

3S12a05 ラマン分光イメージングによる単一細胞生活性の *in vivo* 非侵襲分子レベル解析

○濱口 宏夫
(東大院・理・化学)

物理化学と生命

Schrödingerは1944年に出版された「What is life」と題する小編の書き出しで「生命体の中で起こる時空間的事象は物理と化学によってどう説明されるのだろうか」と述べている。物理と化学の論理で明快に説明できる可能性が高いのは、分子から最も近い階層にあり、かつ生命の最小単位である細胞中の生命事象であろう。本講演で紹介するラマン分光は、生きた単一細胞を何の手を加えることもなくあるがままに時空間分解計測し、そこで起こる生命事象を分子レベルで詳細に研究することができる極めて有望な手法である。

細胞分裂の時空間分解ラマン分光

分裂酵母は、最も単純な真核細胞として、生命への新しい物理化学的アプローチを試みるうえで格好な材料である。現在最も標準的な共焦点顕微ラマン分光計は、時間分解能 100 秒、空間分解能 0.3 マイクロメートルでの測定が可能である。したがって、数時間の時間スケールで分裂して行く酵母細胞（長さ10 マイクロメートル、直径2マイクロメートル）中のオルガネラを空間分解し、かつその変化を時間分解して測定することが可能である。筆者らは、分裂中の分裂酵母の中央部分にレーザー光を集光し、分裂に伴う物質変化の様子を、染色等の操作なしに、*in vivo*、非侵襲かつ分子レベルで追跡することに成功した。

「生命のラマン分光指標」の発見

分裂酵母のラマンスペクトルには、既知の生体物質には帰属できない強いバンドがラマンシフト 1602cm⁻¹に観測される。GFPでミトコンドリアを標識した酵母を用いてラマンマッピングの実験を行った結果、このバンドを与える分子種はミトコンドリア内に存在することが証明された。またこの 1602cm⁻¹ のバンドは、酵母が好適な環境下で高い活性を持つときには強く、飢餓条件など劣悪な環境下では弱くなり、細胞が死ぬと消失することがわかった。そこで、筆者らは1602cm⁻¹のバンドを「**生命のラマン分光指標**」と呼んでいる。このバンドを与える分子種はまだ特定されていないが、いくつかの間接的証拠から、代謝過程に存在する未知の反応中間体である可能性が高いと考えている。

ダンシングボディーの出現と飢餓条件下での出芽酵母の自然死過程

飢餓状態に置かれた出芽酵母の液胞には、Dancing Body (DB) と呼ばれる顆粒が時折出現し、激しく動き回ることが知られていた。筆者らは、いったん液胞内にDBが出現すると、その後液胞が潰れ細胞内が無秩序になり、最終的に細胞死に至ることを見出した。その過程で、DBが出現すると同時に「生命のラマン分光指標」が消失し、代謝活性が急速に失われることを明らかにした。またDBの出現、「生命のラマン分光指標」の消失の直後に栄養を与えると、DBが急速に消滅し、「生命のラマン分光指標」が復活することも見出した。これらの結果はDBの出現と「生命のラマン分光指標」の消失が何らかの因果関係で結びつけられていることを示している。DBのラマンスペクトルは、ポリリン酸結晶のスペクトルと酷似しており、その生成、消滅が液胞内におけるリン酸濃度の変化と関連していることは確実であるが、それがミトコンドリア内の代謝活性とどのように相関しているのか興味深い。またDBが出現した後、どの段階まで代謝活性の復活が可能なのか、細胞の生死の境界は存在するのか、また存在するとしたらがどのように定義されるのかも大変深遠で興味ある問題である。

生命を測り、定量化する物理化学

生命の最小単位である細胞中の事象を時間と空間を分解してあるがままに計測し、それを定量的に議論する物理化学が始まっている。生命の仕組みを分子レベルで解明する新しい科学として、その成果が待たれる。

In vivo, non-invasive and molecular-level diagnostics of single cell viability by Raman spectroscopic imaging

○Hiro-o Hamaguchi
(Department of Chemistry, The University of Tokyo)

Key words Raman spectroscopy, viability, fission yeast, budding yeast

3S12a06 Microcavity array を用いた細胞集積化技術と単一細胞解析への応用

○松永 是
(東農工大・工・生命工)

【目的】細胞集団の動態を明らかにする“Single-cell analysis(単一細胞解析)”は、組織、器官などのより高い階層での生命現象を理解するための次世代の研究アプローチに位置づけられるようになった。細胞集団の動的遷移を解析するためには、細胞集団中の個々の細胞を網羅的に解析するアプローチが必須である。フローサイトメーターは、細胞性免疫検査やリンパ球サブセット検査などの細胞集団の網羅的解析手法として汎用的に利用されているが、個々の細胞状態の経時変化を追跡することは原理上不可能である。個々の単一細胞の経時的な変化を解析するためには、個々の細胞を平板基板上に規則的に配置し、アドレッシング可能な状態に置いた上でイメージングする方法が優位である。これらの要求に対し、我々は単一細胞を高密度に集積することが可能な Microcavity array の開発を行っており、イメージング技術と組み合わせた非侵襲な単一細胞解析の実現を目指している。

【実験方法及び結果】レーザー加工によってpolyethylen terephthalate基板上に100×100のアレイ状の微細貫通孔を配したMicrocavity arrayを作製した。このMicrocavity arrayとpoly(dimethylsiloxane)で作製したマイクロ流路を統合し、単一細胞集積デバイスを構築した。本デバイスに細胞懸濁液を導入後、Microcavity arrayを介して1分間の吸引操作を行うことで、導入した全細胞の約90%を捕捉し、微細孔上に規則的に配列化することが可能であった。本デバイスは各微細孔下方から陰圧を付加することで、物理的に細胞をトラップするものであり、細胞への侵襲性の少ない細胞捕捉法を採用している。また、非接着性の細胞、例えば血液細胞なども規則的に基板上に捕捉し保持することが可能であり、単一細胞を高密度に集積化することによって、撮像・解析の迅速化・簡易化が実現できる。本細胞捕捉技術の応用として、細胞捕捉後にマイクロ流路内の液交換を連続的にを行い、捕捉細胞に対してfluorescence *in situ* hybridization (FISH)を行う手法を開発した。本手法により、血清供給条件と血清飢餓条件で培養した細胞におけるβ-actin mRNA 発現量の変動を単一細胞レベルで明らかにすることが可能であった。さらに、本デバイスの高い細胞捕捉効率を利用することで、生体サンプルからの希少細胞検出への応用も行っている。ヒト末梢血単核球を微細孔アレイ上に網羅的に捕捉し、蛍光イメージングにより個々の細胞の免疫表現型を解析することにより、ヒト末梢血単核球の約0.1%に当たる造血幹細胞(CD34⁺細胞)を検出することが可能であった。以上のように、数万レベルの細胞を捕捉できる細胞マイクロアレイを実現しており、本技術は非侵襲な単一細胞解析の実現を支える基盤技術の一つとなると考えられる。

Cell entrapment technique using microcavity array and its application for single-cell analysis

○Tadashi MATSUNAGA
(Dept. Biotech., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

Key words single-cell analysis, non-invasive analysis, rare cell, mRNA