

増殖細胞核抗原の観察によるレーザー光の光毒性評価

Phototoxicity evaluation of laser light by observation of PCNA

阪府大院・工¹, 生環² ○金丸直弘¹, 高橋圭介¹, 松山哲也¹, 和田健司¹, 岡本晃一¹

川喜多愛², 村田香織², 杉本憲治²

Engineering¹, Life and Environmental Sciences², Osaka Pref. Univ., N. Kanamaru¹, K. Takahashi¹,

T. Matsuyama¹, K. Wada¹, K. Okamoto¹, A. Kawakita², K. Murata², K. Sugimoto²

E-mail: kanamaru0617@pe.osakafu-u.ac.jp

1. はじめに

生体に対する多量の短波長光の曝露は、加齢黄斑変性症（AMD）や網膜傷害などの疾患の原因となることが知られている。我々はライブセルイメージングにおいて LED と半導体レーザーを組み合わせる光源に用い、青色光が生細胞に与える光毒性の定量評価を行っている。前回は、細胞核に青色レーザー光を照射すると照射部に増殖細胞核抗原（PCNA）が集積することから、青色光照射により DNA 損傷が生じることを示した¹⁾。今回は、生細胞に対して異なる波長のレーザー光を照射し、光毒性の波長依存性について調べたので報告する。

2. 実験系

蛍光顕微鏡の光学系を Fig. 1 に示す。バンドパスフィルターを用いて白色 LED 光から特定波長の光を切り出し、ダイクロイックミラーにより反射した後、対物レンズ(×60)で集光してシャーレ内の悪性黒色腫由来細胞に照射した。生細胞は細胞核を mPlum-histoneH3 で、PCNA を EGFP で可視化している。生細胞からの蛍光は、対物レンズ、ダイクロイックミラーを通過し、蛍光フィルターで励起光と分離した後、レンズで集光して EMCCD カメラで観察した。レーザー光は、アテネーターで強度を調整した後、カバーガラスで反射させ顕微鏡に導入し、観察視野内にある生細胞の特定部位に照射した。

3. 実験結果

生細胞の細胞核中心に対して波長 450 nm または 532 nm のレーザー光を強度 100 W/cm² で 3 分間照射し、その後の PCNA の動態を 10 分間観察した。細胞核に対するレーザー光照射部の輝度比の時間変化を Fig. 2 に示す。532 nm レーザー光照射時は、輝度比は約 1 でほぼ一定であり、照射部への PCNA の集積は見られない。一方、450 nm レーザー光照射時は、照射 2 分後に輝度比 2 に達し、生じた DNA 損傷を修復するべく PCNA が集積したことがわかる。

[1] 応用物理学会秋講演会, 21p-234A-12 (2018)

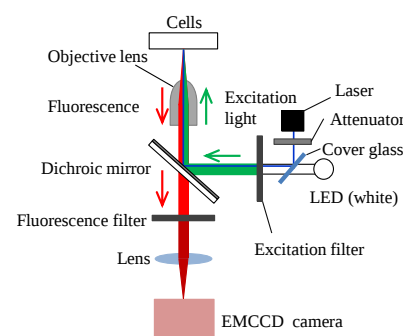


Fig. 1. Configuration of fluorescent microscope

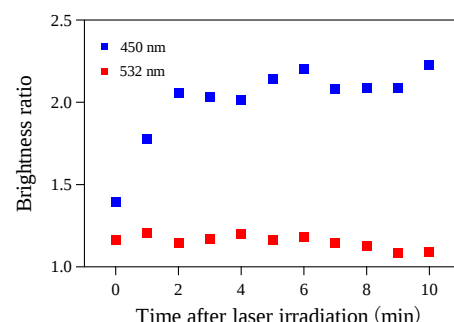


Fig. 2. Brightness ratio after laser irradiation