

フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した細胞への分子導入における複数パルス照射効果

Effect of Multiple Pulse Irradiation on Molecular Delivery to Target Cells Using Femtosecond Laser Impulse

奈良先端大物質, °田中幸宏, 山田壮平, 岡野和宣, 安國良平, 細川陽一郎

Div. Mat. Sci. NAIST, °Yukihiro Tanaka, Sohei Yamada, Kazunori Okano, Ryohei Yasukuni

Yoichiroh Hosokawa

E-mail: tanaka.yukihiro.tr1@ms.naist.jp

パルスレーザーを細胞膜に集光して一時的な小孔を形成する細胞のフォトポレーションは、高い空間選択性を有した細胞組織への分子導入法として、単一細胞レベルでの機能操作への応用が期待されている。しかしながら細胞へ直接レーザーを照射する場合、レーザー集光点で発生した活性酸素種による損傷や、光照射自体が細胞機能へ与える影響が懸念される。我々はこれまでに水中に集光したフェムト秒レーザーパルスが誘起する衝撃力を利用した細胞への分子導入を提案しており、細胞膜へ作用した衝撃により蛍光性の低分子を細胞へ導入することに成功している。本研究では、衝撃力を誘導するレーザーのパルス数や周波数が、導入される蛍光分子の導入効率に与える影響を報告する。

細胞試料としてマウスの筋芽細胞 (C2C12) をガラスボトムディッシュに培養し、導入する分子として蛍光性の低分子である FM1-43 を培養液に添加した。FM1-43 は通常は細胞透過性がなく、細胞外膜の脂質と結合して蛍光を発するが、細胞質に導入されると細胞の内側の脂質膜と結合し、細胞内部の蛍光強度が増加する。試料を顕微鏡下に配置し、フェムト秒レーザー(130fs, 800nm)を 20 倍の対物レンズ(NA = 0.46)を用いて細胞近傍の培養液中に集光照射し、細胞へ衝撃力を作用させた。レーザー集光点で発生するキャビテーションバブルと、その細胞への作用は高速度カメラによって撮影した。また細胞内の蛍光強度変化は sCMOS カメラにより撮影した蛍光画像から取得した。蛍光励起には、CW-DPSS レーザー (488nm, 0.02mW) を用いた。

パルス間隔 4 ms で 2 パルス照射して FM1-43 を導入した場合、1 パルスと比較して導入効率の平均値が約 2 倍に増加した (Fig.1)。これは細胞膜の修復前に次の衝撃を作用させることで形成する小孔のサイズが増加するためと考えられる。また、パルス間隔 10 s でパルス照射し続けると、膜修復が阻害されることで分子導入量が上昇した。発表では、より大きな高分子の導入結果及び、細胞内の活性酸素種濃度から評価した本分子導入法における細胞へのダメージを合わせて報告する。

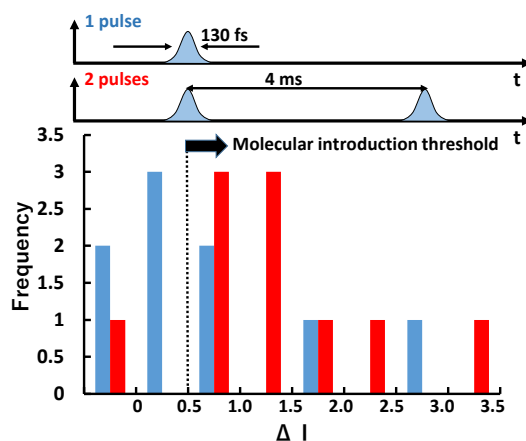


Fig. 1. Histograms of differential fluorescence intensity (ΔI) inside cells between before and after application of femtosecond laser impulse. When 2 laser pulses was applied for the introduction, ΔI was shifted to larger values.