

氏名	やす かわ とも ゆき		
授与学位	安川 智之		
学位授与年月日	博士(工学)		
学位授与の根拠法規	平成12年3月23日		
研究科, 専攻の名称	学位規則第4条第1項		
学位論文題目	東北大学大学院工学研究科(博士課程)応用化学専攻		
指導教官	マイクロ電極システムを用いた単一細胞の機能探索		
論文審査委員	およびイメージング法の開発		
	東北大学教授 末永 智一		
	主査 東北大学教授 末永 智一	東北大学教授	野澤 庸則
	東北大学教授 内田 勇	東北大学教授	

論文要旨内容

個々の細胞は、その時々状態、周囲環境により能力や活性が異なる。従って、生体機能を解明するためには、集団でなく単一細胞を対象とした計測が必要である。ファイバ形マイクロ電極を用いた電気化学的手法は、細胞活性の経時変化をリアルタイムで計測することが可能なため単一細胞機能の評価に極めて有力である。また、マイクロ電極を探針とした走査型電気化学顕微鏡(SECM)を用いて細胞近傍の酸化還元物質をマッピングすると細胞活性のイメージングが可能である。本研究の目的は、マイクロ電極を用いて単一細胞応答の経時変化の定量的な計測、および、その電極をプローブとしたSECMによるイメージングを試み、細胞機能を時間的に空間的に解析し、これらから得られた知見を基に単一細胞の機能探索およびイメージングシステムを構築することにある。

第一章 序論

本章では、本論文の背景と目的、その意義について記述した。まず、生体機能を解明し工学的に医学的に応用するためには、単一細胞を対象とした定量的な計測が必要であることを論じ、ファイバ形マイクロ電極を用いた計測法の有効性について記述した。走査型電気化学顕微鏡(SECM)を用いた細胞の形状および活性の画像化について、その特徴と独創性を中心に近年の研究状況を含めて概説した。

第二章 実験方法

ここでは、本研究で行った実験方法に関して記述した。特に、新規開発したマイクロ電極の作製方法について詳しく論じた。その他、測定システム、薬品、細胞培養などに関して説明した。

第三章 単一植物細胞の膜透過性の評価および形状イメージング

本章では、マイクロアンペロメトリーを用いて生きた1個のプロトプラスト膜を透過する数種類のレドックス種の膜透過係数を決定した。電極を細胞膜に近接させることにより、細胞膜の障壁としての機能を計測している。細胞近傍における酸化還元電流は、マイクロ電極を細胞膜に近接させるに従って減少した。これは、細胞膜がバルク溶液から電極表面へのレドックス種の移動の障壁として作用するためである。この酸化還元電流応答をデジタルシミュレーションを用いて定量的に解析し、それぞれのレドックス種に対する細胞膜透過係数を決定した。また、各レドックス種の膜透過係数をもとに、レドックス種の細胞内透過速度をデジタルシミュレーションを用いて計算した。次に、SECMのフィードバックモードを用いプロトプラストの形状イメージングを行った。細胞近傍において溶液中に介在させた細胞膜をほとんど透過しない $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ の酸化電流は減少し形状イメージを得ることができた。

第四章

本章では、生きた植物細胞近傍に設置したマイクロ電極で、酸素還元電流の光強度依存性を計測し、光合

成, 呼吸による酸素放出, 消費速度を算出した. 単一細胞の光合成による酸素発生速度と呼吸による酸素消費速度, 光合成と呼吸による酸素流入出量が見かけ上ゼロになる光強度 (補償点), 酸素発生量が飽和する光飽和点を決定した. これらは細胞の光合成能力を示すための重要な要素であり, マイクロ電極を用いたアンペロメトリーが単一細胞の機能評価に極めて有効であることを示した.

また, SECM を用いて単一植物細胞の光合成および呼吸活性のイメージを行った. Fig. 1 に, 単一プロトプラストの光合成および呼吸活性に基づく SECM イメージを示す. イメージにおける明領域は酸素濃度が高いことを示している. 明所 (光強度, 15 kLx) では, プロトプラスト存在部位において酸素濃度の高いイメージが得られ, 光合成により酸素が放出されていることがわかった. 一方, 暗所においては, プロトプラストは呼吸により酸素を消費しているために存在部位が暗いイメージを得ることができた. 外部の物理的条件を変化させることにより細胞の 2 つの機能をイメージとして得ることに成功した.

第五章

本章では, 化学物質による化学的刺激が, 光合成や呼吸活性に与える影響について検討した. キノン類のように膜透過性が大きな電子受容体は, 容易に葉緑体のチラコイド膜まで達し光合成電子伝達鎖から電子を奪い取る Hill 酸化剤として機能する. 電子受容体である p-キノンを含む溶液中においてマイクロ電極を細胞近傍に設置し, 光照射, 消光に伴う細胞膜表面でのキノン, ヒドロキノンの濃度変化をそれぞれの酸化還元電流から定量的に計測した. 細胞に吸収されたキノンは, すべてヒドロキノンに還元され細胞外に放出されていることがわかった. キノン存在下における酸素発生速度を測定した. Fig. 2

に, 1.0 mM キノン添加時における酸素還元電流の変化を示す. キノン存在下における酸素放出速度は光合成の明反応速度に依存し, 通常に比べて 1.5~2.0 倍に増加する. 光合成電子伝達鎖からキノンに電子が移動したため, 細胞から過剰に酸素が放出されたと結論づけ, その増加量を物質収支の面から詳しく検討した.

また, 極微量 (5 μ M) の光合成阻害剤 (3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素(DCMU)) が光合成活性に与える影響について SECM を用いて検討した. 複数の細胞が存在する中で, 特定細胞に DCMU を注入した際の光合成活性変化および隣接細胞への影響を明らかにした. わずかな環境変化に対する細胞応答をモニタリングすることが可能なため, 細胞と電極を組み合わせた環境センサを構築することが可能であることを示した.

第六章

本章では, 単一細胞 (半径 25 μ m) 近傍の 2 種類の電気化学活性種を同時に検出するためにデュアルマイクロディスク電極を作製し, 単一細胞計測に適用した. この電極の基礎特性をサイクリックボルタンメトリーにより評価した. Fig. 3 に, 単一植物細胞の形状および光合成活性の同時 SECM イメージを示す. 形状イメージでは細胞存在部位において外部溶液に添加した $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ の酸化電流が小さい, 活性イメージでは酸素還元電流の大きいイメージが得られた. デ

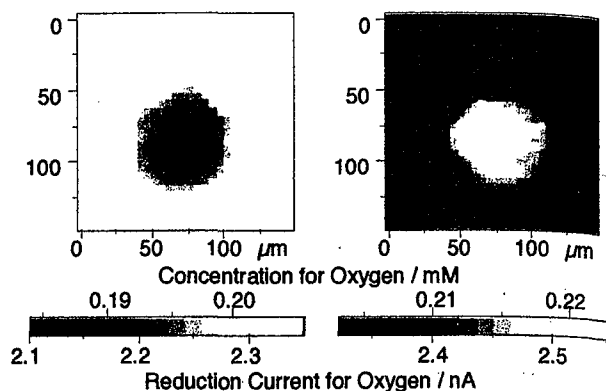


Fig. 1. SECM images of the respiration (a) and the photosynthesis (b) of the same single protoplast. Imaging is based on the reduction current for oxygen. Tip radius, 1.2 μ m; Protoplast radius, 25 μ m; Pixel size, 5 x 5 μ m.

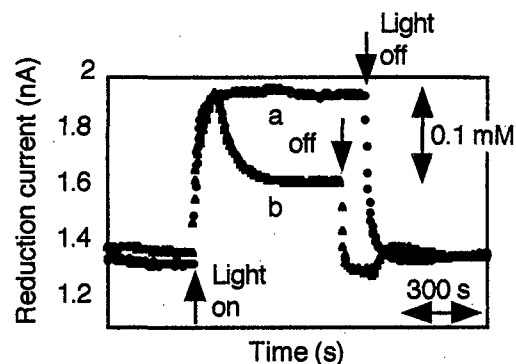


Fig. 2 Responses of oxygen reduction current upon light irradiation (25 kLx) without (a) and with 1.00 mM BQ (b) in solution.

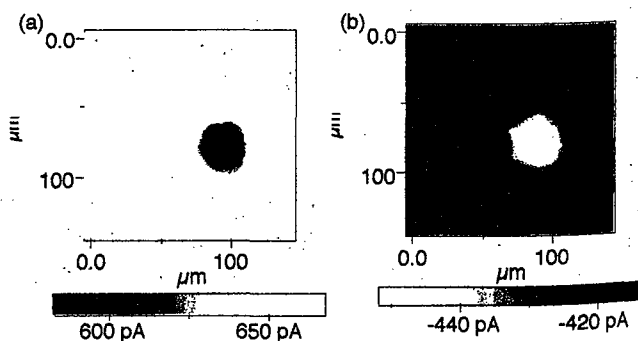


Fig. 3. Dual-SECM images of single, living protoplast (radius, 25 μ m) based on the oxidation current for $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (a) and reduction current for oxygen (b).

リアルマイクロディスク電極を SECM のプローブとして用いると、細胞の形状および細胞活性を同時にイメージングが可能であることを示した。この電極を用いると局所領域における 2 種類の電気化学活性種をリアルタイムで同時に検出することが可能なため、細胞機能の詳細な検討を行うことができる。

第七章

本章では、ヒトの結腸腺由来ガン細胞 (SW-480, 半径: 約 $10\mu\text{m}$) を用いて、細胞極近傍に置いたマイクロ電極で酸素還元電流を測定するアンペロメトリーにより呼吸活性を定量的に評価した。また、SECM を用いてマイクロ電極を 2 次元に走査させながら酸素還元電流をマッピングしたところ、細胞存在領域において酸素還元電流の小さいイメージが得られた。これは、細胞の呼吸による酸素消費に起因し、SECM による呼吸活性のイメージングが可能であることを示した。呼吸阻害剤の影響に関して SECM を用いた定量的な解析を行った。

第八章 総括

本章では、本論文の主要な成果を総括し、今後の展開について述べた。

マイクロ電極システムを単一細胞計測に適用すると、細胞特性に加えて環境変化に伴う細胞活性の時間変化の情報を得ることができる。また、マイクロ電極をプローブとして用いた SECM により細胞近傍の酸素濃度分布を得ることができ細胞活性をイメージとして得ることが可能である。これは、生体機能を解明し、生命現象を理解するために極めて重要である。高効率で高選択的な生体反応を医学的、工学的に利用するためには、細胞の複雑な機能を理解することが不可欠であり、生体分子間の相互作用や細胞間の相互作用、その空間的拡がりさらには時間変動をも考慮した 4 次元情報を得る必要がある。今後、個々の細胞にアプローチし、さらに詳しい情報を得るための新規技術開発が期待される。

論文審査結果の要旨

複雑な生命現象を理解し利用するためには、細胞など極微小な生体材料の局所領域における反応を定量的に計測可能な手法開発が必要である。著者は、単一細胞に適用可能な新規マイクロ電極を開発し、単一細胞の機能探索を試みた。また、マイクロ電極をプローブとした単一細胞の機能探索および走査型電気化学顕微鏡(Scanning Electrochemical Microscopy, SECM)を用いた活性イメージング法を開発した。本論文は、この研究成果についてまとめたもので、全文8章よりなる。

第1章は序論であり、本研究の背景及び目的を述べている。

第2章では、本研究で用いたマイクロ電極の作製方法、測定システム、測定方法について記述している。

第3章では、レドックス種の単一細胞膜透過性について検討した結果について記述している。それぞれのレドックス種の膜透過係数を決定し、細胞内流入速度をデジタルシミュレーションにより計算している。膜透過性の小さなレドックス種を利用して単一細胞の形状イメージを得ている。

第4章では、単一植物細胞(ハネモプロトプラスト)極近傍に置いたマイクロ電極で、酸素還元電流の光強度依存性をアンペロメトリーにより計測し、光合成、呼吸による酸素放出および消費量を決定している。また、SECMを用いてマイクロ電極を2次元に走査し酸素還元電流をマッピングし、SECMによる光合成および呼吸活性のイメージングが可能であることを示している。

第5章では、マイクロ電極を用いた化学物質の細胞活性に与える影響について単一細胞レベルで検討した結果を記述している。外部溶液に加えたキノン類は光合成電子伝達系の電子受容体として機能し、その電子受容能を単一プロトプラストを用いて定量的に決定している。キノン存在下における酸素放出速度が明反応速度に依存し、通常に比べて増加することを明らかにしている。また、光合成阻害剤である極微量(5 μM)の3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素(DCMU)の影響を酸素還元電流に基づくSECM計測により画像として得ることに成功した。わずかな環境変化に対する細胞応答をモニタリングすることが可能なため、細胞と電極を組み合わせた環境センサを構築することが可能である。

第6章では、細胞近傍の2種類の電気化学活性種を検出可能なデュアルマイクロディスク電極を新たに開発し、その基礎特性を得ている。この電極をSECMのプローブとして用いることにより単一細胞の形状と活性の同時イメージングが可能であった。

第7章では、動物細胞であるヒトのガン細胞(直径約20 μm)を対象に、呼吸活性による酸素の消費に基づくイメージングを試みている。また、化学物質が細胞に与える影響に関してSECMを用いて検討している。

第8章は結論である。

以上要するに本論文は、新規マイクロ電極システムを単一細胞の機能探索およびイメージングに用いることにより、マイクロ電極計測法が単一細胞の機能評価に極めて有効なことを示したものであり、生体情報工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。