

3次元的な細胞培養を指向したフッ素樹脂マイクロ流体チップの開発

機械システム課 鍋澤浩文 加工技術課 川堰宣隆

1. 緒言

再生医療や創薬の開発のために、立体的な細胞組織を人工的に形成する技術が求められている。従来の細胞培養用シャーレやプレートでは細胞が平面的に成長するため、立体的な組織形成のために、非接着性材料上での培養や、ハイドロゲル材料にチャンバーアレイを形成し、その立体構造の中で培養する手法などが提案されている。本研究では、細胞に対して低接着性を持つフッ素樹脂 (PFA) について、反応性イオンエッチング技術を用いた深堀加工技術を開発し、この加工技術で作製したマイクロ流路内において細胞培養を試みた。

2. 実験方法

2.1 フッ素樹脂用エッチングマスクの開発

3次元的な細胞培養を行うためには、フッ素樹脂基板上に 100 μm 以上の深堀加工を行う必要がある。そのためには、この深堀加工を可能にするエッチングマスクをフッ素樹脂基板上に形成しなければならない。しかし、ニッケル製ステンシルマスク¹⁾やフォトレジストマスク²⁾など既報のエッチングマスクでは、基板との密着性やエッチング選択比の観点から、深堀加工は困難であった。一方、シリコン樹脂の一種である PDMS が高結合エネルギーを持つ主鎖のシロキサン結合により、酸素プラズマ耐性に優れていることを見出し、PDMS メンブレンに貫通孔を設けた PDMS ステンシルマスクをフッ素樹脂用のマスクに用いることを着想した。しかし、マイクロ流体チップの製法であるソフトモールドニング法では、モールドに PDMS を充填し、上からフィルムで圧着・硬化しても、PDMS メンブレンに薄い残膜が形成され、貫通孔の形成が困難であった。そこで、PDMS の架橋抑制剤であるアミノシランを用いたスルーホール形成法を新たに考案した。Fig. 1 に、PDMS ステンシルマスクの作製フローを示す。始めにシリコンウェーハ上に、レジスト (SU-8) のモールドを形成する(a)。次に、PDMS のプレポリマーと硬化剤をモールドに充填し、上方からアミノシランをコートした樹脂フィルムを圧着する(b)。バイクした後でモールドから硬化した PDMS メンブレンを外し(c)、さらに樹脂フィルムを取り外す(d)。この一連の工程により、モールドの上面に接した領域は、アミノシランの効果により硬化せず、その領域がスルーホールとなる。

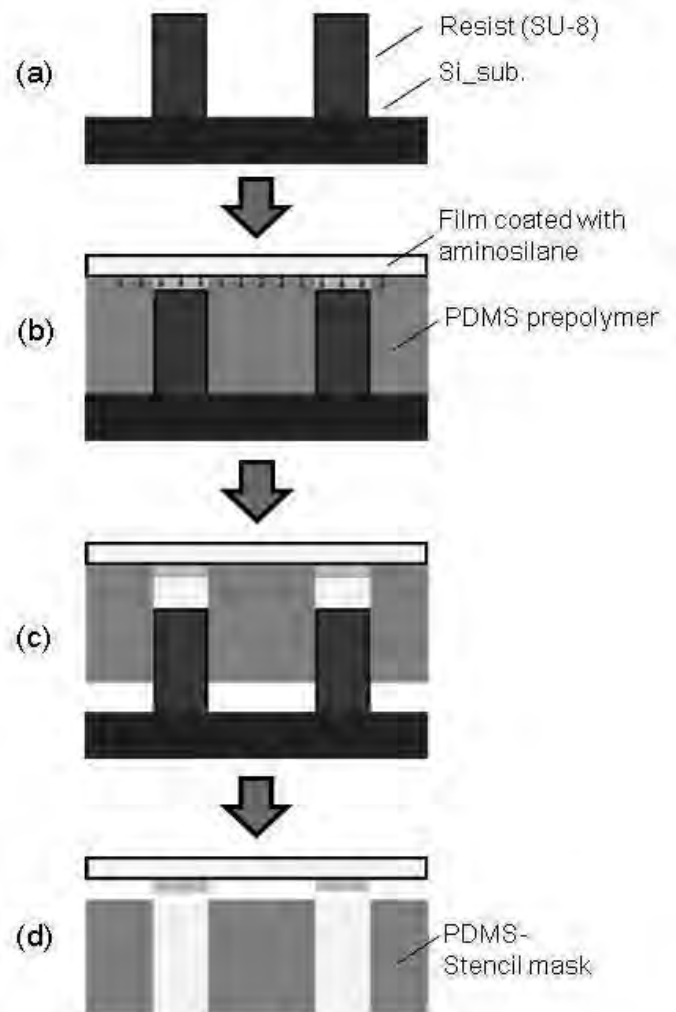


Fig. 1 Process flow of PDMS stencil mask.

2.2 PFA 細胞培養流体チップの開発

PFA 基板 (25mm 角, 厚さ 1mm) 上に、Fig. 2 のパターンで作製した PDMS 製ステンシルマスクを載せ、磁場支援型反応性イオンエッチング装置にて、深堀加工を行った。エッチング条件は、プロセス圧力を 0.5Pa、ステージの冷媒温度を 0 $^{\circ}\text{C}$ 、RF 電力を 50W に設定した。

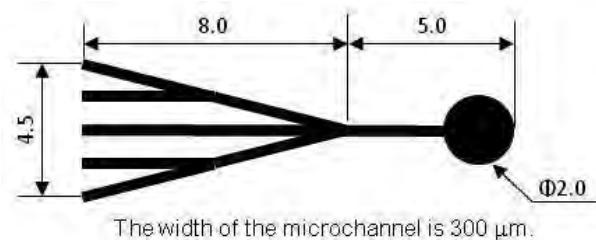


Fig. 2 Microfluidic device design

2.3 PFA 細胞培養流体チップによる細胞培養

2.2 で作製した PFA チップのマイクロ流路に、3T3 細胞(5.71×10^6 cells/mL)を播種し、液体培地を与えながら、集塊形成の振る舞いをデジタルマイクロスコープで観察した。

3. 実験結果および考察

3.1 フッ素樹脂用エッチングマスクの開発

アミノシランの濃度の最適化、アミノシランを固定する樹脂材質や厚みを最適化することにより、モールドの形状を正確に転写したスルーホールを形成することができた。

3.2 PFA 細胞培養流体チップの開発

Fig. 3 に、作製した PFA 細胞培養流体チップの写真を示す。形成したマイクロ流路の深さは $110\mu\text{m}$ であった。PDMS マスクの基板への高密着性により、エッチングだけは発生しなかった。

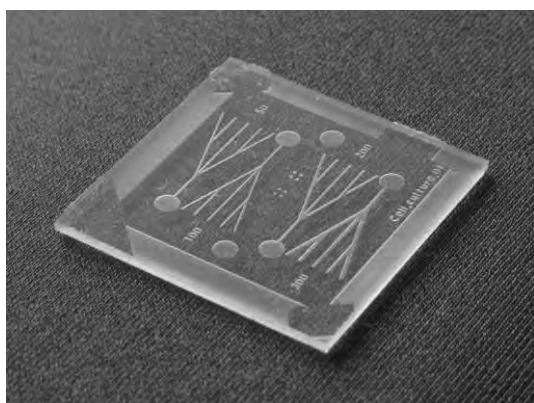


Fig. 3 PFA microfluidic chip.

3.3 PFA 細胞培養流体チップによる細胞培養

Fig. 4 に、培養を開始して 3 日後のマイクロ流路パターンを示す。流路パターン全体に沿って細胞集塊が形成されている様子を確認できた。

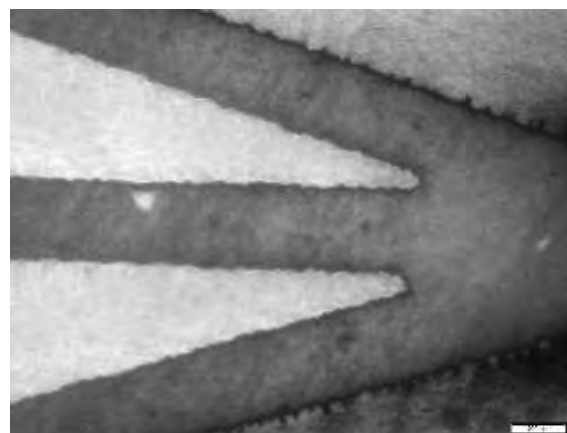


Fig. 4 3T3 cells cultured in PFA microchannel

4. 結言

細胞集塊を形成するためのフッ素樹脂製マイクロ流体チップを開発するために、フッ素樹脂深掘用の PDMS ステンシルマスクを開発した。このマスクを用いて、PFA マイクロ流体チップを作製し、3T3 細胞細胞集塊形成までを確認できた。今後は流路デザインや細胞種を変えながら、集塊形成の挙動の違いについて考察していきたい。

参考文献

- 1) C. E. Garner *et al.*, Thin Solid Films, **95**, 1982, p.351.
- 2) L. P. Lee *et al.*, Sens. Actuators A, **71**, 1998, p. 144.

謝辞

終わりに、本研究推進にあたり数多くご指導を頂いた千葉大学 関教授に深く感謝致します。

キーワード：細胞培養、フッ素樹脂、ドライエッチング、PDMS、ステンシルマスク

Development of PFA microfluidic chip for 3D cell culture

Mechanical System Section; Hirofumi NABESAWA and Processing Technology Section; Noritaka KAWASEGI

Formation technique of cell aggregate is required for drug development and tissue engineering. In this study, PFA microfluidic chips for 3D cell culture were fabricated by RIE technique with PDMS stencil mask. The PDMS membrane having through-hole structures was made by using aminosilane for preventing the PDMS prepolymer from polymerization. PFA microchannel plate was dryetched by a magnetron enhanced RIE systems developed in the previous study. The width and depth of microchannel were $300\mu\text{m}$, $100\mu\text{m}$, respectively. 3T3 cells (5.71×10^6 cells/mL) were seeded into the microchannel and the aggregation behavior of the cells was observed for 6 days.