

課題番号 : F-14-KT-0153
利用形態 : 技術補助
利用課題名(日本語) : COI「細胞組織化と血液検査」(2)
Program Title (English) : Development of devices for fabricating 3-D tissues and blood testing (2)
利用者名(日本語) : 鈴木 雅登, 下野 健
Username (English) : M. Suzuki, K. Shimono
所属名(日本語) : パナソニック株式会社
Affiliation (English) : Panasonic Corporation

1. 概要(Summary)

iPS 細胞や ES 細胞など多能性を有する幹細胞は、適切な培養条件下において自発的に分化を開始し、その過程にて胚様体(embryonic body: EB)と呼ばれる細胞凝集塊を形成する。EB はサイズによって発現する遺伝子の種類や量が異なることが報告されており、EB から特定の細胞へ選択的に分化誘導する上で、均一なサイズの EB を作製することが重要である。近年、半導体微細加工技術の汎用化に伴い、EB と同程度の大きさ(直径 100 ~ 1000 μm) である窪みを作製し、その中で ES 細胞を培養することで均一な大きさの EB を大量一括で作製する方法が提案されている。

我々はアクリル製の樹脂を鋳型にしてシリコーンゴム(PDMS)製のマイクロウエルを作製し、マイクロウエル内のマウス ES 細胞を培養し EB の作製を試みた。マイクロウエル内の表面の凹凸をナノテクノロジーハブ拠点所有の FE-SEM (Field-emission scanning microscopy) により観察し、ウエル内の微小な凹凸が EB 形成に及ぼす影響を評価した。

2. 実験(Experimental)

・利用した主な装置

超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡

・実験方法

直径 500 μm の半球状の凸型構造を有したアクリル製の基板を機械加工により作製し、その基板に PDMS (SIIPOT 184, 東レ・ダウコーニング) プレポリマー溶液(主剤:硬化剤 = 10:1(g/g))流し込み 60 $^{\circ}\text{C}$ で一晩静置し、PDMS を硬化させた後、型から離型しマイクロウエルとした。作製した PDMS マイクロウエルのそれぞれのウエルに、マウス ES 細胞懸濁液(濃度 5.0×10^6 cells/ml) を 1 μl /well ずつ加え 24 時間培養し、マイクロウエル内の mES 細胞を観察した。

3. 結果と考察(Results and Discussion)

ウエル内で培養された mES 細胞の光学顕微鏡写真を Fig. 1(A)に示した。一部の細胞が自発的に凝集し、直径 300 μm 程度の凝集塊が確認されたが、凝集塊は1つではなくウエル内で大小様々な大きさの凝集塊が観察された。マイクロウエル表面のラフネスを観察するために SEM 観察を行った結果(Fig. 1(B))、マイクロウエル内の表面に微小な凹凸が多数みられた。この SEM 像より、細胞は自重によりマイクロウエル中央に集まる途中にウエル表面の凹凸により一部補足され、1つの細胞凝集塊ではなく大小様々な細胞凝集塊がマイクロウエル内に形成されたと考えられる。以上の結果より、マイクロウエルの鋳型の表面形状の制御が重要であることが判明し、今後は鋳型表面の化学的なコーティング、PDMS 製マイクロウエルの親水化などを行い、1マイクロウエル内に1つの細胞凝集塊が確実に作製可能なマイクロウエルの条件出しを行う。

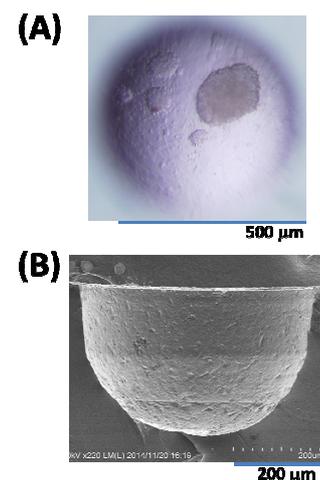


Fig. 1 (A) A microscopic image of mES embryonic bodies in a PDMS micro-well. (B) A sectional SEM image of PDMS micro-well.

4. その他・特記事項 (Others)

特になし。

5. 論文・学会発表 (Publication/Presentation)

なし。

6. 関連特許 (Patent)

なし。