[フォーラム]

F4-4 ナノメディシン・Bio-MEMS 技術開発

Development of Bio-MEMs for Nano-Medicine

○正 小寺 秀俊(京都大学)

Hidetoshi Kotera^{*1,*2}^{*1}Dept. of MicroEngineering, Kyoto University, Yoshida-Honmachi, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8501 Japan., ^{*2}JST CREST

In this paper, a novel method of platform for regenerative medicine are proposed and experimentally demonstrated.

To realize a regenerative medicine, it is key issue to measure not only the cell – cell interactions and communications but the cell – tissue interactions. We have developed single-mask fabrication method for high aspect-ratio embedded micro-channels and high-density arrayed micro-orifices to measure the cell – cell communications for more than several thousand cells simultaneously. To stimuli the target cells and/or to bring foreign substances, such as genes and drugs, into the cells, we have also developed the high-efficiency low-voltage (typically 1.5 V) electroporation method and demonstrated its efficiency.

Key Words : NanoMechine, Bio Simulation, Micro-TAS, MEMS

1. 緒言

医療の目標の1つに再生医療がある。近年幹細胞やES細胞に関する基礎研究とともに応用研究が盛んに行われている。一方、従来の生理学分野においては、複雑な生命維持のメカニズムを解明し、それをもとに創薬や治療を実現するため、実験的な手法が用いられてきたが、その結果をもとに細胞機能モデルを構築しそれを数値的に解析して、細胞内部の各種分子の機能発現のメカニズムを解明する研究が進んでいる。

我々は、2002年より細胞生体機能シミュレーションプロジェクトを文部科学省のリーディングプロジェクトとして進めるとともに、シミュレーションに必要な細胞機能の計測方法に関する研究を進めてきた。また、2006年より細胞から組織までの再生を目的としたマイクロTASの研究開発を進めている。本稿では、シミュレーションと再生医療のため現在進めている細胞機能評価デバイスに関する研究開発の内容について述べる。

2. 細胞生体機能計測用デバイス

細胞の機能を計測する方法として生理学の分野ではパッチクランプ法が一般的に用いられている。これは、図1に示すように、内径 $2\mu\text{m}$ 程度になるように熱加工したガラスピペットを用いて細胞膜を吸引固定し、細胞膜表面のタンパク質が動作する時の膜電位の変化をガラスピペットの内と外に取り付けた電極で計測するものである。ガラスピペットの中に様々な溶液を入れて、局所的な刺激に対する応答なども計測できるため、この方法は電気生理学の研究分野で標準的に利用されている。しかし、この方法はガラスピペットの先端は小さいのだがそれ以外の部分は大きいため、細胞に1本程度しかガラスピペットを接続することができないという問題がある。

1990年代以降MEMSの応用分野として発展したマイクロTAS (Total Analysis Systems) に関する研究は、2003年頃まではマイクロTASの基本構造や液体を搬送するためのマイクロポンプやマイクロミキサーに関する研究が多かったが、近年では、マイクロTASを利用した細胞機能計測や分子計測に関する応用分野の研究が主になっている。我々は、上述したパッチクランプの問題点をマイクロTASを用いて解決し、大量の細胞に対して同時にパッチクランプできる素子の開発を行ってきた。パッチクランプに要求される機能として、①計測するための電極があること、②細胞を吸引固定するためのマイクロオリフィス (直径 $2\mu\text{m}$ 程度) が開いていること、③細胞内に導入する溶液を搬送できること等があげられる。マイクロTASに要求されるものとしては、量産できるプロセスで

作製できかつ上記①から③を集積化できること (細胞を数十から数千の数同時に実験することが要求されるため) が求められる。図2は計測用の電極と溶液のための流路および細胞を吸引固定するためのオリフィスを、2回の露光で作製することができるSIMPLEプロセスの概要を示した図である。

このプロセスは光造形を用いたものであるが、光硬化性のレジスト (SU8) を用いて、最終的に流路にしたい部分に露光用のマスクとしてアルミ薄膜を蒸着してパターンニングする。このマスクを利用して基板に対して斜めに2度UV露光を行うことで、マスク面上に未露光領域ができる。この未露光領域は現像後流路となる。マスクの幅は大きく、未露光領域がレジストの厚みを超える場合、未露光領域はレジストの表面まで貫通することになり、流路につながった表面の穴になる。この原理を用いてオリフィスを作製することができる。図3は作製したオリフィスと流路の光学写真とSEM写真である。

Fig.1 Conventional Pipette clamp method

Fig. 2 Principle of single-mask inclined UV lithography by cross-sections I-I'.

a) Embedded microchannels with length/width ratio: 47μm × 6mm
b) Circular micro-orifice with a diameter of 6μm

Fig. 3 SEM images of fabricated single-cell analysis chip.

3. マイクロ TAS を用いた細胞内への物質導入実験

通常、細胞内に物質を導入する場合、caged 化合物を用いる方法や electroporation を用いる方法が一般的である。前者は caged 化合物を設計することが難しいことから、細胞に電界を加えて、細胞膜表面に集中する電界により細胞膜に小さな穴があくことを利用した electroporation が最近一般的である。しかし、従来の electroporation 方法においては、細胞が懸濁した溶液に電極を挿入し電界を加えるに、かける電圧も高く収率も数%と低いことが問題であった。我々が開発したマイクロオリフィスに細胞を固定する場合、図 4 に示すように、細胞を固定している膜は絶縁体であるため、オリフィス部の細胞膜に電界が集中する。そのために、従来方法では数百ボルトかけていた電圧を 1 V 程度に下げることができるばかりでなく、収率も 99% 以上になった。図 5 は、直径約 10μm の HELA 細胞を吸引固定して下部の流路に IMPOTINE β を入れ、electroporation を行った結果である。* が入ると細胞は蛍光反応する。これを計測した結果である。作製したデバイスが細胞に対して化学的・物理的に影響を及ぼしていないかを実験的に確認する必要があるが、細胞内に効率よく導入できていることが実験的に証明できている。

Fig. 4(a). Conventional electroporation in a uniform field

Fig.4(b) Electroporation using field constriction at a micro-orifice

3. 再生医療を目指したバイオナノプラットフォームを目指して

細胞を固定し物質導入できる実験原理を発展させて、細胞間のコミュニケーションを計測するデバイスの開発とそれを用いた細胞機能計測および細胞の機能制御に関する研究を進めている。その概要に関しても講演時に説明する。

Fig.5 Suction of HeLa-GFP cells. The cells were attracted to and immobilized at the orifices

Fig.6 Bio/ Nano hybrid platform for measuring cell-cell communication

謝 辞

本稿に紹介する研究成果は、文部科学省リーディングプロジェクト「細胞生体機能シミュレーション」と科学技術振興機構 CREST「再生医療に向けたバイオ/ナノハイブリッドプラットフォーム技術の構築」の研究成果である。研究資金を提供した研究に協力・ご助言いただいている方々に感謝いたします。