原子間力顕微鏡を用いた単一細胞の液中回収システムの開発

Single adherent cells collection in liquid using an AFM

○学 安達 誠 (静岡大)、水口 裕也 (静岡大)
岩田 太 (静岡大)

Makoto ADACHI, Shizuoka University

Yuya MIZUGUCHI, Shizuoka University

Futoshi IWATA, Shizuoka University, tmfiwat@ipc.shizuoka.ac.jp

AFM can be used not only for surface observation but also for local surface fabrication. In particular, in micro-anatomical field, AFM has been expected as a micro-manipulator. Thus, highly accurate positioning of the AFM probe relative to a sample has been required.

We have developed a compact AFM manipulator coupled with an inverted optical microscope to observe the AFM probe edge for accurate probe positioning and monitoring the scene of the manipulation. In this research, the apparatus was customized to remove a single biological cell selectively from a substrate. To avoid damaging the cell, a micro-cell scraper was fabricated from a micro cantilever using focused ion beam milling. As a demonstration, a single Hele cell was selectively removed from the substrate, and then it was collected by a micropipette. The system would be very useful as a single cell sorter.

Key Words: Nano manipulation, Single cell manipulation

1. はじめに

原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope:AFM)は、真空中や大気中のみならず、液中でも使用することが可能であり、液中環境下における生体試料の観察が必要となる生物学分野で盛んに利用されている。AFMの応用には観察のみでなくマニピュレーションへの応用も期待されている¹⁾。これまで我々は倒立顕微鏡ステージ上に搭載可能な小型AFMを製作し、さらにハプティックデバイスと組み合わせることで力覚を有するナノマニピュレータとして液中環境で生体試料をマニピュレーションできるシステムを開発してきた²⁾。これまでに本装置を用いて液中でのAFM観察やコラーゲン線維などの生体試料の切断などのマニピュレーションについて応用した例を報告してきた³⁾。しかしながら本装置を細胞や試料特定部位の回収に用いようとした場合、針先の尖った通常のカンチレバー探針を用いると対象となる細胞を傷つけてしまう。特定の細胞を回収できることはセルソータとして需要があり、特に単一細胞レベルで回収する技術が望まれている。

本発表ではこれまでに開発した小型マニピュレータにおいて、特殊な加工を施したカンチレバーにより、細胞を基板から生きたまま剥離・回収するシステムを開発したので報告する。操作は液中で生きたままの細胞に対して実験を行った。

2. 装置構成

2.1 AFMマニピュレータ

本研究で使用するAFMユニットの概略図を図1(a)に示す。カンチレバーのたわみを一定に保つz軸積層型圧電素子、走査を行うxy軸機構として変位拡大と直進運動を担う弾性ヒンジを利用したピエゾアクチュエータ、探針を試料にアプローチするためのz軸粗動ステージ、そして探針の位置決めを行う一体成型による薄型のxy軸粗動ステージから構成されている。AFMユニットのサイズは(縦80mm, 横120mm, 高さ50mm)である。図1(b)に倒立型光学顕微鏡に搭載した様子を示し、図1(c)に生体試料の培養に広く使用されているガラススペースディッシュに自己検知カンチレバーを挿入する様子を示す。培養した生体試料を別の環境に移すことなく直接カンチレバー

をアプローチすることができるため、試料への環境変化による影響が少なくより生理条件に近い状態で観察を行うことが可能となる。

また、図2に示すように力覚フィードバックデバイスとしてオペレータに力を提示することが可能なハプティックデバイス(FALCON, Novint)を用いた。このデバイスはPCに接続されており、パラレルリンク機構のハンドルを動かすことでAFM探針が試料表面の任意の場所に移動し、その間AFMカンチレバーが検出した表面凹凸形状や押し込み荷重を感じることができる。

(a) AFM unit

(b) The unit mounted on a sample stage of a inverted optical microscope

(c) Operation in liquid condition in petri dish

Fig. 1 A compact AFM manipulator

Fig. 2 Set up of AFM manipulator

2.2 ヘラ型カンチレバー

通常のカンチレバー探針は先端が尖っているため、基板から細胞を剥離させる際に傷つけてしまう恐れがある。そこで、本研究では集束イオンビーム (Focused Ion Beam : FIB) 装置 (JIB-4500, 日本電子) を使用してカンチレバーをヘラ型に加工した。加工を行ったカンチレバーは、バネ定数 40N/m の自己検知型カンチレバーである。加工したヘラ型カンチレバーを図3に示す。

Fig. 3 Micro-cell scraper

3. 実験結果

3.1 ヘラ型カンチレバーによる細胞の剥離

ヘラ型に加工したカンチレバーを用いて、ガラスベースディッシュ上の細胞を剥離した。使用した細胞は HeLa 細胞で、インキュベータから取り出して1時間以内のものを用いた。

カンチレバーはハプティックデバイスによって操作され、液中環境下の細胞を剥がした。カンチレバーのバネ定数は 40N/m である。実験の様子を図4に光学顕微鏡像を図5に示す。

図5において黒丸内の細胞を見ると実験後に対象の細胞を基板より剥離できていることが確認できる。

Fig. 4 Operation scene of the manipulator

Fig. 5 Scraping to detach a single cell from a substrate

3.2 細胞の回収

単一の細胞を基板から剥離させた後に、マイクロピペットにより回収を試みた。HeLa細胞の大きさが $10\sim 30\text{ }\mu\text{m}$ 程度であるため、実験で使用したマイクロピペットは内径 $50\text{ }\mu\text{m}$ のものを使用した。実験結果を図6に示す。黒丸内の細胞が実験後になくなっていることが確認できる。これは細胞がピペット内に吸いこまれたためである。したがって、単一の細胞を回収するのにマイクロピペットが有効であることが分かる。

Fig. 6 Single cell collection using a micropipette

4. まとめ

本報告では原子間力顕微鏡を用いた単一細胞の液中回収システムの開発について述べた。液中環境下の生細胞に対して通常のカンチレバーよりも低浸襲なヘラ型カンチレバーを用いることにより基板から細胞を剥離した。また、ヘラ型カンチレバーにより単一細胞を剥離した後に、マイクロピペットによって対象細胞を回収できることを確認した。これにより剥離と回収の操作を連続的に行うことで、対象となる単一の細胞のみを回収できることが分かった。

今後は、細胞を回収し別の基板の上にアレイ状に再配置する実験や、AFM カンチレバーを利用し、細胞の接着力の測定を行っていく予定である。

謝辞

本研究は、文部科学省「浜松地域知的クラスター創成事業」に関するプロジェクト研究として行われたものである。関係者に感謝する。

参考文献

- 1) 岩田 太, "微細加工ツールとしてのプローブ技術": 応用物理 73 (2004) 490-4932
- 2) F. Iwata, Y. Mizuguchi, K. Ozawa and T. Ushiki : Jpn. J. Appl. Phys. 49 (2010) 08LB14
- 3) 水口 裕也, 岩田 太ほか: 2009 年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集. P823