親水・疎水面を利用したハイドロゲルマイクロ構造体の作製

Hydro-gel Microstructure by Hydrophilic and Hydrophobic Surface

○正 中島正博 (名古屋大学) 田島 寛隆 (名古屋大学)
正 福田敏男 (名古屋大学)

Masahiro NAKAJIMA, Nagoya University, nakajima@mein.nagoya-u.ac.jp
Hirotaka TAJIMA, Nagoya University
Toshio FUKUDA, Nagoya University

In this paper, a method is proposed to fabricate arbitral shape hydro-gel microstructure by hydrophilic and hydrophobic surface. The micro-structure is extended from 2D to 3D structure by micro-manipulation technique. By the proposed method, we aim to fabricate arbitral 2D/3D cell structure by embedding biological cells in to the hydro-gel.

Key Words: Hydro-gel, Hydrophilic Surface, Hydrophobic Surface, 2D/3D Cell Structure

1. 緒言

従来まで、様々な臓器疾患を代替するための人工臓器は、工学技術を応用したものが主流であった。現在、ES 細胞 (Embryonic Stem Cell) や iPS 細胞 (induced Pluripotent Stem Cell) などの研究進展・発見に伴い、細胞を用いた人工臓器について注目が集まっている。再生医療分野への応用も含めて、3 次元組織を構築するために様々な手法が提案されてきている[1]。

我々は、ハイドロゲル構造体を細胞に包埋することで、3 次元細胞組織を作製する技術に注目する[2]。ハイドロゲルは、水分を 90% 程度含んでいて、生体親和性が高く、細胞足場やドラッグデリバリー、光学流体デバイス、生体外組織モデルなど様々な期待され研究が進められている[3]。しかし、一般帝にゲル化速度が急速に進行するために、任意の形状のハイドロゲル構造体を作製することが困難であった。

そこで、本研究では、親水・疎水面を利用することで、未硬化状態でパターンニングを行い、ハイドロゲル構造体を作製する手法を提案する。また、作製した 2 次元構造体をマイクロマニピュレーションにより 3 次元構造体に拡張する手法を提案する。実際に細胞を包埋したハイドロゲル構造体を作製するための細胞培養・分化実験について報告する。

2. 親水・疎水面を利用したハイドロゲルマイクロ構造体の作製手法

親水・疎水面を利用したハイドロゲルマイクロ構造体の作製手法を、図 1 に模式図として示す。まず、親水表面により、疎水表面上に任意形状をパターンニングする。この親水表面部分に、細胞を包埋したハイドロゲル溶液を滴下することで、ハイドロゲル溶液を親水表面部分の形状と同様にパター

Fig. 1 Concept of fabrication of arbitrary shape microstructure by hydrophilic and hydrophobic surface

ニングすることができる。最後に、パターンニングしたハイドロゲル溶液を硬化させる。

本研究で実施した実験手順を図 2 に示す。疎水表面としては、PDMS(poly(dimethylsiloxane))を用いた。任意形状を有したスリット状のマスクを介して、エキシマ照射を行い、PDMS の疎水表面の一部を親水化した。次に、ハイドロゲル溶液であるアルギン酸水溶液 (2 wt%) を滴下した。この際、作製した構造物の観察を容易にするために、コンゴレッド (congo red) を混合した。次に、エアなどでフラッシングを行うことで、アルギン酸水溶液を親水表面と同様にパターンニングした。最後に塩化カルシウム溶液 (0.4 mol/l) を滴下することでアルギン酸水溶液をゲル化した。

3. 親水・疎水面を利用したハイドロゲルマイクロ構造体の作製実験

図 3(a), (b)に、コの字形状とドット形状のハイドロゲル構造粒を作製するためのマスクパターンを示す。マスクの作製は、NC 加工装置を用いた。実際に作製したアルギン酸ハイドロゲルの構造体を図 3(c), (d)に示す。本結果から、親水表面部分の形状に従ってアルギン酸ハイドロゲルが作製することが確認できた。ただし、マスクパターンに対して、ハイドロゲルの形状が 30~40% 程度、収縮した。この原因は、親水表面上にアルギ

Fig. 2 Experimental steps of patterning of alginate hydro gel microstructure

Fig. 3 Patterning result of alginate hydro gel microstructure (a) and (b): designs of hydrophilic pattern by mask, (c) and (d): fabricated alginate microstructures

Fig. 4 Fabrication of arbitral shape alginate hydro gel microstructure (a) design of spiral shape, (b) fabrication mask for spiral shape

ン酸水溶液をパターニングした際に、表面張力の影響でアルギン酸水溶液の量が中心部に集まったことが考えられる。

次に、任意の形状として、図 4(a)に示すような渦巻形状のハイドロゲル構造体を作製した、図 4(b)に、この際に作製したマスクの外観写真を図 4(b)に示す。マスクは、同様に NC 加工装置を用いて加工した。作製したハイドロゲルマイクロ構造体の顕微鏡写真を図 5(a)に示す。本図に示す通り、親水表面に従って、渦巻形状のハイドロゲル構造体を作製することができた。さらに、図 5(b)に示すように、マイクロマニピュレータを用いて、渦巻形状の外側部分を基板から剥がして、中心部分は基板に付着した状態で引き上げることによって、3 次元的な構造体を作製することができた。

4. 筋芽細胞の培養実験

実際にハイドロゲルに包埋する細胞として、本研究はマウス由来の筋芽細胞である C2C12 に注目した。この細胞は、筋芽細胞として分化能を有しており、様々な筋細胞に分化することができるため、これまでマイクロアクチュエータなど様々な応用が試みられてきている [4]。培養には、DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)に、HS(Horse Serum, 2%)を混合することで、筋芽細胞への分化を誘導した。

細胞培養実験結果を図 6 に示す。図 6(a)の初期状態から、約 1 週間程度培養を継続することで、図 6(d)に示すように初期状態の細胞とは明らかに異なる、細長い筋管細胞へ分化することが確認できた。今後は、本細胞をハイドロゲル構造体に包埋することで任意の筋管構造体の作製を試みる。

Fig. 5 Experimental results of micromanipulation of alginate hydro gel microstructures

Fig. 6 Culture of myoblast (C2C12) cells for differentiation to myotube cells

5. 結言

本稿では、親水・疎水面を利用して任意のハイドロゲル構造体を作製する手法を提案した。マイクロマニピュレーション技術を用いて、2 次元から 3 次元へ構造体を拡張する手法を提案した。また筋芽細胞から、筋管細胞へ分化誘導して培養した。今後は、ハイドロゲル構造体中に細胞を包埋することで任意の筋管構造体の作製を試みる方針である。

謝 辞

本研究の一部は名古屋大学グローバル COE プログラム（マイクロ・ナノメカトロニクス教育研究拠点）及び文部科学省科学研究費・新学術領域研究「超高速バイオアセンブラ」の助成を得た。

文 献

- [1] Ratmir Derda, Anna Laromaine, Akiko Mammoto, Sindy K. Y. Tang, Tadanori Mammoto, Donald E. Ingber, and George M. Whitesides, "Paper-supported 3D cell culture for tissue-based bioassays", Proc. of the National Academy of Sciences, Vol. 106, 18457-18462, 2009
- [2] Masumi Yamada, Sari Sugaya, Yoji Naganuma and Minoru Seki, Microfluidic synthesis of chemically and physically anisotropic hydrogel microfibers for guided cell growth and networking, SoftMatter, 8, 3122, 2012
- [3] Jeong-Yun Sun, Xuanhe Zhao, Widusha R. K. Illeperuma, Ovijit Chaudhuri, Kyu Hwan Oh, David J. Mooney, Joost J. Vlassak & Zhigang Suo, "Highly stretchable and tough hydrogels", Nature, 489, pp. 133-136, 2012.
- [4] T. Ishisaka, H. Sato, Y. Akiyama, Y. Furukawa, and K. Morishima, "Muscle-Actuated Power Generator Using Cultured Cardiomyocytes and PZT Fiber", Proceedings of 28th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, New York, USA, (2006.9).