

生きた細胞に対する短波長可視レーザー光の毒性評価

Valuation of damage of living cells by short wavelength visible laser beam

難波慎太郎¹, 川原翔平¹, 松山哲也¹, 和田健司¹, 堀中博道¹,

川喜多愛², 村田香織², 杉本憲治² (1. 阪府大院・工, 2. 阪府大院・生環)

Osaka Pref.Univ., S. Namba, S. Kawahara, T. Matsuyama, K. Wada, H. Horinaka,

A. Kawakita, K. Murata, K. Sugimoto

E-mail: nanba0228@pe.osakafu-u.ac.jp

はじめに ライブセルイメージングでは、観察用の LED 励起光照射が生細胞にダメージを与えることがしばしば問題となっている。これまで、我々は、ダメージを与えない観察条件を提案することを目的として、励起光毒性の定量的評価を行ってきた[1]。本研究では、細胞へのダメージが無視できる励起光照射条件下で、細胞周期を特定した細胞の特定部位にレーザー光を照射し、その影響を観察したので報告する。

実験方法 半導体レーザーを組み込んだ蛍光顕微鏡の光学系を Fig.1 に示す。観察用の LED 励起光とレーザー光を同時に細胞に照射することが可能となっている。シャーレ内の悪性黒色腫由来細胞は、細胞核が Plum (励起/蛍光波長: 560 nm/650 nm) により、PCNA (増殖細胞核抗原) が EGFP (励起/蛍光波長 484 nm/520 nm) によりラベル化されている。Fig.2 に示すように、EGFP-PCNA は G1 期には細胞質全体に拡散しているが、S 期中期には核内へ移動し、S 期後期にはドット状の局在を示す。EGFP の観察により細胞周期の時期を特定し、各時期において、細胞核の中心にレーザー光を照射した。照射後 24 時間にわたり細胞核にある Plum からの蛍光を計測することにより、時期ごとのレーザー光照射が細胞の動態に与える影響を調べた。

実験結果 波長 405 nm, 強度 800 W/cm² のレーザー光を細胞核中心に照射したときに観測された照射エネルギー、照射時期ごとの細胞の動態変

化 (24 時間以内に細胞死に至った数/観察細胞数) を Table.1 にまとめた。一定時間以上の青色レーザー光の照射による細胞核中心へのダメージが細胞死につながることを確認できる。また、照射時間 60 s の結果では、他の時期に比べ S 期中期の細胞死確率が低くなっており、S 期におけるダメージ修復作用が影響していると考えられる。

まとめ 細胞周期の特定時期にある細胞の細胞核中心に青色レーザー光を照射し、その影響を調べた結果、S 期中期に照射された場合の細胞死確率が低い傾向が得られた。

参考文献 [1] 難波 他, 第 76 回応用物理学会秋季学術講演会 14p-2N-16

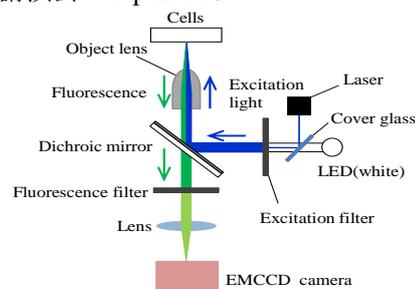


Fig.1 Configuration of fluorescent microscope

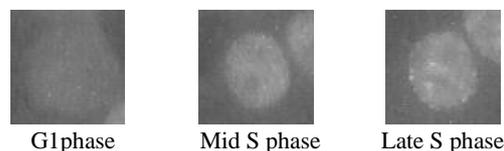


Fig.2 Observed EGFP-PCNA for each phase

Table.1 Dynamics in the cells for each irradiation time, and irradiation energy (the number of cell death / observed number)

Irradiation time(s)	Irradiation energy(kJ/cm ²)	G1 phase	Mid S phase	Late S phase
30	24	0 / 5	0 / 5	0 / 4
60	48	3 / 6	1 / 6	5 / 8
90	72	5 / 5	4 / 6	5 / 5
120	96	4 / 5	3 / 5	3 / 5