

電気回転速度を指標とした単一細胞の非染色電気特性評価装置の開発

兵庫県立大学大学院理学研究科 准教授 鈴木 雅登

1. はじめに

近年、細胞内シグナル伝達を人工的に組み換え、治療や創薬材料の産生に利用できるデザイナー細胞の作製が進んでいる。デザイナー細胞は特定の刺激に対して目的の機能を発現するように人工的に高機能化された細胞である。例えば、ガン抗原に対する結合能と免疫活性化能を有するタンパク質（CAR）が組み込まれた T 細胞（CAR-T 細胞）やグルコースと結合してインスリンを分泌する人工 β 細胞などがある。しかし、人工的に高機能化した細胞群内で機能の発現にばらつきがあり、その品質管理が課題である。通常、単一細胞の評価には、細胞の破碎や細胞への染色を必要とし、評価した細胞の利活用ができない。

そこで本研究では、細胞の電気回転現象を利用して、非染色で網羅的に単一細胞の電気特性（細胞膜容量、細胞質導電率）を計測する装置の実現を目的にする。本研究の計測原理である電気回転は、外部から印加した回転電場と、その回転電場によって細胞内に誘起された分極電荷との相互作用によって細胞に対してトルクが生じ細胞が回転する現象である。回転速度は細胞の電気特性に依存するため、回転速度を計測するだけで、細胞への染色や微小電極などを接触させることなく非標識に細胞の電気特性の評価が可能である。通常の電気回転デバイスは、平板基板上に 4 種類の電極を配置させ、その中央部で形成される回転電場を用いて細胞を回転させる。そのため 1 度に評価可能な細胞数は数細胞程度で、さらに細胞は電極中央部に浮遊している状態のため溶液の流れによって容易に散逸し、溶液を介した抗原での刺激ができない。一方、本研究の電極デバイスは、個々の細胞をマイクロウェルに捕捉し、そのマイ

クロウェル内で電気回転を誘導するため、長時間安定して単一細胞の電気回転計測が可能である。

本研究では免疫を司る細胞の 1 つである T 細胞を計測対象とした。T 細胞は、異物（抗原）を細胞膜受容体で認識すると、細胞膜表面積の増大（細胞膜容量の増加に相当）やイオンチャネルの開閉（細胞膜のイオンコンダクタンスに相当）といった細胞の電気特性を動的に変化させる。その結果、異物排除に利用されるタンパク質（サイトカイン）の分泌や異物への結合能の向上など免疫機能を発揮する。そのため単一の T 細胞の電気特性の経時変化を網羅的で簡便に評価できれば、T 細胞の免疫応答を調整する薬剤の迅速なスクリーニングにつながる。さらに、細胞に対して非標識で網羅的に免疫応答を評価できれば、目的の応答を示した細胞を回収し培養することで均一な細胞集団が取得でき、その細胞集団を治療用の細胞として移植することで安全な細胞移植治療が期待できる。このように本計測技術は、移植用細胞の品質評価の分野に貢献できる。

T 細胞の活性化には細胞内 Ca^{2+} の増加が必要である。また、多くの細胞に置いて、細胞内 Ca^{2+} の増加は細胞膜の反転を誘導しその結果、細胞膜容量の増加が報告されている^{[1][2]}。そこで細胞内へ Ca^{2+} を導入させるイオノマイシン添加時の Jurkat 細胞の細胞膜容量の増加を電気回転速度の変化として検出することを目的とした。

2. 実験方法

2.1. 電気回転の原理

電気回転速度 Ω は Eq.(1) で示される。

$$\Omega = -\frac{\epsilon_s \epsilon_0}{2\eta} \text{Im}[\text{CM}] E^2 \quad \text{Eq.(1)}$$

ここで、 ϵ_s と η はそれぞれ溶液の比誘電率と粘度、 ϵ_0 は真空の誘電率、 E は電場強度を示す。Im [CM] は Clausius-Mossotti 因子の虚部を示し電気回転速度の向きと速度を決定する。Jurkat 細胞の Im[CM] の周波数依存性を Fig. 1 に示した。Im[CM] は Single-shell model を用い、計算に必要な Jurkat 細胞の細胞膜容量 (9.82 mF m^{-2})、細胞質導電率 (250 mS m^{-1}) は先行研究の値を参照した^[3]。300 kHz 付近にピークをもつ曲線が得られた。Im[CM] は 10 kHz から 5 MHz の範囲では負を示し、回転電場とは逆方向の回転を示す。

電気回転スペクトルは細胞膜容量の増加によって低周波数側にシフトする。低周波数に保持しながら電気回転すると細胞膜容量の増加を回転速度の増加として検出できる。

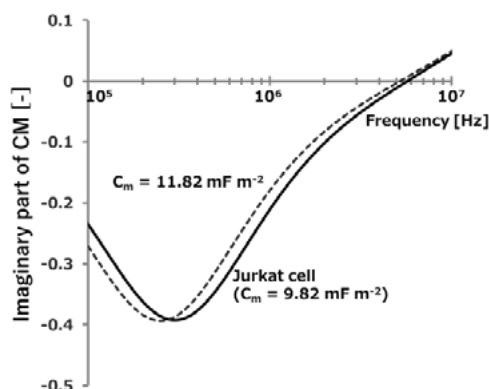


Fig. 1 Jurkat細胞の Clausius-Mossotti 因子の虚部の周波数特性（実線），および細胞膜容量が 2 mF m^{-2} 増加した場合（破線）

2.2. ウェル型電気回転デバイス

マイクロウェル型電極デバイスは 1,521 個の長方形型マイクロウェル ($20 \times 30 \mu\text{m}$, 高さ $20 \mu\text{m}$) をもつ (Fig. 2 A)。マイクロウェル底面の短辺側に Indium-Tin Oxide (ITO) 透明電極（幅 $5 \mu\text{m}$, 長さ $20 \mu\text{m}$ ）、マイクロウェル長辺側の上面に Au/Cr 電極（露出領域幅 $5 \mu\text{m}$, 長さ $20 \mu\text{m}$ ）を配線し 1 つのマイクロウェルに対して 4 電極を配置した

(Fig. 2 B)。マイクロウェル型電極デバイスは NTT-AT 社で作製した。電極チップにアクリル製溶液チャンバ（ひし形状、長辺 10 mm , 短辺 6 mm , 厚み 5 mm ）を取り付け、通電用の治具を介してファンクションジェネレータ (WW5064, TABOR Electronics) と接続した。電気回転デバイスへ 10 mg mL^{-1} BSA (bovine serum albumin) を溶解させたリン酸緩衝液を加えて 30 min 以上 4°C で静置しデバイス表面への細胞の非特異的な吸着を抑制した。

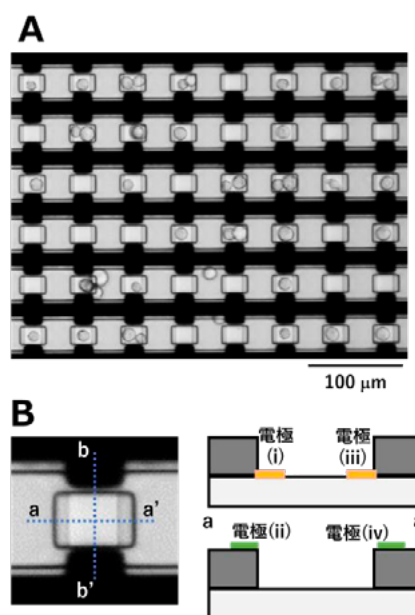


Fig. 2 A. マイクロウェル型電気回転デバイスの光学顕微鏡写真。長形状のマイクロウェルを 1,521 有する。B. 1 つのマイクロウェルの拡大写真と断面の模式図。電極 (i), (iii) がマイクロウェル底面、電極 (ii), (iv) がマイクロウェルに配置される。

2.3. 細胞の準備と電気回転計測

細胞は Jurkat E6.1 細胞 (以下 Jurkat 細胞) を用いた。Jurkat 細胞の培養には、10% fetal bovine serum と 1% penicillin-streptomycin を加えた RPMI1640 培地を用いて 5% CO_2 , 37°C の雰囲気中で培養した。Jurkat 細胞懸濁液を遠心分離 (1000

rpm, 5 分) し, 電気回転溶液 (300 mM マンニトール水溶液で 10 倍へ希釈した RPMI1640 培地, 導電率 110 mS m^{-1}) へ置換した. 細胞濃度を $1.5 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ まで希釈した後にアクリル製溶液チャンバへ 200 μL 添加し 10 分静置した.

Jurkat 細胞への化学刺激にはイオノマイシンを用いた. 電気回転計測開始 10 秒後に 200 μM イオノマイシン溶液を 1 mL 添加し, イオノマイシンの終濃度 1 μM で Jurkat 細胞を化学刺激した.

2.4. 回転速度の評価

細胞の回転挙動はフレームレートが $60 \text{ frame second}^{-1}$ の CMOS カメラ (DFK33UX174, The Imaging Source, LLC) で記録した. 得られた動画へ研究室で作製したソフトウェアを適用して細胞の回転速度を算出した^[4]. 回転速度は各フレーム間での規格化相関係数から算出した. 基準とした時間の細胞画像から相関係数が最も高い細胞画像に至るまでのフレーム数を算出し, このフレーム数を細胞が 1 回転に要する時間とした.

3. 実験結果

3.1. Jurkat 細胞の電気回転特性

Fig. 3 に, Jurkat 細胞懸濁液を電気回転デバイスに滴下して 5 分後の光学顕微鏡写真を示した. マイクロウエルに Jurkat 細胞が単一細胞の状態で捕捉される様子が確認できた. 約 30% 程度のウエルで単一細胞の捕捉が確認できた. 細胞懸濁液の濃度を増加させると単一細胞を捕捉するウエル数は増加するが, 2 細胞以上含むウエルが増加した. 1 ウエルに複数の細胞が捕捉されると電気回転計測ができなくなる. そのため本研究では充填率は少ないが, 本細胞懸濁液の濃度を使用した.

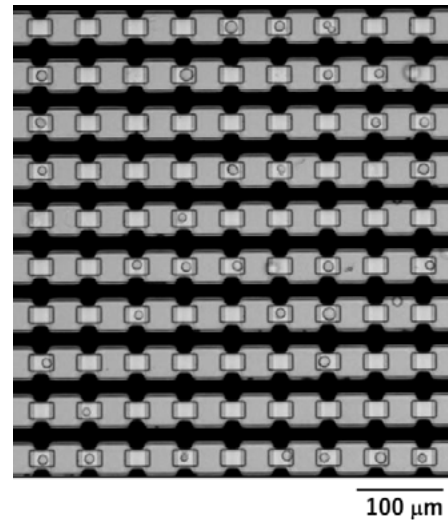


Fig. 3 Jurkat 細胞が捕捉されたマイクロウエル電気回転デバイスの光学顕微鏡写真. マイクロウエルへほぼ単一細胞の状態で捕捉された.

3.2. 電気回転計測における印加周波数

Jurkat 細胞のウエルへの捕捉を確認した後, 4 電極 (Fig. 2 B (i), (ii), (iii), (iv)) へ位相を 90° ずつずらした交流電圧を印加し各マイクロウエルへ回転電場を誘導した. Fig. 1 より $-\text{Im}[\text{CM}]$ が最小となる 300 kHz, 4 Vpp を印加するとその場で Jurkat 細胞は回転し始めた. 一方, 印加周波数を低下させ 50 kHz を印加するとほぼすべて細胞が回転しながらウエルへ放出された. この原因を考えるために, CM 因子の実部 ($\text{Re}[\text{CM}]$) の周波数依存性を計算した. $\text{Re}[\text{CM}]$ は Jurkat 細胞に作用する誘電泳動力の大きさと向きを示す. $\text{Re}[\text{CM}]$ が正の場合, 強電場領域への引力が Jurkat 細胞に作用し, $\text{Re}[\text{CM}]$ が負だと強電場領域からの反発力が作用する. Jurkat 細胞が安定に回転した 300 kHz は $\text{Re}[\text{CM}]$ がほぼ 0 になるため誘電泳動力は細胞に作用しない. そのため, 細胞はウエル内に保持された状態でその場で回転した. 一方, 印加周波数が 50 kHz では $\text{Re}[\text{CM}]$ は負の値を示し Jurkat 細胞へ負の誘電泳動が作用す

る。Jurkat 細胞にトルクが作用するとともに負の誘電泳動に由来した強電場領域からの反発力も作用したため、細胞は回転しながらウェルから放出されたと考えられる。

一方で、細胞膜容量の増加は電気回転スペクトルの低周波数側へのシフトを誘導する (Fig. 1)。膜容量の増加を検出するには低周波数 (50 kHz) での電気回転が有利である。そこで、負の誘電泳動の作用による Jurkat 細胞の散逸を抑制するために、ウェル上面の電極 (電極 ii, iv) への印加電圧を 4 Vpp、ウェル底面への電極 (電極 I, iii) への印加電圧を 2.8 Vpp へ変更した。その結果、細胞をマイクロウェルから散逸することなく安定して電気回転できた。そこで、この条件で電気回転させた Jurkat 細胞に対してイオノマイシンを添加しその回転速度を評価した。

3.3. イオノマイシン添加時の電気回転速度の計測

電気回転 (印加周波数 50 kHz, 電極 ii, iv への印加電圧 4.0 Vpp, 電極 i, iii への印加電圧 2.8 Vpp) させ、10 秒後にイオノマイシンを添加した。代表的な 1 細胞の電気回転速度の経時変化を Fig. 4 に示した。4 radian s^{-1} 程度の速度で回転し、40 秒程度はほぼ一定の速度で回転した。その後、徐々に回転速度が増加し、計測開始 140 秒後には 6 radian s^{-1} を示し、初期の回転速度に対して約 50% 回転速度が増加した。この回転速度の増加は膜容量の増加に起因する。

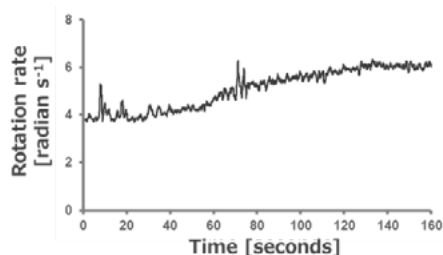


Fig. 4 電気回転速度の経時変化. 開始 10 秒後にイオノマイシン (終濃度 1 μM) を添加した。

この回転速度の増加を統計的に処理するために、計測開始 15~25 秒後間と 150~160 秒間の回転速度の平均値を算出し、イオノマイシン添加前後の回転速度を比較した。Fig. 5 にイオノマイシン添加前 (15~25 秒間の平均値) と添加後 (150~160 秒間の平均値) の相関図を示した。初期回転速度の 5% 以上増加した細胞は 224 細胞中 94 細胞で確認され、イオノマイシンによって誘導された細胞膜容量の増加を電気回転速度の増加として検出できた。

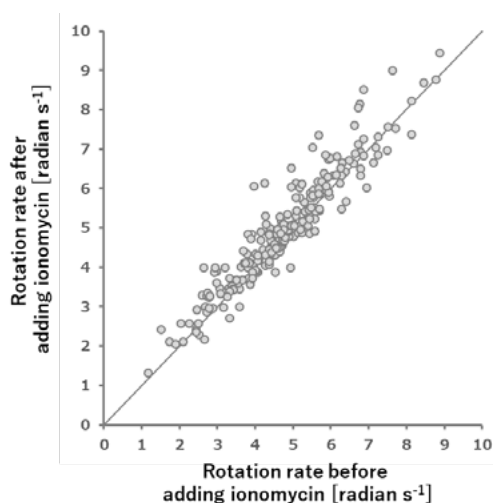


Fig. 5 イオノマイシン添加前後の電気回転速度の比較. 224 細胞分の回転速度を解析した。

4. 結論

本研究では、薬剤によって誘導される Jurkat 細胞の膜容量の増加の電気回転速度の変化として検出することを目的に、計測周波数を検討した。その結果、電気回転の理論計算から細胞膜容量の増加によって電気回転スペクトルの低周波数側へのシフトを確認した。一方で、低周波数である 50 kHz での電気回転は、負の誘電泳動も同時に作用しマイクロウェルから排出されてしまうことが判明した。マイクロウェルからの細胞の散逸抑制のために、上面電極への印加電圧を下面電圧と比較してわずかに大きくすることによって、マイ

クロウエルからの細胞の散逸を防ぐことに成功した。

イオノマイシンの添加により多くの細胞で回転速度が増加した。印加周波数が 50 kHz における回転速度の増加は細胞膜容量の増加を反映する。そのため、電気回転速度の増加としてイオノマイシンの添加によって誘導される細胞膜容量の増加を検出できた。通常、細胞膜容量の検出にはパッチクランプ法が利用される。パッチクランプ法は、ガラス電極を単一細胞に接触させ、細胞膜の一部を破断させるため煩雑で熟練した実験手技が必要である。また、パッチクランプ計測した細胞は大きく損傷を受け培養ができない。一方、本法は電極デバイスに細胞懸濁液の滴下だけで膜容量を概測できる。また、計測後の細胞をガラスピペットで回収し培養した結果、7 割程度の細胞の増殖を確認できた。この結果は、イオノマイシンの応答量に応じた細胞の選別やクローニングできることを示唆する。今後は、イオノマイシンに対する応答性の違う細胞をそれぞれ回収し培養し、単一細胞で評価した応答性を増殖後も維持されるかを検証する。また、薬剤に対する応答性だけではなく、抗体分泌細胞やウイルス完成細胞など、細胞膜の特徴に差がある細胞の電気回転評価を進め、電気回転計測に基づく細胞評価装置の開発を進める。

5. 参考文献

- [1] Bricogne, C.; Fine, M.; Pereira, P. M.; Sung, J.; Tijani, M.; Wang, Y.; Henriques, R.; Collins, M. K.; Hilgemann, D. TMEM16F Activation by Ca^{2+} Triggers Plasma Membrane Expansion and Directs PD-1 Trafficking. *Sci. Rep.* 9-1 (2019) 1–13.
- [2] Deisl, C.; Hilgemann, D. W.; Syeda, R.; Fine,

M. TMEM16F and Dynamin's Control Expansive Plasma Membrane Reservoirs. *Nat. Commun.* 12 (1), 2021, 4990.

- [3] Kawai, S.; Suzuki, M.; Arimoto, S.; Korenaga, T.; Yasukawa, T. Determination of Membrane Capacitance and Cytoplasm Conductivity by Simultaneous Electrorotation. *The Analyst* 145 (12), 2020, 4188–4195.
- [4] Suzuki, M.; Kawai, S.; Shee, C. F.; Yamada, R.; Uchida, S.; Yasukawa, T. Development of a Simultaneous Electrorotation Device with Microwells for Monitoring the Rotation Rates of Multiple Single Cells upon Chemical Stimulation. *Lab Chip* 23 (4), 2023, 692–701.

6. その他成果発表等

- ・ Masato Suzuki “Non-invasive detection of cell surface morphological changes induced by T-cell activation using simultaneous electrorotation” UC San Diego | Kyoto University - KSAC Joint Research Symposium, UC San Diego, 2023 年 10 月 11 日.
- ・ 鈴木雅登, 中澤亜美, 磯崎勇志, 安川智之“一括電気回転計測によるアルカリフォスファターゼ分泌活性を有する細胞の識別”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 48 回研究会, 熊本, 2023 年 11 月 7 日.
- ・ Ryoga Yamada, Masato Suzuki, Tomoyuki Yasukawa “Monitoring Cell Membrane Capacitance by Cell Electrorotation in Microwells with Three Microelectrodes” 14th Asian Conference on Chemical Sensors, Manila, 2023 年 11 月 21 日.
- ・ 鈴木 雅登, 水谷櫻, 藤本萌, 山田稜河, 磯崎勇志, 安川 智之“細胞の一括電気回転を用いた

単一細胞の非標識な薬剤 応答の分析法の開発”，第 76 回日本生物工学会大会，東京，2024 年 9 月 8 日

鈴木雅登，水谷 櫻，吉川 雄人，今井健太，磯崎勇志，安川智之，化学とマイクロ・ナノシステム学会第 50 回研究会最優秀発表賞，CHEMINAS50 実行委員会，2024 年 11 月 26

日。

7. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団の助成金により遂行しました。貴財団からの助成に深く感謝を申し上げます。