エキシマーレーザー細胞精密プロセシング装置を用いた基礎的実験

Basic experiments of microprocessing system for biological cells with excimer lasers

牧野和浩^{*}、佐藤俊一^{*}、稲場文男^{**}

K.Makino, S.Sato and H.Inaba

^{*} 東北大学電気通信研究所

^{**} 新技術開発事業団稲場生物フォトンプロジェクト

Recently, in the field of biotechnology and genetic engineering, research and development of new micropocessing and mmicrosurgery systems for living biological cells are strongly desired. From this point of view, we are trying to develop precise microprocessing system using an ultraviolet excimer laser, in which the microscope stage is controlled two-demensionally with the resolution of $1\text{ }\mu\text{m}$ or smaller by means of piezoelectronic motors.

In order to obtain the basic data of cell laser-microprocessing, we measured the survival rate and growth rate of mouse's fibroblast cells which were microirradiated by UV-laser light in the region of those nuclei. this irradiation condition of UV-laser output were the wavelength of 355nm(excimer-laser excited dye-laser), the pulse width of 17ns and the pot diameter of $2\text{ }\mu\text{m}$.

We confirmed experimentally that as the number of irradiated laser pulses increases, the survival rate of the irradiated cells with the pulse energy of $1\text{ }\mu\text{J}$ decreases, but it was almost independent on the laser pulse repetition rate. Moreover, it observed that the growth rate of the irradiated cells under the condition of the pulse energy of $1\text{ }\mu\text{J}$, the number of irradiated pulses of 500 and the repetition rate of 100 Hz did show little change untill 24 hours after the irradiation, while nonirradiated cells revealed the growth rate change with a cell cycle of about 18 hours.

1. はじめに

最近の光エレクトロニクスの著しい進歩によって、遺伝子工学や生命工学などの分野にも新しい光技術が積極的に導入されるようになってきている¹⁻³⁾。それらの中でも生体細胞の微小器官、遺伝子などの機能について、コヒーレント特性の優れたレーザー光を利用する研究は特に興味深いものの一つである。そのためには、簡単な操作で、しかも、短時間で多量の生体細胞の微細加工を行うことができる装置の研究開発が強く望まれている。

我々はこのような観点より、波長の短い紫外域レーザー光を用いた、非接触で生体細胞のマイクロプロセッシングを行うことのできるエキシマーレーザー細胞精密プロセッシング装置の試作開発を進めてきた⁴⁾。本文では、集光したレーザー光と生体細胞との相互作用を確かめるために、先ず基礎実験として本装置を用いて紫外域レーザー光を繊維芽細胞の核付近に照射したときの細胞生存率ならびにその形態変化などを調べたのでそれらの結果について報告する。

2. 実験装置

試作開発したエキシマーレーザー細胞精密プロセッシング装置のブロック図をFig. 1に示す⁴⁾。本装置は、エキシマーレーザー部、画像処理部、微小位置決め部で構成されている。エキシマーレーザー部は、XeCl気体レーザーの基本波（波長308nm）で励起した色素レーザー（波長355nm）から成り、色素レーザー光を対物レンズ（Zeiss Ultrafluor 32×）で集光して対象とする個々の細胞に照射する。また、光パルスエネルギーの測定は、ジュールメーター（Molelectron社 J 3 Pyroelectric Joulemeter）を用いており、対物レンズの出力と図のDetector位置での出力とで予め校正を行っている。画像処理部は、CCDカメラからの細胞のビデオ信号をイメージプロセッサに送り、TVモニターに映し出している。微小位置決め部は、ランダムモード操作の場合には、前回に報告した様に、ライトペンで指定したモニター上の個々の生体細胞の特定部位にレーザー光が照射できるように二次元的に1μm以下の精度で倒立型顕微鏡の2次元ステージを移動させることが可能である。

実験にはマウスの繊維芽細胞（L929）を用い、これにエキシマーレーザー励起色素レーザー光（波長；355nm、パルス幅；17ns、スポットサイズ；約2μm）を照射した後、細胞の生存率を求めた。

Fig. 1 エキシマーレーザー細胞精密プロセッシング装置のブロック図

3. 実験結果

1) パルスくり返し周波数依存性

パルスエネルギーを約1μJに固定して、照射くり返し周波数を4Hz、35Hz、72Hz、100Hzとしたときの照射光パルス数と細胞生存率との関係を調べた。Fig. 2にその結果を示す。縦軸は細胞の生存率をパーセントで表示したものである。照射光パルス数が多くなるに従って、細胞の生存率は低下していくことが認められた。周波数100Hzの時やや効果的に細胞を破壊するように見受けられるが、周波数による変化はそれほど顕著には現れていない。

2) パルスエネルギー依存性

細胞破壊のエネルギーしきい値を求めるために、照射光パルスエネルギーを変化させて、1パルス光照射による細胞の生存率を測定した。Fig. 3はその結果を示すもので図のように約4μJ付近から顕著に細胞の生存率が低下し始めることが認められた。また、光パルスエネルギーが約10μJになるとほとんどの細胞が破壊されてしまうことがわかった。この場合にはレーザー光照射の瞬間に破裂するようにして壊れる細胞数が増加するこ

とが認められた。

3) 照射光パルス数依存性

パルスエネルギーを $1\mu\text{J}$ 、 $3\mu\text{J}$ 、 $4\mu\text{J}$ と変えて、くり返し周波数 35Hz の一定の条件下で照射光パルス数と細胞生存率との関係を調べた。Fig. 4 に示したように、パルスエネルギーが $1\mu\text{J}$ 、 $3\mu\text{J}$ の時には、照射光パルス数が 100 を越えると生存率の低下が生じ始めるのに対して、Fig. 3 で述べたように 1 パルスで細胞生存率に大きな影響を与えるはじめる $4\mu\text{J}$ では、照射光パルス数が 100 になると大部分の細胞が破壊されてしまうことがわかる。

4) 細胞の増殖率への影響

レーザー光照射が細胞へ与える経時変化を考察するため、レーザー光を照射した細胞と照射しない細胞の増殖率について比較検討した。照射条件は、パルスエネルギー $1\mu\text{J}$ 、くり返し周波数 100Hz 、照射パルス数 500 で、照射後 24 時間までの細胞の規格化した増殖率を調べた。規格化した増殖率は次のようにして求めた；照射後所定の時間、上述の条件でインキュベイトを行う。そして、トリパンブルーで失活または破壊した細胞を染色して、染色していない細胞をカウントする。この数を照射した細胞数で割ることにより規格化した増殖率を得る。Fig. 5 はその結果を示すもので、横軸はレーザー照射後の時間である。○はレーザー光照射していない細胞の増殖率、●はレーザー光照射した細胞の増殖率をそれぞれ表している。照射していない細胞の増殖率から、実験に使用した繊維芽細胞の細胞周期は、約 18 時間であると推定される。これに対して、照射した細胞の増殖率は 24 時間の観測時間内ではほとんど変化しないことが認められる。

レーザー光照射した細胞と照射していない細胞の増殖率の差違を表示するため、実験を行った個々のシャーレで測定した、レーザー光照射の細胞と照射していない細胞のそれぞれの増殖率の比を求めると Fig. 6 のようになる。Fig. 5 の結果に対応して、約 9 時間後から増殖比が低下して行くことがわかる。このことから、この照射条件ではレーザー光は照射直後には明かな破壊は惹起させないが、その後経時的に細胞分裂に必要な器官、または物質が破壊され、その機能を失うものと推定

Fig. 2 細胞生存率の照射光パルスくり返し周波数および照射光パルス数に対する依存性

Fig. 3 細胞生存率の照射光パルスエネルギーに対する変化

Fig. 4 細胞生存率の照射光パルスエネルギーおよび照射パルス数の対する変化

Fig. 5 レーザー光照射した細胞および照射しない細胞に対する規格化細胞増殖率の経時変化

することができる。

4. レーザー光照射した細胞の形態変化

以上のような一連の実験を行っている間に、レーザー光は個々の細胞に様々な形態変化をもたらすことが観測された。例えば、レーザー光照射した瞬間に細胞が破裂するように破壊したり、また連続照射によって徐々に照射部位が変性して行くものも見られた。Fig. 7はそのような変化の一例を示すものである。(a)はレーザー光照射前、(b)は照射0.07秒後、(c)は照射0.23秒後、(d)は0.40秒後のビデオのスクリーン画像を写真撮影したものである。レーザー光照射時に生じた照射部位の黒い影のようなものが照射0.4秒後には消滅して、照射前とほぼ同じ状態に回復していることがわかる。

(a) レーザー光照射前 (b) 照射0.07秒後

(c) 照射0.23秒後 (d) 照射0.40秒後
Fig. 7 レーザー光照射後の細胞の形態変化の測定例

5. まとめ

今回、我々はエキシマーレーザー細胞精密プロセシング装置の試作開発を行い、基礎実験として本装置を用いてマウスの繊維芽細胞の核付近にレーザー光照射を行ったときの細胞生存率を測定した。その測定結果は次の通りである；

Fig. 6 レーザー光照射した細胞と照射しない細胞の増殖率比の経時変化

1) パルスエネルギーが一定の時、照射パルス数が増加するに従って細胞の生存率が低下することが測定された。ただし、そのときのパルスくり返し周波数への細胞生存率の依存性は認められなかった。

2) パルスエネルギーが約 $4 \mu\text{J}$ を越えると、細胞の失活および破壊が顕著に認められた。

3) パルスエネルギー $1 \mu\text{J}$ 、くり返し周波数 100 Hz 、照射光パルス数 500 のレーザー光照射条件で、レーザー光照射後 24 時間までの増殖率の経時変化を測定した。その結果、レーザー光照射しない細胞は約 18 時間の細胞周期で増殖して行くが、レーザー光照射した細胞は照射後 24 時間まで細胞増殖が認められなかった。

1) M.W.Berns, J.Aist, J.Edwards, K.Strahs, J.Girt on, P.McNeill, J.B.Rattner, M.Kitzes, M.Hammer-Wilson, L.-H.Liaw, A.Siemens, M.Koonce, S.Peterson, S.Brenner, J.Burt, R.Walter, P.J.Bryant, D.van Dyk, J.Coulombe, T.Cahill and G.S.Berns: Science, 213, 505 (1981)

2) M.Tsukakosi, S.Kurata, Y.Nomiya, Y.Ikawa and I.Kasuya, Appl.Phys.B 35, 135 (1984)

3) 茅野照雄、山本肇、日本レーザー医学会誌、8(2) 15 (1987)

4) 牧野、佐藤、稲場、日本レーザー医学会誌、8(3) 171 (1987)