

Short Report

PDMS スタンプを用いたマイクロコンタクトピーリング法の検討

伊藤一志¹¹ 秋田県立大学システム科学技術学部機械知能システム学科

細胞の形状および配列を制御する細胞パターンニング技術が再生医療分野および創薬分野において注目されている。細胞パターンニング技術のひとつであるマイクロコンタクトピーリング法（以下、 μ CPE）はこれまでの手法に比べて、簡便な方法として報告されている。一般に μ CPE は親水化した培養基質に金属製スタンプを用いて μm オーダーの疎水性領域を選択的に形成する方法である。しかしながら、金属製スタンプでは基質との均一な圧着が困難などの課題が挙げられる。そこで本研究では、柔軟なシリコーンエラストマーであるポリジメチルシロキサン（PDMS）で作製したスタンプを用いた μ CPE を検討した。本研究の結果として、PDMS スタンプを用いて、プラズマ処理した PDMS 表面の選択的領域を疎水化できることが明らかになった。また、PDMS スタンプを用いた μ CPE により、血管内皮細胞の細胞パターンニングを実施した結果、血管内皮細胞の配列を形成することが可能であった。したがって、 μ CPE に PDMS スタンプを適用できることが明らかとなった。

キーワード：細胞パターンニング、マイクロコンタクトピーリング法、ポリジメチルシロキサン

従来の培養容器に培養した細胞は周囲の細胞との局所的な接触および細胞間接着の形成により、細胞毎の形状およびタンパク質の発現などが異なることが知られている（Park et al., (2006)）。さらに、それらの細胞に物理的および生化学的刺激を負荷した場合、その応答性は細胞毎に異なる。そのため、細胞の形状および配列を制御する細胞パターンニング技術が再生医療分野および創薬分野などにおいて注目されている。

細胞パターンニング技術は、マイクロコンタクトプリンティング法（Ruiz & Chen, (2007)）、マイクロステンシル法（Folch et al., (2000)）、マイクロコンタクトピーリング法（以下、 μ CPE）（Yokoyama, Tsubasa, & Deguchi (2014)）などの手法が知られており、その中でも μ CPE は簡便な方法として報告されている。図 1 に μ CPE の工程を示す。培養基質表面に酸化層を形成後、金属製スタンプを圧着する。その後、スタンプを剥離することにより、スタンプのパターンを反映した領域の酸化層を除去する。細胞は酸化層

に接着するため、スタンプのパターンにより細胞の配置を制御できる。しかしながら、金属製スタンプでは基質との均一な圧着が困難などの課題が挙げられる。そこで本研究では、シリコーンエラストマーであるポリジメチルシロキサン（PDMS）で作製した柔軟なスタンプを用いた μ CPE の構築を検討する。

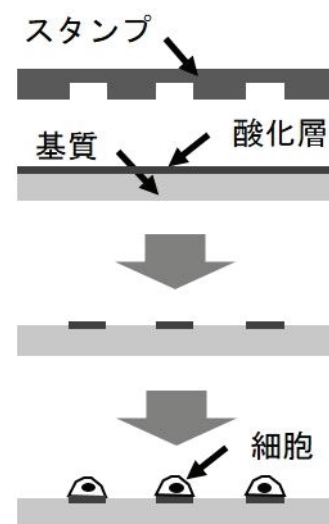


図1 マイクロコンタクトピーリング法

実験方法

PDMS スタンプおよび PDMS 基質の作製

PDMS スタンプの作製に用いた Si ピラーチップの概要を図 2 に示す。ピラーの各寸法および形状は直径 30, 40, 50, 60 μm の円形状ピラーと一辺 50, 60 μm の四角形状ピラーである (ピラー数 : 50 \times 50 本) ピラーの中心間距離は 200 μm とした。本実験で用いた Si ピラーチップは山形県工業技術センターに作製頂いた。ピラーチップ表面の電子顕微鏡画像を図 3 に示す。ここでは四角形状ピラーが配列されている様子が分かる。

PDMS スタンプの作製では、まず PDMS (東レ・ダウコーニング, SILPOT 184) は主剤と硬化剤を重量比 5 : 1 で混合した。その後、混合した PDMS を Si ピラーチップに注入して、恒温槽 (SHIMAZU, TCE-N300) で加熱硬化した。PDMS 基質の作製では、カバーガラスに PDMS を滴下後 12 時間静置した。恒温槽で加熱硬化後、PDMS 基質はソフトプラズマエッチング装置 (メイワフォーシス, SEDE-GE) を用いて大気プラズマ (15 Pa, 10 mA) で 1 分間処理した。この処理により PDMS 基質表面に酸化層が形成される。PDMS 基質における PDMS の混合比は 5 : 1 および 20 : 1 とした。以降、それぞれを高弾性および低弾性基質と記述する。

PDMS スタンプにおけるパターンの評価

加熱硬化した PDMS スタンプのパターン形状を評価するため、PDMS スタンプをカバーガラスに設置後、光学顕微鏡を用いてパターン形状の画像を撮影した。その後、画像処理ソフトである Image J (NIH) を用いて画像から各パターンの面積を測定した。

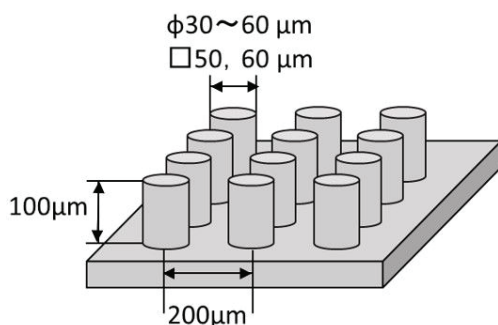


図 2 Si ピラーチップの概要

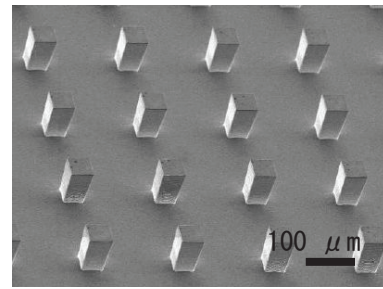


図 3 Si ピラーチップ

PDMS スタンプにおけるパターンの評価

加熱硬化した PDMS スタンプのパターン形状を評価するため、PDMS スタンプをカバーガラスに設置後、光学顕微鏡を用いてパターン形状の画像を撮影した。その後、画像処理ソフトである Image J (NIH) を用いて画像から各パターンの面積を測定した。

PDMS 基質の表面粗さおよび濡れ性の評価

スタンプ処理前後の PDMS 基質の表面粗さ (Ra) は非接触三次元表面形状測定装置 (Canon, NewView600) を用いて測定した。また、基質における濡れ性は、各基質に蒸留水を滴下し、水滴と基質表面の接触角を撮影後、Image J を用いて評価した。接触角は図 4 のように水滴表面端部の接線と水滴底面間の角度である。なお、本項目の実験ではパターンを形成していない PDMS スタンプを用いた。

PDMS 基質における μCPe および細胞培養

紫外線滅菌した PDMS 基質を 6 ウェルプレート (住友ベークライト) に配置後、PDMS スタンプを 10 秒間圧着した。0.02 % プルロニック F-127 および 0.1% ゼラチン溶液を用いて基質表面を処理後、濃度調整したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の懸濁液を各ウェルに 2 mL 添加した。なお、培養液には 2% ウシ胎児血清が含まれる EBM-2 培地 (タカラバイオ) を用いた。その後、37 $^{\circ}\text{C}$ 、95% Air、5% CO_2 に保たれたインキュベータに静置した。

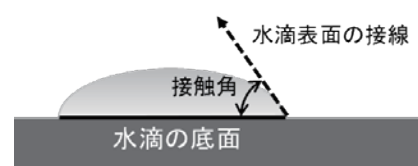


図 4 PDMS スタンプ

アクチンフィラメントおよび細胞核の染色

細胞培養開始 24 時間後、細胞の様子を観察するため、血管内皮細胞を 0.4% パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定した。その後、Alexa flour 488-conjugated phalloidin (Molecular Probes) および SlowFade Gold antifade reagent (Invitrogen) を用いてアクチンフィラメントおよび細胞核を染色した。観察には共焦点レーザー走査型顕微鏡 (OLYMPUS, FV1000) を用いた。

結果および考察

PDMS スタンプにおけるパターン形状

PDMS スタンプの顕微鏡画像を図 5 に示す。図から、円形状および四角形状パターンの形成が確認された。PDMS スタンプの各パターンにおける面積を図 6 に示す。直径 30, 40, 50, 60 μm の Si ピラー

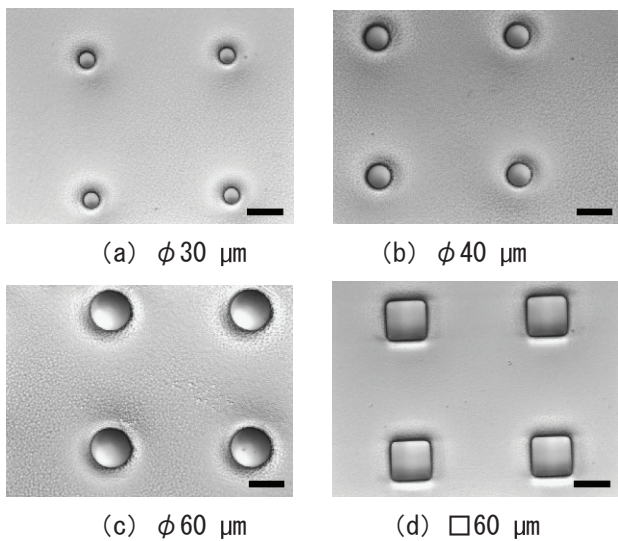


図 5 PDMS スタンプの顕微鏡画像 (Bar : 50 μm)

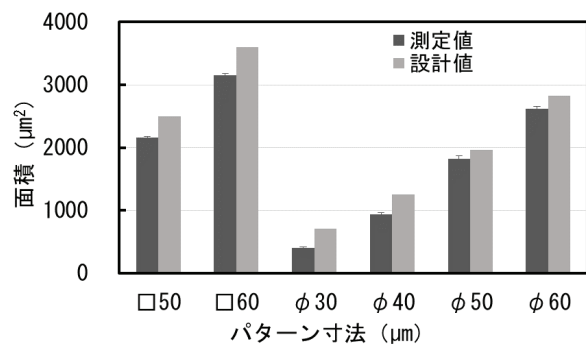


図 6 PDMS スタンプにおけるパターンの面積

を用いたパターンでは設計値に比べて、面積が 42, 26, 7, 7%, 一辺 50, 60 μm のパターンでは 14, 13% 小さくなった。なお、設計値は Si ピラーの設計寸法である。これは Si ウェハのエッチング工程において Si ピラーの直径および一辺が設計値よりも小さくなったことに起因すると考えられる。

PDMS 基質の表面粗さおよび接触角

各 PDMS 基質におけるスタンプ処理前後の算術平均粗さ R_a を図 7 に示す。ここで、 R_a は基質表面の凹凸が大きくなるほど高くなる指標である。本実験では、プラズマ処理後の PDMS 基質とスタンプを圧着することにより、PDMS 基質表面の酸化層を剥離させる原理を想定している。結果として、スタンプ処理後の R_a は処理前に比べて高くなった。このことから、酸化層が剥離されていると考えられる。

図 8 にプラズマ処理前後の PDMS 基質における水滴の様子を示す。プラズマ処理後では、水滴は基質表面に広がった。このことから、プラズマ処理により基質表面が親水化していることが分かる。

図 9 に各処理前後における PDMS 基質の接触角を示す。プラズマ処理前の高弾性 (5 : 1) および低弾性 (20 : 1) 基質の接触角は 108 および 110° であり、はっ水性であった。プラズマ処理後の両基質における接触角は 30, 10° と小さくなった。高弾性に比べ

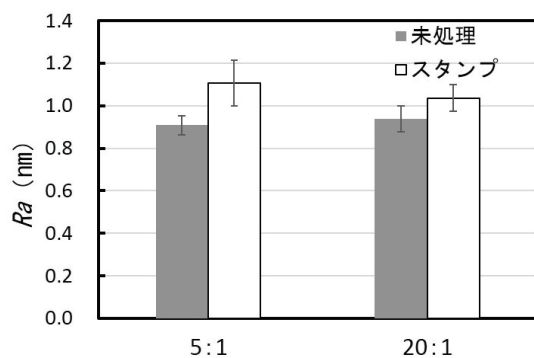


図 7 各基質の算術平均粗さ R_a (nm)

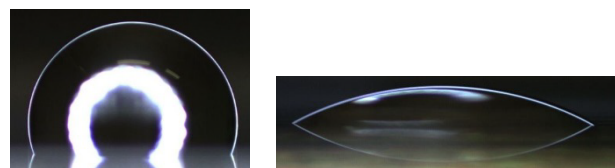


図 8 PDMS 基質における水滴の様子

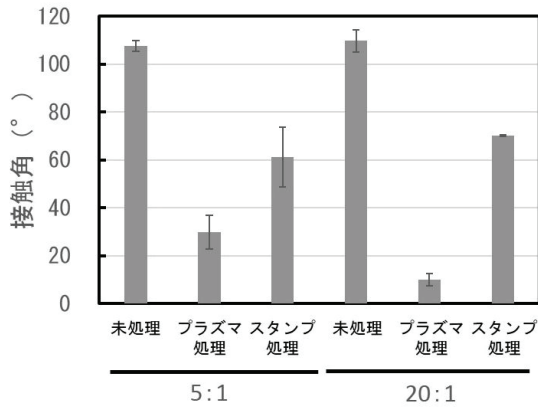


図9 各 PDMS 基質の接触角

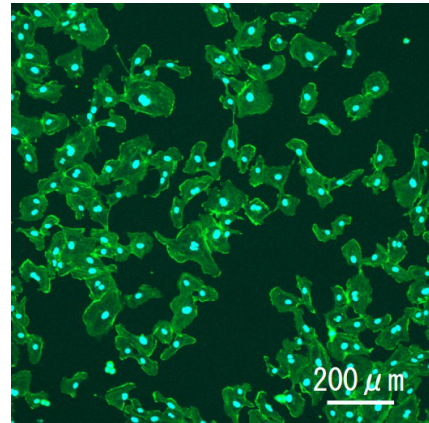
て、低弾性基質は接触角が 20° 小さくなった。基質ともに接触角を 30~60° 大きくなった。μCPE は基質表面に疎水性と親水性の領域を局部的に形成することにより細胞の接着領域を制御する方法である。そのため、この結果から、金属製と同様に PDMS スタンプでも基質の部分的な疎水化が可能であることが分かった。

μCPE した培養血管内皮細胞

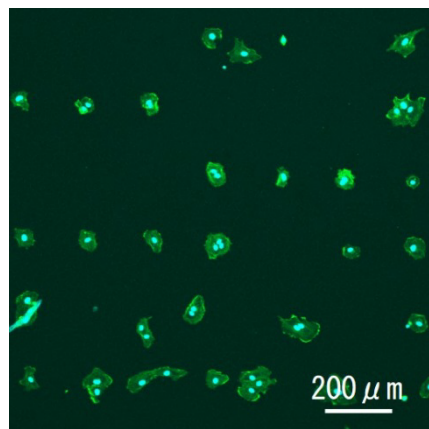
μCPE を施した高弾性基質に培養した HUVEC の様子を図 10 に示す。プラズマ処理した基質に比べて、μCPE を施した基質では細胞数が明らかに減少した。また、約 200 μm 間隔で HUVEC が配列している様子が観察された。この結果から、PDMS スタンプを用いて μCPE が可能であることが分かった。しかしながら、細胞形状はパターンを反映していなかった。この点については、細胞接着領域および非接着領域の親水性および疎水性を高めることで改善できると考えている。

結言

本研究では、柔軟なスタンプを用いた μCPE の構築を検討した。そのため、PDMS を用いてスタンプ作製後、μCPE を施した培養基質に HUVEC を播種した。その結果、約 200 μm 間隔で HUVEC が配列して接着している様子が部分的に観察された。この結果から、PDMS スタンプを用いた μCPE が可能であることが分かった。



(a) プラズマ処理した高弾性基質



(b) μCPE した高弾性基質

図10 μCPE を施した高弾性基質に培養した HUVEC

文献

- Park, M., C., et al., (2006). Pumpless, selective docking of yeast cells inside a microfluidic channel induced by receding meniscus. *Lab. Chip.*, 6, 988-994.
- Ruiz, S., A., & Chen, C., S., (2007). Microcontact printing: a tool to pattern. *Soft Matter.*, 3, 168-177.
- Folch, A., J., B., H., Hurtado, O., Beebe, D., J., & Toner, M., A., (2000). Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures. *J. Biomed. Mater. Res.*, 52, 346-353.
- Yokoyama, S., Tsubasa S., M., & Deguchi, S., (2014). Microcontact peeling as a new method for cell micropatterning, *PLOS ONE*, 9, e102735.

〔平成 28 年 7 月 20 日受付〕
〔平成 28 年 7 月 31 日受理〕

Basis examination for microcontact peeling using by PDMS stamp

Kazushi Ito¹

¹ *Department of Machine Intelligence and Systems Engineering, Faculty of System Science and Technology, Akita Prefectural University*

Cell patterning techniques, which enable control of cell morphology and arrays on a surface, have received widespread attention in the fields of tissue engineering and drug discovery in recent years. As a new method among these techniques, the microcontact peeling (μ CPe) method has been reported to be more accessible than previous methods. This method usually involves the treatment of a hydrophilic substrate with a metallic stamp to selectively form a hydrophobic region at the microscale. However, achieving uniform physical contact between the metallic stamp and the substrate is difficult. In this report, we used a polydimethylsiloxane (PDMS) silicone elastomer as a peeling stamp to perform μ CPe. The results showed that a hydrophobic region on the surface of the plasma-treated PDMS substrate could be selectively formed using a PDMS peeling stamp. In addition, selective adhesion of HUVECs to the unpeeled areas was observed, indicating that the PDMS peeling stamp was effective for μ CPe.

Keywords: cell patterning, micro-contact peeling, poly(dimethylsiloxane)