

表面の幾何学的特徴が細胞接着に及ぼす影響

首都大学東京 ○芹沢 壮梧, 武田 伊織 ◎金子 新

表面の幾何学的特徴が細胞接着に及ぼす影響を調査している。移流集積法を用いて SiO₂ 微粒子を Si 基板に整列させ、同微粒子列をマスクとして RIE を行った。加工の Si 基板をマスターとして PDMS に転写し、最終的に表面粗さ Ra28~85nm, 歪度 0.5~0.1, 尖度 1.5~0.9 の微細形状をもつ PDMS 足場を創成した。細胞接着は歪度と尖度に対して高い相関を有し、特に尖度の低い構造ほど細胞が接着しやすいことが明らかとなった。

1. 緒言

疾患の治療や早期発見のために、培養細胞の分析が有効とされている。培養細胞をバイオチップなどへの応用を考えたとき、細胞を所望の位置に接着させる技術が必要である。一般に、細胞は微細構造（表面幾何形状）に接着しやすいが、細胞接着に支配的な表面幾何形状については明らかになっていない。

本研究では、自己整列微粒子²⁾を応用して様々な幾何学的特徴（算術平均粗さ Ra , 歪度 Rsk , 尖度 Rku ）をもつ規則的な微細構造を形成し、同表面を足場として細胞を培養し、幾何学的特徴と細胞接着率の関係を体系的に調査することを目的としている。なお、細胞の接着は足場材料にも強く依存するため、表面の材料の影響についても併せて検討する。

2. 微細構造化足場の作製

2.1 足場構造の方法と条件

図 1 示す工程で微細構造を作製した。あらかじめピラニア処理で Si 基板を親水化 (OH 基生成) させ、同 Si 基板に疎水性のオクタデシルトリクロロシラン単分子膜 (OTS) をマイクロコンタクトプリントして親水/疎水パターンを作製する。同パターン基板を、粒径 1 μ m のシリカ微粒子が分散した懸濁液から、一定の速度と角度で引き上げる。その結果、親水部上のみ微粒子が六方最密充填構造で自己整列する³⁾。この微粒子列をマスクとして反応性イオンエッチング (RIE) を行い、図 1(c) のような微細構造を創成する。RIE のエッチング時間を 1, 3, 5, および 7min と変えることで、表面の幾何学的特徴を変化させる。加工後の Si 表面を鋳型として PDMS をキャストし、微細構造化した PDMS 足場を作製する。

2.2 構造の作製結果

微粒子整列した Si 表面を図 2 に示す。親水パターンに依ってライン状の微粒子列が形成できている。図 3 に RIE 後の Si 表面（微粒子列を除去済み）を SEM で観察した結果を示す。エッチングによってピラー状の突起が形成されて

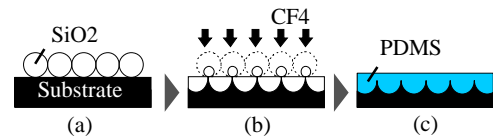


Fig. 1 Fabrication process for micro-structured scaffold

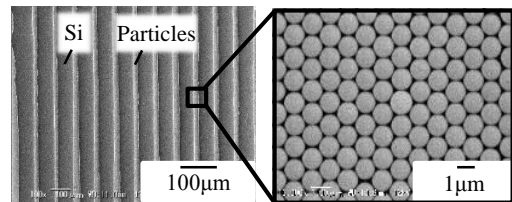


Fig. 2 Self-assembled SiO₂ particles

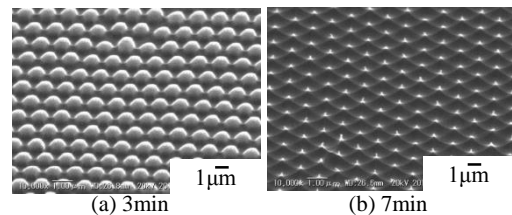


Fig. 3 Micro-structured Si surfaces after RIE (1 μ m particle).

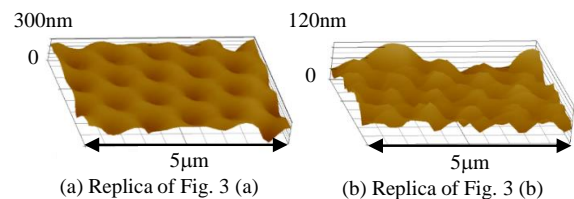


Fig. 4 AFM images of PDMS scaffold surfaces.

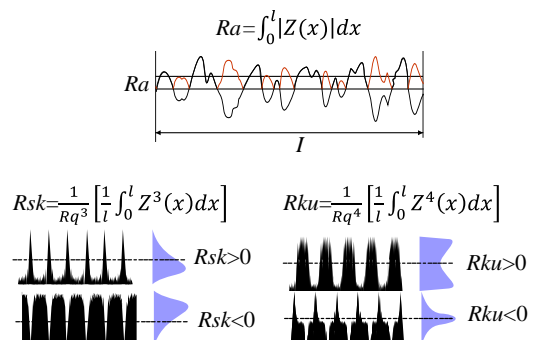


Fig. 5 Definition of surface properties (Ra , Rsk , Rku).

いる。また、図3はRIE時間3minおよび7minの場合であるが、同時間によってピラー形状が変化していることが確認できる。同構造をPDMSに転写した結果を図4に示す。PDMSの充填率や離型性の問題から、Si表面構造が完全には転写されていないが、微細構造をもつPDMS表面が作製できた。これらの表面構造を図5に示す表面パラメータ(Ra , Rsk , Rku)で評価した。なお、 Ra は算術平均粗さ、 Rsk は山と谷の非対称性を示す歪度、 Rku は凸部の尖りを示す尖度である。その評価結果を表1に示す。また、このような微細構造は、図6に示すように一定間隔で形成されている。

3. 微細構造上での細胞培養

3.1 実験方法および条件

PDMS足場は同一形状のものを2種類用意し、一方は未処理のまま足場として使用し、他方は細胞接着性のよいポリスチレンで被膜した。同ポリスチレンディッシュ上に静置し、培養液(DMEM培地)を充填する。PC12細胞(ラット副腎髄質褐色細胞腫)を10000cells/cm²で播種し、温度37°、湿度100%(5%CO₂)のインキュベーターで培養した。培養後24時間のPDMS足場表面を位相差顕微鏡で観察した。

3.2 結果および考察

培養後24時間のPDMS表面の観察結果を図7に示す。 $Rsk=0.1$ の表面では細胞は微細構造と平坦部の両方に接着しているが、 $Rsk=-0.2$ の場合には微細構造への選択的な接着が確認できる。そこで、PDMS表面への全接着細胞数に対する微細構造上への接着細胞数を選択接着率と定義し、各表面パラメータとの関係を図8に示す。

全般的にPS被膜に比べて、PDMS表面の方が微細構造への細胞接着が優位となっている。t検定の結果、各データ間は $p<0.05$ となったため、グラフ内の大小関係は有意差としてみなせる。選択的細胞接着率は算術平均粗さ Ra に対して特定の傾向はみられなかった。一方で、歪度(Rsk)に対しては、はじめに増加傾向を示した後に、 -0.2 以降は減少に転じた。一方で、歪度(Rku)に対しては減少傾向を示した。これらの結果を整理すると、細胞が接着面積の増大するように、かつ細胞下面での変形を少なくするような表面形状が適していると考えられる。

4. 結言

細胞接着は歪度と尖度に対して高い相関を有し、特に尖度の低い構造ほど細胞が接着しやすいことが明らかとなった。

参考文献

1) S. P. Khan, et al., Nanomed-Nanotechnol., **1**, 2 (2005) 125-129.

Table 1 Surface properties of PDMS scaffold.

Sample	a	b	c	d
Ra [nm]	28	44	85	20
Rsk	0.1	-0.5	-0.3	-0.2
Rku	-1.4	-0.9	-1.2	-1.5

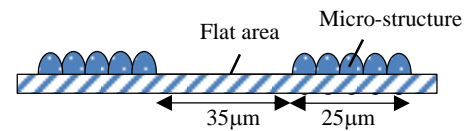


Fig. 6 Schematic illustration of PDMS scaffolds

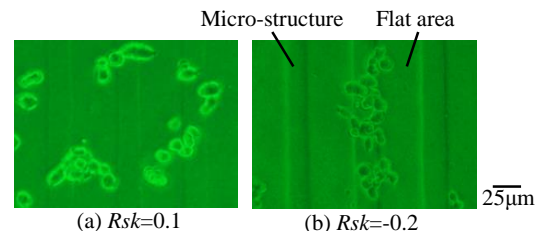


Fig. 7 Cell adhesion on micro-structured scaffolds.

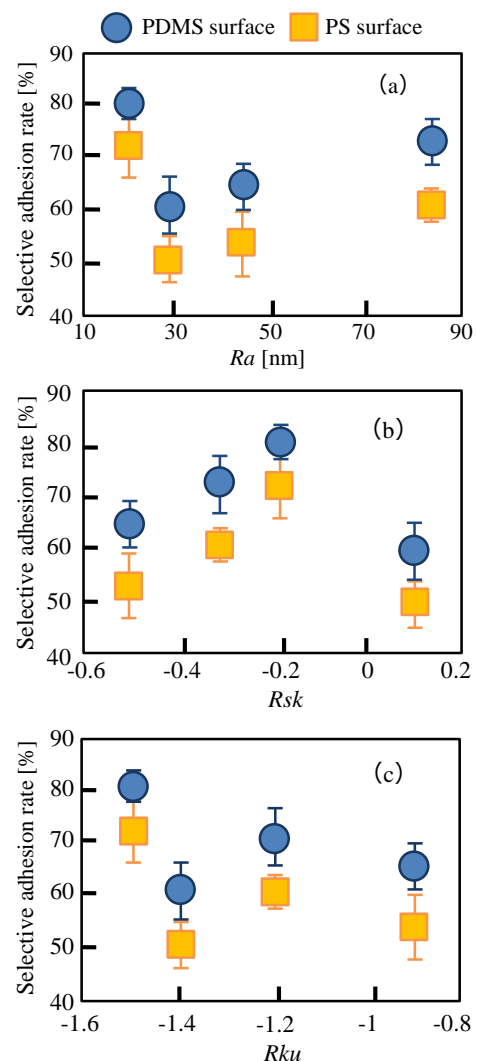


Fig. 8 Effects of surface properties on cell adhesion

2) I. Takeda, et al., Precision Engineering, **43** (2016) 294-298.
3) A. Kaneko, et al., Key Eng. Matter., **516** (2012) 523-524.