

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者：上阪 等

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nonomura Y, Nagasaka K, Hagiwara H, Sekine C, Nanki T, Tamamori-Adachi M, Miyasaka, N and Kohsaka H,	Cyclin-dependent kinase 4/6 directly modulates expression of rheumatoid inflammatory mediators in retinoblastoma protein-dependent and independent pathways	<i>Arthritis Rheum</i>	54(7)	2074-2083	2006
Murakami Y, Kohsaka H, Kitasato H, and Akahoshi T.	Lipopolysaccharide-induced up-regulation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on macrophages is regulated by endogenous Prostaglandin E2	<i>J Immunol</i>	178(2)	1144-1150,	2007

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者：諏訪 昭

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
諏訪 昭	免疫血清学的検査	池田康夫 鈴木則宏	内科研修マニュアル (改訂第2版)	南江堂	東京	2006	522-525
諏訪 昭	混合性結合組織病 (MCTD) ・ 重複症候群 (OL)	池田康夫 鈴木則宏	内科研修マニュアル (改訂第2版)	南江堂	東京	2006	548-549
諏訪 昭	二次性アミロイドーシス	池田康夫 鈴木則宏	内科研修マニュアル (改訂第2版)	南江堂	東京	2006	554
諏訪 昭	成人Still病	池田康夫 鈴木則宏	内科研修マニュアル (改訂第2版)	南江堂	東京	2006	555
諏訪 昭	リウマチ性多発筋痛症	池田康夫 鈴木則宏	内科研修マニュアル (改訂第2版)	南江堂	東京	2006	565

雑誌

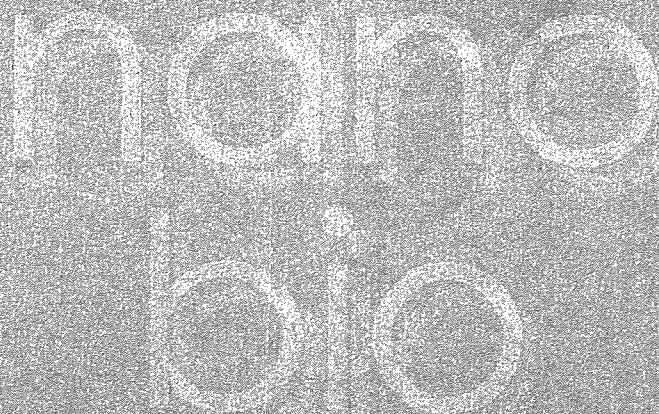
発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
鈴木康夫, 斉藤栄子 若林孝幸, 諏訪 昭	ステロイド骨粗鬆症の海外の予防・ 治療ガイドライン	痛みと臨床	6 (2)	29-36	2006
鈴木康夫, 若林孝幸 小宮喜代里, 斉藤栄子, 諏訪 昭	RAの薬物療法と免疫抑制薬	臨床リウマチ	18 (1)	15-23	2006
鈴木康夫, 諏訪 昭 若林孝幸, 斉藤栄子 小宮喜代里	抗リウマチ薬 (DMARDs)	内科	97 (4)	647-651	2006
鈴木康夫, 諏訪 昭 若林孝幸, 斉藤栄子 小宮喜代里	MTXとその問題	カレントセラピー	24 (5)	46-50	2006
鈴木康夫, 諏訪 昭 若林孝幸, 斉藤栄子 小宮喜代里	内科医のための関節痛, 筋肉痛の診か た: その他の膠原病と関節痛・筋肉痛	診断と治療	94 (7)	79-83	2006
鈴木康夫, 諏訪 昭 若林孝幸	抗リウマチ薬の選び方と使用法のコツ	日本医師会雑誌	135 (5)	1057-1062	2006
鈴木康夫, 斉藤栄子 若林孝幸, 諏訪 昭	抗リウマチ薬, 免疫抑制薬	診断と治療	94 (10)	1929-1937	2006
鈴木康夫, 若林孝幸 斉藤栄子, 諏訪 昭	メトトレキサートの使い方と注意すべ き副作用	治療	89 (2)	277-283	2006

IV.研究成果の刊行物・別刷

ナノバイオ大事典

COMPREHENSIVE NANO BIO HANDBOOK

監修
山根恒夫 松永是 民谷栄一



株式会社 **テクノシステム**

デバイス

マイクロコンタクトプリンティング法
Micro-contact Printing Method

マイクロコンタクトプリンティング(μ CP)法は、1993年、米国ハーバード大学の Whitesides, G. M. のグループによって最初に報告された。ソフトリソグラフィー(soft lithography)の一手法である¹⁾。ソフトリソグラフィーの用語の由来は、柔らかいゴム状プラスチックでマイクロスタンプを作成することにあり、曲面へのプリントも可能となる。 μ CP法の特徴は、そのスタンプを使って、自己集積能を持つ分子をインクに用いて単分子層(SAM: Self Assembled Monolayer)をマイクロパターン状に形成させるものである。このスタンプの使用により、マイクロパターンを安価で簡単にコピーすることができる。

その原理を図1に示す。まず、従来法の光リソグラフィーや電子線リソグラフィーによって作製した微細加工マスターに、室温で、液状のポリジメチルシロキサン(PDMS)プレポリマーを流し込む。そして加熱し、

固化させてPDMSスタンプを得る。次に、このスタンプ表面に分子を吸着させ、基板に密着(コンタクト)することで、パターン化した凸部に対応した分子の膜を基板上に作製する。

例えば、ヘキサデカンチオールをインクとする場合、約2mMのエタノール溶液につけた後、10~20秒間コンタクトさせる。長時間(30秒間以上)コンタクト基板とさせると、ヘキサデカンチオールが拡散して明瞭なパターンができなくなる。最近では本方法により、10nmの分解能までのパターンが報告されている。

PDMSは無機のシロキサン骨格に有機のメチル基を側鎖につけたもので、スタンプの素材にはこれ以外にも、ポリウレタン、ポリイミドなども用いることができる。また、これまでは、主にチオール基を末端に持つ有機分子を金基板上にパターン化することが多かったが、銀や銅の上にも同様にパターン化された。また、アルキルシロキサンの水酸化表面へのパターン化や、コロイド粒子や高分子をインクとして用いて、疎水性相互作用でマイクロパターン状に吸着させることも報告されている。

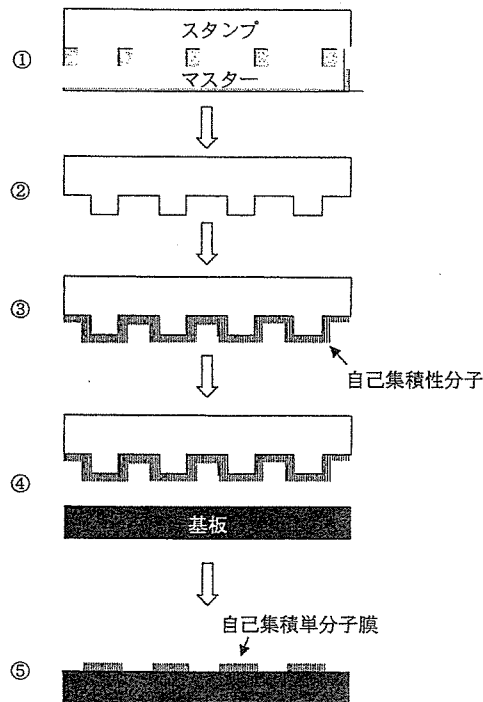


図1 マイクロコンタクトプリンティング(μ CP)の原理

- ①マスターにポリジメチルシロキサン(PDMS)プレポリマーを流し込んだ後、固化させる。
- ②固化させたPDMSをマスターから剥がす。 ③PDMS表面上に自己集積性分子を吸着させる。
- ④PDMSを基板に接触させる。
- ⑤PDMS凸部の分子が転写され、自己集積単分子膜(SAM)のマイクロパターンが形成される。

(伊藤 嘉浩)

再生医療の基礎シリーズ
—生医学と工学の接点—

5

再生医療のための バイオマテリアル

田畑泰彦 編著

*Regenerative
Medicine*

創立80周年記念出版

(創立1927年)

コロナ社

マイクロパターン技術

13.1 はじめに

再生医工学では、生体組織の再生が重要なテーマとなる。生体組織は、細胞がマイクロメートルスケールで秩序立った構造を形成して成り立っている。マイクロパターン化は、生体と材料の相互作用を微細なレベルで研究するうえで、そして生体組織を微細なレベルから再生するうえで重要な要素技術として研究されてきた¹⁾²⁾。そして最近は、ゲノミクス、プロテオミクス、セロミクス解析のため、あるいはドラッグスクリーニングのためのマイクロアレイシステムとしての研究も盛んに行われるようになってきた³⁾。

本章では、まずマイクロパターン素材と技術について述べたあと、生体分子を用いたマイクロパターン化、マイクロアレイの応用、さらにこれらマイクロパターン材料の医工学分野での応用について述べる。

13.2 マイクロパターン素材

これまでにマイクロパターン化処理が施されてきた素材にはシリコン、ガラス、高分子材料（プラスチック）がある⁴⁾。

シリコンは集積回路の加工で歴史があり、微細加工で最もよく用いられる。典型的な単結晶ウエハは直径 75~200 mm で厚みが 0.25~1.0 mm である。その優れた電氣的性質に加えて機械的特性も優れていることから微細加工に適している。初期の研究では微細加工シリコンと細胞との相互作用を調べたものがあつたが、現在では、透明でないことやコストもかかることから基材としては汎用されず、マスター/モールドとして使用される場合が多い。

ガラスはシリコンほど微細加工技術の集積はないが、透明であることからさまざまに用いられている。組成から、融合シリカとボロシリケートに分類され、前者は純粋の無定形二酸化シリコン (SiO_2) で 1580°C まで耐え、自家蛍光も非常に低い特徴がある。後者の例としてはパイレックス[®]が知られ、融合シリカより非常に安価で、シリコンよりも安価である。

高分子材料は最も安価で大量生産に適している。しかし、マスター/モールドとしてシリコンやガラスを必要とする。また、精密な微細加工は困難な場合が多く、自家蛍光がしばしば問題となる場合がある。

このように、それぞれの素材には特徴がある。シリコンはおもに凹凸マイクロパターンの形成に、ガラスや高分子材料は凹凸パターンだけでなく、マイクロパターン化表面修飾あるいは生体分子固定化に用いられてきた。ガラスはシランカップリング処理などにより表面が有機化され、高分子材料と同じように用いられる場合も多い。

13.3 マイクロパターン化法

マイクロパターン化は図 13.1 のように凹凸や親水・疎水のような 2 元系と、多種類の生体分子を微小領域に固定化した多元系に分けられる。材料の微細加工としては古くから 2 元系パターン化が行われてきたが、1990 年代に DNA チップを代表とするマイクロアレイバイオチップが応用されるようになると、さまざまな多元系パターン化が行われ、いまやバイオテクノロジー分野では欠くことのできない技術になってきた。

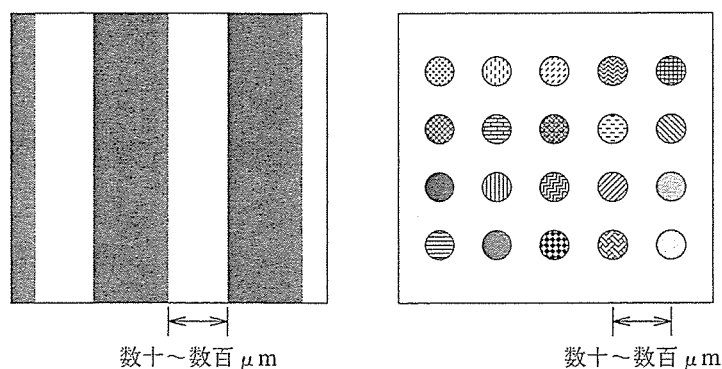


図 13.1 2 元系 (左) と多元系 (右) マイクロパターン化

13.3.1 2 元系マイクロパターン化

2 元系のマイクロパターン化のために、これまでに多くの方法が考案されてきた⁹⁾。そして 2 元系は、さらに 2 次元平面をマイクロパターン化する場合と、3 次元あるいは 2.5 次元に幾何学的な凹凸をマイクロパターン化する場合に分類される (図 13.2)。

〔1〕 平面マイクロパターン 平面をマイクロパターン化する基本的な方法を図 13.3 にまとめる。これまでさまざまな方法により、親水・疎水性のマイクロパターン化や生体分子の固定化・非固定化領域のマイクロパターン化が行われてきた。

1) 光リソグラフィ法 最も一般的な方法は、光リソグラフィ法である。これは、光

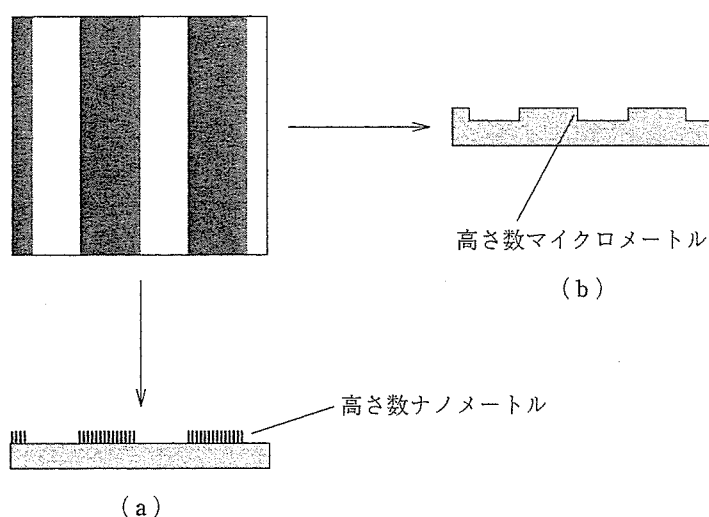


図 13.2 2元系マイクロパターン化。図 (a) は表面性質 (親水・疎水や生体分子固定化・非固定化) のマイクロパターン化。図 (b) は幾何学的マイクロパターン化

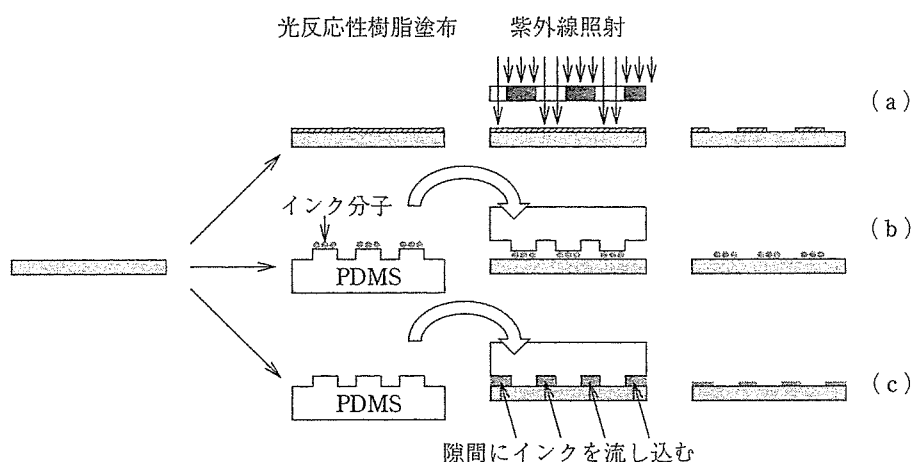


図 13.3 平面上の2元系マイクロパターン化の方法。図 (a) は光リソグラフィ。図 (b) はソフトリソグラフィの一つ、マイクロコンタクトプリンティング法。図 (c) はソフトリソグラフィの一つ、マイクロ流路を用いる方法。

反応性の高分子樹脂 (フォトレジスト) を用いる。図 13.3 (a) で示すように、光反応性高分子をキャストしたのち、乾燥し、UV 光をマスクを介して照射することにより行われる。マスクには UV 光を通す透明ガラスにマイクロパターン状にクロムを蒸着したものがよく使用される。透明部分だけを UV 光が透過し、光反応性高分子が反応して架橋が起こり、マイクロパターンが形成されることになる。光マスクにはマイクロメートルレベルからサブマイクロメートルレベルのパターンができる。

2) ソフトリソグラフィ法 ハーバード大学の Whitesides らのグループが中心に開発してきているもの^{6),7)}で、微細加工した透明で弾性体のポリジメチルシロキサン (PDMS)

を用いることから、こう名づけられた。その一つは、マイクロコンタクトプリンティング法で、これは図 13.3 (b) に示すように、微細加工したモールドに液体の PDMS を流し込み、架橋させて固体の PDMS スタンプを作成する。できあがったスタンプの凸部分に自己集積性の分子をインクとして塗り、基材に押し付け転写を行う。柔らかいスタンプを用いているため曲面への転写も可能で、何回も押すだけで作成できる。一度スタンプを作成すれば、安価になるなどの利点がある。現在では、数十ナノメートルレベルのパターンの形成が可能になり、転写する分子も自己集積性の低分子化合物から、吸着性の高分子化合物まで応用範囲が広がってきている。

そのほかの方法としてマイクロ流路を用いた方法なども使われる (図 13.3 (c))。この場合も PDMS スタンプを用いるが、スタンプの凸部分でなく、スタンプ凹部分と基材の隙間にインクを流して転写を行う。

3) 傾斜パターン化 さらに、図 13.4 に示すような傾斜パターン化 (グレイ) もさまざまな方法で作成されるようになってきている⁸⁾。グラデーショントーンパターンの光マスク、マイクロ流路を使った傾斜化、処理時間の制御によるアナログ的な傾斜化などが行われている。また、マイクロパターンの粗密によって傾斜を作成するデジタル的な傾斜パターンも作成されている。これら傾斜パターンは細胞の運動性を検討したり、固定化分子の表面濃度依存性を検討する際に有用となる。

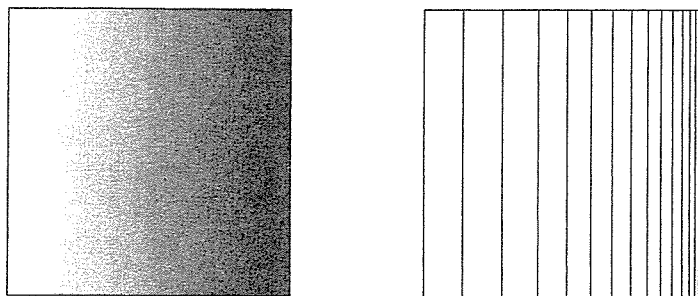


図 13.4 傾斜表面の作成。アナログ的傾斜 (左) とデジタル的傾斜 (右)

〔2〕 立体的マイクロパターン 立体的、3 次元的マイクロパターン化、特にシリコン加工は、マイクロマシニングとも呼ばれ、エッチングと蒸着で表面に立体的な凹凸パターンを形成する。最も一般的な方法は図 13.5 に示すような方法である。フォトレジストを表面に均一に塗布し、マイクロパターンを投影露光する。フォトレジストにはネガ型とポジ型があり、前者は感光部が難溶性になり、後者は可溶性になる。したがって、現像するとネガ型では露光した部分が、ポジ型では露光しない部分が基板に残される。残されたレジストをマスクとして非被覆領域をエッチング、イオン注入、あるいは金属蒸着して、最後にレジス

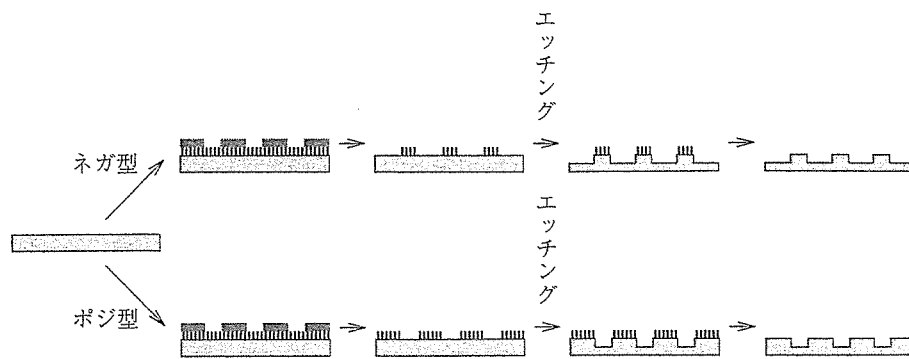


図 13.5 光リソグラフィの方法。ネガ型では光硬化レジストを使用し、ポジ型では光分解型レジストを用いる。

トを除去することによって最終的に凹凸パターンを作成できる。光源には、紫外線、エキシマレーザー、電子線、イオンビーム、X線（シンクロトロン放射光）などが用いられる。

そのほかに、マイクロ切削などの機械加工、電解・放電加工、電子ビーム加工、レーザー加工、イオンビーム加工のようなマイクロ電気加工、イオンプレーティング、気相成長法（CVD）、最近ではレーザー加工、RIE（reactive ion etching）、FIB（集束イオンビーム加工）、FAB（fast atom beam）などの微細加工技術が開発されてきている⁹⁾。光マスクを用いないレーザー加工や電子線加工は、時間はかかるものの、さまざまなパターンが自由に描ける特徴がある（図 13.6）。

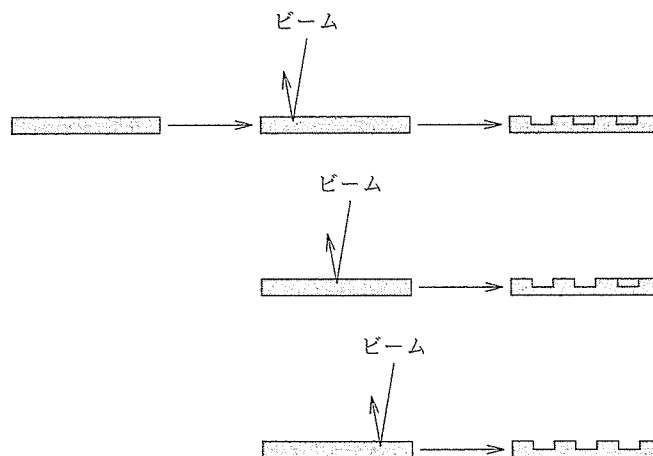


図 13.6 光マスクを用いずに集束ビームを用いて立体的なマイクロパターン化を行う

高分子材料の加工では、図 13.7 に示すような射出成型法、プレス法、ホットエンボス法などが知られている。比較的古くからの成型法であるが、微細加工技術の進歩に伴い、マイクロレベルからナノレベルまでの加工が可能となっており、ナノインプリント法とも呼ばれるようになっている。

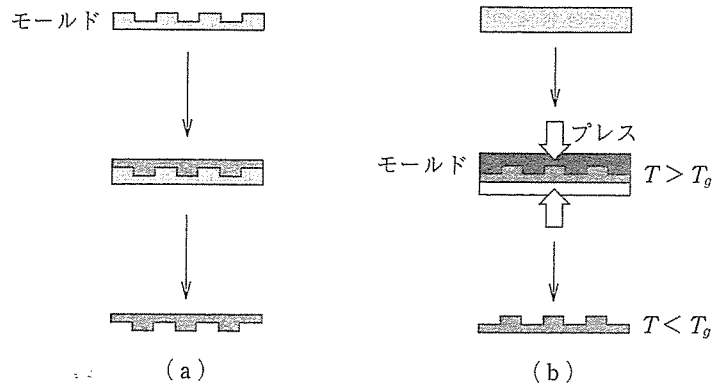


図 13.7 高分子樹脂の微細加工。図 (a) は射出成型，金型（モールド）に樹脂を流し込み成型。図 (b) はナノインプリント法。樹脂をガラス転移点 (T_g) 以上にまで加熱し，モールドを押付けて成型し，ガラス転移点以下にしてから離型。

13.3.2 多元系マイクロパターンニング（マイクロアレイ）

マイクロアレイバイオチップのためのマイクロパターンニング，すなわち多元系マイクロパターンニングは，1990 年に Fodor らが光リソグラフィ法を用いてペプチドのマイクロアレイを作成したことに始まる（図 13.8）³⁾。彼らは，ペプチド固相合成を光保護基を用いて行うことで，マイクロレベルで領域ごとに別々の配列のペプチドを作成することに成功した。のちに，DNA のマイクロアレイに応用され，これが，ジーンチップとしていまや世界中で遺伝子解析に用いられている。

このように，チップ上で生体分子を合成しながら多元系を作成していく（Fodor らが設立したアフィメトリクス社にちなんで，アフィメトリクス型と呼ばれる）ほかに，既存の生

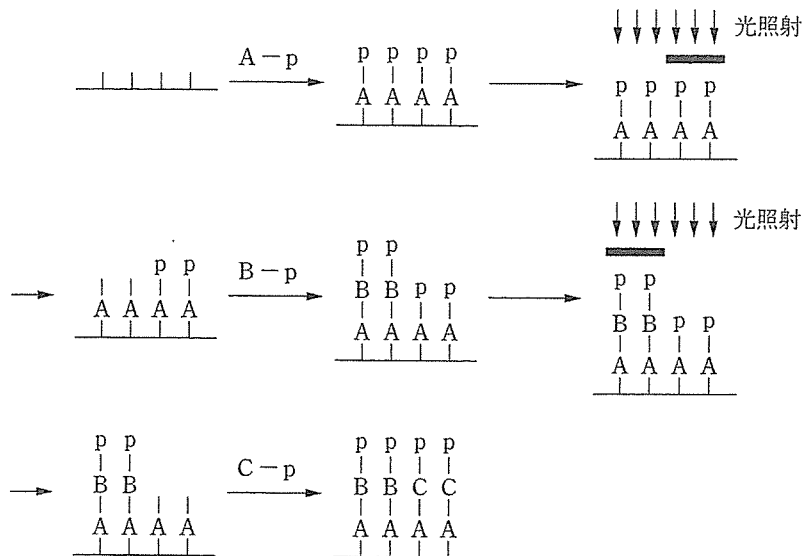


図 13.8 光リソグラフィを用いたマイクロアレイ作成法。図中の A~C は塩基あるいはアミノ酸を，p は光照射によって解離する光保護基を示す。

体分子を直接マイクロアレイすること（1995年にスタンフォード大学のBrownらがDNAマイクロアレイを初めて作成したためスタンフォード型と呼ばれる）も行われるようになり、現在のマイクロアレイバイオチップの二大作成法になっている。マイクロアレイ固定化方法はさまざまな方法が考案されており、通常のマイクロピッチングの延長のものから、ペン法、インクジェット法、キャピラリー法、ペン&リング法、さらにエレクトロスプレー法などが開発され自動化が進められている（図13.9）。さらに同じペンでも、先割れペン、ソリッドペンなどと工夫も凝らされている。

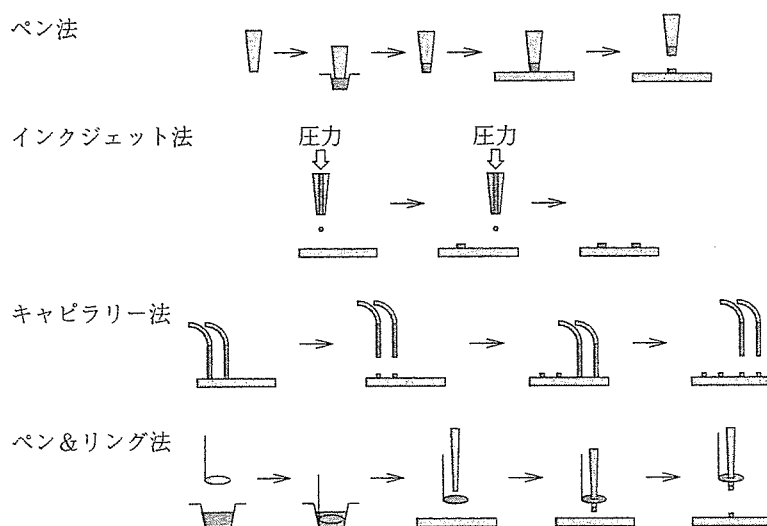


図 13.9 マイクロアレイ作成方法

ナノレベルのアレイとしては、Dip-penを用いたナノリソグラフィ（Dip-pen nanolithography：DPN）が注目を集めている¹⁰⁾。これは、原子間力顕微鏡（atomic force microscope：AFM）のチップを用いて、化学物質をサブミクロン領域へ直接書き込むものである。当初は、マイクロコンタクトプリンティング法と同様、自己集積性のあるアルカンチオールを金基板上にパターンニングしたものであったが、最近ではさまざまな化合物が、さまざまな基材上にパターンニングされ、多元パターンニングすなわちマイクロアレイ（ナノアレイ）にまで発展してきている。

13.4 生体成分のマイクロパターン化とその応用

マイクロパターン化は当初、凹凸や親水・疎水のような物理的あるいは物理化学的パターン化だけであったが、1990年代後半からはさまざまな分子のマイクロパターン化が一般的に行われるようになってきた⁹⁾。特にマイクロアレイチップは、いまや生命科学研究になくしてはならない存在になってきている。

13.4.1 核酸固定化

図 13.10 に、一般に用いられる生体分子の固定化の方法を示す。スタンフォード型は、当初は正電荷をもつ基板表面に DNA の負電荷を使って DNA を静電的に固定化するだけであったが、DNA 末端に官能基を導入して、「立った」状態を保って共有結合で固定化できるようになった。これにより、DNA どうしのハイブリダイゼーション効率が高まり、分析の正確性が向上した。

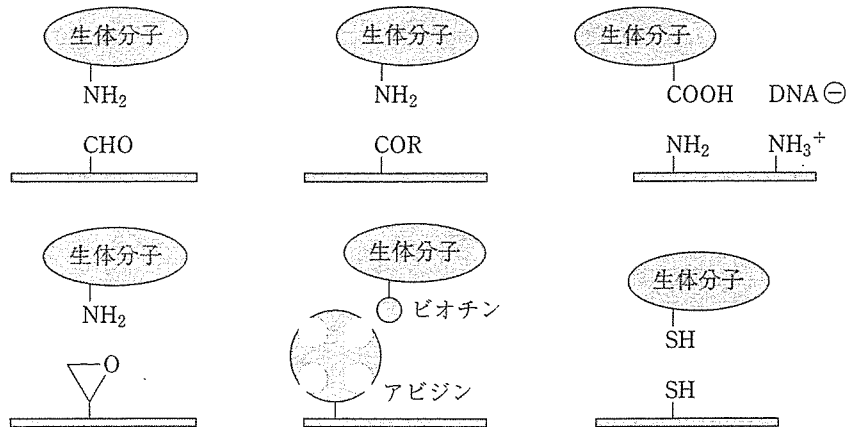


図 13.10 生体分子の化学的固定化法の例

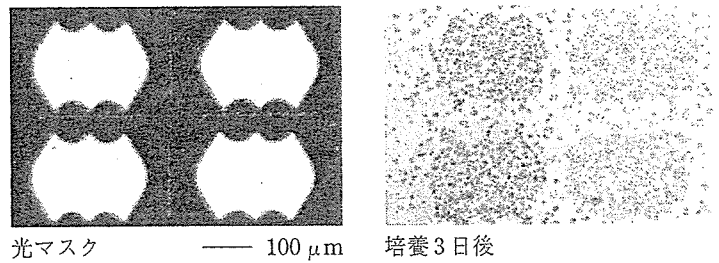
DNA マイクロアレイでは、アレイされている DNA のサンプル中の DNA が、調べたいサンプルから作成した溶液中の DNA とハイブリッドしたかどうかを調べて、どのような遺伝子がサンプル中で発現されているかと調べる。最も一般的な例は、サンプルとなる核酸を蛍光ラベル化し、チップ上の核酸とハイブリッドしたかどうかをレーザースキャンで検出する方法である。チップ上のあらかじめ配列のわかっている、どの核酸に結合したかを調べることによりサンプルにどのような DNA が発現されているか調べることができる。このほかにも微細加工した電極に DNA を固定化して、二重らせん構造形成に伴う電気信号の変化を検出する方法も考案されている。少数のある程度決まった種類の DNA を固定化して検出を行う場合には、電気化学的分析が有効と考えられている。また、非標識で DNA 検出が効率よく行うことができれば、利便性も高い。

これまでは、DNA マイクロアレイはゲノミクスのような学術研究に用いられるだけであったが、2004 年に初めてヨーロッパで診断用チップが認可を受け、日本でも臨床応用へ向けた取組みが積極的に行われている。

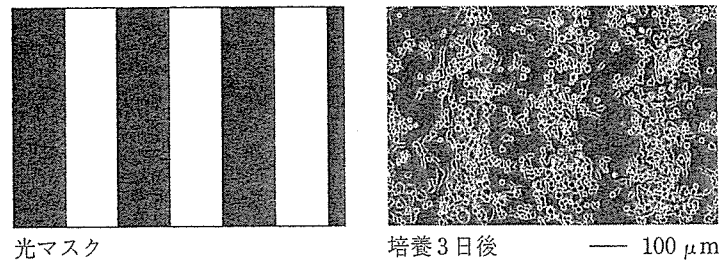
また、核酸固定化は、ハイブリダイズによる相補鎖検出用ばかりでなく、抗体のように分子認識能をもつ核酸アプタマーにも応用でき、開発が進められている。これは、捕捉するタンパク質と核酸を別々に染色することができ、新しいタイプの抗体マイクロアレイとして注目されている。

13.4.2 タンパク質固定化

タンパク質のマイクロパターン化の先駆的な研究は、光リソグラフィを用いて行われた¹¹⁾。細胞接着性のゼラチンに直接光反応性基を導入することで光反応性高分子として、光リソグラフィでのマイクロパターン化が行われ、ゼラチンをマイクロパターン状に固定化した表面で細胞のマイクロパターン接着が可能となった。この方法は、細胞成長因子の固定化にも用いられ、マイクロパターン化基板で細胞の成長や分化を制御できることが示された(図 13.11)。この光リソグラフィ法は、有機分子であればどのような分子の固定化も可能となり、これからのマイクロアレイチップ調製全般に有用な方法となることが期待される。



(a) 光マスクの白部分にインシュリンを固定化しインシュリンレセプター過剰発現細胞を培養すると、インシュリン固定化領域でのみ細胞の増殖を観測できた。



(b) 光マスクの白部分にエリスロポエチンを固定化しエリスロポエチン依存性細胞を培養すると、エリスロポエチン固定化領域でのみ細胞増殖が観察され、そのほかの領域の細胞はアポトーシスを受けた。

図 13.11 固定化成長因子上での細胞培養

そして、タンパク質の基材上への多元固定化は、2000 年から報告されるようになってきた。固定化されたタンパク質と溶液中のタンパク質の相互作用を調べることで、生体内での複雑なタンパク質間相互作用を一つひとつ明らかにするために用いられる。固定化には、最初はアルデヒド基導入基板が行われた。また一方で、固定化されるタンパク質に基材接着性を付与(タンパク質にポリヒスチジンタグをつけるとニッケルへ結合する性質を利用)するタンパク質工学的手法も応用されるようになってきている。

ポストゲノム解析は、プロテオーム解析ということで、タンパク質マイクロアレイ基板を

用いたタンパク質相互作用解析が盛んに研究されている。2003年には、約500種類の抗体をマイクロアレイしたチップ、2004年には約5000種類のタンパク質をマイクロアレイしたチップなどが開発され市販されるようになってきている。まだ、研究用のチップしかないものの、疾病の診断には、患者自身がそのとき発現しているタンパク質を調べることが必要となるため、将来はさまざまなプロテインチップが実現されてくるものと思われる。

13.4.3 そのほかの分子のパターニング

ペプチド、糖、低分子化合物などさまざまな分子の固定化についても数々の方法が開発されている。低分子化合物固定化法としても上述の光固定化法が用いられ、従来は固定化が困難であった分子が固定化可能となり、注目を集めている。

そのほか、温度や光に応答して性質が変化する材料をマイクロパターン化して、細胞の接着や脱着をマイクロパターン状に制御することも報告されている。自由自在にマイクロレベルの細胞シートを作ることができる（後述）。

研究用も含めDNA以外では、まだ実用的なマイクロアレイチップは開発されていないが、図13.12に示すように、さまざまなプローブキャプチャーをマイクロアレイして、分析物（アナライト）との相互作用を調べる研究がこれまでに行われている。

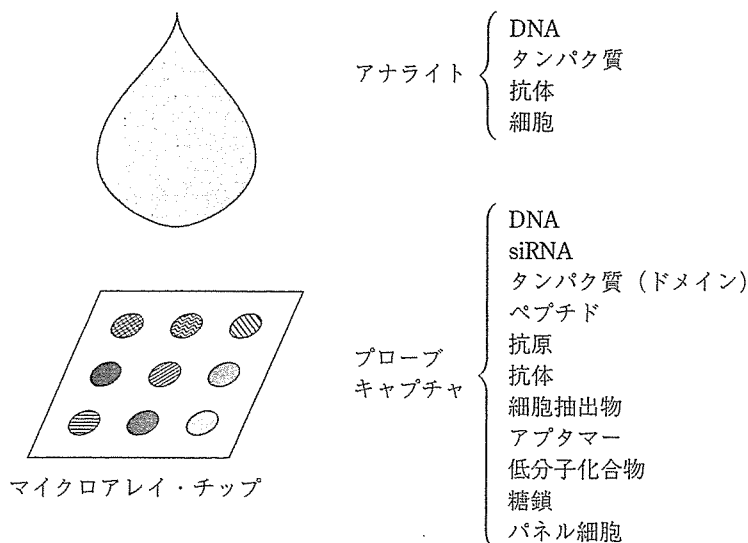


図13.12 マイクロアレイによる分析例

図13.13に、マイクロアレイチップの歴史を示す。コンピュータチップの集積度の上昇は、「ムーアの法則」と呼ばれるが、マイクロアレイバイオチップも、それに劣らない集積度の向上がなされている。今後さまざまなマイクロアレイバイオチップが上市され、ハイスループットスクリーニング（HTS）が展開されてくるものと期待される。

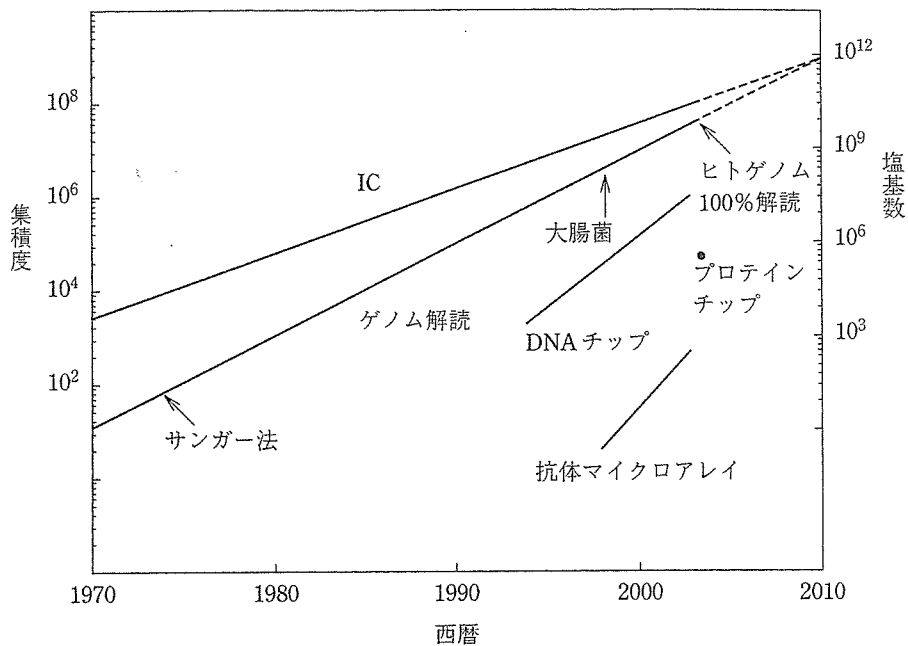


図 13.13 マイクロアレイの集積度

13.4.4 細胞マイクロパターン

(1) マイクロパターン上での細胞

さまざまにマイクロパターン化された表面での細胞挙動の観察は、比較的古くから行われている^{12)~14)}。細胞は、中程度の親水性表面に接着しやすく、表面が負電荷を帯びているため、正電荷をもつ基材に接着しやすいこと、さらに、細胞外基質として知られるタンパク質が接着因子としてはたらくことが知られている。そこで、表面にマイクロメートルサイズの親水・疎水、正電荷・負電荷のパターン、接着因子タンパク質のパターンを形成させると、細胞接着がマイクロパターン状に起こることが知られており、数々の例が報告されている。

そしてこのマイクロパターンで、細胞接着より高次な機能が顕著に制御されることもいくつか知られている。最も有名な報告例は、海（疎水性領域）に島（親水性領域）を形成させるようなマイクロパターン上で細胞を培養すると、細胞が十分に伸展しないような島サイズでは、アポトーシスが誘起されることである。最近ではナノメートルサイズの凹凸が、細胞内部の細胞骨格系タンパク質に影響を与え、細胞の接着や伸展、さらに運動性などが変化することが明らかにされてきている。

細胞より小さいパターン化の細胞への効果は、細胞への局所的な層流刺激や局所的な放射線刺激、あるいは成長因子を固定化した微小領域や微小粒子による刺激によっても検討されている。例えば、上皮成長因子（EGF）を固定化して細胞を刺激すると、刺激された領域でのみ EGF レセプターを含む情報伝達タンパク質が活性化されることが示されている（図13.14）。

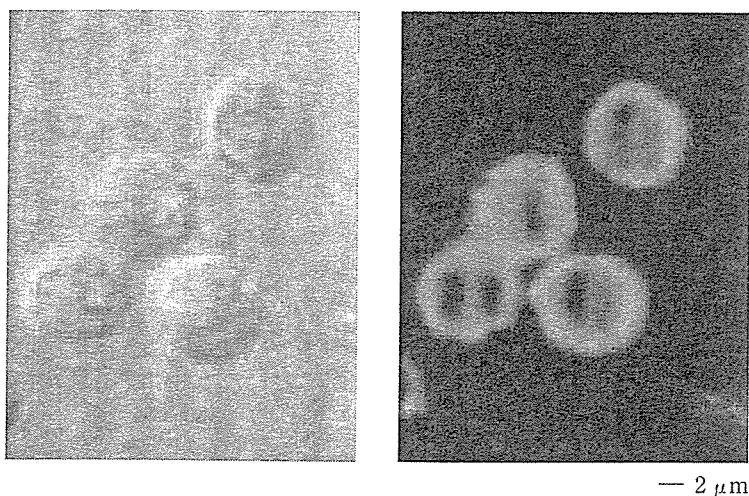


図 13.14 細胞より微細な領域に EGF を固定化し、EGF レセプター過剰発現細胞を培養し、抗体チロシンリン酸化抗体で染色すると、固定化 EGF で活性化された領域のみ (2 マイクロメートルのストライプ) と細胞周辺 (輪郭) でのみリン酸化が観察され、情報伝達が部位特異的に起こっていることがわかる (口絵 15 参照)

刺激応答性表面での細胞挙動もマイクロパターンで観察すると、その効果を顕著に観察することができる。温度応答性や光応答性の高分子でマイクロパターンを形成し、その上で細胞を培養するとまんべんなく増殖するが、温度変化や光照射を加えることにより、刺激応答性高分子上の細胞だけが脱着することが報告されている (図 13.15)。

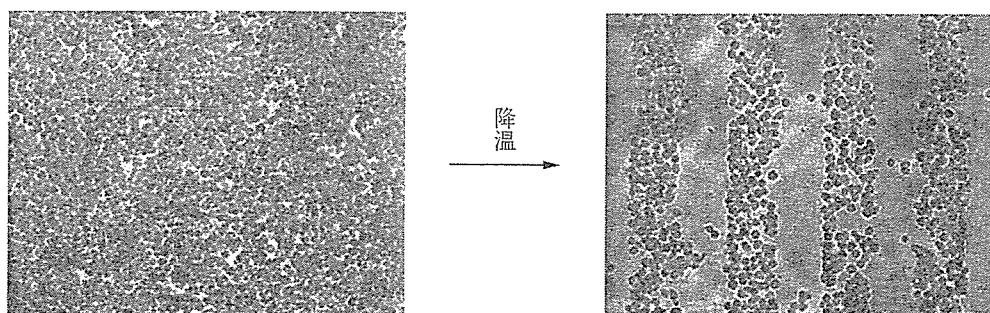


図 13.15 温度感受性高分子をマイクロパターン (ストライプ) 状に固定化し、その上で細胞を培養して満杯にしたあと降温すると感受性高分子固定化領域の細胞だけが脱着する。

一方、タンパク質をマイクロパターン固定化した表面での細胞の挙動を観察する研究手法が開発されている。抗体をマイクロアレイしてその上への細胞の接着をもとに、フローサイトメトリーの代わりに細胞表面の抗原性のプロファイリングを行う方法が報告されている。フローサイトメトリーでは、数種類の抗原へ蛍光ラベル化抗体を反応させて調べるのが限度であるが、抗体マイクロアレイを用いれば原理的には、マイクロアレイしただけの抗体に対する抗原性を一度に検索可能になる。多元系マイクロパターンでは、固定化した DNA ではなく、徐放性の DNA マイクロアレイを作成し、その上で細胞を培養し、遺伝子の細胞への

作用を調べるトランスフェクションマイクロアレイシステムがいくつかのグループで開発されてきている。

〔2〕 細胞のマイクロパターン化 細胞そのものを直接マイクロパターン化する例も報告されている。そこでは、細胞プリンティング法として、DNAのパターニングとして使われるインクジェットプリンティングが細胞に応用される。これまでに、普通のサーマルプリンターを改造して生きた細胞をプリントできることが報告されている¹⁵⁾。複数の細胞をおのおのプリントすることも可能であることから、この技術を展開すればコンピュータ制御で臓器の形を模倣できるのではないかと期待されている。

一方、細胞をマイクロアレイ固定化してタンパク質（おもに抗体）との相互作用を研究する例が報告されている。細胞の固定化方法としては、細胞表面が負に帯電していることを利用して、正に荷電した表面（例えば、ポリ L-リシン吸着表面）に静電的相互作用に固定化して、抗体を反応させて解析を行うものである¹⁶⁾。

〔3〕 細胞マイクロパターンの応用 このような細胞のマイクロパターン化により、いくつかの応用研究も行われている。まず一つは、マイクロレベルからの組織再生を目指した研究がいくつか行われている。バイオエレクトロニクス、あるいはバイオセンサーとして神経細胞のニューロサイトの方向づけを行うものである。まだ、直接の応用が開発されているわけではないが、潜在的な用途が考えられている。

また、生体組織は何種類もの細胞が組織立って機能している。そこで、2種類以上の細胞をマイクロパターン化して、より生体組織に近い構造を得ようとする試みもある。最初は線維芽細胞と肝臓細胞で行われ、現在では血管細胞をマイクロパターン化して毛細血管様に構築し、その間に肝臓細胞を培養して培養組織全体に血管を張り巡らし、栄養や酸素の補給ができるような組織作りも研究されている。

細胞アレイは、薬物のハイスループットスクリーニングの一環としても注目を集めている。動物実験の回避、環境に配慮した研究のために、少量で短時間でより多くの結果を得ようとする培養細胞を用いたマイクロシステムは必須である。

そのほか、多種類の細胞を基板上に固定化したマイクロアレイを作成し、血液型抗体検査を行う方法も考案されている¹¹⁾。ABO型のパネル血球を固定化して、血液を反応させると、A型血球にはA型血清は反応しないが、B型血球には反応する。これにより血液型抗体の検出が可能になる。組織マイクロアレイもすでに広く用いられるようになってきている。このようにマイクロアレイ（マイクロパターン化）されるのは、もはや分子だけでなく、細胞やさらには組織にまでも展開が始まっている。

13.5 立体的パターンニングの応用例

いわゆるバイオチップは、上述の生体分子パターン化マイクロアレイ型のほかに、2元系の代表的なパターンである凹凸マイクロパターンを形成させた基材があり、これはマイクロ流路を作成したチップとして、現在広く研究されている¹⁷⁾。このデバイスを用いた分析法は、マイクロ総合分析システム (micro total analysis system: μ TAS) あるいは、Lab-on-a-chip と呼ばれ、すべての分析過程を1チップ上でできるように設計することを目標としている。例えば、① 生体組織を分解して核酸を抽出し、② PCR で核酸を増幅し、③ 核酸の配列解析を行う、という一連の過程が1チップ上でできるように工夫される。このシステムにより、少量の試料から短時間で分析ができるようになる。また、チップ内で肝臓細胞を組織的に培養して、人工肝臓モジュールを作成しようとする試みも行われている。

分析のほかにも、化学反応を行う容器、マイクロリアクターとしても期待されている。化学反応をマイクロ領域で行うことにより、体積当りの接触界面が大きくなり、界面を介した物質移動や熱交換の効率が高くなり、反応速度を高め、爆発性の化学反応も制御しながら行うことが可能になる。

システムの設計のためには、50~200 μ m 幅のマイクロチャネルを流れる層流を操作できるマイクロポンプ、マイクロコネクタ、マイクロバルブ、マイクロミキサーが必要となる。これらのコンポーネントは、初期はシリコンで、のちにガラスを微細加工して用いられるようになり、現在では水系反応や分析には高分子材料を用いることも可能になってきており、応用範囲は拡大している。

13.6 おわりに

マイクロパターンニング技術は半導体加工の2元系から、マイクロアレイバイオチップの多元系へと進歩してきた。工学と生命科学をつなぐ典型的な研究手段であったのが、現在では生命科学にはなくてはならない技術となっている。ただ、まだ現状では、研究用に用いられるのが主で、産業として社会で用いられるまでには至っていない。しかし、今後は、まずは臨床診断などの分野で大きな発展が期待される。そして、再生医工学においても重要な技術として、展開していくものと思われる。