

図2 COCの光学顕微鏡像

a: グレード1; 卵子(⇒)の周囲には卵丘細胞層が多層に密に付着している。b: グレード2; 卵丘細胞が1~3層付着している。c: グレード3; 卵丘細胞層は1~3層で部分的に剥離している。d: グレード4; 卵丘細胞がまったく付着していない。e: グレード5; 卵丘細胞層の付着が認められるが卵子が変形している。スケールバーは、50 μmを示す。

表1 形態的特徴(グレード1~5)により分類したCOCの酸素消費量

カテゴリー	酸素消費量 ($F \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$)
グレード1	7.79 ± 1.00 (50)
グレード2	1.46 ± 0.15 (25)
グレード3	1.26 ± 0.35 (8)
グレード4	0.86 ± 0.30 (2)
グレード5	0.77 (1)

括弧内の数字は、測定した試料の数を示す。

においてミトコンドリアを中心とする細胞小器官の微細構造を電子顕微鏡により観察した。呼吸測定したCOCの一部をグルタルアルデヒドおよびオスミック酸で固定した後、定法に従いエポキシ樹脂に包埋し超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で微細構造観察を行った。グレード1のCOCでは、卵丘細胞において拡張したクリステを持つミトコンドリアが多数存在し、卵丘細胞と卵子の間には典型的なギャップ結合が数多く観察された(図3a, b)。卵子には、円形で小型のミトコンドリアが多数存在し、それらの多くはクラスターを形成し細胞質にほぼ均一に分布していた(図3c)。一方、グレード2およびグレード3のCOCでは、卵丘細胞内のミトコンドリアはグレード1のCOCと比べて

小型で数も少なく、また、多くのミトコンドリアはクリステが未発達であった(図3d, e)。グレード1で観察された卵丘細胞と卵子とのギャップ結合は、グレード2およびグレード3のCOCではほとんど認められなかった。卵子のミトコンドリアについては、数や形態、分布様式などグレード間での顕著な違いは認められなかった。

5 COCの形態と卵子成熟率の関係

ヒトのCOCは、卵丘細胞の付着状態を基準に分類したグレードによって、呼吸量やミトコンドリアの微細形態が顕著に異なることが明らかとなった。ミトコンドリアやギャップ結合は卵子の成長や成熟に重要な役割を果たしていると考えられることから、本研究では各グレードのCOCを成熟培養し、卵子の成熟能にグレード間の違いがあるのか検討した。COCをTCM199培地に10%患者血清(patient's serum)、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(human chorionic gonadotropin; HCG) 100IU/ml、卵胞刺激ホルモン(follicle stimulating hormone; FSH) 75 IU/mlを加えた培養液を用いて37°C、5% CO₂ in airの条件で26時間、成熟培養を行った。その結果、卵子成熟率はグレー

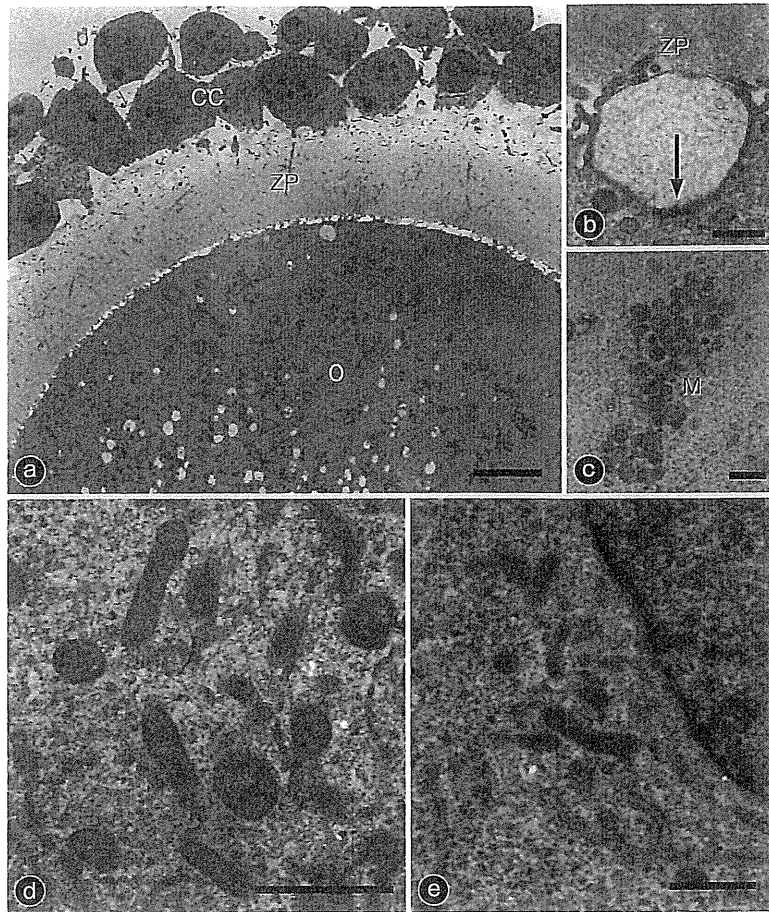


図3 COCの電子顕微鏡像

a~d: グレード1。卵細胞表面には卵丘細胞から伸びた突起との間にギャップ結合(⇒)が観察される(b)。卵子(O)には円形で小型のミトコンドリア(M)がクラスター状になって、ほぼ均一に局在している(a, c)。卵丘細胞にはクリスタが発達したミトコンドリアが多数観察される(d)。e: グレード3。卵丘細胞のミトコンドリアは小型で数も少ない。ZP: 透明帯。スケールバーは、a: 10 μm , b~e: 1 μm を示す。

ド1で70.0%, グレード2で63.3%, グレード3で20.0%, グレード4で33.3%, グレード5で0%でありグレード間に卵子成熟率の違いが認められた(図4)。

2. 考 察

細胞の酸素消費量測定をもとにした胚の呼吸量測定は、Cartesian diver法²⁾、分光光度法(spectrophotometrics)^{3)~5)}、ピレンなど蛍光物質を用いた蛍光発色法(fluorescence)^{6)~8)}などが報告されている。しかし、これらの方法は計測感度が低く、侵襲的な方法であることから、

一般的には普及していない。非侵襲的呼吸測定方法としては、自己参照型微小電極(self-referencing microelectrode)やクラーク型酸素センサーを用いた胚の呼吸量測定が報告されている⁹⁾¹⁰⁾。筆者らは、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する有効な技術である電気化学的イメージング法に注目し、この技術の中心となる走査型電気化学顕微鏡(SECM)をベースに、「受精卵呼吸測定装置(細胞呼吸測定システム)」を開発している¹⁾¹¹⁾。さらに、センサープローブの高感度化や非侵襲性測定液を開発することで、単一の卵子の呼吸量

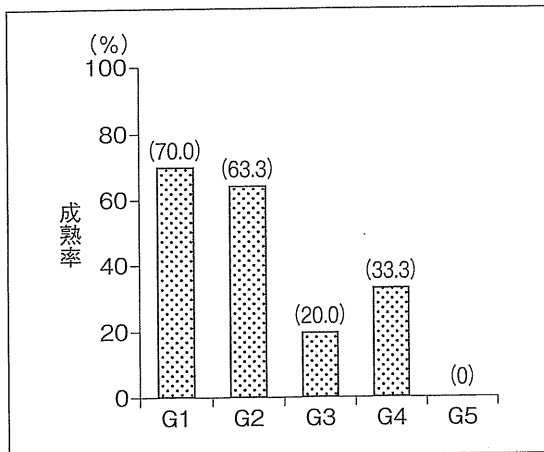


図4 COCを成熟培養した後の卵子成熟率
G1:グレード1, G2:グレード2, G3:グレード3, G4:グレード4, G5:グレード5。

を高精度で測定することができるようになってきた¹²⁾。

現在、胚の品質(クオリティー)は、割球などの数や形態を指標とする形態観察による評価が一般的である。しかしながら、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、評価の精度に影響が出る可能性がある。これまでに、胚の客観的評価のための様々な手法が検討されてきた。例えば、胚の代謝に注目した評価法として、胚の代謝活性をグルコース、ピルビン酸、アミノ酸などの栄養素の消費に着目した研究がある^{13)~17)}。また、ミトコンドリアは酸化反応(呼吸)により細胞活動に必要なエネルギー(ATP)を産生し、胚の発生などに密接に関与していることから、細胞の酸素消費量測定によって胚の品質を評価する方法も試みられてきた⁷⁾⁹⁾。

一方筆者らは、詳細な胚の微細構造観察によりミトコンドリアの発達と胚の品質がリンクしていることを発見し、呼吸活性を指標とする胚品質評価法を提案してきた¹⁸⁾。前述の「受精卵呼吸測定装置」を用いて、家畜や実験動物を中心に呼吸能を指標とする品質評価の有効性に関して興味深い知見が得られている。ウシでは桑実胚期において高い呼吸活性を有する胚の多く

は、呼吸測定後に追加培養を行うと高い確率で品質良好な胚盤胞へと発生する¹²⁾。また、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という結果が得られている¹⁹⁾。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 $1.0 \times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$ 、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¹²⁾²⁰⁾。

これら動物実験の結果を踏まえ、ヒト胚のクオリティー評価と不妊治療における臨床応用を目的として「受精卵呼吸測定装置」の探索的臨床研究を試みている。ヒト胚の形態的クオリティーと呼吸能との関連を調べた結果、Veck分類によるグレードと胚の呼吸能の間には明確な相関は認められないが、胚の呼吸能と胚盤胞発生率に興味深い関係が認められている²¹⁾。媒精3日目(day3)の胚を呼吸量($\times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{sec}^{-1}$)を基準に、 >0.26 、 $0.26 \sim 0.56$ 、 <0.56 の3グループに分け、それぞれ胚の追加培養を行った結果、 $0.26 \sim 0.56$ の範囲の呼吸量を示した胚の65.8%が胚盤胞に発生し、他のグループと比較して最も高い胚盤胞発生率を示した。この結果は、呼吸活性値がある一定の範囲内にあるヒト分割胚は高い発生能を有するクオリティー良好胚であることを示している。さらに呼吸計測の有効性を調べるために、患者の同意を得た上で呼吸測定した胚の移植を行った。Veck分類で同じグレードの胚が複数得られた症例において、形態的グレードと呼吸活性が最も良好な胚を移植した場合、従来の形態的評価のみで選別した胚を移植した場合と比べて妊娠率が優位に向上するという結果が得られている²²⁾。このように、臨床レベルにおいても呼吸活性を指標とする胚品質評価の有用性が示されてきている。

本症例では「受精卵呼吸測定装置」を用いて、初めて単一ヒトCOCの呼吸量測定に成功し、COCの呼吸量活性と卵子成熟能の関係を示唆

する結果が示された。卵子は単一細胞であるため、胚のように割球数やその形態を基準にクオリティーを評価することは困難である。しかし、卵子のクオリティーを卵丘細胞の状態から評価しようとする試みがある。採卵時に回収された顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現率が低い卵胞から得られた卵ほどクオリティーが良好であると報告している²³⁾。最近筆者らは、IVM-IVF (in vitro maturation and in vitro fertilization) 施行時に、COCにおいて卵子面積 (oocyte-area), 卵子円形率 (oocyte-circularity), 卵丘細胞の多層形成 (cumulus-layer), 卵丘細胞-卵子面積比 (C-ratio) などを画像解析ソフト (NIH Image) により解析し、これら計測値を指標にCO Cの段階で卵子成熟能の予測が可能かどうか検討している。これまでに、成熟培養26時間前後においてC-ratioが大きい、すなわち卵丘細胞が多く付着しているCO Cは高い卵子成熟率を示すことを明らかにしている²⁴⁾。本研究では、卵丘細胞の数と付着状態とCO Cの呼吸活性および卵子成熟率の関係を調べた結果、卵子成熟率と呼吸量は付着している卵丘細胞の数にほぼ比例することが明らかになった。さらに、卵子成熟率と呼吸活性が両方とも最も高いグレード1では、卵子と卵丘細胞間のギャップ結合の発達が非常に顕著であり、他のグレードのCO Cと比べて卵丘細胞内のミトコンドリアもよく発達していた。このように、卵丘細胞の呼吸活性は卵丘細胞-卵子間相互作用と卵子のクオリティーと密接に関連していることから、CO Cの呼吸測定は卵子のクオリティーをCO Cの段階で早期に評価できる画期的な方法となる可能性がある。

おわりに

本症例では、SECMを用いた電気化学計測技術は、ヒトCO Cのミトコンドリアの呼吸機能解析に有効であること、また、これまで困難であったCO C内の卵子の品質を呼吸活性を指標に評価できる可能性が示された。電気化学計測技術は、非侵襲・高感度測定法であることから、

ヒト胚や卵子の品質評価など不妊治療における臨床応用が十分に期待できる。

文 献

- 1) Abe H : A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with a scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *J Mamm Ova Res* 24 : 70-78, 2007
- 2) Mills RM et al : Oxygen consumption of pre-implantation mouse embryos. *Exp Cell Res* 47 : 337-344, 1967
- 3) Magnusson C et al : Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. *Hum Reprod* 1 : 183-184, 1986
- 4) Magnusson C et al : Oxygen consumption of maturing rat oocytes. *Biol Reprod* 17 : 9-15, 1977
- 5) Nilsson B et al : Correlation between blastocyst oxygen consumption and trophoblast cytochrome oxidase reaction at initiation of implantation of delayed mouse blastocysts. *J Embryol Exp Morphol* 71 : 75-82, 1982
- 6) Houghton FD et al : Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 44 : 476-485, 1996
- 7) Thompson JG et al : Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil* 106 : 299-306, 1996
- 8) Donnay I et al : Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Mol Reprod Dev* 53 : 171-178, 1999
- 9) Trimarchi JR et al : Oxidative phosphorylation-dependent and independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 62 : 1866-1874, 2000
- 10) Lopes AS et al : Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. *Reproduction* 130 : 669-679, 2005
- 11) Shiku H et al : Oxygen consumption of single bovine embryos probed with scanning electrochemical microscopy. *Anal Chem* 73 : 3751-3758, 2001
- 12) Abe H et al : In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J Mamm Ova Res* 21 :

- 22-30, 2004
- 13) Overstrom EW : In vitro assessment of embryo viability. *Theriogenology* 45 : 3-16, 1996
 - 14) Rieger D et al : Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and piruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev* 4 : 547-557, 1992
 - 15) Rieger D : Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology* 37 : 75-93, 1992
 - 16) Rieger D et al : Changes in the metabolism of glucose, puruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocyte in vitro. *J Reprod Fertil* 100 : 257-262, 1994
 - 17) Gopichandran N et al : Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. *Reproduction* 126 : 299-308, 2003
 - 18) Abe H et al : Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J Reprod Dev* 49 : 181-192, 2003
 - 19) Shiku H et al : Metabolic and enzymatic activities of individual cells, spheroids and embryos as a function of the sample size. *Sens Actuat B* 108 : 597-602, 2005
 - 20) Abe H 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* 52 (Suppl) : S55-S64, 2006
 - 21) Utsunomiya T et al : Evaluating the quality of human embryos with a measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *J Mamm Ova Res* 25 : 2-7, 2008
 - 22) 後藤香里ほか : 選択的単一胚移植 (eSET) における移植胚選別困難例に対する呼吸量測定の有用性. *産婦の実際* 59 : 1277-1281, 2010
 - 23) Nakahara K et al : The incidence of apoptotic bodies in membrane granulose can predict prognosis of ova from patients participating in vitro fertilization programs. *Fertil Steril* 68 : 312-317, 1999
 - 24) Murakawa H et al : Morphological evaluation and measurement of the respiration activity of cumulus-oocyte complexes to assess oocyte quality. *J Mamm Ova Res* 26 : 32-41, 2009

特集

卵子のエイジング III. 胚の非侵襲的評価法

10. 体外培養卵子の評価—臨床応用

よしだ ひろ ありき たなか たか ゆき あべ ひろ けい
吉田仁秋*1・田中孝幸*1・阿部宏之*2吉田レディースクリニック ART センター*1
山形大学大学院理工学研究科*2

要旨

走査型電気化学顕微鏡 (SECM) はミトコンドリア機能とヒト卵子、胚のクオリティー機能の関係を評価する有益な装置である。体外培養卵子の評価法としてわれわれは SECM を用いてヒト IVM 卵子や胚の呼吸量を測定し検討した。ヒト卵子は MII 期卵に成熟することによりその呼吸量を維持し、受精後呼吸活性はさらに上昇し、桑実胚から胚盤胞で最大となる。IVM 由来卵と COH 由来卵において両者の呼吸量に有意差を認めず、さらにその後の胚発生においても同様の結果が得られた。このことは IVM 由来卵子も受精卵となればその後の胚発生は呼吸量からも同様の機能を有することが示唆された。

Key Words IVM 卵子, 胚の品質, 酸素呼吸量

1978 年 Edward が世界で初めて体外受精を成功させ、昨年ノーベル賞を受賞したことは記憶に新しい。この間体外受精も排卵誘発法や培養液の開発が進み胚盤胞まで培養が可能となり、患者に負担の少ないかつ妊娠率の損なわない誘発法等が開発されてきた¹⁾。多嚢胞性卵巣症候群 (polycystic ovary syndrome: PCOS) は無排卵あるいは稀発月経を呈する症候群で卵胞が多数存在するため、誘発により卵巣過剰刺激症候群 (ovarian hyper stimulation syndrome: OHSS) を引き起こすこととなり注意を要する。そこで低刺激周期の誘発方法や無刺激により未熟卵を回収し、体外で成熟させ受精卵を移植する方法 IVM-IVF ET (in vitro maturation, in vitro fertilization & embryo transfer) が開発された。この IVM は妊娠率の上昇とともに ART (assisted reproductive technology) にも急速に取り入れら

れ、最近のデータでは従来から行われている通常の体外受精とほぼ同様な有用性と安全性も報告されている¹⁾。

卵子や胚の形態学的評価はその精度を高めるため、非侵襲的な卵子や胚評価のため様々なアプローチがなされてきた²⁾。ミトコンドリアは呼吸により細胞活動に必要な ATP を産生する重要な細胞小器官であり、酸素消費と密接な関係があることを山形大学の阿部らは報告している³⁾⁴⁾。その報告によると、様々な動物種の胚の研究においてミトコンドリアが正常に発達している胚は、高い品質の良好胚であるとしている。これらの観点から卵子や胚の品質管理として、走査型電気化学顕微鏡 (SECM) が開発され、呼吸測定装置は安全で、簡便かつ精度の高い客観的評価可能な装置である。

今回われわれはヒト未成熟卵の呼吸量測定を

このSECMを用いて施行し、ヒト未受精卵や卵子-卵丘細胞複合体 cumulus oocyte complex (COC) の呼吸量を測定し、その電顕的な超微形態を観察し、胚評価法として有用か検討した。さらにその後発生した胚の呼吸量について検討してきたのでその概要を報告する。

当院における治療成績

当院での2009年までの治療成績(表1)および当院でのプロトコルを(図1)に示す。2004年の妊娠率と比較し約2倍の29%と上昇している。これは成熟培養液の開発や技術の進

表1 IVM-IVF成績(2007年4月~2009年9月)

パラメーター	結果	範囲	妊娠
年齢(y)	30.0±4.9*	25-34	32.0±3.2
ΣFSH(IU)	354±265*	0-750	330±265
ピークE ₂ (pg/mL)	216±315*	64-783	220±185
採卵日	11**	8-12	11
hCG投与例(%)	93.7		95
採卵数	6**	1-17	10.4±5.3
成熟率(%)	62.8	0-100	54.7
受精率(%)	63.8	0-100	85.8
移植胚数	1.3±0.7*	1-2	2
キャンセル率(%)	18.7		
臨床的妊娠率/胚移植(%)	27.3		
融解周期	11.6		
流産率(%)	22.2		

Values are expressed as mean±SD (*) or medians (**)

Mann-whitney's U test.

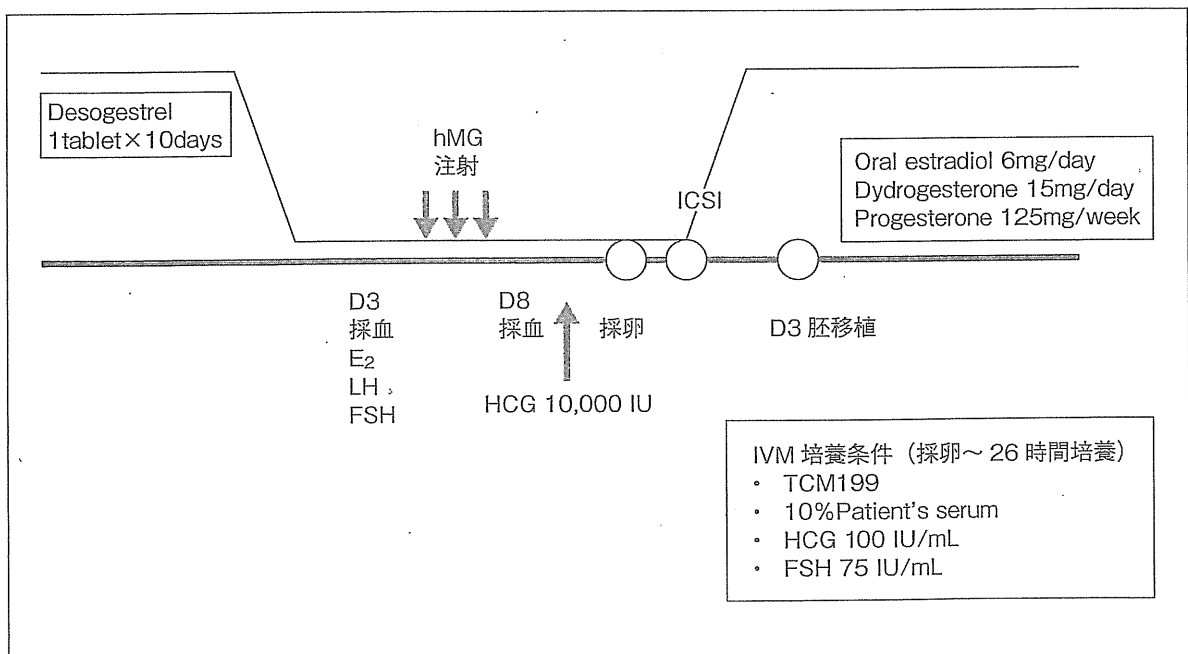


図1 IVM-IVFプロトコル

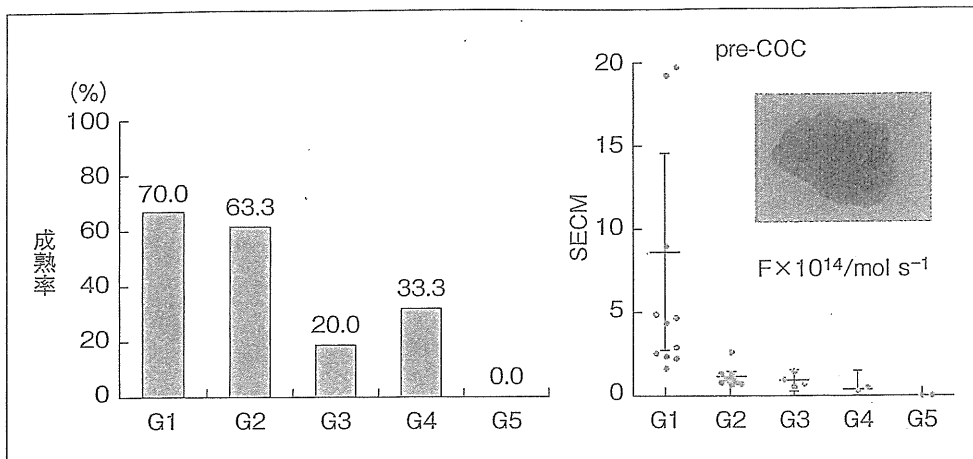


図2 ヒト未成熟卵の成熟率と酸素呼吸量

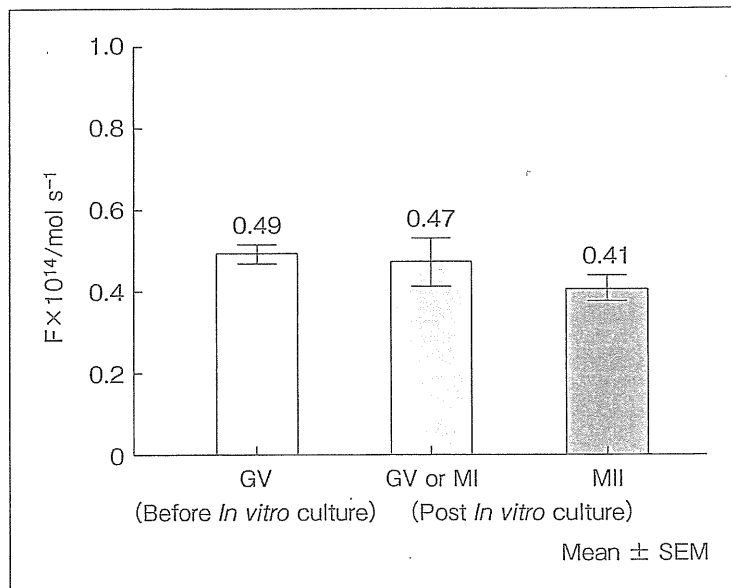


図3 ヒト未成熟卵の酸素呼吸量

歩等のためと考えられる。しかしながら成熟率や受精率は controlled ovarian hyperstimulation (COH) と比較し未だ低値でさらなる改善が必要であり、今後妊娠率の向上を目指し、排卵誘発法の検討、培養液や技術の改良、着床率の改善を検討する必要がある。

卵子卵丘細胞複合体 (COC) および未成熟卵子の呼吸量

今回われわれは IVM-IVF にて採取された

COC および未成熟卵子を形態学的に分類すると、Grade 1 は 4 層以上に重なる卵丘細胞と均等円形卵子、Grade 2 は 3 層に重なり合う卵子全体を覆う卵丘細胞 Grade 3 は卵丘細胞に覆われる領域が半分以下 Grade 4 は完全裸化卵子 (卵丘細胞なし) Grade 5 は卵子が小さいもしくは変形したものとした。これらの形態学的分類によるヒト卵子成熟率は Grade 1 で 70.0%、Grade 2 で 63.3%、Grade 3 で 20.0%、Grade 4 で 33.3%、Grade 5 で 0%と、Grade の下降に

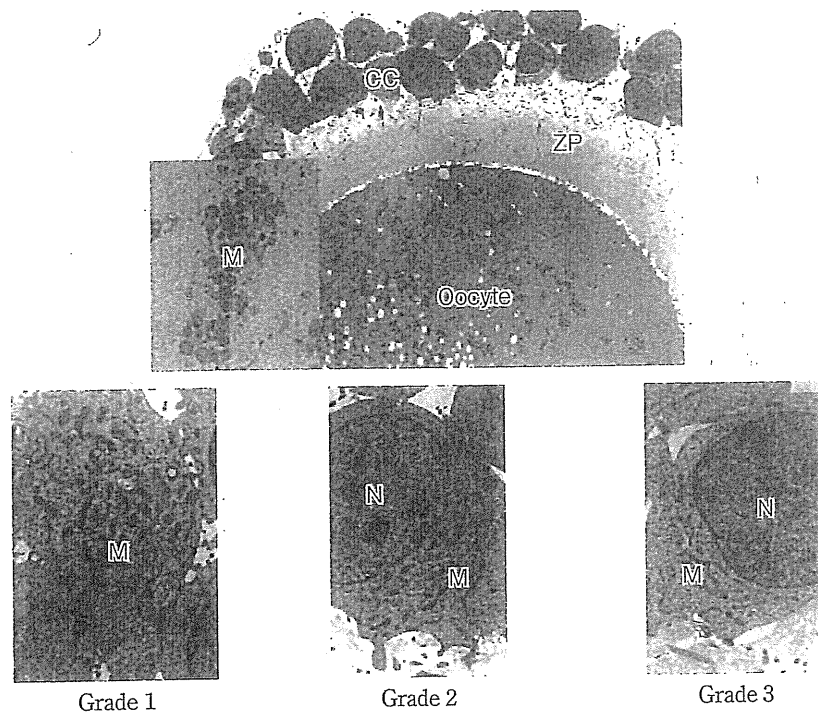


図4 ヒト卵子-卵丘細胞複合体 (COC) の微細構造

伴って成熟率も減少した (図2)。

IVM26時間培養前のヒトCOG全体の呼吸量は平均値は $4.17 \pm 1.18 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ であった。IVM培養前のGrade分類による酸素呼吸量の比較では、培養前後ともにGradeの下降とともにその酸素呼吸量は減弱した。図3はヒト卵子IVM卵とCOHによる卵子の呼吸量を示す。GV期の平均値は $0.49 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ GV期もしくはMI期で $0.47 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ MII期で $0.41 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ となり統計学的に有意差を認めなかった。

透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いたヒトCOGおよび未成熟卵子の電子顕微鏡像

ヒト未成熟卵を採取し、卵丘細胞、未成熟卵子の微細構造を透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察評価した (図4)。上段はGrade1のヒト卵子-卵丘細胞複合体の微細構造を示し、内側 (Oocyte) は卵細胞質で卵細胞質内に矢印で

示したようにミトコンドリアが観察される。数も豊富で円形の丸いミトコンドリアの拡大像が左側である。下段はGrade別のヒト卵丘細胞の微細構造で、Grade1はミトコンドリアの発達が著明で数も豊富で cristae 形成も一部散見される。Grade2,3になるに従ってミトコンドリアの数も減少し、疎になり、ミトコンドリアの形状も縮小傾向を示した。この研究により卵丘細胞の豊富な卵子ほどミトコンドリアの発達が顕著であり、かつ酸素呼吸量もGradeのよいものほど高くなり、細胞内のミトコンドリア量と酸素呼吸量が正の相関を示すことが判明した⁶⁾(図2)。

ヒトIVMおよびCOH分割胚の酸素呼吸量

ヒト受精卵の酸素呼吸量の測定はIVM由来受精卵では平均 $0.40-0.50 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ とCOHの受精卵と同様の結果を得た。さらに受精卵の酸素呼吸量もそれぞれ初期分割胚の平均

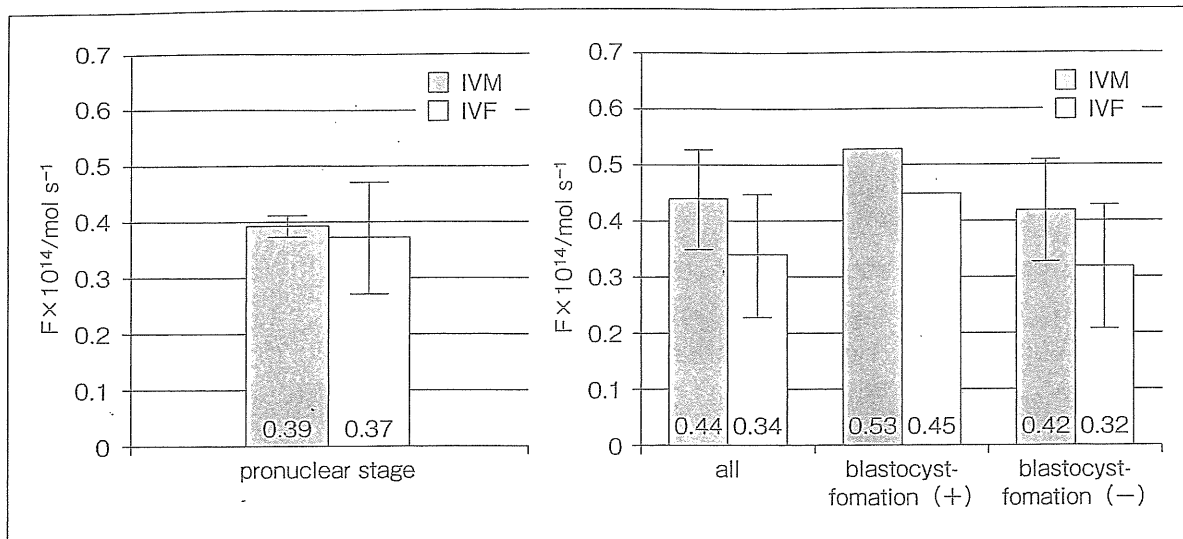


図5 受精卵(前核期・Day 3)の酸素呼吸量の比較

酸素呼吸量は4細胞期6細胞期8細胞期および10細胞期でそれぞれ 0.34 ± 0.1 , 0.37 ± 0.1 , 0.4 ± 0.2 , 0.50 ± 0.2 ($F \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$)である。D-3の分割胚では同じVeek分類のGradeの胚でも個々の分割胚によって酸素呼吸量が異なった。COH胚とIVM胚との両方で相違を認めなかった。すなわちD3の分割胚での比較ではIVM 0.44 ($F \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$), COH 0.34 ($F \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$)で胚盤胞発生したものは呼吸率に高い傾向を認めたが有意差を認めなかった(図5)。この結果は、ヒト分割胚はある一定の最適な酸素呼吸量の範囲があり、その後の胚発生は予測可能であることが示唆された。

考察

卵子や胚の品質評価として形態学的手法が長く用いられてきた。しかし形態学のアプローチのみではその後の胚発生や妊娠率の精度を上昇させることが困難な場合も経験する。そこで卵子や分割胚の品質評価のため、胚の代謝活性をグルコース、ピルビン酸、アミノ酸等の栄養素の消費に着目した研究もなされた⁷⁾。細胞の呼吸(酸素消費)は酸化的リン酸化の過程で

ATPを産生し、酸素消費を起こし、これも胚の代謝活性の評価の一つとされる⁸⁾。

近年胚の新しい評価法として培養24時間後の前核の核小体の配列により胚盤胞への発生率と着床率の改善例がTesarikらにより報告されたが⁹⁾、最近の見尾らのtime-lapse cinematographyを用いた報告では、核小体の配列も個々の分割卵で様々に移動し、動的観察では核小体の配列はある一時点での評価の一部にすぎないことが判明した¹⁰⁾。すなわち核小体は発育の過程で配列をドラマチックに変えている。

最初のマウス胚盤胞とヒト卵、胚盤胞の測定は¹¹⁾酸素ヘモグロビンからヘモグロビンへの変換による酸素呼吸量を間接的に計測した。その後哺乳類胚の酸素呼吸量は様々な代謝過程の情報をパラメーターとしてCartesinのようにdiverを用いたり¹²⁾、電気化学的方法などにより計測された¹³⁾。より正確で簡便な酸素呼吸量の測定が求められ、単一の酸素呼吸量の測定が可能な方法が開発された¹⁴⁾。この単一胚の測定可能なシステムは底辺を円錐状に工夫したmicrowellの使用により電気化学顕微鏡のスキャンを可能にした³⁾⁴⁾。このシステムの使用により単一細胞の呼吸量測定が可能になった。

阿部らの報告によると、多くの動物胚では桑実期から胚盤胞に期にかけて呼吸量の増加とミトコンドリアの発達が一致して起こり、呼吸量の高い胚は発生能や耐凍能が良好である。さらに呼吸量測定後の移植実験では基準値以上の呼吸量を示す胚は妊娠率が高いことが判明した。よって呼吸量測定は胚の品質評価に有効である。ヒト胚では同じWeek分類のGradeでも呼吸量が個々の胚の品質により異なるが、胚分割には最適な酸素呼吸量を必要とし、一般に桑実期胚や胚盤胞期にその呼吸量は上昇した。

ヒト受精卵においてIVM卵、COH卵でも卵の質は個々の個体差が大きいが、その後の胚発生に最適な酸素呼吸量の範囲があることが判明した。さらに初期分割胚、桑実胚、胚盤胞と酸素呼吸量は次第に上昇し、胚盤胞で最も上昇していた。これらの結果はウシやブタなどの他の動物種と同様な結果を示した⁴⁾。さらに形態学的評価と呼吸量を組み合わせると妊娠率が上昇すると最近報告されている。

さらに卵丘細胞の付着状態によって卵子の呼吸能が異なり、高い呼吸活性を有するCOCは卵子成熟培養後の成熟率が高いことが判明した。ヒト卵子の呼吸量も同様に卵丘細胞の付着3層以上のGrade 1, 2では有意に呼吸量は高く、その後の成熟率にも反映され、受精率や胚発生率に影響を与えることが判明した。

文献

- 1) Jin-Ho Lim, RC Chian, et al : Selection of patients for natural cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes. *Fertil Steril* 2009 ; 91 : 1050-1055.
- 2) Boiso I, Veiga A, Edwards RG, et al : Fundamentals of human embryonic for growth in vitro and the selection of high-quality emryos for transfer. *Reprod. Biomed. Online* 2002 ; 5 : 328-350.
- 3) Abe H, Shiku H, Aoyagi S, Matsue T, Hoshi H, et al : Respiration activity of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing media. *Reprod. Fertil. Develop* 2005 ; 17 : 205.
- 4) Abe H, et al : A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with a scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *J. Mamm. Ova. Res* 2007 ; 24 : 70-78.
- 5) Utsunomiya T, Goto K, Nasu M, Kumasaki Y, Araki Y, Yokoo, Sasaki T, Abe H, et al : Evaluating the quality of human embryos with a Measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *J. Mamm. Ova. Res* 2008 ; 25 : 2-7.
- 6) H Murakawa, H Yoshida, et al : Morphological Evaluation and Measurement of the Respiration Activity of Cumulus-oocyte complexes to Assess oocyte Quality. *Reproductive Research Center Yoshida Ladies Clinic Sendai Japan, J. Mamm. Ova Res* 2009 ; 26 : 32.
- 7) Rieger D, Loskutoff NM, et al : Changes in the metabolism of glucose, puruvate, glutamine and glycine and glycine during maturation of cattle oocyte in vitro. *J. Reprod. Fertil* 1994 ; 100 : 257-262.
- 8) Thompson J G, Partridge R J, Houghton F D, Cox C I, Leese H J, et al : Oxygen up take and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J. Reprod. Fertil* 1996 ; 106 : 299-306.
- 9) Tesalik J, Junca A M, Hazout A, Aubriot F X, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M, et al : Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum. Reprod* 2000 ; 6 : 1396-1399.
- 10) Mio Y, et al : Morphological analysis of human embryonic development using time lapse cinematography. *J. Mamm. Ova. Res* 2006 ; 23 : 27-35.
- 11) Nilsson B, Magnusson C, Wideha S, Hillensio T, et al : Correlation between blastocyst oxygen consumption and trophoblast cytochrome oxidase reaction at initiation of delayed mouse blastocysts. *J. Embryol. Exp. Morphol* 1982 ; 71 : 75-82.
- 12) Millis RM, Brinster RL, et al : Oxygen consumption of pre-implantation mouse embryos. *Exp. Cell Res* 1967 ; 47 : 337-344.
- 13) Overstorm EW, Dudy RT, Dobrinsky J, Roche JF, Boland MP, et al : Viability and oxidative metabolism of the bovine blastocyst. *Theriogenology* 1992 ; 37 : 269.
- 14) Shiku H, Shiraishi T, Aoyagi S, Utsumi Y, Matsudaira M, Abe H, et al : Respiration activity of single bovine embryo entrapped in a cone-shaped microwell monitored by scanning electrochemical microscopy. *Anal chemical Acta* 2004 ; 522 : 51-58.

著者連絡先

〒982-0817
宮城県仙台市太白区西中田二丁目23-5
吉田レディースクリニック ART センター
吉田仁秋

特集

卵子のエイジング III. 胚の非侵襲的評価法

9. 走査型電気化学顕微鏡を用いた胚の評価法

あべひろゆき
阿部宏之*

山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻*

要旨

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(ATP)を合成する細胞小器官であり、細胞の代謝活動や胚の発生、アポトーシスなどの重要な生物現象に関与している。したがって、高精度の細胞呼吸計測は、胚の品質やミトコンドリア呼吸機能を評価・解析するための有用な技術となる。本項では、電気化学計測技術を応用した細胞呼吸測定法を解説し、この技術の中心装置である走査型電気化学顕微鏡を用いた胚の品質評価法を紹介する。

Key Words 細胞呼吸, 胚発生, 電気化学計測

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(ATP)を合成する細胞小器官であり、細胞の代謝活動や胚の発生、アポトーシスなどの重要な生物現象に関与している。したがって、高精度の細胞呼吸計測は、胚の品質やミトコンドリア呼吸機能を評価・解析するための有用な技術となる。本項では、電気化学計測技術を応用した細胞呼吸測定法を解説し、この技術の中心装置である走査型電気化学顕微鏡を用いた胚の品質評価法を紹介する。

電気化学計測技術を応用した細胞呼吸測定

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、この技術の有効な装置としてマイクロ電極をプローブとす

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¹⁾。たとえば、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²⁾。筆者らは、SECMをベースに胚の呼吸量測定に特化したシステムとして「受精卵呼吸測定装置」の開発に成功している³⁾。この測定システムは、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

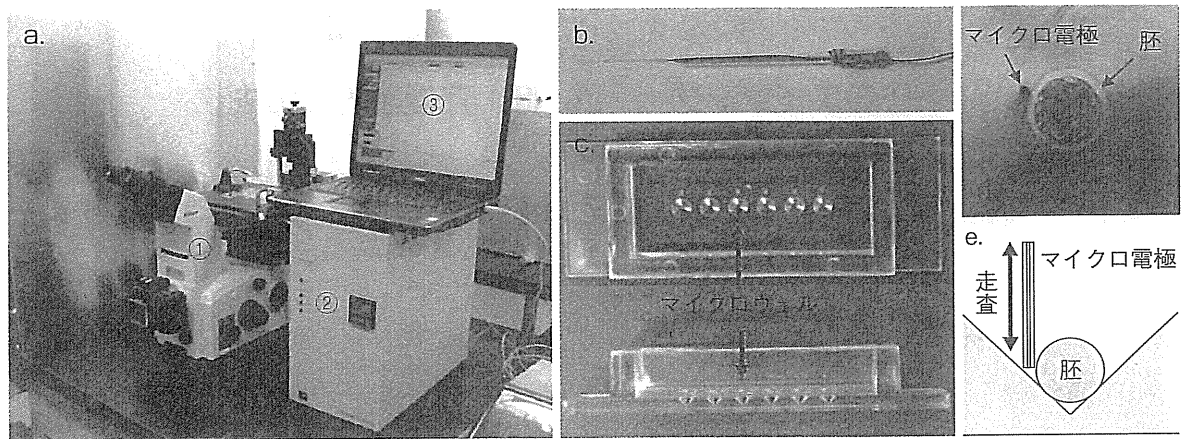


図1 電気化学計測技術を応用した超高感度細胞呼吸測定システム

(a) 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，②：ポテンシオスタット，③：ノートパソコン（呼吸能解析ソフトを内蔵）。(b) ディスク型白金マイクロ電極。(c) 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。(d) マイクロウェル底部に静置したウシ胚。(e) マイクロ電極は胚近傍を鉛直方向に挿引し，胚の酸素消費量を測定する。

の移動を制御し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ーにより構成されている（図1a）。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3次元走査を可能とするXYZステージが設置されており，気相条件を制御できる測定用チャンバーの設置も可能である。

「受精卵呼吸測定装置」による胚の呼吸量測定

「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1b），専用の多検体測定プレートと受精卵培養液をベースに調製した非侵襲測定液を用いる。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1c）。マイクロ電極を用いた電気化学計測は高精度計測技術であることから，呼吸測定には微弱な酸素還元電流計測に影響を与えず，かつ細胞の呼吸機能に影響を及ぼさない成分組成の測定液を用いる。たとえば，電気化学計測には比較的単純な成分で調製されているHTF（Human tubal fluid）

培地が有効である。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1d）。マイクロ電極を胚の透明帯直近に手動で移動したのち，酸素が還元可能な -0.6V vs. Ag/AgCl に電位を保持した状態でコンピューター制御により透明帯近傍を鉛直（Z軸）方向に挿引する（図1e）。通常，1試料あたりマイクロ電極を2～3回走査し，呼吸によって胚近傍に生じる酸素濃度勾配を測定する。マイクロ電極走査後，胚の酸素消費量は球面拡散理論式を基盤とする呼吸解析ソフトを用いて，呼吸によって胚近傍に生じる酸素濃度差から算出する⁴⁾。

胚のミトコンドリア呼吸機能解析

「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測定に成功している。ほとんどの動物胚では，発生過程において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（表1）。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微細構造との関係を調べ

た結果、呼吸活性の低い8細胞期まではミトコンドリアのほとんどは未成熟であるが、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、呼吸量の増加とミトコンドリアの発達がリンクしていることがわかる(図2)。また、ミトコンドリア内膜に存在し酸素呼吸に関与するシトクロムcオキシダーゼ(COX)の遺伝子発現と呼吸量の増加

が一致することが明らかにされている⁵⁾。このように、「受精卵呼吸測定装置」は呼吸量を指標に、胚のミトコンドリア呼吸機能を高精度で解析できる有用な測定システムである。

呼吸機能解析と胚のクオリティー評価

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。胚移植前に最も質的に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、胚の品質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ー評価法であるといえる。

表1 ウシ体外受精胚の発生過程における呼吸量変化

発生ステージ	測定胚数	酸素消費量 ($\times 10^{14}/\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)
2細胞	15	0.46 ± 0.05^a
4細胞	17	0.45 ± 0.03^a
8細胞	18	0.46 ± 0.02^a
桑実胚	48	1.03 ± 0.05^b
胚盤胞	55	1.86 ± 0.07^c
孵化胚盤胞	24	3.01 ± 0.07^d

異符号間で有意差あり ($P < 0.05$)。

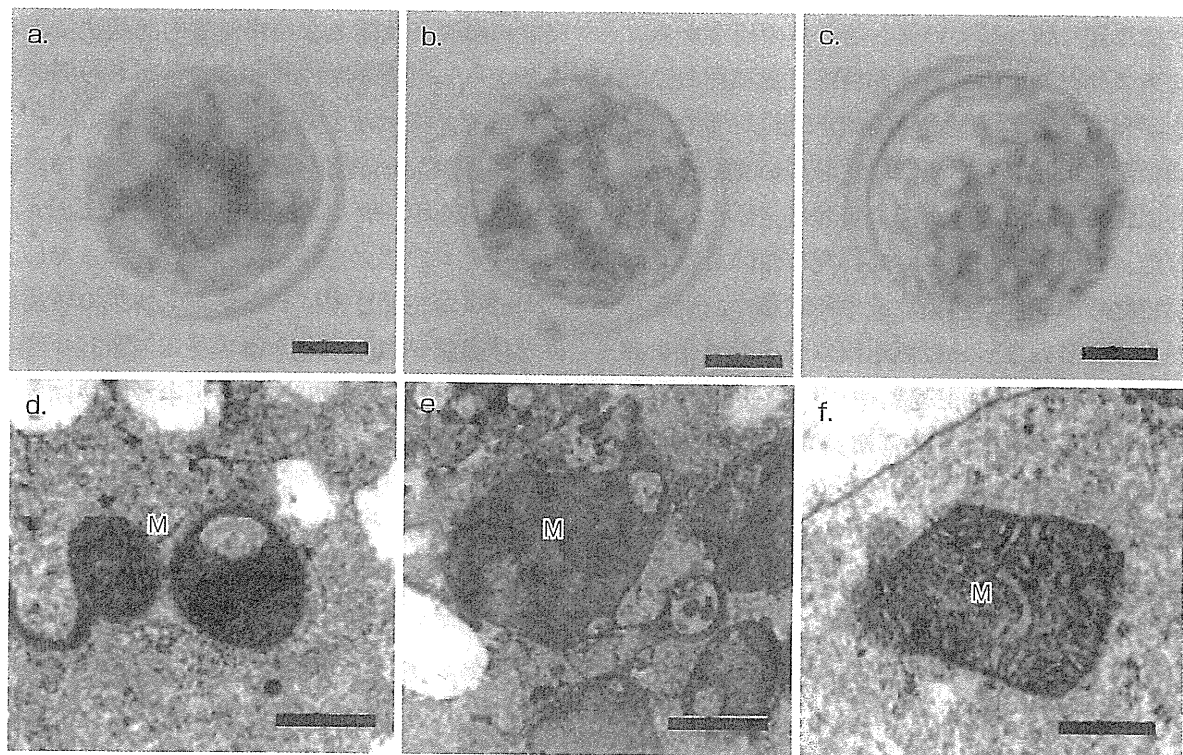


図2 ウシ胚の発生過程における胚の形態(a-c)とミトコンドリアの微細構造(d-f)

a, d: 8細胞期胚, b, e: 桑実胚, c, f: 胚盤胞. M: ミトコンドリア. ミトコンドリアの発達と呼吸量の増加は一致する. スケールバーは, a-c: $20 \mu\text{m}$, d-f: $0.5 \mu\text{m}$ を示す.

表2 ウシ胚の呼吸量と妊娠率の関係

移植時の発生 ステージ	酸素消費量 ($F \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)	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)

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。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ている⁶⁾⁷⁾。ミトコンドリアは酸化的リン酸化(呼吸)により細胞活動に必須のエネルギーであるアデノシン三リン酸(ATP)を産生し、胚の発生等に深く関与している。これらの研究から、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受精卵品質評価システムの開発を進めてきた。

これまでのウシを用いた研究において、胚の品質と呼吸活性の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(表2)。一方、呼吸量が基準値以下の胚は、ほとんど受胎しない。この研究結果により、SECMをベースに開発した「受精卵呼吸測定装置」は、妊娠が期待できる品質良好胚の選別に有効なシステムであることが示された⁸⁾。

表3 ヒト胚(余剰胚)の胚発生過程における酸素消費量(呼吸量)変化

発生ステージ	胚数	酸素消費量 ($F \times 10^{14} / \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$)
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

ヒト胚の呼吸機能解析と 探索的臨床研究

「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、不妊治療などの医療応用が期待できる。ウシやマウスを用いた動物実験において、呼吸測定した胚を移植し誕生した産子の染色体や行動等を解析した結果、染色体異常や奇形、行動異常などの事例はまったく確認されていない。このように、「受精卵呼吸測定装置」による呼吸測定は、細胞機能に影響を及ぼさない非侵襲的計測法であることから、医療応用へ向けて安全面での問題はクリアできると考えている⁹⁾。

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3、図3)、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¹⁰⁾。また、形態的評価が同じ胚でも呼吸活性が大きく異なることから、呼吸測定は形態観察だけでは知ることができない胚の代謝活性を客観的に評価できる可能性を示している¹¹⁾。これらの研究成果を踏まえ所定の倫理承認を得た後、不妊治療での臨床応用を目的に呼吸測定胚の移植試験を開始している¹²⁾。試験的な臨床例では、形態的評価が同じ胚が複数得られた症例において呼吸活性を指標とする評価法を導入している。これまでに形態

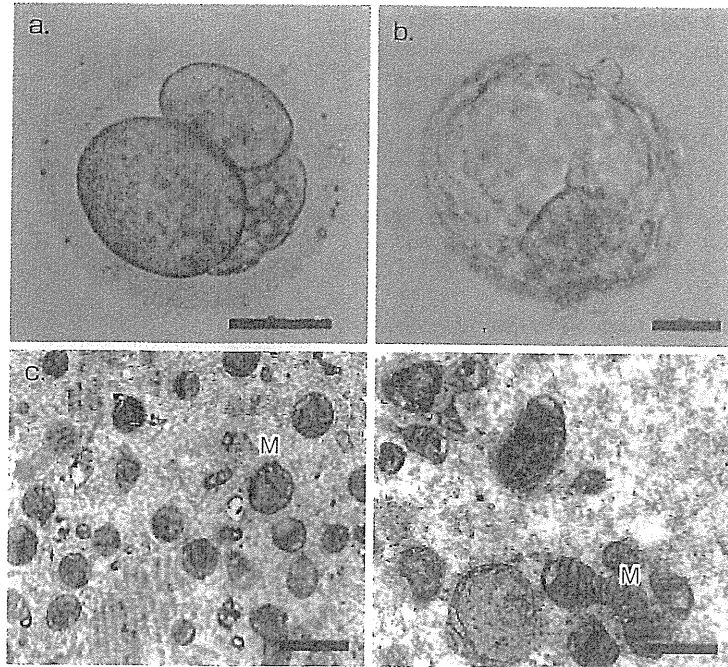


図3 ヒト胚(余剰胚)の形態(a,b)とミトコンドリアの微細形態(c,d)
a, c: 2細胞期胚, b, d: 拡張胚盤胞. M: ミトコンドリア. ミトコンドリアの発達と呼吸量の増加は一致する. スケールバーは, a, b=50 μ m, c, d=0.5 μ mを示す.

表4 不妊治療における探索的臨床研究

評価方法	周期数	妊娠例 (%)	流産例 (%)
形態+呼吸	25	13 (52.0)	1 (7.6)
形態	27	8 (29.6)	2 (25.0)

的評価が良好で呼吸活性が最も高い胚を移植した場合、従来の形態的評価のみで評価した胚を移植した場合と比べて有意に妊娠率が向上することが示されている(表4)。このように、「受精卵呼吸測定装置」はヒト胚の品質評価においても有用なシステムであると考えられる。今後は、呼吸測定によるヒト胚品質評価の臨床的有効性を示すための多施設臨床研究を計画している。

おわりに

今後、不妊治療を望む患者の高年齢化や多様

化が進み、IVF-ETによる不妊治療成績の向上には移植に供する胚の品質評価がこれまで以上に重要になってくる。精度の高い胚の品質評価を実現するためには、形態的評価法と併用できる客観性の高い品質評価法の開発が極めて重要である。本項で解説した「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、新しい胚の品質評価の有効な技術としての実用化が期待される。

文献

- 1) Bard AJ, Mirkin MV: Scanning Electrochemical Microscopy, Marcel Dekker, New York, 2001.
- 2) Shiku H, Shiraishi T, Ohya H, et al: Oxygen consumption of single bovine embryos probed with scanning electrochemical microscopy. Anal Chem 2001; 73: 3751-3758.
- 3) 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.
- 4) Shiku H, Shiraishi T, Aoyagi S, et al: Respiration activity of single bovine embryos entrapped in cone-shaped microwell monitored by scanning electrochemical microscopy. Anal Chim Acta 2004; 522: 51-58.

- 5) 岡崎直人・他：マウス胚発生過程におけるミトコンドリア機能解析. *J Mamm Ova Res* 2007; 24: S47.
- 6) Abe H, Yamashita S, et al: Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 57-66.
- 7) Abe H, Matsuzaki S, Hoshi H: Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology* 2002; 57: 1273-1283.
- 8) Abe H: A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with a scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *J Mamm Ova Res* 2007; 24: 70-78.
- 9) 横尾正樹・他：呼吸活性を指標とした胚の品質評価 — マウス胚移植試験の成績と産子の正常性について —. *産婦の実際* 2010; 59: 1375-1379.
- 10) Utsunomiya T, Goto K, Nasu M, et al: Evaluating the quality of human embryos with a measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *J Mamm Ova Res* 2008; 25: 2-7.
- 11) 後藤香里・他：電気化学的吸計測技術におけるヒト胚クオリティー評価と安全性, *受精着床学会雑誌* 2010; 27: 53-58.
- 12) 後藤香里・他：選択的単一胚移植 (eSET) における移植胚選別困難例に対する呼吸量測定の有用性. *産婦の実際*; 59: 1277-1281.

一口メモ

私たちが開発した「受精卵呼吸測定装置」は、真核細胞に共通する細胞呼吸を計測対象としていることから、その応用範囲は極めて広いと考えています。ここで紹介した胚の品質評価のほか、糖尿病治療における膵島の機能診断、魚介類などの鮮度評価などにも応用されています。また、この装置は、現在最も高感度・無侵襲的に細胞呼吸を測定できることから、シングルセルレベルでのリアルタイム呼吸代謝解析や、形態観察では評価が困難である卵子の品質評価にも有効であることがわかってきています。この装置がポストゲノム時代の有力な細胞機能解析システムとして、基礎研究や医療・産業分野において応用されることを期待しています。

(阿部宏之)

著者連絡先

〒992-8510
山形県米沢市城南 4-3-16
山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻
阿部宏之

Multifunctional Nanoprobes for Nanoscale Chemical Imaging and Localized Chemical Delivery at Surfaces and Interfaces**

Yasufumi Takahashi, Andrew I. Shevchuk, Pavel Novak, Yanjun Zhang, Neil Ebejer, Julie V. Macpherson, Patrick R. Unwin, Andrew J. Pollard, Debdulal Roy, Charles A. Clifford, Hitoshi Shiku, Tomokazu Matsue, David Klenerman, and Yuri E. Korchev*

The dynamics of chemical and biological processes at interfaces underpin a wide range of phenomena, from surface adsorption and crystal growth to signal transduction at the cell membrane. Since many interfaces have nanoscale structures which control these phenomena, it is vital to be able to perform measurements of chemical and biochemical fluxes on this length scale. One technique with the potential to measure chemically specific fluxes on the nanoscale is scanning electrochemical microscopy (SECM),^[1,2] but a lack of reliable distance (feedback) control (in contrast to other scanning probe microscopes) and difficulties in fabricating small-scale electrodes have largely restricted the technique to the micro-scale.^[3] Electrochemical imaging on the nanoscale has been demonstrated only rarely^[4] and in rather unusual environments.^[5,6] There have been various attempts to introduce distance control into SECM by using, for example, shear force,^[7-9] intermittent contact (IC) SECM,^[10,11] SECM-AFM,^[11-14] and the combination of SECM with scanning ion conductance microscopy (SICM).^[15,16] While these techniques

have the potential to allow electrochemical imaging on the nanoscale, they have the major disadvantage that they require specialist probes which are often difficult and time-consuming to fabricate and use.

Herein, we introduce an extremely quick (<2 min) and simple process with a high success rate for making double-barrel carbon nanoprobes (DBCNPs) for use in SECM-SICM. The overall probe radius is controllable on the nano- to microscale (see below), and the probes can be used for simultaneous chemical and topographical imaging, nanopositioning, and localized chemical delivery and detection by using SICM^[17-20] distance feedback control. We first demonstrate its capability with approach curve measurements and by imaging test samples, and then by demonstrating its application to rat adrenal pheochromocytoma cells (PC12) by the simultaneous high-resolution imaging of the topography and electrochemical activity. Finally, exemplar studies of the localized chemical stimulation and detection of neurotransmitter release from PC12 cells by using DBCNPs is reported, which provides a platform for many future applications in cell biology.

DBCNPs were fabricated with one barrel filled with carbon for use as the SECM nanoelectrode, and the other barrel filled with electrolyte for SICM. The double-barrel pipette was pulled from a “theta” quartz capillary. This type of pipette was previously used for SICM and controlled deposition,^[21,22] for the electrochemical imaging of electrode surfaces,^[23] and for investigation of charge-transfer processes.^[24] For SECM-SICM, one barrel was coated internally with carbon, formed *in situ* by the pyrolytic decomposition of butane,^[25-27] the details of the fabrication method are described in the experimental section (Figure 1a). After carbon deposition, electrical contact was established by inserting a conductive wire through the top end of the pipette barrel to contact the carbon layer. The second barrel was unmodified, filled with electrolyte, and used for SICM distance control and chemical delivery (Figure 1b).

The method allows fabrication of DBCNPs with a radius ranging from 10 nm to 1 μm. Examples of field emission scanning electron microscopy (FESEM) images of different-sized electrodes are presented in Figure 1 and Figure S1 in the Supporting Information. The sizes of the DBCNPs are controlled by the initial capillary pulling process, and show high reproducibility; a typical size distribution of DBCNPs is shown in Figure S2 in the Supporting Information. The Supporting Information also contains exemplar studies of voltammetry at these probes, for a range of apparent sizes and

[*] Dr. Y. Takahashi, Dr. A. I. Shevchuk, Dr. P. Novak, Prof. Y. E. Korchev
Division of Medicine, Imperial College London
London W12 0NN (UK)
E-mail: y.korchev@ic.ac.uk

Prof. Y. Zhang
China National Academy of Nanotechnology & Engineering
Tianjin 300457 (China)

N. Ebejer, Prof. J. V. Macpherson, Prof. P. R. Unwin
Department of Chemistry, University of Warwick
Coventry CV4 7AL (UK)

Dr. A. J. Pollard, Dr. D. Roy, Dr. C. A. Clifford
National Physical Laboratory
Teddington TW11 0LW (UK)

Dr. H. Shiku, Prof. T. Matsue
Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University
Aramaki Aoba 6-6-11-605, Sendai 980-8579 (Japan)

and
Advanced Institute of Materials Research, Tohoku University
Katahira, Aoba 2-1-1, Sendai 980-8577 (Japan)

Prof. D. Klenerman
Department of Chemistry, Cambridge University
Cambridge, CB2 1EW (UK)

[**] This work was funded by the EPSRC and the Chemical and Biological Programme of the National Measurement System of the UK Department of Business, Innovation, and Skills. Y.T. acknowledges support from JSPS Postdoctoral Fellowships for Research Abroad. P.R.U. thanks the European Research Council for support.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201102796>.

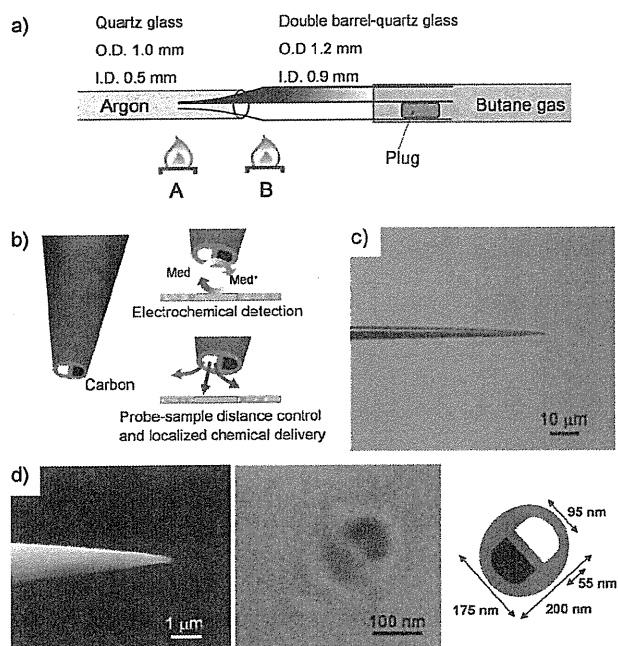


Figure 1. DBCNP fabricated by using the pyrolytic carbon deposition method. a) Schematic illustration of the fabrication method of the DBCNP. b) The principle of combined SECM-SICM measurement with a DBCNP. c) Optical microscopy image of the side view of the DBCNP. d) FESEM images of the side and top of the DBCNP. Note, the carbon deposited inside one of the barrels appears lighter compared to an empty barrel on the FESEM image, but is shown black in the schematic representation (a,b)

redox couples, from simple electron transfer to ferrocenyl-methanol (FcCH_2OH) to fast-scan cyclic voltammetry (FSCV) for the detection of dopamine (Figure S3).

Figure 1c,d show optical and FESEM images of the apex of a typical DBCNP. In this particular case, the effective radii of the SICM aperture and SECM carbon electrode are less than 50 nm and the overall probe radius is only 100 nm. This provides an important advantage for the topographical and electrochemical imaging of cell surfaces, since the probe can access the cell surface and detect areas of slight roughness without unwanted probe-cell contact.^[20]

Figure 2a,b show typical experimental approach curves (black lines), for the SECM and SICM channels (recorded simultaneously), with insulating and conducting substrates, respectively. Both channels were fit to established theoretical curves for a simple disk geometry or opening^[4,10,28–30] (red lines). This is found to provide a reasonable description of the basic characteristics of the probes, particularly given the idealized (single symmetric channel) of these models compared with the DBCNP geometry, and the fact that the latter will show some non-idealities on the nanoscale. As expected, the ion-current signal decreases for both the insulating and conducting substrates as the distance decreases, thereby highlighting that it can be used for unambiguous distance feedback control.

The SECM approach for the insulating and conducting substrates (Pt interdigitated array electrode (IDA)) showed negative (hindered diffusion) and positive (redox regenera-

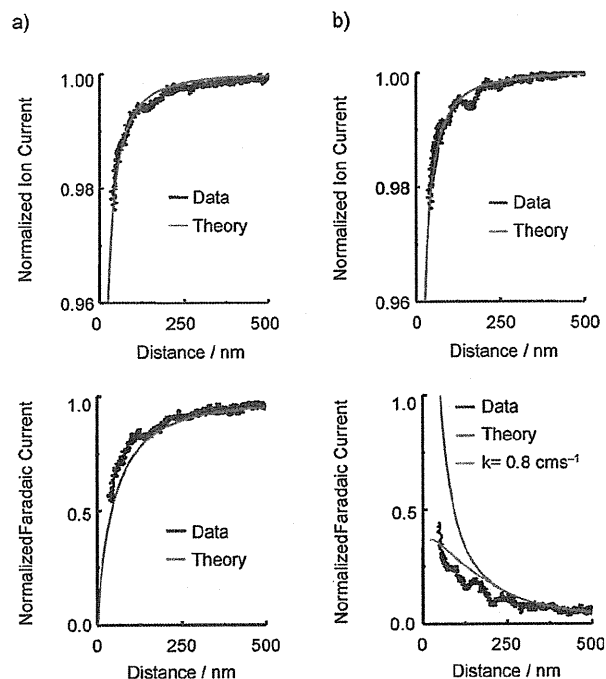


Figure 2. Approach curves of a DBCNP for simultaneous ion current (top) and electrochemical (bottom) measurements on an insulating (a) and conducting (b) substrate in 1.0 mM FcCH_2OH + PBS. The SECM and SICM electrodes were held at 500 and 200 mV versus a reference Ag/AgCl electrode, respectively. The RG value used for the theoretical curves was 1.5.

tion) feedback responses, respectively.^[31] In this case, the electrode radius a was estimated to be 120 nm from the steady-state current in bulk solution and the fact that the negative feedback approach curve fits reasonably well to this value (and RG 1.5 (RG = ratio of the radii of the insulating sheath and the electrode)) indicates that the disks have a good planar geometry, as evident in the FESEM images. Furthermore, it is noteworthy that, by using the ion current feedback distance control, the electrode could approach the substrate as close as 50 nm without making direct contact. While one might expect to see pure positive feedback with an unbiased conducting surface, the experimental data indicate finite regeneration (surface redox) kinetics. Such effects have been seen previously with nanoscale tips at unbiased surfaces^[4,10] and can be attributed to the fact that a small tip-substrate separation results in high mass transfer (D/d ca. 2 cm s^{-1} at the closest separation d , where D is the diffusion coefficient of the redox species). The characteristic heterogeneous rate constant appears to be of the order of $k = 0.80 \text{ cm s}^{-1}$; deviations in the fit between experiment and theory can be attributed to non-ideality in the probe geometry.

Importantly, because the SICM channel provides the tip to surface distance, k is the only adjustable parameter when fitting the data. This highlights a key aspect of the SECM-SICM technique: the unambiguous quantitative determination of surface kinetics (and fluxes) because the distance between the tip and surface is known.

To evaluate the resolution of the DBCNP we recorded topographical and electrochemical images of nanopores (pore radii ca. 100 nm) in polyethylene terephthalate (PET) membranes. In our experiment, both sides of the membrane were filled with phosphate-buffered saline (PBS) containing 1.0 mM FcCH_2OH . The oxidation current of the FcCH_2OH was recorded simultaneously with the topography by using the DBCNP ($a = 28$ nm); the potentials of the SECM carbon and SICM Ag/AgCl electrodes were 500 and 200 mV, respectively, for this and other test substrates. A constant d value of 30 nm was maintained by the SICM feedback. Figure 3a shows simultaneously recorded topographical and electrochemical images of the PET membrane, with the pore shapes and the electrochemical signals corresponding to the pore positions seen clearly. The decrease in the FcCH_2OH oxidation current indicates that the diffusion of the FcCH_2OH was blocked by the pore (decreased SECM channel current), because the probe moves towards the membrane under SICM feedback control as the probe encounters the pore.

To test the DBCNPs further, SECM-SICM was used to image a Pt IDA (Figure 3b). The d value was maintained at 100 nm by the SICM feedback, so that the SECM current clearly reflects the electrochemical activity of the sample. The oxidation current of the FcCH_2OH was recorded simultaneously with the topography by using a DBCNP ($a = 88$ nm). It is clear that the electrochemical signal increases over the Pt

bands (100 nm high in the SICM topography image) because of redox cycling, as for the approach curves in Figure 2c. Importantly, with this design of SECM-SICM probe, the insulation is considerably better (there are no pinholes or recessing of the electrode) and the probe size is smaller than previously reported.^[15]

To demonstrate electrochemical and topographical imaging of neurons using DBCNPs ($a = 240$ nm) we visualized the permeation of FcCH_2OH , a hydrophobic mediator which can cross the cell membrane, simultaneously with the topography of living sensory neurons. Figure 3c shows the SECM-SICM images of sensory neurons in Hank's buffered salt solution (HBSS) containing 0.5 mM FcCH_2OH . The tall cell bodies, exceeding 25 μm in height, and dendritic structures are clearly observed in both the SICM and SECM images, which correlate very well. The SICM images represent the topography, whereas the SECM images measure the flux of FcCH_2OH . When the probe is over the bare petri dish, a current of 23 pA is typically recorded, which is the value expected for hindered diffusion. In contrast, when the probe is over the cells, an enhanced current is observed, which approaches the value of 38 pA when the probe is in bulk solution. This finding indicates that the cellular membrane is permeable to FcCH_2OH and that the permeability can be visualized, largely free from topographical effects, because of the independent distance control from SICM. Furthermore, the electrochemical response shows no deterioration in this biological medium. Thus, the DBCNP can be used for localized electrochemical measurements and simultaneous imaging of the surface topography of complex live biological samples.

To further validate the capabilities of SECM-SICM for imaging the topography of living cells we compared the topography of differentiated PC12 cells by using both a DBCNP and a single SICM nanopipette (Figure 4a,b respectively). The topography of neurons^[7,32] and release of neurotransmitters have been previously investigated by using shear force distance control SECM^[7] and SICM.^[32] However, the resolution of these measurements was not sufficient to probe the dendritic structure of the neuron in any detail. In this present study, the radii of the SICM aperture of the DBCNP and the SICM nanopipette were both 50 nm. The quality of the topographic images were comparable: similar dendritic structures, less than 200 nm diameter, were observed on both images (Figure 4a,b, white arrows).

To enhance the sensitivity of the electrochemical detection by the DBCNPs to enable the release of neurotransmitters to be detected it is important to increase the carbon surface area, but not the SICM barrel aperture for distance feedback control. We thus fabricated cylindrically shaped DBCNPs by depositing additional carbon on the outside of the pipette. The method for depositing carbon on the outer surface of the micropipette tip was as described previously,^[27] such that the steady-state current measured in 1 mM FcCH_2OH and PBS was 1.85 nA. We then measured the release of neurotransmitter from undifferentiated PC12 cells with this type of probe (Figure 5a). The FESEM image was taken at a tilted angle to show the deposited carbon on the outside of the capillary. A key advantage of the DBCNP is

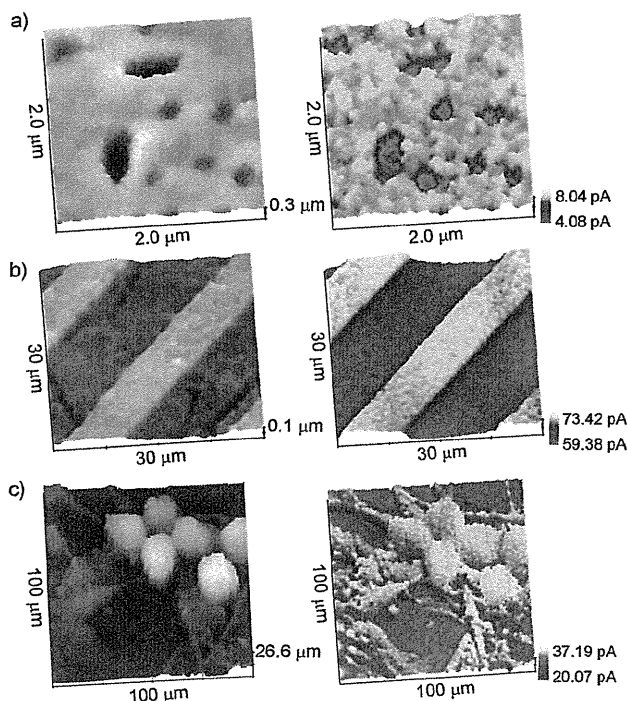


Figure 3. Simultaneous topographical (left) and electrochemical (right) images. a) PET in 1.0 mM FcCH_2OH + PBS. b) Pt interdigitated array in 1.0 mM FcCH_2OH + PBS. c) Living sensory neurons in 0.5 mM FcCH_2OH + HBSS. The SECM and SICM electrodes were held at 500 and 200 mV versus a reference Ag/AgCl electrode, respectively. Electrochemical images were based on an oxidation current of FcCH_2OH .