

## 集光フェムト秒レーザー誘起衝撃波による 単一生細胞内への微粒子導入

(阪大院工<sup>1</sup>, 科学技術振興機構<sup>2</sup>, 京大再生研<sup>3</sup>)

山口 敦<sup>1</sup>, 細川 陽一郎<sup>1,2</sup>, 朝日 剛<sup>1</sup>, 開 祐司<sup>2,3</sup>, 増原 宏<sup>1,2</sup>

### 1. 緒言

我々は、高出力フェムト秒レーザーを溶液中に集光したときの非線形光学現象に着目し、細胞レーザー操作など新しい方法論を提案している[1]。本研究では、集光したフェムト秒レーザーにより発生した衝撃波を利用し、細胞外物質を単一生細胞内に導入する新規手法の開発を試みた。

### 2. 実験

本研究で用いた実験装置の概略図を Fig. 1 に示す。フェムト秒チタンサファイアレーザー(800 nm, 120 fs, Spectra Physics 社製, Hurricane)を共焦点顕微鏡(オリンパス社製, FV-300, IX-71)に導入し、100 倍対物レンズ(オリンパス社製, Plan, N.A. = 1.25)により集光した。レーザー強度は N.D. フィルターにより調整した。サンプルとして、ガラスボトムディッシュ(松浪硝子工業(株)社製)に接着したマウス繊維芽細胞(NIH 3T3)を用いた。このディッシュには培養液が満たされているが、これにポリスチレン蛍光ビーズ(Molecular Probe 社製, F8811, 505/515, 200 nm)を注入し、約 10 分静置した後培養液で 3 回洗った。このとき蛍光ビーズは細胞膜に付着している。その後、細胞から 20  $\mu\text{m}$  離れた位置の培養液中にフェムト秒レーザーを集光し、衝撃波を発生させた。細胞膜の位置を特定するため、スチリル色素(Molecular Probe 社製, N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino)styryl) pyridinium dibromide)で細胞膜染色を行った。蛍光ビーズ及びスチリル色素の励起用レーザーとして、半導体励起ブルーレーザー( $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$ )を用いた。コンフォーカル・アパーチャ(150  $\mu\text{m}$ )を通過した蛍光について 570 nm 以下及び以上の蛍光に分けて 2 波長蛍光イメージングを行うことで、蛍光ビーズ由来の蛍光と、細胞膜を染色しているスチリル色素由来の蛍光を区別した。

### 3. 結果及び考察

まず、細胞から 20  $\mu\text{m}$  離れた位置の培養液中にフェムト秒レーザー(800 nm, 120 fs, 10 nJ/pulse)を単発照射すると、透過像により細胞が少し縮むことが観測された。このことより、この程度の強度で培養液中で衝撃波が発生し、細胞膜が影響を受けることが分かった。パルス強度が強すぎると細胞は吹き飛んでしまい、弱すぎると変化が観測されなかった。次に、この強度でフェムト秒レーザーパルスを 20 発照射した後の共焦点蛍光分光像を Fig. 2 に示す。このとき蛍光ビーズは、レーザー照射位置に比較的近い細胞膜に近い細胞内に存在することが明らかとなった。蛍光ビーズ

を細胞内に導入できる確率は約 5 % 程度である。これはレーザー照射前の細胞の形や、蛍光ビーズの付着している位置に依存しているものと思われる。

比較のため、蛍光ビーズを混入した培養液中で 24 時間細胞を培養したときの細胞内への取り込みを調べた。このとき 200 nm の蛍光ビーズは細胞内に取り込まれ、細胞核のまわりに集まることが分かった。これはエンドサイトーシスによるものと思われる。この場合には、取り込みにはある程度の時間を要し、また、培養液中の多数の細胞に蛍光ビーズが導入されることになる。一方、我々の提案する集光フェムト秒レーザー誘起衝撃波を用いた微粒子導入法では、短時間でかつ、特定の細胞に対して、ある一方向から微粒子を導入することができる。

#### 4. 参考文献

[1] Y. Hosokawa et al., *Appl. Phys. A*, **79**, 795-798 (2004).

Fig. 1. Schematic diagram of a confocal microscopy system incorporating a femtosecond laser for nanosphere injection into single cells.

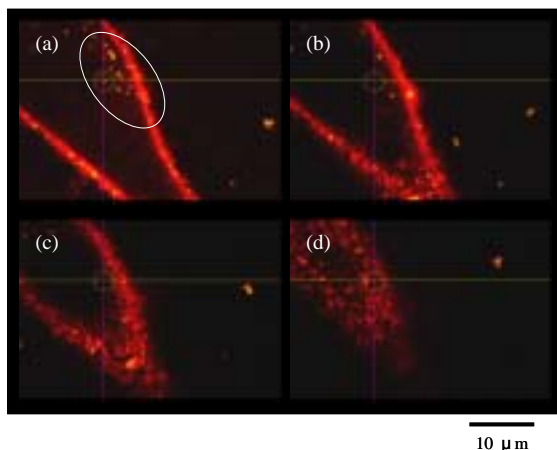
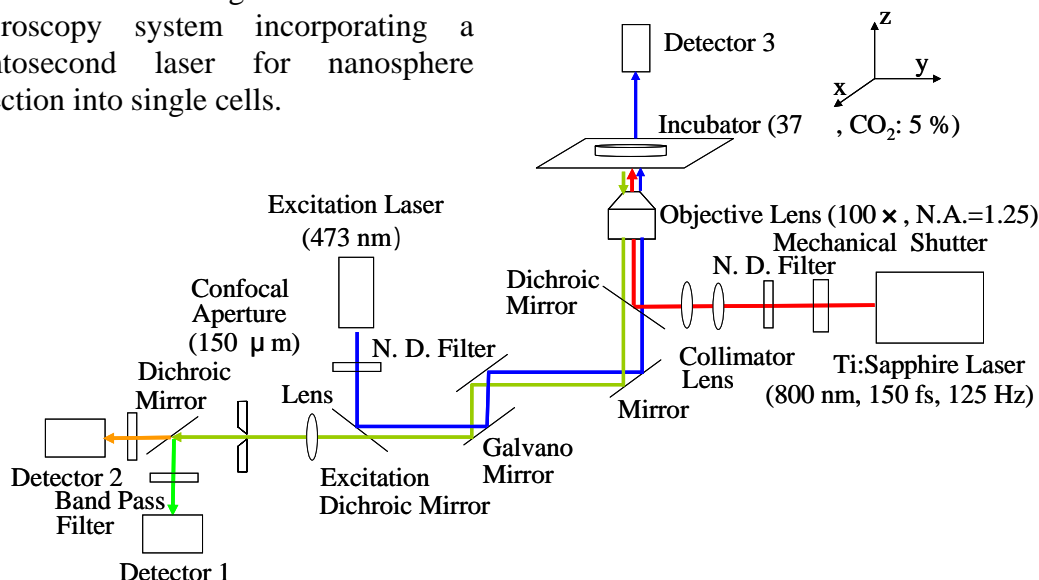


Fig. 2. Confocal fluorescence images of the fluorescent polystyrene nanospheres (200 nm) and the NIH 3T3 cell membrane stained by the styryl dye after the shockwave irradiation. The optical sections in (a)-(d) are at 2, 4, 6, and 8  $\mu\text{m}$  from the bottom of the cell, respectively. Excitation wavelength is  $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$ . Confocal aperture; 150  $\mu\text{m}$ .