

テラヘルツ波全反射減衰分光法を用いた
細胞の酸化ストレス応答評価のための基礎研究
Fundamental Research for the Evaluation of Oxidative Stress Response
in Cells by Using Terahertz Attenuated Total Reflection Spectroscopy

Key words: Oxidative stress, Terahertz, Hydrogen peroxide

生物センシング工学分野 堀 彩夏

1. 背景

酸化ストレスとはタンパク質や DNA などの生体分子を酸化損傷させる活性酸素とそれを無毒化する抗酸化成分のバランスが活性酸素側に傾いた状態であり、酸化ストレス状態では生体分子の機能発現に障害がおり、様々な疾病や老化の原因となると考えられている¹⁾。近年では抗酸化成分を含む農産物や食品に注目が集まっており²⁾、抗酸化機能や酸化ストレス状態に関する研究が多々行われている。このような研究では、活性酸素の一種であるフリーラジカルを定量する電子スピン共鳴法や酸化ストレスマーカーを定量する ELISA 法などが用いられているが、酸化ストレスを評価する統一的な基準は定められていないため、様々な手法で得られた評価結果を相互的に比較することは困難である。また、細胞内では様々な生体分子の相互作用によりその機能を発現しているが、従来法は特定の活性酸素や酸化ストレスマーカーのみにしか注目しておらず、酸化ストレスに対する体系的な理解を試みるためには細胞内の生体分子の相互作用に関する知見を得ることが不可欠である。

細胞内の重量の約 70% を占める水は、生体分子の構造や機能発現にとって重要な因子であり³⁾、細胞中における相互作用の中核をなしていると考えられる。したがって、酸化ストレスによる水の物性変化を従来法による酸化物質の発現評価と照らし合わせることで、酸化ストレスが細胞に及ぼす影響の全体像を把握できると期待される。ここで、水の物性を知る有効な手段としてテラヘルツ (THz) 波を用いた分光法がある。THz 波は 0.1~10 THz の周波数帯に位置する電磁波であり、THz 帯での水の複素誘電率は水分子の動態を反映するいくつかのピークの足し合わせであることが明らかとなっている⁴⁾。また、THz 帯における水のような吸収の大きな試料の測定には全反射減衰分光法 (ATR 法) が適しており、これはプリズム底面から臨界面以上で入射した波がプリズム表面で全反射される際に発生するエバネッセント波により試料の吸収を観測する方法である。エバネッ

セント波はプリズム表面から離れるに従い指数関数的に減衰し、電場強度が $1/e$ となる深さで定義される浸み出し深さは周波数に依存しており、周波数増加に応じて浸み出しは浅くなる。

本研究では、THz 帯における細胞内水の ATR スペクトル変化に基づき酸化ストレス応答を評価することを目指し、ATR 法を用いて細胞の酸化ストレス応答の経時変化を評価できるかを検討した。そのために、共焦点顕微鏡を用いて酸化ストレスを加えた細胞の厚みの経時変化を測定し、また、12 時間かけて酸化ストレスを加えた細胞を ATR 法で測定し、ATR スペクトルに見られる 5 THz のピークに経時変化が見られるかを評価した。

2. 実験方法

2.1 細胞の厚み測定

ガラスボトムディッシュ (AGC テクノグラス製) に培養した HeLa 細胞に、酸化ストレスとして 200 μM の過酸化水素濃度に調整した MEM α (和光純薬工業製) を 1 mL 加えてインキュベートした。インキュベートの時間は 0, 3, 6, 9, 12 時間のものをそれぞれ 2 個ずつ用意した。インキュベート後、それぞれの試料の細胞膜を CellMask orange plasma membrane stain (Invitrogen 社製) により染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 A1 (Nikon 製) を用いて細胞の断面画像を高倍分解能 500 nm で各試料 5 枚ずつ取得した。画像 1 枚から 10 個の細胞の厚みを測定し、その平均値を細胞の厚みとした。

2.2 ATR 法による酸化ストレス応答評価

FARIS-1S (日本分光製) を用いて ① MEM α 、② 200 μM 過酸化水素入り MEM α 、③ HeLa 細胞 + MEM α 、④ HeLa 細胞 + 200 μM 過酸化水素入り MEM α の 4 つの試料を 0~12 時間目まで 1 時間おきに測定した。測定領域は 2.0~12 THz で分解能は 120 GHz、積算回数は 500 回とし、各試料 37 $^{\circ}\text{C}$ で二酸化炭素濃度 5.0% に保ち測定を行った。12 時間目の測定終了後にリファレンスとして空気を 5 回測定した。再現性確認のため、各試料につき 3 回の測定を行った。

3. 結果および考察

3.1 細胞の厚み測定

表 1 に 200 μM の過酸化水素入り MEM α を添加後 12 時間までの細胞厚みの経時変化を示す。エラーバーは各時間における細胞厚みの標準偏差を表す。過酸化水素処理から 12 時間後まで細胞厚みに有意な差は見られず、この条件において細胞厚みは変化しないことが分かった。また、測定したすべての細胞厚みの平均値から HeLa 細胞の厚みを求めると $6.83 \pm 1.35 \mu\text{m}$ となった。ATR 法ではエバネッセント波の浸み出し深さが周波数に依存し、低周波側で浸み出し深さが大きくなる。このため、低周波側で細胞の上の培地の情報が得られるスペクトルに影響を与える可能性が考えられる。ここで、本実験により求めた細胞厚み $6.83 \mu\text{m}$ と同じ浸み出し深さとなる周波数は 4 THz であり、4 THz 以下の領域において ATR 法により得られるスペクトルには細胞上部に存在する培地の情報が反映されると考えられる。

表 1 : 細胞厚みの経時変化

処理時間 [時]	0	3	6	9	12
細胞厚み [μm]	6.91	6.84	6.79	6.75	6.87
標準偏差 [μm]	1.43	1.55	1.38	1.35	1.03

3.2 ATR 法による酸化ストレス応答評価

図 1 に得られた ATR スペクトル $A(\omega)$ の平均値を示す。③、④のスペクトルは①、②のスペクトルよりも低い値を示しており、これは細胞の生体分子によりエバネッセント波と相互作用する水分子のモル数が減少することに起因すると考えられる。また、全体としてブロードなピークが見られ、③、④において細胞内の生体分子による急峻なピークが見られないことから、ATR スペクトルでは水分子の動態が支配的であることが確認された。

図 1 において見られる 5 THz のピークには水分子間で形成される正四面体構造に関する情報が反映されている。図 2 に試料③、④について 5.0 THz での ATR スペクトルのピーク高さの経時変化を示す。エラーバーは 3 回の測定の標準誤差を示す。THz 帯での時間領域分光法を用いた研究では、複素誘電率虚

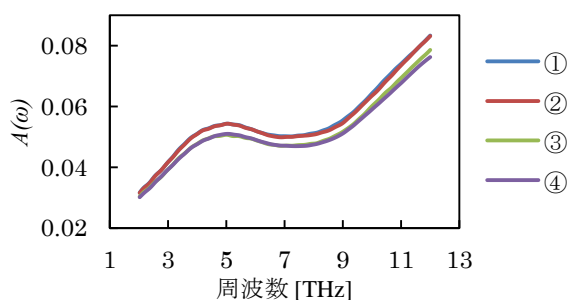


図 1 各試料の ATR スペクトル

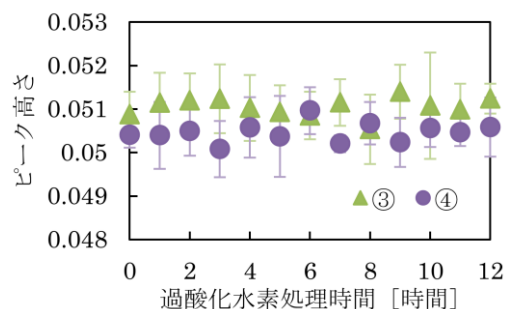


図 2 5 THz でのピーク高さの経時変化

部における 0.5 THz のピークについて細胞への酸化ストレス添加による変化が見られており、5 THz のピークについても変化する可能性が考えられるが、本実験においてはどちらの試料についても時間による体系的な変化は見られず、酸化ストレス応答を評価することができなかった。これは過酸化水素の添加により得られる変化は非常に小さいものと予想されるが、本測定系の精度ではそのわずかな変化を評価することができなかったためであると考えられる。

4. 結論

本研究では、ATR 法を用いて細胞の酸化ストレス応答の経時変化を評価することを目的に研究を行った。共焦点顕微鏡を用いた細胞厚みを測定から、HeLa 細胞の厚みが $6.83 \pm 1.35 \mu\text{m}$ であり、過酸化水素の添加により変化しないことが分かった。また、細胞厚みと同程度の浸み出し深さを持つ周波数である 4 THz より高周波側では細胞の情報のみが ATR スペクトルに反映されることが示唆された。また、ATR 法による細胞測定から ATR スペクトルに細胞内の水分子の動態が反映されていることが確認されたが、装置の精度が足りないために細胞の酸化ストレス応答を ATR スペクトルを用いて評価することはできなかった。今後は実験系の高精度化を図り、細胞の酸化ストレス応答を THz 帯における誘電応答から評価できるか検討していく。

参考文献

- 1) 酒居一雄(2007) : 酸化ストレスと未病, 日本未病システム学会雑誌, 13, 1, 10-13
- 2) 大澤俊彦(2005) : 酸化ストレス制御因子含有植物素材の探索と評価システム, 日本食品科学工学会誌, 52, 1, 7-18
- 3) S. K. Pal, J. Peon, and A. H. Zewail(2002) : Biological Water at the Protein Surface Dynamical Solvation Probed directly with femtosecond resolution, PNAS, 99, 4, 1763-1768
- 4) H. Yada, M. Nagai, K. Tanaka(2008) : Origin of the Fast Relaxation Component of Water and Heavy Water Revealed by Terahertz Time-domain Attenuated Total Reflection Spectroscopy, Chemical Physics Letters, 464, 166-170