

氏 名 えむでい、 あぶどうる ありむ
Md. Abdul Alim

学位の種類 博士（工学）

学位記番号 富生命博甲第 141 号

学位授与年月日 令和 4 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院生命融合科学教育部 博士課程
生体情報システム科学専攻

学位論文題目
**Electrochemical technique for cell viability assessment via monitoring
of intracellular NADH with a modified double mediator system**
(改良型ダブルメディエーターシステムを用いる細胞内NADHの
モニタリングによる電気化学的細胞生存活性評価法)

論文審査委員

(主査) 教授 鈴木 正康

(副査) 教授 篠原 寛明

(副査) 教授 田中 大祐

(副査) 教授 田渕 圭章

(指導教員) 教授 篠原 寛明

学位論文内容要旨

学位論文題目: Electrochemical technique for cell viability assessment via monitoring of intracellular NADH with a modified double mediator system
(改良型ダブルメディエーターシステムを用いる細胞内 NADH のモニタリングによる電気化学的細胞生存活性評価法)

専攻: Biological Information Systems (生体情報システム科学)

氏名: Md. Abdul Alim (エムディ. アブドウル アリム)

In this thesis, I proposed and developed a new electrochemical technique for cell viability assessment via monitoring of intracellular NADH with a modified double mediator system.

Developing of rapid and precise methods for cell counting and cell viability assessment is very important to evaluate the acute cytotoxicity of fast-acting drugs, pollutants, food additives, fermentation processes in the food processing industry, and in cell biology. There are various kinds of conventional methods have been developed for cell viability assessment. However, some methods such as the fluorescent dye-staining methods take a time to analysis and cannot assess the intracellular metabolic activity. To resolve this problem, electrical methods such as the impedance spectroscopy method and electro-orientation method have been developed. These methods are rapid but still unable to assess an intracellular metabolism as cell viability. On the other hand, conventional MTT or WST assays can assess the total intracellular NADH as a marker of cell viability though it is time-consuming. These colorimetric methods have some other limitations such as cytotoxicity of assay dye, several steps to get results, scattering effect of cells suspended in medium, and therefore cannot evaluate the toxic effect of fast-acting drugs or chemicals.

With this background, the main objective of this study was to develop a rapid, precise, and convenient electrochemical method to evaluate the real cell viability through the monitoring of intracellular NADH which is one of the most important metabolites for not only mammalian cells but also microorganisms.

In chapter 1, I highlighted the background and purpose of this study, and provided some important biological terms related to this study. In chapter 2, I comprehensively explained the required materials and methods for this study.

In chapter 3, I introduced the electrochemical technique with 1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate (mPMS) and $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (FeCN) as a modified double mediator system to monitor intracellular NADH on mammalian cells. A combination of 10 μM mPMS and 500 μM FeCN was the optimum concentration, and 10 minutes of incubation was enough to monitor intracellular NADH by chronoamperometry at +0.5 V applications. My this mPMS/FeCN system worked as useful as previously reported enzyme-dependent menadione (Mena)/FeCN system. I confirmed that the electron transfer from intracellular NADH to mPMS occurred non-enzymatically, though the cytosolic enzyme catalyzed the electron transfer from intracellular NADH to Mena. Next, I applied my modified double mediator system to count the various kinds of mammalian cells. Here the cell counting results by my method were compared with the results by conventional WST-1 assay. The oxidation current in chronoamperometry after 10 minutes of incubation showed an excellent linear relationship in two times wider cell concentration as compared to the cell concentration detected by conventional WST-1 assay. Furthermore, I applied my method to investigate the acute toxic effect of oxamic acid on metabolic activity in PC12 cells as a model tumor cell by blocking LDH. Recently, lactate dehydrogenase (LDH) inhibition by oxamic acid has taken a lot of attention for the anti-cancer drug. My result demonstrated that the electrochemical technique with the modified double mediator system might be useful for screening of fast-acting drugs to intracellular metabolism.

In chapter 4, I described the application of my method for yeast cell counting and to evaluate the acute cytotoxicity of two antifungal agents in yeast cells. Firstly, I paid attention to itaconic acid that has been especially used to make hydrogels for water decontamination and eco-friendly biodegradable polymer. Itaconic acid is also important as a natural metabolite that acts as a key regulator for the TCA cycle by an inhibitory effect on succinate dehydrogenase (SDH). Itaconic acid with mM concentration interferes the TCA cycle metabolism by direct inhibition of SDH. So, itaconic acid cytotoxicity monitoring is highly important. I succeeded to evaluate the metabolic inhibition effect of itaconic acid in yeast cells by electrochemical monitoring of intracellular NADH with my modified double mediator system. Further, I applied my method to evaluate the toxic effect of nystatin in yeast cells. Nystatin is widely used as an anti-fungal drug. It has been reported that the toxic effect of nystatin at the concentration of $\mu\text{g/mL}$ range was evaluated by the colony counting method on the basis of cell membrane disruption. Here, the toxic effect of nystatin with two order lower concentration was evaluated by my method. The results obtained by my method demonstrated that $0.01 \mu\text{g/mL}$ of nystatin induced intracellular NADH decrease to promote apoptosis without cell membrane disruption.

In chapter 5, I concluded this research. Result obtained in this study suggested that my method might be applicable to evaluate the various types of acute cytotoxicity such as inhibition of respiratory chain, protein and DNA synthesis, etc. I believe that my method might be useful as a tool for academic study, cell-based research, medical and pharmaceutical applications. Finally, in the future perspective, I introduced the possibility of controlling intracellular metabolic activity by electrochemical reduction of intracellular NAD^+ to NADH.

【論文審査の結果の要旨】

本審査委員会は、令和4年2月17日（木）に Mohammad Abdul ALIM 氏の博士学位論文公聴会及び最終審査を行い、以下に概要を示す通り、博士学位論文審査及び最終試験ともに合格と判断した。

本博士学位論文の概要は、以下のとおりである。

まず第1章において、生物学的研究から医療、製薬、食品産業までにおける細胞生存活性評価の重要性を述べ、WST法をはじめとする従来の細胞生存活性評価法の長所、短所を比較し、細胞内 NADH のより迅速簡便な計測が求められていることに言及した。その上で、本論文では、1-Methoxy-5-methylphenazinium イオンとフェリシアンイオンの2つの電子メディエーターを組み合わせることで改良した電気化学測定により、迅速簡便に動物細胞や酵母の細胞内 NADH 量のモニタリングを実現することを研究目的としたことと、その計測原理について記した。

第2章では、研究に用いた材料や試薬、装置類と実験方法について記述した。

第3章では、2つの電子メディエーターを組み合わせる電気化学測定による細胞内 NADH 量のモニタリングのための最適条件を検討したうえで、神経系や免疫系の株化動物細胞を用いて、種々の動物細胞について、WST法を用いるよりもより広い細胞濃度域で、わずか10分程度で細胞計数を行えることを示した。さらに、乳酸脱水素酵素の阻害剤投与による即効的な細胞内 NADH 減少の評価に応用できることを示した。

また第4章では、開発した改良型ダブルメディエーターを用いる電気化学測定法が、分裂酵母細胞内の NADH 量のモニターにも利用可能であり、細胞計数へ応用した場合には、WST法よりも細胞濃度に対する直線領域が広く、短時間での計数を実現できた。また TCA 回路の阻害剤であるイタコン酸投与による即効的な細胞内 NADH 減少の評価に応用できることも示した。

第5章では、本研究の成果を総括するとともに今後の展望が記された。

以上の通り、ALIM 氏は、本博士学位論文研究において、細胞膜透過性で NADH から電子を受容できる 1-Methoxy-5-methylphenazinium イオンと細胞膜非透過性のフェリシアンイオンの2つの電子メディエーターを組み合わせる電気化学測定により、わずか10分で動物細胞や酵母の細胞内 NADH 量をモニタリングし、細胞生存活性を評価し得る方法を開発した。また、本方法で細胞内の NADH 生成に関わる酵素に対する即効性の阻害効果の評価を実現した。

最終試験を兼ねた公聴会では、来聴者及び審査委員より多くの質問がされたが、ALIM 氏はいずれにも適切に回答することができた。また博士学位論文も、研究背景としての従来の細胞生存活性測定法について、予備審査時よりもより詳細な調査、記載がなされ、さらなる改善が認められた。

また、本学位論文の研究成果は、第3章に相当する内容が、国際学術誌である

Electrochemistry 誌 (Web of Science, Scopus に登録) に掲載され、生体情報システム科学専攻における学位授与基準を満たしていることが、確認された。さらに iThenticate による剽窃チェックでも問題ないことが報告された。以上により、博士学位論文審査及び最終試験ともに合格と判断した。