マイクロメカニカルデバイスを用いた 1対1細胞融合技術の開発*

河村喜雄** 田中伸司** 佐藤一雄** 内田憲孝*** 小比田啓之†

Development of One-to-one Biological Cell Fusion
Technique using Micromechanical Devices

Yoshio Kawamura, Shinji Tanaka, Kazuo Sato, Kenko Uchida and Hiroyuki Kohida

A cell fusion technique using micromechanical silicon devices has been developed. It permits a number of one-to-one cell fusion operations between two different biological cell groups to be carried out simultaneously, instead of the conventional collective fusion operation. A matrix array of 1584 microchambers, each containing a single pair of cells, have been fabricated on a 3-inch silicon wafer. Fusion of the paired cells is induced by electric pulses applied between electrodes embedded in the microchambers. In order to feed a pair of cells from two different cell groups to every microchamber, a cell carrier made of a silicon wafer has been developed. A single cell particle is absorbed to and released from the port of the carrier plate. The carrier plate is transferred over the microchamber plate and simultaneously releases cells into the microchambers. Repeating this operation independently for the cell groups A and B, a single pair of AB is formed in every microchamber. It is observed that pairs of lettuce cells are successfully fused in the microchambers.

Key words: biological cell, cell fusion, micromachining, micromechanical, silicon wafer

1. 緒 言

半導体プロセス技術を利用して、単結晶シリコン基板上に微細な機構部品を作り、その特質を活かした新しいマイクロシステムを開発しようとするマイクロメカニクスの研究が1970年代後半からIBM社、Stanford大学等で行われ始めた¹⁾²⁾。マイクロメカニクスが対象とする構造体は代表寸法が数～数百 μm にわたるものであり、LSIのような平面的な加工技術に加えて3次元的な微細加工技術(マイクロマシニング)が要求される。我々は単結晶シリコンのKOH水溶液による異方性エッチングを用いたマイクロマシニングの研究を行ってきた^{3)~6)}。本論文では、この技術をバイオテクノロジーに応用して開発した、新しい細胞操作手段について報告する。

食品、医薬の分野で有用な新品種の植物を育種する

上で、細胞融合は有力な方法の一つである。融合による育種においては、目的とする組合せで融合した細胞を $10^3 \sim 10^4$ 個培養して、新しい形質を持った植物体が育つことを評価する必要がある。

従来、2種類の細胞A、Bを融合する場合には、これらを一つの容器の中で集団的に混合して融合処理を施している⁷⁾。その結果、融合処理後の容器中において、ABの組合せで融合した細胞粒子の存在する確率は全粒子の1%以下にすぎない⁸⁾。細胞の懸濁液の中から、所望の細胞を1個1個顕微鏡下で選抜し、数百個以上集める作業が必要とされるが、熟練者でも1時間当たり十数個程度しか選抜できないと言われている。ここに、大量の細胞を選抜したり、個別に取り扱うための技術の開発が望まれており、例えば、一方の細胞にマーカを付けて融合後に選抜する装置⁹⁾やマイクロポンプを用いて細胞を個々に扱う研究¹⁰⁾が報告されているが、それぞれ、細胞にダメージを与えること、時間当たりの処理能力が低いことなどの課題がある。

我々の研究の目的は、大量の植物細胞を個別に操作する技術を開発することにある。シリコンのマイクロマシニングを応用して、大量の細胞を一つ一つ扱う

* 原稿受付 平成元年7月6日、1989年度精密工学会春季大会学術講演会(平成元年3月23日)にて発表

** 正会員 (株)日立製作所中央研究所(国分寺市東恋ヶ窪1-280)

*** (株)日立製作所基礎研究所

† (株)日立製作所中央研究所

ールを開発し、これを用いて新しいコンセプトの1対1細胞融合装置を実現した。開発した微細ツールは、①融合すべき細胞ペアを1組ずつ収容し、電氣的にこれを融合させる約1600個の微小容器（マイクロチャンバ）と、②マイクロチャンバに細胞を1個ずつ一括して注入する細胞搬送器（キャリア）であり、いずれも3インチの単結晶シリコンの基板上に形成した。さらに、これらのツールを用いて、マイクロチャンバに一括して細胞を1個ずつ注入する細胞ハンドリング機構を開発した。一方、マイクロチャンバ内での電氣的融合条件の最適化を図り、1対1細胞融合装置としての機能を確認した。これにより、所望の組合せの細胞対を大量に作り、それぞれの1対1ペアを独立に融合させることが可能になった。

2. 1対1細胞融合のコンセプト

従来の集団的な細胞融合法と本研究で開発した1対1細胞融合法との比較を図1に示す。図(a)に示す従来の方法では、2種類の細胞A、Bを集団的に混ぜ合わせて融合処理していた。融合処理としては、ポリエチレングリコール(PEG)を用いた化学的融合処理や、数mm間隔の電極間に高周波電圧を印加して電気泳動により細胞同士を接触させ、その後数kVの電気パルス印加して行う電氣的融合処理が行われている。細胞に与えるダメージが少ないという理由から、最近では電氣的融合処理が多く行われている。いずれの処理においても、従来は細胞を集団として扱っているため、融合処理後に得られる細胞の中には、AA、AB、BB、AAB、ABB、…、A、Bというように、所望のAB以外の組合せや未融合の細胞が混入してい

Fig.1 Comparison between conventional and one-to-one fusion operations

Fig.2 SEM photograph of the surface of a microchamber plate

Fig.3 Structure of a microchamber plate

る。従って、目的とする細胞の選別のため、顕微鏡下でのピックアップ、あるいは所望の細胞のみが生き残る選択培地の開発等、多大な労力が費やされている。

本研究で開発した図(b)に示す1対1細胞融合法は、あらかじめAとBの細胞をマイクロチャンバに1個ずつ入れて、電氣的融合を行うものである。この方法によれば、融合した細胞が所望のABの組合せとなる確率が飛躍的に高まることが期待される。

3. 細胞操作ツール

細胞操作のマイクロチャンバプレート^{1,2)}とキャリアプレート^{1,2)}の構造と機能、製法について述べる。

図2はマイクロチャンバプレートの表面の拡大写真である。1ペアの細胞を収納するマイクロチャンバがピッチ間隔770 μmで36×44のマトリクス状に1584個並んでいる。図3はその断面の構造を示す拡大図である。マイクロチャンバプレートは2枚のシ

リコン基板を重ねあわせた構造である。上部のプレートは、細胞を等張液の流れによってチャンバ内に導くため、四角すいのテーパ状の貫通穴を持っている。下部のプレートには $10 \times 80 \mu\text{m}$ のスリットとこれをはさむ一対の電極が形成されている。直径 $20 \sim 100 \mu\text{m}$ の細胞は、微小な負圧によって下部のプレートのスリット上に吸引固定される。融合すべき1ペアの細胞が互いに接触してスリット上に固定された状態で、電極間にパルスを印加すると、2個の細胞の接触部の膜が破れて融合が始まる。

各プレートの加工には、化学的異方性エッチングを用いた。KOH水溶液でシリコンをエッチングする際に、基板の面方位を $\{100\}$ に選び、矩形のマスクパターンの一辺を $\langle 110 \rangle$ に平行に合わせると、図2に示すようにサイドエッチングのない、精密な形状が得られる。図の四角すい面は、すべて $\{111\}$ で構成されている。特に細胞を保持する下部のプレートの加工では、基板の表と裏からエッチングして作るスリット寸法の均一性が要求される。異方性エッチングで形成する表裏のパターン合わせ用の貫通マーク等の開発により、1584か所のスリット寸法のばらつきを数 μm 以下にすることができた¹³⁾。

下部のプレートの電極は、金を蒸着して形成し、リフトオフの手法でパターンニングした。各プレートは、機械的なクランプによって互いに位置決め固定され、それぞれ分解して洗浄、オートクレーブできる。

細胞を供給するためのキャリアプレートは、マイクロチャンバの配列と一致するマトリクス状の位置に、細胞を1個ずつ吸着、放出する機能を持つ1584個の吸着座で構成される。

図4はキャリアプレートの吸着座の拡大写真である。 $40 \mu\text{m}^2$ の四角すい状の吸着座の中に $10 \mu\text{m}^2$ の貫通孔を有する構造である。貫通孔は基板の裏面に通じており、裏面からの吸引、加圧によって、細胞を吸着、放出することができる。吸着座に細胞を1個だけ吸着すると貫通孔が塞がれるため、複数の細胞が1か所の

Fig.4 SEM photograph of an absorption port on a carrier plate

Fig.5 Crosssectional view of the cell delivery mechanism using carrier plate

Fig.6 Developed one-to-one cell fusion processor

吸着座に吸着されることはない。

図5は細胞のハンドリング方法を示す概念図である。図(a)に示すように、まず1種類の細胞を懸濁した等張液をキャリアプレートの下面に流し、背面から僅かな負圧で吸引すると、細胞が1個ずつ吸着座に吸着する。吸着していない余分な細胞を洗い流した後、図(b)に示すようにキャリアプレートをマイクロチャンバプレート上に移動し位置合わせする。次に、キャリアプレートの背面から加圧すると、細胞が一つずつ、しかも一斉にマイクロチャンバに注入される。この手順をA、Bの2種類の細胞についてそれぞれ行えばABのペアができる。

4. 1対1細胞融合装置

図6は1対1細胞融合装置の外観写真である。本体は幅700mm、奥行500mm、高さ250mmである。等張液を入れた水槽の底の中央にマイクロチャンバプレートが上向きに設置されている。キャリアプレート

Fig.7 Schematic crosssection of the cell fusion processor

Table 1 Liquid level

Level	Head value
A	0 mm
B	- 6 mm
C	- 2.6 mm
D	3.2 mm
E	0 mm
F	1.1 mm
G	3.0 mm

A-C: Accuracy ± 1 mm

Fig.8 Distribution of diameters of the lettuce protoplasts operated in experiments

は細胞AとBについて1式ずつあり、それぞれ左右からマイクロチャンバの上方に接近できる。図7は一式のキャリアプレートとマイクロチャンバプレートとの位置関係を示す装置の断面概略図である^{1,2)}。各プレートはそれぞれの保持板上に予めアライメントし、所定位置に設けた位置決めピンに保持板の端面を押し当てただけで、数 μm の精度で装置に着脱できる。

細胞融合に供する細胞は、酵素処理で細胞壁を除き、細胞膜だけになったプロトプラストすなわち裸細胞なので、膜内外の浸透圧差で破損したり小さな外力でも変形する。従って、そのハンドリングは等張液中で、数百Pa(数十mmAq)以下の水頭差を利用する方法で行う。脈動のない水頭差はサイフォンで得た。表1は水槽の液面の水位Aを基準とした時の各水位の設定値である。水位Bはマイクロチャンバプレートのスリットに細胞を吸引し、水位Cはキャリアプレートの吸着座に細胞を吸引する水頭差を与える。水位Dは細胞を吸着座から放出するときの加圧力を与える。キャリアプレートと供給板とで形成される流路に供給される細胞の懸濁液は水位Fの等張液で送られる。吸着座に吸着されない不要な細胞は水位Gの等張液で洗浄される。なお、配管内や吸着座、スリットに気泡が残っていると所定の水頭差が得られないので、予め等張液の脱気や配管系から気泡を除去することが大切である。

5. 実験結果

実験用細胞として、入手の容易さからサラダ菜のプロトプラストを用いた。単一の葉から採取したプロトプラストの粒径分布を図8に示す。粒径は平均値が約 $35\mu\text{m}$ で幅広く分布しており、規格化されない生物材料を機械的に扱うことの難しさの一因になっている。

Fig.9 Safe absorbing conditions of cells to the carrier related to the throughhole diameter and pressure difference between front and rear side of the plate

5.1 キャリアプレートへの細胞の吸引条件

細胞を損傷することなく、1個ずつ確実に吸着し、マイクロチャンバまで搬送するための吸引圧力の最適値を求めた。図9はキャリアプレートの吸着座の吸引条件を、200個の細胞を用いて、貫通孔の直径及び吸引圧力との関係に対して求めたものである。吸引時に、破損したり貫通孔を通り抜けることなく吸着座に残る割合を図中に残存率として表わした。吸引圧力を高めるほど、また吸引孔の寸法が大きくなるほど残存率は低くなる。同一吸引条件で残るものと残らないものがあるのは、細胞の大きさの違いや個体差によるものと考える。▲印は細胞が脱落せずに吸着可能な圧力の下限を示している。網かけした範囲の圧力で吸引すれば、細胞を確実に吸着できることが認められた。本装置の場合、直径が $20\sim 100\mu\text{m}$ の細胞を対象としているので、吸引孔の寸法は $10\mu\text{m}^2$ に設計し、吸引圧力は 260Pa (図7の水位Cに相当)とした。

5.2 流体による細胞の操作

キャリアプレートと供給板を近接させて $300\mu\text{m}$ 程度の間隙の流路を形成し、細胞懸濁液を供給する。キャリアプレートの吸着座で吸引する液の流量は極めて少ないので、細胞の懸濁濃度が低いと細胞が吸着座

Fig.10 Characteristic of rising velocity of carrier plate

に到達しない。5.1で設定した吸引条件で細胞が吸着座に吸引される領域は、吸着座を中心にして半径約 $50\mu\text{m}$ の範囲であり、この領域内に1個の細胞が存在するための懸濁濃度は約 $10^6\text{個}/\text{cm}^3$ である。

一方、通常精製可能な細胞の懸濁濃度は $10^5\text{個}/\text{cm}^3$ 程度なので、懸濁濃度を一桁高める必要があるため、懸濁液と細胞との比重の差を利用して、見かけの懸濁濃度を高める方法を考案した。すなわち、細胞供給時の等張液(図7の水位F)として細胞より比重の大きい 0.5mol/l のシュクロース液(比重 1.073)を用いて細胞を浮上させ、キャリアプレート表面付近の懸濁濃度を局部的に上げた。この結果、細胞を浮上させない場合に比べて、吸着座への吸着率を2倍以上に向上できた。細胞を吸着後、不要な細胞を洗浄する際には、細胞より比重の小さい 0.5mol/l のソルビトール液(比重 1.034)を洗浄液(図7の水位G)に用いて、細胞を沈降させて洗浄効率を高めた。

キャリアプレートの移動のため、供給板から離して上昇させる際、上昇速度が速いと狭い流路内が負圧になり、吸着座から細胞が脱落する。偏心円弧カム機構を用いて、上昇速度を図10に示すように制御することにより細胞の脱落を防いだ。なお、水平方向への移動に関しては、キャリアプレート表面の流れの速度勾配がほぼ零になり、細胞の脱落が生じにくいため、水平方向の移動速度は数 mm/s まで許容できる。

マイクロチャンバに注入された細胞は、スリット上で吸引保持されるが、固体壁に数分以上続けて接触していると細胞膜が付着してしまう。間欠的に細胞をスリット上からわずかに浮上させることにより、壁面への付着を防いだ。この目的で、マイクロチャンバの背面から一定の吸引圧力に加えて、数秒間隔でわずかな正圧(〜数十 Pa)を重畳する微圧変動法を考案した。

5.3 電気的な融合条件

マイクロチャンバの底面のスリット上に注入された一対の細胞は、微弱な吸引圧で生じる流れによって互

Fig.11 Frequency of fusion in a microchamber related to electric stimulation

Fig.12 A pair of lettuce protoplasts fusing in a microchamber. Photographs taken with time increments.

いに接触状態を保つ。スリットをはさんで $200\mu\text{m}$ の間隔で配置された電極間に電気パルスを印加すると接触部の細胞膜が破れ、ここから細胞融合が始まる。図11は、印加する電圧とそのパルス幅をパラメータとして、一対の細胞が融合する確率を測定した結果である。電圧とパルス幅が 20V 、 $150\mu\text{s}$ の条件のとき、最大の融合率 52% が得られた¹⁴⁾。

マイクロチャンバ内での融合の特徴は、①電極間隔が小さいため比較的低い電圧で融合できること、②流体圧で細胞が物理的に接触するので電気泳動の併用なしに融合できることである。図12は融合開始後、ダルマ状から球状に変化する過程で、1分ほど経過した

細胞をスリットから浮上させて撮影した写真である。チャンバの四角すい状の壁が鏡面であるため、その4か所に映っている像から融合した細胞の境界面が認められる。なお、融合が進行中の細胞を微圧変動法でスリットから浮上させたり、吸引したりする動作を反復しても細胞が破損する等の弊害は認められなかった。

5.4 装置の性能と今後の課題

本装置において、2回の注入操作により異種の細胞を逐次導入し、電気的融合操作を加えるまでに要する時間は約20分である。また、1対1融合細胞の生成する確率は、次の式で推定される。

(1対1融合細胞の生成率)

= (細胞1個のみの注入率)

× (同一位置への細胞注入の再現率) × (融合率)

サラダ菜を用いた実験では、細胞1個の注入率は約50%、1個の細胞の入った所へ再度細胞を注入できる再現率は約70%、ペアの細胞の融合率は約50%である。従って、1対1融合細胞の生成率は15%程度になる。この値は従来の集団的な処理に比べて、一桁以上大きいとはいえ、さらに改善の余地がある。

今後、細胞1個の注入率やペア細胞の融合率を向上するためには次のような対策が必要である。

- (1) 供給する細胞懸濁液中に、酵素処理が不十分な細胞や細胞の破片が混入していると、装置の原理上、これらを健全な細胞と識別できない。従って、プロトプラスト精製時の不要な粒子の混入を減らし、さらに、粒子径の大きさによる分級を行えば、注入率の向上が期待できる。
- (2) 注入時の細胞の乗った流れの流線を均一にして、近隣からの混入を低減するため、各プレートの局所的な加工欠陥の低減など、マイクロマシニングにおける加工精度の一層の向上が必要である。
- (3) バイオ分野の研究者と協力して、融合条件等の最適化を図る。

6. 結 言

マイクロマシニングを応用した1対1細胞融合技術を開発し、以下の結果を得た。

- (1) 細胞を一对一で電気的に融合できる1584個のマイクロチャンバをシリコン基板上に形成した。マイクロチャンバ内でサラダ菜細胞を用いた電気融合実験を行い、約20Vの電圧パルスの印加で融合が行えることを確認し、融合率52%を得た。
- (2) 多量の細胞を1個ずつ吸引できるキャリアプレ

ートをシリコン基板上で形成し、マイクロチャンバに一括して細胞を搬送する技術を開発した。この結果、融合する細胞の組合せの制御、および融合操作の自動化が可能になった。

- (3) キャリアプレートで異種の細胞を逐次導入し、電気的融合操作を加えるまでの所要時間は20分であり、全マイクロチャンバの約15%に1対1の融合細胞が得られる見通しを得た。

今後は、マイクロチャンバへの細胞の注入率の向上を図るとともに、細胞の自動チェック技術等の開発を行い装置の性能向上を図る。なお、本技術は、マイクロチャンバのマトリクス状の配列を利用して細胞を個別管理できるので、細胞融合以外に1個ずつの細胞を扱う遺伝子導入や培養の分野への展開も可能と考える。

参 考 文 献

- 1) D.L.Kendall: Vertical Etching of Silicon at Very High Aspect Ratio, Ann.Rev.Mater.Sci., 9, (1979)373.
- 2) K.E.Petersen: Silicon as a Mechanical Material, Proc. IEEE, 70, 5, (1982)420.
- 3) 佐藤一雄, 田中伸司, 河村喜雄, 寺澤恒男: KOH水溶液による単結晶Siのエッチレートの方位依存性, 昭和61年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集(1986)751.
- 4) 河村喜雄, 寺澤恒男, 佐藤一雄, 田中伸司: Si動子の共振振幅におよぼす雰囲気圧力の効果, 昭和61年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集(1986)753.
- 5) 佐藤一雄: 単結晶Siの異方性エッチング技術, 精密工学会誌, 53, 6(1987)849.
- 6) 佐藤一雄: シリコンウエハ上の微小な機械要素の加工, 精密工学会誌, 54, 9(1988)1630.
- 7) 十川好志, 戸田健三, 高山慎一郎, 三浦靖高, 望月崇孝, 岩崎 功: 細胞電気融合, 島津評論, 44, 1(1987.3)17.
- 8) C.L.Afonso, K.R.Harkins, M.A.Thomas-Compton, A.E.Krejci&D.W.Galbraith: Selection of Somatic Hybrid Plants in Nicotiana through Fluorescence activated Sorting of Protoplasts, Bio-technology, 3, (1985)811.
- 9) 山形 光, 高橋 滋: 細胞工学におけるフローサイトメータの応用, BIO INDUSTRY, 4, 11(1987)887.
- 10) 鷺津正夫, 難波利行, 増田閃一: 流体集積回路を用いた電気的細胞融合, 成蹊大学報告, 45, 14(1988)3061.
- 11) 田中伸司, 佐藤一雄, 河村喜雄, 小野里陽正, 内田憲孝: 細胞の電気融合用マイクロチャンバの開発, 1989年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集(1989)613.
- 12) 河村喜雄, 田中伸司, 佐藤一雄, 小比田啓之, 内田憲孝: 細胞の一括整列機構の開発, 1989年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集(1989)615.
- 13) 田中伸司, 寺澤恒男, 佐藤一雄, 河村喜雄, 鶴岡 久: 細胞融合用マイクロチャンバの試作, 昭和62年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集(1987)845.
- 14) 内田憲孝, 湯浅光義, 高辻正基, 河村喜雄, 田中伸司, 佐藤一雄: 1対1細胞融合法の検討, 日本農芸化学会, 1989年度大会プログラム, (1989.4)178.