

生細胞へのレーザー光照射により生じる光毒性の波長依存性

Wavelength dependence of phototoxicity caused by 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、短波長可視光が生細胞に与える影響について研究してきた。これまでにレーザー光照射後のPCNAの動態を観察することにより、光毒性の照射部位、細胞周期依存性を示してきた¹⁾。今回は、新たに波長 375 nm, 405 nm の 2 波長のレーザー光を照射することができる系を構築し、光毒性の波長依存性を調べた。

2. 実験系

蛍光顕微鏡の光学系を Fig. 1 に示す。励起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。また、側方に配置した半導体レーザー (375 nm, 405 nm) の出力光をダイクロイックミラーにより合波し、LED 照射系に挿入したカバーガラスで反射させ (~3%), 生細胞の特定部位に集光照射した。

3. 実験結果

S 期にある生細胞の細胞核中心に対して、波長 375, 405 nm のレーザー光を 1 分間照射し、その

後 10 分間にわたり EGFP の蛍光画像を 1 分間隔で取得することにより 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。Fig. 2 に強度 3.0 μW でレーザー光を照射した場合の輝度比の変化を示す。両波長とも、時間の経過とともに輝度比は増加し、最大 2 程度で飽和する輝度変化を示しており、レーザー光照射による DNA 損傷は同程度であったと考えられる。レーザー光照射後の細胞の生存率に関しては、当日報告する。

参考文献

[1] 山口等, 第 81 回応物秋季講演会 10p-z28-13.

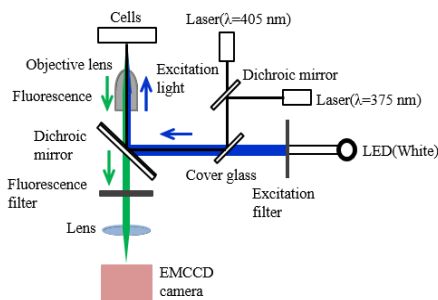


Fig. 1 Configuration of fluorescent microscope

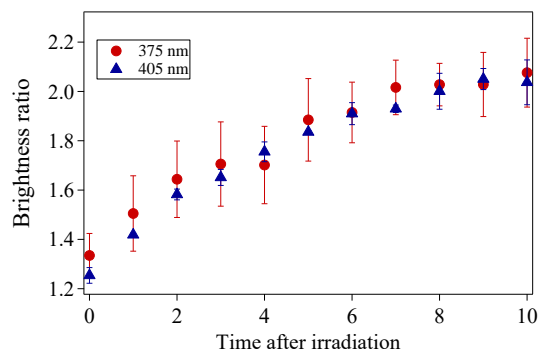


Fig. 2 Brightness ratio after laser irradiation to cell nucleus in S phase