

## C305

## 蛍光イメージングによる細胞呼吸活性の非侵襲的かつ簡便な評価

(東大生研)○(学)藤井 翔<sup>\*</sup>・中村 寛子・木村 啓志・(正)モニターニュ ケビン・  
(正)小森 喜久夫・藤井 輝夫・(正)大竹 勝人(正)酒井 康行

**【緒言】**細胞の酸素消費量に基づく呼吸活性計測は、細胞の質を評価する方法の一つである。微小電極を用いた電気化学的手法<sup>1</sup>や、酸素による蛍光性錯体の消光作用を利用した光学的手法<sup>2</sup>は、非侵襲で細胞近傍の酸素濃度を計測できることが知られている。これらの技術に基づいて近年、受精卵の管理および選別への利用が検討されつつある。しかしながら電気化学的手法の場合、操作に手間が掛かる。一方、光学的手法の場合、アレイ化が容易であるため、多数の受精卵を短時間で評価できる。

我々はこれまでに酸素感受性の錯体、白金オクタエチルポルフィリン(PtOEP)フィルム上に二次元の肝細胞アレイを構築し、肝細胞の呼吸活性を光イメージングから評価してきた<sup>2</sup>。本研究では、マイクロウェル構造を有し、そのウェルの底面にPtOEPフィルムをコートした、受精卵の個別管理・選別培養アレイを開発し、光イメージングによる肝ガン細胞株Hep G2およびマウス受精卵の呼吸活性を評価した。

**【実験】**2 mM PtOEP と 7 wt% ポリスチレンを含むトルエンをガラス表面にスピコートし、さらに高酸素透過性のポリマーであるポリジメチルシロキサン(PDMS) 3.3 wt% を含む 2-プロパノールを 1000 rpm でスピコートした。この表面に、直径 500  $\mu\text{m}$  の貫通孔を有するアクリル板またはガラス板を接着させた (図 1.a)。貫通孔に Hep G2 の凝集体または 1 個のマウス受精卵を入れて培養した。PtOEP ( $\lambda_{\text{ex}}=540, \lambda_{\text{em}}=640 \text{ nm}$ ) の光イメージング計測には、蛍光顕微鏡を用いた。

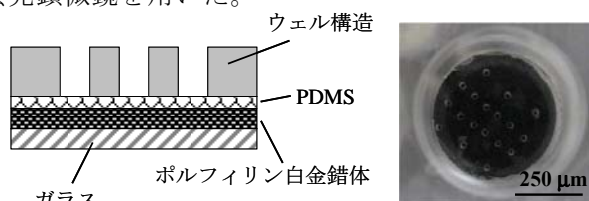
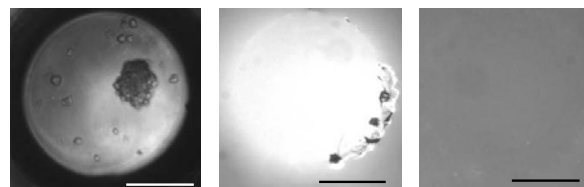


図 1.a 受精卵評価デバイス

図 1.b 受精卵の個別管理・選別培養アレイ

**【結果と考察】**開発した受精卵の個別管理・選別培養アレイ(図 1.b)を用いて、まず Hep G2 の凝集体(直径約 200  $\mu\text{m}$ )の光イメージング計測を試みた。Hep G2 の凝集体を入れて培養 5 日目のマイクロウェルを図 2.a に、そのときの光イメージング画像を図 2.b に示した。また、空のマイクロウェルの光イメージング画像を図 2.c に示した。図 2.b と c を見て分かる通り、Hep G2 存在下でのマイクロウェルの底面が明らかに発光していた。この違いはマイクロウェル内の酸素濃度に起因する。Hep G2 存在下では、細胞呼吸に基づく酸素消費速度がマイクロウェル内への酸素の拡散速度よりも速くなったため、マイクロウェル底面の酸素濃度が低下し、PtOEP の発光が酸素によ

って消光されなかったものと推察される。

図 2.a ウェル内の Hep G2 図 2.b Hep G2 の光イメージング 図 2.c 空の光イメージング  
スケールバー: 250  $\mu\text{m}$ 

次にマウス受精卵の呼吸活性を計測した。ここでは 2 分割(Day 2)の受精卵をマイクロウェル内に入れて検討した(図 3)。その結果、全ての受精卵(図 3、プロット a-e)について、Day 3 での光強度は Day 2 のものよりも増加した。Day 4 以降では、受精卵 a と b 存在下でのマイクロウェル底面の光強度は増加し続けたものの、受精卵 c-e 存在下でのものは変化しなかった。それぞれ受精卵の形態を観察したところ、Day 6 では受精卵 a と b はそれぞれ胚盤胞になっており、一方、受精卵 c-e は 4 分割や 8 分割のままであった。つまり、受精卵 a と b の場合、細胞数が増加するに伴い、酸素消費量も増加したため、光強度の増加につながり、受精卵 c-e の場合、細胞分裂が停止してしまったため、光強度が増加しなかったものと推察される。

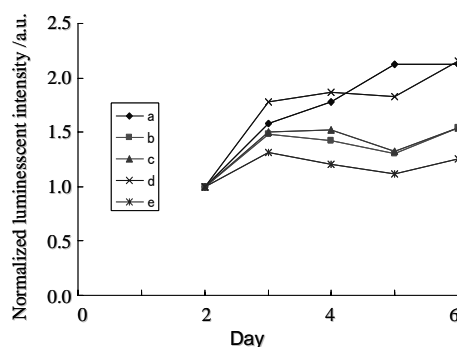


図 3 蛍光強度分布

以上より、光イメージングによる呼吸活性評価から細胞凝集体や受精卵の個別管理・選別を容易にできる可能性が示された。将来的には、数十~数百個の受精卵を同時に個別播種・培養し、短時間で選別・個別回収できるアレイの開発を目指す。

**【謝辞】**本研究は、「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」の援助を受けて実施した。

**【参考文献】**

- Shiku et al., *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 3751.
- Montagne et al., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2009**, 8, 1529. s-fujii@iis.u-tokyo.ac.jp