

フェムト秒レーザー誘起衝撃力とマイクロパターンを用いた 細胞接着強度の評価手法

Evaluation method of cell adhesion strength using femtosecond laser induced impulsive force and micro-pattern

奈良先端大物質, °間瀬亮太, 伊藤賢四郎, 山田壮平, 岡野和宣, 安國良平, 細川陽一郎

Div. Mat. Sci. NAIST, °Ryota Mase, Kenshiro Ito, Sohei Yamada,

Kazunori Okano, Ryohei Yasukuni, Yoichiro Hosokawa

E-mail:mase.ryota.ml7@ms.naist.jp

細胞接着とは、細胞—細胞間、細胞—細胞外マトリックス間の接着を示し、多細胞生物の細胞増殖、分化、死などの細胞機能に重要な役割を果たす。細胞接着は、接着強度により細胞機能へ影響をもたらすとされている。そのため、細胞機能と細胞の接着強度の関係性を正確に評価することで細胞接着の理解を得ることができると考えられる。当研究室では、高強度のフェムト秒レーザーを水溶液中に集光照射した際に発生する衝撃力（フェムト秒レーザー誘起衝撃力）による細胞の剥離の様子を高感度に観察できる反射干渉顕微鏡（RICM）を用いて、剥離までのレーザーの照射回数から細胞の接着強度を評価する手法を確立している。しかし、細胞の接着領域が広範囲、狭範囲のときで、その剥離挙動に差があり、細胞の接着強度を正確に評価することが難しい。接着強度を正確に評価するためには、細胞の接着領域を均一にする必要がある。そこで、本研究では、細胞非接着性の MPC ポリマー(MPC:poly-2-methacryloyloxy-ethyl phosphoryl choline)を化学固定したガラス基板表面に、フェムト秒レーザー加工を施し、細胞が基板上に同一形状で接着できるマイクロパターンの作製をした。本実験では、このマイクロパターン上に細胞を培養し、フェムト秒レーザー誘起衝撃力による細胞の剥離挙動を RICM により観察し、細胞の接着領域と接着強度の関係について調べた。

マイクロパターン作製のためガラス基板に MPC ポリマーを塗布した。この基板上にフェムト秒レーザーパルス（150 fs, 800 nm, 5 kHz, 200 nJ /pulse）を 20 倍対物レンズ(NA:0.46)で集光スキャンし、MPC ポリマーを円形(d=10, 15, 20, 30 μm)に除去した。このマイクロパターン基板上に、人由来の肺がん細胞 A549 を播種した。次に、単発のフェムト秒レーザーパルス（130 fs, 800 nm, 32Hz, 100 nJ）を 100 倍対物レンズ(NA:1.25)で、細胞の 20 μm 離れたところに集光し、レーザー集光点で生じるキャビテーションバブル発生に伴う衝撃波、応力波を細胞に衝撃力として作用させた。

マイクロパターンの直径が 15 μm 以下のとき、細胞はパターンの全領域に接着し、RICM では、その領域が黒いパターンとして観察される。この細胞の側面方向から、単発のフェムト秒レーザーパルスを断続的に照射すると、照射された方向から細胞に衝撃力が作用して、細胞は剥離し、RICM では黒いパターンの減少が、接着領域の減少として観察された。Fig.2 に細胞の接着が剥離するまでのレーザーパルスの照射回数を示す。マイクロパターン上の細胞が剥離に要するパルス照射回数の平均は 10 μm で、 5 ± 0.89 (A) 回、15 μm で、 5 ± 1.26 (B) 回であった。一方で、マイクロパターンのない細胞が自由に接着できる基板では、細胞剥離に要するパルス照射回数は大きくばらつき、 5.5 ± 3.62 (C) 回であった。このばらつきは、細胞ごとの接着領域の違いを大きく反映していると考えられるが、同一サイズ内でのマイクロパターン上での接着強度のばらつきは、細胞と基板間の接着強度の差に強く依存していると考えられる。この様にマイクロパターンを併用した本手法を用いることにより、細胞の接着強度を接着領域の依存性として評価することができる。発表ではマイクロパターンの大きさ、形状や表面状態などを検討し、細胞の接着強度を評価した結果についても示す。

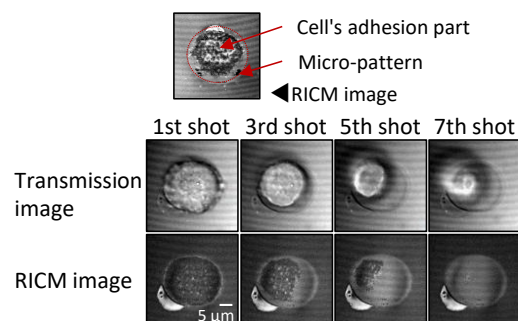


Fig. 1 Cell detachment by the femtosecond laser-induced impulsive force on a circular micro-pattern. The shot-to-shot dependence was observed by transmission and RICM imaging. The single shot laser pulses were focused 20 μm away from right direction of the cell.

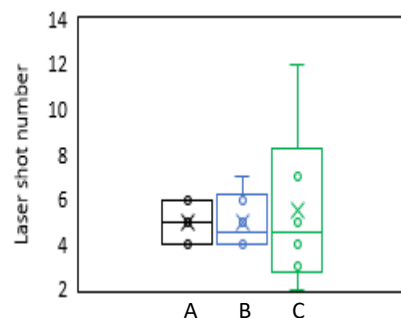


Fig. 2 Number of laser pulses required to detach cell on circular micro-pattern with diameter of 10 (A) and 15 (B) μm . (C) is for cells adhered on a glass substrate without pattern. N=6.