

細胞を傷つけずに培養細胞の酸素代謝を計測できる 柔らかいシート型センサを開発

1. 発表者:

- 一木隆範（東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻／総合研究機構 准教授）
小島麻里（東京大学大学院工学系研究科大学院生(研究当時)、現：株式会社ニコン）
竹原宏明（東京大学大学院工学系研究科大学院生(研究当時)、現：奈良先端科学技術大学院大学
特任助教、）
赤木貴則（東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 特任講師）
塩野博文（株式会社ニコン）

2. 発表のポイント

- ◆ 培養された細胞に載せるだけで、細胞のわずかな酸素代謝を高感度に計測できるやわらかい光学式センサシートを開発。
- ◆ がん由来の培養細胞や脳組織切片に対して、1 分間に 100 箇所の高い効率で、酸素代謝量を自動計測。
- ◆ 再生医療用に培養される細胞の品質評価や、細胞を用いる新薬の機能評価・毒性スクリーニングへの応用に期待。

3. 発表概要:

東京大学大学院工学系研究科の一木隆範准教授らと株式会社ニコンの共同研究グループは、細胞の酸素代謝を、細胞を傷つけずに計測できる、柔らかい光学式シート型センサを世界で初めて開発しました。培養細胞や 3 次元組織切片に被せるだけで、細胞を傷つけずに、代謝活動によるわずかな酸素消費量を高感度に測定するのに成功しました。

医薬品や再生医療の研究では、使用する細胞の品質を評価する必要がありますが、従来の計測法では、細胞自体を傷つけてしまっていました。本研究グループは、培養シャーレ中で、細胞の代謝活性を細胞を傷つけずに計測でき、終了後には簡単に取り除ける、柔らかいシート型センサを開発しました。

本センサは、柔らかな透明ポリマーシートの表面に、マイクロチャンバーと呼ばれる髪の毛の太さほどの小さなへこみがたくさん形成されており、その中に酸素濃度によって発光応答が変わるリン光発光性金属錯体(さくたい)(注 1)のセンサを備えています(図 1)。このシートを培養細胞や生体組織に載せ、自動光学計測システムと組み合わせて使うことにより、1 分間に 100 箇所の自動計測が行え、がん細胞や脳組織中の神経細胞の酸素代謝を計測することに成功しました。

このセンサシートは、大量生産が可能で、医薬品開発や再生医療用に使う細胞の品質管理技術への応用が期待されます。

4. 発表内容:

【研究の背景】

近年、iPS細胞などの細胞技術の発達により、医薬品開発から再生医療研究まで、培養細胞の使用範囲が大きく拡大しています。細胞技術を産業化するには、研究に使う細胞を同じ品質で供給する方法や、細胞の状態を傷つけない「非侵襲(ひしんしゅう)・非破壊」で評価する技術が必要となります。

細胞の品質を評価する指標の一つとして、細胞の呼吸による酸素消費量があります。細胞の代謝活動では必ず酸素を消費するため、細胞の酸素消費量を簡便に評価する手法を確立することにより、細胞の品質管理をすることができます。しかし、現在市販されている酸素センサでは、培養液中の酸素濃度を計ることはできますが、個々の細胞の酸素消費量を計測することはできません。従来の方法では、細胞1つあたりの代謝活性を測定するには、細胞を培養シャーレから剥がして専用の装置の中に細胞を移す必要があり、細胞を傷つけてしまうため、培養状態で代謝を計測できるような簡便な手法の開発が求められていました。

【具体的な研究内容・成果】

本研究グループは、培養した細胞や組織に貼ってはがせる柔らかいシート型センサを開発し、簡便に細胞の代謝活性を評価する手法を確立しました。本技術のポイントとして、下記の点が挙げられます。

1. 標準的な細胞培養環境での使用が可能:細胞培養シャーレ内で使用でき、汎用性が高い。
2. 柔らかいポリマー製:細胞に与える物理的なダメージを抑えられる。
3. 細かいマイクロチャンバー(ミクロのくぼみ)構造:シート表面に細かい断面が筒状(ウェル構造)の小さなくぼみ(マイクロチャンバー)を形成。細胞の上に被せることで、一時的に細胞周囲に小さな閉鎖空間を形成し、細胞によるわずかな酸素消費を高感度に測定できる。

1分間あたりに細胞が消費する酸素量は、フェムトモル(注2)オーダーとごくわずかで、培養液全体の酸素濃度はあまり変化しません。本センサでは、細胞の上に小さな閉鎖空間を一時的に形成し、細胞の酸素消費量を高感度に計測できるようにしました。開発したシート型センサの厚みは髪の毛2本分程度(200マイクロメートル)です。シート表面には、微細加工技術(注3)を駆使し、髪の毛の太さ程度(直径90マイクロメートル)の小さなくぼみ(マイクロチャンバー、図1)が無数に形作られ、その内部に、強い光が当たるとりん光を発する酸素センサ(注4)が組み込まれています。マイクロチャンバー構造を利用して、細胞の上におよそ1マイクロリットル(注5)の小さな閉鎖空間を作り、細胞が閉鎖空間内の酸素を呼吸で消費して濃度が変化するのを酸素センサで計り、細胞の酸素消費量を算出します。

シート型センサの構造を作製するには、薄いポリマーシートに小さなくぼみ形状を加工する技術と、その底面に、センサ層を搭載する技術が求められ、従来の技術でこの構造を作ろうとすると、複数の高価な製造装置が必要になり、時間と費用がかかります。そこで、本研究では低コスト、短時間で簡便にデバイスを作製する技術として、「自己整合型ホットエンボス法(注6)」を開発し、シート型センサを一括加工できるようにしました。この方法を使うと、シート上にたくさんの小さなセンサを埋め込むことができ、本研究では1平方センチメートルの中に、2500個のセンサが並んだ構造を作りました。

開発したシート型センサと自動計測装置を組み合わせると、1分間に100箇所自動計測を実現し、培養した乳がん細胞1個あたりの酸素代謝量の計測に成功しました(図2)。同時に、透明なシート型センサを通して光学顕微鏡でも観察できます。柔らかいセンサを細胞に押し付けても、細胞がすぐに傷つくことはありません。さらに、3次元生体組織(ラット脳切片)の局所的な酸素消費量の計測にも成功しました。より生体に近い環境である3次元生体組織中で、細胞の代謝を測定できたので、脳や肝臓、膵臓といった複雑な臓器の機能評価と関連する疾患の治療薬開発に大きく貢献することが期待されます。

【研究成果の重要性】

標準的な細胞培養環境で使用できる、細胞を傷つけない柔らかいシート型センサを開発し、培養細胞と生体組織切片の酸素代謝を計測できるようにしました。個々の細胞や細胞コロニー単位で代謝活性を計れるため、薬効の評価や治療に使用する細胞の品質管理に役立つと考えられます。また、これまで不可能であった、生体組織の細かい部位ごとに挙動の変化を調べられるので、医薬品の開発における新しいスクリーニング(注 7)に道を拓く可能性があります。本研究グループが開発した、貼ってはがせる柔らかいシート型センサは、セルエンジニアリング分野の産業化の基盤となる、細胞の品質管理技術の開発に大きく貢献すると期待されます。

なお本研究は、東京大学と株式会社ニコンの社会連携講座の成果です。

なお、本成果は米国のオンライン科学誌「PLOS ONE」(米国東部時間:2015年12月1日午後2時)に掲載されます。

5. 発表雑誌:

雑誌名:PLOS ONE(2015年12月1日オンライン)

論文タイトル:Flexible sheet-type sensor for noninvasive measurement of cellular oxygen metabolism on a culture dish

著者:Mari Kojima, Hiroaki Takehara, Takanori Akagi, Hirofumi Shiono, and Takanori Ichiki

DOI 番号:DOI: 10.1371/journal.pone.0143774

6. 注意事項:

日本時間12月2日(水)午前4時(米国東部時間:1日(火)午後2時)以前の公表は禁じられています。

7. 問い合わせ先:

一木 隆範

東京大学 大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 准教授

8. 用語解説:

(注1) リン光発光性金属錯体(さくたい)

酸素により消光する性質があり、光学式の酸素センサ用の材料として用いられます。この物質のリン光寿命もしくはリン光強度を測定することで、溶液中に残っている酸素量を計測することができます。今回はプラチナオクタエチルポルフィリンを用いています。

(注2) 1 フェムトモル= 1×10^{-15} モル。1 モルは $6. \times 10^{23}$ 個の原子・分子。

(注3) 微細加工技術

目に見えない非常に微細なパターンや構造を形成するための加工技術。電子回路を集積化した半導体チップの製造技術として発展してきました。

(注4) 光学式酸素センサ

電気化学式の酸素センサと比較して、光による計測は時間的な分解能や空間的な自由度が高く、非接触・非侵襲的であることから細胞の状態を変えずに測定が可能であるという特徴があります。

(注5) 1 マイクロリットル=100 万分の1リットル。

(注6) 自己整合型ホットエンボス法

鋳型をポリマー樹脂製シートの表面に押しつけるだけで、3次元の凹パターンをシート表面に転写し、同時に、その底部にセンサ層を形成する技術。

(注7) スクリーニング

創薬におけるスクリーニングは、多数の候補化合物・分子の中から、薬効や活性、性質の改善を示す物質を探し出すこと。

9. 添付資料:

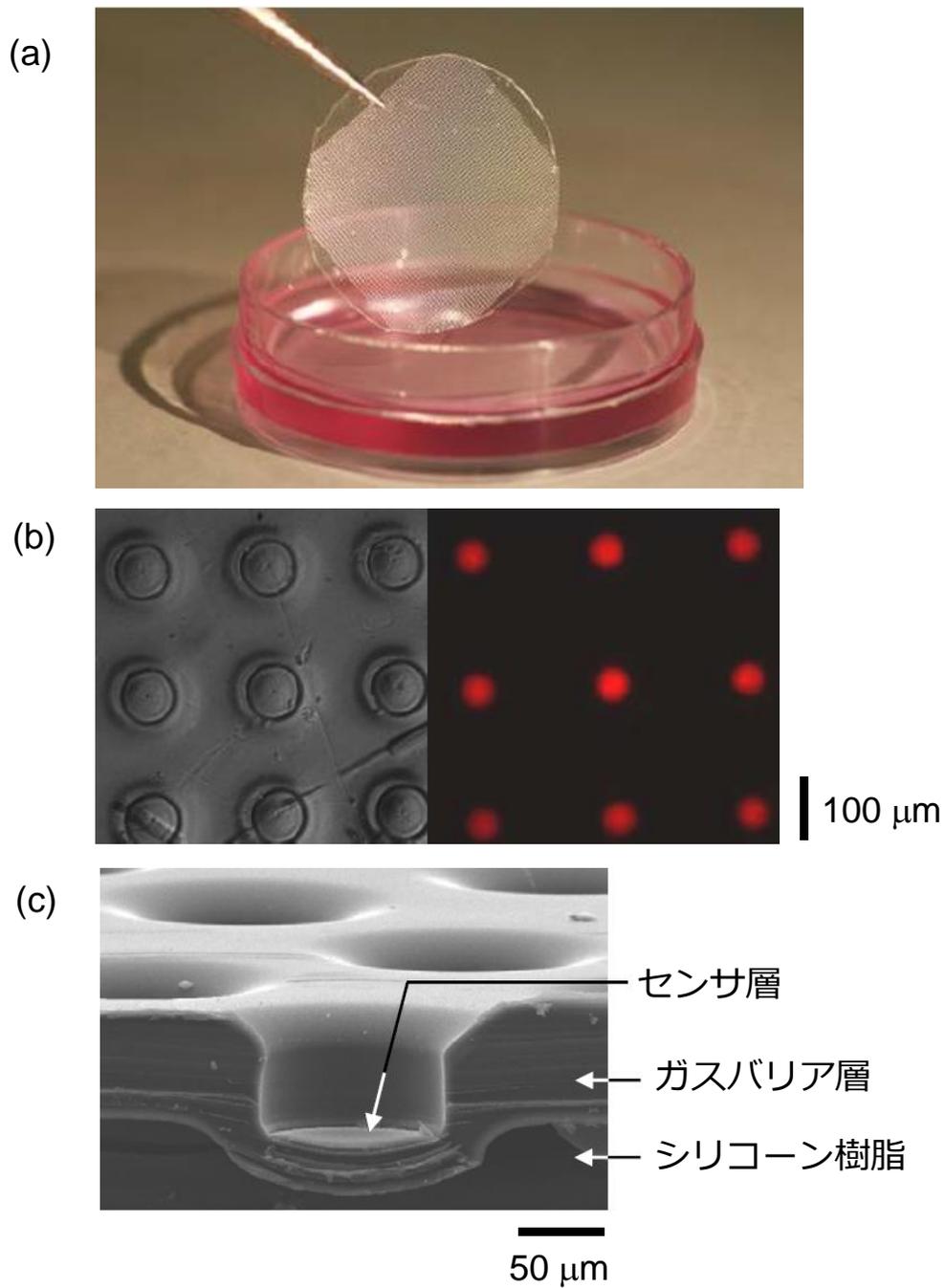


図1 本研究で開発した、細胞や組織切片に貼ってはがせる柔らかいシート型センサ

(a) センサシート表面には無数のマイクロチャンバーが形成してあります。(b) 作製されたシート型センサの顕微鏡写真から、赤く光るリン光発光性金属錯体(さくたい)(注1)を含むセンサ層が、マイクロチャンバーの底面のみに形成されていることが確認できます。(c) シート型センサの断面写真です。きれいなマイクロチャンバー形状が形成されています。底面にはセンサ層があり、その周囲はガスバリア層で覆われています。

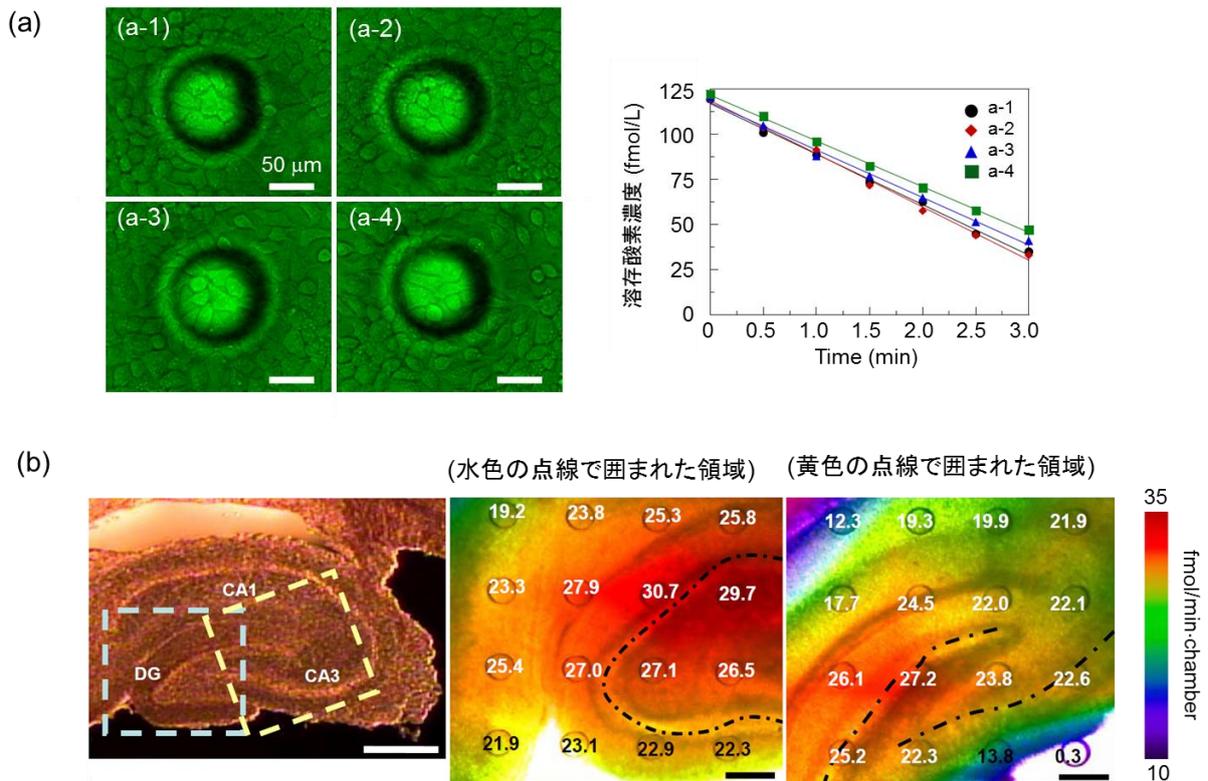


図2 開発したシート型センサを用いた培養細胞と3次元生体組織の酸素代謝の計測

(a) 開発したシート型センサを用いて、培養シャーレ中で細胞の酸素代謝を計測しました。左は、シート型センサを被せた細胞の顕微鏡写真です。マイクロチャンバー内の細胞の数を数えられます。右は、マイクロチャンバー中の酸素濃度の時間変化を数値で示したグラフです。マイクロチャンバー内の酸素が細胞の呼吸で消費され、時間とともに溶存酸素濃度が低下しています。グラフの傾きとマイクロチャンバー内の細胞数から、細胞1個あたりの酸素消費量を算出することができます。(b) 3次元生体組織(ラット脳切片)の酸素代謝を計測しました。左は脳切片の顕微鏡写真です。DGとCAはそれぞれ、歯状回(Dentate Gyrus: DG)とアンモン角(Cornu Ammonis: CA)と呼ばれる領域で、海馬の一部を表しています。中央は、DGが含まれる部位の酸素消費量分布を疑似カラーでマッピングしてあります。細胞体の多い点線部分の酸素消費量が多い結果となっています。右は、CAを含む部位の酸素消費量分布です。こちらと同様の傾向が見られます。

本リリースは、以下のURLにてご覧いただけます。

<http://bionano.t.u-tokyo.ac.jp/limited/20141022scirep.pdf>

ユーザ名: nanobio

パスワード: device