トピックス

電気化学顕微鏡を用いた 細胞計測法の実用化をめざして

東北大学大学院環境科学研究科・工学研究科
安川智之, 鳥澤勇介, 珠玖 仁, 末永智一

1. はじめに

走査型プローブ顕微鏡 (SPM) の一種である電気化学顕微鏡 (SECM) ^{1,2)} は, 界面の化学プロセスを研究するための新しい技術として導入された. SECM では, SPM の代表である走査型トンネル顕微鏡や走査型原子間力顕微鏡における探針の位置制御技術をマイクロ電気化学反応に応用している. 探針として微小電極を用いた SECM では, チップ表面で電気化学反応を検出しながら試料表面上を走査する. この際, 凹凸形状のイメージや化学反応の拡がりを捕らえることが可能である. SECM は, 試料表面上の局所領域における定量的な評価や速度論的解析に優れているため急速に進歩し, イムノアッセイ ^{3,5)}, 生体イメージング ^{6,7)}, 表面改質 ⁸⁾ などの多くの応用が試みられている.

我々は, SECM を単一細胞分析やプロテインチップの評価に適用して独自の研究を行っている. 例えば, 単一細胞近傍に微小電極を設置し, 細胞に吸収される酸素や細胞から放出される酸素を経時的に連続モニタリングすることにより, 単一細胞の呼吸活性や光合成活性を評価できる (Fig.1) また, 薬剤を添加した際の, 細胞膜透過性 ⁹⁾ および薬剤感受性 ^{10,11)} を検討することも可能である. さらに, 電極を走査すると, 細胞近傍の電気化学活性種の濃度プロファイルを獲得し, 細胞の薬物に対する感受性などの活動状況をイメージングすることが可能である ^{12,13)}. 近年では, 細胞ネットワーク構造の構築を目指して細胞のパターン培養も精力的に研究されており, その細胞の評価システムに SECM が利用されている ¹⁴⁾. 近年, SECM は, 高解像度の分析を目的

Fig.1 SECM measurement for a living cell.

としたシアフォース電気化学顕微鏡 ¹⁵⁾ (電極表面 - サンプル間距離を一定にフィードバック制御) や化学発光計測顕微鏡 ¹⁶⁾ とのハイブリッド化に応用されている. さらに, SECM の Pt 電極をわずかに溶出させて微小空間を作製し, そこに単一細胞を閉じ込めて化学的ストレス刺激を受容した際に単一細胞から放出される過酸化水素の全量検出 ¹⁷⁾ も行われている.

本稿では, SECM を検出部として用いる細胞診断システムおよびウシ胚の品質評価システムについて紹介したい. 細胞診断システムでは, 新規医薬品のハイスループットスクリーニング, 患者への負担を抑制できる低侵襲医療, さらに, 患者個人の個性を反映させたテーラーメイド医療を念頭におき, 細胞活性の評価に SECM を導入している. また, 胚の品質評価システムでは, 優良で経済性の高い家畜を効率的に生産するシステムにおいて, 将来の発生状況や着床率の向上を目指し体外受精卵や体外受精胚などを初期の段階で診断し選別するための評価法に SECM を応用している.

2. 電気化学顕微鏡を用いた細胞診断システムの構築

動物実験の代替法として, 培養細胞を利用した薬剤スクリーニングを実施するためには, 個々の培養細胞の活性を高精度で経時的に計測する必要がある. 現在, 細胞レベルでのスクリーニングには, 主に吸光計測法や蛍光計測法が用いられている. 吸光計測法は, 簡便であり多検体同時計測が可能であるが, 個々の細胞応答のリアルタイム計測には不向きである. また, 蛍光計測法は, リアルタイムで単一細胞計測が可能だが, 蛍光プローブを添加する必要がある. また, シャーレ上に培養された細胞は, 生体内とまったく異なった環境下にあ

Towards Practical Use of Single Cell Measurements with Electrochemical Microscopy

Tomoyuki YASUKAWA, Yu-suke TORISAWA, Hitoshi SHIKU and Tomokazu MATSUE

Department of Environmental Studies, Graduate School of Environmental Studies and Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

るが、生体内に類似した条件で3次元培養された細胞を対象とした計測が好ましい。そこで、我々は、コラーゲンゲルドロップ培養を用いた薬剤感受性試験法（CD-DST法）を応用した細胞チップを作製し、SECMを用いて細胞の酸素消費量を指標とした活性を計測し、薬剤スクリーニングシステムの構築を試みている¹⁸⁾。

全タンパク質の25%を占め、細胞の分化、発生、形態形成の過程において重要な役割を果たすとされているコラーゲンに細胞を包埋すると、細胞が有する固有の形態学的特性と分化機能を維持し、生体内に類似した環境下で培養可能なため、生体内環境下にきわめて近い状態で薬剤感受性を計測できる。我々は、シリコン基板に作製した複数の微小貫通孔にコラーゲン包埋細胞を固定化し、SECMを用いて細胞活性の評価を試みた。

シリコン基板に微細加工技術を駆使してピラミッド型の微小貫通孔（Fig.2）を作製した。微細加工技術を用いると、同じ大きさの微小孔の任意配列が容易なため、多種の培養細胞株を微小孔に固定化したスクリーニングシステムを構築できる。この貫通孔に細胞 - コラーゲン混合液を充填後、³⁷ でインキュベートして固定化し細胞チップを作製した。微小孔の体積は18 nLで、約300個の細胞が存在する。この微小孔にマイクロ電極を近接させて走査し、近傍の酸素濃度を検出した。

Fig.3に、コラーゲンゲルドロップ培養法によって微小貫通孔に固定化した細胞チップの顕微鏡写真およびそのSECMイメージを示す¹⁸⁾。細胞としてヒト赤芽球様白血病細胞株（K562、半径；10 μm 、細胞充てん率；

約7%、写真左）およびADM耐性細胞株（K562/ADM、写真右）を固定化し、制がん剤であるアドリマイシン（ADM）を作用させた際の細胞活性を評価した。SECMイメージでは、写真の細胞パネルと一致した位置に2つの明スポットが観測された。細胞不含のパネルではスポットが観測されないため、細胞パネル近傍での酸素還元電流の減少は、酸素の細胞 - コラーゲンゲルへの取り込みを意味し、細胞は呼吸により生命活動を維持していることが示唆された。K562細胞およびK562/ADM細胞の酸素還元電流の減少は約30 pAと同程度であり、パネルへの包埋細胞数が同数なので、呼吸活性はほぼ同程度とみなせる。一方、1 μM のADMを細胞チップに投与し3日間培養後のSECMイメージでは、K562/ADMの呼吸活性がK562と比較して明らかに高い。K562細胞はADMにより増殖を阻害されるが、K562/ADM細胞は増殖を続けることが示された。これらの結果から、薬剤投与前後の細胞活性の直接比較検討が可能であることにSECMを用いたアッセイの最も重要な特長があると言える。また、蛍光法では、プローブ

Fig.2 SEM image of silicon microstructures and SECM-based viability assay.

Fig.3 (a)Optical micrograph of collagen-cell matrix integrated on silicon microstructure¹⁸⁾. K562 and K562/ADM were embedded in left and right holes, respectively. (b, c) SECM images of the cell panel in HEPES-based saline solution before (b) and 3 days after (c) exposure to a medium containing 1 μM ADM. A Pt microelectrode was set at the potential of - 0.5 V and scanned 30 μm above the silicon substrate at the scan rate of 19 $\mu\text{m/s}$.

が細胞毒性を有する可能性を否定できず、経時的な長期検討には不向きであるが、コラーゲンゲルドロップ法を応用した細胞チップSECMでは、複数の異種細胞を細胞チップに固定して3次元的に培養でき、数日間における長期的および経時的な比較検討が可能である。さらに、ADM濃度依存性や連続投与に対する感受性試験を試みた結果、低濃度(0.1 μM ADM)の制がん剤の繰り返し長期投与が効果的であるという可能性を示せた。

現在では、がんなどの疾病のテーラーメード治療に対応すべく、細胞チップを利用した薬物感受性アッセイシステムの確立に取り組んでいる。がんの化学療法の観点から、分子レベルおよび遺伝子レベルで新規制がん剤開発が活発に行われているが、それと並行して個々の患者に最も効率的な薬剤を選択し、投与条件を決定するシステムの確立が必要不可欠である。新薬の薬効を把握し、患者への副作用を限りなく抑制し、高い治癒効果の取得を期待して、患者にあった化学療法を施行できるテーラーメード医療に大きな注目が集まっている。そこで、我々は、SECMと細胞チップを用いた制がん剤スクリーニングの抽出細胞への適用を検討している。免疫不全マウスにヒトがん細胞を移植し腫瘍を形成させて抽出する。その抽出細胞を用いて細胞チップを作製し、SECMを用いて複数種類の制がん剤感受性試験を試みている。SECMを用いた細胞診断システムは、次に挙げた特長を有しており、臨床医療の分野において開発が待ち望まれている。

- ・ 診断に必要な抽出細胞はごくわずかである
- ・ 患者の心理的および肉体的なダメージを軽減できる
- ・ 繰り返し抽出や体力の衰えた患者への適用も容易である
- ・ 投与した薬剤の効能を経時的に診断できる
- ・ 正常細胞も含む多種細胞の薬剤感受性を同時に検討できる

また、この手法はハイスループットスクリーニングとして有効であり、新規医薬品の開発速度が飛躍的に向上するとともに、不必要な薬剤投与を抑えることができるため医療費への負担の削減、副作用の軽減も可能になると期待している。

3. ウシ胚の品質評価システム

クローン家畜やトランスジェニック家畜作出の基盤技術である体外受精胚生産技術は、優良な家畜を選択的にそして能率的に生産するために必要不可欠である。現在では、体外受精胚の体外培養において、培養液と胚の微細形態および品質の連関について詳細な検討がなされている。特に、ウシ胚の体外培養におけるミトコン

ドリアの形態変化と品質との関係について(株)機能性ペプチド研究所および(財)山形県企業振興公社のグループが精力的に研究を行っている。このグループは、開発した無血清培地(IVMD101およびIVD101)を用いて体外胚培養¹⁹⁾²⁰⁾を行うと、桑実胚期以降において細胞内には脂肪滴が少なく成熟したミトコンドリアが多く存在するようになり、胚盤胞形成率の高い高品質胚が得られると報告している²¹⁾²³⁾。しかし、これは形態観察による胚評価であり、生産者はさらに信頼性の高い無侵襲的な胚の品質評価法を切望している。

そこで、我々はウシ体外受精胚の品質評価に、呼吸活性を指標とした電気化学顕微鏡を応用している²⁴⁾²⁵⁾。胚をマイクロピペットで固定し、微小電極を胚近傍でXYZ方向にそれぞれ走査する。その際に計測した酸素還元電流から、胚近傍の酸素濃度プロファイルを得ることができ、胚の呼吸活性を測定できる。この手法を用いると、胚1個ずつの酸素消費量を定量的に計測²⁶⁾できるため胚のランク判定が容易である。さらに、蛍光プローブなどを介在させる必要もなく、培養状況にきわめて近い状態の計測が可能であるため、胚にほとんどダメージを与えることがない。よって、計測後の継続培養および受精卵移胚や凍結保存の工程へ移行可能である。Fig.4に、測定時の顕微鏡写真と体外受精後6日の

Fig.4 Local concentration profiles for a morula on day 6 after *in vitro* fertilization, versus the distance from the embryo surface²⁴⁾. The tip approached the morula by scanning in the X direction. The tip scanned a 500 μm step at 14.7 $\mu\text{m/s}$. Bar, 200 μm .

Table 1 The relationship between the oxygen consumptions of the morulae on day 6 and the further developmental potency of these embryos ($n = 29$)²⁴⁾.

Category determined by SECM measurement	r_s (day 8)			Blastocoel formation	Development to hatched blastocyst
	$r_s < 80$	$80 \leq r_s < 90$	$90 \leq r_s$		
ΔC day 6 $\geq 5.0 \mu M$	4/20 (20%)	5/20 (25%)	11/20 (55%)	19/20 (95%)	13/19 (68%)
ΔC day 6 $< 5.0 \mu M$	7/9 (78%)	2/9 (22%)	0/9 (0%)	3/9 (33%)	0/9 (0%)

The embryo radius including zona pellucida (r_s) on day 8, the blastocoel formation, and the development to hatched blastocyst was surveyed under an optical microscopy.

桑実胚近傍の酸素濃度プロファイルを示す²³⁾。マイクロピペット (写真右) を用いて直径150 μm の桑実胚を固定し、マイクロ電極 (写真左) を胚のZ方向中心においてY方向に走査している。マイクロ電極を桑実胚近傍に近接させると胚の呼吸に伴う酸素消費のため酸素濃度が減少していることがわかる。この胚のバルクと胚表面の酸素濃度の差 (ΔC) は、4.36 μM であった。

次に、受精後6日目の桑実胚をあらかじめ形態判定法によりExcellent, Good, Fairに分類し、それぞれの胚を電気化学的に評価してその後の発生を調査した。高ランクと判定されたほとんどの胚の呼吸活性は高いが、低ランクの胚の呼吸活性は低い。さらに、胚を呼吸活性の高い胚 ($\Delta C < 5.0 \mu M$) および呼吸活性の低い胚 ($\Delta C > 5.0 \mu M$) に分別し発生率を検討した (Table 1)²³⁾。活性の高い胚は大きな胚へ発生し、ほとんどが胚盤胞、脱出胚盤胞まで到達した。一方、活性の低い胚のサイズ増加率は小さく、胚盤胞への発生率も低かった。また、呼吸量の大きな胚は高い耐凍能を有しており、凍結保存および融解操作における生存率が高いことも示されている。このように、受精後初期の段階で電気化学顕微鏡を用いた胚の品質評価を行うことにより、その後の発生率を高い信頼性で予測できることを示した。この計測を用いて体外受精胚を選別することにより受胎率および凍結保存率の向上を図ることが現実的になってきた。この品質評価法が、経済性の高い家畜において効率的に高品質の産仔を得るための生産システムに組み込まれていくことと期待している。

4. おわりに

本稿では、電気化学顕微鏡を利用した細胞診断システムとウシ胚の品質評価について紹介した。SECMを利用した細胞診断システムは、臨床検査の前の段階にある大量の医薬品候補物質のハイスループットスクリーニングに適用できるとともに、実際の患者から摘出した細胞を診断することにより、その患者に最も適した薬剤の選定、薬量の決定を行うことが可能になり、さらには、投薬後の疾病の状況を連続的にモニターでき

るテーラーメイド医療へとつながると考えている。ウシ胚の品質評価では、体外受精後6日目の桑実胚の段階で将来の発生状況を高確率で予測できている。今後は、さらに初期の段階における品質判別を試み、高品質家畜生産システムの開発における基礎的な評価システムとして確立させていきたい。どちらも、SECMが最も実用化に近いシステムであり、今後のさらなる研究の進歩と開発を期待している。

文 献

- 1) Bard, A. J. *et al.* (1989) *Anal. Chem.* **61**, 132-138.
- 2) Engstrom, R. C. *et al.* (1989) *Anal. Chem.* **61**, 1099A-1104A.
- 3) Kasai, S. *et al.* (2000) *Anal. Chem.* **72**, 5761-5765.
- 4) Shiku, H. *et al.* (1996) *Anal. Chem.* **68**, 1276-1278.
- 5) Shiku, H. *et al.* (1997) *J. Electroanal. Chem.* **438**, 187-190.
- 6) Yasukawa, T. *et al.* (2000) *Electroanalysis* **12**, 653-659.
- 7) Yasukawa, T. *et al.* (1999) *Anal. Chem.* **71**, 4637-4641.
- 8) Shiku, H. *et al.* (1997) *Langmuir* **13**, 7239-7244.
- 9) Yasukawa, T. *et al.* (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1369**, 152-158.
- 10) Yasukawa, T. *et al.* (1999) *Biophys. J.* **76**, 1129-1135.
- 11) Yasukawa, T. *et al.* (1998) *Chem. Lett.* 767-768.
- 12) Yasukawa, T. *et al.* (1999) *Chem. Lett.* 975-976.
- 13) Kaya, T. *et al.* (2003) *Biosens. Bioelectron.* **18**, 1379-1383.
- 14) Nishizawa, M. *et al.* (2002) *Langmuir* **18**, 3645-3649.
- 15) Oyamatsu, D. *et al.* (2003) *Bioelectrochemistry* **71**, 439-441.
- 16) Kasai, S. *et al.* (2002) *Anal. Chem. Acta.* **458** (2), 263-270.
- 17) Yasukawa, T. *et al.* (2002) *Anal. Chem.* **74**, 5001-5008.
- 18) Torisawa, Y. *et al.* (2003) *Anal. Chem.* **75**, 2154-2158.
- 19) Yamashita, S. *et al.* (1999) *Cytotechnology* **31**, 1-9.
- 20) Hoshi, H. *et al.* (1999) *Tiss. Cult. Res. Commun.* **18**, 163-172.
- 21) Abe, H. *et al.* (1999) *Anat. Embryol.* **199**, 519-527.
- 22) Abe, H. *et al.* (1999) *Mol. Reprod. Dev.* **53**, 325-335.
- 23) Abe, H. *et al.* (2002) *Theriogenology* **57**, 1273-1283.
- 24) Shiku, H. *et al.* (2001) *Anal. Chem.* **73**, 3751-3758.
- 25) Shiku, H. *et al.* *Anal. Chim. Acta.* submitted.
- 26) Yasukawa, T. *et al.* (1998) *Denki Kagaku* **66**, 660-661.

安川智之(やすかわ ともゆき)
東北大学大学院環境科学研究科 助手
連絡先: 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉07
E-mail: yasu@bioinfo.che.tohoku.ac.jp
鳥澤勇介(とりさわ ゆうすけ)
東北大学大学院環境科学研究科 博士課程1年
連絡先: 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉07
E-mail: tori@bioinfo.che.tohoku.ac.jp
珠玖 仁(しく ひとし)
東北大学大学院環境科学研究科 助教授
連絡先: 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉07
E-mail: shiku@bioinfo.che.tohoku.ac.jp
末永智一(まつえ ともかず)
東北大学大学院環境科学研究科・工学研究科 教授
連絡先: 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉07
E-mail: matsue@bioinfo.che.tohoku.ac.jp
URL : <http://www.bioinfo.che.tohoku.ac.jp>