

背景

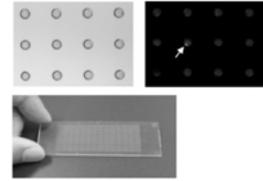
■ 神経細胞

末梢神経損傷時の現治療法

- 直接縫合
 - 自家神経移植
- 治療の限界
知覚異常

再生医療に向けて

- 神経細胞相互作用
- 神経ネットワークの形成
- 電気刺激による応答



S. Yamamura, et al., Vol.130, No.10, (2010), 1795-1799

■ 目的

MEMS技術を使って神経細胞を任意の空間へ配置可能なマイクロアレイの開発

■ 研究課題

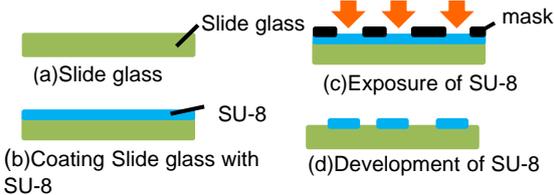
- ①2次元での神経細胞配列のためのパターニング技術の確立
- ②アレイ化した神経細胞の長期的観察可能なデバイスの開発

実験方法

■ マイクロアレイ作製

▶ SU-8パターニング技術の確立

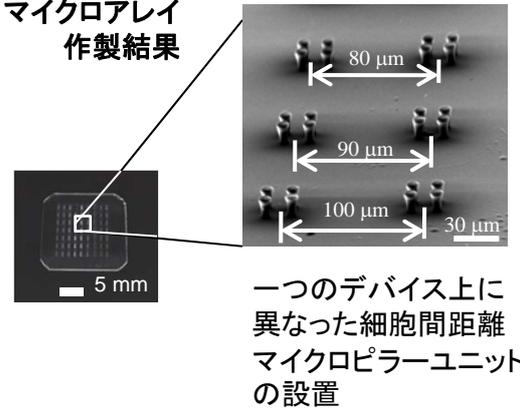
SU-8はフォトレジストでありMEMS分野において最も多く使われる。右に示す条件で膜厚20 μmのマイクロピラーを作製し、ピラー間に神経細胞が捕獲される構造とした。



パターニング工程

	Substrate	Slide glass
Spin coating	800 rpm-10 sec	3000 rpm-40 sec
Soft bake	65°C-3 min	95°C-15 min
Exposure	20 sec	
PEB	65°C-1 min	95°C-8 min
Development	8 min	
Hard bake	130°C-15 min	

■ マイクロアレイ作製結果

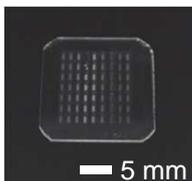


一つのデバイス上に異なった細胞間距離マイクロピラーユニットの設置

■ デバイス作製

▶ アレイチップ

スライドガラス
25 mm × 25 mm



- ①SU-8パターニング
- ②クリーニング
- ③親水化処理(5 min)
15 W 15Pa O₂ 10 sccm
- ④オートクレーブ処理

PDMS (型枠)
厚さ: 1 cm



- ①樹脂: 硬化剤 = 10:1で混合
- ②真空脱泡
- ③50°Cオープンで2時間ベーク

■ 神経細胞播種方法

神経細胞
PC-12D

DMEM { 10%牛血清
10%ウマ血清
抗生物質

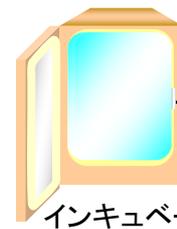


2.2 × 10⁵ cells / ml
細胞懸濁液

2 ml



35 mm ディッシュ



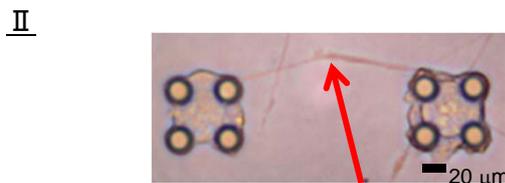
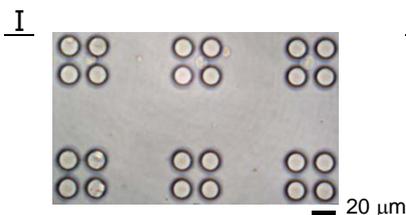
インキュベータ

- 細胞播種後24時間で神経成長因子(NGF)を1 μl添加
- 2時間毎に形態観察を48時間後まで行う

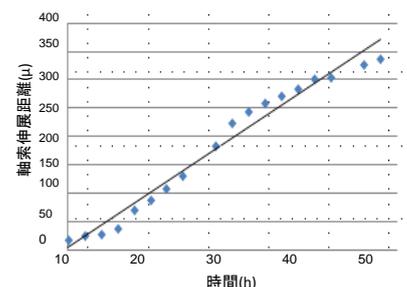
評価方法

- I 細胞の相互作用
- II 細胞間距離における軸索伸展距離

実験結果



- 細胞の捕獲が確認された
- 細胞間距離100 μm以内において軸索結合が確認され、110 μm以上においては軸索が伸展せず結合しなかった



- 軸索伸展速度は85.6 μm/hであった

単一細胞を捕獲し、細胞間距離による軸索伸展への影響評価可能なデバイスの創製に成功した