

## 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24年6月1日現在

機関番号：37112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550076

研究課題名（和文）プローブ光の偏向と電気泳動法を用いた、単一細胞レベルでの酸化ストレスの計測

研究課題名（英文）Measurement of Oxidative Stress on a single cell level by the beam deflection method and capillary electrophoresis

研究代表者

呉 行正（WU XING-ZHENG）

福岡工業大学・工学部・教授

研究者番号：70234961

研究成果の概要（和文）：本研究は単一細胞レベルで酸化ストレスの計測を目指していた。まずプローブ光の偏向測定法で単一細胞の過酸化水素のような酸化ストレス応答を測定した。次に、自作したキャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出法により単一細胞内の活性酸素を定量した。さらに、ルミノール化学発光法による細胞中の活性酸素の定量も行った。培養した HeG2 細胞をモデル細胞として検討した。

研究成果の概要（英文）：This research aimed at developing a novel method for measurement of oxidative stress in a single cell. Firstly, behavior of a single cell before and after an oxidative stress such as by addition of a hydrogen peroxide solution was monitored and compared by the deflection method of a probe beam. Then, analysis of active oxygen species in cells was carried out by a home-made capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection system. The luminol-chemluminescence method was further used for quantitative analysis of active oxygen species in cells. HeG2 cell was cultured and used as a model cell sample.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：計測、細胞、酸化ストレス、活性酸素、プローブ光の偏向、電気泳動、化学発光

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは生体内で生成する活性酸素群の酸化損傷力と生体内の抗酸化システ

ムの抗酸化ポテンシャルとの差として定義されている（日本抗酸化学会）<sup>1)</sup>。活性酸素群は、本来、エネルギー生産や侵入異物攻撃などに際して生産される有用なものである

が、生体内の抗酸化システムで捕捉しきれない余剰な活性酸素群が生じる場合、生体の構造や機能を担っている脂質、蛋白質・酵素、DNA等を酸化し損傷を与え、病気を引き起こし、老化が早まり、癌や、生活習慣病になりやすくなると言われている<sup>1)</sup>。従って、生体内の活性酸素及びそれによる酸化ストレスの計測は極めて重要である。

酸化ストレスの測定は、ESR法、化学発光法、電気化学法などで血液、尿、唾液などの生体試料中の活性酸素（ヒドロキシルラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）、スーパーオキシドアニオン（ $\text{O}_2^-$ ）、過酸化水素（ $\text{H}_2\text{O}_2$ ）等）の濃度あるいは量を測定することによって行われている<sup>2)</sup>。しかしながら、従来の測定法では、試料中の活性酸素種の総量しか測定できない。最近、蛍光プローブや微小電極等を利用して単一細胞を対象とした活性酸素種の測定研究も行われているが<sup>3,4)</sup>、単一細胞レベルでの酸化ストレスの研究は始まったばかりで、これから人類にとって大きな研究課題となっている。

一方、申請者は化学反応過程で生じた濃度勾配、温度勾配をプローブ光の偏向を用いて測定、解析する新規 in-situ 偏向計測法を開発し<sup>5-6)</sup>（その成果により日本分析化学会1999年度奨励賞を受賞）、近年さらに単一細胞の計測へ応用した<sup>7-8)</sup>。

生きている細胞なら、細胞膜内外の物質輸送が必ず発生する。例えば、細胞内へ栄養分を取り込んだり、細胞外へ老廃物を放出したりしている。この物質輸送により、細胞膜近傍での濃度勾配、屈折率勾配の変化を引き起こし、細胞膜近傍を通すプローブ光の偏向を誘起する。もう一方、死亡している細胞なら、このような積極的な物質輸送をないので、プローブ光の偏向信号が無い。申請者はこの独自の発想に基づいて、プローブ光一本でヒト由来肝臓細胞 HepG2 を非侵襲的に測定し、過酸化水素のような物質の細胞への毒性を単一細胞レベルで迅速的に判定できることが分かった。

一方、このプローブ光の偏向法は細胞内活性酸素の定量ができない。そこで、本研究は酸化ストレスによる細胞の応答を偏向法で非侵襲的に測定すると同時に、キャピラリー電気泳動法（CE）を併用することにより単一細胞内の活性酸素も定量し、細胞内活性酸素の濃度と酸化ストレス応答との関係を明らかにすることを目的としている。

## 2. 研究の目的

- (1) キャピラリー電気泳動法で単一細胞内の  $\text{O}_2^-$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  の定量法を確立する。
- (2) 単一細胞内の活性酸素濃度とプローブ光の偏向信号との関係を明らかにし、偏向信号で酸化ストレスを評価できるか

どうかを明らかにする。

- (3) 紫外線照射により細胞内  $\text{O}_2^-$  と  $\text{H}_2\text{O}_2$  等の活性酸素の発生を定量的に検討し、紫外線強度と発生した活性酸素の濃度との関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 細胞培養：ヒト肝細胞株 HepG2 を使い、5% ウシ胎児血清を含有させた Eagle's MEM 培地（FBS-MEM）に培養した。
- (2) 酸化ストレスによる細胞応答の偏向測定：培養した HepG2 細胞を自作したビーム偏向測定系に設置し、その偏向信号を一定時間（10分間）測定した。その後、一定濃度の過酸化水素を添加し、細胞の偏向信号の変化をモニタリングした。
- (3) 単一細胞のキャピラリー注入、及び電気泳動分析による活性酸素の定量：単一細胞のキャピラリー内への注入は顕微鏡下で見ながらXYZマイクロステージから作られるマニピュレーターで行い、その後、キャピラリーの両端に20kVの高電圧を印加し、自作のキャピラリー電気泳動-レーザー誘導蛍光検出を行った。

## 4. 研究成果

- (1) 酸化ストレスによる細胞応答の偏向測定

自作してきたビーム偏向測定系で単一細胞の偏向信号を測定する。測定は細胞培養条件（5%  $\text{CO}_2$  の雰囲気、温度が  $37^\circ\text{C}$ ）下で行う。酸化ストレスは①紫外線照射処理、②過酸化水素の処理等の方法で細胞内に活性酸素を発生させ、それによる細胞の酸化ストレス応答は偏向信号でreal time でモニタリングした。紫外線の照射量、照射時間の細胞への殺傷力を詳しく検討した。また、添加した過酸化水素の濃度が  $10^{-3}\%$  程度のなると細胞は即死することも明らかにした。

- (2) 単一細胞のキャピラリー内への注入方法の検討

単一細胞のキャピラリー内への注入は顕微鏡下で見ながらXYZマイクロステージから作られるマニピュレーターで（自作）行えることを明らかにした。一方、細胞はキャピラリー内壁へ吸着しやすいため、再現性がある単一細胞の注入は難しいことを明らかにした。今後、再現性がある単一細胞の注入には、細胞の吸着を防げるキャピラリー内壁の表面処理が必要である。

### (3) キャピラリー電気泳動(CE)ーレーザー誘導蛍光検出系の作製

単一細胞内の $O_2^-$ と $H_2O_2$ の濃度はあまり高くないので、検出は最も高感度なレーザー蛍光検出法を用いる。励起用の光源として、半導体レーザー及びArレーザーを比較検討したところ、Arレーザーを用いた。蛍光は光電子増倍管及び関連する検出回路で測定した。光路は共焦点方式を用いた。また、キャピラリーのオンカラム方式、ポストカラム方式、さらにシースフロー方式のレーザー蛍光検出を検討した。結果として、シースフロー方式の方が検出下限が最も低かったことを明らかにした。ウラニンやローダミンBのような蛍光性試料なら、作製したキャピラリー電気泳動(CE)ーレーザー誘導蛍光検出系の検出下限は $10^{-8}M$ 程度であった。

また、キャピラリー内で蛍光誘導体化反応も検討したが、やはり再現性に問題があり、今後いかに再現性を向上することが課題である。

### (4) キャピラリー電気泳動(CE)ーレーザー誘導蛍光検出による細胞の測定

試作したCE-レーザー蛍光検出系により細胞中の過酸化水素や $O_2^-$ 等の活性酸素の測定を試みた。論文で報告された蛍光誘導体化試薬2',7'-dichlorofluorescein (DCF-H2)と過酸化水素や $O_2^-$ との反応性や、更に細胞中の活性酸素の測定を検討したところ、再現性があるデータを得ることができなかった。その原因はやはり細胞のキャピラリー内壁への吸着や、細胞の状態が常に変化していることが考えられる。

### (5) 細胞内活性酸素の化学発光測定法の検討

ルミノールなどの化学発光試薬を利用して、細胞内活性酸素の測定が可能かどうか検討した。結果として、現在50個程度のHepG2細胞中の過酸化水素は測定することができた。

また、培養した細胞を紫外線照射処理した後、偏向信号とルミノール化学発光信号を測定し、それらの相関関係も検討した。

化学発光法から、一個の細胞中の活性酸素の量は $10^{-15}mol$ と見積もることができた。

また、死んだ細胞に活性酸素の量が多いことも分かった。

### 参考文献：

(1) [http://www.jsa-site.com/sanka\\_storesu.htm](http://www.jsa-site.com/sanka_storesu.htm)

1

(2) 「酸化ストレスマーカー」、二木鋭雄・野口範子・内田浩二編、学会出版センター

(3) Cécile Batandier, E. Fontaine, Christiane Kériel, X. M. Lerverve. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 6, No 2, 2002 pp. 175-187

(4) Yue Sun, Xue-Feng Yin, Yun-Yang Ling, Zhao-Lun Fang, *Anal Bioanal Chem*, 2005, 382, 1472-1476

(5) X.-Z. Wu, H. Shindoh, M. Yamada, T. Hobo, *Anal. Chem.* 1993, 65, 834.

(6) X.-Z. Wu, 分析化学, 1996, 45, 55 (総合論文).

(7) X.-Z. Wu, S. Terada, *Biotechnology Progress*, 2005, 21, 1772

(8) X-Z. Wu, T. Kato, Y. Tsuji, S. Terada, *Anal. Chem Insight*, 2007, 2, 119-124.

### 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6件)

① キャピラリー電気泳動法による牛乳中のメラミン分析のための簡易試料前処理法の開発, 加藤 雄一、呉 行正、分析化学, 61, **419-423 (2012)**.

査読あり

<http://dx.doi.org/10.2116/bunsekikagaku.61.419>

② Ti/SnO<sub>2</sub>, Sb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, RuO<sub>2</sub>/α-PbO<sub>2</sub>/β-PbO<sub>2</sub> electrodes for pollutants degradation, Yinghan Zheng, Wenqiu Su, Shengying Chen, Xing-Zheng Wu, Xueming Chen, *Chemical Engineering Journal*, 174, **304-309 (2011)** 査読あり

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.035>

③ Comparison of Chemiluminescence from Luminol Solution and Luminol-TiO<sub>2</sub> Suspension after Illumination of a 355 nm Pulse Laser, Lingyue Min, Xueming Chen, and Xing-Zheng Wu\*, *Luminescence*, 25(5), **355-359 (2010)**

査読あり

DOI: 10.1002/bio.1153

④ Optical Sensing of Materials Movements Occurring at a Plant Surface with a Probe Beam Xing-Zheng Wu\*, Nakaoka

Toshiaki, Tomomi Inoue, Haruo Inoue, Sensors & Actuators: A. Physical., 155(2), 241-245 (2009).

査読あり

<http://dx.doi.org/10.1016/j.sna.2009.09.004>

- ⑤ マイクロチップ電気泳動分析用の凸型鋳型ガラス基板の簡易作製  
呉 行正\*, 後藤聡志, 内山一美, 分析化学, 58 (10), 909-913 (2009).

査読あり

<http://dx.doi.org/10.2116/bunsekikagaku.58.909>

- ⑥ Chemiluminescence from Luminol Solution after Illumination of a 355nm-Pulse Laser, Lingyue Min, Xing-Zheng Wu\*, Luminescence, 24, 400-408 (2009)

査読あり

DOI: 10.1002/bio.1126

[学会発表] (計 9 件)

- ① キャピラリー電気泳動分析による牛乳中のメラミンの測定, 加藤雄一、呉 行正, 日本化学会第 92 春季年会 2012. 3. 25-28、東京
- ② ビーム偏向法を利用した植物の光合成過程の新規計測法の開発, 呉 行正、中岡俊景、井上智美, 日本分析化学会第 60 年会, 2011. 9. 14-16, 名古屋大学
- ③ ルミノール化学発光法による細胞中の過酸化水素の測定, 酒井香子、荒井敦子、寺田聡、呉行正, 日本分析化学会第 60 年会, 2011. 9. 14-16, 名古屋大学
- ④ A noninvasive analytical method for a single cell with a probe beam (invited lecture), Xing-Zheng Wu, Satoshi Terada, ASIANALYSIS XI, the 11th Asian Conference on Analytical Sciences, 2011. 8. 23-26, Nanjing (China)
- ⑤ Noninvasive Diagnosis of a Single Dead/Alive Cell and Hazard Identification on a Single Cell Level Using a Laser Beam, Xing-Zheng Wu, Satoshi Terada, BIT' s 3rd Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells 2010, 2010. 12. 6, Shanghai (China).
- ⑥ ビーム偏向法による細胞の計測, 呉 行正、第 6 回ワークショップ 水を電子源とする人工光合成システムの構築、2010.

8. 7、東京

- ⑦ ルミノール化学発光法による細胞中の過酸化水素の測定, 呉 行正、水を電子源とする人工光合成システムの構築、2010. 8. 7、東京
- ⑧ 植物表面における物質輸送過程のビーム偏向計測法の開発, 中岡 俊景・久保田 充俊・井上智美・呉 行正, 日本分析化学会第 58 年会 2009. 9. 24, 北海道大学
- ⑨ Determination of bromide ion in TiO photocatalytically and radiolytically treated waste water containing hexabromocyclododecane, Xing-Zheng Wu, Shutarou Ishikawa, Keisuke Toriyama, Tomoaki Harii, Yoshio Katoh, Tetsuo Taniguchi, The 10th ASIAN CONFERENCE ON ANALYTICAL SCIENCES (ASIANALYSIS X), 2009. 8. 16, Kuala Malaysia

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

呉 行正 (WU XING-ZHENG)  
福岡工業大学・工学部・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