Total Internal Reflection Fluorescence 法を 応用した選択的蛍光測定

Observation of the microstructural cell surface using
Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF).

七沢 洋 米川元樹* 中沢郁生** 西坂 剛**

Hiroshi Nanasawa Motoki Yonekawa* Ikuo Nakasawa**
Tsuyoshi Nishisaka**

富山医科薬科大学第三内科 北海道大学医学部第一
外科* 旭川医科大学第三内科 ** 東京農工大学保健
管理センター **

3rd. Dept. of Int. Medicine, Toyama Med.& Pharmaceut. Univ
* 1st. Dept. of Surg., Faculty of Medicine, Hokkaido Univ.
**3rd. Dept. of Int. Medicine, Asahikawa Medical College.
**Health Science Center, Tokyo Noh-Koh Univ.

This paper presents a pilot study observing the fluorescence from the regions of contact between the cultured cells and the substrate. The technique utilizes the evanescent wave of a totally reflecting laser beam to excite only those fluorescent molecules within one light wavelength or less of the substrate surface. TIRF examination of cells appears to have promising applications, including visualization of the membrane underlying cytoplasmic structures at cell-substrate contacts, and mapping of fluorescent molecules.

1. はじめに

光化学療法的作用機序を解明する手がかりとして、細胞における感光色素の分布・吸着状態を測定するため、我々は Total Internal Reflection Fluorescence (以下 TIRF) 法を応用し、細胞表層部における蛍光の選択的測定を試みたので、その装置の概要と測定結果を報

告する。

2. TIRF の原理

光が臨界角以上の入射角で屈折率の大きい物質から小さい物質に移行するとき、その境界面では屈折せず全反射する。

この時、通常的全反射と異なり、その境界面では光は波長に比例した深さだけ物質内に入り、

そこから反射方向に進む。

この部分に感光色素があれば、照射光により蛍光を発する。これを利用したのが TIRF 法である。(Figure 1)

臨界角以上の各入射角における光の深達長 d (nm) は、次の式で表わされる。

$$d = \frac{\lambda}{4\pi n_2} \sqrt{\frac{\sin^2 \theta}{\sin^2 \theta_c} - 1}$$

ここで

$$n_1 = 1.51$$

(プリズムの屈折率)

$$n_2 = 1.36$$

(培地の屈折率)

$$\theta_c = 65^\circ$$

(システムの臨界角)

$$\theta = 65^\circ \sim 70^\circ$$

(入射角)

$$\lambda = 514.5 \text{ nm}$$

(入射光の波長)

で、 θ_c は n_1 および n_2 で決まる。

各入射角と深達長の関係を示したのが Table 1 である。

この表から判るように、入射角が増すにしたがい、深達長 d が浅くなり、極く表層の蛍光観察が可能となる。

Fig.1 TIRF の原理

3. 方法および対象

(Figure 2,3)

- (1) 10% FBS 添加 DM-160 培地を入れたシャーレの底にカバーガラスを敷き、HeLa Cell を再播種後、37°C にて 24 時間、incubate する。
- (2) 0.3% Eosine を添加し、3 分間取り込ませる。
- (3) PBS (一) 溶液にて洗浄し余分な色素を取り除く。
- (4) スペーサーとして、両面テープを用いてスライドグラスの上に、裏がえしにしてカバーガラスを置き、その間は培養液でみたす。
- (5) カバーガラスの上に無蛍光のエマージョンオイルをごく薄くぬったプリズムを置き、Figure 3 のごとく、ステージ上に置く。
- (6) 波長 514.5 nm のアルゴンレーザー光をプリズムに入射させ、入射角を変化させ、ガラス面と接触している細胞表層部の蛍光の選択的測定を行う。

入射角 θ ($^\circ$)	深達長 d (nm)
65.5	323
66.0	230
67.0	166
68.0	140
69.0	120
70.0	10

Table 1 入射角と深達長

Fig.2 実験手順

Fig.3 システム図

4. 成績

Figure 4 は同一細胞を左側は通常のレーザー励起蛍光法で右側は TIRF 法で観察したものである。

通常のレーザー励起蛍光像では、細胞中央の核の形状がよく

Fig.4 細胞の蛍光像

わかり、発足形成も観察される

TIRF 法では、観察可能な範囲が細胞表層部となるため、核は観察されにくくなる反面、カバーガラスに沿って発育した、通常の蛍光像では観察されないような、ごく細かな発足形成が認められる。

なお、細胞中央部の蛍光強度の差は主として、細胞とガラス面との接触状態によるものである。

5. 考察

レーザー光と HpD で代表される感光色素を用いた、光化学療法は近年特に注目を集めている。しかし、光化学療法のメカニズムとも関係する、感光色素の分布や吸着状態などの細胞内動態については未だ不明な点が多い。

我々は AXELROD らが細胞膜の topography や各種 membrane receptor の様子を観察するために用いた、TIRF 法を利用し、細胞表層部の選択的蛍光観察をおこなった。

本法では、通常のレーザー励起蛍光像では観察不可能な

選択的蛍光観察が可能であり、
蛍光を観察することにより、感
光色素の細胞動態の分析の手が
かりになると思われる。

今回、肉眼的観察を主体とし
たため、感光色素に蛍光強度の
強い Eosine を用いたが、今後
は光化学療法 of 感光色素として
臨床的に用いられている HpD
を用い、肉眼的観察のみならず
機器的な測定おも行なう予定で
ある。

6. 結論

TIRF 法を用い、細胞の選択的
蛍光を観察し、以下の様な結論
を得た。

- (1) 本システムの臨界角は 65°
で、TIRF が可能な入射角は
 $65^{\circ} \sim 70^{\circ}$ である。
- (2) 入射角が 65.5° で観察可能
な深度は表面から 0.3 ミク
ロンの範囲であり、入射角
が増大するにしたがって深
度は浅くなり、 70.0° では
0.01 ミクロンとなる。
- (3) TIRF 法を用い、感光色素の
分布や吸着状態など、色素
動態の基礎的研究が可能と
なる。

文献

AXELROD, D et al: Cell —
Substrate Contacts Illu —
minated by Total Internal
Fluorescence, J. cell. Biol.
89: 141 — 145, 1981