

R1370

3次元細胞システム構築用マイクロチャンバレイの開発

Development of PMMA Micro-chambers for 3D cell tissues

洞出 光洋

Mitsuhiro Horade

大阪大学大学院基礎工学研究科

Graduate School of Engineering Science, Osaka University

近年、*in vitro* 環境における3次元細胞システムを構築し、再生医療への応用を目指した研究が行われてきている。3次元細胞システムを構築するための手法の1つとして、本研究では細胞を培養するための型そのものを形状自由度の高い状態で製作し、細胞をモールドイングする方法を採用した。実際にPMMA製のマイクロチャンバレイを製作し、細胞をマイクロチャンバ上で培養し、チャンバの形状に沿って形状が製作される過程を確認することができた。

In recent years, researches on construction of 3D tissues *in vitro* are reported and we aim to construct three-dimensional cellular systems and apply in regeneration medicine. In this time, we focused the shape of micro-chamber for cell culture. First, we established the development of a method of fabricating three-dimensional micro-structures, micro-chamber arrays with various 3D surface a were fabricated. Finally, constructions of three-dimensional cell tissues were succeeded.

Keywords: microscale fabrication, tissue engineering, cell tissue, X-ray lithography

背景と研究目的: 近年、*in vitro*環境における3次元細胞システムを構築し、再生医療への応用を目指した研究が行われてきている。また、3次元細胞システムを構築するための手法が数多く報告されている[1][2]。本研究では、機械パーツの成形加工技術と同様に、細胞培養を行うための型を高精度に3次元加工する手法を確立し、細胞パーツを製作することを目的とした。培養用の3次元形状を有するマイクロチャンバは、自由曲面や側壁傾斜等を有するマイクロスケールの微細構造体の製作が可能で3次元リソグラフィ技術を用いることで実現可能である。

まず、X線リソグラフィを用いて、側壁傾斜を有するPoly methyl methacrylate (PMMA)製のマイクロチャンバレイを製作する。次に細胞をチャンバ上に撒く。一定時間培養することで3次元形状を有する細胞パーツの製作が可能となる (Fig.1)。

実験: マイクロチャンバレイの製作について述べる。露光には立命館大学SRセンターに設置された、超電導小型SR光源AURORAのBL-6を利用し、被加工材には日東樹脂工業株式会社製の0.5mm厚のバルクPMMAを用いた。現像には、GG現像液を用いて、37℃で3h行った。また露光量の上限は現像後最大加工深さが約300μmになるように与えた。

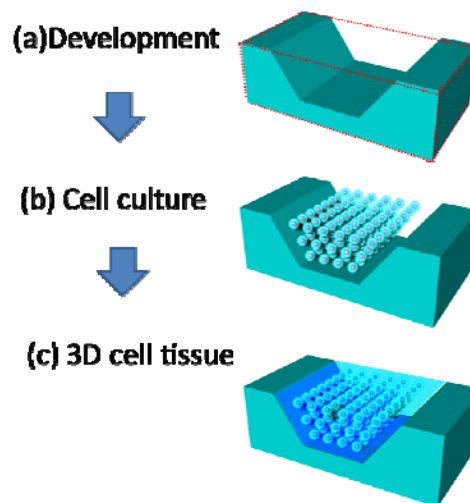


Fig. 1 Process flow of construction of 3D cell tissues *in vitro* (a) Fabrication of 3D micro structure with flexibility surface after development. (b) Cells are seeded on to the 3D micro-chamber. (c) Construction of 3D cell tissues after cell culture.

次に、細胞培養について述べる。製作したPMMA製マイクロチャンバを、エタノール、イソプロピルアルコールを用いて十分に洗浄し、その後UV light環境下で5h処理した。マウス由来のNIH 3T3細胞を含む細胞懸濁液をマイクロチャンバ上へ塗布し、細胞培養を

行った。なお、細胞培養液は NIH 3T3 を 7.0×10^2 [cell/ml] の濃度にしたものであり、培養はインキュベータ内で行った。

結果、および、考察： 露光条件として、Fig. 2(A) (B) (C) それぞれに示すような3種類の露光量分布を与えた。最大のDose量は $0.025 \text{ A}\cdot\text{h}$ となっている。被加工材を露光後、 90° 回転させて再度同じ露光量分布を与えた。この2度目の露光により、1軸方向のみならず2軸方向への照射量分布を与えた。Fig. 3(A) (B) (C) に製作後のPMMA製マイクロチャンバの上部側からの顕微鏡図を示す。なお、Fig. 3(A) (B) (C) それぞれはFig. 2 (A) (B) (C) に対応している。図のように等間隔で傾斜を有するピラー形状を持つマイクロチャンバアレイが製作できた。これらの形状は露光量分布と同様、すなわち露光量の大小と加工深さの大小に相関関係を持つような加工深さを有する3次元マイクロチャンバアレイの製作に成功した。

また、これらのマイクロチャンバアレイ上に細胞懸濁液を塗布した。一定時間の培養後製作したマイクロチャンバの3次元形状面に沿って細胞が集まっていることを確認した。以上の結果より、これまで製作が困難であった細胞パーツに製作に期待できる。製作要求の高いトロイダル形状用チャンバ等を3次元リソグラフィにより製作し、それに細胞培養することで、人工血管の構造等も製作可能と思われる。今後はこれらのアプリケーションを視野に入れた研究展開を行っていく予定である。

文 献

[1] Tao Yue, Masahiro Nakajima, Masaru Takeuchi, Chengzhi Hu, Qiang Huang and Toshio Fukuda, *Lab on Chip*. **14** (2014) 1151

[2] Puwanan Chumtong, Masaru Kojima, Kenichi Ohara, Yasushi Mae, Mitsuhiro Horade, Yoshikatsu Akiyama, Masayuki Yamato and Tatsuo Arai, *Journal of Robotics and Mechatronics* **25** (2013) 665

[3] Mitsuhiro Horade and Susumu Sugiyama, *Recent Advances in Nanofabrication Techniques and Applications*, *InTech* **16** (2011) 315

論文・学会等発表 (予定)

[1] 洞出 光洋, 小嶋 勝, プワナン チュムトン, 神山 和人, 前 泰志, 新井 健生, ロボティクス・メカトロニクス講演会 2014 in Toyama (ポスター発表)

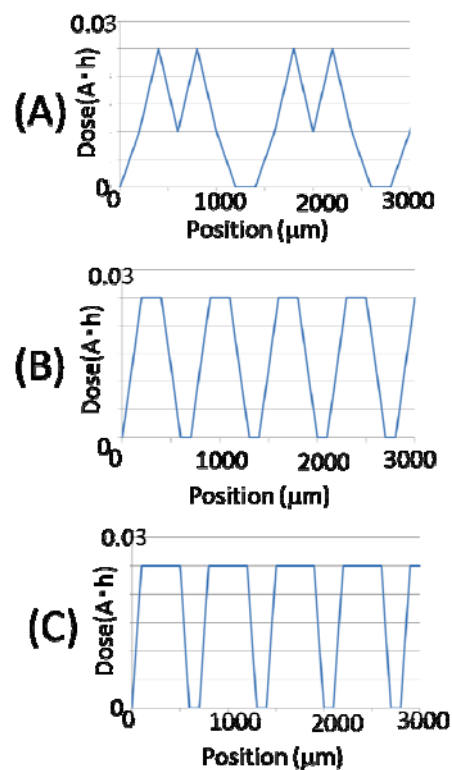


Fig. 2 The relationships between position (X, Y) and energy dosage amount (A·h),

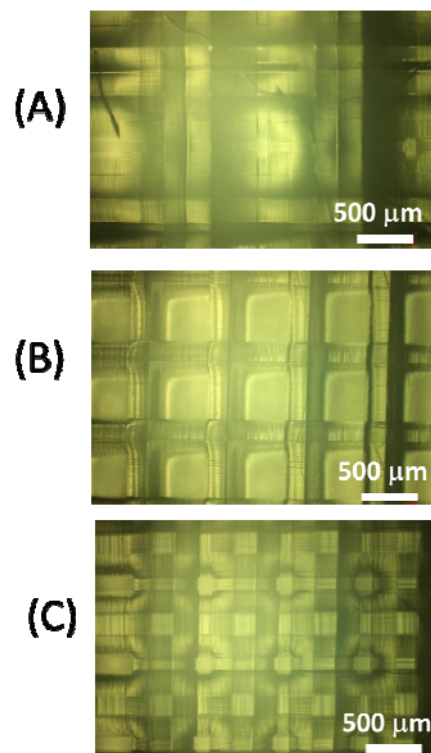


Fig. 3 microscope views of micro-chamber arrays.