

マイクロ流体回路を用いたエレクトロポレーション過程の観察

機械工学専攻 修士 2 年生 嵐 琢紀

1. 背景

1.1 エレクトロポレーションの原理と課題

エレクトロポレーションとは、細胞に電圧を印加して細胞膜を穿孔し、細胞外にある DNA 等の物質をこの孔を通した拡散により細胞内に導入する手法である。細胞に外部電場 E をかけると、細胞膜の膜電位 $V_m(\theta)$ は

$$V_m(\theta) = 1.5E \cos \theta$$

となる (Fig.1) [1]。膜電圧 $V_m(\theta)$ が適度 (約 1 V) である場合は、膜穿孔は数分で自復することが知られている。

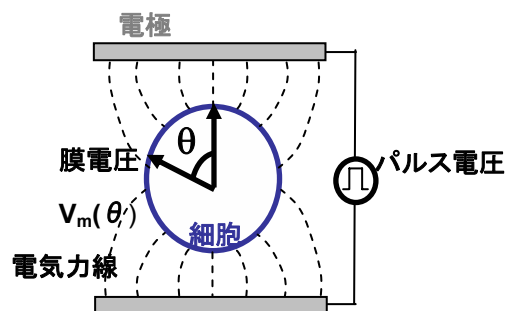


Fig.1 エレクトロポレーションにおける膜電圧

しかしながら、エレクトロポレーションにおいて膜電圧 V_m の制御が困難であるため、いかなる条件で膜穿孔はどの程度の時間持続するのか、あるいは、いかなる条件でどの程度の量の物質 (特に DNA 等の高分子量) が導入されるかといった点に関して有効な評価方法が存在しないのが現状である。

1.2 電界集中を用いた単一細胞へのエレクトロポレーション

当研究室では、電界集中効果により膜電圧 V_m を制御可能なオンチップエレクトロポレーションに関する研究を行ってきた (Fig.2). この手法は、細胞を絶縁膜に開けたオリフィスに吸引固定した状態、あるいは、オリフィス上に培養した状態でパルス電圧を印加するもので、オリフィス部に電界集中が生じるため、オリフィス上の細胞膜に電極電圧にほぼ等しい膜電圧を印加することが可能となる。そのため、極めて低い電圧 (0.5–3.0V) で、高効率 (吸引固定された細胞の 90% 以上) のエレクトロポレーションを実現できる。

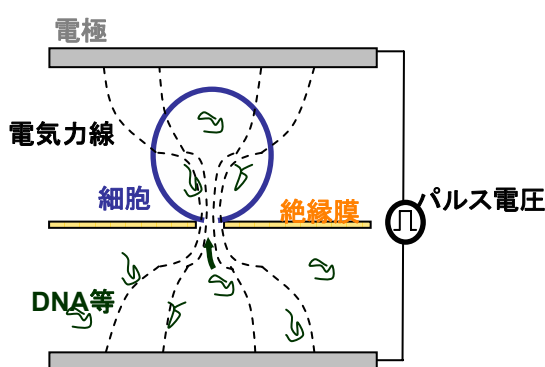


Fig.2 電界集中を利用したオンチップエレクトロポレーション

2. 目的

本研究では、このオンチップエレクトロポレーションの手法を用いて、エレクトロポレーション過程における以下の測定 / 評価を達成するための実験系の構築を目的とする。

- 細胞膜穿孔の持続時間を測定するための実験系の構築(3 章)
- DNA 等の高分子量の物質の導入効率を評価するための実験系の構築(4 章)

3. 流体回路付エレクトロポレーションチップを用いた細胞膜穿孔持続時間の測定

3.1 実験方法

本実験では、Y字型のマイクロ流体回路を利用して、PI (Ex 535 nm, Em 617 nm, invitrogen 製) と YO-PRO 1 (Ex 491 nm, Em 509 nm, invitrogen 製) という 2 種類の蛍光色素を、時間差をおいて細胞に接触させ、その取り込みを観察することにより膜穿孔の修復時間を測定した (Fig.3).

- ① マイクロ流体回路に 1 種類目の蛍光色素 PI を流入させた
- ② 絶縁膜上の微細オリフィスに U937 ヒト単球様細胞を吸引固定した
- ③ パルス電圧を印加し、PI の取り込みを示す蛍光により膜穿孔が生じたことを確認した
- ④ ある時間をおいて、電圧を印加せずに 2 種類目の蛍光色素 YO-PRO 1 を流入させ、これが細胞内に取り込まれ蛍光を発するか否かにより、膜修復時間の測定を行った。

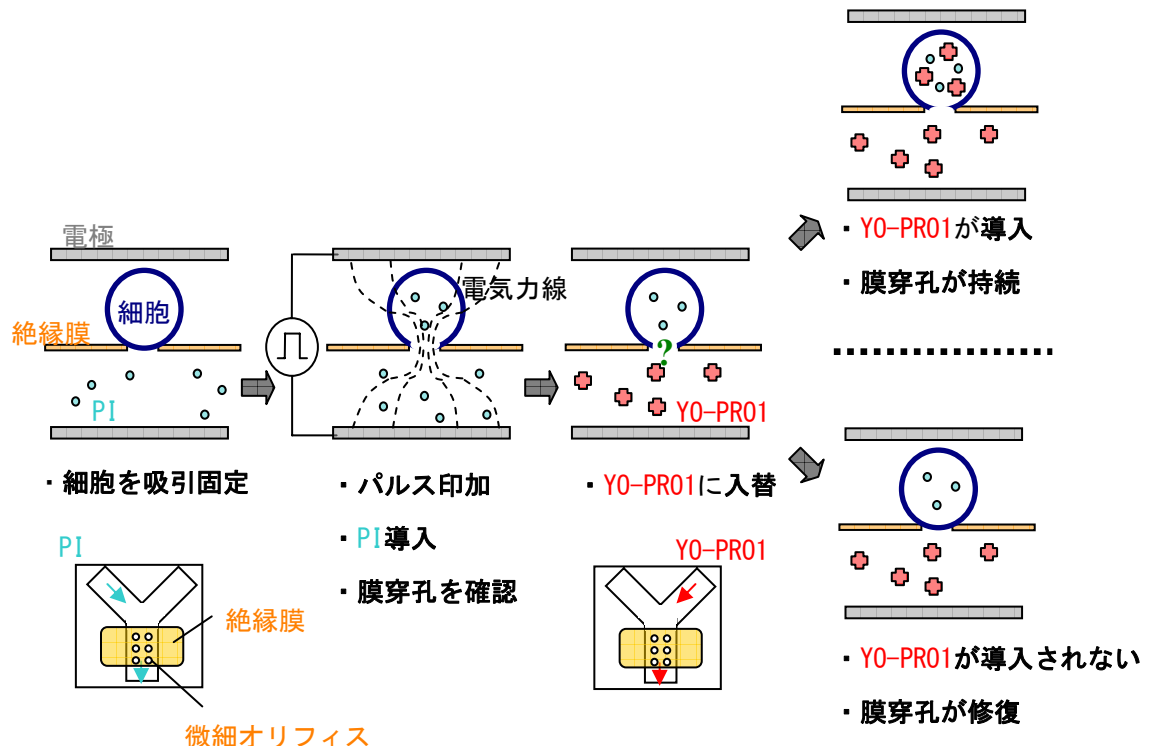


Fig.3 細胞膜穿孔持続時間測定実験原理

3.2 結果

微細オリフィスに吸引固定された U937 (Fig.4 (a)) にパルス電圧を印加後、U937 が PI を取り込んだことを示す蛍光を発した (Fig.4 (e)). これにより、この時点で細胞膜に穿孔が生じ、その穿孔を通して PI が U937 に導入されたことが確認された. さらに、細胞膜穿孔を確認してから 5 分後に、マイクロ流体回路の溶液を YO-PRO 1 に入れ替えると、YO-PRO 1 の取り込みを示す蛍光を発した (Fig.4 (i)). このことから、PI の導入により膜穿孔を確認してから 5 分後の時点で細胞膜の穿孔は閉じていないことが分かった.

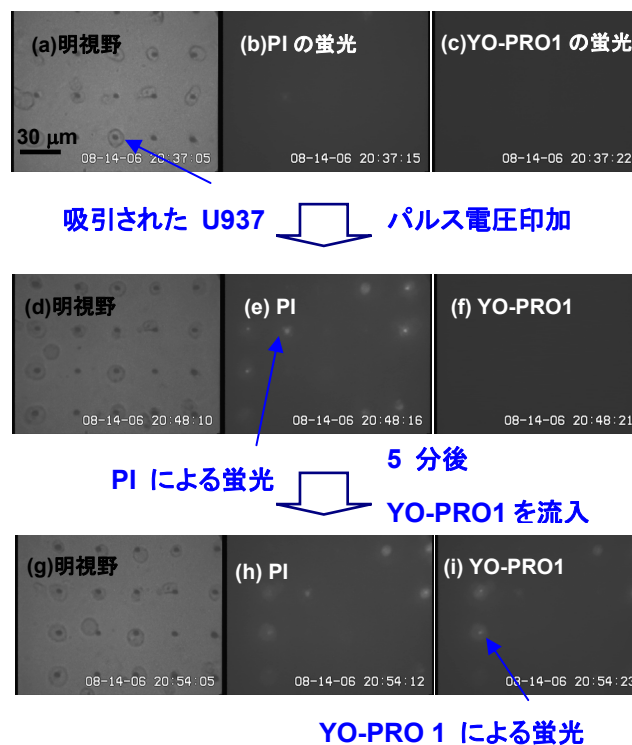


Fig.4 細胞膜穿孔持続時間の測定

3.3 考察

細胞膜穿孔の持続時間は一般に 2-3 分程度と言われている. 本実験の結果から、細胞膜穿孔が生じてから 5 分後という比較的長い時間経った時点においても細胞膜穿孔が持続していることが確認された.

この実験系において、PI と YO-PRO 1 の導入タイミングを変化させることにより、種々の条件下での細胞膜修復時間を測定することが可能となる.

4. Qdot を用いた細胞への導入物質の観察

4.1 実験方法

本実験では，エレクトロポレーションによる導入過程が明らかではない DNA 等の高分子量の物質を模擬するものとして蛍光微粒子 Qdot を用い，接着 / 浮遊細胞内に導入された個々の微粒子をカウントすることにより，導入効率の評価を行った。

- ① 微細オリフィス付絶縁膜上でマウス繊維芽細胞 L929 を培養，もしくは，浮遊状態にある L929 を微細オリフィスに吸引固定した
- ② Qdot655 Streptavidin と YO-PRO 1 の混合液を，微細オリフィスを介し L929 に接触させた
- ③ パルス電圧を印加し，YO-PRO 1 の取り込みを示す蛍光から細胞膜穿孔が生じたことを確認した
- ④ Qdot655 Streptavidin と YO-PRO 1 の混合液を洗い流し，観察した

4.2 結果

接着状態にある L929

L929 内に，Qdot の輝点が数個確認された (Fig.5 (b)). 観察された Qdot は細胞内の定点に固定されており，移動する様子は観察されなかった．この実験における L929 内の Qdot655 の個数は平均 4 個であった ($n = 4$).

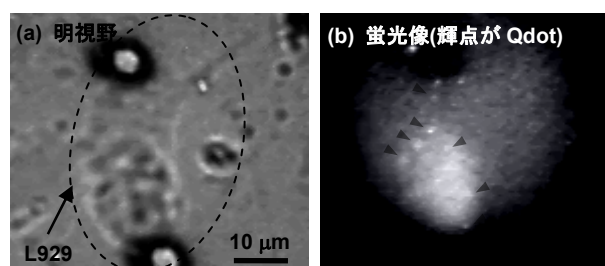


Fig.5 接着状態の L929 内の Qdot

浮遊状態にある L929

L929 内に，Qdot の輝点が確認された (Fig.6 (b),(c)). 観察された Qdot は細胞内の定点に固定されたものだけでなく，細胞内をブラウン運動するものが確認された．Fig.6(b) の時点で細胞の中心部にあった輝点は，その 3 秒後にはブラ

ウン運動により Fig.6 (c) に示すように細胞の輪郭部にまで移動した. この実験における L929 内の Qdot の個数は平均 3.2 個であった ($n = 6$).

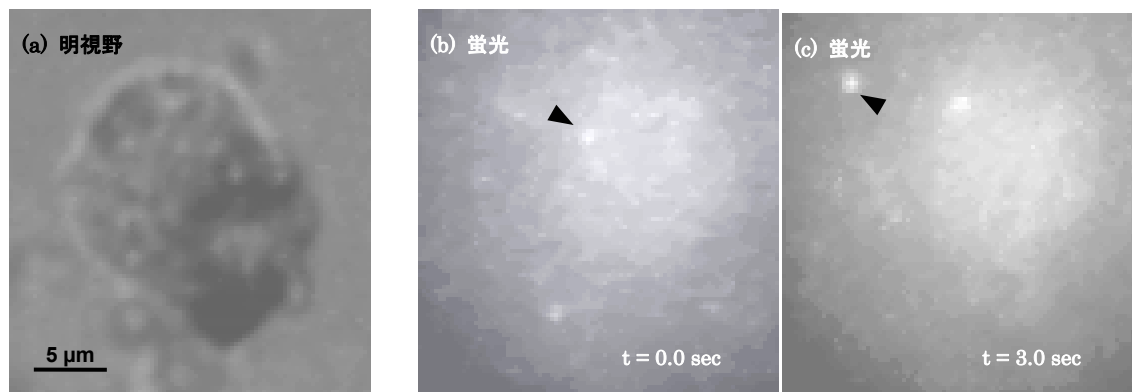


Fig.6 浮遊状態の L929 内の Qdot

4.3 考察

本実験の結果から, エレクトロポレーションにより細胞内に直径 15 – 20 nm の Qdot を導入可能であり, 導入された Qdot をカウントすることにより導入高率も評価できることが判明した.

また, 生化学の研究においてはしばしば DNA を細胞に導入する必要性が生じるが, 数百 bp の直鎖 DNA が溶液中で凝縮状態になった時の直径は数十 nm と言われている. 本実験系を利用することによりこのサイズの DNA をオンチップエレクトロポレーションにより細胞内に導入できる可能性が示唆された.

さらに, 細胞内の Qdot は接着細胞においては定点に固定されたもののみが確認され, 浮遊細胞においては定点に固定されたものとブラウン運動をするものが確認された. このことから, 接着細胞と浮遊細胞の細胞内構造の違いにより, 物質導入後の細胞内拡散に差異が生じることが示唆された. また, 本実験系を細胞内拡散の計測に応用できる可能性が示唆された.