

図2 胚の呼吸測定のための関連技術

- a: ディスク型白金マイクロ電極.
- b: 多検体測定プレート. 底面には円錐形のマイクロウェルが6穴施されている.
- c: マイクロウェル底部に静置したウシ胚.
- d: マイクロ電極は胚近傍を鉛直方向に走査し, 胚の酸素消費量を測定する.

関係を示す興味深い研究成果が得られている。呼吸測定後の胚を借腹牛に移植し胚の呼吸活性と受胎率の関係を調べた結果、移植前の呼吸量が基準値以上(胚盤胞で $1.0 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$, 初期胚盤胞で $0.8 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$, 桑実胚で $0.5 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$) の胚を移植した場合、60%以上の高い妊娠率が得られている。一方、呼吸量が基準値以下の胚は、ほとんど受胎しない。この研究結果から、受精卵呼吸測定装置はクオリティ良好胚の選別に有効なシステムであると考えられている³⁾。

ヒト胚の呼吸機能解析

受精卵呼吸測定装置は、ほとんどの細胞に共通するミトコンドリア呼吸を測定していることから汎用性は高く、ヒト胚の呼吸機能解析やクオリティ評価への応用が期待されている。

ヒトへの応用を目的とした基礎的研究として、ヒト胚(余剰胚)の形態と呼吸測定例を示す(図6)。体外受精3日(day 3)および5日(day 5)の胚の酸素消費量は、それぞれ $0.45 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ および $1.15 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ で

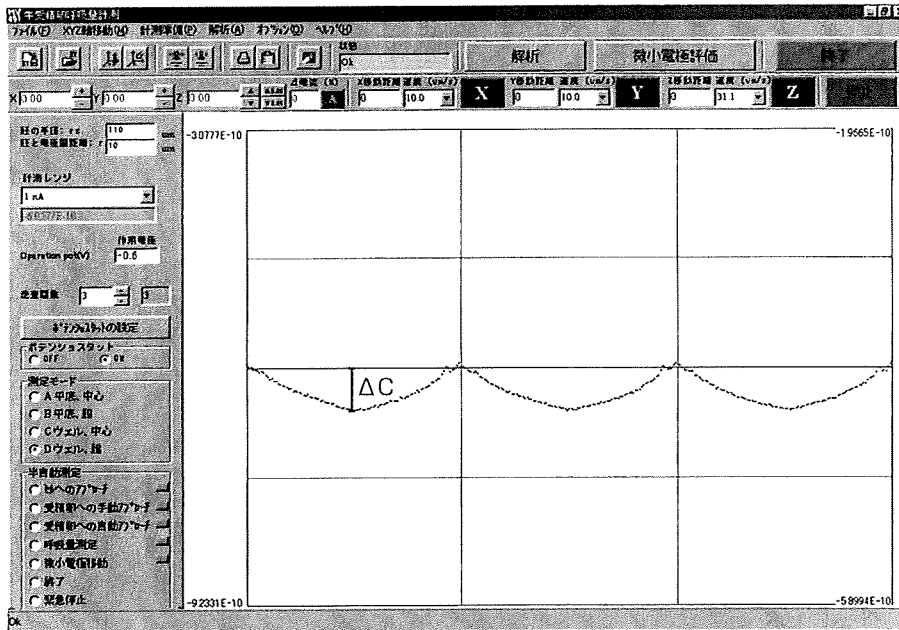


図3 呼吸解析ソフトの画面

マイクロ電極の走査の始点と終点の電流値の差 (ΔC) から胚の酸素消費量 (呼吸) を算出する。

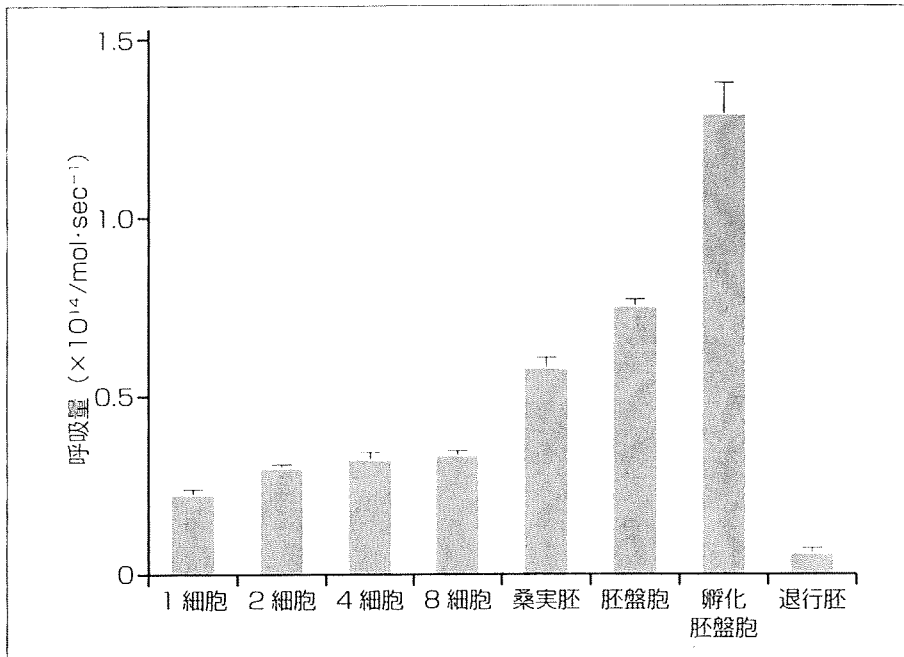


図4 マウス胚の発生過程における呼吸量変化
桑実胚から胚盤胞期にかけて呼吸量が増加する。

あり、発生が進んだ胚の呼吸活性は高い傾向にある。電子顕微鏡を用いたミトコンドリアの微細構造解析により、day 5胚では発達したミトコンドリアが多く観察される。このようにヒト胚においても、受精卵呼吸測定装置を用いたミトコンドリア呼吸機能解析研究が進んでいる。

今後、IVF-ETを中心とする不妊治療成績の向上には、移植の対象となる胚のクオリティ評価がこれまで以上に重要になってくる。精度の高い胚クオリティ評価法確立のためには、現行の形態の評価法と比べて客観性の高いクオリティ評価法の開発が不可欠である。

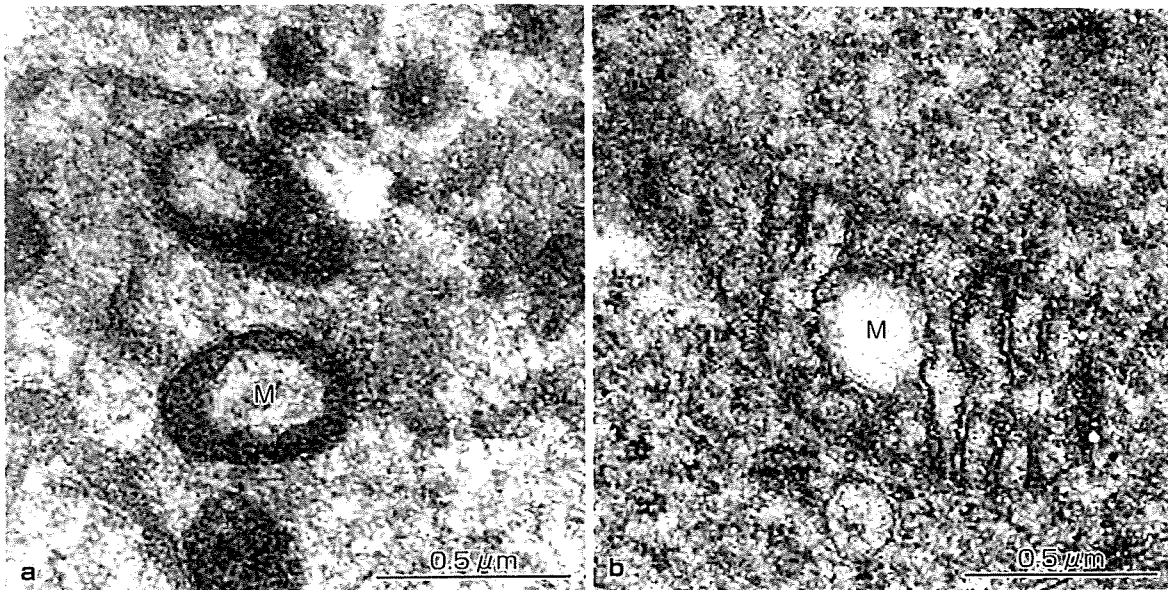


図5 マウス胚のミトコンドリアの微細形態
a: 2細胞期胚, b: 胚盤胞. M: ミトコンドリア.

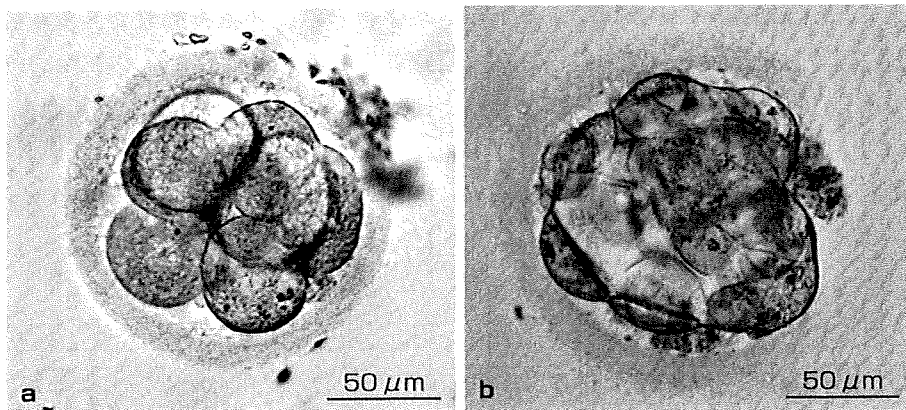


図6 ヒト体外受精胚の形態と酸素消費量
a: day 3 胚 ($0.45 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$), b: 胚盤胞 ($1.15 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$).

本稿で述べた受精卵呼吸測定装置は、高精度・非侵襲的に胚の呼吸代謝機能を解析できることから、新しい胚のクオリティ評価の有効な基盤技術として期待できる。

文献

1) Abe H, Shiku H, Aoyagi S, et al. In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J Mamm Ova Res.* 2004;

21: 22-30.

2) Shiku H, Shiraishi T, Ohya H, et al. Oxygen consumption of single bovine embryos probed with scanning electrochemical microscopy. *Anal Chem.* 2001; 73: 3751-8.

3) Abe H, Shiku H, Yokoo M, et al. Evaluating the quality of individual embryos with a non-invasive and highly sensitive measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *J Reprod Dev.* 2006; 52 (Suppl): S55-64.

電気化学計測技術を応用した シングルセル呼吸機能解析と応用

阿部宏之*

* 山形大学 大学院理工学研究科 物質化学工学分野 教授

『シングルセル解析の最前線』
2010年3月 シーエムシー出版刊 抜刷

5 電気化学計測技術を応用したシングルセル呼吸機能解析と応用

阿部宏之*

5.1 はじめに

ミトコンドリアは生命活動に必要なエネルギーの生産やアポトーシスなど重要な生物現象に関与しており、その機能が障害されると代謝異常や種々の疾患の原因となる。また、ミトコンドリアの呼吸活性は細胞の代謝活動や機能評価の有効な指標となることから、シングルセルレベルでの高精度呼吸計測技術は、細胞のクオリティー評価や疾患の診断などに極めて有効な手段となる。本節では、局所領域における生体反応をリアルタイムで追跡できる電気化学計測技術を応用した高精度・非侵襲細胞呼吸計測システムを解説するとともに、この技術を応用したシングルセルレベルでの呼吸機能解析や細胞間ネットワーク解析、受精卵クオリティー評価への応用研究を紹介する。

5.2 マイクロ電極を用いた細胞呼吸測定装置

電気化学計測法はプローブ電極による酸化還元反応を利用し、局所領域における生物反応を電気化学的に検出する技術であり^{1,2)}、この技術の有効な装置としてマイクロ電極を探針とする走査型電気化学顕微鏡 (Scanning electrochemical microscopy : SECM) が注目されている。SECMの空間分解能は探針であるマイクロ電極径に依存するため原子や分子レベルの解析は困難であるが、局所空間での化学反応の評価やイメージング、生体材料を用いたリアルタイム解析や化学反応誘起が可能であることから、局所領域の電気化学センシングなど種々の系で用いられている³⁻⁶⁾。例えば、酸素の還元電位を検出できるマイクロ電極を用いることで細胞の酸素消費量(呼吸)を高感度・非侵襲的にリアルタイムで測定することができる(図1)。

従来、SECMは微量な酸素消費を検出できることから、金属鏑の検出装置として用いられてきた。筆者らは、従来型SECMを生物試料、特に受精卵の呼吸計測に応用するために、呼吸測定に関連した要素技術の開発を行ってきた。その結果、SECMをベースに受精卵や微小組織などの球状試料の酸素消費量を非侵襲的に測定できる「受精卵呼吸測定装置」の開発に成功した⁷⁾。この呼吸測定システムは、倒立型顕微鏡、マイクロ電極の電位を一定に保持するポテンシオスタット、マイクロ電極の移動を制御するコントローラー、酸素消費量算出のための専用解析ソフトを内蔵したノート型コンピューターにより構成されている(図2)。倒立型顕微鏡のステージ上には、マイクロ電極の3次元走査を可能とするXYZステージが設置されており、生物試料の呼吸計測のために気相条件制御が可能な測定用チャンバーや保温プレートが設置できる。また、計測

* Hiroyuki Abe 山形大学 大学院理工学研究科 物質化学工学分野 教授

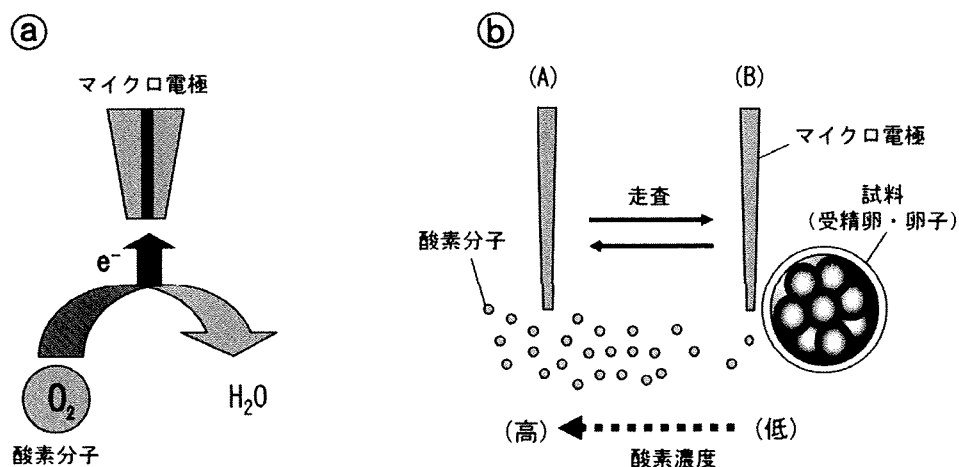


図1 マイクロ電極を用いた受精卵呼吸測定法

- ① マイクロ電極は酸素の還元電位を検出する。
- ② 走査型電気化学顕微鏡による呼吸測定。呼吸により胚近傍の溶存酸素が減少するため、沖合との間に溶存酸素の濃度勾配が生じる。その酸素濃度差（電流値の差： ΔC ）から球面拡散理論式⁸⁾を用いて試料の酸素消費量を算出する。

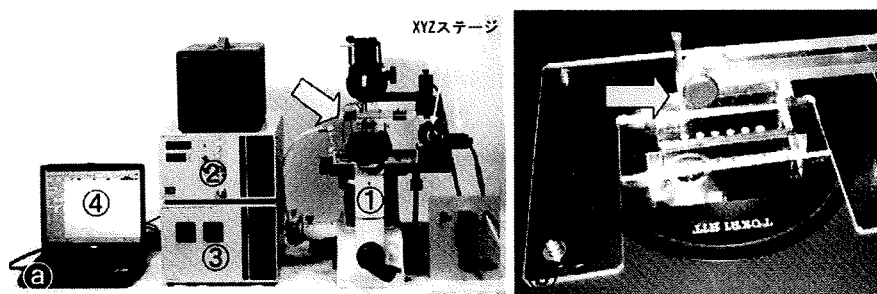


図2 走査型電気化学顕微鏡を改良した「受精卵呼吸測定装置」（北斗電工(株)製）
 ①倒立型顕微鏡，②ポテンシostat，③コントローラー，④ノートパソコン（呼吸解析ソフトを内蔵）。矢印は、専用の測定チャンバーを示す。
 ⑤測定ステージ部。矢印は、ホルダーに設置したマイクロ電極を示す。

精度と操作性の向上を目的に、マイクロ電極の改良と専用の多検体測定プレートおよび測定液の開発を行っている。従来型SECCMは、金属などの腐食部位を検出する装置として先端径10～20 μm のマイクロ電極を探針として用いているが、酸素消費量が非常に小さい細胞や受精卵の呼吸測定には電極の感度が不十分であるため、より高感度のマイクロ電極が必要である。マイクロ電極の計測感度は先端径が小さいほど高いため、受精卵や細胞の呼吸測定では先端径2～4 μm にエッチング加工した白金電極をガラスキャピラリー先端部に封止したディスク型マイクロ電極（図3①、②）を使用している。

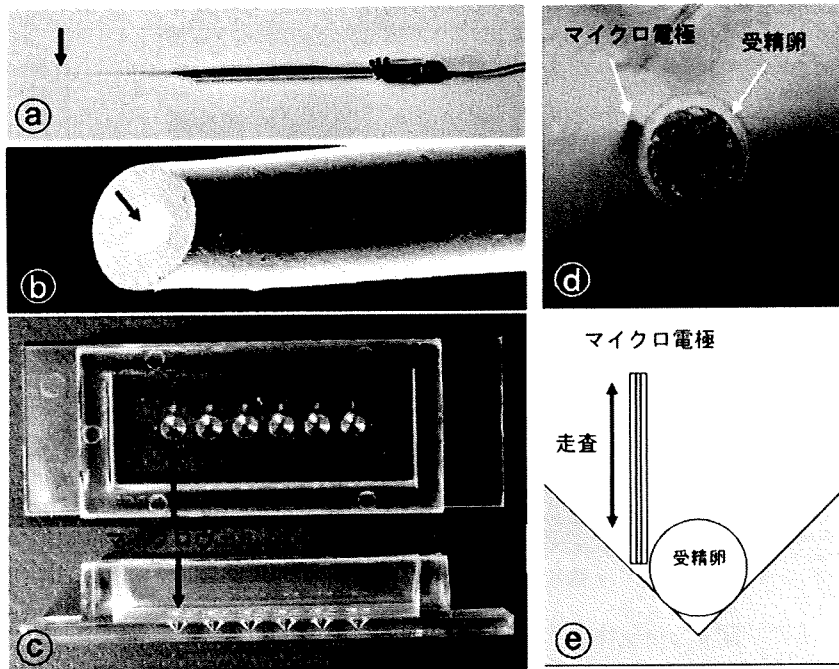


図3 受精卵呼吸測定用のマイクロ電極①と多検体測定プレート③

- ①ディスク型白金マイクロ電極。
- ②マイクロ電極の走査電子顕微鏡像。先端部(矢印)が直径2~4 μm にエッチング加工された白金電極がガラスキャピラリーに封止されている。
- ③多検体プレート底面には円錐形のマイクロウエルが6穴施されている。
- ④マイクロウエル底部に静置したウシ胚。
- ⑤マイクロ電極を胚に対して鉛直方向に走査し酸素消費量を測定する。

5.3 単一受精卵の呼吸量測定

「受精卵呼吸測定装置」を用いた呼吸測定には、専用の多検体測定プレートと測定液を用いる。多検体測定プレートは測定操作の簡易化を目的に開発され、プレートの底面には逆円錐形のマイクロウエルが施されている(図3③)。マイクロ電極が検出する微弱な電流は溶液の成分によって影響を受けるため、呼吸量測定にはマイクロ電極の測定感度に影響を与えず、胚に対して無侵襲な専用の測定液を用いる。測定液を満たしたマイクロウエル内に試料(胚)を導入した後、マイクロウエルの底部中心に静置させる(図3④)。胚のサイズ(半径値)を解析ソフトに入力した後、マイクロ電極を胚の透明帯直近に手で移動する。マイクロ電極は酸素が還元可能な $-0.6\text{ V vs. Ag/AgCl}$ に電位を保持した後、移動速度 $20\sim 30\ \mu\text{m}/\text{sec}$ 、走査距離 $150\sim 300\ \mu\text{m}$ の条件に設定し、コンピューター制御により透明帯近傍を鉛直方向に自動的に走査する(図3⑤)。通常、1回の呼吸測定ではマイクロ電極を2~3回走査した後、胚の酸素消費量は球面拡散理論式^{8,9)}を基本に開発した解析ソフトを用いて算出する。

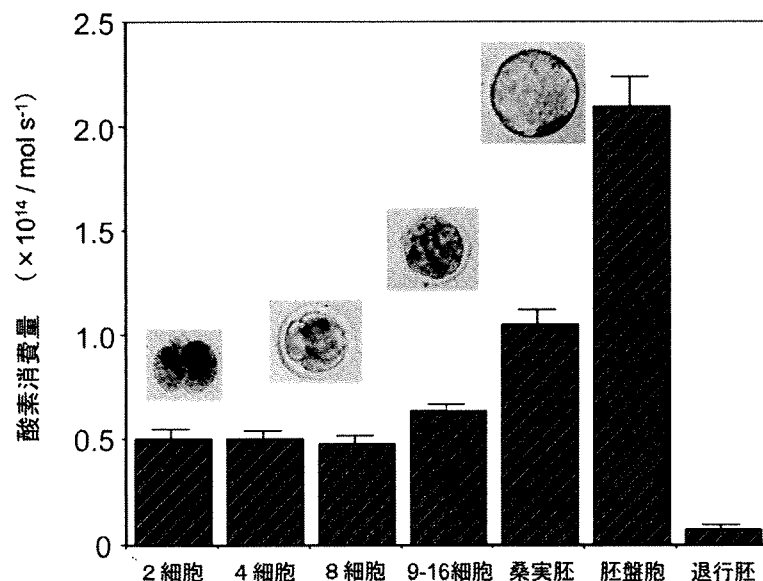


図4 ウシ体外受精胚の発生過程における呼吸量変化
 桑実胚から胚盤胞期にかけて呼吸量が増加する。退行胚ではほとんど呼吸量は検出されない。

これまでに「受精卵呼吸測定装置」を用いて、ウシ、ブタ、マウスの単一胚の呼吸量測定を行っている。ほとんどの動物胚において、8細胞期までの発生初期では酸素消費量は少なく、桑実胚から胚盤胞にかけて顕著に呼吸量が増加する（図4）。呼吸測定の有用性を評価するために呼吸能とミトコンドリアの関係を調べた結果、呼吸活性の低い8細胞期まではほとんどのミトコンドリアは未成熟であるが、桑実胚から胚盤胞にかけてミトコンドリアの顕著な発達（クリステの拡張）が認められた¹⁰⁾。このように、ミトコンドリアの発達と呼吸量の増加が一致して起こることから、「受精卵呼吸測定装置」はミトコンドリア呼吸を高精度でモニタできることがわかる。

5.4 呼吸測定による受精卵の品質評価

体外受精・胚移植技術は、不妊治療の最も有効な治療法となっている。不妊治療では、質的に良好な胚の選択は妊娠率向上、多胎妊娠回避、流産率低下のために不可欠である。現在、胚の品質は割球の数や形態を基準に評価されているが、このような形態的特徴は定量性に欠けるため判定基準が観察者の主観に左右される可能性が指摘されている。筆者らは、形態良好胚ではミトコンドリアは正常に発達しているが、形態不良胚や発生停止胚ではミトコンドリアの多くは未成熟あるいは退行していることを発見した¹¹⁻¹³⁾。そこで、ミトコンドリア呼吸活性を指標に受精卵の品質を評価するという独創的発想に至り、「受精卵呼吸測定装置」を用いた精度の高いシングルセルレベルでの細胞呼吸計測システム開発を進めてきた。これまでに、ウシを用いた動物実験によって、呼吸活性の高い胚は呼吸測定後に追加培養を行うと高い確率でクオリティー良好な胚

表1 ウシ胚の呼吸量と妊娠率の関係⁹⁾

移植時の発生ステージ	酸素消費量 ($F \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$)	受胎胚数/移植胚数 (妊娠率%)
胚盤胞	$F \geq 1.0$	21/36 (58.3)
	$F < 1.0$	0/6 (0)
初期胚盤胞	$F \geq 0.8$	16/25 (64.0)
	$F < 0.8$	0/6 (0)
桑実胚	$F \geq 0.5$	17/28 (60.7)
	$F < 0.5$	1/12 (8.3)

盤胞へと発生すること¹⁴⁾、凍結時に呼吸量の大きい胚盤胞は融解した後の生存率も良好であることを明らかにしている¹⁵⁾。さらに、呼吸測定後の胚を借腹牛に移植し胚の呼吸活性と受胎率の関係を調べた結果、移植前の呼吸量が基準値以上（胚盤胞で $1.0 \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$ 、初期胚盤胞で $0.8 \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$ 、桑実胚で $0.5 \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$ ）の胚を移植した場合、60%以上の高い確率で妊娠するが、基準値に満たない胚のほとんどは受胎しないことが確認されている（表1）。このように、「受精卵呼吸測定装置」を用いた呼吸測定は、妊娠が期待できる品質良好胚の有効な選別法になると考えられる。

5.5 呼吸測定システムの医療応用

「受精卵呼吸測定装置」は、短時間で非侵襲的に細胞の呼吸量を測定できることから、不妊治療や移植医療における受精卵や微小組織のクオリティー評価への応用が可能である。ウシやマウスを用いた動物実験により、呼吸測定した胚を移植し誕生した個体の染色体や行動などを調べているが、染色体異常や奇形、行動異常などの事例は確認されていない。電気化学呼吸計測技術は、医療応用へ向けて安全面での問題もクリアできると考えられる。現在、探索的臨床研究として「受精卵呼吸測定装置」を用いたヒト胚の呼吸量測定と品質評価システムの確立を試みている。これまでに、ヒト胚（余剰胚）ではミトコンドリアの発達に伴い呼吸量が増加すること（表2、図5）、呼吸活性の高い胚は胚盤胞への発生率が高い傾向にあることが示されている¹⁶⁾。これらの研究成果を踏まえ所定の倫理承認を得た後、不妊治療への臨床応用を目的に呼吸測定胚の移植試験を予定している。

表2 ヒト胚（余剰胚）の胚発生過程における酸素消費量変化

発生ステージ	胚数	酸素消費量 ($F \times 10^{14} / \text{mol s}^{-1}$)
2-8細胞	18	0.51 ± 0.05
桑実胚	5	0.61 ± 0.11
初期胚盤胞	13	0.72 ± 0.06
胚盤胞	4	1.01 ± 0.02

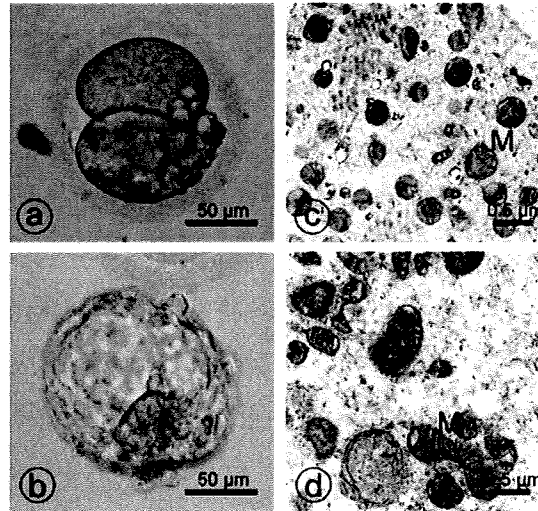


図5 ヒト胚におけるミトコンドリアの超微細形態変化

(a), (c) 2細胞期胚, (b), (d) 胚盤胞。

(a), (b) 光学顕微鏡像, (c), (d) 電子顕微鏡像。M: ミトコンドリア。

5.6 シングルセル呼吸測定と細胞間ネットワーク解析

本節の最後に、哺乳類卵子をモデル系とする細胞間ネットワーク解析研究を紹介する。卵巣から回収した直後の卵子は数層の卵丘細胞に被われており（卵丘細胞—卵子複合体：COC）、卵丘細胞と卵子はギャップ結合を介した細胞間ネットワークを形成している（図6）。卵子—卵丘細胞間のギャップ結合は、卵丘細胞と卵子間の物質交換に関与することで、卵子の成長や機能成熟に極めて重要な役割を果たしている。例えば、未成熟卵子では減数分裂抑制作用を示す環状AMP（cyclic AMP）が卵丘細胞から卵子に供給されている¹⁷⁾。一般に、卵巣から採取した卵子は未成熟であり、血清や成長因子を加えた培地で成熟培養を行う。そこで、「受精卵呼吸測定装置」を用いて単一のCOCおよび卵子の呼吸量を測定し、卵子成熟過程における呼吸活性と細胞間ギャップ結合の関連を調べた。その結果、卵子は成熟の進行に伴い呼吸活性が顕著に高くなるが、一方の卵丘細胞は成熟培養により卵丘細胞層が膨潤し、卵子—卵丘細胞間ギャップ結合は呼吸活性の著しい低下とともに消失することが示された（図7）。

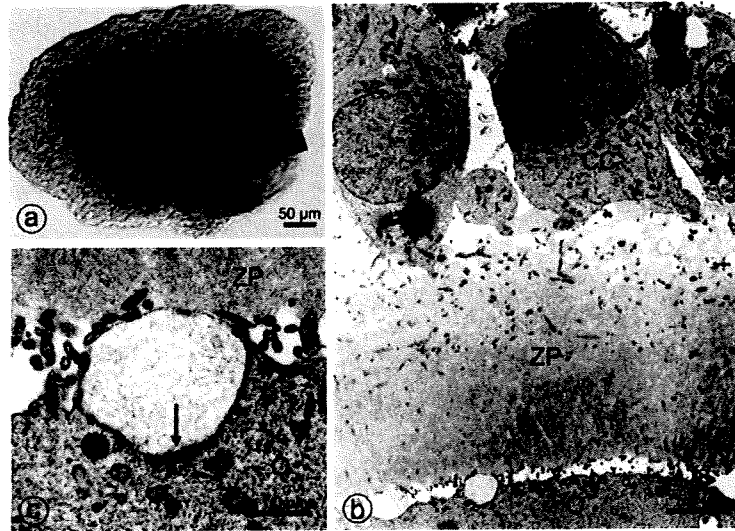


図6 ヒト卵丘細胞—卵子複合体 (COC) の形態

- ①光学顕微鏡像。矢印は、卵子を示す。
 ②, ③電子顕微鏡像。矢印は、卵丘細胞と卵子間のギャップ結合を示す。
 CC: 卵丘細胞, O: 卵子, ZP: 透明帯。

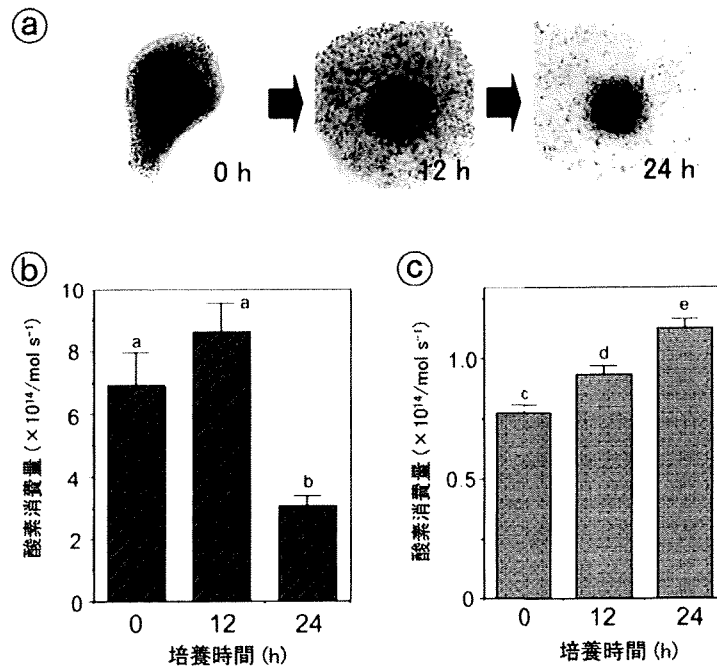


図7 ウシ卵子成熟過程における呼吸活性変化

- ①卵子成熟過程における卵丘細胞層の膨潤。
 ②卵丘細胞—卵子複合体 (COC) の酸素消費量。
 ③卵子の酸素消費量。

卵子は単一の細胞であるため、受精卵のように割球の数や形態を基準に品質を評価することは困難である。このため、卵細胞質の形態（透明度や顆粒の分布状態など）や卵丘細胞の付着状態を基準にクオリティーが評価されている¹⁷⁻¹⁹⁾。一般に、卵丘細胞が密にほぼ均一に付着し卵丘細胞間とのギャップ結合が正常に発達している卵子は、成熟率が高くクオリティー良好胚へと発生する割合も大きい^{20,21)}。このことは、卵子と卵丘細胞の細胞間ネットワークが正常に機能していることが卵子の機能維持に極めて重要であることを示している。「受精卵呼吸測定装置」による呼吸測定は、卵子—卵丘細胞間のネットワークをリアルタイムで解析することができ、これまで困難であった卵子品質評価の有効な方法になるものと期待される。

5.7 おわりに

本節で解説した電気化学計測技術は、細胞呼吸を無侵襲的に測定できることから、細胞の代謝機能解析、受精卵や卵子の品質診断システムへの応用が期待できる。さらに、この技術は超高感度計測であることからシングルセルレベルでの呼吸能解析やミトコンドリア機能解析が可能であり、卵子においては卵子—卵丘細胞間ネットワーク解析に有用な方法であることが示された。細胞呼吸は動物・植物問わずほとんどの細胞に共通する生物現象であることから、電気化学計測技術および装置の応用範囲は極めて広い。今後、筆者らが開発した「受精卵呼吸測定装置」がシングルセル機能解析や不妊治療などの医療において活用されることを期待している。

文 献

- 1) R. C. Engstrom, C. M. Pharr, *Anal. Chem.*, **61**, 1099A (1989)
- 2) A. J. Bard, M. V. Mirkin, "Scanning Electrochemical Microscopy", Marcel Dekker, New York (2001)
- 3) H. Shiku, T. Matsue, I. Uchida, *Anal. Chem.*, **68**, 1276 (1996)
- 4) S. Kasai, A. Yokota, H. Zhou, M. Nishizawa, K. Niwa, T. Onouchi, T. Matsue, *Anal. Chem.*, **72**, 5761 (2000)
- 5) K. Yamashita, M. Takagi, K. Uchida, H. Kondo, S. Takenaka, *Analyst*, **26**, 1210 (2001)
- 6) D. Oyamatsu, N. Kanaya, H. Shiku, M. Nishizawa, T. Matsue, *Sens. Actuat. B*, **91**, 199 (2003)
- 7) H. Abe, H. Shiku, S. Aoyagi, H. Hoshi, *J. Mamm. Ova Res.*, **21**, 22 (2004)
- 8) H. Shiku, T. Shiraishi, H. Ohya *et al.*, *Anal. Chem.*, **73**, 3751 (2001)
- 9) H. Shiku, T. Shiraishi, S. Aoyagi *et al.*, *Anal. Biochim. Acta*, **522**, 51 (2004)

- 10) H. Abe, *J. Mamm. Ova Res.*, **24**, 70 (2007)
- 11) H. Abe, T. Otoi, S. Tachikawa *et al.*, *Anat. Embryol.*, **199**, 519 (1999)
- 12) H. Abe, S. Yamashita, T. Satoh, H. Hoshi, *Mol. Reprod. Dev.*, **61**, 57 (2002)
- 13) H. Abe, S. Matsuzaki, H. Hoshi, *Theriogenology*, **57**, 1273 (2002)
- 14) H. Abe, H. Shiku, M. Yokoo *et al.*, *J. Reprod. Dev.*, **52** (Suppl.), S55 (2006)
- 15) H. Shiku, Y. Torisawa, A. Takagi *et al.*, *Sens. Actuat. B*, **108**, 597 (2005)
- 16) T. Utsunomiya, K. Goto, M. Nasu *et al.*, *J. Mamm. Ova Res.*, **25**, 2 (2008)
- 17) R. Boni, A. Cuomo, E. Tosti, *Biol. Reprod.*, **66**, 836 (2002)
- 18) F. De Loos, P. Kastrop, P. van Maurik *et al.*, *Mol. Reprod. Dev.*, **28**, 255 (1991)
- 19) H. Aktas, M. B. Wheeler, N. L. First *et al.*, *J. Reprod. Fertil.*, **105**, 237 (1995)
- 20) P. Blandin, M. A. Sirard, *Mol. Reprod. Dev.*, **39**, 54 (1995)
- 21) N. L. Hazeleger, D. J. Hill, R. B. Stubbings *et al.*, *Theriogenology*, **43**, 509 (1995)

3 単一細胞由来 mRNA 回収プローブの開発

珠玖 仁^{*1}, 伊野浩介^{*2}, 末永智一^{*3}

3.1 はじめに

生体内において、神経系・免疫系など多様な細胞が共存する組織、発生段階や疾病進行・癌化の過程で異なる状態の細胞が共存する場合など、1細胞レベルでの遺伝子発現解析が有用となる。*In vitro*培養系でも、未分化細胞培養・分化誘導・共培養、遺伝子導入—ウイルス感染から形質変化までの工程など、いずれにおいても細胞の個性、形質のばらつきを遺伝子発現レベルで均一化することは技術的にも困難な状況にある。近年報告された興味深い研究¹⁾によると、マウスの造血前駆細胞ではクローン集団であっても、ある幹細胞マーカータンパク質の発現レベルが3桁にわたるブロードな分布を示す。その不均一性は3週間以上培養しても維持される一方、発現レベルの異なる集団をソートすると数時間以内に分布のブロード化が始まる。しかしながら、ソートする以前の分布と一致するようになるまでには1週間以上かかるという。このように、細胞集団のレベルでは観測不可能であった現象が、1細胞解析により明らかになりつつある。

我々は、1細胞操作・計測のプラットフォームとして走査型プローブ顕微鏡 (SPM) システムを用い、探針として様々な多機能プローブ (ガラスキャピラリ, リング電極, 流体プローブおよびそれらを複合化した探針) の微小化・高機能化を検討してきた。本節では、1細胞由来 mRNA 回収—定量プローブの開発について紹介する。本研究は、プローブ開発と探針—試料間距離制御機構^{2~4)}に関わるこれまでの蓄積を活かしつつ、熟練を要するマイクロシステム (マイクロマニピュレータ, マイクロインジェクタ操作を含む) の刷新を目指して、操作性・精度の観点からの大幅な改良を目的とする。尚、原子間力顕微鏡 (AFM) システムによる遺伝子回収および遺伝子導入は、各々猪飼ら⁵⁾ および中村ら⁶⁾による先駆的研究がある。

3.2 リング電極プローブによる電場破碎法

1細胞由来の mRNA 定量解析を可能とする探針として、リング電極プローブを開発した⁷⁾。ガラスキャピラリを Pt, パリレン C 絶縁層で被覆した。探針の先端は、当初は精密はさみで切り出し直径 10~20 μm 程度のリング電極を作製した。現在では集束イオンビーム (FIB) により直径 5 μm 以下のリング電極を高い歩留まりで (90% 以上) 量産することが可能となっている (図 1)。キャピラリ内壁をフッ化ヘキシルシラン処理により疎水化した。細胞培養基板として、コ

* 1 Hitoshi Shiku 東北大学 大学院環境科学研究科 准教授

* 2 Kosuke Ino 東北大学 大学院環境科学研究科 助教

* 3 Tomokazu Matsue 東北大学 大学院環境科学研究科 教授

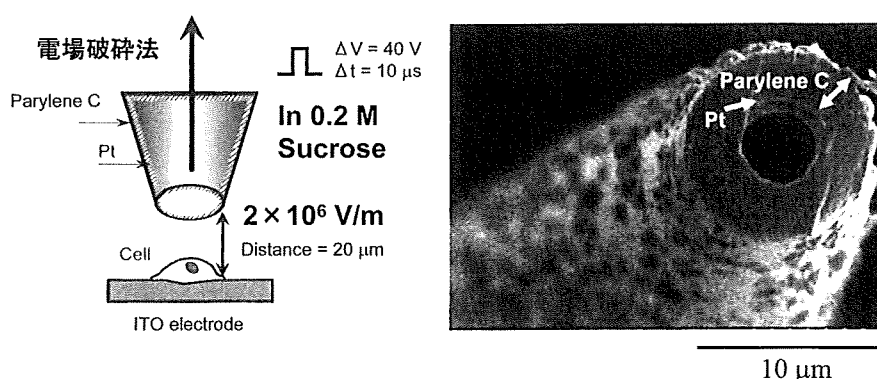


図1 リング電極プローブによる電場破碎法

ラゲンコートしたIndium Tin Oxide (ITO) 電極を用いて細胞を播種，単層培養しておき，培地を0.2 Mスクロース溶液に置換した後，リング電極プローブを細胞の上方20 μm に近接させて40 V，10 μs の電気パルスを印加し（ECM 2001 Electro Cell Manipulator，BTX-Harvard Apparatus），細胞膜を瞬時に破碎した。同時にシリンジで探針内部に細胞内容物を吸引した。回収した細胞破碎液はDNaseとRNase Inhibitorを含むCell Lysis Bufferと混合し，逆転写反応（RT），real-time PCRを実施して遺伝子発現量を定量した。この方法により，顕微鏡観察下狙った1細胞を電場破碎し，ほぼ100%の効率でmRNAを回収，定量解析することに成功した。目的遺伝子（ β 1-integrin）の相対発現量の違いから，細胞株の違い（例えば乳癌細胞MCF-7と乳腺細胞HMT-3522 T4-2）が1細胞レベルで判別可能であることが分かった。同様にしてマトリゲル上で培養した細胞塊（スフェロイド）に電場を印加し，細胞塊の破碎回収，遺伝子発現解析を実施した。リング電極プローブによりマウス胚の内部細胞塊と栄養外胚葉から細胞を採取し，マーカー遺伝子により未分化状態を評価可能であることを確認した。さらに，発現レベルの異なる4種類のハウスキーピング遺伝子に着目し，回収法の違いにより遺伝子発現量に差があるかどうか検証した。図2にガラスキャピラリおよびリング電極プローブにて1細胞から回収したmRNAの定量結果を示す⁸⁾。細胞には単層培養状態のMCF-7を使用し，遺伝子は文献⁹⁾を参考に，真核生物翻訳伸長因子1 γ （EEF1G），コハク酸脱水素酵素複合体（SDHA）， β 2-ミクログロブリン（B2M），TATAボックス結合タンパク質（TBP）を選んだ。各遺伝子において多細胞系の実験（ 5×10^4 cells）から得られた値とほぼ同等の結果を得た。また，TBPのような10コピー/cell程度の低発現遺伝子を検出できた。以上より本手法を用いて細胞のmRNA解析が可能であることが示唆された。電場破碎による単一細胞分析は既にAllbrittonらの報告があるが¹⁰⁾，我々は初めてreal-time PCRを用いたmRNAの定量に成功し，電場破碎法によってmRNAの分解がほとんど起きないことを実証した。

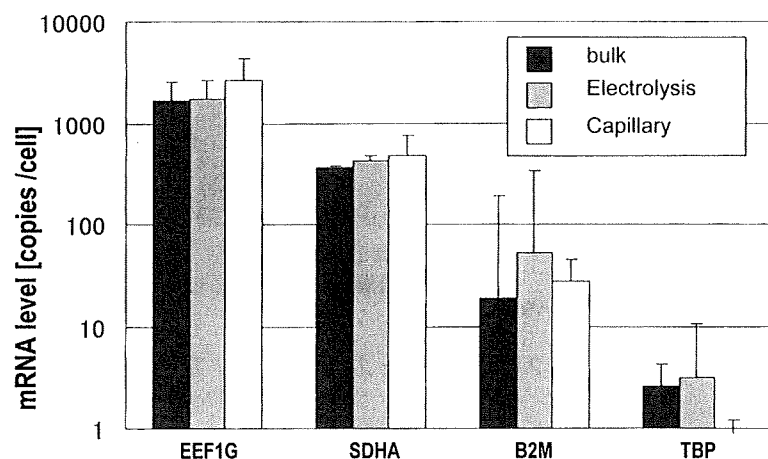


図2 ハウスキーピング遺伝子4種類の発現量を回収法の違いにより比較

3.3 マイクロ流体プローブによるmRNA定量解析

プローブ先端に、局所的層流を誘起して細胞破砕液を作用し、単層培養系から1細胞を回収した¹¹⁾。マイクロ流体プローブ (MFP) は、ダブルバレルガラスキャピラリ管 (θ 管) をキャピラリプレーで細尖化し、ダイヤモンドグラインダーで先端を切り出し用いた。内壁はフルオロシラン処理により核酸の吸着を防止した。注入シリンジから流速 $Q_I=40$ nL/min にて Cell Lysis Buffer を導入すると同時に、吸引シリンジから $Q_A=360$ nL/min にて細胞破砕液を培地ごと吸引した (図3)。 $Q_A/Q_I=9.0$ の条件下では、プローブが試料近傍に配置されている場合に層流が形成され、導入した Cell Lysis Buffer をすべて回収できることを確認した。しかしながら回収溶液の RNase Inhibitor の濃度が低下するため、mRNA の回収効率は10%以下であった。単層培養系にてコンフルエントな状態に増殖した細胞に対し本法を適用すると、直径 $100 \mu\text{m}$ の探針の場合、局所領域の細胞 (11個) を回収できた。細胞播種密度が疎の状態では1細胞を回収可能であり、 $\beta 1$ -integrin 相対発現量から MCF-7 と HMT-3522 の違いを判別することができた。MFP は元々 Delamarche らにより考案され¹²⁾、シリコンウェハに設けた $20 \mu\text{m}$ 四方の貫通孔2個を導入口・吸引口とし、タンパク質パターンニングや細胞への色素導入などのデモンストレーションが行われた。その他にも近年では、液滴マイクロ流路の技術を組込んだプローブにより、土壌サンプルからの難培養性微生物の回収や、増殖能・グラム染色・fluorescence *in situ* hybridization (FISH) の並列分析などが報告されている¹³⁾。

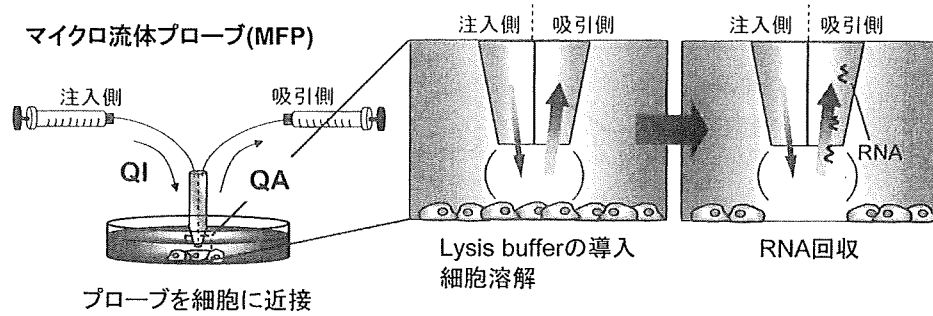


図3 マイクロ流体プローブによるmRNA定量解析

3.4 レポーターシステムにおけるmRNAとタンパク質の発現定量

大腸菌など単細胞バクテリアであっても、クローン集団が複数の安定状態を持ち得ることは比較的早くから知られていたが、1細胞レベルでの「ゆらぎ」の重要性が明らかとなっていく過程で、GFPなどレポーター遺伝子とセルソーターの技術が大きな役割を果たした^{14,15)}。Elowitzは波長の異なる2種類の蛍光タンパク質遺伝子を1コピーずつ大腸菌の染色体に導入し、1細胞ごとの発現活性の違いについて詳細な解析を試みた¹⁶⁾。その後、このような研究は酵母や哺乳動物細胞でも行われるようになっていく。

我々はレポーターシステムとしてGFP、分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP)、ルシフェラーゼ (Luc) 発現系を用い、mRNAとタンパク質双方のレベルでの発現量を評価してきた。まず、GFPを導入したHeLa細胞 (HeLa/pGFP) に発現するmRNAおよびタンパク質を、同一サンプルごとに定量し両者の相関性を評価した。蛍光顕微鏡観察時に蛍光強度によりタンパク質発現量を定量化した後、個々のアドレスの細胞に対しmRNA定量を行った^{8,17)}。図4に、1細胞ごとのmRNAおよびタンパク質発現量の相関を示した。相関係数は遺伝子導入時のプラスミドDNA濃度を含む諸条件により影響を受けることが分かった。

SEAPを導入したHeLa細胞 (HeLa/pSEAP) の発現過程を電気化学的に評価した¹⁸⁾。酵素反応の基質としてp-アミノフェニルリン酸 (PAPP) を用い、脱リン酸化により生成するp-アミノフェノール (PAP) を電極電位 +0.3 V vs Ag/AgCにて検出した (図5)。ITO電極上に絶縁膜SU-8を積層し直径30 μ mの1細胞ウェルアレイ (4 \times 5) を作製した。誘電泳動により1細胞を捕捉し (捕捉率はほぼ100%) 1細胞ごとのSEAP発現を走査型電気化学顕微鏡 (SECM) により可視化した。次にNF κ B経路のシグナル伝達を追跡するためにSEAP遺伝子の上流に κ B応答配列を有するプラスミドを使用した (HeLa/pNF κ B-SEAP)。当初SU-8ウェルアレイを使用していたがNF κ B経路が応答してしまいバックグラウンドが上昇した。そこでウェルの材質をpoly(dimethylsiloxane) (PDMS) に変更したところ、サイトカインTNF- α 刺激の有無に対する

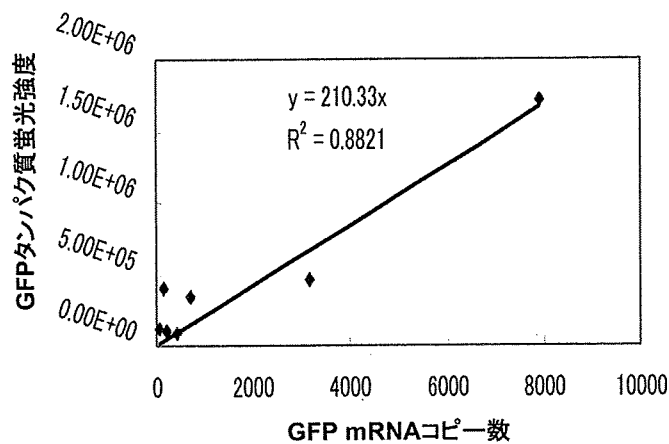


図4 HeLa/pGFPにおけるmRNAおよびタンパク質発現量の相関

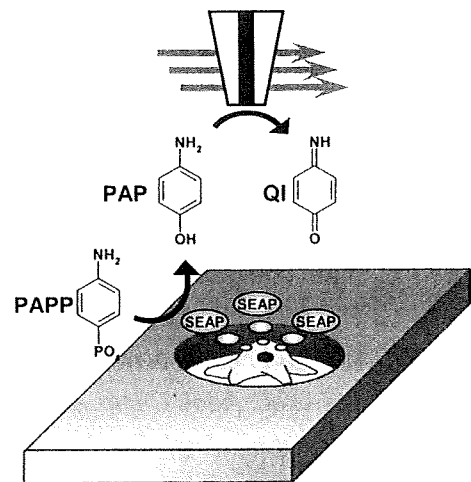


図5 SEAP発現過程の電気化学的評価法

1細胞応答に有意差を確認することができた。さらに、新規多点計測電気化学デバイスを作製した¹⁹⁾。本デバイスは1細胞ウェルアレイ(10×10)を交差バンド電極で挟む構造を持ち、各交点で起きるレドックスサイクルにより、100ポイントの計測を22秒で完了する。PAPの電極生成物であるp-キノニンイミン(QI)の還元電流を測定することによりバックグラウンド電流を抑え、1細胞由来の電流応答を観測することに成功した。Lucを安定に発現するHeLa-Luc細胞²⁰⁾(北海道大学原島研究室秋田英万先生提供)と、リポフェクション法によりプラスミドベクターを導入後12時間の細胞(HeLa/pGL3-Luc)とでmRNAおよびタンパク質の発現量を比較した²¹⁾。mRNAおよびタンパク質の発現量はHeLa/pGL3-LucがHeLa-Lucよりも1桁大きい結果となった。また、1細胞ごとの発現量の分散はHeLa/pGL3-Lucのほうが大きくなることが示唆された。細胞集団から得られる情報は1細胞ごとの性質の平均を必ずしも反映していない。ある遺伝子の発現に注目してみると正規分布よりもむしろ対数正規分布に従うという実験事実が続々と報告されるようになってきている。このことは、1細胞解析ツールのみならずデータの解釈、統計解析法から刷新されるべきであることを示唆している。

文 献

- 1) H. H. Chang *et al.*, *Nature*, 544 (2008)
- 2) Y. Takahashi *et al.*, *Langmuir*, 22, 10299 (2006)

- 3) Y. Takahashi *et al.*, *Anal. Chem.*, **81**, 9674 (2009)
- 4) 特願2009-140602「走査型電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡測定法, 走査型電気化学イオンコンダクタンス顕微鏡, その探針および探針の製造方法」高橋康史ほか
- 5) H. Uehara *et al.*, *Ultramicroscopy*, **100**, 197 (2004)
- 6) I. Obataya *et al.*, *Nano Lett.*, **5**, 27 (2005)
- 7) Y. Nashimoto *et al.*, *Anal. Chem.*, **79**, 6823 (2007)
- 8) H. Shiku *et al.*, Proceedings of the Sixth International Forum on Post-genome Technologies (IFPT'6), p.261 (2009)
- 9) K. Taniguchi *et al.*, *Nature Methods*, **6**, 503 (2009)
- 10) F. Han *et al.*, *Anal. Chem.*, **75**, 3688 (2003)
- 11) H. Shiku *et al.*, *Anal. Biochem.*, **385**, 138 (2009)
- 12) D. Juncker *et al.*, *Nature Materials*, **4**, 622 (2005)
- 13) W. Liu *et al.*, *Lab Chip*, **9**, 2153 (2009)
- 14) 金子邦彦, 「生命とは何か」第2版, 東京大学出版会 (2009)
- 15) A. Raj *et al.*, *Cell*, **135**, 216 (2008)
- 16) M. B. Elowitz *et al.*, *Science*, **297**, 1183 (2002)
- 17) 岡崎大甫ほか, 第24回生体機能関連化学シンポジウム要旨集, 2C-04, p.88 (2009)
- 18) T. Murata *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 913 (2009)
- 19) Z. Lin *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 2044 (2009)
- 20) T. Masuda *et al.*, *Biomaterials*, **29**, 709 (2008)
- 21) H. Shiku *et al.*, The 3rd International Workshop on Approaches to Single-Cell analysis, ETH Zurich, p.51 (2008)

電気化学的呼吸計測技術におけるヒト胚クオリティー評価と安全性

Evaluating the Safety and Quality of Human Embryos with Measurement of Oxygen Consumption by Scanning Electrochemical Microscopy

後藤 香里¹ 小池 恵¹ 熊迫 陽子¹
宇津宮隆史¹ 荒木 康久² 阿部 宏之³

KAORI GOTO¹, MEGUMI KOIKE¹, YOKO KUMASAKO¹,
TAKAFUMI UTSUNOMIYA¹, YASUHISA ARAKI², HIROYUKI ABE³

¹St-Luke Clinic, 5, Tsumori Tomioka, Oita City, Oita 870-0947, Japan

²The Institute for ARMT, 909-21, Ooaza Ishii, Setagun Fujimi, Gunma 391-0105, Japan

³Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University, 4-3-16, Jyonan, Yonezawa City, Yamagata 992-8510, Japan

要旨: プローブ電極を用いた走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は、局所領域における生物反応を電気化学的にモニタリングできる。本研究では、電気化学呼吸計測技術を応用したヒト胚クオリティー評価法の安全性と胚評価の可能性を検討した。体外受精-胚移植または凍結胚移植を施行した後の未移植胚に対し、個々の胚の透明帯近傍をマイクロ電極で走査し胚の酸素消費量を測定した。測定時の最適状態を保つため、顕微鏡に設置されている保温プレートの温度について検討した。呼吸量測定群と非測定群にて胚の胚盤胞発生率も比較した。測定群は51.8%であり非測定群は57.0%と差は認めなかった。測定時のDay 3における分割は4細胞期~10細胞期であったが、平均呼吸量は各分割期で偏りはみられず、また、Veckの分類とは相関のない呼吸活性を示した。測定後の胚を培養した結果、呼吸量が $0.26-0.56 \times 10^{14}/\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ であった胚の胚盤胞発生率は65.8%であり、0.26未満または0.56より大きい場合の胚盤胞発生率は39%と有意差が認められた。SECMを用いて胚の呼吸活性を計測することにより、従来のVeck分類では知りえなかった胚の質を安全により厳密に評価することができる可能性が示唆された。

キーワード: 呼吸量, 走査型電気顕微鏡, 安全性, 胚評価, ヒト胚

ABSTRACT: Respiration is a useful parameter for evaluating embryo quality as it provides important information about metabolic activity. A scanning electrochemical microscopy (SECM) measurement system provides a non-invasive, simple, accurate, and consistent measurement of the respiration activity of single human embryos. In this study, we describe an accurate method for assessing the quality of individual human embryos. We measured oxygen consumption rates of human embryos at various cleavage stages. We monitored the temperature of the hot plate which was installed in the microscope to keep the most suitable state at the time of the measurement. We compared the blastocyst development of embryos in the measurement group with those of the no-measurement group. The measured embryos (51.8%) showed the same developmental rate to the blastocyst as the no-measurement group embryos (57.0%). There were no significant differences in the mean rates of oxygen consumption at each cleavage stage. Embryos with moderate respiration rates ($0.26-0.56 \times 10^{14}/\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$) showed a high developmental rate (65.8%) to the blastocyst. The developmental rate of embryos with lower and higher respiration rates ($<0.26 \times 10^{14}/\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ and $>0.56 \times 10^{14}/\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$) was 39.0%. These results support the suggestion that measuring embryonic respiration provides safety and valuable information about embryo quality.

Key words: Respiration, scanning electrochemical microscopy, safety, evaluation of embryos, human embryo

受付日: 2009年7月1日 / 受理日: 2009年11月30日

緒 言

¹セント・ルカ産婦人科: 〒870-0947 大分県大分市津守富岡5組
TEL: 097-568-6060 FAX: 097-568-6299

e-mail: lukelab@oct-net.ne.jp

²高度生殖医療技術研究所, ³山形大学大学院理工学研究科物質化学工学専攻

現在、体外受精における移植胚の選択は、移植時の胚の形態を基に行っている。妊娠率の向上、多胎率、流産率を減少させるには、より着床しうる能力を持った胚を