

ナノ凹凸表面を利用した高効率細胞培養技術への挑戦

大阪大学大学院工学研究科

洞出 光洋

要旨

再生医療分野における臨床応用や創薬の実現においては、材料となる細胞を多量に用意する必要があり、細胞を培養させて供給する必要がある。本研究課題では、ナノ凹凸を有する細胞付着防止膜付き培養系（培養ディッシュ）を開発することで、熟練技術や高価な薬品を必要とせず、容易で高効率な細胞培養技術の確立を目指す。微細加工学をベースとし、再生医療分野の要素技術確立へ挑戦する課題である。

1. 研究背景と目的

近年、再生医療の産業化が期待されており、さらに臨床応用が既に報告されるなど、その実用化へ向けて大きく加速する見通しがたっている。しかし、細胞の臨床応用や創薬には、大量の細胞を必要とするが、大量生産するには培養により増殖させるしかない。細胞は人間の体と同じく、培養材（ガラスディッシュ等）のようなものに物理的に接着させなければ増殖しない（図1 増殖過程）。

しかし、細胞は増殖しすぎると大きな細胞塊となり、内部まで栄養が供給されず効率よく培養することは容易ではない。今回提示する方法は、本報告者が見出した細胞付着防止効果のあるナノ凹凸を、パターンニング技術と組み合わせることで、細胞塊が形成されにくい環境を実現することである（図2 提案型新規培養系）。この手法により、特殊な技術や手間が不要になり、細胞数が一定量以上増えず収束し、容易に誰でも最適な高効率培養が可能になると考えた。

2. 実験方法

今回確立したシリコンウエハ上にナノ凹凸パターンを形成する手法を示す（図3 細胞付着膜パターンニング手法）。まずフォ

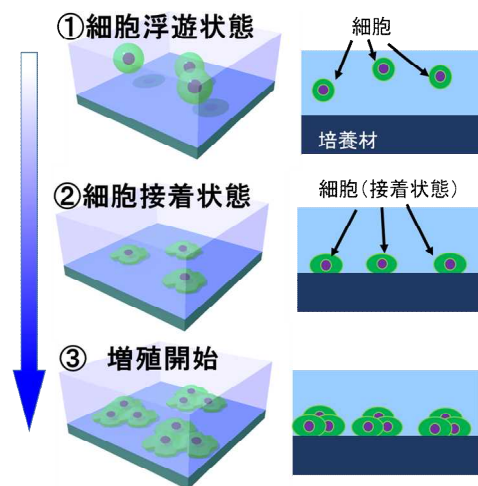


図1 増殖過程模式図。浮遊細胞は増殖しないが、培養材（ガラスディッシュ等）に接着後、増殖が開始される。

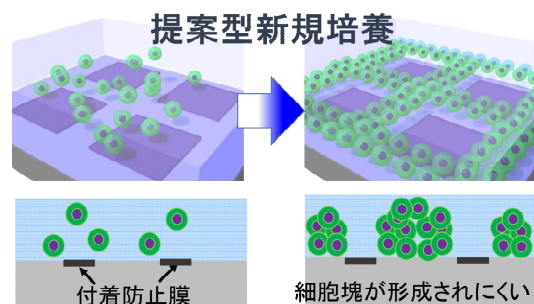


図2 提案型新規培養系。付着防止膜により細胞塊が形成されず、癌化することなく効率よく培養することが可能。

トリソグラフィによりレジストパターンを形成し、次に反応性イオンエッチング（RIE）でシリコン表面をナノ凹凸に加工する。このとき、パターニングされたレジストがマスク材となる。最後にレジストを除去することで、ナノ凹凸がパターニングされたシリコン基板が製作可能となる。ナノ凹凸の加工には、高価で長時間の加工となる電子線描画を用いず、RIEを用いてわずか5分の加工時間で形成できることが特徴の1つでもある。

製作した基板上に細胞を播種する。図4はマウス線維芽細胞 NIH3T3 を播種した際の顕微鏡画像である。なお、図中赤丸は繊維芽細胞を示している。図4には、製作した基板上のある2つの領域における顕微鏡画像を示しているが、いずれの場合もナノ凹凸領域には細胞が付着していないことが確認できる。

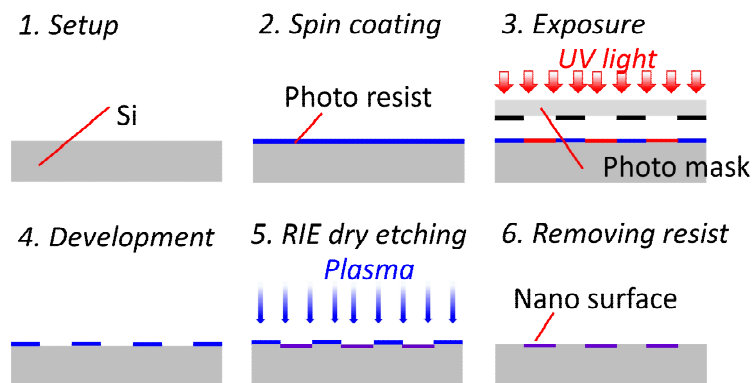


図3 細胞付着膜パターニング手法。一般的なフォトリソグラフィによりレジストをパターニングし、パターニングされたレジストをマスク材として、RIEによりナノ凹凸を加工する。

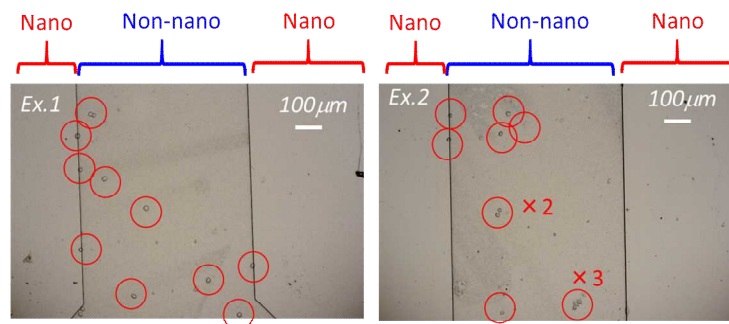


図4 細胞播種実験結果。ナノ凹凸領域には細胞が付着していないことが確認できる。

3. 結果と考察

細胞付着防止効果のあるナノ凹凸パターンを任意に基板上に形成できる技術を確立した。さらに、細胞を播種したところ、ナノ凹凸パターンの有無により、細胞密度が異なることが確認できた。細胞密度を含めた播種条件にももちろん依存するが、本来の目的である、細胞塊が形成しにくい状況をあらかじめ形成することができている。これは、効率よく培養することや、パターニングされた細胞シートの製作にも期待がもてる結果となった。

4. まとめと今後の課題

今回シリコンウエハ上に形成したナノ凹凸上で細胞の付着防止効果を確認した。実際に細胞培養用ディッシュとして用いるためには、ポリスチレン等の材料で最終的に製作する必要がある。そのため、シリコンウエハを母型として、金型製作、成形加工と組み合わせることが必要である。今後は金型製作、成形加工時に、ナノ凹凸の転写精度を維持可能かどうか、さらにポリスチレン材料でも同等の効果があるかを検証していく。