

Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone, *Proc Natl Acad Sci USA*, 84; 8282-8286.

Yamamoto S, Konishi I, Nanbu K, et al (1997) Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary, *Gynecol Endocrinol*, 11; 223-230.

Yamamoto M, Minami S, Nakano R, et al (1992) Immuno-

histochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles during the menstrual cycle, *J Clin Endocrinol Metab*, 74; 989-993.

Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, et al (1997) Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary, *Mol Endocrinol*, 11; 1924-1933.

胚の機能検定法

阿部宏之

ミトコンドリアは酸素呼吸によって細胞活動に必須のエネルギーを合成する重要な細胞小器官であり、その呼吸機能は胚や卵子の代謝活性解析やクオリティ評価の有力な指標となる。したがって、精度の高い細胞呼吸計測法は、胚の厳密なクオリティ評価や細胞機能解析にきわめて重要な技術となる。

本稿では、高精度・非侵襲的に細胞呼吸を測定することができる電気化学計測技術を応用した“受精卵呼吸測定装置”と、この装置を用いた胚の呼吸機能解析とクオリティ評価法について述べる。

電気化学計測法と 受精卵呼吸測定装置

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高精度で検出できる有効な技術である。酸素の還元電位を検出するマイクロ電極をプローブとする走査型電気化学顕微鏡(SECM)を用いることで、細胞が消費する酸素量が無侵襲的に測定することができる。

このSECMをベースに胚の呼吸量測定のためのシステムとして、“受精卵呼吸測定装置”が開発されている¹⁾。この測定システムは、倒立型顕微鏡(図1①)、マイクロ電極の電位を一定に保持するポテンシostat(図1②)、マイクロ電極の移動を制御するコントローラ(図1③)、短時間で酸素消費量を算出する専用の解析ソフトを内蔵したノート型コンピュータ(図1④)により構成されている。倒立型顕

微鏡のステージ上には、保温プレート、マイクロ電極の三次元走査を可能とするXYZステージが設置されており、気相条件を制御するための測定用チャンバーの設置も可能である。

胚の呼吸量測定

受精卵呼吸測定装置を用いた呼吸量測定には、超高感度のディスク型マイクロ電極(図2a)、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円錐形のマイクロウェル6穴が施されている(図2b)。マイクロ電極が検出する微弱な電流値は溶液の成分によって値が変動するため、呼吸測定には胚および細胞用培養液をベースに調製した専用の測定液を用いる。

測定液を満たしたマイクロウェル内に胚を導入した後、ウェルの底部中心に静置する(図2c)。胚の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動で移動させる。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、コンピュータ制御により透明帯近傍を鉛直(Z軸)方向に走査する(図2d)。通常、1試料当たりマイクロ電極を2~3回走査し、呼吸量を測定する(所要時間は約30秒)。マイクロ電極走査後、胚の酸素消費量は球面拡散理論式²⁾を基盤とする呼吸解析ソフトを用いて算出する(図3)。波形の始点(マイクロ電極が胚に最も接近している)と終点(マイクロ電極が胚から最も離れている)の電流値の差(ΔC)から呼吸量を算出する(ΔC

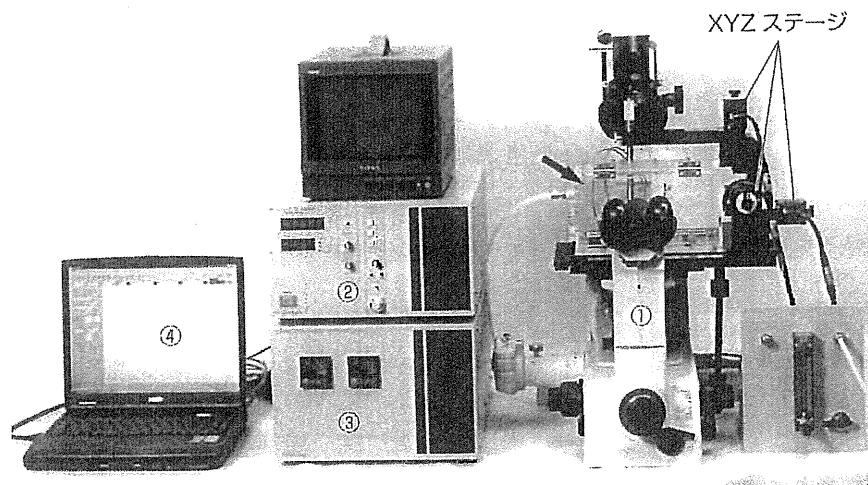


図1 走査型電気化学顕微鏡をベースに開発した受精卵呼吸測定装置
①：倒立型顕微鏡(矢印は測定チャンバーを示す)，②：ポテンショスタット，③：コントローラー，④ノートパソコン(呼吸機能解析ソフトを内蔵)。

が大きいほど胚の呼吸量は大きい)。

機能解析に有効な方法であることがわかる。

胚のミトコンドリア呼吸機能

受精卵呼吸測定装置を用いて、種々の哺乳動物胚の呼吸量を測定することができる。

図4に、マウス胚の発生過程における呼吸量変化を示す。マウス胚の呼吸量は、受精直後の1細胞期から8細胞期までは $0.5 \times 10^{11} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 前後と低い。桑実胚から胚盤胞にかけて呼吸量は増加し、発生が進み細胞数も増加した孵化胚盤胞では最も高い呼吸活性が計測される。

ミトコンドリアは呼吸機能の成熟に伴い顕著な微細構造変化を起こすことから、電子顕微鏡による胚の微細構造観察は呼吸測定の有効性を検証するために重要である。マウス胚の微細構造を観察すると、呼吸活性の低い2細胞期胚ではミトコンドリアのほとんどは未成熟であるが、呼吸量が増加する胚盤胞ではミトコンドリアの顕著な発達(クリステの拡張)が起こる(図5)。

このように、ミトコンドリアの発達と呼吸量の増加は一致することから、受精卵呼吸測定装置による呼吸測定は、胚のミトコンドリア呼吸

呼吸機能解析と胚のクオリティ評価

体外受精・胚移植 (*in vitro* fertilization and embryo transfer: IVF-ET) は、最も有効な不妊治療法の一つである。一般に IVF-ET では、IVF によって得られた複数の胚のなかから移植する胚を選択する。胚移植前に質的に最も良好な胚を選択することは、妊娠率の向上、多胎妊娠の回避、流産率の低下のために有効である。

現在、胚のクオリティ評価は形態観察による方法が一般的である。形態的評価法は、簡単・迅速で無侵襲的な方法であることから、現状では最も有効な胚のクオリティ評価法であると言える。しかし、評価の基準となる形態的特徴は定量性に欠けるため、判定結果が観察者の主観に左右される可能性がある。これまでの研究によって、ミトコンドリア呼吸機能と胚のクオリティは深く関係することが明らかになっており、受精卵呼吸測定装置による呼吸量測定は胚クオリティ評価の有力な指標になると考えられる。

ウシにおいて、胚のクオリティと呼吸活性の

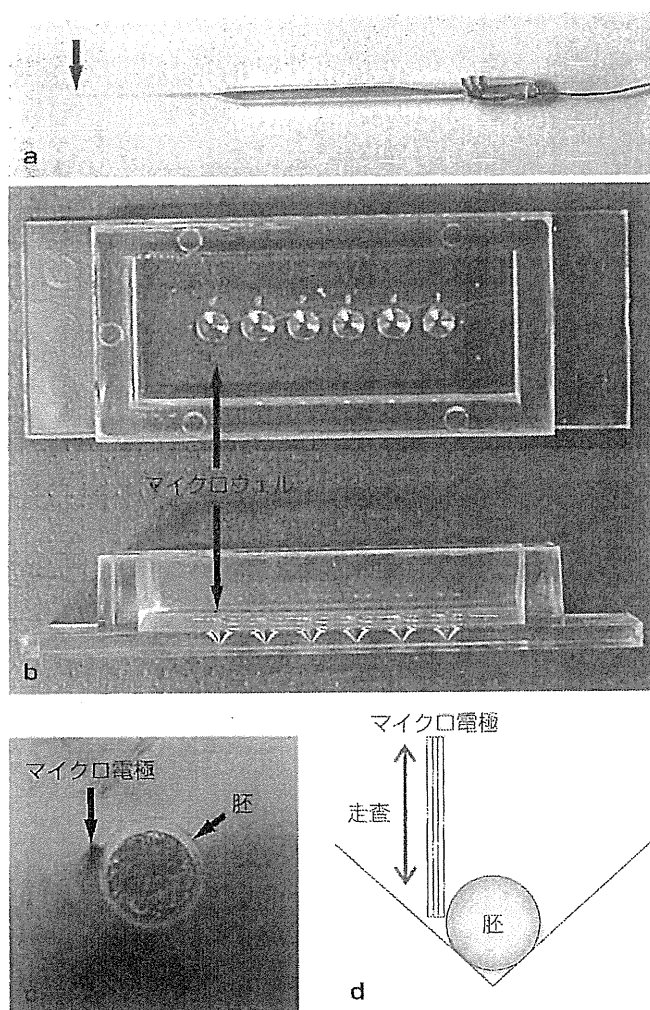


図2 胚の呼吸測定のための関連技術

- 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

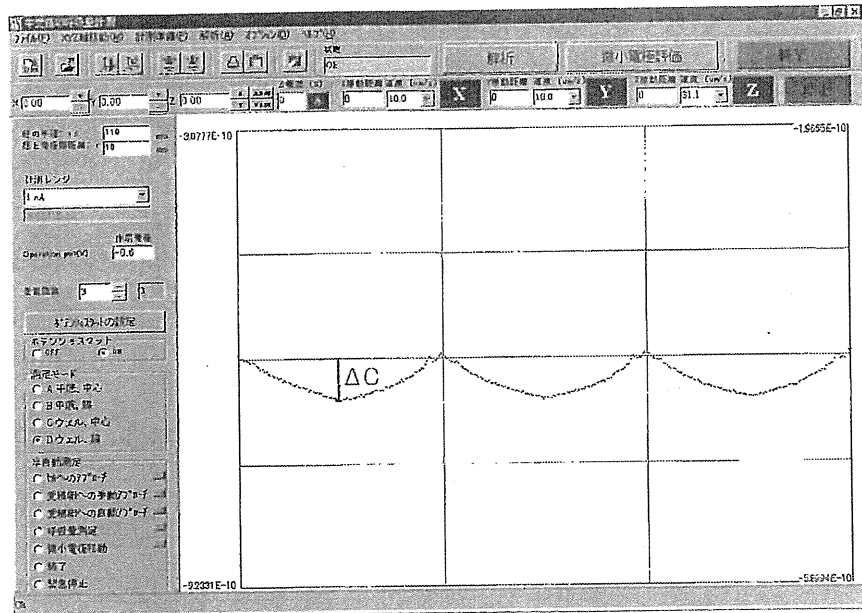


図3 呼吸解析ソフトの画面

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。

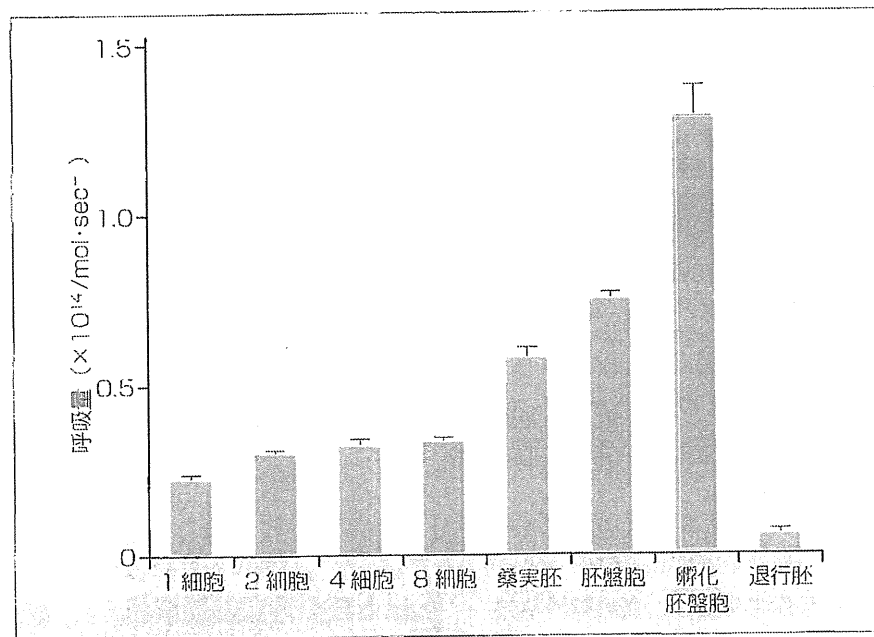


図4 マウス胚の発生過程における呼吸量変化

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、現行の形態的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。

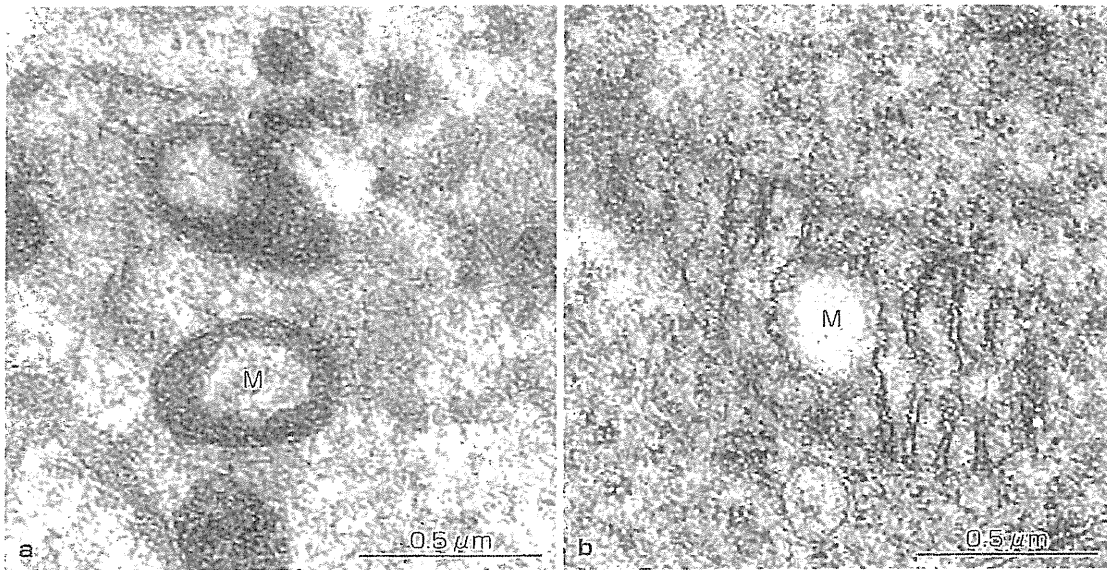


図5 マウス胚のミトコンドリアの微細形態
a: 2細胞期胚, b: 胚盤胞. M: ミトコンドリア.

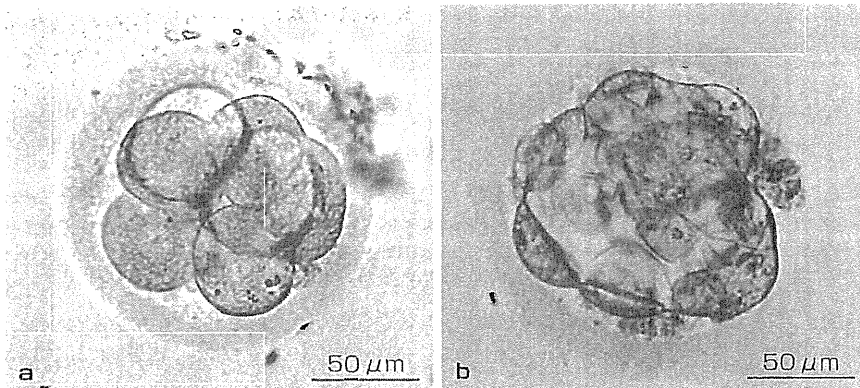


図6 ヒト体外受精胚の形態と酸素消費量
a: day 3 胚 ($0.45 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$), b: 胚盤胞 ($1.15 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$).

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、金属錆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组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ョスタット、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

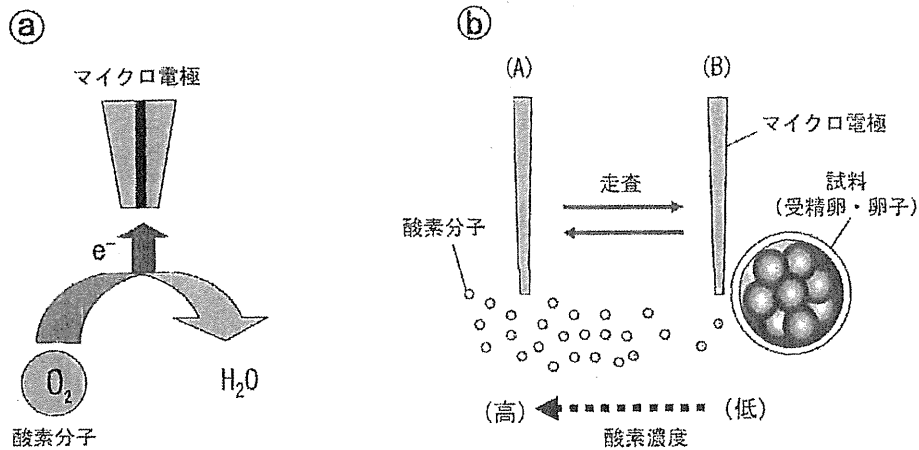


図1 マイクロ電極を用いた受精卵呼吸測定法

- 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。

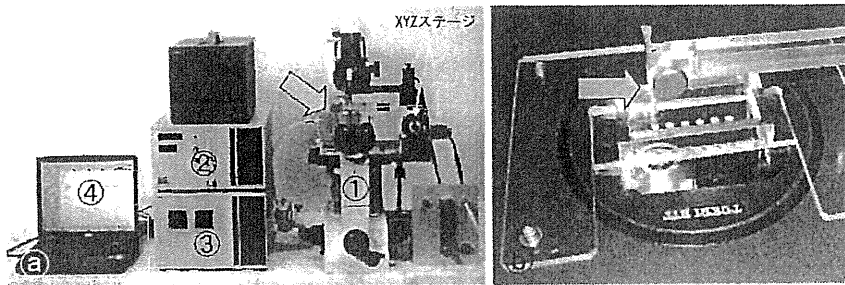


図2 走査型電気化学顕微鏡を改良した「受精卵呼吸測定装置」（北斗電工^(株)製）
 ①倒立型顕微鏡，②ポテンシostat，③コントローラー，④ノートパソコン（呼吸解析ソフトを内蔵）。矢印は，専用の測定チャンバーを示す。
 ⑤測定ステージ部。矢印は，ホルダーに設置したマイクロ電極を示す。

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3(a), (b)）を使用している。

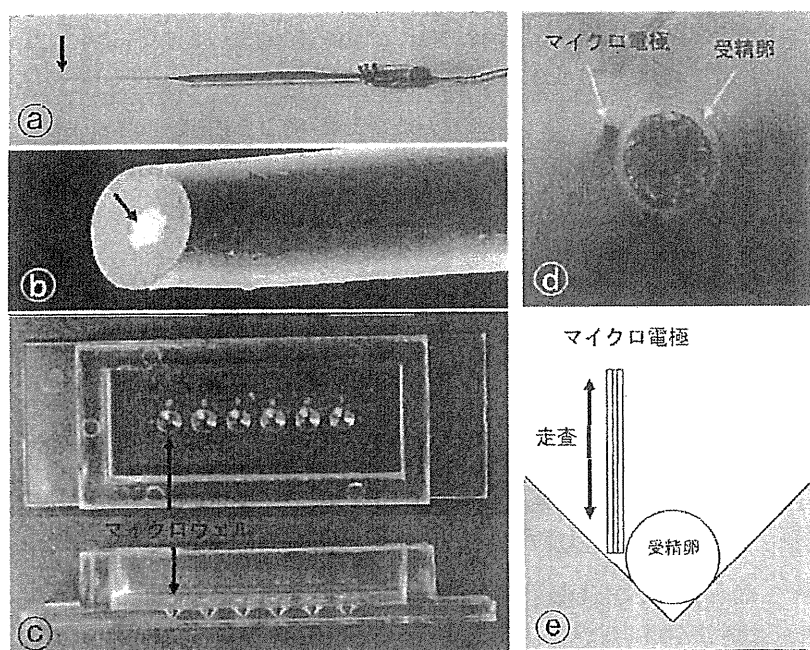


図3 受精卵呼吸測定用のマイクロ電極①と多検体測定プレート②

- 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ェルが6穴施されている。
- ④マイクロウェ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ェルが施されている（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ェル内に試料（胚）を導入した後、マイクロウェ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動で移動する。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。

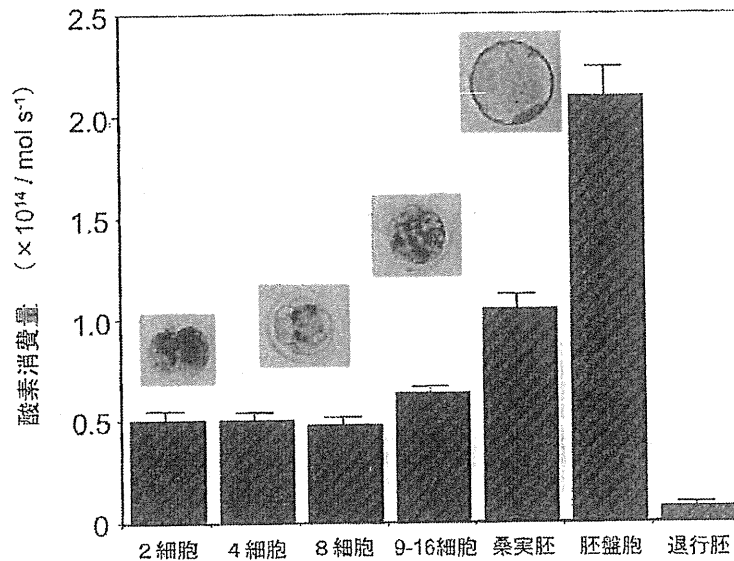


図4 ウシ体外受精胚の発生過程における呼吸量変化
桑実胚から胚盤胞期にかけて呼吸量が増加する。退行胚ではほとんど呼吸量は検出されない。

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

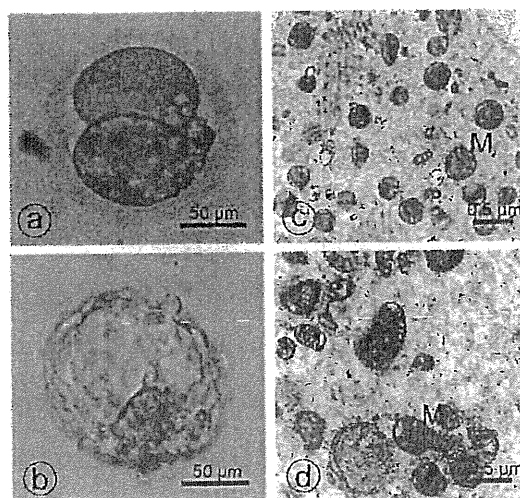


図5 ヒト胚におけるミトコンドリアの超微細形態変化

- (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)。

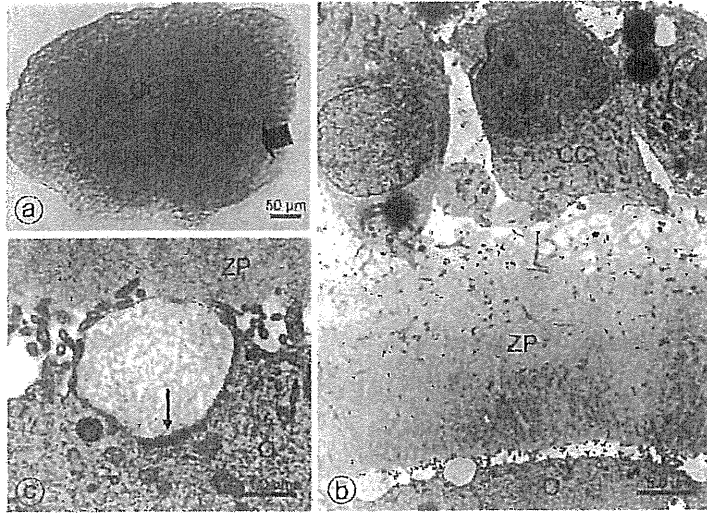


図6 ヒト卵丘細胞-卵子複合体 (COC) の形態

- 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。

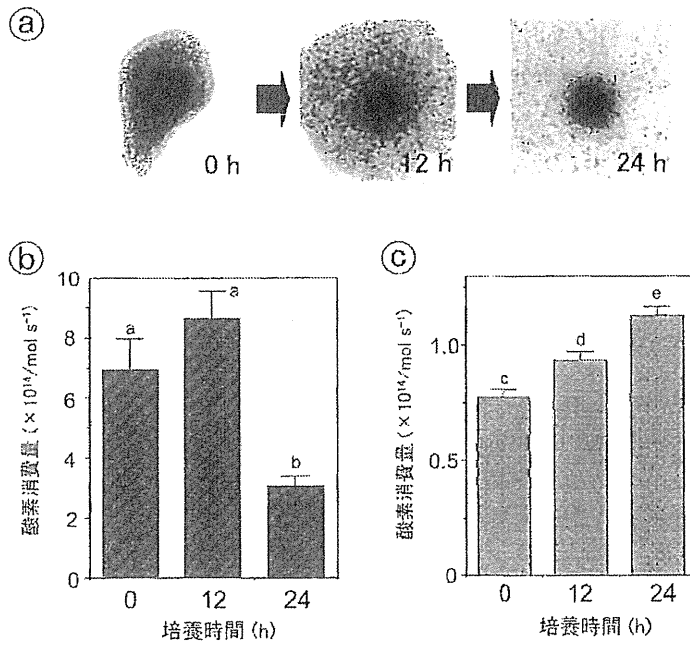


図7 ウシ卵子成熟過程における呼吸活性変化

- 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. Coto, 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)

第2節

走査型電気化学顕微鏡による 酵素イメージング

1. 走査型電気化学顕微鏡(SECM)とは

走査型電気化学顕微鏡(scanning electrochemical microscopy; SECM)は走査型プローブ顕微鏡の一種である。SECMは、プローブとして微小電極(ここではプローブ電極と称することにする)を用い、局所領域の電気化学反応種をファラデー電流として定量的にとらえることにより、位置分解能の高いピンポイント計測や2次元・3次元的イメージングが可能なシステムである。プローブ電極をバルク溶液中に設置し、電気化学反応種が十分に酸化あるいは還元される電極電位に保持すると、拡散律速に基づく以下の定常電流が得られる。

$$i_{TP}^{\infty} = 4nFDaC \quad (1)$$

n 反応電子数, F 9.65×10^4 (C/mol) ファラデー定数, D (cm^2/s) 拡散係数, a (cm) 電極半径, C (mol/cm^3) 電気化学反応種濃度

一方、プローブ電極が測定対象基板の表面の近傍にある場合には、計測電流値は表面の性質に大きく影響される。SECMの計測には、フィードバック(FB)モードおよびジェネレーション/コレクション(G/C)モードがある。FBモードにおいて、プローブ電極を試料基板に近接させた場合、電極-基板間距離(d)が電極直径($2a$)以下($d < 2a$)になると、観測される電流(i_{TP})が急激に変化する。例えば、電気化学反応種を含む溶液中において、プローブ電極を金属基板に接近させると、電極-金属表面間における電気化学反応種のレドックスサイクリングが形成され観測電流が増加する(図1(a))。これが、ポジティブFBモードである。一方、プローブ電極を

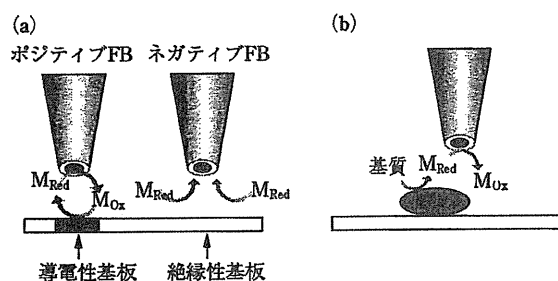


図1 SECMによる測定法
(a)FBモード, (b)G/Cモード

絶縁性基板に近接させた場合には、バルク溶液中から電極表面への電気化学反応種の供給が阻害されるため電流は減少する(図1(a))。これが、ネガティブFBモードである。

G/Cモード計測では、基板表面等により生成される電気化学反応種をプローブ電極で捕捉する(図1(b))。したがってこのモードを用いると、試料基板の表面における反応領域や電気化学反応種の生成速度を定量的に解析可能である。また、バルク溶液中に存在しない物質を計測する場合には、バックグラウンド電流を低減でき高感度分析が可能となる。

2. 酵素活性のイメージング

SECMは、局所領域に固定化された酵素活性評価のためのきわめて有効なツールである。固体基板表面に固定化されたさまざまな酵素の活性がSECMにより測定されている。図2に、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)の酸化酵素であるジアフォラーゼ(Dp)がパターンニングされた

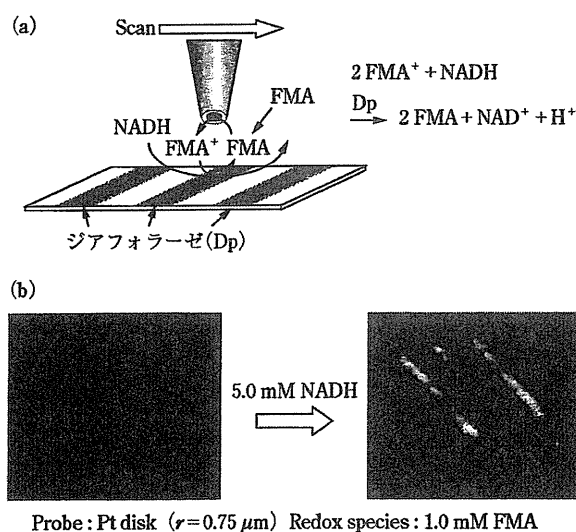


図2 固定化酵素イメージング

(a) 固定化した酵素(Dp)のイメージングの概要, (b) 基質であるNADHの添加前後のSECMイメージ

基板のSECMイメージを示した。この場合には、電気化学反応種(メディエータ)としてフェロセンメタノール(FMA)を用いている。酵素の基質であるNADHが溶液中に存在しない場合には、SECMイメージにはとくに特徴は認められないが、溶液中にNADHを添加すると、イメージにはラインアンドスペースのパターンが現れる。これは、プローブ電極表面で酸化され生成したFMA酸化物(FMA^+)が、NADHが存在する場合には、酵素固定化領域でFMAに再生し、そのFMAが再び電極に酸化されるからである。このように、電極-酵素間においてメディエータのレドックスサイクリングが生じ電流応答は増幅される。プローブ電極がDp固定化領域の上方に移動してきた場合だけレドックスサイクリングによる電流増幅が起こるために、図2に示したようなイメージが得られる。このように、酵素が機能し触媒反応の進行を捕捉できることがSECMイメージングの大きな特徴の一つである。これは、ポジティブFBモード計測であるが、注意しなければならないのは、常に一定のバックグラウンドがあるということである。また、ポジティブFBモードを用いてパターンされた西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)やグルコースオキシダーゼの評価も行われている。

β -ガラクトシダーゼ(Gal)やアルカリホスファターゼ(AP)の活性は、G/Cモード計測を用いて評

価できる。Galの基質である

-aminophenyl- β -D-galactopyranoside(PAPG)は、基板表面に固定化されたGalにより加水分解され

-aminophenol(PAP)が生成する。生成したPAPは酸化されやすい物質であるため、プローブ電極を適切な電位に設定することによりPAPを検出できる。したがって、G/Cモード計測を行うことにより、局所領域のGal活性を捕捉することができる。APの場合には、基質として

-aminophenylphosphate(PAPP)を用いることにより、同様にイメージングすることが可能である(後述)。しかし、G/Cモード計測ではメディエータのレドックスサイクリングによる電流増幅ができないため高感度化が困難であった。Wittstokらは、2種類の酵素が固定化されたマイクロビーズを混合して固定化し、ポジティブFBモードとG/Cモードを融合させた高感度測定システムも報告されている。

SECMのプローブ電極上で進行する極微化学反応を利用すると局所的な反応場を構築し、表面改質を行うことが可能である。SECMによるマイクロファブリケーションでは、探針であるマイクロ・ナノ電極の酸化還元電位を制御することにより、さまざまな化学反応系が設計可能であるという特長がある。例えば、プローブ電極で発生させたHOラジカルなど反応活性種を利用することにより、試料表面の局所領域に化学反応を誘起し、酵素のパターニングを行うことができる。

3. プロテインチップのイメージング

マイクロ・ナノ電極を用いた電流計測法は、一般に考えられているより高感度な計測法である。とくに、サンプル量を極微量とすることが可能なので、絶対量という観点では非常に高感度である。マイクロ・ナノ電極を用いて1 pAの電流を計測することは、ノイズ対策をしなければならないが、それほど困難なことではない。1 pAの電流は、測定対象物に換算すると 10^{-17} mol/sに相当し、かなり微量といえる。酵素の化学増幅を利用した電流計測では、非常に高感度で酵素のセンシングが可能となる。例えば、酵素のターンオーバーを $10^5/\text{s}$ とすると、絶対量として 10^{-22} molと zmol(10^{-21} mol)より下のレ

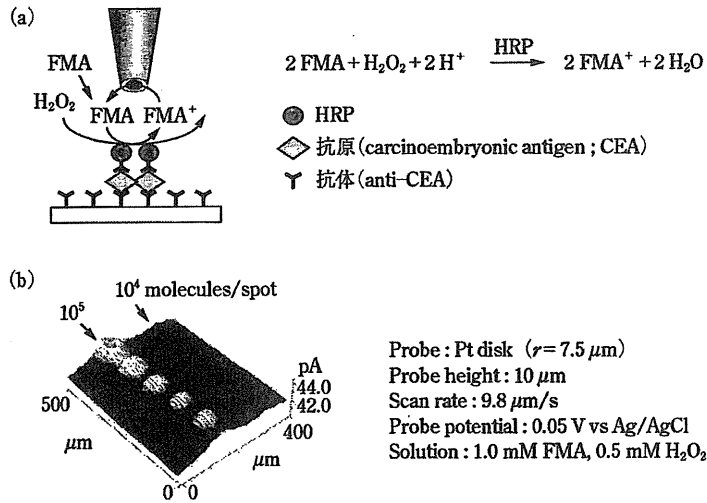


図3 SECMによるイムノアッセイシステム
 (a)標識酵素(HRP)のイメージングの概要, (b)イムノアッセイ後のHRPのSECMイメージ

ベルの酵素が電気化学的に計測できることになる。

したがって、マイクロ・ナノ電極をプローブとしたSECMと酵素免疫法を組み合わせることにより、高感度のイムノアッセイシステムが構築できる(図3)。

例えば、表面局所領域に異なる抗体を固定した基板(抗体チップ)上での、抗原-抗体反応を、高感度でSECMにより検出することが可能である。この場合、抗体チップに抗原(一般にタンパク質)を含む溶液を滴下すると、抗原はチップ上の特定抗体に捕捉される。その後、適当な酸化酵素(例えばペルオキシダーゼ)で標識された抗体で処理すると、この標識酵素をSECMによりイメージングできる。標識酵素が存在する場所には抗原が捕捉されているので、レスポンスが現れた場所から試料中に含まれるタンパク質の種類を特定できることになる。非常に低濃度の特定物質を検出・定量するためには、一般にその物質を濃縮する必要がある。抗体チップを用いると、微小領域に試料中の抗原を濃縮固定できるという特徴もあり、微細加工を施した基板の利用は、サンプル量の少量化や集積化という観点だけでなく、計測時間の短縮や検出感度の向上にも有効である。

また、酵素固定法を工夫することにより、抗体チップを用い100分子と超高感度でタンパク質を検出することが可能である。

4. 細胞が生産する酵素のリアルタイムイメージング

単一細胞で進行する化学反応プロセスを分析する技術は、細胞工学、遺伝子工学およびバイオチップデバイスの分野においてきわめて重要である。SECMは、光合成および呼吸のイメージングや定量的解析など、単一細胞レベルでの機能評価に用いられている。最近では、レポータータンパク質のイメージングにもSECMが用いられるようになってきている。

一般的に、レポータータンパク質として、緑色蛍光タンパク質(GFP)やルシフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)が用いられている。SEAPを用いたシステムでは、検出に蛍光基質や発光基質が用いられているが、PAPPを基質として用いた場合、SEAPによる加水分解でPAPが生成されるため、電極による検出が可能である(図4)。SECMを用いたアッセイは細胞に対して非侵襲であるため、SECMによるレポータータンパク質を介したリアルタイムな遺伝子発現の評価が可能になる。

SEAPを用いたレポータータンパク質のイメージングの概要を図5に示す。まず始めに、レポーター遺伝子を細胞に導入する。この遺伝子は、外部刺激からのシグナルで活性化した転写因子に応答する。その結果、転写・翻訳が行われ、SEAPが細胞外へ

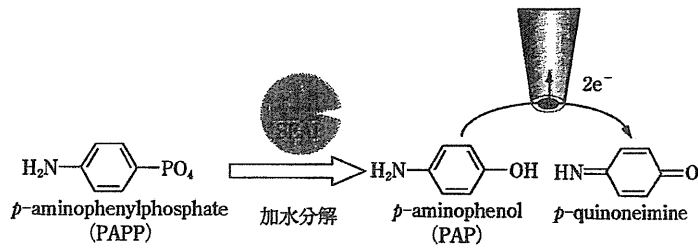


図4 細胞が生成するSEAPの電気化学測定
PAPPはSEAPによりPAPに加水分解され、このPAPをプローブ電極で検出

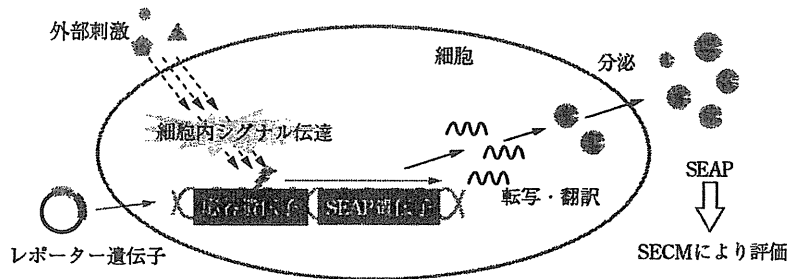


図5 SECMによるレポータータンパク質のイメージング

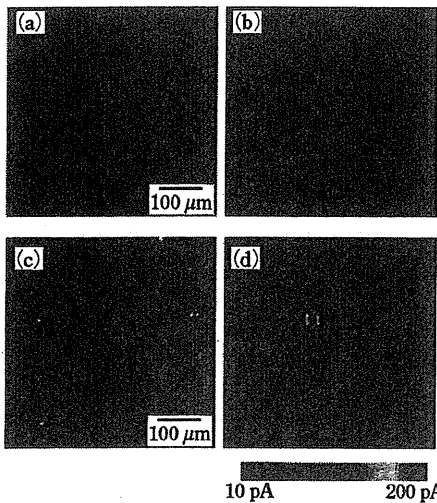


図6 SECMと微細ウェルを用いた単一細胞解析
(a), (b)TNF- α なし, (c), (d)TNF- α (100 ng/ml), (a), (c)位相差顕微鏡写真, (b), (d)SECMイメージ

分泌される。このSEAPはG/Cモード計測で検出できるため、得られた電流値により、外部刺激に対する遺伝子発現の解析が可能になる。さらに、図6のように微細ウェルを用いた1細胞アレイを作製することで、ハイスループットな単一細胞の遺伝子機能の評価が行える。図6は、転写因子であるNF κ Bに対する応答遺伝子が用いた結果を示しており、

TNF- α がNF κ Bを活性化させる様子がイメージングされている。このように、SECMを用いた細胞が生産する酵素のイメージングにより、外部刺激に対する遺伝子機能の1細胞解析が可能になっている。さらに、異なる応答遺伝子をもつ遺伝子を導入することで、網羅的な遺伝子解析への応用が期待されている。

5. SECMの解像度を上げるためには

SECMイメージングにおけるプローブ電極の走査法には、高さ一定モードと距離一定モードの二つの走査モードがある(FBモードとGCモードとは異なるので注意)。高さ一定モードは、プローブ電極先端を試料表面基板の上方で一定に保持し、高さ方向(Z方向)に位置フィードバックをかけない操作法である。距離一定モードは、基板表面(XY表面)上のサンプルの凹凸に応じてZ方向にフィードバックをかけ、試料-電極先端間の距離を一定とする走査法である。

高さ一定モードでのSECMイメージングでは、プローブ電極を単にXY方向に走査するだけであり