

HeLa 細胞における微粒子取込量に対する粒子表面特性の影響

Effect of particle surface properties to the cellular uptake of the microparticles

明大理工, °芦澤 拓也, 隈部 拓矢, 加藤 徳剛

Meiji Univ., °Takuya Ashizawa, Takuya Kumabe, Noritaka Kato

E-mail: nkato@isc.meiji.ac.jp

1. 背景・目的: マイクロサイズの微粒子をキャリアに用いた薬物送達システムにおいて、キャリア粒子をいかに効率よく細胞の内部へ取り込ませるかが重要となる。粒子表面の性質と粒径の違いが細胞内への粒子の取込量に影響を及ぼすことが、報告されている^{1,2)}。我々は高分子電解質を吸着させ、表面電荷を調節した微粒子の HeLa 細胞への取込量を、非線形光学顕微鏡で評価している。これまで表面電荷が正の粒子の方が、負の粒子よりも多く細胞内に取り込まれることが分かった³⁾。そこで今回は微粒子表面にコートさせる高分子電解質の種類の違いや、表面電位の強弱による取込量の違いについて評価することを目的とした。

2. 実験方法: HeLa 細胞は Eagle's MEM 培地によって培養した。粒径が 0.2 μ m と 1.0 μ m の蛍光ポリスチレン微粒子にポリカチオンである Poly(ethyleneimine)(PEI)、または Poly-L-Lysine (PLL) を吸着させた。細胞培養後、培地をハンクス平衡塩に取り換え、等しい数密度の微粒子を加え 1、2、または 4 時間インキュベートした。その後、細胞膜を n-(4-sulfobutyl)-4-(6-(4-(dibutylamino)phenyl) hexatrienyl) pyridinium (RH237)によって染色した。RH237 は永久双極子モーメントを細胞膜に対して垂直に向けるように配向・吸着し、細胞膜を光第二高調波発生(SHG)活性にする³⁾。波長 850nm のフェムト秒パルスレーザーを励起光源とし、細胞膜は SHG 像、蛍光微粒子は二光子励起蛍光(TPF)像で同時観察した。

3. 実験結果: Fig.1 に PLL 被覆後の粒径 0.2 μ m の微粒子を 2 時間インキュベートした後の画像を示した。細胞膜の SHG 像 (紫) と微粒子の TPF 像 (緑) を重ね合わせた。インキュベート時間に対する細胞内の微粒子の積算蛍光強度の違いを Fig.2 に示す。両被覆微粒子の表面電位は共に約 28mV であるにも関わらず、PLL 被覆粒子の方が、PEI 被覆粒子に比べ速く細胞内に取り込まれた。従って、粒子表面の化学種の違いが取込量に大きな影響を与えることが分かった。一方、インキュベーションが 2 時間を超えると両被覆微粒子共に取込量が減少し、細胞外に排出された粒子が細胞内に取り込まれる粒子よりも多くなっていることが分かった。さらに表面電荷の強弱や粒径に対する取込量の違いを観察し、粒子表面特性や粒径の違いと、複数あるエンドサイトーシスの機構との関連性について検討する。

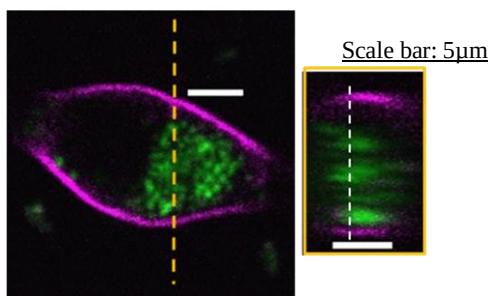


Fig.1 Images of living HeLa cell after the 2-h incubation. The membrane (purple) and the fluorescent particles (green). (a) Transverse section image. (b) Longitudinal section image along the orange line shown in Fig.1a.

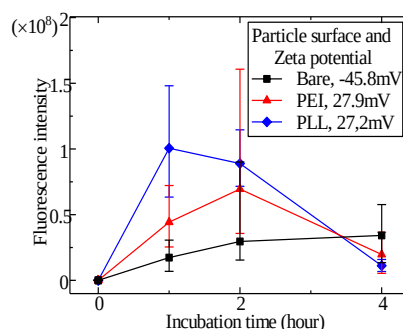


Fig.2 Uptake amount of the particles (0.2 μ m). Due to the limitation of the resolution, the uptake amounts were qualitatively evaluated by comparing the integration of the fluorescence intensity of the particles observed inside the cell. Each plot was obtained by averaging over 20 cells.

1) J. Dausend, et al, *Macromol. Biosci.* 8 (2008) 1135.

2) J. Rejman, et al, *Biochem* 377 (2004) 159.

3) 芦澤拓也、加藤徳剛、2012 年第 59 回応用物理学関係連合講演会 16p-F1-9.