

【助成 38 -32】

磁化細胞単一操作機構を具備したマイクロ引張デバイスによる  
細胞-細胞間接着強度の測定

研究者 静岡大学工学部 助教 大多 哲史

静岡大学工学部 准教授 菊池 将一

東京工業大学物質理工学院 助教 倉科 佑太

静岡大学工学部 助教 中澤 謙太

〔研究の概要〕

血球系の細胞を除く大部分の細胞は、接着性細胞である。体内で足場に細胞外マトリックスを介して接着しており、また細胞同士も相互に接着して存在している。このような接着性細胞が接着していない場合には、生細胞でも増殖することができないこと(Byrne et al., *Mathl. Comput. Modelling*, 1996)が知られている。このように、増殖や分化などの細胞特性は接着性と極めて密接に関係している。このため、本研究では、細胞の接着力を実験的に数値化し、細胞の接着性と細胞特性の関係性や細胞接着メカニズム解明に寄与する知見を得ることを最終目標とし、その準備として、計測用基板材質の選定と、単一細胞を基板先端への誘導し培養可能な基板形状の最適化を実施した。

〔研究経過および成果〕

本研究では、細胞間の接着強度を計測するためのシステム構築の足掛かりとして、図 1(a)のように、先端にマイクロサイズの突起のある基板上で、その突起部に単一細胞を誘導する技術の確立を実施した。

―基板の準備― 研究開始当初はシリコン基板上で細胞誘導を行うことを想定していたが、取り回し易さから、細胞誘導の段階では倒立型の顕微鏡により観察を行うことにした。しかし倒立顕微鏡では光源と対物レンズの間に基板が挟まれる形になるため、光を透過する透明な基板を用意する必要がある。このため、光が透過し強度のある OSTE (Off Stoichiometry Thiol Enes)ポリマー(Yasuga *et al.*, *Lab on a Chip*, 2018)を使用することとした。本研究では、図 1(b)のように基板先端の突起部分の形状に関わるパ

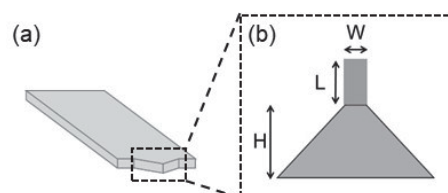


図 1、基板の設計

ラメータ(W: 突起部分の幅、L: 突起先端の長さ、H: 突起付根部の長さ)を変化させた OSTE 基板を複数パターン作製し、細胞誘導具合と基板形状の依存性を評価した。

―細胞誘導実験手順―  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ナノ粒子にポリエチレンイミン(Polyethylenimine: PEI)を表面修飾することで、細胞への取り込み効率を向上させた材料(Ota *et al.*, *J. Nanopart. Res.*, 2013.)を用意した。この PEI 修飾磁性ナノ粒子をヒト間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells: MSC)に添加し、取り込ま

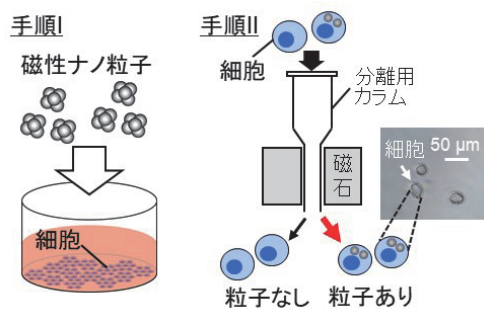


図 2、磁性ナノ粒子を取り込んだ細胞の分離

せることで、細胞に磁場に対する応答性を付与した(図 2、手順 I)。さらに、磁気分離を実施することで、磁性ナノ粒子を含む細胞のみを分画した(図 2、手順 II)。また、基板上的細胞位置を明瞭化するために、磁気分離前に細胞をカルセインにより蛍光染色した。磁気分離後の細胞が混合した液をマイクロピペッターで吸入して、基板上的滴下し、磁石により基板先端に誘導する実験を実施した。

PEI 修飾磁性ナノ粒子の細胞への添加量に関する検討も実施した。添加量 2, 20, 100  $\mu\text{g}$  について実施したが、何れも磁石による誘導は行えた。また、添加量 20, 100  $\mu\text{g}$  の際には、細胞表面に凝集した粒子が付着している様子も顕微鏡により観察されたが、2  $\mu\text{g}$  では明らかな付着は確認されなかった。細胞表面に余分な粒子が付着することで、誘導の際の立体障害を招く可能性もあるため、添加量 2  $\mu\text{g}$  で実施することが適切であると判断した。

—細胞誘導実験— 図 3 に OSTE 基板上における磁場による誘導を実施した際の顕微鏡観察画像をである。本報告では、 $W=50\ \mu\text{m}$ 、 $L=0\ \mu\text{m}$ 、 $H=200\ \mu\text{m}$  (基板(i))と、 $W=200\ \mu\text{m}$ 、 $L=50\ \mu\text{m}$ 、 $H=50\ \mu\text{m}$  (基板(ii))について示した。基板(i)に対して基板(ii)は、突起先端が伸びておりかつ、先端部分の幅が広いという特徴がある。基板(i)では、細胞が基板先端付近まで

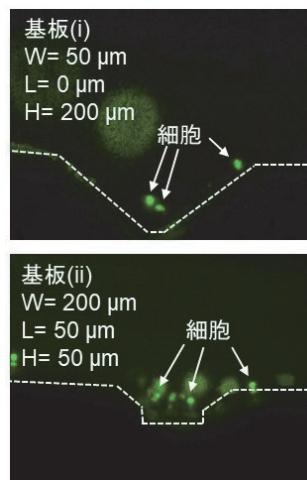


図 3、細胞誘導の様子

誘導されていることが分かった。対して基板(ii)では、先端に突き出した箇所には全く細胞が到達していないことが分かった。これは、細胞は基板に滴下した液滴内と移動するため、液が浸透しない位置には、細胞は到達できない。基板(ii)のような、鋭く先端に突き出るような構造では、表面張力の影響で液が浸透しなかったと考えられる。また基板(i)についても、基板の表面加工の粗さのため、細胞が完全には基板先端まで到達していないと考えられる。このため、基板の面方向の観察のみではなく、厚み方向の観察も行い、厚み方向の形状評価も必要であると言える。

本研究から、液の表面張力を考慮した際の適切な基板形状の条件出しを行えた。今後は細胞引張試験に必要な単一細胞誘導のための基板形状の最適化を行い、細胞間接着強度の計測へと展開する。