

「微細加工技術を用いた細胞計測の研究」

今井 雄一郎

1. 序論

細胞は、細胞膜にあるチャンネルを通じて、外部とのシグナル伝達や物質の搬入・排出を行う。このチャンネルの動作をリアルタイムで計測する手法としては、パッチクランプ法[1]があるが、通常この手法ではガラス毛細管を用いるため、物質輸送のコンダクタンスが小さく、薬剤の供給などが困難、並列化が困難などの問題点があった。この問題を解決するため、微細加工技術により製作される平面状のオリフィスアレイを用いる手法が近年様々な研究機関において開発されている[2]。本研究においても、シリコン基板上的酸化膜や窒化膜に直径 $1\ \mu\text{m}$ 程度のオリフィスを加工し、ここに細胞を吸引・固定して膜計測を行う手法と装置の開発を行ってきた。

しかしながら、これらの研究においては、パッチクランプ法で要求されるリークタイトなシールを実現するための加工条件については、十分に明らかにされているとは言い難い。また、デバイスを構成する材料についても、応用面からはコンタミネーションを防止するためには使い捨てのデバイスであることが望ましいが、シリコンの微細加工によるデバイスは高コストで、この要求をみたせるものではない。

そこで、本研究では、まず、リークタイトな細胞の固定を行うための微細加工孔に要求される条件を明らかにし、次に、リークタイトな固定をローコストで実現するための手法として、有機薄膜にオリフィスを穿孔し、この膜の表面を細胞接着性物質でコーティングする手法を開発した。そして、その応用例として、生体膜の電気穿孔を行った際の、膜の自復に要する時間の計測を行った。

また、この研究過程において、細胞の一部がオリフィスを通過する程度の条件で吸引を行った場合、細胞を破壊することなく、流体力により複数の小胞に分割できることが発見された。この技術は、細胞内小器官の分画や、脱核に代わる操作としての応用が期待される。

本論文では、これらの微細オリフィスを用いた細胞操作・計測技術に関して報告する。

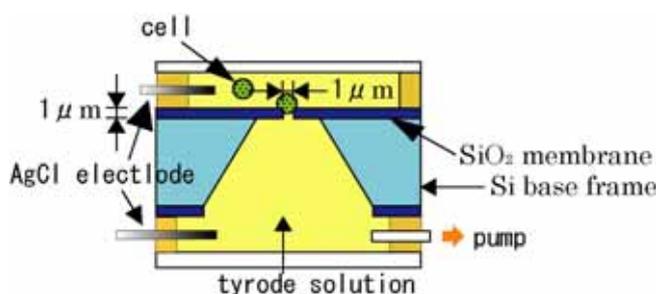


Fig.1 Measurement of cell membrane using a microfabricated orifice

2. マイクロオリフィスを用いた細胞膜計測

2.1. 計測装置について

ここで用いた装置を図1に示す。直径約 $1\ \mu\text{m}$ のオリフィスを持つシリコン酸化膜（以下オリフィスプレートと呼ぶ）が、補強のための構造で支持されており、その両側に液槽を設けている。下側の槽を緩衝液で満たした後に上側の槽に細胞懸濁液を導入し、顕微鏡下で観察しながら、下側の槽を徐々に減圧すると、流体力により細胞がオリフィス上へと運ばれ、吸引・固定される。これと同時に、上下の槽それぞれに浸漬させている電極間のインピーダンスを計測することにより、オリフィスに固定された細胞膜上にあるイオンチャンネルのコンダクタンスを計測する（つまり、パッチクランプ法を行う）。

2.2. オリフィスの加工精度のパッチクランプへの影響

以上から、細胞膜上のチャンネルの計測を行うためには、細胞膜とオリフィスプレートが密着し、両者の隙間を流れる電流（リーク電流）がチャンネルを流れる電流より十分小さくなる必要があります。具体的には、リークの抵抗値が 1 G 以上であること（いわゆるギガシール）が必要とされている。

本研究室では、これまでに固体紫外パルスレーザー（波長：355nm，繰り返し周波数：60kHz，（株）ネオアーク製）でオリフィスを作製し、このオリフィスを用いてパッチクランプを試行したが、ギガシールは達成できなかった。そこで、オリフィス形状をSEMを用いて調べたところ、図2a)のようにイレギュラーな形をしており、これが細胞膜とオリフィスの密着を妨げ、大きなリーク電流を生むと考えられた。

そこで、FIB（Focused Ion Beam（株）日立製作所製 FB - 2000A，0.2nA）を用い真円度の高い直径 $1\mu\text{m}$ のオリフィスを製作した（図2b）。そして、これを用いて、細胞の吸引固定にともなうリーク電流を波高値 50mV，パルス幅 20ms のパルス電圧を間欠的に印加することにより計測した結果が図3である。用いた細胞はヒト単球性白血病由来の U937 細胞である。

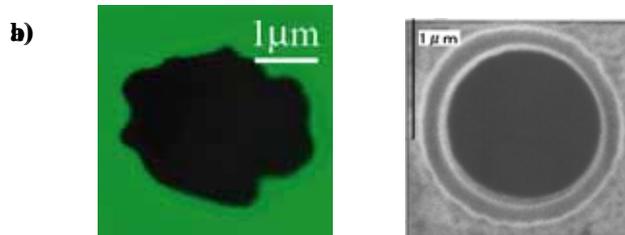


Fig2. SEM image of fabricated micro orifices
a) fabricated by UV laser, b) fabricated by FIB

細胞は、図3の a)に示した時点でオリフィス直近に到達し、b)でオリフィス内に引き込まれ電流が減少しはじめる。c)の時点で、細胞の一部がオリフィスの反対側に引き出され、小球状の形状になる（図6a)の模式図参照）。細胞膜は、オリフィス壁面とよく密着するため、リーク電流が急激に減少する。d)では、シール抵抗 7 G が得られた。なお、図 b)-d)の写真にはシリコン酸化膜の下側に形成された小球状の構造の輪郭が見える。

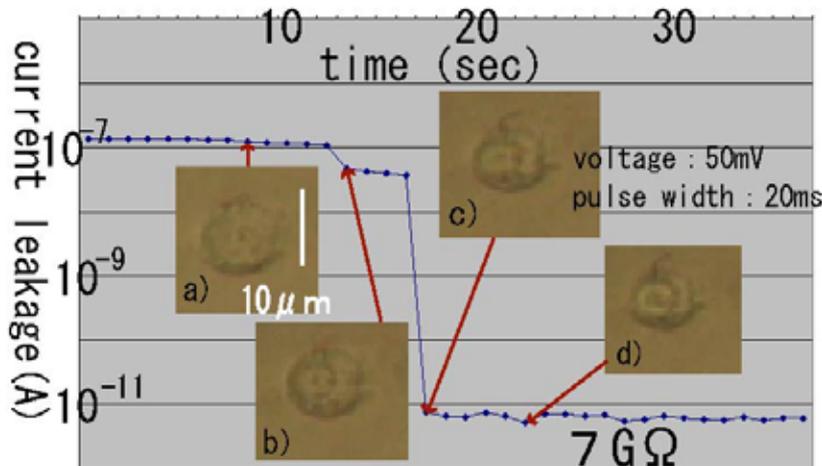


Fig.3 Time course of the leakage current a) cell above the orifice, b) being trapped by suction, c) partial penetration of the cell into the orifice at which instance giga seal is achieved, d) stable giga seal

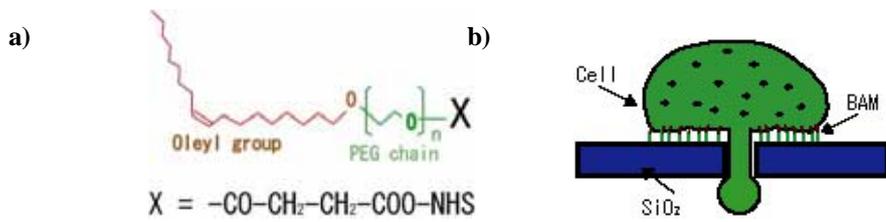


Fig.4 Leak-tight immobilization of a cell onto the orifice using the cell-anchoring agent.

a) Molecular structure of BAM, b) A schematic of the principle.

2.3. 細胞接着物質を用いたデバイス作製

前節では加工精度の良いオリフィスを用いてギガシールの形成に成功したが、FIBによる1つのオリフィス加工に20分もの時間を要し、実用的でないばかりか、エッチングによる図1の構造の作製は高価でもある。そこで、加工精度の悪いオリフィスや廉価な基板材料を用いても高いシール度を得るために、細胞接着性コーティングを用いる手法を開発した。すなわち、図4 b)に示すように、基板を細胞接着性物質でコーティングすることで、オリフィス壁面のみならず、基板の平面部分でも密着させ、高いシール抵抗を実現しようとするものである。

用いた細胞接着性物質はBAM (Biocompatible Anchor for cell Membrane, 日本油脂(株)製, 図4 a))であり、片側にオレイル基, 反対側にNHS (N-ヒドキシスクシンイミド)基を持ち, それらをPEG(Polyethylene Glycol)がつなぐ形をしている。NHS基は基板にBAMを固定するためにあり, 疎水性のオレイル基は細胞膜にささり, 細胞を基板へ固定させる。PEGはスペーサであり, オレイル基が柔軟な運動をするために必要だが, 長すぎるとリークの原因ともなり得る。ここでは, 市販のBAMのうち, PEGが4000個繋がったものを用いた。NHS基はアミノ基を標的に結合するため, 基板にまずBSA(ウシ血清アルブミン)を吸着させ, これの持つアミノ基にBAMを結合させた。また, オリフィスプレートの材料には, 薄膜フィルムとして, 入手や加工が容易で, 機械的強度が高いポリイミドフィルム(厚さ7.5 μ m)を用い, 紫外線レーザーで直接穿孔することにより約4 μ mのオリフィスを製作した。

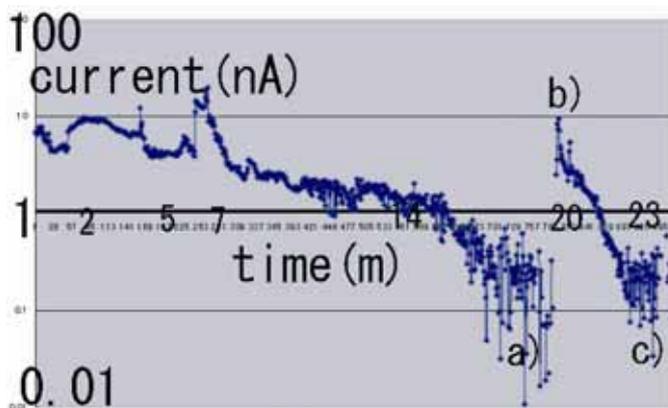


Fig5 Time course of the leakage current as the cell membrane is anchored onto the orifice by BAM(measured with 20 mV, 20 ms)

2.4. 細胞接着物質を用いたデバイスの評価

以上のように製作したオリフィスプレートの評価を, カイワレダイコンの茎のプロトプラストを

用いて行った。用いた装置は図1と同様である。吸引を開始しプロトプラストをオリフィス上に固定させた($t = 1$)。さらに強く吸引することによりオリフィスに接している細胞膜をより引き込んで破壊すると、細胞上側の細胞膜がオリフィス周辺に降下させて展開・接着した($t = 6$)。以上の過程におけるオリフィスのコンダクタンスを波高値20mV,パルス幅20msのパルス電圧を印加することによりモニターしたものが図5である。細胞膜をオリフィス上に展開して13分後にシール抵抗値が約100M Ω へと上昇した(図5 a))。オリフィスの径が通常のパッチクランプより大きいことを考慮すると、これはほぼギガシールの条件に相当する。ここで、2V,20msのパルス電圧を10回印加したところ抵抗値が約2M Ω (図5 b))となり、3分後にシール抵抗値が約100M Ω と回復した(図5 c))。生体膜に1-2V程度のパルス電圧を印加すると、一過的な膜穿孔が生じ、ある時間の後に自復することが知られている(エレクトロポレーション)が、図5の結果は、この過程を捉え、その自復に要する時間が約3分であることを示したものと考えられる。

3. 微細オリフィスによる細胞分割

以上の研究過程において、細胞がオリフィスを通り複数的小胞に分割されることが観察された。図6 d)はその写真で、模式図 a)-c)に示すように、a) オリフィスに引き込まれた細胞の一部が小球化する、b) もとの細胞と小胞をつないでいるチューブ状の膜が、膜の張力に由来するインスタビリティにより細くなる、c) このプロセスの繰り返しにより多数の小胞が出現する、という過程による

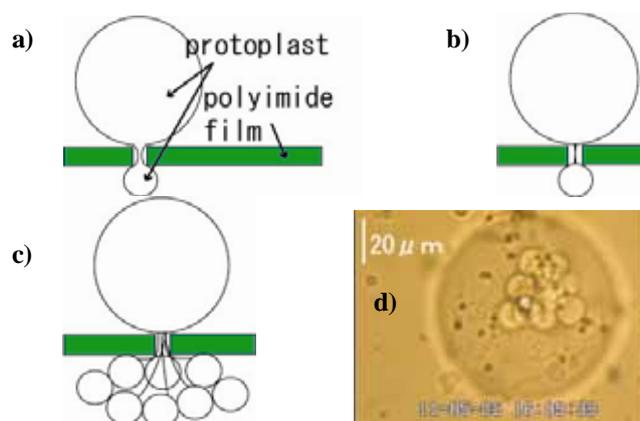


Fig6 Division of a protoplast into vesicles using a micro-orifice

- a) partial suction of the protoplast membrane into the orifice
 b) breakage of the connecting tubular membrane c) multiple vesicles are formed d) bright-field microscopic view from the top

ものと思われる。小胞間をつないでいるチューブ状の膜は流体力により消滅するが、膜のリコネクションが生ずるためか、プロトプラストまたは小胞の破壊はなかった。

このような現象は、実験時にパルス電圧を印加しつづけた時にのみ観察された。この現象には、プロトプラストの持つ柔らかい膜構造と電圧の印加による膜の裏打ち構造の破壊などに起因する高い生体膜の流動性が必要である可能性がある。

4. 結論

1. パッチクランプにおいてリークタイトな固定を行うためには、オリフィスの形状が重要なファクターであることが判明した。FIBを用いることにより、表面粗さの小さい真円形状のオリフィスを作製し、ギガシールを実証した。
2. より低コストな材料および加工法によるリークタイトなオリフィス作製のため、細胞接着物質でオリフィスプレート表面をコーティングする手法を提案し、表面での細胞の固定を確認した。
3. 2.の手法の応用として、細胞膜の電気穿孔および自復の過程の観察を行った結果、自復に要する時間は約3分であると計測された。

4. プロトプラストを吸引してオリフィスを通過させることにより、複数の小球状の小胞に分割できることを発見した。

特に4は、現在は遠心力等を利用して行われる細胞分画[3]を置き換えるマイクロデバイスへの応用として、今後の発展が期待される。