

# 2D/3D微細積層構造からなる 3次元細胞共培養基材

～物体の表面加工方法、積層体、及び積層体の製造方法～



群馬大学 大学院理工学府 知能機械創製部門

教授 鈴木孝明

大学 MEMS

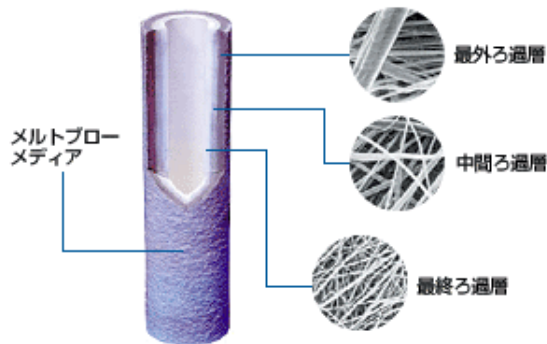
検索



## 2D/3D微細積層構造の作製方法と実施例（バイオ応用）

	前半：作製方法	後半（実施例）：3次元共培養基材
新技術	<ul style="list-style-type: none"> <li>強度が脆弱、かつ表面が非平坦な材料上へのマイクロパターン積層技術</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2次元の薄膜微細構造と3次元の立体ポラス構造を組み合わせた細胞培養基材</li> </ul>
特徴	<ul style="list-style-type: none"> <li>積層するマイクロパターンの解像度 5 μm以下</li> <li>マイクロパターンより大きい凹凸材料上にも積層可能</li> <li>大面積化に適用可能で、作製時間は、作製面積に依存しない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>より生体に近い組織構造を生成可能な2次元+3次元培養足場</li> <li>既存の3次元培養用ポラス基材に微細パターンを含む膜構造を積層可能</li> <li>手のひらサイズに、培養容器に合わせて、高精細化可能</li> </ul>
応用例	<ul style="list-style-type: none"> <li>3次元細胞共培養基材</li> <li>ポラス材を用いた電子デバイスやセンサ、生体模倣システム</li> <li>光学、電磁気学、機械力学的なメタマテリアル構造</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>生体組織を模倣した細胞組織構造の in vitro構築 (例：血管の内・中・外膜からなる積層構造の3次元培養)</li> </ul>

## マイクロポラス材料:

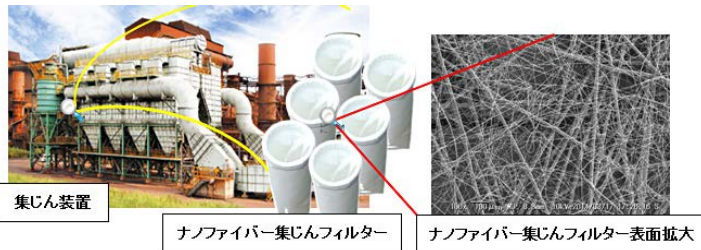


<http://www.daidomachines.com/filter/depthfilter.html>

特徴:

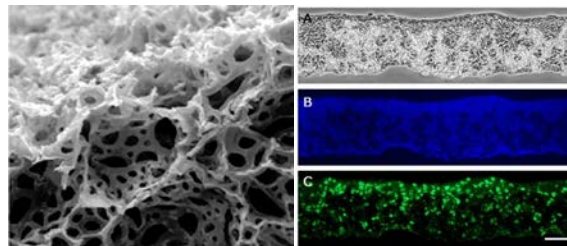
- 1 mm以下の微細なポラス（孔）をもつ
- 高い空隙率
- 表面は非平坦
- 脆弱

## 環境



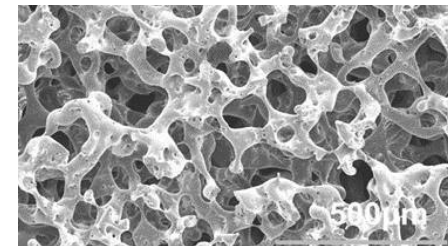
[https://www.nedo.go.jp/news/press/AA5\\_100259.html](https://www.nedo.go.jp/news/press/AA5_100259.html)

## バイオ



<https://search.yahoo.co.jp/image/search?rkf=2&ei=UTF&gdr=1&p=Alvetex#mode%3Ddetail%26index%3D56%26st%3D1799>

## 医療



<https://astamuse.com/ja/published/JP/No/2017052829>

排ガス/汚染物質フィルタ

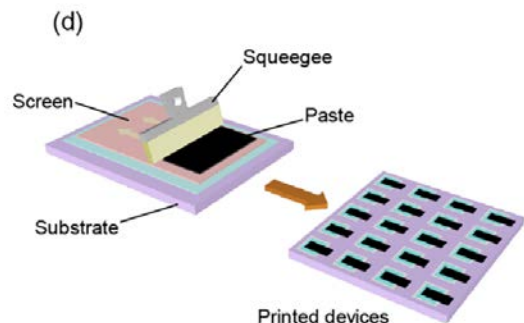
細胞組織の足場

再生医療

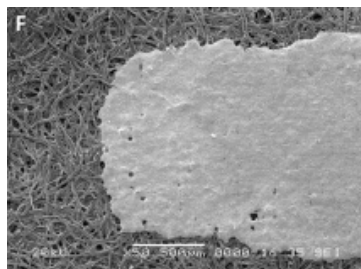
課題：ポラスのサイズや形状は化学反応依存

ポラス材上にマイクロパターンを積層し、機能性を向上・安定化したい

## スクリーン印刷



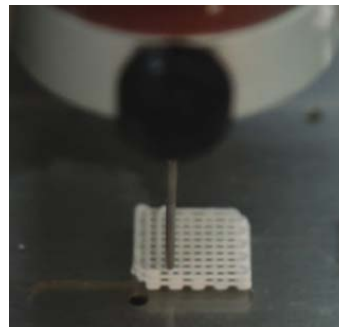
Y. Rong, et al, Journal of Physical Chemistry Letters, 2018



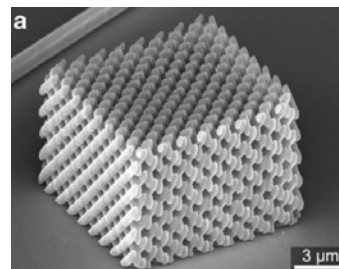
P.J. Lamas-Ardisana, et al, Biosensors and Bioelectronics, 2018

マイクロポーラス材料の  
孔より小さいマイクロパ  
ターン作製難

## 3Dプリンティング



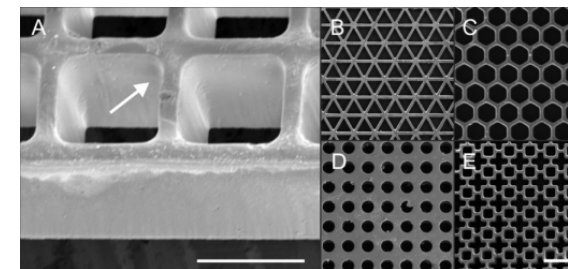
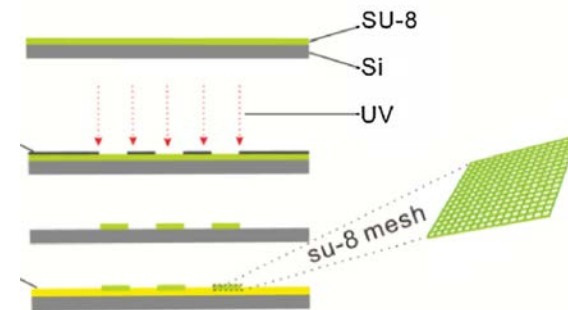
C. Minas, et al, Advanced materials, 2016



M. Vaezi, et al, The International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 2013

高精細化に  
比例して  
作製時間長

## フォトリソグラフィ

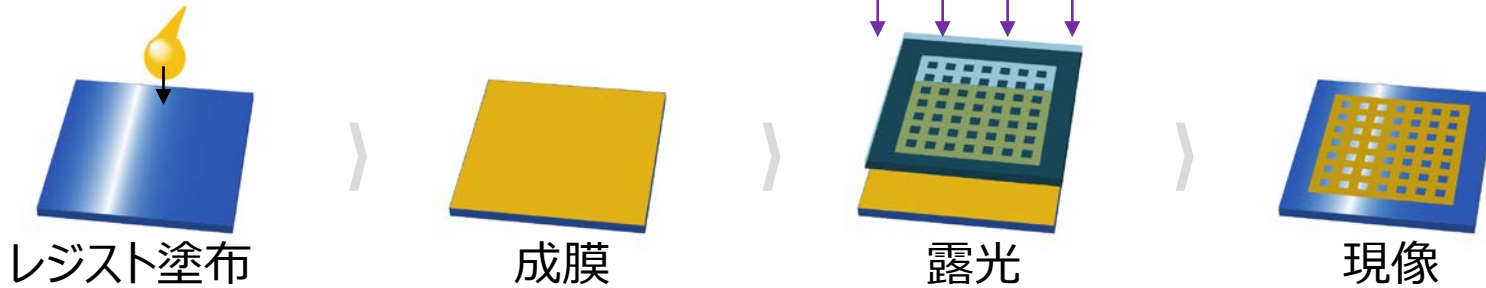


Y. Wang, et al, Sensors and Actuators B: Chemical, 2019

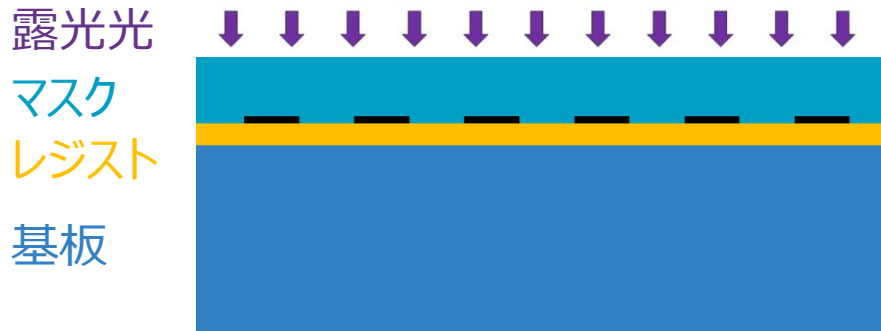
・高精細パターン作製可  
・大面積化が容易  
・作製時間は非面積依存

本技術ではフォトリソグラフィの応用を着想した

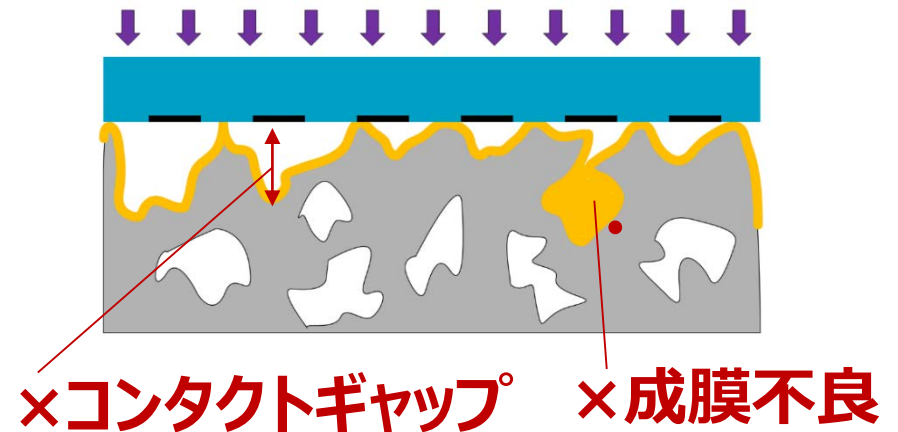
基本的なフォトリソグラフィ：SiやGlass基板など平坦な面が必要になる



## 平坦な基板



## 凹凸のあるマイクロポーラス材

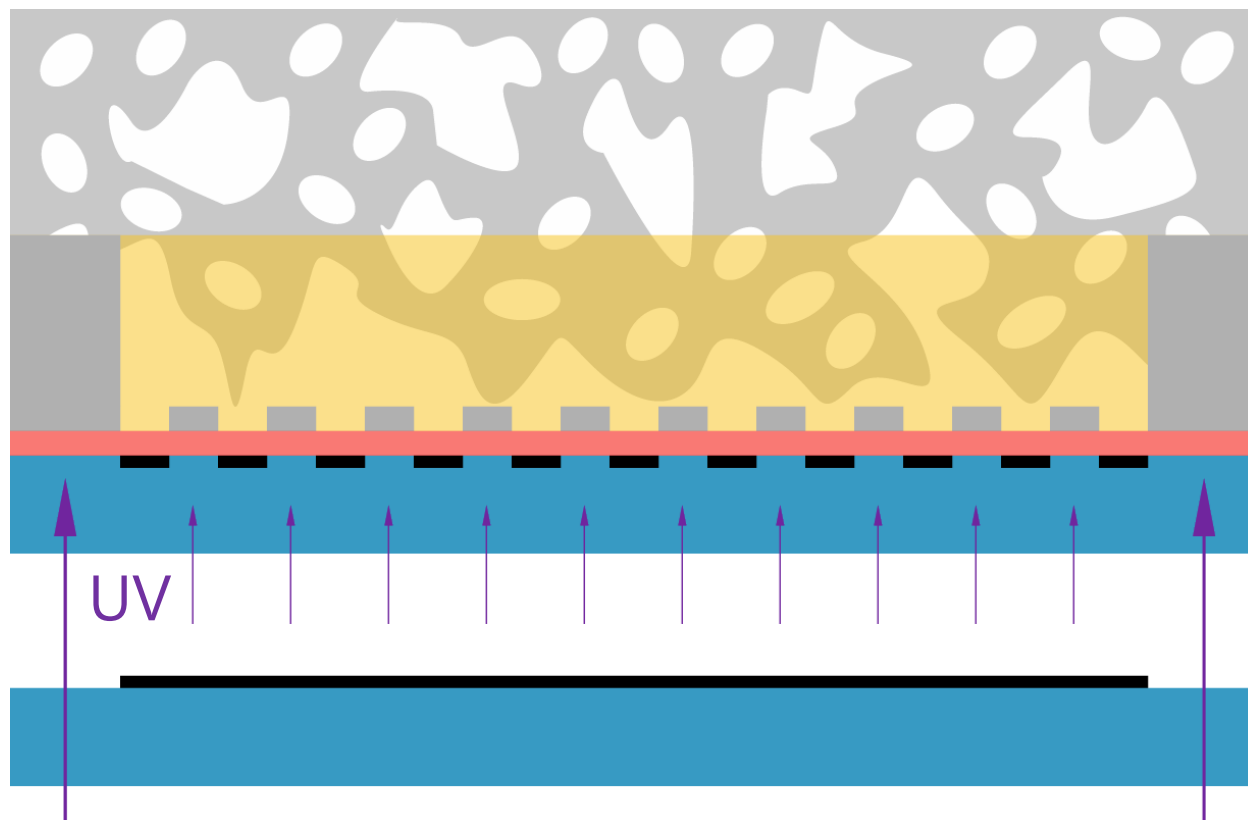


課題：凹凸のマイクロポーラス材上では、高精度のパターン作製不可

既存のフォトリソグラフィの直接利用は困難である

## 提案技術の特徴：

- ・透過基板側からの多段露光
- ・犠牲層エッチングによる回収
- ・部分リフローによるポーラス材への浸透



マイクロポーラス材料

レジスト (未露光/露光)

犠牲層

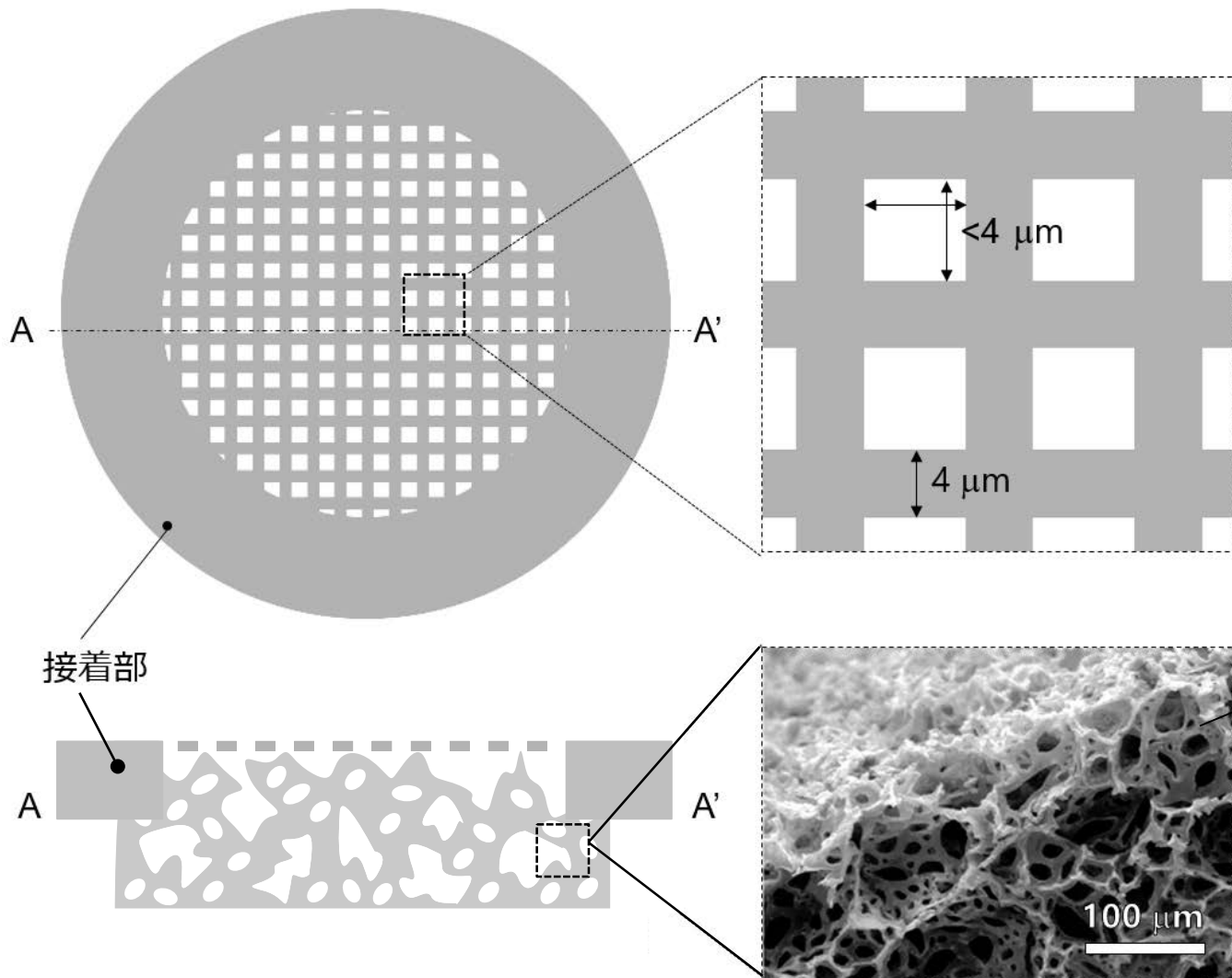
ガラス基板①

マスクパターン付

ガラス基板②

ナノ・マイクロスケールのパターンを高精度かつ高速に作製する

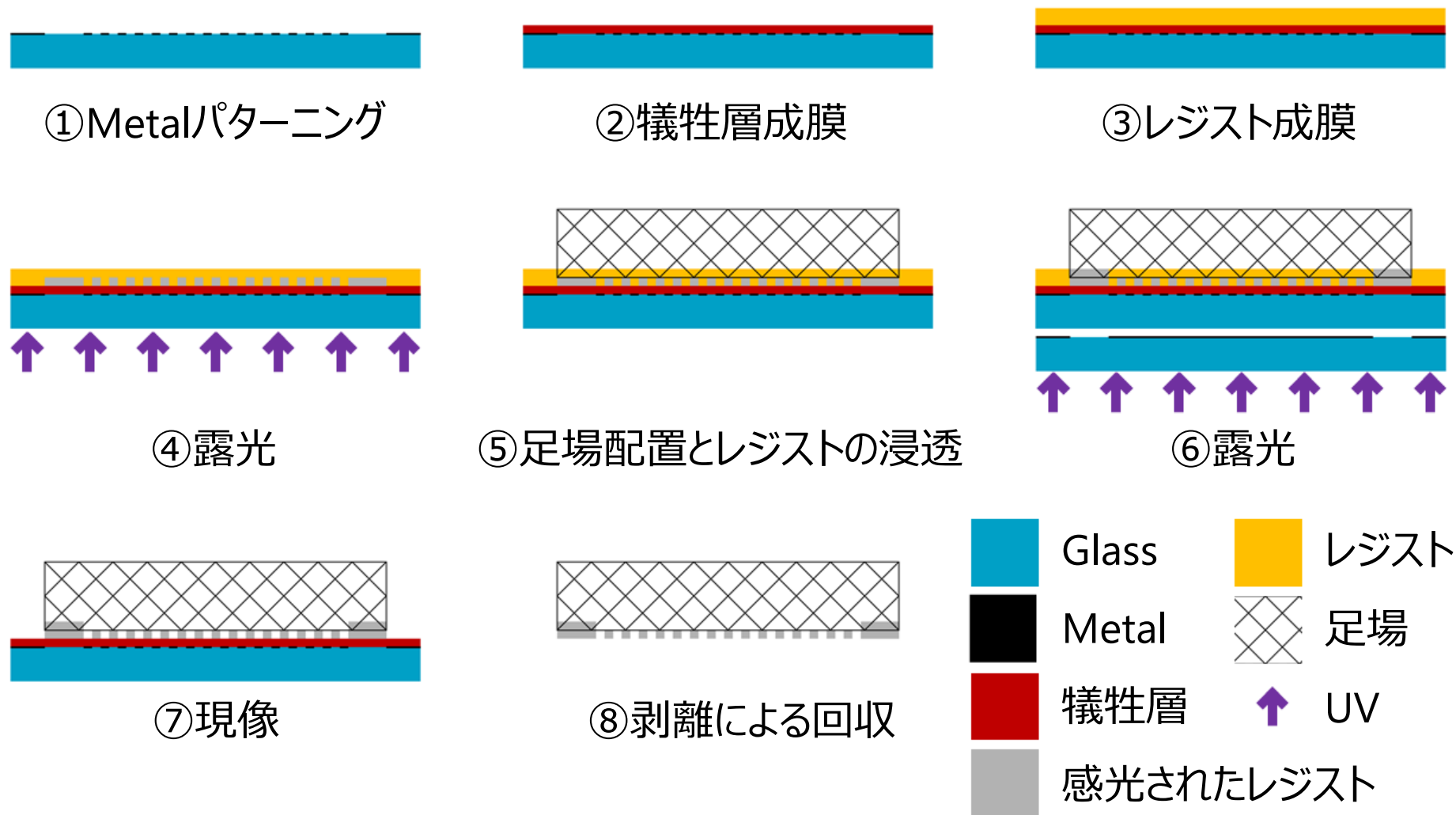
## 3Dポラス材料上に2Dマイクロ構造(5 $\mu\text{m}$ 以下)を積層



ポラス材料  
孔:  $50 \mu\text{m}$ 以上を含む  
空隙率: 90%  
材質: ポリスチレン  
製法: 相分離法

細胞培養用の足場表面に、細胞より小さい穴を持つ格子パターンを積層する

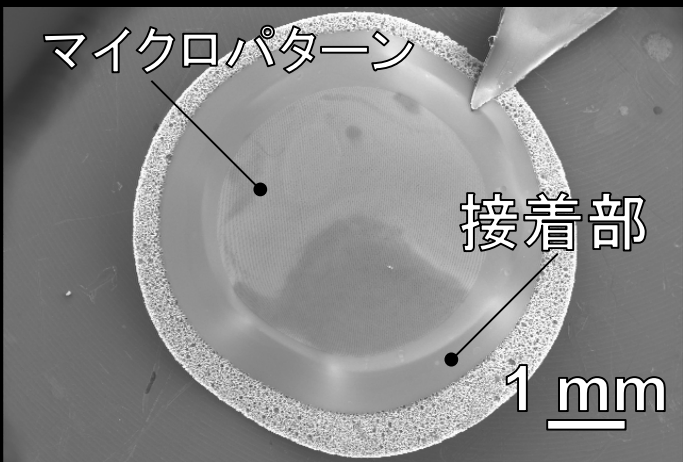
## 多段裏面露光 + 未露光部リフロー + 犠牲層リリースによる構造作製



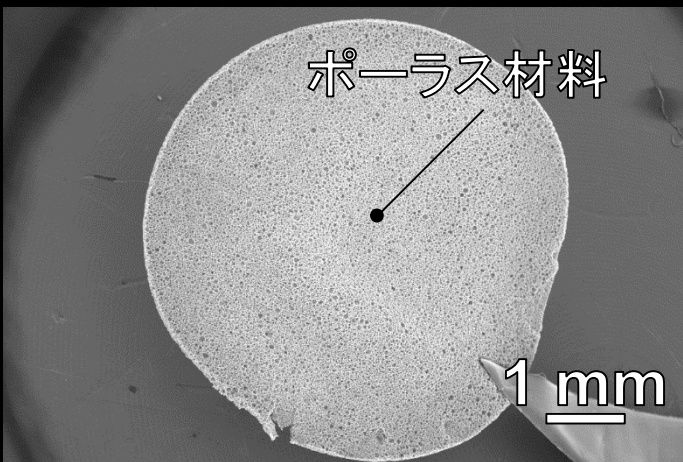
単層のレジストを利用し、マイクロパターンを積層できる



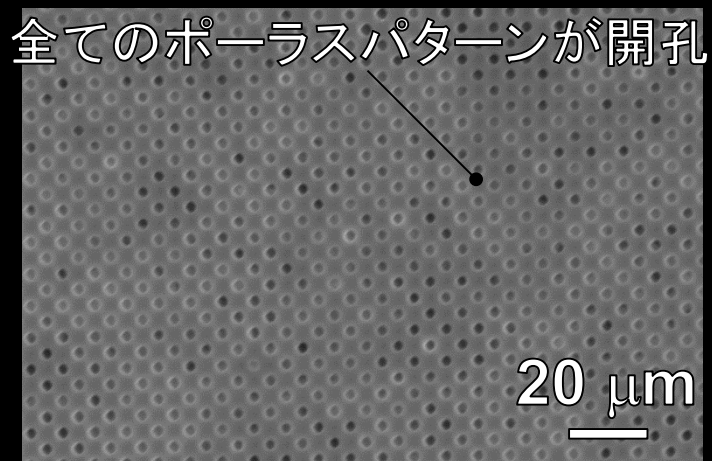
積層面



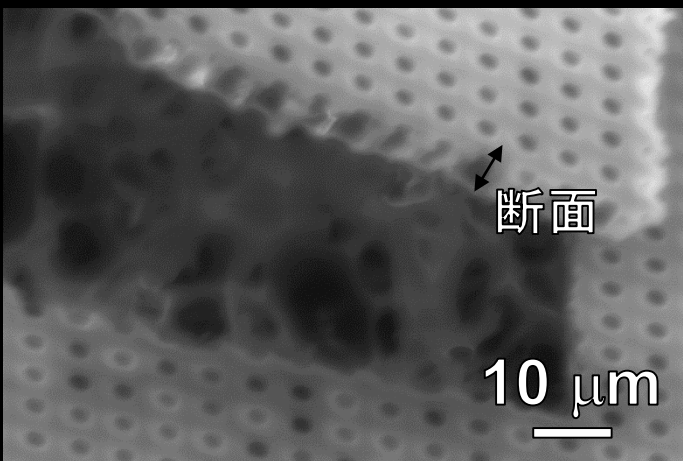
裏面



積層面拡大

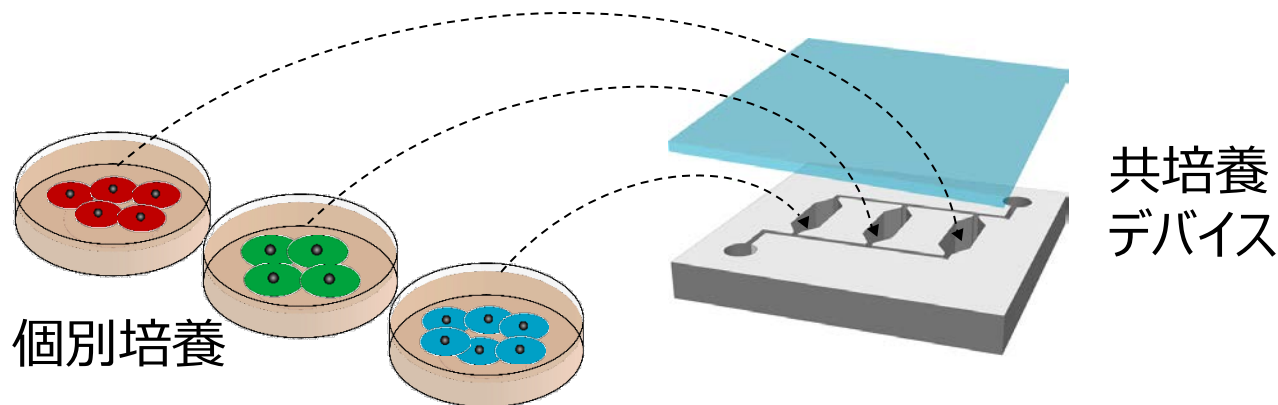


断面

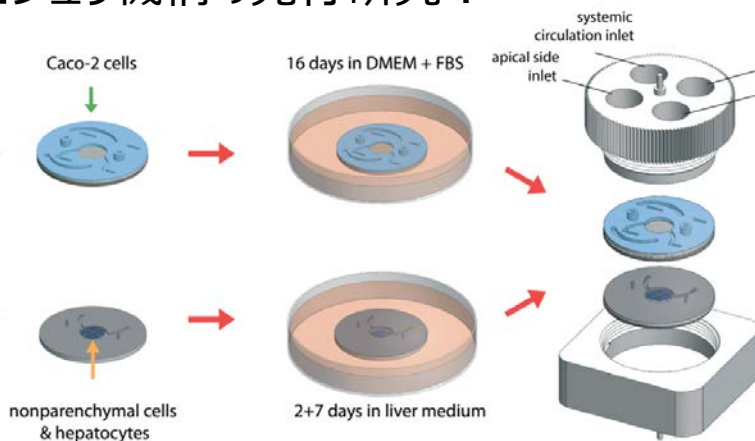


パターン径3.49 μm, 開孔率100 %, 膜厚8.29 μmの構造を積層できた

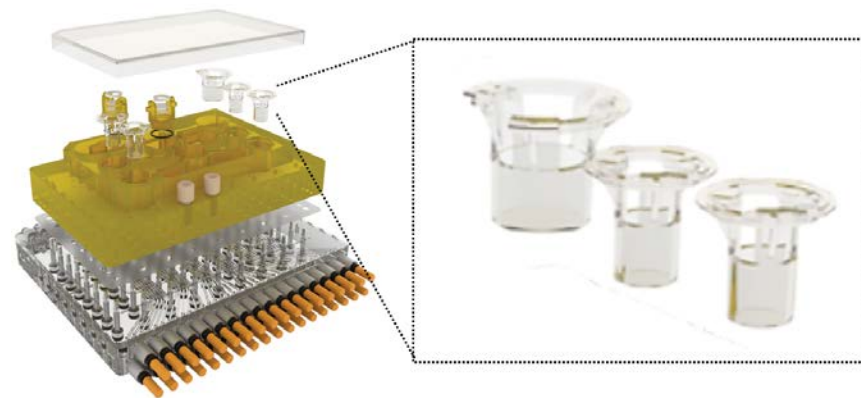
## 個別に培養した細胞組織を共通の空間で共培養



### モジュラ機構の先行研究：



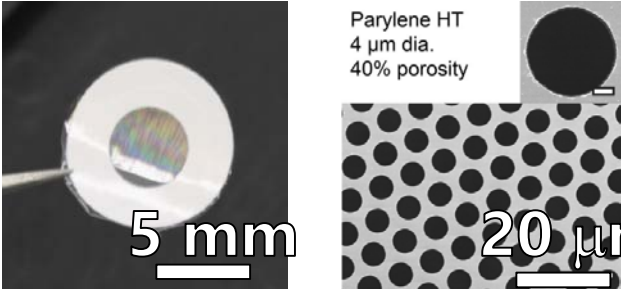
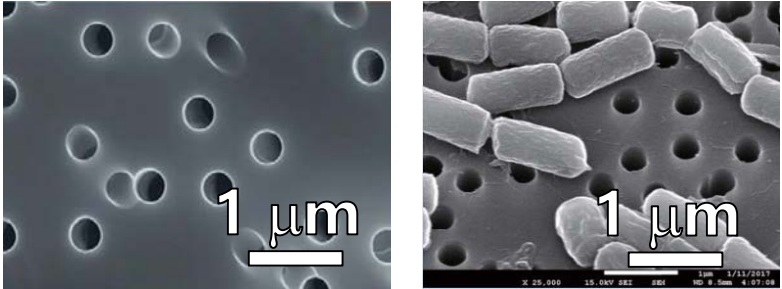
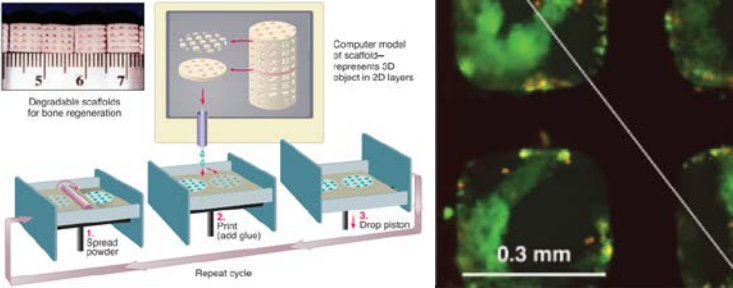
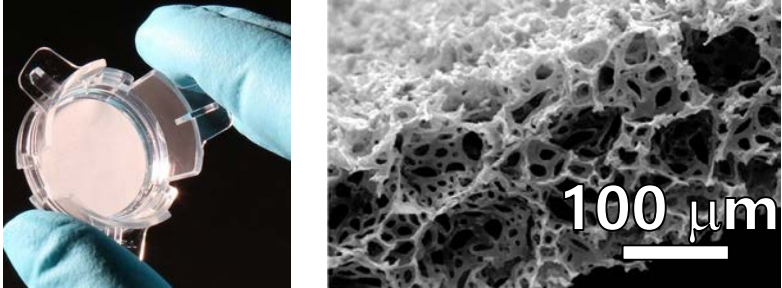
M. Esch et al, Lab Chip, 2016



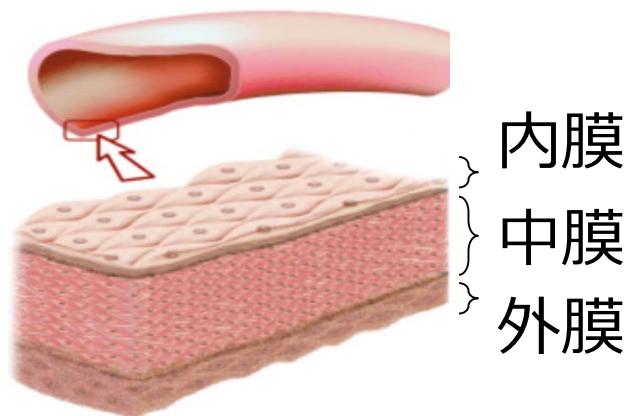
C. Edington et al, Sci REPORTS, 2017

生体内の細胞組織構造を再構成するには、足場構造が重要

## 細胞培養用の足場：培養される細胞組織の形状とその機能に影響

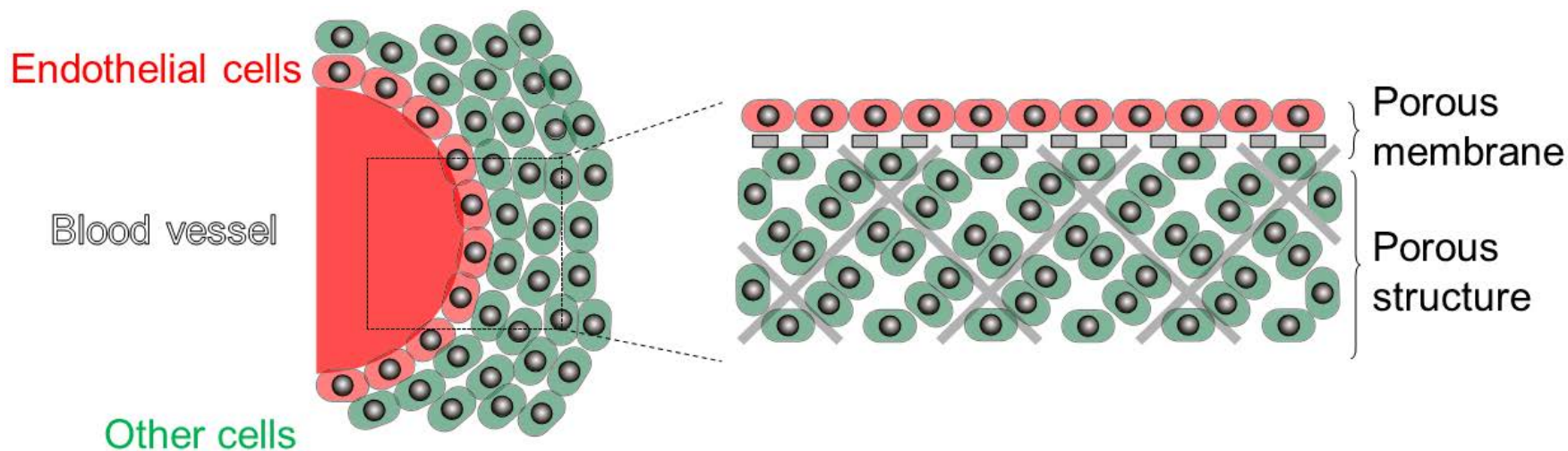
組織形状	学術	産業
2D	 <p>Parylene HT 4 μm dia. 40% porosity</p> <p>M.Y. Kim, Membrane Science, 2014 製造方法: フォトリソグラフィ・エッチング</p>	 <p>ARBROWN CO.,LTD 製造方法: トラックエッチング法</p>
3D	 <p>Degradable scaffolds for bone regeneration</p> <p>Computer model of scaffolds—represents 3D object in 2D layers</p> <p>L.G. Griffith, Science, 2002 製造方法: 3Dプリンティング</p>	 <p>ReproCELL Inc. 製造方法: 相分離法</p>

2次元と3次元の両構造を有する足場構造の作製は難しい



生体組織：

- ・細胞は多層に配置
- ・2次元と3次元の構造が混在



生体内の組織を模した2次元と3次元の細胞組織を一つの足場構造上に作製する

播種細胞：  
血管内皮細胞(HUVEC)  
(赤色染色)

子宮癌細胞 (HeLa)  
(緑色染色)

プロトコール：

1. HeLa播種
2. 20日培養
3. HUVEC播種
4. 5日培養

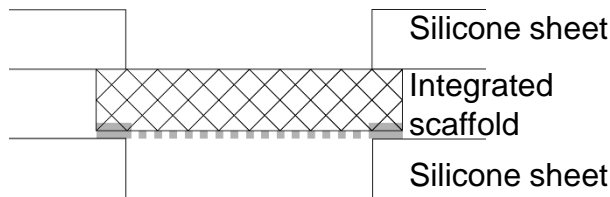
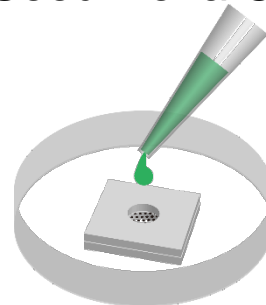
培養条件：

培地：DMEM+FBS+penicillin

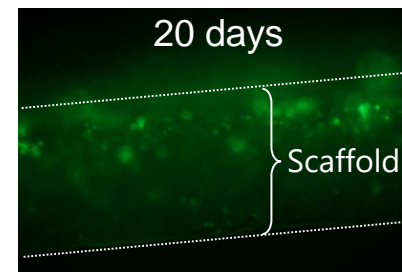
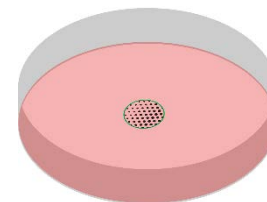
コーティング：フィブロネクチン

その他条件：37℃、CO<sub>2</sub> 5%

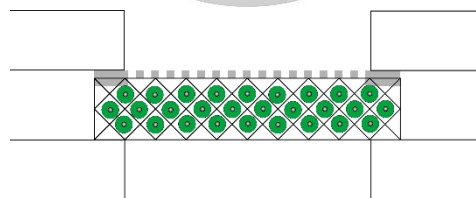
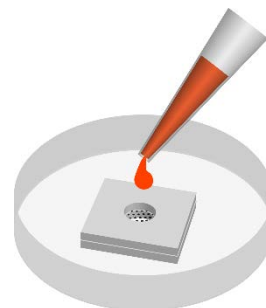
## 1. Seed HeLa Cells



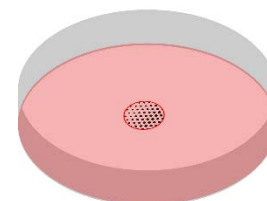
## 2. Culture HeLa Cells



## 3. Seed HUVEC Cells



## 4. Co-culture (5 days)



播種細胞：  
血管内皮細胞(HUVEC)  
(赤色染色)

子宮癌細胞 (HeLa)  
(緑色染色)

プロトコール：

1. HeLa播種
2. 20 日培養
3. HUVEC播種
4. 5 日培養

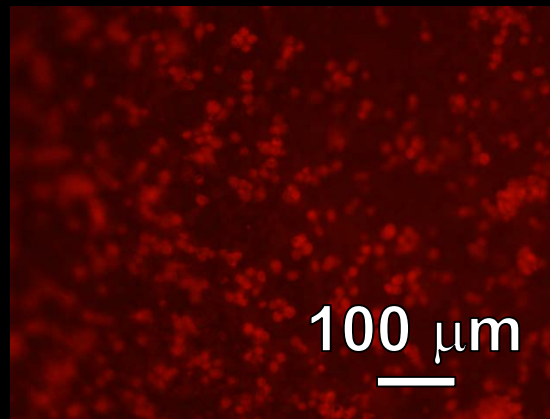
培養条件：

培地: DMEM+FBS+penicillin

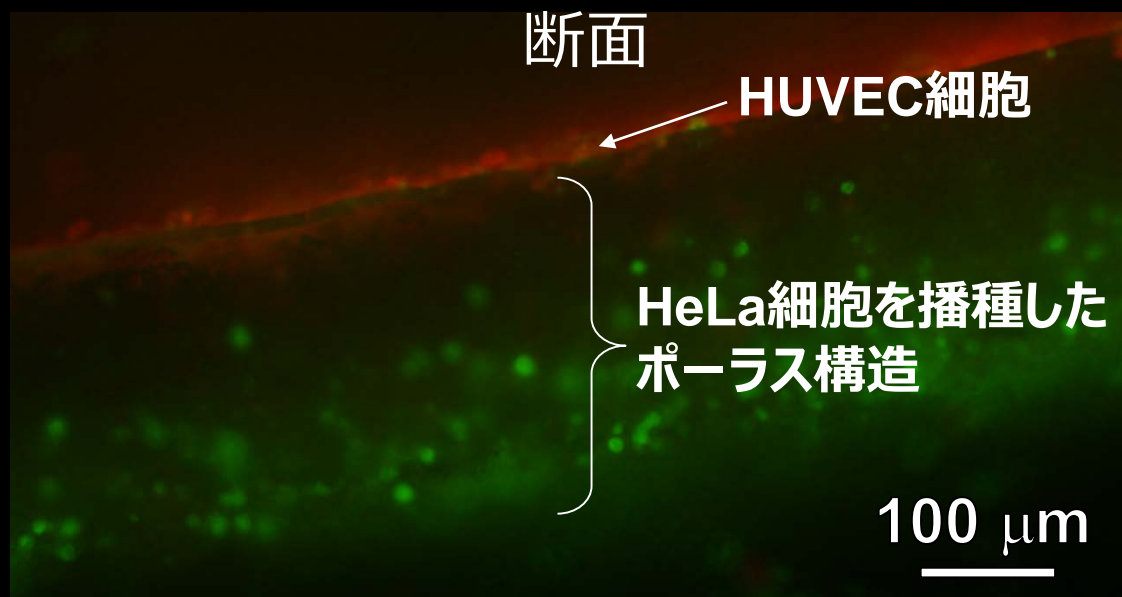
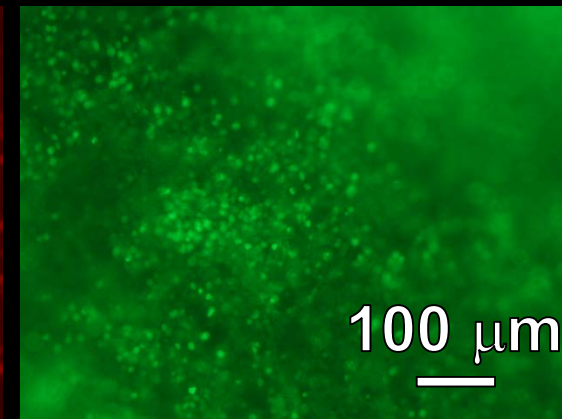
コーティング: フィブロネクチン

その他条件: 37 °C、CO<sub>2</sub> 5 %

積層面



非積層面

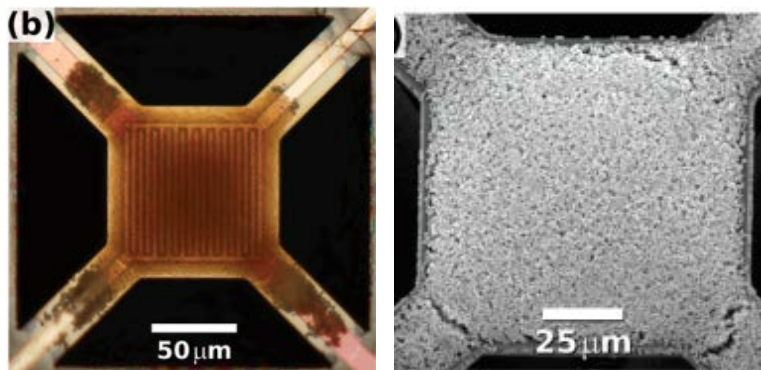


作製構造の両面に2種類の細胞を2D/3D培養ができる

## 2D/3D微細積層構造の作製方法と実施例（バイオ応用）

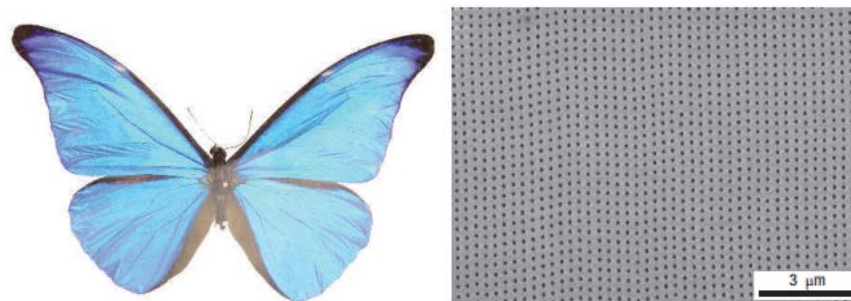
	前半：作製方法	後半（実施例）：3次元共培養基材
今まで できなかった こと	<ul style="list-style-type: none"><li>非平坦な面上へのマイクロパターンの積層</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>化学反応を利用するため、構造制御性に大きな制限</li><li>2D、または、3Dのいずれかのみのもので単独構造</li></ul>
この技術で できること	<ul style="list-style-type: none"><li>凹凸の無い平面上で作製したマイクロパターンを、非平坦な面へ積層</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>より生体に近い組織構造を生成</li><li>既存の3次元培養用ポラス基材に微細パターンを含む膜構造を積層</li></ul>

## ポーラス材を用いた素子



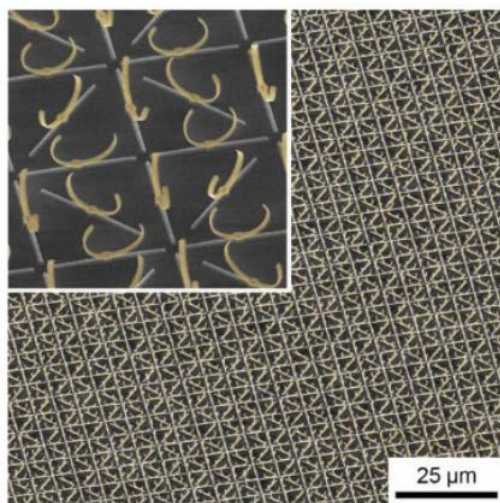
C.J. Martinez, et al, Langmuir, 2005

## 生体模倣システム

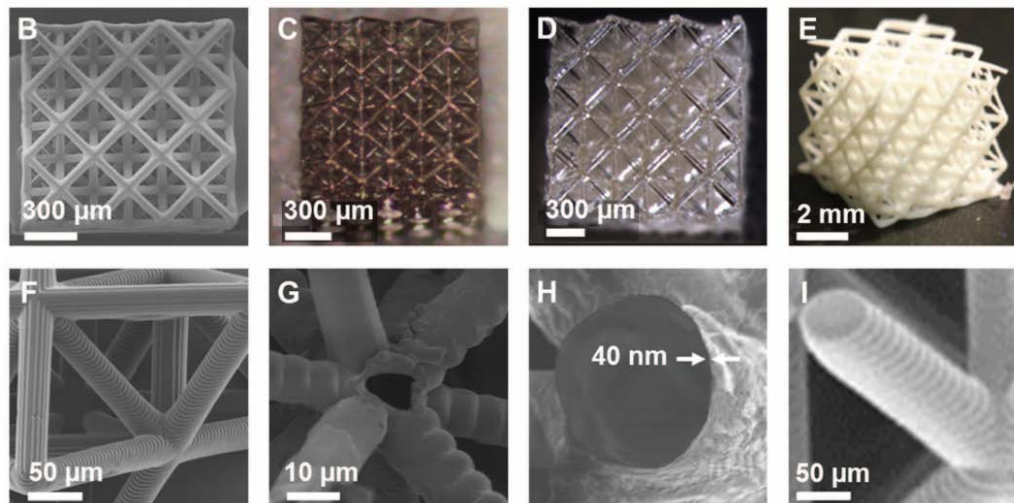


A.R. Parker, et al, Nature nanotechnology, 2007

## メタマテリアル



C. Chen, et al, Advanced optical materials, 2015



X. Zheng, et al, Low-density materials, 2014

etc...





### 課題①：3次元細胞共培養基材の作製と応用 基材の実用化研究や利用例の構築

- 3次元培養関連製品（培養基材など）製造メーカーとの共同研究やライセンス
- 細胞培養評価受託企業や3次元細胞培養ユーザーとの共同研究

### 課題②：使用材料の制限 数百 $\mu\text{m}$ 以上の厚膜が成膜可能なレジストが必要

- 材料メーカー（レジスト、樹脂）との新材料に関する共同研究

### 課題③：生産性の向上 既存の半導体加工と異なるプロセスが可能な生産体制

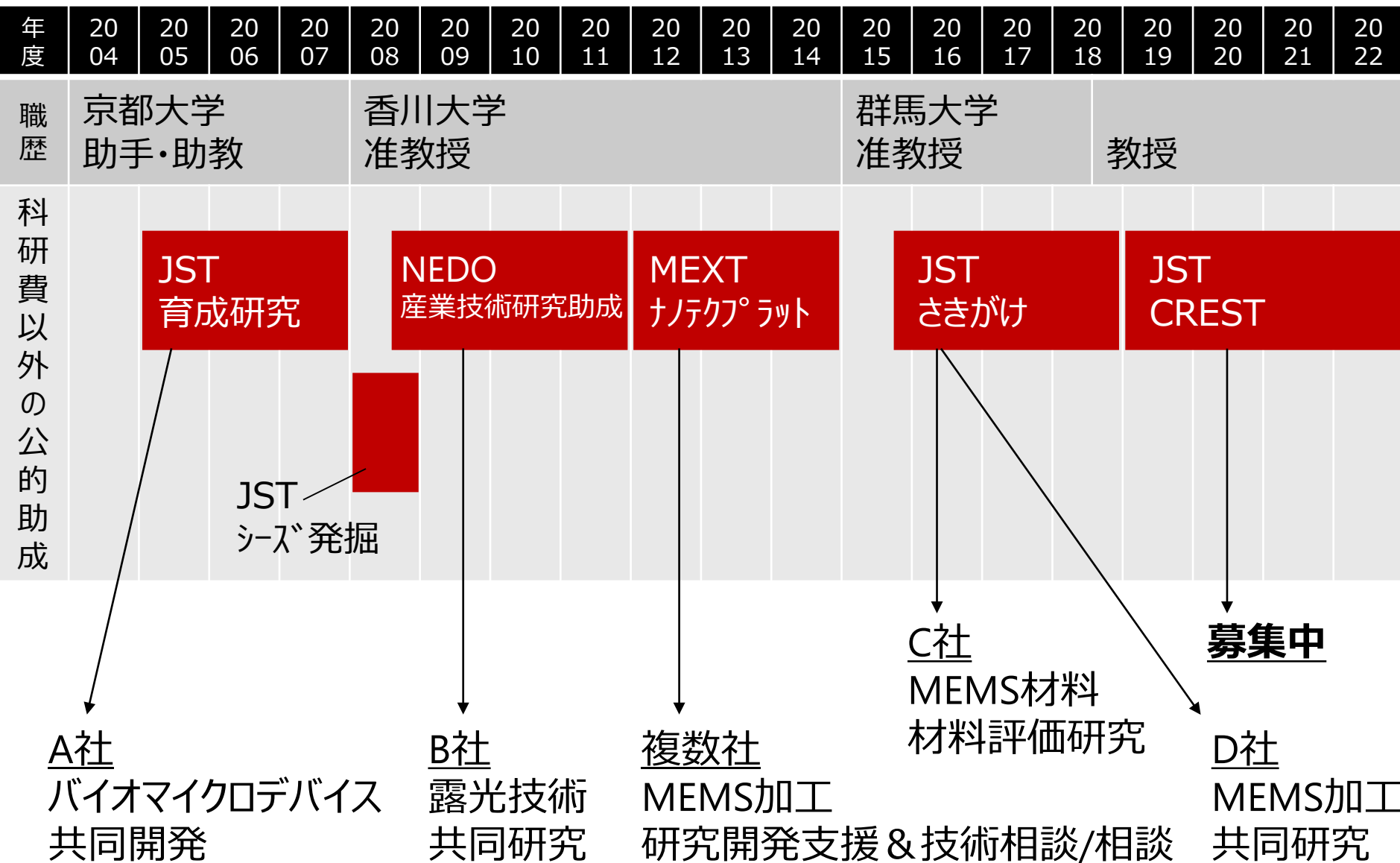
- 装置メーカー（半導体、フィルムなど）との新規加工装置に関する共同研究

### 課題④：応用探索 想定されるその他の用途、あるいは、それ以外の応用探索

- ポーラス材製造メーカー/ユーザーとの共同研究やライセンス

- 【発明の名称】 物体の表面加工方法、積層体、及び積層体の製造方法
- 【出願日】 2019年11月14日
- 【出願番号】 PCT/JP2019/044689
- 【公開日】 2020年5月22日
- 【公開番号】 WO2020/100976
- 【学内発明者】 鈴木孝明、上野秀貴
- 【特許出願人】 国立大学法人群馬大学

# 産学連携の経歴 (公的助成に関係した例のみ)



微細加工、MEMSデバイス開発：共同研究、ライセンス、支援、相談、いずれも経験あり



## 群馬大学 産学連携・知的財産活用センター

TEL 0277-30-1171~1175

FAX 0277-30-1178

e-mail [tlo@ml.gunma-u.ac.jp](mailto:tlo@ml.gunma-u.ac.jp)

下記サイトもご覧下さい

群馬大学 マイクロナノ工学研究室 (SyncMEMS研究室) HP

大学 マイクロマシン

検索

大学 MEMS

検索