

微粒子を応用した微細構造化足場の作製と
その幾何形状が細胞の接着と成長に及ぼす影響

平成 28 年 3 月

武田 伊織

首都大学東京

目次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 微粒子の整列による微細構造の作製	21
2.1 緒言	22
2.2 表面の定義	23
2.3 微粒子自己整列の基本機構	25
2.4 微粒子の自己整列	26
2.4.1 微粒子懸濁液の準備	26
2.4.2 微粒子整列基板の準備	27
2.4.3 滴下による微粒子整列	28
2.4.4 微粒子列の配置技術	29
2.4.5 微粒子整列に関するまとめ	37
2.5 ラインアンドスペース形状の作製	38
2.6 微細構造へのポリスチレン薄膜形成	40
2.6.1 薄膜形成の目的	40
2.6.2 ポリスチレン薄膜の形成	40
2.7 結言	44
第 3 章 微粒子列の細胞接着足場への応用と細胞の自律パターンニング	50
3.1 緒言	51
3.2 培養細胞の選定	52
3.3 微粒子列上での細胞の培養方法	54
3.3.1 作製した基板の前処理	54
3.3.2 細胞の培養工程	55
3.3.3 培養細胞の観察方法および接着数の評価方法	56
3.4 微粒子列の細胞接着足場への適用	58
3.5 OTS-SAM が細胞の接着に及ぼす影響と UV 処理の効果	61
3.6 微粒子列による細胞の接着位置制御	63
3.6.1 PC12 細胞の微細構造化 SiO ₂ 微粒子列への接着	63
3.6.2 C2C12 細胞および HeLa 細胞の微粒子列への選択接着	68
3.6.3 細胞の微粒子列への選択接着過程	69
3.7 微粒子列上での細胞の増殖	74

3.8	粒径の異なる微粒子上での細胞の分化	76
3.9	結言	82
<hr/>		
第4章	微細構造の幾何的特徴量が細胞の接着に及ぼす影響	85
4.1	緒言	86
4.2	微細構造の表面幾何形状と細胞接着	87
4.2.1	細胞接着の従来研究とその課題	87
4.2.2	表面幾何形状の指標	89
4.3	微粒子を用いた微細構造の作製	93
4.3.1	微細構造の作製プロセス	93
4.3.2	微粒子列をマスクとした Si 基板のエッチング	95
4.3.3	微細構造の形状転写	98
4.3.4	微細構造化 PDMS の作製結果	101
4.4	微細構造への細胞接着	104
4.4.1	実験方法および条件	104
4.4.2	実験結果および考察	104
4.4.3	細胞の接着モデルの提案とその検証	108
4.5	細胞の接着に影響する幾何形状以外の要因の検討	119
4.5.1	微粒子列と微細構造化 PDMS での細胞接着性の違い	119
4.5.2	空隙の無い微粒子列の作製工程	120
4.5.3	空隙の無い微粒子列の作製結果	123
4.5.4	空隙が細胞の接着および成長に及ぼす影響とその考察	124
4.6	微粒子列の細胞培養足場としての応用	128
4.6.1	はじめに	128
4.6.2	タンパク質修飾微粒子列上での細胞培養	128
4.6.3	3次元構造側面への細胞接着	132
4.7	結言	135
<hr/>		
第5章	結論	141

第 1 章

緒論

細胞は、我々生命体の微小な構成要素であり、それ自体が生命とも呼べる存在である。しかし、その機能については解明されていないことも多い。この細胞の異常が、がんやアルツハイマーをはじめとした様々な病理の元となっている。そこで、細胞の機能や刺激への応答を調査し、これら病理の治療法を探る研究がされている。こうした調査の一例が創薬スクリーニングであり、**図 1-1**のように、流路内の所望の位置に細胞を配置し、薬品等を流し、その応答を調査するためのデバイスが提案されている¹⁻¹⁾。細胞機能の解明のためには、細胞の集合体としての機能を明らかにすることや、細胞単体での機能を知ることが必要である。生体内において、細胞は集合体として存在しているため、生体内と同環境であることを重視するならば、細胞の集合体を解析することが望ましい。一方で、細胞が、周囲に存在する他の細胞と信号伝達などの相互作用をすることが知られている。したがって、ある刺激に対する応答を調査する際、細胞の集合体ではこの相互作用の影響を排除することができない。例えば、培養表面を引っ張るなどして細胞の集合体に機械刺激を加えた場合、培養表面からの刺激と同時に周囲の細胞とも引っ張り合う刺激が発生し、本来調査すべき刺激への応答のみを計測することができない。つまり、細胞本来の機能（刺激への応答）を調査するためには、単一の細胞を対象とすることが重要である。そのため、創薬スクリーニングを目的としたバイオチップでは、細胞単体での機能や応答を調査することが求められる。例えば、流路内に単一の細胞が一定の間隔で配列しているようなバイオチップでは、細胞への薬剤による化学刺激とその応答を効率的に調査することが可能である。しかし、培養用ディッシュなどの、場所による表面の材質や形状の差がほとんどない基板で細胞を培養した場合、その接着する位置は無作為である。そこで、細胞の接着位置を制御できるような基板が研究されている¹⁻²⁾⁻¹⁻³⁾。

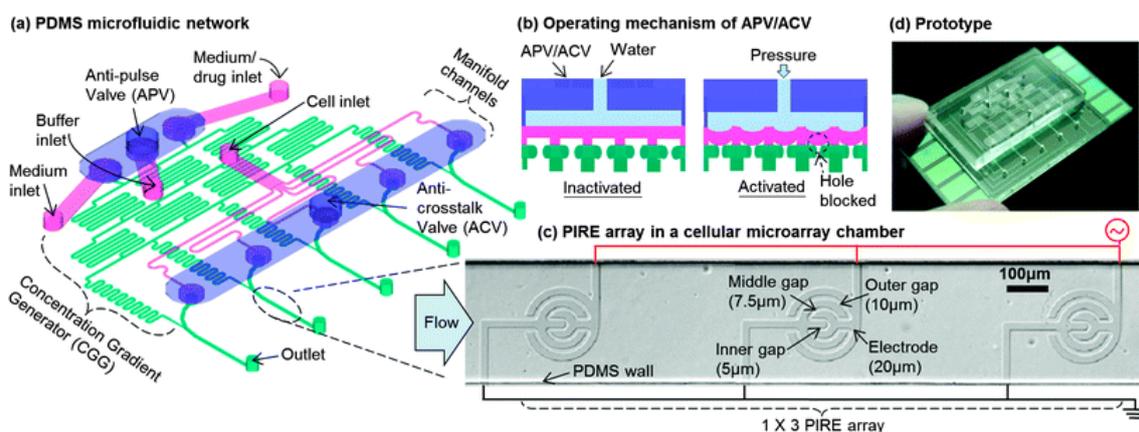


図 1-1 細胞の薬品への応答を調査するデバイス¹⁻¹⁾

また、再生医療の分野では、**図 1-2**に示すような、細胞シートと呼ばれる膜状の細胞集合体が注目されている¹⁻⁴⁾。例えば、角膜細胞を培養し、シート状にすることで、移植可能な角膜を形成することが可能である(図 1-2 左)。さらに、これを積層すればやがては人工の臓器の作製も期待できる(図 1-2 中央, 右)。移植用の細胞シートは、患者の治療箇所に適用するため、その形状が重要な要素である。細胞は培養基板を埋め尽くすように増殖していくので、目的に応じて適切な形状に形成させるような工夫が必要である。すなわち、細胞が所望の形状に沿うようにして増殖、シートを形成させることが可能な基板が必要である。

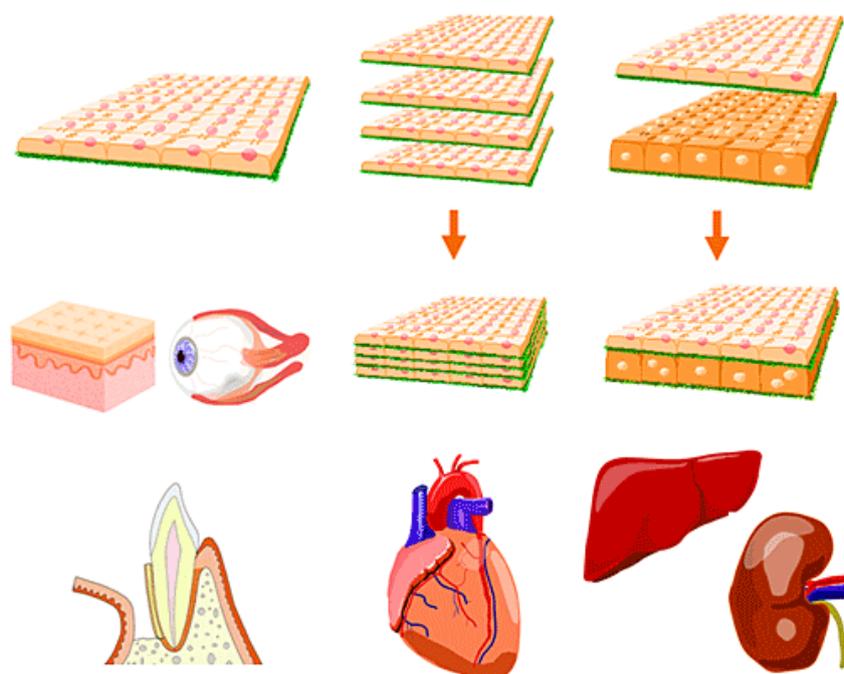


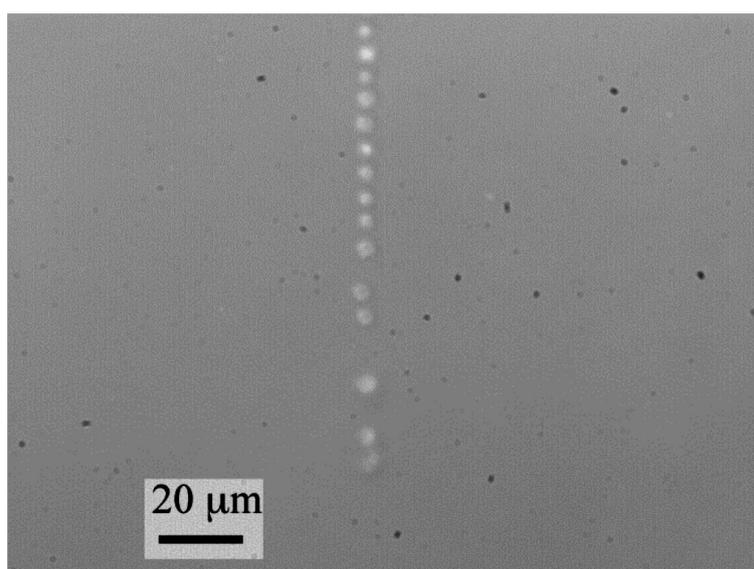
図 1-2 細胞シートとその応用¹⁻⁴⁾

以上のような要求から、細胞を接着段階で所望の位置に配置することや、所望の領域内に増殖させるといった、いわゆるパターンニング技術が求められている。本研究では、従来研究における細胞のパターンニング方法を、**表 1-1**に示すような2種類に大別している。それらを、細胞をマニピュレーションで配置させる直接パターンニング法と、細胞自身が自ら配列する自律パターンニング法と定義する。直接パターンニング法は、光ピンセットやマイクロプローブ等を用いて細胞を“把持”し、研究者自身の手で所望の配置に並べていくという方法である¹⁻⁵⁾⁻¹⁻⁶⁾。光ピンセットでの細胞の移動機構は、対象とする物体内で屈折した光子

がその屈折時の運動エネルギーを反作用として対象に与え、結果として一定方向へと対象物を移動させるというものである。図 1-3 は、光ピンセットを用いてパターンニングしたウシの赤血球である¹⁻⁶⁾。写真中央の丸いものが赤血球であり、直線状に整列している。このような直接パターンニング法は、マイクロプローブでは細胞にダメージを与える(=侵襲的)手法であったが、光ピンセットの登場でこれが解決された。しかし、細胞一つ一つを動かしていくため、スループットが非常に低いという課題が依然として存在している。このスループットの低さを解決できる手段として、インクジェットによる細胞の吐出および配置が提案されているが¹⁻⁷⁾、このような方法ではまた侵襲性が問題となってしまう。

表 1-1 細胞のパターンニング方法

	直接パターンニング法	自律パターンニング法
適用例	マイクロプローブ 光ピンセット	タンパク質のパターンニング 表面の形状
長所	正確に配置可能	所望の領域に配置可能 高スループット (細胞が自律的に配置)
短所	プローブは、細胞へダメージ 低スループット (細胞を1個ずつ操作)	化学物質等の使用

図 1-3 光ピンセットによりパターンニングされたウシ赤血球¹⁻⁶⁾

一方、自律パターンニング法とは、培養する基板自体に細胞の接着領域や非接着領域をあらかじめ作製しておくことで、細胞自身が自律的にパターンニングされる手法である。そもそも、細胞の接着は、分子細胞生物学の分野において図 1-4 に示すようなモデルが提案されている¹⁻⁸⁾。すなわち、細胞と基質（細胞接着における足場）との間には、細胞膜を貫通して存在するインテグリンと呼ばれるタンパク質で繋がれるようにして接着している。細胞は表面と直接的に接しているわけではなく、細胞接着性タンパク質や細胞外マトリクスを介して接着している。自律パターンニング法では、これらを参考にし、接着領域や非接着領域を設けている。自律パターンニング法は、さらに2種類のアプローチに大別できる。一つは、タンパク質などの化学物質を用いたパターンニング手法である。この手法では、細胞が接着しやすい、あるいは接着しにくい化学物質のパターンを設けた基板を用いることで細胞の接着領域を限定し、結果としてパターンニングされた細胞を得ることができる。このような化学的パターンの作製方法としては、以下が代表的である。まず、前述のとおり細胞は直接基板に接着しているのではなく、特定のタンパク質等を介して接着している。そのため、あらかじめそのようなタンパク質を塗布しておくというアプローチが考案されている。アミノ酸のポリマーである α -ポリリジンは、細胞培養の際によく使用される細胞接着性タンパク質の一つであり、基板の細胞接着性を改善させるためによく使用される¹⁻⁹⁾⁻¹⁻¹¹⁾。これをパターンニングすることができれば、局所的に細胞接着性の違いを作り出すことができる。すなわち、ポリリジンが存在する領域のみに細胞を配置させることができる。実際に、Chang らは、ポリリジンで接着領域を限定した基板上で海馬ニューロンを培養することで、図 1-5 に示すようなパターンニングに成功している¹⁻¹⁰⁾。海馬ニューロンの接着領域や神経突起の伸長領域は、格子状にパターンニングされたポリリジン上に限定され、ニューロン同士が接続してネットワークを形成している。同様に、Fink らは、従来用いられていた金とアルカンチオラート SAM¹⁻¹²⁾の代わりに、ポリリジンを側鎖にグラフトしたポリエチレングリコール (PLL-g-PEG) をコーティングしたガラス基板にフィブロネクチンをマイクロコンタクトプリントすることで、図 1-6 に示すようにより簡易に細胞をパターンニングすることに成功している¹⁻¹³⁾。

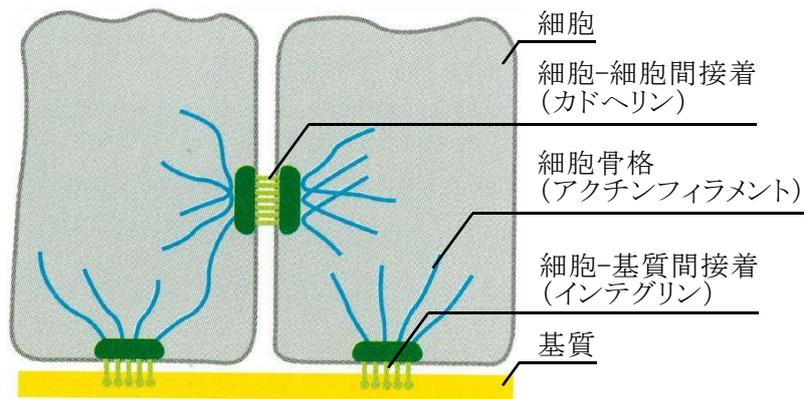


図 1-4 細胞の接着機構^{1-8)改訂}

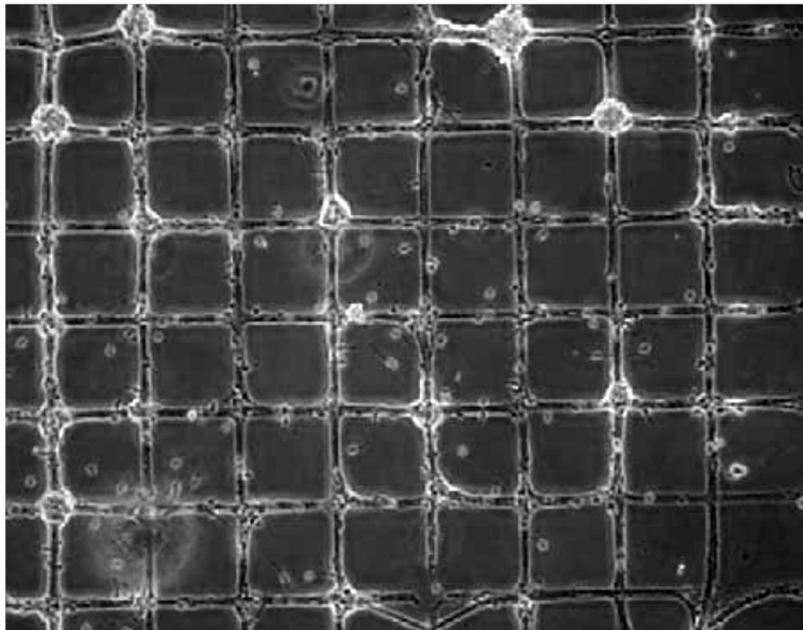


図 1-5 ポリリジンによる海馬ニューロンのパターンニング¹⁻¹⁰⁾

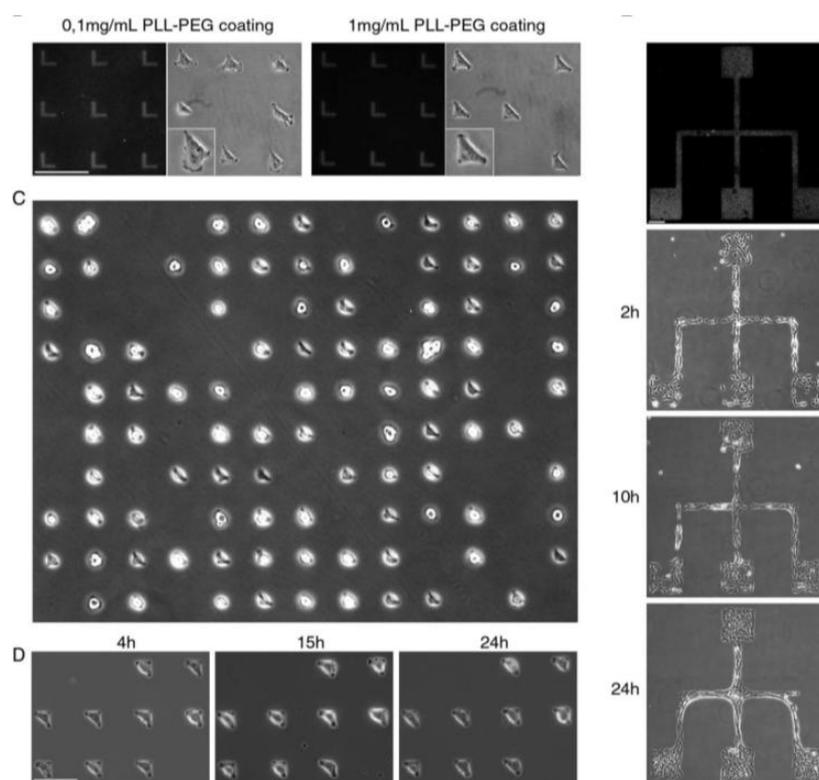


図 1-6 マイクロコンタクトプリントしたフィブロネクチンによる hTERT RPE-1 細胞のパターニング¹⁻¹³⁾

タンパク質自体が吸着しやすいようなパターンニングをすることで、間接的に細胞のパターニングを達成する研究も行われている。松田らは、親水/疎水パターンを設けた基板を用いることで、図 1-7 に示すように細胞のパターニングを行っている¹⁻¹⁴⁾。これは、タンパク質が疎水性表面によく吸着するという性質を利用しており、超親水性領域を作製することでその部分へのタンパク質の吸着、ひいては細胞の接着を抑制している。類似した手法に、レーザで基板の接触角を変えることで、その軌跡に沿うようにして細胞を配置させるものも存在している¹⁻¹⁵⁾⁻¹⁻¹⁶⁾。その他、化学パターンニングとして代表的なものに、シランカップリング剤¹⁻¹⁷⁾、細胞接着性コラーゲン¹⁻¹⁸⁾⁻¹⁻¹⁹⁾、ラミニン¹⁻²⁰⁾等を用いている研究がある。別の種類の細胞を利用した、細胞のパターニング法も存在している。共培養 (Co-Culture) は、2 種類以上の細胞を同時に培養する培養法であり、主として異なる細胞種間の相互作用を調査する目的で用いられている。例えば、生体内での細胞が、近隣の細胞からシグナル伝達を受ける等相互作用をし、その挙動を変化させることが知られている。我々の体内でも、酸欠状態の細胞から発生したシグナルを受け取り、その方向に血管新生が促進されている¹⁻²¹⁾⁻¹⁻²²⁾。この共培養において、先に接着した細胞によって接着位置が制限され、図 1-8 のように、後に播種した細胞がパターンニングされた状態になることが確認されている¹⁻²³⁾⁻¹⁻²⁶⁾。このようなアプローチは 3 次元的な細胞集合体を作製することにも応用可能である¹⁻²⁷⁾。ま

た，化学的なパターンニングではないが，細胞が持つ反磁性という性質に着目した，磁場によるパターンニングも興味深い¹⁻²⁸⁾。

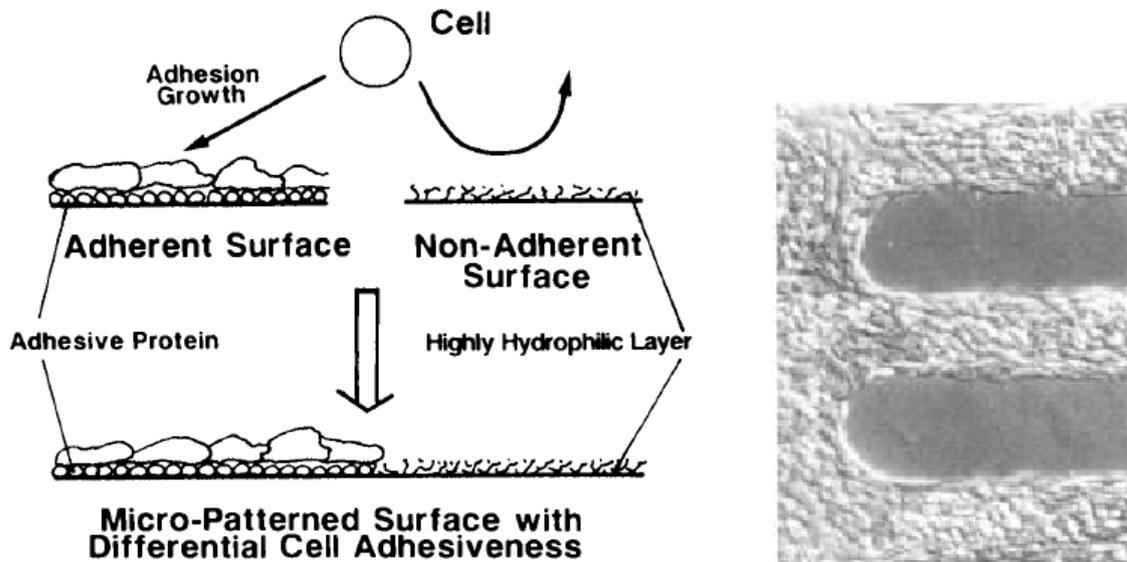


図 1-7 親水/疎水性パターンによるウシ内皮細胞のパターンニング. 原理の模式図と培養結果の位相差像¹⁻¹⁴⁾



図 1-8 共培養によりパターンニングされた細胞¹⁻²³⁾. コントラストの違う領域には異なる細胞が接着している. スケールバーは 100 μ m.

上記の化学物質等を用いたパターンニング法は、よく制御された細胞パターンを非侵襲的に得ることができている。一方で、細胞はタンパク質などを“消費”してしまうので、有効にはたらく期間に制限があるという課題が存在する。また、細胞が本来存在している生体内は、実験で使用するディッシュ底面のような平面ではなく、いくらかの凹凸構造を持っている。微細構造化した表面で生体模倣が行えることが示唆されていることや¹⁻²⁹⁾、**図 1-9**のように微細構造を設けることで細胞の接着位置を制御することができるという報告もあり¹⁻³⁰⁾、微細構造を細胞培養の足場として適用する事例も増えている。特に、先に挙げた創薬スクリーニングの例では、細胞を流路内に配置することが必要とされるが、流路内への化学物質の局所的なパターンニングは困難である。一方、そのような流路のほとんどが作製プロセスに PDMS のモールドイング技術を使用しているため、モールド側の表面を改質するなどして流路内を微細構造化することは比較的簡易であると言える。また、表面の形状によって細胞の接着および増殖領域を制御することができれば、細胞シート用の足場としての応用も期待できる。そして、微細構造化した表面での生体模倣により、生体内と同様の機能を持つ細胞シートや人工臓器が作製できる可能性がある。

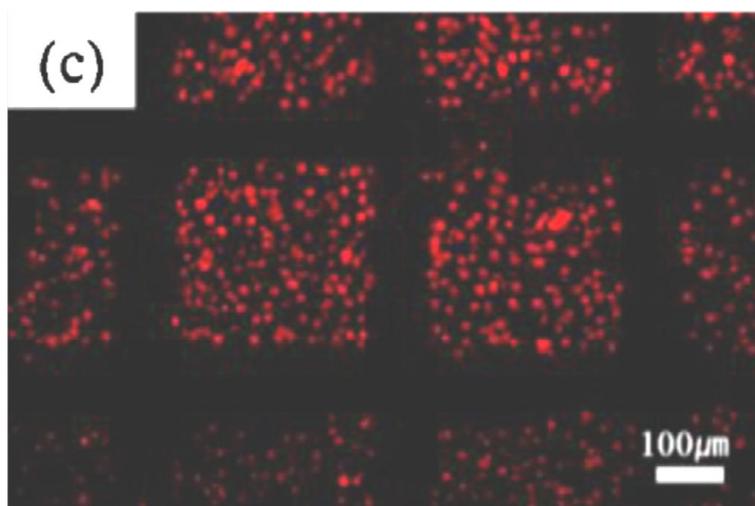


図 1-9 微細構造化した基板を足場とした細胞の接着位置制御¹⁻³⁰⁾。赤く光っているものが細胞である。

微細構造、特に表面の形状による細胞のパターンニングは、上記のような利点から細胞培養用の足場として研究されており、細胞はある微細構造に対しては選択的に接着する一方で、他の微細構造には接着しなくなるというような性質を持っていることが判明している。一方で、なぜそのような傾向があるのか、微細構造の何が細胞の接着に影響しているのかは、未だに明らかでない。本研究ではこの原因を以下のように考えている。まず、多くの

研究で、他の研究と比べ、細胞の種類や足場となる基板の材質、そして微細構造の形状等が統一されておらず、研究分野全体で体系的にまとめることができていない。つまり、採用している微細構造がピラー構造であったり¹⁻³⁰⁾ 単純な溝構造であったり¹⁻³¹⁾⁻¹⁻³⁵⁾と、それぞれの構造での傾向は明らかになっているが、構造が変わるとその結果を応用できない、いわば対症療法的な研究が主である。このような課題の解決のためには、同じ評価指標を用いて、体系的に細胞への影響を調査することが必要である。

以上のような理由から、基板をエッチング等で荒らすことで微細構造を作製し、これを細胞培養の足場として適用するという研究が行われている¹⁻³⁶⁾⁻¹⁻⁴¹⁾。これらの研究では、エッチングの時間等を変えることで異なる表面粗さを持った表面を作製し、その表面粗さと細胞の接着性との関係を調査している。この手法では、表面粗さという共通の評価指標での体系化が試みられているが、いくつかの課題が存在している。まず、表面を荒らすことで得られる微細構造は規則的な構造では無いため、特異的に荒れた場所が存在する可能性がある。したがって、表面粗さは評価する領域によって異なる値をとる。以上から、体系的調査のためには規則的な形状を用いることが必要であり、ランダムな形状では傾向を調査することが困難である。実際に、以下の二つの研究では Si ウエハを荒らして作製した基板上で同様の細胞を培養しているが、その際の傾向が異なっている。Fan らの研究では、表面を荒らした Si ウエハ上で神経細胞を培養した際、算術平均粗さ Ra が 25nm の時にもっとも良い生存率を示すことを報告している¹⁻⁴²⁾。一方で、Khan らの報告によれば、同じ基板材質、エッチング方法、神経細胞を用いても、表面粗さ Ra が 60-70nm なる Si ウエハでもっとも良い生存率を示した¹⁻⁴³⁾。

同じ細胞の種類、同じ材質の基板を用いて、異なる結果が出る理由として、本研究では以下に着目した。そもそも、このような研究における“表面粗さ”とは、正確には算術平均粗さを示している場合がほとんどである。算術平均粗さとは、表面の荒れ状態を表す代表的な指標の一つにすぎず、算術平均粗さのみでは表面の特徴を完全に表すことはできない。その一例として、**図 1-10** のような断面形状を持つ二つの構造を考える。図 1-10(a)は丸みを帯びた凸形状を持っており、図 1-10(b)は比較的鋭い凸形状を持っている。また、(b)は(a)の反転形状であり、両者は共通の粗さ曲線を持つ。両者は見かけ上、異なる幾何形状を持つ表面であるものの、粗さ曲線が共通であることから、その算術平均粗さは同一の値になってしまう。以上より、算術平均粗さのみで表面を分類することはできないことがわかる。この問題の解決のためには、粗さの評価としては複数の指標を用いることが必要である。



図 1-10 同一の算術平均粗さを持つ 2 表面の断面曲線

表面粗さの指標として、トライボロジ分野では、最大高さ粗さ R_z 、十点平均粗さ R_{z10} 、算術平均粗さ R_a 、二乗平均平方根粗さ R_q 、凹凸の平均間隔 S_m 、局部山頂の平均間隔 S 、負荷長さ率 $R_{mr(c)}$ 、歪度 R_{sk} 、尖度 R_{ku} 、粗さ曲線要素の平均高さ R_c 、相関距離 β 、そして空間周波数 ν の 12 指標を代表として挙げている。ここで、前述した通り、細胞の接着に影響する要因を調査する場合、その形状は規則的なものであることが望ましい。上記の表面粗さの指標は、規則的な構造を分類する際、他の指標と同じ意味となるものが存在する。そこで、本研究では着目する指標として、算術平均粗さ Sa 、歪度 Ssk 、そして尖度 Sku を選定した。まず、2次元での算術平均粗さ、歪度、そして尖度の定義はそれぞれ以下のとおりである¹⁴⁴⁾。

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |f(x)| dx \quad (1-1)$$

$$R_{sk} = \frac{1}{R_q^3} \left\{ \frac{1}{L} \int_0^L f^3(x) dx \right\} \quad (1-2)$$

$$R_{ku} = \frac{1}{R_q^4} \left\{ \frac{1}{L} \int_0^L f^4(x) dx \right\} \quad (1-3)$$

ここで、 $f(x)$ は粗さ曲線を、 L は基準長さを、 R_q は R_a の標準偏差を表している（図 1-11 参照）。 Sa 、 Ssk 、そして Sku はこれらの値を3次元空間に拡張したものである。算術平均粗さ、歪度、尖度の定義は以下のとおりである。

$$S_a = \frac{1}{A} \int \int_A ||f(x,y)|| dx dy \quad (1-4)$$

$$S_{sk} = \frac{1}{S_q^3} \left\{ \frac{1}{A} \int \int_A f^3(x,y) dx dy \right\} \quad (1-5)$$

$$S_{ku} = \frac{1}{S_q^4} \left\{ \frac{1}{A} \int \int_A f^4(x,y) dx dy \right\} \quad (1-6)$$

ここで、 $f(x,y)$ は粗さ曲線を、 A は基準面を、 S_q は S_a の標準偏差を表している。歪度とは山と谷の対称性を表す指標であり、その正負や絶対値の大きさを、粗さ曲線（面）の分布が上下（山谷）のどちらかに偏っているかを表す。例えば、図 1-10(b)のような形状の場合、算術平均粗さは同じ値をとるが、歪度の正負でどのような形状であるのか判断することがで

きる。尖度とは高さの分布に関する指標であり、その断面（表面）がどれだけ尖っているかを表す。図 1-11(c)のように、尖度 Ssk が 3 より大きい場合、高さの分布は中央付近が多くなり、鋭い山や谷が多いことがわかる。表面に山や谷が多くなく、全体的に平坦である場合尖度は 3 より小さい値をとる。尖度が 3 と等しい場合、その粗さ曲線の高さ分布は正規分布となる。以上の 3 つの幾何的特徴量を評価指標として用いれば、同一の算術平均粗さを持つ基板であってもその表面形状を分類することができると考えられる。

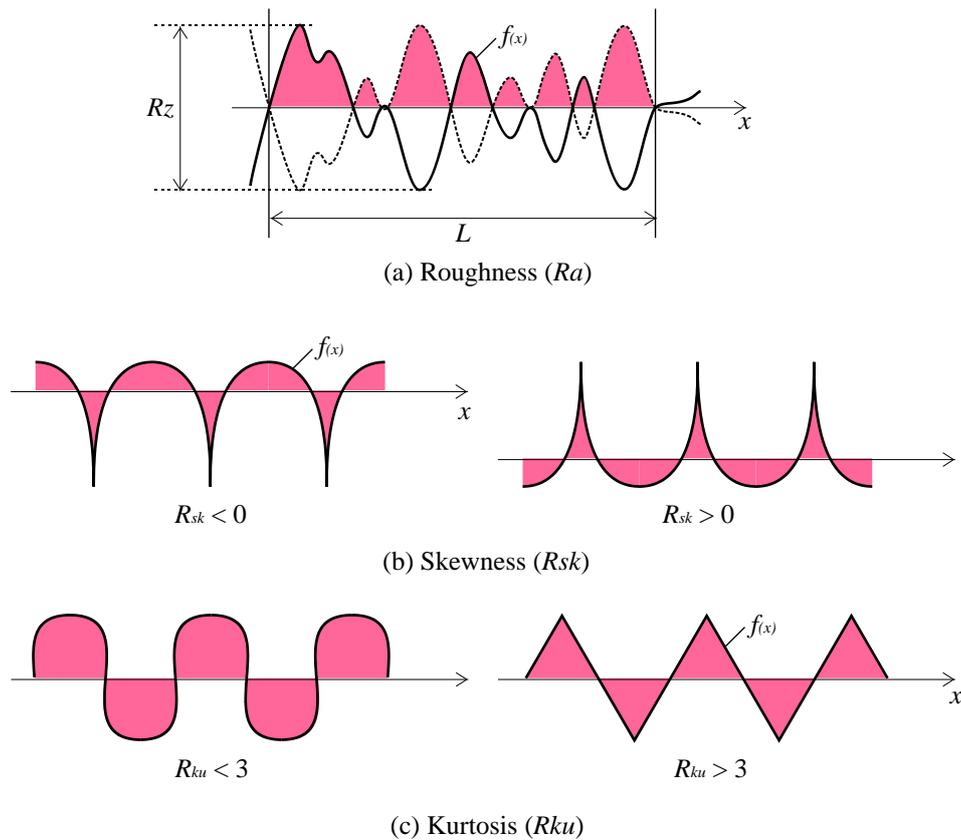


図 1-11 粗さ曲線とその評価指標

次いで、微細構造の作製方法について考える。微細構造の形状は、上述した課題の存在から、規則性のある構造が望ましい。そのような規則性のある構造の作製手法は半導体リソグラフィを用いたトップダウンプロセスや、自己集積によるボトムアッププロセスが主である。半導体リソグラフィでは煩雑な工程が必要なことや、使用する薬品に細胞毒性がある可能性がある。また、図 1-10 のような曲面形状を作製することが非常に困難である。一方で、微粒子は簡易な手順で所望の形状に自己集積させることが可能であり¹⁻⁴⁵⁾⁻¹⁻⁵¹⁾、その創成表面は極めて規則的な幾何形状を有する。また、これをマスクとしたエッチングに

より, Si ウエハの微細構造化が行われている¹⁻⁵²⁾⁻¹⁻⁵³⁾. これらの研究では, 丁度図 1-10(b)のような形状の作製に成功している. このような, 半導体リソグラフィ等では作製することが難しい曲面を創生することができるのも, 微粒子ならではの利点である. 更に, 整列した微粒子は細胞培養の足場として適用できる¹⁻⁵⁴⁾⁻¹⁻⁶¹⁾.

そこで, 本研究では, まず微粒子を用いて微細構造を作製し, これを細胞接着の足場として適用することで細胞のパターニングを行うことを目的とする. そして, そのような微細構造のどのような幾何的特徴量が細胞の接着に影響をおよぼしているのかを明らかにすることを目的とする.

ここで, 本研究で調査対象とすべき微細構造を考える. まず, 微粒子の上に, そもそも細胞が接着するのかを調査する必要がある. この調査には, パターニングした微粒子列は必要ないため, ランダムな形状の微粒子列を作製する. 次いで, 微粒子列の持つ特徴量と細胞の接着等との関係を明らかにするため, パターニングした微粒子列を作製する必要がある. 微粒子列の作製方法が, 直線状の構造の作製に長けていることから, ラインアンドスペース形状の微粒子列を作製する. この微粒子列の作製において, 粒径や整列パターンを変更することで, 様々な特徴量を持った構造を作製することができる. 最後に, 算術平均粗さ, 歪度, そして尖度といった幾何的特徴量の調査には, 微粒子をマスクとして用いた Si ウエハの反応性イオンエッチング (RIE) が有効である¹⁻⁵²⁾⁻¹⁻⁵³⁾. また, その Si ウエハをモールドとして形状転写した微細構造は, 元の微細構造と共通の粗さ曲線を有する. これを利用することで, 算術平均粗さの値は変えずに, 他の幾何的特徴量を制御することが可能である.

本論文の構成は以下のとおりである. また, 論文全体の構成を図 1-12 に示す.

第 1 章は緒論であり, 研究背景となる微細構造と細胞接着に関する先行研究の成果や課題についてまとめ, 次いで本研究の目的, アプローチ, および研究上の位置付けを示している.

第 2 章では, 微粒子の自己整列による足場作製について示している. 直径 $0.5 \sim 2\mu\text{m}$ のシリカ (SiO_2) またはポリスチレン (PS) 微粒子の懸濁液を準備し, 以下の 2 種類の方法で自己整列を試みている. 一方は, ガラス基板および PS ディッシュ上に懸濁液を滴下し, 不規則形状の微粒子列を作製している. 他方は, あらかじめマイクロコンタクトプリントで疎水性単分子膜のラインパターンを形成した基板に移流集積法を適用し, 幅数 $10\mu\text{m}$ のライン状の微粒子列を作製している. いずれの場合においても微粒子は六方最密充填構造であり, 深さが粒径の半分 ($0.25 \sim 1\mu\text{m}$) の周期的な凹凸ができており, 細胞の接着が期待できる表面アスペリティが得られている.

第 3 章では、微粒子列を用いた細胞のパターニングについて示している。微粒子列を作製した PS ディッシュとガラス基板のいずれにおいても、その平面部に比べて微粒子列への接着細胞数が多いことがわかった。一般に、ガラス基板への細胞接着性は低いとされているので、微粒子列の表面幾何形状が細胞接着性を向上させたと考えられる。次いで、ライン状の微粒子列の場合に、PC12, HeLa, C2C12 細胞はいずれも微粒子列上に選択的に接着、配列した。すなわち、微粒子列による細胞の自律パターニングが実証できたと言える。ここで、微粒子列の間隔が $60\mu\text{m}$ 以下の構造では、90%以上の細胞が微粒子列に接着したが、 $80\mu\text{m}$ 以上では次第に減少した。培養中のインプロセス観察から、細胞は遊走を経て、播種後 24 時間で微粒子列に到達していたことから、細胞パターニングには細胞の遊走距離を考慮した構造設計が必要であることがわかった。播種後 1 週間の HeLa 細胞は微粒子列のみを覆うようにして増殖しており、微粒子列上での選択的な細胞成長も確認できた。そして、神経細胞様に分化した PC12 が神経突起を微粒子列に沿うようにして伸長させることもわかった。

第 4 章では、表面の幾何的特徴量が細胞の接着と成長に及ぼす影響について示している。本研究では、細胞の接着面積等の観点から、算術平均粗さ Sa 、歪度 Ssk 、尖度 Sku という 3 つの幾何的特徴量に着目している。これらは凹凸の深さ、対称性、そして分布を表しており、それらの異なる表面を次のように作製している。微粒子列をマスクとして Si ウエハをドライエッチングし、高さ数 10nm ～数 100nm のマイクロピラー配列を形成する。この形状をマスターとして転写することで、 Sa が $13\sim 46\text{nm}$ 、 Ssk が $-0.6\sim 0.8$ 、そして Sku が $2.7\sim 3.3$ の微細形状をもつシリコン樹脂 (PDMS) の作製に成功した。これらの PDMS 上で細胞を培養した結果、 Ssk が小さいほど微細形状への接着細胞数が多くなるが、 Sa や Sku との相関は低いことがわかった。また、細胞の成長方向は特徴量にかかわらず微細構造に沿っていた。微細構造化した PDMS に比べて微粒子列の方が細胞はより選択的に接着するが、これは微粒子間の空隙がグルコースの供給路として機能したためと考えられる。

第 5 章は結論であり、本研究で得られた成果についてまとめるとともに今後の展望について述べている。

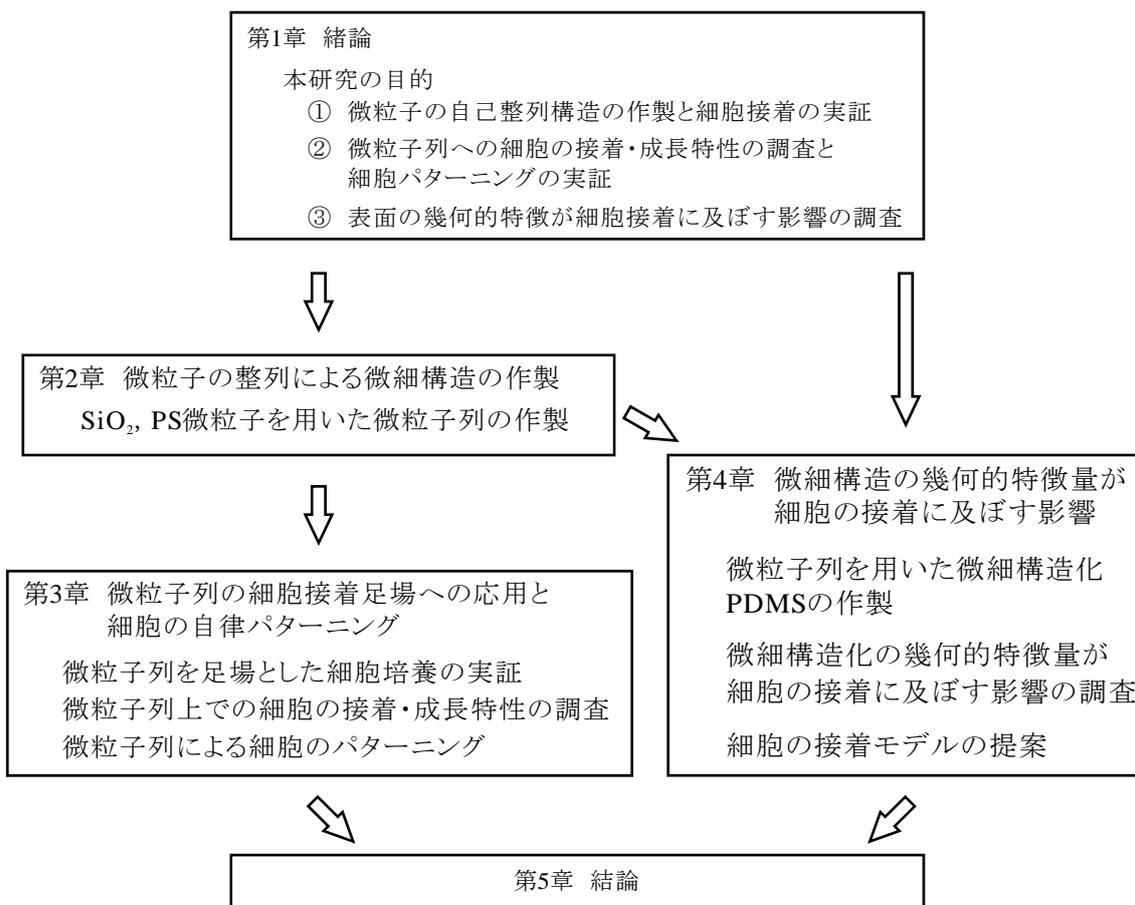


図 1-12 本論文の構成

第1章 参考文献

- 1-1) L. C. Hsiung, C. L. Chiang, C. H. Wang, Y. H. Huang, C. T. Kuo, J. Y. Cheng, C. H. Lin, V. Wu, H. Y. Chou, D. S. Jong, H. Lee, and A. M. Wo, “Dielectrophoresis-based cellular microarray chip for anticancer drug screening in perfusion microenvironments”, *Lab on a chip*, 11 (2011) 2333-2342.
- 1-2) B. Amelie, V. Laurence, F. Emmanuel, S. Florent, L. Isabelle, and V. Christophe “Multi-scale engineering for neuronal cell growth and differentiation” *Microelectron Engineering*, 88 (2011) 1668-1671.
- 1-3) M. Nagai, K. Asai, and H. Fujita, “Reciprocation of micro-objects by contraction and extension of *Vorticella convallaria* using polylysine as adhesive material”, *Mechanical Engineering Journal*, 1, 4 (2014) MN0038.
- 1-4) 東京女子医大 先端生命医科学研究所 細胞シートティッシュエンジニアリングセンター, <http://www.twmu.ac.jp/ABMES/CSTEC/ja/cellsheetengineering> (2016/1/16)
- 1-5) E. Eriksson, K. Sott, F. Lundqvist, M. Sveningsson, J. Scrimgeour, D. Hanstorp, M. Goksöra, and A. Granéli, “A microfluidic device for reversible environmental changes around single cells using optical tweezers for cell selection and positioning”, *Lab on a Chip*, 10 (2010) 617-625.
- 1-6) R. W. Applegate Jr., and J. Squier, “Optical trapping, manipulation, and sorting of cells and colloids in microfluidic systems with diode laser bars”, *Optics Express*, 12, 19 (2004) 4390-4398.
- 1-7) 中村真一, バイオプリンティング-生体組織と臓器作製へのチャレンジ, *医学のあゆみ*, 218, 2 (2006) 139-144
- 1-8) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of THE CELL*, NEWTON PRESS (2010). (中村桂子, 松原謙一・訳, *細胞の分子生物学* 第5版, ニュートンプレス, (2010))
- 1-9) A. Kobayashi, H. Miyake, H. Hattori, R. Kuwana, Y. Hiruma, K. Nakahama, S. Ichinose, M. Ota, M. Nakamura, S. Takeda, and I. Morita, “In vitro formation of capillary networks using optical lithographic techniques”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358 (2007) 692-697.
- 1-10) J. C. Chang, G. J. Brewer, and B. C. Wheeler, “A modified microstamping technique enhances polylysine transfer and neuronal cell patterning”, *Biomaterials*, 24 (2003) 2863-2870.
- 1-11) A. Ruiz, M. Zychowicz, L. Buzanska, D. Mehn, C.A. Mills, E. Martinez, S. Coecke, J. Samitier, P. Colpo, and F. Rossi, “Single Stem Cell Positioning on Polylysine and Fibronectin Microarrays”, *Micro and Nanosystems*, 1 (2009), 50-56.

- 1-12) C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber, "Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function" *Biotechnology Progress* 14 (1998) 356-363.
- 1-13) J. Fink, M. They, A. Azioune, R. Dupont, F. Chatelain, M. Bornens, and M. Piel, "Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques", *Lab on a Chip* 7 (2007) 672-680.
- 1-14) T. Matsuda, K. Inoue, and T. Sugawara, "Development of Micropatterning Technology for Cultured Cells", *Transactions/ American Society for Artificial Internal Organs*, Vol. XXXVI, SLIDE FORUM 14 (1990)
- 1-15) Y. Hanada, K. Sugioka, H. Kawano, T. Tsuchimoto, I. Miyamoto, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, "Selective cell culture on UV transparent polymer by F2 laser surface modification", *Applied Surface Science*, 255 (2009) 9885-9888.
- 1-16) T. Adachi, F. Kajita, K. Sato, K. Matsumoto, and M. Tagawa, "Cell Micro-Patterning by Atom Beam Exposure", *Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers. A*, 34, 688 (2003) 1782-1788.
- 1-17) D. Kleinfeld, KH. Kahler, and PE. Hockberger, "Controlled Outgrowth of Dissociated Neurons on Patterned Substrates", *The Journal of Neuroscience*, 8, 11 (1998) 4098-4120.
- 1-18) S. N. Bhatia, ML. Yarmush, and M. Toner, "Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: Hepatocytes and 3T3 fibroblasts", *Journal of Biomedical Materials Research*, 34 (1997), 189-199.
- 1-19) S. N. Bhatia, UJ. Balis, ML. Yarmush, and M. Toner, "Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells", *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13 (1999) 1883-1900.
- 1-20) L. Lauer, C. Klein, and A. Offenhausser, "Spot compliant neuronal networks by structure optimized micro-contact printing", *Biomaterials*, 22 (2001) 1925-1932.
- 1-21) E. J. Bategay, R. Thommen, and R. Hunar, "Platelet-derived growth factor and angiogenesis", *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 8, 42 (1996) 231-251.
- 1-22) 今山修平, 創傷治癒と血管新生, *興和医報*, 40 (1997) 8-13.
- 1-23) S. N. Bhatia, M. L. Yarmush, and M. Toner, "Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: Hepatocytes and 3T3 fibroblasts", *Journal of Biomedical Materials Research*, 34 (1997) 189-199.
- 1-24) S. N. Bhatia, U. J. Balis, M. L. Yarmush, and M. Toner, "Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells", *The FASEB Journal*, 13 (1999) 1883-1900.

- 1-25) Y. Tsuda, A. Kikuchi, M. Yamato, G. Chen, and T. Okano, "Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348 (2006) 937-944.
- 1-26) Y. Torisawa, B. Mosadegh, G. D. Luker, M. Morell, K. S. O'Shea, and S. Takayama, "Microfluidic hydrodynamic cellular patterning for systematic formation of co-culture spheroids", *Integrative Biology*, 1 (2009) 649-654.
- 1-27) K. L. Schmeichel and M. J. Bissell, "Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions", *Journal of Cell Science*, 116, 12 (2003) 2377-2388
- 1-28) 佐藤由紀子, 岩坂正和, 木村史子, 木村恒久, 上野照剛, 磁場を用いた細胞のパターニング, 電子情報通信学会, (2004)
- 1-29) L. Eric, S. Yasuyuki, and F. Teruo, "Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane)", *Biomed Microdevices*, 5 (2003) 109-114.
- 1-30) J. Ahn, S. J. Son, and J. Min, "The control of cell adhesion on a PMMA polymer surface consisting of nanopillar arrays", *Journal of Biotechnology*, 164 (2013) 543-548.
- 1-31) B. Wojciak-Stothard, Z. Madeja, W. Korohoda, A. Curtis, and C. Wilkinson, "Activation of macrophage-like cells by multiple grooved substrata Topographical control of cell behavior", *Cell Biology International*, 19, 6 (1995) 485-490.
- 1-32) A. Wood, "Contact guidance on micro fabricated substrata: the response of teleost fin mesenchyme cells to repeating topographical patterns", *Journal of Cell Science*, 90 (1988) 667-681.
- 1-33) A. Curtis and C. Wilkinson, "Topographical control of cells", *Biomaterials*, 18 (1997) 1573-1583.
- 1-34) H. Baac, J. H. Lee, J. M. Seo, T. H. Park, H. Chung, S. D. Lee, and S. J. Kim, "Submicron-scale topographical control of cell growth using holographic surface relief grating", *Material Science and Engineering C*, 24 (2004) 209-212.
- 1-35) G. A. Dunn and A. F. Brown, "Alignment of fibroblasts on grooved surfaces described by a simple geometric transformation", *Journal of Cell Science*, 83 (1986) 313-340.
- 1-36) S. Y. Yang, E. S. Kim, G. Jeon, K. Y. Choi, and J. K. Kim, "Enhanced adhesion of osteoblastic cells on polystyrene films by independent control of surface topography and wettability", *Materials Science and Engineering C*, 33 (2013) 1689-1695.
- 1-37) D. D. Deligianni, N. D. Katsala, P. G. Koutsoukos, and Y. F. Missirlis, "Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength", *Biomaterials*, 22 (2001) 87-96.
- 1-38) H. H. Huang, C. T. Ho, T. H. Lee, T. L. Lee, K. K. Liao, and F. L. Chen, "Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion", *Biomolecular Engineering*, 21 (2004) 93-97.

- 1-39) A. B. Faia-Torres, S. Guimond-Lischer, M. Rottmar, M. Charnley, T. Goren, K. Maniura-Weber, N. D. Spencer, R. L. Reis, M. Textor, and N. M. Neves, “Differential regulation of osteogenic differentiation of stem cells on surface roughness gradients”, *Biomaterials*, 35, 33 (2014) 9023-9032.
- 1-40) S. Y. Yang, E. S. Kim, G. Jeon, K. Y. Choi, and J. K. Kim, “Enhanced adhesion of osteoblastic cells on polystyrene films by independent control of surface topography and wettability”, *Materials Science and Engineering C*, 33 (2013) 1689-1695.
- 1-41) L. Ponsonnet, V. Comte, A. Othmane, C. Lagneau, M. Charbonnier, M. Lissac, and N. Jaffrezic, “Effect of surface topography and chemistry on adhesion, orientation and growth of fibroblasts on nickel-titanium substrates”, *Materials Science and Engineering C*, 21 (2002) 157-165.
- 1-42) Y. W. Fan, F. Z. Cui, S. P. Hou, Q. Y. Xu, L. N. Chen, and I. -S. Lee, “Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topograph”, *Journal of Neuroscience Methods*, 120 (2002) 17-23.
- 1-43) S. P. Khan, G. G. Auner, and G. M. Newaz, “Influence of nanoscale surface roughness on neural cell attachment on silicon”, *Nanomedicine Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1, 2 (2005) 125-129.
- 1-44) 山本雄二, トライボロジー (第 2 版), 理工学社 (2010)
- 1-45) A. Kumar, H. A. Biebuyck, and G. M. Whitesides. “Patterning self-assembled monolayers: applications in materials science”. *Langmuir*, 10 (1994) 1498-1511.
- 1-46) Y. Kanamori, A. Kaneko, N. Moronuki, and T. Kubo, “Self-assembly of fine particles on patterned wettability in dip coating and its scale extension with contact printing” *Journal of Advanced Mechanical Design System*, 2 (2008) 783-791.
- 1-47) P. A. Kralchevsky and K. Nagayama, “Capillary forces between colloidal particles”, *Langmuir*, 10 (1994) 23-36.
- 1-48) M. Nishio, N. Moronuki, and A. Kaneko, “Modeling the start conditions of fine particles self-assembly in groove on hydrophilic/hydrophobic patterned substrate”, *Journal of Japan Society of Precision Engineering*, 80 (2014) 172-176.
- 1-49) M. Nishio and N. Moronuki, “Self-assembly of particle on three dimensional curved structure”, *Transactions of the JSME*, 80, 810 (2014) MN0031.
- 1-50) C. D. Dushkin, P. A. Kralchevsky, V. N. Paunov, H. Yoshimura, and K. Nagayama, “Torsion Balance for Measurement of Capillary Immersion Forces”, *Langmuir*, 12, 3 (1996) 641-651.
- 1-51) R. Krechetnikov and G. M. Homsy, “Dip-coating in the presence of a substrate-liquid interaction potential”, *Physics of fluids*, 17 (2005), 10105.

-
- 1-52) Y. Tanaka, N. Keyaki, N. Moronuki, and A. Kaneko, "Increase in the area of structured surface and its effect on sensitivity improvement of biochemical sensing", *Key Engineering Materials*, 516 (2012) 160-165.
- 1-53) V. Gianneta, A. Olziersky, and A. G. Nassiopoulou, "Si nanopatterning by reactive ion etching through an on-chip self-assembled porous anodic alumina mask", *Nanoscale Research Letters*, 8 (2013) 71.
- 1-54) S. C. Balmert and S. R. Little, "Biomimetic Delivery with Micro- and Nanoparticles", *Advanced Materials*, 24, 28 (2012) 3757-3778.
- 1-55) F. L. Yap and Y. Zhang, "Assembly of polystyrene microspheres and its application in cell micropatterning", *Biomaterials*, 28 (2007) 2328-2338.
- 1-56) A. Kaneko, T. Sugihara, H. Murakami, I. Takeda, Y. Tanaka, and N. Moronuki, "Fabrication of spatially-patterned cells using selective adhesion on pre-structured fine particles", *Key Engineering Materials*, 523-524 (2012) 615-620.
- 1-57) S. Kruss, T. Wolfram, R. Martin, S. Neubauer, H. Kessler, and JP. Spatz, "Stimulation of Cell Adhesion at Nanostructured Teflon Interfaces", *Advanced Materials*, 22, 48 (2010) 5499-5506.
- 1-58) T. Sugihara and A. Kaneko, "Self-Patterning of PC12 Cells on Micro-Structures of Protein-Modified Particles", *Journal of Solid Mechanical Material Engineering*, 7, 2 (2013) 142-154.
- 1-59) I. Takeda, A. Kaneko, Y. Tanaka, and N. Moronuki, "Selective Cell-adhesion on Micro-structured Fine Particles", *Key Engineering Materials*, 516 (2012) 130-135.
- 1-60) I. Takeda, M. Kawanabe, and A. Kaneko, "Autonomous patterning of cells on microstructured fine particles", *Material Science Engineering: C*, 50 (2015) 173-178.
- 1-61) I. Takeda, M. Kawanabe, and A. Kaneko, "An investigation of cell adhesion and growth on micro/nano-scale structured surface -Self-assembled micro particles as a scaffold", *Precision Engineering*, 43 (2016) 294-298.

第2章

微粒子の整列による微細 構造の作製

2.1 緒言

本章は、細胞培養用の基板（足場）として、所望の形状を簡易に作製することができる微粒子に着目し、微粒子を自己整列により微細構造化することを目的としている。まず、微粒子の懸濁液を基板に滴下し、アイランド状の微粒子構造を作製する。滴下した懸濁液の溶媒が蒸発することで、微粒子が自律的に構造化した。次いで、移流集積法と呼ばれる手法によって、微粒子をラインアンドスペース状に整列させる。微粒子は、基板を懸濁液から一定速度・一定角度で引き上げることで、濡れ広がった溶媒の乾燥に伴い発生するメニスカス力等のはたらきで、基板表面に自己集積化する。この際、引き上げる基板に疎水性の自己組織化単分子膜をライン状に成膜することで、 $\phi 500\text{nm} \sim 2\mu\text{m}$ の SiO_2 微粒子を、幅約 $40\mu\text{m}$ のラインアンドスペース構造状に整列させた。

2.2 表面の定義

本節では、本研究で細胞培養用足場として適用する表面について、改めてその特徴量を定義する。特徴量とは、その対象を説明・表現するために必要なパラメータである。

まず、接着をはじめとする細胞の機能にかかわる要因は、生化学的な要因、物理化学的な要因、そして構造力学的な要因の3種類に分類されると考えられている²⁻¹⁾。生化学的な要因とは、ホルモンや成長因子などの生体分子が該当する。物理化学的な要因とは、温度、pH、酸素濃度、表面エネルギーなどが相当する。構造力学的な要因とは、弾性率、マイクロ・ナノトポグラフィなどが相当する。これを踏まえ、細胞培養表面の持つ特徴量のうち、細胞の接着に影響するものを考える。

ある表面の持つ特徴量は、その表面を構成する材質由来の「物性」と、表面の持つ「形状」の2種類に大別できる。第1章で紹介したように、表面の物性と細胞の接着との関係を対象とした研究が多く行われている。例えば、物性の一つ、機械的性質として、細胞培養表面の弾性率と細胞の接着との関係を調査した研究がされており、一定以上の弾性率を持った表面でないと細胞はアクチンフィラメントをはじめとする細胞骨格の形成に影響することや、ハイドロゲルなどの“柔らかい”材料が、細胞に生体内と同様の機能を発現するために必要であることが明らかになっている²⁻²⁾。また、細胞接着性タンパク質の有無や、それらの吸着に影響を及ぼす表面の濡れ性、電荷、そして官能基といった化学的・電気的性質に関しても、細胞の接着に影響を及ぼすことがわかっている。細胞はそれ自体が活動に酸素を必要とするので、ガス透過率も影響因子として考えられる。実際に、PDMSはその優れた酸素透過率から、マイクロ流路などの細胞培養用デバイスの素材として採用されている²⁻³⁾⁻²⁻⁴⁾。また、細胞の接着を、細胞-足場界面の形成と捉えれば、濡れ性とは別に、表面・界面エネルギーも細胞の接着に影響する可能性がある。

表面が本来持っている性質以外に、加工プロセスによって新たに導入される性質も考えられる。Si ウエハのウェットエッチングは代表的な微細構造作製技術の一つであるが、そのエッチングの際、エッチャントに含まれるイオンや反応生成物が基板表面に残留することがあり、腐食の原因等となることが知られている。また、細胞はその信号伝達に濃度勾配を利用したイオンの授受を利用していることがわかっており、その際にはカリウムイオンやナトリウムイオン等が用いられる。従って、加工プロセスによって表面にそのようなイオンが残留した状態であれば、細胞がそれを認識してしまう恐れがある。本研究ではこうした特徴量も、表面の材質由来として分類する。

表面の形状についても、細胞の接着との関係を調査した研究が多く存在している。例えば、荒れた表面に細胞が接着する場合、その接着の形態によって細胞-表面界面の面積（接着面積）が変わる。平面と面接触している場合を基準とすれば、荒れた表面と面接触して

いる場合にはその接着面積は大きく、点接触している場合には小さくなる。こうした接着面積は接着部に吸着しているタンパク質の量に影響するため、細胞の接着に影響する可能性がある²⁻⁵⁾⁻²⁻⁶⁾。また、Wenzel や Cassie-Baxter のモデルのように、表面の形状によっては濡れ性が変化してしまうことも考えられる²⁻⁷⁾⁻²⁻⁸⁾。この他、微細な孔構造なども、表面の形状の特徴として考えられる。例えば、連通多孔質材料を足場として用いることで、細胞に新鮮な培地を供給し、細胞の老廃物は排出させることを狙った研究があり、一定の成果を上げている²⁻⁹⁾⁻²⁻¹¹⁾。

以上から、本研究では表面の持つ特徴量を、図 2-1 に示すようにまとめている。第 1 章でも述べたとおり、表面の材質由来の特徴量が細胞の接着等に及ぼす影響については、様々な研究によって体系化されている。一方で、幾何形状の影響は、その影響因子が何であるかわかっていない。そこで本研究では、細胞培養用表面を単一の材料で被膜することで、材質由来の特徴量を一定にし、幾何形状の持つ影響のみに着目することを試みる。

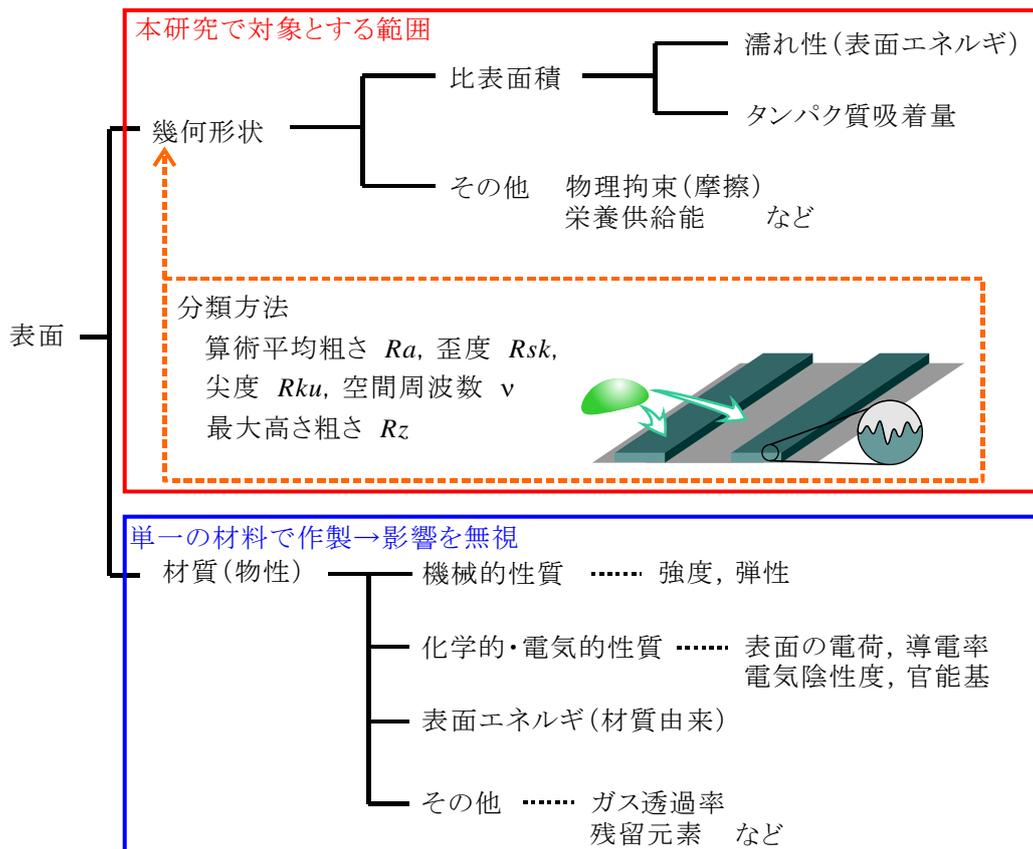


図 2-1 表面の持つ特徴量

2.3 微粒子自己整列の基本機構

前節では、本研究が細胞培養表面の形状が細胞の接着に及ぼす影響を対象とすることを説明した。以降では、本研究で作製する微細構造について説明している。第1章で述べたように、微粒子の自己整列を応用することで、簡易かつ低コストで微細構造化した表面を作製することが可能である。そこで、まずはその自己整列の基本機構について説明する。

固体基板上で微粒子懸濁液の溶媒が蒸発する場合を考える。溶媒の蒸発に伴う接触角の変化と微粒子間にはたらく力は図2-2で示される。まず、図2-2の上のように、微粒子が溶媒中に分散している（懸濁液）とする。溶媒の蒸発に伴い、微粒子の表面が溶媒界面に接触すると、その接触面は図2-2の中央のようになる。ここでの接触角は θ_A となり、主に下方向に液架橋力がはたらく。結果として、微粒子は基板表面に押し付けられる。この際、微粒子の周囲に他の微粒子が存在する場合、微粒子間に液架橋が発生する。接触角は θ_B となり、液架橋力が微粒子同士を引き付け合うように発生する。結果として、溶媒の蒸発後、分散していた微粒子はお互いに引き合い、基板表面に六方最密充填した状態で整列する（図2-2下）^{2-12)・2-25)}。

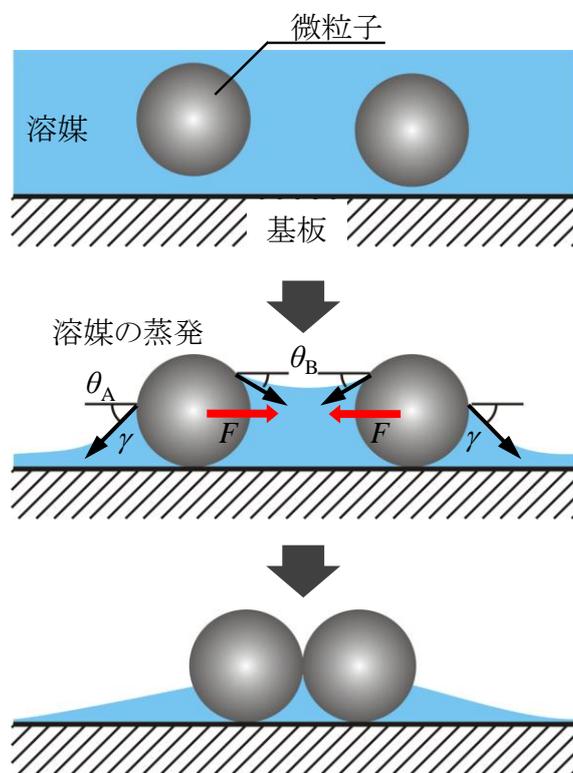


図2-2 微粒子自己整列の基本機構

2.4 微粒子の自己整列

2.4.1 微粒子懸濁液の準備

微粒子は、上記の原理を利用するため、懸濁液の状態を使用する。ポリスチレン（以下、PS）微粒子（Duke Standards, Thermo Fisher Scientific）は、懸濁液の状態で購入し、超純水を加えて微粒子濃度を 1wt% に調整した。シリカ（ SiO_2 ）微粒子（ハイプレシカ、宇部日東化成）は粉末状態で購入し、超純水を溶媒として、微粒子 1wt%、ドデシル硫酸ナトリウム 0.1wt% となるよう調整した。ドデシル硫酸ナトリウムは界面活性剤であり、微粒子同士の凝集を防ぐ分散剤として添加している。図 2-3 は SiO_2 微粒子が分散した懸濁液である。微粒子が分散しているので、溶液は白濁しており、背景が透けて見えない。



図 2-3 分散状態の懸濁液

2.4.2 微粒子整列基板の準備

微粒子を微細構造化させる基板として、Si ウエハ（松崎製作所）、ガラス基板（S1225，松浪ガラス，ソーダ石灰），そしてポリスチレンディッシュ（Thermo Scientific， $\phi 35\text{mm}$ ）を用いた。微粒子は懸濁液の状態から用いるため，基板は親水性であることが望ましい。そこで，Si ウエハとガラス基板は流水による洗浄（5分間），エタノールでの超音波処理（5分間），超純水による超音波処理（5分間）を行った後，ピラニア処理による親水化を行った。ピラニア処理とは，ピラニア溶液（硫酸：過酸化水素水=3：1， 70°C ）に基板を浸漬させる処理であり，基板表面に付着した有機物を除去でき，更に基板表面にはヒドロキシ基（-OH）が付加され親水化される。

実際に基板が親水化しているかどうか調査するため，基板に超純水 $1\mu\text{l}$ を滴下し，その際の水接触角を観察した。図 2-4 は，ピラニア処理前後の，ガラス基板の水接触角変化である。洗浄のみを施したガラス基板の水接触角は 72° であった。ピラニア処理を施したガラス基板は親水性を示し，その水接触角は $\theta < 5^\circ$ となった。以上から，基板の親水化に成功したと言える。



図 2-4 ピラニア処理前後でのガラス基板の水接触角変化

2.4.3 滴下による微粒子整列

アイランド形状の微粒子は、**図 2-5** に示すように、微粒子懸濁液 1 滴を基板に滴下し、24 時間自然乾燥させることで作製する²⁻²⁶⁾⁻²⁻²⁷⁾。なお、本構造の作製に用いた微粒子は、粒径 $1\mu\text{m}$ のシリカ (以下 SiO_2) およびポリスチレン (以下 PS) 微粒子である。作製した粒径 $1\mu\text{m}$ の SiO_2 微粒子列を、走査型電子顕微鏡 (以下 SEM, VE-9800SP, KEYENCE) で観察した。**図 2-6** は、観察した微粒子列の SEM 像である。微粒子は観察像のように、六方最密充填している。つまり、頂点間の距離は微粒子の粒径に依存し、細胞の代表寸法に比べ小さい値となっている。また、微粒子が六方最密充填していることがわかる。ただし、滴下によって作製される微粒子列は**図 2-5(c)**の模式図のように単層部分と複層部分が混在しているので、観察領域によって表面の幾何的特徴が大きく変わってしまう。また、微粒子列の端面は不規則な形状をとっている。

以上より、懸濁液の滴下による微粒子の整列に成功した。

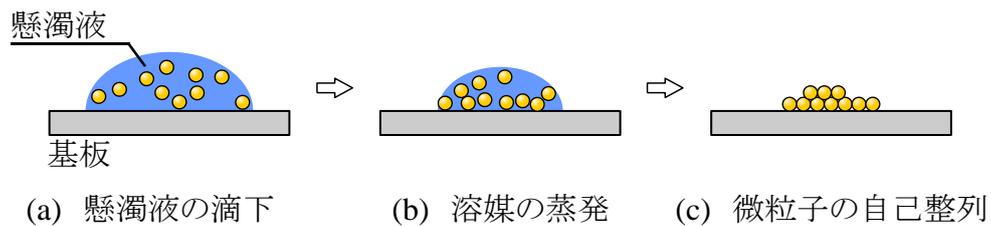


図 2-5 アイランド形状の微粒子列作製方法

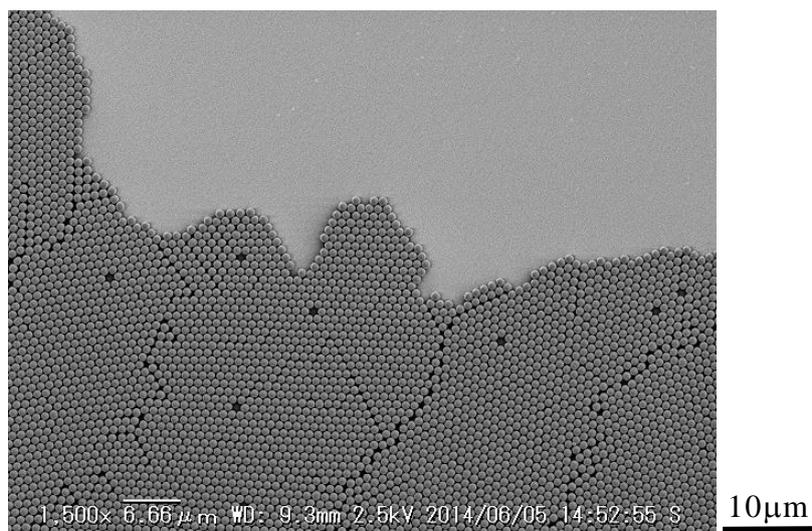


図 2-6 アイランド形状の微粒子列

2.4.4 微粒子列の配置技術

懸濁液の滴下による微粒子列の作製は、簡易に微粒子を整列させることができる一方でその形状は不規則なものであり、所望の配置をすることができない。そこで、微粒子の局所的な配置が可能となるいくつかの手法が提案されている。

マニピュレーション法は、第1章で紹介した細胞の非自律的パターンニングと同様に、マイクロプローブや光ピンセット等で微粒子を1個ずつ操作する手法である²⁻²⁸⁾⁻²⁻³³⁾。本手法では、**図2-7**のように $\phi 10\mu\text{m}$ のポリスチレン微粒子を操作できている。一方で、精密なパターンニングが可能である一方スループットが低いという課題が存在する。

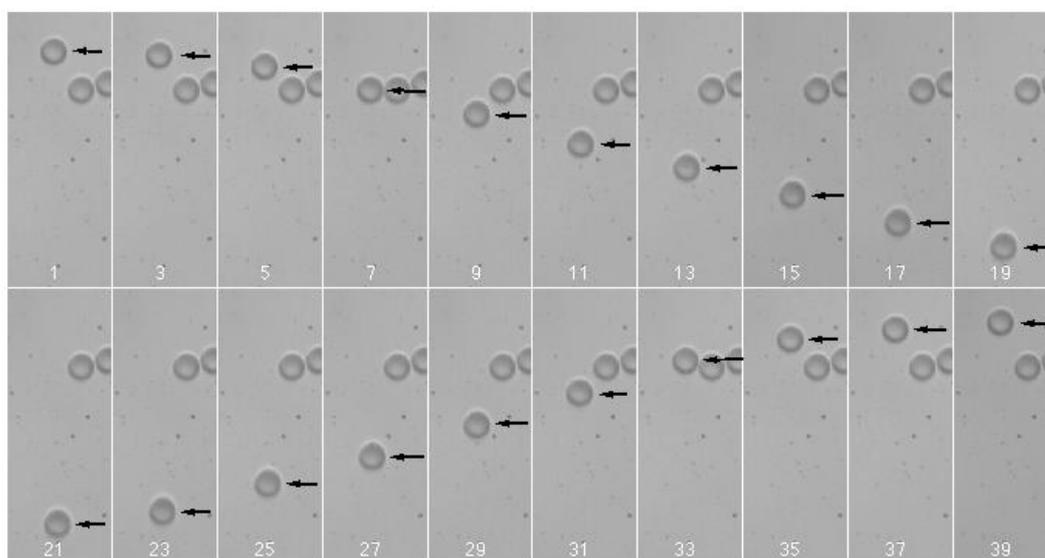


図2-7 ポリスチレン微粒子の光ピンセットによるマニピュレーション²⁻²⁸⁾

二溶液法は、増田らによって考案された微粒子のパターニング法である²⁻³⁴⁾⁻²⁻³⁵⁾。親水/疎水パターンを設けた基板の上に、メタノールを溶媒とした微粒子懸濁液を滴下する。懸濁液は疎水領域からはじかれ、親水領域に沿うように濡れ広がる。この状態で、メタノールと溶解しにくいデカヒドロナフタレン溶液内に基板を浸漬させる。メタノールはデカヒドロナフタレン中に徐々に溶解していき、コロイド溶液の収縮および乾燥が生じる。この際に発生するメニスカス力によって微粒子が充填する。図2-8は、この方法によって作製された微粒子列である。微粒子が緻密に構造化している様子が確認できるが、構造化の原理としては上述の滴下での作製と同様であり、微粒子を単層で整列させるためにはパターンに応じた濃度および滴下量の調整が必要である。実際に、微粒子で構成された球体の作製など、立体的な構造の作製に長けている。

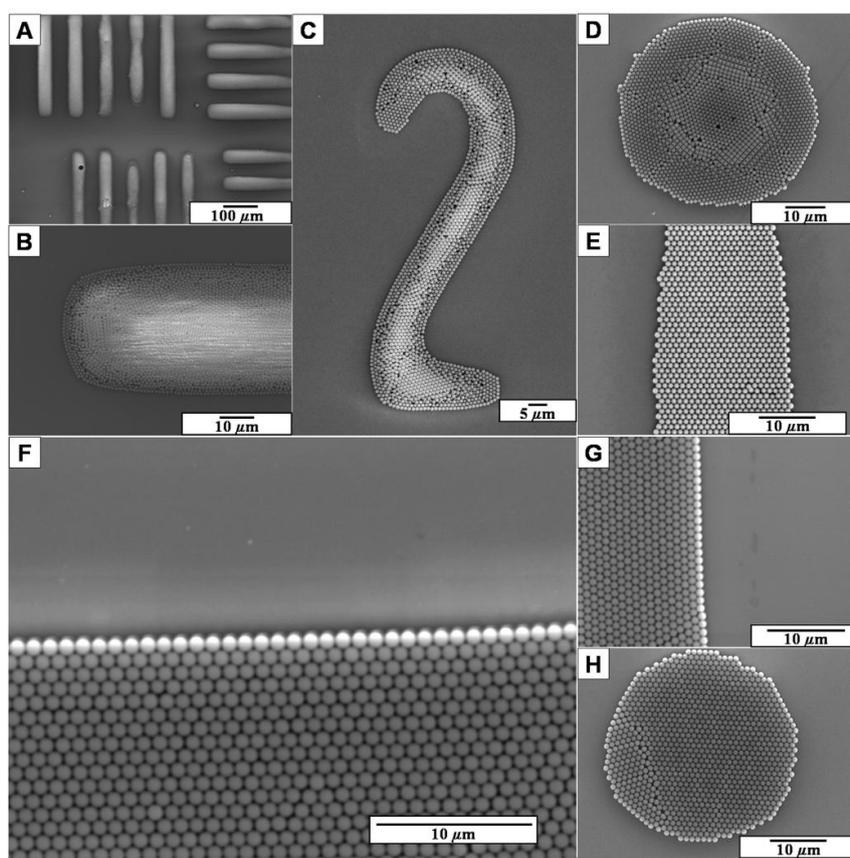


図2-8 二溶液法により作製された微粒子構造²⁻³⁴⁾

マイクロコンタクトプリントは、表面に被転写物を塗布した、ポリジメチルシロキサン（以下 PDMS）等をスタンプとして用い、押し付けることで基板に対象を転写する技術である。Yan らはこの方法を用いて、図 2-9 のように凸状ラインアンドスペース構造に整形した PDMS の凸部に微粒子を転写し、更に別の基板に押し付けることでこの微粒子を再度転写している²⁻³⁶⁾⁻²⁻³⁷⁾。微粒子を転写する基板にはポリマーの薄膜が製膜されており、ガラス転移点まで昇温した状態で転写している。図 2-9 右の SEM 写真のように、幾本もの微粒子列を単層に配列させることが可能であるが、ガラス転移点までの昇温によって、微粒子列間のポリマー薄膜が平面ではなくなってしまう恐れがある。

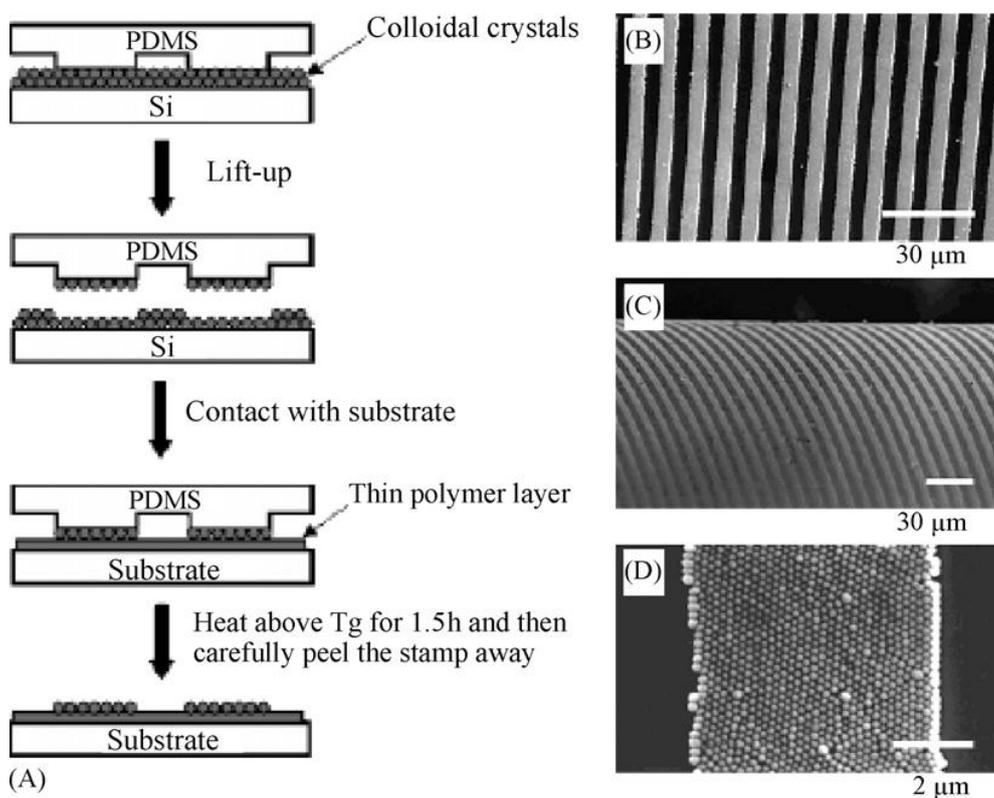


図 2-9 マイクロコンタクトプリントによって作製された微粒子列²⁻³⁶⁾

移流集積法（ディップコート法）は、図 2-10 のように、微粒子懸濁液から基板を一定速度・一定角度で引き上げることで、その表面に微粒子を単層で自己集積化させる技術である²⁻³⁸⁾⁻²⁻⁴⁴⁾。この際、引き上げる基板に親水/疎水パターンを設けることで、親水部のみに微粒子を整列させることが可能である。本研究では、作製される微細構造の規則性に着目し、この移流集積法を採用した。また、移流集積法はその整列方法からラインアンドスペース形状の作製に向いているため、本研究でもラインアンドスペース形状を採用することとした。

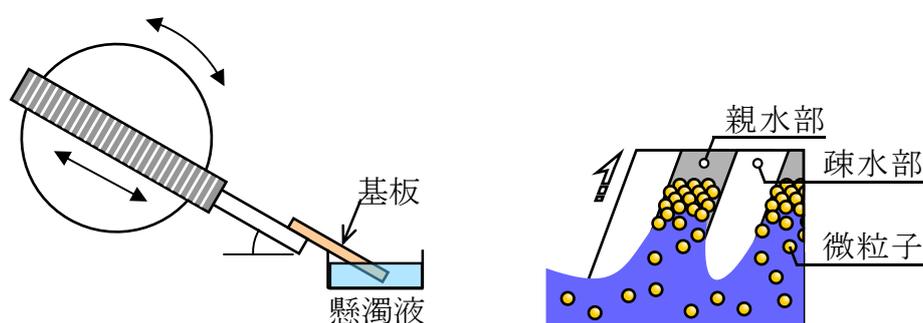


図 2-10 移流集積法の概要

ここで、基板に Si やガラスを用いることで、ピラニア処理による親水化および疎水性単分子膜の形成の両方が可能である。オクタデシルトリクロロシラン（以下、OTS, Thermo Fisher Scientific）は、図 2-11 に示すように、Si 基板やガラス基板表面の OH 基と反応する。この反応は OTS と基板が触れた面内で連続的に発生し、自己組織化単分子膜 (Self-assembled monolayer, SAM) を形成する。この結果、疎水基であるオクタデシル基が表面に露出し、OTS-SAM が存在する部分は疎水性を示す。この OTS をパターンニングすることで、所望の形状を持つ微粒子列を作製することができる。

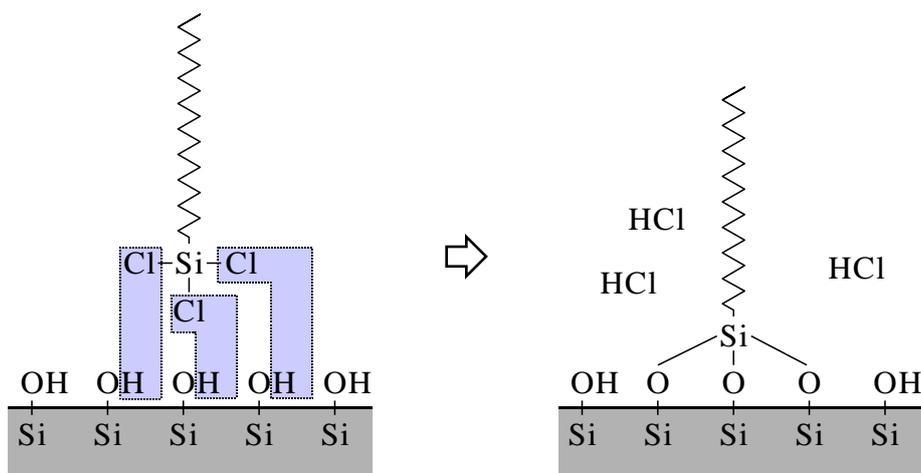


図 2-11 基板上への OTS 単分子膜形成

OTS のパターンニングは、PDMS をスタンプとしたマイクロコンタクトプリントによって行った。この手順を図 2-12 に示す。まず、あらかじめ作製したモールドに PDMS を流し込み、硬化させることでスタンプを作製する。OTS-シクロヘキサン溶液 (2vol.%) を調整し、ベンコットに滴下する。PDMS スタンプを上記ベンコット上に 10 秒置き、スタンプ表面に OTS を付着させる。その後、余分なシクロヘキサンを乾燥させるため、3 分間静置する。基板に PDMS スタンプを 7 分間静置し、その接触部に OTS-SAM を形成させる。なお、OTS は光や水とよく反応するため、上記までの工程はすべてグローブボックス (UN-650F-B1006, UNICO) 内で行った。OTS-SAM を形成させた基板は、ピラニア溶液に 3 分間浸漬した後、流水で 10 分間洗浄した。以上の工程により、基板上に OTS-SAM が形成される。図 2-13 は、先行研究において同一の工程で Si ウエハに成膜したラインアンドスペース状の OTS-SAM の ESEM 像であり、OTS が成膜された箇所とされていない箇所で、異なる大きさの液滴が形成されている²⁻³⁹⁾。

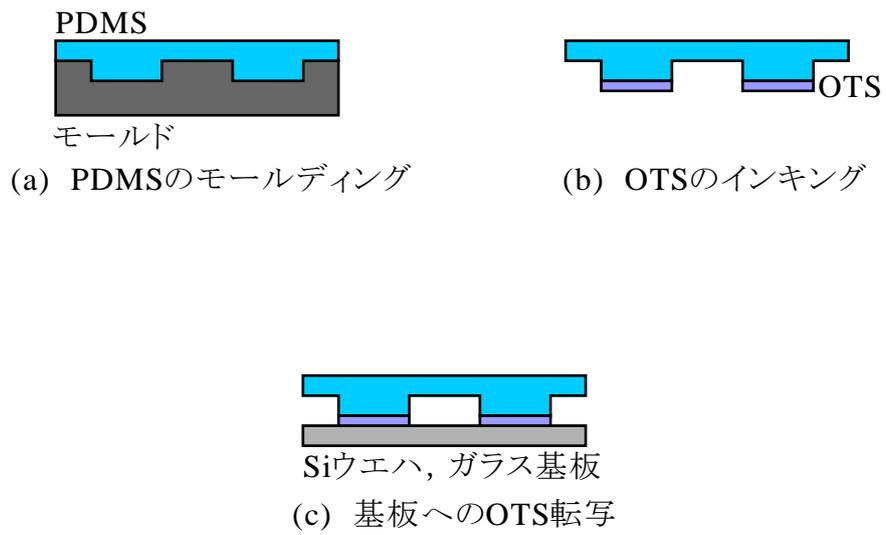


図 2-12 OTS-SAM の成膜方法

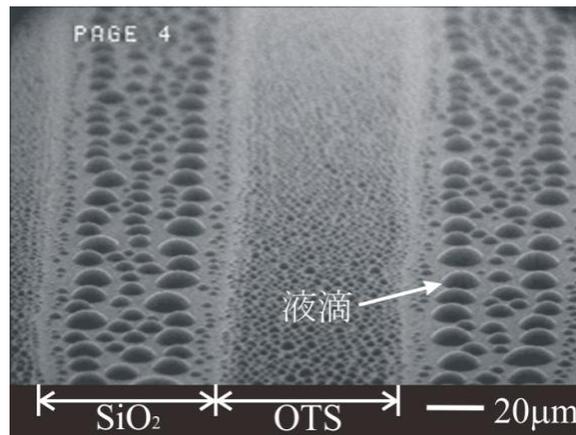


図 2-13 ラインアンドスペース状に成膜された OTS-SAM の ESEM 像²⁻³⁹⁾

次いで、親水/疎水領域を形成させた基板の上に微粒子を整列させる。上記の基板を、**図 2-14**で示す電動スライダ先端に取り付け、微粒子懸濁液を張ったシャーレに1cmほど浸す。規定の速度・角度で電動スライダを動かし、基板を懸濁液から引き上げる。溶媒の蒸発と微粒子間に発生する液架橋力により、懸濁液中の微粒子が基板の親水部に自己組織化する。引き上げる際の条件は、先行研究を参考に、すべて引き上げ角度 30° 、引き上げ速度 $20\mu\text{m}/\text{sec}$ で行った²⁻³⁸⁾⁻²⁻⁴⁴⁾。本条件で引き上げを行うことで、基板表面に単層の微粒子列を形成させることが可能である。



図 2-14 引き上げ装置とその模式図

図 2-15 は本手法で作製した微粒子列の SEM 像である。微粒子は滴下で作製したものと同様、六法最密充填しており、なおかつ単層である。今回、OTS-SAM 形成のための PDMS スタンプには凹部凸部ともに $50\mu\text{m}$ のものを使用したので、基板に形成される親水/疎水パターンの幅はどちらも $50\mu\text{m}$ である。しかし、実際に作製された微粒子列の幅は約 $30-40\mu\text{m}$ 、間隔は約 $60-70\mu\text{m}$ となった。金森らの研究において、親水部の幅よりも整列した微粒子列の幅が一定の割合で狭くなることが報告されており²⁻³⁹⁾、本研究でもこれと同様の結果となった。したがって、所望の形状に微粒子を整列させる場合には、この減少分も考慮に入れる必要がある。次いで、この微粒子列の表面形状を、走査型プローブ顕微鏡（以下 AFM, SPM-9700, 島津製作所）で測定した。**図 2-16** は観察した微粒子列の AFM 像である。AFM 像からも、微粒子が六方最密充填していることがわかる。また、微粒子列の高さは、微粒子の粒径と同じく $1\mu\text{m}$ であり、このことから単層に整列していることがわかる。そして、微粒子によって構成されている微細構造は極めて規則的な構造である。本研究では、細胞培養用の足場として、 $\phi 500\text{nm}$ 、 $\phi 1\mu\text{m}$ 、 $\phi 2\mu\text{m}$ の SiO_2 微粒子をそれぞれラインアンドスペース状に整列させている。ここで、 $\phi 1\mu\text{m}$ の微粒子列を足場として PC12 細胞（接着時の代表寸法： $25\mu\text{m}$ ）を培養した際の、微細構造と細胞との大きさの関係は、縦方向のスケールを

考慮せずに図示すると，**図 2-17** のような関係になる．足場表面の形状は微粒子の球形状を反映しており，その頂点間のピッチは細胞と比べ小さくなる．この図のように，微粒子の粒径が， $1\mu\text{m}$ ，細胞の接着時の代表寸法が $25\mu\text{m}$ の場合，細胞 1 個の 1 辺あたりに存在する凹凸の数は約 25 個となる．

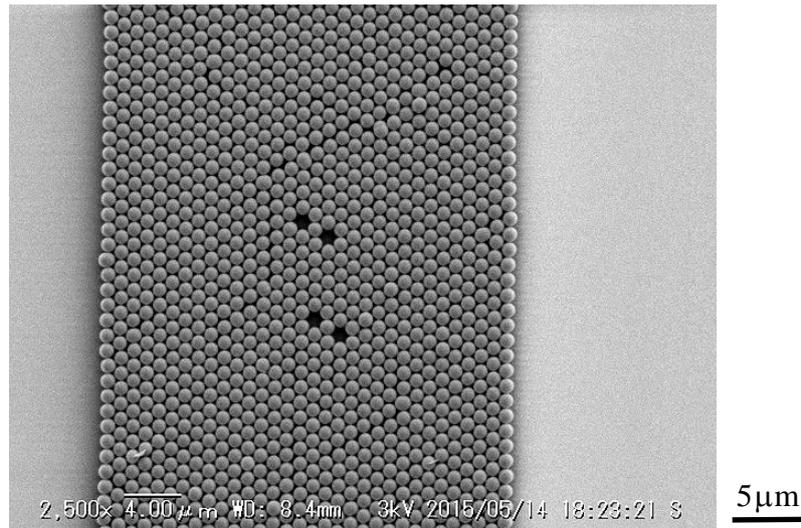


図 2-15 ラインアンドスペース形状の $\phi 1\mu\text{m}$ SiO_2 微粒子列の SEM 像

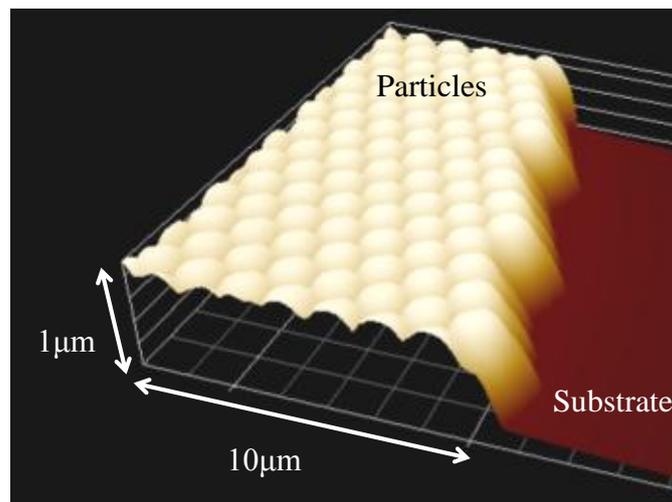


図 2-16 ラインアンドスペース形状の $\phi 1\mu\text{m}$ SiO_2 微粒子列の AFM 像

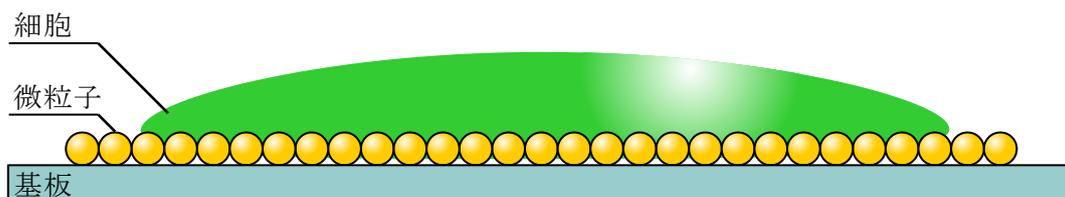


図 2-17 細胞と微細構造の大きさの対比

2.4.5 微粒子整列に関するまとめ

本研究では、アイランド形状の微粒子列を、滴下法により作製した。また、ラインアンドスペース形状の微粒子列を、OTSのマイクロコンタクトプリントと移流集積法を組み合わせることで作製した。いずれの構造も微粒子の球形状に由来した微細な凹凸を持っており、細胞培養用の足場としての適用が期待できる。なお、本論文では、前者を「微粒子列」、後者を「微細構造化した微粒子列」と呼称する。

本章で作製した微細構造化した微粒子列は、 $\phi 500\text{nm}$ 、 $\phi 1\mu\text{m}$ 、 $\phi 2\mu\text{m}$ の SiO_2 微粒子が単層に整列したものである。したがって、構造の高さおよび空間波長は、その粒径に相当する $500\text{nm}\sim 2\mu\text{m}$ となる。構造の高さに関して、様々な研究から、十数 nm 程度の高さを持つ構造では細胞の接着性が良く²⁻⁴⁵⁾⁻²⁻⁴⁸⁾、 100nm 程度では接着性が悪くなり²⁻⁴⁹⁾⁻²⁻⁵⁰⁾、更に数百 nm 程度ではまたよく接着するようになることがわかっている²⁻⁵¹⁾。また、規則的なホール構造のピッチの影響が調査されており、これは空間波長に相当する。ホール構造のピッチが十数 nm 程度で細胞はよく接着し²⁻⁵²⁾、 $200\sim 300\text{nm}$ では接着性が悪くなり²⁻⁵³⁾⁻²⁻⁵⁵⁾、 400nm でまた良くなるということがわかっている²⁻⁵⁶⁾。本研究では、以上のように先行研究で接着性が良くなるとされている 500nm 程度の構造の高さおよび空間波長から調査範囲を広げ、マイクロメートルオーダーの構造の高さおよび空間波長に関して調査する。

2.5 ラインアンドスペース構造の作製

本研究では、微粒子列の持つ、表面の微細なアスペリティが細胞の接着に影響すると考えている。一方で、細胞の接着への影響がそのようなアスペリティによるものなのか、それとも単に段差の存在によるものなのか、明らかにする必要がある。この検証には、同等の高さを持つラインアンドスペース構造を細胞培養の足場として適用し、両者を比較すればよい。ラインアンドスペース構造は光硬化性樹脂を用いたナノインプリントで作製することができる。本研究では、光硬化性樹脂として、PAK-02（東洋合成）を使用した。図 2-17 にナノインプリント装置（EUN-4200, 太洋工業）の写真を示す。構造作製の手順は図 2-18 の通りである。まず、ガラス基板に光硬化性樹脂 PAK-02 を滴下する（図 2-18(a)）。次いで、リッジ構造を持つモールドを、ナノインプリント装置を用いて、PAK-02 の塗布されたガラス基板に一定圧力で転写する（図 2-18(b)）。この転写と同時に、紫外線を照射する（図 2-18(c)）。最後に、モールドを基板から剥離する（図 2-18(d)）。



図 2-17 ナノインプリント装置

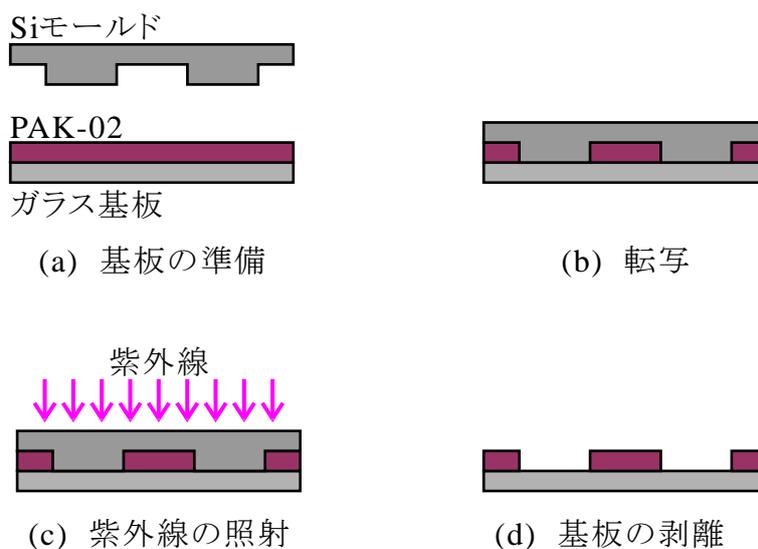


図 2-18 ラインアンドスペース構造の作製工程

本工程により作製した構造の, SEM 像と AFM 像をそれぞれ図 2-19 および図 2-20 に示す. 所望のラインアンドスペース構造が作製されており, モールドから基板を剥離する際の変形や破壊は見られなかった. また, 構造の幅および間隔は $50\mu\text{m}$, 高さは $2\mu\text{m}$ と, モールドの寸法と同じ値となった. 構造の凸部および凹部の表面はなだらかであり, 平面であると言える.

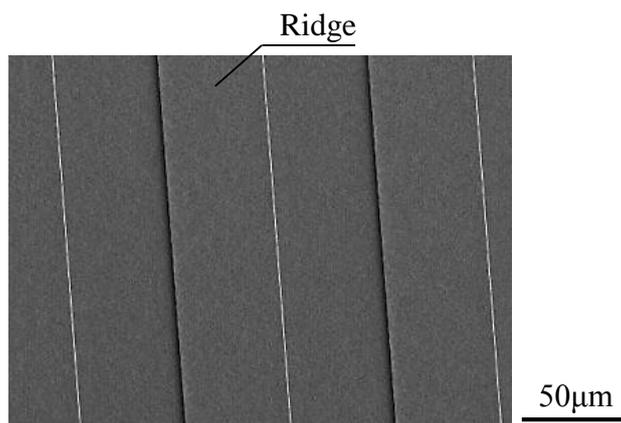


図 2-19 ラインアンドスペース構造の SEM 像

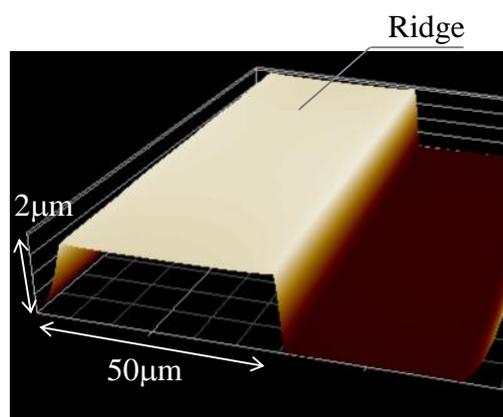


図 2-20 ラインアンドスペース構造の AFM 像

2.6 微細構造へのポリスチレン薄膜形成

2.6.1 薄膜形成の目的

ガラス基板に SiO_2 微粒子列を整列させた場合、平面部分と微細構造化した部分の材質は、純度の違いによって厳密には異なる（平面がソーダ石灰であり、微粒子は石英である）。本研究では微細構造が細胞の接着に及ぼす影響を調査することを目的としているが、第1章でも紹介した通り、足場の材質を変更することで細胞の接着性が変化することが報告されている。そのため、細胞培養用の足場の材質は、平面部分と微細構造化した部分で一定にする必要がある。ポリスチレンは一般的な細胞培養用ディッシュの素材であり、細胞毒性が無く細胞の接着性も良い。そこで、細胞培養表面の材質を一定とするため、基板にポリスチレンを被膜したのも用意する。

2.6.2 ポリスチレン薄膜の形成

固形ポリスチレン（スチレンポリマー、重合度 2000, Wako）にトルエンを加え、スターラーで一晩攪拌することで溶解し、ポリスチレン溶液を作製する。これをガラス基板にスピンコートし、溶媒のトルエンを揮発させる。この基板をターゲット材とし、ECR によるスパッタを5分間行うことで、ガラス基板にポリスチレンを被膜させる。まず、以上の方法でポリスチレン薄膜が形成できているか調査するため、ガラス基板の右半分にはマスクを施した状態で成膜を行った。この方法でガラス基板に成膜したポリスチレンの光学顕微鏡像を図 2-21 に示す。基板の左右で色合いが異なることが観察できる。従って、ポリスチレンが形成されていると考えることができる。

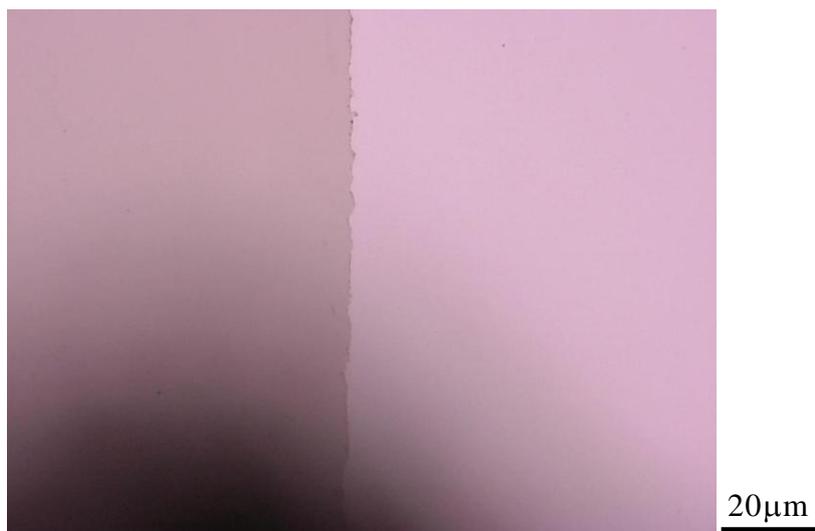


図 2-21 ポリスチレン被膜を施したガラス基板の光学顕微鏡像

PS 薄膜は、微細構造を埋めないようなるべく薄く成膜することが望ましい。そこで、ECR の成膜時間を制御し、成膜された PS の膜厚を計測することで、時間に対する薄膜の成膜レートを調査した。なお、成膜時間は 1 分、3 分、5 分とした。図 2-22 は、製膜された PS 薄膜の断面プロファイルである。被膜部とガラス平面の境界部に、マスクを剥がす際にできたと思われる高いピークが見られるものの、被膜部の厚さはおよそ一定であり、それぞれ 5, 15, 20nm となった。この結果をまとめたものを図 2-23 に示す。成膜時間の増加に伴い、ポリスチレンの膜厚は上昇しており、その上昇傾向はおよそ線形となった。

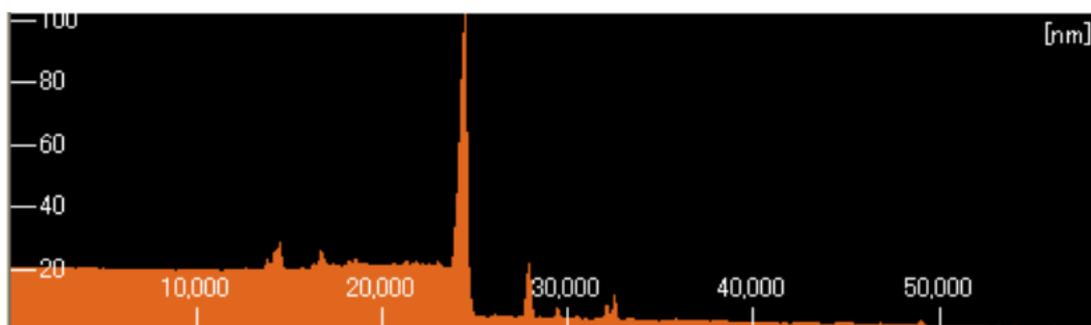


図 2-22 ポリスチレン被膜を施したガラス基板の断面プロファイル。

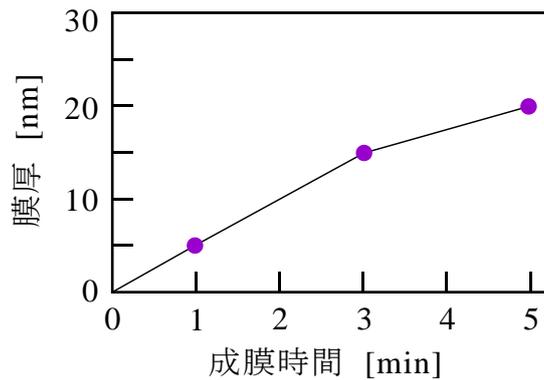


図 2-23 ポリスチレン薄膜の成膜時間と膜厚の関係

前述のとおり、微細構造に成膜する薄膜はなるべく薄いことが望ましい。一方で、薄膜は短い成膜時間では不完全な膜となる場合がある。そこで、各成膜時間における薄膜の濡れ性を評価した。図 2-24 は、PS 薄膜を成膜した基板に超純水 1 μ l を滴下し、その際の水接触角を観察した結果である。(a)が成膜時間 1 分、(b)が 3 分、(c)が 5 分の PS 薄膜の水接触角を示している。いずれの基板においても、その水接触角は約 20°であった。つまり、成膜時間によって濡れ性が変化することは無かった。以上より、本研究では、作製した微細構造への影響が少なくなるよう、成膜時間を 1 分、膜厚を 5nm とし、微細構造への成膜を行う。

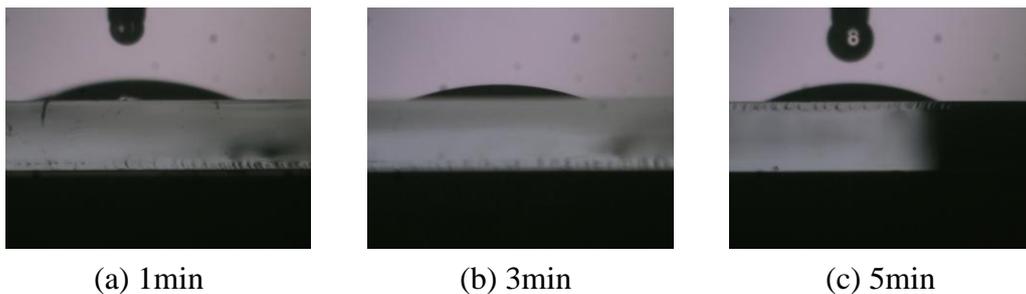


図 2-24 成膜時間と PS 薄膜の濡れ性の関係

前述のとおり、基板への PS の被膜は、微細構造部分と平面部分の材質を一定にするために行っている。一方、細胞やタンパク質はそれ自身が帯電しているので、基板の表面電位が細胞やタンパク質の接着・吸着に影響を及ぼすという報告がされている²⁻⁵⁷⁾⁻²⁻⁶⁰⁾。本研究では足場表面の幾何形状が細胞に及ぼす影響に着目しているため、足場の材料のみならずそ

の表面電位も統一されていることが望ましい。そこで、PS被膜した基板のゼータ電位を調査した。測定した基板はガラス基板（PS被膜有り/無し）、ガラス基板全面に単層に整列したSiO₂微粒子（PS被膜有り）であり、測定はゼータ電位計（ELS-Z1, 大塚電子株式会社）を用いて行った。

図2-25は各基板のゼータ電位をまとめたものである。まず、ガラス基板に着目すると、そのゼータ電位はPS被膜の有無によって-34mVから-13mVへと変化している。これは、ガラス基板に他の物質が被膜されていることを示している。次いで、PS被膜されたガラス基板と微粒子列に着目すると、両者のゼータ電位は同程度である。このことから、どちらの基板にも同じ物質が被膜されていることがわかる。ゼータ電位の数値の有意差は、 $p < 0.05$ をもって有意とするt検定を行うことで検証した。検定の結果、PS被膜の有無によって、ゼータ電位が有意に変化していることが分かった。一方で、同じPS被膜を施してあるガラス基板と微粒子列とでは、ゼータ電位の値に有意差は無かった。以上より、ラインアンドスペース状の微粒子列を持つガラス基板にPS被膜をすることで、微細構造化された部分と平面部分の材質および電位を統一することができることがわかった。

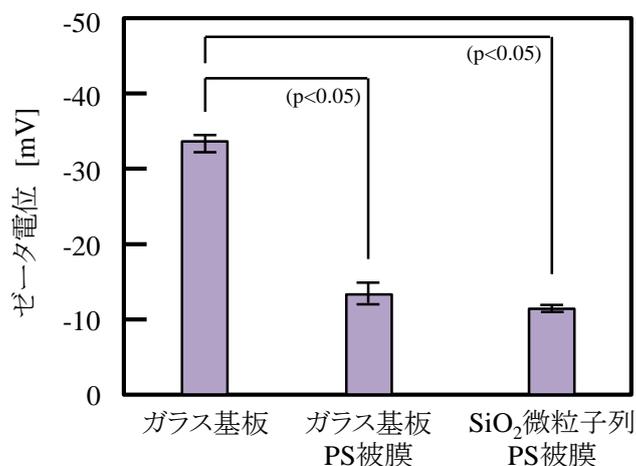


図2-25 各基板表面のゼータ電位

2.7 結言

本章では、細胞培養用の基板（足場）として、簡易に所望の形状を作製できる微粒子に着目し、自己整列による微粒子の微細構造化技術について示し、実際に構造を作製した。アイランド状の微粒子列は、微粒子の懸濁液を基板に滴下し、その溶媒が蒸発することで構造化した。次いで、自己組織化単分子膜のマイクロコンタクトプリントを利用し、あらかじめ親水/疎水領域を設けた基板を微粒子懸濁液から一定速度・一定角度で引き上げることで、親水領域のみに微粒子列を整列させた。この際、疎水性の自己組織化単分子膜をライン状に成膜し、 $\phi 500\text{nm} \sim 2\mu\text{m}$ の SiO_2 微粒子からなる、幅 $40\mu\text{m}$ のラインアンドスペース構造の作製に成功した。この微粒子列は粒径に依存した高さや表面微細構造を持ち、例えば、 $\phi 1\mu\text{m}$ の微粒子からなる微粒子列では、凹凸の深さが粒径の半分に相当する 500nm となった。また、基板の材質を一定とするため、基板に PS 薄膜を形成した。以上をもって、本章の目的である、自己整列による微粒子の微細構造化が達成できた。

第 2 章 参考文献

- 2-1) 荏原充宏, 宇都甲一郎, 青柳隆夫, 基材の構造力学的性質による細胞機能の制御, 生体の科学, 64 巻 3 号 (2013) 194-198.
- 2-2) A. Kunze, A. Bertsch, M. Giugliano, and P. Renaud, “Microfluidic hydrogel layers with multiple gradients to stimulate and perfuse three-dimensional neuronal cell cultures”, *Procedia Chemistry*, 1 (2009) 369-372.
- 2-3) Z. R. Xu, C. G. Yang, C. H. Liu, Z. Zhou, J. Fang, and J. H. Wang, “An osmotic micro-pump integrated on a microfluidic chip for perfusion cell culture”, *Talanta*, 80 (2010) 1088-1093.
- 2-4) L. C. Hsiung, C. L. Chiang, C. H. Wang, Y. H. Huang, C. T. Kuo, J. Y. Cheng, C. H. Lin, V. Wu, H. Y. Chou, D. S. Jong, H. Lee, and A. M. Wo, “Dielectrophoresis-based cellular microarray chip for anticancer drug screening in perfusion microenvironments”, *Lab on a chip*, 11 (2011) 2333-2342.
- 2-5) C. A. Scotchford, M. Ball, M. Winkelmann, J. Voros, C. Csucs, D. M. Brunette, G. Danuser, and M. Textor, “Chemically patterned, metal-oxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-interactions. II: Protein adsorption and early cell interactions” *Biomaterials*, 24 (2003) 1147-1158.
- 2-6) H. Du, P. Chandaroy, and S. W. Hui, “Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1326 (1997) 236-248.
- 2-7) R. N. Wenzel, Resistance of Solid Surfaces to Wetting by Water, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 28 (1936) 988-994.
- 2-8) A. B. D. Cassie, “Wettability of Porous Surfaces”, *Transactions of the Faraday Society*, 40 (1944) 546-551.
- 2-9) M. C. Peters and D. J. Mooney, “Synthetic Extracellular Matrices for Cell Transplantation”. *Material Science Forum*, 250 (1997) 43-52.
- 2-10) C. N. Degeratu, C. Zaharia, M. R. Tudora, C. Tuceanu, G. Hubca, A. Salageanu, and C. Cincu, “Influence of Porosity Upon Cells Adhesion on Polyhydroxyalkanoates Films”, *Chemical Bulletin of “POLITEHNICA” University of Timisoara*, 55, 69 (2010) 189-192.
- 2-11) Q. Cai, J. Yang, J. Bei, and S. Wang, “A novel porous cells scaffold made of polylactide–dextran blend by combining phase-separation and particle-leaching techniques”, *Biomaterials*, 23 (2002) 4483-4492.
- 2-12) M. P. Boneva, K. D. Danov, N. C. Christov, and P. A. Kralchevsky, “Attraction between particles at a liquid interface due to the interplay of gravity- and electric-field-induced interfacial deformations”, *Langmuir*, 25, 16 (2009) 9129-9139.

- 2-13) N. Chatterjee and M. Flury “Effect of particle shape on capillary forces acting on particles at the air-water interface”, *Langmuir*, 29, 25 (2013) 7903-7911.
- 2-14) N. Denkov, O. Velev, P. Kralchevski, I. Ivanov, H. Yoshimura, and K. Nagayama, “Mechanism of formation of two-dimensional crystals from latex particles on substrates”, *Langmuir*, 8, 12 (1992) 3183-3190.
- 2-15) N. Denkov, O. Velev, and P. Kralchevsky, “Two-dimensional crystallization”, *Nature*, 361 (1993) 26.
- 2-16) K. D. Danov and P. A. Kralchevsky, “Interaction between like-charged particles at a liquid interface: electrostatic repulsion vs. electrocapillary attraction”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 345, 2 (2010) 505-514.
- 2-17) K. Nagayama, “Two-dimensional self-assembly of colloids in thin liquid films”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 109 (1996) 363-374.
- 2-18) P. Kralchevsky, V. Paunov, I. Ivanov, and K. Nagayama, “Capillary meniscus interaction between colloidal particles attached to a liquid—fluid interface”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 151, 1 (1992) 79-94.
- 2-19) P. A. Kralchevsky, V. N. Paunov, N. D. Denkov, and K. Nagayama, “Capillary image forces: I. Theory”, *Journal of colloid and Interface Science*, 167 (1994) 47-65.
- 2-20) P. A. Kralchevsky and K. Nagayama, “Capillary forces between colloidal particles”, *Langmuir*, 10 (1994) 23-36.
- 2-21) P. A. Kralchevsky and K. Nagayama, “Capillary interactions between particles bound to interfaces, liquid films and biomembranes”, *Advances in Colloid and Interface Science*, 85, 2-3 (2000) 145-192.
- 2-22) O. H. Pakarinen, A. S. Foster, M. Paajanen, T. Kalinainen, J. Katainen, I. Makkonen, J. Lahtinen, and R. M. Nieminen, “Towards an accurate description of the capillary force in nanoparticle-surface interactions”, *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering*, 13, 7 (2005) 1175-1186.
- 2-23) V. N. Paunov, P. A. Kralchevsky, N. D. Denkov, I. B. Ivanov, and K. Nagayama, “Capillary meniscus interaction between a microparticle and a wall” *Collids and Sufaces*, 67 (1992) 119-138.
- 2-24) T. Okubo, S. Chujo, S. Maenosono, and Y. Yamaguchi, “Microstructure of silica particle monolayer films formed by capillary immersion force”, *Journal of Nanoparticle Research*, 5 (2003) 111-117.
- 2-25) O. D. Velev, N. Denkov, V. N. Paunov, P. A. Kralchevsky, and K. Nagayama, “Capillary image forces: II. Experiment”, *Journal of colloid and Interface Science*, 167 (1994) 66-73.

- 2-26) M. D. Doganci, S. Cavusoglu, M. Oksuz, and H. Y. Erbil, "Effect of surface free energy to control the deposit morphology during evaporation of graphiteSDS dispersion drops", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 461 (2014) 310-322.
- 2-27) H. Y. Erbil, "Control of stain geometry by drop evaporation of surfactant containing dispersions", *Advances in Colloid and Interface Science* 222 (2015) 275-290.
- 2-28) R. W. Applegate Jr., and J. Squier, "Optical trapping, manipulation, and sorting of cells and colloids in microfluidic systems with diode laser bars", *Optics Express*, 12, 19 (2004) 4390-4398.
- 2-29) D. Wouters, and U. S. Schubert, "Nanolithography and nanochemistry: probe-related patterning techniques and chemical modification for nanometer-sized devices", *Angewandte Chemie International Edition*, 43, 19 (2004) 2480-2495.
- 2-30) C. Baur, A. Bugacov, and B. Koel, "Nanoparticle manipulation by mechanical pushing: underlying phenomena and real-time monitoring", *Nanotechnology*, 9 (1998) 360-364.
- 2-31) R. Garcia and R. Perez, "Dynamic atomic force microscopy methods", *Surface Science Report*, 47 (2002) 197-301.
- 2-32) T. Junno and K. Deppert, "Controlled manipulation of nanoparticles with an atomic force microscope", *Applied Physical Letters*, 66, 26 (1995) 3627-3629.
- 2-33) 樋口 俊郎, マイクロマシン技術総覧, 産業技術サービスセンター, (2003)
- 2-34) Y. Masuda, T. Itoh, and K. Koumoto, "Self-Assembly of Silica Colloidal Crystals", *Langmuir*, 21 (2005) 4478-4481.
- 2-35) Y. Masuda, T. Itoh, and K. Koumoto, "Self-assembly and micropatterning of spherical particle assemblies", *Advanced Materials*, 17 (2005) 841-845.
- 2-36) X. Yan, J. M. Yao, G. A. Lu, X. Chen, K. Zhang, and B. J. Yang, "Microcontact printing of colloidal crystals", *Journal of American Chemical Society*, 126 (2004) 10510-10511.
- 2-37) F. L. Yap and Y. Zhang, "Protein and cell micropatterning and its integration with microparticles assembly", *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 775-788.
- 2-38) A. Kumar, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, "Patterning self-assembled monolayers: applications in materials science", *Langmuir* 10 (1994) 1498-1511.
- 2-39) Y. Kanamori, A. Kaneko, N. Moronuki, and T. Kubo, "Self-assembly of fine particles on patterned wettability in dip coating and its scale extension with contact printing", *Journal of Advanced Mechanical Design System*, 2 (2008) 783-791.
- 2-40) P. A. Kralchevsky and K. Nagayama, "Capillary forces between colloidal particles", *Langmuir* 10 (1994) 23-36.
- 2-41) M. Nishio, N. Moronuki, and A. Kaneko, "Modeling the start conditions of fine particles self-assembly in groove on hydrophilic/hydrophobic patterned substrate", *Journal of Japan Society of Precision Engineering*, 80 (2014) 172-176.

- 2-42) M. Nishio and N. Moronuki, “Self-assembly of particle on three dimensional curved structure”, *Transactions of the JSME*, 80, 810 (2014) MN0031.
- 2-43) C. D. Dushkin, P. A. Kralchevsky, V. N. Paunov, H. Yoshimura, and K. Nagayama, “Torsion Balance for Measurement of Capillary Immersion Forces”, *Langmuir*, 12, 3 (1996) 641-651.
- 2-44) R. Krechetnikov and G. M. Homsy, “Dip-coating in the presence of a substrate-liquid interaction potential”, *Physics of fluids*, 17 (2005) 10105.
- 2-45) T. Sjoström, M. J. Dalby, A. Hart, R. Tare, R. O. Oreffo, and B. Su, “Fabrication of pillar-like titania nanostructures on titanium and their interactions with human skeletal stem cells”, *Acta Biomaterialia*, 5 (2009), 1433-1441.
- 2-46) J. Y. Lim, J. C. Hansen, C. A. Siedlecki, J. Runt, and H. J. Donahue, “Human foetal osteoblastic cell response to polymer-demixed nanotopographic interfaces”, *Journal of The Royal Society Interface*, 2 (2005), 97-108.
- 2-47) M. J. Dalby, S. J. Yarwood, M. O. Riehle, H. J. Johnstone, S. Affrossman, and A. S. Curtis, “Increasing fibroblast response to materials using nanotopography: morphological and genetic measurements of cell response to 13-nm-high polymer demixed islands”, *Experimental Cell Research*, 276 (2002), 1-9.
- 2-48) J. Y. Lim, J. C. Hansen, C. A. Siedlecki, R. W. Hengstebeck, J. Cheng, N. Winograd N, and H. J. Donahue, “Osteoblast adhesion on poly(L-lactic acid)/polystyrene demixed thin film blends: effect of nanotopography, surface chemistry, and wettability”, *Biomacromolecules*, 6 (2005), 3319-3327.
- 2-49) M. J. Dalby, S. Childs, M. O. Riehle, H. J. Johnstone, S. Affrossman, and A. S. Curtis, “Fibroblast reaction to island topography: changes in cytoskeleton and morphology with time”, *Biomaterials*, 24 (2003), 927-35.
- 2-50) C. C. Berry, M. J. Dalby, R. O. Oreffo, D. McCloy, and S. Affrosman, “The interaction of human bone marrow cells with nanotopographical features in three dimensional constructs”, *Journal of Biomedical Materials Research part A*, 79 (2006), 431-439.
- 2-51) K. R. Milner and C. A. Siedlecki, “Submicron poly(L-lactic acid) pillars affect fibroblast adhesion and proliferation”, *Journal of Biomedical Materials Research part A*, 82 (2007) 80-91.
- 2-52) J. Park, S. Bauer, K. A. Schlegel, F. W. Neukam, K. Mark, and P. Schmuki, “TiO₂ nanotube surfaces: 15 nm—an optimal length scale of surface topography for cell adhesion and differentiation” *Small*, 5 (2009) 666-671.
- 2-53) A. Hart, N. Gadegaard, C. D. Wilkinson, R. O. Oreffo, and M. J. Dalby, “Osteoprogenitor response to low-adhesion nanotopographies originally fabricated by electron beam lithography” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18 (2007) 1211-1218.

- 2-54) M. J. Dalby, M. J. Biggs, N. Gadegaard, G. Kalna, C. D. Wilkinson, and A. S. Curtis, “Nanotopographical stimulation of mechanotransduction and changes in interphase centromere positioning”, *Journal of Cell Biochemistry*, 100 (2006) 326-338.
- 2-55) A. S. G. Curtis, N. Gadegaard, M. J. Dalby, M. O. Riehle, C. D. W. Wilkinson, and G. Aitchison, “Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings”, *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 3 (2004) 61-65.
- 2-56) N. W. Karuri, T. J. Porri, R. M. Albrecht, C. J. Murphy, P. F. Nealey, “Nano- and microscale holes modulate cell-substrate adhesion, cytoskeletal organization, and -beta1 integrin localization in SV40 human corneal epithelial cells”, *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 5 (2006) 273-280.
- 2-57) 岩田博夫, バイオマテリアル, 高分子学会 (2005)
- 2-58) M. Lestelius, B. Liedberg, and P. Tengvall, “In vitro plasma protein adsorption on ω -functionalized alkanthiolate self-assembled monolayers”, *Langmuir*, 13, 22 (1997), 5900-5908.
- 2-59) E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, and G. M. Whitesides, “A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein”, *Langmuir*, 17, 18 (2001), 5605-5620.
- 2-60) K. Fujimoto, H. Inoue, and Y. Ikeda, “Protein adsorption and platelet adhesion onto polyurethane grafted with methoxy-poly (ethylene glycol) methacrylate by plasma technique”, *Journal of Biomedical Materials Research*, 27, 12 (1993) 1559-1567.

第3章

微粒子列の細胞接着足場 への応用と 細胞の自律パターンニング

3.1 緒言

本章では、微粒子列への細胞の接着およびその成長特性を明らかにすることを目的としている。微粒子列を細胞接着の足場として適用し、細胞の接着位置、増殖の方向、そして神経突起の伸長方向の制御を試みている。平面と微粒子列とが交互に存在する基板上で細胞を培養したところ、細胞は平面よりも微粒子列に選択的に接着することがわかった。一方で、微粒子列と同等の高さを持つラインアンドスペース構造では、細胞の接着位置に選択性は見られなかった。したがって、微粒子列の持つ微細なアスペリティが細胞の接着に良い影響を与えていると考えられる。微粒子列への選択的な接着は、PC12, HeLa, C2C12という異なる特徴を持つ3種類の細胞すべてで確認された。この際、インプロセス観察により、一旦平面部分に接着した細胞が、遊走と伸長により微粒子列に到達していることがわかった。そのため、微粒子列の間隔が広がるに従い、微粒子列上に接着する細胞の数が減少した。増殖の方向や神経突起の伸長方向も、微粒子列の長手方向に沿って行われることがわかった。特にHeLa細胞では、播種後1週間経っても、微粒子列からはみ出すことなく増殖を続けることがわかった。

3.2 培養細胞の選定

本論文では、細胞のパターンニングを主たる目的とし、それが可能な微細構造の要件およびその理由を明らかにする。したがって、対象とする細胞はパターンニングすることに意義のあるものが望ましい。

神経細胞は、刺激に対して電気信号のやり取りによってこれを伝達する。しかし、その伝達経路など解明されていないことが多い。研究者の要求に合わせたネットワーク系を構成することは、神経細胞の機能を理解する手助けとなる。一方で、神経細胞は増殖能を持たず、その培養は初代培養と呼ばれる方法で行われる。初代培養では、対象の生物から摘出した神経細胞を、そのまま *in vitro* で培養する。そのため、生物の個体差に左右されやすいという問題が存在する。ここで、ある種の細胞は神経成長因子 (NGF, Nerve Growth Factor) の添加により、神経突起様の構造を伸ばす。こういった、他の種類の細胞へと変化する現象を「分化」と呼び、神経細胞に分化する能力を持った細胞を用いることで、初代培養をすることなく神経細胞に関する研究が可能である。ラット副腎髄質由来褐色細胞腫 (PC12) は、NGF の添加によって神経細胞様に分化する細胞の一種であり、神経細胞のモデル細胞としてよく用いられている³⁻¹⁾⁻³⁻²⁾。上記の理由から、本論文では、培養する細胞の一つとして PC12 を対象とする。図 3-1 は NGF 添加前後の PC12 細胞の位相差顕微鏡像を示している。NGF の添加により、細胞端部から神経突起様の構造が伸びている様子が観察できる。

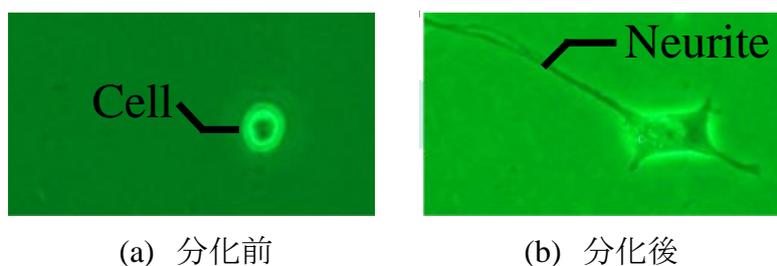
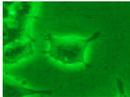
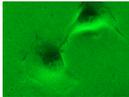


図 3-1 PC12 細胞の位相差顕微鏡像. (a)分化前, 接着状態の細胞. (b)NGF 添加後 24 時間後の PC12 細胞の位相差顕微鏡像.

ここで、微細構造と細胞の接着に関して調査するにあたり、単一の細胞のみを対象とすると、研究結果がその細胞特有の現象である可能性を否定出来ない。そこで、PC12 と種類の異なる細胞を対象とし、同様の実験を行う。まず、細胞自体の大きさが違えば、微細構造との相対的な関係も変化すると考えられる。したがって、対象とする細胞には代表寸法の異なるものを用いることが望ましい。ここで、細胞の代表寸法を以下のように定義する。ポリスチレンディッシュ平面上で24時間培養した細胞の面積を計測し、平均を算出する。細胞を真円形と仮定した際、計測した面積を持つような円の直径を代表寸法と定義する。PC12の代表寸法は、非接着状態で10 μm 、接着状態で25 μm である。

また、PC12は、髄質由来の細胞であるため、髄質との比較として皮質系の細胞が望ましい。ヒト子宮頸がん由来細胞株(HeLa)は上皮様の細胞であり、取り扱いの容易さなどから広く研究されている細胞である³⁻³⁾⁻³⁻⁴⁾。その代表寸法はPC12と比べ大きく、非接着状態で18 μm 、接着状態で50 μm である。マウス横紋筋由来筋芽細胞株(C2C12)は代表的な線維芽細胞様の細胞であり、筋分化や脳疾患の研究に広く利用されている³⁻⁴⁾⁻³⁻⁵⁾。接着時の形態は細長い形状である。その代表寸法は、非接着状態で20 μm 、接着状態で45 μm である。以上3種を用いることで、おおまかにではあるが種類、大きさ、そして接着時の形状といった違いを持つ細胞においてどのような影響があるのか調査できる。それぞれの細胞の特徴を、表3-1にまとめる。なお、細胞の栄養を含む液体培地は培養する細胞の種類に応じて変更する必要がある。本研究で用いる液体培地の組成は、すべてDulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Thermo Fisher Scientific)に、ペニシリン(10ml/L)を添加したものの基本とし、PC12細胞ではウシ血清(10%)およびウマ血清(10%)を、HeLa細胞では仔ウシ血清(10%)を、そしてC2C12細胞ではウシ血清(10%)を添加している。

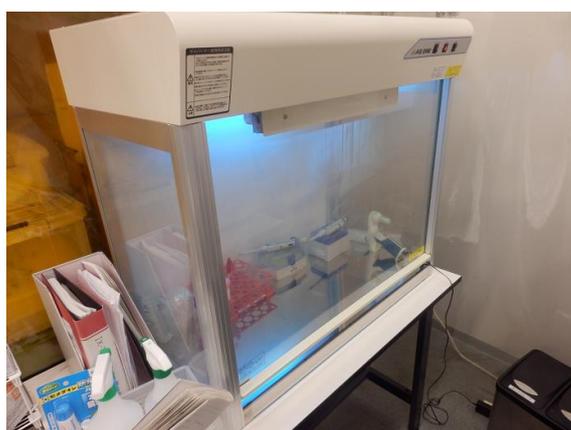
表3-1 本研究で使用する細胞の特徴

	PC12	HeLa	C2C12
代表寸法(非接着時) [μm]	10	18	20
代表寸法(接着時) [μm]	25	50	45
その他の特徴	髄質由来	皮質由来	筋芽細胞
外観			

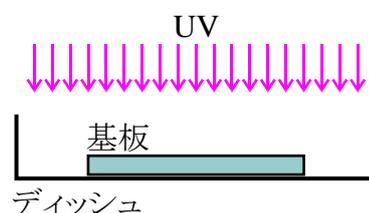
3.3 微粒子列上での細胞の培養方法

3.3.1 作製した基板の前処理

液体培地は培養する細胞の栄養素を含んでおり，温暖湿潤な培養環境も相まって，菌類等の意図していないものまでをも培養してしまう恐れがある（コンタミネーション）．したがって，細胞培養前にはUV やアルコール等による基板の滅菌を行うことが必要である．**図 3-2(a)**は本研究で使用するクリーンベンチ（CT-900N-UV ， AS ONE）を示している．クリーンベンチ内はHEPA フィルターを介した空気が送り込まれている．また，紫外線ランプが備わっており，UV による滅菌を行うことができる．作製した基板は，**図 3-2(b)**のように，液体培地への浸漬前に，一晩のUV 滅菌を行った．



(a) クリーンベンチ



(b) UV滅菌工程

図 3-2 クリーンベンチと UV 滅菌工程

本研究では，微粒子をラインアンドスペース状に整列させるため，疎水性の OTS-SAM を利用している．一方で，基板の濡れ性は細胞の接着位置に影響を及ぼすことがわかっているため³⁻⁶⁾⁻³⁻⁸⁾，微粒子列の幾何形状が及ぼす影響のみに着目したい場合にはこれを除去する工程が必要である．OTS-SAM は，増田らをはじめ，紫外線の照射による局所化がされており³⁻⁹⁾，本論文においては細胞播種前の UV 滅菌がこれと同等のはたらきをされると考えられる．これに関しては，後述の実験でその影響を調査している．なお，基板の材料を一様にするためポリスチレンを被膜した基板においては，OTS 自体が露出していることは無く，細胞の接着に影響は無いと考えられる．

3.3.2 細胞の培養工程

本研究における，ディッシュ，基板，微細構造，そして細胞の位置関係を図 3-3 に示す．細胞培養用ディッシュに，微細構造を設けた基板が静置されており，その上に細胞が存在する．本章では微細構造として，第2章で紹介した微粒子列を用いている．基板の大きさはおよそ $1\text{cm} \times 2\text{cm}$ であり，その端部 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ の領域内に微粒子が整列している．本研究における播種とは，あらかじめ培養していた細胞を回収し，規定の濃度 ($5000\text{cells}/\text{cm}^2$) で微細構造に滴下することを指す．培養とは，図 3-4 で示すインキュベータ (APC-50D, ASTEC) 内で，温度 37°C ，湿度 100% ，気相 $5\% \text{ CO}_2 + \text{Air}$ の環境下で静置することを指す．細胞の播種は，図 3-5 で示すように，ディッシュ内に基板を静置し，(滅菌をした後) マイクロピペットにより液体培地を添加 (2ml) し，同ピペットで細胞懸濁液を添加することで行う．

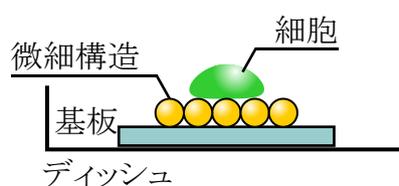


図 3-3 細胞培養系の位置関係



図 3-4 細胞培養用インキュベータ

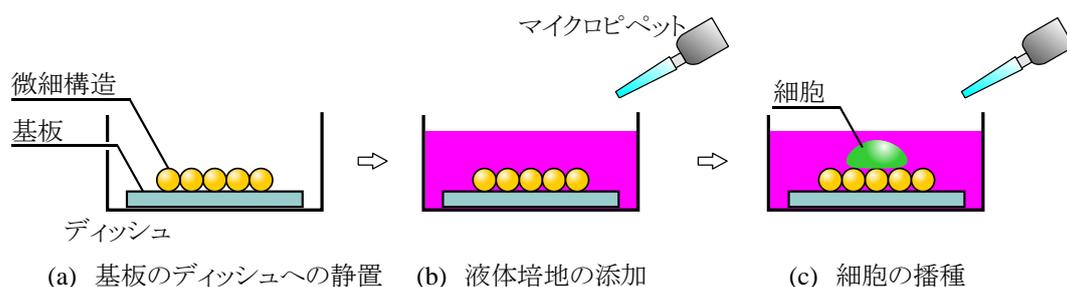


図 3-5 細胞の播種方法

3.3.3 培養細胞の観察方法および接着数の評価方法

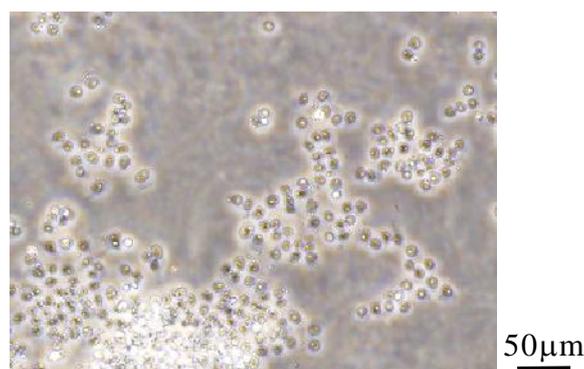
本研究では観察の簡易さから、接着した細胞は位相差顕微鏡で観察・評価する。しかし、目視による観察では、例えば死細胞と生細胞の区別が難しいといった課題も存在する。そこで、「接着している細胞」の基準を設定し、この基準のもとで評価を行うこととする。細胞の生死や接着しているかどうかは、染色を行うことで調査が可能である。そこで、ガラス基板の上に細胞を播種し、アクチンおよびビンキュリンを染色した。細胞の染色方法を以下に示す。

- ① ディッシュから培地を除去し、37°C 湯浴で温めたリン酸緩衝液（以下、PBS）で 3 回ほど洗浄する。
- ② ディッシュに固定液を加える（室温、10 分間）。
- ③ PBS で洗浄し、ディッシュに PBST 溶液を加える（室温、5 分間）。
- ④ PBS で洗浄し、Acti-stain 溶液を 200 μ l 滴下する。（暗所・湿潤化、30 分間）
- ⑤ PBS で 3 回洗浄し、抗ビンキュリン抗体溶液（hVIN-1）を滴下する。（1 時間、インキュベータ内）
- ⑥ PBS で 3 回洗浄する。

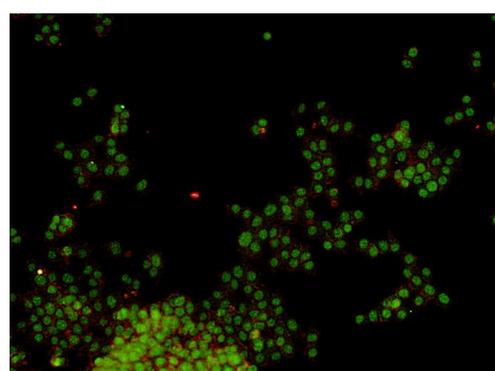
ここで、固定液とはパラホルムアルデヒド（pH 7.0）を PBS に加えて 3.7% に調整したものである。Acti-stain 溶液とはリン酸緩衝液（PBS）500 μ l に 14 μ M の Acti-stain 555 を 3.5 μ l 加え、100nM としたものである。PBST 溶液とは、PBS に Tween-20（0.05%）を加えたものである。抗ビンキュリン抗体溶液は、PBS で 50 倍に希釈することで調整した。

図 3-6 は以上の方法でアクチンおよびビンキュリンを染色した PC12 細胞である。図 3-6(a)(b)が、それぞれ同一箇所を位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察した結果である。なお、アクチンは赤色、ビンキュリンは緑色に染色されている。ビンキュリンの存在は細胞の焦点接着斑を示している。つまり、ビンキュリンを確認できる細胞は、基板に接着していると言える。図に示したように、位相差顕微鏡像で観察できる細胞の位置と、蛍光顕微

鏡像において観察できる細胞の位置は同一である。すなわち、接着している細胞の観察は位相差顕微鏡で行うことができる。この結果をもとに、本研究では以下のように接着細胞を観察する。細胞播種後、観察前に浮遊細胞を除去する。位相差像により、接着している細胞を観察・撮影・評価を行う。



(a) PC12の位相差顕微鏡像



(b) PC12の蛍光顕微鏡像

図 3-6 スライドガラス表面に接着した PC12 細胞. (a)位相差顕微鏡像, (b)蛍光顕微鏡像. 同一箇所を, 光源の波長を変えて観察している.

本研究では, 細胞の接着位置について, 全接着細胞のうちの微細構造に接着している細胞の割合を算出することで評価する. この評価指標を選択接着率 α とし, 以下で定義する.

$$\alpha = N_m \times 100 / (N_m + N_f) \quad (3-1)$$

ここで, N_m と N_f は, それぞれ微細構造上および平面上に接着した細胞の数である. 例えば, 図 3-7 で α を計測すると, $\alpha = 4 \times 100 / 5 = 80\%$ となる.

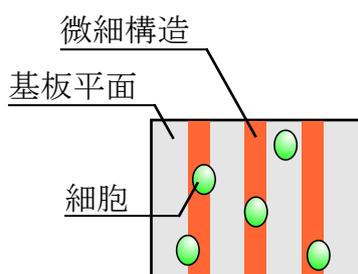


図 3-7 選択接着率 α の算出基準

3.4 微粒子列の細胞接着足場への適用

微粒子列を細胞接着の足場として適用するに当たり、そもそも微粒子列上で細胞培養を行うことができるかどうか、第2章で紹介した滴下法によって作製した微粒子列上で細胞を培養することで、調査した。φ1 μ mのポリスチレン (PS) 微粒子懸濁液を、ディッシュ上に滴下した後乾燥させ、微粒子列を作製した。これを足場として、PC12 細胞を播種した。図 3-8 は、播種後 24 時間時点での位相差顕微鏡像である。観察結果より、細胞はディッシュ平面および微粒子列上の両方に接着している。すなわち、微粒子列は細胞接着の足場としての適用が可能である。一方で、細胞のパターンニングを考えた場合、細胞が微粒子列以外の領域に接着していることは好ましくない。今回の実験で微粒子列を作製したポリスチレンディッシュは、比較的細胞の接着性が良いとされる材質であり、それゆえディッシュ上にも細胞が接着していると考えられる。このような、基板の接着性の改善によって微細構造の効果が低下するという結果は、Beduer らによっても報告されている³⁻¹⁰。そこで、微粒子列を整列させる基板として、細胞のパターンニングに適したものを选定する必要がある。

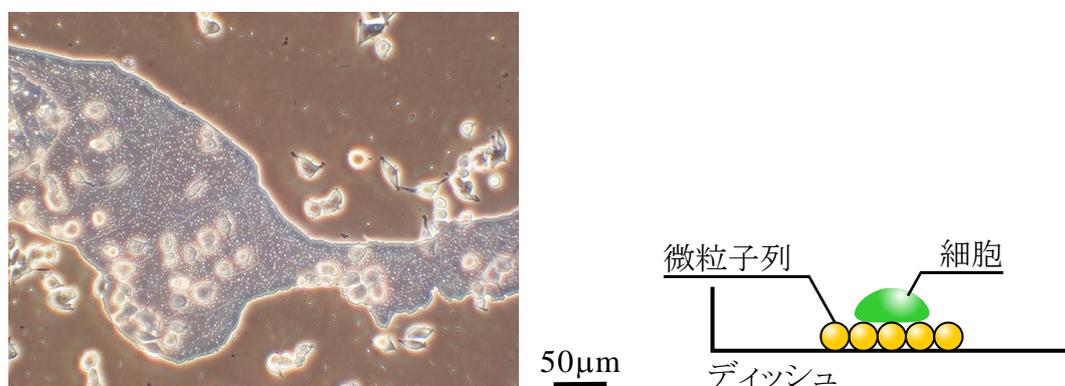


図 3-8 ディッシュ/微粒子列上で培養した PC12 細胞の位相差顕微鏡像

ガラスは、細胞培養用器具の材質として一般的であり、ポリスチレンよりも細胞接着性が良くないとされる材質である。図 3-9 のように、ポリスチレンディッシュ上にガラス基板を置き、これを足場として PC12 細胞を培養したところ、播種後 24 時間で多くの細胞がポリスチレンディッシュ上に接着した。一方で、ガラス基板には細胞がほとんど接着していなかった。したがって、微粒子以外の領域の材質をガラスとすることで、細胞を微粒子列上だけに接着させることが可能であると考えられる。

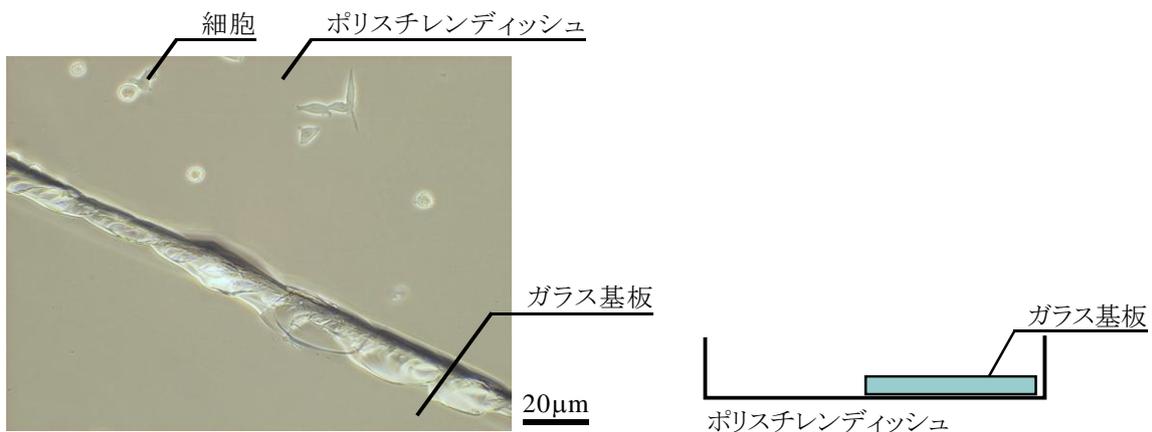


図 3-9 ポリスチレンディッシュ/ガラス基板上で培養した PC12 細胞の位相差顕微鏡像

以上の結果を踏まえ、 $\phi 1\mu\text{m}$ のポリスチレン (PS) 微粒子列を、ガラス基板上に作製し、これを足場として PC12 細胞を培養した。図 3-10 は、播種後 24 時間時点の位相差顕微鏡像である。微粒子列上に多くの細胞が接着している様子が観察できる。また、図 3-8 と比べて、多くの細胞が微粒子列上に接着している。両者における選択接着率 α を計算した結果を図 3-11 に示す。図 3-11 より、選択接着率 α は (a) が 51% であるのに対し、(b) は 90% であった。ここで、データの有意性を検証するため、 $p < 0.05$ をもって有意とする F 検定および t 検定を行ったところ、 $p < 0.05$ で有意であった。つまり、平面の材質がポリスチレンであるよりも、ガラスである方が、微粒子列上により多くの細胞が接着することがわかった。

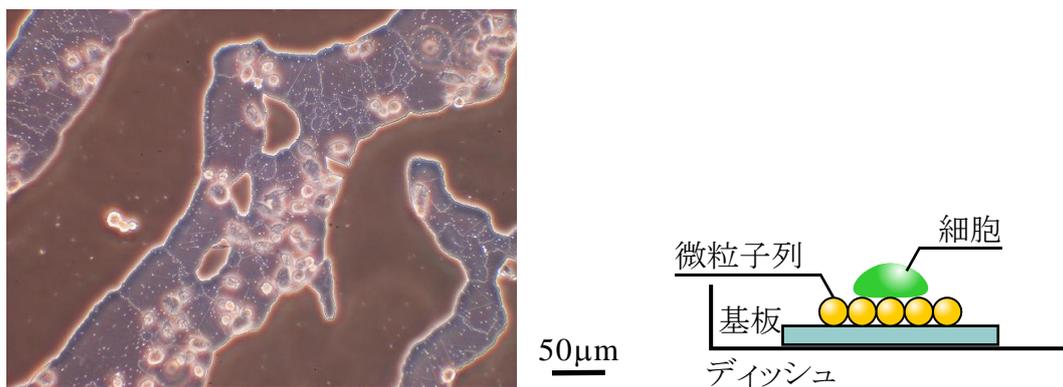


図 3-10 ガラス基板/微粒子列上で培養した PC12 細胞の位相差顕微鏡像

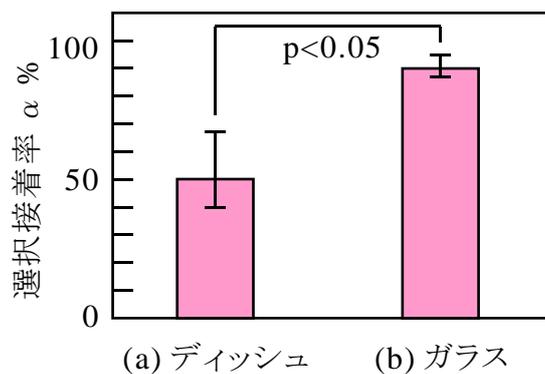


図 3-11 各微細構造上での選択接着率

3.5 OTS-SAM が細胞の接着に及ぼす影響と UV 処理の効果

3.3.1 節で説明した通り，微細構造化した微粒子列では，その平面部分に OTS-SAM が残存している．そこで，UV 滅菌による OTS の除去が行われているか，および細胞接着への影響を調査するため，以下の実験を行った．**図 3-12** のように，OTS をラインアンドスペース状に自己組織化させたガラス基板を用意し，UV 滅菌の有無によって細胞の接着位置に影響があるか観察した．UV 滅菌していない基板については，コンタミネーション防止の為，エタノールによる滅菌を行い(b)，もう一方は 12 時間の UV 滅菌を施した．滅菌後の両基板に PC12 細胞を播種し，24 時間経過後に観察した結果を**図 3-13** に示す．**図 3-13(a)** は UV 滅菌を施していない基板であり，**図 3-13(b)** は UV 滅菌を施した基板である．(a) では PC12 細胞が，その接着位置が特定のライン状に限定されている一方で，(b) では基板全体に接着している様子が観察できる．本実験結果より，基板に自己組織化した OTS は細胞の接着に影響を及ぼすが，UV 滅菌を施すことによってその影響を無視できるようになると考えられる．

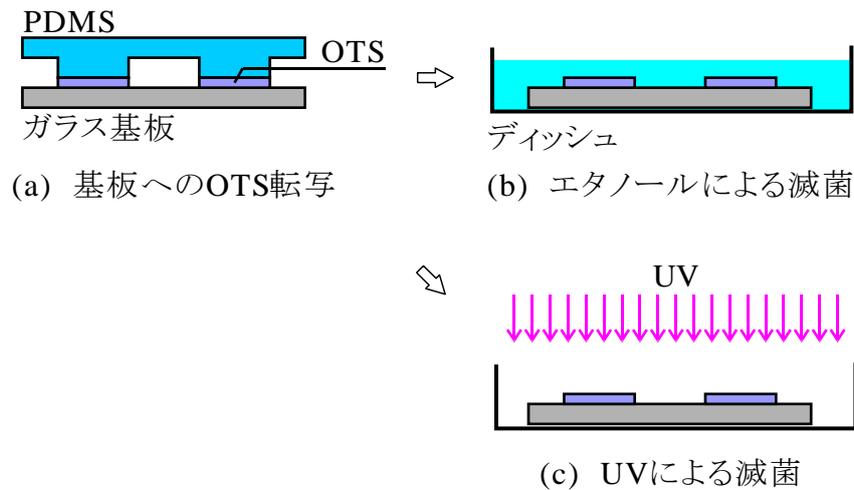
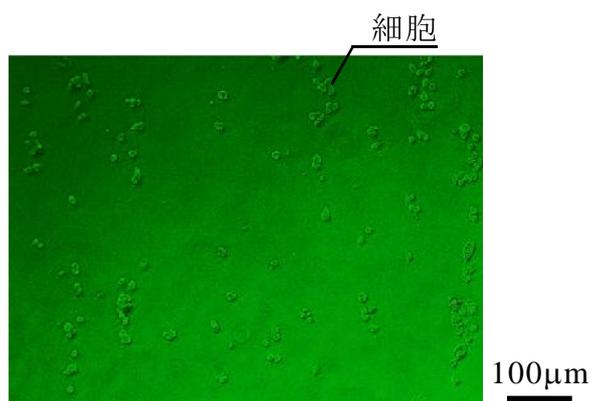
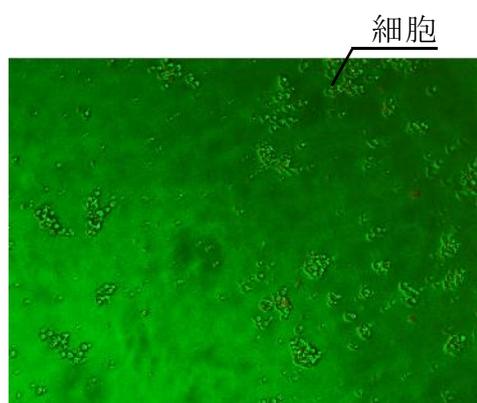


図 3-12 OTS-SAM 修飾基板の準備



(a) UV滅菌前



(b) UV滅菌後

図 3-13 OTS 転写ガラス基板上での細胞培養

3.6 微粒子列による細胞の接着位置制御

3.6.1 PC12 細胞の微細構造化 SiO₂ 微粒子列への接着

微粒子列によって細胞のパターンニングが可能であるかどうか体系的に調査するためには、微粒子列の形状は規則的である必要がある。移流集積法は一定の幅および間隔を持つライン状の構造を作製するのに長けているので、本研究ではラインアンドスペース形状の微粒子列を PC12 細胞の培養用の足場として適用した。また、パターンニングに適した微細構造の寸法等も不明であるため、微粒子の粒径を $\phi 0.5\mu\text{m} \sim 2\mu\text{m}$ の範囲で変えた微粒子列を作製し、細胞の接着位置を観察した。接着している細胞の形状を半球と仮定すれば、その断面形状はおおよそ図 3-14 のようになる。この時、細胞の大きさが一定であるならば、微粒子の粒径が変化することで、微粒子列に接着している細胞の底面に存在する微粒子の数が変わる。例えば、 $\phi 0.5\mu\text{m}$ の微粒子列では $\phi 1\mu\text{m}$ の微粒子列に比べ、2 倍の数の微粒子が存在する。この微粒子の数は、細胞 1 個あたりの相対的な凹凸の数と見なせる。本研究では簡単のため細胞 1 辺のみを考え、これを、

$$(\text{細胞 1 個あたりの相対的な凹凸の数}) = \frac{(\text{細胞の代表寸法})}{(\text{微粒子の粒径})} \quad (3-2)$$

と定義する。細胞の代表寸法を $25\mu\text{m}$ とすれば、 $\phi 0.5\mu\text{m} \sim 2\mu\text{m}$ の微粒子列それぞれにおける細胞 1 個あたりの相対的な凹凸の数は表 3-2 のようになる。

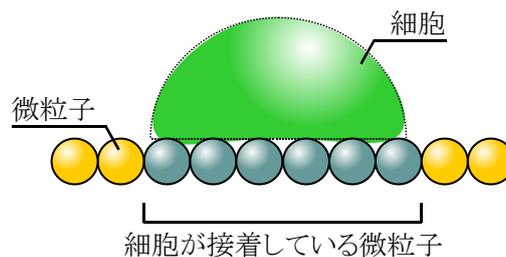


図 3-14 微粒子列に接着している細胞の模式図

表 3-2 微粒子列の粒径と細胞 1 個あたりの相対的な凹凸の数との関係

微粒子の粒径 μm	細胞1個あたりの相対的な凹凸の数 個
0.5	50
1	25
2	12.5

まず、第2章で説明したように、**図 3-15** のような $\phi 1\mu\text{m}$ の SiO_2 微粒子列を作製した。構造は単層で整列しており、その表面は微粒子の球形由来である凹凸が存在している。微粒子整列の際に使用した OTS-SAM は、前節のとおり、12 時間の UV 滅菌処理により細胞の接着に影響が出ない程度まで除去できている。これを足場として PC12 細胞を播種した。

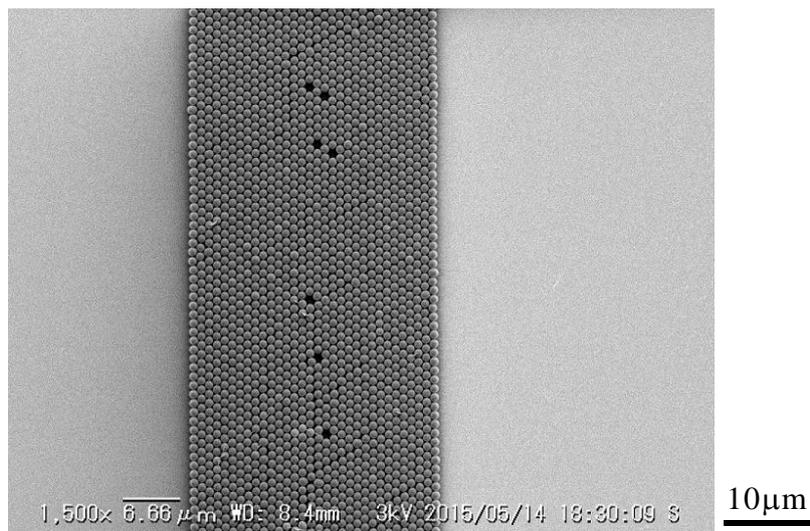


図 3-15 微細構造化した微粒子列

図 3-16 は播種後 24 時間時点での位相差顕微鏡像である。多くの細胞が微粒子列上に接着している一方で、平面であるガラス基板には細胞があまり接着していない。接着位置に関しては、微粒子列の端部に接着している細胞が多い。接着している細胞の形態については、一般に接着性が良いとされる伸展状態ではなく、球形のものが多かった。楕円形（紡錘形）の細胞も多く観察され、そのような細胞では、楕円の長辺が微細構造化した微粒子列の長手方向に伸びている。つまり、細胞の伸展方向に異方性が生じていることがわかる。

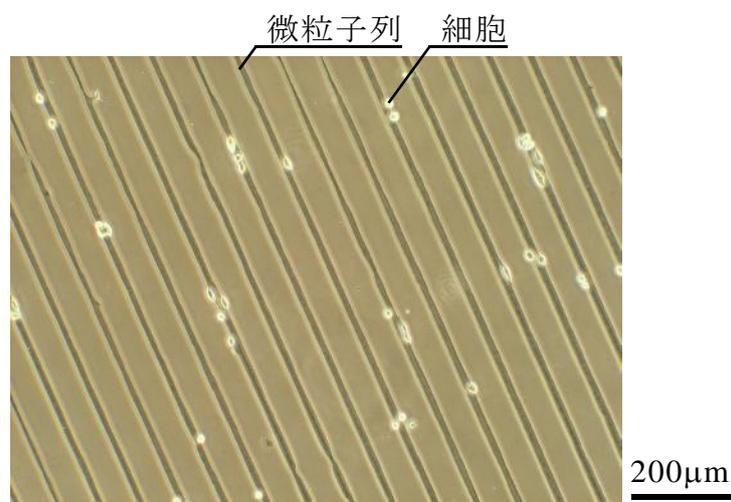


図 3-16 微粒子列状での細胞培養

次いで、粒径の異なる微粒子列を作製し、これを足場として同じく PC12 細胞を培養した。図 3-17 は、播種後 24 時間での位相差顕微鏡像である。いずれの粒径においても、多くの細胞が微粒子列上に接着している様子が確認できる。図 3-18 は、観察像から計測した選択接着率 α をまとめたものである。選択接着率は、粒径によらずほぼ 80% 以上を示している。これらの結果に対し、 $p < 0.05$ をもって有意とする F 検定および t 検定を行ったところ、3 つの値の間に有意差は見られなかった。したがって、本研究の調査範囲内である $\phi 0.5 \mu\text{m} \sim 2 \mu\text{m}$ においては、ほぼすべての PC12 細胞が微粒子列上に接着することがわかった。

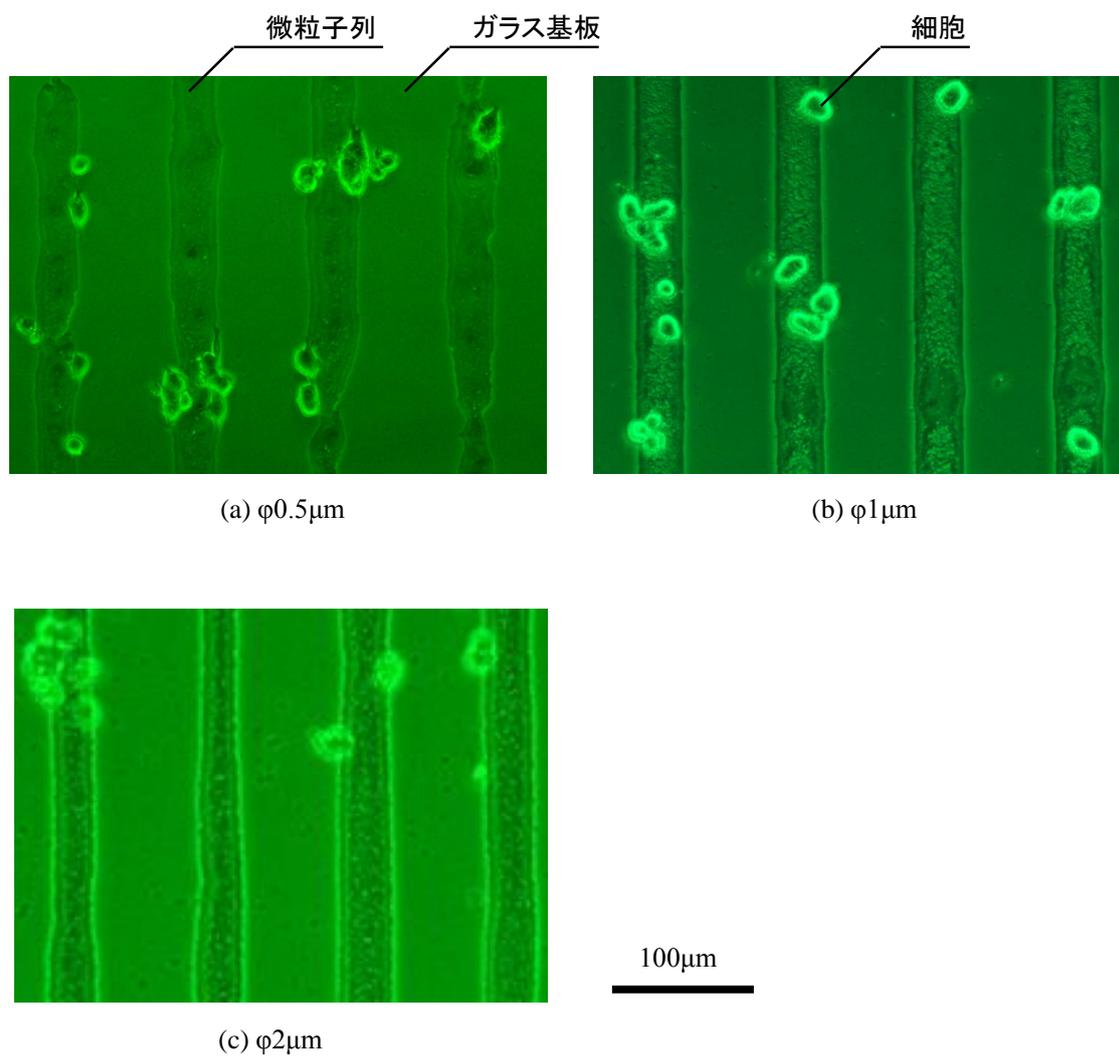


図 3-17 粒径の異なる微粒子列での細胞培養

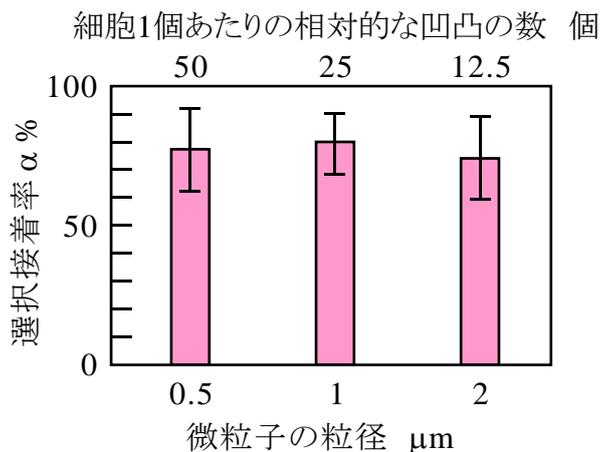


図 3-18 微粒子列の粒径が細胞の接着位置に及ぼす影響

以上より、微細構造化した微粒子列を足場として用いることで、細胞のパターンニングに成功した。しかし、これは単純に段差が存在することで移動が制限され、結果として位置制御されているだけとも考えられる。これは、同等のラインアンドスペース構造で細胞を培養し、比較することで明らかにすることができる。そこで、高さ $2\mu\text{m}$ のラインアンドスペース構造を作製し、これを細胞接着の足場として適用した。図 3-19 は、作製したラインアンドスペース構造に細胞を播種した 24 時間後の位相差顕微鏡像である。細胞は構造の凸部や凹部の両方に接着しており、微粒子列の場合に見られた選択性は確認できない。すなわち、単純な凹凸にはない微粒子列特有の要因が、接着の選択性に影響をおよぼしていることがわかった。

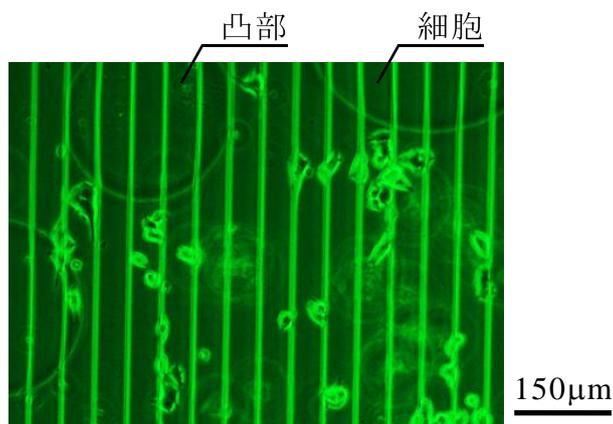


図 3-19 ラインアンドスペース構造上での細胞培養

3.6.2 C2C12 細胞および HeLa 細胞の微粒子列への選択接着

本結果が PC12 細胞でのみ発生する現象であるかどうか調査するため、PC12 と種類の異なる細胞を対象とし、3.6.1 節と同工程の実験を行った。図 3-20 は、PC12 細胞での実験と同様の微粒子列上で培養した C2C12 細胞と HeLa 細胞の、播種後 24 時間での位相差顕微鏡像である。PC12 細胞の結果と同様、C2C12, HeLa 共に、多くの細胞が微粒子列上に接着しており、平面（ガラス基板）にはあまり接着していなかった。伸展の方向に関しても、先述の PC12 の結果と同様、微粒子列の長手方向に沿っている様子が確認できた。この異方性は、特に C2C12 細胞で顕著であった。ライン状の微粒子列の場合、微粒子が存在する長手方向に細胞が進展したということは、以下のように考えられる。細胞は平面部分よりも微細構造に選択的に接着する。細胞は接着後、伸展しようとするが、この際に接着時と同様、平面部分を避ける。結果として、細胞の伸展方向は微粒子列の長手方向に沿い、異方性が生じる。

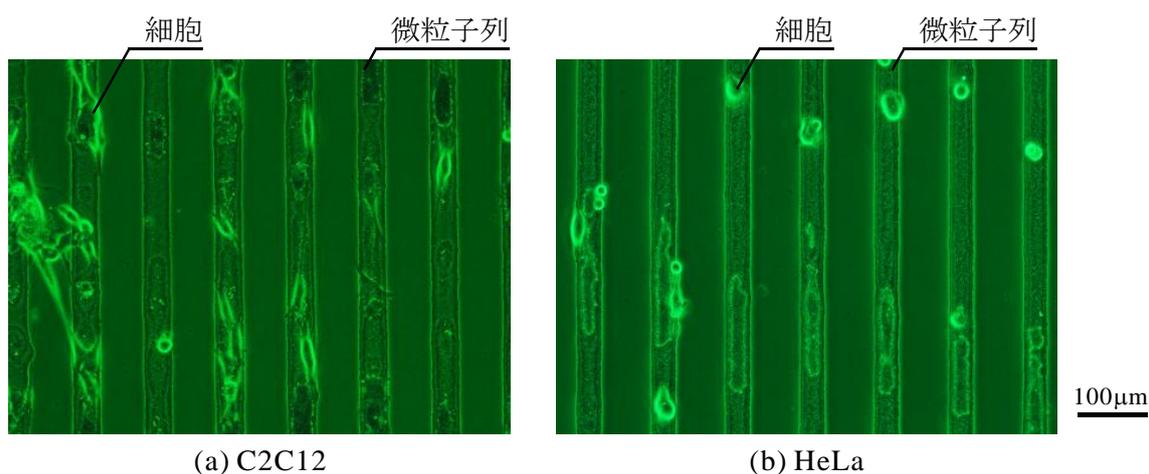


図 3-20 微粒子列上で培養した C2C12 細胞と HeLa 細胞

以上 3 種類の細胞に対して、その選択接着率 α を計測した結果を図 3-21 に示す。PC12, HeLa, C2C12 のいずれにおいても、選択接着率 α は 90%以上となった。それぞれの値に対し、 $p < 0.05$ をもって有意とする F 検定および t 検定を行ったところ、有意差は見られなかった。したがって、微粒子列上に細胞が選択的に接着するという現象は、本研究の調査範囲では細胞の種類に依存しなかった。

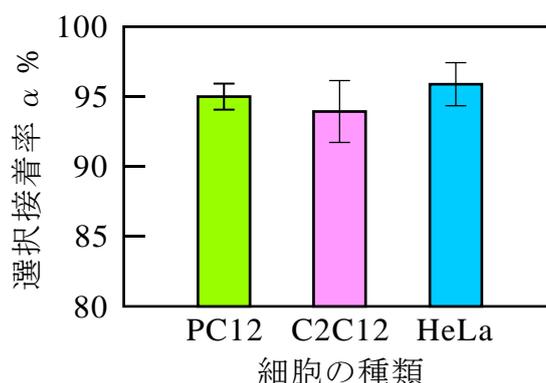


図 3-21 微粒子列上で培養した3種類の細胞の選択接着率

3.6.3 細胞の微粒子列への選択接着過程

細胞は、播種後の沈降によって基板底面へ接着する。沈降は単純に重力方向に従うので、この時点ではその接着位置に選択性はないと考えられる。すなわち、これまで紹介した細胞の選択接着は、平面部分に接着した細胞がランダムに遊走（細胞の移動）する過程で微細構造に到達した結果であると考えられる。すなわち、微細構造への細胞の接着は、図 3-22 に示すように、以下のプロセスを踏むと考えられる。

- ① 播種した細胞は沈降により底面に近付き、そのまま接着する。この際の接着位置は無作為である。
- ② 微細構造など、細胞の接着に有利な足場に接着した細胞は、その位置からあまり遊走しない。
- ③ 平面など、細胞の接着に有利でない足場に接着した細胞は、仮足を伸展し、遊走する。
- ④ 遊走中の細胞は、微細構造など、細胞の接着に有利な足場に到達すると、その場で遊走をやめる。
- ⑤ 接着に有利な足場に到達しなかった細胞は、接着状態が悪くともその場に接着するか、あるいは浮遊する。
- ⑥ 結果として、接着している細胞の位置に選択性がうまれる。

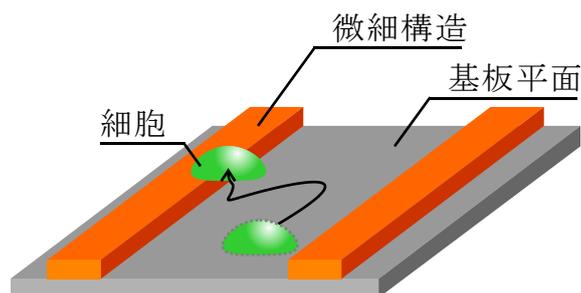


図 3-22 細胞の微細構造への接着過程モデル

以上のモデルが正しいとすれば、細胞の接着位置に選択性が現れるには、播種後からある程度の時間が必要である。そこで、このような選択性が見られるようになるまでに必要な時間を明らかにするため、C2C12 細胞の播種直後から 10 時間後までの細胞の様子を、インプロセス観察した。図 3-23 は本観察に用いた装置の概要である。位相差顕微鏡の観察ステージに恒温槽を設置し、一定時間ごとに位相差像を撮影（タイムラプス観察）することができる。図 3-24 は、播種後から 200 分間隔で撮影した位相差像である。最初、微粒子列と基板平面の両方に接着していた細胞が、時間経過とともに段々と微粒子列上へその接着位置を変えている様子が観察できる。ここで、1 時間間隔で選択接着率 α および全接着細胞数 $N_m + N_f$ を計測した結果を図 3-25 に示す。時間経過に伴い、全接着細胞数はあまり変化していない一方で選択接着率は上昇している。すなわち、播種直後には基板平面に接着していた細胞が、時間経過とともに微粒子列上に接着している。細胞の微細構造への接着は、おおよそ 5 時間時点で 90% に達している。 α の上昇が特に顕著なのは播種後～3 時間までの間であるので、細胞はこの期間によく遊走していると考えられる。播種後 5 時間からも時間経過に従って選択接着率が上昇していき、播種後 9 時間ほどで一定となる。選択接着率の計測はこの時間から増殖が開始するまでの間に行うべきである。以上の結果より、例えば PC12 細胞の場合には、その増殖は 48 時間に 1 回の割合であるため³⁻¹¹⁾、最初の接着の観察は播種後 9 時間～57 時間で行うことが望ましい。また、増殖の観察は播種後 57 時間～105 時間で行うことが望ましい。本研究では、PC12 細胞の接着を播種後 24 時間時点で、細胞の増殖を播種後 72 時間時点でそれぞれ行っている。

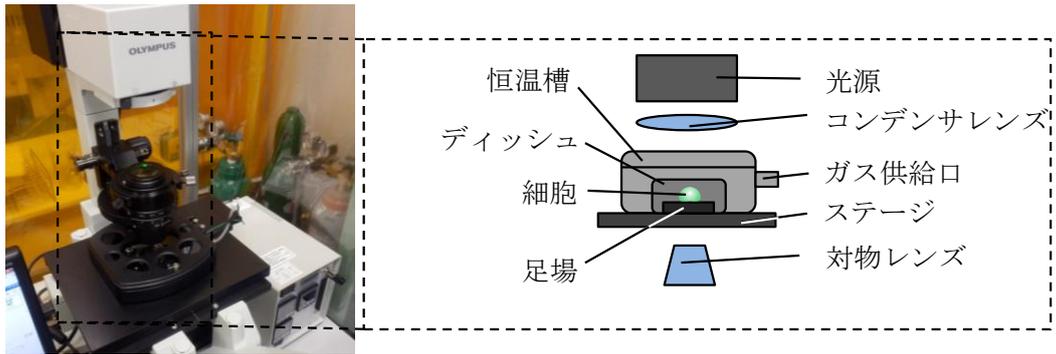


図 3-23 タイムラプス観察装置構成図

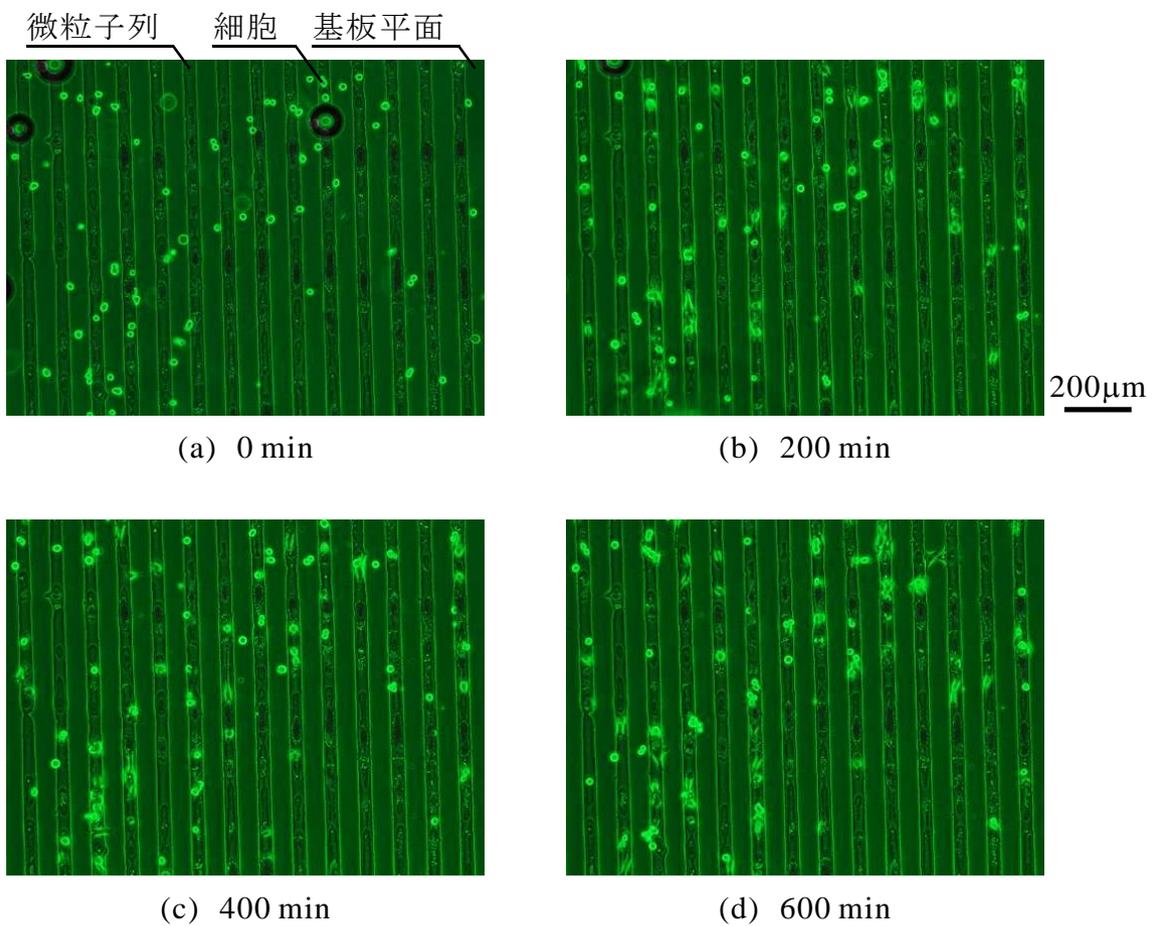


図 3-24 細胞播種後から 200 分毎の位相差顕微鏡像

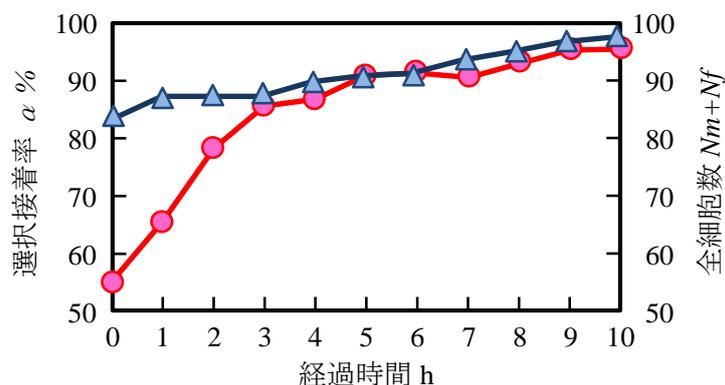


図 3-25 細胞播種後からの接着細胞数と細胞の選択接着率の変化

次いで、細胞が微細構造への接着にいたるまでのプロセスを詳細に観察した。図 3-26 は C2C12 細胞播種後 5 時間から、20 分ごとに撮影した位相差顕微鏡像である。播種後に微細構造に接着した細胞（写真右）は、その場所からあまり動いていない。一方で、平面部に接着した細胞はよく遊走しており、遊走中に仮足の一端が微細構造に触れ、そこを起点として細胞全体が微細構造上に遊走、接着している。このような現象は観察領域全体で観察でき、上記のプロセスを踏んで細胞の選択的接着が達成されていることがわかった。図 3-16 など、微粒子列の端部に接着した細胞が多く見られているが、このような細胞は平面から遊走して微粒子列に到達した細胞であることが予想できる。一方で、図 3-8 や図 3-10 など、細胞の代表寸法に比べ微粒子列が広い場合には、播種後そのまま微粒子列に接着した細胞が多くなり、接着位置が微粒子列端部となる細胞が少ないと考えられる。

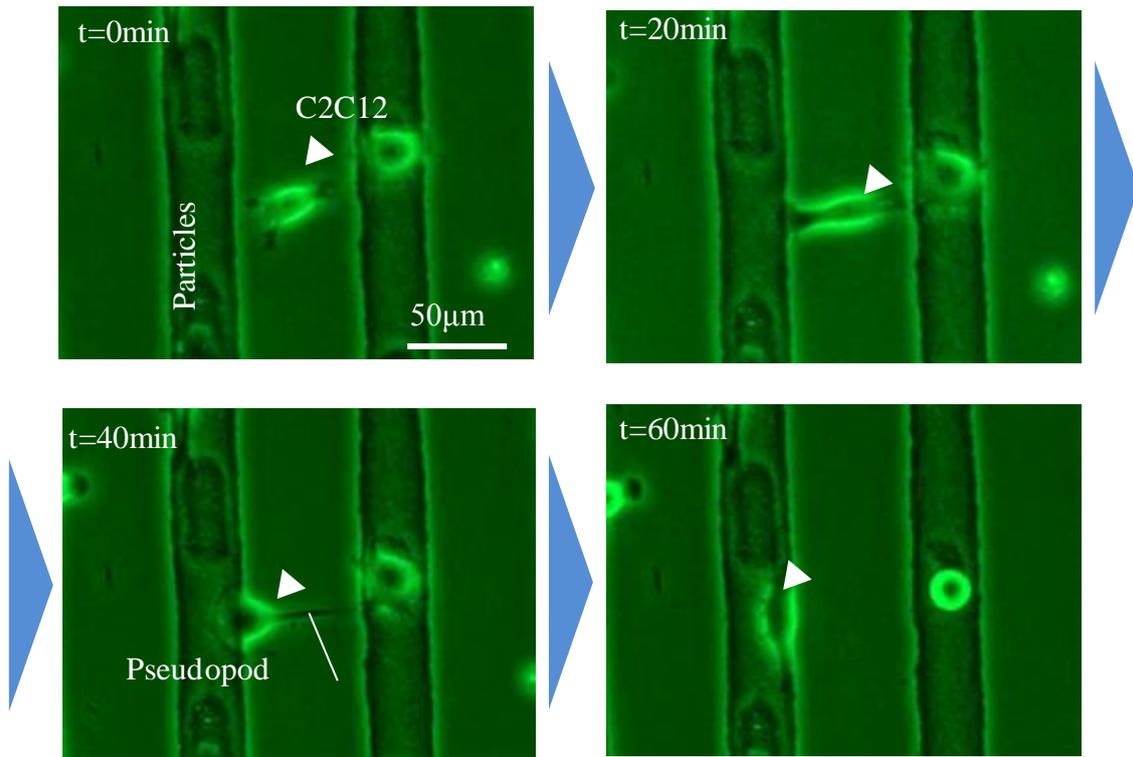


図 3-26 微粒子列を足場として播種した C2C12 細胞の、時間経過による接着位置の変化

以上より、一旦平面部分に接着した細胞が微細構造へと遊走することで、接着位置に選択性が生じていることがわかった。したがって、微粒子列の間隔と細胞の遊走距離との関係が、細胞の接着位置に影響を及ぼす可能性がある。そこで、間隔の異なる微粒子列を作製し、それらを細胞培養の足場として適用した。播種後 24 時間時点での基板を位相差顕微鏡で観察し、接着している細胞を計測、各足場に対して選択接着率 α を算出した。図 3-27 は微粒子列の間隔が選択接着率に及ぼす影響をまとめた結果である。結果より、列間の間隔が狭くなるほど細胞の選択性が高くなることがわかった。細胞のパターンニングを考えた場合、90%以上の細胞を微細構造上に接着させるには、構造同士の間隔は $60\mu\text{m}$ 以下であることが望ましい。この結果から、PC12 細胞の遊走距離は、構造の間隔 $60\mu\text{m}$ の半分である $30\mu\text{m}$ 程度であると見積もることができる。図 3-25 のとおり、播種後 10 時間程度で細胞の遊走が見られなくなることから、遊走の速度は約 $3\mu\text{m}/\text{h}$ である。ここで、環状オレフィン・コポリマーという高分子材料を足場として PC12 細胞を培養した研究では、その遊走距離は 14 時間で $50\mu\text{m}$ 、つまり遊走の速度は約 $3.6\mu\text{m}/\text{h}$ となっている³⁻¹²⁾。本研究とは細胞を培養する足場の材質が異なっているため、多少異なる値となったと考えられる。このように、基板の材質と細胞種の組み合わせごとに、細胞の遊走する距離が変化するので、パターンニングに際しては適切な設計をする必要がある。本研究の範囲では、PC12 とガラス基板とい

う組み合わせにおいて、先述した通り構造同士の間隔は $60\mu\text{m}$ 以下であることが望ましいことがわかった。

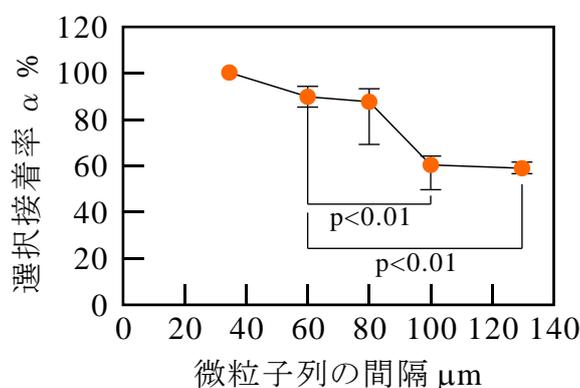


図 3-27 微粒子列の間隔が細胞の選択接着率に及ぼす影響

3.7 微粒子列上での細胞の増殖

細胞の接着後、さらに培養を進めると、それら細胞は増殖（分裂）する。この際に微細構造からはみ出して増殖する場合、細胞の位置制御は難しい。逆に、増殖が微細構造に沿って行われるならば、培養時間の増加によって所望の形状に配列した細胞を得ることも可能である。これは、所望の形状を持つ細胞シートの作製に応用できる。そこで、細胞播種後 24 時間からさらに培養を続け、微粒子列上に接着した細胞の増殖方向について調査した。なお、培養の条件は前節までと同条件としている。

図 3-28 は、HeLa 細胞の、播種後 28 時間後から 40 分ごとに撮影した位相差顕微鏡像であり、図 3-29 は、C2C12 細胞の、播種後 17 時間後から 20 分ごとに撮影した位相差顕微鏡像である。どちらの細胞も、微粒子列の長手方向に沿って増殖している。また、伸展していた細胞が一旦球形となり、分裂した後にまた進展するという、一般的な増殖の過程も見る事ができる。この観察結果より、細胞の増殖が微粒子列に沿って行われることが分かった。したがって、更に培養時間を伸ばせば、微粒子列に沿ったシート状の細胞や細胞塊を得ることができると考えられる。

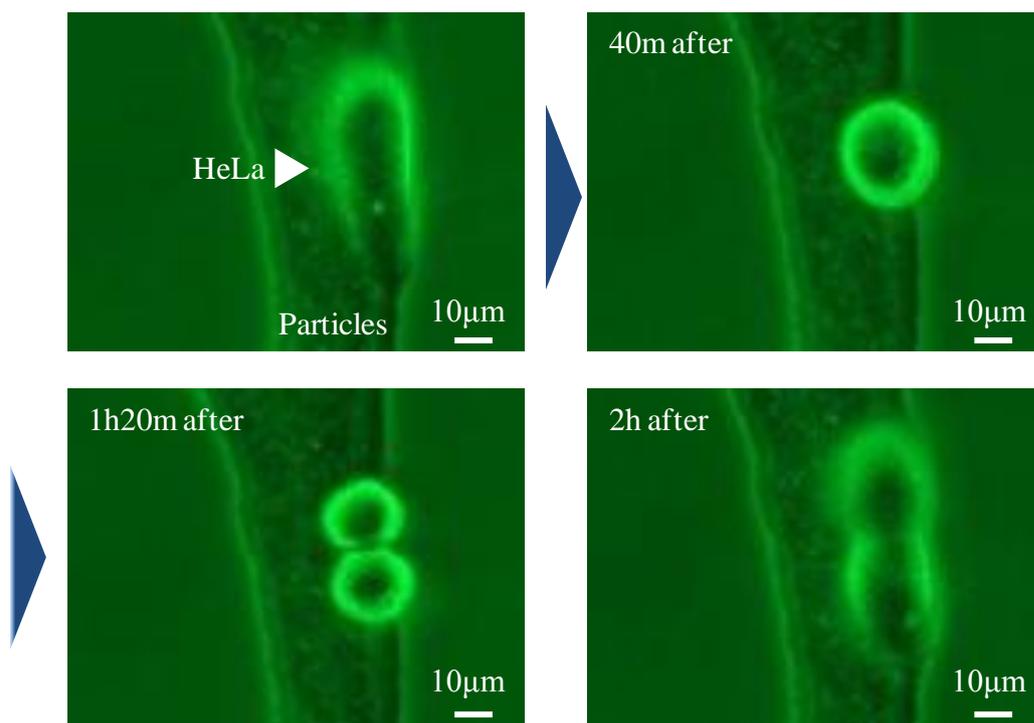


図 3-28 微粒子列上に接着した HeLa 細胞の経時変化

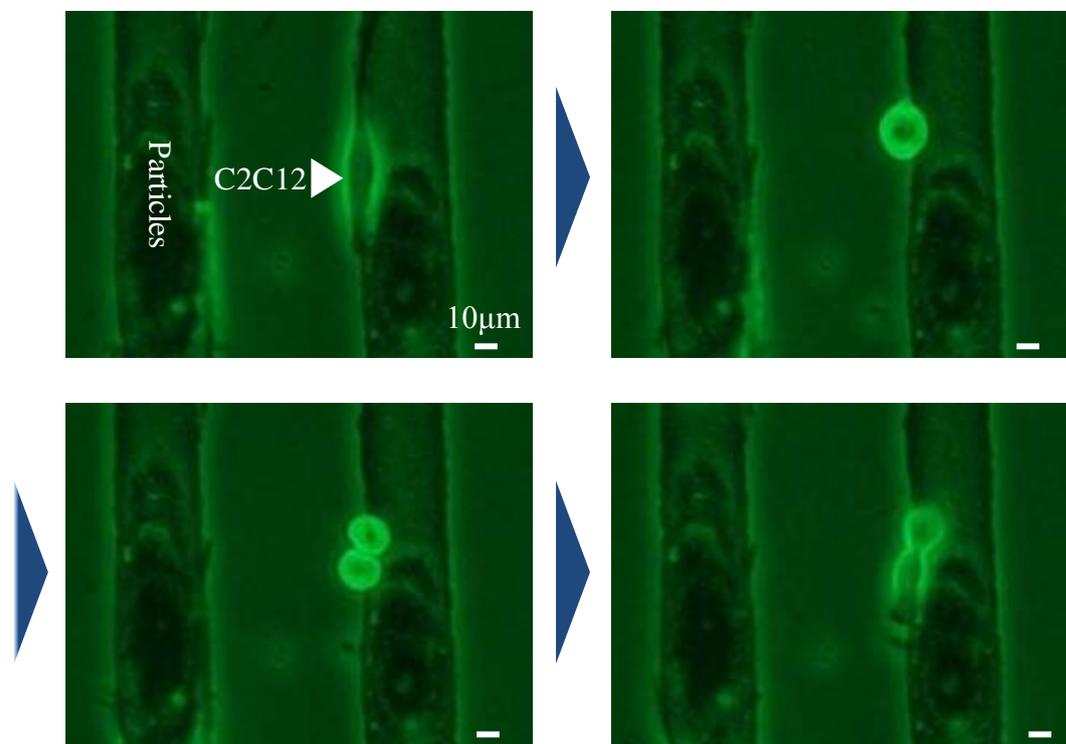


図 3-29 微粒子列上に接着した C2C12 細胞の経時変化

図 3-30 は播種後 1 週間時点での HeLa 細胞の位相差顕微鏡像である。細胞は微粒子列からはみ出すことなく増殖しており、平面にはほとんど接着していないことがわかる。特に、細胞が接着していない微粒子列が存在することから、細胞は微粒子列から隣の微粒子列へと遊走することなく増殖していると考えられる。つまり、図 3-27 の時点で細胞が接着していない微粒子列には、播種後 24 時間の時点で細胞が接着していなかったと言える。これは、微粒子列上にいったん接着した細胞が、その位置から動かないことの裏付けとなる結果である。今回の結果より、微粒子列を用いることで、細胞の接着位置および増殖位置を制御することが可能であることがわかった。ただし、細胞シート状になるまで培養を続けると、細胞-基板間の接着力よりも細胞-細胞間の接着力のほうが強くなり、結果として細胞がシートの形態を保ったまま剥がれてしまうことも報告されているので³⁻¹³⁾、細胞との接着力を強くするため、微粒子にタンパク質をコーティングする等が必要となるだろう。あるいは、この課題を培養した細胞が回収できると考えることも可能である。

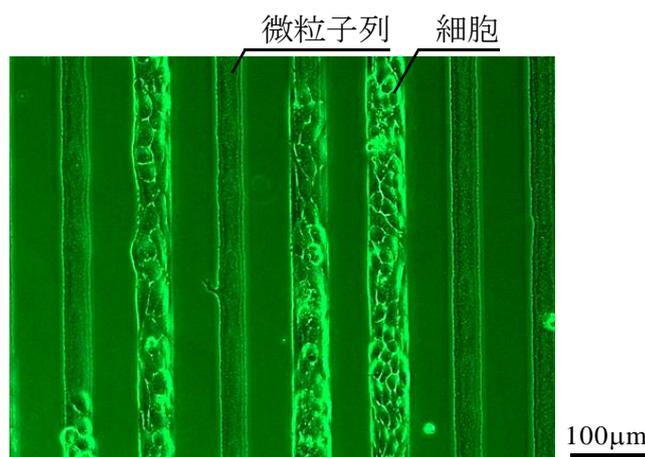


図 3-30 播種後 1 週間の HeLa 細胞

3.8 粒径の異なる微粒子列上での細胞の分化

接着および増殖と同様に、分化もまた細胞の代表的な機能のひとつである。第 1 章でも触れたとおり、神経細胞の機能を解明するには、そのネットワークの形成が重要である。そのため、微細構造を利用した神経突起の伸長方向制御が行われている³⁻¹⁴⁾⁻³⁻¹⁵⁾。そして、細胞の機能は接着した足場の形状に影響される。そこで、微細構造の幾何形状が、細胞の分化にどのような影響を及ぼすか調査した。微粒子列は、整列させる微粒子の粒径を変更することで、その創成する形状を制御することができる。本節では、SiO₂ 微粒子を対象と

し、微粒子の粒径を 500nm, 1 μ m, 2 μ m として整列させた. 図 3-31 で示すように, これらを足場として PC12 細胞を培養し, 播種後 24 時間に神経成長因子 (NGF) を添加した. 3.2 節で説明したとおり, PC12 細胞は NGF の添加により神経突起様の構造を形成する性質を有する. 神経突起形成の評価方法として, 微粒子列に接着した細胞のうち, 神経突起を形成した細胞の割合を示す, 神経突起形成率 γ [%] を導入した. γ は以下の式で定義される.

$$\gamma = N_{mn} / N_m \quad (3-3)$$

ここで, N_m は微粒子列上に接着した細胞の数であり, N_{mn} は微粒子列上に接着した細胞のうち, 神経突起を形成した細胞の数である. 例えば, 図 3-32 で γ を計測すると, $\gamma = 3 \times 100 / 4 = 75\%$ となる.

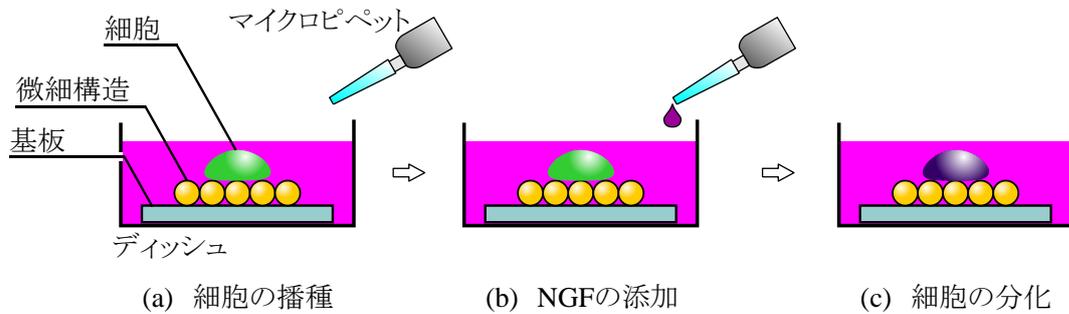


図 3-31 NGF の添加手順

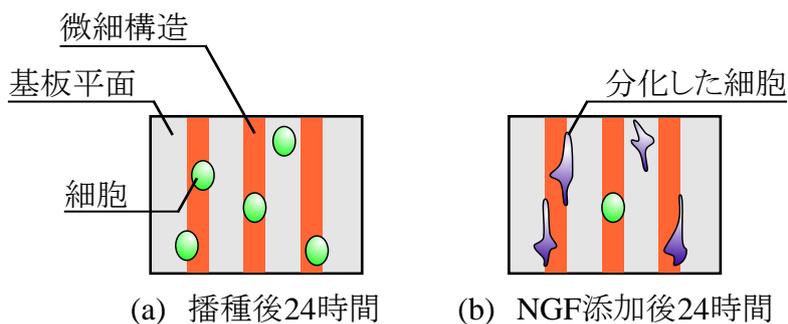
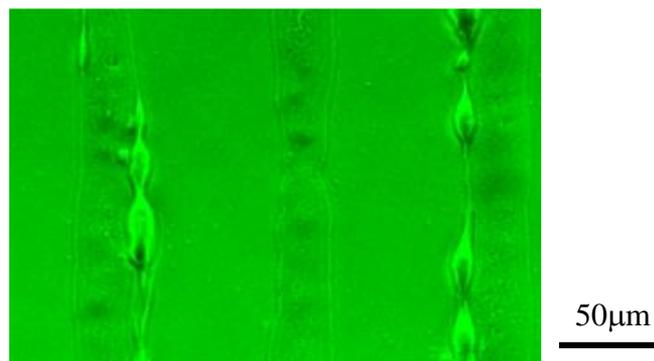


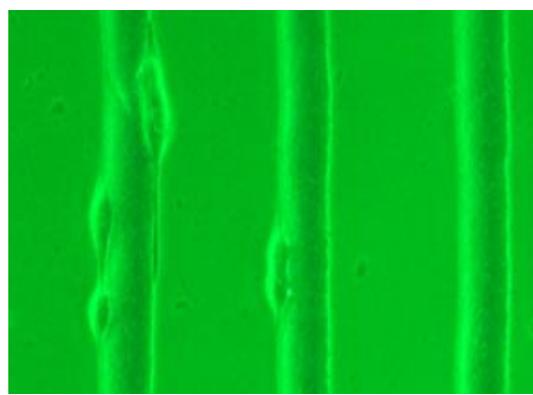
図 3-32 神経突起形成率 γ の算出基準

NGF 添加後 24 時間での各基板の位相差顕微鏡を 図 3-33 に示す. いずれの基板においても, PC12 細胞が神経突起様の構造を形成している様子が確認できる. また, その伸長方向は微粒子列に沿っている. 一方で, 分化している細胞の数自体は多くなく, 特に $\phi 2\mu$ m の微

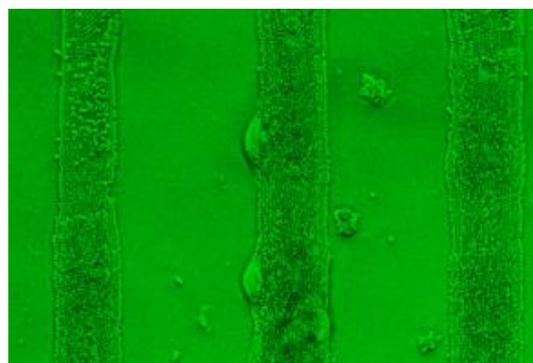
細構造化した微粒子列で少なかった。ここで、神経突起形成率 γ を計測した結果を図 3-34 に示す。それぞれの値に対して F 検定および t 検定を行ったところ、 $\phi 0.5\mu\text{m}$ の微粒子列と、 $\phi 1\mu\text{m}$ および $\phi 2\mu\text{m}$ の微粒子列との間で、その分化率にそれぞれ有意差が存在した。一方で、 $\phi 1\mu\text{m}$ と $\phi 2\mu\text{m}$ との間には有意差は見られなかった。神経突起を形成した細胞の割合は粒径に依存し、粒径が小さいほどその割合が増加することがわかった。



(a) $\phi 0.5\mu\text{m}$



(b) $\phi 1\mu\text{m}$



(c) $\phi 2\mu\text{m}$

図 3-33 微粒子列上に接着した分化 PC12 細胞. (a) $\phi 0.5\mu\text{m}$ の SiO_2 微粒子列, (b) $\phi 1\mu\text{m}$ の SiO_2 微粒子列, (c) $\phi 2\mu\text{m}$ の SiO_2 微粒子列.

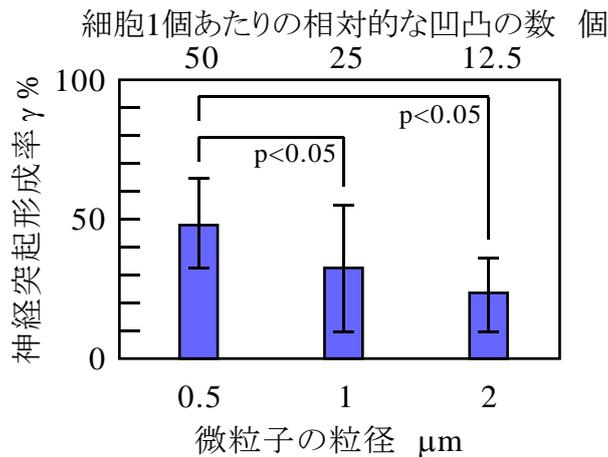


図 3-34 微粒子の粒径が細胞の選択接着率および神経突起形成確率に及ぼす影響

選択接着率および神経突起形成率について、以下のように考察する。まず、細胞にとっての接着しやすい微細構造とは、その構造の寸法に下限や上限が存在することが予想される。つまり、構造が極めて微細であり、基板平面の幾何形状と変わらないような構造では細胞の機能への影響が平面と変わらなくなる。また、微細構造の高さが極めて高ければ、細胞がこれを越えて接着することができず、結果として接着位置に選択性が無くなる、といった現象が起こり得る。したがって、本研究で用いた粒径 0.5~2μm の範囲は、細胞が微粒子列を微細構造と認識でき、かつこれを乗り越えて接着することができる範囲であったと考えられる。一方で、粒径の違いは、先述の通り微細構造の凹凸の数に相関する。細胞の代表寸法を r とし、微粒子の粒径を a とすれば、粒径の異なる微粒子列に接着している細胞のモデルを図 3-35(a)および(b)のように考えることができる。(a)は、微粒子の粒径が細胞の代表寸法の 1/2 である微粒子列であり、(b)は微粒子の粒径が細胞の代表寸法の 1/4 である微粒子列である。図 3-35 のように、微粒子の粒径が大きいほど細胞の底面と接する凹凸の数が減る。より多くの凹凸と接することができる方が、細胞の接着に有利であると考えられる。ただし、粒径が小さいほど良いというわけではなく、焦点接着などの細胞の認識機構よりも小さければ、平面と変わらなくなるとも考えられる。以上より、粒径 0.5μm 微粒子列に接着した細胞では接着状態が安定となり、分化という機能が発現する細胞の割合が増えたと考えられる。

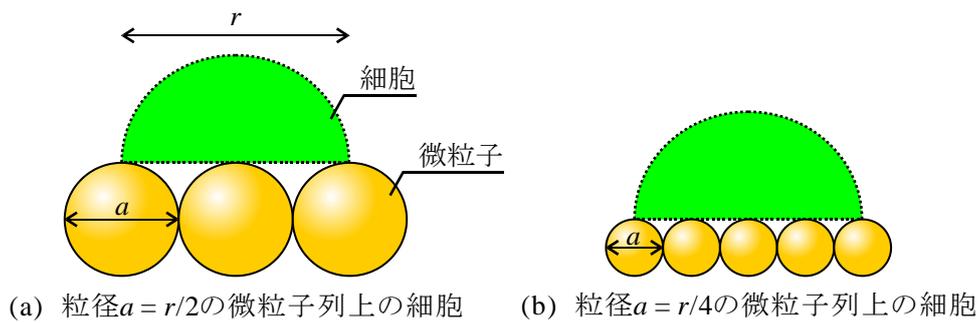


図 3-35 異なる粒径の微粒子列に接着した細胞のモデル図

神経突起の伸長方向について、以下のように考察する。マイクロオーダーの溝構造が、神経突起形成を制御することは知られており³⁻¹⁶⁾⁻³⁻¹⁷⁾、関連する研究では、ラインアンドスペース構造や微細な溝構造を作製し、それに沿って突起を伸長させているものが多い。微粒子列は整列させた微粒子の粒径に応じた高さを持つラインアンドスペース構造とも見なすことができる。また、微粒子列表面の持つ微細な凹凸も溝構造と同じはたらきをすると考えられる。したがって、関連する研究における構造は、本研究において微粒子列およびその表面微細構造に相当する。これにより、神経突起の伸長方向も微粒子列に沿ったものとなったと考えられる。したがって、微粒子列による神経突起伸長方向の制御が期待できる。

以上の結果より、微粒子によって構成された微細構造が、細胞の接着位置、増殖方向、分化、そして神経突起伸長方向に影響を及ぼしていることが判明した。

3.9 結言

本章では、微粒子列への細胞の接着およびその成長特性を明らかにした。微粒子列を細胞接着の足場として適用し、細胞の接着位置、増殖の方向、そして神経突起の伸長方向の制御を試みた。細胞は平面よりも微粒子列に選択的に接着する一方で、微粒子列と同等の高さを持つラインアンドスペース構造では、接着位置に選択性は見られなかった。微粒子列への選択的な接着は、PC12, HeLa, C2C12 という異なる特徴を持つ細胞すべてで確認された。この際、インプロセス観察により、一旦平坦な表面に接着した細胞が、遊走と伸長により微粒子列に到達することがわかった。そのため、微粒子列の間隔が広がるに従い、微粒子列上に接着する細胞の数が減少した。また、増殖の方向や神経突起の伸長方向が微粒子列の長手方向に沿って行われることがわかった。特に HeLa 細胞では、播種後 1 週間経っても、微粒子列からはみ出すこと無く増殖を続けることがわかった。以上をもって、本章の目的である微粒子列への細胞の接着およびその成長特性を明らかにすることができたとと言える。

微粒子列と同等の高さを持つラインアンドスペース構造で細胞の接着に選択性が見られなかったことから、微粒子によって創生される微細な凹凸ないし粗さが細胞の接着などに影響を及ぼしていると考えられる。一方で、微細構造の何が細胞に影響を及ぼしているのかは未だ明らかでない。以降の章では幾何形状に着目し、微細構造の何が、何故、どのように細胞の接着に影響を及ぼしているのかを調査する。

第3章 参考文献

- 3-1) H. Imagawa, H. Saijo, H. Yamaguchi, K. Maekawa, T. Kurisaki, H. Yamamoto, M. Nishizawa, M. Oda, M. Kabura, M. Nagahama, J. Sakurai, M. Kubo, M. Nakai, K. Makino, M. Ogata, H. Takahashi, and Y. Fukuyama, "Syntheses of structurally-simplified and fluorescently-labeled neovibsanin derivatives and analysis of their neurite outgrowth activity in PC12 cells", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 5 (2012) 2089-2093.
- 3-2) J. H. Lee, H. Y. Lee, and H. W. Kim, "Adhesive proteins linked with focal adhesion kinase regulate neurite outgrowth of PC12 cells" *Acta Biomaterialia*, 8, 1 (2012) 165-172.
- 3-3) N. C. Chen, C. H. Chen, M. K. Chen, L. S. Jang, and M. H. Wang, "Single-cell trapping impedance measurement utilizing dielectrophoresis in a parallel-plate microfluidic device", *Sensors And Actuators B: Chemical*, 190 (2014) 570-577.
- 3-4) J. L. Charest, A. J. Garcia, and W. P. King, "Myoblast alignment and differentiation on cell substrates with microscale topography and model chemistries", *Biomaterials*, 28, 13 (2007) 2202-2210.
- 3-5) T. M. Patz, A. Doraiswamy, R. J. Narayan, R. Modi, and D. B. Chrisey, "Two-dimensional differential adherence and alignment of C2C12 myoblasts", *Materials Science and Engineering B*, 123, 3 (2005) 242-247.
- 3-6) T. Matsuda, K. Inoue, and T. Sugawara, "Development of Micropatterning Technology for Cultured Cells", *Transactions/ American Society for Artificial Internal Organs*, Vol. XXXVI, SLIDE FORUM 14 (1990)
- 3-7) Y. Hanada, K. Sugioka, H. Kawano, T. Tsuchimoto, I. Miyamoto, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, "Selective cell culture on UV transparent polymer by F2 laser surface modification", *Applied Surface Science*, 255 (2009) 9885-9888.
- 3-8) T. Adachi, F. Kajita, K. Sato, K. Matsumoto, and M. Tagawa, "Cell Micro-Patterning by Atom Beam Exposure", *Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers. A*, 34, 688 (2003) 1782-1788.
- 3-9) Y. Masuda, S. Wakamatsu, and K. Koumoto, "Site-selective deposition and micropatterning of tantalum oxide thin films using a monolayer", *Journal of the European Ceramic Society*, 24, 2 (2004) 301-307.
- 3-10) A. Beduer, L. Vaysse, E. Flahaut, F. Seichepine, I. Loubinoux and C. Vieu, "Multi-scale engineering for neuronal cell growth and differentiation", *Microelectronic Engineering*, 88 (2011) 1668-1671.
- 3-11) B. Gong, M. C. Lim, J. Wanderer, A. Wytenbach, and A. J. Morton, "Time-lapse analysis of aggregate formation in an inducible PC12 cell model of Huntington's disease reveals

- time-dependent aggregate formation that transiently delays cell death”, *Brain Research Bulletin*, 75 (2008) 146-157.
- 3-12) A. Ferrari, M. Cecchini, R. D. Innocenti, and F. Beltram, “Directional PC12 cell migration along plastic nanotracks”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 56, 11 (2009) 2692-2696.
- 3-13) M. Miura and K. Fujimoto, “Formation and recovery of a cell sheet by a particle monolayer with the surface roughness”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66 (2008) 125-133.
- 3-14) L. Griscom, P. Degenaar, B. LePioufle, E. Tamiya, and H. Fujita, “Techniques for patterning and guidance of primary culture neurons on micro-electrode arrays”, *Sensors and Actuators B*, 83 (2002) 15-21.
- 3-15) J. C. Chang, G. J. Brewer, and B. C. Wheeler, “A modified microstamping technique enhances polylysine transfer and neuronal cell patterning”, *Biomaterials*, 24 (2003) 2863-2870.
- 3-16) W. Xuefeng, A.O. Christian, L. Qinghua, and H. Jun, “Cell directional migration and oriented division on three-dimensional laser-induced periodic surface structures on polystyrene”, *Biomaterials* 29, 13 (2008) 2049-2059.
- 3-17) T. Akinori, T. Masaru, Y. Sadaaki, F. Nobuyuki, Y. Hiroshi, and S. Masatsugu, “Topographical control of neurite extension on stripe-patterned polymer films”, *Colloids and Surfaces A*, 284-285 (2006) 470-474.

第4章

微細構造の幾何的特徴量が細胞の
接着に及ぼす影響

4.1 緒言

本章では、微細構造表面の幾何形状が、細胞の接着に及ぼす影響を明らかにすることを目的としている。本研究では幾何的特徴量として、算術平均粗さ Sa 、歪度 Ssk 、尖度 Sku に着目し、これらが異なる表面を、微粒子列を応用して作製している。歪度とは表面の山と谷の対称性を表す指標であり、その正負や絶対値の大きさを、粗さの分布が上下（山谷）のどちらに偏っているかを表す。尖度とは表面の高さの分布に関する指標であり、その表面がどれだけ尖っているかを表す。Si ウエハに微粒子列を整列させ、これをマスクとしたドライエッチングを行うことで、微粒子の粒径に応じた周期性を持つピラー様の微細構造が得られる。この構造は加工時間を長くすることで、ピラー先端が鋭くなっていく。この Si ウエハをモールドとして、その形状をシリコン樹脂（PDMS）に転写することで、 Ssk が $-0.6 \sim 0.5$ のホール構造を作製した。また、この PDMS をモールドとして形状転写した PDMS は、 Ssk が $-0.3 \sim 0.8$ のピラー構造となった。両者は共通の粗さ曲線を持つため算術平均粗さが同等となる一方で、異なる歪度を持つことがわかった。次いで、上記で作製した微細構造を足場として細胞を培養した。歪度が小さい微細構造ほど、その上に接着する細胞の割合が多いことがわかった。一方で、算術平均粗さおよび尖度との相関は歪度よりも低かった。

4.2 微細構造の表面幾何形状と細胞接着

4.2.1 細胞接着の従来研究とその課題

第1章で述べたように、微細構造を用いた細胞のパターニングに関する研究が行われており、どのような形状が細胞の接着に影響しているか、様々な調査がされている。しかし、基板の材質や微細構造の形状が研究者によってまるで異なっており、比較検討や体系的なまとめが困難となっている。そこで、基板をエッチング等で荒らすという共通の手順で作製した微細構造を足場として細胞を培養し、その表面粗さと細胞の接着との関係を調査するという研究が行われている。Fanらの研究では、荒れたSiウエハ上でラットの神経細胞を培養し、表面粗さによってその接着を制御している⁴¹⁾。その際、**図4-1**のように、異なる表面粗さを持つ領域を作製することで、細胞のパターニングも行っている。また、表面粗さ Ra に対する細胞の接着性に関して、生存率で評価しており、**図4-2**のように $Ra=25\text{nm}$ の時最も高い値を示している。生存率とは、播種後ある程度培養した後に接着し続けている細胞の割合を表しており、これが高いほどその足場が細胞接着に適していることを示している。一方、Khangらもまた荒れたSiウエハ上でラットの神経細胞を培養し、その生存率を調査している⁴²⁾。**図4-3**は足場の表面粗さと細胞の生存率の関係を表した結果である。細胞の生存率は、評価方法の差異はあるものの、Fanらの結果と異なり $Ra=70\text{nm}$ の時最も高く、 $Ra=25\text{nm}$ 付近では低い値を示している。つまり、同じ足場と細胞を用いても、研究者によって異なる傾向が得られている。

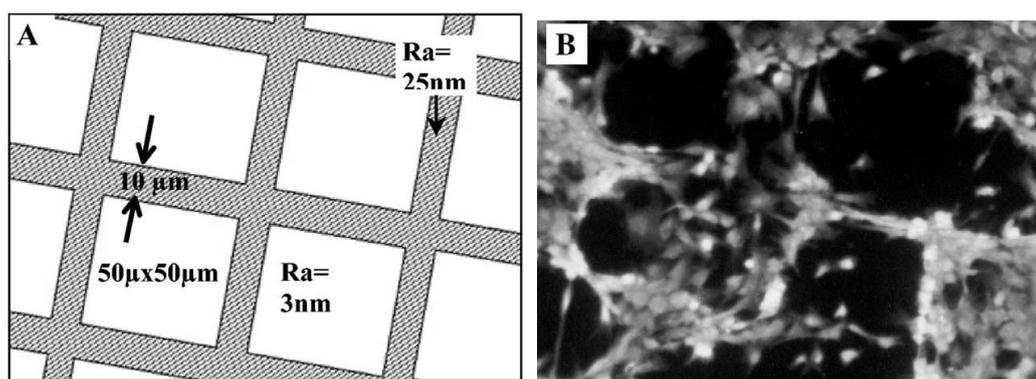


図4-1 表面粗さによる神経細胞のパターニング⁴¹⁾

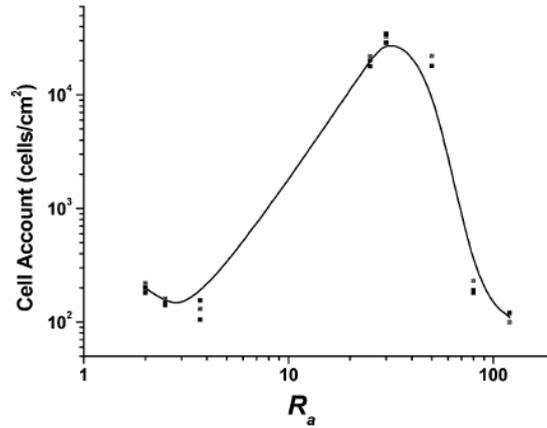


図 4-2 足場の表面粗さと細胞の生存率の関係⁴⁻¹⁾

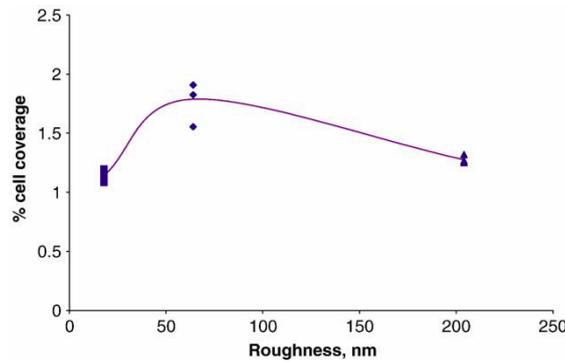


図 4-3 足場の表面粗さと細胞の生存率の関係⁴⁻²⁾

以上のような結果の差異が発生する原因として、本研究では次に着目した。まず、多くの研究で「表面粗さ」として計測・評価されている指標は、正確には「算術平均粗さ」として定義される指標である。エッチング等で基板を荒らすと、その面はランダムな形状を持ってしまい、計測する場所や範囲によって異なる粗さを持っている。つまり、基板全体として持っている粗さは、局所的に粗い場所や平坦な場所などをすべて含めて平均した値となっている。そのため、算術平均粗さの値が同じであっても表面の形状が同じであるとは限らない。この顕著な例として、図 4-4 のような断面を持つ構造を考える。図 4-4(a)は(b)に比べ凸部分の形状が丸い。見た目としては異なるこの 2 つの構造は、共通の粗さ曲線を持つため、その算術平均粗さはまったく同じ値である。したがって、ある構造を分類する際、算術平均粗さのみでは、十分とは言えない。



図 4-4 同一の算術平均粗さを持つ 2 表面の断面曲線 (第 1 章 図 1-5 再掲)

4.2.2 表面幾何形状の指標

本節では、一般に、表面の幾何的特徴を示すためのパラメータとして用いられている指標を紹介する⁴⁻³⁾。なお、ここでは簡単のため粗さ曲線を例として紹介するが、本研究ではこれら 2 次元での指標を 3 次元に拡張した「面粗さ」を対象とし、計測や評価を行っている。

算術平均粗さとは、粗さ曲線 $f(x)$ (図 4-5(a)) から、その平均線の方向に基準長さ L だけ抜き取り、抜き取った部分の平均線から曲線までの偏差の絶対値を合計し、平均した値である。定義式は(4-1)式で表される。

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |f(x)| dx \quad (4-1)$$

平均化することで特異的な値が及ぼす影響が小さくなり、安定した結果を得ることができる。

次いで、歪度とは山と谷の対称性を表す指標であり、その正負や絶対値の大きさで、粗さ曲線の分布が上下 (山谷) のどちらかに偏っているかを表す。例えば、図 4-5(b)のような粗さ曲線の場合、算術平均粗さは同じ値をとるが、歪度の正負でどのような形状であるのか判断することができる。歪度が負の場合、粗さ曲線の分布は上に偏る。すなわち、なだらかな山と鋭い谷のある形状となる (図 4-5(b)左)。歪度が正の場合、粗さ曲線の分布は下に偏る。すなわち、鋭い山となだらかな谷のある形状となる (図 4-5(b)右)。歪度の定義は(4-2)式で表される。

$$R_{sk} = \frac{1}{R_q^3} \left\{ \frac{1}{L} \int_0^L f^3(x) dx \right\} \quad (4-2)$$

ここで、 R_q は R_a の標準偏差を表している。

尖度とは高さの分布に関する指標であり、その断面 (表面) がどれだけ尖っているかを表す。図 4-5(c)のように、尖度 Ssk が 3 より大きい場合、高さの分布は中央付近が多くなり、鋭い山や谷が多いことがわかる。表面に山や谷が多くなり、全体的に平坦である場合尖度

は 3 より小さい値をとる。尖度が 3 と等しい場合、その粗さ曲線の高さ分布は正規分布となる。尖度の定義は(4-3)式で表される。

$$R_{ku} = \frac{1}{R_q^4} \left\{ \frac{1}{L} \int_0^L f^4(x) dx \right\} \quad (4-3)$$

S_a , S_{sk} , そして S_{ku} は、それぞれこれらの値を 3 次元空間に拡張したものであり、その定義は以下のとおりである。

$$S_a = \frac{1}{A} \int \int_A |f(x,y)| dx dy \quad (4-4)$$

$$S_{sk} = \frac{1}{S_q^3} \left\{ \frac{1}{A} \int \int_A f^3(x,y) dx dy \right\} \quad (4-5)$$

$$S_{ku} = \frac{1}{S_q^4} \left\{ \frac{1}{A} \int \int_A f^4(x,y) dx dy \right\} \quad (4-6)$$

ここで、 $f(x,y)$ は粗さ曲面を、 A は基準面を、 S_q は S_a の標準偏差を表している。それぞれの表す意味は 2 次元の場合と変わらないが、本研究では表面の微細構造を対象としているので、評価指標としては以上の面粗さのほうが適切である。

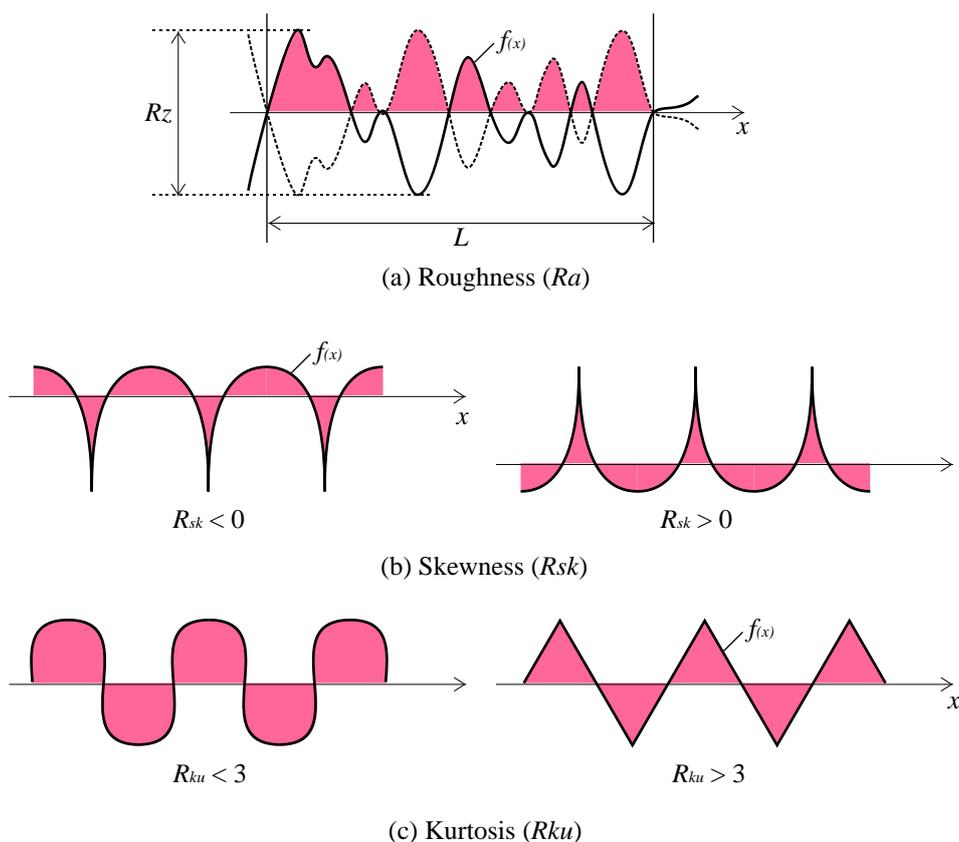


図 4-5 粗さ曲線とその評価指標

歪度や尖度といった値は、トライボロジ等の分野で、摩擦との関係をよく研究されている⁴⁻⁴⁾⁻⁴⁻⁶⁾。例えば、高い Sk_u と負の Ssk を持つような表面は、摩擦を減少させるということがわかっている⁴⁻⁷⁾。算術平均粗さでは分類することのできない、図 4-4 のような形状は、歪度 Ssk を用いることで分類できる。また、尖度 Sk_u で表される表面の凹凸の鋭さも算術平均粗さの値では判断することができない。ナノピラーなどの、細胞の接着できる面積を小さくすることで、その接着を抑制できるという報告があることから、歪度および尖度で特徴づけられる構造が細胞の接着に影響を及ぼしていると考えられる。ナノピラーやホール構造のピッチ（空間波長）が細胞の接着に及ぼす影響が、先述した算術平均粗さと共によく調査されている一方で⁴⁻⁸⁾⁻⁴⁻¹²⁾、歪度や尖度の影響を調査した報告は少なく、体系的な整理がされていない。そこで、以降の節では、図 4-4 で示されるような形状を持つ構造を作製し、これを細胞接着の足場として適用する。また、そのような微細構造の幾何的特徴量が細胞の接着・成長に及ぼす影響を調査する。

ここで、図 4-4 のような構造は曲面を持っているため、従来の半導体プロセスでは作製が困難である。一方で、図 4-6 に示すように、微粒子列をマスクとした Si 基板のドライエツ

チングによって、形状の特徴が図 4-4(a)や(b)と類似した構造の作製が行われている⁴⁻¹³⁾。この基板をモールドとして、熱硬化性樹脂であるポリジメチルシロキサン（以下、PDMS）への形状転写をすれば、元の構造の反転形状を得ることができる。また、その PDMS をモールドとして新たな PDMS でのモールドニングを行えば、図 4-4 のように共通の粗さ曲面を持つ構造が作製できると考えられる。さらに、PDMS は細胞培養の足場として望ましい透明材料である。そこで、本研究では以上の方法を用いて細胞培養用の足場を作製する。

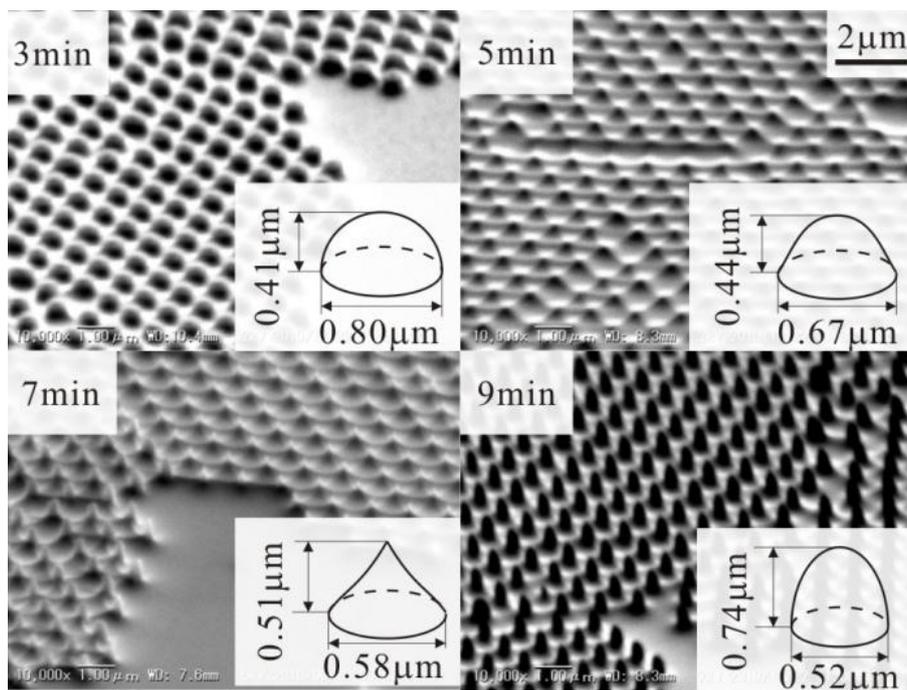


図 4-6 微粒子をマスクとした Si 基板のドライエッチング⁴⁻¹³⁾

4.3 微粒子を用いた微細構造の作製

4.3.1 微細構造の作製プロセス

4.2.3 節で示したような表面幾何形状を持つ構造を、以下の手法で作製する。まず、第2章と同様の手順で、Si ウエハを基板として微細構造化した微粒子列を作製する。次いで、この微粒子列をマスクとして、Si 基板に CF_4 による反応性イオンエッチング（以下、RIE）を施す。これにより、Si ウエハを微細構造化することができる⁴⁻¹⁴。マスクとする微粒子の粒径、エッチング時間、そして高周波（RF）パワーを制御することで、構造の形状が変化する⁴⁻¹⁵⁻⁴⁻¹⁶。こうして微細構造化された Si 基板は、概ね凸形状のピラーを持った構造となる。この方法で作製した微細構造をモールドとし、PDMS をモールドニングする。これにより、モールドの反転形状を持った PDMS を作製することができる。更に、この PDMS をモールドとして、新たに PDMS をモールドニングすれば、元の Si 基板の形状と同様の形状となる。両者は同等の算術平均粗さを持ちながら、異なる幾何的特徴を持つ微細構造である。更に、両方共 PDMS なので、材質や機械的特性等も統一されている。以上の工程を図 4-7 に、手順を以下に示す。

- ① 2.3.4 節のとおり、微粒子列を Si 基板上に作製する（図 4-7(a)）。
- ② CF_4 による RIE を行う（5min~10min, 図 4-7(b)）。
- ③ 残留する微粒子を、超音波洗浄機で脱離させる。
- ④ モールドに PDMS を流し込む。微細構造の形状を正確に転写するため、真空脱気を 1 時間行う（図 4-7(c)）。
- ⑤ 70°C で 1 時間、硬化させる。
- ⑥ ⑤で作製した PDMS に剥離処理を施し、新たなモールドとする。
- ⑦ モールドに PDMS を流し込み、真空脱気を 1 時間行う。
- ⑧ 70°C で 1 時間、硬化させる。

また、本工程で作製する構造の要求仕様を以下のように設定する。まず、算術平均粗さとしては、先述の研究を参考に 20~50nm とする⁴⁻¹⁾⁻⁴⁻²⁾。歪度および尖度に関しては、細胞の接着との関係を調査した研究が少ないので、摩擦への影響を調査したものを参考とする。Bastos らの研究によれば、歪度 $Rsk = -1$ なる表面では接触面積が増加する⁴⁻⁶⁾。本研究でも同様の効果を期待し、更に正の歪度の影響も調査するため、歪度の要求仕様を $Ssk = -1 \sim 1$ と設定する。また、尖度に関しては、 $Rku = 2$ の表面よりも、 $Rku = 3$ の表面で接触面積が大きく増加している。そこで、尖度の値の変化は 1 程度で良いと考えた。尖度の基準は 3 であるため、尖度の要求仕様を $Sku = 2.5 \sim 3.5$ と設定する。構造の空間波長に関しては一定の値とし、以下のように決定した。まず、空間波長が細胞の代表寸法よりも大きい構造では、

その表面形状は細胞にとって粗さではなくうねりとして影響すると考えられる。本研究の主旨として、細胞に比べて小さい構造を対象としているため、空間波長は細胞の代表寸法よりも小さいことが必要である。また、接着した細胞1個の底面に対して複数の微細な凹凸が存在することが望ましいため、少なくとも細胞の代表寸法の1/10程度の空間波長が必要である。ここで、Muhammadらの研究では、ポリスチレンディッシュのエンボス加工によって、ピラー構造とウェル構造を作製し、ヒト角膜内皮細胞を培養している⁴¹⁷⁾。そして、**図4-8**のように、ピラー構造のピッチ(=空間波長)を $1\mu\text{m}$ とした時、ヒト角膜内皮細胞がもっともよく増殖している。そこで、本研究において、微細構造の空間波長を $\lambda=1\mu\text{m}$ とした。

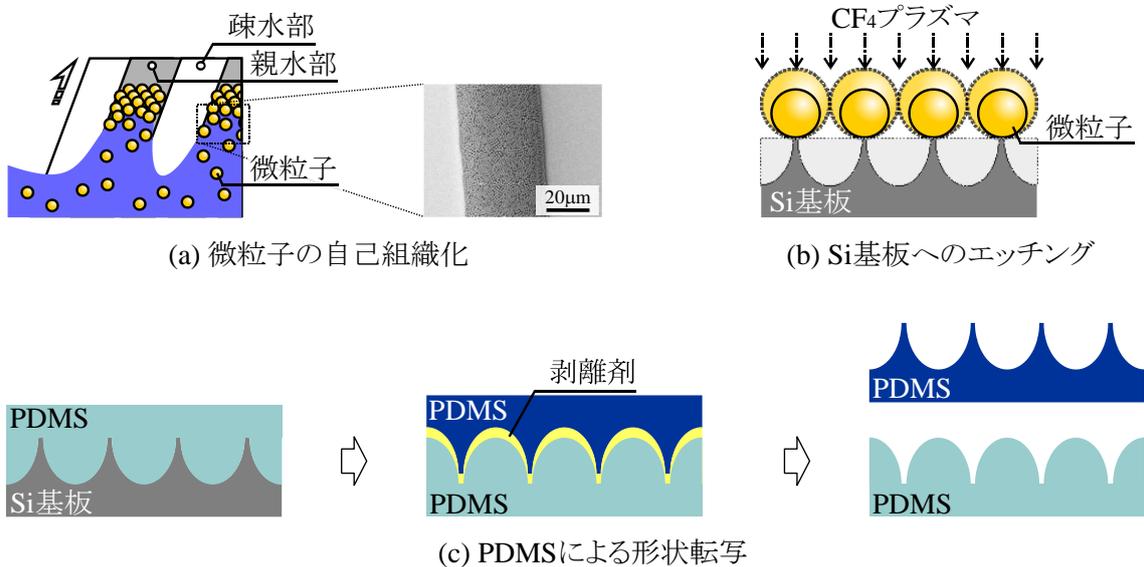


図4-7 微細構造化PDMSの作製工程

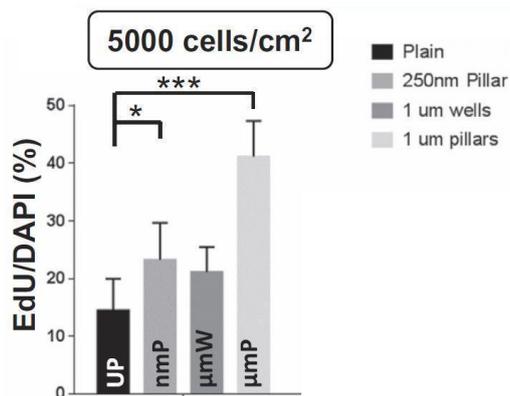


図 4-8 様々な表面でのヒト角膜内皮細胞の増殖率⁴⁻¹⁷⁾抜粋

4.3.2 微粒子列をマスクとした Si 基板のエッチング

本項では、微粒子列をマスクとした Si 基板のエッチングについて説明する。まず、2.3.4 項のとおり、ピラニア処理を施した Si 基板に OTS-SAM で親水/疎水パターンを設ける。この基板を $\phi 1\mu\text{m}$ の SiO_2 微粒子が分散した懸濁液から引き上げ、親水部に微粒子を整列させる。次いで、図 4-8 に示す RIE 装置（コンパクトエッチャー FA-1K, Samco）を用いて、 CF_4 ガス供給量を 20sccm, RF POWER を 100W, そしてエッチング時間 5~10 分間の条件のもとエッチングを行う。Si 基板上に整列した微粒子がマスクの役割を果たし、エッチング深さに勾配が生じる。最後に、基板上に残存している微粒子を超音波洗浄機で脱離させる。なお、本研究では、特にエッチング時間を変えることで形状の制御を行っている。

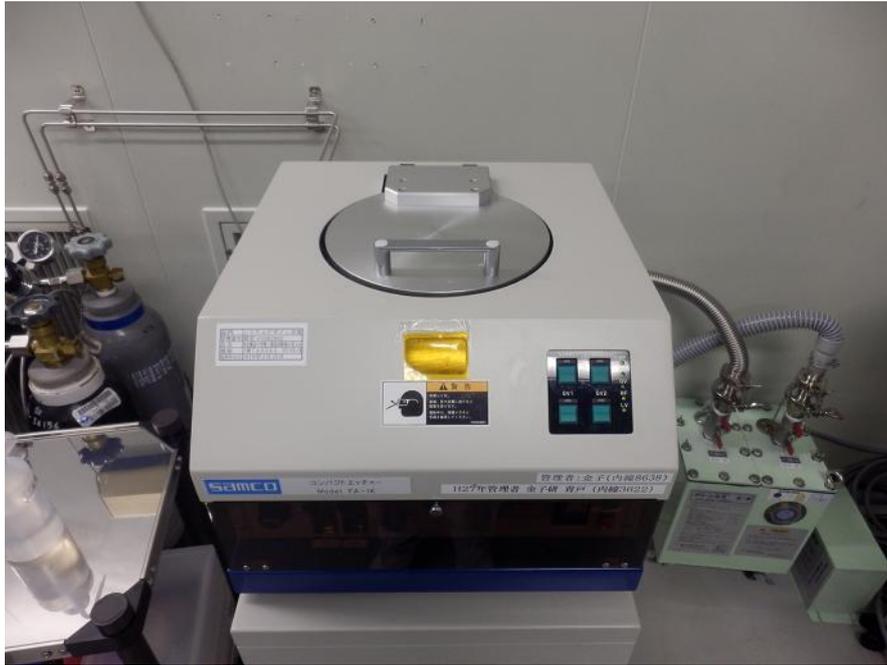
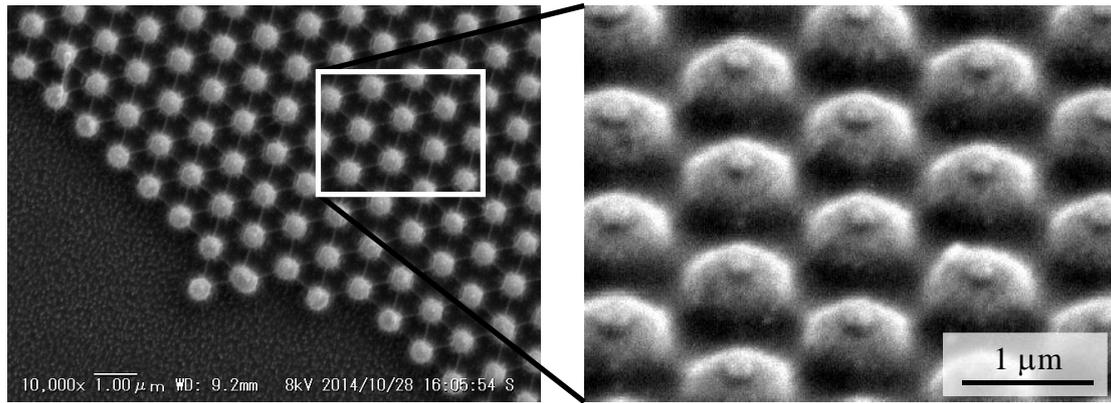
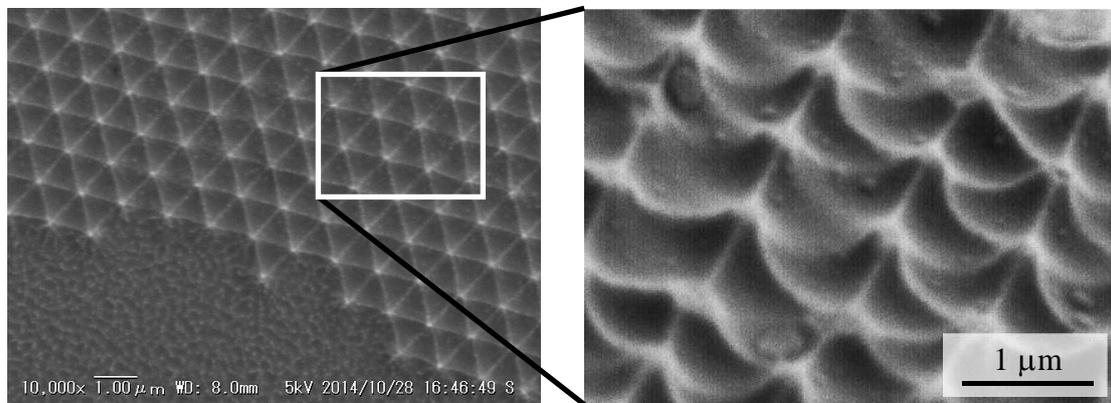


図 4-8 コンパクトエッチャー (RIE 装置)

図 4-9 は、上記の方法で微細構造化した Si 基板の SEM 像である。図 4-9(a)はエッチング時間が 5 分間のものを、(b)は 7 分間のものを示している。それぞれ、マスクとした微粒子列と同じように、六方最密に配列した微細構造が確認できる。また、構造の頂点間の距離はマスクとした微粒子の粒径と同じく $1\mu\text{m}$ であり、培養する細胞の代表寸法に比べ小さい値となっている。このような微細構造が、マスクとした微粒子列と同様、平面と交互に配列している。図 4-9(a)では微細構造はピラー様の構造であり、図 4-9(b)ではテント状のピラー様の構造である。このようにして作製された微細構造は、非常に規則的に配列している。第 1 章で述べたとおり、従来の研究では、細胞培養用の足場の微細構造化をプラズマ処理等で行っている。従って、微細構造には規則性が無く、足場全体で一様な形状ではない。これに対し、本研究で作製した規則配列している微細構造を用いることで、細胞への影響を正確に知ることができると考えられる。なお、エッチング時間に伴って形状が変化することは、以下が原因として挙げられる。微粒子をマスクとして Si ウエハをエッチングした場合、その時間経過に伴う形状は図 4-10 のように変化すると考えられる。すなわち、エッチングは最初、微粒子間の空隙から開始され、エッチングによる微粒子の形状変化にともなってエッチングの範囲が拡大していく。この際、Si ウエハに形成される微細構造には微粒子の球形状に従った勾配が発生する。



(a) エッチング時間5分



(b) エッチング時間7分

図4-9 微細構造化した Si 基板の SEM 像. (a)エッチング時間 5 分, (b)エッチング時間 7 分.

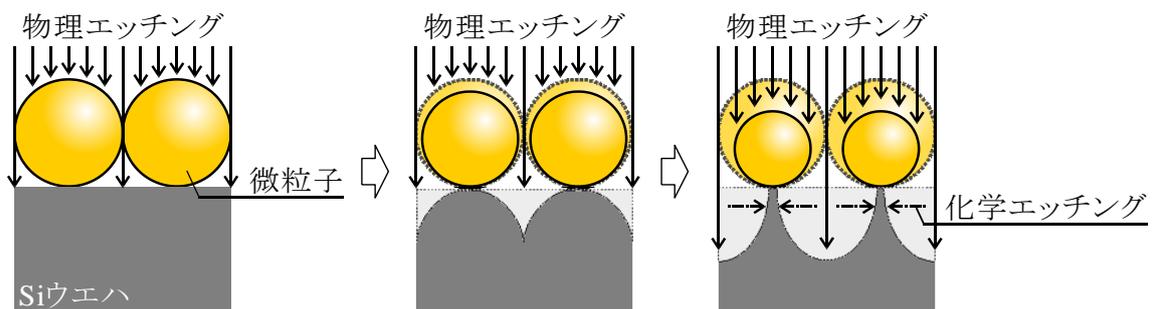


図4-10 微粒子をマスクとした Si ウエハの, 時間経過に伴う形状変化

4.3.3 微細構造の形状転写

本節では、PDMS による形状転写について説明する。微細構造の幾何的特徴量のみに着目すれば、細胞培養に適用する足場は、モールドとなる微細構造化した Si 基板と、その反転形状を転写した PDMS にすればよい。しかし、基板のヤング率が細胞の接着に影響を及ぼすという研究結果もあり、比較の際には両者のヤング率等をなるべく統一することが望ましい⁴⁻¹⁸⁾。更に、観察の際には透明材料であることが望ましい。そこで、本研究では、Si 基板をモールドとして作製した PDMS を新たなモールドとして用いて、再び PDMS のモールドニングを行うことで、元々の Si 基板の形状を持った PDMS を作製する。

PDMS をモールドとして同じ材料である PDMS をモールドニングする場合、モールドとなる PDMS に剥離剤を塗布することが必要である⁴⁻¹⁹⁾。本論文では剥離剤として OPTOOL HD-1100 (ダイキン工業, 以下, オプツール) を用いた。オプツールの修飾方法を図 4-11 に、説明を以下に示す。

- ① モールドとする PDMS を、オプツールに 1 分間浸漬する。
- ② 温度 70°C, 湿度 90% の環境で 1 時間静置し、反応させる。
- ③ PDMS をリンス剤 OPTOOL HD-TH に浸漬させ、リンス処理を行う。
- ④ 温度 23°C, 湿度 65% の大気中で 24 時間静置する。

まず、剥離剤の効果を検証するため、ラインアンドスペース形状のモールドで PDMS を作製した。更に、その表面に上記の手順でオプツール処理を施した。図 4-12 はこの方法で作製した、ラインアンドスペース構造を持つ PDMS の SEM 像である。PDMS は、元のモールドと同じ形状である幅 50 μm , 間隔 50 μm のラインアンドスペース形状となっている。凸部付近で顕著に見られる亀裂のような線は、SEM 観察時に行った Au のコーティングによって発生したものであると考えられる。

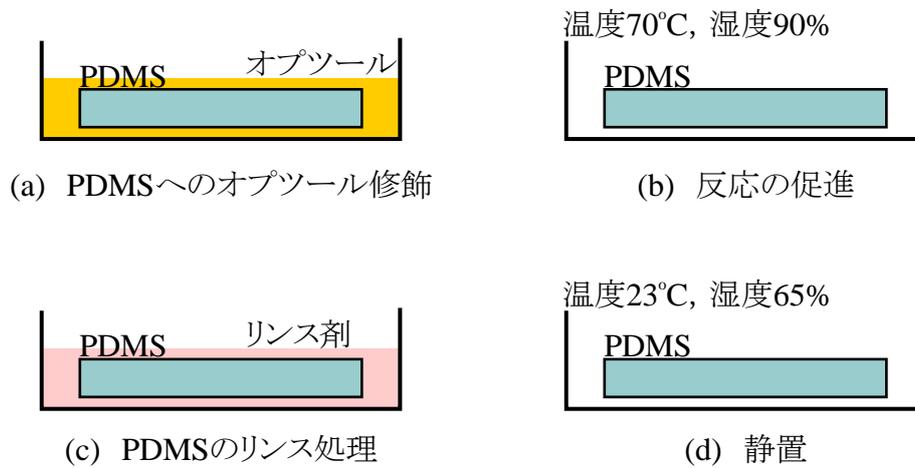


図 4-11 PDMS へのオブツール修飾工程

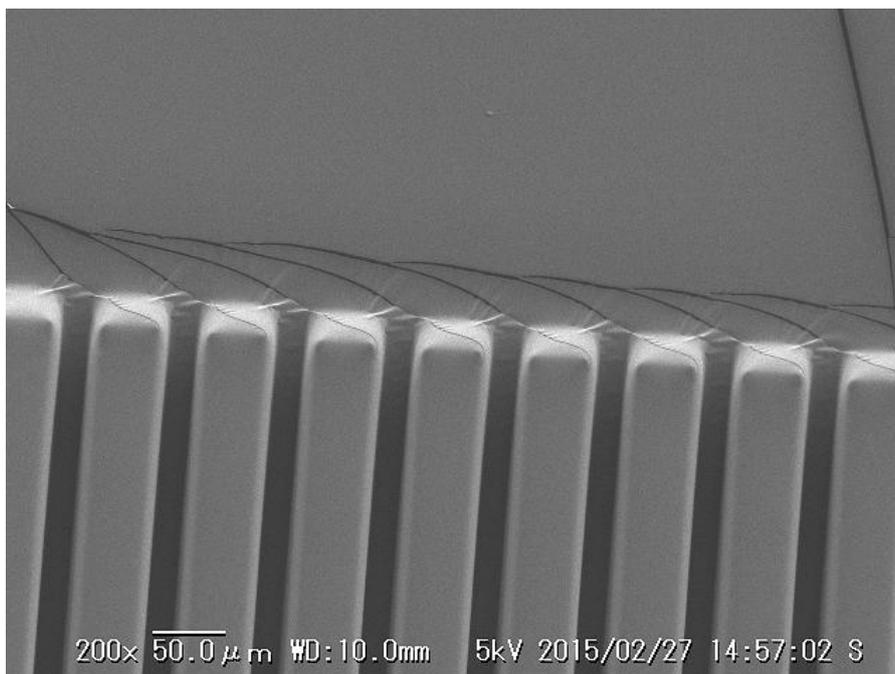


図 4-12 オブツール修飾を施した PDMS モールドの SEM 像

上記の工程で作製した PDMS をモールドとして、新たに PDMS を以下の手順でモールドイングした。

- ① 前述した PDMS をモールドとし、PDMS を流し込む。
- ② 微細構造の形状を正確に転写するため、真空脱気を1時間行う。
- ③ 70°C で1時間、硬化させる。

図 4-13 は、本手法で PDMS をモールドとして作製した PDMS の SEM 像である。元のモールドおよび図 4-9 と同じく、幅 50 μm 、間隔 50 μm のラインアンドスペース形状となっている。図 4-9 で顕著に見られた亀裂のような線は、これをモールドとして作製した図 4-10 には見られない。以上の結果から、本手法を用いて PDMS への剥離剤の修飾およびこれを新たな PDMS のモールドとすることができることが明らかとなった。

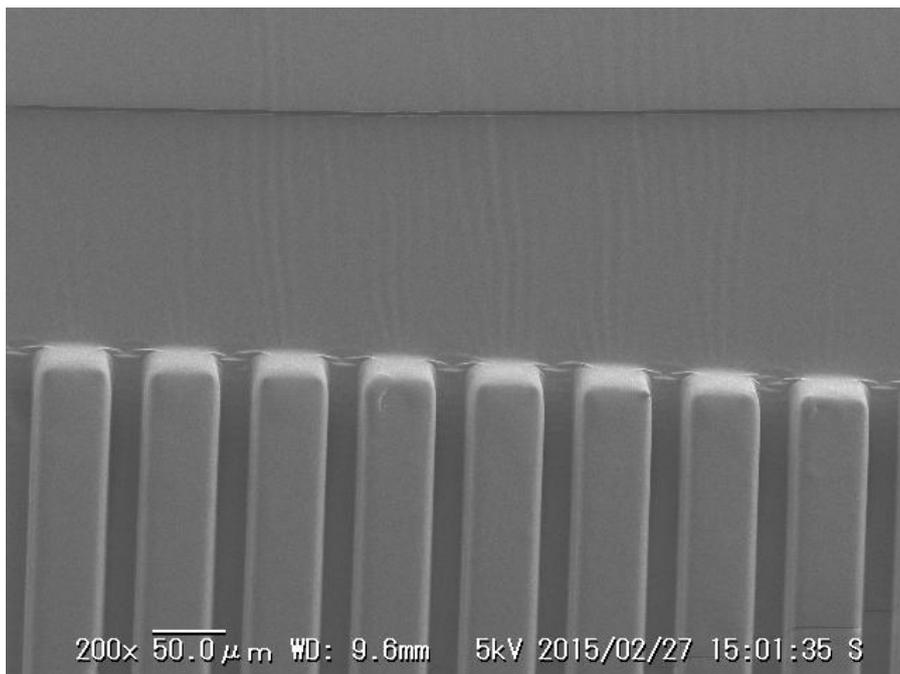


図 4-13 PDMS をモールドとしてモールドイングされた PDMS の SEM 像

4.3.4 微細構造化 PDMS の作製結果

剥離剤を用いることで、PDMS をモールドとして PDMS の形状転写ができることがわかった。そこで、RIE により微細構造化した Si 基板をモールドとした PDMS への形状転写、およびその PDMS をモールドとした PDMS への形状転写を試みた。作製の工程は上記と同様である。マスクとする微粒子列は、第 3 章で作製したものと同様、幅が約 $40\mu\text{m}$ 、間隔が約 $60\mu\text{m}$ のものを採用した。すなわち、PDMS 平面上に、幅が約 $40\mu\text{m}$ の微細構造化された領域が形状転写される（図 4-14）。図 4-15 はこの方法で作製した微細構造化 PDMS の、微細構造部分の AFM 像であり、表 4-1 はこの部分の幾何形状をまとめたものである。AFM 像では、左に鉛直方向から見た像を、右に鳥瞰図および断面曲線を示している。Scaffold *a*, *c*, *e* は、微細構造化した Si をモールドとして作製している。Scaffold *b* は、Scaffold *a* を、Scaffold *d* は Scaffold *c* を、そして Scaffold *f* は Scaffold *e* をモールドとして、それぞれ作製している。微細構造化した Si をモールドとして作製した PDMS ではホール様の形状が、これをモールドとして作製した PDMS ではピラー様の形状が観察できた。すなわち、2 回の転写によって元の Si の構造と同様の構造が作製できた。どの構造も、構造の頂点（凸部）間を結ぶような線も確認できる。これは、図 4-9(b)でも同様に観察された、RIE のマスクに微粒子を用いたことに由来する形状であると考えられる。また、微細構造の設けられていない PDMS 平面の幾何的特徴量は、 $Ra = 2\text{nm}$ であり、微細構造化した部分と比べて平坦であることがわかる。今回用いた AFM に付属するソフトでは、算術平均粗さは計測可能であるが歪度および尖度は計測できないため、これらの特徴量については、計測した数値データを Microsoft Excel に入力し、定義に基づき計算することで求めている。ただし、同ソフトの設定では基準を 0 とした尖度の値が表示されてしまうので、尖度に関してのみすべての値に 3 を足している。同じ Si モールドが元となって作製された PDMS 同士を比較した場合、その算術平均粗さおよび尖度はおおむね同じ値となっている。一方で、歪度に関しては両方で符号が逆転しており、その絶対値は近い値となっている。

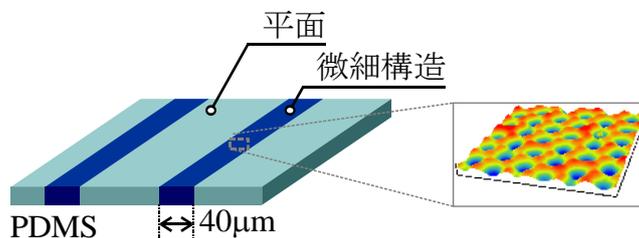
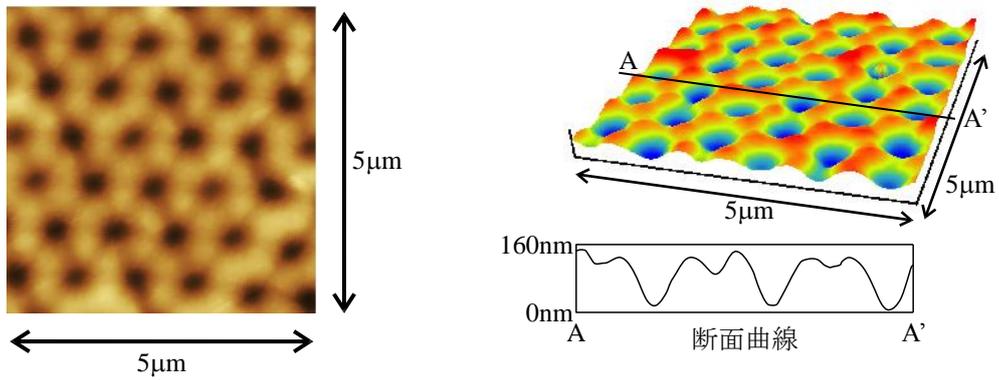
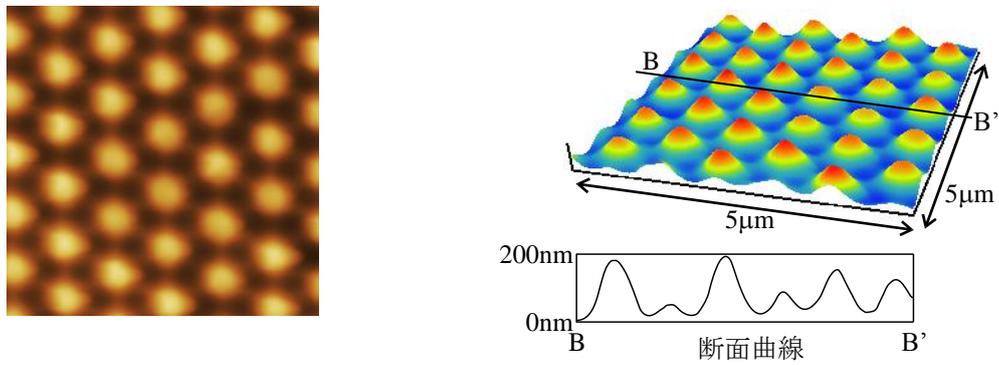


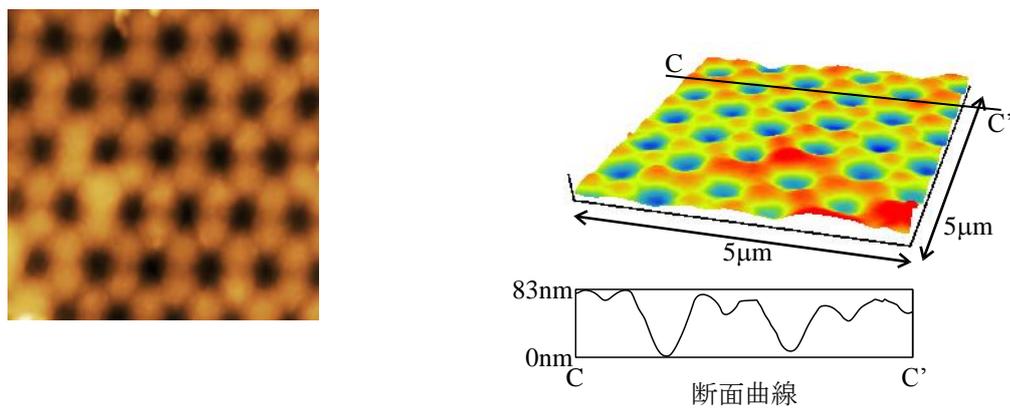
図 4-14 微細構造化した PDMS の模式図



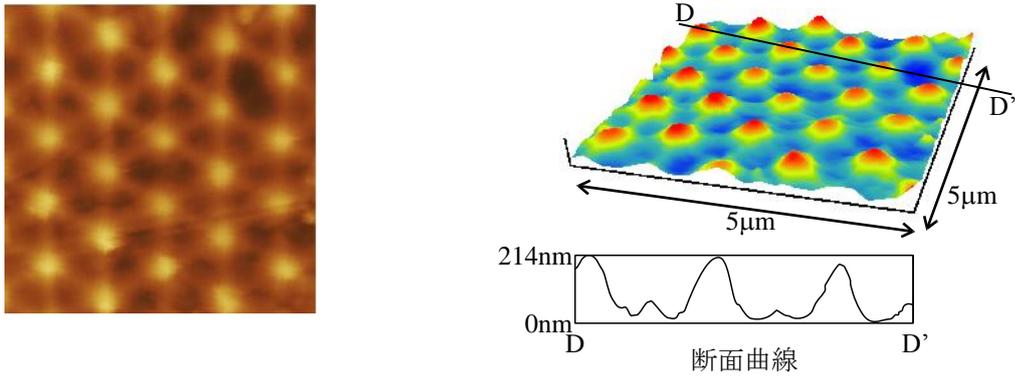
(a) Scaffold *a* $Ra = 40 \text{ nm}$, $Rsk = -0.6$, $Rku = 2.7$



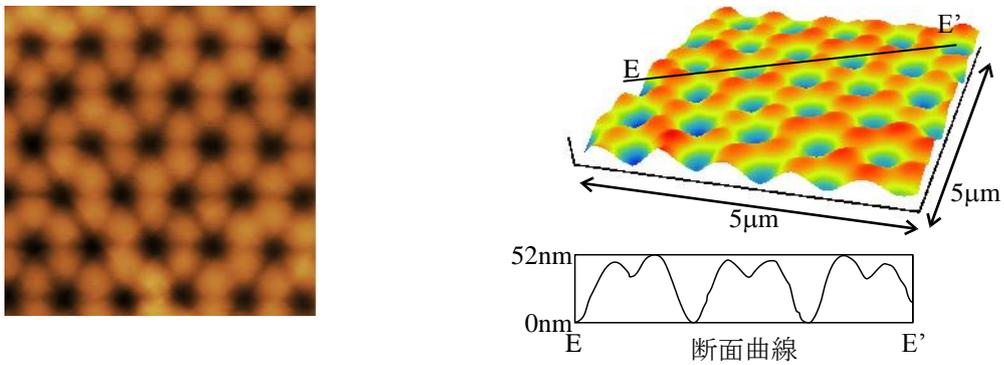
(b) Scaffold *b* $Ra = 46 \text{ nm}$, $Rsk = 0.8$, $Rku = 2.7$



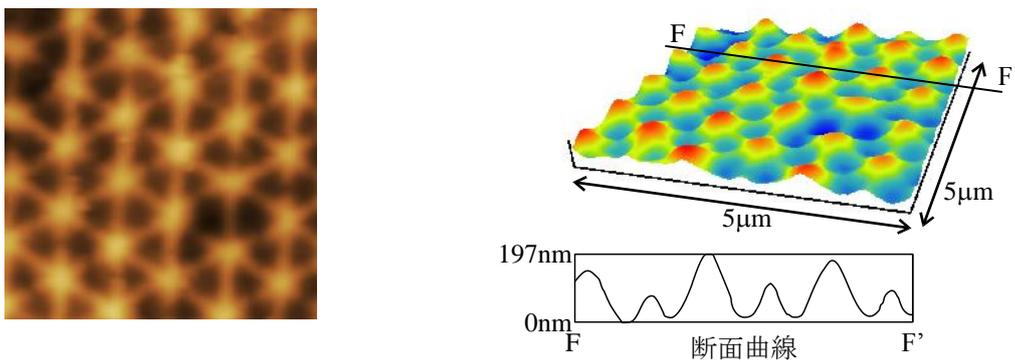
(c) Scaffold *c* $Ra = 22 \text{ nm}$, $Rsk = -0.2$, $Rku = 3.1$



(d) Scaffold *d* $Ra = 19 \text{ nm}$, $Rsk = 0.2$, $Rku = 3.3$



(e) Scaffold *e* $Ra = 30 \text{ nm}$, $Rsk = 0.5$, $Rku = 2.8$



(f) Scaffold *f* $Ra = 13 \text{ nm}$, $Rsk = -0.3$, $Rku = 3.0$

図 4-15 微細構造化 PDMS の AFM 像と幾何的特徴量

表 4-1 微細構造化 PDMS の幾何的特徴量

Scaffold	Sa [nm]	Ssk	Sku	概形
<i>a</i>	40	-0.6	2.7	ホール
<i>b</i>	46	0.8	2.7	ピラー
<i>c</i>	22	-0.2	3.1	ホール
<i>d</i>	19	0.2	3.3	ピラー
<i>e</i>	30	0.5	2.8	ホール
<i>f</i>	13	-0.3	3.0	ピラー

4.4 微細構造への細胞接着

4.4.1 実験方法および条件

前節で作製した微細構造を足場として、PC12 細胞を播種・培養する。PDMS 表面はあまり細胞の接着性が良くないため、ポリスチレンをコーティングする。また、コンタミ防止のため細胞播種前に UV 滅菌を 12 時間行う。培養等の条件は 3.3 節と同様、播種濃度 $5000\text{cells}/\text{cm}^2$ 、温度 37°C 、湿度 100%、気相 5% CO_2+Air である。以上の手順を図 4-16 に示す。

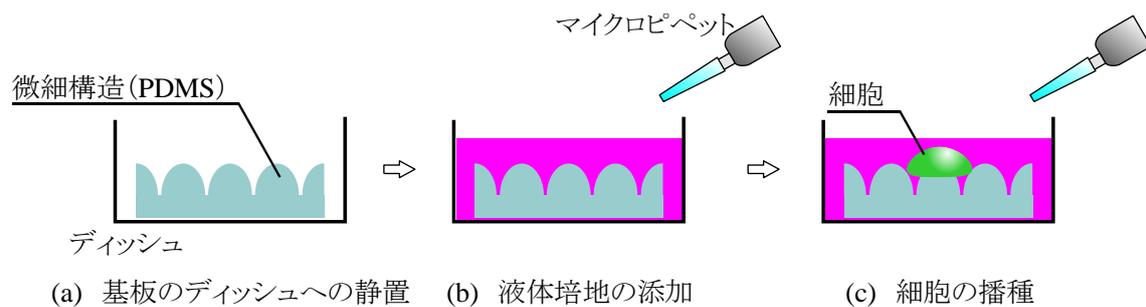


図 4-16 微細構造化 PDMS 上での細胞培養手順

4.4.2 実験結果および考察

微細構造化した PDMS を足場として適用し、その細胞接着におよぼす影響を調査した。図 4-17 は、微細構造化した PDMS 上で PC12 細胞を培養した、播種後 24 時間時点での位相差顕微鏡像である。すべての基板で、細胞が微細構造上に接着していることが確認できる。

一方で、その細胞の数は基板によって異なっている。特に、図 4-16(a)では、多くの細胞が微細構造上に接着しているが、(b)では平面部分に接着した細胞も多く存在している。ただし、どの基板においても、微細構造化した微粒子列を足場とした場合の方が、微細構造部に接着した細胞の数が多かった。

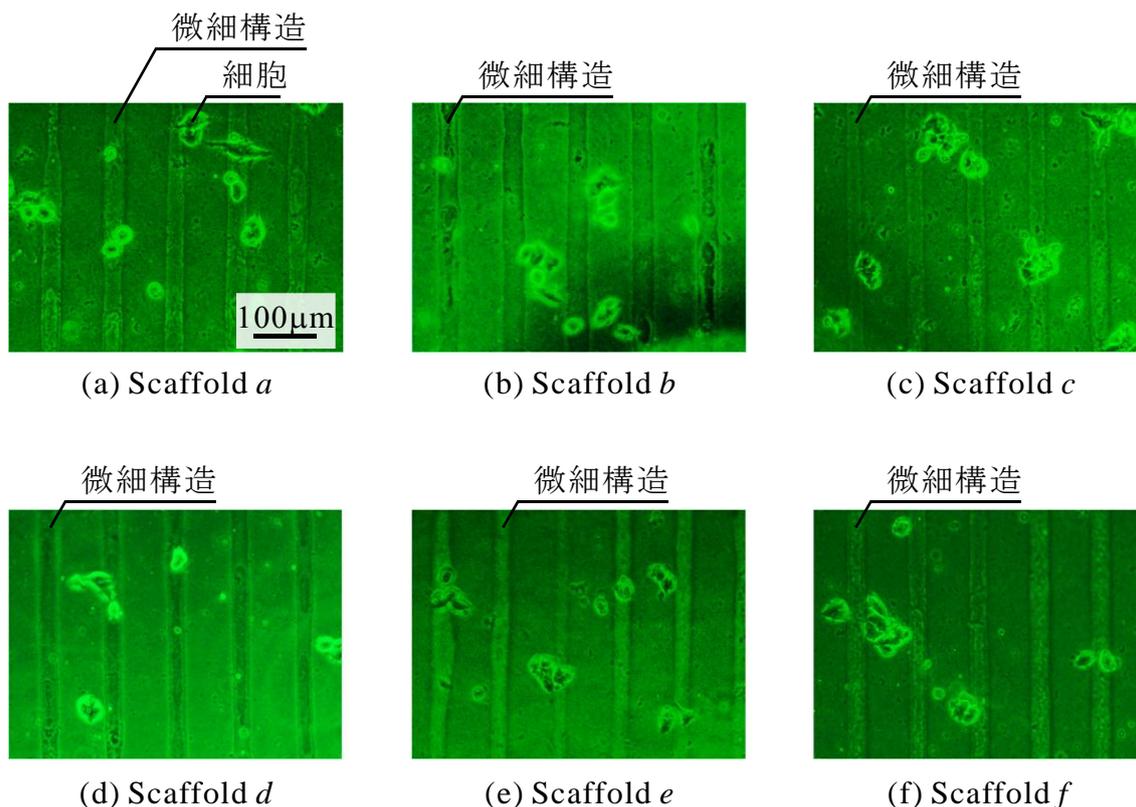
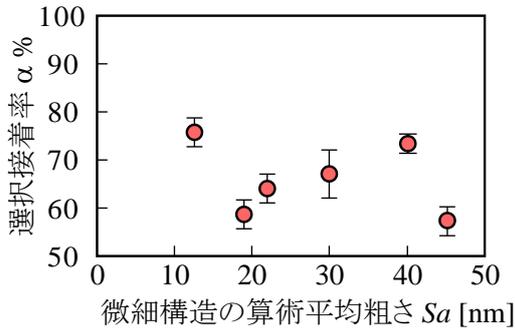
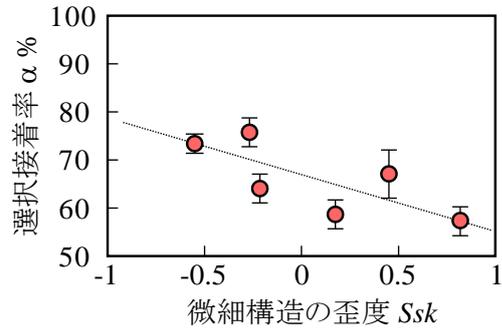


図 4-17 微細構造化した PDMS 上での細胞培養

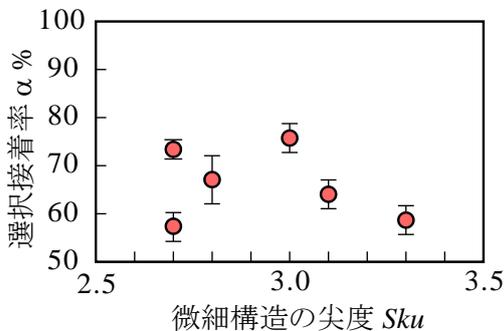
図 4-18 は、以上の各基板における選択接着率 a をまとめたものである。それぞれ、(a)が算術平均粗さ Sa の影響、(b)が歪度 Ssk の影響、(c)が尖度 Sku の影響についてまとめている。(a)および(c)では、それぞれの幾何学的特徴量に対して、選択接着率 a との相関は見られない。一方で、(b)においては強い相関が見られ、歪度の低下に従って a が高くなる。これは特に、以下のサンプルに着目することで明らかである。Scaffold a と b, Scaffold c と d については、 Sa および Sku の値がそれぞれほぼ同程度であるが、 Ssk の値は符号が逆転している。そして、Scaffold a と b の選択接着率 a および Scaffold c と d の選択接着率 a は、それぞれ異なる値をとっている。



(a) 算術平均粗さ Sa が選択接着率 α におよぼす影響



(b) 歪度 Ssk が選択接着率 α におよぼす影響



(c) 尖度 Sku が選択接着率 α におよぼす影響

図 4-18 微細構造の幾何特徴量が細胞の接着におよぼす影響

ここで、影響するパラメータとして算術平均粗さ、歪度、そして尖度の 3 種類が存在しているため、どのパラメータの影響が支配的であるかはわからない。そこで、多変量解析を行うことで、支配的なパラメータを調査した。行った解析は重回帰分析であり、表 4-2 は解析の結果である。自由度調整済みの決定係数と F 検定に基づく p 値は、どちらも今回の解析の信頼性を示す値であり、前者は 1 に、後者は 0 に近いほど解析結果の信頼性が良い。今回の場合、自由度調整済みの決定係数が約 0.8、F 検定に基づく p 値がほぼ 0 であり、信頼できる解析結果であると言える。算術平均粗さ、歪度、そして尖度の p 値は、選択接着率の値が変動する要因であるかどうかを判断するための値であり、これが 0.05 未満であれば影響すると言える。今回の解析結果では、各パラメータのうち歪度のみが $p < 0.05$ であるため、選択接着率の値には歪度の値の大小が支配的と言える。

表 4-2 重回帰分析の結果

自由度調整済みの決定係数	8.2×10^{-1}
F検定に基づくp値	1.5×10^{-7}
算術平均粗さSaのp値	1.5×10^{-1}
歪度Sskのp値	$4.2 \times 10^{-7} (< 0.05)$
尖度Skuのp値	6.6×10^{-2}

加えて、各グラフにおいて相関性を調査した所、その相関係数はそれぞれ、選択接着率と算術平均粗さとの関係が-0.3、選択接着率と歪度との関係が-0.9、そして選択接着率と尖度との関係が-0.3であった。相関係数とはその名の通り、二つの物理量の相関関係を表す量であり、今回の場合は以下の(4-7)式で定義できる。

$$(\text{相関係数}) = \frac{(\text{共分散})}{(\text{選択接着率 } \alpha)(\text{幾何的特徴量})} \quad (4-7)$$

相関係数の正負は比例・反比例の関係を表し、その絶対値が 1 に近いほど両者の間に高い相関関係がある。以上の重回帰分析の結果と相関係数から、選択接着率 α に最も強く影響しているのは、今回の実験条件下では歪度 Ssk の値と考えるのが妥当である。

仮足先端の焦点接着斑の表面積は、遊走時には約 $0.25\mu\text{m}^2$ であるという報告がある⁴⁻²⁰⁾。そして、PC12 細胞では、接着後の安定状態で $1\mu\text{m}^2$ まで大きくなるという報告もある⁴⁻²¹⁾。これらの関連研究での調査結果をもとに考えると、以下のような考察ができる。本論文で対象としている微細構造は周期性の良い構造であり、その空間波長（ピッチ）は微粒子の粒径と同じく $1\mu\text{m}$ である。これは、接着状態の焦点接着斑と同等のサイズである。いま、PC12 細胞が遊走の過程で微細構造に到達し、その接着斑を大きくして安定な接着状態になろうとした時、歪度が大きい構造ではピラーをまたぐようにして接着しなければならない。これと比較すると、歪度が小さい構造では接着面積が大きくなるよう接着できると考えられる。

次いで、微細構造が細胞の増殖に及ぼす影響についても、増殖率 β を以下で定義し、調査した。

$$\beta = N_{m48} \times 100 / N_{m24} \quad (4-8)$$

ここで、 N_{m24} および N_{m72} は、それぞれ播種後 24 時間および 72 時間時点での微細構造上に接着している細胞の数である。微細構造化した PDMS 上での細胞培養を継続して行い、微

細構造上での細胞の増殖を観察した。第 3 章での微粒子列の結果と同様ならば、微細構造に沿った増殖が見られるはずである。図 4-19 は播種後 72 時間時点での基板の位相差顕微鏡像である。なお、図 4-19 は図 4-17 と同一箇所を撮影している。すべての基板で、接着している細胞の数が増えており、細胞が増殖していると判断できる。特に、微細構造に接着している細胞は微細構造のある方向に増殖している。増殖率 β を算出したところ、もともとの α にかかわらず、すべての基板でその値はほぼ 2 となった。つまり、微細構造上に接着したほとんどの細胞の増殖方向は、微細構造に沿っているということである。ただし、平面に接着した細胞について、これが微細構造に遊走することではなく、微細構造のある方向へ増殖もしていないため、選択性自体が上がることはなかった。

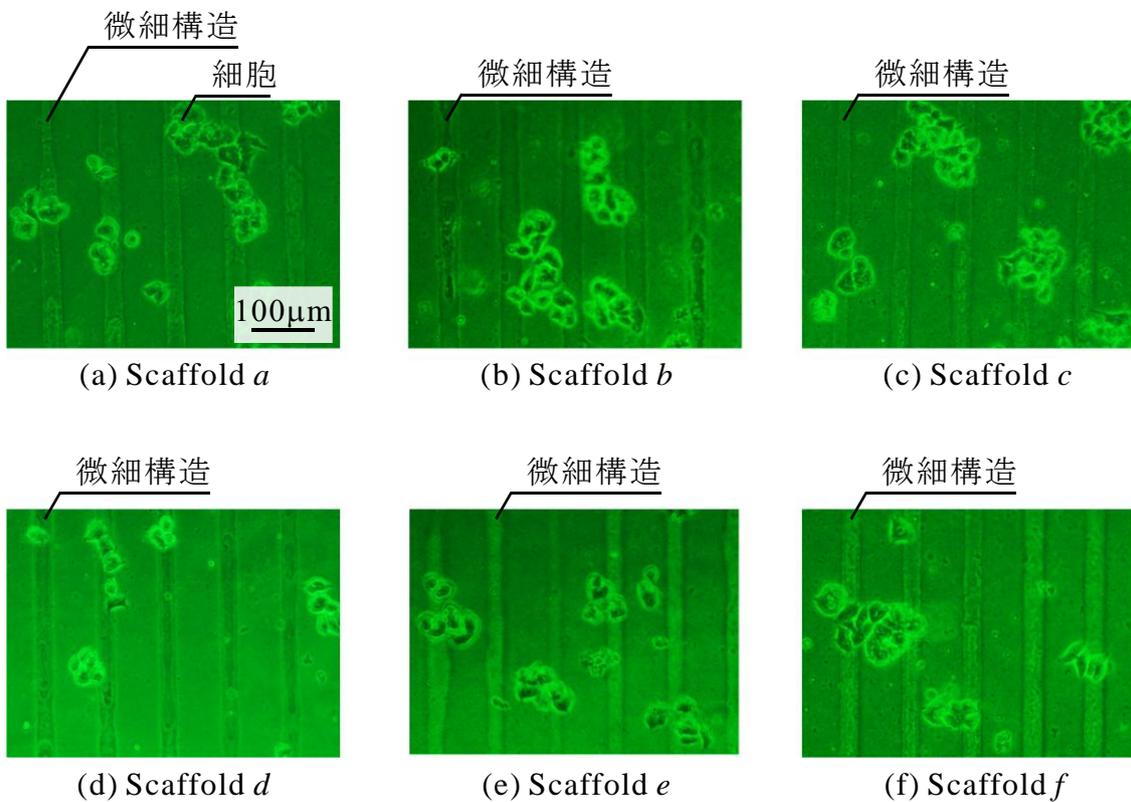


図 4-19 微細構造化した PDMS 上での細胞増殖

4.4.3 細胞の接着モデルの提案とその検証

ここまでで、細胞の接着には足場となる表面の歪度が需要であることがわかった。先行研究においても、接着する表面の微細な構造が細胞の接着面積に影響を与えられている。つまり、微細構造上の細胞を液滴に見立て、Wenzel のモデル⁴⁻²²⁾のように粗い面全

体と細胞が接着している場合、平面と接着しているよりも接着面積が大きくなる。一方で、Cassie-Baxter のモデル⁴²³⁾のように、細胞と微細構造の間にトラップが存在する場合、平面と接着しているよりも接着面積が小さくなる。例えば、ナノピラー構造を HeLa 細胞の接着の足場として適用したところ、細胞の接着力が弱くなったという報告がある⁴²⁴⁾。

本研究では、細胞をひとつの材料と見立て、この現象の解明を試みる。細胞が接着に不安定な場所（平面）から安定する場所（微細構造）へ遊走するさまは、薄膜の島状成長における表面拡散と似た挙動である。この成長のことを Volmer-Weber モード（VW モード）と呼び、**図 4-20** で示すようにして基板に薄膜の核が形成される⁴²⁵⁾。すなわち、薄膜材料の原子は基板表面に衝突した後、その表面を拡散する。その後、同じく拡散している原子や後述する安定核に衝突し、クラスタを形成する。このクラスタを構成する原子数が一定以上となると、それは安定核となる。安定核が成長を続け、他の安定核とコアレスセンスし、薄膜が形成されていく。この核形成は、薄膜の原子がエネルギー的に有利な状態に移行するため起こると考えられている。このような成長が見られる条件は、基板-薄膜原子間の結合の力を F_1 とし、薄膜原子-薄膜原子間の結合の力を F_2 とした時、 $F_1 < F_2$ のような基板と薄膜材料を選択した時であると言われている。細胞は一般に、集団で存在する方が安定しており、単純な平面で培養した場合、複数の細胞が寄り集まるようにして接着していくことから、細胞-細胞間の結合の力が基板-細胞間に比べ強いと考えられる。細胞の場合、薄膜の原子に相当するものが細胞であり、播種直後に平面に接着した細胞は遊走をはじめ。そして、接着に有利な場所（微細構造）に衝突して、安定となると考えれば、細胞の選択的接着もエネルギーで解釈することが可能であると考えられる。つまり、細胞が平面に接着している状態よりも、微細構造に接着している状態の方がエネルギー的に安定であれば、全体として状態は後者に遷移していくと考えることができる。

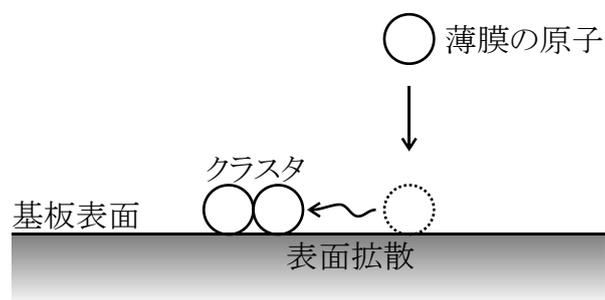


図 4-20 Volmer-Weber モードにおける薄膜原子の表面拡散とクラスタ形成

ここで、細胞の接着について、本研究では図4-21で示したモデルを参考としている⁴⁻²⁵⁾。細胞の伸展方向には仮足と呼ばれる機構が形成される。糸状仮足はその先端に存在する細長い構造であり、多数の受容体タンパク質で周囲の環境を検知する。葉状仮足には焦点接着 (focal adhesion) が存在し、細胞の遊走に際し巨大化 (focal complex) し、遊走の支点となることが知られている⁴⁻²⁶⁾⁴⁻²⁷⁾。細胞の仮足ではない部分と基質との間は、インテグリンで構成される接着機構を介して接着していることが分かっている。すなわち、この接着機構の数が多きほど、安定した細胞の接着となる。

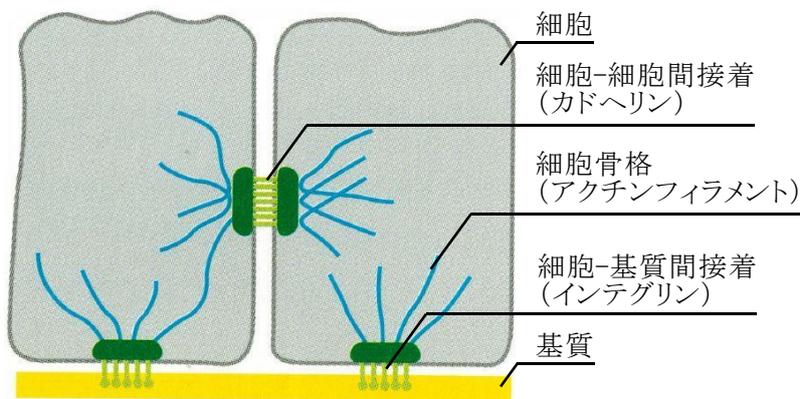


図4-21 細胞の接着モデル⁴⁻²⁶⁾

いま、図4-22のように、一つの細胞に着目する。基板には、微細構造化された領域と平面とが存在しているとする。細胞が平面に接着している状態を状態1、微細構造に接着している状態を状態2、そして細胞が浮遊している状態を状態3と定義する。各状態の系全体のエネルギーを $E_1 \sim E_3$ とすれば、各々の値は

$$E_1 = S_s \gamma_{s/m} + (S_f - S_{f/c}) \gamma_{f/m} + S_{c/m} \gamma_{c/m} + S_{f/c} \gamma_{f/c} \quad (4-9)$$

$$E_2 = S_f \gamma_{f/m} + (S_s - S_{s/c}) \gamma_{s/m} + S_{c/m}' \gamma_{c/m} + S_{s/c} \gamma_{s/c} \quad (4-10)$$

$$E_3 = S_s \gamma_{s/m} + S_f \gamma_{f/m} + S_{c/m}^* \gamma_{c/m} \quad (4-11)$$

となる。ここで、 S は表面積を、 γ は単位面積あたりの表面エネルギーを意味しており、それぞれの示す物理量は表4-3でまとめている。細胞が平面に接着した状態から、遊走して微細構造上に接着した状態に遷移するためには、少なくとも $E_1 - E_2 > 0$ であることが必要である。式(4-9)および(4-10)より、これを計算すると、

$$E_1 - E_2 = S_{f/c} (\gamma_{f/c} - \gamma_{f/m}) + (S_{c/m} - S_{c/m}') \gamma_{c/m} + S_{s/c} (\gamma_{s/m} - \gamma_{s/c}) > 0 \quad (4-12)$$

となる。ここで、表面の微細構造化に伴う表面（界面）エネルギーの変化は、接触面積の変化に伴う現象であるため、単位面積あたりの界面エネルギーが変わるわけではない。したがって、平面と微細構造の材質が同じであれば、 $\gamma_{f/c} = \gamma_{s/c}$ であり、 $\gamma_{f/m} = \gamma_{s/m}$ である。このことから、式(4-11)は

$$E_1 - E_2 = (S_{f/c} - S_{s/c})(\gamma_{f/c} - \gamma_{f/m}) + (S_{c/m} - S_{c/m}')\gamma_{c/m} > 0 \quad (4-13)$$

と表すことができる。接着面積や単位面積あたりの表面エネルギーは正の値であるため、式(4-13)が正となるためには、 $(S_{f/c} - S_{s/c})(\gamma_{f/c} - \gamma_{f/m})$ および $(S_{c/m} - S_{c/m}')$ が正となればよい。

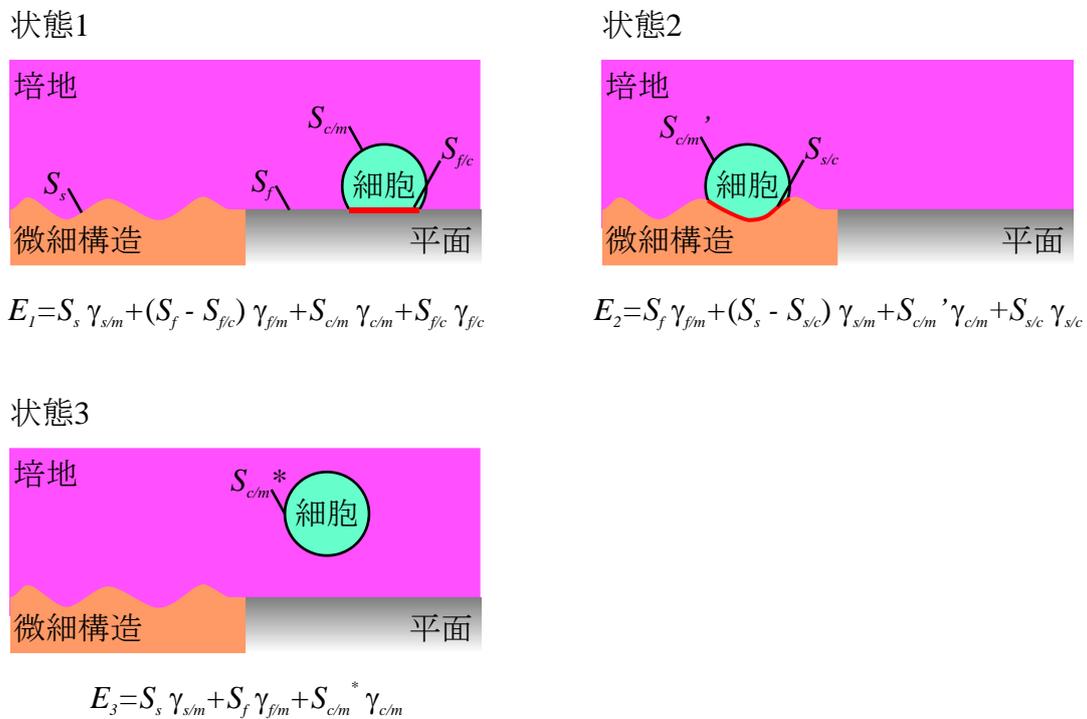


図 4-22 細胞の位置と系のエネルギーの関係

表 4-3 状態 1~3 で対象とする物理量の定義

S_s	微細構造の表面積	γ_{sm}	微細構造-培地間の単位面積あたりの界面エネルギー
S_f	平面部分の表面積	γ_{fm}	平面部分-培地間の単位面積あたりの界面エネルギー
S_{cm}	細胞-培地界面の面積(状態1)	γ_{cm}	細胞-培地間の単位面積あたりの界面エネルギー
S_{cm}'	細胞-培地界面の面積(状態2)	γ_{sc}	微細構造-細胞間の単位面積あたりの界面エネルギー
S_{cm}^*	細胞-培地界面の面積(状態3)	γ_{fc}	平面部分-細胞間の単位面積あたりの界面エネルギー
$S_{s/c}$	微細構造-細胞間の接触面積		
$S_{f/c}$	平面部分-細胞間の接触面積		

ここで、 $(\gamma_{f/c} - \gamma_{f/m})$ の大小は、以下のように考えることができる。細胞が培地中に浮遊した状態(状態 3)から、平面上に接着した状態(状態 1)に遷移する場合を考える。(ただし、細胞が重力の影響を受けないほど軽い材料であるとする。)この遷移のためには、少なくとも $E_3 - E_1 > 0$ であることが必要である。式(4-9)および(4-11)より、これを計算すると、

$$E_3 - E_1 = (S_{cm}^* - S_{cm})\gamma_{cm} - S_{f/c}(\gamma_{f/c} - \gamma_{f/m}) > 0 \quad (4-14)$$

となる。接着性細胞は培地中に浮遊しているよりも何かに接着している方が安定であり、通常の培養条件では状態 4 から状態 3 への遷移が起きる。前述のとおり、接着面積や単位面積あたりの表面エネルギーは正の値であるため、 $(S_{cm}^* - S_{cm})\gamma_{cm}$ の値にかかわらず $(\gamma_{f/c} - \gamma_{f/m})$ の値は負となればよい。したがって、式(4-13)が正となるためには、 $(S_{s/c} - S_{f/c})$ および $(S_{cm} - S_{cm}')$ が正となればよい。すなわち、微細構造-細胞間の表面積が平面部分-細胞間の表面積よりも大きく、かつ細胞の非接触部の面積が状態 1 よりも状態 2 の方が大きければ、エネルギーで考えると細胞が微細構造上に接着している方が安定であるため、状態が遷移すると考えられる。

上記の仮定の下では、微細構造であればその幾何形状によらず細胞が選択的に接着することとなる。しかし、実際には選択的に接着する細胞の割合は微細構造の特徴量によって差があり、接着しづらい構造なども存在する。これは、以下のように考えられる。まず、状態 1 から 2 への遷移が起こる確率は、式(4-13)の $E_1 - E_2$ の値が大きいほど高くなる。つまり、 $(S_{s/c} - S_{f/c})$ および $(S_{cm} - S_{cm}')$ の値が大きいほど、細胞が微細構造に選択的に接着しやすい。逆に、これらの値が小さい場合、細胞はあまり微細構造に接着しない。特に、微細構造-細胞間の接触面積 $S_{s/c}$ が小さいほど $E_1 - E_2$ の値が小さくなり、結果として細胞が微細構造に接着した状態となりづらくなると考えられる。

以上の考察は、細胞を 1 つの材料として扱い、固体物理学の観点から整理したものである。そのため、細胞の生物学的な要素は考慮していない。本研究では、細胞の微細構造

への接着に関する全体のモデルを、**図 4-23** のように考えている。すなわち、細胞の微細構造への接着は、以下の 3 段階を踏んで行われる。まず、(a)播種後、沈降によって平面に接着した細胞が、遊走を開始する。(b)遊走の過程で、細胞が微細構造の端部に到達する。(c)細胞が微細構造に接着する。この 3 段階の内、(a)~(c)のすべてで、分子細胞生物学に分類される、仮足での認識や接着機構での接着がかかわってくると考えられる。そして、本研究での範囲、エネルギー的に有利な状態へ遷移するという現象は、(b)~(c)にかかわると考えられる。以上より、本研究の成果に加え、分子細胞生物学の観点を取り入れれば、細胞の接着という現象を、より詳細に解明できると考えている。例えば、分子細胞生物学の観点では、接着時の表面積が大きい方が細胞の接着に有利であるということは、以下のように考えられる。まず、糸状仮足やその受容体タンパク質は、本研究で対象としている微細構造に対して非常に小さいため、糸状仮足での微細構造の認識は行われていないと考えられる。先述の通り、細胞の仮足ではない部分と基質との間は、インテグリンが集合した接着機構によって接着している(図 4-21)。この接着機構は細胞-基質間に複数存在しており、細胞の接着面積が大きくなるほどその数も増加し、細胞の接着に有利であると考えられる。このような分子細胞生物学での解釈と、上記の工学的視点での解釈を合わせ、接着機構の数、そしてエネルギーのはたらきにより、細胞の接着位置が決定されると考えられる。

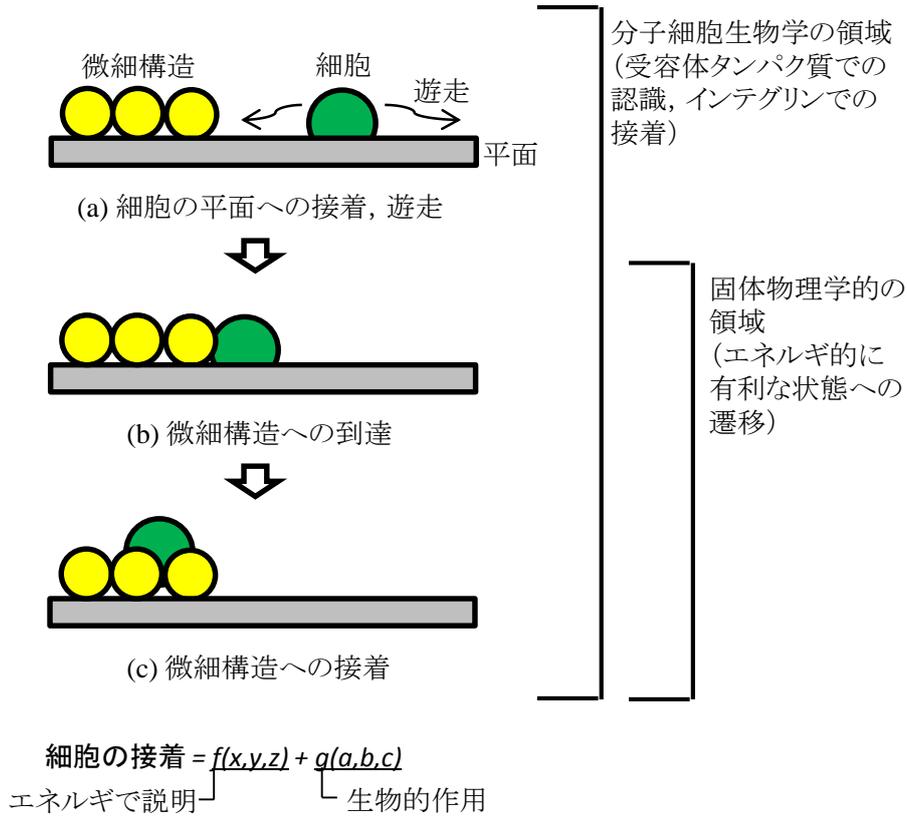


図 4-23 細胞の微細構造への接着モデル

細胞の接着面積が大きくなるような構造とは、どのような構造であるか、以下のように考えた。まず、例として図 4-24(a)および(b)のような、負の歪度を持つ構造と正の歪度を持つ構造を考え、その上に細胞が接着しているとする。これら 2 つの構造が、共通の粗さ曲面を持つとすれば、細胞が表面全体に接着すればその接着面積は同じ値となる。一方で、細胞がそのような表面全体との接着を果たすには、細胞自体の変形が必要となる。例えば、表面全体との接着に、図 4-24 (a)と(b)はそれぞれ(c)と(d)のように変形する必要がある。この変形した領域は、図中に斜線で表している。いま、図 4-24 のような 2 次元平面のみを考え、変形前の細胞を半径 r の半円であると考え、表面の形状を半径 $\frac{r}{3}$ の円が配列したもの (図 4-24(a)(c)) と、その反転形状 (図 4-24(b)(d)) とする。図 4-24(c)および(d)のような変形した領域の面積が、細胞全体の面積に占める割合を計算すると、(c)では約 9%、(d)では約 33% となる。つまり、図 4-24(c)のような接着状態になるほうが、(d)のような接着状態になるよりも、変形しなければならない量が少ない。例えば、細胞の材質を弾性率 $1 \times 10^4 \text{Pa}$ のゲルと仮定し、断面積 A を (細胞の代表寸法が $25 \mu\text{m}$ とした場合) $490 \mu\text{m}^2$ とし、上記の変形量が起こるために加える力 F は、以下のように計算できる。

$$F = 1 \times 10^4 \times A \times \Delta x \quad (4-15)$$

ここで、 Δx は、細胞の変形した領域の面積が細胞全体の面積に占める割合である。これを計算すると、(c)では $0.4\mu\text{N}$ 、(d)では $1.7\mu\text{N}$ となり、約4倍の差が存在することが分かる。このような、接着面積が大きくなるよう接着する際に、細胞の変形量が小さくて済む構造が、細胞の接着に有利であると考えられる。

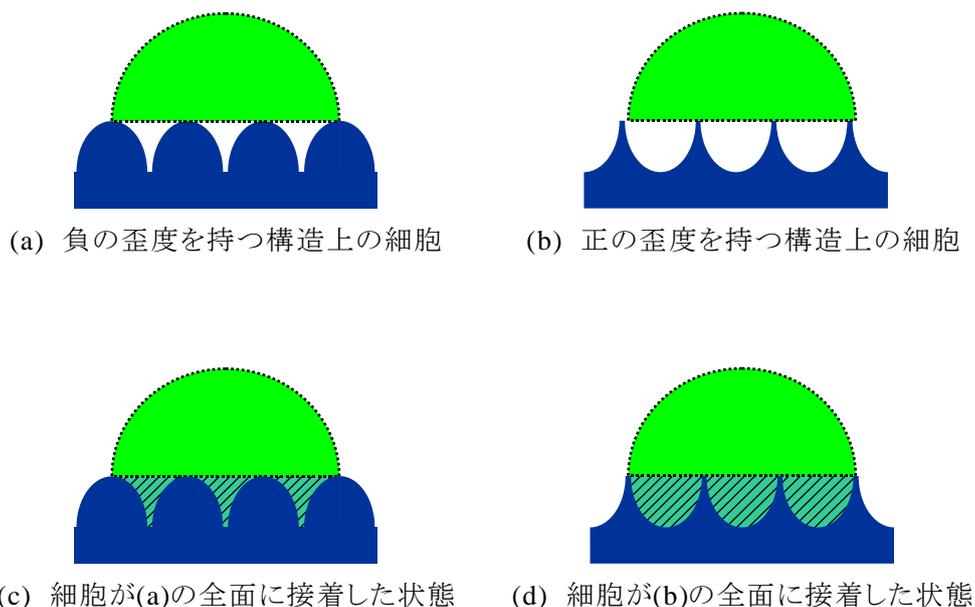


図 4-24 細胞の接着状態の模式図

以上では、歪度が正である構造では細胞の接着面積が小さくなるであろうことを、理論的に説明した。そこで、細胞があまり接着しなかった、歪度が正である微細構造における細胞の接着状態を、実際に SEM で観察した。ただし、SEM はその観察原理から、鏡筒内を高真空にする必要がある。完全に乾燥していない試料を真空下に置くと、試料からガスが発生、このガスの分子により電子ビームが散乱し、像が得られないことが考えられる。このような理由から、細胞は水分を大量に含んだ材料であるので、そのままでは SEM で観察できない。そのため、材料の水分を除去する必要があるが、単純に乾燥させると蒸発時の表面張力によって構造が破壊され、元々の構造が維持されない。そこで、こうした材料の観察には、主に凍結乾燥法や臨界点乾燥法という技術を用いる。両者は水分の除去の際に表面張力を発生させないという点で共通している。凍結乾燥法は、臨界点乾燥法のように数十気圧まで加圧するような作業を必要とせず、工程が簡便である。そこで、本研究では細胞の SEM 観察に凍結乾燥法を採用した。

凍結乾燥法は液体窒素を用いて凍結させる方法が主流であったが、高い凝固点と高い蒸気圧を持つ t-ブチルアルコールを用いることで、液体窒素を用いずに同様の結果を得ることができる⁴⁻²⁸⁾⁴⁻²⁹⁾。凍結乾燥法では材料の水分をエタノールで脱水し、そのエタノールをすべてブタノールに置換する。このブタノールを凍結させて固体の状態にし、そこから気体に昇華させることで、表面張力を発生させることなくブタノールを除去できる。このようにして処理された材料は、水分を含んでおらず、形状も脱水前の状態を維持している。凍結乾燥法の詳細な工程を以下に示す。まず、細胞のタンパク質を固定するため、Karnovsky 溶液を調整し、細胞培養基板をこれに浸漬させる。表 4-4 は Karnovsky 溶液調整のために使用した薬品であり、表中の数値は Karnovsky 溶液 26ml を調整する場合のものである。

表 4-4 Karnovsky 溶液調整に使用する薬品

溶液名	添加量 ml	最終濃度
11.4% パラホルムアルデヒド溶液	3.5	1.5%
0.2mol/L カコジル酸ナトリウム溶液	13.1	0.1mol/L
8% グルタルアルデヒド溶液	9.4	2.9%

Karnovsky 溶液によって固定化した細胞中の水分を脱水するため、濃度の異なるエタノールに、濃度の薄いものからはじめて順次浸漬する。その後、同様の手順でエタノールを t-ブチルアルコールへ置換する。脱水した細胞を、図 4-25 に示す凍結乾燥装置（真空デバイス, VFD-21S）によって処理した。まず、試料を冷蔵庫や試料ステージで凍結する。次いで、真空排気装置で、t-ブチルアルコールを昇華する。



図 4-25 凍結乾燥装置の外観

以上の方法でPC12細胞の接着した微細構造化Siウエハを凍結乾燥し、SEMで観察した。足場としたのは、図4-9(b)で示すようなピラー様の構造である。図4-26は観察したSEM像である。ピラー様の微細構造上に接着した細胞はその接着部をピラー先端に限定されるように接着している。つまり、微細構造-細胞間の接着面積が小さく、エネルギー的に不利であると考えられる。実際に、このような構造は正の歪度を持っており、図4-17(b)の結果と整合する。

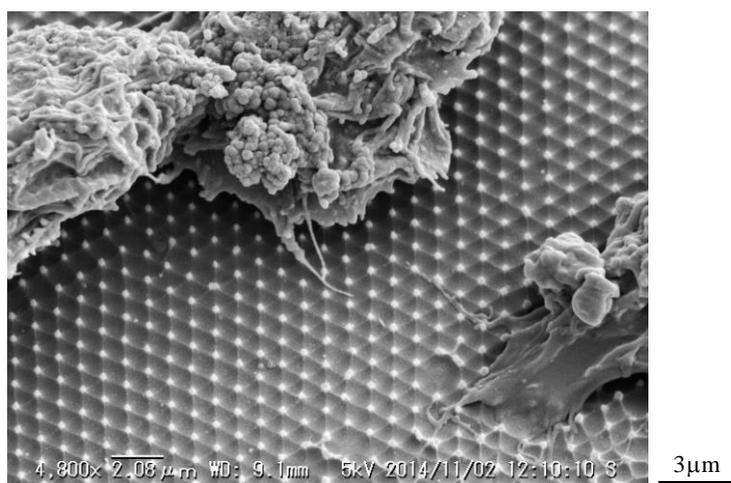


図 4-26 ピラー様構造上に接着した PC12 細胞の SEM 像

以上より，細胞の微細構造との接着面積が，微細構造の幾何的特徴に従って変化することがわかった．ピラーのような，歪度の大きい構造に接着した場合，細胞と微細構造との接着面積は小さくなる．一方で，微粒子のような，歪度の小さい構造に接着した場合，細胞と微細構造との接着面積は大きくなる．(4-13)式より，細胞と微細構造との接着面積の大小がその系のエネルギーに影響するので，よりエネルギー的に安定な状態への遷移が起こり，結果として細胞の接着位置が決定されると考えられる．

4.5 細胞の接着に影響する幾何形状以外の要因の検討

4.5.1 微粒子列と微細構造化 PDMS での細胞接着性の違い

第3章では、微細構造化した微粒子列を対象とし、これを足場として細胞を培養した。結果、多くの細胞が微細構造に選択的に接着している様子が確認できた (図 4-27)。一方、前節では微細構造化した PDMS を対象とし、これを足場として細胞を培養した。この構造においても、多くの細胞が微細構造に選択的に接着している様子が確認できた (図 4-28)。また、このような細胞の接着位置制御には微細構造の幾何的特徴量である歪度 Rsk が大きな影響を与えることが明らかとなった。しかし、微粒子列での選択接着率の高さは PDMS のそれと比較しても高く、幾何形状以外の要因が存在する可能性がある。

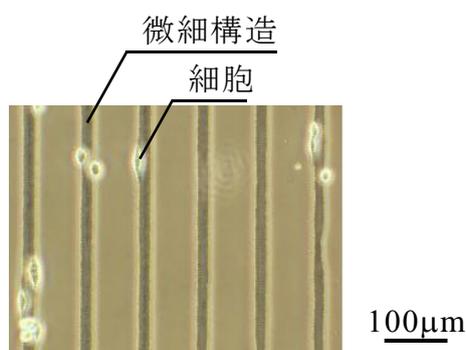


図 4-27 微粒子列上での細胞培養 (図 3-16 抜粋)

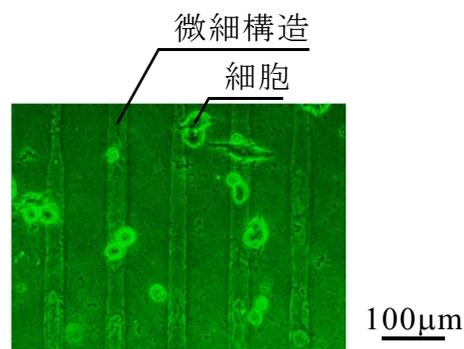


図 4-28 微細構造化 PDMS 上での細胞培養 (図 4-17 抜粋)

細胞培養に関する研究において、栄養供給能および老廃物除去能を持っていることが有効であるとされており、その最たる例が灌流培養である⁴⁻³⁰⁾⁻⁴⁻³⁶⁾。灌流培養では液体培地を灌流させることで、細胞に常に新鮮な培地、つまり栄養の分子を供給し、細胞から代謝された老廃物を除去させている。この他にも、連通多孔質材料を細胞培養の足場とすることで、同様の効果を狙った研究があり、一定の成果を上げている⁴⁻³⁷⁾⁻⁴⁻³⁹⁾。微粒子列には、**図 4-29** に示すように、微粒子と微粒子の間に球形由来の空隙が存在する。構造下部に広がる空間の存在や細胞接着面とその空間を繋ぐ空隙の存在から、微粒子構造を連通多孔質ととらえることもでき、関連研究のように栄養供給能や老廃物除去能を有している可能性がある。具体的には、細胞の活動により消費された栄養が、その濃度勾配に従って微細構造下部から拡散し、微粒子間の空隙から細胞へと供給されると考えられる。そこで本節では、この細胞下部の空間および微粒子間の空隙を埋めた構造を用意し、それらが細胞の接着および成長に影響を及ぼしているか調査する。

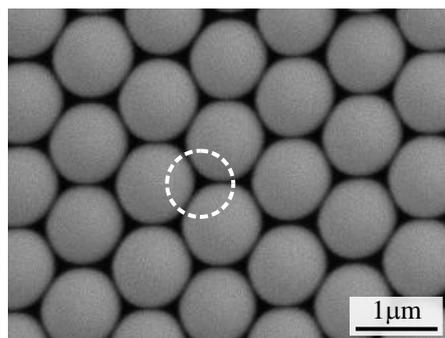


図 4-29 微粒子間に存在する空隙

4.5.2 空隙の無い微粒子列の作製工程

微粒子間の空隙がない構造を作製する手順は、①微粒子の熱溶着、または②樹脂による埋没の2つが考えられる。①とは、ポリスチレンなどの比較的融点が高い材料を用いて、それらが整列した基板を微粒子の融点付近まで加熱し、微粒子同士を熱溶着させるという方法である。②とは、微粒子の整列した基板を、硬化性樹脂を塗布した基板に押し付け、そのまま樹脂を硬化させることで微粒子の下半分を埋めるという手法である。

①の手法では、工程は加熱のみのため簡易なプロセスでの作製が可能であると期待できるが、いずれの条件においても、熱のムラにより溶解の度合いを一様に制御することが難しく、**図 4-30** のように場所による溶解具合の差が避けられない。

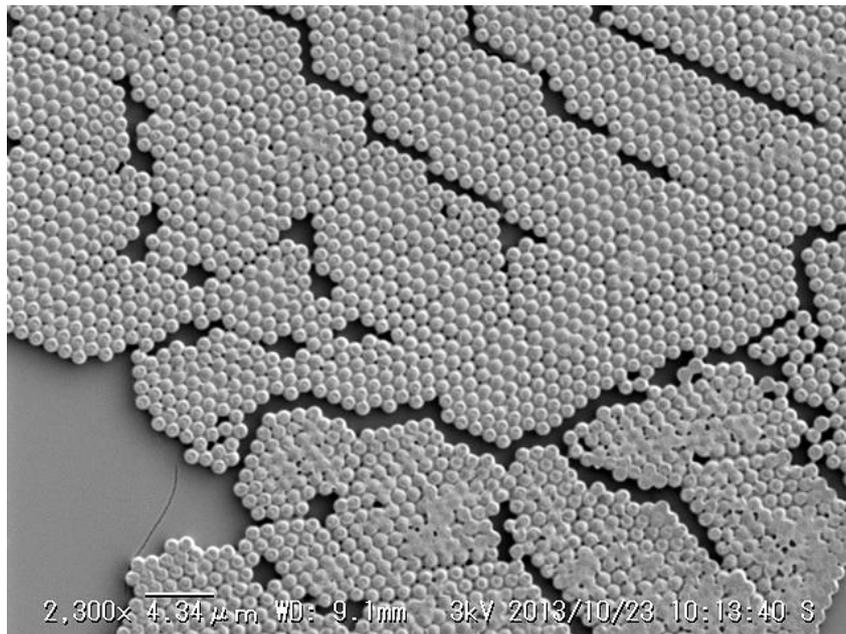


図 4-30 熱により溶着した PS 微粒子

一方で②の手法は、成田らの研究により、光硬化性樹脂を用いることで微粒子の下半分を埋めた形状を作製することが可能であることがわかっている⁴⁻⁴⁰。本構造を作製する手順は以下のとおりであり、その工程を図 4-31 に示す。

- ① ガラス基板に光硬化性樹脂 PAK-02 をスピコートする。
- ② 別の Si ウエハやガラス基板に、2 章で紹介したとおり、微粒子列を作製する。
- ③ ナノインプリント装置（太洋工業，EUN-4200，図 4-32）を用いて、①で作製した基板に②の微粒子列を一定圧力で転写し、紫外線を照射する。
- ④ 微粒子の整列した基板を，PAK-02 を塗布した基板から剥離する。

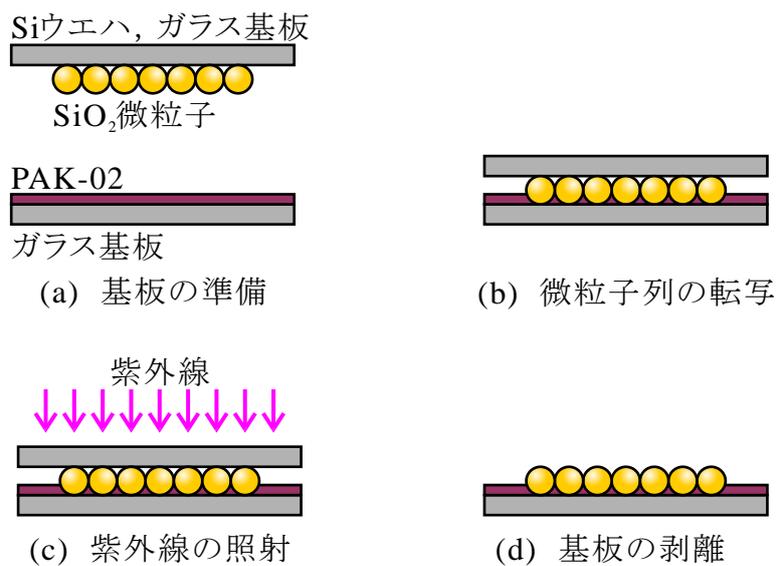


図 4-31 下半分を埋めた微粒子列の作製工程



図 4-32 ナノインプリント装置の外観

4.5.3 空隙の無い微粒子列の作製結果

前節で紹介した手順により、空隙の無い微粒子列の作製を行った。なお、微粒子列を転写する際に加える圧力の大小で、微粒子の埋まる深さを制御できる。図 4-33 は、転写された微粒子列の転写深さと転写圧力との関係を示している。ここで、転写深さとは転写された微粒子がどの程度 PAK-02 に埋もれているかを表している。つまり、構造の高さは $1\mu\text{m} - (\text{転写深さ})$ で表すことができ、例えば転写深さが $1\mu\text{m}$ の場合、微粒子はすべて PAK02 に埋まっている状態である。また、転写の際の接触面積は、微粒子が球形であるため計算が困難である。そこで、本研究における転写圧力とは転写の際に加えた圧力を示している。図 4-33 より、微粒子の転写深さは転写圧力の上昇にともなって上昇することがわかる。ただし、転写圧力 200kPa の時と 400kPa の時ではあまり差が無く、微粒子全体が PAK-02 に埋まることは無かった。本研究の目的では微粒子の下半分のみを埋めた構造が必要であるため、以降の転写圧力は 10kPa とした。

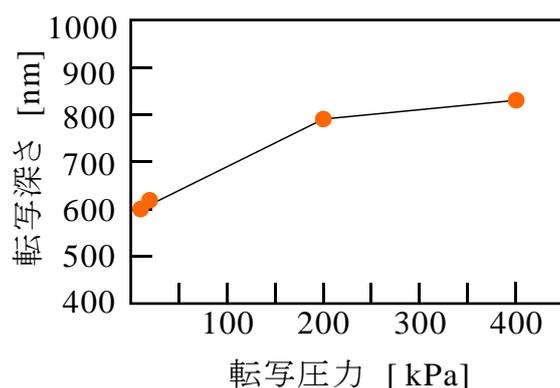


図 4-33 転写圧力と微粒子の転写深さの関係

第3章と同様の方法で微細構造化した微粒子列を作製し、これを PAK-02 がスピンコートされた基板へと転写した。転写圧力は上記のとおり 10kPa としている。作製された構造の SEM 像と AFM 像をそれぞれ図 4-34 および図 4-35 に示す。図 4-34 より、微粒子本来の球形状が保たれたままであることが確認できる。すなわち、構造の歪度をはじめとする幾何的特徴量はほとんど変化していないと考えられる。図 4-35 より、構造の高さは約 400nm であった。したがって、微粒子の下半分は完全に埋まっており、微粒子間の空隙が存在しないことがわかる。

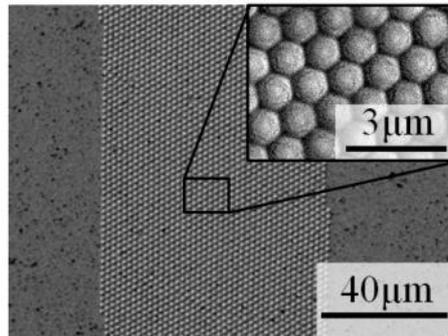


図 4-34 下半分を埋めた微粒子列の SEM 像

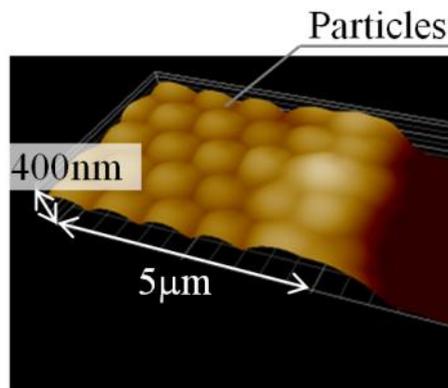


図 4-35 下半分を埋めた微粒子列の AFM 像

4.5.4 空隙の有無が細胞の接着および成長に及ぼす影響とその考察

空隙の無い微粒子列を足場として、PC12 細胞を播種・培養した。空隙の有無の影響を調査するため、空隙を有する微粒子列でも同様に細胞を培養する。両者の培養面の材料を一定とするため、表面に PS をコーティングした。また、コンタミ防止のため、細胞播種前に UV 滅菌を 12 時間行った。培養等の条件は 3.3 節と同様、播種濃度 $5000\text{cells}/\text{cm}^2$ 、温度 37°C 、湿度 100%、気相 5% CO_2+Air である。以上の手順を図 4-36 に示す

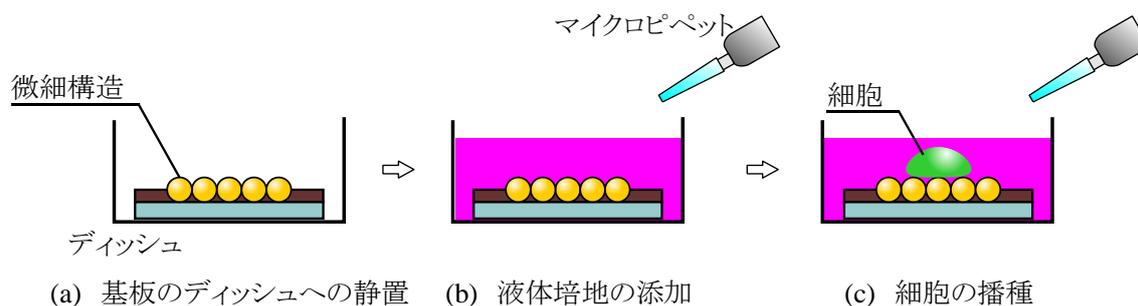


図 4-36 空隙の無い微粒子列上での細胞培養手順

図 4-37(a)は $\phi 1\mu\text{m}$ の SiO_2 微粒子からなる微粒子列で、図 4-37(b)は(a)の構造の下半分を埋めた微粒子列で細胞を培養した結果である。観察は播種後 24 時間および 72 時間で行った。両基板とも、微細構造への細胞の接着が観察された。空隙を有する微粒子列では、平面部よりも微粒子列上に接着している細胞の方が多い一方で、空隙を有していない微粒子列の方では、平面にも同程度の数の細胞が接着している。両者の構造では構造の高さが異なっているが、第 3 章の図 3-18 で示したように、細胞の選択接着率は $\phi 1\mu\text{m}$ と $\phi 0.5\mu\text{m}$ ではあまり変化しないため、この差は高さに依存したものでは無いと考えられる。更に、細胞の増殖に着目すると、第 3 章で紹介したとおり、空隙を有する微粒子列では構造に沿った増殖が見られる。一方で、空隙の無い微粒子列では構造と平面の区別なく全体的に広がって増殖している。以上の結果を選択接着率 α および増殖率 β で評価したものを図 4-38 に示す。なお、選択接着率の値に対して、 $p < 0.05$ をもって有意とする F 検定および t 検定を行っている。空隙を有する構造の選択接着率は、空隙の無い構造に比べて有意に高く、増殖率に関しても空隙を有する構造の方が高かった。したがって、微粒子間に存在する空隙が細胞の接着を向上させる影響を持っていると考えられる。

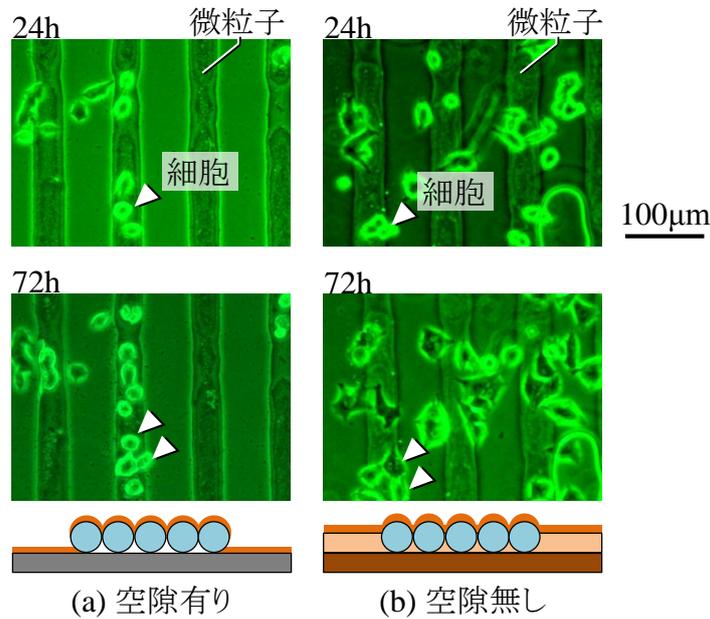


図 4-37 微粒子列および空隙を埋めた微粒子列上での細胞培養

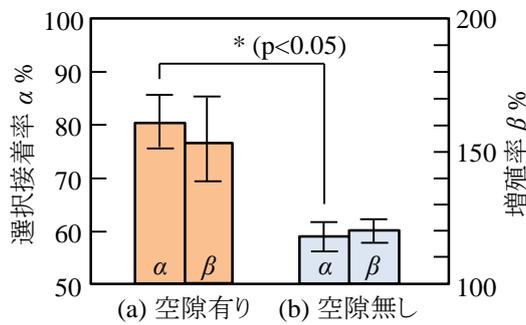


図 4-38 空隙の有無が細胞の接着および増殖におよぼす影響

細胞の接着する部分の表面微細構造は、空隙の有無にかかわらずほぼ同じであることから、やはり空隙の存在が細胞の接着および成長に影響していると考えられる。ここで、微粒子間の空隙が細胞への栄養供給を果たす流路となっていると仮定し、その栄養供給能を算出した。微粒子列の下部には空間が存在しており、その端部は外側とつながっているため、この空間内は液体培地で満たされている。細胞が栄養分子を消費し、濃度勾配が生じると、微粒子間に空隙が存在する場合、これを通じた分子の拡散が起こると考えられる。

図 4-39 は以上をまとめたモデル図である。グルコースは、細胞の栄養素として代表的な物質の一つであり、単一の PC12 細胞が消費するグルコースの量は 25pg/day であることがわか

っている⁴⁴¹⁾。簡単のため、細胞を直径 $10\mu\text{m}$ の半球と仮定する。半球の底面の面積は、上面の面積の 50% の大きさとなる。細胞全体の細胞膜から栄養を取り込むと仮定すると、底面において全体の 1/3 の栄養が供給されることが必要である。グルコース供給量 J は、以下のフィックの法則の変形式から求めることができる。

$$J = -D \times (dc/dx) \times S \quad (4-16)$$

ここで、 D は培地の拡散係数を、 (dc/dx) はグルコースの濃度勾配を、そして S は接着した細胞の下に存在する空隙の総面積を示している。培地の拡散係数は、 $2.13 \times 10^{-9} \text{m}^2/\text{sec}$ である⁴⁴²⁾。グルコースは培地中に 1g/L の濃度で添加されているので、細胞底面近傍ですべてのグルコースが消費されると仮定すれば、 (dc/dx) は $-5.55/(1 \times 10^{-6}) \text{mol/m}^4$ である。そして、 S は、 $7.31 \times 10^{-12} \text{m}^2$ となる。以上より、式(4-16)を解くと、 $J=190\text{ng/day}$ となり、上記の PC12 細胞 1 個が 1 日に消費するグルコース量を上回る供給量となる。したがって、微粒子間の空隙が存在すれば、構造下部のグルコースが濃度勾配に伴う拡散によって供給されるが、空隙が無い場合は供給されることはない。以上の理由から、微粒子間の空隙が細胞の接着および増殖に影響をおよぼすと考えられる。

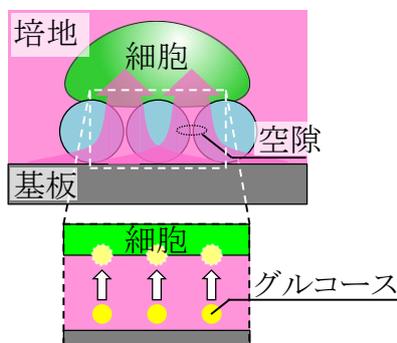


図 4-39 細胞への栄養供給のモデル図

4.6 微粒子列の細胞培養用足場としての応用

4.6.1 はじめに

本論文で明らかとなった結果を応用すれば、研究者の望む配置に細胞を接着させることが可能となる。特に、微粒子によって構成された微細構造は、簡易な作製手順で周期性が良い構造を作製できる上、細胞の選択接着を可能とし、更には細胞への栄養供給能も持った構造である。ここでは微粒子を用いた細胞パターンニングの実例を挙げ、本論文の有効性を示す。

4.6.2 タンパク質修飾微粒子列上での細胞培養

第3章で主に述べたように、細胞は微粒子列に選択的に接着する。一方で、播種した細胞数に対して接着した細胞数が少ないという課題も存在している。ここで、微粒子は官能基やタンパク質によってその表面を修飾することができる。つまり、細胞接着性タンパク質を微粒子表面に修飾すれば、化学的にも接着に有利な足場を作製することができ、細胞の接着数も増加すると考えられる。フィブロネクチンは細胞接着性タンパク質の一つであり、細胞のパターンニングにもよく用いられている⁴⁻⁴³⁾⁻⁴⁻⁴⁵⁾。本研究では、細胞培養環境での表面電位の関係から、フィブロネクチンを修飾することとした。

培養工程でのフィブロネクチンの剥離を防ぐため、微粒子とタンパク質の結合を強くする必要があるので、そこで、微粒子自体に3-アミノプロピルトリエキシシラン（以下、APTES, ACROS ORGANICS）を修飾し、更にフィブロネクチンを修飾することとした（図 4-40）。APTES は SiO_2 に対して SAM 膜を形成し、親水性を示すアミノ基が表面に露出する⁴⁻⁴⁶⁾。アミノ基はタンパク質との親和性がよいので、微粒子とタンパク質を強固に結合させることができる。本研究では、静電相互作用によって微粒子へのタンパク質修飾を試みる。物質の、液中での表面電位は、その液体の pH によって変動する。従って、APTES 修飾した SiO_2 微粒子とフィブロネクチンの表面電位の符号が逆転するような pH 環境下におくことで、両者を結合させることができる。図 4-41 のように、APTES 修飾した SiO_2 微粒子の等電点は 9.0 程度であり、この値を境に負の値をとる⁴⁻⁴⁷⁾⁻⁴⁻⁴⁸⁾。一方、フィブロネクチンの等電点は 5.5 ~ 6.0 程度であり、この値を境に負の値をとる⁴⁻⁴⁹⁾⁻⁴⁻⁵⁰⁾。したがって、両者の符号が逆転しており、かつその絶対値が比較的大きい pH 6.5 ~ 8.5 の液中で修飾を行うことが望ましい。APTES とフィブロネクチンの修飾方法は図 4-42 に示すとおりである。まず、所望の pH (6.5 ~ 8.5) に調整した緩衝液に、微粒子と修飾する物質とを混ぜ合わせる（図 4-42(1)）。遠心分離機を用いて微粒子を沈殿させ、緩衝液を除去する（図 4-42(2)~(3)）。緩衝液を加え、微粒

子を再度分散させる (図 4-42(4)~(5)). 以上の緩衝液の除去と添加を繰り返す, 微粒子に吸着していない余分な修飾する物質を除去する.

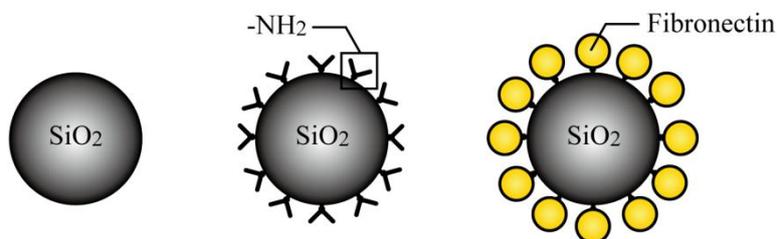


図 4-40 フィブロネクチン/APTES 修飾した SiO₂ 微粒子の模式図

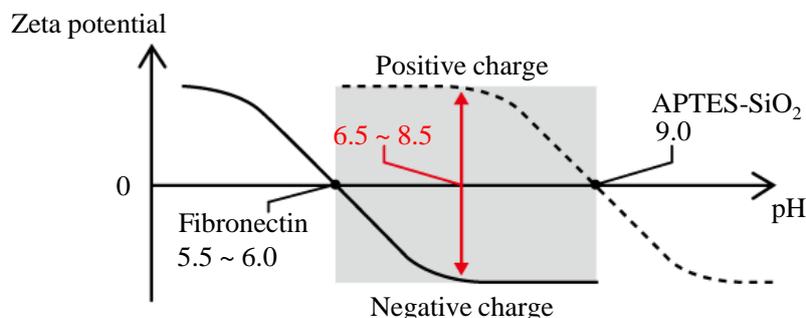


図 4-41 APTES 修飾 SiO₂ 微粒子とフィブロネクチンの pH によるゼータ電位の遷移

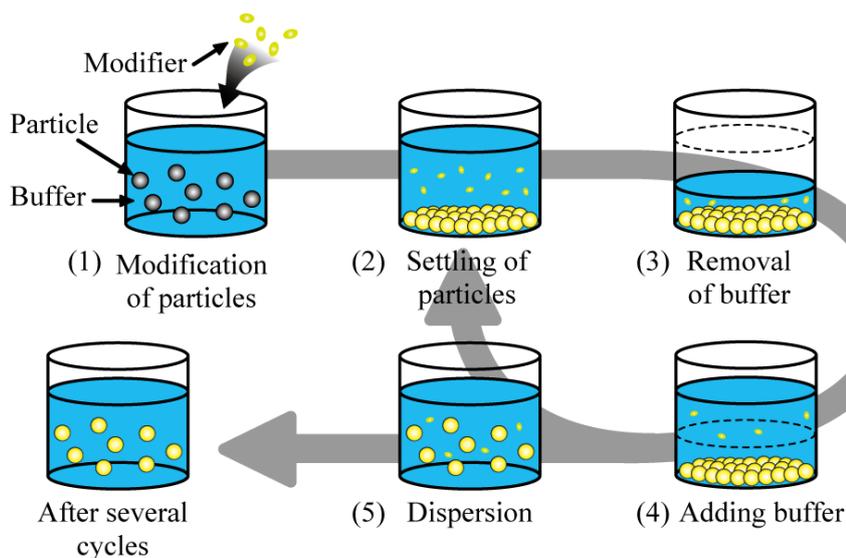


図 4-42 微粒子へのフィブロネクチン修飾方法

以上の方法で APTES およびフィブロネクチンを修飾した微粒子を、第2章で説明した移流集積法を用いてラインアンドスペース状に整列させた。図 4-43 は整列した微粒子列の SEM 像である。微粒子は幅約 $30\mu\text{m}$ の列状に整列している。ただし、微粒子列は単層ではなく二層程度の複層構造となっている。これは、フィブロネクチンによって微粒子同士が凝集したためであると考えられる。

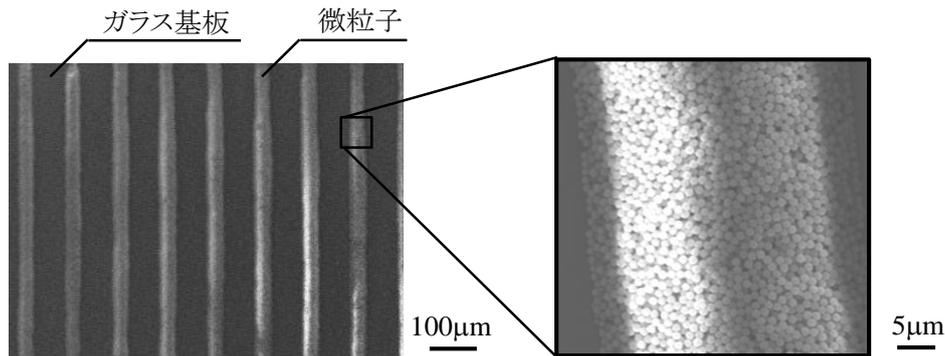


図 4-43 ラインアンドスペース状に整列した FN-APTES 修飾 SiO_2 微粒子列の SEM 像

次いで、作製したラインアンドスペース状の微粒子列を足場とし、PC12 細胞を培養した。また、比較のため未修飾の微粒子列でも培養した。観察した位相差顕微鏡像を図 4-44 に示す。図 4-44(a)は未修飾の微粒子列での培養結果であり、図 4-44(b)はフィブロネクチン修飾微粒子列での培養結果である。どちらの微粒子列においても、細胞は主として微粒子列上に接着しており、平面部分にはあまり接着していなかった。また、接着した細胞の数にも違いが見られ、フィブロネクチン修飾微粒子列上には多くの細胞が接着していた。微粒子列上に接着した細胞の数を計測したところ、図 4-45 に示すように、フィブロネクチン修飾微粒子列上の方で 3 倍以上多くの細胞が接着していた。また、未修飾の微粒子列上では複数の細胞が互いに接着している様子がよく見られる一方で、フィブロネクチンを修飾した微粒子列では、細胞は単体で接着していた。細胞の接着状態を、単体で接着しているか、複数で集合して接着しているかで分類し、各微粒子列で計測した結果を図 4-46 に示す。フィブロネクチン修飾微粒子列では約 94%の細胞が単体で接着しているのに対し、未修飾の微粒子列では約 55%の細胞が複数で接着していた。これは、以下のように考えられる。今回培養に用いている PC12 は接着性細胞である。接着性細胞は、何かに接着した状態が安定した状態であり、浮遊状態では生存できない。ここで、細胞-足場間の接着性が良くない場合、安定のため近傍の細胞同士が接着する。一方で、細胞-足場間の接着性が良い場合、この必要が無いため、細胞は単体で接着した状態となる。以上より、フィブロネクチン修飾により、多くの細胞を微粒子列上に選択的に接着させることができる。

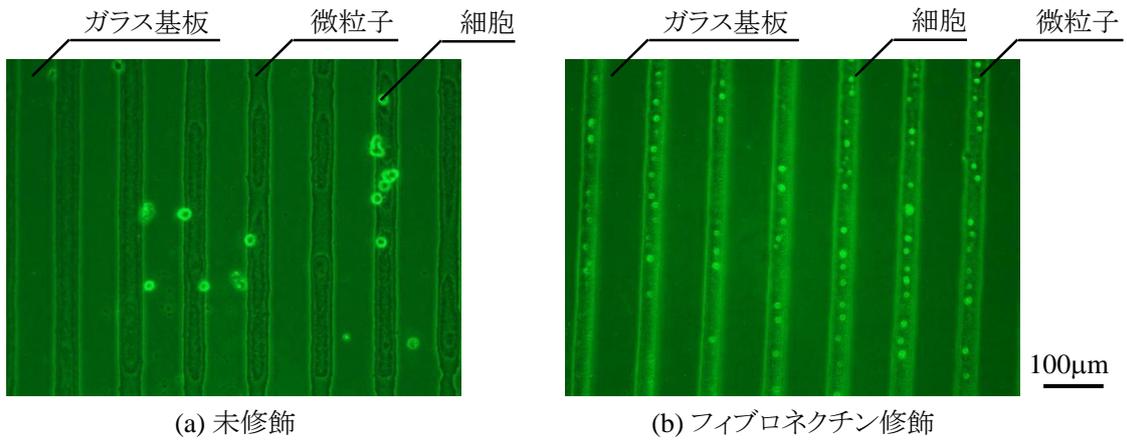


図 4-44 微粒子列上での細胞培養結果

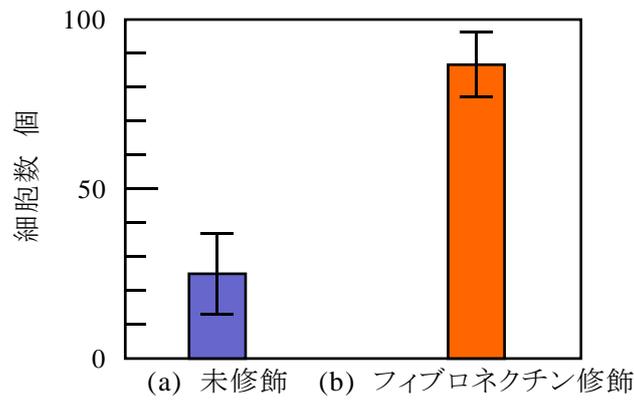


図 4-45 微粒子列上に接着した細胞の数

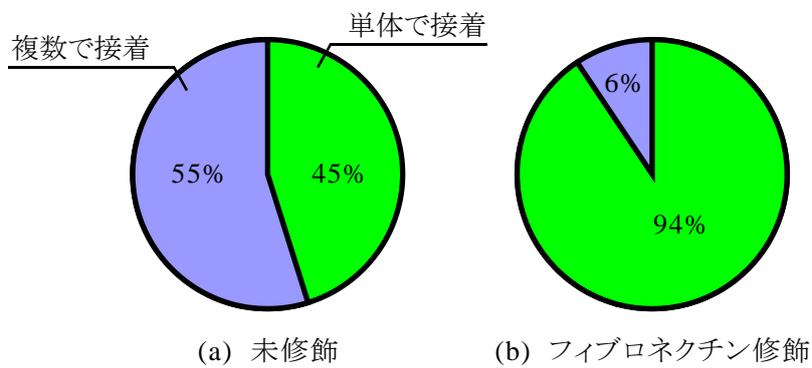


図 4-46 細胞の接着形態の分類

4.6.3 3次元構造側面への細胞接着

現在、細胞のパターニング技術の応用先として、人工臓器の培養が期待されている。これは、「細胞の望む位置への配置」という技術を突き詰めれば、細胞を3次元的に配置して臓器を形作ることが可能となると考えられているためである。このような3次元的な細胞の配置には、スフェロイドと呼ばれる多数の細胞の集合体を形成させる研究が盛んである⁴⁻⁵¹⁾⁻⁴⁻⁵³⁾。一方で、酸素や栄養をスフェロイド中心部まで供給することができないため、現状ではそのサイズには限界がある。従って、スフェロイドの巨大化のためには血管系を導入するなど、中心部への酸素および栄養供給が必要である。ここで、円筒状に構造化した微粒子を血管に見立て、その周囲を覆うようにして細胞を培養できれば、微粒子間の空隙から酸素や栄養が供給され、スフェロイドの巨大化が見込める。このためには、構造の側面に細胞を接着させることが必要である。一方で、構造の側面に積極的に細胞を配置する研究はほとんど行われていない。この側面への配置は、3次元的に細胞を培養するにあたり必要であると考えられる。ここで、細胞の構造側面への接着には2通りが考えられる。一つは、播種した細胞がそのまま構造の側面へ接着するというものであり、もう一つは一旦構造以外の場所に接着した細胞が遊走の過程で構造に到達し、これを登るようにして接着するというものである。後者の接着が起こるためには、構造への細胞の選択接着性が求められ、これは本論文で扱ってきた微粒子列と平面によって達成できると考えられる。

そこで、毛細管力を利用したキャピラリモーリング⁴⁻⁵⁴⁾⁻⁴⁻⁵⁵⁾と呼ばれる手法により、数十 μm の高さを持つ微粒子列を作製し、これを細胞培養の足場として適用する。キャピラリモーリングとは図4-47で示す微粒子整列方法である、まず、ガラス基板に溝構造を持つPDMSを接触させ、流路を形成する。このPDMSの一端に微粒子懸濁液を接触させると、毛細管力によって懸濁液は流路内を充填していく。そのまま静置することで、懸濁液を接触させた側とは反対側から懸濁液の溶媒が蒸発し、微粒子間に液架橋力が発生する。これにより、微粒子が六方最密充填していく。そして、蒸発により失った溶媒を補うため、界面に懸濁液が流れこむ。以上の蒸発、充填、供給が繰り返され、流路の寸法に依存した微粒子列が作製できる。図4-48はこの方法で $\phi 1\mu\text{m}$ の SiO_2 微粒子を整列させた構造のSEM像であり、その高さは約 $20\mu\text{m}$ である。微粒子は均一に構造化しており、上面・側面共に六方最密充填した微粒子が観察できる。

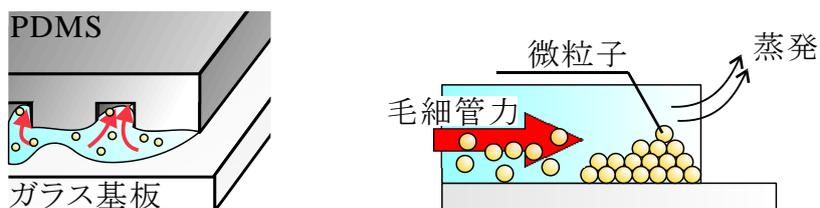


図 4-47 キャピラリーモールドイングの概略図

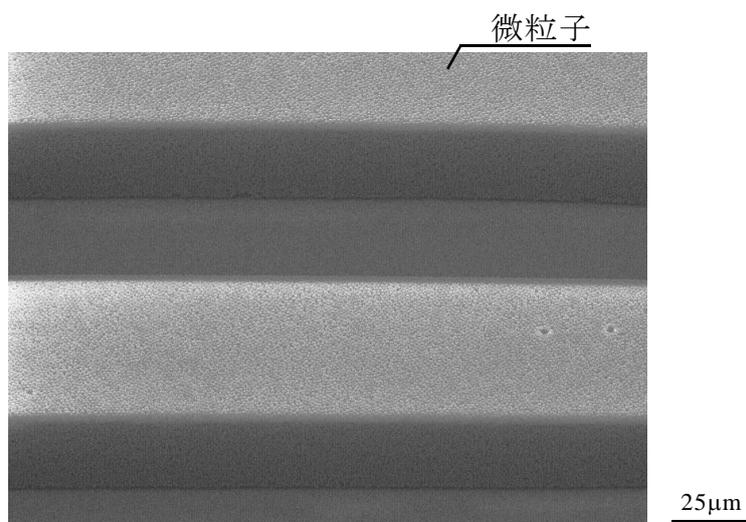


図 4-48 キャピラリーモールドイング法で作製した微粒子列

このような構造を細胞接着の足場とし、PC12 細胞を培養した。図 4-49 は播種後 24 時間時点での位相差顕微鏡像である。細胞が微粒子列に沿うようにして接着している様子が観察でき、顕微鏡の焦点をずらしながら観察することで、その接着位置が底面でないことも確認できた。ただし、位相差顕微鏡下では明確に側面に接着しているとは確認できない。そこで、細胞の凍結乾燥を行い、SEM による観察を試みた。図 4-50 は凍結乾燥した細胞の SEM 像である。細胞は、確かに微粒子列の側面に接着しており、仮足を微細構造上に伸ばしている様子も確認できる。以上の結果から、微粒子などの微細構造を用いることで、細胞を底面・側面を問わず望む場所に配置することが可能であることがわかった。

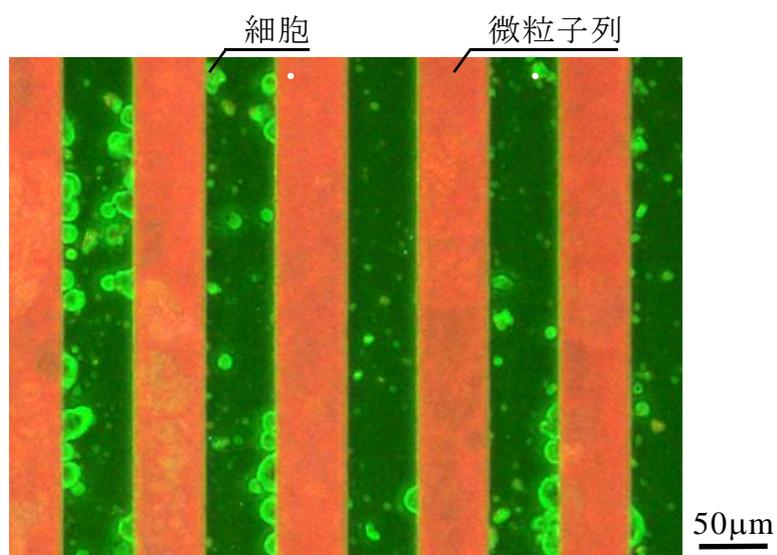


図 4-49 高さ 20 μm の微粒子列側面に接着した細胞の位相差顕微鏡像

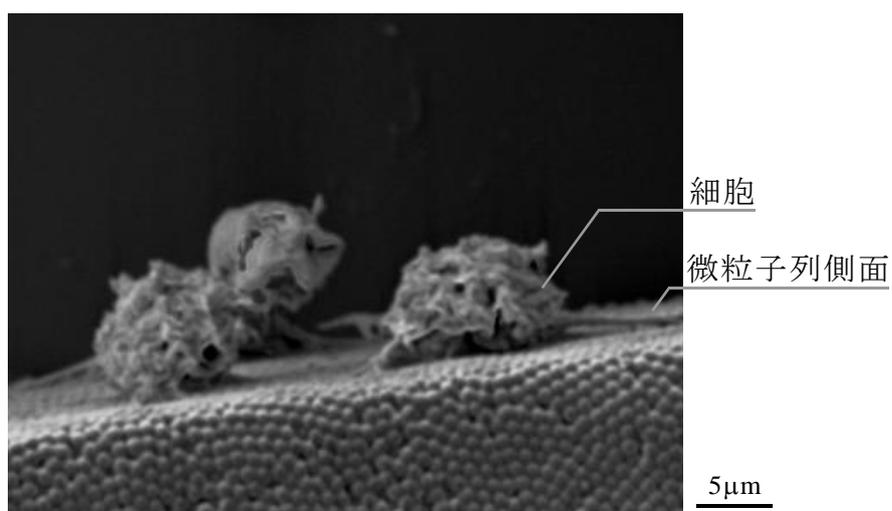


図 4-50 高さ 20 μm の微粒子列側面に接着した細胞の SEM 像

4.7 結言

本章では、表面の幾何形状が細胞の接着性におよぼす影響を明らかにした。本研究では表面の幾何的特徴量として、算術平均粗さ Sa 、歪度 Ssk 、尖度 Sku に着目し、これらが異なる表面を、微粒子列を応用して作製した。Si ウエハに微粒子列を整列させ、これをマスクとしたドライエッチングを行うことで、微粒子の粒径に応じた周期性を持つ微細構造が得られた。この構造は、加工時間を長くすることで、ピラー形状の先端が鋭くなった。この Si ウエハをモールドとして、その形状をシリコン樹脂 (PDMS) に転写することで、 Ssk が $-0.6 \sim -0.5$ のホール構造が作製できた。また、この PDMS をモールドとして形状転写した PDMS は、 Ssk が $-0.3 \sim -0.8$ のピラー構造となった。両者は共通の粗さ曲線を持つため算術平均粗さが同等となる一方で、異なる歪度を持つことがわかった。次いで、上記で作製した微細構造を足場として細胞を培養した。歪度が小さい微細構造ほど、その上に接着する細胞の割合が大きいことがわかった。一方で、算術平均粗さおよび尖度との相関は歪度よりも薄かった。本研究ではこれを系のエネルギーと関連付けて考察し、この考えの下で細胞と微細構造との接着面積が平面とのそれよりも大きいほどエネルギー的に安定であることを明らかにした。以上より、表面幾何形状が細胞の接着性におよぼす影響を解明した。

第4章 参考文献

- 4-1) Y. W. Fan, F. Z. Cui, S. P. Hou, Q. Y. Xu, L. N. Chen, and I. -S. Lee, “Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topograph”, *Journal of Neuroscience Methods*, 120 (2002) 17-23.
- 4-2) S. P. Khan, G. G. Auner, and G. M. Newaz, “Influence of nanoscale surface roughness on neural cell attachment on silicon”, *Nanomedicine Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1, 2 (2005) 125-129.
- 4-3) 山本雄二, トライボロジー (第2版), 理工学社 (2010)
- 4-4) N. Tayebi, and A. A. Polycarpou, “Modeling the effect of skewness and kurtosis on the static friction coefficient of rough surfaces”, *Tribology International*, 37, 6 (2004) 491-505.
- 4-5) R. Horvath, A. Czifra, and A. Dredelyi-Kiss, “Effects of conventional and non-conventional tool geometries to skewness and kurtosis of surface roughness in case of fine turning of aluminium alloys with diamond tools”, *International Journal of Advance Manufacturing Technology*, 78 (2015) 297-304.
- 4-6) F. S. Bastos, E. A. Oliveria, L. G.Fonseca, S. M. Vargas, and E. B. L. Casas, “A FEM-based study on the influence of skewness and kurtosis surface texture parameters in human dental occlusal contact”, *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 295 (2016) 139-148.
- 4-7) M. Sedlacek, B. Podgornik, and J. Vizintin, “Correlation between standard roughness parameters skewness and kurtosis and tribological behavior of contact surfaces”, *Tribology International*, 48 (2012) 102-112.
- 4-8) J. Park, S. Bauer, K. A. Schlegel, F. W. Neukam, K. Mark, and P. Schmuki, “TiO₂ nanotube surfaces: 15 nm—an optimal length scale of surface topography for cell adhesion and differentiation” *Small*, 5 (2009) 666-671.
- 4-9) A. Hart, N. Gadegaard, C. D. Wilkinson, R. O. Oreffo, and M. J. Dalby, “Osteoprogenitor response to low-adhesion nanotopographies originally fabricated by electron beam lithography” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18 (2007) 1211-1218.
- 4-10) M. J. Dalby, M. J. Biggs, N. Gadegaard, G. Kalna, C. D. Wilkinson, and A. S. Curtis, “Nanotopographical stimulation of mechanotransduction and changes in interphase centromere positioning”, *Journal of Cell Biochemistry*, 100 (2006) 326-338.
- 4-11) A. S. G. Curtis, N. Gadegaard, M. J. Dalby, M. O. Riehle, C. D. W. Wilkinson, and G. Aitchison, “Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings”, *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 3 (2004) 61-65.
- 4-12) N. W. Karuri, T. J. Porri, R. M. Albrecht, C. J. Murphy, P. F. Nealey, “Nano- and microscale holes modulate cell-substrate adhesion, cytoskeletal organization, and -beta1 integrin

- localization in SV40 human corneal epithelial cells”, *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 5 (2006) 273-280.
- 4-13) 櫻徳人, 諸貫信行, 田中靖紘, “Surface area evaluation of micro structure fabricated by dry etching through self-assembled particles”, 日本機械学会関東支部第18期総会講演会講演論文集, (2012) 519-520.
- 4-14) W. Li, W. Zhao, and P. Sun, “Fabrication of highly ordered metallic arrays and silicon pillars with controllable size using nanosphere lithography”, *Physica E*, 41 (2009) 1600-1603.
- 4-15) Y. Tanaka, N. Keyaki, N. Moronuki, and A. Kaneko, “Increase in the area of structured surface and its effect on sensitivity improvement of biochemical sensing”, *Key Engineering Materials*, 516 (2012) 160-165.
- 4-16) V. Gianneta, A. Olziersky, and A. G. Nassiopoulou, “Si nanopatterning by reactive ion etching through an on-chip self-assembled porous anodic alumina mask”, *Nanoscale Research Letters*, 8 (2013) 71.
- 4-17) R. Muhammad, G. S. L. Peh, K. Adnan, J. B. K. Law, J. S. Mehta, and E. K. F. Yim, “Micro- and nano-topography to enhance proliferation and sustain functional markers of donor-derived primary human corneal endothelial cells”, *Acta Biomaterialia*, 19 (2015) 138-148.
- 4-18) D. Dado and S. Levenberg, “Cell-scaffold mechanical interplay within engineered tissue”, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, (2009), 656-664.
- 4-19) G. Shao, J. Wu, Z. Cai, and W. Wang, “Fabrication of elastomeric high-aspect-ratio microstructures using polydimethylsiloxane (PDMS) double casting technique”, *Sensors and Actuators*, 178 (2012) 230.
- 4-20) R. Zaidel-Bar, M. Cohen, L. Addadi, and B. Geiger, “Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes”, *Biochemical Society Transactions*, 32, 3 (2004) 416-420.
- 4-21) F. Aldo, C. Marco, S. Michela, F. Paolo, P. Dario, and B. Fabio, “Neuronal polarity selection by topography-induced focal adhesion control”, *Biomaterials*, 31 (2010) 4682-4694.
- 4-22) R. N. Wenzel, “Resistance of Solid Surfaces to Wetting by Water”, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 28 (1936) 988-994.
- 4-23) A. B. D. Cassie, “Wettability of Porous Surfaces”, *Transactions of the Faraday Society*, 40 (1944) 546-551.
- 4-24) S. Nomura, H. Kojima, Y. Ohyabu, K. Kuwabara, A. Miyauchi, and T. Uemura, “Cell Culture on Nanopillar Sheet Study of HeLa Cells on Nanopillar Sheet”, *Japanese Journal of Applied Physics*, 44, 37 (2005) L1184-L1186.
- 4-25) 金原粲, 薄膜工学 [第2版], 丸善出版 (2011)
- 4-26) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of THE CELL*, NEWTON PRESS (2010). (中村桂子, 松原謙一・訳, 細胞の分子生物学

第5版, ニュートンプレス, (2010))

- 4-27) 井手利憲, 図解入門 よくわかる細胞生物学の基本としくみ, 秀和システム (2008)
- 4-28) T. Inoue, H. Osatake, and H. Takahashi, “A New Freeze-drying Instrument Using t-butyl Alcohol for Scanning Electron Microscopy”, *Journal of Electronic Microscopy*, 38, 4 (1989) 246-249.
- 4-29) K. Kasraian and P. P. DeLuca, “The Effect of Tertiary Butyl Alcohol on the Resistance of the Dry Product Layer During Primary Drying”, *Pharmaceutical Research*, 12, 4 (1995) 491-495.
- 4-30) Z. R. Xu, C. G. Yang, C. H. Liu, Z. Zhou, J. Fang, and J. H. Wang, “An osmotic micro-pump integrated on a microfluidic chip for perfusion cell culture”, *Talanta*, 80 (2010) 1088-1093.
- 4-31) Y. Torisawa, B. Chueh, D. Huh, P. Ramamurthy, T. M. Roth, K. F. Barald, and S. Takayama, “Efficient formation of uniform-sized embryoid bodies using a compartmentalized microchannel device”, *Lab on a Chip*, 7 (2007) 770-776.
- 4-32) M. Inamori, H. Mizumoto, and T. Kajiwara, “Investigation of medium perfusion through scaffold-free tissue constructs using endothelial cell-covered spheroids in vitro”, *Biochemical Engineering Journal*, 50 (2010) 116-121.
- 4-33) P. Shah, I. Vedarethinam, D. Kwasny, L. Andresen, M. Dimaki, S. Skov, and W. E. Svendsen, “Microfluidic bioreactors for culture of non-adherent cells”, *Sensors and Actuators B*, 156 (2011) 1002-1008.
- 4-34) J. W. Song, S. P. Cavnar, A. C. Walker, K. E. Luker, M. Gupta, Y. C. Tung, G. D. Luker, and S. Takayama, “Microfluidic Endothelium for Studying the Intravascular Adhesion of Metastatic Breast Cancer Cells”, *PLoS ONE*, 4, 6 (2009) e5756.
- 4-35) W. W. Minuth, L. Denk, and K. Hu, “The role of polyester interstitium and aldosterone during structural development of renal tubules in serum-free medium”, *Biomaterials*, 28 (2007) 4418-4428.
- 4-36) L. Liu, C. Luo, X. Ni, L. Wang, K. Yamauchi, S. M. Nomura, N. Nakatsuji, and Y. Cheng, “A micro-channel-well system for culture and differentiation of embryonic stem cells on different types of substrate”, *Biomed Microdevices*, 12 (2010) 505-511.
- 4-37) M. C. Peters and D. J. Mooney, “Synthetic Extracellular Matrices for Cell Transplantation”. *Material Science Forum*, 250 (1997) 43-52.
- 4-38) C. N. Degeratu, C. Zaharia, M. R. Tudora, C. Tucureanu, G. Hubca, A. Salageanu, and C. Cincu, “Influence of Porosity Upon Cells Adhesion on Polyhydroxyalkanoates Films”, *Chemical Bulletin of “POLITEHNICA” University of Timisoara*, 55, 69 (2010) 189-192.
- 4-39) Q. Cai, J. Yang, J. Bei, and S. Wang, “A novel porous cells scaffold made of polylactide–dextran blend by combining phase-separation and particle-leaching techniques”, *Biomaterials*, 23 (2002) 4483-4492.
- 4-40) K. Narita, N. Moronuki, Y. Tanaka, and A. Kaneko, “Replication/transfer of self-assembled

- particles by imprint process”, 2010 年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集, (2010) 609-610.
- 4-41) K. Fujino, Y. Ogura, K. Sato, and T. Nedachi, “Potential neuroprotective effects of SIRT1 induced by glucose deprivation in PC12 cells”, *Neuroscience Letters*, 557 (2013) 148-153.
- 4-42) K. Sumaru, and T. Kanamori, “Optimal design of bio-hybrid systems with a hollow fiber scaffold: model analysis of oxygen diffusion/consumption”, *Biochemical Engineering Journal*, 20 (2004) 127-136.
- 4-43) 竹市雅俊, 細胞接着分子, 東京化学同人 (1996)
- 4-44) A. J. Garcia, M. D. Vega, and D. Boettiger, “Modulation of Cell Proliferation and Differentiation through Substrate-dependent Changes in Fibronectin Conformation”, *Molecular Biology of the Cell*, 10 (1999) 785-798.
- 4-45) A. Ruiz, M. Zychowicz, L. Buzanska, D. Mehn, C. A. Mills, E. Martinez, S. Coeck, J. Samitier, P. Colpo, and F. Rossi, “Single Stem Cell Positioning on Polylysine and Fibronectin Microarrays”, *Micro and Nanosystems*, 1 (2009) 50-56.
- 4-46) D. Aruga, A. Kaneko, and N. Moronuki, “Self-assembly of modified particles on hydrophilic-hydrophobic patterned surface”, 2009 年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集 (2009) 733-734.
- 4-47) M. Alkan, G. Tekin, and H. Namli, “FTIR and zeta potential measurements of sepiolite treated with some organosilanes”, *Microporous and Mesoporous Materials*, 84 (2005) 75-83.
- 4-48) C. Duran, K. Sato, Y. Hotta, and K. Watari, “Covalently Connected Particles in Green Bodies Fabricated by Tape Casting”, *Journal of the American Ceramic Society*, 90 (2007) 279-282.
- 4-49) A. Bouafsoun, S. Helali, S. Mebarek, C. Zeiller, A. F. Prigent, A. Othmane, A. Kerkeni, N. Jaffrezic-Renault, and L. Ponsonnet, “Electrical probing of endothelial cell behaviour on a fibronectin/polystyrene/thiol/gold electrode by Faradaic electrochemical impedance spectroscopy (EIS)”, *Bioelectrochemistry*, 70 (2007) 401-407.
- 4-50) J. I. Paul and R. O. Hynes, “Multiple fibronectin subunits and their post-translational modifications”, *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 21 (1984) 13477-13487.
- 4-51) C. T. Kuo, C. L. Chaing, R. Y. J. Huang, H. Lee, and A. M. Wo, “Configurable 2D and 3D spheroid tissue cultures on bioengineered surfaces with acquisition of epithelial-mesenchymal transition characteristics”, *NPG Asia Materials* 4, (2012).
- 4-52) M. Kato-Negishi, Y. Tsuda, H. Onoe, and S. Takeuchi, “A neurospheroid network-stamping method for neural transplantation to the brain”, *Biomaterials*, 31 (2010) 8939-8945.
- 4-53) C. Brito, D. Simao, I. Costa, R. Malpique, C. I. Pereira, P. Fernandes, M. Serra, S. C. Schwarz, J. Schwarz, E. J. Kremer, and P. M. Alves, “Generation and genetic modification of 3D cultures of human dopaminergic”, *Methods*, 56 (2012) 452-460.

- 4-54) E. Kim, Y. Xia, and G. M. Whitesides, "Polymer microstructures formed by moulding in capillaries", *Nature*, 376 (1995) 581-584.
- 4-55) E. Kim, Y. Xia, and G. M. Whitesides, "Two- and three-dimensional crystallization of polymeric microspheres by micromolding in capillaries", *Advanced Materials*, 8 (1996) 245-247.

第 5 章

結論

本章は、本研究で明らかとなった結果についてまとめている。まず、第2章では、微粒子の整列による微細構造の作製を行った。アイランド形状の微粒子列、ラインアンドスペース形状の微粒子列について、その作製方法を紹介した。微粒子列の作製方法として、工程の簡便さや細胞接着の評価のしやすさなどの観点から移流集積法を選択し、作製した構造の評価を行った。移流集積法で作製した微粒子列は単層に整列しており、その粒径に相当する高さ、微粒子の球形状に由来する表面微細構造を持っている。また、この微粒子列との対照実験のため、単純なラインアンドスペース構造も作製した。両者は材質が異なるため、表面へのポリスチレンコーティングによって材質の統一を図った。本章で紹介した方法で作製した微細構造は、細胞培養の足場として適用できる。

第3章では、第2章で作製した構造を細胞接着の足場として適用し、細胞のパターニングを試みた。また、微粒子の粒径や構造の間隔が、細胞の接着位置、増殖方向、そして分化に及ぼす影響についても調査した。細胞はランダムな形状を持つ微粒子列においても、規則的に並んだ微粒子列においても、平面よりも微粒子の上を選択的に接着することがわかった。播種後の沈降で平面に接着した細胞は、遊走と伸長で微細構造に到達することがわかった。また、このような遊走による微細構造への到達は播種後9時間程度まで起こるため、その時点で微細構造へ到達できなかった細胞が平面に接着した状態となると考えられる。このような過程を踏んで細胞が微粒子列上に選択的に接着するので、構造同士の間隔が選択性に重要な影響を及ぼしており、細胞のパターニングに際し、その遊走距離を考慮した設計をすべきであることがわかった。上記のような細胞接着の選択性は、単一種の細胞だけに見られる現象ではないことも確認した。また、細胞の増殖や神経突起の伸長方向も、微粒子列に沿う形になることがわかった。神経突起の伸長は、微粒子の粒径が小さいほど良く、今回の調査の範囲内では粒径500nmの微粒子列でもっとも良いことがわかった。一方で、同寸法のラインアンドスペース構造と比較すると、微粒子列の方が細胞の接着に有利であることがわかった。したがって、微粒子によって創生される微細構造が細胞の接着などに影響を及ぼしていると考えられる。

第4章では、自己組織化微粒子を応用して微細構造を作製し、これを細胞培養の足場に適用することで、その幾何的特徴量が細胞に及ぼす影響を調査した。Siウエハに微粒子を整列させ、これをエッチングのマスクとして用いることで、ピラー様の構造を作製した。この構造をモールドとして用いることで、共通の算術平均粗さを持ち異なる幾何形状の微細構造を作製することができた。この微細構造を細胞培養の足場として適用することで、算術平均粗さだけでは表すことのできない微細構造の形状が、細胞の接着に影響を及ぼすことがわかった。これは、従来の研究で報告されていた「同じ細胞・同じ粗さだが異なる傾向」が見られたことの原因として考えられる。本研究の範囲では、歪度が小さい微細構造ほど細胞の接着に有利なことがわかった。一方で、算術平均粗さおよび尖度に関しては、

細胞の接着との有意な相関が見られなかった。増殖の方向に関しては、形状によらず同様の傾向を示していた。

また、微粒子列には微粒子間に空隙が存在しているが、微粒子列の下半分を埋めることで、これが存在しない構造を作製した。この構造を細胞培養の足場として適用することで、空隙の有無が細胞の接着や増殖に影響を及ぼすことがわかった。微粒子間の空隙や微粒子列の下半分に存在している空間は、連通多孔質材料と同様の栄養供給能を有していると考えられる。

以下に、本研究で明らかにしたことを列挙する。

- ① 微粒子列は細胞のパターニング用足場として適用できる
- ② 提案した細胞の接着モデルは、実際の実験結果と整合する
- ③ 細胞の接着に対して支配的な微細構造の幾何的特徴量は、歪度 Ssk である
- ④ 細胞のパターニングには、歪度 Ssk が小さい構造を用いるべきである

このように、本研究では細胞のパターニングに適した微細構造を、体系的な調査をもって明らかにした。

今後の展望

本研究により、第1章で挙げたような、細胞の応用事例への貢献ができると考えている。ここでは、その代表的なものを紹介する。

臓器移植における、ドナーの不足や拒絶反応は解決すべき大きな課題である。移植のための臓器を、患者の細胞から人工的に作製することができれば、このような問題を解決できると考えられている。人工臓器に関する研究は発展途上であり、現在のところその前段階である細胞シートやスフェロイドに関する研究がされている。細胞シートとは、シート状に培養した細胞であり、移植可能な角膜への応用がすでにされている。スフェロイドとは、細胞塊とも呼ばれる複数の細胞の集合体であり、肝細胞のスフェロイドで肝臓機能の再現ができているという報告もある⁵⁻¹⁾。細胞シートやスフェロイドは、その用途から培養後に回収することが必要であり、現在のところは温度応答性ポリマーを用いた回収方法が代表的である⁵⁻²⁾。温度応答性ポリマーとは、温度によって表面の親水/疎水性が変化するポリマーである。温度応答性ポリマーの表面は、細胞の至適培養条件である37°Cでは疎水性を示し、20°C付近では親水性を示す。細胞接着性タンパク質は親水性表面には吸着しにくいので、37°Cで細胞を培養し、その後温度を20°Cに下げることによって基板表面のタンパク質を剥離させ、培養した細胞を回収することができる。しかし、厳密に制御すべき培養温度を変えるというアプローチは、細胞自体にダメージを与えることが考えられる。

ここで、第3章で細胞が微粒子列に沿うようにして増殖していたこと(図3-30)は、細胞を所望の形状に増殖させることができることを意味している。また、第4章で細胞の立体的な配置に成功していること(図4-51)は、その所望の形状は2次元平面に限定されず、立体的な配置も可能であることを示唆している。更に、本研究で用いている微粒子列は、微粒子同士を特別に固定するような工程を行っていない。従って、整列後に元の分散状態へと分解することも可能であると考えられる。このようにして、培養後の細胞の回収が期待できる(図5-1)。

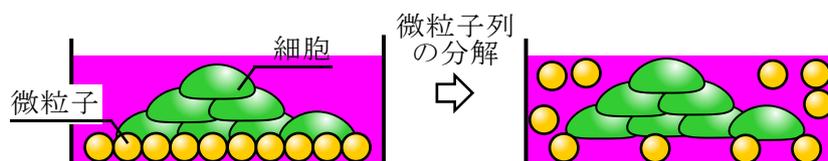


図5-1 培養細胞の回収

人工臓器の作製には、上記の他に血管系の導入や、細胞が生成する基質を所望の形状にする必要があるなど、未だ課題が多い。しかし、本研究の結果が、将来的な人工臓器の培養基板の設計指針として適用できると考えている。

創薬スクリーニングの分野では、患者ががんなどに罹患しているかどうか、迅速に判断可能なデバイスが求められている。そのため、罹患状況がわからない患者から採取した細胞のうち、必要な細胞のみを単離することが必要である。本研究では細胞種ごとに接着の傾向に有意差は見られなかったが、提案した接着モデルをより正確にすることができれば、細胞の種類に応じた、その細胞の接着に有利な微細構造の設計指針が確立できると考えている。例えば、**図 5-2**のように、様々な細胞が混在した懸濁液から必要な細胞を単離できるようなデバイスに、本研究の成果や体系的な調査のアプローチが貢献できると考えている。

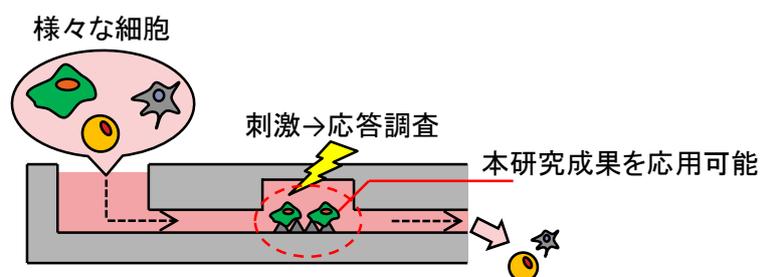


図 5-2 創薬スクリーニングへの応用

今後の課題

本研究の範囲内では明らかにすることのできなかったことを以下に挙げ、どのような研究方針でこれを解決すればよいかまとめる。

- ・ 微細構造の尖度の調査範囲を広げる
- ・ 微細構造の空間波長が細胞の接着に及ぼす影響の調査

まず、第5章では尖度の影響について、ほとんど影響がないことを示した。しかし、今回作製できた微細構造は、2.7~3.3 という範囲内の尖度しか持っていない。この結果と尖度の定義より、尖度は構造の山と谷の両方が鋭かったり、平坦であったりするような形状で大きく変化することが予想できる。尖度 Ssk が3より大きくなるような、山と谷の両方が平坦である構造の作製は、本研究でも紹介した凸状ラインアンドスペース構造で達成できる。一方で、尖度 Ssk が3より小さくなるような、山と谷の両方が急峻な構造は、Si ウエハやリン化インジウムの異方性エッチング⁵⁻³⁾で作製することができる (**図 5-3**)。Si ウエハでは、

バルクの Si 原子は 4 本の結合手によって共有結合しているが、表面では結合手が余った状態（ダングリングボンド）となっている。例えば、表面の Si 原子 1 個に対して、(100)面では 2 本のダングリングボンドが、(111)面では 1 本のダングリングボンドが存在する。ダングリングボンドの存在はその表面の化学的な活性を示すので、これが多い(100)面の方が、化学エッチングの際にエッチング速度が速い。このエッチング速度の差を利用し、エッチングの方向に異方性を持たせる技術が異方性エッチングであり、これを利用した Si ウエハへの V 溝の作製が行われている。この方法で作製できる構造は、その作製原理から斜面の角度が 54.7° で固定される。つまり、エッチングの時間を制御することで、断面が台形のような構造も作製できる。また、溝間の距離はエッチングのマスク幅を変えることで制御できる（図 5-4）。そして、これをモールドとして使用すれば、反転形状についても調査可能である。

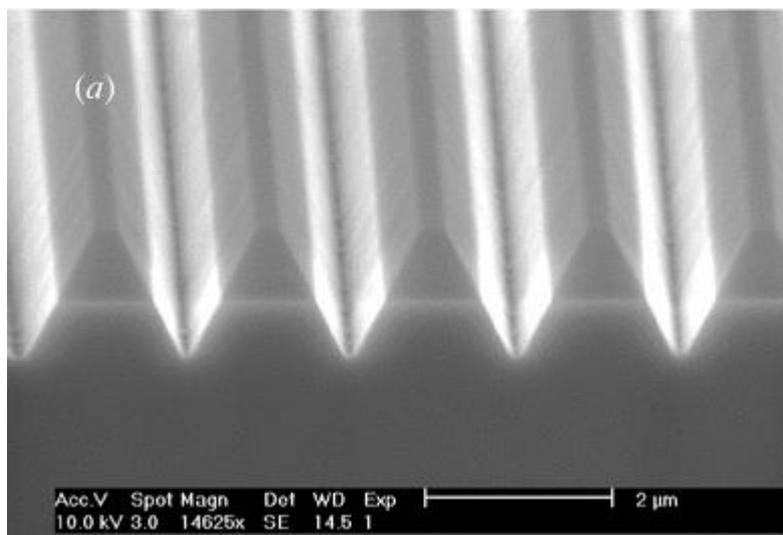


図 5-3 異方性エッチングにより作製したリン化インジウムの V 溝構造⁵⁻²⁾

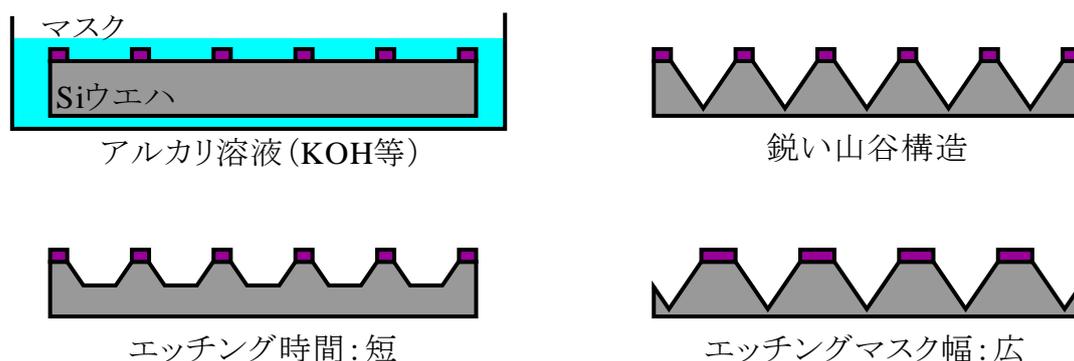


図 5-4 Si ウエハの異方性エッチングによる微細構造の作製

本研究で作製した微細構造の空間波長は、用いる微粒子の粒径と同等であり、どの微細構造においても細胞の代表寸法より小さいものを適用している。また、本研究で用いた粒径 $500\text{nm}\sim 2\mu\text{m}$ の範囲では、細胞の接着に及ぼす影響に差は見られなかった。したがって、微細構造の周期を更に大きく、あるいは小さくすることで、細胞に影響を及ぼす寸法の範囲を知ることができる。つまり、構造の周期が細胞に比べて十分に小さい場合、それは細胞にとって平面と同じ状態であると考えられるが、どの程度まで小さければその状態になるのか、閾値が存在するのかといったことを調査できる。微細構造の周期の制御は、例えば用いる微粒子の粒径について更に範囲を広げて調査することで可能である。ただし、微粒子の粒径を大きくすることで、微粒子列と水との接触形態が **Wenzel** モデルから **Cassie-Baxter** モデルへと変化し、微粒子列の水接触角が大きくなることが報告されているため、その影響についても考慮すべきである⁵⁻⁴⁾。

以上の 2 点について、それぞれの影響を明らかにすることができれば、細胞のパターニングに必要な微細構造の寸法や形状に、新たな指針を加えることができる。

細胞の遊走や伸展は、仮足と呼ばれる機構を伸ばすことで行われている。特に、その先端には糸状仮足と呼ばれる細長い構造が形成される。糸状仮足は数十 nm の幅を持つ構造で、糸状仮足の更に先端には、周囲の環境を検知する受容体タンパク質が分布している。数ナノメートルオーダーの粗さを持つ微細構造において、細胞の接着位置や配向方向が制限される報告があるが、このような研究では糸状仮足による構造の認識が支配因子となると考えられる。一方で、本研究で対象としている微細構造は空間波長が $1\mu\text{m}$ のものが主であり、糸状仮足で認識できる範囲ではないと考えている。そこで、細胞の接着モデルを第4章の図 4-21 のように考え、細胞-基質間接着であるインテグリンを介した接着に焦点を当てている。上記の先行研究の結果も参考にすれば、本研究で作製した構造に、糸状仮足で認識可能な微細構造を追加で設けることで、微細構造へ更に多くの細胞を接着させることができると考えられる。微粒子を例にあげれば、その表面に微細な構造が存在するもの

(例：ポーラス微粒子，**図 5-5**) を用いた微粒子列の作製が挙げられる．**図 5-4** のような表面形状の微粒子を用いることで，糸状仮足によっても認識可能な構造の作製が期待できる．

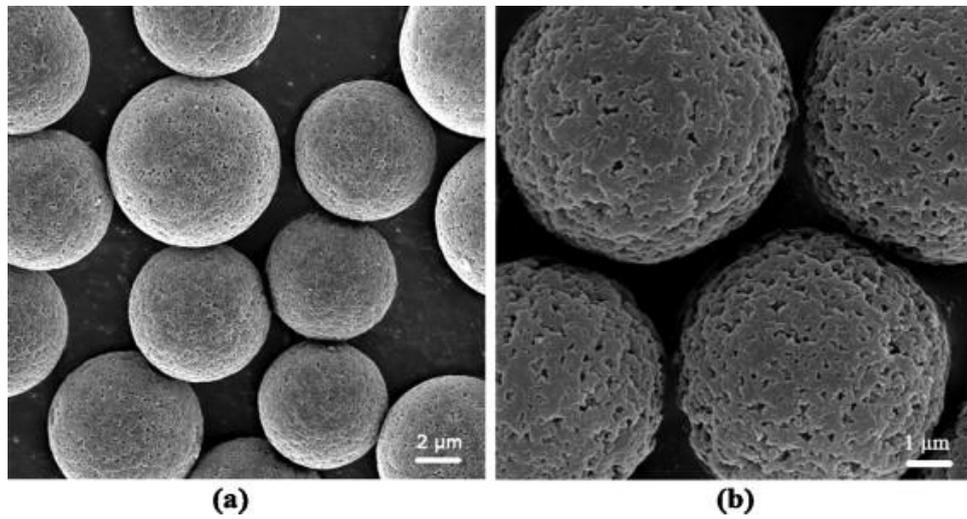


図 5-5 ポーラス微粒子⁵⁻⁵⁾

第 5 章 参考文献

- 5-1) R. Takahashi, H. Sonoda, Y. Tabata, and A. Hisada, “Formation of hepatocyte spheroids with structural polarity and functional bile canaliculi using nanopillar sheets”, *Tissue Engineering Part A*, 16, 6 (2010) 1983-1995.
- 5-2) Z. Tang, A. Y. Akiyama, and T. Okano, “Temperature-Responsive Polymer Modified Surface for Cell Sheet Engineering”, *Polymers*, 4 (2012) 1478-1498.
- 5-3) K. Kennedy, K. M. Groom, and R. A. Hogg, “Fabrication of v-groove gratings in InP by inductively coupled plasma etching with SiCl₄/Ar” *Semiconductor Science and Technology*, 21 (2006) L1-L5.
- 5-4) M. Miyaki, K. Fujimoto, and H. Kawaguchi, “Cell response to micropatterned surfaces produced with polymeric microspheres”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 153 (1999) 603-608.
- 5-5) Y. Song, Y. Du, D. Lv, and J. Wang, “Macrocyclic receptors immobilized to monodisperse porous polymer particles by chemical grafting and physical impregnation for strontium capture: A comparative study”, *Journal of Hazardous Materials*, 274, 15 (2014) 221-228.

謝辞

本論文は、筆者が2010年4月から2016年3月までの6年間、金子新准教授のご指導の下、得られた研究成果をまとめたものです。

金子新准教授には、研究内容は勿論の事、理系研究者のあるべき姿など、時に厳しく、しかし親身にご指導頂きました。また、国内・国外を問わず、学会発表の機会を数多く設けて下さり、得難い経験をさせていただきました。謹んで、御礼申し上げます。

初澤毅教授は、ご多忙の中審査会において副査を担当して下さいました。微細加工とそのバイオ分野への応用という研究フィールドにおける、多くのご助言を頂きました。ここに、深く謝意を表します。

諸貫信行教授は、金子研究室との交流が盛んであることもあり、研究室配属時よりご指導を賜りました。また、修士論文に引き続き、審査会の副査も担当して下さい、微細加工の観点から有用なご助言を頂きました。深く感謝いたします。

藤江裕道教授には、修士論文に引き続き、審査会の副査として細胞の生物学的作用の観点より、適切なお助言を頂きました。厚く御礼申し上げます。

楊明教授ならびに菅原宏治准教授には、同じ機能デバイスグループとして、研究報告会やゼミ等でご指導を賜りましたことを、感謝いたします。

中楯浩康助教ならびに現株式会社シーワテックの田中靖紘先生には、研究室配属当時より細胞を研究対象とするに辺り、多くのご助言をいただきました。また、細胞の培養方法や研究に必要な設備についての相談に乗っていただきました。ここに、感謝の意を述べさせていただきます。

清水徹英助教には、研究報告の場において、鋭いご指摘・ご助言をいただきました。また、英語原稿の添削なども引き受けて下さったことにも、感謝しております。

現成蹊大学の大家溪助教には、細胞のSEM観察に際し、臨界点乾燥および凍結乾燥の手順を教えていただきました。また、実験設備も貸していただき、本研究を進める上で重要な知見を得ることができました。ありがとうございます。

東海大学の榎屋和義教授ならびに機械工学コースの小林訓史准教授は、お忙しいところ合同研究ゼミという活発な議論の場を設けて下さいました。また、公聴会にも来てくださり、その場でも多くのご指摘をいただき、感謝しております。

金子研究室、諸貫研究室、楊研究室の学生ならびに卒業生の方々には、研究はもとより合宿などの学外行事を通じ、充実した学生生活を送らせていただいたことを感謝しており

ます。特に、同じ細胞応用班として苦楽を共にした、杉原達記君、笠松寛央君、増子龍也君、井上諒君、川鍋真人君、青戸隆志君、井戸崇太君、芹沢壮梧君、そして長澤潤君に、御礼申し上げます。また、私が研究室の一期生であったことから、先輩として指導して下さい、その後の博士課程においても目標とさせていただいた西尾学さんに、感謝いたします。

秘書の野田久美子様には、不自由ない日々の研究生生活を送る上で多くのサポートをしていただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、長期間に渡り私の研究活動を支援して下さい、両親、家族に深謝いたします。

なお、本研究の内容の一部は、笹川科学研究助成(26-204)、住友財団基礎科学研究助成(101014)、日本学術振興会・基盤研究(C)(22560130)、若手研究(B)(20760088)の助成を受けて実施いたしました。