

低出力レーザー照射が神経細胞の 細胞内小器官におよぼす影響 —特に共焦点レーザー顕微鏡による観察—

齋藤 勇

The Influence of Low-Energy Laser Irradiation on the Cytoplasmic Organelles in Nerve Cells —A Study with Confocal Laser Scanning Microscope—

Isamu SAITO

We studied the influence of low-energy laser irradiation on the cytoplasmic organelles in the neurosecretory PC12 cell differentiated by nerve growth factor.

The endoplasmic reticulum, mitochondria, Golgi apparatus and F-actin were labeled by commercial fluorescent probes and investigated by confocal laser scanning microscope.

We showed that fluorescent images of some organelles were altered because of morphological changes after laser irradiations. Many mitochondria were accumulated at one fluorescent globe in the terminal and in the varicosity accompanied with shrinking neurites. F-actin composed of the spinous fillopodia were collapsed and detached from the extracellular matrix after laser irradiations.

On the other hand, fluorescent images of the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum showed no significant changes before/after laser irradiations.

This paper demonstrates that laser irradiation on nerve cells makes morphological and functional changes of the cytoplasmic organelles.

Key words : low-energy laser, organelles, fluorescent probe, confocal laser scanning microscope, PC12 cell

緒 言

低出力レーザーには、消炎作用、治癒促進作用、鎮痛作用などの効果があるとされており¹⁻³⁾、日常臨床に広く応用されているものの、その生物学的根拠については未だ明確な見解が得られていない⁴⁾。

1980年に Plog が鎮痛作用に関する最初の報告⁵⁾をしたが、27年経た現在においても、レーザー照射が神経細胞にどのような直接的変化をもたらすかについて明らかにした研究はほとんどない⁶⁾。

そこで本研究では、培養神経細胞株PC12を用い、低出力レーザー照射前後における細胞内小器官の形態変化について、共焦点レーザー顕微鏡に

よる検索を行った。

材料および方法

1. レーザー装置

レーザー装置は、GaAlAs半導体の近赤外線レーザー (trinpl D, 株式会社ヨシダ) を使用した。本装置の仕様は、最大出力10W, 平均出力2.4mW, 波長905nm, 発振周波数1.2kHz, パルス幅200ns, エネルギー密度1.25J/cm², ビーム直径6mmである。

2. 照射条件と実験群

レーザーの照射条件は、保温装置の中に培養細胞を容器ごと入れ、培養液の液面上にレーザー照射口を近づけ、約5mmの距離から細胞に向けて150秒間連続照射した。

レーザー照射を施さない実験群をレーザー非照射群、レーザー照射を施したものをレーザー照射群とした。

3. 実験材料

実験には、Rat Pheochromocytoma 由来の神経細胞株PC12⁷⁾ (PC12細胞) を用い、直径35mmの Glass Bottom Dish (D110100, 松浪硝子工業株式会社) にコラーゲンコートをし、NGF (NC011, Chemicon International Inc., USA) を50ng/ml加えたDulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO BRL, USA) で2週間培養した細胞を実験に供した。

4. 観察方法

1) 装置

観察装置は、空冷Arレーザー (488nm, 15mW) とGreen He-Neレーザー (543.5nm, 2mW) を備えた共焦点レーザー顕微鏡 (PCM2000, Nikon) を用い、油浸対物レンズ (60x/1.40 Oil) で観察

した。生細胞の観察は、顕微鏡用保温装置とCO₂培養チャンパー (株式会社三啓) およびサーモプレート (東海ヒット) にて、温度と湿度を一定 (37±0.3°C, CO₂ 5%) に保ちながら行った。

2) 蛍光指示薬と検出

ミトコンドリアの検出には、蛍光指示薬として200nM MitoTracker™ Green FMを培養液に添加して30分間反応させた後、レーザーを照射し、共焦点レーザー顕微鏡下で経時的に観察を行った。

小胞体の検出には、レーザー照射の後、30分、60分に0.25%グルタルアルデヒド (0.1M PBS, pH7.4) で5分間固定し、DiOC₅(3) (2.5 μg/ml, 0.1M PBS, pH7.4) に30分間室温で反応させ、0.1M PBSで洗浄した後観察した。

F-Actinの検出には、レーザー照射後、3.2%パラホルムアルデヒド (0.1M PBS, pH7.1) で10分間固定して、0.1%Triton-Xで10分間処理し、BODIPY® 558/568 phalloidin (33nM, 0.1M PBS, pH7.1) に30~90分間室温で反応させ、0.1M PBSで洗浄した後観察した。

Golgi装置の検出には、レーザー照射後60分にHanks' Buffered Salt Solutionと10mM HEPES (pH7.4) で調整された溶液で洗浄して、BODIPY® FL ceramide (5 μM, pH7.4) に30分間4°Cで反応させた後、2.1%グルタルアルデヒド (0.1M PBS, pH7.4) で10分間固定し、観察した。

全ての蛍光指示薬はMolecular Probes, Inc. (USA) の製品を使用した (表1)。

3) 画像取得と解析ソフトウェア

蛍光画像は、PCM2000標準ソフトウェアSimple 32 (C-Imaging, Canada) を使用して、デジタル画像 (1,024 x 1,024 pixel, 8 bit) として取得

表1 実験に使用した蛍光指示薬一覧

Organelles	Cat#	Product Name	Unit Size
ER	D-272	3,3'-dipentylloxacarbocyanine iodide (DiOC ₅ (3))	100 mg
F-Actin	B-3475	BODIPY® 558/568 phalloidin	300 U
Golgi	D-3521	BODIPY® FL ceramide	250 μg
Mitochondria	M-7514	MitoTracker™ Green FM "special packaging"	20×50 μg

した。

画像の解析には、National Institute of Health (USA) のソフトウェア Image J あるいは NIH Image を使用した。

結 果

1. ミトコンドリア

1) レーザー非照射群

NGFを添加して分化させたPC12細胞において、共焦点レーザー顕微鏡によるミトコンドリア像は、短桿状あるいは球状を呈する明るい蛍光像として観察され、細胞体内部においては、ほぼ均一に分布しているのが認められた(図1-a, b)。また、長く伸張した神経突起の内部にも、ところどころに明るい蛍光像が点在していたが、とくに、突起先端の平たく伸展した終末部とVaricosityとよばれる神経突起のやや太くなった部分には、多くのミトコンドリア像が観察された(図1-a, b, c, 矢印)。

2) レーザー照射群

レーザー照射60分後において、神経突起の終末部がやや丸く腫大したように変化した部位では、中心部にミトコンドリアの集積している像が認められた(図2-a, b, 矢印)。神経突起先端部が退縮して短くなった部位では、ミトコンドリアの集積が著しく、丸い塊の明るい蛍光像として観察された(図1-c, d, 矢印)。

レーザー照射直後より、顕微鏡下で連続的に像の変化を観察したものでは、神経突起が退縮して細胞体に吸収されるのに伴い、ミトコンドリアを示す短桿状の蛍光像が一塊の固まりとなり、細胞体内部に吸収される像が観察された(図3, 矢印)。

細胞体内部に存在していたミトコンドリア像には、非照射群と比較して明瞭な差異は認められなかった。

2. Golgi装置

1) レーザー非照射群

Golgi装置は、細胞体内に黒く丸く抜けてみえる核の一側に、くの字状の凹みをもった数個の明るい蛍光像の集団として観察された。一方、神経突起内部や終末部にGolgi装置を示す蛍光像は認められなかった(図4-a, b)。

2) レーザー照射群

レーザー照射60分後において、Golgi装置を示す蛍光像は、やや輪郭が不明瞭となり、その分布が拡大する傾向が認められた。しかし、その他には非照射群と比較して顕著な差異を認めることはできなかった(図4-c, d)。

3. 小胞体

1) レーザー非照射群

小胞体は、細管状の構造物が連続した網目状を呈したものと小球状の蛍光像として、核周囲のGolgi野を除く細胞体内部のほぼ全域にわたって密に観察されたが、細胞辺縁部では疎であり、神経突起の起始部の方向に屈曲しながら伸びている像が認められた。神経突起のVaricosityや終末部には、球状ないし短桿状のわずかな蛍光像が観察された(図5-a, b)。

2) レーザー照射群

レーザー照射後30分、60分ともに、小胞体を示す蛍光がやや強まる傾向が認められるものの、細管が連なった網目構造に変化は認められなかった。また、腫大したようにみえる終末部においても、小胞体の構造に著変は認められなかった(図5-c, d)。

4. F-Actin

1) レーザー非照射群

F-Actinを示す蛍光は、細胞体から伸びる細かな糸状突起、神経突起の外周部および終末部から伸びる突起に一致しており、その蛍光像は、あたかも指を広げた様子あるいはササの葉状を呈していた(図6, 矢印)。

2) レーザー照射群

レーザー照射後、神経突起の退縮や終末部の腫大に伴い、指状あるいはササの葉状に広がっていた突起が一塊となり、明るい蛍光を発する像が観察された(図7, 矢印)。

考 察

NGFを添加して分化させたPC12細胞に低出力レーザーを照射すると、長く伸びた神経突起終末部の腫大や明調化、および神経分泌顆粒の減少が惹起され、その後、神経突起の退縮、細胞体部の粗面小胞体およびゴルジ装置の形態に変化が生じ

ることが報告されている⁹⁾。

本研究では、ミトコンドリア、小胞体、Golgi装置、F-Actinなどの細胞内小器官を市販の蛍光指示薬でラベルし、レーザー照射前と照射後の形態的变化を高解像度の共焦点レーザー顕微鏡で検索した。その結果、レーザー照射前後で細胞体部に存在していたミトコンドリアに大きな変化は認められないものの、レーザー照射後に神経突起先端の終末部やVaricosityに分布していたミトコンドリアの集積が生じ、非常に明るい蛍光を発するようになった。これは、短桿状の形態が崩壊して一塊のものに変化したためではなく、多数のミトコンドリアが狭い空間に押し込められ集積した結果、生じたものと考えられる。透過電子顕微鏡による観察ではレーザー照射後にミトコンドリアの腫大やクリステの消失などがあり⁹⁾、生化学的検索ではミトコンドリアのRNA合成やタンパク合成が亢進されるとの報告^{8,9)}もなされているが、今回の手法でミトコンドリア内部の微細構造および機能変化までは明らかにできなかった。しかしながら、顕微鏡下でレーザー照射後の変化を経時的に観察した実験において、神経突起が退縮して細胞体内部に吸収される際、突起内部に分布していたミトコンドリアは一塊にまとめられて、細胞体内部に吸収されることが明らかとなり、必ずしもミトコンドリアが崩壊・消滅するわけではないことが証明された。

細胞の運動や接着、あるいは物質輸送に重要な役割を担うとされているF-Actinについては、レーザー照射後に神経突起の終末部が腫大した際に、指状あるいはササの葉状に広がっていた糸状突起の構造が崩れ、あたかも広げていた指を閉じるように一塊の固まりとなることが明らかになった。すなわち、神経突起の退縮と関連して、神経突起と細胞外マトリックスとの接着が壊れていることが示唆される^{10,11)}。

神経分泌顆粒の形成やタンパク合成に不可欠な小胞体およびGolgi装置については、レーザー照射前後で大きな形態的变化は認められないものの、レーザー照射後にGolgi装置の輪郭がやや不明瞭となり、分布がやや拡大する傾向にあったことや、小胞体の蛍光がやや強まる傾向が認められた。こ

れらのことは、透過電子顕微鏡での観察でGolgi槽の拡張や小胞化があるとされていることと関連するものと推測される。

今後さらに、低出力レーザーの神経細胞におよぼす影響を明らかにするためには、神経突起の骨格を形成する神経細管や神経線維の動態も検索する必要があると考える。

結 論

NGFを添加して分化させたPC12細胞の細胞内小器官におよぼす低出力レーザー照射の影響について、共焦点レーザー顕微鏡による形態的検索を行い、以下の結論を得た。

1. レーザー照射により終末部の腫大と神経突起の退縮が生じる際、糸状突起を形成するF-Actinの崩壊が起きるとともに、神経突起終末部やVaricosity内に分布するミトコンドリアや小胞体は、すべて一塊となって細胞体内部に吸収されることが明らかとなった。

2. レーザー照射によりGolgi装置の輪郭がやや不明瞭となり、分布がやや拡大する傾向や、小胞体の蛍光がやや強まる傾向が認められた。

3. 共焦点レーザー顕微鏡と市販の蛍光指示薬を用いて細胞内小器官の内部構造まで観察することは困難であるが、細胞の動態を捉えることは十分可能であり、本検索方法の有用性が確かめられた。

文 献

- 1) 三浦祐士：歯科用レーザーの臨床 臨床基礎編。初版；1-244 歯界展望 医歯薬出版 東京 1994.
- 2) 葛西真一，山本康弘，小谷裕美，安藤修敏ほか：損傷・潰瘍の治療。日本レーザー医学会誌 **18**；27-34 1997.
- 3) 目澤修二：低出力レーザーの鎮痛効果および骨組織形成促進効果に関する研究。日本レーザー医学会誌 **17**；43-50 1996.
- 4) 山本茂久，齋藤 勇，中川敏浩：培養細胞に及ぼすソフトレーザーの生物学的作用。口腔組織培養会誌 **8**；1-11 1999.
- 5) Plog, F. M. W. : Biological application of the laser beam. Laser in medicine. (Ed, Koebner, H. K.) ; 21-37 John Wileys & Sons Chichester New York-Brisbane-Toront 1980.

- 6) 齋藤 勇：神経細胞株PC12に対する低出力レーザーの影響. 奥羽大歯学誌 **26** ; 67-88 1999.
- 7) Greene, L. A. and Tischler, A. S. : Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci USA **73** ; 2424-2428 1976.
- 8) Greco, M., Guida, G., Perlino, E., Marra, E. *et al.* : Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. Biochem Biophys Res Commun **163** ; 1428-1434 1989.
- 9) Vacca, R. A., Marra, E., Quagliariello, E. and Greco, M. : Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne laser irradiation. Biochem Biophys Res Commun **195** ; 704-709 1993.
- 10) 白井龍一：ヒト歯肉上皮細胞の細胞接着および細胞骨格におよぼすソフトレーザーの影響. 奥羽大歯学誌 **29** ; 221-233 2002.
- 11) 土肥宏樹, 齋藤 勇, 月田秀夫, 西上堅二ほか：培養ヒト線維芽細胞の細胞接着におよぼす低出力レーザーの効果. 奥羽大歯学誌 **29** ; 285-291 2002.

著者への連絡先：齋藤 勇, (〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座
Reprint requests : Isamu SAITO, Department of Oral Medical Science, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama 963-8611, Japan

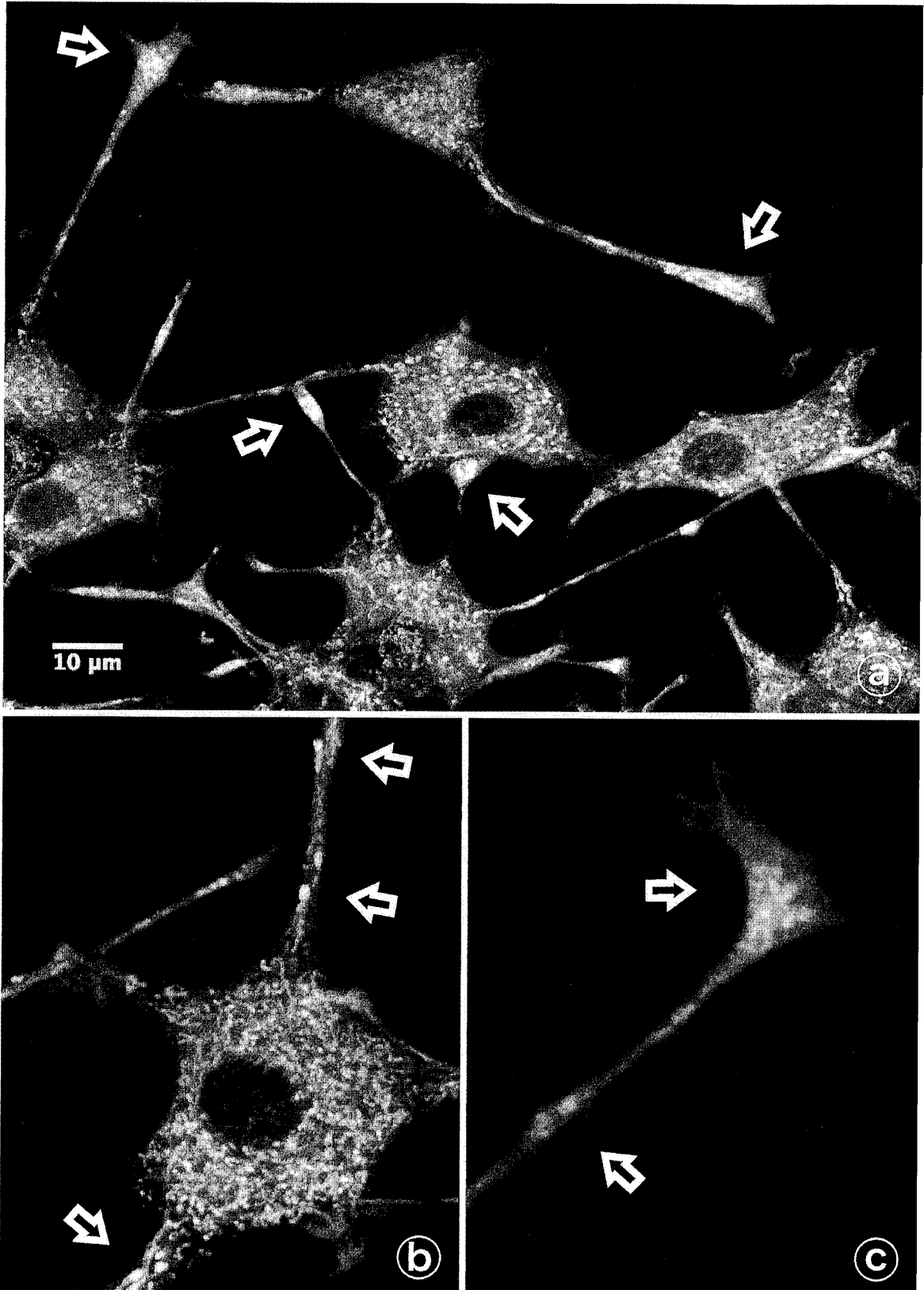


図1 ミトコンドリアの蛍光像：レーザー非照射群

- a：細胞体内部や神経突起の終末部（矢印）に短桿状の蛍光像がみられる。
 b：神経突起起始部や突起内部（矢印）に短桿状の蛍光像がみられる。
 c：神経突起の終末部（矢印）に短桿状の蛍光像がみられる。

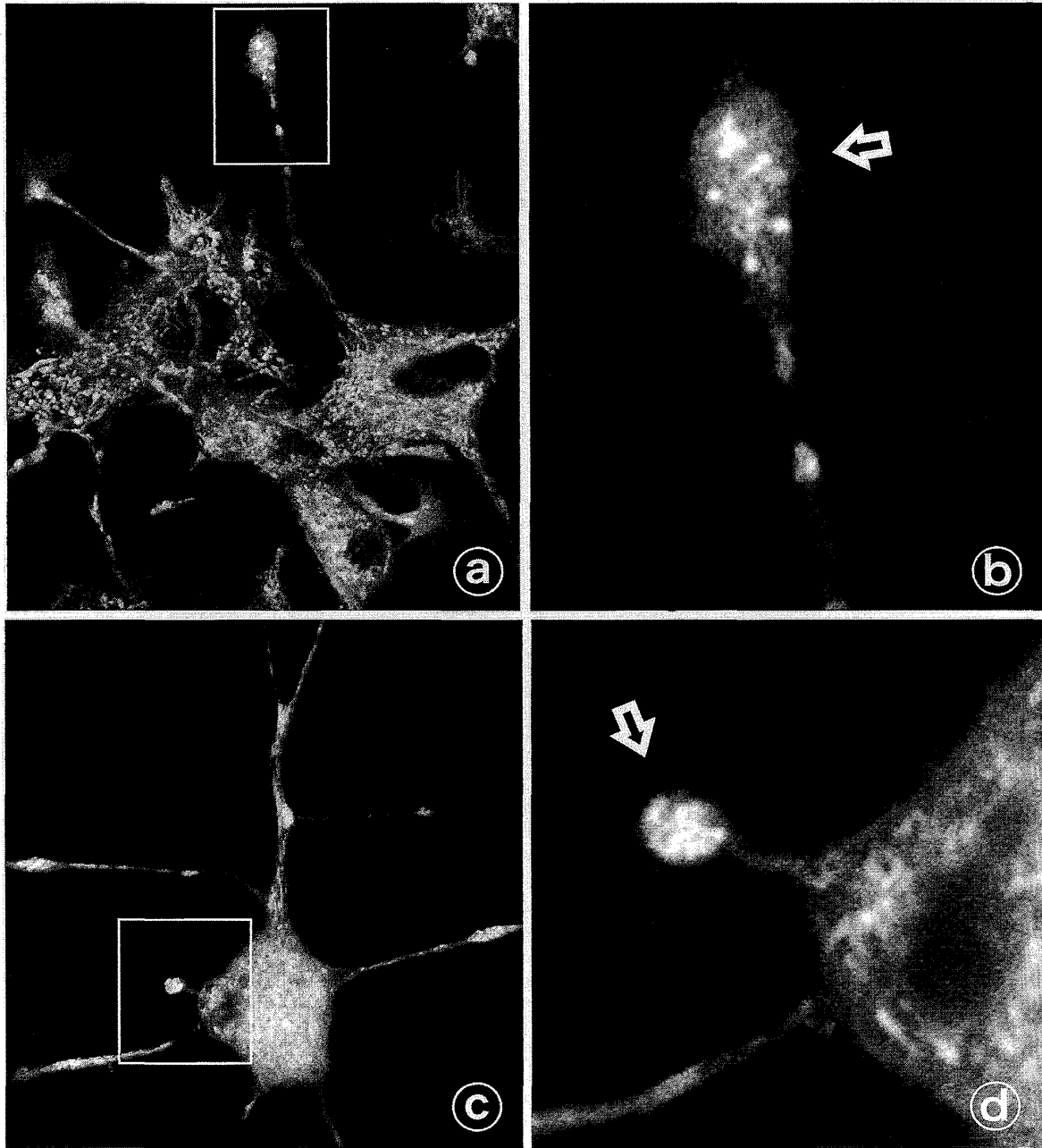


図2 ミトコンドリアの蛍光像：レーザー照射群

a：レーザー照射後，終末部が腫大している。

b：aの四角で囲んだ部の拡大像。腫大した突起内部にやや固まりとなった蛍光像（矢印）がみられる。

c：レーザー照射後，著しく神経突起が退縮している。

d：cの四角で囲んだ部の拡大像。一塊となった蛍光像（矢印）がみられる。

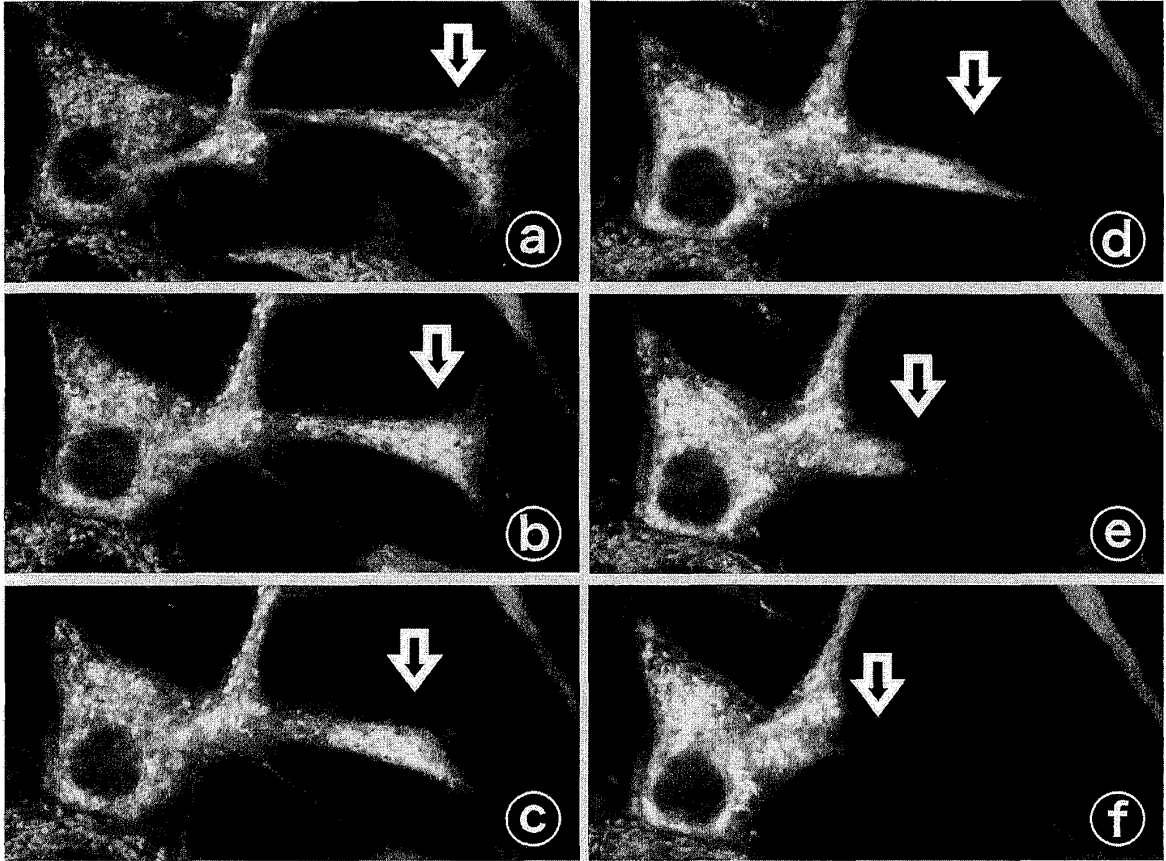


図3 退縮する神経突起の経時的変化：レーザー照射群

神経突起（矢印）が退縮して細胞体に吸収されるのに伴い，短棒状の蛍光像が一塊の固まりとなり，細胞体内部に吸収される。

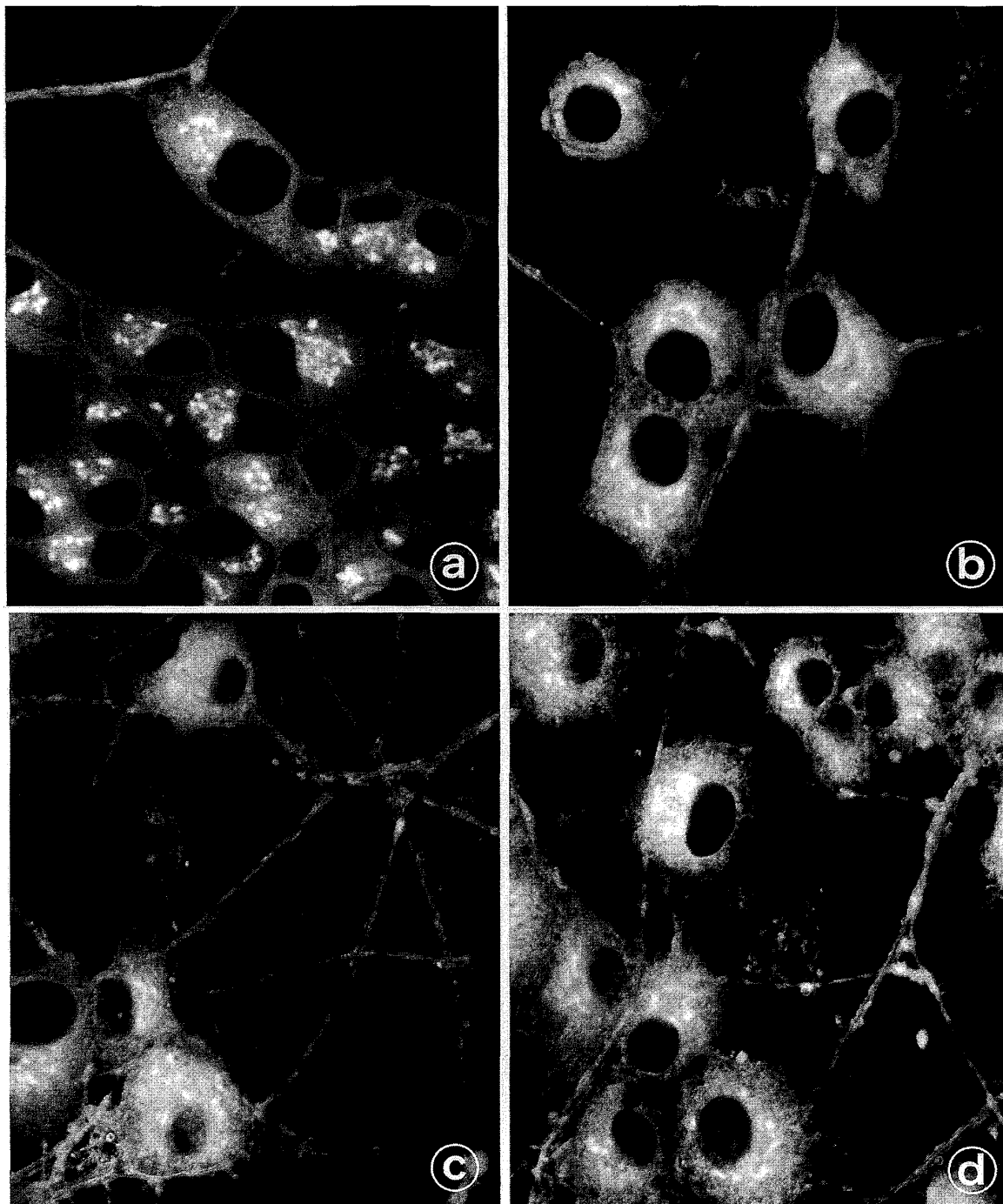


図4 Golgi装置の蛍光像

a,b: 細胞体内の黒く丸く抜けてみえる核の一侧に、くの字状の凹みをもった数個の明るい蛍光像が固まってみられる (レーザー非照射群)。

c,d: 像の輪郭がやや不鮮明となり分布が拡大する傾向がある (レーザー照射群)。

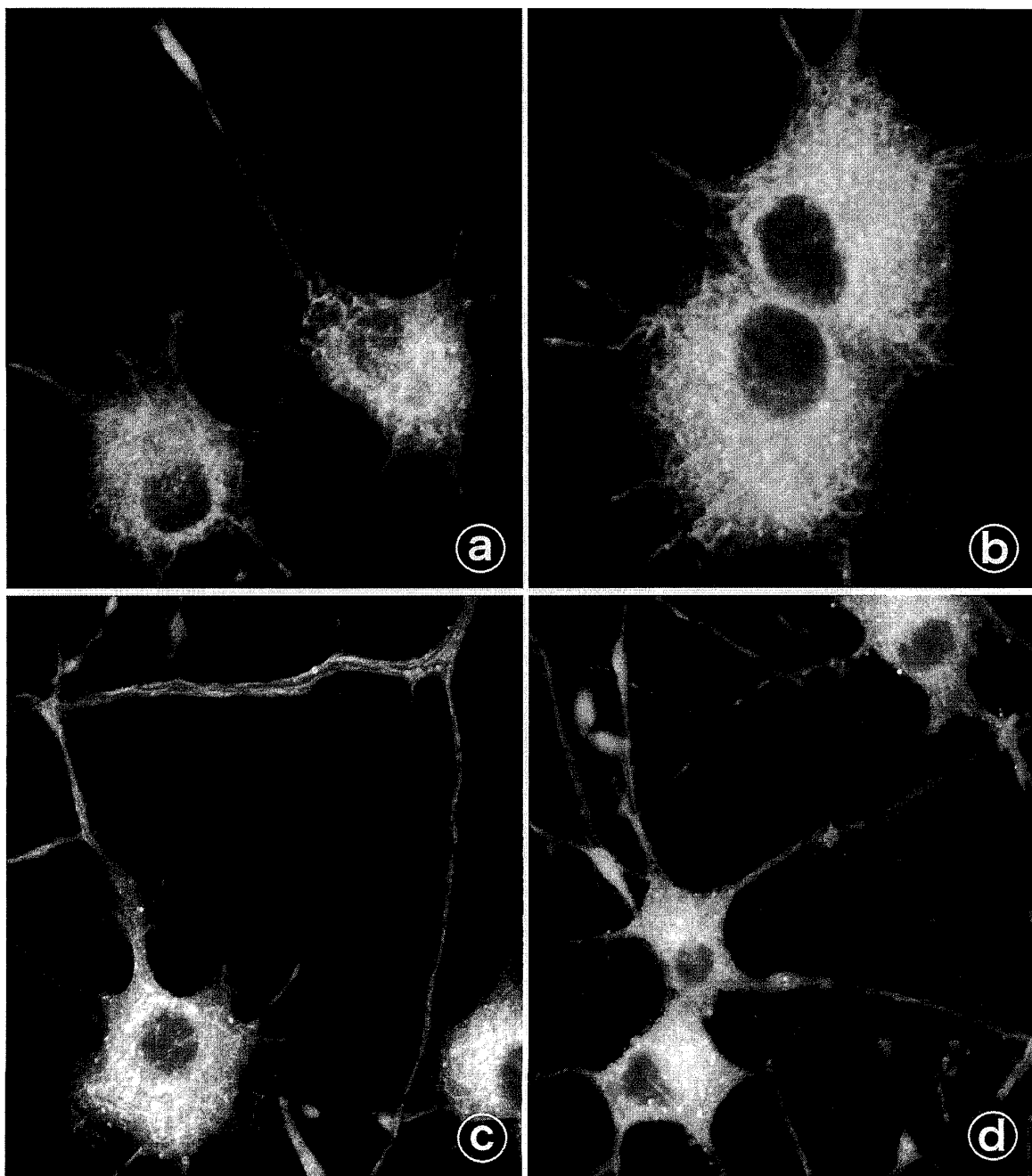


図5 小胞体の蛍光像

a,b: 細胞体と終末部内に細管状ないし網目状の蛍光像がみられる (レーザー非照射群)。
c,d: 蛍光が若干強まる傾向がみられる (レーザー照射群)。

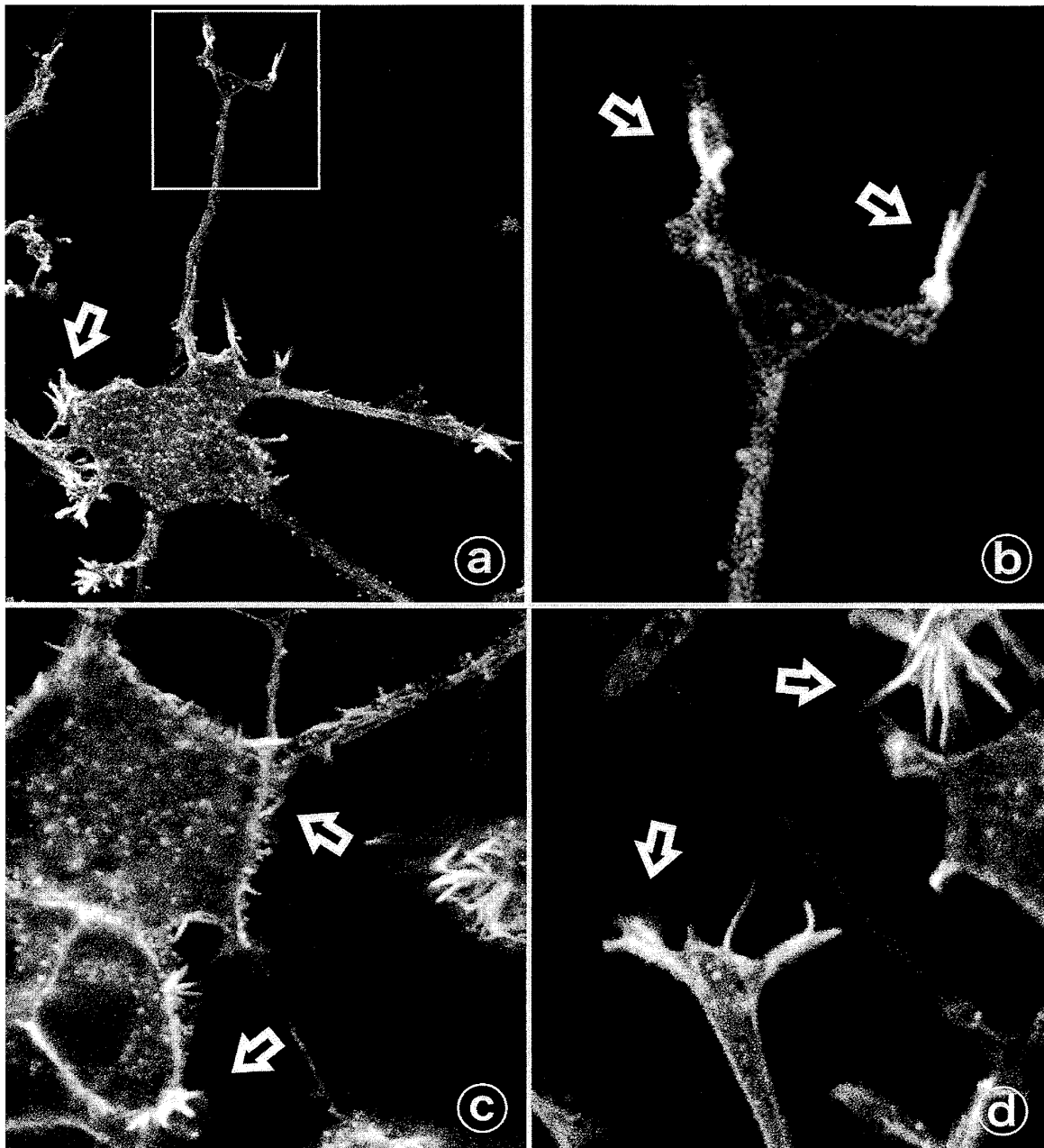


図6 F-Actinの蛍光像：レーザー非照射群

- a：細胞や神経突起から伸びる糸状突起（矢印）に一致して蛍光が観察される。
 b：aの四角で囲んだ部の拡大像。終末部から伸びる糸状突起（矢印）に蛍光がみられる。
 c：細胞体から伸びる糸状突起（矢印）に一致して蛍光が観察される。
 d：神経突起の先端部や細胞体から伸びる糸状突起（矢印）に蛍光がみられる。

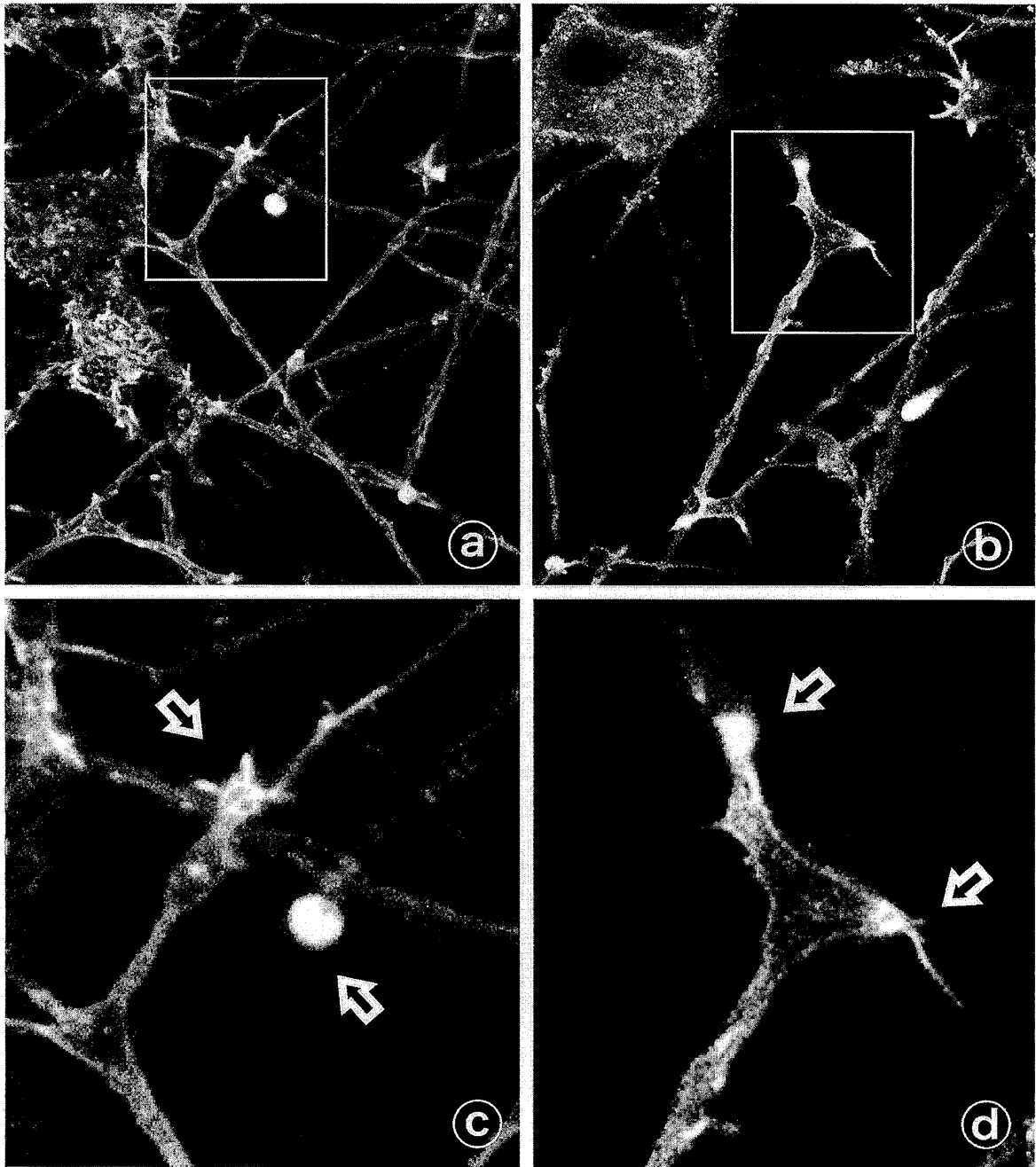


図7 F-Actinの蛍光像：レーザー照射群

a：レーザー照射後，終末部が腫大している。

b：終末部先端にやや固まりとなった蛍光像（矢印）がみられる。

c：aの四角で囲んだ部の拡大像。腫大した突起内部に一塊となった蛍光像（矢印）がみられる。

d：bの四角で囲んだ部の拡大像。突起先端は固まりとなった蛍光像（矢印）がみられる。