

補助事業番号 2023M-376

補助事業名 2023年度 単一細胞の網羅的な電気特性評価装置の社会実装に向けた
研究開発 補助事業

補助事業者名 兵庫県立大学大学院理学研究科 准教授 鈴木雅登

1 研究の概要

本事業は、細胞の膜容量の変化を電気回転速度の増減として迅速・簡便に検出する電極デバイスとイメージセンサを融合させ、細胞の応答の検出を介して低分子化合物を簡便に検出するポータブル型のケミカルセンサを構築する。

2 研究の目的と背景

低分子(分子量500程度)化合物は化学的な特徴が小さいため、その低分子と選択的に結合するセンサ材料の合理的な設計は難しい。そのため、低分子化合物と選択的に結合するセンサ材料の種類が少なく低分子を選択的に検出するケミカルセンサの種類は限定的である。一方、細胞は嗅覚細胞や味覚細胞に代表されるように様々な細胞膜受容体を介して低分子を認識する。特に嗅覚受容体はヒトでは約400種類、マウスでは約1,000種類あり、認識できる芳香性の低分子化合物は10万種類以上あると考えられている。そのため嗅覚受容体を用いた低分子センサの研究開発が進んでいる。しかし嗅覚受容体は細胞膜に存在する膜タンパク質のため、細胞膜からの精製に手間と時間を要しセンサ材料としての利用は難しい。そこで、目的の低分子を認識する嗅覚受容体を発現させた細胞(センサ細胞)をセンサ素子として利用することで、選択的な低分子センサの構築が期待できる。しかし嗅覚受容体への標的分子の結合は細胞内でcAMP濃度の増加を経由してCa²⁺チャネルを開口させ細胞内Ca²⁺濃度を増加させる。そのため低分子と嗅覚受容体の結合の検出にはセンサ細胞を予め蛍光プローブでの染色や微小な電極の細胞への接触が必要で迅速性や簡便性に課題がある。

そこで本研究の目的はセンサ細胞への低分子の結合を電気回転速度の変化として検出する原理を確立し、小型な電気回転計測装置のプロトタイプの実現にある。電気回転は回転電場に曝された細胞が分極しその場で回転する現象で、回転速度は細胞の電気特性(細胞膜容量、細胞質導電率)に依存する。嗅覚受容体への低分子の結合に伴う細胞内Ca²⁺をきっかけに細胞膜容量を増加させ、その増加を回転速度の増加として検出する。電気回転計測は蛍光顕微鏡や特別な計測装置が不要で、光学顕微鏡による細胞の観察だけで実施できる。本細胞センサの社会実装には、空港検疫、診療所、環境分析現場など可搬性が必要とされる。そこで本事業では、対物レンズ不要なイメージセンサをベースとした顕微鏡観察システムと本電極デバイスを融合させて、片手サイズの小型な電気回転計測装置のプロトタイプを実現する。

3 研究内容

センサ細胞の電気回転による検出原理の確立と小型電気回転計測装置の開発

(https://www.sci.u-hyogo.ac.jp/material/analytical_chem/electrorotation.html)

細胞膜容量の増加を電気回転速度の増加として検出できることを実証した。細胞には電気回転計測の実績があるK562細胞(ヒト慢性骨髄性白血病)を用いた。細胞膜容量の増加はCa²⁺イオノフォアであるイオノマイシンを用いた。細胞内Ca²⁺の増加はスクランブラーゼ活性を持つカルシウムチャネルであるTMEM16Fの活性化を誘導する。その結果、細胞膜の一部を結束するダイナミンタンパク質が弛緩し細胞外液と接触する細胞膜の面積が増加し細胞膜容量が増加することがパッチクランプ法によって明らかにされている。そこで、イオノマイシン添加に伴う電気回転速度の経時変化を計測した。

電気回転計測は前回の事業で実現したウエル型電気回転デバイスを用いた。1細胞を捕捉するマイクロウエルの上下面にそれぞれ2電極ずつ配線されており、個々のウエルへ回転電場を形成できる。細胞をマイクロウエルに捕捉した状態で回転速度の経時計測が可能である。ここで重要な点は電気回転させる周波数である。下式に電気回転速度の理論式を示した。回転速度 Ω は細胞の分極度を示す定数であるClausius-Mossotti因子の虚部(Im[CM])に依存する。

$$\Omega = -\frac{\epsilon_s \epsilon_0}{2\eta} \text{Im}[CM] E^2$$

$$CM = -\frac{\omega^2(\tau_s \tau_m - \tau_c \tau'_m) + j\omega(\tau'_m - \tau_s - \tau_m) - 1}{\omega^2(\tau_c \tau'_m + 2\tau_s \tau_m) - j\omega(\tau'_m + 2\tau_s + \tau_m) - 2}$$

$$\tau_m = \frac{C_m R}{\sigma_c}, \tau_c = \frac{\epsilon_c}{\sigma_c}, \tau'_m = \frac{C_m R}{\sigma_s}, \tau_s = \frac{\epsilon_s}{\sigma_s}$$

ϵ_s : 溶液の誘電率 [F m⁻¹], ϵ_0 : 真空の誘電率 8.85·10⁻¹² [F m⁻¹], ϵ_c : 細胞質の誘電率 [F m⁻¹], η : 水の粘度 [kg m⁻¹ s⁻¹], ω : 角周波数 (= 2 πf , f : 印加周波数 [Hz]), σ_c : 溶液の導電率 [S m⁻¹], σ_s : 細胞質の誘電率 [S m⁻¹], R : 細胞の半径, C_m : 細胞膜の電気容量[F m⁻²].

図1にK562細胞の-Im[CM]を示した。周波数の増加に伴いIm[Cm]は大きくなり200 kHz付近で最大を示した。さらに大きな周波数を印加するとIm[CM]は減少する。また細胞膜容量を増減させた際のIm[CM]を示した。細胞膜容量の増加はピーク周波数の低周波数側へのシフトをもたらす。そのため計測周波数をピーク周波数付近にすると細胞膜容量の増減に関わらず回転速度の減少が想定される。一方、低周波数側での電気回転速度の計測は、細胞膜容量の増減に従い回転速度が増減する。

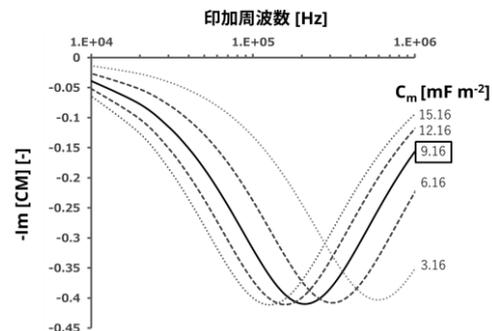


図1. 細胞膜容量を変更した場合の K562 細胞の理論電気回転スペクトル。

図2Aに周波数50 kHzで電気回転させたK562細胞の回転速度の経時測定の結果を示した。交流電圧の印加と同時にすべてのウェルで細胞は回転電場と逆方向に回転を始めた。回転開始10秒後にイオノマイシンを添加した。回転速度は徐々に増加し添加150秒後には初期回転速度の1.15倍に達した。計測周波数をピーク周波数近傍である300 kHzにすると、イオノマイシンを添加すると回転速度は徐々に減少した。一方、いずれの周波数においてもイオノマイシンを含まない溶液を添加しても回転速度はほぼ一定であった。以上より、イオノマイシン添加に伴う膜容量の増加を回転速度の変化として検出できることが明らかになった。特に計測周波数の50 kHzへの設定は膜容量の増加を回転速度の増加として検出でき膜容量の増減を回転速度の増減として検出できる。

次に電気回転計測装置の小型化に取り組んだ。独自のイメージセンサ技術に基づく小型な顕微鏡装置の開発・製造・販売しているスタートアップ企業と共同研究を実施した。同社が有するイメージセンサデバイス上に対物レンズを配置し、照明と光学系を最適化した後に電気回転チップを配置させたプロトタイプを開発した(図3)。個々のマイクロウェルの形状を十分に観察でき電気回転計測に十分な画像の解像度であった。プロトタイプ大きさは W100 × D100 × H60 mmでA5サイズ大きさである。このプロトタイプはイノベーションジャパン2023にも出展し、小型な細胞検査装置として訴

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

社会実装の姿は前回の事業と変わらない。現場で迅速・簡便に低分子化合物を検出するケミカルセンサである。このケミカルセンサは、空間中に含まれる微量な爆発物や危険物の早期検出、呼気や飛沫に含まれるバイオマーカーを検出できる。テロや病気のリスクを恐れずに多様なヒトとモノが自在に行き来できる

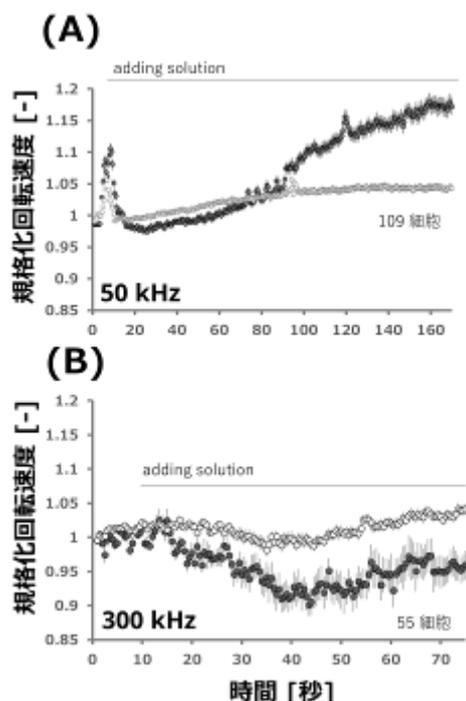


図 2. K562 細胞の電気回転速度の経時変化. 計測条件 (A) 印加周波数 50 kHz, 印加電圧 2.0 Vp (上部電極), 1.4 Vp (下部電極) (B) 印加周波数 300 kHz, 印加電圧 2.0 Vp. .

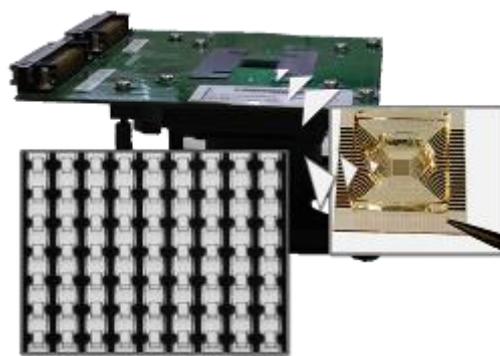


図 3. 小型電気回転計測装置のプロトタイプ



置として訴

図 4. イノベーションジャパン2023での出展の様子

社会の実現に貢献する。さらに、電気回転計測に基づく細胞計測装置は創薬や細胞培養プロセス管理へも応用できる。先端創薬では細胞が分泌する抗体や細胞自体が医薬品として利用される。本技術の成熟によって細胞群から目的の活性や機能を持つ細胞の非破壊・非標識な識別と回収が達成できる。抗体の分泌活性の高い細胞や治療効果の高い細胞の迅速で簡便な取得につながり、創薬コストや開発期間の飛躍的な低下に貢献できる。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

電気回転は、細胞に対して染色や破碎などの前処理が不要で回転速度の計測だけで細胞の種類や状態を推定できる優れた方法である。しかし従来の電気回転計測には平面上に配線された4電極が必要で、1回の計測で数細胞しか評価できず、溶液の流れによって細胞が容易に散逸し経時計測ができずほとんど利用されてこなかった(図5左)。本事業者はマイクロウエルを介した電極の立体的な配線に着想し、一度に1,000細胞以上の細胞の電気回転

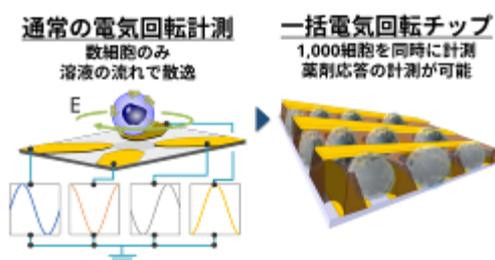


図5.従来の電気回転デバイスと事業者が開発した網羅的一括電気回転チップ

の経時計測ができるマイクロ電極構造を考案し特許出願した(図5右, 特願2020-093819)。そして、電気回転計測による細胞種や分化状態の識別、薬剤への応答の検出を明らかにしてきた。

一方で個々の細胞回転運動の観察には実験室で利用される大型で高価な光学顕微鏡が必要で、装置の大型化や高コスト化が懸念され実用化の課題であった。そのような流れの中で、本事業では顕微観察可能なイメージセンサとの融合によって電気回転計測の持ち運び可能なサイズまで小型化に成功した。小型化により研究所以外でも環境現場、ベッドサイド、培養槽など様々な場所で細胞の電気回転データの収集が加速できる。今後、種類や状態の異なる様々な細胞の電気回転データの蓄積が進み、細胞分析のスタンダードへと昇華できるように研究開発を進める。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

M Suzuki, S. Kawai, C. Fei Shee, R. Yamada, S. Uchida, T. Yasukawa. "Development of a simultaneous electrorotation device with microwells for monitoring the rotation rates of multiple single cells upon chemical stimulation" Lab Chip, 23, 692 (2023).

鈴木雅登, 河合志希保, 安川智之「電気回転デバイス及びこれを備えた細胞評価システム」特許第7486162号。

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

https://www.sci.u-hyogo.ac.jp/material/analytical_chem/electrorotation.html

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

特になし。

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名： 兵庫県立大学 大学院理学研究科

(ヒョウゴケンリツダイガク ダイガクインリガクケンキュウカ)

住 所： 〒678-1297

兵庫県赤穂郡上郡町光都3丁目2-1

担 当 者： 准教授 鈴木 雅登 (スズキ マサト)

担 当 部 署： 化学分析学講座 (カガクブンセキガクコウザ)

E - m a i l: suzuki@sci.u-hyogo.ac.jp

U R L: https://www.sci.u-hyogo.ac.jp/material/analytical_chem/index-j.html