

オリゴチオフェンによる細胞の傷害

廣 田 敏

## オリゴチオフエンによる細胞の傷害

齋藤 敬

目次

|   |    |
|---|----|
| 第一章 序論 .....                              | 1  |
| 1-1 本研究の背景と位置付け .....                     | 1  |
| 1-2 関連研究の進捗状況 .....                       | 7  |
| 1-2-1 細胞への物質導入技術 .....                    | 7  |
| 1-2-2 光増感機構による細胞膜リン脂質連鎖過酸化反応 .....        | 9  |
| 1-2-3 光増感剤 .....                          | 10 |
| 1-3 本研究の目的と意義 .....                       | 15 |
| 1-3-1 実験の構成 .....                         | 15 |
| 1-4 本論文の構成 .....                          | 18 |
| 第二章 ビスアミノメチルオリゴチオフェンの基礎特性評価 .....         | 19 |
| 2-1 緒言 .....                              | 19 |
| 2-1-1 光増感作用の検討 .....                      | 20 |
| 2-1-2 原子間力顕微鏡による膜形状測定 .....               | 23 |
| 2-2 実験 .....                              | 24 |
| 2-2-1 試薬等 .....                           | 24 |
| 2-2-2 使用機器 .....                          | 24 |
| 2-2-3 BOT 吸収ピーク波長の測定 .....                | 25 |
| 2-2-4 水溶液中における解離定数の導出 .....               | 26 |
| 2-2-5 Trolox-C 酸化実験 .....                 | 27 |
| 2-2-6 真空蒸着膜の表面形状測定 .....                  | 27 |
| 2-3 結果 .....                              | 28 |
| 2-3-1 BOT 吸収ピーク波長の測定 .....                | 28 |
| 2-3-2 BAB, BAT の溶液中における解離定数の導出 .....      | 29 |
| 2-3-3 Trolox-C 酸化実験 .....                 | 29 |
| 2-3-4 BAQ および BAQ 二塩酸塩の真空蒸着膜の表面形状測定 ..... | 36 |
| 2-4 考察 .....                              | 38 |
| 2-5 結言 .....                              | 40 |
| 第三章 光照射による BAT の細胞膜破壊の評価 .....            | 42 |
| 3-1 緒言 .....                              | 42 |
| 3-1-1 パッチクランプ法 .....                      | 44 |
| 3-1-2 神経系株化細胞 PC12 .....                  | 46 |
| 3-2 実験 .....                              | 47 |
| 3-2-1 試薬等 .....                           | 47 |
| 3-2-2 機器 .....                            | 48 |
| 3-2-3 細胞培養 .....                          | 48 |
| 3-3 結果 .....                              | 52 |
| 3-4 考察 .....                              | 61 |
| 3-5 結言 .....                              | 65 |

|       |                                     |     |
|-------|-------------------------------------|-----|
| 第四章   | BAT 膜破壊機構の解析                        | 67  |
| 4-1   | 緒言                                  | 67  |
| 4-1-1 | BAT による細胞膜破壊の解析                     | 67  |
| 4-1-2 | 細胞からの脂溶性成分抽出と tocopherol 類の HPLC 測定 | 68  |
| 4-2   | 実験                                  | 70  |
| 4-2-1 | 試薬等                                 | 70  |
| 4-2-2 | 細胞培養                                | 71  |
| 4-2-3 | 機器                                  | 72  |
| 4-2-4 | 細胞脂質中の $\alpha$ -toc 濃度導出           | 74  |
| 4-2-5 | 細胞傷害率測定実験                           | 77  |
| 4-3   | 結果                                  | 80  |
| 4-3-1 | 細胞脂質中の $\alpha$ -toc 濃度導出           | 80  |
| 4-3-2 | 細胞傷害率測定実験                           | 80  |
| 4-4   | 考察                                  | 88  |
| 4-5   | 結言                                  | 91  |
| 第五章   | BAT 膜破壊を応用したマイクロインジェクション            | 92  |
| 5-1   | 緒言                                  | 92  |
| 5-1-1 | マイクロインジェクション実験について                  | 92  |
| 5-2   | 実験                                  | 96  |
| 5-2-1 | 試薬等                                 | 96  |
| 5-2-2 | 細胞培養                                | 98  |
| 5-2-3 | 機器                                  | 98  |
| 5-2-4 | マイクロインジェクション装置の設定                   | 99  |
| 5-3   | 結果                                  | 106 |
| 5-4   | 考察                                  | 110 |
| 5-5   | 結論                                  | 113 |
| 第六章   | 結論                                  | 115 |
| 6-1   | 本研究の成果                              | 115 |
| 6-2   | 今後の細胞膜穿孔技術の課題・発展性について               | 117 |
| 6-2-1 | 今後の課題                               | 117 |
| 6-2-2 | 本研究に基づく技術の今後の発展性の検討                 | 117 |
| 6-3   | 結論                                  | 120 |
| 謝辞    |                                     | 122 |
| 参考文献  |                                     | 123 |



## 第一章 序論

### 1-1 本研究の背景と位置付け

生物を構成する基本単位である細胞に対する、物質の導入は生物工学の基本技術である。しかしながら遺伝子治療や細胞を用いた物質生産等において、細胞内に核酸やタンパク質等の物質を導入する手段は限られていた。

従来の物質導入法としてはウイルスベクター(レトロウイルスベクター等)、非ウイルスベクター(リポソーム等)、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、パーティクルガンといった、細胞群を対象にしたもの(a)、また、マイクロインジェクションのような、特定の細胞を対象にしたもの(b)を挙げることが出来る。一般に従来の技術においては、卵細胞のような大型の細胞を除いて、細胞群に対して確率的に処理を加えるという手法(a)が取られている。すなわち、多量の細胞に対し、その一部が目的となる改変を受ければよいという前提で成立している手法であり、大多数の細胞は未改変である。そのような場合には目的となる処理を施された細胞を分離する必要も多いが、処理直後に機能・形状ともほぼ同一のままの処理・未処理の細胞を分別することは非常に困難である。

また、微小ガラスピペットを用いて、大型の細胞に対して行われるマイクロインジェクション法(b)は施術者の熟練を要する技法である。このため自動化は極めて困難である他、一般の細胞には細胞膜の柔軟性故にピペットが刺入できず適用不可能である。

これら細胞処理が医学・工学において日常的な技術となっている現在、処理の再現性・精度の向上は非常に重要な課題である。特に生殖細胞の処理に際しては、卵細胞が体細胞に比較して各個体から非常に少数しか得られない貴重な遺伝資源であることを考慮すると、その処理の成功率が施術者の技量に左右されるという状況は医学的・工学的見地から大きな問題である。

また、上記の処理はいずれも、単細胞、あるいは遊走性細胞のような生体からの単離・生体への再導入が可能な細胞に限られていたことは無視できない。すなわち、神経細胞のように生体と不可分の細胞への改変処理はほぼ不可能なのである。

これら細胞処理の根本的な問題は細胞膜の破壊を制御する技術の不備に由来するものと考えられる。

単に細胞を破壊する用途であれば、種々の毒物が長期にわたって検討されている。しかしながら、細胞死を引き起こすことなく、部分的かつ一時的に細胞膜を破壊するという細胞工学上の要求に応えるものではなかった。

一方で、細胞の改変による技術発展の可能性はますます大きくなっている。以下に数例を示す。

- 1) クローン生物の作成: 卵細胞の膜を介して遺伝子を注入する作業が必須である。しかしながら、その成功率は非常に低い。
- 2) 磁性体を組み込んだ細胞: これは細胞の位置を磁気的に制御するための手段として研究が進められているものである。現在、そのような細胞を製造する試みは、磁性細菌の磁性体生成遺伝子を導入する手段により行われている。細胞の大量生産という点ではこのような遺伝子改変が望ましいが、医療用途の細胞等においては人工的な磁性体を挿入した方が適する場合も多い。
- 3) マイクロマシン: マイクロマシンの典型的な応用期待例は細胞レベルの微小手術機械である。細胞レベルでの手術を行う場合、単なる物理的手段では細胞膜を切開するに足る出力が得られないことは容易に想像される。また、界面活性剤等を利用した化学的な膜破壊を利用することも考えられるが、破壊を制御する上で問題がある。

4)細胞電極:神経細胞の活動電位を計測したり、電気刺激を加える場合において、基礎研究用の電極を除く実用電極はいずれも細胞外での計測・刺激の印加を行っていた。細胞外電極には、本来の神経活動に関わる細胞膜電位(-70~+40 mV程度)に比較して、検出される信号の微弱化(数 $\mu$ ~数十 $\mu$  V)および神経刺激に必要な電位入力が増大(数百mVが必要)という問題点がある。これに対し、神経細胞内への電極設置が可能となれば、神経の本来の膜電位と同等の電位計測・電気刺激が可能となることに加え、電極と神経の情報交換が一対一で行えることになる。

5)細胞エネルギー源の追加ないし交換:エネルギー変換工学分野において、人工光合成を目指し光起電力を持つ微小な光電変換素子の人工膜への配置の研究が行われている。これは光電変換素子による起電力を膜間電位発生に利用するものであるが、このような微小光電変換素子を細胞膜中やミトコンドリア膜中に配置することで、細胞代謝に必要なエネルギーを光で供給することが可能になる。すなわち、様々な細胞に植物のような光エネルギー利用能力を付加することが可能になると思われる。

このような技術の実施性を根本的に向上させるためには、細胞膜の破壊制御が必要不可欠である。膜破壊技術は前述の通り様々なものがあるが、部位特異的に膜を破壊可能な技術は限られていた。また部位特異的に膜破壊を行うマイクロインジェクション装置は、機械的剪断力により無理に膜を穿孔しているために、細胞が傷つき、インジェクション処理後の生存率が低いという問題があった。以上の現状から、膜破壊技術において解決すべき課題は、機械的剪断力のみならず、何らかの手段により膜を任意に一時的かつ部分的に変性もしくは破壊する方法の開発であると考えられた。

このような膜破壊法に必要なのは、破壊場所と破壊量の制御である。そこで細胞膜を対象に、膜破壊活性を制御可能な膜変性剤を用いた穿孔技術を検討した。具体的に膜を一時的かつ部分的に変性もしくは破壊する方法として、本研究においてはリン脂質連鎖過酸化反応に着目した。

一重項酸素やスーパーオキシドラジカルといった活性酸素種は細胞膜の不飽和リン脂質を連鎖反応で過酸化する( Figure 1-1 )。それに対し細胞は膜中の抗酸化剤である $\alpha$ -tocopherol(以下 $\alpha$ -toc, ビタミンE)や、水溶性の抗酸化剤である L-ascorbic acid(ビタミンC)、superoxide dismutase(以下 SOD)等の酸化防衛機構を持ち、酸化に抵抗する<sup>(1)</sup>。

このような連鎖酸化作用が酸化防衛能を越えると、膜破壊は指数関数的に急速に進行し、細胞膜がイオン透過阻止能を失うため、細胞は代謝維持が不可能となる。この連鎖膜破壊が進むと最終的に細胞死に至ることになる。

光により活性酸素を生成し、このような脂質連鎖過酸化反応のトリガーとなる分子は光増感剤(Photosensitizer)と呼ばれる。一般的な光増感剤としては、ローズベンガル、メチレンブルー、トルフィリン等が挙げられるが、これらの増感剤は照射射下、タンパク質に酸化傷害を与えることが知られている。

このような光増感剤を膜変性剤として使用することで、目標となる最小限の細胞表面に部分的に短時間、連鎖過酸化反応を起こすだけで膜の変性が可能となる。しかも膜穿孔作業の際に過酸化反応により傷害を受けた膜は、穿孔後に膜自身の流動性、また細胞の抗酸化機構により修復されることが期待された(Figure 1-2)。

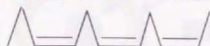
この技術は細胞膜の他、ミセル・リポソームといった人工脂質膜にも適用可能と考えられる。また、膜変性に連鎖反応を利用することで、少量の開始反応から大きな変性を生じさせることが可能という特徴がある。

本研究においては、以上のような問題点に関して検討を行い、細胞工学の発展上大きな鍵を握る細胞膜破壊技術の新たな糸口を探った。

本研究の目的は、光により生体膜の破壊を制御しながら穿孔する基礎技術の可能性を検討しつつ、新規光増感剤による細胞傷害の検討を行うことである。



二重結合を三つもつ脂肪酸



-H•

水素引き抜き



分子内転移



↓

O<sub>2</sub> 酸素吸収

ペルオキシラジカル:  
他の脂肪酸から水素ラジカル(H)を引き抜き、  
自動触媒的連鎖反応を  
起こす。



↓

H•



Figure 1-1 脂質過酸化の開始反応と成長反応<sup>(1)</sup>

三つの二重結合をもつ脂肪酸の過酸化の例

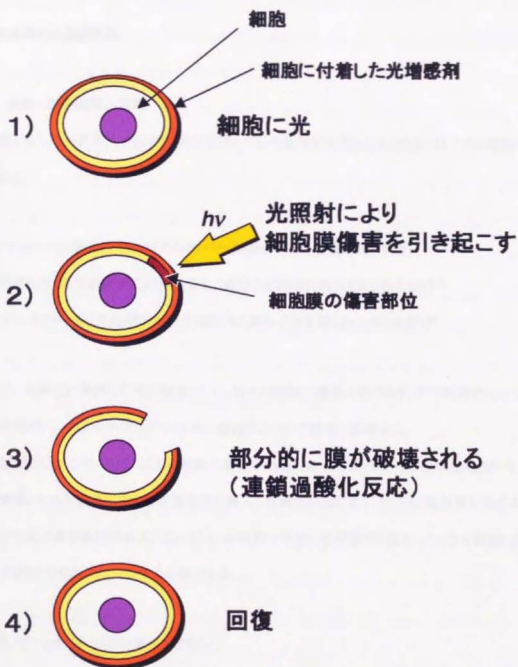


Figure 1-2 光照射による膜破壊プロセス

## 1-2 関連研究の進捗状況

### 1-2-1 細胞への物質導入技術

細胞膜を介した物質導入の分野で現在成功している技術を大まかにまとめると以下の3種類に分類される。

- (a): マイクロピペット刺入、パーティクルガン<sup>(3,4)</sup>(機械的に膜を貫通させる手段)
- (b): 電気穿孔法(電氣的衝撃により膜を乱し、低分子を膜中に取り込ませる手段)<sup>(3,4)</sup>
- (c): ウイルスベクター等(生化学的手段で細胞内に遺伝子等を取り込ませる手段)<sup>(5)</sup>

ここでは、本研究に関連した先行技術として、個々の細胞に適用可能であり、かつ制御性の有る膜穿孔手段として、(a)のマイクロピペット系の技術<sup>(6)</sup>について簡単に記述する。

なお電気穿孔法については、以前は細胞分散液が処理対象であったが、付着性培養細胞<sup>(6)</sup>や、肝臓や皮膚といった組織に対して直接物質を導入した報告が出てきている<sup>(7,8)</sup>。電気穿孔法の穿孔精度の向上や適用範囲の拡大によっては、本研究の目指す応用領域と重なってくる可能性もあり、今後の同法の発展には注目する必要がある。

#### a) マイクロピペット(微小ガラス管キャピラリー)

直径数ミリのガラス管の中央部を加熱して両端から引っ張り、引きちぎることでピペット先端が直径200ナノメートルほどの直径をもつ鋭いガラス管キャピラリーが作製される。このキャピラリーを細胞膜に貫通・刺入させ、キャピラリー内液を細胞内に注入するのがマイクロインジェクションである。

電気生理実験のための微小電極は、このガラス管内部に電解質溶液(通常は3 Mの塩化カリウム水溶液)を充填し、電極となる金属線(銀塩化銀電極等)を入れたものである。この電極を細胞膜に刺入して、あるいは細胞外に設置して使用する。

微小ガラス管ピペットはアフリカツメガエルの卵母細胞といった大型の細胞には容易に刺入できるが、小型の細胞膜には細胞膜の柔軟性・流動性のためにピペットが刺入困難であるという問題がある。また、細胞膜に鋭い先端部を刺入しているため、わずかな振動によっても先端部が刺入部の細胞膜の傷を広げてしまい、細胞が死んでしまう。そのためキャピラリーを細胞へ長時間安定して接続することは困難である。

このような問題点を解決するために、キャピラリーを確実に動作させるための機器が開発された。例えば市販の高精度なマイクロナビレータには数百ナノメートル単位でキャピラリーの位置を制御し、細胞へのインジェクション処理を半自動化したものもある。また用途に応じた様々なキャピラリー作製器や、既製品のキャピラリーも市販されている。

#### b) パッチピペット

パッチピペットは微小ガラス管キャピラリーでは不可能な小型細胞への物質導入・電氣的接続のために開発された<sup>9,10)</sup>。

パッチピペットは微小ガラス管キャピラリーの一種で、先端部直径が2マイクロメートルほどと太く、ガラス管の先端部の縁が加熱処理によりより丸く加工してある。先端部の縁を丸めるのはピペットを細胞に刺さずに、細胞膜に密着させて使用するためである。

パッチピペットは細胞膜に先端を接触させた後、ピペット内を減圧して細胞膜とピペットの密着性を高めて使用するため、細胞との接続は非常に安定である。その安定性から、パッチピペットは微小電極として、主として電気生理実験に用いられる。パッチ電極の使用法には大別して4種類があるが、細胞全体の電氣的情報を得る使用法はホールセルパッチクランプ(whole-cell patch clamp)法と呼ばれる。これは、細胞に密着したパッチ電極内液に陰圧をかけることで細胞膜を電



極内に吸い抜いて、電極内と細胞内を貫通し細胞膜電位や膜電流を測定する方法である。この場合の電極内液は細胞内液に近い組成のものが選択される。パッチピペット先端に膜が密着した状態で微小電極よりはるかに長時間(数時間以上)細胞との接続が維持される。パッチピペット表面と細胞膜の密着性が高くないとこの電極としては使用できない。すなわち細胞とパッチピペットの接続にはピペット表面が清浄であることが必須であるため、細胞に対して適用する毎にパッチピペットは使い捨てることになる。

機械的剪断力のみを用いた既存の細胞膜破壊法は、膜が変形しやすく、流動性に富むことを勘案すると、決して最良の方法とは考えられない。すなわち、単に鋭利な先端を持つ物体で細胞膜が貫通できるとは限らないのである。前述の様に鋭利な先端を持ち、強度的に比較的丈夫なガラス微小電極でさえも、細胞への刺入が困難であるという問題を抱えていた。その解決のためにパッチ電極が考案されたほど、膜穿孔法の改良は重要な課題であった。

細胞膜の穿孔の困難さの原因は、胞膜が流動性に富むリン脂質から構成されることによるものと考察されている。その流動性は軽油に近いものであり、1970年代に細胞融合の研究の過程で明らかになっている<sup>(11-14)</sup>。また、細胞膜の強度については、各種の微小計測機器の発展によって80年代初頭に基礎的な研究がなされ<sup>(15)</sup>、細胞膜の強度に数値的な裏づけがなされた。特に、近年の走査プローブ顕微鏡による細胞計測技術<sup>(16,17)</sup>の発展は細胞膜の機械的強度の問題を一層明確化している。すなわち生きている神経細胞表面を原子間力顕微鏡で測定した研究において、表面形状を走査測定する探針の接触圧力を上げても、細胞質が漏れを起こすほどの傷は細胞に与えられなかったという報告がある<sup>(18,19)</sup>。

### 1-2-2 光増感機構による細胞膜リン脂質連鎖過酸化反応

活性酸素は細胞膜の不飽和リン脂質を対象に連鎖的に過酸化反応を引き起こすとされている<sup>(20,21)</sup>。このような細胞膜脂質の酸化による傷害については、動物個体・組織レベル、あるいはタン

バクテリアレベルでの研究が主流である。また、その解析については、過酸化反応により生成した過酸化脂質を膜破壊後に測定するか、あるいは組織の酸素消費より過酸化反応の進行を間接的に測定することで行われてきた<sup>(22-24)</sup>。

光増感機構による活性酸素の発生を利用した研究については、疾病治療と関連付けられた研究が多い。光増感剤の使用による疾患の治療研究は、ミトコンドリアに対する毒性<sup>(25)</sup>といった基礎研究の分野から、ガン細胞の殺傷<sup>(26,27)</sup>、レーザー光による微生物の殺傷<sup>(28,29)</sup>等の実際のな応用分野に至るまで、近年特に報告が相次いでいる。しかし、これらの研究は細胞組織や微生物へ不可逆的な傷害を引き起こすことが主眼となっており、本研究の意図するような個々の細胞や細胞膜を対象にした、可逆的な膜破壊を意図した研究とは異なるものである。近年、光増感機構を利用した細胞膜傷害に関連する基礎研究として、あらかじめ細胞膜内に担持させておいた色素の漏出を膜傷害の指標として、ビデオ顕微鏡によって細胞レベルの光増感傷害を経時変化解析した報告がなされた<sup>(30)</sup>。しかしながら、この方法では細胞膜の修復過程を把握するのは困難と考えられた。また、光照射による細胞傷害の解析に電気生理実験を適用した研究例は三例を見出したが、それらは組織を対象にした適用<sup>(31)</sup>ならびにイオンチャンネルを対象とした基礎研究であった<sup>(32,33)</sup>。その他、個別の細胞破壊に光増感作用を利用した研究も報告されているが<sup>(34,35)</sup>、これらはいくまでも細胞の機能を停止するために用いられているのであり、本研究の意図している細胞膜の部分的かつ一時的な破壊とは異なるものであった。

以上の既存の研究に関する調査から、本研究のコンセプトである、光照射による膜破壊制御は、極めて新規性の高い研究として位置付けられるものと考えられた。

### 1-2-3 光増感剤

本研究に必要な光増感剤の望ましい性質としては、以下のような条件が考えられた。

- 1) 低分子量で天然物に近い構造を持ち細胞に分解代謝されやすい、あるいは細胞より排除されやすい。
- 2) 励起波長として、320 nm より長波長側に吸収ピークを持つ。
- 3) 固体表面への修飾材料としての発展性がある。

これらの項目について補足する。今まで検討してきた光増感剤による細胞膜破壊については、細胞の回復が可能な増感剤の選択が重要と考えられた。そのため、光増感剤の選択に際しては、増感剤自体の毒性が低いことが第一の前提条件であった。また、細胞実験に光増感剤を適用するには、光照射自体による細胞傷害が少ない波長で励起されることが必要であった。長波長紫外線 UVA(320-400 nm)に比較して、中波長紫外線 UVB(280-320 nm)は細胞に紫外線障害を強く引き起こす波長領域であるため<sup>39)</sup>、光増感剤の選択に際しては励起波長が320 nm以上であることを第二の前提条件とした。さらに、光増感機構による細胞膜破壊技術の応用を考えると、将来的に固体表面の修飾に適用可能な光増感剤であることが望まれた。例えば、光増感剤で表面を修飾した微小センサーは、光膜破壊技術によって細胞内に挿入して使用することが可能になると思われる。今後の光膜破壊技術の発展を考慮し、これを第三の前提条件とした。

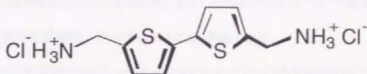
天然物の光増感剤で、増感機構解析・薬理的応用が検討されている一般的なものとして、オリゴチオフェンの一種である $\alpha$ ターチエニルを挙げることが出来る。この化合物はマリーゴールド根より単離された<sup>27)</sup>植物由来の天然光増感剤であり、天然物を含む様々な誘導体の合成や<sup>28-40)</sup>、光増感の機構解析<sup>41-46)</sup>、蚊<sup>47)</sup>、ボウフラ<sup>48,49)</sup>やウイルス<sup>50)</sup>、皮膚糸状菌<sup>51)</sup>を対象にした薬理実験が行われてきた<sup>52)</sup>。また、光化学療法への応用の基礎研究が最近報告されている<sup>53)</sup>。これらの幅広い研究の背景には、 $\alpha$ ターチエニルが天然物由来の光増感剤ということが挙げられる。すなわち、 $\alpha$

ターチエニルを農業用途等に使用した場合でも、環境への負荷が低いと期待されるためである。本来水への溶解性に乏しい $\alpha$ ターチエニルではあるが、その適用範囲を拡大するため、様々な置換基を導入することにより水溶液系での適用が検討されている<sup>(53,54)</sup>。

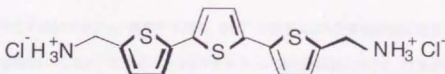
また、オリゴチオフェン類は、導電性高分子の一種であるポリチオフェン合成のモノマーとしても用いられている。オリゴチオフェン類は真空蒸着法や、有機溶媒に溶解した上で溶媒を蒸発させる方法により、緻密な成膜が可能であるため、実際にこれらの誘導体を素材とした光電池<sup>(55,56)</sup>、電解効果トランジスター(field-effect transistors, FET)や発光ダイオード(light emitting diodes, LED)も試作されている<sup>(57)</sup>。

本研究においては光増感剤として、主に当研究室で合成されたアミノメチル基をチオフェン鎖の両末端に持つ新規なオリゴチオフェン<sup>(58)</sup>を使用した。このビスアミノメチルオリゴチオフェン(以下BOT)は $\alpha$ ターチエニルの誘導体であり、低分子量かつ末端のアミノメチル基により他の $\alpha$ ターチエニル誘導体に比較して水溶性が高いことが期待された。BOT自体は新規な分子であり、本研究開始時点で光酸化剤としての実績はなく、分子の基礎評価段階にあったが、“より水溶性の高い $\alpha$ ターチエニル系光増感剤”<sup>(53,54)</sup>として期待するに十分な可能性があった。

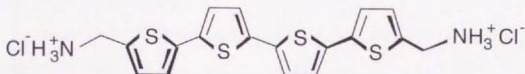




5,5'-Bis(aminomethyl)-2,2'-bithiophene (BAB) Dihydrochloride



5,5''-Bis(aminomethyl)-2,2':5',2''-terthiophene (BAT) Dihydrochloride



5,5'''-Bis(aminomethyl)-2,2':5',2'':5'',2'''-quaterthiophene (BAQ) Dihydrochloride

Figure 1-3 本研究で使用したビスアミノメチルオリゴチオフェン(BOT)

本節冒頭で述べた光増感剤に求められる3条件とBOTの性質の対応について略記する。

- 1) BOTは植物由来の光増感剤 $\alpha$ ターチエニルの誘導体である。
- 2) 近年BOTの類似化合物であるジメチルオリゴチオフェンの合成が報告された<sup>60)</sup>。これらジメチルオリゴチオフェンの二塩化メチレン(以下 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )中での吸収ピーク波長は316 nm(二量体)、364 nm(三量体)、397 nm(四量体)であり<sup>60)</sup>、BOTも同様に紫外領域に吸収ピークを持つものと期待された。
- 3) 金と親和性の高いチオフェン環<sup>60,61)</sup>を持ち、BOTは吸着により金電極表面に容易に修飾可能<sup>60)</sup>と期待された。また、先に述べたオリゴチオフェン類の成膜製の高さも、将来的な固体表面修飾への発展性上、有利であると考えられた。

### 1-3 本研究の目的と意義

本研究の目的は、光増感剤を使用した細胞膜の破壊制御の可能性を検討することにあつた。具体的には、天然の光増感剤である $\alpha$ ターチエニルの誘導体 BOT を対象に、細胞膜傷害への適用を軸として、BOT の段階的な機能解析を行った。

#### 1-3-1 実験の構成

本研究の目的は、細胞への物質導入を最終目標として、光増感剤として新規なオリゴチオフェンを使用し、細胞膜の破壊程度を光によって制御することにあつた。そのための実験は、以下のような段階によって行うこととした。

- a) 水溶性の光増感剤を用いて、対象となる細胞全体に光増感剤を接触させ、照射に伴う細胞膜傷害から修復までの過程を計測する。
- b) 細胞へ部位特異的に光増感剤を作用させることで、外部より何らかのマーカ―を細胞内に導入可能であるか、また導入されたマーカ―が保持されるか確認する。

このような核になる実験に加え、光増感剤の特性の解析実験を加えた。実験内容は以下のよう  
に要約される。

- 1) 新規 BOT 類の特性解析
- 2) 選択された光増感剤 BAT の細胞膜破壊効果の解析…前述の a) に相当する実験である。
- 3) BAT 膜破壊機構の解析
- 4) BAT 膜破壊を利用したマイクロインジェクション…前述の b) に相当する実験である。

本研究においては、細胞膜傷害の評価手段として、電気生理実験を選択した。電気生理実験は、リアルタイムで細胞膜抵抗・膜電位・膜電流を計測可能であり、細胞膜の破壊・修復の過程を追跡する目的に適した計測法であった。

また、光増感剤を実際に細胞への物質導入に使用する実験としては、マイクロインジェクション法を選択した。光増感剤は細胞に対しては毒物であるため、少ない光増感剤で効果的に細胞膜破壊を生じさせる必要があった。もっとも簡便にそのような実験を行うには、光増感剤をピンポイントで細胞膜に作用させることが適当と考えられた。マイクロインジェクション法においては、インジェクション用キャピラリーの内液に光増感剤を添加することにより、キャピラリーが細胞膜に接触した部分のみ、光増感剤を作用させることが可能であった。

また本研究において、光増感剤を作用させる対象としては神経系株化細胞 PC12 を選択した。これは光増感剤の細胞膜傷害の評価法として電気生理実験やマイクロインジェクション法を用いることを考慮すると、これらの実験法による知見の蓄積のある神経系の培養細胞が実験対象として適当と判断したことが理由であった。

ラットクロム親和細胞腫(pheochromocytoma)である PC12 細胞は1976年に Greene と Tischler によって樹立された<sup>(63)</sup>。この細胞の特徴は神経成長因子(Nerve Growth Factor, NGF)の添加により、神経類似の細胞に分化する点にあり<sup>(64)</sup>、中枢神経細胞のモデルとして基礎研究から、細胞センサーといった応用研究まで様々なに用いられている<sup>(65,66)</sup>。

また、本研究においては、強力な紫外光源により、数秒～数十秒間の短時間の光照射による細胞膜傷害を測定する必要があった。それらの条件を定量的に検討可能な光源として、第三章ではアルゴンイオンレーザー、第四章ではエキシマレーザーを利用した。一般に光増感剤の研究においては、紫外蛍光灯や水銀ランプ、ハロゲンランプ等の非レーザー光源を用い、数十分から数日単位での光照射の影響を解析した事例が多く、本研究で試みたような秒～数分単位の光照射実験は、光増感剤の研究としては類例が少ない。



本研究の意義は、細胞工学から医療工学の領域において極めて高いものがある。近年の半導体プロセスやマイクロマシーニング技術の進歩により、各種マイクロデバイスはサブマイクロメートル級の大きさで様々な機能を実現している。その用途として、特に医療工学を視野に入れた細胞レベルのセンサーデバイスへの応用が期待されており、実際に細胞外に設置する微小機器については様々な報告がなされている<sup>(87,88)</sup>。しかし、そのようなデバイスを細胞へ組み込もうとしても、現在の細胞膜破壊技術では組み込みが不可能である。本研究により提起された新規な細胞膜穿孔技術のまさに延長線上に、そのような細胞レベルでの生体-機器接続を可能にする技術体系が確立されるであろう。



Figure 1-4 ラット クロム親和性細胞腫(Pheochromocytoma) PC12

#### 1-4 本論文の構成

本論文は六章より構成される。本論文の第二章では、新規ビスアミノメチルオリゴチオフェン類の基礎的な特性の解析結果をまとめた。

第三章、第四章では、第二章の結果を元に光増感剤として選択されたオリゴチオフェン BAT の細胞への適用についてまとめた。第三章では電気生理実験により BAT の PC12 細胞に対する光増感作用について検討を行った結果を記述した。第四章では、一般的な膜傷害の評価法である乳酸脱水素(lactate dehydrogenase, LDH)検出法を指標とした、BAT による光細胞傷害の解析結果について記述した。

第五章では、BAT 膜破壊を実際に細胞への物質導入に応用した、光増感マイクロインジェクションの結果をまとめた。

第六章は結論であり、本論文の総括を行った。

## 第二章 ビスアミノメチルオリゴチオフェンの基礎特性評価

### 2-1 緒言

オリゴチオフェン類は、導電性高分子の一種であるポリチオフェン合成のモノマーとして近年注目されている。これらオリゴチオフェンに対し、電子物性の改変、結晶性や分子の安定性の向上等を目的とした各種の置換基の導入も試みられており、実際にこれらの誘導体を素材とした光電池<sup>(63,66)</sup>、電解効果トランジスター(field-effect transistors, FET)や発光ダイオード(light emitting diodes, LED)も試作されている<sup>(67)</sup>。

オリゴチオフェンについてはこのような導電性高分子材料としての機能の他に、光増感剤としての機能もある(第一章1-2-3 参照)。三量体オリゴチオフェンの基本分子骨格である $\alpha$ ターチエニルは植物由来の光増感剤として単離されたもので<sup>(67)</sup>、典型的な光増感剤の一つとして1970年代末以降、数々の誘導体を含めて光増感機構の解析・薬理面での応用が検討されてきた。しかしこれら $\alpha$ ターチエニル誘導体の多くは水への溶解性が低く、その用途もアルコール等の有機溶媒に溶解した形で殺虫剤に用いられる等、限定されてきた<sup>(68)</sup>。この様な背景の元で、主として光化学療法への適用を視野に入れた水溶性の高い $\alpha$ ターチエニル誘導体の合成が望まれていたのである<sup>(63,70)</sup>。

本章では、新規に合成されたビスアミノメチルオリゴチオフェン(以下BOT)の二量体(以下BAB)、三量体(以下BAT)、四量体(以下BAQ)について、細胞実験に使用可能か、調査を行った結果を記述した。

光増感剤として選択したBOTは、六車らにより水溶性が高い導電性高分子モノマーとして新規に分子設計・合成されたもので、合成と平行して本章に記述した特性解析実験が行われた<sup>(68)</sup>。

BOT は、光増感剤としての可能性は未知であったが、他の  $\alpha$ -ターチエニル誘導体に比較してアミノメチル基による水溶性の高さと  $\alpha$ -ターチエニルに類似した光増感機能を併せ持つことが期待されていた。

これらの BOT 類を細胞実験に適用可能か、検討を行った。具体的な検討項目は以下のようになった。

- a) BOT 類の水溶性の検討と併せ吸収ピーク波長の測定を行い、励起波長が細胞実験に適するものを選択した。
- b) 細胞実験に際しては、生体計測において重要な中性 (pH  $\approx$  7.4) 領域での BOT の解離状態を把握する必要がある。そのため BOT 二塩酸塩を対象に電位差滴定実験を行い、解離定数を求めた。
- c) 細胞実験用に選択した BOT が光増感作用を示すか、評価実験を行った。実験においては、水溶性抗酸化剤 Trolox-C<sup>TM</sup>と BAT を等濃度含む水溶液系を対象に、光照射および BAT の有無によりどのように抗酸化剤の濃度が変化するか測定を行った。

なお第一章 (1-2-3)において、BOT の成膜応用性について述べた。成膜用に用いる BOT とし、水溶液中での膜の維持を考慮すると、水溶性が低いことが望ましかった。そのため、上記の探索の過程で判明した低水溶性 BOT について、真空蒸着による成膜を試み、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope, 以下 AFM) によって膜表面形状を測定した。この AFM 測定は、水溶性が求められる細胞実験用 BOT の解析には直接は寄与しないものの、今後の成膜応用への知見を得る目的で BOT 解析の一環として行った。

### 2-1-1 光増感作用の検討

抗酸化剤 Trolox-C は、 $\alpha$ -tocopherol (以下  $\alpha$ -toc、ビタミンE) のアルキル鎖部分をカルボン酸に置換した水溶性の高い誘導体で、細胞膜透過性も高いとされている。Trolox-C は活性酸素種を

捕獲し、自身は酸化され、消費される。そのため Trolox-C の濃度を測定することで、BOT により活性酸素種の生成が促進されているか、知見を得ることが可能となる。なお Trolox-C 濃度の測定には電気化学検出器を装備した高速液体クロマトグラフィー(以下、ECD-HPLC)を用いた。

また BOT が生成する活性酸素種についての知見を得るため、各種の特異的な活性酸素捕獲剤の添加により BOT 存在下での Trolox-C の消費が抑制されるか、比較実験を行った。活性酸素種には、一重項酸素、過酸化水素、スーパーオキシドラジカル、ヒドロキシルラジカルといった種類がある。Trolox-C は活性酸素種全般を捕獲し消費するために、BOT が光照射によりどのような活性酸素種を生成した結果、Trolox-C が消費したか判断がつかない。ここで仮に Trolox-C と、特異的に活性酸素を捕獲する試薬 A が共存している場合を考える。試薬 A を含まない対照例に比較して、試薬 A 存在下で BOT 由来の活性酸素種による Trolox-C の消費が抑制されれば、この抑制量は試薬 A が捕獲した活性酸素種の量を反映しているものと推定される。このようにして活性酸素の種類についての知見が得られるものと考え、以下 a)~d)の活性酸素捕獲剤の影響を検討した。

- a) 一重項酸素捕獲剤 ヒステジン
- b) 過酸化水捕獲剤 カタラーゼ
- c) スーパーオキシドラジカル捕獲剤 スーパーオキシトディスムターゼ(super oxide dismutase、以下 SOD)
- d) ヒドロキシルラジカル捕獲剤 ジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide、以下 DMSO)

これら試薬の種類および適用濃度については、論文<sup>7)</sup>および成書<sup>8)</sup>を参項にした。

今回使用した活性酸素捕獲剤は、適用対象が BOT と Trolox-C を含む水溶液であるため、水溶液系で適用可能であるものが選択された。一重項酸素捕獲剤としては、一般的にはベータカロチンが用いられるが、ベータカロチンは極めて水溶性が低いために今回の実験においては代替としてヒステジンを使用した。



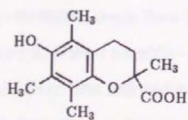


Figure 2-1 Trolox-C 構造式

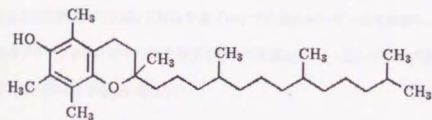


Figure 2-2  $\alpha$ -tocopherol (ビタミン E) 構造式

## 2-1-2 原子間力顕微鏡による膜形状測定

原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope, 以下 AFM)は、微小な探針で直接的に対象の表面を走査し画像化する走査プローブ顕微鏡(Scanning Probe Microscope, 以下 SPM)の一種である。最初の SPM 機器である走査トンネル顕微鏡が主として導電性試料を対象にサンプルの表面の電流の流れ易さを指標に画像化する顕微鏡<sup>74)</sup>であるのに対し、AFM は微小な針状の走査プローブの先端がサンプル表面との相互作用により反発、あるいは吸引により変形することを利用して、表面形状を測定する顕微鏡である<sup>75)</sup>。本研究において使用した AFM は光てこ方式と呼ばれる方式を採用している。これは走査プローブの梁にレーザー光を照射し、その反射光の変位を走査プローブとサンプルの相互作用の強さの指標として、一定のプローブ接触圧力で形状測定を行うものである (Figure 2-3)。

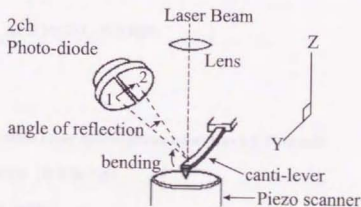


Figure 2-3 光てこ方式原子間力顕微鏡 模式図 <sup>76)</sup>

本章においては AFM により、オリゴチオフェン BAQ の真空蒸着膜の表面形状測定を行った結果についても記述した。

## 2-2 実験

### 2-2-1 試薬等

BAB, BAT, BAQ は六車らにより合成・提供されたものを使用した<sup>68)</sup>。

以下の試薬については市販品を使用した。

水酸化ナトリウム(以下 NaOH, SIGMA)

フタル酸水素カリウム(SIGMA)

塩化ナトリウム(以下 NaCl, SIGMA)

塩酸(以下 HCl, SIGMA)

### 高速液体クロマトグラフィー関連試薬

メタノール (以下 MeOH、ナカライテスク)

Trolox-C (Fluka)

過塩素酸ナトリウム (以下 NaClO<sub>4</sub>、和光純薬)

### 2-2-2 使用機器

吸光光度計 8451A diode array spectrophotometer (Hewlett Packard)

蛍光光度計 NAES700 (堀場製作所)

pH メーター(IOL-50, DKK)

照度計 RADIOMETER 365 nm probe 装備 (UVX)

#### 2-2-2-1 高速液体クロマトグラフィー

カラム SPELCO SIL LC-18(SPELCO)

電気化学検出器 SHISEIDO Nanospace SI-1 (資生堂)

ポンプ PU-980 (日本分光)

デガッサー兼カラムオープン CO-965 (日本分光)

クロマトバック C-R7A pulse (島津製作所)

### 2-2-2-2 光増感剤励起光源

パルスエキシマレーザー光源 LPX200, XeCl gas (Lambda physik)

$\lambda=308$  nm, ca.130~20 mJ/pulse, Pulse Duration 100 ns, max 20 Hz (1.6~0.25 W cm<sup>-2</sup>)

光照射面積あたりの出力については、照度計の実測値を基に以下のように算出した。

エキシマレーザー光は縦 7 mm 横 23 mm 程度の長方形面に照射され、その面積は 1.61 cm<sup>2</sup>となる。100 mJ/pulse の場合を例にすると、光照射面積は 1.61 cm<sup>2</sup>であるため、面積あたり光量に換算すると 62.1 mJ cm<sup>-2</sup>、20 Hz 発振時の値は出力 1.24 W cm<sup>-2</sup>と算出された。レーザー出力は随時レーザー装置本体に表示されるため、この表示出力値を基に最大出力値と同様の計算を行って、必要な光量に相当するレーザー発振回数を選択した。

### 2-2-2-3 走査プローブ顕微鏡

走査プローブ顕微鏡本体 Nanoscope III (Digital Instruments)

走査プローブ顕微鏡スキャナ Type J (Digital Instruments)

走査プローブ Type S3G3T3-5L125 (Nanosensors)

### 2-2-3 BOT 吸収ピーク波長の測定

BOT 二塩酸塩は蒸留水、BOT については二塩化メチレン(以下 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)に適宜溶解し、それぞれの溶媒における吸収ピーク波長を吸光光度計により測定した。

## 2-2-4 水溶液中における解離定数の導出

BOT を細胞実験に供する前段階として生体計測において重要な中性 (pH  $\approx$  7.4) 領域での BOT の解離状態を把握する必要があった。

BOT 二塩酸塩は二価の酸であり、水溶液中で Figure 2-4 に示した様に二段階に解離することが予想された。なお  $K_1$ 、 $K_2$  は各平衡状態における解離定数である。

実際の測定に際しては、水溶性の低い BAQ を除いて、BAB 二塩酸塩と BAT 二塩酸塩について、pH メーターを用いて 25°C で滴定を行い、各定数を求めた。

BAB 被検定液は 10 mM 20 ml を調製、検定液 50 mM NaOH (フタル酸水素カリウム溶液 5 mM により標定済) により滴定測定を行った。

BAT 被検定液は 5 mM 20 ml を調製、検定液 25 mM NaOH (フタル酸水素カリウム溶液 5 mM により標定済) により滴定測定を行った。なお BAB、BAT 被検定液のイオン強度  $I$  は NaCl の添加により  $I = 0.09$  に調製した。

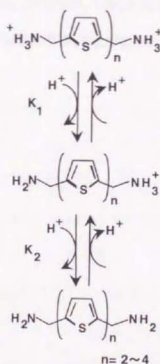


Figure 2-4 BOT 解離機構



### 2-2-5 Trolox-C 酸化実験

96 ウェルアッセイプレートの個々のウェルに、被検液として 2  $\mu$ M Trolox-C PBS 溶液を 200  $\mu$ l 添加した。ウェル中の被検液に対し、エキシマレーザーで設定した光量に達するまで光照射を行った上で ECD-HPLC により、液中の Trolox-C 濃度を測定した。このようにして得られた Trolox-C 濃度から、照射量と Trolox-C の酸化について、光増感剤 BAT の有無、および以下の活性酸素捕獲剤の添加による影響の解析を行った。

|                     |               |
|---------------------|---------------|
| 光増感剤 BAT            | 2 $\mu$ M     |
| 一重項酸素捕獲剤 ヒスチジン      | 10 mM         |
| 過酸化水捕獲剤 カタラーゼ       | 1000 units/ml |
| スーパーオキシドラジカル捕獲剤 SOD | 1000 units/ml |
| ヒドロキシルラジカル捕獲剤 DMSO  | 100 mM        |

### HPLC 溶媒組成

MeOH 50%(v/v): 蒸留水 50%(v/v), 50 mM NaClO<sub>4</sub>

### 2-2-6 真空蒸着膜の表面形状測定

BOT の成膜性について、水溶性の低い BAQ および BAQ 二塩酸塩について真空蒸着膜を作成し、AFM によって膜表面形状の測定を行った

BAQ、および BAQ 二塩酸塩の成膜は以下の条件で行われた。

温度 ca. 180 °C、気圧  $7 \times 10^{-4}$  Pa、膜厚 100 nm

成膜基盤には市販の 2 インチ径単結晶シリコン基盤を用いた。

なお AFM 測定は室温下、タッピングモード<sup>TM</sup>、走査範囲は一辺 1 $\mu$ m 四方で測定を行った。

## 2-3 結果

### 2-3-1 BOT 吸収ピーク波長の測定

得られたピークの一覧を Table 2-1 に示す。測定の結果、BAB の吸収ピーク波長が 310 nm と、中波長紫外線 UVB(280-320 nm)領域内になることが判明した。中波長紫外線は長波長紫外線 UVA(320-400 nm)に比較して、細胞に紫外線障害を強く引き起こすため(第一章1-2-3 参照)、細胞実験に適用するには BAB は不相当と判断された。

また、BOT を細胞に適用するには高い水溶性が求められる(第一章1-3-1 参照)。一連の吸収ピーク測定の過程で、室温25℃において BAB は 10 mM、BAT は 5 mM 濃度の水溶液を調製できた。一方、BAQ は最大で 0.4 mM 程度しか水に溶解しないことがわかった。

以上の理由、および生体に光傷害に関連する研究がチオフェン三量体で集中的に行われていることから(第一章1-2-3 参照)、BAT を細胞実験に適用することとした。この BAT について、吸収スペクトル測定を行った結果を Figure 2-5 に示す。BAT は中波長紫外線領域から長波長紫外線領域にわたって吸収を示した。なお、参考までに Figure 2-6 に波長 360 nm で励起した場合の BAT 蛍光スペクトルを示す。BAT の最大蛍光ピーク波長は 437 nm であった。

Table 2-1 BOT 類吸収ピーク波長

|                 |                          | BAB | BAT | BAQ |
|-----------------|--------------------------|-----|-----|-----|
| Dihydrochloride | $\lambda_{max} H_2O$     | 310 | 359 | 394 |
| amine           | $\lambda_{max} CH_2Cl_2$ | 320 | 367 | 400 |

(nm)

### 2-3-2 BAB, BAT の溶液中における解離定数の導出

水溶性が低い BAQ を除いた BAB, BAT について、滴定実験を行った。得られた滴定曲線を Figure 2-7 に示す。BAB 二塩酸塩、BAT 二塩酸塩の両方において、第 1 当量点、第 2 当量点共に明確な変曲点は認められなかった。しかしながら、 $pK_{a1} = -\log K_1$ 、 $pK_{a2} = -\log K_2$  であることから、この曲線より、 $pK_{a1}$ 、 $pK_{a2}$  の値は BAB において約 8~9、BAT においては約 6.5~7.5 と概算された。BAT は酸性から pH 7.5 程度まで水に溶解していたが、溶液をさらにアルカリ側に変化させたところ、次第に黄色いコロイド状の析出物を生じた。

### 2-3-3 Trolox-C 酸化実験

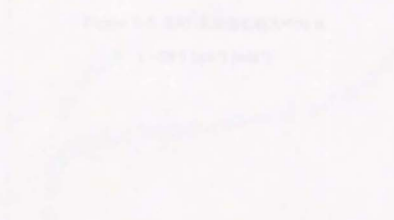
光量と Trolox-C の濃度の対応について、ECD-HPLC による測定を行った結果を Figure 2-8 に示す。なお測定の結果、Trolox-C 濃度が 0.2  $\mu\text{M}$  以上の領域については、光量に逆比例して Trolox-C 濃度はほぼ直線的に減少して行くことが判明した。そのため、この領域における光量と Trolox-C 濃度の関係について、近似した一次式を図中に記載した。この一次近似式の傾きは光照射に伴って、エキシマレーザー光量  $1 \text{ J cm}^{-2}$  あたりの酸化された Trolox-C 濃度を表している。

測定の結果、Trolox-C は BAT 未添加の場合に  $1 \text{ J cm}^{-2}$  あたり 0.07  $\mu\text{M}$  酸化されたのに対し、BAT を添加した場合には  $1 \text{ J cm}^{-2}$  あたり 0.8  $\mu\text{M}$  酸化されていた。

また、Trolox-C と BAT を含むサンプル液に対し、照射量を一定にした条件で、1 パルスあたりのレーザー光の強度と、照射パルス数を変えて同様の実験を行った結果を Table 2-2 に示す。一方は 1 パルスあたり約 56 mJ の光を 60 パルス、他方は同約 124 mJ の光を 26~27 パルス照射し、どちらも照射量は  $2.1 \text{ J cm}^{-2}$  とした。その結果、光強度が異なっても照射光量が等しければ、BAT によってほぼ同濃度の 1.49  $\mu\text{M}$  Trolox-C が酸化される結果が得られた。

また BAT の生成する活性酸素種の検討のため、Trolox-C に加え各種の活性酸素捕獲剤の添加を行った結果を Figure 2-9 に示す。光量  $2.1 \text{ J cm}^{-2}$  において、Trolox-C は BAT 存在下で

約 1.5  $\mu\text{M}$  酸化された。これに対し、SOD 添加を添加した場合は Trolox-C は約 1.2  $\mu\text{M}$  酸化され、酸化は若干抑制された。その他、ヒスチジンおよびカタラーゼでは抑制が認められず、DMSO では Trolox-C の酸化が約 1.6  $\mu\text{M}$  に増加した。



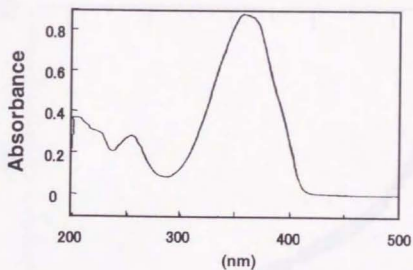


Figure 2-5 BAT 水溶液吸収スペクトル

$$\epsilon = 28.5 \text{ (cm}^{-1}\text{) (mM}^{-1}\text{)}$$

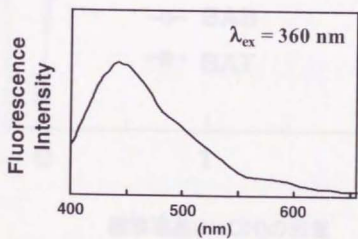
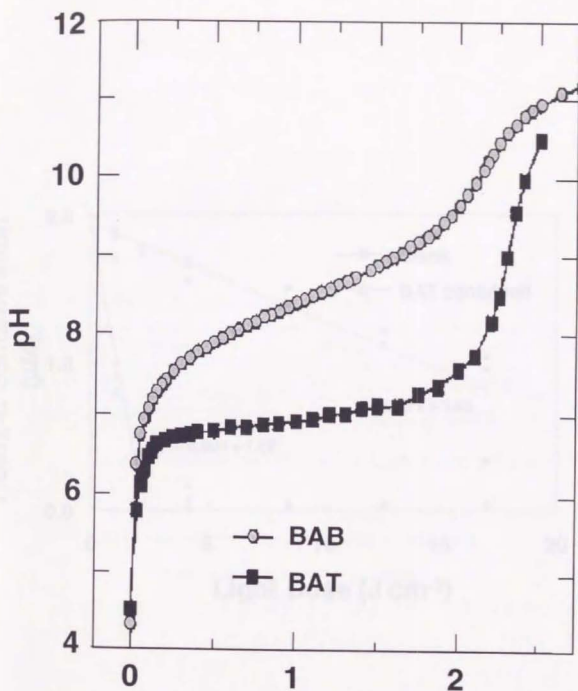


Figure 2-6 BAT 水溶液蛍光スペクトル

$$\lambda_{em \text{ max}} = 437 \text{ nm}$$





標準塩基(NaOH)の当量

Figure 2-7 BAB および BAT の滴定曲線

$pK_{a1}, pK_{a2} = \text{ca. } 8 \sim 9(\text{BAB}) \quad 6.5 \sim 7.5(\text{BAT})$

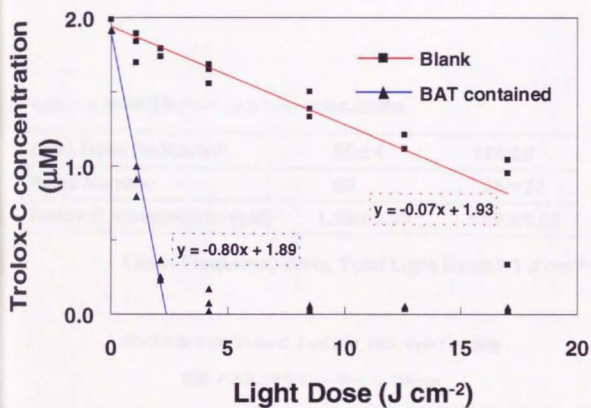


Figure 2-8 抗酸化剤 Trolox-C の紫外線照射による酸化  
: 照射光量ならびに BAT 添加による差

Sample: 2 μM Trolox-C, 2 μM BAT, pH 7.4 by PBS

Table 2-2 紫外線強度とBATによるTrolox-C酸化との関係

|                          |           |           |
|--------------------------|-----------|-----------|
| Light Dose (mJ/pulse)    | 56±4      | 124±8     |
| Pulse Number             | 60        | 26~27     |
| Trolox-C consumption(μM) | 1.49±0.09 | 1.49±0.06 |

Laser Frequency 20Hz, Total Light Dose 2.1 J cm<sup>-2</sup>

サンプル液: 2 μM Trolox-C, 2 μM BAT, PBS でpH 7.4に調整

光源: パルスエキシマレーザー λ= 308 nm

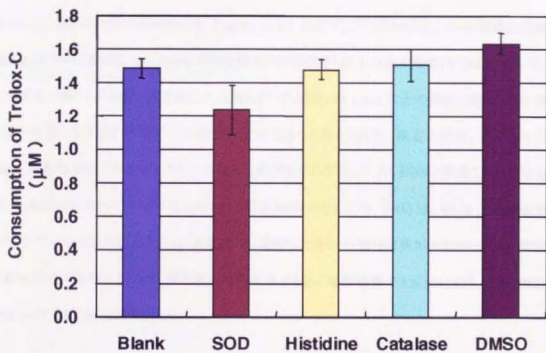


Figure 2-9 抗酸化剤 Trolox-C の紫外線照射による酸化: 其他活性酸素捕獲剤による影響

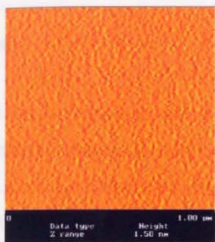
(Sample: 2 μM Trolox-C, 2 μM BAT, pH 7.4 by PBS Light Dose: 2.1 J cm<sup>-2</sup>)

#### 2-3-4 BAQ および BAQ 二塩酸塩の真空蒸着膜の表面形状測定

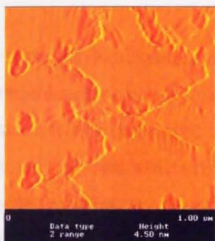
水溶性の低かった BAQ については、BOT 類による固体表面修飾への適用性を評価するため、真空蒸着による成膜と、その表面形状の測定評価を行った。

単結晶シリコン基盤、同基盤上に蒸着した BAQ 二塩酸塩膜、および同基盤上に蒸着した BAQ 膜について、得られた膜の表面形状を Figure 2-10 に示す。ブランクとなるシリコン単結晶基盤は BAQ 膜の形状測定に対し十分な平滑さ(領域内の変位が約 1 nm の範囲内に収まっている)を示す画像が得られた(a)。この基盤上に成膜を行った場合、約 1 nm 以上の起伏が測定された場合には、対象となる膜に特有の表面構造の反映であると考えられた。測定の結果、蒸着された BAQ 二塩酸塩膜はアモルファス的な不定形な形状を示した(b)。一方、同様に蒸着された BAQ 膜は、結晶的な多数のブロックの集合からなる形状を示した(c)。また、BAQ 膜、BAQ 二塩酸塩膜ともに、ブランクとなる単結晶シリコン基盤表面に類似した形状の部分は見出せなかった他、測定した 1 $\mu$ m 四方の領域において、膜表面の高低差は BAQ 二塩酸塩膜で 4.5 nm 以内、BAQ 膜で 10 nm 以内である結果が得られた。

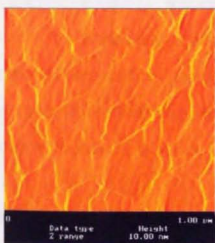




(a) Si - Substrate  
(Blank)



(b) BAQ  
- Dihydrochloride



(c) BAQ

Figure 2-10 BAQ 蒸着膜の AFM 像

## 2-4 考察

BOT の吸収ピーク測定の結果、BAB の吸収ピーク波長は細胞に紫外線障害を強く引き起こす中波長紫外線 UVB (280-320 nm) 領域になることが判明した。また、室温25°Cにおいて BAB は 10 mM、BAT は 5 mM 濃度の水溶液を調製可能であった一方、BAQ は最大で 0.4 mM 程度しか水に溶解しないことがわかった。これらの結果、細胞実験には三量体 BOT である BAT を選択した (2-3-1 参照)。

解離滴定実験の結果、BAB 二塩酸塩、BAT 二塩酸塩の両方において、第 1 当量点、第 2 当量点共に明確な変曲点は認められなかった。これは  $K_1$ 、 $K_2$  が接近した値、すなわち  $K_1/K_2$  の値が 100 未満になっているためと推定される<sup>(78)</sup>。また、 $pK_{a1} = -\log K_1$ 、 $pK_{a2} = -\log K_2$  であることから、この曲線より、 $pK_{a1}$ 、 $pK_{a2}$  の値は BAB において約 8~9、BAT においては約 6.5~7.5 と概算された。これらの値は典型的な脂肪酸ジアミン二塩酸塩である、エチレンジアミン/ヘキサメチレンジアミン二塩酸塩の対応する  $pK_{a1}$  ( $pK_{a2}$ ) はそれぞれ 7.08 (9.89) および 9.83 (10.93) である (イオン強度 0.1、25°C)<sup>(79)</sup> ことを考慮すると、解離定数の比較から BAB、BAT は、エチレンジアミン/ヘキサメチレンジアミン二塩酸塩に比較して強い酸であるといえる。また BAT 水溶液は第 2 当量点 pH 7.5 以降アルカリ側で次第にコロイド状の析出を生じた。これは酸性領域においては二価カチオンであった BAT がアルカリ領域では完全解離して電荷を失ったために、実験条件である 5 mM BAT の高濃度下では析出したと考えられた。

細胞実験用に選択した BAT が光増感作用を示すか、抗酸化剤の酸化を指標に評価を行った。その結果、水溶性抗酸化剤 Trolox-C の照射による酸化は、BAT 未添加の場合では  $1 \text{ J cm}^{-2}$  あたり  $0.07 \mu\text{M}$  であった一方、BAT 存在下では  $0.8 \mu\text{M}$  と約 11 倍増加した。これは BAT が光照

射により活性酸素種を生成し、Trolox-C の酸化を促進したためと考えられた。これはすなわち、BAT が光増感機能を持つことを示唆するものである。

また、Trolox-C と BAT を含むサンプル液に対し、照射射量を一定にした条件で、1パルスあたりのレーザー光の強度と、照射パルス数を変えて同様の実験を行った結果、光強度が異なっても照射光量が等しければ、BAT によってほぼ同濃度の Trolox-C が酸化される結果が得られた。この結果は、BAT による Trolox-C の消費がレーザー光照射による熱的な反応ではなく、光反応に起因することを支持するものである。

さらに、いくつかの特異的な活性酸素捕獲剤の添加による Trolox-C の酸化の抑制を指標に BAT の生成する活性酸素種の検討を行った。しかしながら SOD によって Trolox-C の酸化が若干抑制された以外は、明確な結果は得られなかった。Trolox-C の酸化の抑制に SOD が若干有効であったことから BAT が照射射下でスーパーオキシドを生成していることが示唆されたが、これは  $\alpha$ -ターチエニル誘導体が水溶液系においてスーパーオキシドを生成したという報告<sup>(48,54)</sup>に対応している可能性がある。既存の研究においては、BAT の元になった  $\alpha$ -ターチエニルおよびその誘導体においては一重項酸素の発生が主要な光増感機構であると<sup>(4)</sup>報告されていることもあり、BAT の光増感機構については、今後の検討が期待される。

BAQ および BAQ 二塩酸塩の蒸着膜について AFM 測定を行った結果、BAQ 二塩酸塩膜はアモルファス的な不定形な形状を示す一方、BAQ 膜は結晶的な多数のブロックの集合からなる形状を示した。この AFM 測定にあたっては、BAQ 二塩酸塩膜、BAQ 膜について X 線回折、X 線光電子分析 (X-ray photoelectron spectroscopy, 以下 XPS)、紫外～近赤外分光分析による測定が同時平行して行われた<sup>(55)</sup>。これらの解析の結果、BAQ、BAQ 二塩酸塩とも、蒸着処理による化合物の分解は見出せなかったこと、また BAQ 二塩酸塩膜においては規則的な構造が認められない一方、BAQ 膜は規則的な層状構造を示す結果が得られた。この BAQ 膜については、BAQ 分子がチオフェン鎖の  $\pi$  電子系同士が接触する形で基盤上に直立し、膜表面には BAQ 末端のアミ

メチル基が露出しているという結果が得られた。なおこれらの分光測定用のサンプルにおいて用いられた蒸着基盤については、各測定に適合する様に、近赤外分光測定では臭化カリウム、その他は石英スライドガラスが用いられた。これらの基盤の表面形状によっては膜のマクロ構造は異なっていると思われる。しかし、本研究で測定した単結晶シリコン上の膜が、基盤の平滑さから考慮して膜の本来の形状を示しているものと考えられた。

これらの分光学的な測定によって得られた BAQ 二塩酸塩膜構造の不規則性、および BAQ 膜構造の規則性についての結果は、AFM による観察の結果を支持するものであると考えられた。また、形状測定を行った  $1\mu\text{m}$  四方の領域において、膜表面の高低差は BAQ 二塩酸塩膜で  $4.5\text{ nm}$  以内、BAQ 膜で  $10\text{ nm}$  以内である結果が得られた。これらの膜厚が  $100\text{ nm}$  であることを考慮すると、基盤表面は全面的に BAQ 二塩酸塩、BAQ に覆われており、その膜表面はナノメートルレベルで平滑であることが示された。

以上の結果から、BOT 類を成膜して使用するための基礎的な知見が得られた。

特に BAQ 膜については膜内において  $\pi$  電子系同士が接触していることから電気伝導性が期待されるほか、表面にアミノメチル基をもつ均一性の高い緻密な膜が作成できたことから、今後の有機導電膜<sup>(8)</sup>としての応用や、アミノメチル基を介して BAQ 膜に酵素等を結合させるといったセンサー方面への応用が期待された。

## 2-5 結言

新規に合成された BOT 二量体(BAB)、三量体(BAT)、四量体(BAQ)の特性を評価した。BOT の水溶液中における吸収ピーク測定の結果、BAT、BAQ ではそれぞれ  $359$ 、 $394\text{ nm}$  の長波長紫外線 UVA ( $320$ - $400\text{ nm}$ ) 領域にピーク波長を持つ一方、BAB は細胞に紫外線障害を強く引き起こす中波長紫外線 UVB ( $280$ - $320\text{ nm}$ ) 領域にピーク波長を持つことが判明した。また、室温  $25^\circ\text{C}$  において BAB は  $10\text{ mM}$ 、BAT は  $5\text{ mM}$  濃度の水溶液を調製可能であった一方、BAQ は

最大で 0.4 mM 程度しか水に溶解しないことがわかった。以上の結果から、細胞傷害実験には三量体である BAT を選択した。

BAT の水溶液系での基礎物性を検討し、滴定実験の結果から生体計測において重要な中性 (pH ≒ 7.4) 領域で BAT は溶液として使用可能であることが示唆された。

また、BAT が光増感作用を示すか評価するため、照射量および BAT の有無によって抗酸化剤 Trolox-C がどの程度酸化されるか、比較測定を行った。その結果、Trolox-C は BAT 未添加の場合に光量  $1 \text{ J cm}^{-2}$  あたり  $0.07 \mu\text{M}$  酸化された一方で、BAT 存在下では  $0.8 \mu\text{M}$  と約 11 倍多く酸化された。また、光強度が異なっても照射光量が等しければ、BAT によってほぼ同濃度の Trolox-C が酸化された。以上の結果から BAT が照射下で活性酸素種の生成を促進する、すなわち光増感作用を持つことが示された。

以上の結果から、BAT は細胞膜破壊剤として使用可能であることが示唆された。

なお BOT 四量体である BAQ については、真空蒸着による成膜を行い、表面形状の測定を行った。原子間力顕微鏡による観察から、BAQ 膜が結晶構造を持つこと、その膜表面は  $1 \mu\text{m}^2$  あたり高低差 10 nm 以下で平滑であることが示され、今後の固体表面上での BOT の適用が期待される結果が得られた。

### 第三章 光照射による BAT の細胞膜破壊の評価

#### 3-1 緒言

一般に生物は光照射により傷害を受けることが知られている。その機構は生体中の  $\pi$  電子系を持つ分子が光励起され、各種の酸化傷害を引き起こす活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, 以下 ROS) を生成するためと考えられている<sup>(20)</sup>。光増感剤 (Photosensitizer, 以下 PS) とは、光による ROS の生成を促進する物質である。

$\alpha$  ターチエニルは植物由来の光増感剤として知られる分子で<sup>(21)</sup>、マリーゴールド等の植物自身が昆虫から身を守るために 2 次代謝物として生産するとされている。 $\alpha$  ターチエニルの光増感機構については、主に 3 重状態の  $\alpha$  ターチエニルが高い収率で一重項酸素を発生させるためと解析されている<sup>(42-44)</sup>。この  $\alpha$  ターチエニルはその誘導体も人工合成され<sup>(22,23)</sup>、ボウフラ、蛆虫、カビなど駆除に利用され、その構造と光毒性の関係についての数多くの報告がなされている他、最近では光療法 (Photodynamic Therapy, 以下 PDT) としてガン腫瘍、皮膚腫瘍、HIV の殺傷にも利用されている。このようにターチオフェンとその類似化合物は光毒として広範囲な応用の可能性を秘めている。

前章で三種のビスアミノメチルオリゴチオフェンから、細胞実験用に BAT を選択した。BAT は、酸性～中性水溶液に容易に溶解する性質を持つ。そのため BAT 水溶液で細胞を灌流することで、この分子を細胞表面に容易に付加させることが可能である。これは、他の修飾チオフェンオリゴマーに限らず、導電性高分子モノマーとして設計された他の分子には類のない新規な性質である。



光増感剤の毒性機構は、光励起され励起三重項状態になった光増感剤が ROS を生成し、これら ROS が細胞膜の不飽和脂質の連鎖的過酸化反応を引き起こすためと考えられている。細胞毒性を引き起こす色素、そしてその毒性の光増感作用については、既に膨大な研究が行われており、傷害の多くが細胞膜や細胞内のリン脂質、膜タンパクの過酸化による傷害であることが明らかになっている<sup>11)</sup>。それらの脂質過酸化のモニタリング法としては酸化に伴う酸素消費、あるいは呈色反応等の化学的な方法が主流である<sup>12,23)</sup>。しかしながら現在に至るまで、細胞膜破壊の時間依存性の研究は乏しく、多くの研究は照射からある程度の時間を経た後の膜の傷害状態について調べられていた。

これに対し本研究では、細胞レベルでの微小な膜傷害を、回復過程も含めて秒から数分のオーダーでモニタリングする必要があり、上記の測定法は適さない。そのため、本研究においては、電気生理実験の手法であるパッチクランプ法<sup>24)</sup>により細胞膜間電位、あるいは細胞膜を透過するイオン電流を測定することで、膜のイオン透過性より細胞膜傷害を検討した。

光増感剤による細胞傷害を電気生理実験で解析する研究の類例は少ない。例えば Tarr らによってローズベンガルを光増感剤として、カエル筋細胞のカリウム遅延チャンネルの電流と光量の関係が調べられている<sup>25)</sup>。しかしながら、これは光増感作用によってイオンチャンネルの機能を劣化させ、イオンチャンネルの解析を目的とした研究であった。このため、本研究の新規性としては細胞膜破壊に電気生理実験を適用した点、またオリゴチオフェンを細胞レベルの実験に適用した点の2つを挙げることができる。

本章においては、光増感機構を制御された細胞膜穿孔技術へと発展させる第二段階として、BAT 分子を直接細胞に添加して細胞死を生じない程度の細胞膜破壊を照射によって引き起こすことが可能であるか、検討を行った。

### 3-1-1 パッチクランプ法

パッチクランプ法は神経細胞の機能解析に広く用いられている細胞膜電位測定法である<sup>9,10)</sup>。

本実験では細胞全体(Whole-cell パッチクランプ法)、また電極上に単離した細胞膜(outside-out パッチクランプ法)を用いて、BAT 添加により実際に細胞膜にどのような影響が生じるか測定した (Figure 3-1)。



Figure 3-1. Patch-clamp method.

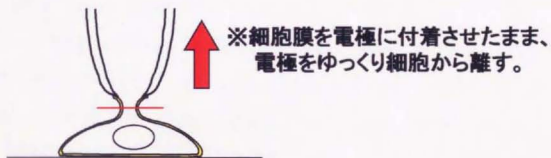
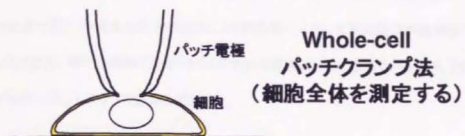


Figure 3-1 パッチクランプ法

### 3-1-2 神経系株化細胞 PC12

神経系株化細胞 PC12 はラット副腎髄質由来の神経節類似細胞である<sup>(65)</sup>。PC12 細胞は培養が容易であり、神経成長因子の添加により神経様に分化した同細胞は中枢神経のモデルとして用いられる他、種々の細胞工学デバイスのモデル実験にも用いられている<sup>(65,66)</sup>。PC12 細胞については第一章(1-3-1)で詳細を記述した。

## 3-2 実験

### 3-2-1 試薬等

光増感剤として使用した BAT は前章と同様に六車らにより合成・提供されたものを使用した。

以下の試薬は市販品を使用した。

#### 細胞培養関係試薬

ウマ血清(horse serum) (GIBCO BRL)

ウシ胎児血清(fetal bovine serum) (中標津ウシ準胎児血清 三菱化学)

L-グルタミン酸(GIBCO BRL)

L-グルタミン(GIBCO BRL)

Neurobasal Medium™ (以下 NB、GIBCO BRL) <sup>60</sup>

リン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline,PBS;組成:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.10 g/l、NaCl 90.00 g/l、

NaHPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 7.26 g/l、1 N NaOH 液で pH 7.4 に調整)

ウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin,BSA) (GIBCO BRL)

神経成長因子 Murine 2.5S NGF solution 100 µg/ml 100µ l (GIBCO BRL)

#### 抗酸化剤

Trolox-C (Fluka)

#### 培養容器

継代培養容器: ガンマ線滅菌済み 25 cm<sup>2</sup>培養フラスコ(岩城硝子)

神経化培養: ガンマ線滅菌済み φ 35 mm コラーゲンコートディッシュ(岩城硝子)

## その他

0.22  $\mu\text{m}$  フィルタ (Millex<sup>®</sup>-GV SLGV 025 LS, MILLIPORE)

## 溶液組成

パッチ電極内液(組成: 132 mM KCl, 8 mM NaCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 30 mM HEPES, 4 mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 0.3 mM GTP, 0.5 mM EGTA,最終的に NaOH 添加により pH 7.3 に調製)

Trolox-C 溶液(1 mM Trolox-C を NaOH 水溶液 (pH 10.0)に溶解)

電気生理実験用培地(組成:124 mM NaCl; 5 mM KCl; 2.4 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1.3 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mM glucose、最終的に NaOH 添加により pH 7.4 に調製)

## 3-2-2 機器

$\text{CO}_2$  インキュベーター (朝日ライフサイエンス製)

共焦点レーザー顕微鏡(confocal laser scanning microscope,CLSM) MRC-1000 UV (BIO-RAD laboratories)

細胞膜電位測定用アンプ Axopatch 1-D (Axon Instruments)

解析ソフトウェア Axoscope ver.1.1 ソフトウェア(Axon Instruments)

## 3-2-3 細胞培養

実験細胞には神経系株化細胞 PC12 を使用した。同細胞は大日本製薬 AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION より入手した。



### 3-2-3-1 培地調製

10% ウマ血清、5% ウシ胎児血清、7.35 mg/l L-グルタミン酸、2 mM L-グルタミンを含む NB 培地 (pH 7.3) を用いて PC12 細胞を CO<sub>2</sub> インキュベーター中 95% CO<sub>2</sub> ガス下、37°C で培養した。

なおウマ血清については 56°C、30 分の加熱により熱非働化処理したものを使用した。

### 3-2-3-2 PC12 細胞培養プロトコル

培養プロトコルは大日本製薬 AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION 説明書および実験医学別冊神経生化学マニュアルより以下の様に要約し、培養を行った。

継代培養は、培地を細胞に吹き付け培養フラスコ壁面よりはがし、300g、5 分の遠心分離により細胞を集めた後、底面積 25 cm<sup>2</sup> の培養フラスコ内に 1 ml あたり  $1 \sim 3 \times 10^4$  cell cm<sup>-2</sup> となるように細胞をまき、2~3 日毎に培地交換することにより行った。

PC12 細胞を神経様細胞に分化させる際には神経成長因子 (Nerve growth factor, 以下 NGF) 2.5S を最終濃度 50 ng ml<sup>-1</sup> となるように培地に添加した。培地添加用 NGF 分散液調製法は以下の通りである。

- 1) 2 mg ウシ血清アルブミンを PBS 1000  $\mu$ l に分散し、分散液を ポアサイズ 0.22  $\mu$ m のフィルタを通し滅菌した。
- 3) この滅菌液 100  $\mu$ l と NGF solution 100  $\mu$ l を加え全量を 200  $\mu$ l に調製し、これを 8  $\mu$ l づつミニチューブに入れ、-20°C で凍結保存した。

このように分注した NGF 液を培地に 1000 倍希釈となるように添加して、PC12 細胞を分化させた。

PC12 細胞はプラスチックボトルの壁面に弱く接着し、小さいクラスターを形成しながら生育した。なお継代培養容器には 25cm<sup>2</sup> 培養フラスコ、神経化培養にはコラーゲンコートディッシュを使用した。

以上のプロトコルに従い、細胞を培養した。電気生理実験には神経様細胞に分化開始後六日以上経過した細胞を使用した。

### 3-2-3-3 電気生理実験

細胞レベルでの微小な膜傷害を、回復過程も含めて秒から数分のオーダーでモニタリングする必要があるため、電気生理実験の手法であるパッチクランプ法により細胞膜間電位、あるいは細胞膜を透過するイオン電流を測定した。

光増感剤 BAT は HEPES (25 mM, pH 7.4) 緩衝液に分散した。マイクロピペットにより細胞近傍に局所的に添加するための BAT 液(原液)は 2 mM、灌流液全体に添加するための液は 0.2 mM に調製した。

なお、BAT 液の局所添加に際してはマイクロマニピュレーターに保持された微小ガラスキャピラリーを使用し、適宜細胞に吹き付ける形で供給した。このキャピラリー内部に光増感剤 BAT 液(BAT 濃度 2 mM、水溶液)を充填し、キャピラリー先端部が、膜電位・膜抵抗を計測する細胞の近傍 200 μm 以内になるように配置した。実験にあたってはキャピラリー内部をマイクロインジェクション装置により加圧(0.08 kg cm<sup>-2</sup>)して BAT 液を放出し、目的となる細胞膜に BAT を付着させた。

電気生理実験中、細胞は 2 ml の電気生理実験用培地により室温で維持された。なお培地蒸発による影響を防ぐため、電気生理実験用培地は最長でも 40 分に一度はピペットにより交換した。

また、BAT 存在下、光照射によって生じた膜破壊の機構に何らかの酸化反応の寄与があるか評価するために、神経灌流液に抗酸化剤 Trolox-C を添加し、細胞傷害が抑制されるか比較した。

### 3-2-3-4 BAT 励起光照射

励起光源は共焦点レーザー顕微鏡に標準装備されている 50 mW, 波長 363 nm のアルゴンイオンレーザーを使用した。顕微鏡観察視野(約  $470 \mu\text{m} \times 680 \mu\text{m}$ )の  $1/16$  (X軸、Y軸方向それぞれ  $1/4$ ,  $117 \mu\text{m} \times 170 \mu\text{m}$ )の領域を前述のレーザー光で順次走査した。この領域に、パッチ電極の接続された被測定細胞全体が入るように設定した。レーザー光は 100 %出力で 50 mW であった。照射光量は、照射時間を  $1/16$ ,  $1/4$ ,  $1/32$  秒から選択することで調節した。また、減光フィルタによる調節も適宜行った。なお、共焦点顕微鏡においてサンプルを拡大計測するズーム機能を使用した場合は、通常に比べ光を狭い領域で集中して走査するため、単位面積あたりの光量はズーム倍率の二乗に比例して増加することになった。また実際に細胞に励起光が届くまでにはコーラゲンコートディッシュのプラスチックを透過するため、プラスチック透過に伴う減光を考慮する必要があった。なお、本章で述べた光量には、このディッシュによる減光を含んでいない。

また、励起光照射の際には電気生理記録と連動した矩形波信号を光源に送信し、光照射と電気的測定の同期をとった。

電気生理実験の開始にあたり、細胞膜電位は  $-80 \sim -60 \text{ mV}$  の間に維持されていた。パッチ電極の抵抗は  $3 \sim 4 \text{ M}\Omega$  で、前述の電極内液を充填して用いた。

細胞膜抵抗値はパッチ電極により 350 ms, 1 Hz の矩形波過分極電流を通電した際の膜電位変化より算出し、この分極のための通電量( 0.1 または 0.15 nA) は通電による膜電位変化が 30 mV を越えないように選択した。なおこの実験条件下では、PC12 細胞は活動電位を発生しなかった。なお、実験に際しては細胞膜の膜抵抗は  $100 \text{ M}\Omega$  以上の平均  $120 \pm 10 \text{ M}\Omega$  のものを用いた。

測定された電位・電流のデータは 5 kHz のローパスフィルタによって高周波ノイズを除去、ソフトウェアを用いて解析した。

なお実験の結果には、参考のため、光照射量を  $\text{J cm}^{-2}$  単位で表示した。

### 3-3 結果

Figure 3-2 は実験系の略図である。Figure 3-3は実験中の細胞の顕微鏡写真である。写真右手よりパッチ電極が中央の細胞にあてがわれている。この細胞は細胞全体に光照射され、膜電位および膜抵抗が消失した状態にある。周辺の細胞と比較して、光照射された細胞は平面的になっている様に見受けられる。

電気生理実験によってBATの有無、および光照射の有無による細胞膜電位の変化を測定した結果をFigure 3-4に示す。細胞膜電位は光照射によっても、またBATの吹き付けによってもほとんど変化しなかった。これに対して、BATを吹き付けた後、光照射を行った場合には細胞膜電位の脱分極が測定された。

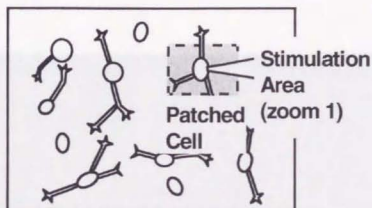
outside-out パッチクランプ法により測定された膜電流の経時変化をFigure 3-5に示す。この膜電流は細胞よりパッチ電極上に分離された直径約 $2\ \mu\text{m}$ の細胞膜を透過する電流である。膜電流は光照射前にはほぼ $0\ \text{nA}$ であったが、 $1.57\ \text{J cm}^{-2}$ の光照射後約14秒の誘導期間の後に測定レンジである $1\ \text{nA}$ を上回る過大な電流が流れ、回復は認められなかった。

BAT存在下、光照射を行った場合の典型的な3種類の膜電位および膜抵抗の変化をFigure 3-6、Figure 3-7に示す。光量 $0.47\ \text{J cm}^{-2}$ では $4\ \text{mV}$ 以上の過分極、5%以上の膜抵抗の減少も観測されなかった。一方、光量 $0.94\ \text{J cm}^{-2}$ では、約3秒後に $20\ \text{mV}$ 程度の脱分極と膜抵抗の減少が観測された。さらに光量 $1.57\ \text{J cm}^{-2}$ では光照射の約14秒後に膜電位および膜抵抗が消失した。

以上のように測定された脱分極や細胞膜電位の消失は、BATの光増感作用による酸化的な細胞膜傷害によるものと考えられた(第一章1-2-2参照)。そのために光照射下でBATが引き起こす膜傷害について、酸化機構が作用しているか知見を得るために、細胞灌流液に抗酸化剤を添加してその影響を評価した。具体的には、 $10\ \mu\text{M}$ 水溶性抗酸化剤Trolox-Cを含む細胞灌流液を使用

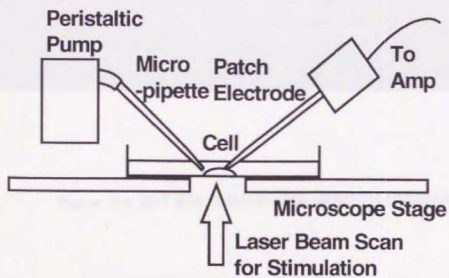
し、BAT 存在下での細胞の光傷害に Trolox-C を含まない通常の灌流液に比較して、膜傷害の程度に差が認められるか比較実験を行った。照射光量と傷害の程度を BAT 濃度および Trolox-C 添加の有無によって整理した結果を Figure 3-8 に示す。ここで光照射による細胞傷害のデータを比較する場合、放射線障害の評価法が参考になる。放射線を照射された場合に対象となる生物の 50% が死に至る放射線量は 50% 致死線量 (lethal dose 50) と定義される<sup>29)</sup>。これを光照射に対して適用すると、ある条件において、対象となる生物の 50% が死に至る光量は 50% 致死光量 (lethal light dose 50) と定義することができる。

Figure 3-8 において、回復可能な膜傷害 (レベル A) と、回復不可能な膜傷害 (レベル B) との間となる光量が、対応する実験条件における細胞の 50% 致死光量と考えられる。この 50% 致死光量について Figure 3-8 より概算した結果を、参考のため Table 3-1 に示す。その結果、細胞灌流液に BAT が 49  $\mu\text{M}$  含まれていた場合には 50% 致死光量は、約  $1 \text{ J cm}^{-2}$  と推定された。一方細胞灌流液に 2  $\mu\text{M}$  BAT を含む場合、細胞の 50% 致死光量は 10  $\mu\text{M}$  Trolox-C を添加することによって約  $10 \text{ J cm}^{-2}$  から約  $1000 \text{ J cm}^{-2}$  へとおよそ 100 倍増加することが示された。



Full Sight of microscope

(a) Photo Stimulation Area Setting



(b) Patch-Clamp and Photo Stimulation

Figure 3-2 実験系概略図



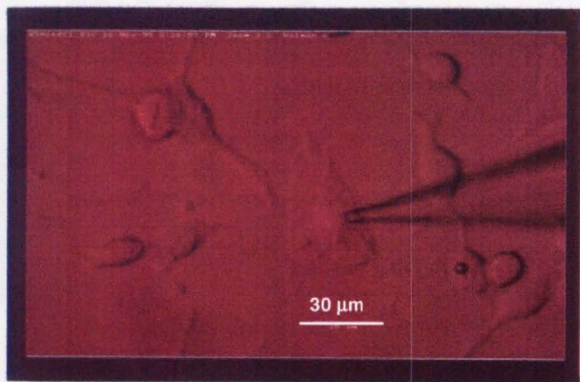


Figure 3-3 BAT 添加、光照射後の細胞(膜電位および膜抵抗消失)

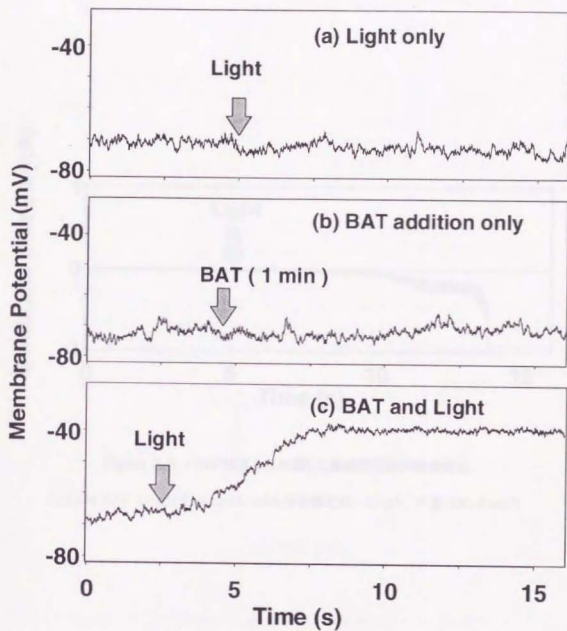


Figure 3-4 BAT 添加と光照射の膜電位に及ぼす影響

( 2 mM BAT液を細胞に吹き付けて添加, 光量  $25.1 \text{ J cm}^{-2}$  )

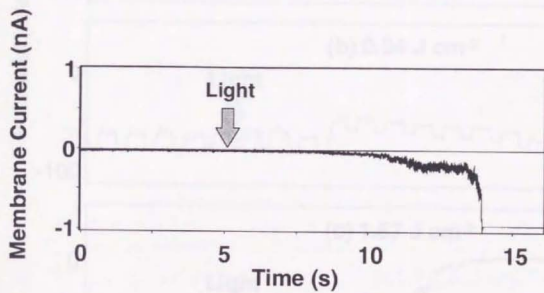


Figure 3-5 パッチ電極上に分離した細胞膜電流の経時変化

(18  $\mu$ M BAT, 10  $\mu$ M L-ascorbic acid, 設定膜電位 -70 mV, 光量 183 J cm<sup>-2</sup>)

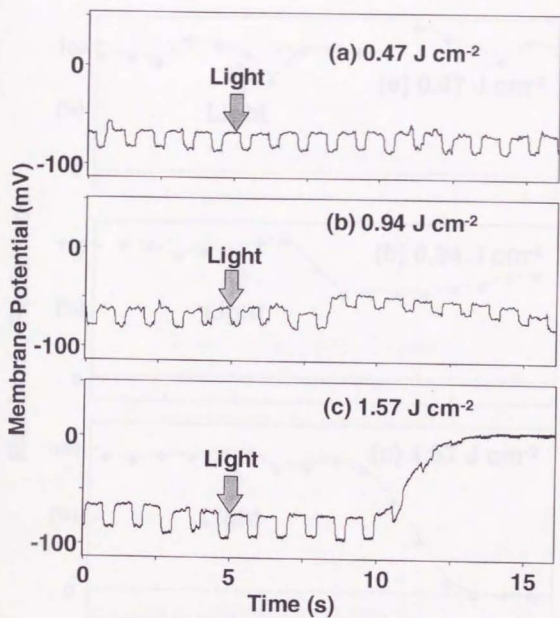


Figure 3-6 光照射量による細胞膜電位への影響の違い (49  $\mu$ M BAT)

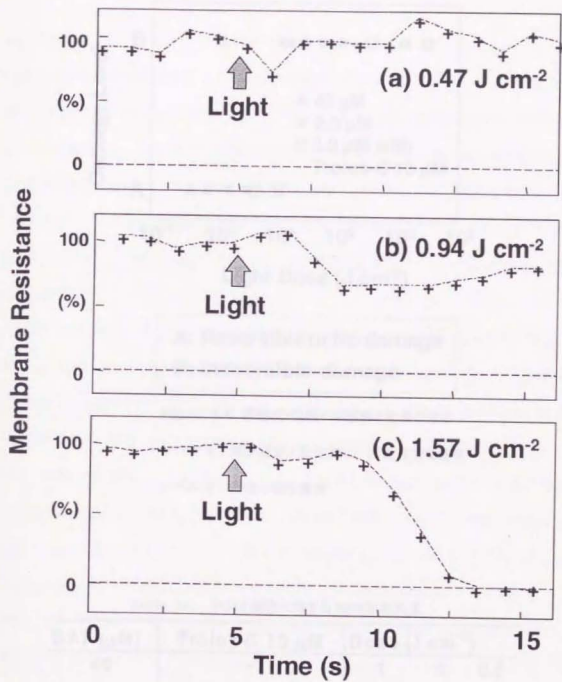
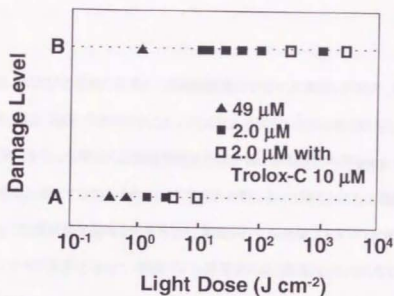


Figure 3-7 光照射量による細胞膜抵抗への影響の違い

(49  $\mu$ M BAT, 膜電流 1.5 nA保持)



A: Reversible or No damage  
 B: Irreversible damage

Figure 3-8 膜電位・抵抗の回復性と光量の対応

レベル A: 電位測定上変化無し〜回復可能な傷害

レベル B: 回復不能な傷害

Table 3-1 PC12 細胞に対する 50%致死光量

| BAT ( $\mu\text{M}$ ) | Trolox-C 10 $\mu\text{M}$ | Dose ( $\text{J cm}^{-2}$ ) |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 49                    | -                         | 1 $\pm$ 0.2                 |
| 2                     | -                         | 10 $\pm$ 3                  |
| 2                     | +                         | 1000 $\pm$ 300              |

(Irradiated by  $\lambda = 363 \text{ nm}$  Argon-ion Laser)



### 3-4 考察

BAT の有無、および光照射の有無による細胞膜電位の変化を測定した結果、細胞膜電位は光照射によっても、また BAT の吹き付けによってもほとんど変化しなかったのに対して、BAT を吹き付けた後、光照射を行った場合には細胞膜電位の脱分極が測定された (Figure 3-4)。膜電位はイオン透過性の低い膜、すなわちイオンバリア能のある膜によって隔てられた 2 種類の電解質溶液の間に生ずる。この電位発生機構を考慮すると、観測された脱分極は BAT の光増感作用の結果、細胞膜のイオンバリア能が劣化して、膜間イオン濃度差による膜電位は小さくなり、脱分極が生じたものと考えられる。

細胞膜のイオン透過性を評価するには、細胞膜を透過するイオン電流 (膜電流) の測定が有効である。そのため、outside-out パッチクランプ法によって膜電流の経時変化を行った。その結果 (Figure 3-5)、膜電流は光照射前にはほぼ 0 nA であったが、1.57 J cm<sup>-2</sup> の光照射後約 14 秒の誘導期間の後に測定レンジである 1 nA を上回る過大な電流が流れ、回復は認められなかった。この過大な電流は、膜のイオンバリア能が消失したこと、すなわち細胞膜が破壊されたことを示唆している。Outside-out パッチクランプ法においては、細胞膜が細胞より分離された状態にあるため、細胞の代謝に依存しない膜自体の性質を測定している。光照射を行ってから約 13 秒後に膜が破壊されたことを示唆するこのデータは、光照射下、BAT による急性の細胞膜の傷害が細胞系の代謝変化によって間接的に生じたのではなく、細胞膜自体が直接的に破壊される機構により生じた可能性を強く示唆している。

一般に励起されたターチオフェンは励起三重項状態を介して、酸素と次のような反応経路を経て活性酸素を生ずるとされている。



これらの機構がこれまでの研究で検討されたターチオフェンの光毒性の開始反応であり、本研究で使用したターチオフェン誘導体 BAT も同様の機構で活性酸素種を生成、光毒性を示すものと推測される。

これら活性酸素種が不飽和脂質を酸化し、そのとき生じた過酸化脂質が連鎖的に脂質を酸化していくものと考えられる。細胞膜の酸化傷害は膜脂質のみならず膜タンパクについても報告されており<sup>63)</sup>、膜電位変化については活性酸素による膜タンパクのイオンポンプ機能等の傷害もある程度は寄与していると考えられる。

本研究においては、BAT 存在下、照射射によって細胞膜の傷害が発生するならば、その機構は膜の酸化傷害によるものであろうと想定していた。実際に、抗酸化剤である 10 $\mu$ M Trolox-C を灌流液に添加することによって、2  $\mu$ M BAT における 50%致死光量が約 10 J cm<sup>2</sup> から約 1000 J cm<sup>2</sup> へとおよそ 100 倍増加することが示された (Table 3-1)。これは、照射射によって生成した活性酸素種が Trolox-C によって捕獲された結果、細胞膜の過酸化脂質の発生が抑えられ、細胞死を引き起こすために必要な光量を増加させたものと考えられる。このように Trolox-C によって傷害が抑制されたことから、照射射下、BAT によって生ずる細胞膜の傷害には何らかの酸化機構が寄与していることが示唆される。

また、一般にターチオフェンの光毒性には分子の疎水性も寄与するものと考えられている。BAT は他のターチオフェン誘導体に比較して分子末端のアミノメチル基の親水性とチオフェン環部の疎水性のために細胞膜内へ容易に取り込まれ、寿命の短い活性酸素を脂質の近くで発生させることができるものと推定される。50%致死光量においては過酸化脂質の連鎖反応による膜破壊と細胞膜の防衛機構、すなわち  $\alpha$ -tocopherol や superoxide dismutase による酸化反応の停止、細胞の代謝機能による酸化脂質の除去、イオンポンプの稼働等との競合状態になり、どちらかの機構が優位となったときに細胞死、あるいは回復に至ると考えられる。このような酸化防御能力は antioxidant defence capacity (抗酸化能) と呼ばれている<sup>65)</sup>。

Figure 3-6、Figure 3-7に示したBATによる膜電位変化と膜抵抗変化は、光照射による膜傷害が、膜電位や膜抵抗を変化させるほどのイオンの漏れが生じた後でも可逆的に回復可能であることを示している。これは短時間の光照射によって活性酸素種が集中的に発生した後、新たな活性酸素種の供給が途絶えた状態で膜破壊が進行したことが影響しているものと考えられる。細胞や組織において、ある一定量の活性酸素種に対して、十分にその傷害を取り除ける程度の抗酸化能があっても、短時間に処理可能な酸化傷害には限界があるものと考えられる。本研究においては、レーザー光照射によって1秒以内の短時間に活性酸素種の発生を行った。そのため光照射の直後、一時的に膜電位や膜抵抗を変化させるほどの細胞膜の傷害が生じて、数十秒から数分後に抗酸化能が膜傷害に対して十分優勢になった場合は細胞が回復するものと考えられる。

通常の光増感剤による光傷害を評価する実験系では、紫外線ランプ等によって数時間～数日間、連続的に光照射を行い、その結果生じた細胞の傷害を測定している(1-2-2参照)。このような既存の実験において、光増感剤による細胞傷害や組織傷害は非可逆的な傷害であると考えられてきた。しかし、少なくとも本実験系において、細胞レベルで短時間の光照射を行った場合については、細胞膜の傷害はある程度可逆的であることが示唆された。

また、BAT存在下、膜電位の変化が認められた場合には、いずれの場合でも瞬間的に強力な光照射を行った後、光照射から実際に膜電位が変化するまでには数秒の時間差があった。これは脂質過酸化の誘導期(膜内抗酸化機構による防御が過酸化に抵抗している期間)に相当するものと思われる。

以上のことから、この実験における膜電位の脱分極変化・膜抵抗変化は、連鎖的な脂質膜過酸化反応にともなう膜の傷害により、通常の条件では膜から漏出しにくい各種イオンの漏れに起因するものと推測された。実際に強力な光照射によって最終的に膜電位が消失した後、細胞を光学顕微鏡によって観察すると、外見は扁平的になり全体的に収縮するような形態を示した(Figure 3-3)。これは文献<sup>86)</sup>に記載のシアンによって引き起こされた脂質過酸化によって変化した細胞膜形態の電子顕微鏡像と類似している。

本研究においては、照射量と膜破壊の関連の精密な定量的評価は困難であった。

その原因として以下の点が挙げられる。

- 1) 神経細胞様に分化させた PC12 細胞においては、神経化の進行が細胞毎の膜の状況が異なっていたと想定される。
- 2) 細胞毎の膜修復能力に違いがある。
- 3) 細胞表面への BAT 付着量を正確に制御出来なかった。
- 4) 有効な照射量の検討に、個々の細胞の面積を考慮しなかった。

また、パッチクランプ法を膜破壊剤と併用すること自体による問題もある。パッチクランプ法においては細胞膜とパッチ電極の先端が密着し、この接合部分からは電流がほとんど漏れないようにする必要がある。この電極—細胞膜接合部分の抵抗値は数ギガオームになるため、ギガシールと呼ばれる。一般的にパッチクランプ法は培養細胞で多用されるが、その理由は細胞表面が他の結合組織等で覆われていないきれいな状態であり、電極と細胞の密着性がよいためである。生体中から単離した細胞では、表面に結合組織等が残っているため、酵素処理等で細胞表面をきれいにする必要があったため、近年までパッチクランプ法の適用例は少なかった。なお現在では、スライスパッチ、ブラインドパッチといった新しい手法により、脳組織に直接パッチ電極を接続することが出来るようになっている。実際に BAT 濃度を高めるほど、ギガシールの成功確率は下がり、BAT を 181.8  $\mu\text{M}$  添加した際はギガシールが不可能であった。この条件下で、光学顕微鏡で細胞を確認したところ、灌流液中に析出した BAT が認められた。この観察は、細胞表面が過剰の BAT によって汚れたために、細胞膜とパッチ電極が密着できなくなった可能性を示している。

### 3-5 結言

$\alpha$ ターチエニル誘導体 BAT を細胞光傷害の光増感剤として使用し、光照射量により細胞膜への傷害を制御することを試みた。実験は神経様分化させた神経系株化細胞 PC12 を対象として、この光増感剤 BAT による細胞膜傷害の経時変化測定を行った。膜傷害の評価は電気生理実験 (パッチクランプ法) により行い、膜電位、膜抵抗を求めた。BAT を励起する光源としては共焦点レーザー顕微鏡のアルゴンイオンレーザー ( $\lambda=363$  nm, 50 mW) を使用した。BAT は細胞近傍のピペットから細胞に吹き付けるか、あるいは灌流液に直接添加して用いた。細胞灌流液ならびにパッチ電極内液はラット細胞に標準的に用いられる組成のものを使用した。

その結果、電気生理実験の手法により BAT による細胞膜のダメージを照射量により、

1) 細胞膜への影響なし、2) 細胞膜が数分で回復する傷害、3) 細胞膜が破壊され回復しない

以上の様に段階的に制御出来ることがわかった。

各 BAT 濃度下での 50% 致死光量についても検討を行った。その結果、細胞灌流液に BAT が 49  $\mu$ M 含まれる場合の 50% 致死光量は約 1 J  $\text{cm}^{-2}$ 、2  $\mu$ M 含まれる場合には約 10 J  $\text{cm}^{-2}$  と推定された。一方 2  $\mu$ M BAT と 2  $\mu$ M 抗酸化剤 Trolox-C (水溶性ビタミン E 誘導体) が含まれる灌流液においては、50% 致死光量は約 1000 J  $\text{cm}^{-2}$  と推定され、Trolox-C を含まない場合に比較しておよそ 100 倍増加することが示された。このことから BAT 存在下の光による膜破壊現象には、何らかの酸化反応が関与していることが示唆された。

従来、光増感剤の毒性は個体・組織レベルでの評価、あるいはイオンチャンネル等の機能性タンパクのレベルでの評価が行われてきた。また、その評価も光を連続数十分～数時間照射した後の化学的な測定に基づくものがほとんどであった。

本章においては、細胞レベルでの光増感剤の膜破壊作用についてミリ秒から秒のスケールで計測することが出来た。ある目的部位に短時間の光照射を行うことで、目的とする反応・化合物を作り出す技法は閃光分解と呼ばれる。この閃光分解の技法を応用して電気生理学的なリアルタイム計測より、光増感剤による細胞膜傷害に関する知見を導き出した研究は、本研究が世界初である。こ



のような短時間の光照射による、細胞膜傷害の解析法は今後の光増感剤の薬理・生理的作用の解析において重要な技法となると思われる。本法により得られた特に重要な知見として、光増感剤により傷害を受けた細胞膜抵抗が適当な条件下では 30 秒程度で回復することが判明した点を挙げることが出来る。光照射により開始反応として活性酸素種を生成し、その後暗下、すなわち開始反応が停止した状態で細胞膜の傷害～回復を計測した前例は文献調査によっても見いだせなかった。このように細胞膜の光傷害からの修復過程を計測することで、膜の動的プロセスの解析から工学的な細胞操作を対象とした、様々な有用な知見が得られると思われる。



## 第四章 BAT 膜破壊機構の解析

### 4-1 緒言

#### 4-1-1 BAT による細胞膜破壊の解析

前章における電気生理実験は、BAT 液を細灌流液に添加後3分～30分以内に行われた。この時間内では細胞内に BAT が取り込まれ、細胞の代謝に影響を与えるには、時間的に不十分と推測された。また、細胞膜破壊は、光照射後数秒以内で生じている迅速な反応であった。以上の2点から、BATによる細胞膜破壊は細胞代謝変化による可能性は低いものと考えられた。しかしながら、BATの光照射によらない細胞毒性の有無が不明であり、また BAT による細胞膜破壊に膜の酸化反応が寄与しているか、知見は得られていなかった。

これらの問題点を整理すると、以下のようになる。

電気生理実験は、細胞膜の電気的特性の経時変化をサブミリ秒～分の単位で測定できる。しかし細胞傷害の分析法としては一般的ではない他、個々の細胞の測定時間は数十分にとどまり、急性毒性しか評価できないという問題があった。

このため引き続き、既存の一般的な細胞傷害評価法によって BAT 光増感作用の解析を進める必要があった。

必要な検討項目は以下のようになった。

- a) 光増感剤と細胞の作用時間と膜傷害の関係を評価する。
- b) 細胞傷害と光増感剤の濃度との関係を評価する。

c) 脂溶性抗酸化剤である  $\alpha$ -tocopherol (vitamine E, 以下 $\alpha$ -toc)を添加した培地で細胞を培養し、細胞膜の  $\alpha$ -toc を増し抗酸化能を増大させる。これらの細胞に対し、a) b)と同様の実験を行い細胞傷害が減少すれば、BAT による細胞傷害が細胞膜脂質の酸化に起因する有力な裏付けとなる。

これらの細胞傷害の評価法として、遊離乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase, 以下 LDH)活性測定法を選択した。LDH は細胞質に含まれる遊離酵素であり、細胞膜に傷害が生じた場合には、細胞質から LDH が細胞外に漏出する。この細胞外の LDH 活性を指標に、細胞傷害を評価する手法が遊離 LDH 測定法であり、細胞傷害の評価法として一般的に用いられている<sup>87)</sup>。この LDH 法を PC12 細胞に対して適用した報告もなされており<sup>88-90)</sup>、同細胞に対する酸化的膜傷害についても、LDH 法により解析を行った報告もなされている<sup>91)</sup>。

#### 4-1-2 細胞からの脂溶性成分抽出と tocopherol 類の HPLC 測定

第三章に記述した電気生理実験においては、光増感剤による細胞傷害を抑制する目的で水溶性抗酸化剤の Trolox-C を使用した。Trolox-C は培地や灌流液への添加が容易である反面、水溶性・細胞膜透過性が高いために、実験系において、どの部位で活性酸素種を捕獲し、細胞膜の傷害を抑制しているのか、情報が得られないという問題があった。

照射射下の BAT による細胞膜破壊の機構としては、細胞膜脂質の過酸化が寄与していることが想定された。このような膜破壊機構に関する知見を得るため、細胞膜に特異的に抗酸化剤 $\alpha$ -toc を添加した細胞を調製し、対照例の細胞に比較して光による膜傷害が抑制されるか検討を行った。通常、 $\alpha$ -toc は水にほとんど溶解しないため、細胞膜に局在している。この $\alpha$ -tocを増加することで、細胞膜の抗酸化能を高め、前述のような比較実験が可能となった。

$\alpha$ -toc を強化した細胞を調製するために、細胞培養血清に  $\alpha$ -toc を添加した。細胞や生体組織に対する酸化傷害の解析実験においては、細胞や組織に  $\alpha$ -toc を添加し、抗酸化能を高めた状

態で傷害の抑制が認められるか、観察することが一般に行われている。しかし、そのような実験においては、細胞培地や組織灌流液に DMSO 等の有機溶媒に溶解した  $\alpha$ -toc を高濃度で水溶液に添加している。本来、動物においては血清中の脂質成分である低比重リポタンパク質 (Low-Density Lipoprotein, 以下 LDL) に脂溶性の  $\alpha$ -toc を溶解させ、LDL を介して細胞膜に  $\alpha$ -toc を取り込ませている。本実験系においては、血清 LDL に脂溶性の  $\alpha$ -toc を溶解させた上で、LDL を介して細胞膜に  $\alpha$ -toc を取り込ませている。この技法は、生体中において細胞膜に  $\alpha$ -toc が取り込まれる過程に近い自然な形で、細胞膜にのみ  $\alpha$ -toc を増加添加するために東大先端研の高橋らにより考案されたものである<sup>92)</sup>。

なお、このような比較実験を行う場合は、 $\alpha$ -toc 添加培養によって細胞膜中の  $\alpha$ -toc 含有量に実際どの程度の差が生ずるか、標準的な培養細胞における含有量と併せて把握しておくことが望ましかった。そのため、通常の培養を行った細胞と、 $\alpha$ -toc 添加培養を行った細胞の膜脂質の抽出を行い、膜脂質中の  $\alpha$ -toc 含有量を ECD-HPLC 測定を用いて導出した。

## 4-2 実験

### 4-2-1 試薬等

BAT は六車らにより合成・提供されたものを使用した。

以下の試薬は市販品を使用した。

#### 細胞培養関係試薬

第三章に準ずる(略称も含む)。

#### 抗酸化剤

$\alpha$ -tocopherol (D,L 混合物, SIGMA)

$\delta$ -tocopherol (D,L 混合物, SIGMA)

#### 実験用細胞培地

Hibernate A™ Media (以下 Hib-A, Gibco BRL) <sup>93)</sup>

#### 細胞培養容器

継代培養容器: ガンマ線滅菌済み 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ(岩城硝子)

神経化培養ディッシュ: ガンマ線滅菌済み  $\phi$  35 mm コラーゲンコートディッシュ(岩城硝子)

神経化培養マイクロプレート: ガンマ線滅菌済み 96 ウェルマイクロプレート(岩城硝子)

#### 高速液体クロマトグラフィー関連試薬

メタノール (以下 MeOH, ナカライテスク)

tertiary-ブチルアルコール (以下 tert-BuOH, 和光純薬)

過塩素酸ナトリウム (以下  $\text{NaClO}_4$ , 和光純薬)

その他

0.22  $\mu\text{m}$  フィルタ (Millex<sup>®</sup>-GV SLGV 025 LS, MILLIPORE)

LDH 細胞傷害検出キット LDH Cytotoxicity Detection Kit MK401 (以下 LDH キット, 宝酒造)

96 ウェル平底アッセイプレート(岩城硝子)

界面活性剤 Triton X-100 (以下 TX-100, Sigma)

Phosphate Buffered Saline, 7.4 Ca, Mg 不含(以下 PBS, GIBCO BRL)

死細胞核染色試薬 Propidium Iodide (以下 PI, Molecular Probes)

#### 4-2-2 細胞培養

実験細胞には神経系株化細胞 PC12 を使用した。同細胞は理化学研究所細胞開発銀行より入手した。培地調製・培養プロトコルは第三章(3-2-3-1)(3-2-3-2)に準じた。

##### 4-2-2-1 実験用 Hib-A 培地調製

Hib-A 培地に 10%ウマ血清、5%ウシ胎児血清、7.35 mg/l L-グルタミン酸、2 mM L-グルタミンを添加した。なお、ウマ血清については 56°C、30 分の加熱により熱非働化処理したものを使用した。

##### 4-2-2-2 実験用 PC12 細胞調製

神経化 PC12 細胞の培養容器については市販のコラーゲンコート済 96 ウェルマイクロプレートを使用した。実験用の細胞調製にあたっては、継代培養中の PC12 細胞を細胞密度  $0.9 \times 10^5$

cell cm<sup>2</sup>でウェルに植え継いだ。培地はウェルあたり300 μlとし、2〜3日ごとに 200 μl 交換した。膜脂質抽出実験用の細胞はφ35 mm コラーゲンコート済ディッシュへ細胞密度 0.9×10<sup>5</sup> cell cm<sup>2</sup> で殖え継いだ。培地はディッシュあたり 3 ml とし、2〜3日ごとに 2 ml 交換した。なおウェル用、ディッシュ用共に、培地には第三章(3-2-3-2)と同様に神経成長因子 NGF2.5S を添加し、細胞を神経状に分化させた。

ウェルの場合、実験にあたっては、まず炭酸ガス依存性 NB 培地を除去し、次に細胞を剥離しないように注意して洗浄用 PBS 100 μl で二回洗浄を行った。PBS を除去した後、最終的に大気下実験用 Hib-A 培地 100 μl に交換した。なお、ディッシュの場合は洗浄用 PBS 量 1 ml、Hib-A 培地 1 ml となる。

#### 4-2-2-3 α-toc 添加細胞培養

α-toc を細胞膜に添加し、抗酸化能を高めた細胞を調製するにあたっては、高橋らによる以下の未発表プロトコル<sup>(92)</sup>に基づいて培養を行った。

α-toc を DMSO に溶解し、150 mM DMSO 分散液を調製する。この原液を熱非働化ウマ血清(3-2-3-1 参照)に 1 mM α-toc になるように添加し、転倒攪拌を8時間以上行った後、0.22 μm フィルタで滅菌濾過を行う。

この α-toc 添加ウマ血清を用い、培養を行った。培地調製・培養プロトコルは第三章(3-2-3-1)(3-2-3-2)に準じた。

なおα-toc 添加ウマ血清は実験用 Hib-A 培地(4-2-2-1)には使用しなかった。これはα-toc 細胞を実験に使用する場合、細胞以外の実験条件は通常の実験と同一にする必要があったためである。

#### 4-2-3 機器

CO<sub>2</sub> インキュベーター (Forma Scientific)



蛍光顕微鏡 Axiovert135 (Zeiss)

マイクロプレートリーダー MPR-A4 i (東ソー)

Sample 492 nm, reference 600 nm

純水製造装置 Biocel A10 / Elix 10 (MILLIPORE)

#### 4-2-3-1 高速液体クロマトグラフィー

第二章(2-2-2-1)に準ずる。

#### 4-2-3-2 光増感剤励起光源

第二章(2-2-2-2)に準ずる。

本章においては、BATの励起光源として第二章で使用したパルスエキシマレーザーを選択した。このエキシマレーザー光源は、照射面積が約  $1.5 \text{ cm}^2$  であり、他のレーザーに比較して大きいという特徴がある。第三章で用いたアルゴンイオンレーザー光源は、数 $\mu\text{m}$  大のレーザースポットで最大  $150 \mu\text{m}$  四方を走査するために、一度に照射可能なサンプル量は体積的には極微量に限られていた。そのため、数十 $\mu\text{l}$  以上のサンプル量が必要なLDH活性測定による細胞傷害率の測定においては、本エキシマレーザー光源を使用するのが適当であると考えられた。

エキシマレーザーを使用した実験においては、以下の点に注意する必要がある。

- a) 使用したエキシマレーザー光の波長は  $307 \text{ nm}$  と中波長紫外線 UVB(  $280\text{-}320 \text{ nm}$  )領域内に入るため、レーザー光自体による細胞傷害の可能性について配慮する必要がある(第一章 1-2-3 参照)。

b) BAT の励起効率の点で、アルゴンイオンレーザーの波長 363 nm、エキシマレーザーの波長 307 nm、それぞれにおける BAT の吸光度 (Figure 2-5 参照) から BAT の励起効率を単純に比較すると、エキシマレーザーに比較してアルゴンイオンレーザーの方が単純計算では約 5 倍有利であろうと考えられる。第三章と本章の実験結果を比較する場合は、この効率の違いについても配慮する必要があった。

c) 第三章で使用したアルゴンイオンレーザーは、集光系により狭い面積に集中して光を照射可能であり、照射時間もほぼ一秒以内で十分であった。エキシマレーザーは光量では劣るため、レーザー発振回数を増すことで照射光量を増した。第三章において 49  $\mu\text{M}$  BAT の条件下で約 1.6  $\text{J cm}^{-2}$  以上の光量で非可逆的な細胞膜破壊が生じたことを参考に (Figure 3-8 参照)、光量は約 17  $\text{J cm}^{-2}$  を最大値として実験条件を定めた。この条件ではエキシマレーザー発振 20 Hz 時において、照射時間は 1 サンプルあたり最大 30 秒以内となった。データの解析に必要なサンプル数を確保するためには、1 サンプルあたりの照射処理を行う時間を抑える必要もあり、このような照射量の最大値を定めた。

#### 4-2-4 細胞脂質中の $\alpha$ -toc 濃度測定

##### 4-2-4-1 脂溶性成分抽出・ $\alpha$ -toc 測定手順

通常の培養を行った細胞、および  $\alpha$ -toc 添加培養を行った細胞に対して、細胞膜中の  $\alpha$ -toc 含有量を以下の a)~e) の手順にしたがって測定した。

a) PC12 細胞をコラーゲンコート済ディッシュ上で 7~10 日間神経化培養した後、細胞培地を除去了。同細胞を洗浄用 PBS 1 ml で 3 回洗浄した後、蒸留水 1 ml を細胞に吹き付け、容器か

ら剥離させて遠心チューブ(ポリプロピレン 1.5ml)に移した。遠心分離( 1500 rpm )により細胞を沈殿させベレット状にした状態で、上清を除き、最終的に水を 110  $\mu$ l 入れて細胞分散液にした。

- b) この細胞破壊液のうち 10  $\mu$ l を分取し、血球計算盤により細胞密度を求めた。残りの細胞分散液 100  $\mu$ l については液体窒素により急冷、凍結融解を3回繰り返し、細胞を破壊した。
- c) 細胞分散液に脂質抽出液 200  $\mu$ l を入れ ( total 300  $\mu$ l ), Voltex mixer で1分間振り混ぜた後に 12000 rpm で3 分間遠心分離を行った。下に脂質を含むクロロホルム層が沈降するので、100  $\mu$ l を別の遠心チューブ(ポリプロピレン製、容積 1.5 ml )に分取した。
- d) 遠心チューブ内の脂溶性成分を含むクロロホルムに対し、ドラフトチャンバー内で  $N_2$  ガスを吹き付けてクロロホルムを蒸発させた。乾燥状態で残った脂質をメタノール 50  $\mu$ l で溶解し、このメタノール液を ECD-HPLC により測定した。
- e) ECD-HPLC の測定条件設定は電極電位 0.6 V、流量 0.8 ml min<sup>-1</sup>とした。この場合、サンプルの HPLC への注入から  $\alpha$ -toc では約 10 分後、 $\delta$ -toc では約 6 分後にピークが現れた。

#### HPLC 溶媒組成

MeOH 90%(v/v):tert-BuOH 10%(v/v)、50 mM NaClO<sub>4</sub>

なお tert-BuOH は常温では固体のため、MeOH 50%(v/v) : tert-BuOH (v/v)の組成の stock solution を調製、これを使用した。

#### 脂質抽出液

クロロホルム 2:MeOH 1(v/v)混合液

#### 4-2-4-2 細胞抽出脂質からの tocopherol 類濃度算出方法

脂質抽出液によって抽出した細胞脂質に含まれる  $\alpha$ -toc 濃度を算出する手順は以下のようになる。

抽出率測定のための内部標準として、細胞分散液の段階で一定濃度の  $\delta$ -tocopherol (以下  $\delta$ -toc) を添加した。 $\alpha$ 、 $\delta$ -toc は同一の分配率で水層からクロロホルム層に抽出されると仮定して、この内部標準を利用して tocopherol (以下 toc) 類の抽出回収率を算出する。

細胞分散液からの toc 類の回収率は式(1)のように表される。内部標準とする  $\delta$ -toc 濃度を決め、その濃度サンプルにより得られるシグナル(下辺)と細胞分散液に同一濃度の  $\delta$ -toc 添加し、抽出後に得られる内部標準シグナル(上辺)を比較する。理想的に 100%抽出された場合、回収率は 1 になる。

$$\frac{(\text{CellSample中}\delta\text{-tocArea})}{(\delta\text{-tocSt.Area})} \quad (1)$$

抽出用クロロホルムメタノール 2:1 液を細胞分散水に対して 2 倍量入れると、抽出脂質を含む有機溶媒層の体積は水層に対して 1.38 倍になる。そのため、有機溶媒層における細胞密度は水層における密度に対して、この比率で希釈されることになる。

以上の条件から、細胞あたり  $\alpha$ -toc 濃度 [pmol/cell] は式(2)のように表される。

$$(\text{CellSample中}\alpha\text{-toc濃度[pmol]}) \times \frac{(\text{MeOH}[\mu\text{l}])}{(\text{CH}_2\text{Cl}[\mu\text{l}])} \times 1.38 \times \frac{1}{(\text{回収率})} \times \frac{(\text{分散水量}[\mu\text{l}])}{(\text{細胞数[cell]})} \quad (2)$$

この式の中の Cell Sample 中  $\alpha$ -toc 濃度は式(3)のように表される。

$$\frac{(\text{CellSample中}\alpha\text{-tocArea})}{(\alpha\text{-tocSt.Area})} \times \frac{(\alpha\text{-tocSt.Conc.}[\mu\text{M}]) \times (\alpha\text{-tocSt.vol.}[\mu\text{l}])}{(\text{CellSample.vol.}[\mu\text{l}])} \quad (3)$$

ECD-HPLC により測定された toc 類の濃度から、以上の式(1, 2, 3)より目的とする細胞あたり  $\alpha$ -toc 量が求められる。一般に、尿中の toc 類のような微量成分については  $1 \times 10^6$  細胞あたりに含まれる量で比較されるため、本研究においても同様の比較を行った。

#### 4-2-5 細胞傷害率測定実験

コラーゲンコート済 96 ウェルマイクロプレートを培養容器として、神経化した PC12 細胞を対象に実験を行った(4-2-2-2 参照)。ウェル中の細胞および培地に対し、エキシマレーザーで設定した光量に達するまで照射を行った上で、LDH キットにより細胞傷害率を測定した。このようにして得られた細胞傷害率から、照射光量と光増感剤の作用時間について、光増感剤 BAT の有無、および細胞への  $\alpha$ -toc 添加培養による影響の解析を行った。

使用した市販 LDH キットは以下のような反応により LDH 活性をホルマザン吸光度により評価するものである<sup>9)</sup>。



NAD<sup>+</sup>:ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド、H<sup>+</sup>:水素イオン

LDH 測定プロトコルについては、使用したキットの取り扱い説明書に準じ、以下の a)~e)の手順で測定を行った。

a) 光照射等の細胞実験後、培地 200  $\mu$ l のうち上清 100  $\mu$ l を、96 ウェルアッセイプレートに移す。  
この際に、ウェル底面の細胞を吸引しない様に慎重に上清を採取する。この上清に、直前に調製したキットの酵素-色素液 100  $\mu$ l を添加、LDH と反応させる。反応は室温で 30 分、遮光下で行う。

b) 各ウェルに酵素反応を停止するため 1N HCl を 50  $\mu$ l 加える。

c) バックグラウンドコントロール(培地中の LDH 活性)、低コントロール(無処理細胞から放出される LDH 活性)、および高コントロール(細胞を TX-100 1% 処理することで最大に放出される LDH 活性)の測定も行う。

d) マイクロプレートリーダーを用いて、サンプリング波長 492 nm、対照波長 600 nm でホルマザン吸光度を測定する。

e) 細胞傷害率を以下のように計算する。

$$\text{細胞傷害(\%)} = \frac{(\text{測定値} - \text{低コントロール})}{(\text{高コントロール}) - (\text{低コントロール})} \times 100 \times \frac{100}{(\text{光による LDH 活性低下(\%)})}$$

なお、式中の測定値、低コントロール、高コントロールについては、あらかじめバックグラウンドコントロール値を減算しておく。

また光による LDH 活性低下(%)は、高コントロールサンプルにエキシマレーザーによる光照射を行い、光照射を行わなかった場合の LDH 活性を 100%として各光量ごとの比活性を求めた。



#### 4-2-5-1 細胞傷害率について

通常、遊離 LDH 活性測定に基づく細胞傷害率は、測定細胞全体に対する死細胞の比率と考えられている<sup>(87)</sup>。しかし、本研究における第三章(3-3 参照)で得られたような可逆的な膜傷害の場合については、細胞死に至らなくとも LDH が膜から漏出する可能性があると考えられた。そのため、以降の細胞傷害の解析については、傷害率が単に死細胞の比率を表すのではなく、生細胞の一時的な膜傷害の影響も含まれている可能性に配慮した。

## 4-3 結果

### 4-3-1 細胞脂質中の $\alpha$ -toc 濃度導出

脂質抽出用サンプル液の細胞密度、および ECD-HPLC によって測定された抽出脂質中の $\alpha$ -toc 濃度から、設定した培養条件における  $\alpha$ -toc の細胞含有量を Table 4-1 に示した。

細胞膜中の  $\alpha$ -toc 含有量は、 $\alpha$ -toc 未添加細胞では  $0.02 \text{ nmol} / 10^6 \text{ cell}$  であったのに対して、 $\alpha$ -toc 添加細胞では  $1.37 \text{ nmol} / 10^6 \text{ cell}$  と 50 倍以上となっている結果が得られた。

### 4-3-2 細胞傷害率測定実験

光照射による LDH 活性の劣化を測定した結果を Figure 4-1 に示す。以降の細胞傷害率の導出においては、Figure 4-1 の結果に基づき算出した 数値 (Table 4-2) に従って、光照射による LDH 活性の劣化を補正した。このような補正処理を行った上で、光照射の有無、および $\alpha$ -toc 添加の有無による細胞傷害率の差を比較した。その結果を BAT 濃度別に Figure 4-2、Figure 4-3、Figure 4-4 に示す。なお各グラフの横軸は細胞と BAT の接触時間であり、BAT を含む Hib-A 培地に交換後、この時間経過した後には光照射を行ったことを意味している。また、光照射量は  $17 \text{ J cm}^{-2}$  に統一した。

光照射を行わなかった場合、BAT 接触時間が一時間以上のサンプルにおいて、次第に細胞傷害が生じた。いずれの場合も細胞傷害率は最大で 25%程度になった。

光照射を行った場合、 $2 \mu\text{M}$  BAT および  $10 \mu\text{M}$  BAT においては、細胞傷害率は BAT 接触時間にほとんど依存せず、約 20%程度であった。

一方、 $20 \mu\text{M}$  BAT において光照射を行った場合は、BAT 接触時間に依存して細胞傷害率の顕著な上昇が認められた。BAT 接触時間 60 分のサンプルでは傷害率は約 25%であったが、接触

時間 120 分のサンプルでは約 75%に上昇、接触時間 240 分のサンプルでは約 90%の障害率となり、2  $\mu$ M、10  $\mu$ M BAT とは明らかに異なる結果となった。

$\alpha$ -toc 添加培養細胞を対象にした比較実験においては、光照射を行った 20  $\mu$ M BAT、BAT 接触時間 120 分のサンプルにおいて最大約 60%の傷害率の減少が認められた。

$\alpha$ -toc 添加培養細胞でのその他のデータについては、元々の細胞傷害率が 25%程度と低かったこともあり、BAT 接触時間に依存した明瞭な傷害率の変化は認められなかった。

Figure 4-5は光照射処理を行った細胞の蛍光写真である。上段 a)は、BAT が添加されなかった細胞、下段 b)は 20 $\mu$ M BAT、接触時間 1 時間の処理が行われた細胞である。なお、写真中の細胞には、死細胞核染色試薬 PI を添加してある。PI は、細胞膜不透過性の核染色試薬であり、細胞膜損傷を受けている場合、あるいは細胞死により細胞膜が崩壊している場合に、核を蛍光染色する<sup>98)</sup>。

a)においては、PI 染色による蛍光はほとんど観察できなかった。一方、b)においては、核が PI 染色されている細胞が認められるほか、細胞全体が BAT による青白い蛍光を発していた。また、この青白い蛍光は細胞質からも発せられており、細胞核の部分が丸く抜けた状態になっていた。

Table 4-1 PC12 細胞膜脂質中の $\alpha$ -toc 含有量

| Sample                            | Native cell     | $\alpha$ -toc added cell |
|-----------------------------------|-----------------|--------------------------|
| Conc.                             | 0.02 $\pm$ 0.01 | 1.37 $\pm$ 0.12          |
| nmol / 10 <sup>6</sup> cell (n=3) |                 |                          |

サンプル中の $\alpha$ -toc 濃度は ECD-HPLC により計測、細胞密度は血球計算盤により算出した。

Table 4-2 エキシマレーザー照射量とLDH 活性の劣化値

|                                  |     |     |     |     |     |      |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Light Dose (J cm <sup>-2</sup> ) | 0   | 1.1 | 2.1 | 4.2 | 8.5 | 17.0 |
| LDH Activity (%)                 | 100 | 95  | 91  | 89  | 81  | 63   |

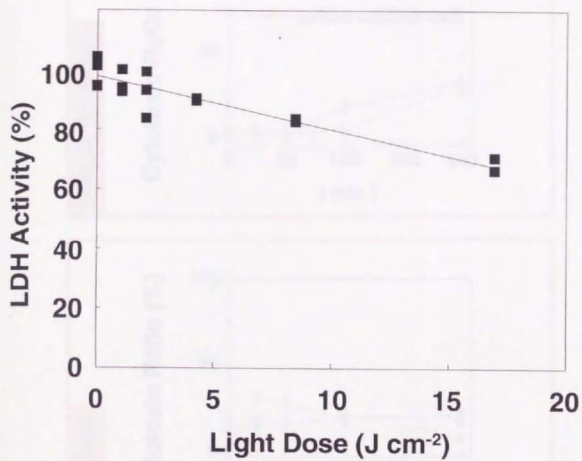
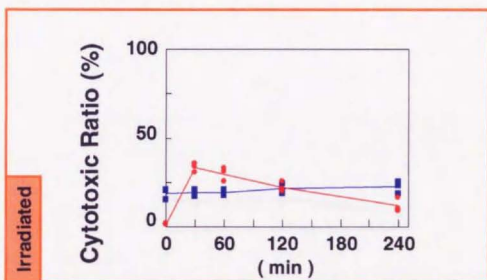
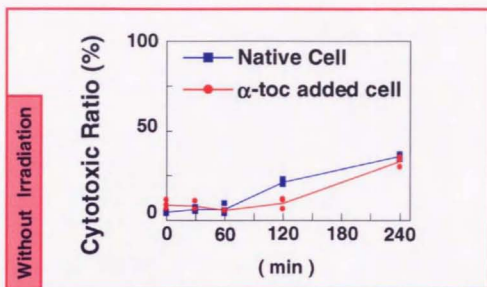


Figure 4-1 光照射による LDH 活性低下

サンプル: 神経化 PC12 細胞を 1% 界面活性剤 Triton X-100 で溶解した上清



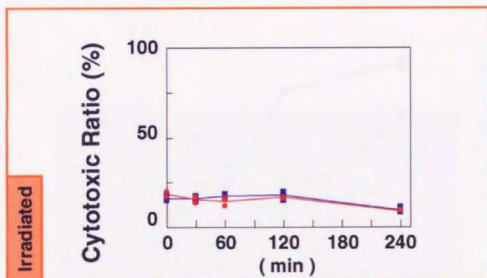
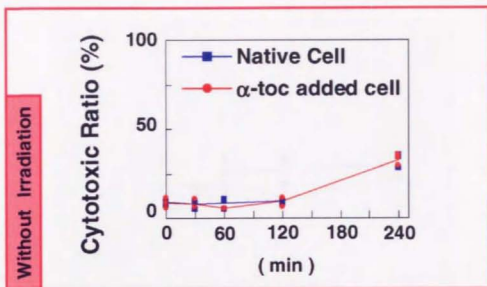
### BAT Exposure Duration

Figure 4-2 細胞傷害率測定(1) ~ 2  $\mu$ M BAT

: 光照射の有無 および  $\alpha$ -toc 添加による差

光照射量 17 J cm<sup>-2</sup>



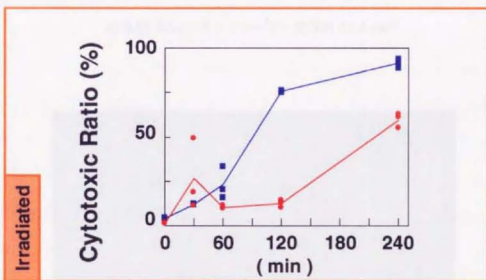
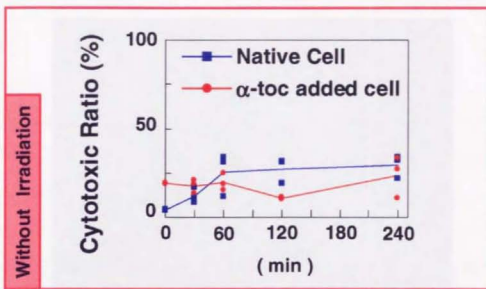


### BAT Exposure Duration

Figure 4-3 細胞傷害率測定(2) ~ 10 μM BAT

: 照射の有無 および α-toc 添加による差

照射量 17 J cm<sup>-2</sup>



### BAT Exposure Duration

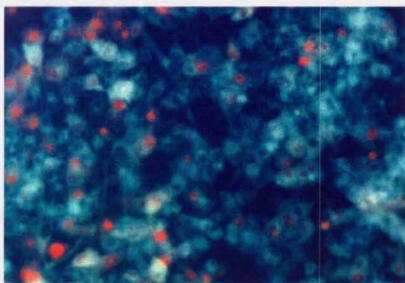
Figure 4-4 細胞傷害率測定 (3) ~ 20  $\mu$ M BAT

: 光照射の有無 および  $\alpha$ -toc 添加による差

光照射量 17 J cm<sup>-2</sup>



a) BAT なし、エキシマレーザー照射  $17 \text{ J cm}^{-2}$



b)  $20 \mu\text{M}$  BAT 接触時間 1 時間、エキシマレーザー照射  $17 \text{ J cm}^{-2}$

Figure 4-5 BAT の細胞蓄積写真

※ 照射から 30 分後に、膜不透過性核染色試薬 Propidium Iodide  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  で死細胞核を染色 (赤) を行った写真である。蛍光顕微鏡において紫外線励起フィルタセットを使用し撮影した。

#### 4-4 考察

細胞膜中の $\alpha$ -toc含有量は、 $\alpha$ -toc未添加細胞における $0.02 \text{ nmol} / 10^6 \text{ cell}$ に対して、 $\alpha$ -toc添加培養を行った細胞では $1.37 \text{ nmol} / 10^6 \text{ cell}$ と50倍以上となっている結果が得られた。このことから、 $\alpha$ -toc添加細胞では通常の培養を行った細胞と比較して、細胞膜の抗酸化能はあきらかに上昇しているものと考えられた。そのため、ある細胞傷害について、通常の培養細胞と比較して $\alpha$ -toc添加細胞において傷害率が減少したとするならば、その細胞傷害の機構には細胞膜の酸化が寄与していると考えられた。

照射を行わなかった場合には、BAT接触時間が長くなるにつれ次第に細胞傷害が生じた。また、いずれの場合も細胞傷害率は最大で25%程度になった。これは照射によるない細胞傷害であったため、BATが何らかの薬理的な作用により細胞傷害を引き起こしているものと考えられた。これを仮に傷害Aと定義する。

照射を行った場合、 $2 \mu\text{M}$  BAT および  $10 \mu\text{M}$  BAT においては、細胞傷害率はBAT接触時間にほとんど依存せず、約20%程度であった。この傷害の程度が、照射を行った場合に比較して若干低かったこと、およびBAT接触時間による影響がほとんど認められなかったことから、この細胞傷害は先の傷害Aとは別の機構によるものと考えられる。これを仮に傷害Bと定義する。

$20 \mu\text{M}$  BAT において照射を行った場合は、BAT接触時間60分で約25%、接触時間120分で約75%、接触時間240分で約90%の傷害率となった。この傷害率の変化には照射およびBAT接触時間の寄与が認められたことから、傷害A、傷害Bとも異なる機構による傷害であることが推測された。これを仮に傷害Cと定義する。

これら傷害A、傷害Bについては、 $\alpha$ -toc添加により細胞膜の抗酸化能が高められていた場合でも傷害率の減少ははっきりとは認められなかった。これは傷害の機構として膜の酸化を経なかった

ためか、膜の酸化が生じたが反応が弱かったためか、傷害率自体が小さかったためか、現段階では判断できない。これらの傷害の解析については今後、より長時間に渡る細胞傷害実験を行うか、あるいはより強力な光源による細胞傷害実験を行う必要があるものと考えられる。

一方、傷害 C については  $\alpha$ -toc 添加培養細胞での比較実験において、最大約 60% の傷害率の減少が認められた。これは傷害 C の機構において細胞膜の酸化が寄与していることを強く示唆しているものと考えられる。

BAT 接触時間を長くすることで、傷害 A、傷害 C については細胞傷害率が増した。このことから、BAT が細胞に蓄積することで、傷害 A、C については傷害が大きくなっていることが示唆された。BAT の細胞蓄積性については、Figure 4-5 が参考になると思われる。BAT 由来と思われる蛍光が細胞質からも発せられていることから、BAT は細胞膜だけでなく、細胞質にも蓄積しているものと考えられた。

この顕微鏡像により得られた知見と細胞傷害のパターンから、以下のような仮説を立てた。

- a) 細胞膜内、あるいは細胞内に次第に蓄積された BAT によって、何らかの代謝変化により細胞傷害を引き起こされた(傷害 A)。これは光照射によらない、BAT の薬理的な作用によるものである。
- b) 培地中の BAT は細胞表面に接しており、その細胞への作用濃度は BAT 接触時間に依存しない。この細胞外の BAT が光照射によって、接触時間依存性のない細胞傷害を引き起こした(傷害 B)。
- c) 細胞内に蓄積された BAT と細胞外の BAT が光照射を行うことで、相乗的に細胞傷害を引き起こした(傷害 C)。 $\alpha$ -toc 添加により細胞膜の抗酸化能が高められていた場合には、傷害の減少が明確に現れたことから、この細胞傷害は膜の酸化によって引き起こされたものと考えられる。

第三章との比較において問題となるのは傷害 B のケースである。第三章で行った実験は、BAT 添加後 3~30 分の光増感作用、照射量は  $0.47 \text{ J cm}^{-2} \sim$  約  $1000 \text{ J cm}^{-2}$  で行われた (Figure 3-6, Figure 3-7, Figure 3-8 参照) この実験条件による細胞傷害について、膜の崩壊に至らない傷害を傷害 D (Figure 3-8 における段階 A に相当する)、膜が崩壊する傷害を傷害 E (Figure 3-8 における段階 B に相当する) と仮に定義する。

傷害 D、E を本章の細胞傷害率実験に対応させると、BAT 添加後 3~30 分で発生している細胞傷害であることから、これは傷害 B に類するものと考えられる。その一方で傷害 D、E は抗酸化剤 Trolox-C によって抑制されたことから、抗酸化剤が有効であった傷害 C に対応する可能性もある。

Figure 3-8 によれば、膜崩壊に至る膜傷害 E が生ずるのに必要な光量は  $49 \mu\text{M}$  BAT 下で約  $1.6 \text{ J cm}^{-2}$  以上、 $2 \mu\text{M}$  BAT で約  $30 \text{ J cm}^{-2}$  以上と見積もられた。本章における  $10 \mu\text{M}$  BAT、 $2 \mu\text{M}$  BAT 下  $17 \text{ J cm}^{-2}$  の照射によって引き起こされた傷害 B は、光量から推測して膜の崩壊に至らない傷害 D に相当するのではないかと考えられる。

このことから、BAT 接触時間についての違いはあるものの、傷害 C と傷害 E の対応が推測される。光増感剤の作用量が少なくとも、光量が大きければ短い BAT 接触時間で大きな傷害を引き起こすという可能性は十分考えられる。すなわち、第三章においては BAT 接触時間が 30 分以内と短かったにもかかわらず、数十~数百  $\text{J cm}^{-2}$  の比較的大きい照射量によって傷害 C に類似した膜破壊、すなわち傷害 E が生じたものと考えられる。

これらの機構は仮説である。しかし、BAT が活性酸素種を生成していること、また傷害 C は細胞膜の抗酸化能が高められている場合に最大 60% の明らかな減少を示したことから、照射下の BAT による細胞傷害には、膜の酸化的な傷害が寄与している可能性が高いものと考えられた。



#### 4-5 結言

BAT によって引き起こされる細胞傷害が、細胞膜の酸化によるものであるか、検討を行った。細胞の傷害については神経化 PC12 細胞を対象として、一般的に用いられる遊離乳酸脱酸素酵素測定法により評価を行った。細胞に 20  $\mu\text{M}$  BAT を約 1 時間以上作用させた場合には、光照射により細胞膜の破壊を示す細胞傷害が認められた。これに対し細胞膜中の抗酸化剤  $\alpha\text{-toc}$  の含有量を 0.02 nmol /  $10^6$  cell から 1.37 nmol /  $10^6$  cell へ約 50 倍強高めた細胞においては、光照射による細胞傷害率が最大で 60% 減少した。このことから BAT 光増感による細胞傷害の機構として、細胞膜脂質の酸化の寄与が示唆された。

## 第五章 BAT 膜破壊を応用したマイクロインジェクション

### 5-1 緒言

本章においては、光増感機構を利用した細胞膜の破壊制御を実際にマイクロインジェクションに適用した結果を記述する。

インジェクションのマーカースとして水溶性蛍光色素 Lucifer Yellow CH (LY) を使用し、インジェクション液中の BAT の有無、および BAT 励起光照射の有無によって、細胞への LY インジェクション成功率がどのように変化するか評価した。

LY はマイクロインジェクションに用いられる低毒性の蛍光色素であり、細胞分裂の際、娘細胞に移行する特徴がある<sup>96)</sup>。また、高い水溶性と拡散性からマイクロインジェクションにより細胞に注入される神経系の細胞蛍光ラベル剤としても用いられる<sup>97)</sup>。さらに LY はギャップ接合<sup>98)</sup>で連結された細胞間を分単位で迅速に移行する特徴があり、PC12 細胞についても同様のギャップ接合形成のマーカースとして用いられた報告がなされている<sup>99)</sup>。LY を注入された細胞は過大な LY 励起光照射に対しては細胞死を引き起こす<sup>100)</sup>が、インジェクション液中の BAT の有無、および BAT 励起光照射の有無によって、細胞へのインジェクション成功率がどのように変化するか評価した。

#### 5-1-1 マイクロインジェクション実験について

通常、マイクロインジェクションを成功させる場合には、先端開口部の直径が数百ナノメートルであるガラス細管(キャピラリー)を高速で細胞に接触させ、機械的に、瞬時に細胞膜、あるいは核膜を貫通・穿孔する必要がある。本実験においてはプログラム動作可能な電動マイクロマニピュレーター(Eppendorf 社製、Micromanipulator5171)および電動インジェクター(Eppendorf 社製、Transjector5246)を使用し、キャピラリーの接触速度を任意の値に設定することが可能であった。

また、インジェクション用キャピラリーは同装置用に市販された量産品 (Eppendorf 社製、FemtoTips) を用いた。電動マイクロマニピュレーターによりインジェクション作業が再現性よく自動化されたこと、また自作キャピラリーに比較して形状の均一性が高い市販のキャピラリーを使用したことから、インジェクション成功率についての統計的処理を行うことが可能になった。なお、マイクロマニピュレーターは蛍光顕微鏡 (IX70、オリンパス光学工業) に装備した。

このような系では、光増感剤 BAT がキャピラリー先端の直径  $0.5 \mu\text{m}$  の領域に集中され、キャピラリーが接している領域以外については、BAT は拡散によって速やかに希釈された。そのため、細胞に作用する BAT 濃度としては、キャピラリー接触部の濃度に比較するとその他の部位の濃度は無視できると思われる。

インジェクション作業に際しては、キャピラリー接触速度  $1000 \mu\text{m s}^{-1}$  で細胞にキャピラリーが刺入できるようにマニピュレーターの動作範囲を設定した上で、キャピラリーを  $7 \mu\text{m s}^{-1}$  の低速度で動作させ、物理的に細胞膜を穿孔しないようにキャピラリーを細胞膜に接触させた。この条件で、BAT による光増感作用によって細胞のインジェクション成功効率がどのように変化するか比較した。なおキャピラリーのアプローチ速度  $1000 \mu\text{m s}^{-1}$  は、使用したマニピュレーターのほぼ最大設定速度であり、 $7 \mu\text{m s}^{-1}$  はマニピュレーターの最低設定速度である。

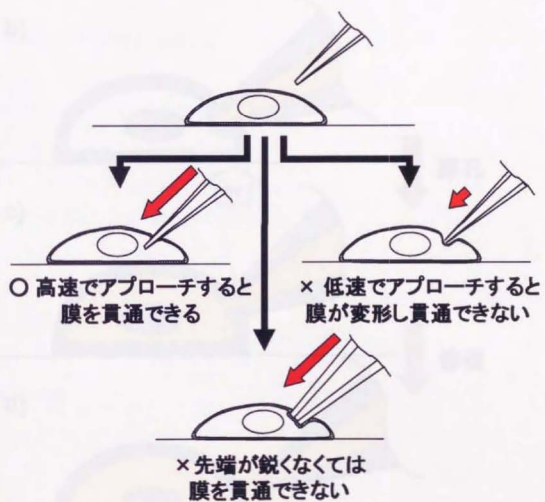


Figure 5-1 マイクロインジェクションの問題点

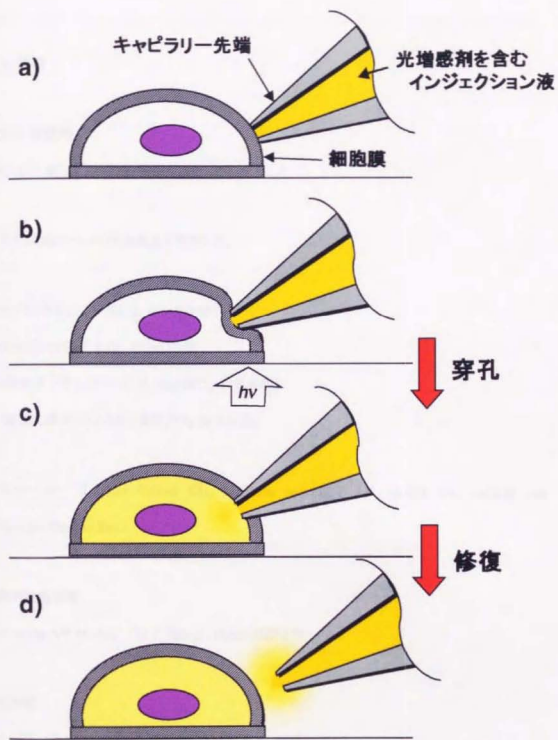


Figure 5-2 光穿孔プロセス図(マイクロインジェクション)

## 5-2 実験

### 5-2-1 試薬等

BAT は六車らにより合成・提供されたものを使用した。

以下の試薬については市販品を使用した。

塩化ナトリウム(以下 NaCl, キシダ化学)

塩化カリウム(以下 KCl, キシダ化学)

リン酸水素二ナトリウム(以下  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 和光純薬)

リン酸二水素カリウム(以下  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 和光純薬)

蛍光マーカー Lucifer Yellow CH, Lithium salt (以下 LY, ex.428 nm, em.536 nm,

Molecular Probes Inc.)

### 実験用細胞培地

Hibernate A™ Media (以下 Hib-A, Gibco BRL) (90)

### 抗生物質

ペニシリン・ストレプトマイシン混合物 凍結乾燥品 (Gibco BRL)

### 細胞培養容器

継代培養容器: ガンマ線滅菌済み 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ (岩城硝子)



実験用細胞培養ディッシュ:ガンマ線滅菌済みφ35 mm コラーゲンコートディッシュ(岩城硝子)

#### リン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline、以下 PBS)

インジェクション用 PBS は以下の濃度になるように各成分を精製水に溶解、調製した。

|                                  | 最終濃度     |
|----------------------------------|----------|
| NaCl                             | 8 g/l    |
| KCl                              | 0.2 g/l  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1.15 g/l |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0.2 g/l  |

※インジェクション用 PBS は5倍濃度で stock solution を調製した。

#### 細胞洗浄用 PBS

Phosphate Buffered Saline, 7.4 Ca, Mg 不含(GIBCO BRL)

光増感剤 BAT stock solution (2 mM BAT, 希塩酸により pH 3.0 に調製)

#### インジェクション液組成

光増感剤 100 μM BAT (BAT stock solution 5%添加)

蛍光マーカー 2 mM LY

インジェクション用 PBS

(なお BAT を含まない対照実験用インジェクション液については、BAT stock solution に代わり

同比率の pH 3.0 希塩酸を添加した。)

## 5-2-2 細胞培養

実験細胞には神経系株化細胞 PC12 を使用した。同細胞は理化学研究所細胞開発銀行より入手した。培地調製・培養プロトコルは第三章(3-2-3-1)(3-2-3-2)に準じ、実験に使用する細胞は  $\phi$  35 mm コラーゲンコート済ディッシュへ細胞密度 90000 cell / ディッシュで継代培養を行った。

### 5-2-2-1 実験用 Hib-A 培地調製

Hib-A 培地調製は第四章(4-2-2-1)に準ずる。

なお、抗酸化剤 Trolox-C 添加 Hib-A 培地は以下の様に調製した。

Trolox-C を 1mM NaOH 液に溶解、10 mM 液とする。この原液を、調製済みの Hib-A 培地に 1% 添加して最終的に 100  $\mu$ M Trolox-C とする。

### 5-2-2-2 抗生物質添加培養用 NeuroBasal 培地調製

NeuroBasal 培地調製プロトコルは第三章(3-2-3-1)(3-2-3-2)に準ずる。

抗生物質としてペニシリン・ストレプトマイシン混合物の凍結乾燥品を使用した。培地添加用 50 倍濃度のグルタミン・グルタミン酸溶液を調製する際に、この溶液に抗生物質混合物を添加、0.22  $\mu$ m フィルタを通して濾過滅菌した上で、抗生物質・グルタミン・グルタミン酸混合溶液として -20°C で凍結保存した。この抗生物質・グルタミン・グルタミン酸混合溶液を使用して、ペニシリン最終濃度が 10,000 単位  $\text{ml}^{-1}$ 、ストレプトマイシン最終濃度が 10,000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  となるように抗生物質添加 NeuroBasal 培地を調製した。

## 5-2-3 機器

CO<sub>2</sub> インキュベーター (Forma Scientific)

顕微鏡 IX70 蛍光顕微鏡 (オリンパス光学工業)

光増感励起光源 同顕微鏡用 100 W 水銀ランプ(オリンパス光学工業)

紫外線励起フィルタセット U-MWU ミラーユニット(オリンパス光学工業)

紫色光励起フィルタセット U-MWBV ミラーユニット(オリンパス光学工業)

電動マイクロマニピュレータ 5171(Eppendorf)

インジェクタ Transjector 5246 (Eppendorf)

インジェクション用キャピラリー FemtoTips (Eppendorf) 先端開口部直径 0.5  $\mu\text{m}$

純水製造装置 Biocel A10 / Elix 10 (MILLIPORE)

#### 5-2-4 マイクロインジェクション装置の設定

光増感機構によるマイクロインジェクションの成功確率を評価する際には、ピペット先端の機械的剪断力が寄与しない条件でインジェクションを行う必要があった。適切なインジェクションのためにはキャピラリーの到達位置(以下 Z limit)の調節が重要である。そのため、設定した Z limit において通常のアプローチ速度である  $1000 \mu\text{m s}^{-1}$  で成功確率80%以上でインジェクション可能であることを確認した上で、アプローチ速度を  $7 \mu\text{m s}^{-1}$  に低下させた。このアプローチ速度では、キャピラリー先端はインジェクション成功時と同じ位置(細胞に刺入できる位置)まで到達するものの、細胞膜をほとんど貫通できない。このような機械的剪断力による膜穿孔が困難なアプローチ条件下において、光増感機構を利用したインジェクション成功率の比較実験を行った (Figure 5-3)。

なお、このアプローチ速度値は細胞に実際にキャピラリーが接触する速度であり、マニピュレータに入力設定した値ではない。前述の各アプローチ速度について、 $1000 \mu\text{m s}^{-1}$  では設定値  $700 \mu\text{m s}^{-1}$ 、 $7 \mu\text{m s}^{-1}$  では設定値  $5 \mu\text{m s}^{-1}$  となる。

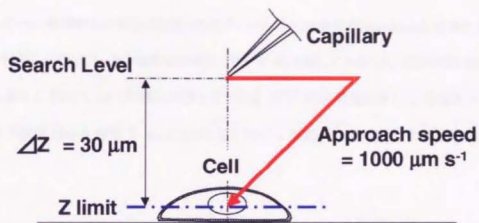
使用したマイクロマニピュレーターにおけるアプローチ速度入力値は X、Z 軸上での値である。このマニピュレーターにインジェクション動作を指令すると、X 軸・Z 軸が同時に入力速度で動作し、キャピラリー先端は水平面に対し45度方向、すなわちキャピラリー軸方向で細胞を突き、戻る形になる。そのために、マニピュレーターに入力設定した速度値を $\sqrt{2}$ 倍すると、アプローチ速度の実効値となる<sup>(100)</sup>。

また、同マニピュレーターのインジェクション設定時間には、キャピラリーがインジェクション位置への移動に要する時間が含まれる。そのため、Z limit 位置にキャピラリーが保持される時間、すなわちインジェクション時間の実効値は以下の様に算出される。

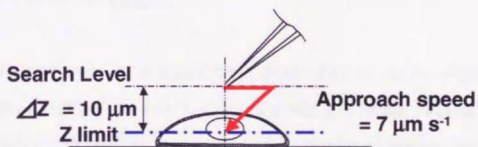
インジェクション時間設定値  $t_i$  [s]、アプローチ速度設定  $s$  [ $\mu\text{m s}^{-1}$ ]、インジェクション対象となる細胞およびインジェクション位置を定めるためにキャピラリー先端を移動させる面を Search Level とし、Z limit と Search Level の高低差を  $\Delta Z$  [ $\mu\text{m}$ ] とすると、インジェクション時間の実効値  $t_{act}$  [s] は以下の式で表される。

$$t_{act} = t_i - \frac{2 \times \Delta Z}{s}$$

マイクロマニピュレーターの使用にあたっては以上の点に留意して、インジェクション実験を行った。



- 1) 通常のマイクロインジェクションを行い、  
Z limitが適切に設定されていることを確認する。



- 2) 刺入困難な速度でアプローチするように設定を変更し、  
光増感作用によるインジェクション効率への影響を評価する。

Figure 5-3 マイクロインジェクションの各種パラメーターの設定

#### 5-2-4-1 インジェクション実験手順

実験手順の概略を Figure 5-4 に示す。以下はその補足である。

- a) インジェクション処理時には細胞が培養されたディッシュから培養用 NeuroBasal 培地の全量 3 ml を除去し、ディッシュ上の細胞を洗浄用 PBS 1 ml を流して洗浄した。この PBS 全量を除去し、新たな PBS 1 ml で同様に洗浄を行った後、再び PBS 全量を除去し、最終的にディッシュは実験用 Hib-A 培地 2 ml によって充たされた。細胞はこの Hib-A 培地により維持された。
- b) 使用したマイクロマニピュレーター装置においては、インジェクション実行時にキャピラリー先端部が細胞に刺入可能であるように、キャピラリー先端がディッシュ面に最接近する限界位置 (Z limit) を設定することが必要であった。この Z limit 位置がディッシュ上の細胞核の位置と一致する様にマニピュレーターを設定した。
- c) キャピラリー位置を Z limit の上方 30  $\mu\text{m}$  に変更し、その他の条件についてもアプローチ速度入力値 700  $\mu\text{m s}^{-1}$  (実効値 1000  $\mu\text{m s}^{-1}$ )、インジェクション時間 1.1 s (実効値 1.0 s) に変更した。この条件下で 10 細胞以上に対し、成功率 80% 以上の確率で通常の機械的なマイクロインジェクション処理が可能となるように Z limit 位置を調整した。成功率が低い場合には Z limit 位置を再設定した。
- d) キャピラリー位置を Z limit の上方 10  $\mu\text{m}$  に変更し、アプローチ速度入力値 5  $\mu\text{m s}^{-1}$  に設定、インジェクション時間を 124 秒 (実効値 120 秒) に変更した。



- e) 顕微鏡の落射蛍光源を LY 蛍光の観察に適した紫色光励起(U-MWBV ミラーユニット)フィルターセットに切り替えて、インジェクターの Clear 機能(7000 hPa をキャピラリー内のインジェクション液に加圧し、キャピラリーの詰まりを除去する )により、LY のキャピラリーからの放出を確認した。キャピラリーが詰まっていた場合は新しいキャピラリーに交換した。
- f) インジェクション圧の設定はキャピラリー先端から LY が徐放される程度の圧力に設定した。なお、インジェクション処理においてキャピラリー先端から LY の徐放が認められるために必要な圧力は、キャピラリー先端の状況によって 10 hPa から 1000 hPa と大きなばらつきがあったため、適宜圧力の補正を行った。
- g) 顕微鏡視野において、細胞中心にキャピラリー先端が位置するように細胞とキャピラリーの位置を調整した。BAT を励起するため、適宜、落射蛍光源を紫外光励起(U-MWU ミラーユニット)フィルターセットに切り替えて紫外光を照射した。また、励起用紫外光以外の光による影響を抑制するため、細胞観察用の透過光源は遮断した。なお、紫外光を照射する面積は顕微鏡の蛍光光学系の絞りを調節して直径約 100  $\mu\text{m}$  とした。
- h) マニピュレーターのインジェクション処理スイッチを押した。キャピラリーが細胞に接し、その位置においてインジェクション液を設定時間、設定圧力で放出した後に、キャピラリーは元の位置に戻る、以上のプロセスが自動的に実行された。
- i) インジェクション処理終了後、顕微鏡の落射蛍光源のフィルタを紫外光用から紫色光用 (U-MWBV ミラーユニット)に切り替え、LY 励起光を照射し、細胞が LY 染色されているか確認した。死細胞にインジェクションを行った場合は速やかに LY が細胞膜から漏出して蛍光が消失するので、そのような細胞はデータから除いた。

j) 細胞観察用の透過光源を再び開き、細胞を観察しつつ次の細胞にキャピラリー先端位置を合わせる。

k) e)に戻り、繰り返しインジェクション処理を行った。

l) インジェクション処理後、ディッシュから実験用 Hib-A 培地を除去し、PBS 1ml による 2 回の洗浄を行った後、培養用の NeuroBasal 培地 3ml に戻した。以降は通常の手順に従い培地交換を行った。なお、インジェクション処理後に使用した NeuroBasal 培地には抗生物質ペニシリン・ストレプトマイシン混合物を添加し、細菌等による細胞培地の汚染を防止した。

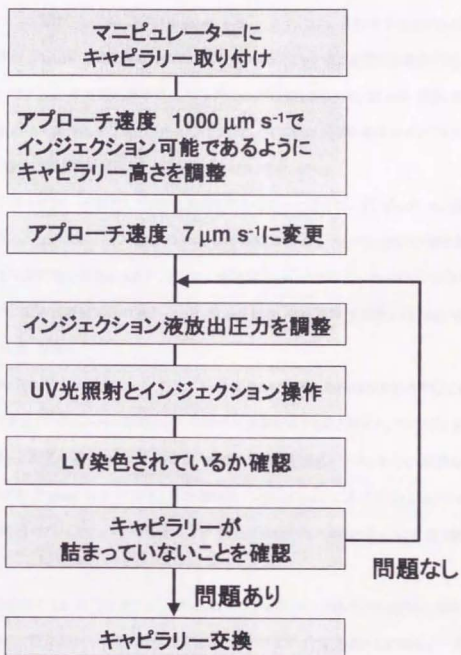


Figure 5-4 インジェクション実験手順

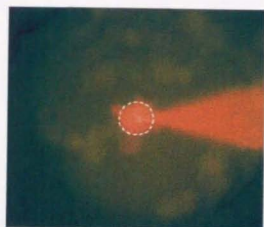
### 5-3 結果

インジェクションを実施した直後の写真をFigure 5-5 に示す。また、各条件下におけるインジェクション成功率を Figure 5-6に示す。BAT を含むインジェクション液を使用した場合には、紫外光を2分照射することで、約8割の確率でインジェクションが成功した(n=30, 25 cell 成功, 83%)。これに対し、培地に水溶性抗酸化剤 Trolox-C を添加し、その他は同様の条件でインジェクション実験を行った場合には成功率が低下した(n=30, 20 cell 成功, 67%)。

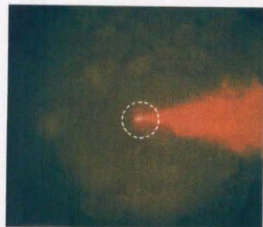
一方、細胞にキャピラリーが接触したまま光照射を行わなかった場合は、インジェクション成功率は約10%であった (n=30, 4 cell 成功, 13%)。また BAT を含まないインジェクション液を使用した場合には、UV 光照射の有無によらず、アプローチ速度  $7 \mu\text{m s}^{-1}$  ではインジェクションはほとんど成功しなかった (UV 光照射実行の場合、n=30, 0 cell 成功, 0%) (UV 光照射を行わない場合、n=30, 3 cell 成功, 10%)。

また、細胞膜が崩壊した死細胞においては、LY は速やかに拡散し染色は失われる<sup>(10)</sup>。このことから、LY 保持率をインジェクション処理された細胞の生存率を示すものと考えた。このように定義した細胞生存率を、通常の機械的インジェクション処理の場合と光増感インジェクション処理の場合で比較した結果を Figure 5-7 に示す。なお機械的インジェクションにおけるインジェクション液注入量は、光増感インジェクションと同程度の LY 蛍光が細胞内に認められるように目視で調整した。

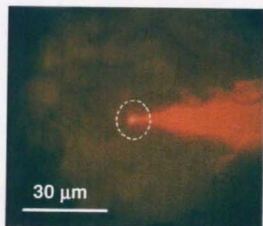
対照例となる通常の LY インジェクション、LY-BAT インジェクションではインジェクションから3日目の観察の時点で既に細胞生存率は3割以下になっていた(LY: 17%, BAT+LY: 30%)。一方、光増感インジェクションを行った細胞群では、インジェクション処理から3日、6日経過しても約9割の細胞が生存していた (BAT+LY+light: 91%)。なお、これら3通りのインジェクション条件のいずれにおいても3日目、6日目の間では細胞生存率に変化は認められなかった。



a) BAT + Light 2 min  
 キャピラリーから細胞中に  
 LYが拡散し、黄緑色蛍光を  
 発している。



b) BAT 2 min only  
 キャピラリーから細胞への  
 LY拡散は見られない。



c) Light 2 min only  
 キャピラリーから細胞への  
 LY拡散は見られない。

Figure 5-5 インジェクション実験写真

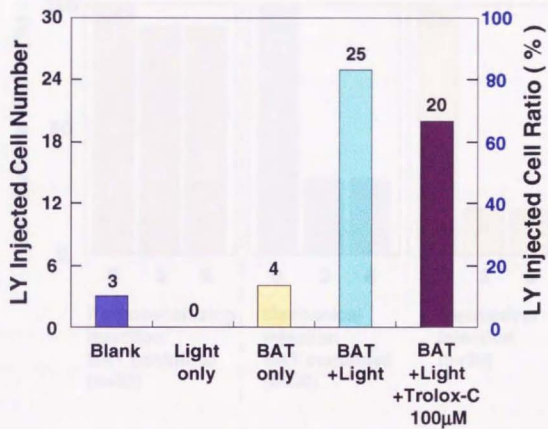


Figure 5-6 インジェクション成功率の比較

(各条件毎、30細胞に対しインジェクションを試みた結果)



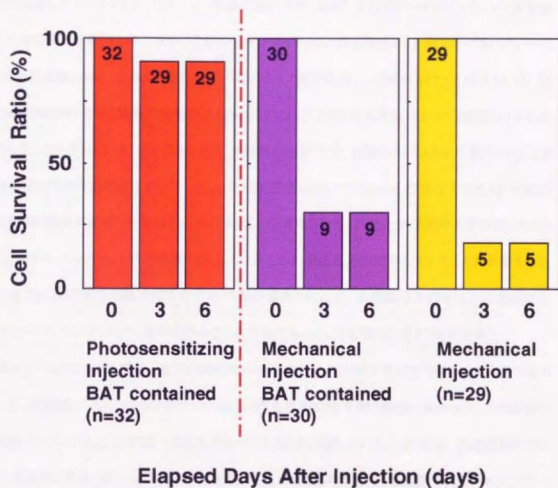


Figure 5-7 インジェクションが成功した細胞の生存率の経過

LY : LYのみ含有、機械的インジェクション、n=29

BAT-LY : LY+BAT含有、機械的インジェクション、n=30

BAT-LY-Light: LY+BAT含有、光増感インジェクション、n=32

#### 5-4 考察

今回実施したマイクロインジェクション実験においては、BAT を含まないインジェクション液を使用した場合や、光照射を行わなかった場合はインジェクション成功率は約 1 割以下であった。そのような対照実験に対して、BAT を含むインジェクション液を使用し、光照射を行った場合は LY 染色の成功率が約 8 割と顕著な改善が認められた。これは BAT が光照射によって細胞膜の穿孔に寄与したことを示している。また BAT 含有・光照射の条件下で、抗酸化剤 Trolox-C 添加により LY 染色の成功率が 7 割弱と若干低下した。これは第三章において、Trolox-C 存在下で BAT・光照射による細胞傷害が抑制された結果に対応するものと考えられる。抗酸化剤が膜穿孔を抑制したことから、このインジェクションの成功率の向上には何らかの酸化反応が寄与していることが示唆される。第二章での BAT が光増感作用を示すという解析結果と合わせ、本実験は BAT による光増感作用がマイクロインジェクションの効率を高めるのに有効であったことを強く示唆するものである。

またインジェクション処理後、通常の機械的インジェクションでは 6 日後の生存率は 2~3 割であった一方、光増感インジェクションを行った細胞は同生存率は約 9 割と顕著に高かった。この結果は光増感インジェクションが細胞へ与えるダメージの低さを示唆している。これには、光増感剤のピンポイント適用が大きく寄与しているものと考えられる。本実験系では、光増感剤 BAT がキャピラリーに細胞膜に接した直径 0.5  $\mu\text{m}$  の領域に集中され、キャピラリーが接している領域以外については、BAT は拡散によって速やかに希釈された。そのため、BAT による光増感作用は、キャピラリー接触部に比較するとその他の部位では無視できると思われる。

細胞に注入された LY は、迅速に細胞質に拡散し細胞を染色する。しかし、細胞膜のイオンバリア機能が消失した死細胞の場合、LY はインジェクションされても 1~2 秒で細胞外に拡散してしまう。この迅速な LY の拡散は、細胞間の液々連絡路であるギャップ接合<sup>96)</sup>を通じても行われることが報告されている<sup>96,99)</sup>。LY の迅速な拡散についてのこのような報告を考慮すると、インジェクション後も LY 蛍光が保持されている細胞においては、穿孔された細胞膜がインジェクション後に再閉塞して

いるものと考えられる。この迅速な膜の修復は、第三章の電気生理実験において、膜電位・膜抵抗の回復が照射後数分以内に認められることによっても支持されると考えられる。

この膜の閉塞機構については、2通りの機構が考えられる。一つは細胞の抗酸化機構による、酸化した膜の代謝的修復によるものである<sup>100)</sup>。もう一方は、生化学的な膜の修復ではなく、膜脂質の流動性によって<sup>101)</sup>損傷部位が閉塞される機構である。

本実験系においては、キャピラリーを細胞から引き離すと、増感剤がほとんど作用しなかった細胞膜成分が流動することで膜の穿孔部位を閉塞したものと思われる。その理由として、単に機械的な細胞膜穿孔の際も、同様の速やかな細胞膜閉塞が観察されることが上げられる。先に第一章(1-2-1)において、微小ガラスピペットやパッチピペットによって機械的に細胞膜を穿孔する場合について述べた。このような機械的穿孔の後、ピペット除去後に細胞膜の穿孔部が閉塞することも多いが、その迅速な再閉塞は膜脂質の流動性・自己組織性によるものと考えられている<sup>102)</sup>。

一方の生化学的な代謝による膜回復機構によっては、少なくとも数秒のオーダーでは膜の再閉塞には至らないものと考えられる。無論、膜破壊後には生化学的な膜の修復も生ずると考えられるが、こちらの機構は数時間から数日のオーダーで酸化された細胞膜を正常化するものと考えられる。

今回行った光増感インジェクションについては、キャピラリーの先端が実際に細胞膜中に刺入されているか、今後の検討が必要と思われる。通常の機械的剪断力によるインジェクションでは、インジェクション液に細胞内圧以上の圧力を印加することによって、インジェクション液が注入される。しかし、過剰なインジェクション液の注入は、細胞の膨張を引き起こし、最悪の場合は細胞を破裂させてしまうことになる<sup>9)</sup>。今回の実験におけるインジェクション液の時間あたり放出量については、LYが徐放される程度を目安に設定したものの、実際に有効な放出量については厳密な設定が不可能であった。また、そのような微小なインジェクション液放出量であっても、1秒間のインジェクションによって細胞が膨張し、中には細胞質の漏出が認められる場合があった。

インジェクション液の放出量はキャピラリー先端の状態によって大きく影響を受けた。すなわちキャピラリー先端への細胞膜片や微小なごみの付着によって、インジェクション液に同じ圧力を印加した場合であっても有効な放出量が大きく変化するのである。なお、実験においてキャピラリー先端からLYの徐放が認められるために必要な圧力は、キャピラリー先端の状況によって10 hPaから1000 hPaと大きなばらつきがあった。

今回の光増感インジェクションでは、2分間の光照射の間、キャピラリー先端は細胞膜に押し付けられていた。もし、この途中で通常の機械的剪断力によるインジェクションと同様に、キャピラリー先端が細胞内に刺入されていたとしたら、光による膜穿孔が生じてから数秒のうちにインジェクション液の過剰な注入によって細胞は恐らく破裂してしまった筈である。しかし、実際にはそのような破裂は生じなかった。このことから、以下 a)、b)の2つの可能性が考えられる。

a) キャピラリー接触部と細胞膜の密着性は通常のインジェクションに比較して光増感インジェクションは低い。そのためインジェクション液の注入により細胞内圧が過剰になると、キャピラリー刺入部からインジェクション液が漏出する。

b) キャピラリー接触部位における膜が完全に破壊されて細胞質とインジェクション液が直に接触するのではなく、光増感機構によって細胞膜に生じた微小な穴を介して低分子量のLYが拡散により細胞を染色した。

なお、このb)の機構はパッチクランプ法における穿孔パッチ法<sup>100)</sup>に類似するものである。

これらの仮説に対しては、光増感インジェクションにより注入可能な物質の大きさの検討、あるいは穿孔中の膜の凍結切片を電子顕微鏡標本にして穿孔の状態を直接観察することで、何らかの知見が得られるものと考えられる。

光増感インジェクションによって LY が細胞に注入されたということは、細胞への電極接続技術を考慮すると、非常に意義深いものがある。先に記述した様に、LY は直接注入された細胞のみならず、ギャップ接合で連結された隣接細胞にも浸透し、染色することが可能である<sup>96,99</sup>。

ギャップ接合の機能の一つに、細胞間の電気的接続が上げられる<sup>98</sup>。心筋細胞等は、多数の筋肉細胞がギャップ接合を介して電気的に連結されることにより、電気的な刺激に対して、筋組織全体として同期のとれた収縮反応を生ずる。

今回の BAT 光増感機構による膜穿孔の形態については現在のところ把握できていないが、キャピラリーから放出された LY で細胞の染色が可能であったことから、光増感インジェクションによって少なくともギャップ接合程度に細胞膜が穿孔されていたものと考えられる。すなわち、キャピラリー内液と細胞質の間に、細胞膜の穿孔部分を通じて少なくともギャップ接合程度の電気的接続が達成されていた可能性を示唆するものである。

## 5-5 結論

光増感作用を細胞への物質導入に応用可能か検討を行うため、マイクロインジェクション実験への適用を試みた。2 mM 水性蛍光染色試薬 Lucifer Yellow CH (LY) を含むインジェクション液を調整し、LY を PC12 細胞に注入可能であることをインジェクション成功の判定指標とした。また実験に際しては、電動マニピュレーターによりインジェクション処理を自動化し、インジェクション成功率に可能な限り人為的な影響が及ばないようにした。

光増感機構によるマイクロインジェクションの成功確率を評価する際には、ピペット先端の機械的剪断力が寄与しない条件でインジェクションを行う必要があった。適切なインジェクションのためにはピペットの到達位置(Z limit)の調節が重要である。そのため、設定した Z limit において、通常のアプローチ速度である  $1000 \mu\text{m s}^{-1}$  において成功確率 80% 以上でインジェクション可能であることを確認した上で、アプローチ速度を  $7 \mu\text{m s}^{-1}$  に低下させた。このアプローチ速度では、

ピペット先端は細胞膜をほとんど貫通できない。このような機械的剪断力による膜穿孔が困難なアプローチ条件下において、インジェクション液中の 100  $\mu\text{M}$  BAT の有無、および 100W 水銀ランプによる 2 分間の光照射処理の有無により、インジェクション成功確率がどのように変化するか測定を行った。

その結果、BAT 含有液で光照射を実施した場合は成功確率約 80%であった一方、その他対照例では同約 10%と顕著な成功率の改善が認められた。さらにインジェクション処理後の LY 保持率を細胞生存率の指標として、光増感処理と通常処理の間での細胞生存率の比較を行った。その結果、光増感処理を行った細胞は3日～6日生存率が約 90%となり、約 10%という従来処理による生存率と比較して極めて高かった。これらの結果は、光増感機構を利用することによって、インジェクションが細胞に及ぼす傷害を効果的に抑制できることを示唆している。



## 第六章 結論

### 6-1 本研究の成果

本研究で得られた成果を以下にまとめる。

- 1) 新規に合成されたビスアミノメチルオリゴチオフェン(以下 BOT)の基礎的な性質を検討し、細胞膜破壊実験に適した BOT としてビスアミノメチルターチオフェン(以下 BAT)を選択した。また、BAT が照射下で活性酸素種の生成を促進する光増感作用を持つことが示唆された。
- 2) 電気生理実験により、BAT による PC12 細胞膜のダメージを照射量により制御できることを確認した。この制御は以下の様に段階的に行うことが可能であった a) 細胞膜への影響なし b) 細胞膜が数分で回復する傷害 c) 細胞膜が破壊され回復しない
- 3) BAT による PC12 細胞傷害について、傷害機構の検討を行った。細胞に BAT を長時間作用させた場合には、照射射によって細胞質中の乳酸脱水素酵素(以下 LDH)の漏出が認められた。この LDH 漏出は細胞膜の傷害を示し、この膜傷害が  $\alpha$ -tocopherol (以下  $\alpha$ -toc)の添加により細胞膜の抗酸化能を高めた場合には大幅に緩和されたことから、傷害の機構として膜脂質の酸化が示唆された。
- 4) 光増感剤を利用した細胞膜破壊技術を用いて、PC12 細胞に対するマイクロインジェクションを行った。インジェクション液に BAT を添加した場合、照射射下でインジェクションの成功確率が

有為に高くなることを見出した。また、光増感を利用したマイクロインジェクション処理を施された細胞は、従来の機械的なマイクロインジェクション処理を施された細胞に比較して、極めて高い細胞生存率を示した。

本研究で明らかになった光増感剤としての BAT の細胞膜破壊作用については、今後の解析が期待される。例えば、BAT は米国立衛生研究所において、細胞毒性・抗 HIV 活性を調査されている<sup>100</sup>が、その結果は BAT の薬理作用は特筆すべき効果がないのものであった。しかし、これはあくまでも暗下における BAT 薬理作用に対する評価であって、換言すれば、BAT は暗下では低毒性でありながら、光照射によって 10 秒程度で細胞膜を破壊するほどの毒性を発現させる特性を持つということになる。BAT の解析に基づいて、このような二面性を兼ね備えた、細胞膜破壊を目的とした新規の分子の設計・合成が期待されると共に、既存の光増感剤や膜電位感受性色素<sup>100</sup>についても同様の細胞膜破壊用途についての再解析を行う必要があると考えられる。

本章の成果の工学的応用は極めて多岐に渡る事が想像される。例えばフローサイトメトリーと併用することで、光刺激により膜を開け細胞あるいはミセルへの物質導入を行うことで、非常に多数の細胞あるいはミセルへ同時に物質を入れることが可能と考えられる。また、BAQ で特に顕著であった  $\alpha$  ターチエニル誘導体の成膜性の高さ<sup>99</sup>を利用して、基盤上に修飾した  $\alpha$  ターチエニルを利用して細胞に使用するという応用も考えられる。また BAT を光化学療法用の細胞破壊剤として、小児期の神経芽細胞腫(neuroblastoma)等の化学療法へつなげられる可能性もある。

以上、BAT の光による細胞傷害について調査し、光量や BAT の接触量によって膜破壊を制御できることを明らかにした。この知見は、殺虫剤や PDT の研究に指針を与えるだけでなく、細胞内センサーといった工学的な技術への応用を期待できる。

## 6-2 今後の細胞膜穿孔技術の課題・発展性について

### 6-2-1 今後の課題

光増感剤など、細胞膜破壊物質は基本的に細胞に対しては毒物である。そのため、光増感剤の生体への適用に際しては、膜破壊剤が不必要な個所で毒性を発揮しないようにすることが望ましい。このような用途には、例えば酸化チタン等の固体表面を修飾可能な光触媒を使用することが考えられる。細胞と増感剤が直に接した部分だけで細胞膜破壊作用を生じさせることが、本技術の応用範囲を拡大する上で重要な課題であると思われる。

### 6-2-2 本研究に基づく技術の今後の発展性の検討

本研究の核である外部制御による膜破壊技術は、さらに応用を施すことにより、様々な分野における技術として利用可能と考えられる。第一章で記述した内容と、一部重複する部分があるが、以下にその一例を記述する。

#### 6-2-2-1 ドラッグデリバリーシステム用薬剤含有ミセル・リボソームの部位特異的な破壊

遺伝子治療等で用いるドラッグデリバリーシステム(DDS)用薬剤含有ミセル・リボソームの部位特異的な破壊技術として、本研究に基づく膜穿孔技術を応用することができる。薬剤の副作用を抑制しつつ、目的となる患部周辺で集中的に使用するためのDDS研究が進められている。例えば薬剤を入れたマイクロカプセルに生体透過性の赤外線を増感される膜破壊剤を組み込み、患部周辺を赤外線照射することで、カプセルを破壊できる。このように膜破壊技術を適用することにより、より効率的なDDSが可能になるものと考えられる。

#### 6-2-2-2 平面・球面等の膜を対象にした機能性分子の配列作業と新規機能発現

生体膜においては、様々な機能を持った膜タンパクが膜中で流動しつつ単独で、あるいは離合集散することによって膜面内および膜内外の化学物質の代謝・電子の伝達等、多様な機能を発揮している。このような膜面内や膜外の移動機能単位(膜タンパク)の組み合わせによる機能発現は微小な化学プラントと呼べるものである。

このような反応場としての生体膜の機能発現をモデルに、目的にあった機能発現に必要な膜デバイスを人工膜や生体膜に組み込み可能になれば、膜面を利用した非常に自由度の高い反応システムを構築できるものと考えられる。本研究の膜穿孔技術を応用することにより、そのような膜デバイスとして、機能性タンパク等の生体機能分子に限らず、圧電素子や光電変換素子や記憶素子等といった人工物も組み込めるものと考えられる。

#### 6-2-2-3 膜操作とデバイス追加による細胞機能拡張

上記の例の拡張であり、膜穿孔技術によって細胞と人工物の融合によって新たな機能を付加することが可能となる。一例として磁性細菌由来の微小磁性体粒子を入れた白血球を作り、磁気的に白血球を患部に誘導することが考えられる。これはドラッグデリバリーではなく、セルデリバリーシステムとも呼べる応用である。その他、膜に光電変換素子を組み込むことで、細胞に光エネルギーを化学エネルギーに変換する植物細胞的な機能を持たせることも可能と思われる。また、神経細胞の信号入力・出力に、細胞膜に埋め込んだ光電変換素子を適用することで、将来的に用いられる光情報処理型のコンピューターと直結で神経細胞を接続することも可能であろう。

#### 6-2-2-4 マイクロマシン等による細胞操作

現在、世界的にマイクロマシンの研究が進められているが、その将来的な応用医療分野は最も有望視されている。しかし現実問題として検討すると、そのような医療マイクロマシンはたとえば血管に入るほど小型である必要があり、その動力源は大きく制約を受けることになる。すなわち、この

ようなマイクロマシンに対しては有線でのエネルギー供給は困難であり、またマイクロマシン自体に内蔵可能なエネルギーはわずかなものになる。このためマイクロマシンによって細胞破壊や細胞改変等、細胞に影響を及ぼすには内蔵エネルギー源による物理的な手段では出力が不足することは明白である。光増感剤等の膜破壊剤とその活性化を応用することで、そのようなマイクロマシンによる細胞操作を簡便に実現することが可能と考えられる。具体的な一例として、赤外線で活性化するようなポルフィリン等の光増感剤を膜破壊剤として使用すれば、膜破壊に必要なエネルギーを体外から赤外線レーザー等により供給可能である。

#### 6-2-2-5 個々の神経に電極を接続し、電子情報機器と神経間で情報の授受を行う神経インターフェースの作製

近年、神経と電子機器の間で直接に電気的な信号の授受を行うことを目指した、神経インターフェースと総称される電極の研究が進められている。神経インターフェースには、半導体加工技術を利用して集積化された金属微小電極が用いられることが多い。このような金属微小電極は細胞の外部に設置されるために、以下のような問題が生じている。

- a) 神経細胞の電気的な活動は細胞膜電位に生ずる 100 mV 程度のパルスであるが、細胞外電極によって計測される神経信号は、数 $\mu$ V から数十 $\mu$ V レベルに低下してしまう。
- b) 電極近傍の複数の神経活動が重複した信号が計測されるため、個々の神経の活動を把握するには、信号の解析処理が不可欠である。

これに対し、細胞内に電極を設置できれば、電極神経の膜電位を直接計測可能になり、上記の a)、b)の問題は解消することになる。そのため、本研究で検討してきた細胞膜穿孔技術を応用して、神経細胞内に刺入可能な微小金属電極を実現することが可能と考えられる。照射光量や電極の細胞膜への接触圧力といった細胞内への電極刺入条件が明らかになれば、細胞と電極の接続を自動化することも可能になると考えられる。このようにして膜穿孔技術を発展させることで、多数の神経と電極を接続した、理想的な神経インターフェースが実現可能と考えられる。

### 6-3 結論

本研究は、新規オリゴチオフェン BAT を光増感剤として用い、光照射による細胞傷害の制御を新規な細胞膜穿孔技術の可能性を示した。

その過程で得られた光増感作用を応用した膜穿孔技術は、細胞工学の基幹技術として非常に幅広い用途が考えられる。本研究は基礎研究ではあるが、この研究を源流とする応用的な科学技術の発展性も極めて大きいものと推定される。



### 1. 本研究に関連する論文

Hitoshi Muguruma, Takashi Saito, Satoshi Sasaki, Shu Hotta and Isao Karube  
"Synthesis and Characterization of  $\alpha, \alpha'$ -Bis(aminomethyl)oligothiophenes and Their  
Related Compounds" *J.Heterocyclic Chem.*, Vol.33, 1996, p1-6

Hitoshi Muguruma, Takashi Saito, Atsunori Hiratsuka, and Isao Karube, "Structural  
Characterization and Surface Modification of Evaporated Thin Films of  
5,5'-Bis(aminomethyl)-2,2':5',2''-quaterthiophene and Its Dihydrochloride", *Langmuir*,  
Vol.12, 1996, p5451-5457

Takashi Saito, Nick A Hartell, Hitoshi Muguruma, Shu Hotta, Satoshi Sasaki, Masao  
Ito and Isao Karube, "Light dose- and time- dependency of photodynamic cell membrane  
damage" *Photochemistry and Photobiology*, Vol.68, 1998, p745-748

Takashi Saito, Hitoshi Muguruma, Shu Hotta, Mareyuki Takahashi and Isao  
Karube, "A pin-point photodynamic cell membrane damage for assistance of  
microinjection"  
In preparation

### 2. 参考論文

Hitoshi HOSHINO, Takashi SAITOH and Takao YOTSUYANAGI, "Photophysical  
Investigation of Energy Transfer Luminescence of Lanthanide Chelates with Aromatic  
Polyaminocarboxylate Ligands in Aqueous Solutions", *Analytical Science*, Vol.11, 1995,  
p175-180

### 3. 学会発表

日本化学会第74春季年会(尽 同志社大・同志社女子大)  
「オリゴチオフェンを用いる細胞膜破壊の光制御」  
(東大先端研・Aston Univ.・Rutgers Univ.・物質研・理研)  
齋藤敬・Hartell N.A.・六車仁志・堀田収・佐々木聰・伊藤正男・軽部征夫  
日本化学会第74春季年会(1998) 3G2-25

'99 ASIAN CONFERENCE ON ELECTROCHEMISTRY(尽 早稲田大)

"Electrophysiological Monitoring of Photodynamic Cell Membrane Damage: Light Dose  
and Time Dependency of Photodynamic Effect"

Takashi Saito, Nick A Hartell, Hitoshi Muguruma, Shu Hotta, Satoshi Sasaki and Isao  
Karube  
(1999) 発表予定

### 4. 特許出願

- 1) 出願番号 特願平10- 80177  
齋藤 敬、軽部 征夫  
「細胞の特定部位穿孔技術」1998年3月12日出願
- 2) 出願番号 特願平10- 80182  
齋藤 敬、軽部 征夫  
「自動微小膜電位計測装置」1998年3月12日出願

## 謝辞

本研究を遂行し論文をまとめるに当たって、終始暖かい御指導、御鞭撻を賜りました東京大学先端科学技術研究センター・軽部征夫教授に深く感謝致します。また、本論文を作成するに当たり、貴重な御助言、御指導をいただきました同センター長・二木鋭雄教授、同センター・井街宏教授、ならびに同センター・橋本和仁教授に対して心から謝意を表します。池袋一典講師、佐々木聰助手、矢野和義助手、六車仁志研究員(現高知工科大学講師)始め軽部研究室の皆様には、終始有益なる御討論、御協力をいただきました。深く感謝の意を表します。

第二章はフランス共和国 Paul Sabatier 大学・Maurice Comtat 教授との共同研究であり、御指導頂いた Regine Deuvor 博士に深く感謝申し上げます。

第三章は財団法人理化学研究所思考ネットワークグループとの共同研究であり、御指導頂いた、伊藤正男グループリーダー(現 理化学研究所 脳科学総合研究センター所長)、同グループ・矢野良治博士、宮田麻里子博士に厚く感謝申し上げます。

第四章、第五章は東京大学駒場オープンラボラトリー・高橋希之助手、東京大学先端科学技術研究センター生命反応化学分野・高部稚子氏、東京大学国際産学共同研究センター生体計測分野・満洲邦彦教授、鈴木隆文助手のご指導ご協力を賜りました。

ご多忙の中、共同研究へ御支援、御協力頂きました諸先生方に対しましてはどのような感謝の言葉をもってしても足りぬということはありません。

さらに、本研究を行うに当たり、御指導と御激励をいただいた岡崎国立生理学研究so・老木成稔助教、ドイツ連邦共和国フンボルト大学・Reinhardt Stöber 教授、BEBIG Isotopentechnik GmbH・Klaus Tannenberger 博士、同 Andre Hess 博士に深く感謝の意を表します。

最後に重ねて、在学中に様々な機会を与えていただきました軽部征夫教授に感謝いたしますとともに、生活を支えてくれた両親並びに弟妹に感謝のこぼを述べたいと思います。

参考文献

- (1) Halliwell, Band Gutteridge, J.M.C, "Free Radicals in Biology and Medicine" Oxford University Press (1985)
- (2) 萩尾高志、蛋白質 核酸酵素、39 (1994) 1757-1769
- (3) 編/横田崇 新井賢一、「実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法」、羊土社 (1994)
- (4) Prausnitz, M.R., Corbett, J.D., Gimm, J.A., Goran, D.E., Langer, R and Weaver, J.C., Biophys. J., 68 (1995) 1864-1870
- (5) 小山昇 その他、医用電子と生体工学、21 (1983) 501-580
- (6) Firth, K.L., Brownell H.L and Raptis, L., BioTechniques, 23 (1997) 644-646
- (7) Suzuki, T., Shin, B-C., Fujikura, K., Matsuzaki, T and Takata, K., FEBS Lett., 425 (1998) 436-440
- (8) Prausnitz, M.R., Bose, V.G., Langer, R and Weaver, C., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90 (1993) 10504-10508
- (9) Neher, E. and Sakmann, B., Nature, 260 (1976) 799-802

- (10) Hamil, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J., *Pflügers Arch.*, **391** (1981) 85-100
- (11) Frye, L.D. and Edidin, M., *J. Cell Sci.*, **7** (1970) 319-335
- (12) Yagi, K., *Biochem. Med.*, **15** (1976) 212-216
- (13) Scandella, C.J., Devaux, P. and McConnell, H.M., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69** (1972) 2056-2060
- (14) Devaux, P. and McConnell, H.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **94** (1972) 4475-4481
- (15) Evans, E.A. and Skalak, R., "Mechanics and Thermodynamics of Biomembranes" (1980)
- (16) Pappas, V., Haydon, P.G. and Henderson, E., *Journal of Cell Science*, **104** (1993) 427-432
- (17) Xu, W., Mulhern, P.J., Lackford, B.L., Jericho, M.H., Firtel, M. and Beveridge, T.J., *Journal of Bacteriology*, **178** (1996) 3106-3112
- (18) Haydon, P.G., Lartius, R., Pappas, V. and Marchese-Regona, S.P., *Journal of Microscopy (Oxford)*, **182** (1996) 114-120
- (19) De-Stasio, G., Cricenti, A., Generosi, R., Mercanti, D., Ciotti, M.T., Casalbore, P., Margaritondo, G. and Perfetti, P., *Neuroreport*, **7** (1995) 65-68

- (20) Pooler, J.P. and Valenzano, D.P., *Photochem. Photobiol.*, **30** (1979) 581-584
- (21) Pryor, W.A., *Ann. Rev. Physiol.*, **48** (1986) 657-667
- (22) Niki, E., Saito, T., Kawakami, A. and Kamiya, Y., *J. Biol. Chem.*, **259** (1984) 4177-4182
- (23) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., *Anal. Biochem.*, **95** (1979) 351-358
- (24) Pailous, N. and Fery-Forgues, S., *Biochimie*, **76** (1994) 355-368
- (25) Bunting, J.R., *Photochemistry and Photobiology*, **55** (1992) 81-87
- (26) Ochsner, M., *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, **39** (1997) 1-18
- (27) Haylett, A.K., McNair, F.I., McGarvey, D., Dodd, N.J.F., Forbes, E., Truscott, T.G. and Moore, J.V.,  
*Cancer Lett.*, **112** (1997) 233-238
- (28) Wilson, M. and Mia, N., *Laser Med. Sci.*, **9** (1994) 105-109
- (29) Soukos, N.S., Wilson, M., Burns, T. and Speoght, P.M., *Laser Surgery Med.*, **18** (1996) 253-259
- (30) Thorpe, W.P. and Yarmuch, M.L., *Biophysical Journal*, **68** (1995) 2198-2206
- (31) Valenzano, D.P., *Photochemistry and Photobiology*, **53** (1991) 195-201

- (32) Kunz, L. and Stark, G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1327** (1997) 1-4
- (33) Koufen, P., Zeidler, U. and Stark, G., *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, **38** (1997) 129-135
- (34) Miller, J.P. and Selverston, A.I., *Science*, **206** (1979) 702-704
- (35) Wang-Bennet, L.T., Libl, D.J. and Bennett, G.N., *Brain Reserch*, **534** (1990) 122-128
- (36) 「医学大辞典CD-ROMプロメディカ 紫外線関連項目」、南山堂 (1998)
- (37) Bakker, J., Gommers, F.J., Nieuwenhuis, I. and Wynberg, H., *J. Biol. Chem.*, **254** (1979) 1841-1844
- (38) Kagan, J., Afora, S.K. and Üstünel, A., *J. Org. Chem.*, **48** (1983) 4076-4078
- (39) Eachern, A.M., Soucy, C., Leitch, L.C., Arnason, J.T. and Morand, P., *Tetrahedron*, **44** (1988) 2403-2412
- (40) MacEachern, A., Soucy, C., Leitch, L.C., Arnason, J.T. and Moland, P., *Tetrahedron*, **44** (1988) 2403-2412
- (41) Evans, C.H. and Scaiano, J.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **112** (1990) 2694-2701



- (42) Veith, G.D., Mekenyan, O.G., Anley, G.T. and Call, D.J., *Environ. Sci. Technol.*, **29** (1995) 1267-1272
- (43) Scaiano, J.C., MacEachern, A., Arnason, J.T., Morand, P. and Weir, D., *Photochem. Photobiol.*, **46** (1987) 193-199
- (44) Boch, R., Mehta, B., Connolly, T., Durst, T., Arnason, J.T., Redmond, R.W. and Scaiano, J.C., *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, **93** (1996) 39-47
- (45) Scaiano, J.C., Evans, C. and Arnason, J.T., *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, **3** (1989) 411-418
- (46) Kagan, J., Hasson, M. and Grynspan, F., *Biochim. Biophys. Acta*, **802** (1984) 442-447
- (47) Marles, R.J., Compadre, R.L., Compadre, C.M., Soucy-Breau, C., R. W. Redmond, F. Duval, B. Mehta, P. Morand, J. C. Scaiano and J. T. Arnason, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **41** (1991) 89-100
- (48) Nivsarkar, M., Kumar, G.P., Laloraya, M. and Laloraya, M.M., *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **19** (1992) 261-270
- (49) Downum, K.R., Rosenthal, G.A. and Towers, G.H.N., *Pest. Biochem. Physiol.*, **22** (1984) 104-109
- (50) Hudson, J.B., Harris, L., Marles, R.J. and Arnason, J.T., *Photochem. Photobiol.*, **58** (1993) 246-250

- (51) Romagnoli, C., Mares, D., Fasulo, M.P. and Bruni, A., *Phytotherapy Res.*, **8** (1994) 332-336
- (52) Marles, R.J., Hudson, J.B., Graham, E.A., Soucy-Breau, C., Morand, P., Compadre, R.L., Compadre, C.M., Towers, G.H.N. and Arnason, J.T., *Photochemistry and Photobiology*, **56** (1992) 479-487
- (53) Boch, R., Mohtat, N., Lear, Y., Arnason, J.T., Durst, T. and Scaiano, J.C., *Photochem. and Photobiol.*, **64** (1996) 92-99
- (54) Kagan, J., Bazin, M. and Santus, R., *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, **3** (1989) 165-174
- (55) Pernaut, J.M., Garcia, P. and Delabouglise, D., *J.Chim.Phys.Phys.-Chim.Biol.*, **91** (1994) 433-442
- (56) Noma, N., Tsuzuki, T. and Shirota, Y., *Adv.Mater.(Weinheim, Ger.)*, **7** (1995) 647-648
- (57) Grandström, M., Berggren, M. and Inganäs, O., *Science*, **267** (1995) 1995
- (58) Muguruma, H., Saito, T., Sasaki, S., Hotta, S. and Karube, I., *J. Heterocyclic Chem.*, **33** (1996) 1-6
- (59) Hotta, S. and Waragai, K., *J.Mater.Chem.*, **1** (1991) 835-842

- (60) Albers, W.M., Lekkala, J.O., Jeuken, L., Canters, G.W. and Turner, A.P.F., *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **42** (1997) 25-33
- (61) Qu, X., Lu, T., Dong, S., Zhou, C. and Cotton, T.M., *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **34** (1994) 153-156
- (62) Willner, I., Katz, E., Lapidot, N. and Bäuerle, P., *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **1992** (1992) 29-45
- (63) Greene, L.A. and Tischler, A.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73** (1976) 2424-2428
- (64) Dichter, M.A., Tischler, A.S. and Greene, L.A., *Nature*, **268** (1977) 501-504
- (65) Shear, J.B., Fishman, H.A., Allbritton, N.L., Garigan, D., Zare, R.N. and Scheller, R.H., *Science*, **1267** (1995) 74-77
- (66) Solem, M., McMahon, T. and Messing, R.O., *Journal of Neuroscience*, **15** (1995) 5966-5975
- (67) Kovacs, G.T.A., Stormont, C.W., Halks-Miller, M., Belczynski, C.R. Jr., Della-Santina, C.C., Lewis, E.R. and Maluf, N.I., *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **41** (1994) 567-577
- (68) Hoogerwerf, A.C. and Wise, K.D., *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **41** (1994) 1136-1146
- (69) Liu, J.W., Yap, W.H., Thanabalu, T. and Porter, A.G., *Nature Biotechnology*, **14** (1996) 343-347

- (70) Berthiaume, F., Reiken, S.R., Toner, M., Tompkins, R.G. and Yarmush, M.L., *Bio/Technology*, **12** (1994) 703-706
- (71) Bisby, R.H., Ahmed, S. and Cundall, R.B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **119** (1984) 245-251
- (72) 木村修一・高橋勇二・古川勇次・, *Photomed. Photobiol.*, **2** (1980) 93-94
- (73) 中野稔・浅田浩二・大柳善彦 編、「活性酸素 生物での生成・消去・作用の分子機構」、共立出版 (1988)
- (74) Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, Ch. and Weibel, E., *Appl. Phys. Lett.*, **40** (1981) 178-180
- (75) Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, Ch., *Phys. Rev. Lett.*, **56** (1986) 930
- (76) 森田清三、「原子間力顕微鏡のすべて」、工業調査会 (1995)
- (77) 「デジタルインスツルメンツ NanoScope<sup>®</sup> 走査型プローブ顕微鏡 コマンドリファレンスマニュアル」、デジタルインスツルメンツ (1995)
- (78) Skoog, D.A., West, D.M. and Holler, F.J., "Fundamental of analytical chemistry, 6th Ed." Saunders College Publishing (1992)
- (79) 日本化学会、「化学便覧第三版」、丸善 (1984)

- (80) Muguruma, H., Saito, T., Hiratsuka, A. and Karube, I., *Langmuir*, **12** (1996) 5451-5457
- (81) 吉村進, 「高分子新素材One Point-5 導電性ポリマー」, 共立出版 (1987)
- (82) Soucy-Breau, C., Eachern, A.M., Leitch, L.C., Arnason, T. and Morand, P., *J. Heterocyclic Chem.*, **28** (1991) 411-416
- (83) Tarr, M., Arriaga, E. and Valenzeno, D., *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **27** (1995) 1099-1109
- (84) Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K. and Price, P.J., *J. Neurosci. Res.*, **35** (1993) 567-576
- (85) Mahle, C. and Dasgupta, A., *Life Sciences*, **61** (1997) 437-443
- (86) Ardelt, B.K., Borowitz, J.L. and Isom, G.E., *Toxicology*, **56** (1989) 147-154
- (87) 大野忠夫 編著, 「動物実験代替法マニュアル 培養細胞を用いた理論と応用」, 共立出版 (1994)
- (88) Saura, J., MacGibbon, G. and Draganow, M., *Molecular Brain Research*, **48** (1997) 382-388
- (89) Maduh, E.U., Turek, J.J., Borowitz, J.L., Rebar, A. and Isom, G.E., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **103** (1990) 214-221

- (90) MacGibbon, G.A., Cooper, G.J.S. and Dragunow, M., *NeuroReport*, 8 (1997) 3945-3950
- (91) Vimard, F., Nouvelot, A. and Duval, D., *Biochemical Pharmacology*, 51 (1996) 1389-1395
- (92) 高橋希之、未発表
- (93) Brewer, G.J. and Price, P.J., *NeuroReport*, 7 (1996) 1509-1512
- (94) TaKaRa LDH Cytotoxicity Detection Kit 説明書 Code No. MK401
- (95) Grunsven, L.A., Thomas, A., Urdiales, J.L., Choler, P., Durand, I. and Rudkin, B.B., *Oncogene*, 12 (1996) 855-862
- (96) Pochapin, M.B., Sanger, J.M. and Sanger, J.W., *Cell & Tissue Res.*, 234 (1983) 309-318
- (97) Furness, J.B., Bornstein, J.C., Trussell, D.C., *Cell & Tissue Res.*, 254 (1988) 561-571
- (98) 野々村禎昭・小幡邦彦 編, 菅野義信, 「新生理学体系7 発生・分化の生理学 第4章 細胞間連絡の発生 I. 電気的結合」, 医学書院 (1991)
- (99) Lustig, R.H., Hua, P., Yu, W., Ahmad, F.J. and Baas, P.W., *J. Neurosci.*, 14 (1994) 3945-3957
- (100) マイクロ マニピュレーション・インジェクション システム 技術資料、ライカ株式会社



(101) Stewart, W.W., *Cell*, **14** (1978) 741-759

(102) Lamb, R.G., Harper, C.C., McKinney, J.S., Rzigalinski, B.A. and Ellis, E.F., *J. Neurochem.*, **68**  
(1997) 1904-1910

(103) 香川靖雄、「生体膜と生体エネルギー」〔第3版〕 7. 生体膜の再構成」、東京大学出版会  
(1985)

(104) 岡田泰伸 編、八尾 寛、「パッチクランプ実験技術法 3.ホールセル記録法と穿孔パッチ  
法」、吉岡書店 (1996)

(105) 六車仁志、未発表

(106) Ebner, T.J. and Chen, G., *Prog. Neurobiolog.*, **46** (1995) 463-506

