

Sensor chips for multiparametric real time monitoring of cell metabolism and drug response

細胞代謝と薬物反応用のリアルタイムモニタリング用マルチパラメータ・センサーチップ

M. Zottmann¹, J. Wiest², T. Flurschütz¹, M. Schmidhuber¹, B. Wolf¹

¹Heinz Nixdorf Lehrstuhl Medizinische Elektronik, Technische Universität München, Deutschland

²cellasys GmbH, München, Deutschland

概要 酸素消費量や細胞外酸化のような代謝パラメータのモニタリングは薬物に対する細胞の活動や反応の第一線の情報を提供する。この目的のために、マルチパラメータを使ったセンサーチップによる生体電子工学検査システムが開発されている。細胞はセンサーチップ上で直接培養され、チップにはpHとpO₂測定のためのセンサーや、さらに細胞のインピーダンス変化を検出するために二つのIDESセンサーが組み込まれている。流体システムが新鮮な細胞培養基を供給し、更に試験薬物を追加したり除いたりすることが可能である。センサーはリアルタイムで出力し、データは酸素消費や細胞外酸化の割合に変換される。個々の細胞培養が数時間から数週間に渡って連続的にモニターできる。実験のために、人のMCF-7細胞株に濃度の違うシスプラチン(5 μ Mと10 μ M)が供給され3日間モニターされた。比較のために、24時間ごとに標準培養のWST検査とセルカウントが行われた。センサーチップでは15時間後に薬物の最初の介在効果が検出された。一連のエンドポイント測定によるWST分析やCASYセルカウントとは大いに異なり、センサーチップはオンライン、リアルタイムで薬物介在効果検出を可能にする。

キーワード センサーチップ(sensor chips)、リアルタイムモニタリング(real time monitoring)、シスプラチン(cisplatin)、MCF-7

I. 緒言

細胞分析の一連の検査は、新薬の研究開発にとって避けられない手順である。セルカウント、DNA合成やあるいは細胞全体の要素の染色など異なる細胞パラメータに基づいたさまざまな試験分析が、現在薬効のスクリーニングのために使われている。このような標準的な方法の欠点は、各々細胞活力の障害や細胞死が必要条件であることにある。従って、薬効の追跡や反応分析には、分析する時間毎に必要な多数の同様の培養が必要となる。

一連のエンドポイント測定を用いた分析とは異なり、センサーチップはオンラインでリアルタイムに薬効検出が可能である[1]。細胞はエネルギー代謝を調節することで細胞のシグナル伝達ネットワークでの調節に対応する[2]ので、導入された生命電子工学検査システムは代謝活動の電荷の分析や、個々の細胞培養の形態分析を利用する。

II. 実験材料および方法

A. 細胞チップシステム

IMOLA (Intelligent MOBILE LAB) は、バイオチップを用いた測定用に作られた統合生命維持システム付きの携帯装置である(図1)。細胞はセラミック基盤のマルチパラメータセンサーチップ(Biochip-C)上で直接培養され、そのチップ

チップがIMOLAに装着され、灌流システムに接続される。本実験では、非常に豊富なデータを受取るために6台のIMOLAが並列に使われた。ラップトップPCやPCでIMOLAソフトを使い、無線で測定の設定構成をすることができるし、収集データを保存する。



図 1: IMOLAモジュールと供給・排出用培地ビン

チップの細胞培養箇所は直径 6 mmで複数のセンサーを含んでいる(図2)。細胞はセンサー上で直接成長する。測定中、培養体積の高さはスパーサーリングで0.2mmに調整され、その結果総体積7 μ に固定される。この小さな容積内の多数の細胞が、細胞代謝率の速くて感度のよい記録を可能にする[3]。流体システムが灌流ポンプに接続され、一時または連続モードで培養体の溶剤を交換する。

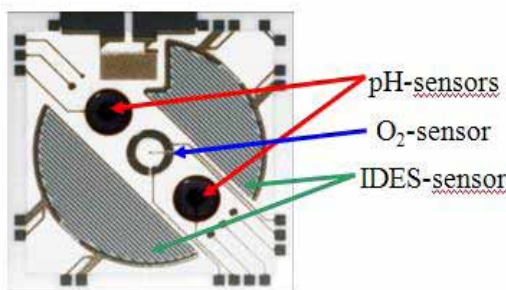


図 2: pH, pO₂、インピーダンス測定センサー付きの Biochip-C

細胞活力はO₂の呼吸測定(ミトコンドリア活力)と細胞外酸化で決まる。pH値の測定のために金属酸化物センサーが使われた。溶解酸素の変化は3つの電流測定溶解酸素センサー電極により測定される[4]。細胞培養の接着力における細胞の増殖と変化は、10 kHz、100mVの交流信号を使う楕円電極構造センサー(IDES) [5]で決められる。Pt1000センサーはチップの温度を出力できる。

B. 細胞と媒体

人の粘着性乳がん株MCF-7が用いられた。実験のために、細胞はトリプシン処理がされ、チップ上、5% FCSと3.7 g/ NaHCO₃を含んだ300 μ DMEM(ダルベッコ改変イーグル培地)中で1チップ当たり3 \times 10⁴個の細胞に培養された。それから細胞は標準環境(37 $^{\circ}$ C, 10% CO₂)で測定を開始するまで培養された。

測定中、改変培養基(5% FCSのDMEMと50 μ g/mlのゲンタマイシン、NaHCO₃は含まない)がpH測定の感受性を確保するために使われた。化学薬品はSigmaから購入した。

C. 薬物

シスプラチンは、様々なタイプの癌治療に使われるアルキル化剤のような化学療法薬剤である。白金錯体はDNAの架橋結合を引き起こし、有糸分裂による細胞分裂を阻害し、DNA修復メカニズムをブロックし、その結果細胞静止(増殖抑制)作用をもたらす。実験のために、0.1から10 μ Mまでの濃度が使用された。

D. 実験

MCF-7 細胞はバイオチップ上で直接300 μ 培養液の中で3 \times 10⁴個の細胞に培養された。バイオチップはシャーレー内に置かれて、80%のサブコンフルエンスに達するまで標準環境下で3日間培養された。

4日目にチップがIMOLAでの測定用に用意された。チップ上の最初の細胞増殖(成長)は反射光

顕微鏡を使って制御された。スパーサーリングと灌流液ヘッドがチップに追加され、セルチャンバーの培養基の容積は7 μ までに減る。チップがIMOLAに装着され液体灌流システムにつながれ、測定が開始された。18時間後から24時間後に2つの濃度の異なる(5と10 μ M)シスプラチンが添加された。

E. WST検査と細胞数

WST検査はWST-1の、比色分析によって区分されるホルマザンへの還元に基づいている。ホルマザン染料の量はマルチウェルプレートリーダー内で450 nmの吸光度を測定することで計量される。セルカウントはWST検査後にCASYセルカウントで行われた。

細胞は4つの24穴-ウェルプレート上、ウェル当たり500 μ の培地で 0.5×10^4 細胞まで培養された。3日間の培養期間の後、0.1から10 μ M濃度のシスプラチンが添加された。コントロールとして3個のウェルが投薬しないで残された。

III. 結果

A. センサーチップによる測定

センサーチップ上で成長するMCF-7細胞の細胞呼吸と細胞外酸化が3日間モニターされた。

18時間後、各々0、5、10 μ M濃度のシスプラチンを含んだ新鮮な溶剤の供給ボトルがIMOLAモジュールに加えられた。

図3は各々異なる濃度の薬剤を添加された3つのMCF-7培養の細胞外酸化率を示している。

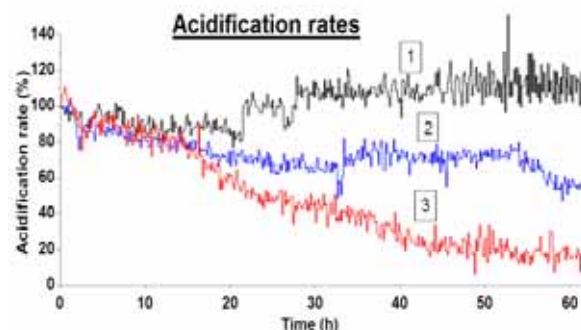


図 3 : センサーチップ上のMCF-7培養の酸化率。薬物添加のない培養(1)、5 μ Mシスプラチン(2)、10 μ Mシスプラチン(3)の各信号。

シスプラチンを添加しないコントロール培養は測定の終了まで酸化の増加を示している。薬物添加の二つの培養は15時間の遅延後に用量依存性の一定の酸化率減少を示している。

B. WST検査と細胞数

3日間の培養後、0、5、10 μ M濃度のシスプラチンが24穴-ウェルプレートに添加された。最初のWST検査とセルカウントは培養の値を入手するための薬剤添加の日の薬剤添加前に行われた。その後、WST検査とセルカウントは24時間毎に行われた。図4と図5は両方の検査結果を示している。センサーチップの結果との比較のために、5と10 μ Mのデータが示されている。

WST検査は薬物添加なしのコントロールウェルと5 μ Mのシスプラチン添加のウェルにおいて細胞活性の一定の増加を見せており、5 μ Mのシスプラチンの方の増加は幾分少ない。10 μ Mのシスプラチンを供給されたウェルの細胞活性の増加は2日後に成長が止まっている。

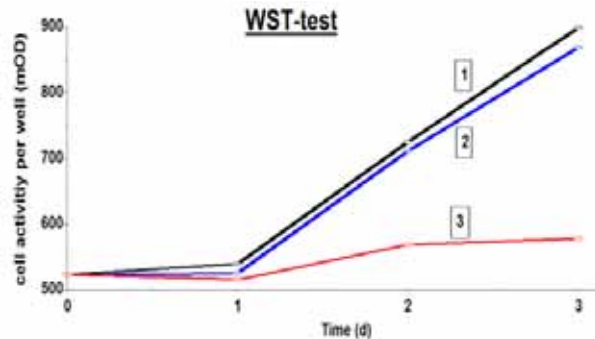


図 4: WST検査で測定された細胞活性。薬物添加のないウェル(1)、5 μ Mシスプラチンのウェル(2)、10 μ Mシスプラチンのウェル(3)のデータ。

CASYセルカウントは投薬のないウェルで細胞数の一定の増加を生じ、一方薬物添加の二つのウェルでは細胞増殖の減少効果を示している。5 μ Mのシスプラチン添加のウェル内で細胞数の停滞があり、10 μ Mのシスプラチン添加のウェル内では僅かな減少がある。

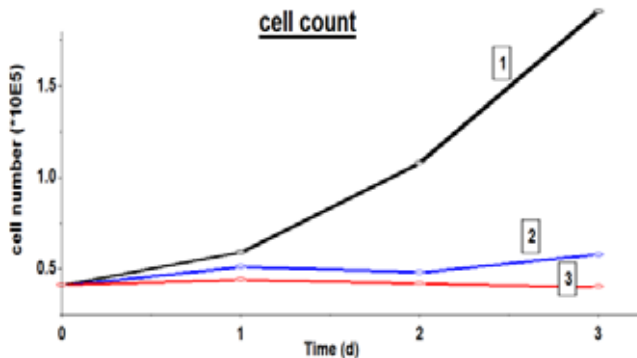


図 5: CASYで測定した細胞数。薬物添加のないウェル(1)、5 μ Mシスプラチンのウェル(2)、10 μ Mシスプラチンのウェル(3)の各データ

二つの方法は24時間以降、薬物添加とコントロール培養との間にはっきりとした違いを示している。

IV. 考察

今回の結果は標準の細胞分析とマルチパラメータセンサーチップによる今までにない検査方法を比較している。CASYによるセルカウントは

生き残っている細胞数によって薬物効果を評価しているが、一方WST検査はミトコンドリアの還元酵素の活力を決定する細胞培養の活動を測定している。提示されたセンサーチップは、細胞外酸化と呼吸をオンラインでリアルタイムに測定することで細胞エネルギー代謝の変化の測定ができる。全ての検査方法は、MCF-7細胞が5 μ M または10 μ M濃度のシスプラチンに反応することを示した。

CASYセルカウントの結果は、シスプラチンを添加したウェル内の細胞増殖の用量依存性の減少を示した。これは、シスプラチンが細胞分裂に破壊的な効果を持っていることと一致する。10 μ Mのシスプラチンのウェルは添加24時間後の細胞数の一定減少さえ示している。

CASY結果とは著しく異なって、WST検査は5 μ Mのシスプラチンでの細胞の減少効果を示唆していない。5 μ Mシスプラチンのウェルのミトコンドリアの還元酵素の活動はコントロール培養の活動に近く、10 μ Mシスプラチンのウェルだけが薬物添加後に活動増加を抑えられることを示す。この効果はまだ説明できないが、活性/細胞の計算は、シスプラチン濃度の増加により一つの細胞活性の用量依存性減少を明らかにする(データは示されていない)。

センサーチップによるリアルタイム測定はMCF-7細胞の試験薬の用量依存性を説明する。15時間の遅延後、シスプラチンを与えられた細胞培養は細胞外酸化率を減らし、一方コントロール培養の酸化率は増加し続けた。これは既に文献に見られる代謝速度論[6]に一致している。WST検査データと比較して、5 μ Mの培養とコントロール培養の活動にははっきりとした違いがある。また、IDESセンサーは細胞数の減少を示す表面被覆率の減少を示している。

V. 結論

シスプラチンによるMCF-7細胞の知られている感受性と用量依存性効果は3つの検査方法全てで示すことができただろう。24時間毎に行われた二つの標準検査に比べて、マルチパラメトリックセンサーチップはリアルタイムで個々の細胞培養

をオンラインモニターできる。従って、化学療法薬の最初の効果を15時間後にはすでに認識することができた。

センサーチップ検査システムは化学療法薬スクリーニングや環境モニタリングのような様々な利用に適した道具である。将来の応用の大きな目標の一つは個別化した癌治療である。個人毎の癌生検材料を使った化学療法剤感受性予測分析が不必要な化学療法治療を回避し、化学療法開始に先立って、より効果的な選択を可能にすることができるだろう。

謝辞

cellasys GmbHとHP Me-dizintechnikの協力を感謝申し上げます。

引用文献

1. B. Wolf et al. (1998) Biofunctional hybrid structures – cell-silicon hybrids for applications in biomedicine and bioinformatics. *Bioelec-trochemistry and Bioenergetics*, 46, 215-225
2. M. Kraus, B. Wolf (1996) Implications of Acid Tumor Microenvi-ronment for Neoplastic Growrh and Cancer Treatment: A Computer Analysis. *Tumor Biology*, 17, 133-154
3. J. Wiest, T. Stadthagen et al (2006) Intelligent Mobile Lab for Me-tabolics in Environmental Monitoring. *Analytical letters*, 39: 1759-1771
4. J. Wiest, M. Brischwein et al. (2005) Planar Microsensors for Mea-surement of Cellular Respiration. *SENSOR 2005 Proceedings II*, 249-254
5. J. Ressler et al. (2004) New concepts for chip-supported multi-well-plates: Realization of a 24-well-plate with integrated impedance-sensors for functional cellular screening applications and automated microscope aided cell-based assays, *Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBC*; 2074-2077
6. A. M. Otto, M. Brischwein, E. Montrescu, B. Wolf (2004) Analysis of Drug on Tumor Cell Metabolism Using Electronic Sensor Chips. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, 337, 682-686

Author: Marlies Zottmann
 Institute: TU München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für medizinische Elektronik
 Street: Theresienstr. 90
 City: 80333 München
 Country: Germany
 Email: zottmann@tum.de

訳注

FCS: Fetal Calf Serum ウシ胎仔血清

WST-1 解析: テトラゾリウム塩 WST-1 を使用した細胞増殖の解析法。WST-1 は生細胞においてのみホルマザンに分解される。ホルマザン色素量を吸光度計によって測定することにより、生細胞数を定量的に解析する。

酵素反応や、NADH または NADPH との直接の作用により、テトラゾリウム塩が還元を受けると対応するホルマザン色素が生成する。酵素活性の検出に有用であることから、ホルマザン色素はしばしば細胞増殖能や毒性のテストに使用される。

翻訳に当たって

幾つかの用語はカタカナ表記でそのまま使っている。これは用語としてそのまま通用していて適訳がないため。

well ウェル: 培養プレートの窪みが井戸のようになっているから。穴

cell count 細胞数のカウントはセルカウントとした。

confluence コンフルエンス: 培養細胞が接着面いっぱいに広がる状態を指している。

formazan ホルマザン

単位はカタカナ表記にせず、そのまま用いた。

μ M マイクロモル

nm ナノメートル

mm ミリメートル

μ マイクロリットル