

電気化学的手法を用いた細胞活性評価

伊野 浩介^{1*}・珠玖 仁¹・末永 智一^{1,2}

はじめに

細胞の活性を評価する事で、さまざまな応用が可能である。たとえば、細胞が分泌するタンパク質の種類や量を測定する事で、有用細胞のスクリーニングが可能である。また、細胞移植に向けた品質管理や細胞評価も可能であり、再生医療において重要な役割を果たす。また、患者から採取した細胞を評価することで、緻密な健康診断が可能となる。この他に、細胞をセンサ素子としたバイオセンサが開発されており、新しい環境モニタリング法が提案されている。学術的な面においては、1細胞解析を行う事でこれまで知られていなかった新しい細胞機能の解析が期待できる。また、高解像度の細胞活性のイメージングを行う事でシグナル伝達に関する新しい知見を得る事ができる。

このような応用のためには、1細胞レベル、1スフェロイド（細胞塊）レベルで検出できるような高感度な測定法が求められる。また、網羅的でハイスループットな測定を実現するためのシステムや装置が重要である。このために、さまざまなシステム・デバイスが開発されている。一般的な細胞活性評価法として、蛍光や吸光分析のような光学的な検出法が用いられている。このような光学的検出法は広く用いられているが、周辺装置も含めた小型化が困難、光を吸収、遮光、放出する物質や材料を使えないと言った問題がある。そこで、従来の蛍光などの光学的システムを用いた評価手法に加えて電気化学的手法を用いた細胞活性評価法が多く開発されている。電気化学センサは安く簡単に作製可能であるにも関わらず小型化が容易である。さらにリアルタイム計測や定量的解析が可能であるという優れた特徴を持っている。また、非侵襲的な測定が可能である。このような優れた特徴から、近年ではウェアラブルセンサや埋め込み型センサへの応用も検討されている。

1細胞解析や個々の細胞や細胞塊を計測するためには、高感度な測定が必要である。また、細胞スクリーニングへの応用のためには、ハイスループットである必要がある。この他に、細胞の局所の反応を解析するためには空間分解能が高い測定法が必要であり、リアルタイムな測定のためには時間分解能が高い必要がある。これら

を満たすため、現在、マイクロ・ナノ技術を用いた電気化学測定システム・デバイスが開発されている。今回は、マイクロ～ナノメートルサイズの微小電極を用いた細胞活性評価に関する測定システムやデバイスについて紹介する。

それぞれの具体的なシステムやデバイスを紹介する前に、電極の大きさがマイクロ～ナノメートルサイズの微小電極の特徴について紹介する。微小電極の優れた特徴の一つとして、細胞の局所的な反応を計測できる事があげられる。一方、局所的な測定が可能であるといった特徴以外にも、微小電極はさまざまな優れた特徴を持っている。たとえば、電極サイズを小さくすると、得られる電流が小さくなるが、電流密度が高くなり、その結果測定感度が良くなる¹⁾。これは電極に垂直方向以外の物質移動の寄与が大きくなるからである。微小電極を用いる利点を以下に簡単にまとめる¹⁾。

- (1) 定常または準定常電流が得られる。
- (2) ノイズである充電電流の寄与が小さく、測定精度が高い。
- (3) 定常の条件下で化学反応速度、電極反応速度が測定可能である。
- (4) 高速な化学反応速度を測定できる。
- (5) 微小電極の組合せで、シグナルを増幅できる。

ここであげた特徴以外にもさまざまな優れた特徴があるが、このような特徴から細胞からの微弱なシグナルを高感度に測定できる。したがって、電気化学的な細胞活性評価のためには、マイクロ・ナノテクノロジーが必要不可欠である。

細胞活性評価に用いる電極にはさまざまな種類がある。たとえば、プローブ型電極やデバイス型電極があり(図1)、それぞれの特徴を生かした測定が行われている²⁾。今回は走査型電気化学顕微鏡(scanning electrochemical microscopy: SECM)とチップ型電極デバイスについて説明し、電気化学的手法を用いた細胞活性評価について紹介する。

走査型電気化学顕微鏡 (SECM)

微小電極をプローブに用いたシステムの一つとして、走査型電気化学顕微鏡(SECM)があげられる。SECM

* 著者紹介 東北大学大学院環境科学研究科環境科学専攻(助教) E-mail: ino.kosuke@bioinfo.che.tohoku.ac.jp

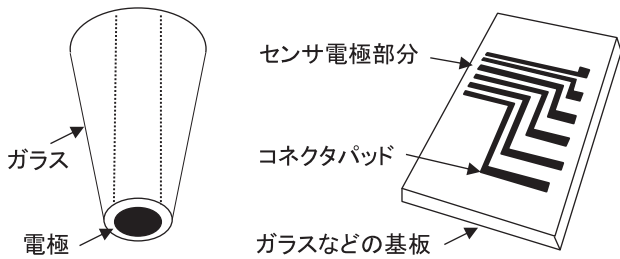


図1. 細胞活性評価に用いられる電極の種類. プローブ型電極 (左) とチップ型電極デバイス (右) のイメージ図.

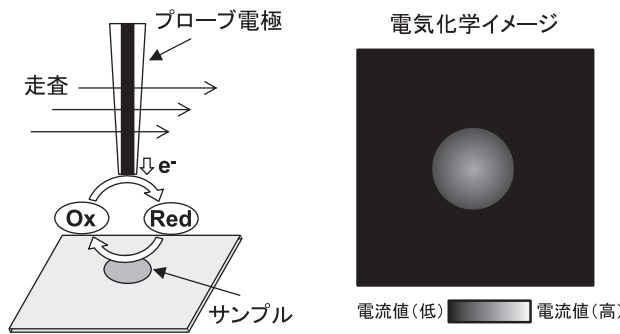


図2. SECMを用いた電気化学イメージングのイメージ図

ではサンプル近傍で微小電極を走査し、その位置情報と得られた電流値から、サンプル近傍の化学反応を2次元イメージとして可視化できる(図2). 空間分解能はプローブ電極のサイズに大きく依存し、高分解能の電気化学イメージングを目指して直径がナノメートルサイズの電極プローブが開発されている³⁾. SECMを用いて半導体の表面分析や腐食研究、液界面間のイオン移動研究、電池評価への応用が行われているが、細胞などのバイオ試料評価にも用いられている。たとえば、SECMを用いてアルカリホスファターゼ (ALP) などの酵素活性を測定する事で、細胞活性評価を行える。この手法では基質として *p*-アミノフェニルホスフェート (PAPP) を用いており、酵素生成物である *p*-アミノフェノール (PAP) を電気化学的に計測している(図3)。この手法を用いる事で、分泌型ALPを用いたレポーター遺伝アッセイ⁴⁾ や胚性幹細胞の分化評価⁵⁾ が可能になっている。

また、細胞近傍の溶存酸素の還元電流値を取得して細胞近傍での溶存酸素の減少量を計算する事で、1細胞や細胞塊の呼吸量を評価する事が可能になっている(図4)^{5,6)}。この手法は受精卵の評価への応用が可能であり、不妊治療において非常に有用な手法であると言える。また、エキソサイトーシスの検出⁷⁾、酸化ストレスも計測可能である⁸⁾。この他にも細胞内部と外部に電極を配置する事で、活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNS)

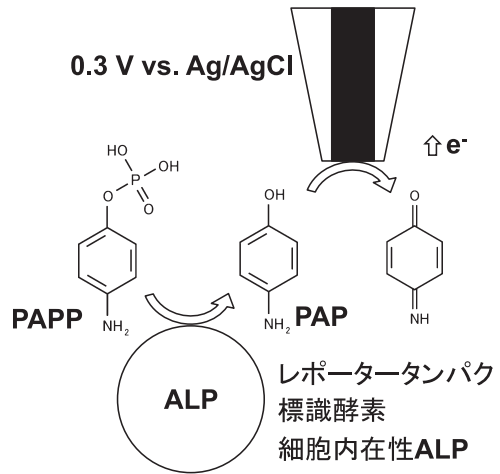


図3. 電気化学的手法を用いたALP活性評価

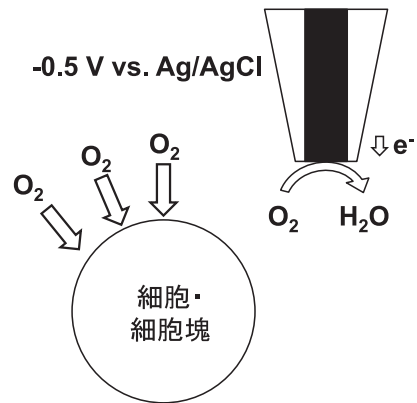


図4. 電気化学的手法を用いた細胞の呼吸活性評価

を測定する事が可能になっている。

この他にもナノメートルサイズのプローブ電極を用いる事で液中での細胞の形状イメージングが1細胞レベルで可能になっており、生きたままで細胞の高解像度のイメージングを可能にしている。

このようにSECMは、細胞の高解像度の電気化学イメージングを可能とし、さまざまな物質を測定する事が可能である。一方で電極プローブを走査するための時間がかかってしまうため、ハイスループットな細胞活性評価やリアルタイムな電気化学イメージング、簡便な細胞アッセイに向かないといった問題があげられる。この問題を解決するため、電極をあらかじめ基板に配置したチップ型の電極デバイスが開発されている。

チップ型電極デバイス

SECMに対し、簡便な細胞アッセイやハイスループットなアッセイを目指して、チップ型電極デバイスが開発

されている。また、プローブを走査する必要がないため、時間分解能が高いリアルタイムな細胞計測やイメージングが可能である。チップ型電極デバイスは、半導体作製技術を用いて作製するため、マイクロからナノメートルサイズの電極が作製可能である。また、微細加工技術を用いる事でチップ上に微小流路、微小ウェルなどのさまざまな構造物を作製する事が可能であり、測定系に応じたさまざまなチップ型電極デバイスが報告されている。

高感度な測定に向けて、チップ型デバイスの電極表面をタンパク質やポリマーで修飾する研究が多く報告されている。たとえば、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) とオスmium (Os) ポリマーで電極表面を修飾することで、高感度な過酸化水素の測定が可能になる(図5)。過酸化水素はシグナル伝達物質などの役割を果たしており、細胞機能の解析において重要であり、たとえば、ホルボールミリステートアセテート (PMA) の刺激により白血球細胞が放出した過酸化水素を電気化学的にリアルタイム計測する事で、シグナル伝達などの解析が期待できる。

チップ型電極デバイスは、先であげたSECMと違いプローブ電極を走査する必要がないため、物質の拡散を阻害しないという利点がある。また、リアルタイムな計測が可能であるため、細胞機能解析への応用が期待されている。特に1細胞解析への応用が行われている⁹⁾。この際、各測定点に細胞捕捉用の微小ウェルを配置する事で、ハイスループットなアッセイが行える(図6)。

神経細胞や心筋細胞の評価のために、多数の電極をアレイ状に配置した多点電極が開発されており、活動電位などの電位計測が行われているが¹⁰⁾、今回は電流計測型

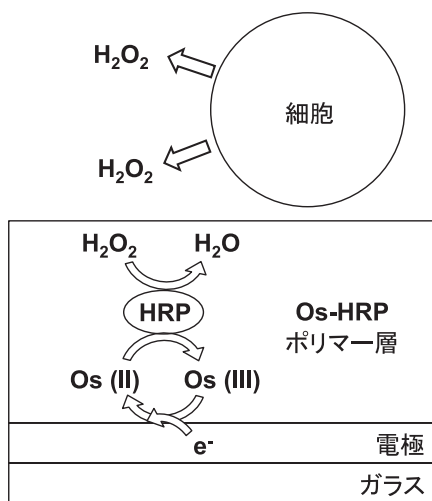


図5. 電気化学的手法を用いた過酸化水素の検出。

デバイスを用いた細胞活性評価を紹介する。多点電極デバイスはハイスループットな細胞活性評価や細胞活性のイメージングに用いられている。一方で単純に電極を配置させた場合では、センサ部分以外にもコネクタ電極やコネクタパッドの面積が膨大になってしまうため、1000点を超えるようなセンサ電極を配置するのは困難な課題である。このような問題点を解決するため、現在さまざまな手法が検討されている。これらの手法については後述する。

先に微小電極の特徴であげたが、微小電極を組み合わせる事で、電気化学シグナルを増幅して通常の電気化学測定より高感度な測定を実現できる。例として、図7で示したような交互くし型電極があげられる¹¹⁾。それぞれのくし型電極に適切な電圧を印可することで、図7に示すレドックスサイクルと呼ばれる現象を誘導できる。レドックスサイクルでは、片方の電極で酸化したレドックス種を、もう一方の電極で還元させる事で、測定対象物を何度も電極上で反応させる事が可能になり、得られる電流値を増大させて高感度な測定を実現できる。電極間の距離をナノメートルオーダーまで近接させたナノ流路電極デバイスを用いる事で、1分子検出も可能であり¹²⁾、1分子の挙動解析への応用が検討されている。このような微小電極を用いた測定には、マイクロ～ナノメートルサイズの電極を作製する事が必要であり、現在、さまざまな電極作製法や電極デザインが報告されている。

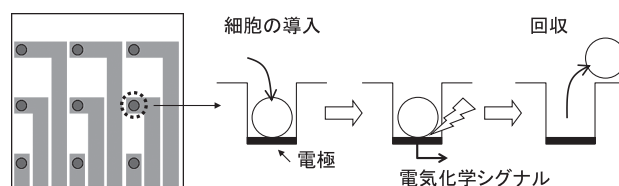


図6. 微小ウェル組み込み型多点電極デバイスを用いた細胞活性評価のイメージ図。

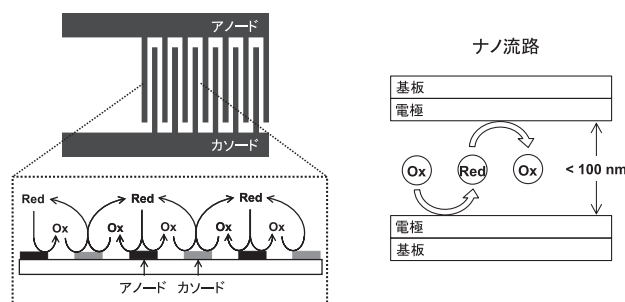


図7. レドックスサイクルによるシグナル増幅。交互くし型電極(左)とナノ流路電極デバイス(右)を用いたレドックスサイクルの誘導。

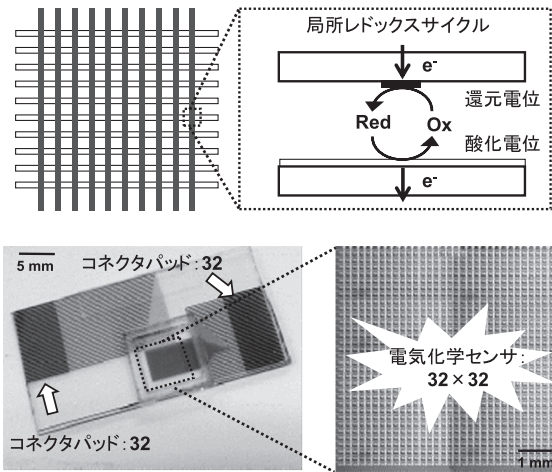


図8. 局所レドックスサイクルによる多点電気化学測定システムの概要 (上) とデバイス (下).

また、レドックスサイクルを巧みに利用することで、多数の電気化学センサを組み込む事ができるシステムが報告されている。この測定システムでは、縦と横の電極が立体的に交差しており、それぞれの電極に適切な電圧を印可する事で各格子点に局所的にレドックスサイクルを誘導できる(図8)。このレドックスサイクルによる電気化学シグナルの取得、印可する電圧制御によるレドックスサイクルを誘導する場所の変更を繰り返す事で、各格子点を独立した電気化学センサとして用いる事が可能である。したがって、 $2n$ 本のコネクタパッドで n^2 個の電気化学センサを組み込む事が可能であり(図8)、前述した多点電気化学測定の問題点を見事に解決している。これまでに、各格子点にくし型電極を配置したチップ型デバイスが開発されており、1024個の電気化学センサが組み込まれたチップデバイスが報告されている¹³⁾。これにより、酵素の活性評価¹³⁾やDNAアレイの検出¹⁴⁾、1細胞解析¹⁵⁾、胚性幹細胞の分化評価¹⁶⁻¹⁸⁾が報告されている。

また、LSIの製造技術を用いる事で、高感度な電気化学センサを集積化したチップ型のデバイスが開発されている¹⁹⁾。このようなLSI型電気化学デバイスには多数の電気化学センサが搭載されており、バイオ分子の高感度2次元マッピングが可能になっている。各測定点にシグ

ナル増幅器を配置する事で、ノイズが載る前にシグナルを増幅する事も可能であり、高感度な計測が期待できる。このようなチップ型電極デバイスを用いる事でドーパミンなどの神経伝達物質のリアルタイムな計測が二次元的に可能であり、神経細胞のシグナル伝達物質の解析や有用細胞のスクリーニングなどへの応用が行われている²⁰⁾。

終わりに

電気化学的手法には今回紹介したようなアンペロメトリックな計測(電流検出型の測定)以外にもインピーダンス計測などのさまざまな手法があり、それぞれの特徴を生かして細胞活性評価が行われており、今後の細胞活性評価法のさらなる発展が期待されている。

このようにマイクロ・ナノテクノロジーと電気化学的測定を組み合わせる事で、さまざまな細胞活性評価が可能になっている。今後は、ナノメートルサイズの電極や緻密に設計されたデバイス構造により、さらに高感度な細胞活性評価や高解像度の細胞イメージングが可能になると思われる。

文 献

- 1) 青木ら, 微小電極を用いる電気化学測定法, 電子情報通信学会.
- 2) Matsue, T.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **85**, 545 (2012).
- 3) Takahashi, Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 11540 (2012).
- 4) Murata, T. *et al.*: *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 913 (2009).
- 5) Obregon, R. *et al.*: *Talanta*, **94**, 30 (2012).
- 6) Nebel, M. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 6335 (2013).
- 7) Watson, D. J. *et al.*: *Electroanal.*, **23**, 2757 (2011).
- 8) Wang, Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 11534 (2012).
- 9) Liu, X. *et al.*: *Anal. Chem.*, **83**, 2445 (2011).
- 10) Stett, A. *et al.*: *Anal. Bioanal. Chem.*, 377, 486 (2003).
- 11) Niwa, O. *et al.*: *Anal. Chem.*, **65**, 1559 (1993).
- 12) Zevenbergen, M. A. *et al.*: *Nano Lett.*, **11**, 2881 (2011).
- 13) Ino, K. *et al.*: *Lab Chip*, **11**, 385 (2011).
- 14) Zhu, X. *et al.*: *Sens. Actuator B-Chem.*, **160**, 923 (2011).
- 15) Şen, M. *et al.*: *Lab Chip*, **12**, 4328 (2012).
- 16) Ino, K. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 6648 (2012).
- 17) Ino, K. *et al.*: *Chem. Commun.*, **48**, 8505 (2012).
- 18) Ino, K. *et al.*: *Electrochemistry*, **81**, 682 (2013).
- 19) Inoue, K. *et al.*: *Lab Chip*, **12**, 3481 (2012).
- 20) Kim, B. N. *et al.*: *Biosens. Bioelectron.*, **41**, 736 (2013).