

生細胞への青色レーザー光照射による光毒性の照射部位依存性

Irradiation site dependence of phototoxicity by blue laser irradiation to living cells

阪府大院・工¹, 生環² ○山口樹也¹, 大坂昇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., M. Yamaguchi¹, N. Osaka¹

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

E-mail: yamaguchi0619@pe.osakafu-u.ac.jp

1. はじめに

我々は、ライブセルイメージング技術を用いて、生細胞に青色レーザー光を照射した後の増殖細胞核抗原 (PCNA) の動態を観察することにより、生細胞中において青色レーザー光照射により DNA 損傷が引き起こされることを示した^[1]. 今回は、特定の細胞周期にある細胞の細胞核および細胞質にレーザー光を照射し、DNA 損傷の照射部位依存性について調べた。

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 光から蛍光タンパク質の励起に適した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. 光毒性発現用の 405nm 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して顕微鏡に入射させ、観察視野内にある生細胞の細胞核中心および細胞質に照射した。

3. 実験結果

S, G1 期にある生細胞の細胞核中心および細胞質に対して、波長 405 nm のレーザー光を強度 100

W/cm² で 1~5 分間照射した. レーザー光照射後 10 分間にわたり EGFP の蛍光画像を 1 分毎に取得し、PCNA の動態を観察した. 非照射部の輝度を基準として照射部の輝度変化を調べ、PCNA の集積を評価した. レーザー光を 5 分間照射した際に観測された輝度変化を Fig 2 に示す. 細胞核に照射した場合では、S 期、G1 期ともに輝度比の上昇が見られ、PCNA の集積が確認された. S 期の細胞では輝度比が 1.1 程度まで上昇したのに対し、G1 期では 0.4 程度に留まっている. S 期では PCNA は細胞核に集まっており、PCNA の濃度差を反映していると考えられる. また細胞質照射では、S 期、G1 期ともに輝度比の上昇が観測されず、PCNA の集積は見られなかった。

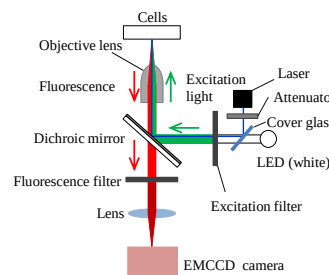


Fig 1. Configuration of fluorescent microscope

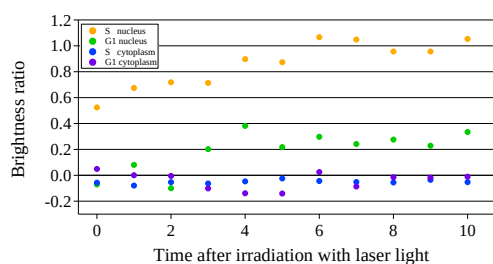


Fig 2. Brightness ratio after irradiation