

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19550082
 研究課題名（和文） プローブ光の偏向を利用した化学物質の細胞への毒性の迅速判定技術の確立
 研究課題名（英文） Establishment of a Fast Diagnosis Technique for Toxicity of a Chemical to Cells by Deflection of a Probe Beam
 研究代表者
 吳 行正（Wu Xing-Zheng）
 福井大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号： 70234961

研究成果の概要： 化学物質の生体への毒性は今まで人間への被害報告で分かったものが多いが、現在動物実験あるいは *in-vitro* 細胞培養実験で研究されるようになった。一方、ある化学物質が細胞に対して強い毒性を示す場合、その化学物質の存在により生存細胞が死滅したりするので、細胞膜近傍を通すプローブ光の偏向信号が大きく変化する。本研究はこの発想に基づいて、プローブ光一本で化学物質の細胞への毒性を判定する方法を開発した。ヒト肝臓由来の HepG2 細胞に対して 330～370nm の紫外線が強い殺傷力を持つことを明らかにした。また、アルコール及び過酸化水素の毒性も検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 複合化学

科研費の分科・細目：分析化学

キーワード：細胞、計測、化学物質の毒性、プローブ光、偏向

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、世界で使用されている人工化学物質の総数だけでも、1000万種類を超えているといわれ、しかも、その数は年々増加している。しかし、その殆どの化学物質の生体への毒性は明らかにされていない。化学物質の生体への毒性は今まで人間への被害報告で分かったものが多いが、現在動物実験あるいは *in-vitro* 細胞

培養実験で研究されるようになった。

(2) 一方、細胞培養実験及び細胞増殖に対する阻害活性実験では、細胞の生死判別が最も重要なことで、それにより、細胞の生存率あるいは生細胞の密度が求められ、更に化学物質の毒性も検討される。現在細胞の生死判別は色素で染色に基づく分染法や、蛍光標識に基づくフローサイトメトリー等がある。これらの方法は細胞

に染色剤で反応させたりするので、何なかの影響あるいは損傷を細胞に与えている。

- (3) 一方、一方、化学反応過程で生じた物質変化及び反応熱が濃度勾配、温度勾配を引き起こし、この濃度勾配及び温度勾配がさらに屈折率勾配を誘起する。申請者はその屈折率勾配をプローブ光の偏向で測定、解析することにより、化学反応を計測できると考え、化学反応の新規 in-situ 計測法を開発してきた。さらにこの手法を単一細胞・生体組織の計測に応用し、プローブ光一本で細胞の生死判定、物質輸送のモニタリングに応用できることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

ある化学物質が細胞に対して強い毒性を示す場合、その化学物質の存在により生存細胞が死滅したり、細胞膜内外の物質輸送が著しく変化したりするので、細胞膜近傍を通すプローブ光の偏向信号が大きく変わるはずである。従って、プローブ光の偏向信号をモニタリング、解析することにより、化学物質の細胞への毒性を迅速に判別できると考えられる。本研究はこの発想に基づいて、単一細胞の細胞膜近傍を通すプローブ光の偏向を測定することにより、化学物質の細胞への毒性を迅速的に判定しようとしている。

3. 研究の方法

- 1) 単一細胞のビーム偏向測定：ヒト肝臓細胞 HepG2 を自作したビーム偏向測定系に設置し、その偏向信号を測定した。
- 2) 細胞生死の従来判定実験：細胞をトリパンブルーで染色し、死亡率を判定した。
- 3) 細胞成分の同定定量を目指すキャピラリー電気泳動分析も行った。
- 4) 人工肝臓にもしばしば用いられる HepG2 細胞を培養液（10% FBS、DMEM）で培養した。

4. 研究成果

- 1) 紫外線の細胞に対する殺傷力の検討：紫外可視光の HepG2 細胞への殺傷力を検討した。

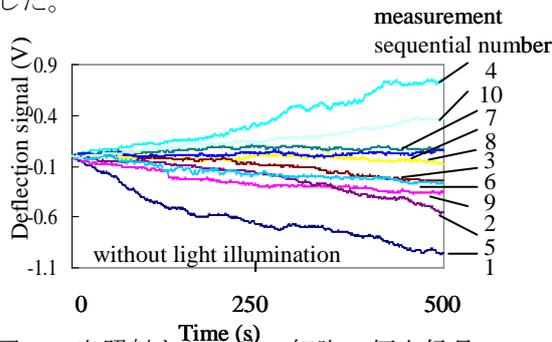


図1 光照射なしの時の細胞の偏向信号

図1には光照射せずに、培養した直後の HepG2 細胞の偏向信号を示した。明らかに細胞によって偏向信号の時間変化が異なる。これは個々の細胞の挙動が異なることを反映していると考えられる。

図2には、370nm以上の紫外可視光を10分間照射した後の細胞の偏向信号である。明らかに波長が370nm以上の光を照射しても、細胞は時間とともに変化する偏向信号を示し、生きていることを意味する。

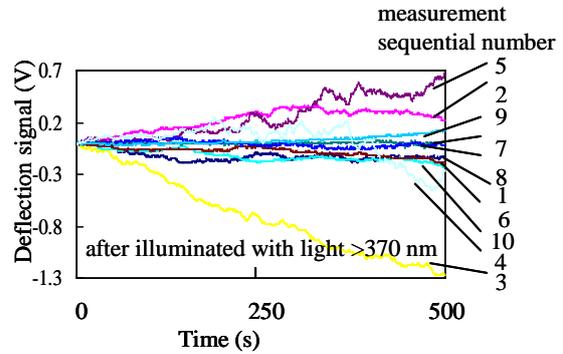


図2 波長が370nm以上の光を10分間照射後の細胞の偏向信号

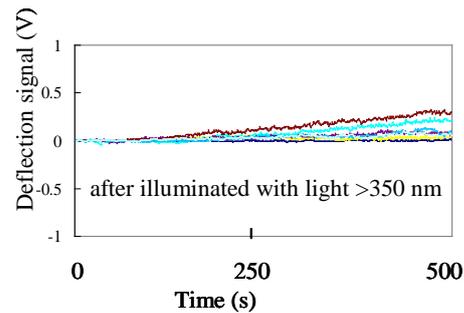


図3 波長が350nm以上の光を10分間照射後の細胞の偏向信号

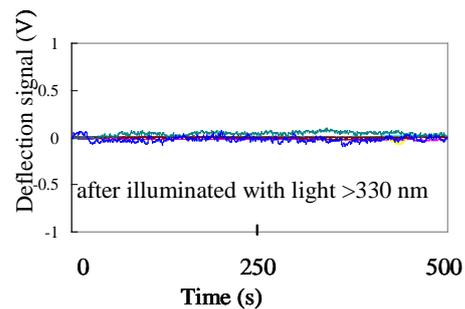


図5 波長が330nm以上の光を10分間照射後の細胞の偏向信号

一方、図3に示すように、波長が350nmの光を10分間照射すると、細胞の偏向信号の変化が小さくなった。また、図4に示すように、波長が330nmの光を10分間照射すると、細胞の偏向信号が変化しなくなった。即ち、細胞がすでに死滅したことを意味する。従って、波長が330~350nmの紫外線がこの細胞

に対して強い殺傷力を持つことが分かった。

2) 紫外線の連続照射時の殺傷力:

さらに、生きている細胞に紫外可視光を連続照射しながら偏向信号の変化をモニタリングできる測定系を作成した。高圧水銀ランプから 0.028W の紫外線を直径 5 cm の培養皿に照射し、その中の HepG2 細胞は大体 6000~9000 秒後死滅したことを明らかにした。また、細胞死滅する前に大きな偏向信号を示すことも分かった。

3) 過酸化水素の HepG2 細胞への毒性:

培養液に過酸化水素の濃度が 10^{-4} mol/L 程度になると細胞の生存率が低くなることが分かった。従来の培養実験で得た過酸化水素の毒性に関する知見は偏向測定法とほぼ一致した。

4) グルコースの添加による細胞の偏向信号の変化:

HepG2 細胞培養液にグルコースを添加すると、偏向信号が大きくなり、細胞膜内外の物質輸送がより大きくなっており、細胞の活性が高くなっていることを示唆した。

5) アルコールの肝臓細胞への毒性

一方、培養液に 30% のアルコールを添加すると HepG2 細胞が即死となり、10% のアルコールを添加しても細胞の生存率が大きく減少したことがビーム偏向信号から分かった。

6) 細胞膜輸送物質の同定と定量を目指すキャピラリー電気泳動分析法の開発:

細胞内蛋白質の定量を目指す等電点電気泳動実験も行い、微量蛋白質を測定できるキャピラリー電気泳動法も開発した。また、光照射により発生した活性酸素の化学発光測定法も検討した。

以上の結果から、本法は化学物質の細胞への毒性判定に利用できることを明らかにした。また、今後キャピラリー電気泳動分析と結合することにより、毒性物質の細胞内への輸送についても定量的に検討できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Optical Beam Deflection Approach for Studying Ion-exchange Reactions Occurring at a Single Ion-exchange Resin Particle, Xing-Zheng Wu, Yumiko Tsuji, Norio Teramae, Reactive and Functional Polymers, 67, 113-119 (2007). 査読有
- ② Hazard Identification on a Single Cell

Level Using a Laser Beam, Xing-Zheng Wu, Tomohisa Kato, Yumiko Tsuji, Satoshi Terada, Anal. Chem. Insight, 2, 119-124 (2007). 査読有

③ Study of Protein-Protein Binding Reaction by Whole Column Fluorescence Imaged Capillary Isoelectric Focusing, Xing-Zheng Wu, Shinya Asai, Yoshie Yamaguchi, Electrophoresis, in press (2009). 査読有

④ Chemiluminescence from Luminol Solution after Illumination of a 355 nm-Pulse Laser, Lingyue Min, Xing-Zheng Wu, Luminescence, in press (2009)

⑤ キャピラリー電気泳動分析の新規キャピラリー内濃縮法の開発 (総合論文)、呉 行正、分析化学、57、77-90 (2008)、査読有

⑥ A Simple Transmitted Interference Method for Nano-volume Detection, Cong Dai, Xing-Zheng Wu, Chem. Lett., 36, 1334-1335 (2007), 査読有

⑦ On-capillary Chemiluminescence Detection for Capillary Electrophoresis with a Single Capillary, Cheng-Jie ZHANG, Xing-Zheng WU, Anal. Sci., 23, 743-746 (2007), 査読有

⑧ Capillary Electrophoresis with In-capillary Solid Phase Extraction Sample Clean-up, Luo-Hong Zhang, Xing-Zheng Wu, Anal. Chem., 79, 2562-2579 (2007), 査読有

⑨ Time-resolved Chemiluminescent Study of the TiO₂ Photocatalytic Reaction and Its Induced Active Oxygen Species, Lingyue Min, Xing-Zheng Wu, Tetsuya Shimada, Haruo Inoue, Luminescence, 22 (2), 105-112 (2007). 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① X.-Z. Wu, T. Kato, S. Terada, Noninvasive Diagnosis of a Single Cell with a Laser Beam, Pittcon 2008, 2008. 3. 4, New Orleans (USA).
- ② X.-Z. Wu, S. Asai, Study of Protein-Protein Interaction by Capillary Electrophoresis and Whole Column Imaged Capillary Isoelectric Focusing, Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separation and Analysis, 2007. 12. 17, シンガポール
- ③ 加藤 智久, 寺田 聡, 呉 行正, 単一細胞の非侵襲的なビーム偏向測定及び化学試薬の細胞への毒性の研究, 日本分析化学会第 56 年会, 2007. 9. 10, 徳島
- ④ 戴 ちよん, 呉 行正, キャピラリー干渉検出法の開発, 日本分析化学会第 56 年

会, 2007. 9. 10, 徳島

- ⑤ 張 洛紅, 吳 行正, In-Capillary 固相抽出—キャピラリー電気泳動法の開発, 日本分析化学会第 56 年会, 2007. 9. 10, 徳島
- ⑥ 浅井 真哉, 山 啓介, 吳 行正, 全カラムイメージングキャピラリー等電点電気泳動法によるタンパク質とナノ粒子の相互作用の研究, 日本分析化学会第 56 年会, 2007. 9. 10, 徳島
- ⑦ 加藤 智久, 寺田 聡, 吳行正, 化学物質の細胞への毒性の光偏向判定法, 第 69 回日本分析化学討論会, 2008. 5. 20, 名古屋

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吳 行正 (Wu Xing-Zheng)
福井大学大学院工学研究科准教授
研究者番号 : 70234961

(2) 研究分担者

寺田 聡 (Terada Satoshi)
福井大学大学院工学研究科准教授
研究者番号 : 60311685