集束光加熱エッチング法によって加工したアガロースマイクロ チャンバーアレイを用いた神経細胞の培養

非会員 森口裕之 (東京大学) 非会員 高橋一憲 (東京大学)
非会員 杉尾嘉宏 (東京大学) 非会員 若本祐一 (東京大学)
非会員 井之上一平 (東京大学) 正員 神保泰彦 (NTT 基礎研究所)
非会員 安田賢二 (東京大学)

On-chip Neural Cell Cultivation using Agarose-microchamber Array constructed by Photo-thermal Etching Method.

Hiroyuki Moriguchi, Non-member (Univ. of Tokyo) Kazunori Takahashi, Non-member (Univ. of Tokyo)
Yoshihiro Sugio, Non-member (Univ. of Tokyo) Yuichi Wakamto, Non-member (Univ. of Tokyo)
Ippei Inoue, Non-member (Univ. of Tokyo) Yasuhiko Jimbo, Member (NTT Ltd)
Kenji Yasuda, Non-member (Univ. of Tokyo)

We have developed a novel method for on-chip cultivation of neural cells in flexible agarose-microchamber array on the glass slide. Agarose-microchamber is a micrometer order cavity constructed on the surface of agarose-layer by molding the 50-micrometer-high square/circle shaped micro-cast of thick photo-resist, SU-8. In addition, the shape of agarose-microchamber was rearranged by using the “photo-thermal etching method”, in which we used infrared (1064-nm) focused laser beam as the heat source to melt and remove a portion of agarose gel at the heating spot. By using the photo-thermal etching method we can also manufacture narrow tunnel-shaped channels between microchambers. When nerve cells were cultured on the agar-microchamber array chip, the nerve cells in two adjacent microchambers connected through the photo-thermal-etched channel after 48 hours of cultivation. Those results suggest the potential of agarose-microchamber array integrated with the photo-thermal etching method for the next stage of the single cell cultivation and measurement of nerve cells, such as real-time control of cells' interactions during cell cultivation.

キーワード: マイクロチャンバーアレイ、集束光加熱エッチング、細胞培養中の形状加工、神経細胞、アガロース

Keywords: microchamber array, photothermal etching, shape rearrangement during cultivation, nerve cell, agarose.

1. はじめに

神経ネットワークの学習の仕組みを明らかにするためには、個体レベルから1細胞レベルまでのいくつかの階層からのアプローチがある。そのうち、1細胞単位の計測では、神経

細胞一つ一つに着目して、これらが組み合わされたネットワークの形状とその各細胞の相互作用(刺激、応答)の経時変化に着目し、単離したプライマリーの培養神経細胞の電気生理学的刺激・計測と形態の高解像度顕微鏡観察を組み合わせた

技術が開発され何十年もの間盛んに研究に利用されてきた。

(1, 2)この技術には同時に3点以上の多点で計測できない、パッチクランプ法などを用いると細胞が数時間で死んでしまうといった問題点があったが、電極アレイ基板 (MEAs) 上での神経細胞の培養と計測が開発されることで上記の問題点を克服して数週間に及ぶ長期培養も可能となっている。(3, 4)

他方、多点計測が可能となったことから、神経細胞が基板上で作るネットワークパターンを生化学的、あるいは物理的な手法を用いて制御することで計測するネットワークパターンの特性を明らかにする試みが始まりつつある。ネットワーク形状自体を制御する試みの歴史は古く、たとえば、生化学的方法では、Letourneau 達が神経細胞を培養する基板表面にラミニンなどの細胞接着性の基質でパターンを描き、神経突起をパターンに沿って伸展させることに成功している⁽⁵⁾。物理的方法では、基板表面に神経細胞の伸展にとって障壁となる高さ数 μm の段差をあらかじめ構築した基板上で培養することで神経細胞の伸展・移動を制限するという報告がある。(6, 7)

半導体製作技術を応用して発展してきたマイクロ加工技術によって、先に述べた電極アレイ基板や物理的障壁の製作は可能となったが、基板を加工、修飾するためにはクリーンルーム等で露光、エッチングなどの複雑な工程を繰り返して、細胞の培養を開始する前に、あらかじめ形状・パターンを組み込む必要があった。したがって、培養直前に簡単に構造を変更したり、神経細胞の培養中に形状加工を行ったり、細胞の挙動に応じて微小構造を変更するようなことはできなかった。そこでわれわれは、神経細胞培養基板の構造材料として集束光加熱によって容易に溶解できるソフトマテリアル (アガロース) を用いることで、ガラス・シリコン等のハードマテリアルを素材としてきた従来のマイクロファブリケーション技術では難しかった、細胞の状態の観察に応じて簡便かつ自在にエッチング加工を追加することが可能なアガロースマイクロチャンバーアレイ技術を新たに開発した。

アガロースチャンバの主な利点は、上記のように①細胞培養開始直前あるいは培養中のマイクロ加工が可能である、②アガロースの細胞不活性と細胞非接着性を利用した物理的かつ生化学的な神経突起伸展の制御が可能である、③ $1\mu\text{m}$ 程度の分解能でのエッチングが可能であり、トンネル型チャンネル等の従来の技術では製作工程が複雑な形状の作成も容易である、という点である。以上のような利点をもつアガロースマイクロチャンバーアレイチップは、実際には1細胞連続培養顕微鏡観察系の細胞培養部として、連続計測装置系に組み込んで使用する。筆者らの研究グループは独自の1細胞連続培養顕微鏡観察系を開発し、大腸菌の1細胞計測に関する報告を行ってきた。⁽⁸⁻¹⁰⁾本報告では、まずこの1細胞連続培養顕微鏡観察系の構成を述べ、アガロースマイクロチャンバーアレイチップの作成法、集束光加熱エッチング法、そしてそれらを実際に用いて行ったラット小脳顆粒細胞

の培養実験について報告する。

2. 実験装置および方法

<2.1> 1細胞連続培養顕微鏡観察系

1細胞連続培養顕微鏡観察系は、温度、液体培地の成分、細胞の種類と位置関係・相互作用など、細胞の状態に影響を与えるあらゆる条件を1細胞レベルでコントロールしながら、細胞を長期培養し顕微鏡で観察する実験系である。1細胞連続培養顕微鏡観察系において、培養する細胞を収納するのは、厚さ 0.2mm のカバーガラス基板上に作られたマイクロチャンバーアレイである。大腸菌の1細胞計測ではガラスをエッチングして穴を作成してマイクロチャンバーとしたものや、光硬化性樹脂 (SU-8) によってガラス基板上に容器を形成しマイクロチャンバとして細胞培養をした。⁽⁸⁻¹⁰⁾今回われわれが報告するのは、従来のガラスエッチング、光硬化性樹脂に替わるアガロースゲル製のマイクロチャンバーアレイである。図1はアガロースマイクロチャンバーを用いた1細胞連続培養顕微鏡観察装置の模式図である。この装置は、アガロースマイクロチャンバ内の細胞を連続観察する光学顕微鏡、培養液循環系、集束レーザー照射系からなる。

図1 1細胞連続培養顕微鏡観察系の細胞培養部の模式図

Fig.1 A schematic drawing of the on-chip cell culture system.

<2.2> アガロースマイクロチャンバーアレイチップ作成法

まずアガロースマイクロチャンバーアレイチップについて説明する。チップ上に構成された細胞を収容する穴については、凝固前のアガロースに鋳型を押し付け、凝固させた後に鋳型を取り除くことで形成した。すなわち、①表面にコラーゲン分子をグラフト化したクロム蒸着ガラス基板上に、ゾル状態のアガロースを塗布し、②この上から、細胞を収容する容器の立体構造を表面に持つSU-8製凸版を鋳型として押し付け、③冷却してアガロースをゲル化させてから凸版鋳型を取り除くことで、アガロ

ース基板表面にマイクロチャンバアレイ構造を転写した。図 2 はその手順を示した模式図、図 3 は実際の SU-8 製凸版鋳型とそれを用いて作成したアガーマイクロチャンバアレイの写真である。

図2 SU-8 凸版によるマイクロチャンバアレイ作成法
Fig.2. A schematic drawing of the making process of agarose microchamber array plate

図3 SU-8 製凸版鋳型(左)とそれを用いて作成したアガロースマイクロチャンバアレイ(右)
Fig.3. An SU-8 letter print plate (left) and an agar-microchamber array made with the SU-8 plate (right).

以下に詳細に、アガロースマイクロチャンバアレイ基板作成の 3 つの工程

- (i) SU-8 凸版の作成
- (ii) コラーゲン・クロム基板の作成
- (iii) アガロースマイクロチャンバアレイの構築を説明する。

(i) SU-8 凸版鋳型の作成

洗浄したガラス基板(24×60 mm)の表面に光硬化性樹脂 SU-8(Microchem)をスピコートし、80℃30分プレバイクした後、マイクロチャンバアレイのパターンを描画したポジマスクを密着させて、紫外光(I 線)を照射する。SU-8 は紫外光に感光して硬化する高分子レジストであり、マスクのパターンは硬化した SU-8 の形状として転写される。露光後、110℃30分のポストバイクに続いて SU-8 塗布基板を現像液につけ

洗浄すると、SU-8 製凸版鋳型基板が得られる。最終的に出来るマイクロチャンバの深さは SU-8 構造物の高さによって決まるが、SU-8 構造物の高さは基板上にスピコートされた SU-8 層の膜厚で決まるため、マイクロチャンバの深さは使用する SU-8 の粘度とスピコートする際の回転数(rpm)によって調節する。(SU-8 のスピコート時の回転速度と膜圧の関係、膜圧に応じたバイク時間などの詳細なデータは Microchem 社のホームページ:<http://www.microchem.com> を参照。)

(ii) コラーゲン・クロム基板の作成

アガロースマイクロチャンバアレイの基板となる厚さ 0.2mm のスライドガラスに、抵抗加熱式真空蒸着装置を用いて厚さ約 60 Å のクロム層を蒸着し、さらにその上にコラーゲン分子をグラフト化する。クロム層は、細胞培養中の加工を行う際の集束レーザー光を吸収して光を熱に変換する層として必要である。またクロム層上にグラフト化されるコラーゲンは、アガロースマイクロチャンバや集束光加熱エッチングで作られるトンネル型通路の底面に露出し、神経細胞の底面への細胞接着の足場となる。コラーゲン分子は、クロム表面をシランカップリング剤(信越シリコン)で処理してエポキシ基を導入した後、基板をコラーゲン溶液(新田ゼラチンの 10 倍希釈液、pH9.0)に 50℃で約 5 時間浸すことで、コラーゲン分子のアミノ基と基板表面のエポキシ基間のアミド結合生成反応によって基板表面にグラフト化される。

(iii) アガロースマイクロチャンバアレイの構築

(ii) で作成したコラーゲン・クロム基板上に低融点アガロース(ISC BioExpress: GenePure LowMelt) 2%水溶液を加熱しゾル化させたもの約 25 μl を置き、(i)で作成した SU-8 製凸版鋳型で上から挟み込み手で軽く圧する。このようにしてゾル状態のアガロースを 2 枚の基板で挟み込んだ状態のまま冷蔵庫に入れ冷却すると、挟み込まれたアガロースがゲル化する。凸版鋳型をはがすとアガロースマイクロチャンバアレイの構造が凹版のアガロース層がコラーゲン・Cr 基板上に転写形成されている。アガロース層の厚さは SU-8 凸版構造物の高さによって決まり、現在は 2 μm から 100 μm の範囲で作成が可能である。図3からもわかるように、アガロースチャンバの構造は厳密に鋳型の構造と一致してる。

3. 実験結果および考察

<3.1> 集束光加熱エッチング法

まず、集束レーザー光を用いたアガロースマイクロチャンバの形状加工技術について検討した。ここでは、実際に細胞培養をする前に、作成したアガロースマイクロチャンバアレイ基板を倒立型顕微鏡(OLYMPUS IX-70)のステージにセットし、アガロースゲルが乾燥しないように基板に純水をのせた状態で、レーザー集束光による加工実験を行った。レーザーは波長 1064nmCW の Nd:YAG レーザー(SpectraPhysics)を用い、

光学系の途中に組み込んだパワーモニターでレーザー光出力を精密に制御した。また、加工されるアガロースチャンバーの位相差顕微鏡像を CCD カメラ (OLYMPUS CS230) で撮影しながらレーザー集束点位置をモニターで μm 精度で制御した。

レーザーの波長に 1064nm を選んだのは、この波長では、細胞、アガロース、水のいずれにおいてもレーザー光の吸収が無く、特異的に蒸着したクロム層のみで、レーザー光の吸収が起きるからである。実際、レーザー集束光の焦点が Cr 層の位置に来るように顕微鏡ステージの Z 軸を調節すると、レーザー集束光の焦点を中心にアガロース層の底面で局所的なゲルの融解が起こり、融解したアガロースが水中へ拡散するのが観察された。さらに、そのまま xy 平面方向にステージを動かすと、加熱点を通じた領域のゲルに周囲に比べて若干明るく見える痕跡 (すなわち、アガロースが除去されたトンネル) が残ることが観察された。図4に集束光加熱エッチング法によるトンネル型通路の作成過程を模式的に示した。

図4 集束光エッチング法の模式図

Fig.4. A schematic drawing of the photothermal etching method.

図4に示したように、局所加熱点上のアガロースは温度が融点 (65.5°C) に達して局所的にゾルへ相転移し水中へ拡散する。局所加熱点上にはレーザー出力や周囲の温度に応じた半径と高さでドーム型の空洞が形成され、局所加熱点を移動させるとその軌跡がトンネル状の通路となって残る。実際にレーザー光出力 15mW で集束光加熱エッチングによりアガロースチャンバー間にトンネル型チャンネルを作成する過程と、アガロースチャンバーの形状を変更した過程の位相差顕微鏡写真が図5である。ただし図5は、水中にあるときは位相差顕微鏡では観察しにくいトンネル型チャンネルの像をくっきりさせるために、加工する度に余剰の水分を取り去って空气中に置かれた状態で撮影した。トンネルの線幅はおおよそ $10\mu\text{m}$ であるが、これが形成される過程でレーザー照射を開始すると直後にアガロースがゾル化し拡散・消失する。

その後、同じ点に照射を続けてもゾル化する範囲は殆ど広がらなかった。このことから、集束光加熱エッチング法はレーザー光出力に応じた一定の幅のトンネルを作成するのに有用な方法であるといえる。また、この結果から、集束点近傍での熱の拡散は十分に大きく、集束点近傍での温度の上昇はほとんど無いことが推察される。言い換えると、集束点近傍のごく一部のみで局所的に温度上昇が起きていることを示唆している。実際、赤外線カメラを用いて、レーザーによる局所加熱エッチングを観察したところ、レーザースポットの大きさと、アガロースゲルの溶解する大きさは一致した。このことは、細胞から $10\sim 20\mu\text{m}$ 程度の十分離れた位置で局所加熱エッチングをすれば細胞には全く熱の伝播をもたらさない可能性があることを示唆している。

図5 集束光エッチング法によるチャンバー間連絡路の作成 (A 1~8) とチャンバー形状加工 (B 1~6)

Fig.5 Photo-thermal etching of agar microchambers: (A) a series of etching to make new tunnel pathways; (B) a process of etching to change the shape of a microchamber from a circle to a square. The used laser power is 15mW.

また、以上の実験から、局所過熱により局所的にゲルゾル相転位を起こしたゾル状態のアガロースはすばやく水中へ拡散し希釈されるため、局所加熱スポットの通過した軌道上のゾル化したアガロースその場で再びゲル化して作成された空洞を埋めてしまうことはなく、確実に除去されることも確認できた。さらに、レーザー光出力が高いほど作成されるトンネルの幅が大きくなることが観察されたが、出力を上げすぎるとクロム層に不可逆な損傷を与え、また局所加熱点が沸点に達するために水蒸気の気泡が発生して、アガロースゲルの構造を乱すことも観察された。このため、20mW 以上のレーザー出力は集束光加熱エッチング法には適さないことも判明した。

<3.2> 神経細胞の培養

次に、実際にアガロースマイクロチャンバーアレイを用いてラット小脳顆粒細胞の初代培養を行った。図6(A)はアガロースマイクロチャンバーアレイに細胞を蒔いた直後の様子である。

マイクロチャンバーに細胞が数個ずつ入っている。マイクロチャンバー間には集束光加熱エッチング法によりトンネル型チャンネルを写真の左右方向にのみ作成しておいた。

図6(B)は48時間の培養後の写真である。矢印はチャンネルを通る形で新生した細胞間の連絡が形成された部分を示している。作成したチャンネルのほぼ全てにネットワークが新生し、確実に局所加熱エッチングによって形成したトンネルを通じて細胞がネットワークを形成できることが証明された。

図6 アガロースマイクロチャンバーアレイチップ上のラット小脳顆粒細胞 (A)培養開始時 (B)48 時間培養後

Fig.6 Phase-contrast micrograph images of cultured nerve cells in microchamber array at the beginning (A), and after 48 hours (B).

アガロースは細胞非接着性の基質であり、マイクロチャンバー内の細胞がアガロースの壁を乗り越えることはできないと考えたが、今回の実験では確かにチャンネルの壁を乗り越える細胞は見られなかった。また、局所加熱エッチングで作成したトンネルは、クロム層での光吸収によって発生した熱によってアガロースを取り除いて作成することから、効果的にトンネル底面のアガロースを取り除いて効果的に基板表面のコラーゲン層を剥き出しにすることができたと考えている。特に本実験では、あらかじめ作成しておいたアガロースマイクロチャンバアレイに、細胞を導入する直前に、マイクロチャンバアレイ間をつなぐトンネルのパターンを決定し、観察装置系にセットしたまま、ほぼ10分程度の工程で、トンネルネットワークを作成することができた。これは、従来のマイクロ加工技術ではできないことであった。また、マイクロチャンバ内に細胞を導入した後にはトンネルを作成することにも成功している。

本実験系の次のステップは、細胞培養途中のチャンバーの形状加工や、トンネルの段階的構築を通じて各細胞の相互作用を制御した場合の細胞ネットワーク形成の変化を計測することであると考えている。同時に、微小電極アレイ基板との組み合わせも検討している。微小電極基板上にアガロースマイクロチャンバーを構築する場合、使用後の電極基板を洗浄することで容易にアガロース層は取り除かれるため、電極基板の再利用も可能である。

電学論C, 122 巻 9 号, 平成 14 年

ただし、細胞培養中に局所加熱を行う際には、集束光加熱点からどの程度近隣の細胞に熱によるダメージを与える可能性があるのか厳密に計測を行う必要がある。今後、チャンネルに細胞を収納した状態で、細胞からさまざまな距離において集束光エッチングを行い、細胞内ヒートショックプロテインの発現系などを用いて熱によるダメージについて定量的に検討する予定である。

これらの結果から、アガロースを構造物として用いたマイクロチップの実用性を定性的に示唆することができたと考える。このアガロースマイクロチャンバアレイチップの長所は、①チップ上のマイクロ構造が可変であり、②加工操作が簡便で形状を自在に制御でき、③細胞への基質の影響が少ない点であるが、以上のような結果からこれらの長所が実際に検証可能であることを示すことができた。

4. むすび

ハードマテリアルのマイクロファブリケーション技術のアガロースというソフトマテリアルに応用し、アガロースマイクロチャンバアレイ細胞培養チップを作成し、ラット小脳顆粒細胞を収納して培養することができた。さらに、集束光加熱エッチング法により、観察装置系にセットしたゲルの形状を μm オーダーで加工することができた。

マイクロファブリケーション技術の細胞培養系への応用は、細胞レベルで可能な実験操作の範囲の拡大し積極的に細胞に操作を加える実験系を実現するものである。今後は、実際に集束光加熱エッチング法を神経細胞培養系に応用し、細胞を収納するチャンバー間に簡便にトンネル型通路を作成することで、チャンバー内の細胞の相互作用・連絡を選択的に行わせる予定である。

(平成 13 年 12 月 25 日受付、平成 14 年 4 月 3 日再受付)

文 献

- (1) Dichter, M.A.: "Rat cortical neurons in cell culture: Culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation.", *Brain Res.*, 149, 279-293 (1978)
- (2) Mains R.E., Patterson P. H.: "Primary cultures of dissociated sympathetic neurons: I. Establishment of long-term growth in culture and studies of differentiated properties.", *J. Cell. Biol.*, 59, 329-345 (1973)
- (3) Potter S.M., DeMarse T.B.: "A new approach to neural cell culture for long-term studies.", *J. Neurosci. Methods*, 110, 17-24 (2001)
- (4) Jimbo Y., Tateno T., Robinson H.P.C.: "Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons.", *Biophys. J.* 76, 670-678 (1999)

- (5) Letourneau P.C.: Dev. Biol., 66, 183-196 (1975)
 (6) Stopak D. et al.: Dev. Biol., 90, 383-398 (1982)
 (7) Hirono T., Torimitsu K., Kawana A., Fukuda J.: "Recognition of artificial microstructures by sensory nerve fibers in culture.", Brain Res., 446, 189-194 (1988)
 (8) Inoue I., Wakamoto Y., Moriguchi H., Okano K., Yasuda K.: "On-chip culture system for observation of isolated individual cells.", Lab on a chip., 1, 50-55 (2001)
 (9) Wakamoto Y., Inoue I., Moriguchi H., Yasuda K.: "Analysis of single-cell differences by use of an on-chip microculture system and optical trapping.", Fresenius' J. Ana. Chem. 371, 276-281 (2001).
 (10) Inoue I., Wakamoto Y., Yasuda K.: "Non-genetic variability of division cycle and growth of isolated individual cells in on-chip culture system.", Proc. Jpn. Acad., 77, Ser. B, No.8 (2001).

森口 裕之

(非会員) 平成13年東京大学教養学部基礎科学科卒業。現在東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻修士課程2年在学中。微細加工技術を軸に新しい細胞実験系の開発研究を行っている。特に組織工学の基礎研究に貢献できる道がないか考え中。日本生物物理学会学生会員、Biophysical Society, U.S.学生会員。

高橋 一憲

(非会員) 平成12年東北大学大学院工学研究科修士課程修了。現在、東京大学総合文化研究科広域科学専攻博士課程2年在学中。マイクロマシーニングを利用し、生命の微細な構造および機能を明らかにする研究に従事している。日本生物物理学会学生会員、Biophysical Society, U.S.学生会員。

杉尾 嘉宏

(非会員) 平成13年東京工業大学生命理工学部生命理学科卒業。現在、東京大学総合文化研究科広域科学専攻修士課程2年在学中。神経細胞ネットワークパターンと情報の処理・蓄積の関係を明らかにすることを目指している。日本生物物理学会学生会員、Biophysical Society, U.S.学生会員。

若本 祐一

(非会員) 平成13年東京大学教養学部基礎科学科卒業。現在東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻修士課程2年在学中。日本生物物理学会学生会員、Biophysical Society, U.S.学生会員。

井之上 一平

(非会員) 平成12年大阪大学理学部生物学科卒業。現在東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻博士課程1年在学中。日本生物物理学会学生会員、Biophysical Society, U.S.学生会員。

神保 泰彦

(正員) 昭和63年東京大学大学院(電子工学)修了、工学博士。同年よりNTT物性科学基礎研究所にて主として神経科学の研究に従事。平成4-5年、フランス CNRS 客員研究員。電気学会、電子情報通信学会、日本神経科学学会、日本ME学会等の会員。

安田 賢二

(非会員) 平成4年早稲田大学大学院理工学研究科修了。理学博士。同年より平成11年まで(株)日立製作所基礎研究所にてバイオ研究に従事。平成11年より東京大学大学院総合文化研究科助教授。日本生物物理学会、日本応用物理学会、日本音響学会、Biophysical Society, U.S., Acoustical Society of America 会員。