

ナノスケールの力測定を可能にする 超安定なマイクロマニピュレータ

ジョン・ウィンガード

最先端の心臓病の研究では、次世代の光学計装がもつ性能が求められる。あまり知られていないことだが、研究者は3軸マイクロマニピュレータを用いて、一細胞を拾い上げたり、分子レベルの力や動作を計測したりできる。

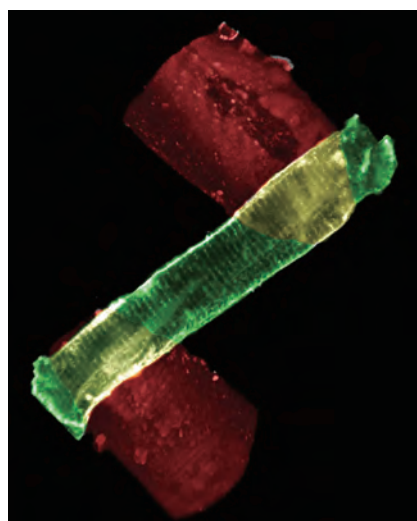
先進工業国における死因第1位である心血管病はしばしば、心筋細胞と呼ばれる個々の心臓筋肉細胞の機能不全によって生じる(口絵)。これらの細胞は、完全に機能する心臓細胞の最小のモデル系であり、イオン制御、力発生、弛緩機能、細胞シグナル、遺伝子発現について調べられている。

研究における多くの重要な手段には、個々の心筋細胞を用いる実験が含まれている。そのような実験では、げっ歯類から取り出した生きた細胞を調べるために光学顕微鏡がよく用いられる。例えば、顕微鏡ベースの機器プラットフォームでは、筋細胞が収縮する増負荷性収縮と、物理的な収縮が発生しない等尺性収縮力の両方を解析する、多様な実験が可能である。個々の細胞で、これら2種類の力を正しく操作することで、心臓サイクルの4つのステージ(IからIV)を実行できる(図1)。

次世代の機器は、この種の研究の発展を目指す。例えば、米イオン・옵ティクス社(IonOptix)の最新のMyoStretchシステムは、力と動作の計測を優れた感受性で利用できる。XYZ軸を操作できるマイクロマニピュレータによって、1個の筋肉細胞を拾い上げることが可能だ。

筋肉細胞を計測する

機器を操作するときには、各マイク



Di-8-ANEPPS(緑)で標識させた細胞膜と、生物学的接着薬MyoTak(赤)で接着させた心臓細胞。Di-8は心臓細胞の筋繊維鞘とT管膜を標識し、接着薬は2本のマイクロガラス棒(ここでは見えない)を覆う。マイクロガラス棒は、1個の心臓細胞を接着させたり伸縮させたりするために用いる(提供:3D再構成は米ペンシルベニア大(UPenn)のベン・プロッサー氏(Ben Prosser))。

ロマニピュレータでガラス棒(一般的には直径が25 μm 、長さが500 μm)を把持する。細胞外マトリックス(ECM)にあるタンパク質や多糖類と接着する分子の混合物であるMyoTakを含む滴にガラス棒を浸す。これをある程度乾燥させると、緩衝液の下のガラス容器に位置する筋肉細胞の各端に操作者が接触する。細胞がガラス棒に接触するまでにかかる時間が約10秒であり、その後は実験のためにガラスから離すことができる。

一度筋肉細胞を拾い上げれば、物理的にも電氣的にも刺激でき、その操作はさまざまな方法で定量できる(オプションのアクセサリが必要)。例えば、システムの圧電アクチュエータで細胞に機械的な収縮力を与えることもできれば、パッチクランプ式の電極を用いて細胞を刺激することもできる。

個々の筋肉細胞は10~1000nNの範囲で収縮力を発生させる。これはOptiForceと呼ばれる、特許のある光学アプローチを用いて計測できる(図1)。簡潔に述べると、カンチレバーが力変換器のヘッドに取り付けられており、カンチレバーの末端部の反射面の位置は、ファイバと結合したレーザダイオード(1550nm)の後方反射を通じて干渉法的に決定される。筋肉細胞の位置は波長のごく一部によって計測できるため、収縮がゼロに近いところで等尺性動作を研究する。

OptiForceによって、分子レベルにおける心筋細胞の活性を2種類の方法で観察できる。一つは、カルシウムイオンの活性における動的なローカル変化を監視することである。もう一つは、収縮に関わる分子の集合によって生じる横紋(暗帯と明帯)である、サルコメアの長さの変化を計測することである。安静時には、サルコメアの間隔は約1.8 μm である。この機器は、ハイスピード(250Hzから1kHz)のCCDカメラを

用いて、赤色照射下で明視野イメージをリアルタイムに取得する。細胞が収縮または弛緩するたびに、サルコメアの長さの平均値を高い正確性をもって取得するため、システムのソフトウェアは横紋イメージを高速フーリエ変換 (FFT) 解析を実行する。

他の代謝プロセスの顕微イメージングで広く使われているように、筋肉細胞のサブ細胞、サブ分子レベルの代謝活性もまたカルシウムイオンのプローブを用いて計測できる。このプローブの蛍光特性は、カルシウムイオンのローカル濃度に依存して定量的である。これは、キセノンランプと落射蛍光アダプタを統合させ、干渉フィルタに結合したカメラを用いることで実現する。

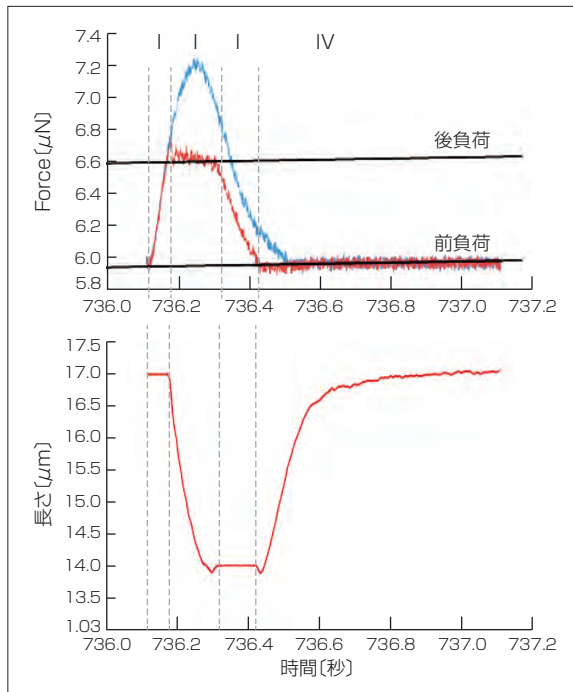


図1 イオンオプティクス社の OptiForce 変換器を用いると、非常に早い反応時間で nN から μ N の範囲で安定して力を計測できる。拡張期と収縮期の力のレベルで固定することで、一細胞レベルで心臓サイクルの4つのフェーズ (I から IV) を再現できる。

光産業技術マンスリーセミナー



Optoelectronics Industry and Technology Development Association

プログラム (12~1月)

No. / 開催日	講演テーマ / 講師
第 403回 12月20日 (火) 15:30-17:30	「太陽光発電の最新動向」 講師: 貝塚 泉氏 (株式会社資源総合システム)
第 404回 1月17日 (火) 15:30-17:30	「先端光技術でセレンディピティの計画的創出」 講師: 合田 圭介氏 (東京大学大学院)

- 場所 一般財団法人光産業技術振興協会
- 定員 各 60 名
- 参加費 光協会賛助会員: 1,500 円 (税込み) / 一般参加: 3,000 円 (税込み)
※支払いは、当日受付にて現金でお願いします。

- 申込方法 オンライン申込フォーム >>> http://www.oitda.or.jp/main/monthly/monthly_postmail.html
- 申込締切 定員になり次第締め切ります。なお、締め切った場合には Web 上にその旨を掲載します。

問い合わせ先 一般財団法人光産業技術振興協会 マンスリーセミナー担当 間瀬、潮田
〒112-0014 東京都文京区関口 1-20-10 住友江戸川橋駅前ビル7F TEL: 03-5225-6431 FAX: 03-5225-6435
E-mail: mly@oitda.or.jp URL: <http://www.oitda.or.jp/>

イオン・オプティクス社の応用科学者であるジョー・ソーハイヤー博士 (Joe Soughayer) は次のように語る。「われわれの機器の最新バージョンの目標は、科学者が計測するときの解像度と感受性を上げるようにすることである。等尺性実験では、筋肉細胞は全体でわずか $1\mu\text{m}$ 以下の動作しか示さない。究極的には、MyoTak 接着薬の弾性コンプライアンスによって設定される技術的限界まで迫りたい。そのために、われわれはマイクロマンピュレータに重要な必須条件を2つもたせた。一つは、ほぼゼロドリフトにする必要があったことだ。サブミクロンレベルのドリフトや操作があれば、われわれのユーザーが研究したいわずかな力や動作を正確に計測するのが不可能になる。もう一つは、これらは複雑で困難な実験のため、ラーニングカーブが生まれないようにシンプルで直感的な操作を特徴とするシステムが必要だった。ユーザーが科学に集中できるようにするためである」。MyoStretcherには、各サブシステムのz軸にガラス棒をマウントするときに、右左持ち構造が組み込まれている。

マイクロマンピュレータを選択する

マイクロマンピュレータには、水力学、マイクロステッパー、圧電を含むさまざまな異なる技術をベースにした数多くの種類がある。イオン・オプティクス社は、米シスキュー社 (Siskiyou) のMX7630のOEMカスタマイズ版であるDCサーボをベースにした3軸マイクロマンピュレータを選択した (図2)。この選択には、運動距離や解像度が必要な範囲を満たすDCサーボの利点があった。一方、圧電は、筋肉細胞の拾い上げ操作で重要となる動作範囲が十分でない。さらにDCアクチュエータは、

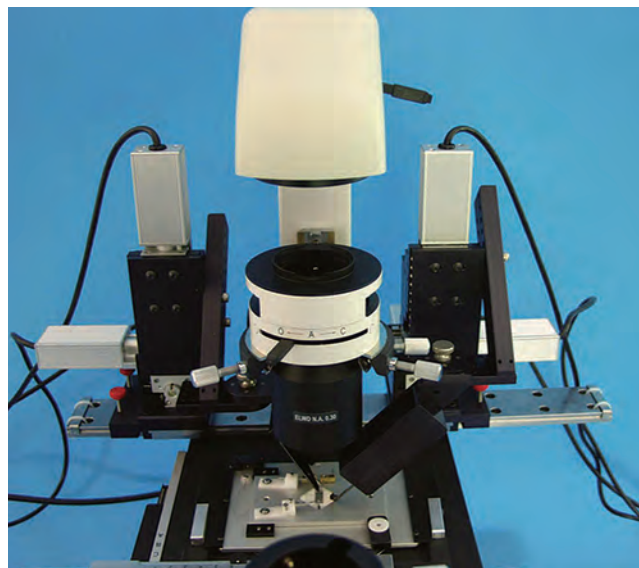


図2 The MyoStretcherには、シスキュー社の3軸マイクロマンピュレータのペア (右左持ち構造) が組み込まれている。

ステッパーや圧電とは異なり、電力を引き出さずに位置を把持できる。現在は電力を引き出すときには、固定時、すなわち計測時ですら、不要な熱が必然的に発生してしまう。熱ドリフトは、正確な位置調整において常に敵である。その点、DCアクチュエータは拡張実験も含め、非常に低いドリフトであると推論される。加えて、電気生理学的な計測も含む実験では、微小な電気信号による電磁気的干渉 (EMI) ノイズを全て避けなければならない。

DCサーボオプションの中ではMX7000シリーズは、MyoStretcherの標的パフォーマンス (1nN の計測) と相性がよい最小量の動作やドリフトでありながら、各軸を20mmまで動かせることを証明した。各軸でバックラッシュ防止のギアヘッドを搭載したモーター付きアクチュエータは、クロスローラーベアリングをリニアステージに高精度で並べられており、軸方向や側方の動作を除外する。前負荷のスクリー駆動が固定時、すなわち典型的な1個の

筋肉細胞の実験中におけるドリフトの可能性を回避する。また、3軸サブシステムは本来、電気生理学的 (パッチクランプ) 実験のために開発されたため、高倍率の光学顕微鏡の限られた手段と全体的に相性がよい。

これらのマイクロマンピュレータでは、シンプルな操作も可能である。コントローラにはプリセットで、高速 ($1.7\text{mm}/\text{秒}$) と中速 ($300\mu\text{m}/\text{秒}$) の2種類のスピード設定がある。3つ目のスピード選択である低速には、 $2\sim 50\mu\text{m}/\text{秒}$ の範囲で連続的に調節できる330度の可変ポテンシオメータがある。最も低速の設定スピードでは、単純に軸ボタンを押すだけで $0.2\mu\text{m}$ だけ動くようにされている。

1nN の力の感受性で可能になる研究が、すでにさまざまな研究室から発表されている。われわれが究極的に望むことである心臓病の減少やよりよい治療につながるであろう発見が、この技術によってさらに生まれることが期待される。

著者紹介

ジョン・ウィンガードはシスキュー社の上級メカニカルエンジニア。
e-mail: johnw@siskiyou.com URL: www.siskiyou.com