

フェムト秒レーザーを用いたコラーゲンゲル内部への マイクロ流体構造作製およびそのメカニズムの検討

Fabrication of Microfluidic Structure Inside Collagen Gel

by Femtosecond Laser Processing

弘前大理工¹, °(M1)藤田 紘雅¹, 山田 壮平¹, 花田 修賢¹

Hirosaki Univ.¹, °Koga Fujita¹, Sohei Yamada¹, Yasutaka Hanada¹,

E-mail: h24ms534@hirosaki-u.ac.jp

はじめに

臓器や器官を三次元的に再構成する技術は、細胞組織の機能や動態を観察できる実験系として、生命科学において大きな推進力となっている。細胞は自身の足場として機能する細胞外マトリックスに接着し、増殖や組織形状などを制御する。臓器や器官を再構成するためには、その足場の形状を任意に操作する必要がある。しかし、細胞外マトリックス成分は熱に弱く、非常に柔らかいため、形状制御を行うことが困難だった。我々の研究室ではこれまでに、近赤外フェムト秒レーザーを細胞外マトリックス成分で構成されるコラーゲンゲル内部に照射すると、細胞組織の形状制御可能なマイクロ流体構造が作製可能なことを明らかにしている。このことは、本手法を用いることで **Organ on a chip** に適応可能な三次元組織モデルを構築できる可能性が示唆されている。しかし、実用化するにあたって照射条件ごとの流体構造作製の能否と作製メカニズムがわかっていない。そこで今回水平及び垂直方向の流体構造の加工基礎特性とその作製メカニズムの検討を行った。

実験方法及び実験結果

コラーゲン溶液 (12 mg/ml) 188 μ L、5 \times PBS 100 μ L、滅菌水 209 μ L、再構成用緩衝液 53 μ L、ゲンピン 10 mM を 4.0 $^{\circ}$ C の条件下で混合し、ガラスボトムディッシュに滴下し、37.0 $^{\circ}$ C で 30 分間静置することで、コラーゲンゲルを硬化させた。Yb:KGW レーザー(波長 1035 nm, パルス幅 100 fs, 繰り返し周波数 75.6 MHz) を、対物レンズ (\times 20, NA: 0.75) を介してディッシュ底面からコラーゲンゲル内部に集光照射及び X 軸方向へ走査し流体構造を作製した (Figure.1A)。流路作製メカニズムを検討するため、流体構造作製の過程をハイスピードカメラ (20000 fps) で観察した。観察結果を Figure. 1B で示す。集光点でコラーゲンゲルが熔融し、発生したマイクロバブルが既存の気泡に取り込まれ、気泡が膨張することでコラーゲンゲルが押し広げられていた。この結果は、集光点で発生したマイクロバブルが融合することで、流体構造が作製されることを示唆している。

次にパルスエネルギー 30, 40, 50 nJ/pulse、走査速度 5 ~ 50 μ m/s で集光照射及び X 軸方向と Z 軸方向へ走査し流体構造を作製した。作製された流体構造の共焦点レーザー顕微鏡像とその断面像を Figure. 1C, D に示す。作製したマイクロ流体構造内における細胞培養の能否を検証するため、イヌ腎尿管由来の培養細胞株 MDCK 細胞を播種した。その結果、マイクロ流体構造内で MDCK 細胞を管腔構造に誘導できる照射条件が明らかになった。以上の結果から、本手法を用いることで、**Organ on a chip** に適応可能な三次元組織モデルをコラーゲンゲル内に作製できる可能性がより強く示唆された。

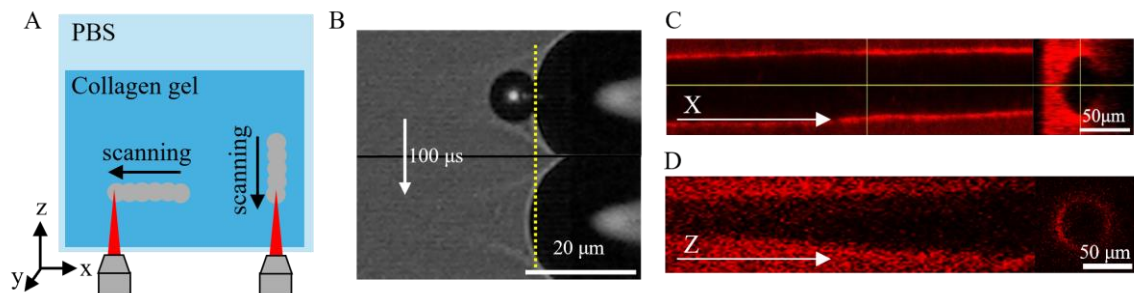


Figure.1 (A) Schematic diagram of the laser irradiation method inside the collagen gel. (B) An image captured by a high-speed camera showing the fabrication of microfluidic structures inside a collagen gel. (C,D) Horizontal and vertical images of the fluidic structure (X-axis direction(C), Z-axis direction(D)) inside the collagen gel.