

集光フェムト秒レーザーを用いた単一動物細胞内への蛍光性デキストランの導入

(阪大院工・応物¹, 科学技術振興機構², 京大再生医学研究所³)
井口 世利也¹, 安国 良平¹, 細川 陽一郎^{1,2}, 開 祐司^{2,3}, 増原 宏^{1,2}

【序】近年、バイオテクノロジーにおいて遺伝子、タンパク質、蛍光色素などの細胞外分子を単一の細胞内に導入しようとする試みがなされている。これまで単一細胞内への細胞外分子の導入技術としては、マイクロピペットによるマイクロインジェクション法が広く用いられているが、技術的難易度が高く、迅速かつ簡便で高精度な技術の確立が望まれている。そのような技術として、局所空間制御性に優れたフェムト秒レーザーの多光子吸収を利用した細胞外分子導入法が提案されている。我々は、特に高出力フェムト秒レーザーを生体試料に集光した際に誘起されるレーザーアブレーションに着目し、それを利用した細胞外分子の導入についての研究を進めている。ここでは、フェムト秒レーザーアブレーションにより引き起こされる細胞膜の形態変化を高速カメラにより調べ、さらに蛍光染色した糖鎖である蛍光性デキストランを細胞内に導入し、細胞内での導入分子の分布をレーザー共焦点顕微鏡により明らかにした結果について述べる。

【実験】細胞試料として代表的な動物細胞であるマウス繊維芽細胞(NIH3T3)を用いた。NIH3T3細胞をガラスボトムディッシュ(Matsunami)上に単層培養し、その細胞培養液に蛍光色素(FITC: fluorescein isothiocyanate)を糖鎖であるデキストラン(dextran)に修飾した FITC-dextran (Sigma - Aldrich, M.W. 2000000)を加えた。FITC-dextran は細胞膜透過性を示さず、細胞への毒性が低い。この細胞試料を倒立顕微鏡に配置し、油浸対物レンズ(100×, N.A. 1.25)により高強度フェムト秒チタンサファイアレーザー(Spectra Physics, 800 nm, 150 fs)を集光照射した。集光スポットの直径は、約 1 μm である。Fig. 1 の実験系を用いて、顕微鏡の視野にある NIH3T3 細胞の細胞膜にレーザーアブレーションを誘起し、その顕微透過像を高速カメラ(Photoron, FASTCAM - MAX)により撮影した。次に、Fig. 2 の実験系を用いて同様にレーザーを集光照射し、その直後に細胞培養液を PBS 溶液に置換し、共焦点顕微鏡(Olympus, FLUOVIEW FV300)により、細胞内における FITC-dextran の分布を 3 次元蛍光像として観察した。ここで FITC-dextran の蛍光励起光源として用いた 473 nm の半導体励起ブルーレーザーの透過光を、試料ステージ上面で検出することにより、細胞の透過像も同時に撮影した。

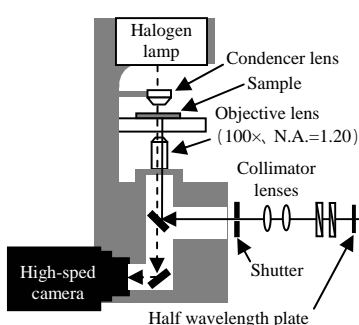


Fig. 1 高速カメラの実験系

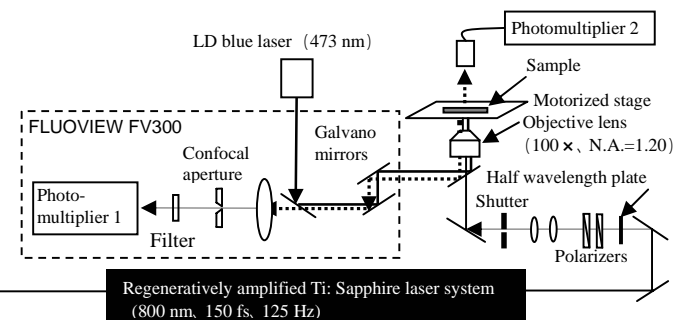


Fig. 2 フェムト秒レーザーを導入できる共焦点顕微鏡システム

【結果・考察】単発レーザーパルス（4.8 nJ/pulse）を細胞膜近傍に集光照射した直後の細胞の様子を高速カメラで観察した結果を Fig. 3 に示す。レーザー照射直後に約 2 μm の小孔が形成され、照射後 18 ms 以内に収縮して消えた。このレーザー強度では細胞培養液や基板にはレーザーアブレーションによる形態変化は観察されず、この小孔形成は細胞が直接レーザーアブレーションされたことに起因すると考えられる。次に、75 個の細胞にレーザーを照射し、その後の細胞の様子を共焦点顕微鏡で観察した。その代表的な結果を Fig. 4、Fig. 5 に示す。Fig. 4 では細胞核と比べて、細胞質から強い蛍光が観察されており、細胞質のみに FITC-dextran が導入されたと考えられる。Fig.5 では細胞内全体からほぼ均一な蛍光が観察されており、細胞核と細胞質の両方に FITC-dextran が導入されたと考えられる。Fig. 4 と Fig. 5 に帰属される細胞は、それぞれ全体の 75 % と 15 % であった。さらに、レーザーを照射した全ての細胞に対してトリパンブルー染色を行った結果、どの細胞も染色されず、細胞の生理活性が失われていないことが分かった。すなわち、フェムト秒レーザーによる局所的なレーザーアブレーションにより細胞膜に過渡的な小孔を形成することで、約 85 % の確率で細胞を破壊することなく、FITC-dextran が導入できることが示された。FITC-dextran の分子量や表面電荷が遺伝子と同等であり、遺伝子も同様に導入できると考えられ、遺伝子導入についても検討を進めている。

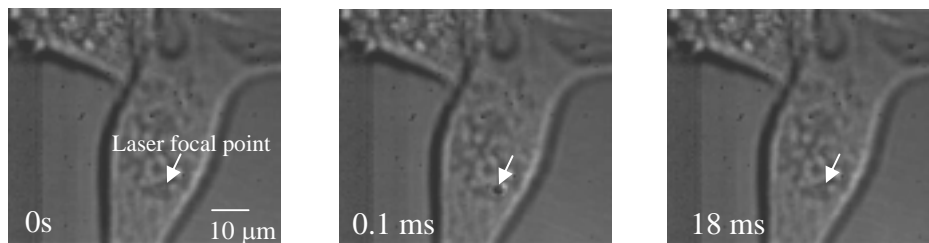


Fig. 3 強度 4.8 nJ/pulse のレーザーを単発照射した直後の細胞膜の透過像

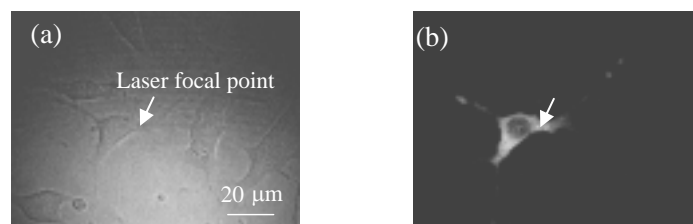


Fig. 4 レーザー照射した細胞の透過像(a)と共焦点蛍光像(b)
細胞質のみに FITC-dextran が導入された例

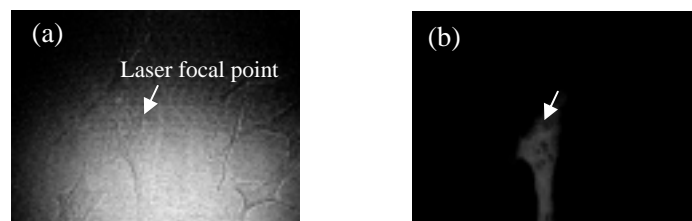


Fig.5 レーザー照射した細胞の透過像(a)と共焦点蛍光像(b)
細胞核と細胞質に FITC-dextran が導入された例