1117 MEMS 技術を用いた 単一細胞の電気生理特性の計測に関する基礎研究

Measurement of electrophysiological properties of a single cell using MEMS device

○学 徳田 貴司 (京大) 学 藤原哲嗣 (京大)
正 鈴木 孝明 (京大) 正 神野 伊策 (京大) 正 小寺 秀俊 (京大)

Takashi TOKUDA, Noritsugu FUJIWARA, Takaaki SUZUKI, Isaku KANNO and Hidetoshi KOTERA

Department of Mechanical Engineering, Kyoto University, Yoshidahonmachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501

Patient-tailored treatments become possible by simulating behavior of organs, which is affected by the change of the environment such as dispensing of drugs. For example, it is necessary to detail the electrical and mechanical properties of a single living cell to build simulation model of heart. This paper proposes a novel planar patch-clamp device integrating electrode, micro-channel and micro-hole.

Key words: MEMS, patch-clamp, μ TAS

1. 緒 言

近年、テーラーメイド治療や製薬等の応用のために、臓器などの生体シミュレーションに関する研究が盛んに行われている。このためには個々の細胞の電気的特性及び機械的特性を詳細に明らかにし、生体機能を解明することが重要である。単一細胞の動的な生理諸機能を定量的に把握できる電気生理学的測定法の一つとして、パッチクランプ法 (Patch-clamp recording) が確立されている。これは、膜パッチ (細胞膜の微小な領域) をガラス製のマイクロピペットにより電気的に隔離し、単一イオンチャネルを流れる電流を記録するものである。一般にパッチクランプ法はマイクロアクチュエータ、光学顕微鏡などの大規模な装置を必要とすること、職人的な技術が要求されること、一度に1つの細胞しか測定を行えないことなどが問題点として挙げられる。近年では大幅なスループットの向上が見込める Planar patch-clamp の原理による測定法が盛んに研究されている^{[1][2]}が、Si 基板の物理的、化学的エッチングを用いてマイクロ孔を作製しているものが主であり、マイクロ孔と電極、流路などのアセンブリが必要であるという問題点がある。著者らは、MEMS 技術を応用し、電極、吸引用マイクロ孔、流路、チャンバー部を一体化したアセンブリ不要のパッチクランプデバイスを考案、試作した。

2. Planar patch-clamp の原理

Planar patch-clamp による細胞の電気生理特性の測定原理図を Fig.1 に示す。デバイスは通常 Si やガラス基板などに直径 $0.5 \sim 3 \mu\text{m}$ のマイクロ孔をエッチングなどにより貫通させたものを用いる。デバイスの下には生理食塩水を充填するためのチャンバーを設け、陰圧を加えることができるようにシリンジと接続する。マイクロ孔の部分に細胞を設置し、チャンバー側から陰圧 ($-20 \sim -200 \text{ cmH}_2\text{O}$) をかけることによって孔内部およびチャンバーと細胞外生理食塩水との間 (上部と下部の電極間) に抵抗値 $1 \text{ G}\Omega$ 以上の絶縁 (Giga-seal) を得る。上下電極間の電位差を OP アンプで構成される I-V コンバーターで測定することにより、吸引された部分の細胞膜 (パッチ膜) を透過する電流を計測することができる。

3. 感光性樹脂 SU-8 を用いたマイクロ孔の作製

ネガレジスト SU-8 を用いて立直性の高い円形のマイクロ孔を作製し、ポリスチレン犠牲層を用いて剥離することにより、planar patch-clamp デバイスを作製した。作製プロセスを Fig.2 に示す。作製した円孔の SEM 像を Fig.3 に示す。

Fig.1 Principle of planar patch-clamp recording

Fig.2 Fabrication process of SU-8 micro-hole

Fig.3 SEM image of SU-8 micro-hole

4. 一体型パッチクランプデバイス

前述で作製した SU-8 の剥離によるデバイスは、厚さ $10\mu\text{m}$ であり、封止のため支持基板に固定しなければならない。また、電極、チャンバー部のアセンブリが必要であり、単体での利用が困難であった。そこで、透過性の高いレジストである SU-8 の性質を利用し、傾斜させて 2 回露光を行うことにより、電極、吸引用マイクロ孔、流路を一体化したアセンブリ不要の一体型パッチクランプデバイスを考案、作製した。デバイスの模式図を Fig.4 に、作製プロセスを Fig.5 に示す。2 回の傾斜露光は基板を 26.6° 傾けて行った。マイクロ孔の Al マスクパターンに Fig.6 に示すものを用いることにより、マイクロ孔のみ開口させることができる。黒色の部分が Al である。作製したデバイスのマイクロ孔と断面形状がわかるように流路の開口部の SEM 像を Fig.7 に示す。(a)-1, (b)-1 はそれぞれ直径 $3\mu\text{m}$, $6\mu\text{m}$ のマイクロ孔であり、(a)-2, (b)-2 はそれぞれのマイクロ孔に対応する開口部の SEM 像である。マイクロ孔は真上から、開口部は試料を 45° 傾斜させて撮影した。設計上で直径 $6\mu\text{m}$ のマイクロ孔は短軸径 $7\mu\text{m}$, 長軸径 $11\mu\text{m}$ の楕円となり、直径 $3\mu\text{m}$ のマイクロ孔は一部のみ亀裂の入ったように開口した。また、SU-8 の膜厚は $12.2\mu\text{m}$ であった。

5. 細胞吸引実験

作製した一体型パッチクランプデバイスを用いて細胞吸引実験を行った。細胞は直径 $10\mu\text{m}$ の球形の癌細胞 H2B-G-19 を用いた。チャンバーからマイクロ孔までを生理食塩水で充填し、癌細胞を滴下した後、吸引用孔から接続したシリンジで陰圧をかけたところ、細胞がマイクロ孔に向かって移動し、固定される様子が観察された。

6. 結 言

Planar patch-clamp の原理を用いた、電極、吸引用マイクロ孔、流路を一体化したアセンブリ不要の一体型パッチクランプデバイスを考案、作製し、癌細胞を用いた吸引実験によりパッチクランプへの利用が可能であることがわかった。

この作製プロセスはマイクロ孔を高密度で配置でき、マイクロ孔作製後の電極の設置が不要なことから、単一細胞でのパッチクランプ記録が期待できる。

今後は細胞を吸引して抵抗測定実験を行い、Giga-seal を達成できるようにマイクロ孔形状の最適化を行う必要がある。

Fig.4 Schematic of SU-8 integrated patch-clamp device

Fig.5 Fabrication process of SU-8 integrated patch-clamp device

Fig.6 Al mask pattern of SU-8 integrated patch-clamp device

Fig.7 SEM images of micro-hole and orifice

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学技術研究費基盤 (A) (2) 一般 (No. 15201033, No. 14205037) の助成を受けて行われた。関係者各位に謝意を表す。

文 献

- [1] Kathryn G Klemic et al, Micromolded PDMS planar electrode allow patch clamp electrical recordings from cells, Biosensors and Bioelectronics, Volume 17 (2002) 597-604
- [2] Niels Fertig et al, Activity of single ion channel proteins detected with a planar microstructure, Applied Physics Letters, Volume 81, Number 25