1110 微細加工技術を用いた細胞計測デバイスの開発

Development of microfabricated cell arraying devices

○ 今井雄一郎 (東京大)
小穴英廣

和気佳史
正 鷲津正夫

Yuichiro IMAI, Yoshihumi WAKE, Hidehiro OANA and Masao WASHIZU
The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8656

We have developed a few types of cell arraying device based on microfabrication. One is for patch-clamp measurements, where the orifice is precisely machined using a focused ion-beam (FIB). To achieve leak-tight clamping, the irregularity of the orifice shape must be minimized, and FIB is found to be suitable for this purpose. Another is the use of lower-cost laser-machining, in combination with the surface treatment with a cell membrane-anchoring chemical, BAM, by which the membrane adheres to the orifice plate to spontaneously seal the gap between the cell and the orifice. Also developed is a cell arraying device made of organic thin-films having laser-machined orifices. In contrast to the conventional devices based on anisotropic etching of the silicon wafer, the method provides a low-cost disposable cell arrayer.

Key Words: micro orifice, cell membrane, patch clamp method, cell chip, micro-TAS, Lab-on-a-chip

1. はじめに

細胞は、細胞膜にあるチャネルを通じて、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[1,2]があるが、通常この手法ではガラス毛细管を用いるため、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。これに対し、微細加工技術を用いて製作されたオリフィスを用いる手法もいくつか提案されている。たとえば、文献[3]では、シリコンの異方性エッチングにより作られるV溝を2つ交差させることにより開口部を作り、ここに細胞を吸引固定する手法の開発を行っている。このような微細加工技術による平面上のオリフィスアレイによれば、上記のコンダクタンスや並列化の問題が解決でき、かつ実際にパッチされた部分を光学顕微鏡で観察しつつ計測を行えるものと期待される。

しかしながら、たとえば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、研究例はほとんどない。また、一般に、コンタミネーションを防止するためにはなるべく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、繰り返し使用せざるを得ない。

本研究室では、これまで、微細加工技術を用いて人工基板上に作製した直径 $1\mu\text{m}$ 程度のオリフィスに細胞を吸引・固定する手法と装置の開発を行ってきた[4]。本研究では、この延長として、まず、リークタイトな細胞の固定を行うための加工条件を明らかにし、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、オリフィスを持つ基板(以下オリフィスプレート)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。また、オリフィスプレート自体をローコストで作製するため、有機薄膜と支持構造を貼り合わせて製作する手法の開発を行った。以下にこれらの結果を報告する。

2. シリコン酸化膜をオリフィスプレートとして用いた細胞固定装置

この装置は、図1に示すように、異方性エッチングにより作ら

れた支持構造の上のシリコン酸化膜に、直径 $2\mu\text{m}$ 程度のオリフィスを穿孔した構造を持つ。酸化膜下部に緩衝溶液を満し、微細オリフィスの上に細胞懸濁液を滴下し、これを下側からシリンジポンプで吸引することにより、細胞をオリフィスに固定する。

図2 a)は反射顕微鏡写真であり、白円の中に微細オリフィスが黒い点として見える。ヒト単球性白血病由来のU937細胞を吸引固定した時の透過顕微鏡像が図2 b)である。直径 $18\mu\text{m}$ 程度の細

Fig.1 Device for cell immobilization

Fig.2 Immobilization of a cell onto the orifice

a) reflection microscope image, b) transmission microscope image c) schematic representation of the immobilized cell

Fig.3. Seal-tight immobilization of a cell membrane

Fig.4. Experimental apparatus for the cell patch clamping

胞像の中心付近に、直径数 μm の白い円形の模様が見える。これは、図の点線の位置での断面模式図を図2c)に示したように、細胞の一部が引き込まれて薄膜下側にできた構造である。このように吸引固定された細胞は、逆圧をかけても外れる事は無かった。

3. パッチクランプのためのシールタイトな固定

パッチクランプを行うには、細胞膜とオリフィスプレートが密着し、2つの膜の隙間を流れる電流（リーク電流）がチャネル電流より十分に小さくなるようにしなければならない（図3）、具体的に述べると、リークの抵抗値が $1\text{ G}\Omega$ 以上であること（いわゆるギガシール）とされている。そこで、図4のように、オリフィスプレートの上下にAgCl電極を挿入し、どのような場合にギガシールが達成されるのか検討した。

われわれは、これまでに固体紫外パルスレーザ（波長：355nm、繰り返し周波数：60kHz、（株）ネオアーク製）でオリフィスを製作し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。オリフィスを詳しく調べてみると、図5a)のようにイレギュラーな形をしており、細胞膜とオリフィスがしっかりと密着しきれない事が、リーク電流が大きくなる原因であると考えられた。

そこで、FIB（Focused Ion Beam 株式会社日立製作所製 FB-2000A, 0.2nA）を用いて、真円度の高い直径 $1\mu\text{m}$ のオリフィスを製作した（図5b）。このオリフィスを加工するのに要した時間は20分であった。

このオリフィスを用いて、ギガシールの検証を行った結果を図6に示す。図に示されているのは、波高値50mV、パルス幅20msのパルス電流を印加した時のリーク電流値を経時的にプロットしたもので、以下が読みとれる。

Fig.5 SEM image of micro orifice
a) fabricated by UV laser, b) FIB

Fig.6 Time course of the leakage current

as a cell is trapped into the orifice

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

- 細胞がオリフィスに接着する（図6a）
- 細胞がオリフィスに引き込まれ始めることで（図6b）リーク電流値が下がる。
- 細胞の一部がシリンジポンプ側にある程度引き込まれ、細胞がオリフィスに密着し（図6c）ギガシール（約 $7\text{ G}\Omega$ 、リーク電流、約 8 pA ）が達成される。
- このギガシール状態は安定的に維持される（図6d）。

以上のことより、真円度の高いオリフィスを用いればギガシールを達成できることが明らかになった。

しかしながら、FIBによる加工は生産性が低く、加工した基板の製作費は高価となる。そこで、紫外線レーザで作製した真円度の低いオリフィス（図5a）を用いたとしてもギガシールを得られる手法として、細胞接着性の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開発した。用いたものはBAM（Biocompatible Anchor for cell Membrane, 日本油脂(株)製、図7a）で、片側にオレイル基、反対側にNHS（N-ヒドロ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。

Fig.7 Immobilization of a cell onto the orifice plate using BAM

a) Molecular structure of BAM

b) schematic representation of a cell anchored onto the orifice plate

Fig.8 Immobilization of the cell by BAM

a) boundary between BAM and non-BAM surface, b) enlarged view

まず、基板表面にアミノプロピルシランをコーティングし、BAMのNHS基とアミド結合を形成させて、基板にBAMを固定する。これにより、疎水性のオレイル基が基板に固定されることになり、これが細胞膜に刺さることにより、細胞は基板上にアンカリングされる。このようにBAMを固定したオリフィスプレートを用いれば、図7b)のように、オリフィスプレートに密着した形で細胞が固定されるので、リークがない細胞固定が実現されと考えられる。

スライドガラス上にBAMを修飾後、細胞懸濁液を滴下した後、20分ほど置き、固定されていない細胞を洗い流したところ、図8a)のように、多数の細胞がスライドガラスに固定されていた。また、図8b)のように、細胞1個レベルで基板に密着するように固定されていることが観察された。よってBAMを基板に修飾すれば、真円度の低いオリフィスを用いても、ギガシールが可能になるものと思われる。

4. 有機薄膜を用いた細胞固定チップの開発

前章では、シリコン基板を異方性エッチングすることによってデバイスを製作した。しかし、シリコン基板の加工は高コストで大量生産には向かず、デバイスを使い捨てで用いることは困難である。そこで、図9に示したように、有機薄膜を支持構造で裏打ちした形状を持つ細胞固定チップをローコストで製作する手法の開発を行った。

Fig.9 Micro-orifice made of an organic membrane

Fig.10 Fabrication of a cell chip using an organic film

一般に、高アスペクト比の穿孔は困難であるので、微小なオリフィスを作製する場合は、薄い膜を用いることになる。しかしながら、膜が薄いと、取り扱いが不便で、かつ機械的に弱く、吸引固定の際に破れてしまう可能性がある。そこで、有機薄膜を支持構造に接着させたデバイスを作製することにした。その手順を以下に示す(図10参照)。

1. ガラス板の上に剥離層としてアモルファステフロン(0.1%)をスピコート。
2. その上に厚さ1~2μm程度の有機薄膜をスピコート。
3. あらかじめ適当なスリットを設けたフィルム(支持構造として用いる)を有機薄膜の上にのせ、上からガラス板で圧迫し、接着する。
4. フィルムを剥がし、剥離層のところで剥離する。

このようにして、スリット付きのフィルムを支持構造とする厚さ1~2μmの有機薄膜を得、その後、レーザーにより直径2μm程度のオリフィスを穿孔する。

有機薄膜としては、フォトレジストSC450および紫外線硬化性接着剤(アーデルOPTOKLEB, HR154, 株式会社第一科学製)を用い、支持構造フィルムとしてはポリイミドフィルムを用いた。有機薄膜として紫外線硬化性の樹脂を用いたのは、支持構造との接着が光照射により容易に行えるからである。

以上のように作製したチップを用いて細胞を吸引固定した結果が図11であり、オリフィスが作製された薄膜は細胞の吸引固定に必要な強度を持つことが示された。

5. 蛍光顕微鏡観察が可能な細胞固定チップ開発

前章で用いた薄膜は特定の励起波長域に自家蛍光を持っているために、細胞内の1分子観察のような、非常に高感度を有する蛍光観察には、この自家蛍光が妨害となる可能性がある。そこで、蛍光励起波長付近で微弱な自家蛍光しか持たないポリイミドフィ

Fig.11 Cells immobilized on the orifice plate made of an organic membrane

ルムを用いたオリフィスプレートを、市販のポリイミドフィルム（厚さ $7.5\mu\text{m}$ ）を紫外線レーザーで直接穿孔することにより製作した。

このオリフィスプレートを用いた細胞固定の結果を図 12 に示す。細胞は、細胞膜を透過して核の DNA を染色する蛍光色素 CyberGreen で染色した U-937 細胞を用いた。図 12 a) は透過顕微鏡像であり、図の中にある 6 つの円は縦 2 行横 3 列合計 6 個の孔をレーザー穿孔によって作製したオリフィスである。直径 $5\mu\text{m}$ 程度と、図 11 で用いたスピンコート薄膜貼り合わせ構造によるオリフィス（ $\sim 2\mu\text{m}$ ）よりも大きくなっている。これは、厚いポリイミドフィルムを用いた必然の結果であるが、直径 $18\mu\text{m}$ 程度の U-937 細胞を適度に固定するには特に支障がなく、この写真でも、オリフィスに細胞が単独または凝集塊として吸引固定されているのがわかる。図 12 b) は同じ位置の蛍光顕微鏡像であり、この結果から、カプトンシートの発する自家蛍光は細胞自体の発する蛍光より十分に小さく、少なくとも細胞レベルでの観察の妨害にならないことがわかる。しかしながら、さらに小さい細胞の固定、あるいはパッチクランプのように強く吸引する必要がある固定の場合には、図 11 のようなスピンコート薄膜貼り合わせ構造を、適切な有機材料の選定をして使用する必要があるものと思われる。

6. おわりに

細胞のパッチクランプや応答計測のための細胞固定チップの製作法の開発を行った。結果は以下のように要約される。

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、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. より低コストの加工法であるレーザー穿孔を用いてリークタイトなオリフィスを作製するため、細胞接着性の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、その予備実験として BAM による細胞の強固な固定を確認した。
3. より低コストとなるチップ作製法として、スピンコートにより作製した厚さ $1\sim 2\mu\text{m}$ の有機薄膜と支持構造を貼り合わせ、その後にレーザー穿孔でオリフィスを作製する方法を開発し、これを用いた細胞の吸引固定を実証した。
4. 蛍光顕微鏡観察が可能でかつ低コストなチップが作製可能であることを実証した。

謝辞

京都大学の小寺秀俊教授・野間昭典教授・松岡達助手、早稲田大学の菊山榮教授の御議論・ご助力に謝意を表します。本研究は NEDO「細胞内ネットワークのダイナミズム解析技術開発」プロジェクトの助成を受けて行われたものであり、ここに謝意を表します。

Fig.12 Immobilization of cells on the orifice plate made of polyimide film

a) Reflection microscope image b) Fluorescence image

参考文献

- [1] E. Neher and B. Sakmann: "Single-Channel Currents Recorded from Membrane of Denervated Frog Muscle Fibres", *Nature*, **260**, p. 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**, p. 85-100, (1981)
- [3] A. Tixier-Mita, J. Jun, S. Ostrovidov, M. Chiral, M. Frenea, B. Le Pioufle and H. Fujita: "A silicon micro-system for parallel gene transfection into arrayed cells", *Proc. μ -TAS2004*, p.180-182 (2004)
- [4] 今井雄一郎・竹中一馬・小穴英廣・鷲津正夫:「微細加工オリフィスを用いた生体膜の展開と計測」機械学会 2004 年度年次大会講演論文集 vol. 2, p. 73-74 (2004)