

## Poly(dimethylsiloxane) 製微小流路デバイス内への I 型コラーゲン固定化法の検討と 灌流培養環境下での HL60 細胞のタイムラプス観察

森本 康一<sup>1</sup>, 西山 裕之<sup>2</sup>, 國井 沙織<sup>2</sup>, 角田 昌明<sup>3</sup>, 加藤 暢宏<sup>4</sup>

### 要旨

灌流培養環境下で HL60 細胞と I 型コラーゲンとの相互作用を観察するため, poly(dimethylsiloxane)を用いて微小流路デバイス (幅 700  $\mu\text{m}$ ×高さ 100  $\mu\text{m}$ ×長さ 20 mm) を作製した. 矩形断面を有する微小流路内壁 4 面すべてを酸素プラズマ処理し, ニワトリ I 型コラーゲンとウシ胎児血清成分タンパク質を灌流して固定化した. 固定化されたタンパク質の吸着量を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて定量的に調べた結果, 血清タンパク質に対して酸素プラズマ処理の効果は認められなかったが, I 型コラーゲンでは酸素プラズマ処理の効果が経時的に減少するに従い, その固定化量が増加した. 作製した微小流路デバイスを用いた 0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$  の灌流培養下で, HL60 細胞は I 型コラーゲンにのみローリングあるいは接着挙動を示した. 酸素プラズマ処理の効果は I 型コラーゲンに対する細胞接着に大きく影響した. HL60 細胞の接着挙動は固定化された I 型コラーゲン量に単純に比例せず, その構造変化を認識することが示唆された.

### 1. 緒言

一般に動物細胞は単独で増殖・分化することはできず, 細胞間に存在する細胞外マトリックス (Extracellular matrix : 以下, ECM と省略) が細胞足場として必要とされる. また組織により ECM の組成や量比が異なる特異性があり, 各組織が正常に働くために ECM は自己的に構築される. ECM のタンパク質成分としてはコラーゲンやフィブロネクチンなどが, 多糖成分としてはグリコサミノグリカンやコンドロイチンなどが挙げられる. 細胞にはこのような ECM の各成分を足場として認識する受容体があり, 周辺の細胞外環境から運動, 細胞周期, 細胞死, 分化などに関わるシグナルを鋭敏に感じとっている. つまり, 受容体は ECM に存在するリガンドと特異的に結合する. 例えば, コラーゲンやフィブロネクチンと結合する主な受容体はインテグリン・ファミリーで, 細胞膜 1 回貫通型の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖のヘテロ二量体分子である<sup>(1,2)</sup>. インテグリンは 19 種類の  $\alpha$  鎖と 8 種類の  $\beta$  鎖の組み合わせでリガンド分子を正確に識別する. 受容体と結合した ECM の質的量的な情報はアクチン結合タンパク質などのシグナル伝達分子を介して細胞内へ伝えられ, 細胞個体の運命を決定する.

これら ECM 成分は生物材料として早くから注目されて構造解析や機能解析などの数多くの研究が成され, さらにその一部は *in vitro* での細胞生物学的な研究に広く利用されている. 特に I 型コラーゲンはウシやブタから多量に調製できることから広く利用されてきた. I 型コラーゲンは 2 本の  $\alpha 1$  鎖と 1 本の  $\alpha 2$  鎖からなる三重らせん構造を特徴とする分子量約 30 万の直鎖状タンパク質で, 中性 pH では自己会合して特徴的な線維を形成する性質をもつ. コラーゲンを含む生物材料の長所は細胞との親和性に優れることなどであり, 短所としては機械的な強度が弱く加工しにくい点などが挙げられる. 今日では, これ

原稿受付 2010 年 6 月 17 日

本研究は近畿大学生物理工学部戦略的研究 No.06-II-1, 2006 および No.07-IV-3, 2007 の助成を受けた.

1. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学生物理工学部 生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
3. 近畿大学生物理工学部 知能システム工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
4. 近畿大学生物理工学部 医用工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

ら短所を補うべく多種類の合成高分子が開発されて担体としての応用が試行されている<sup>(3)</sup>。例えば、加工しやすいポリスチレンはグロー放電や硫酸処理を施すことで、より細胞との親和性を改善することができる。特に最近では、細胞培養の新しい基材として微細加工が可能なシリコンの一種である poly (dimethylsiloxane) (以下、PDMS と省略)を利用した研究応用が報告されている<sup>(4-6)</sup>。PDMS は加熱することにより容易に固化する。よって、 $\mu\text{m}$  サイズの凸凹の型 (モールド) を作製することで任意の微小流路を作製できる。また、タンパク質が PDMS に吸着することはよく知られているので、細胞接着性タンパク質を基板上に任意にパターン化することができる<sup>(7, 8)</sup>。ただし、タンパク質の合成高分子への吸着は表面自由エネルギーや表面電荷などが大きく影響し<sup>(9)</sup>、吸着後にもタンパク質の構造変化が起こるため、普遍的な表面物性を得ることは難しいと考えられている<sup>(10-12)</sup>。その他にも、タンパク質の吸着は極端な親水性でも疎水性でも低くなることが知られている。このような複雑な現象を考慮して生物材料を開発・評価するためには、タンパク質の吸着作用を制御して吸着量を解析することが必要である。

生体組織の環境を考えると、細胞は栄養成分やタンパク質などが流れているもしくは拡散している中で増殖・分化している。これまでの細胞の研究報告の多くは静置培養下での観察であり、灌流培養下での挙動についての言及は少ない。それは *in vitro* で簡便に灌流培養観察できる装置を入手しにくいことが理由の一つとして挙げられる。しかし、流速のある培養条件で、細胞の受容体と ECM 成分のリガンドとの結合に関する研究などは生体内モデルとして重要である。上記の問題点を解決するために、微少な流速を安定に制御できるマイクロポンプを連結した培養器が考えられる。我々はこれまでに灌流培養下で細胞の挙動を観察するため、PDMS を材料とした微小流路デバイスを設計作製することを試みてきた。その一方で、細胞は PDMS に接着しないため (不活性であるため)、直接、細胞を流路面に静止させて観察できない。そこで本研究では、細胞の足場タンパク質として知られる I 型コラーゲンに注目し、PDMS への最適な固定化方法を灌流条件下で検討することを第一の目的とした。まず、PDMS 表面の親水性の強弱がタンパク質の固定化量にどのように影響するかを調べるため、メチル基を水酸基に置換する酸素プラズマ処理を検討した。I 型コラーゲンの線維構造変化や生化学的性質などの知見はデータ解析に重要なので、これまでに研究実績のあるニワトリ I 型コラーゲンを用いることにした<sup>(13-18)</sup>。また、ヒト前骨髄性白血病細胞である HL60 の接着挙動を灌流環境下でタイムラプス観察し、PDMS に固定化したタンパク質種の影響を調べることを第二の目的とした。HL60 細胞は I 型コラーゲンの Pro-HyPro-Gly 配列と特異的に結合する受容体 (Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1, 以下 LAIR-1 と省略) をもつことが既に報告されている<sup>(19-21)</sup>。このような微小流路の灌流培養下で細胞の接着挙動を観察できる系を確立することは、細胞の機能をより正しく理解できると期待される。

## 2. 方法と材料

### 2.1 PDMS 製微小流路デバイスの作製

微小流路デバイスは 3 次元 CAD Pro/ENGINEER WF3.0 (PTC, Needham, MA) で設計し、その設計データに基づいてフォトマスクを制作した。微小流路の寸法は、幅  $700\ \mu\text{m}$  × 高さ  $100\ \mu\text{m}$  × 長さ  $20\ \text{mm}$  とした。シリコン基板上に塗付して熱処理したフォトレジスト SU-8 3050 (日本化薬株式会社) にマスクパターンを露光し、現像することにより流路パターンの母型を得た。PDMS は東レ・ダウコーニング社の Sylgard 184 を用いて、主剤と触媒の重量比を 10 : 1 として混和して脱気した。この混和物をフォトレジストパターンに流し込み、 $60^\circ\text{C}$  で 2 時間放置して固化させた (図 1)。固化した PDMS をモールドから剥がし、細胞注入用の直径  $4\ \text{mm}$  の孔を 2 カ所、吸入用の直径  $3\ \text{mm}$  の孔を 1 カ所開けた。PLASMA CLEANER PDC-32G (HARRICK PLASMA, NY) を用いて微小流路の底面台となる  $50 \times 40\ \text{mm}$  のカバーガラス (松波硝子株式会社) を 5 分間酸素プラズマ処理し、その上に PDMS をスピンコーター (1H-D7, MIKASA

社)により均一に塗付した。その後、120°Cで15分間放置して固化させた。上側面のPDMSと底面のPDMS表面は酸素プラズマ処理(圧力500 mTorr, 出力10.5 W)によって活性化後、貼り合わせて60°Cで15分間放置して接合させた。培地などを流入させるためのシリコンチューブを接着剤にて接合させて、PDMS製微小流路デバイスを完成させた(図2)。

## 2.2 タンパク質のPDMS製微小流路デバイスへの固定化と吸着量の分析

PDMS表面の酸素プラズマ処理がタンパク質の固定化にどのように影響するかを調べるため、吸着したタンパク質量をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて定量化した。PDMS表面の酸素プラズマ処理による効果は経時的にその効果が減少するため、処理後すぐに滅菌水で満たして3日後と7日後まで放置してその効果を検証した。また、固定化するタンパク質は、細胞培養で汎用されるウシ胎児血清(以下、FCSと省略)とペプシンで処理したニワトリI型コラーゲン(研究室で調製、PHColと省略)とした<sup>(18)</sup>。FCSはフェチインやフィブロンectinなど多種多様なタンパク質の混合物であり、また一般に親水性の高いタンパク質が多量に含まれる。一方、I型コラーゲンは典型的な直鎖状タンパク質で血清タンパク質に比べると疎水性であり、生体内では線維を形成して細胞に足場環境を提供することが知られる。これら性質の異なるタンパク質成分は細胞生物学の研究では日常的に用いられる。

まずシリンジポンプ(NE-1000X, ニューロサイエンス株式会社)を用いて、生理食塩を含むリン酸緩衝液(PBS(-))でPDMS製微小流路を洗浄した。次に流速0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$ でFCS成分を3時間流して、タンパク質成分をPDMS表面に固定化した。余分なFCS成分を除くため、PBS(-)で0.6  $\mu\text{L}/\text{min}$ で3分間洗浄した。同様に1.0 mg/mLのPHColをPDMS製微小流路に固定化した。固定化したそれぞれのタンパク質は、剥離液(8 mol/L 尿素, 2% SDS, 10 mM ジチオトレイトール)を44  $\mu\text{L}$ 注入して回収した。回収したFCS成分は10% SDS-PAGEにて、同様な工程で回収したPHColは5% SDS-PAGEにて定量化した。本方法により、酸素プラズマ処理0, 3と7日後の吸着量をそれぞれ調べた(図3Aと3B)。SDS-PAGEの染色画像から各バンドピーク面積をImageJ画像解析ソフトウェア(NIH, Bethesda)にて定量化した結果を表1にまとめた。表1の数値は、電気泳動ゲル画像から得られたデンストグラムの各ピークの面積を画素数(pixel数)で定量化したものである。

## 2.3 タンパク質を固定化したPDMS製微小流路デバイス内部でのHL60細胞のローリングと接着挙動の観察

HL60細胞(ATCC, DSファーマメディカル株式会社)はヒト前骨髄性白血病細胞で、血球系の細胞としてよく研究されている<sup>(19)</sup>。本研究では、未分化のHL60細胞を灌流培養条件下でタンパク質を固定化したPDMS製微小流路内に流し込み、固定化タンパク質へのローリングと接着挙動をECLIPSE-100倒立型位相差顕微鏡(ニコン株式会社)にて観察した。HL60は $2.0 \times 10^5$ 個/mLになるように10%FCS含有RPMI1640培地(日水製薬株式会社)にて調製し、細胞浮遊液とした。本細胞浮遊液をPDMS製微小流路デバイスの細胞導入用ポートに注入し、流速0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$ でシリンジポンプにより培地を吸引しながら直接倍率10倍で1枚/10秒間隔で最長9分間撮影した(図4A)。撮影した画像から、流れた全細胞数とローリングと接着したHL60の各細胞数を積算し、それぞれの比率(%)を計算した。次にFCSタンパク質とPHColを固定化した微小流路デバイスで、それぞれローリング率(%)と接着率(%)を求めた(図4Bと図4C)。さらに酸素プラズマ処理3日目と7日目のPDMS製微小流路デバイスを用いて、同様にHL60のローリングと接着した細胞数を積算して表2と表3にまとめた。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 PDMS 製微小流路デバイスの作製

通常、PDMS 製微小流路デバイスでは、倒立位相差顕微鏡での観察を容易にするために流路の底面をカバーガラスでカバーしている。しかしながら、単にカバーガラスで微小流路を密閉すると、流路内の底面のみがガラスで側壁と上面が PDMS となる。そのため、細胞とタンパク質を固定化した PDMS との接触挙動のみを観察する上で支障が生じる。そこで本研究では、底面となるカバーガラスの表面に厚さ 100  $\mu\text{m}$  程度の PDMS の層を形成することで、微小流路の全ての壁面を PDMS で構成した。この平坦な底面にモールドで型取りした PDMS の凹面を張り合わせることで流路を作成した。図 1 に PDMS の凹面の断面図（幅 715  $\mu\text{m}$ 、高さ 94.3  $\mu\text{m}$ ）を示す。この手法により、顕微鏡画像の鮮明さを得ることができるとともにタンパク質と細胞の接着挙動を観察することが両立できた。PDMS は自家蛍光がほとんどないので、細胞を蛍光染色して蛍光顕微鏡で観察することも可能である<sup>(22)</sup>。また、今回作製したデバイスは Y 字型の流路を有しており、ポート A とポート B に異なる成分を注入してマイクロポンプで吸引すると、微小流体の特性により容易に二層流を形成することができる（図 2）。単一流路内で異なった血清タンパク質およびコラーゲンを個別に固定化することにより、より高い空間分解能で細胞の接着挙動を観察できる。実際、二液の粘性を考慮することにより、0.3  $\mu\text{L}/\text{min}$  の低流速で層流を保つことを確認した（未発表）。生体の血管では Y 字分岐形状は一般的であり、そのような血管形状をモデルとした PDMS デバイスを用いることで血球系細胞の挙動を疑似観察できることが期待される。

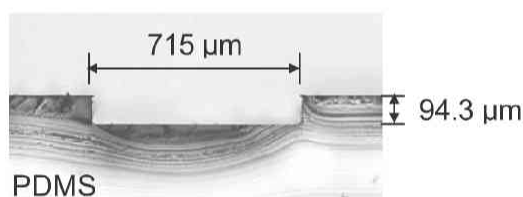


図 1 PDMS 製微小流路の凹面の断面図  
測定した底面の幅は 715  $\mu\text{m}$ 、高さは 93.4  $\mu\text{m}$  である。

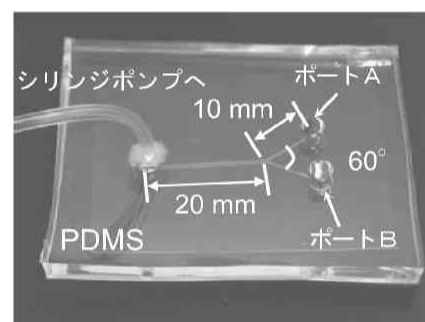


図 2 PDMS 製微小流路デバイスの全体図  
HL60 細胞を注入できる 2 個のポート  
(A と B) を備えた Y 字形のデバイス

#### 3.2 タンパク質の PDMS 製微小流路デバイスへの固定化と吸着量の分析

PDMS 表面の酸素プラズマ処理による親水性効果がタンパク質吸着量に与える影響について調べた結果を図 3 と表 1 に示す。図 3 A と図 3 B はそれぞれ FCS 成分タンパク質と PHCol で、各レーンは酸素プラズマ処理日からの日数を示す。タンパク質の種類によって、PDMS への吸着量に違いが認められた。FCS 成分タンパク質の総吸着量は PHCol の 100 倍以上と考えられ、また FCS に含まれる多種多様なタンパク質が吸着されていることが分かった。分子量で考察すると、 $1.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^5$  までの幅広い分子種が見られる。しかしながら、酸素プラズマ処理と吸着量との関係は断定できなかった。FCS 成分には多量の親水性タンパク質が含まれることから、酸素プラズマ処理の効果に影響を受けにくいかもしれない。一方、PHCol の吸着量は酸素プラズマ処理の効果によって大きく影響を受けた。酸素プラズマ処理 0 日目では吸着量は低く、酸素プラズマ処理効果が弱くなると吸着量は 2 倍程度増加した（表 1）。

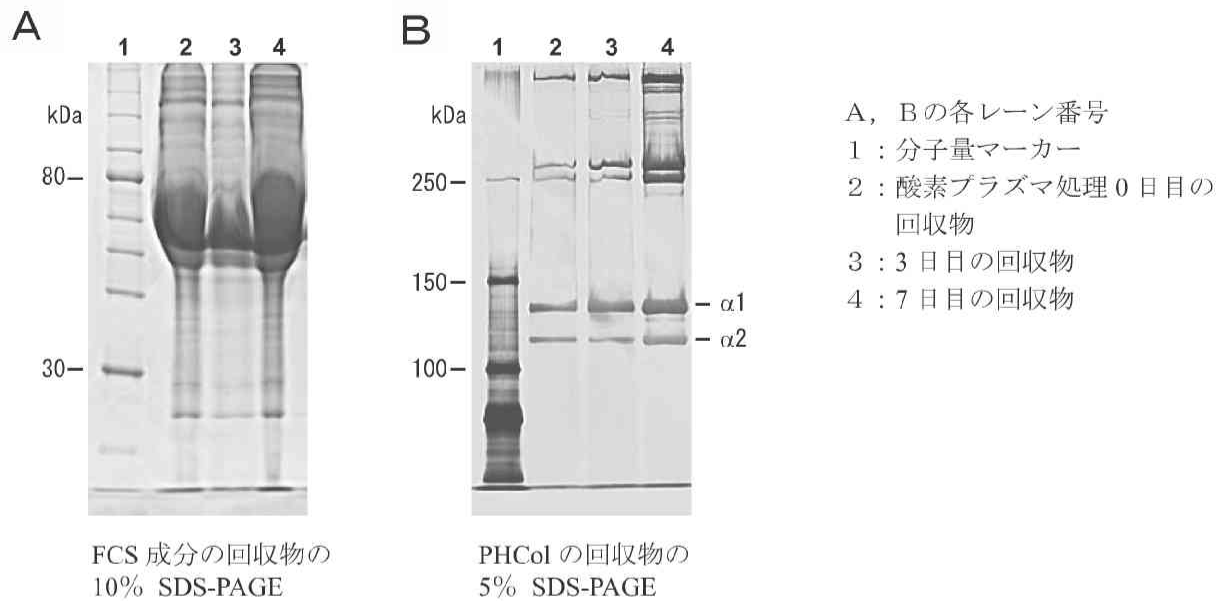


図3 酸素プラズマ処理したPDMS表面に固定化されたFCSとPHColのSDS-PAGE

表1 PDMSの微小流路表面に固定化したPHColの定量値

経時日数 (日)	$\alpha 1$ 鎖	$\alpha 2$ 鎖	$\alpha 1$ 鎖+ $\alpha 2$ 鎖
0	3,220	1,720	4,940
3	3,650	1,180	4,820
7	6,150	3,180	9,330

図3BのPHColのSDS-PAGE染色像をImageJにて定量化した。

### 3.3 タンパク質を固定化したPDMS製微小流路デバイスでのHL60細胞のローリングと接着挙動の観察

HL60細胞浮遊液を流速0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$ で灌流培養し、流速に抵抗してローリングや接着する細胞数を積算した。ローリングや接着する細胞は、受容体が固定化したタンパク質と接触して結合することを意味する。一方、素通りする細胞は受容体が結合しないことを表している。図4Bと4Cの積算した全細胞数との比率(%)を表2と表3にそれぞれ示す。タンパク質を固定化していないPDMS表面では、注入したすべてのHL60細胞はそのまま素通りした(図4A)。酸素プラズマ処理の効果はなにも認められなかった。つまり、HL60細胞はPDMSとの接着点をもたず、流速に従って流れることが示された。FCS成分タンパク質の固定化量に酸素プラズマ処理の効果が認められなかっただけでなく(図3A)、HL60細胞はFCS成分タンパク質にまったく接着挙動を示さなかった(図4B, 表2)。HL60細胞は血球系細胞であり、血清タンパク質とは結合しにくいことを意味している。

しかし、PHColを固定化したPDMS表面の場合、HL60の接着挙動は著しい変化を示した(図4C)。酸素プラズマ処理0日目では、全細胞数368個に対して流路表面をローリングあるいは接着した細胞数は88個(24%)であった。よって4個に1個の細胞は、PHColと接触した後、分子レベルでの結合と解離が起こっていると考えられる。実際には微小流路の高さが約100  $\mu\text{m}$ なので、直径約10  $\mu\text{m}$ の細胞がPDMS面と接触せずに流れる場合も想定される。よって、すべての細胞がPDMS面に接触した場合には

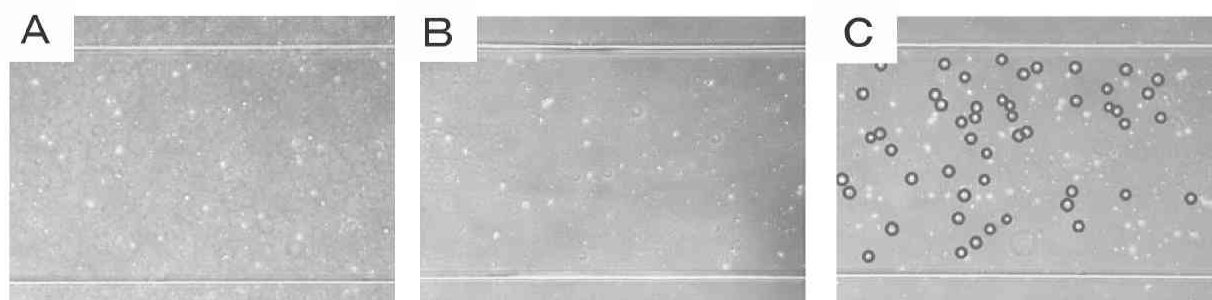


図4 微小流路デバイスで灌流培養した HL60 の細胞観察像

酸素プラズマ処理 0 日目の HL60 細胞の灌流培養の観察像を示す. A, 無処理; B, FCS 固定化処理; C, PHCol 固定化処理. 各図は流速 0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$  の灌流 9 分後の観察像で, ローリングもしくは接着した細胞を円印で示す.

表2 FCS を固定化した PDMS 表面にローリングと接着した HL60 の細胞数

酸素プラズマ経過日数 (日)	全細胞数 (個)	ローリングと接着した細胞数 (個)	比率 (%)
0	542	1	0
3	332	0	0
7	508	5	1

各細胞数は, 0 分から 9 分まで灌流培養した細胞でローリングあるいは接着した細胞数を積算した.

表3 PHCol を固定化した PDMS 表面にローリングと接着した HL60 の細胞数

酸素プラズマ経過日数 (日)	全細胞数 (個)	ローリングと接着した細胞数 (個)	比率 (%)
0	368	88	24
3	281	51	18
7	383	34	9

各細胞数は, 0 分から 9 分まで灌流培養した細胞でローリングあるいは接着した細胞数を積算した.

表3の比率はさらに高くなる. またこのローリングと接着の比率は培養液の流速が増加するに従って減少したことから, HL60 と PHCol との結合の親和性はそれほど強くないことが示唆された (未発表). 興味深いことに, 酸素プラズマ処理の効果増減によって, HL60 細胞の接着挙動に変化が認められた. 酸素プラズマ処理 3 日後と 7 日後, ローリングと接着の比率もそれぞれ 18% から 9% まで減少した. 図3B で示したように, 3 日後においても PHCol の PDMS 表面結合量は十分と考えられる. よって, この現象は HL60 細胞表面に存在するコラーゲン受容体分子と PHCol 分子との数量的な相互作用ではなく, PHCol の質的な変化 (構造変化) が影響していると推察される. 仮に酸素プラズマ処理による PHCol の吸着量が不十分であったならば, タンパク質を吸着していない PDMS 表面には HL60 細胞は接着しなくなるはずである. 以上の結果より, 酸素プラズマ処理の効果は固定化するタンパク質種によって異なり, 必ずしもその効果は同じにならないことが示された. つまり, 固定化するタンパク質を用いて酸素プラズマ処理の効果を調べることが必要である.

HL60 細胞は, 流れに逆らって固定化された PHCol と結合・解離することが明らかになった. 細胞膜表面に存在するコラーゲン受容体は, インテグリン・ファミリーの  $\alpha 1\beta 1$  や  $\alpha 2\beta 1$ , discoidin domain receptor

(DDR) の DDR1 や DDR2, その他に免疫細胞に特異的に発現している LAIR-1 などがよく知られている<sup>(1,2,21,23)</sup>. よって、本研究で示された HL60 の接着挙動に関してもこれら受容体が関与している可能性が高い.

我々は、幅 700  $\mu\text{m}$ , 高さ 100  $\mu\text{m}$ , 長さ 20 mm という微小流路を 4 面 PDMS で作製し、0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$  の安定流速で細胞を灌流培養してその挙動を顕微鏡観察できることを示した. 今後、この微小流路デバイスを用いて二液層流の条件下で異なるタンパク質組成を PDMS 面に同時固定化して灌流培養した細胞の接着挙動の差異を観察し、さらに受容体と細胞内のシグナル伝達に関わるタンパク質を蛍光顕微鏡で観察することを検討している.

## 謝辞

本研究の一部は、平成 21 年度 JST シーズ発掘試験（発掘型）研究（課題番号 11-138）の助成を得てなされた.

## 参考文献

1. J. Jokinen, E. Dadu, P. Nykvist, J. Käpylä, D. J. White, J. Ivaska, P. Vehviläinen, H. Reunanen, H. Larjava, L. Häkkinen, and J. Heino (2004) Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils, *J. Biol. Chem.* **279**, 31956-31963.
2. S. Schmidt, and P. Friedl (2010) Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms, *Cell Tissue Res.* **339**, 83-92.
3. 林 紘三郎 (2007) 生体組織リモデリングのバイオメカニクス (赤池敏宏編, 再生医療のためのバイオエンジニアリング), p54-73 コロナ社, 東京.
4. J. N. Lee, X. Jiang, D. Ryan, and G. M. Whitesides (2004) Compatibility of mammalian cells on surfaces of poly (dimethylsiloxane), *Langmuir* **20**, 11684-11691.
5. J. N. Lee, C. Park, and G. M. Whitesides (2003) Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices, *Anal. Chem.* **75**, 6544-6554.
6. J. C. McDonald, and G. M. Whitesides (2002) Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices, *Accounts of Chemical Research* **35**, 491-499.
7. G. Mehta, J. Lee, W. Cha, Y.-C. Tung, J. J. Linderman, and S. Takayama (2009) Hard top soft bottom microfluidic devices for cell culture and chemical analysis, *Anal. Chem.* **81**, 3714-3722.
8. 赤池敏宏, 原田伊知郎 (2007) 細胞外マトリックス工学のセルプロセッシング工学への応用. (赤池敏宏編, 再生医療のためのバイオエンジニアリング), p129-145 コロナ社, 東京.
9. A. Bernard, J. P. Renault, B. Michel, H. R. Bosshard, and E. Delamarche (2000) Microcontact printing of proteins, *Adv. Mater.* **12**, 1067-1070.
10. Andrade J.D., ed. (1985) Protein Adsorption, Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers, vol. 2, Plenum Press, New York.
11. C. R. Mcmillin, and A. G. Walton (1974) A circular dichroism technique for the study of adsorbed protein structure, *J. Colloid. Interface Sci.* **48**, 345-349.
12. A. G. Walton, and F. C. Maenpa (1979) Application of fluorescence spectroscopy to the study of proteins at interfaces, *J. Colloid. Interface Sci.* **72**, 265-278.
13. M. E. Soderquist, and A. G. Walton (1980) Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces, *J. Colloid. Interface Sci.* **75**, 386-397.
14. 國井沙織, 森本康一 (2005) アクチニダイン酵素処理にて生じた I 型コラーゲンの生化学的特性の変化, 近畿大学先端技術総合研究所紀要 10 号, 19-28.
15. 森本康一, 國井沙織 (2007) Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 分解による I 型コラーゲン会合体の構造解析, 近畿大学生物理工学部紀要 19 号, 57-65.

16. 國井沙織, 森本康一 (2008) 順相分配クロマトグラフィーによるニワトリ I 型コラーゲンの $\alpha 1$  鎖と $\alpha 2$  鎖の分離精製, 近畿大学生物理工学部紀要 22 号、25-32.
17. K. Morimoto, S. Kunii, K. Hamano, and B. Tonomura (2004) Preparation and structural analysis of actinidain-processed atelocollagen of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 861-867.
18. K. Morimoto, K. Kawabata, S. Kunii, K. Hamano, T. Saito, and B. Tonomura (2009) Characterization of type I collagen fibril formation using thioflavin T fluorescent dye, *J. Biochem.* **145**, 667-684.
19. S. Kunii, K. Morimoto, K. Nagai, T. Saito, K. Sato, and B. Tonomura (2010) Actinidain-hydrolyzed type I collagen reveals a crucial amino acid sequence in fibril formation, *J. Biol. Chem.* **285**, 17465-17470.
20. S. J. Collins, R. C. Gallo, and R. E. Gallagher (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture, *Nature* **270**, 347-349.
21. A. Verbrugge, T. de Ruiter, C. Geest, P. J. Coffey, and L. Meyaard (2006) Differential expression of leukocyte-associated Ig-like receptor-1 during neutrophil differentiation and activation, *J. Leukoc. Biol.* **79**, 828-836.
22. D. Wlodkowic, S. Faley, J. Skommer, D. McGuinness, and J. M. Cooper (2009) Biological implications of polymeric microdevices for live cell assays, *Anal. Chem.* **81**, 9828-9833.
23. Y. Shintani, Y. Fukumoto, N. Chaika, R. Svoboda, M. J. Wheelock, and K. R. Johnson (2008) Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1, *J. Cell Biol.* **180**, 1277-1289.

## 英文抄録

### Adsorption of Type I Collagen onto Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Device and Time-lapse Observation of HL60 Cells under Continuous Perfusion.

Koichi Morimoto<sup>1</sup>, Hiroyuki Nishiyama<sup>2</sup>, Saori Kunii<sup>2</sup>, Masaaki Kakuda<sup>3</sup>, Nobuhiro Kato<sup>4</sup>

We developed microfluidic device ( $W$  700  $\mu\text{m}$   $\times$   $H$  100  $\mu\text{m}$   $\times$   $L$  20 mm) with poly(dimethylsiloxane) to observe adhesion of HL60 cells on type I collagen under continuous perfusion. The surface of poly(dimethylsiloxane) was treated by oxygen plasma and then coated by fetal calf serum proteins or chicken type I collagen. By using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, we showed that treatment of oxygen plasma had no effect on binding of serum proteins on the polymer surface. However, the amount of collagen on the surface increased by decreasing of the effect of plasma treatment. On the serum protein-coated polymer surface, HL60 cells fully flowed through under 0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$  flow rate. On the other hand, HL60 cells bound to the collagen-coated polymer surface and subsequently adhered to the collagen-coated polymer surface. We suggest that the conformation of collagen would alter depending on the degree of oxygen plasma treatment of PDMS and HL60 cells would recognize the difference in collagen structure.

1. Department of Genetic Engineering, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Department of Biotechnological Science, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

3. Department of Intelligent Systems, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

4. Department of Biomedical Engineering, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan