

## エレクトロポレーションを用いた細胞内物質導入と細胞応答計測

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 宮北弥加子

現在、刺激に対する細胞の応答を測定する場合、細胞の周辺環境を変化させた際の細胞の応答を測定するといった灌流刺激が多く用いられている。しかし、この手法の場合、細胞膜表面に外部物質を内部に導入するための輸送担体が存在しないとその物質を細胞内に取り込むことができず、細胞応答を測定する際に刺激に用いることのできる物質が限られてしまう。そこで、直接細胞内に物質を導入することを行うことができれば、輸送担体を持たない様々な物質に対する細胞の応答を測定することが可能となる。さらに、細胞個々の応答のリアルタイム観察が行えれば、細胞応答の時定数を求めることや生化学的反応のダイナミクスを測ることも可能となり、細胞の活性の評価や再生医療の分野にも応用できる可能性が広がる。

そこで、本研究では電界集中を利用したエレクトロポレーション技術を用いて細胞内部に直接物質を導入した際の細胞個々の応答を測定することを目的とする。この技術は、絶縁性薄膜で作製したオリフィスアレイに細胞を固定しパルス電圧を印加するため、パルス印加時にオリフィス部に電界集中が発生する(Fig.1)。そのため、細胞のサイズ・形状に依存しない低電圧での物質導入が可能となり細胞低侵襲が実現できる[1]。また、細胞応答を測定する際の指標には、細胞内に普遍的に存在する NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) の発する自家蛍光を利用する。NADH とは、細胞の代謝過程の解凍系および TCA 回路において、糖や脂肪酸の酸化によって得られる物質である(Fig.2)。外部刺激として、細胞の代謝を促進する物質を与えた場合 NADH の産生量が増加して細胞の蛍光強度が増加することが予想される。導入物質は TCA 回路の基質物質であるグルタミン酸・マレイン酸・こはく酸を用いた。実験に使用した細胞は MIN6-m9(ラット膵β細胞)である。

オリフィス上に固定した細胞に対してエレクトロポレーションによる細胞内基質物質導入実験を行った結果、パルス印加時に細胞の輝度の上昇が確認できた(Fig.3)。これは膜穿孔が発生し、基質物質が細胞内に導入されたことにより、細胞の代謝が活性化したため NADH の増加により蛍光が強まったと考えられる。

また、導入物質がされた細胞からの距離に応じて、周囲の細胞にどのような変化が起こるのか調べた。Fig.4 に距離約 250  $\mu\text{m}$ 、Fig.5 に約 500  $\mu\text{m}$ 、Fig.6 に約 1 mm、Fig.7 に約 1.5 mm の場所に固定された細胞の輝度変化を示す。パルスを印加した時間は全て図における赤い縦線で示している。基質物質導入を行った細胞の場合、パルス印加後すぐに輝度の変化が起こっているが、今回は距離が離れるにつれて反応が起こり始めるまでにかかる時間が長くなっているという結果となり、さらに距離 1.5 mm 離れると何も反応は見られなかった。この原因としては基質物質が導入された細胞がインスリンを放出し、拡散により周囲の細胞にも影響をもたらしたのではないかと考えられる。このことより、MIN6-m9 には細胞間コミュニケーションが存在する可能性が示唆された。

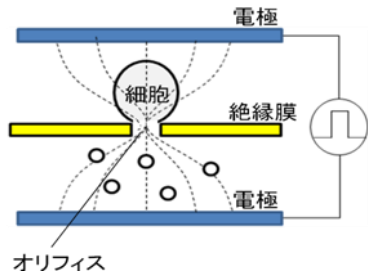


Fig.1 電界集中を用いたエレクトロポレーション

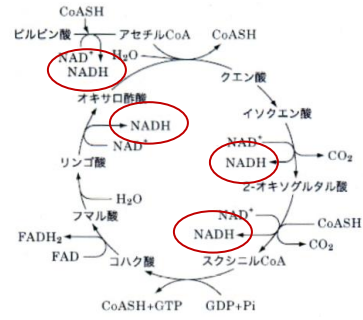


Fig.2 TCA 回路における NADH 産生

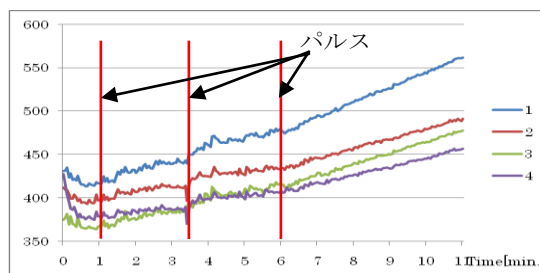


Fig.3 基質物質導入による NADH の変化

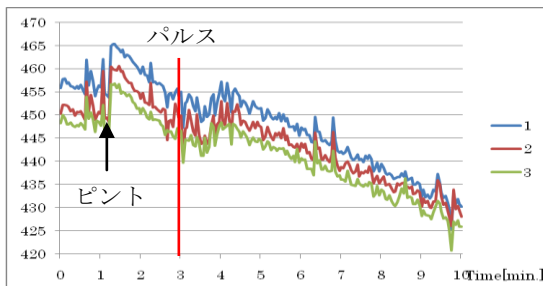


Fig.4 250 μm に存在する細胞の輝度変化

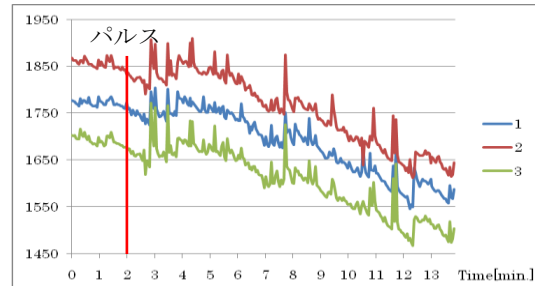


Fig.5 500 μm に存在する輝度変化

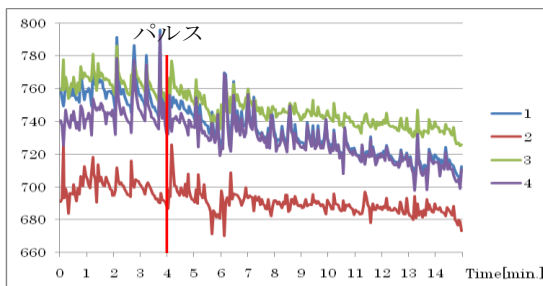


Fig.6 1 mm に存在する細胞の輝度変化

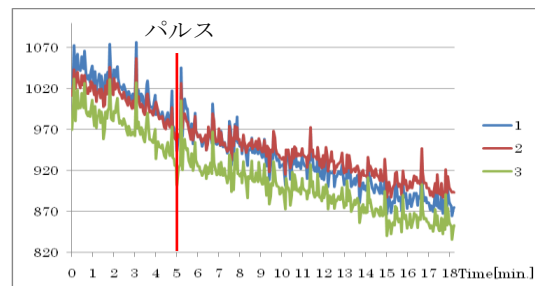


Fig.7 1.5 mm に存在する輝度変化

#### 参考文献

- [1] Kurosawa, O. *et al.* "Electroporation through a micro-fabricated orifice and its application to the measurement of cell response to external stimuli", *Measurement Science and Technology*, 17(2006), pp. 3127-3133.