

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：32407  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22510125  
 研究課題名（和文） 活性酸素による酸化ストレス評価用マイクロアレイチップの研究  
 研究課題名（英文） Study of Microarray Chips to Evaluate Oxidative Stress Induced by Reactive Oxygen Species  
 研究代表者  
 伴 雅人（BAN MASAHITO）  
 日本工業大学・工学部・教授  
 研究者番号：70424059

## 研究成果の概要（和文）：

インクジェット法にて作製したフラーレン C<sub>60</sub> 結晶微粒子の 3 次元構造体をマイクロウェル内部に形成し、可視光照射により活性酸素の生成が可能な「活性酸素発生源」をもつ PDMS 製マイクロアレイチップを試作した。このチップを用いた細胞培養試験により、活性酸素による細胞毒性の定量的な評価が可能であることを実証することで、細胞の酸化ストレス応答性を評価するためのデバイスを構築した。

## 研究成果の概要（英文）：

The crystalline C<sub>60</sub> particles were three-dimensionally synthesized into microwells using an ink-jet method, and the PDMS-based microarray chips with reactive oxygen species (ROS) generation sources, which generate ROS under visible light irradiation, were fabricated. The cell culture tests using the microarray chips revealed that cytotoxicity induced by ROS was quantitatively evaluated, resulting in creation of the devices to evaluate cellular response to oxidative stress.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：プラズマ工学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・マイクロ・ナノデバイス

キーワード：フラーレン、インクジェット、マイクロアレイチップ、活性酸素、酸化ストレス、細胞毒性

## 1. 研究開始当初の背景

生体内で発生する O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> などの活性分子種である活性酸素（ROS）が、感染、炎症、癌、動脈硬化、糖尿病、アルツハイマー病など様々な疾病の原因となることが示唆されている。そして、これらの疾病は、活性酸素

による生体分子の過剰な酸化反応（酸化ストレス）によりもたらされることが明らかにされてきた。しかしながら、現状においても、酸化ストレスに対する細胞の応答性については不明な点が多く残されている。例えば、酸化ストレスが発癌を誘発するとしながら

も、活性酸素がどのタンパク質や遺伝子に損害を与えているかほとんど明らかになっていない。また、近年、活性酸素が生理的なシグナル伝達機能を発揮し、細胞保護、細胞分化増殖、細胞死の制御などを司ることが明らかにされてきており、活性酸素研究は、疾病の診断・予防・治療法の確立に極めて重要な課題となっている。

このような中、研究代表者らは、可視光照射によって活性酸素を効率良く生成する  $C_{60}$  フラーレンに着目し、 $C_{60}$  を扱いやすい結晶微粒子として基材表面に固定化する方法を検討してきた。そして、インクジェット法を用いてサブ  $\mu\text{m}$  径レベルの針状の  $C_{60}$  結晶微粒子が3次元的に固定化された膜を形成させ、この膜が可視光照射により活性酸素を生成する能力を持つことを、蛍光プローブ法にて示してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、この  $C_{60}$  結晶微粒子を使い、生体物質には影響を及ぼさない可視光の照射にて活性酸素の生成制御が可能な「活性酸素発生源」を作製する。そしてこの具体的な応用として、活性酸素発生源をマイクロウェル内底部に封入した PDMS (ポリジメチルシロキサン) 製のマイクロアレイチップを試作し、可視光照射により生成制御した活性酸素により培地内の細胞などの酸化ストレスに対する応答性を評価するシステムを構築する。

## 3. 研究の方法

### (1) $C_{60}$ 結晶微粒子の形成

インクジェット式超微量スポッタ (インクジェット装置) を用い、 $C_{60}$  と PMMA を溶解したトルエン溶液を吐出し、PDMS 上に  $C_{60}$  結晶微粒子の形成実験を行った。インクジェットの吐出条件として、一回の吐出滴数および合計滴数を変化させた。

### (2) 可視光照射による活性酸素生成評価

2種類の蛍光色素 (DCF-DA および DHE) を用いた蛍光プローブ法により、活性酸素生成評価を行った。蛍光色素溶液を入れた石英セルに、 $C_{60}$  結晶微粒子を形成させた PDMS 基板を浸漬させ、4h までグリーンレーザ (532nm) を照射または暗室下に置き、所定の時間に分光蛍光光度計にて蛍光強度を測定した。

### (3) 細胞毒性評価

ソフトリソグラフィ法にて、2種類の PDMS 製マイクロアレイチップを作製した。1つは、光照射源としてグリーンレーザを使用するチップ A であり、24個のマイクロウェルが作り込まれている。1つはグリーンLEDライトを使用することで  $C_{60}$  結晶微粒子が封入された96個のマイクロウェルすべてに光照射することができるチップ B であり、比較として、光照射される96個の  $C_{60}$  結晶微粒子無しのマイクロウェル、

および、 $C_{60}$  結晶微粒子が封入され暗室条件とされる96個のマイクロウェルも作り込まれている。それぞれのマイクロウェル中には、インクジェット装置を用いて  $C_{60}$  結晶微粒子を形成させた。

作製したマイクロアレイチップを使用し、HeLa (ヒト子宮頸部癌由来細胞) および C2C12 (マウス筋芽細胞) の細胞毒性評価を行った。チップはコラーゲン溶液に浸漬して細胞接着性処理をした後に、細胞浮遊液が入ったディッシュに3日間浸漬させ、マイクロウェル内で細胞培養を行った。その後、光 (グリーンレーザまたはグリーン LED) 照射および暗室下で最大 7h まで放置した。Live/Dead 試薬を使用し、細胞の死滅状態を蛍光顕微鏡にて観察評価した。

## 4. 研究成果

### (1) $C_{60}$ 結晶微粒子の形成

図1に、インクジェットの吐出条件を変化させて吐出し、形成された吐出痕の走査電子顕微鏡 (SEM) 観察結果を示す (一回の吐出滴数 - 合計滴数 : A:10-100, B:10-400, C:40-800)。全ての吐出痕から、 $\mu\text{m}$  レベルの針状および粒状の微粒子形成が確認された。B の条件では、より細かい針状微粒子が多く3次元的に形成されていることがわかる。C は、粒状でくっつき合い大きな微粒子を形成している。その他の吐出条件での結果も合わせて総合的に評価すると、一回の吐出滴数の増加に伴って微粒子が針状から粒状に変化し、PMMA の膜に埋もれる傾向が見られた。

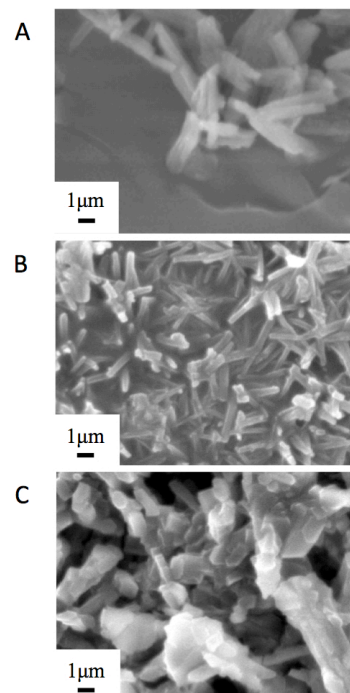


図1  $C_{60}$  結晶微粒子の SEM 観察結果

(2) 可視光照射による活性酸素生成評価

DCF-DA および DHE における蛍光強度測定値について、所定時間後の蛍光強度  $I$  を 0 h における蛍光強度  $I_0$  で規格化した  $I/I_0$  の時間変化として整理をした。その結果、 $C_{60}$  結晶微粒子を形成した PDMS 基板にグリーンレーザを照射させた場合の  $I/I_0$  が、暗室に置いた場合よりも大きいサンプルが認められ、活性酸素が生成されたことが示された。DCF-DA および DHE 双方でこのような差が認められ、 $C_{60}$  結晶微粒子は、それぞれ過酸化水素およびスーパーオキシドを産生する能力があることが明らかとなった。

図 2 に、(a) DCF-DA および (b) DHE を用いて測定した蛍光強度比と一回の吐出滴数および合計滴数との関係を示す。蛍光強度比は、照射の  $I/I_0$  の増加率を暗室の  $I/I_0$  の増加率で除した値である。測定の結果、蛍光強度比は、DCF-DA および DHE ともに一回の吐出滴数 10 滴および合計滴数 400 滴のときに最も大きいことがわかった。また、その付近も蛍光強度比が大きいことから、一回の吐出滴数が少なく、合計滴数 400 滴付近が活性酸素を生成しやすいことが示唆された。図 1B の SEM 結果から、この条件で形成された微粒子はより細かく針状で、3 次元的に形成されていることがわかる。

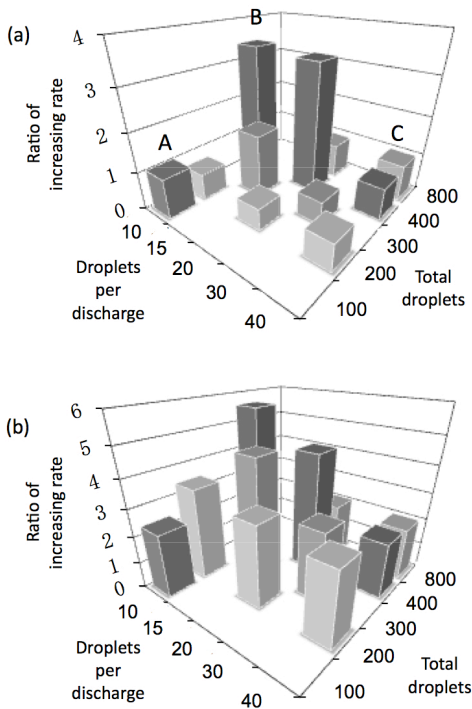


図 2 各条件における蛍光強度比

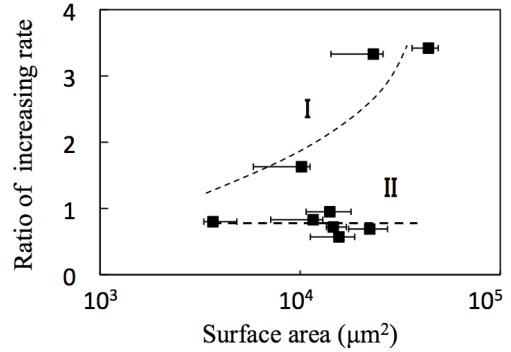


図 3 微粒子表面積と蛍光強度比との関係

図 3 に、DCF-DA による評価において  $C_{60}$  結晶微粒子の表面積と蛍光強度比との関係を示す。 $C_{60}$  結晶微粒子の表面積は、以下の手順で計算した。1 回の吐出量 (直径  $20 \mu\text{m}$  と仮定) と合計滴数の積から全吐出量が計算され、その全吐出量と溶液のフラーレン濃度から PDMS 上に形成されたフラーレンの重量が計算された。次に、SEM から得られた  $C_{60}$  結晶微粒子の寸法とフラーレン結晶の密度より、 $C_{60}$  結晶微粒子 1 個の重量が得られた。吐出された溶液中の全ての  $C_{60}$  が析出したと仮定して、吐出されたフラーレンの重量および 1 個の重量から PDMS 上に形成された  $C_{60}$  結晶微粒子の個数が求められ、1 個の  $C_{60}$  結晶微粒子の表面積から PDMS 上に形成された  $C_{60}$  結晶微粒子の全表面積が計算された。図から、I と II の傾向がみられ、I は、表面積が大きいと蛍光強度比も大きかったのに対し、II は、表面積に対し蛍光強度比はほぼ一定であった。I はより細かい微粒子がより多く 3 次元的に形成されていたが、II は PMMA 膜中に埋もれるように形成されていたことから、微粒子の露出している表面積が活性酸素生成に関係していると考えられる。

以上、活性酸素生成評価を行った結果、DCF-DA および DHE 双方で一回の吐出滴数 10 滴および合計滴数 400 滴で形成した微粒子が、もっとも活性酸素を生成していることがわかった。さらに、その付近で一回の吐出滴数が少ない方が活性酸素を生成しやすいことを確認できた。活性酸素を生成している微粒子は、針状で 3 次元的に形成されていた。また、露出した表面積が大きい場合に活性酸素が生成され、PMMA 膜中に埋もれて形成されている場合には生成されないことがわかった。

(3) 細胞毒性評価

図 4 に、作製されたマイクロアレイチップ A に形成された典型的なマイクロウェルの SEM 観察結果を示す。マイクロウェルは、対角線約  $300 \mu\text{m}$  で深さ約  $80 \mu\text{m}$  であり、その

周囲の壁下に  $C_{60}$  結晶微粒子が形成されていることが確認された。

このようなマイクロアレイチップAを用いて、HeLa細胞による細胞毒性評価が行われた。図5に、それぞれ3回ずつ実施した細胞毒性評価の試験結果として細胞の死亡率を示す。マイクロウェル内に  $C_{60}$  結晶微粒子を形成させ、グリーンレーザー照射および暗室状態にした場合と、 $C_{60}$  結晶微粒子を形成させず細胞培養させグリーンレーザー照射した場合のそれぞれ7hまでの結果となる。 $C_{60}$  結晶微粒子を形成しグリーンレーザーを照射した場合、細胞死亡率は7h後に50%以上となり、そのほかの2条件に関しては、10%以下の死亡率であった。この結果から、 $C_{60}$  結晶微粒子へ可視光を照射させることによって活性酸素が生成し、細胞が死滅したことを確認できた。

さらに、マイクロアレイチップBにてC2C12細胞の培養評価を行った。その結果、このチップBにおいても、 $C_{60}$  結晶微粒子が封入されたマイクロウェルにグリーンLEDライトを照射した場合に細胞の死亡率が高いことが確認された。このことから、グリーンLEDライトを使用し1枚の基板上で細胞培養評価が可能であることが確認され、細胞の酸化ストレス応答性を評価するためのシステムとしてこのチップが使用できることが実証された。

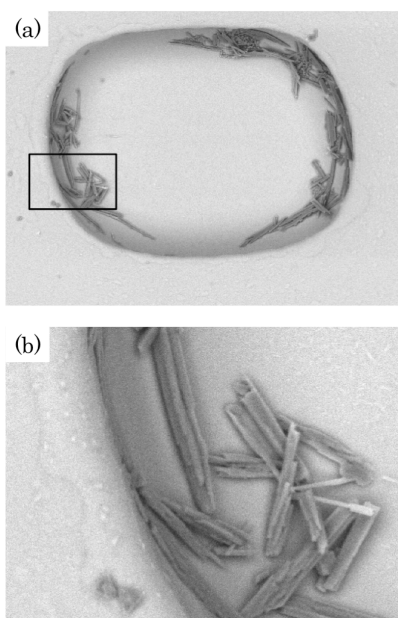


図4 マイクロウェルのSEM観察結果  
(b)は(a)の口部の拡大)

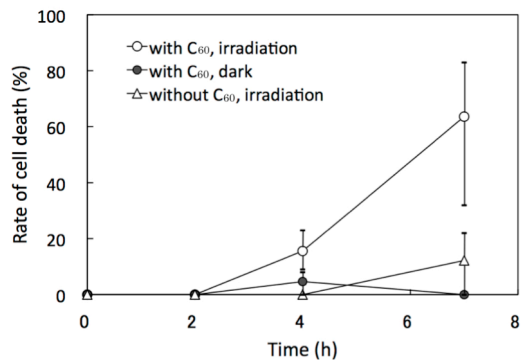


図5 細胞死亡率の経時変化

## 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8件)

1. “Cytotoxicity of photosensitizing crystalline  $C_{60}$  particles formed by ink-jet method,” M. Ban, Y. Kogi, F. Sasaki, J. Imaging Society of Japan, 51 (2012) 496-500, 査読有.
2. “Formation of photosensitizing crystalline  $C_{60}$  particles by ink-jet method,” M. Ban, F. Sasaki, World Journal of Nano Science and Engineering, 2 (2012) 110-115, 査読有, DOI: 10.4236/wjnse.2012.22014.
3. “Application of microstructures formed by plasma and ink-jet processing to cell culture,” M. Ban, 日本工業大学研究報告, 42, 2012, 87-88, 査読無.
4. “Application of inkjet-fabricated crystalline  $C_{60}$  particles generating reactive oxygen species under visible light irradiation to microarray chips,” M. Ban, 日本工業大学研究報告, 41, 2011, 73-74, 査読無.
5. “Crystalline  $C_{60}$  particle formation in PDMS-based microchamber by the ink-jet method,” M. Ban, 日本工業大学研究報告, 40, 2010, 55-56, 査読無.

[学会発表] (計10件)

1. “Control of cell death by green laser irradiation using PDMS-based microarray chip,” M. Ban, F. Sasaki, Y. Kogi, International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2012), Hsinchu, Taiwan, 2012-6-12, T-77.
2. “Application of microstructures

- formed by plasma and ink-jet processing to cell culture,” M. Ban, BIT’s 1<sup>st</sup> Annual World Congress of Nano Science & Technology 2011, Dalian, China, 2011-10-24, 154.
3. “Cytotoxicity of crystalline C<sub>60</sub> particles encapsulated in PDMS-based microwells by ink-jet method,” F. Sasaki, M. Ban, International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM) 2011, Seoul, Korea, 2011-6-2, T3-079.
  4. “Application of inkjet-fabricated crystalline C<sub>60</sub> particles generating reactive oxygen species under visible light irradiation to microarray chips,” F. Sasaki, M. Ban, The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$  TAS 2010), Groningen, Netherlands, 2010-10-5, ID0268.
  5. “Generation of reactive oxygen species by crystalline C<sub>60</sub> particles synthesized using the ink-jet method,” F. Sasaki, M. Ban, Carbon 2010 Extended Abstracts, Clemson SC, USA, 2010-7-13, ID277.
  6. “Photosensitizing crystalline C<sub>60</sub> particles encapsulated in PDMS-based microchamber by ink-jet method,” F. Sasaki, T. Hirose, M. Ban, International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM) 2010, Hong Kong, China, 2010-5-29, 134-135.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伴 雅人 (BAN MASAHITO)

日本工業大学・工学部・教授

研究者番号：70424059

### (2) 研究協力者

佐々木 扶紗子 (SASAKI FUSAKO)

日本工業大学・工学研究科・大学院生