

生細胞への 450 nm レーザー光照射による光毒性の細胞周期依存性 Cell cycle dependence of phototoxicity of living cells irradiated by 450 nm laser light

阪府大院・工¹, 生環² ○山口樹也¹, 金丸直弘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. Kanamaru¹

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において、青色レーザー光を照射後の増殖細胞核抗原 (PCNA) の動態を観察することにより、青色光によって生細胞の DNA 損傷が引き起こされることを示した [1]. 今回は、光毒性の細胞周期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。光毒性発現用の 450 nm 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、450 nm レーザー光を強度 100 W/cm² で 1~5 分間照射し、その後の EGFP の蛍光画像を 1 分ごと 10 分間にわたり取得し、PCNA の動態を調べた。M 期と S 期の生

細胞に対して、レーザー光を 4 分間照射した後の蛍光の輝度比の時間変化を Fig. 2 に示す。輝度比は、M 期の生細胞では最大値約 1.1 に留まったが、S 期の場合はレーザー光照射後 6 分で約 1.5 まで上昇した。これより、S 期では DNA 損傷を修復するために PCNA がレーザー光の照射部位に集積したことがわかる。これまでの実験結果より、同じ条件で青色レーザー光照射した場合、M 期に比べて S 期の細胞の生存率が高いことがわかっており、上の結果から、PCNA の作用により光毒性の細胞周期依存性が生じることがわかった。

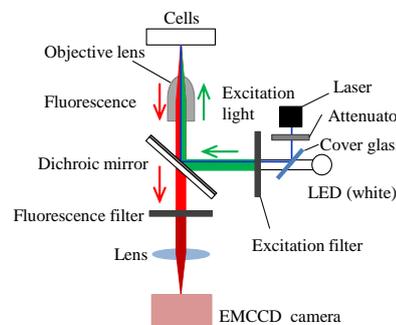


Fig. 1. Configuration of fluorescent microscope

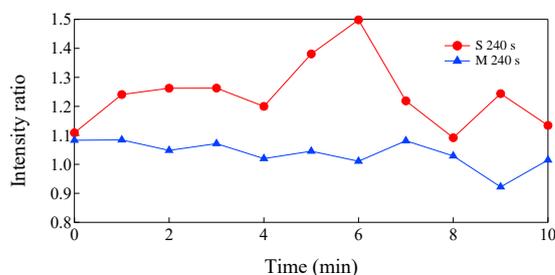


Fig. 2. Temporal variation of brightness ratio (laser irradiation spot vs. other area) in the cell nucleus.

[1] 第 80 回応物秋季講演会 20p-PA1-1.