

多能性幹細胞を分離回収するマイクロチップの開発

電子技術課 高田耕児 中央研究所 大永崇 小幡勤

(国) 富山大学医学薬学研究部 小池千加 二階堂敏雄 (国) 京都大学 古賀毅

1. 緒言

近年、幹細胞を利用した再生医療が新しい医療として期待されている。幹細胞は、様々な細胞へ分化する能力と自己複製する能力を合わせ持つ細胞であり、ES 細胞、iPS 細胞などが再生医療の候補とされているが、倫理的問題、ガン化のリスクの問題等もあることから、私たちの体の中に存在する体性幹細胞を利用する研究も盛んに行われている。母体の中で胎児を包んでいる羊膜は、通常分娩後に廃棄されているが、その中にも幹細胞が存在する¹⁾。羊膜由来の幹細胞は、倫理的問題がない、安定供給が可能、ガン化のリスクがない、移植の際の免疫拒絶性が低いなど、幹細胞供給源として優れた特徴を持っているため、羊膜組織から幹細胞を効率よく抽出できれば様々な再生医療への応用が見込まれる。本研究では、これまでに開発してきた樹脂マイクロチップ技術を応用して、幹細胞を分離回収する際の前処理として、細胞の凝集塊等サイズの大きなものや細胞の残骸等サイズの小さなものを目的の細胞から分離するためのマイクロチップの開発を行った。

2. 実験方法

文献²⁾のチップ構造を参考にしてフォトマスクを設計し(作製は主として外注による)、そのフォトマスクを使ってセンター内の設備で樹脂チップ成形のためのシリコン製鋳型を作製した。次に、このシリコン製鋳型を用いて、これまでに開発した紫外線硬化樹脂および成形方法を用いて樹脂製マイクロチップを成型した。マイクロチップはマイクロピラーが規則正しく並んだ構造をしている。作製したマイクロチップのうち7種類について、マイクロピラーの設計寸法を表1に示す。作成したチップは走査型電子顕微鏡および走査型白色干渉計によりその形状を測定した。

表1 マイクロピラー設計寸法

番号	1	2	3	4	5	6	7
直径 (μm)	12	20	25	30	35	40	45
高さ (μm)	25	50	50	50	50	50	50
間隔 (μm)	10	20	25	30	35	40	45

3. 実験結果および考察

作製したチップの外観と SEM 像をそれぞれ図1、図2に示す。ピラーの直径が12μmのチップ1の流路中央部

の SEM 像が図2A、ピラーの直径が20μm、高さ50μmで一番アスペクト比が高いチップ2の流路中央部が図2B、出口付近が図2Cである。微細なマイクロピラーが規則正

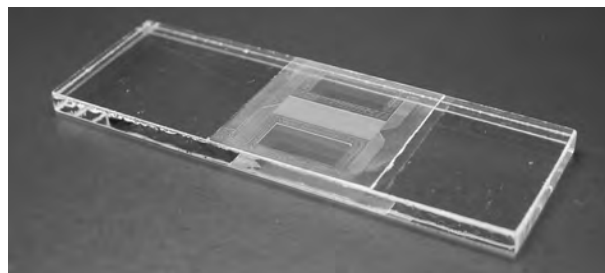


図1 マイクロチップの外観

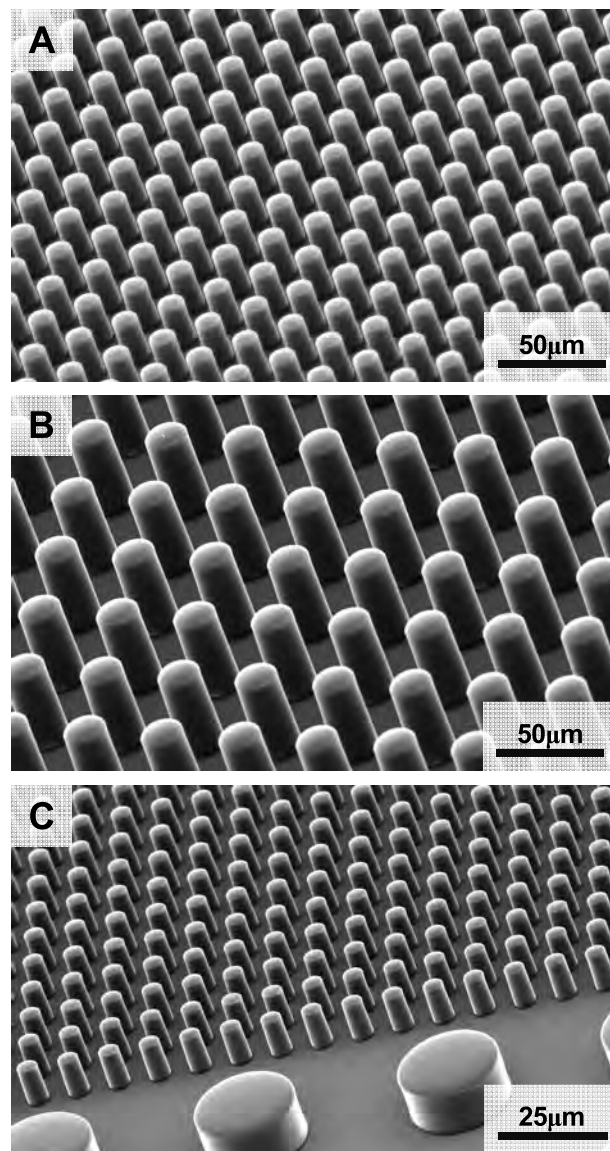


図2 マイクロチップの SEM 像

しく配列した構造が確認できており、開発してきた紫外線硬化樹脂と成型方法により微細かつ高アスペクト比の構造を持つ樹脂マイクロチップが成型できることが分かった。

次に、走査型白色干渉計により、鋳型の穴の深さと樹脂チップのピラーの高さを測定した結果を表 2 に示す。ピラー直径が 20 μm のチップ 2 と、ピラー直径が 25 μm のチップ 3 について測定した。流路の入口付近と出口付近では鋳型の穴深さに違いがあった。これはドライエッチングの速度が場所によって異なるためと考えられ、今後改善は可能である。鋳型の穴深さを基準にしたピラー高さの収縮率は、一番大きいところでも 2.6% であり、非常に精度よく鋳型の構造が樹脂チップへと転写できていることが分かった。また、この測定はチップ成形から 2 カ月以上経過してから行っており、長い時間が経過しても寸法がほとんど変わらないことも分かった。

さらに、同じチップを 121 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間、オートクレーブによって滅菌処理したものを測定した。オートクレーブ処理による収縮率は最大でも 0.68% であり、オートクレーブ処理をしてもほとんど変形しないことが分かった。

表 2 鋳型の穴深さとピラーの高さ

番号	入口付近		出口付近	
	2	3	2	3
鋳型穴深さ (μm) D	48.3	49.6	45.2	46.1
ピラー高さ (μm) H_1	47.2	48.3	44.4	45.2
収縮率 (%) ($D-H_1$)/ $D \times 100$	2.3	2.6	1.8	2.0
オートクレーブ後 ピラー高さ (μm) H_2	47.0	48.1	44.1	45.1
収縮率 (%) (H_1-H_2)/ $H_1 \times 100$	0.42	0.41	0.68	0.22

キーワード：マイクロ流体デバイス、紫外線硬化樹脂、細胞分離、幹細胞

Development of Polymeric Microfluidic Devices for Stem Cell Separation

Koji TAKATA, Takashi OHNAGA, Tsutomu OBATA

Chika KOIKE, Toshio NIKAIDO (University of Toyama)

Tsuyoshi KOGA (Kyoto University)

Microfluidic devices which could be used for cell separation and recovery were developed using new UV curable resin and a new molding method. We made several microchips in which the size and arrangement of micropillars was altered, and observed and measured the chips using scanning electron microscope and scanning white light interferometer, showing that the microchip had a fine structure with high aspect ratio. In comparison with conventional silicon chips, the use of this polymeric chip can drastically reduce the cost of cell separation system.

マイクロチップを医学研究や臨床応用に用いる場合、マイクロチップを滅菌処理する必要がある。オートクレーブによる滅菌処理を行ってもほとんど変形しないことは、この樹脂マイクロチップを実用化の上で極めて重要である。

この樹脂マイクロチップは、従来から用いられているシリコン製のマイクロチップと比べて大きな利点がある。まず、シリコン鋳型から多数複製できるために、高価なシリコンウェハの使用量が少なく、製造コストを大幅に下げることができる。また、チップが透明であるため、顕微鏡による透過観察を行うことができる。さらに、表面に官能基を持たせることで、容易に表面の修飾ができる。MEMS 等によく用いられるポリマーである PDMS と比べても利点がある。PDMS は加熱して短時間で硬化させると収縮が大きいので、常温で数時間から数日かけて硬化させる必要がある。それに対してこの樹脂は数分という短時間で硬化が完了するため製造コストが抑えられる。また、PDMS よりも表面修飾がずっと容易である。

4. 結言

これまで開発してきた紫外線硬化樹脂と成型方法により微細かつ高アスペクト比の構造を持つ樹脂製マイクロチップを成型することができた。これにより今後は羊膜細胞等のさまざまな細胞へとこの樹脂マイクロチップを応用していくことができるようになった。

参考文献

- 1) Toda A. *et al.* J. Pharmacol Sci. **105**, 215-228 (2007)
- 2) A. Davis J. A. *et al.* PNAS **103**, 14779-14784 (2006)