

論 文 要 旨

Method to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species

〔細胞内活性酸素測定試薬 Dichlorofluorescein の問題点とその克服〕

Muhammad Afzal

Background:

Dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) is widely used for the analysis of Reactive Oxygen Species (ROS) in cells. DCFH-DA is converted to DCFH by intracellular esterases, and the DCFH is then converted to Dichlorofluorescein (DCF) after reaction with ROS, especially hydrogen peroxide. DCFH is not fluorescent while DCF is fluorescent. However, DCFH is reported to be oxidized to DCF by photo-irradiation. The photo-reaction is a serious drawback to use DCFH because photo-irradiation, i.e. excitation is necessary to determine the fluorescence of DCF in the presence of DCFH. We investigated the photo-reactivity of DCFH and found suitable ways to suppress the photo-reaction of DCFH, which can ensure the reliability of DCFH for the evaluation of ROS.

Materials and Methods:

Dimethyl sulfoxide differentiated HL60 cells (DMSO-HL60, neutrophil-like cells) were incubated with DCFH-DA to get DCFH loaded cells. DMSO-HL60 were stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) to generate O_2^- . In the cell free system DCFH and DCF were prepared from DCFH-DA and DCF-DA after incubation with esterase. Photo-irradiation was done with a xenon lamp in a spectrofluorometer or a mercury lamp in a fluorescence microscope for excitation. Fluorescence of DCF and photo-irradiated DCFH was observed by a spectrofluorometer, and the fluorescence of the DCFH-loaded cells were observed by a fluorescence microscope. The photo-irradiated DCFH was analyzed by HPLC, equipped with a fluorescence detector.

Results and Discussion:

Spectrofluorometric observation indicated that photo-irradiation to DCFH converted DCFH to fluorescent compound(s). We found two fluorescent products after the photo-reaction by HPLC-analysis. We identified one as DCF, however we could not identify the other.

The photo-reaction was dependent on DCFH concentration. With lower DCFH concentration, the production rate of fluorescent compounds was also lower.

Addition of catalase or elimination of oxygen had little effects on the photo-reaction. SOD or sodium azide enhanced the photo-reaction. These results indicate that neither H_2O_2 , 1O_2 or O_2^-

were involved in the photo-reaction nor were ROS scavengers able to suppress the photo-reaction. DCFH photo-reaction was pH dependent, e.g. under acidic conditions the photo-reaction was markedly suppressed, indicating that protonated form of DCFH was more less liable to the photo-reaction.

Vitamin C, methyl propionyl glycine or methyl cinnamic acid suppressed the photo-reaction almost completely, affecting little on the fluorescence of DCF.

Above findings indicate that electron transfer plays important role in the photo-reaction of DCFH. PMA-stimulation increased fluorescence of DCFH loaded DMSO-HL60. However, the fluorescence of DCFH loaded unstimulated DMSO-HL60 was also increased during the observation with a fluorescence microscope. Thus we could not see the difference in fluorescent intensities between PMA stimulated and PMA unstimulated cells during 5 to 10 sec under the fluorescence microscopic observation.

When we added vitamin C and observed cells under acidic conditions, we could suppress the photo-reaction, i.e. the fluorescence increase. However the suppression was not complete or acceptable.

When we used DMSO-HL60 incubated with low concentration of DCFH, the fluorescence increase under the fluorescence microscope observation was almost unperceivable. We could also see the difference in fluorescent intensities between PMA stimulated and PMA unstimulated cells. Furthermore, we could see the effect of catalase which reduced the fluorescence of the PMA stimulated DMSO-HL60.

Conclusion:

DCFH was converted to fluorescent products, DCF and an unknown product by photo-irradiation. Vitamin C, MPG or MC suppressed the photo-reaction almost completely indicating that these compounds are useful to determine DCF in the presence of DCFH with a spectrofluorometer. DCFH in cells also converted to fluorescent products by photo-irradiation. However, when proper concentration i.e. low concentration of DCFH was used, the effects of photo-reaction would be negligible.

論文審査の要旨

報告番号	医研第 610 号	氏名	Muhammad Afzal
審査委員	主査	秋葉 澄伯	
	副査	松山 隆美	丸山 征郎

Methods to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species (細胞内活性酸素測定試薬 Dichlorofluorescein の問題点とその克服)

Dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)は細胞内活性酸素の解析に広く用いられている試薬である。DCFH-DA は細胞内のエステラーゼによって DCFH になり、DCFH は活性酸素、とりわけ過酸化水素と反応後 Dichlorofluorescein (DCF)へと変化する。DCFHは蛍光物質ではないが、DCFは蛍光物質である。そのため、蛍光強度の変化を観察することで、活性酸素の発生量を推定できるとされている。しかし DCFH は光照射によっても酸化され DCF になると報告されている。DCF の蛍光を測定するためには励起、すなわち DCFH 存在下での光照射は不可避であり、DCFHの光反応は活性酸素量を推定する上で深刻な問題点になる。本研究では DCFH の光反応性を検討し、その反応を適切に抑え、より信頼性の高い DCFH による活性酸素の計測法を考案した。

本研究では、細胞を用いる実験と細胞を用いない実験を行った。細胞を用いる実験では、Dimethyl sulfoxide (DMSO)で好中球様に分化させた HL60(DMSO-HL60)を用い、DCFH を細胞内に取り込ませた。その後、DMSO-HL60 を phorbol myristate acetate (PMA)で刺激し O_2^- を産生させ、蛍光強度の変化を蛍光顕微鏡で観察した。細胞を用いない実験系では、DCFH-DA あるいは DCF-DA をエステラーゼとともにインキュベートし、DCFH 溶液あるいは DCF 溶液を作成し、分光蛍光光度計のキセノンランプで光照射を行なった。蛍光強度並びに蛍光強度の変化は分光蛍光光度計で観察した。また光反応による生成物を解析するために、光照射した DCFH 溶液を HPLC で解析した。光反応を抑制する目的で、Vitamin C (VC), mercaptopropionyl glycine(MPG), methoxycinnamic acid(MC)並びに抗酸化酵素を用いた。

本研究で以下の点が明らかになった。

1. DCFH は光照射によって DCF と未知の蛍光物質を生成した。
2. Vitamin C, MPG, MC は光化学反応をほぼ完全に抑制した。これらの物質は、分光蛍光光度計で DCFH 存在下、DCF を測定する場合有用である。一方抗酸化酵素は光反応を抑制しなかった。
3. 細胞内 DCFH も光照射によって蛍光物質へ変化した。しかし低濃度の DCFH を使用することにより、光反応の影響は無視できる程度となった。
4. DCFH は容易に光反応を起こすので、DCFH を用いて細胞内 ROS の評価をする場合は、使用する細胞に最適な DCFH 濃度を設定し、解析を行う必要がある。

本研究結果は、細胞並びに非細胞実験系における活性酸素測定精度を著明に向上させると考えられる。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 610 号	氏名	Muhammad Afzal
審査委員	主査	秋葉 澄伯	
	副査	松山 隆美	丸山 征郎

主査および副査の3名は、平成18年2月3日、学位請求者 Afzal 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) 蛍光強度の単位はなにか？

回答) 光量を表し、機器、同じ機器でも感度により値が異なる。任意単位である。

質問 2) P1 (未知物質) と P2 (DCF) の蛍光スペクトルは異なるか？

回答) 継続研究で P1 を同定したが、DCF と全く同じ蛍光スペクトルではないが、類似した蛍光スペクトルを示した。

質問 3) 光反応は cytochrome C で抑制できるか？

回答) Cytochrome C が DCFH を酸化するという報告があるため、検討していない。しかし、cytochrome C を用い、光反応によりスーパーオキシドが発生することは確認している。

質問 4) 蛍光顕微鏡像で、PMA 刺激では細胞が顆粒状に染まり、光反応では均一に染まるというような差を観察したか？

回答) いずれも均一に染まり、差は観察できなかった。

質問 5) DCFH は Flow cytometer で用いられるが、その場合も光反応が問題となるか？

回答) Flow cytometer での光照射 (レーザー照射) は短時間であるため、顕著な問題とはならないと思うが、DCFH の濃度が非常に高いと、大きな測定誤差をもたらす可能性があると考えます。

質問 6) P1 の影響を除去できるか？

回答) 現状ではできない。

質問 7) 多くの研究者が光反応を指摘しているか？この論文が初めて明らかにしたか？

回答) 2、3 の論文で既に指摘されているが、本論文は光反応を詳細に検討し、報告した。

質問 8) アジ化ナトリウムはなぜ光反応を増強させたか？

回答) アジド・ラジカルの発生を介すると報告されている。

質問 9) アジ化ナトリウムとビタミン C を同時に使うとどうなるか？

回答) 検討していない。

質問 10) 光反応の対処法をいくつか挙げているが、どの方法が一番良いか？

回答) 最適濃度に設定することがもっとも重要で、実際的に実施しやすい方法である。分光蛍光光度計を用いて測定するときは、VC、MPG あるいは MC を添加し、光反応を抑制する方法が良いと考える。

質問 11) これまでの実験・論文ではどの程度の DCFH 濃度を使っていたか？

回答) 5 μ M、高い場合は 50 μ M を用いている論文もあった。

質問 12) 今回の実験結果を今後どのように応用するか？

回答) まず DCFH の当該実験における最適濃度を決定し、その後実験を行うようにする。

質問 13) DCFH の光反応は機構的に光治療と関連があるか？

回答) 光照射により物質に変化が生じるという面では関連があるが、不明である。

質問 14) HL60 の培養に非働化血清を使っているが、なぜか？

回答) 補体を不活化することで、細胞死を防ぐためである。

HL60 の培養では非働化血清を用いることが多い。

質問 15) HL60 のパッセージナンバーはいくらか？

回答) 不明である。細胞を解凍後 6 ヶ月間は実験に用いることができる。

質問 16) DMSO で HL60 を分化させている時に活性酸素が発生し、

分化に影響を与えているか？

回答) DMSO で分化した HL60 は、刺激を加えないと活性酸素を発生しないため、活性酸素が分化時に発生し、分化に影響を与えることはないと考えられる。

質問 17) PMA の濃度 (1 μ M) は高すぎないか？

回答) 全ての細胞を、より強く活性化するため、高い濃度を用いた。

質問 18) PMA 刺激により、形態学的に変化が生じるか？

回答) PMA 刺激により形態的に変化する。細胞がディッシュに付着し、伸展する。また発生する活性酸素により、膜にも変化・損傷が発生すると考えられ、細胞形態に変化をもたらすと考えられる。

質問 19) 分化にデキサメサゾンを用いたことがあるか？

回答) 用いたことはない。HL60 では分化誘導に通常 DMSO あるいは PMA を用いる。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。