4 水晶振動子マイクロバランスを用いる動物細胞の接着・増殖モニタリングとその応用

篠原 寛明

1 はじめに

細胞培養において増殖計測は、その細胞の増殖能や状態を把握するための基本検討項目であるとともに、細胞の成長に対する促進因子や阻害因子の探索、評価や毒物スクリーニングなどに役立っている。また細胞の接着計測も、増殖や分化などの機能発現の前段階を研究するうえで必要であり、細胞と細胞外マトリックスの相互作用の評価や、細胞接着因子や接着阻害剤の評価などからも重要である。いずれの場合にも培養容器の底面やキャリア担体に接着している細胞を計数する操作が基本であるが、この接着状態の細胞の計数は、浮遊細胞の計数に比べ容易ではない。現在、接着した細胞を計数するために良く用いられている方法としては、光学顕微鏡で直接観察する方法、培養基板から剥離させた後で血球計算盤を用いてあるいはコールターカウンターのような装置を用いて計数する方法、細胞内還元反応を比色定量する方法、ラジオアイソトープ標識したDNA前駆体の取り込みを計測する方法などが挙げられるが、いずれにしても多大な労力を要し、断続的計測にならざるを得ない。実際私たちの研究室でも培養細胞の増殖特性を調べるには、通常光学顕微鏡観察による計数を行っているが、その手間と不連続性を何とか改善できないかと考えてきた。

一方、近年水晶振動子の共振周波数の測定により、振動子表面における物質の吸着、析出や結合反応などナノグラムオーダーでの微小重量変化の測定が可能となり、電析や電解重合などの研究に応用される^{1,2)}とともに、抗体を固定化した水晶振動子を用いた水中でのイムノアッセイや特定微生物の検出^{3,4)}などのバイオセンシングへの応用も進んでいる。また最近では固定化されたオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを利用するターゲットDNAのセンシング⁵⁾などの研究も報告されている。こうした背景の中、筆者は、接着性動物細胞が基板表面に接着した形で増殖する点に注目し、Fig. 1に模式的に示すように水晶振動子を培養基板として用い基板表面の重量変化を測定すれば、細胞数を直接かつ連続的にモニタリングできるものと発想した。また増殖に影響を及ぼす因子の簡便評価も可能になるであろうと期待した。早速文献調査を行ったが、研究開始当時には、血小板の接着挙動を連続モニタリングする試み⁶⁾が報告されていたのみで、培養動物細胞の増殖を水晶振動子マイクロバランス（以下QCMと略す）を用いてモニタリングしている報告は見つからなかった。そこでQCMを用いる微小重量測定法により、接着性培養動物細胞の増殖挙動を直接かつ連続的にしかも簡便にモニタリングする手法を確立し、さらにその手法を細胞の増殖速度に影響を及ぼす物質や培養条件の評価に応用し得

Fig. 1 Idea of real time monitoring of cell proliferation with QCM.

ることを明らかにすることを目的として研究を開始した。本報では、筆者達がこれまで行ってきたQCMを用いる培養動物細胞の増殖モニタリングならびに接着モニタリングの概要⁷⁾について紹介したい。また一昨年来日本でも内分泌かく乱物質いわゆる環境ホルモンの汚染問題が大きくクローズアップされ、早急な研究・対策が望まれているが、この環境ホルモン計測への応用性⁸⁾についても述べたい。なお御存知の方も多いようにQCMの共振周波数は、振動子表面の重量変化だけでなく粘性変化にも依存して変化することが知られており、本研究を進めるに当たっても議論しなければならない基礎的検討点も多々あるが、ここではQCMを微小重量センサーとして用いることによって一応細胞の増殖や接着挙動を簡便にかつリアルタイムにモニタリングできる点を御理解いただければと思う。

2 実験に用いたQCMシステム

本研究では金蒸着(1.33 cm²)、ATカット、共振周波数6 MHzの水晶振動子を用いる北斗電工社のシステムと、金蒸着(0.20 cm²)、ATカット、共振周波数9 MHzの水晶振動子を用いるセイコーEG & G社のシステム、2社の水晶振動子マイクロバランス(QCM)を利用した。実験系はいずれも水溶液系であるので、水晶板の片面のみが細胞培養液に接触するよう工夫する必要があるが、2社とも一応そのままでも細胞培養系にも利用できるようにウェル型のセルが用意されている。用いた両システムの外観をFig. 2に示す。水晶振動子の振動数変化 ΔF (Hz)と吸着物質の質量 Δm (g)との間には、Sauerbreyの式 $\Delta m / \Delta F = -4.42 \times 10^5 \times A / F^2$ (ここでFは基本振動周波数(Hz)、Aは振動子の金蒸着電極部の面積(cm²))が成り立つことから、北斗電工社のQCMシステムの場合には1 Hzの振動数変化が16 ngの重量変化に、またセイコーEG & G社のシステムの場合1 Hzの振動数変化が1 ngの重量変化に対応すると考えられる。

Fig. 2 Schematic illustration of the QCM systems for monitoring of cell proliferation and adhesion.

3 QCM を用いる細胞増殖モニタリングと増殖因子評価への応用

まず QCM の接着性動物培養細胞の増殖モニタリングへの適応性を検討した。実験には、上皮系の細胞でその増殖特性が良く研究されているヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞は、通常は組織培養用フラスコ中で、DMEM-10 % FBS 培地を用い、5 % CO₂, 37 °C 条件下で継代培養した。

増殖モニタリングは、培養フラスコと QCM ウェルに HeLa 細胞を同時に播き、CO₂ インキュベータ中に保ち、培養フラスコの系では、毎日定時刻に倒立型顕微鏡観察により細胞数をカウントすることによって、一方 QCM ウェル系では、振動数を自動計測することによって行った。フラスコ中での細胞の増殖曲線と QCM システムで測定した振動数変化を Fig. 3 に重ねて示す。振動数は、細胞の増殖を反映するように減少しており、QCM システムによって増殖の簡便モニタリングが可能であることが示された。ただし培養フラスコ中の HeLa 細胞の増殖曲線から求めた倍加時間は、約 28 時間であり、一方 QCM モニタリングシステムにおける HeLa 細胞の倍加時間は、約 34 時間であった。Fig. 4 には培養 6 日後に水晶振動子をセルから取りだし、固定化、乾燥した後振動子表面を SEM 観察した結果を示す。HeLa 細胞の接着、増殖が確かめられるとともに、フラスコ中に比べて細胞密度がやや低いことも示された。この増殖速度の差は基板材質の差によるものと考えられる。

次いで増殖に影響を及ぼす因子の評価へ応用できることを明らかにすることを目的として増殖阻害剤の作用モニタリングを試みた。HeLa 細胞を播いた通常の培養フラスコと振動子セル中に DNA 合成酵素阻害剤であるアフィジコリンを培養 2 日目に添加し、3 日目に培地交換する方法により増殖抑制の ON-OFF をかけ、細胞数をそれぞれ顕微鏡計数およ

Fig. 3 Monitoring of proliferation of HeLa cells with the QCM system (●) and by microscopic observation in a culture flask (□). Time interval of QCM monitoring was 1 hr.

Fig. 4 SEM image of HeLa cells cultured on a quartz crystal oscillator.

び振動数測定でモニタリングし、比較した。アフィジコリンによる HeLa 細胞の増殖阻害をフラスコ中の顕微鏡観察と QCM システムで同時観測した結果を Fig. 5 に合わせて示す。培養フラスコ中とややずれがあるもののアフィジコリンの添加にともない増殖抑制がかかり、その除去により増殖が再開される様子を QCM システムでモニタリングできることが示された。このように増殖の開始や停止そして再開を連続的に自動モニタリングできる点が本システムの優れたところといえる。

4 細胞接着モニタリングと接着阻害剤の作用評価への応用

次に QCM を用いた細胞接着モニタリングおよび接着阻害剤の作用評価への応用について紹介する。この接着モニタリングの実験にも、接着特性も良く研究されていることから増殖モニタリングの実験と同じ HeLa 細胞を用いた。HeLa 細胞の継代培養は、増殖モニタリング時と同様に行い、ほぼコンフルエントになった時点で剥離して接着実験に使用した。QCM による接着モニタリングには、セイコー EG & G 社のシステムを用いた。

Fig. 5 Monitoring of proliferation inhibition for HeLa cells with the QCM system (—○—) and by microscopic observation in a well (—■—).

細胞接着活性の測定は、従来法では接着タンパク質であるフィブロネクチンをコートし、BSA ブロッキングした 24 穴マルチウエルに、HeLa 細胞懸濁液を入れ CO_2 インキュベータ中で 90 分インキュベートし、洗浄後底面の接着細胞数を顕微鏡観察し計数した。これに対して QCM による接着モニタリングでは、水晶振動子をウェル型セルにセットしてフィブロネクチンコート、BSA ブロッキングを施し、PBS で平衡化させた後、細胞懸濁培地を添加して細胞接着に伴う振動数変化を 10 秒ごとに 3 ~ 5 時間自動計測した。

20 $\mu\text{g/mL}$ でフィブロネクチンコートした QCM ウェル中に細胞を含まない培地をインジェクトした場合、Fig. 6(A) に見られるように振動数は大きくは変化しないが、細胞懸濁培地をインジェクトした場合には、Fig. 6(B) に示すように振動数は大きく減少しやがて定常になる様子が観測された。計測後水晶振動子上の細胞の接着の様子を走査型電子顕微鏡あるいはデジタルマイクロスコープで観察したところ、確かに接着が確かめられ、振動数変化から接着挙動をリアルタイムでモニタリングできることが示唆された。さらに振動子上へのフィブロネクチンのコート濃度を変えて接着実験を行った。フィブロネクチンコートしたマルチウェルを用いて細胞接着を光学顕微鏡観察する従来法によりフィブロネクチンコート濃度と接着数の関係を調べ、QCM システムで評価した結果と比較した (Fig. 7)。フィブロネクチンのコート時の濃度が高くなるほど細胞接着数ならびに振動数変化は増大し、20 $\mu\text{g/mL}$ 程度のコート濃度で飽和する様子がともに見られ、QCM の振動数変化によりコートしたタンパク質の細胞接着能を評価できることが示唆された。

フィブロネクチンの細胞接着部位 (モチーフ) のひとつはアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (アミノ酸の一文字表記で RGD 配列とよぶ) であることが明らかにされており、RGD ペプチド断片は接着タンパク質をコートした基板への

Fig. 6 Real time monitoring of HeLa cell adhesion onto a fibronectin-coated oscillator with the QCM system. (A): Medium was injected. (B): Cell suspended medium was injected.

Fig. 7 Dependences of adhered cell amount on fibronectin-coating concentration by microscopic observation method (—□—) and by QCM method (—●—).

接着を阻害する。そこでフィブロネクチンコートした振動子上での HeLa 細胞の接着挙動を RGD ペプチド添加下で QCM モニタリングしたところ、振動数変化は確かに RGD ペプチド非存在下に比べ抑制され、しかもその抑制効果は RGD ペプチドの添加濃度にしたがって増大することが示された (Fig. 8)。よって接着阻害作用を QCM の振動数変化で評価できることが示された。

5 内分泌かく乱物質(環境ホルモン)計測への応用

内分泌かく乱物質 (環境ホルモン) とは、生体機能を正常に保つホルモンのはたらきを乱す化学物質で、ごく微量で生殖機能の異常 (精子数の減少や子宮内膜症の発生など)、奇形児の発生、子供の成長や知能発達の遅延、発がんなどの障害を引き起こす可能性が指摘されており、そのため検出法や評

Fig. 8 Evaluation of adhesion inhibition by RGD peptide with QCA measurement. ΔF_0 is the frequency change in the absence of RGD peptide.

価法の早急な確立が求められている。この環境ホルモンの代表的なものとして、これまでプラスチック製の容器や食器などの原料や可塑剤として利用されてきたビスフェノール A やフタル酸エステル類など、女性ホルモンエストロゲンに似たはたらきをする物質が挙げられている。こうしたエストロゲン様環境ホルモンの検出・評価法の代表的なものとして現在は、エストロゲン受容体を用いて天然エストロゲンと環境ホルモンの競争結合を調べるバインディングアッセイ法、ヒトのエストロゲン受容体遺伝子、転写共役因子およびレポーターとよばれる酵素の遺伝子を遺伝子工学的手法で導入したヒトの培養細胞あるいは酵母を用いて、環境ホルモンによる転写活性の発現を酵素活性から測定し定量評価するレポータージーンアッセイ法、エストロゲン量に依存して増殖が促進される細胞（ヒト乳癌由来の MCF-7 細胞など）を培養し、試験化合物を添加して一定時間後に細胞数を測定する E-スクリーン法などが挙げられる。

そこで筆者らは、MCF-7 細胞の増殖モニタリングを QCM を用いて試み、エストロゲンおよびエストロゲン様環境ホルモンのスクリーニングへの応用について検討することにした。MCF-7 細胞の通常培養は、RPMI 1640+10 % FBS を培地として用い、37 °C、5 % CO₂ 下で 2、3 日置きに培地交換して行った。モニタリングには、セイコー EG & G 製の QCM システムを用いた。

培養フラスコでの MCF-7 細胞の増殖曲線を Fig. 9 に示す。通常のフェノールレッド (1.4×10^{-5} M) を含む培地中では、その中に含まれるエストロゲン様不純物のために、MCF-7 は増殖可能であるが、フェノールレッドを含まない培地を用いた場合、細胞はほとんど増殖しない。フェノールレッドを含まない培地中に代表的エストロゲンであるエストラジオール-17 β を 10^{-9} M 加えた場合およびエストロゲン様作用が指摘されているビスフェノール A を 10^{-7} M 加えた場合、フェノールレッドを含む培地中とほぼ同様な速度で細胞増殖が見られた。次いで QCM を用いて MCF-7 細胞の増殖を振動数計測により自動モニタリングすることを試みている。Fig. 10 に示すようにフェノールレッドフリーの培地を用い

Fig. 9 Proliferation curves of MCF-7 cells in flasks by microscopic observation method. (—□—): In the absence of phenol red. (—■—): In the presence of phenol red. (—●—): In the presence of 10^{-9} M estradiol-17- β . (—△—): In the presence of 10^{-7} M bisphenol A.

Fig.10 Evaluation of estrogen-like effect of phenol red impurities by QCM monitoring for proliferation of MCF-7 cells. (a): in a phenol red free medium. (b): in the medium containing phenol red.

た場合、測定期間中大きな振動数変化が見られなかったのに対し、フェノールレッドを含む培地中では、連続的な振動数の減少が観察された。現在エストロゲン自体やビスフェノール A の添加下における増殖過程の QCM モニタリングを進めているところであるが、本方法はエストロゲン様環境ホル

モンによる増殖促進効果を評価するのに応用できるものと期待している。

6 まとめ

水晶振動子マイクロバランス (QCM) を用いる微小重量測定により、接着性培養動物細胞の増殖挙動や接着挙動を極めて簡便に、しかも連続モニタリングできることを紹介した。振動数変化と細胞数や接着力との正確な関係などまだ現在検討中であるが、本システムは、接着性動物細胞の増殖や接着に影響を及ぼすタンパク質、薬物、環境汚染物質、毒物などの評価やスクリーニングに極めて有効であると期待できるだけでなく、現在開発が進んでいる医用材料の素材と動物細胞の相互作用の検討などにも役立つものと期待している。

最後に本研究を進めるに当たり御助成をいただいた岡山工学会に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 小山 昇, 直井勝彦, 大坂武男, (続) 電気化学測定法, 電気化学協会, 第21章 (1995).
- 2) 瀬尾真浩, 電気化学 (presently *Electrochemistry*), **66**, 504 (1998).

- 3) 民谷栄一, バイオエレクトロニクス, 軽部征夫, 民谷栄一編, 朝倉書店, 第3章 (1994).
- 4) 村松 宏, 電気化学 (presently *Electrochemistry*), **63**, 994 (1995).
- 5) 岡畑恵雄, 新倉謙一, 電気化学 (presently *Electrochemistry*), **66**, 7 (1998).
- 6) T. Matsuda, A. Kishida, H. Ebato, and Y. Okahata, *ASAIO Journal*, **38**, M171 (1992).
- 7) 篠原寛明, *Annual Report of the Okayama Foundation for Science and Technology*, **6**, 80 (1997).
- 8) 篠原寛明, 野亀泰宏, 木村克史, 木谷佳弘, 穴戸昌彦, 第3回バイオテクノロジー部会シンポジウム講演要旨集, p. 40 (1998).

●著者プロフィール

氏名: 篠原 寛明 Hiroaki SHINOHARA
 所属: 岡山大学工学部生物機能工学科
 (〒700-8530 岡山市津島中3-1-1)
 役職: 助教授
 趣味: 訪れた町のぶらり歩き

書評

材料電気化学

著者/逢坂 哲彌, 太田健一郎, 松永 是, 発行/朝倉書店 (1998年10月) 価格/4,600円

本書は日本化学会の材料シリーズ書の一つであり、材料という切り口から電気化学分野をまとめたテキストである。3人の著者の立場から特に、研究開発に直結したテーマをなまなましくまとめており、大学院用テキストに最適であり、かつ会社における研究開発部隊の若手研究者には魅力あるテキストとして利用できる。

以下に、その内容を示すが、最後の章は、ここ数年で最も話題性の高いテーマを著者らのみならず何人かの若手研究者が、各々まとめていて興味深い。

- 1章 電気化学システム
- 2章 電気化学の基礎
- 3章 電気化学システム材料
- 4章 電池と材料
- 5章 電解プロセスと材料
- 6章 表面処理と機能めっき
- 7章 化学センサーと材料
- 8章 機能膜とドライプロセス
- 9章 生物電気化学と材料
- 10章 材料電気化学における最近の話題
 (国立リハビリテーションセンター研究所, 山内 繁)