

微細オリフィスを用いた細胞膜の展開法の研究

2004年3月修了 竹中一馬

1. はじめに

従来の *in vivo* の生化学では、細胞を破碎した後に分析・解析を行うため、細胞内での空間構造が失われた状態での観察しか出来ない。これに対し、細胞内での現象をありのままに (*in vivo*) リアルタイムで観察する事が出来れば、細胞内ネットワークのダイナミズムの解明に大きく貢献する事が出来る。しかしながら光学顕微鏡の分解能は $1\mu\text{m}$ 程度である為、 $10\mu\text{m}$ 程度の大きさを持つ細胞や $1\mu\text{m}$ 程度の大きさを持つ核内にパッキングされた細胞内ネットワークの空間構造をありのままに観察する試みには大きな困難が予想される。

そこで、本研究では、生体内での機能を損なう事無く、人工基板上において細胞膜の平面展開及び任意部分の除去などの細胞手術を行い、高分解能での観察や、外来分子との相互作用・外部刺激に対する応答の計測等を行うことを目的とし、微細加工技術や微細操作技術などのマイクロ・ナノテクノロジーを用い、裏打ち構造の上に直径約 $1\mu\text{m}$ の微細オリフィスを持つ薄膜を作製する手法、PDMS により細胞吸引のための微小流体回路を作製し、オリフィスへの細胞吸引固定を行う装置および手法、3点以上の微細オリフィスを用いる事により、その微細オリフィスで囲まれた平面において細胞膜を基板により裏打ちされた状態で固定する手法、赤外レーザーを細胞内部に絞り込んで照射する事により発生する急激に膨張する気泡を利用し、細胞膜を展開する手法、について提案し、そのための技術開発を行った。

この新技术を用いて、膜構造をウェットな状態で基板上に平面展開する事により、膜両面への容易なアクセスが可能となり、また膜内面を露出させる事により蛍光顕微鏡・AFM (原子間力顕微鏡) 等を用いて外来分子と細胞内ネットワークとの相互作用や細胞内ネットワーク構造をリアルタイムかつ空間的に高い分解能で観察・操作する事が可能となる。これは、細胞をあるがままの状態を観察する *in vivo* の立場と、構造を犠牲にして解析を行う *in vitro* の立場の中間を狙った、細胞の解剖に相当するバイオナノテクノロジーと言える。

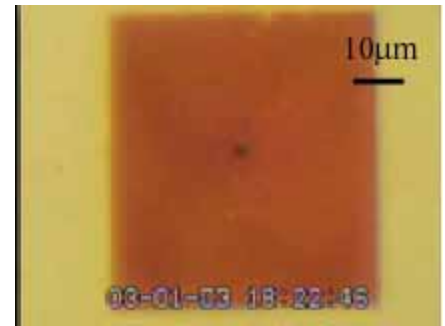
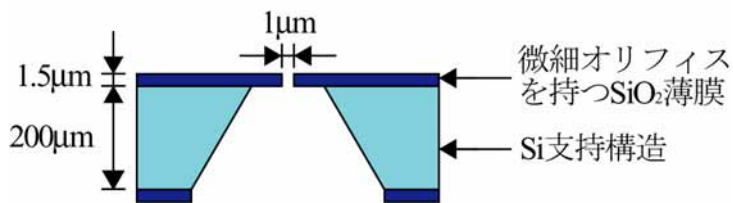
また、オリフィス上に固定した細胞について、細胞膜チャネルの計測 [1-2]、細胞膜チャネルのセンサーとしての利用、および細胞内アレイへの応用も考えられる。本研究では、細胞膜内に埋め込まれた形で存在するイオンチャネルを通過する単一イオン電流を実時間で計測することを目的とし、細胞の吸引固定による手法を用いて微細オリフィス 細胞膜間を高抵抗で密着させ、雑音電流をほぼ 0 にして、単一イオン電流のみを計測する装置の開発を行った。

本実験では、直径 $12\sim 18\mu\text{m}$ のヒト単球性白血病由来 U937 細胞を用いている。

2. 細胞の吸引固定

2.1 微細オリフィスの作製

一般にアスペクト比の大きな微細小孔を作成することは困難であるため、直径 $1\mu\text{m}$ 程度の微細オリフィスを作成するには同程度の厚さの基板



a) 裏打ち構造を持つ微細オリフィス

b) 反射顕微鏡像

図 1. レーザー加工による微細オリフィス

を用いる必要がある。このような薄い基板は機械的強度が非常に低いいため、文献[3-4]にならい、図 1 a)に示す様に裏打ち構造の上に微細オリフィスを持つ薄膜を製作した。

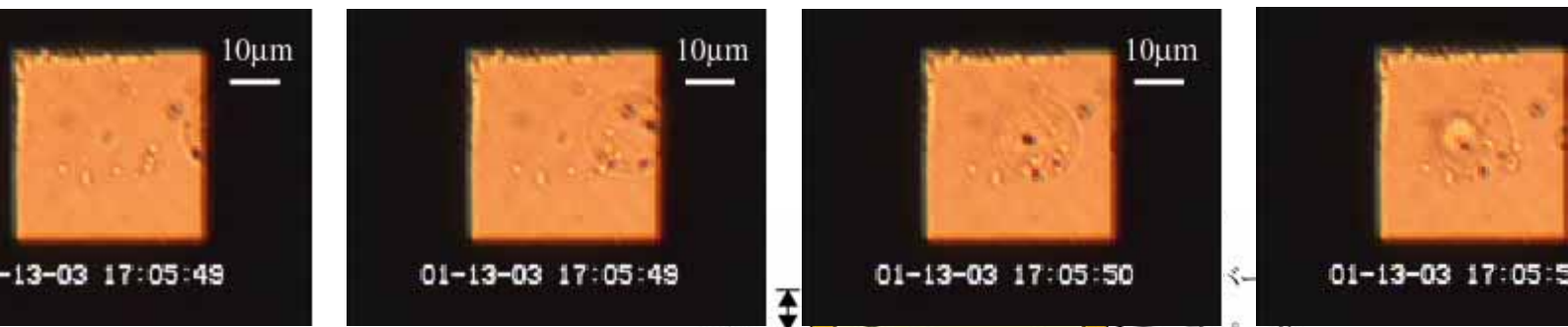
シリコン基板両面に酸化膜薄膜を堆積し、図 1 a)の下側の酸化膜薄膜をマスクとしてシリコン基板の異方性エッチングを行い、上側の酸化膜薄膜の裏打ち構造を作製した。最後に、固体紫外パルスレーザー（(株)ネオアーク製）を用い、短時間酸化膜に照射し、レーザーアブレーションにより薄膜の中心部に微細オリフィスを作製した。図 1 b)に微細オリフィスの反射顕微鏡像を示す。図中の四角の領域がエッチングにより両面露出した薄膜部分であり、中央の黒点が微細オリフィスである。

2.2 細胞の吸引固定

次に、上記の方法にて作製された微細オリフィスに細胞を吸引・固定する手法の開発を行った。細胞吸引固定装置の模式図を図 2 に示す。オリフィスプレートを上にして、支持構造の裏面に PDMS (Polydimethylsiloxane, シリコンゴム)をシールとしてカバーガラスを取り付ける。PDMS シールの 1 箇所にはパイプが取り付けられており、シリンジポンプを用いて吸引を行えるようになっている。細胞の吸引固定の手順を以下に示す。

1. 微細オリフィス下側のチャンバー内を 0.1M グルコース溶液で満たし、基板上に細胞懸濁液を滴下する。
2. シリンジポンプを引き、オリフィスに向かう流れを生じさせ、懸濁液中の細胞をオリフィスへ吸引・固定する。
3. 0.1M グルコース溶液を用いて固定されている細胞以外の余分な細胞を洗い流す。

図 3 は細胞の吸引固定を経時的に観察したものである。微細オリフィス周辺に浮遊している細胞が、シリンジポンプを吸引することにより、微細オリフィスに向かう流れにより引き寄せられ、オリフィス上に固定されている様子が分かる。



a) $t=0[s]$

b) $t=0.5[s]$

c) $t=1[s]$

d) $t=1.5[s]$

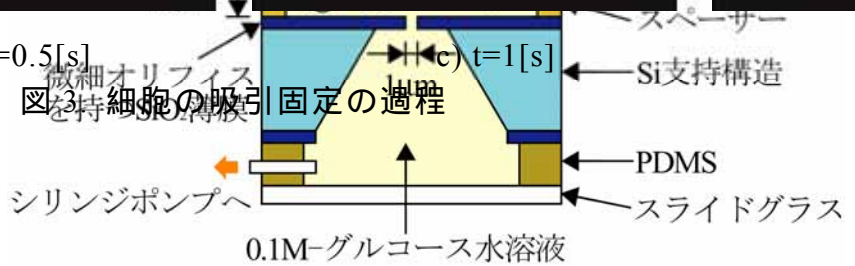


図 2. 細胞の吸引固定装置

3. 細胞膜の平面展開法

3.1 細胞の多点固定

細胞膜内面を容易に露出できるように、複数個の微細オリフィスを作製し、細胞を吸引固定する手法を開発した。この手法により、細胞膜内面をAFMで観察する際には、オリフィス間のプレートが膜の弾性変形を防止する基板となることが期待される。

今回の実験では3点の微細オリフィスを同一プレート上に作製し、細胞の吸引固定を行った。図5 a)は間隔 $6\mu\text{m}$ の3つのオリフィスを作製した基板であり、図5 b)において3点全てにおいて吸引固定されている様子が分かる。このように細胞を多点固定した後、基板上に展開すると、微細オリフィスで囲まれた平面において細胞膜を基板により裏打ちされた状態で固定できる。これにより膜の弾性変形を防止して、細胞膜内面のAFM観察が可能となる。

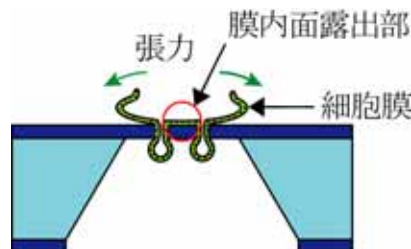
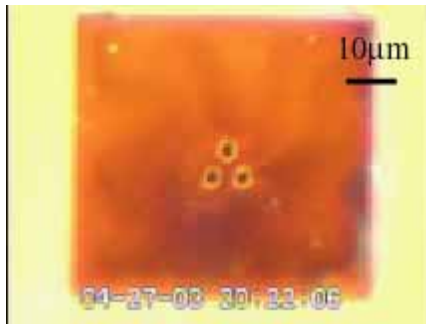


図 4. 細胞の多点固定模式図



a) 三点固定基板



b) 三点固定された細胞

図 5. 細胞の三点固定

3.2 赤外レーザーを用いた細胞膜の破壊

波長 $1.4\mu\text{m}$ のレーザーを用い，細胞内にフォーカスしてパルス状に照射することにより，焦点付近の水を蒸発させ，気泡（マイクロバブル）を発生させて，この圧力で細胞膜を破裂させて細胞膜の展開および内容物の除去を行う手法を試みた。用いたレーザーは CW，パルス幅は，光路に入れた遮光板をメカニカルに動かすことにより制御され，約 500ms である。

今回の実験では，簡単のため，図 6 に示すように細胞接着因子である cell-tak (BD Biosciences 社) をスライドガラス上に塗付し，その上に固定された細胞に赤外レーザーを照射した時の応答の観察を行った。実験手順を以下に示す。

1. cell-tak を塗布したスライドガラス上に細胞懸濁液を滴下し，10 分間放置する。
2. 細胞に赤外線レーザーを照射し，細胞膜の展開を行う。その様子を顕微鏡で観察する。

図 7 にマイクロバブルを発生する出力（約 40mW，対物レンズ後）における赤外線レーザー照射前後の細胞の様子を示す。図 7 a) は赤外線レーザー照射前の細胞の透過顕微鏡観察像である。細胞内部に赤外線レーザーの焦点を合わせ，照射すると図 7 b) に示すようなマイクロバブルが生じる。この気泡が冷却により収縮した後の写真が図 7 c) で，細胞膜がかなり拡張されているが，膜としての形は残っていることから，実際の細胞膜はかなりの余剰面積を持っていたことが推定される。

本実験では細胞膜自体が拡張されてしまっているが，図 5 のような多点固定をうまく用いれば，気泡発生にともなう応力の，基板に接触している膜への伝達を防げるので，この部分の膜上の構造は保存したままでの展開が可能になるかもしれない。また，この実験ではレーザーのパルス幅が長く，かつきちんと制御されていないが，制御された短いパルス幅を用いることにより，細胞への機械的・熱的ダメージの抑制をはかる必要がある。現在，これらの点に関して検討を進めている。

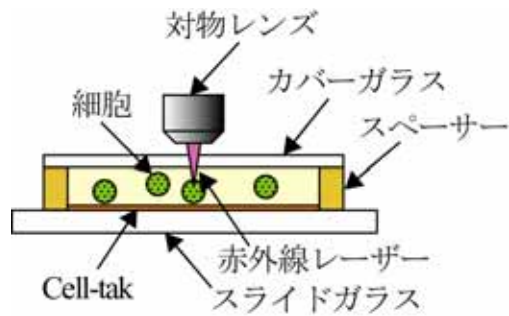


図 6. 赤外線レーザーによる細胞膜展開の模式図



a) 固定細胞

b) 細胞内レーザー照射
による気泡の発生

c) 破裂後の細胞

図 7. マイクロバブルによる細胞膜展開

4. パッチクランプ法への適用

細胞の吸引固定を行った時，細胞膜 微細オリフィス間の密着が不完全である場合，電圧印加によりその部分から電流が流れる。その電流をリーク電流，またその際の抵抗値をシール抵抗と呼ぶ。一方，細胞膜 - 微細オリフィス間の密着が完全である場合，シール抵抗値は $1\text{G}\Omega$ に達し，イオンの拡散による電流雑音は数百 nA 程度となる。この状態をギガ・シールと呼ぶ。ギガ・シール達成により雑音成分の無い (S/N 比の高い) 単一イオン電流を計測することができる。本研究では，イオンチャンネルを通過する単一イオン電流を実時間で計測することを目的として，細胞の吸引固定により細胞膜 微細オリフィス間を高抵抗で密着させ，ギガ・シールを再現性良く達成する装置の開発を行う。

4.1 実験装置

本実験において用いたシール抵抗計測装置について図 8 に示す。基板両側を満たす溶液中にそれぞれ Pt 電極を浸し，パルス電圧を印加して，細胞吸引固定後のシール抵抗を計測する。本実験での印加パルス電圧は 10mV ，パルス幅は 20msec である。リーク電流の計測は，微小電流計測装置 picoammeter (keithley 社) を用いて計測を行った。また，単一イオンチャンネル電流を計測する際には，周囲の環境を生体内と同様の条件にする必要がある。そのため，本実験では細胞懸濁液として，比較的短期

間細胞の生存を維持できるように調節された無機塩類とグルコースの混合溶液から成るタイロード液を用いた。

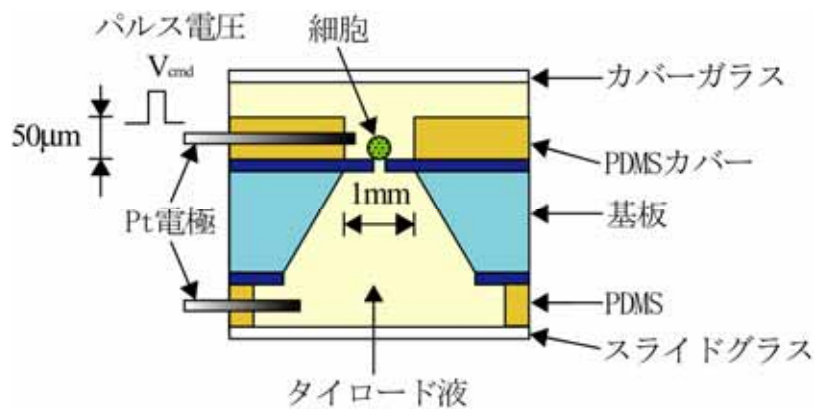


図 8. シール抵抗計測装置

4.2 絶縁処理基板を用いたシール抵抗の計測

PHPS スピンコートにより絶縁処理を行った基板を用いて、細胞の吸引固定を行い、シール抵抗の計測を行った。PHPS (ポリシラザン) とは $-(\text{SiH}_2\text{NH})-$ を基本とする無機ポリマーで、加熱すると大気中の水分と反応し、高純度のシリカガラスへ転化するとされている。図9に使用した基板の模式図を示す。絶縁処理を施したことにより、微細オリフィスを通して流れる電流のみを計測することができる。シール抵抗の計測を行った結果、

吸引固定前 (オリフィス抵抗値) : $0.78 \text{ M}\Omega$

吸引固定後 (シール抵抗値) : $20 \text{ M}\Omega$

となり、ギガ・シールに至らなかった。この原因として、レーザーアブレーションによる微細オリフィス加工では、微細オリフィスの形状が再現性良く円筒状にならず、歪な形状を呈してしまい、結果、微細オリフィス 細胞膜間の接着性が悪くなることが考えられる。図10にレーザーアブレーションによる微細オリフィス加工後の SEM 観察像を示す。この図から分かるように、微細オリフィスは歪な形状を呈している。ガラスピペットを用いたパッチクランプ法においても、ピペット先端部を heat polish して滑らかにしてやることにより、ギガ・シールの再現性を向上させている。そのため、微細オリフィス・エッジを滑らかにしてや

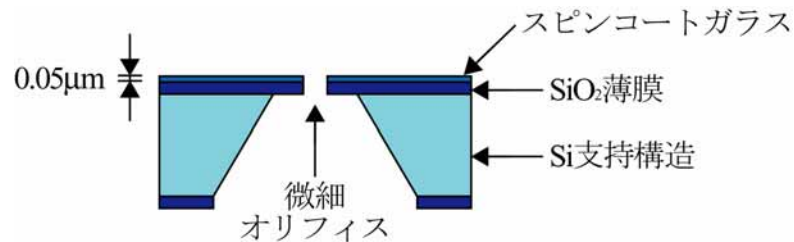


図9. 微細オリフィスを作製した PHPS コート基板

る操作が必要となる。

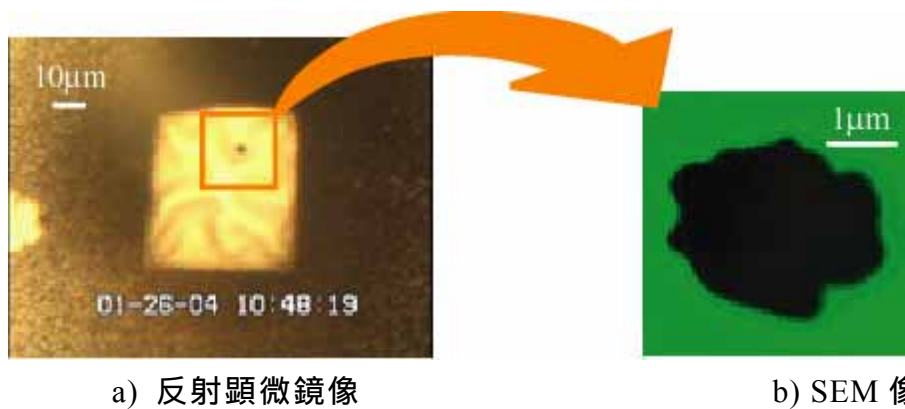


図10. レーザーアブレーション後の微細オリフィス形状

4.4 パリレンコーティングによる微細オリフィス・エッジの平滑化

微細オリフィス・エッジを平滑化し、またレーザーアブレーションによりオリフィスプレートに生じる可能性のあるナノクラックの除去を行うため、パリレンコーティングを行った。パリレンコーティングとは、環状二量体であるジパラキシリレン (DPX) を低圧下において加熱して気化させ、さらに高温で熱分解させることにより発生するラジカルパラキシリレンを基板上に付着させ、パラキシリレンの重合により成膜を行う化学蒸着によるコーティング法である。この手法により基板上に均一の厚さにパリレンを成膜することができるため、図 11 に示すように、微細オリフィス・エッジにパリレンを堆積させて、微細オリフィス・エッジの平滑化およびナノクラックの除去を試みた。本実験ではパリレンコーティングによる微細オリフィス・エッジの平滑度を高めるために、直径約 $4\mu\text{m}$ の微細オリフィスを作製し、約 $1\mu\text{m}$ のパリレンを堆積させる。パリレン C のコーティング条件は気化温度 170°C 、熱分解温度 690°C 、真空度 2kPa である。

図 12 にパリレンコーティング前後における微細オリフィスの観察像を示す。SEM による観察から、前出の図 10 b) のレーザーアブレーション後の微細オリフィスと比較して、エッジ部が滑らかになっている様子が分かる。

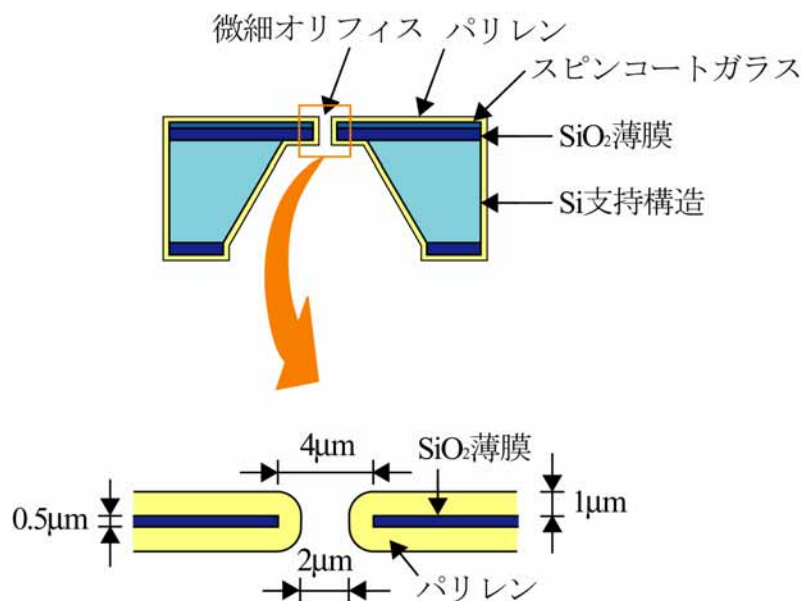
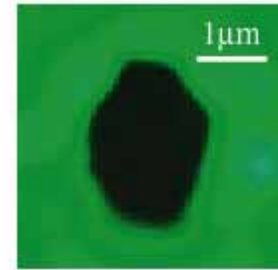
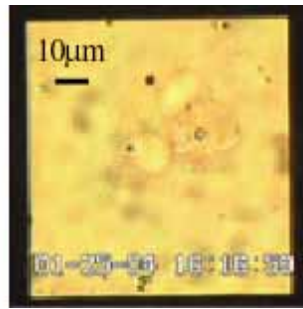
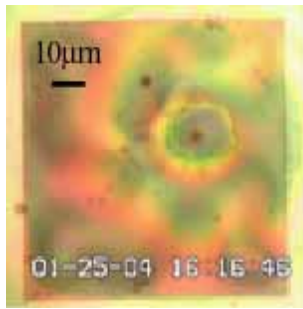


図 11. パリレンコーティングを行った微細オリフィス模式図



a) 反射顕微鏡像

b) 透過顕微鏡像

c) SEM 像

図 12. パリレンコーティングによる微細オリフィスの様子

4.5 アミノパリレンコーティングによる微細オリフィス・エッジの化学修飾

微細オリフィス表面に化学修飾を行うことにより、微細オリフィス・細胞膜間の接着性が高くなり、高い再現性でギガ・シールが得られると考えられる。そこで、本研究では、表面にアミノ基が付いている 4-amino-[2.2]paracyclophane (アミノパリレン) をコーティングすることにより、微細オリフィス・エッジの化学修飾を行った。コーティング条件は気化温度 200 °C、熱分解温度 750 °C、真空度 2kPa である。

図 13 に示すように、パリレンコーティングを行った微細オリフィス・エッジにアミノパリレンを堆積させて、微細オリフィス・エッジの化学修飾を行った。アミノパリレンは、基板に直接成膜すると剥がれやすいため、成膜する際にはパリレン C を成膜した後、アミノパリレンコーティングを行う。本実験では、直径約 4 μ m の微細オリフィスを作製し、約 1 μ m のパリレンを堆積させた後、約 0.2 μ m のアミノパリレンを堆積する。

また、図 14 にアミノパリレンコーティング前後における微細オリフィスの観察像を示す。SEM による観察では、エッジ部が滑らかになっている様子が分かる。

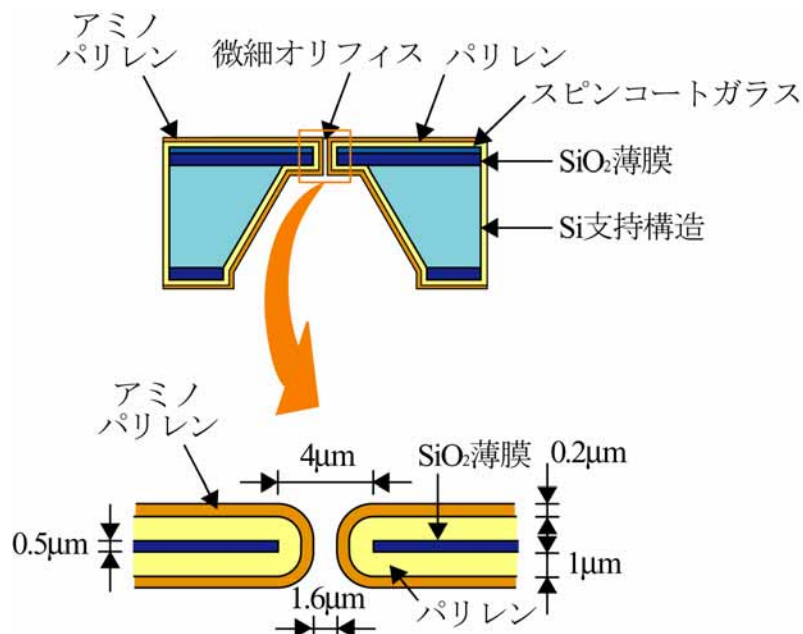
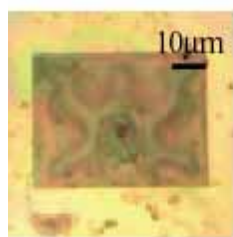
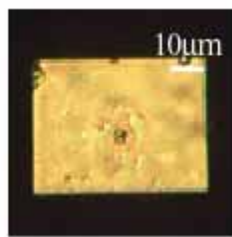


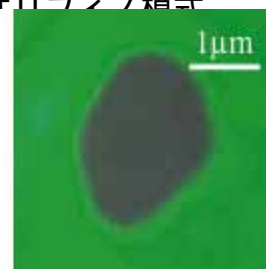
図12 アミノパリレンコーティングを行った微細オリフィス構造



c) 反射顕微鏡像



d) 透過顕微鏡像



e) SEM 像

図14. アミノパリレンコーティングによる微細オリフィスの様子

4.6 平滑化处理した基板および化学修飾した基板を用いたシール抵抗の計測

以上のようにして作製した基板を用いて、細胞の吸引固定を行い、シール抵抗の計測を行った。計測したリーク電流の結果を示す。

[平滑化处理した基板]

- ・吸引固定前（オリフィス抵抗値）：1.6MΩ
- ・吸引固定後（シール抵抗値）：30MΩ

[化学修飾した基板]

- ・吸引固定前（オリフィス抵抗値）：0.5MΩ
- ・吸引固定後（シール抵抗値）：8MΩ

となり、ギガ・シールに至らなかった。現時点でギガ・シールの達成はならなかったものの、細胞膜の酵素処理や、基板に構造上の工夫を行うことにより、達成できると考えている。

5. 結論

細胞内にパッキングされた細胞内ネットワーク，特に細胞膜・核膜上とその周辺のネットワークを，生体内での機能を損なう事無く人工基板上へ平面展開し，高い分解能での観察・外来分子との相互作用・外部刺激に対する応答の計測等を行うこと，および 微細オリフィス上に固定した細胞膜に含まれるイオンチャンネルについて，高い時間分解能で単一イオンチャンネル電流を計測することを目的とし， について，微細加工技術を用いて人工基板上に作製された直径 $1\mu\text{m}$ 程度のオリフィスに細胞を吸引・固定する手法と装置，膜展開の手法，およびレーザーを用いた細胞手術法の開発，また について，細胞の吸引固定による手法を用いて，微細オリフィス 細胞膜を高抵抗で密着させ，再現性良くギガ・シール達成可能となるパッチクランプ用基板の開発を行った。その結果は以下に要約される。

[について]

1. シリコン基板上に酸化膜薄膜を堆積し，裏面から異方性エッチングでシリコン基板をエッチングして機械的強度を持つ裏打ち構造を作製し，最後に酸化膜薄膜の中心にレーザーにより穿孔する手法を開発し，所定のオリフィスを得る事に成功した。
2. シリコン樹脂により細胞吸引の為に微小流体回路を製作し，吸引する事によりオリフィスに細胞を強固に固定出来る事を実証した。
3. 複数個の微細オリフィスを用いて細胞を吸引する事により，細胞膜に予めプレストレスをかけた状態にしておく事が出来，また3点以上の微細オリフィスを用いる事により，その微細オリフィスで囲まれた平面において細胞膜を基板により裏打ちされた状態で固定できる事が分かった。これにより細胞膜裏面の AFM 観察が可能になる。
4. 赤外レーザーを細胞内部に絞り込んで照射する事により発生する急激に膨張する気泡を利用して細胞膜を展開する手法の実証を行った。

これらの手法を用いて，実際に細胞膜を展開して細胞膜裏面を露出し，細胞内ネットワークの観察を行うことが可能であると考えている。

[パッチクランプ用基板の開発について]

1. PHPS スピンコートを行うことにより，絶縁処理基板を作製することができ，ノイズ電流を除去することに成功した。
2. 直径約 $4\mu\text{m}$ の微細オリフィスにパリレンを約 $1\mu\text{m}$ コーティングすることにより，微細オリフィス・エッジを平滑化可能であることを示した。
3. パリレンコーティングによる平滑化を行った基板に，さらにアミノパリレンを約 $0.2\mu\text{m}$ コーティングすることにより，微細オリフィス・エッジを化学修飾することに成功した。
4. シール抵抗の計測可能な装置の開発を行い，シール抵抗の計測を行うことに成功した。

新たな構造上の工夫によりギガ・シールの達成が可能であると考えている。

参考文献

- [1] E.Neher and B.Sakmann: "Single-Channel Currents Recorded from Membrane of Denervated Frog Muscle Fibres", *Nature*, **260**, pp.799-802(1976)
- [2] O.P.Hamill, A.Marty, E.Neher, B.Sakmann and F.J.Sigworth: "Improved Patch-Clamped Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches", *Pflügers Arch*, **391**, pp.85-100, (1981)
- [3] Masato Tanabe, Jiro Makinodan, Kengo Suzuki, Yoshiyuki Hosokawa, Satoshi Konishi, Nobuhiko Ozaki and Hiroaki Oka: "Development of micro channel array with detecting electrodes for electrophysiological biomedical sensor", *Proc. Mems 2003*, p. 407-409 (2003)
- [4] A. Tixier, L. Griscom, K. Cozic, H. Nagai, B. Le Pioufle, Y. Murakami, E. Tamiya and H. Fujita:"Bio-microsystem for gene therapy to catch cells as an array", *IEEE-EMBS 2000*, pp. 36 (2000)