

SHG 顕微鏡による細胞膜損傷の評価と既存の毒性試験との相関

Evaluation of cell membrane damage by SHG microscope and correlation between SHG intensity and conventional cytotoxicity assays

明大理工 ○近藤 良亮¹、大堀裕平、加藤 徳剛²

Meiji Univ., °Ryosuke Kondo¹, Yuhei Ohori, Noritaka Kato²

E-mail: ¹ce61036@meiji.ac.jp, ²nkato@meiji.ac.jp

【背景】 細胞膜に損傷を与える物質には細胞毒性がある。細胞毒性試験として、細胞の代謝活性試験法(CCK-8アッセイ)や色素排除試験法があるが、我々は分子配向に敏感な第二次高調波発生(SHG)を利用して膜損傷を評価する方法を提案した[1]。この方法では、極性色素分子で染色しSHG活性化した細胞膜のSHG強度から膜損傷の程度を評価する。細胞膜を損傷させるPoly(ethyleneimine)(PEI)[2]の濃度が高い培地にさらされた細胞ほど細胞膜からのSHG強度は低下したが、まだ従来のアッセイとの相関が得られていなかった。

【目的】 CCK-8アッセイにより求めた培地中のPEI濃度に対する細胞生存率の関係と、PEI濃度に対するSHG強度の関係との相関を明らかにすることを目的とした。

【実験方法】 PEIを添加したEagle's minimum essential medium (EMEM)中でHeLa細胞を1時間インキュベーションし、アッセイを行った。細胞膜の染色には両親媒性極性蛍光色素分子であるRH237 (Molecular Probes)を用いて、波長850nmのTi:sapphireレーザーを励起光としてSHG像と二光子励起蛍光(TPF)像を得た。色素分子数に比例するTPF強度(I_{TPF})で、SHG強度(I_{SHG})を割り、細胞当たりの I_{SHG}/I_{TPF} を評価した。CCK-8アッセイでは、テトラゾリウム塩WST-8の還元を比色分析して、PEI濃度に対する細胞生存率を評価した。

【結果】 PEI濃度7.5 μ g/mlで細胞膜へ損傷を与えた場合(**Fig.1(b)**)は、PEI濃度0.0 μ g/ml (**Fig.1(a)**)の場合に比べ I_{SHG} が弱く、透過像においても輪郭が不明瞭な細胞が多く観察された。**Fig.2**に示すように、PEI濃度に対する I_{SHG}/I_{TPF} とCCK-8アッセイによる細胞生存率に良い相関が得られた。従って、細胞膜における分子配向の乱れが細胞毒性に関係していることが分かった。現在、色素排除試験法との相関も評価している。

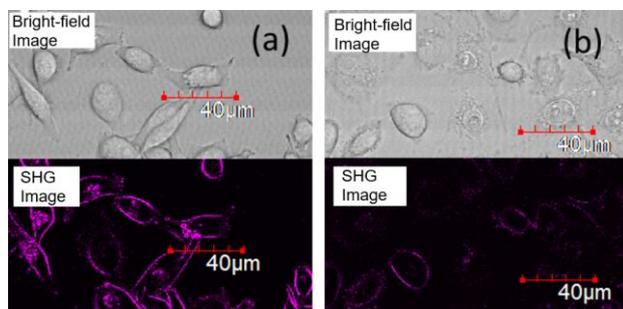


Fig. 1 Bright-field and SHG images of HeLa cells incubated in the EMEM with PEI at (a) 0.0 μ g/ml and (b) 7.5 μ g/ml.

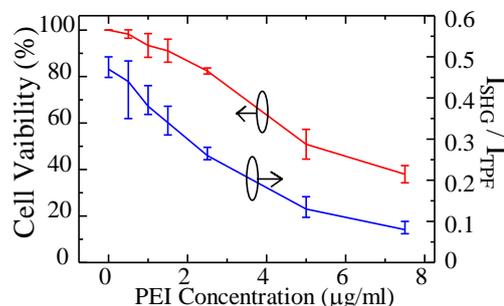


Fig.2 Cell viability obtained by CCK-8 assay and I_{SHG}/I_{TPF} versus PEI concentration.

[1] 斎藤晴之, 加藤徳剛, 第 63 回応用物理学会春季学術講演会(2016), 20a-W323-2.

[2] Dagmar Fischer, Thorsten Bieber, Pharm. Res.16, (1999) 1273-1279.