏡の焦点面を横切る形で動くため高倍率での観察が困難であり、また、入口・出口の同時観察も両面同時観察用の特別の顕微鏡観察システムでも作らない限り不可能である。

その後、観察性を高める目的でマイクロチャンネルアレイ入口および出口に全チャンネルにわたるテラス構造を設ける工夫を行ったが、このテラス構造がいわゆる「血液サラサラ・ドロドロ」の違いを極めて鮮明に現出させることになった。また、エマルションの形成においてもテラス部分での力の関係が極めて重要であることが中嶋らによって示されている¹⁴⁾。

これらのことから、我々が開発したマイクロチャンネルアレイの特徴がフィルター構造にあるというより、フィルター様の空間構造(2つの三次元的空間を多数の並列な一次元的空間が二次元的空間を介してつないでいる構造)にあって、その3つの空間部分で壁との接触面で働く力とバルクにかかる力の関係が大きく異なるため、中を通過する物によっては我々が予想できなかった、すなわちフィルター作用以外の作用・効果がみられるようになったと理解される¹⁵⁾。

マイクロチャンネルアレイに対するパン酵母の通過性

血液レオロジー測定用マイクロチャンネルアレイのチャンネルの深さは4.5μm

であり、チャンネルの底面と同じ位置に設けたテラス面もその上のガラス面から4.5μmの位置にある。パン酵母の円筒部の径は約5μmである。パン酵母浮遊液をマイクロチャンネルアレイに流してみたところ、パン酵母はテラス部分入り口ですべて阻止されることがみられ、その細胞壁が変形を許さない固さであることが示された¹⁶⁾。興味深いことに、出芽期にあるパン酵母を流すと大部分がテラス部分に入れるようになり、一部はチャンネルを通過することが観察された。このことから出芽期には細胞壁が全体的に柔らかくなることが推定された。固い細胞壁を有するパン酵母も濃度50%以上のエタノールで処理するとテラス部分に入り得るようになり、さらにチャンネルを通過し得るようになることも観察された。細胞壁成分のエタノール抽出によって細胞壁物性が大きく変化したことが推定される。

パン酵母は浮遊細胞であるが、その増殖が出芽の形で行われることは、ECM形成と増殖が同時に行われるということで、ECMおよび人工ECMの幾何学の観点からも興味深いことであろう。

マイクロチャンネルアレイ内の細胞培養

筆者ら¹⁷⁾は、マイクロチャンネルアレイのコラーゲンコーティング法を検討した後、ラット骨髄間質細胞、線維芽細胞株および骨芽細胞様細胞株の培養を試みた。その報告には本稿の主題で

ある細胞周囲の微細空間構造の及ぼす影響の解明が目的として記され、さらに、異所性骨化症の1つである後縦靱帯骨化症では靱帯の微小な亀裂がCT撮影で認められることやその患者一般に止血傾向が強いことから、骨化に空間の形状(亀裂)と誘導因子(おそらく血小板由来増殖因子)が重要であることが議論されている。少なくとも目的だけは当時から明確であったようである。

テラス部(二次元的空間部)に入った細胞はその手前の大きな流路部(三次元的空間部)のガラス基板に付着した細胞に比べて速く伸展すること、細胞はチャンネル部を自発的に通過していくこと、線維芽細胞はテラス部分を敷きつめるように伸展・増殖することなどが観察された。特に興味深かったのは、テラス部分を敷きつめた細胞がおそらく酸素・栄養物の不足か老廃物の蓄積により環境が悪化したためと思われるが、細胞膜の激しい揺動を示した後にテラス部分から自発的に脱出していくことが観察されたことである。

マイクロピットアレイを用いた細胞培養

微細加工パターンの培養細胞に及ぼす影響を本格的に研究する目的で開発されたのがマイクロピットアレイであり、その構造はマイクロチャンネルアレイよりさらに単純である。久保木の要請は人工ECM素材、たとえばハイドロキシアパタイトに対する微細加工パターンの作製であったが、半導体基板

を加工するために開発された微細加工技術の他の素材への応用性が低いため、マイクロチャネルアレイ同様シリコン単結晶基板にマイクロピットアレイを加工することになった。

1. 微細加工技術の概略・特徴

半導体微細加工技術の基本行程は以下のようなものである¹⁸⁾。

- ①スピナーを用いて基板にフォトレジスト(感光剤)を塗布する。
- ②フォトレジストを塗布した基板にフォトマスク(表面の金属薄膜にパターンを描いたガラス基板)を重ねて露光する。
- ③露光されたフォトレジストを現像・定着する(光が当たった部分が溶解するポジタイプと光が当たらなかった部分が溶解するネガタイプがある)。
- ④ウェットエッチングもしくはドライエッチング法によりフォトレジストでカバーされていない基板部分を彫り込む。
- ⑤①に戻る。

集積回路を作る場合は、P型もしくはN型領域を作るためのイオン拡散あるいはイオン打ち込み行程および絶縁薄膜や金属薄膜の形成行程が加わって上記の一連の行程が繰り返されることになる。

微細加工技術によって作製できる空間構造のデザインには、上記の実際のプロセスから来る強い制約が存在する。基板表面方向のパターンは線幅の限界があるものの作図の手間を厭わな

ければほぼ任意にデザインが可能であるが、深さ方向に関してはパターンのデザインは基本的にできないと考えたほうがよい。最近普及するようになったICP-RIEと呼ばれる高密度プラズマの反応性エッチングによる垂直の彫り込み、すなわち、垂直の壁が形成されるか、結晶軸方向でエッチング速度が著しく異なるウェットエッチングによって一定の角度の斜面が形成されるかのどちらかである。また、エッチングの深さによるが、ドライエッチングでは底面(エッチング面)が荒れてくるのに対し、ウェットエッチングでは鏡面が形成される。

マイクロチャネルアレイの場合、深さ方向に段差のある構造の加工が不可欠であり、そのためには2枚のフォトマスクを用いて上記プロセスを2回行う必要がある。初回のエッチングで基板表面は平面から段差のある面が変わるため、2回目のフォトレジスト塗布においてカバリング不良が極めて起きやすくなる。カバリング不良があると1回目のエッチングで作った構造が2回目のエッチングで破壊される結果になる。この問題の克服に我々(正確には微細加工を請け負ってくれた会社)は1年以上の時間を要した。

また、半導体微細加工技術は微細加工のためというより大量生産のために開発されたといったほうが正確である。同じものを何百万個と作るから大規模集積回路が信じられないほどの低価格で生産できるわけである。少量生産とデザインの変更は極めて高いもの

につく。

細胞培養の研究に半導体微細加工技術を導入したのは我々が最初ではない。特にマイクロプリント技術で接着因子のパターン(平面パターン)を作製した研究の成果^{19) 20)}には目を見張るものがある。しかしながら、上記の半導体微細加工技術の特殊性からそのような研究を継続していくことは必ずしも容易ではない。

2. マイクロピットアレイ基板の第1版デザイン

細胞サイズ以上のピットということで、直径あるいは1辺の長さが25、50、100、200、400、600 μm 、深さ10 μm の円形および正方形ピットをそれぞれ12mm角基板に加工した。ピット部分の面積とその周囲の面積を等しくしたことがその時のポイントであった。すなわち、ピット部の総面積がピットサイズによらず正確に基板総面積の1/2になるようにしたわけであるが、それが以下に述べる「マイクロピット効果の発見」を可能にした。

深さ10 μm 、直径あるいは1辺の長さが400あるいは600 μm といったサイズは細胞にとってピットというよりグランドであろうが、このようにアスペクト比(縦/横比)を大きく振れることが細胞に対する「空間の幾何学」を明らかにしていく手段になる。

3. 骨芽細胞様細胞に対するマイクロピット効果の発見

筆者ら²¹⁾は、マイクロピットアレイ

基板および同じく12mm角の平板をコーゲンコーティングした後、35mm径の培養ディッシュの中にピットサイズの異なる3枚の基板と1枚の平板を入れて継代2代目(P2)のラット骨髄間質細胞を4日間培養した。培養後トリプシン処理により基板から細胞を剥がして細胞数を数える方法により、50 μ mサイズのマイクロピットアレイ基板で細胞数がピークになるきれいな曲線を得て、マイクロピット内で細胞増殖が促進される効果を明らかにした。その効果を久保木は「マイクロピット効果」と命名した。上記のようにピット部の総面積はピットサイズによらず基板総面積の1/2で一定である。マイクロピット効果がなければどの基板でも細胞数は一定になり、平板上の細胞数と一致するはずである。

培養期間を9日さらに29日まで延長して骨化がピット内で加速されることを示すいくつかの傍証を得たが、骨化の指標となるアルカリフォスファターゼ(ALP)の活性染色による確認はシリコン基板表面からの強い反射光のためうまくできなかった。その後、後述する西らによって開発された透明なプラスチック製のマイクロピットアレイ基板を用いて同じく我々のグループである安田らによって確認がなされた。

4. 稠密型マイクロピットアレイを用いたマイクロピット効果の視覚化
基板面積に対するピット部の面積の比率をP、基板面上の増殖率をX、

ピット内の増殖率を $(1 + \alpha)X$ とすると、基板全体での増殖率は

$$P(1 + \alpha)X + (1 - P)X = (1 + P\alpha)X$$

になる。P=1/2の設計では、したがって $(1 + 1/2\alpha)X$ となる。ピット部の面積の比率Pを高めて1に近づければ基板全体での増殖率は $(1 + \alpha)X$ に近づくことになる。マイクロピット効果の $+\alpha$ をより明確にする目的で、ピットの形状を正方形に限ってその間隔を10、20 μ mとする稠密型マイクロピットアレイを製作した。ピット1辺の長さは50、100、200、400 μ mとし、25 μ mと600 μ mを省いた。深さは前回と同じ10 μ mとした。各マイクロピットアレイ基板は、T50-10やT100-20のように区別した。Tは田圃のTで、シリコンウェーハー内の基板区画が田圃のようにみえることからきている。それに対して前回デザインの基板はE50やE100と名付けた。EはequalあるいはevenのEである。ちなみにE50=T50-20であることが簡単な計算で示せる。

マイクロピット効果を視覚化する目的でアクリジンオレンジ染色による蛍光観察法を導入した。顕微鏡ビデオカメラ画像の1画面内の細胞数は、骨髄間質細胞(P2)の4日間培養の1例で(C(44), T50-10(102), T50-20(73), E50(82)), (C(42), T100-10(77), T100-20(59), E100(51)), (C(47), T200-10(58), T200-20(53), E200(57)), (C(55), T400-10(47), T400-20(63), E400(57))であった(()は同一

ディッシュ内を意味する)²²⁾。50 μ mピットでマイクロピット効果が最大であり、前の報告と一致する。興味深いことはピット間の隔壁の幅が10 μ mのほうが幅20 μ mの場合に比べてマイクロピット効果が大きかったことである。隔壁を乗り越えて細胞が増殖していること、さらに10 μ m幅の隔壁を乗り越える速度が20 μ m幅の隔壁を乗り越える速度より大きいことが示唆されるものである。マイクロピット効果の機序を考える上でそこにヒントが含まれていると思われる。

P4細胞を同じく4日間培養した実験では、マイクロピット効果が全体に減弱していること、最適ピットも100 μ mないし200 μ mピットに変わることが認められた。

5. マイクロピット外を選択した線維芽細胞の増殖および配列

谷と筆者ら²³⁾は、マイクロピットアレイ基板でニワトリ胚線維芽細胞を培養し、これまでの骨髄間質細胞とは反対に、ピット内ではなく、ピット間の隔壁の上面で増殖が速まることを観察した。さらに細胞が隔壁の長軸方向に配列することを観察し、この配列がコンタクトガイダンスによるものではないと推定した。また、E200(隔壁幅80 μ m)基板でピット内外の細胞数の差が最大になることを見出した。

骨芽細胞様細胞はピット内を選択し、線維芽細胞はピット外を選択することが明瞭になったわけであるが(図1)、それぞれ空間あるいは足場の負

の曲率と正の曲率を選択したものであ
るとすれば、細胞がECMないし人工
ECMの幾何学を認識し、空間の形状
に応じて移動と増殖速度の増大を示す
ことを疑いないものにした最初の成績
かもしれない。

6. その後のデザインと接着斑と細胞 内骨格蛋白質の分布の画像化

その後、ピットの形状には長軸/短

軸比を大きく振った長方形を導入し、
また、ピット間の隔壁には隣り合った
ピット間を連通させるための底面に達
する切り欠きを導入した。隣接のピッ
ト間が連通すると、もはやピットのア
レイではなく平板上に垂直の障壁が規
則正しく並んだ構造にトポロジーが一
変する。このトポロジー変化は図面か
らはわかりにくく実際に作ってみてで
き上がった構造を眺めた時に初めてそ

の変化に驚くといった類のものであっ
た。細胞にとっても同様とみえて、
ピット内を嫌っていた線維芽細胞が今
度は底面を選択し、さらに連通部を通
して長く伸展することが観察された。
規則正しく配列された連通部を通過し
て直線的に伸展したため、細胞は規則
正しく配列しているようにみえる。お
そらく隣り合った細胞同士で生じる配
列の傾向に空間構造から生じる配列の
傾向が重なって見事な配列が現出した
ものと思われる。

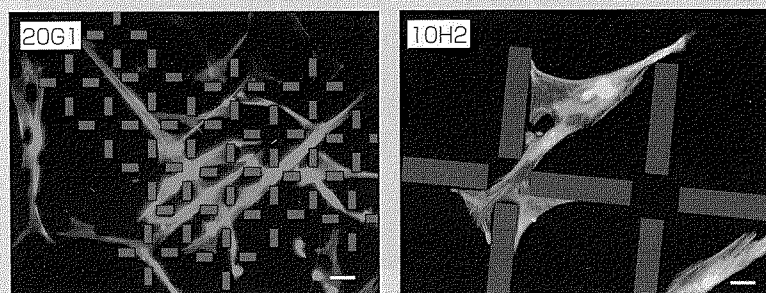
高橋・矢沢らは微細加工基板で培養
した線維芽細胞に対して接着斑蛋白質
のビンキュリンと細胞内骨格蛋白質の
アクチンフィラメントを蛍光抗体で染
め分け、その分布を画像化した。微細
加工パターンに応じた興味深い接着斑
と細胞内骨格蛋白質の分布の変化を観
察し、その分布と細胞の移動・増殖挙
動との関係の解析を進めている。また、
長方形ピット間の長軸方向の隔壁上で
配列した細胞と隔壁連通部を通して配
列した細胞について接着斑および細胞
内骨格蛋白質と配列挙動との関係の解
明を進めている(図2)。

7. プラスチック製マイクロチャンネル アレイとマイクロピットアレイ

半導体基板に対するものだけでなく、
プラスチック基板を対象にした微細
加工技術も近年著しい進歩を示して
きている。その主製品はCDやDVD
である。プラスチック製のマイクロ
チャンネルアレイおよびマイクロピット
アレイにはシリコン単結晶基板では得



図1 マイクロピット内を選択した骨芽細胞様細胞(左)とマイクロピット外を選択した線維芽細胞(右)(→巻頭 Color Gravure 参照)



アクチン染色(左)とアクチン+ビンキュリン染色(右)。

図2 4 隔連通型マイクロピットアレイ基板で配列した線維芽細胞
(→巻頭 Color Gravure 参照)

難しい利点もあるため、西らによって積極的に開発が進められた。現在試作品が供試される段階になっている。また、マイクロピットアレイ基板を通常の培養ディッシュ(Φ35mm)の底面に組み込んだものも作られ、ユーザーの便宜が図られている。使用されたアクリルは紫外励起でも自家蛍光を発することがなく、培養細胞の蛍光観察が可能である。マイクロピットアレイ部の薄いフィルム化(厚さ0.15mm)も達成され、高倍率の顕微鏡観察が可能になっている。材料には、細胞毒性の低い材料が使用され、細胞接着性を高めるためのコーティング処理が行われている。価格の課題が残っているようであるが、多くの読者が使用してくれればそれもいずれ克服されるであろう。

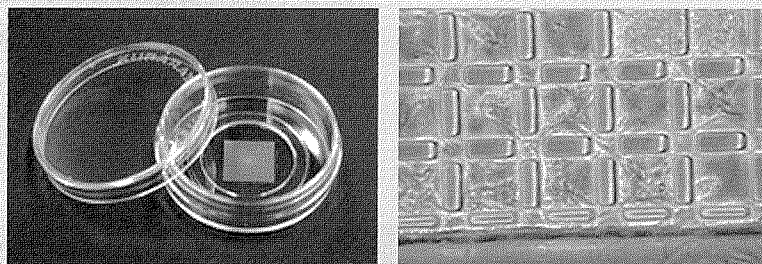
現在、西から提供された4隅連通型マイクロピットアレイ基板を用いて岡山大学大学院医歯薬学総合研究科のグループがラット新生児の心筋細胞の培養を行い、配列と同調した収縮を確認している(図3)。培養心筋細胞の収縮が硬質な基質上で認められた初めての例とのことである。配列だけでなく、立体的な細胞の形状が確保され、アクチンフィラメントの配向性が制御されたため、収縮が可能になったと考えられる。

東京医科歯科大学細胞生物学研究室のグループは、マウス・脳海馬神経細胞の培養試験を行い、蛍光観察により、鮮明な神経ネットワーク画像が得られることを確認している(図4)。さらに、従来よりも高い細胞生存率および

細胞接着性から、培養実験の難しい系への応用が期待されている。

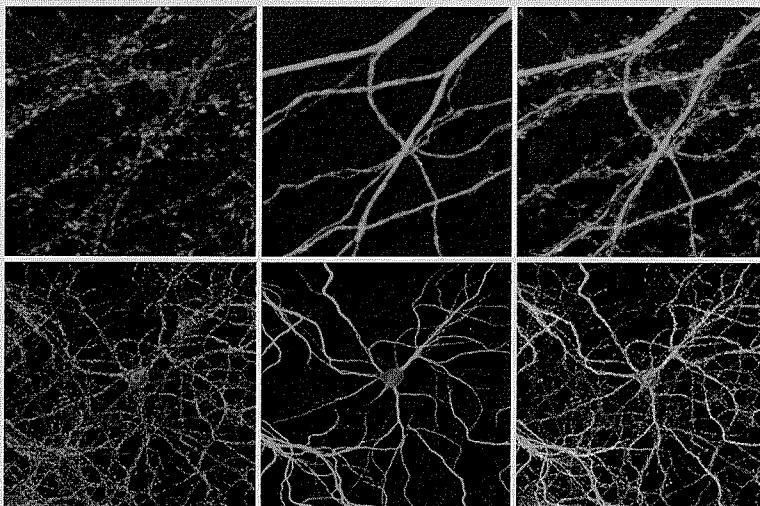
安田らはラット歯髄細胞を培養し、マイクロピット効果を確認すると共

に、前述のように、アルカリフォスファターゼ活性により骨化の促進を確認した(図5)。



配列した心筋細胞は同調した収縮を示した。

図3 4隅連通型マイクロピットアレイフィルムを底面を持つ培養ディッシュ(左)。岡山大・医歯薬学総合研究科のグループによるラット新生児の心筋細胞の培養(右)



蛍光観察により鮮明な神経ネットワーク画像が得られた。さらに、従来よりも高い細胞生存率、細胞接着性を認めた。

図4 東京医科歯科大・細胞生物学研究室のグループによるマウス・脳海馬神経細胞の培養(→巻頭Color Gravure 参照)

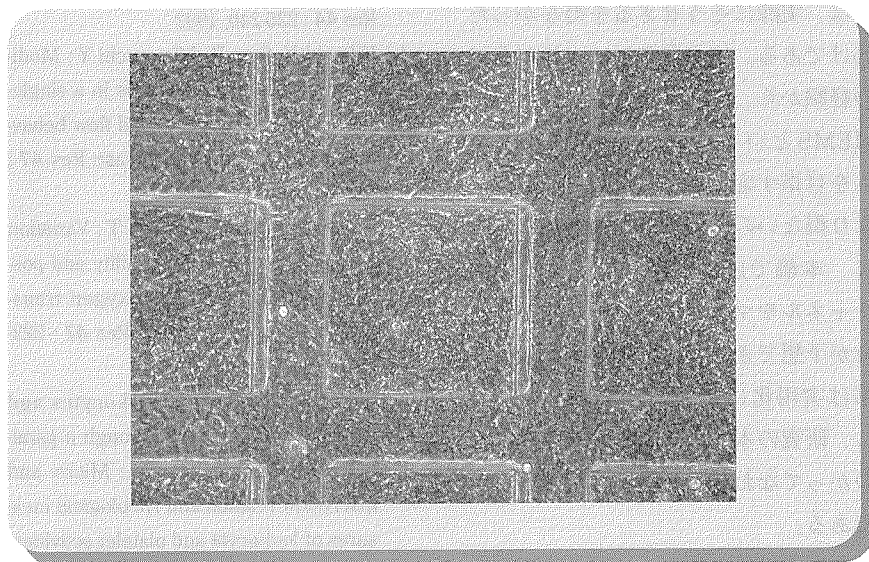


図5 安田らによるプラスチック製 T50-20 マイクロピットアレイを用いたラット歯髄細胞の培養とアルカリフォスファターゼ活性の観察
(→巻頭 Color Gravure 参照)

微細加工空間構造内での培養細胞の増殖挙動についての考察

はじめに述べたように、組織細胞の増殖・分化・組織形成時には特に細胞内の合成反応系の空間方向性が重要になると考えられる。酵素の立体配位は基本的に粗面小包体やゴルジ体の膜で保たれ、反応の流れも核から細胞膜へ方向が守られているのであろうが、おそらくそのような方向性だけでは不十分なのであろう。その時に求められるより強い反応系の異方性は細胞周囲のECMの幾何学が細胞内に伝達されて初めて生じ得るのかもしれない。

細胞内反応系の異方性は細胞の運動の異方性も引き起こし、細胞周囲の空間の異方性と協調ないし強調し合う関係も生じると考えられる。高橋・矢沢

らは線維芽細胞が垂直の壁を登れても降りられないと考えられる証拠を得ている。ピットの存在から必然的に生じる垂直の壁に対して細胞の運動の方向性がこのように制約ないし限定されることは、マイクロピット外を選択することを観察した菊池らの観察と符号するものである。細胞が底面との接触ないし接着を通して上下の関係を認識し、その上下方向に対して壁上端で降りようとする細胞と壁下端で登ろうとする細胞には細胞の曲がりの曲率に正負の違いが生じてくる。正負の違いが線維芽細胞と骨芽細胞とで反対にとらえられることは不思議でない。

細胞の配列はすでに示唆したように、細胞間の関係から生じる傾向と周囲の空間構造から細胞に与えられる傾向とがマッチすれば協同現象的に進む

と考えられる。

これまで観察された興味深い事象をどう解釈すればよいかこれまで我々には全く見当がつかなかったが、本稿で観察された事象をまとめてみるとおのずと解釈の方向もみえてくるようである。

微小循環路を有するマイクロピットアレイ基板の開発と組織モデルの構築

組織の諸機能は極性を有する特徴的な形態を示した細胞が三次元配列することで初めて発揮される。またその組織は微小循環系によって栄養され維持される。細胞の極性化、配列、微小循環はいずれも組織再生のキーワードである。上述のように、我々は異方性を持った空間構造を与えることで培養細胞の配列を導きえることを示してきた。細胞の極性化はおそらく強い方向性を有する物質の流れによってもたらされるものであろう。実組織での栄養血管(毛細血管)の配列が実際に水分および血漿成分の1方向性の流れを作り出している。

平板上で培養した細胞に対して培養液の表層流を与えることはよく行われているが、平板上の細胞はおそらく流れの停留(停滞)層に入り1方向性の流れが細胞に十分達していない可能性が高い。それに対してマイクロピットアレイにマイクロチャンネルアレイを組み合わせた構造では培養液の流れを直接細胞に負荷できる。さらに流れに対する暴露の程度をさまざまに変えるこ

とも可能である。

培養細胞の極性化を導けるか、現在、その可能性を検討する目的でマイクロチャンネルアレイ・マイクロピットアレイ組み合わせ基板の試作を進めている。その評価はこれまでのように培養ディッシュの中に入れて行うというわけにはいかないので、専用基板ホルダーと培養液循環装置、さらに、顕微鏡観察装置と温度制御装置を組み合わせた細胞培養システムの製作を進めている。

配列した細胞が培養液の微小循環路で栄養されている系が、組織モデルとして極めて有用になることは論を待たないであろう。組織モデルの構築は我々のグループが総力を挙げて取り組むべき課題であり、近い将来その報告ができると筆者は確信している。

おわりに

半導体微細加工技術を用いてマイクロマシンを開発する研究は、国を挙げての一大プロジェクトであった。近年はナノテクノロジーと名称を変えてさらに大規模プロジェクトになっている。筆者らの研究は予算には全く恵まれなかったが、その大きなトレンドの中であってそこから生まれたことは間違いない。しかしながら、実際の研究では先端技術が先端であればあるほどその先端部分でしか役立たない現実を思い知らされることになった。筆者らがマイクロチャンネルやマイクロスペースといった単純な構造にたどり着いた

のは、実際にそうせざるを得なかったわけである。筆者自身には、これまでの経験から、マイクロマシン、 μ TAS、MEMSといった高度で複雑なシステムを目指す応用研究は本当の技術にはなり得ないのではとの思いが強い。現に、本稿で述べたように、マイクロチャンネルやマイクロスペースは筆者自身が予想できなかった展開をみせ、一部は実用化にまで至っているのに対し、研究の本流は実際の用途の壁にぶつかってなお苦戦を強いられているのである。

久保木以外の著者らは再生医療の分野の新参者に過ぎないが、我々の技術が本誌の多くの読者の目にとまり、さらに我々が組織モデルの構築の分野ですでに有力な競争者となっていることを認めていただけるものと強く信じている。誠に貴重な機会、まさにスペースとその幾何学を筆者らに与えて下さった久保木先生に、あらためて感謝を申し上げたい。

●文 献

- 1) 北原時雄, 石川雄一 監修: マイクロマシン技術と応用. シーエムシー出版, 東京, 2002
- 2) Mariella Jr R: Instrumentation for biomedical and environmental applications based on microtechnology - Lessons learned. Proc. Micro- and Nanofabricated Structures and Devices for Biomedical Environmental Applications II, SPIE 3606, 74-81, 1999
- 3) Kikuchi Y, Sato K, Ohki H, et al: Optically accessible microchannels formed in a single-crystal silicon substrate for studies of blood rheology. Microvasc Res 44: 226-240, 1992
- 4) Kikuchi Y, Sato K, Mizuguchi Y: Modified cell-flow microchannels in a single-crystal silicon substrate and flow behavior of blood cells. Microvasc Res 47: 126-139, 1994
- 5) Kikuchi Y, Da Q-W, Fujino T: Variation in red blood cell deformability and possible consequences for oxygen transport to tissue. Microvasc Res 47: 222-231, 1994
- 6) Kikuchi Y: Effect of leukocytes and platelets on blood flow through a parallel array of microchannels: Micro- and macroflow relation and rheological measures of leukocyte and platelet activities. Microvasc Res 50: 288-300, 1995
- 7) Kawakatsu T, Kikuchi Y, Nakajima M: Visualization of microfiltration phenomena using microscope video system and silicon microchannels. J Chem Eng Japan 29: 399-401, 1996
- 8) 久保木芳徳, 滝田裕子, 吉本良太, 他: 人工細胞外マトリックスの幾何学. ティッシュエンジニアリング2006 (日本組織工学会監修), 24-33, 日本医学館, 東京, 2006
- 9) 農水省プロジェクト「生物機能の革新的利用のためのナノテクノロジー・材料技術の開発」2002-2006; プロジェクトリーダー中嶋光敏
- 10) 菊池佑二: 赤血球の酸素輸送. 健康と栄養のライフサイエンス 4: 11-16, 1999
- 11) 菊池佑二: 血液をサラサラにする生活術. 講談社+ α 新書, 東京, 2001
- 12) 菊池佑二, 栗原 毅: 血液サラサラで病気を防ぎ治す. 講談社+ α 新書, 東京, 2003
- 13) Kikuchi Y, Arai T, Koyama T: Improved filtration method for red cell deformability measurement. Med & Biol Eng & Comput 21: 270-276, 1983
- 14) Kawakatsu T, Boom RM, Nabetani H, et al: Emulsion breakdown: Mechanisms

- and development of multilayer membrane. AICHE J **45** : 967-975, 1999
- 15) 菊池佑二, 菊池裕子, 中嶋光敏, 他 : マイクロチャネルアレイとその応用. ケミカルエンジニアリング **50** : 694-700, 2005
- 16) Kikuchi HE, Magariyama Y, Kikuchi Y : Changes in stiffness of yeast cells during cell cycle by passability through micromachined channel arrays. Proc. Micro- and Nanofabricated Structures and Devices for Biomedical Environmental Applications. SPIE **3258** : 188-194, 1998
- 17) 菊池裕子, 久保木芳徳, 小野雅昭, 他 : シリコンチップ上での細胞培養の試み—マイクロチャネルに対する伸展・通過挙動—. ヘモレオロジー研究会誌 **1** : 69-78, 1998
- 18) 菊池佑二, 佐藤一雄 : 細胞計測・細胞加工への半導体技術の応用. 化学と生物 **30** : 31-37, 1992
- 19) Singhvi R, Kumar A, Lopez G, et al : Engineering of cell shape and function. Science **264** : 696-698, 1994
- 20) Chen CS, Mrksich M, Huang S, et al : Geometric control of cell life and death. Science **276** : 1425-1428, 1997
- 21) 菊池裕子, 菊池佑二, 久保木芳徳 : シリコンチップ上での細胞培養の試み—マイクロチャネルとマイクロピットにおける線維芽細胞および骨芽細胞の挙動—. ヘモレオロジー研究会誌 **2** : 7-108, 1999
- 22) 菊池裕子, 菊池佑二, 久保木芳徳 : 骨芽細胞様細胞の増殖に対する「マイクロピット効果」—稠密型マイクロピットアレイを用いた検討と蛍光観察による視覚化—. ヘモレオロジー研究会誌 **3** : 121-132, 2000
- 23) 谷 和俊, 菊池裕子, 菊池佑二, 他 : ニワトリ胚線維芽細胞のマイクロピットアレイにおける増殖挙動. 日本ヘモレオロジー学会誌 **5** : 57-61, 2002

69頁

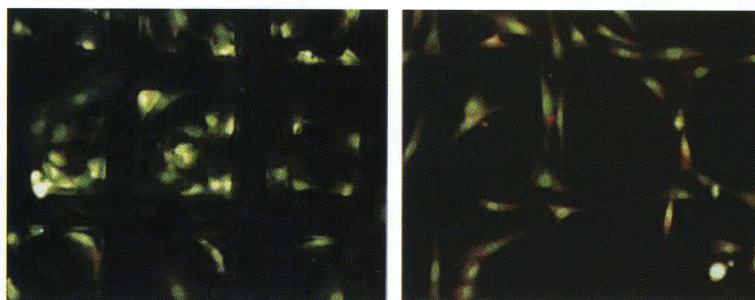


図1 マイクロピット内を選択した骨芽細胞様細胞(左)とマイクロピット外を選択した線維芽細胞(右)

69頁

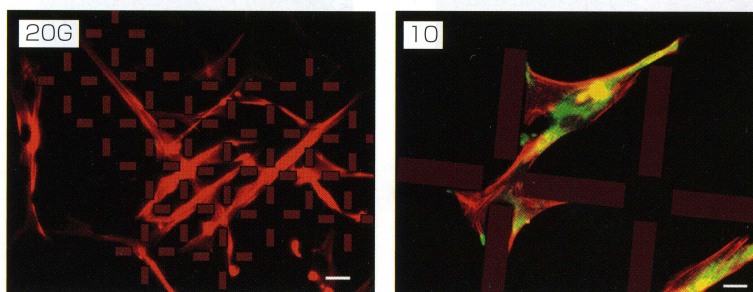


図2 4隅連通型マイクロピットアレイ基板で配列した線維芽細胞
アクチン染色(左)とアクチン+ビンキュリン染色(右)。

70 頁

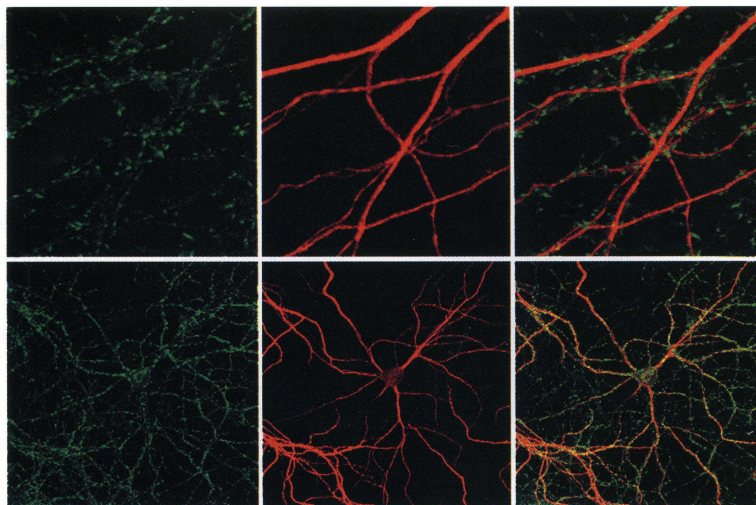


図4 東京医科歯科大・細胞生物学研究室のグループによるマウス・脳海馬神経細胞の培養

蛍光観察により鮮明な神経ネットワーク画像が得られた。さらに、従来よりも高い細胞生存率、細胞接着性を認めた。

71 頁

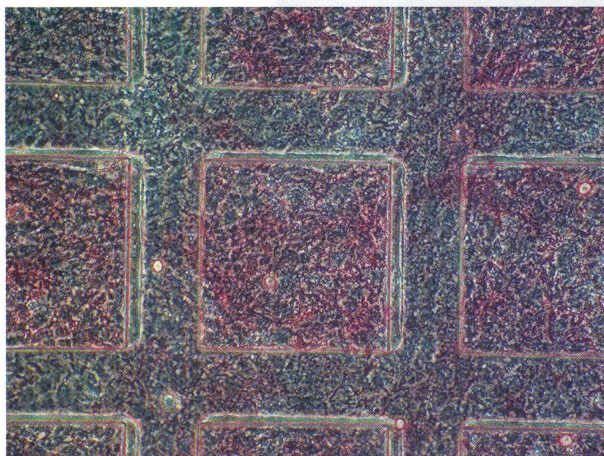


図5 安田らによるプラスチック製T50-20マイクロピットアレイを用いたラット歯髄細胞の培養とアルカリフォスファターゼ活性の観察