【論文】

エキシマレーザを用いた生体材料の 3 次元加工による 神経ネットワーク埋め込み技術の開発

Development of the Neuronal Network Embedding Techniques by Three-dimensional Processing of the Biomaterials Using an Excimer Laser

鈴木 郁郎(正会員), 天野 翔太(非会員), 小田原 あおい(学生会員), 後藤 正男(非会員)

Ikuro Suzuki, Shota Amano, Aoi Odawara, Masao Gotoh

Abstract

Micropatterning methods using three-dimensional (3D) substrates or scaffolds that reproduce aspects of the in vivo microenvironment could facilitate the engineering of functional tissues for transplantation or more robust experimental models. Cell embedding techniques into 3D scaffolds can be expected for applications such as (1) three-dimensional culture technique mimicking the structure of living tissue closely, (2) efficient differentiation of stem cells, and (3) implantation of biocompatible materials-contained cell. In this study, we focused nerve cells and developed a neuronal network embedding method into 3D scaffolds using an excimer laser that precisely etches the 3D biomaterials. It was then possible to guide neural network formation in laser etched area. Using excimer laser, we succeeded in etching collagen fibers at minimum processing 5 μm in width and culturing Rat hippocampal neuronal networks in laser processing area. In addition, we demonstrated that neuron elongates neurites into the hole that has been processed to the Z-axis. This excimer laser etching in 3D scaffold is useful as cell arrangement technology to the biocompatible material depths.

Key Words

Excimer laser, Micro Fabrication, Collagen fiber, Neuronal network, 3D

1. はじめに

細胞から組織を人工的に 3 次元再構成する技術は、再生医療における移植組織や動物実験を代替する薬剤評価組織への応用が期待されている。ヒト人工多能性幹細胞 (hiPS 細胞) の樹立、および大量培養系の構築により、様々な組織において 3 次元培養技術の開発が期待されるようになった。組織構造を模倣する 3 次元培養技術の開発は、その足場としてコラーゲンゲルなどの各

種ゲル^{1,2)}、ポーラス材料³⁻⁵⁾、脱細胞組織^{6,7)}などの生体材料を使用した研究開発、およびインクジェットプリント技術⁸⁻¹⁰⁾や細胞シート積層化技術¹¹⁻¹⁴⁾などの工学技術を使った報告がされている。これまでに、網膜¹⁵⁾、心臓¹⁶⁾、骨^{17, 18)}、皮膚¹⁹⁾などの組織における 3 次元培養技術が進み、移植技術への臨床応用も始まっている。また、近年では、ゲル加工技術や細胞の積層化技術を用いた血管構造の再構成やカプセル化技術による 3 次元培養技術の開発も行われている²⁰⁻²⁶⁾。これらの 3 次元培養における細胞の機能は、2 次元培養下の細胞機能に比べて、生体に近い機能を有することが報告されている。膵臓細胞においてはインシュリン分泌量が 3 次元培養下で増加すること²⁷⁾、心筋細胞においては拍動間隔が 2 次元培養に比べ速く安定したリズムを有すること、および心臓に存在するタンパク質 (α アクチニン) の発現量が増加すること²⁸⁻³⁰⁾、肝臓細胞においては、アルブミンの生成量が向上することなどの報告がある³¹⁾。これらの多くの 3 次元培養

2013 年 3 月 31 日受付

2013 年 4 月 27 日掲載決定

東京工科大学 大学院バイオニクス専攻, 〒192-0982,
東京都八王子市片倉町 1404-1

Department of Bionics, Tokyo University of Technology,
1404-1, Katakuramachi, Hachioji-shi, Tokyo, 192-0982,
Japan

技術は、細胞を集積化させる技術や細胞の自己組織化を利用した培養技術である。しかしながら、足場となる 3 次元材料の中に細胞を埋め込む技術および 3 次元空間に細胞を厳密に配置する技術の開発は十分に行われていない。3 次元の足場(材料)の中に目的の細胞を厳密に空間配置する技術は、①より厳密に生体組織構造を模倣する 3 次元培養技術、②幹細胞の効率的な分化技術、③細胞内包型生体適合性材料を用いた移植などへの応用が期待できる。

我々は組織の中でも、細胞極性を持ち、細胞の空間配置および突起の伸長方向が機能を発揮する上で重要な役割を果たす神経組織に着目した。これまでに、神経科学や工学分野の研究者らは、2 次元平面の基板上で、予め定義された形状の神経回路を構築する技術を開発してきた。基板上で、ある特定の形状の神経回路を構築するのに用いられる一般的な手法は、細胞接着基質を基板上にパターンニングする化学的な手法(例:マイクロコンタクトプリンティング³²⁻³⁵⁾、インクジェットプリント³⁶⁾、表面修飾^{37,38)}、誘電泳動³⁹⁾等)や、構造物などを利用した物理的な手法(例:マイクロ流路デバイス^{40,41)}、フォトリソグラフィ技術⁴²⁾等)である。過去 10 年間で開発されてきた技術により、細胞間コンタクトや神経突起の伸長方向をある程度制御した神経ネットワークを構築することが可能になった。これら開発されてきた技術のほとんどは、神経細胞を培養するための基板作りにおいて、高度なクリーン設備の環境下で複雑な工程を有する微細加工技術を必要としている。また、2 次元平面の培養であり、生体とは全く異なる環境下での細胞制御技術となっている。今後、*in vitro* で神経組織の生体環境を模倣するためには、生体適合性材料を足場とし、細胞の空間配置を制御した新しい 3 次元培養技術の開発が求められる。

そこで、本研究では、神経組織の 3 次元構造を模倣する培養技術として、エキシマレーザを用いた生体適合性材料の 3 次元加工による細胞埋め込み技術の開発を目的とした。エキシマレーザは、高いレーザ光子エネルギーにより、分子結合を切断することが可能であり、ガラスなどの硬い素材も加工することができるため、あらゆる生体材料を加工できる可能性がある。また、エキシマレーザは、レーザ照射による分子結合の切断により、照射表面に OH 基や NH₂ 基などの官能基置換を可能にする特徴を有しているため^{43,44)}、加工領域内に細胞外基質をコートすることなく培養できる可能性がある。本論文では、エキシマレーザを用いたアクリル系共重合体シート、コラーゲンファイバーにおける微細加工の評価、および加工領域内への神経細胞の埋め込みと神経ネットワークを培養した成果を報告する。

2. 方法

2.1 ArF エキシマレーザ

エキシマレーザ微細加工装置は、波長 193 nm のパルスレーザである ArF エキシマレーザ加工装置 Micro Master (IPEX-848ArF, GSI Lumonics, Inc.)を用いた。レーザ照射は、発振周波数 50~200 Hz、パルスエネルギー 100~150 mJ で照射し、照射パルス数およびスキャン速度は材料の種類に応じて変更し

た。レーザ加工領域の制御は、ピンホールを有したマスクを使用した(Fig. 1)。ピンホール直径 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 mm を使用し、生体材料の加工幅の検討を行った。

Fig. 1 Micro-fabrication of biomaterials using ArF excimer laser.

2.2 Block copolymer シートを用いたマイクロ流路の作製

エキシマレーザによる材料加工の精度および特性を評価するために、Polydimethylsiloxane (PDMS) などと同じ用途で使用されるアクリル共重合体である Block copolymer (BCP) シート (2052, フジデノロ)を用いた。一般的に PDMS や BCP シートはフォトリソグラフィ技術によって作製した鋳型を用いてマイクロ流路などの微細加工が行われる。BCP シートは細胞毒性が無く、可視光透過率 91%、自家蛍光の無い透明素材である。厚さ 1mm の BCP シートをエキシマレーザ加工装置にセットし、顕微鏡観察下でレーザ加工を行った(Fig. 2A-a)。照射条件は、50 Hz, 10 pulse/sec, 100 μm/sec で行い、ピンホール直径 0.2~2.0 mm のマスクを使用した。加工した BCP シートを上下反転し、35 mm non-treated dish (1000-035, Iwaki)に接着させ、マイクロ流路を構築した。マイクロ流路が構築されているかを調べるために、蛍光色素である Acid Blue 1 (Tokyo chemical industry Co., LTD.), Tetramethylrhodamine (TMR, Cytodiagnostics, Inc.)を流した。TMR によるマイクロ流路の確認は、Electron Multiplying CCD カメラ (iXon Ultra 897, Andor, USA)を用いて蛍光観察した。

2.3 コラーゲンファイバーのエキシマレーザ加工

生体材料としてコラーゲンファイバーを用いた。直径 12 mm のガラスベースディッシュ (11-0602, Iwaki)に Rat tail collagen type I 溶液 (Life Technologies) 2 mg/ml を 200 μl 滴下し、37°C, 5% CO₂ インキュベータ内に 5 分間入れ、ゲルを架橋した。その後、真空乾燥機で 24 時間乾燥させ、コラーゲンファイバーを作製した。次に加工領域内だけに培養を行うために、コラーゲンファイバー上に細胞非接着分子である分子量 6,000 の 100 μM polyethylene glycol (PEG, Wako)溶液を 50 μl 滴下し、真空乾燥機で乾燥した。エキシマレーザの照射条件は 200 Hz, 50 pulse/sec, 50 μm/sec で行い、ピンホール直径 0.2~1.0 mm のマスクを使用した。

2.4 海馬初代培養細胞の調製と培養法

レーザ加工領域に埋め込む細胞として、Rat 海馬初代培養細胞

胞を用いた。妊娠18日目のWister Rat胎児をDissection Medium (Hank's balanced salt solution (HBSS), 1mM pyruvic acid, 10 mM HEPES, pH7.2) 中に取り出し、実体顕微鏡下で海馬を採取した。その後、Trypsin (0.5 mg/ml) と DNase (0.1 mg/ml) を含む HBSS にて 37°C で 15 分間酵素処理を行い、4°C, 1000 rpm で 5 分間遠心分離した。10% Fatal Bovine Serum (FBS, Invitrogen Corp, CA, USA) を含む HBSS を加えて酵素処理を止め、Dissection medium にて 4°C, 1000 rpm, 5 分間の遠心を 3 回繰り返した。最後に、40 μ m セルストレーナーに通し、 1×10^6 cell/ml の濃度で精製した初代培養細胞を得た。細胞培養に使用した培地は Neurobasal medium (Invitrogen) に 2% v/v B27 supplement (Invitrogen), 0.074 mg/ml L-glutamine (Sigma-aldrich), 50 μ g/ml Gentamycin Reagent Solution (Invitrogen) 100U/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) を加えたものを基本とした。基板上に 1×10^6 cell/ml の細胞懸濁液を 50 μ l 播種し、37°C, 5% CO₂ 環境下のインキュベータで培養した。

2.5 免疫化学染色

コラーゲンファイバーの加工および培養された神経細胞を確認するために、免疫化学染色を行った。4°C の 4% パラホルムアルデヒド溶液にて、サンプルを氷上で 20 分間固定後、-20°C メタノールで、10 分間固定した。その後、非特異吸着を無くすために、Preblock buffer (0.05% Triton-X, 5% fatal bovine serum を PBS に溶解したもの) に置換し、4°C で 1 時間反応させた。1 次抗体として、コラーゲン繊維を同定するための anti-Collagen type I 抗体 (anti-rabbit, chemicon), 神経細胞を同定するための anti- β -tubulin III (anti-mouse, chemicon) を Preblock buffer に 1:1000 の割合で入れ、4°C で overnight した。室温でサンプルを 15 分間に 3 回 Preblock buffer で洗い、2 次抗体として Alexa Fluor 546 (anti-rabbit IgG, Molecular Probes, Inc., OR) と Alexa Fluor 488 (anti-mouse IgG, Molecular Probes, Inc., OR), 核を同定するための Hoechst33258 を 1:1000 の割合で Preblock buffer に溶かし、1 時間反応させた。1 時間後、Preblock buffer で洗い、15 分おきに PBS で 2 回洗ったサンプルを蛍光顕微鏡 (BZ-9000, Keyence, Inc.) を用いて観察した。

2.6 電子顕微鏡観察

レーザー加工によるコラーゲン繊維の除去および神経細胞や神経突起の埋め込みを確認するために、走査型電子顕微鏡 (JSM-7700F, JEOL) を用いて観察した。走査型電子顕微鏡で観察するための細胞固定を以下に示す。室温で、サンプルを 5 分毎に PBS で 2 回洗浄し、2.5% グルタルアルデヒド 0.1 M リン酸バッファー (pH7.2~7.4) で 20 分間固定した。その後、8% スクロース 0.1M リン酸バッファーで 15~20 分毎に 4 回洗浄し、1% 四酸化オシmium 固定液で 20 分間固定した。次に、50%, 70%, 80%, 90%, 95% アルコールの順で 15~20 分間隔で溶液交換を行い、100% 無水アルコールを用いて 15 分間隔で 4 回の溶液交換、酢酸イソアミルで 2 回の溶液交換を行った。その後、サンプルを真空乾燥機にて 24 時間乾燥させた。

細胞固定したサンプルは、カーボンテープで試料台に固定し、Pt コーター (JFC-1600, JEOL) にて白金を蒸着させた。蒸着条件

は真空度: 3.00×10^{-5} pa, 電流値: 10 mA, 蒸着時間: 35 秒 $\times$ 5 回とした。電子顕微鏡観察は加速電圧 5 kV の条件で行った。

3. 結果と考察

3.1 エキシマレーザー加工によるマイクロ流路の構築

エキシマレーザーによる微細加工の精度および特性を評価するために、アクリル系重合体である BCP シートを用いた。BCP シートは、透明素材であり、細胞パターンニングやマイクロ流路を用いた細胞分離などに使用されている PDMS と同じ用途での使用が可能であると共に、基板への接着性が高い特性を有している。一般的に PDMS や BCP シートはフォトリソグラフィ技術によって作製した鋳型を用いてマイクロ流路などの微細加工が行われる。ここでは、複雑な工程を有する鋳型の作製なしで、エキシマレーザー加工によってマイクロ流路が簡便に構築できるかを評価した。

Fig. 2 Fabrication of microchannel in BCP sheet using excimer laser. A: Schematic drawing of microchannel processing. B: Phase contrast images of microchannels fabricated by different pinhole size (a). Relationship between the pinhole diameter and processed channel width (b). C: Overview of microchannel stamp on the 35 mm dish (a). The photo shows a state in which flow into the microchannels Acid blue1. Lower picture shows the fluorescent image flowed into the microchannels the TMR (b).

ピンホール直径 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 mm のマスクを使用し、10 pulse/sec, 100 μ m/sec の条件で直線状

に加工した。Fig. 2B-a は、左からピンホール直径 0.2, 0.3, 0.5, 0.75 mm で加工した位相差像を示している。流路幅はそれぞれ 10.9, 17.5, 31.7, 49.2 μm で加工されていた。位相差像に見られる縞模様は、10 pulse/sec, 100 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の条件で照射したパルスによる加工の跡である。Fig. 2B-b にエキシマレーザのピンホール直径と流路幅の関係を示す。検量線の r 値が 0.999 となったことからピンホール直径と流路幅の間に強い相関があることが確認された。マスクによる照射幅の制御においては、最小加工幅が 10 μm 、最大加工幅が 133 μm であった。深さ方向への加工はマスクサイズに依存した顕著な差はなく、 $27.4 \pm 3.0 \mu\text{m}$ (平均 $\pm$ 標準偏差) であった。同一箇所にパルスを照射し続けた場合には、厚さ 1 mm の BCP シートを貫通したマイクロチャンネルが作製された。

次に、加工した BCP シートをシャーレに接着させ、マイクロ流路が構築されているかを、蛍光色素を流して確認した。Fig. 2C-a に Acid Blue 1 を流した写真を示す。マイクロ流路内に色素が流れていることを確認した。Fig. 2C-b は、流路幅 10 μm から 133 μm までのマイクロ流路に蛍光色素 TMR を流し、蛍光観察した写真を示している。流路幅 10 μm においても、マイクロ流路が形成され、マスクを変更することによって、流路幅を制御したマイクロ流路を構築できることがわかった。

これらの結果より、エキシマレーザにより BCP シートの微細加工が可能であること、および鋳型を用意することなく、10 μm の精度で自在なマイクロ流路を簡便に構築できることがわかった。本技術は、マイクロ流路を用いた研究や技術開発の分野においても大いに応用が期待できる。

3.2 エキシマレーザによるコラーゲンファイバーの加工

次に、生体材料であるコラーゲンファイバーのエキシマレーザによる加工の評価を行った。厚さ約 10 μm のコラーゲンファイバーをピンホール直径 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75 mm のマスクを使用し、50 pulse/sec, 50 $\mu\text{m}/\text{sec}$ の条件で直線上に加工した。Fig. 3B-a は、左からピンホール直径 0.75, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 mm で加工した位相差像を示している。Fig. 3B-b は、加工後にコラーゲンタイプ I 抗体で免疫染色した画像 (赤) である。流路幅は、それぞれ 101.7, 65.4, 43.6, 23.5, 11.6 μm で加工されており、レーザ照射領域のコラーゲンファイバーが全てエッチングされていることが確認された。Fig. 3B-c は、流路幅 11.6 μm で加工した領域の電子顕微鏡写真である。最小ピンホールサイズにおいても、完全にコラーゲンファイバーがエッチングされている様子が観察された。Fig. 3B-d にエキシマレーザのピンホール直径と流路幅の関係を示す。検量線の r 値が 0.995 となったことからピンホール直径と流路幅の間に相関があることが確認された。また、スキャン速度を遅くし、照射パルス数を上げることで、均一な加工ができることも確かめられた。これらの結果より、エキシマレーザにより、コラーゲンファイバーを簡便に微細加工できることがわかった。

3.3 レーザ加工領域への神経細胞の埋め込み

次に、レーザ加工領域への神経細胞の埋め込みを評価した。加工領域のみに細胞を埋め込むために、細胞非接着基質である PEG をコラーゲンファイバー上にコーティングした (Fig. 3A) 。コラ

Fig. 3 Micro-fabrication of collagen fibers using excimer laser. A: Schematic drawing of micro-fabrication. B: Phase contrast images of etched collagen fibers by different pinhole size (a). Fluorescent image of immunostaining by anti-collagen type I (b). Scanning electron microscopic (SEM) image of etched collagen fibers using pinhole size 20 mm (c). Relationship between the pinhole diameter and processed channel width (d).

ゲンファイバーをレーザ加工した基板の上に Rat 海馬初代培養細胞を播種し、培養の様子を観察した。Fig. 4A-a は培養 4 日目に固定し、免疫化学染色を行った結果である。神経細胞のマーカーである β -tubulin III (緑)、コラーゲン繊維のマーカーである Collagen Type I (赤)、核のマーカーである Hoechts 33258 (青) で染色し、各画像を重ねあわせた写真である。画像から見てわかるように、加工領域内のみには神経細胞の接着および神経突起の伸長が観察された。上段から、ピンホール直径 0.75, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 mm で加工した領域を示しており、最下段は、最小のピンホール直径 0.2 mm を使用し、マスク上部に設置されているバリアブルアパチャーにてレーザ照射領域を絞り込み、流路幅 5 μm で加工した領域である。Fig. 4B および 4C は、流路幅 43 μm および 5 μm に培養された神経細胞の拡大写真である。神経細胞が加工領域からはみ出ることなく培養されている様子および神経突起が伸長している様子を示している。流路幅 5 μm における培養では、神経突起が一方向に伸長している様子が観察された。Fig. 4A-b は、

Fig. 4 Cultured neuronal networks in collagen fiber etched area. A: Fluorescent image of cultured rat hippocampal neurons in collagen fiber etched area of different channel width (a). Red staining indicates collagen type 1 fibers. Neurons were stained for β -tubulin III (Green). Blue is the Hoechst 33258 nuclear stain. Lower micrograph shows fluorescent image of cultured neurons in non-treated PEG dish. White dot line indicates collagen etched area. B: Magnified view of cultured neurons in 43 μ m channel width. C: Magnified view of cultured neurons in 5 μ m channel width.

Fig. 5 Embedded neurons in microchamber. A: Phase contrast image of embedded single neuron in microchamber of 102 μ m diameter. B: SEM image of embedded three neurons in microchamber of 65 μ m diameter. C: Magnified view of SEM image B.

PEG コーティングなしで、加工した基板に培養した様子を示している。加工領域内外共に、神経細胞が培養されている様子が観察された。このことから、加工領域内のみの細胞接着はコラーゲンファイバー上にコーティングした PEG の効果であることが示唆された。従来 PEG を基板に修飾させる際には、チオール結合により形成させるが、本実験では真空乾燥のみでコーティングした。PEG を添加させた場合には、細胞が生着しなかったことから、コラーゲンファイバーへ PEG が吸着していたと考えられる。本実験におけるレーザ加工領域はガラス面が露出しており、細胞接着基質のコーティングは行っていない。通常、ノンコーティングのガラ

ス表面には Rat 海馬初代培養細胞は接着しないが、本実験において接着が見られた。エキシマレーザのガラス面への照射は、OH 基を露出させ、表面を親水化させる報告がある⁴⁴⁾。ガラス基板表面の改質により、細胞の接着および培養が可能になったと考えている。細胞外基質のコートなしでエキシマレーザの加工領域に培養できることはエキシマレーザ加工技術の神経細胞培養における長所である。

次に、マイクロチャンバーへの神経細胞の埋め込みを評価した。Fig. 5A は、ピンホール直径 0.75 mm で加工した直径 102 μ m のチャンバーに 1 細胞培養されている位相差像である。Fig. 5B は、

ピンホール直径 0.5 mm で加工した直径 65 μm のチャンバーに 3 細胞が埋め込まれ培養されている様子の電子顕微鏡写真である。チャンバー内にのみ培養され、コラーゲンファイバー表面に突起がはみ出していない様子が観察された。Fig. 5C は 5B の拡大写真であり、コラーゲン繊維が完全にエッチングされている様子および神経突起が底面に伸長している様子を示している。

本実験は、生体材料としてコラーゲンファイバーをエキシマレーザ加工することにより細胞を埋め込んだ。加工領域内に神経ネットワークの埋め込みに成功したことから、エキシマレーザ加工により生体材料深部への細胞導入の可能性が示唆された。しかしながら、エキシマレーザ加工により、細胞の接着性、増殖性、移動性などの厳密な細胞挙動を制御するためには、より微細な加工精度が必要となる。サブミクロンオーダーの加工精度については今後の課題である。

3.4 神経突起の Z 軸方向への誘導

神経ネットワークの情報伝達を担う上で重要な役割を持つ神経突起の方向を Z 軸に誘導することを試みた。ピンホール直径 0.2 mm のマスクを用いて流路幅 10 μm のマイクロチャンネルを作製し、神経細胞を並べ、更に、マイクロチャンネル内に 50 μm 間隔で直径 5 μm の Z 軸方向への加工を行うことで、神経突起を Z 軸方向に誘導することを試みた (Fig. 6A)。Fig. 6B はコラーゲンファイバーを加工した幅 10 μm のマイクロチャンネルに神経細胞を並べた培養 4 日目の写真を示している。神経細胞がマイクロチャンネル内のみに接着している様子、および神経突起が直線状に伸長し、細胞間で結合している様子が観察された。マイクロ流路内に 50 μm 間隔で白く見える箇所が Z 軸方向に加工したホールである。Z 軸に加工したホールに神経突起が落ち込んでいるかを確認するために、電子顕微鏡にて観察した。Fig. 6C は、Z 軸方向に加工したホールに神経突起が落ち込んでいる様子を示している。

Fig. 6 Neurite elongation into the etched hole in Z-axis. A: Schematic drawing of neurite guidance into the etched hole. B: Phase contrast image of linearly cultured neuronal network in microchannel of 10 μm width. C: SEM image of neurite elongation into etched hole in Z-axis.

これらの結果より、神経突起のみを Z 軸方向に誘導できる可能性が示唆された。本実験では、ガラスを Z 軸方向に加工したが、厚い生体材料を用いれば、生体材料中に異なる幅のマイクロチャンネルを Z 軸方向に加工することが可能であり、細胞のみならず、神経突起の空間的制御ができる。今後、生体材料深部への加工を行い、神経突起の伸長方向を 3 次元空間内で制御した新しい 3 次元培養技術へと発展させたい。

4. おわりに

本研究では、生体適合性材料の 3 次元空間に神経細胞を意図した位置に配置する 3 次元培養技術の開発を目的とし、エキシマレーザを用いた微細加工による神経細胞の埋め込みを試みた。エキシマレーザの微細加工の精度および特性を最初に評価するにあたり、BCP シートとコラーゲンファイバーを用いた。BCP シートの加工において、10 μm の精度で微細加工することができた。エキシマレーザによる BCP シートの加工技術は、マイクロ流路の作製において、鋳型を必要としない簡便な作製技術であることがわかった。生体材料としてコラーゲンファイバーをエキシマレーザ加工した結果、5 μm の精度で微細加工することができた。このことから、1 細胞レベルで細胞を埋め込むことのできる精度で加工することがわかった。また、材料表面に細胞非接着分子である PEG を修飾することで、レーザ加工領域内のみ神経細胞を埋め込むことに成功した。照射領域の表面改質を行うエキシマレーザの特徴により、細胞接着基質をコートすることなく、加工領域内に神経細胞を培養することがわかった。更に、エキシマレーザ加工領域に埋め込んだ神経細胞の神経突起を Z 軸方向に加工した穴に誘導することに成功した。これらの結果は、エキシマレーザにより生体材料の微細加工が可能であること、および生体材料中への神経細胞の埋め込みや細胞の空間配置を制御できる可能性を示唆している。生体適合性材料を用いた 3 次元培養技術へと発展させるためには、生体適合性材料の選定、柔軟な生体材料のレーザ加工評価、3 次元空間への細胞の浸潤などを評価して行く必要があり、今後の課題である。

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 24700485 の助成を受けて行われた。

参考文献

- 1) J.Erickson, A.Tooker, Y.C.Tai, J.Pine, Caged neuron MEA: a system for long-term investigation of cultured neural network connectivity. Journal of neuroscience methods 2008; 175(1): 1-16.
- 2) S. Raghavan, C.M. Nelson, J.D. Baranski, E.Lim, C.S.Chen, Geometrically controlled endothelial tubulogenesis in micropatterned gels. Tissue engineering Part A 2010; 16(7): 2255-2263.
- 3) A.K. Ekaputra, G.D.Prestwich, S.M.Cool, D.W.Hutmacher, The three-dimensional vascularization of growth factor-releasing hybrid scaffold of poly (epsilon-caprolactone)/

- collagen fibers and hyaluronic acid hydrogel. *Biomaterials* 2011; 32(32): 8108-8117.
- 4) M.Fujita, Y.Kinoshita, E.Sato, H.Maeda, S.Ozono, H.Negishi, et al. Proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells on poly(glycolic acid)-collagen sponge. *Tissue engineering* 2005; 11(9-10): 1346-1355.
- 5) Y.Hiraoka, Y.Kimura, H.Ueda, Y.Tabata, Fabrication and biocompatibility of collagen sponge reinforced with poly (glycolic acid) fiber. *Tissue engineering* 2003; 9(6): 1101-1112.
- 6) K.H.Nakayama, C.A.Batchelder, C.I.Lee, A.F.Tarantal, Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue engineering Part A* 2010; 16(7): 2207-2216.
- 7) P.Vavken, S.Joshi, M.M.Murray, TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. *Journal of orthopaedic research* 2009; 27(12): 1612-1618.
- 8) X.Cui, T.Boland, Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials* 2009; 30(31): 6221-6227.
- 9) M.Matsusaki, K.Sakaue, K.Kadowaki, M.Akashi, Three-Dimensional Human Tissue Chips Fabricated by Rapid and Automatic Inkjet Cell Printing. *Advanced healthcare materials* 2012; 2(4): 534-539.
- 10) S.Moon, S.K.Hasan, Y.S.Song, F.Xu, H.O.Keles, F.Manzur, et al. Layer by layer three-dimensional tissue epitaxy by cell-laden hydrogel droplets. *Tissue engineering Part C Methods* 2010; 16(1): 157-166.
- 11) Y.Haraguchi, T.Shimizu, T.Sasagawa, H.Sekine, K.Sakaguchi, T.Kikuchi, et al. Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro. *Nature protocols* 2012; 7(5): 850-858.
- 12) M.Kino-oka, T.X.Ngo, E.Nagamori, Y.Takezawa, Y.Miyake, Y.Sawa, et al. Evaluation of vertical cell fluidity in a multilayered sheet of skeletal myoblasts. *Journal of bioscience and bioengineering* 2012; 113(1): 128-131.
- 13) J.Yang, M.Yamato, C.Kohno, A.Nishimoto, H.Sekine, F.Fukai, et al. Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials* 2005; 26(33): 6415-6422.
- 14) T.Shimizu, M.Yamato, T.Akutsu, T.Shibata, Y.Isoi, A.Kikuchi, et al. Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *Journal of biomedical materials research* 2002; 60(1): 110-117.
- 15) J.Yang, M.Yamato, K.Nishida, T.Ohki, M.Kanzaki, H.Sekine, et al. Cell delivery in regenerative medicine: the cell sheet engineering approach. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2006; 116(2): 193-203.
- 16) A.Furuta, S.Miyoshi, Y.Itabashi, T.Shimizu, S.Kira, K.Hayakawa, et al. Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circulation research* 2006; 98(5): 705-712.
- 17) C.Erggelet, M.Sitting, A.Lahm, The arthroscopic implantation of autologous chondrocytes for the treatment of full-thickness cartilage defects of the knee joint. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 2003; 19(1): 108-110.
- 18) A.Gobbi, E.Kon, M.Berruto, R.Francisco, G.Filardo, M.Marcacci, Patellofemoral full-thickness chondral defects treated with Hyalograft-C: a clinical, arthroscopic, and histologic review. *The American journal of sports medicine* 2006; 34(11): 1763-1773.
- 19) S.Ikuta, N.Sekino, T.Hara, Y.Saito, K.Chida, Mouse epidermal keratinocytes in three-dimensional organotypic coculture with dermal fibroblasts form a stratified sheet resembling skin. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2006; 70(11): 2669-2675.
- 20) S.Sugaya, S.Kakegawa, S.Fukushima, M.Yamada, M.Seki, Micropatterning of hydrogels on locally hydrophilized regions on PDMS by stepwise solution dipping and in situ gelation. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2012; 28(39): 14073-14080.
- 21) N.Sadr, M.Zhu, T.Osaki, T.Kakegawa, Y.Yang, M.Moretti, et al. SAM-based cell transfer to photopatterned hydrogels for microengineering vascular-like structures. *Biomaterials* 2011; 32(30): 7479-7490.
- 22) K.Sakaguchi, T.Shimizu, S.Horaguchi, H.Sekine, M.Yamato, M.Umezu, et al. In vitro engineering of vascularized tissue surrogates. *Scientific Reports* 2013; 19(3): 1316.
- 23) T.T.Dang, Q.Xu, K.M.Bratlie, E.S.O'Sullivan, X.Y.Chen, R.Langer, et al. Microfabrication of homogenous, asymmetric cell-laden hydrogel capsules. *Biomaterials* 2009; 30(36): 6896-6902.
- 24) M.Kato-Negishi, Y.Tsuda, H.Onoe, S.Takeuchi, A neurospheroid network-stamping method for neural transplantation to the brain. *Biomaterials* 2010; 31(34): 8939-8945.
- 25) Y.T.Matsunaga, Y.Morimoto, S.Takeuchi, Molding cell beads for rapid construction of macroscopic 3D tissue architecture. *Advanced materials* 2011; 23(12): 90-94.
- 26) Y.Morimoto, R.Tanaka, S.Takeuchi, Construction of 3D, Layered Skin, Microsized Tissues by Using Cell Beads for

- Cellular Function Analysis. *Advanced healthcare materials* 2013; 2(2): 261-205.
- 27) Y.Tsuda, Y.Morimoto, S.Takeuchi, Monodisperse cell-encapsulating peptide microgel beads for 3D cell culture. *Langmuir* 2010; 26(4): 2645-2649.
- 28) M.Zhao, C.Song, W.Zhang, Y.Hou, R.Huang, Y.Song, et al. The three-dimensional nanofiber scaffold culture condition improves viability and function of islets. *Journal of biomedical materials research Part A* 2010; 94(3): 667-672.
- 29) X.M.Liu, H.Liu, F.Y.Xiong, Z.L.Chen, Collagen membrane as scaffold for the three-dimensional cultivation of cardiac cells in vitro. *Chinese journal of biotechnology* 2003; 19(4): 484-488.
- 30) C.Pontes Soares, V.Midlej, M.E.de Oliveira, M.Benchimol, M.L.Costa, C.Mermelstein, 2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. *PloS one* 2012; 7(5): e 38147.
- 31) F.Evenou, M.Hamon, T.Fujii, S.Takeuchi, Y.Sakai, Gas-permeable membranes and co-culture with fibroblasts enable high-density hepatocyte culture as multilayered liver tissues. *Biotechnology progress* 2011; 27(4): 1146-1153.
- 32) J.C.Chang, G.J.Brewer, B.C.Wheeler, A modified microstamping technique enhances polylysine transfer and neuronal cell patterning. *Biomaterials* 2003; 24(17): 2863-2870.
- 33) A.K.Vogt, G.J.Brewer, T.Decker, S.Bocker-Meffert, V.Jacobsen, M.Kreiter, et al. Independence of synaptic specificity from neuritic guidance. *Neuroscience* 2005; 134(3): 783-790.
- 34) A.C.von Philipsborn, S.Lang, A.Bernard, J.Loeschinger, C.David, D.Lehnert, et al. Microcontact printing of axon guidance molecules for generation of graded patterns. *Nature protocols* 2006; 1(6): 1322-1328.
- 35) Z.Zhang, R.Yoo, M.Wells, T.P.Beebe, R.Jr., Biran, P.Tresco, Neurite outgrowth on well-characterized surfaces: preparation and characterization of chemically and spatially controlled fibronectin and RGD substrates with good bioactivity. *Biomaterials* 2005; 26(1): 47-61.
- 36) N.E.Sanjana, S.B.Fuller, A fast flexible ink-jet printing method for patterning dissociated neurons in culture. *Journal of neuroscience methods*. 2004; 1 36(2): 151-163.
- 37) S.J.Kim, J.K.Lee, J.W.Kim, J.W.Jung, K.Seo, S.B.Park, et al. Surface modification of polydimethylsiloxane (PDMS) induced proliferation and neural-like cells differentiation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Journal of materials science Materials in medicine* 2008; 19(8): 2953-2962.
- 38) E.M.Regan, J.B.Uney, A.D.Dick, Y.Zhang, J.Nunez-Yanez, J.P.McGeehan, et al. Differential patterning of neuronal, glial and neural progenitor cells on phosphorus-doped and UV irradiated diamond-like carbon. *Biomaterials* 2010; 31(2): 207-215.
- 39) Z.Yin, D.Noren, C.J.Wang, R.Hang, A.Levchenko, Analysis of pairwise cell interactions using an integrated dielectrophoretic-microfluidic system. *Molecular systems biology* 2008; 4: 232.
- 40) L.J.Millet, M.E.Stewart, R.G.Nuzzo, M.U.Gillette, Guiding neuron development with planar surface gradients of substrate cues deposited using microfluidic devices. *Lab on a chip* 2010; 10(12):1525-15 35.
- 41) A.M.Taylor, M.Blurton-Jones, S.W.Rhee, D.H.Cribbs, C.W.Cotman, N.L.Jeon, A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nature methods* 2005; 2(8): 599-605.
- 42) J.Erickson, A.Tooker, Y.C.Tai, J.Pine, Caged neuron MEA: a system for long-term investigation of cultured neural network connectivity. *Journal of neuroscience methods* 2008; 175(1): 1-16.
- 43) M.Masafumi, S.Linards, H.Hideo, O.Tohr, Photochemical processes induced by 157-nm light in H(2)-impregnated glassy SiO(2):OH. *Optics letters* 1999; 24(13): 863-865.
- 44) M.Okoshi, M.Murahara, Area-selective nucleation of copper on fluorocarbon-resin surface using ArF excimer laser-induced chemical modification. *Applied Physics Letters* 1998; 72(20): 2616-2618.