

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 16 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680058

研究課題名(和文)感染症予防を目指した細胞・抗原分子の高速レーザーナノサージェリー技術の研究

研究課題名(英文)Ultrafast laser nanosurgery of cells and antigen against infectious diseases

研究代表者

寺川 光洋(Terakawa, Mitsuhiro)

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：60580090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,900,000円、(間接経費) 2,970,000円

研究成果の概要(和文)：誘電体微粒子へのフェムト秒レーザー照射により励起した光増強場を細胞のプロセッシングに応用した。非集光単一パルス照射で細胞選択的に多数の細胞の一括プロセッシングが出来ることを実験実証し、抗原選択的に細胞膜に小孔を形成できることを示した。本研究により、(1)熱影響層が極めて小さいナノスケールでのプロセッシングと、(2)多数の粒子の同時励起による高いスループットを兼備した新規細胞サージェリー方法を実現した。

研究成果の概要(英文)：Cell membrane surgery by femtosecond laser-excited enhanced optical field was demonstrated. Simultaneous perforation of multiple cells was demonstrated by using a single pulse of unfocused femtosecond laser with cell selectivity. Combined method of nanoscale-laser processing with limited heat affected zone and high-throughput treatment by simultaneous excitation of multiple particles was realized.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：低侵襲治療システム レーザー医療 ナノサージェリー 細胞膜穿孔

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性菌の感染が大きな社会問題となっている中、感染症予防に向けた次世代医療として DNA ワクチンが注目を集めている。この医療技術の実現には(1)体内で抗原タンパク質を作り出すプラスミドを細胞内へ導入する技術および(2)免疫学的作用メカニズム解明のための選択的抗原分子機能制御技術が必要不可欠である。

非熱的ナノサージェリー(近赤外の集光フェムト秒レーザーによる細胞プロセッシング)は細胞膜への小孔形成や細胞小器官破壊による細胞機能制御の重要技術として位置付けられている。しかし、伝搬光による多光子プロセッシングでは単一の集光焦点における処理となるため、多数の細胞を処理する際はスループットに課題が残る。

誘電体粒子を非集光フェムト秒レーザーで励起すると、粒子近傍に増強光が得られる。増強光をレーザープロセッシングへ応用すると、単一パルスで直径数十ナノメートルのナノホールを多数作製できる。この方法は(1)熱影響層が極めて小さいナノスケールのプロセッシングと、(2)多数の粒子の同時励起による高いスループットを兼備している。

2. 研究の目的

本研究では、誘電体微粒子へのフェムト秒レーザー照射により励起した光増強場を細胞のプロセッシングに応用した。細胞膜への小孔形成による遺伝子デリバリーと抗原選択的ナノサージェリーを行った。

3. 研究の方法

光増強場による細胞プロセッシングの実証実験として、まずポリスチレン粒子を用いた実験を行った。図1に本方法の概念図を示す。NIH 3T3 細胞の細胞膜上に直径 1 μm の多数のポリスチレン粒子を抗原抗体反応により結合し、フェムト秒レーザーパルス(パルス数 1 ショット、パルス幅 80 fs、中心波長 800 nm、レーザーフルエンス 1.06 J/cm^2 ($1.33 \times 10^{13} \text{ W}/\text{cm}^2$)、直線偏光)を上方より垂直方向に入射した。照射スポット径は 300 μm 、照射スポット内の平均細胞数は 77 であった。細胞膜透過性の亢進は、FITC-dextran および Alexa Fluor で標識した siRNA を細胞内に導入することにより調べた。

次に、より生体安全性の高い方法に向けて、生分解性ポリマーを用いた実験を行った。上皮癌細胞(A431)の細胞膜上に抗 EGFR 抗体を介して直径 2 μm のポリ乳酸(Polylactic acid, PLA)粒子を結合し、フェムト秒レーザーパルスを上方より垂直方向に入射した。照射スポット径は 300 μm とした。細胞膜透過性の亢進は Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (20 kDa) を細胞内に導入することにより調べた。また、抗原選択性を調べるため、1. 抗体を使用して細胞膜に PLA 粒子を結合した後レーザー照射を行ったもの、2.

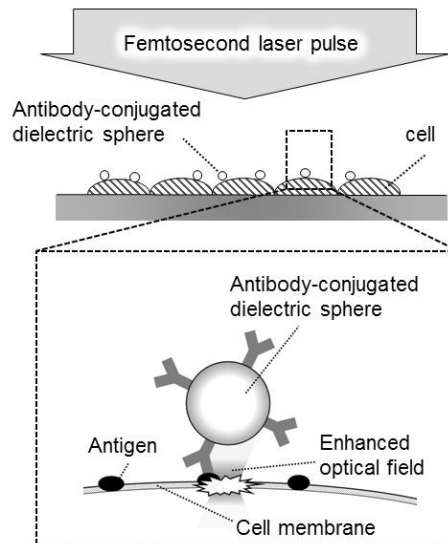


図1 光増強場による細胞プロセッシングの概念図。細胞膜に誘電体粒子を結合後、フェムト秒レーザーを照射。

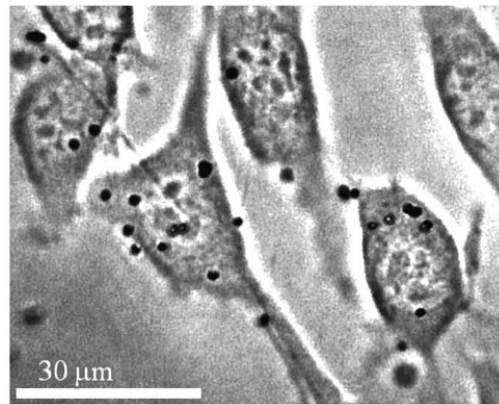


図2 照射前の細胞の位相差画像。多数のポリスチレン粒子が細胞膜表面に結合している。

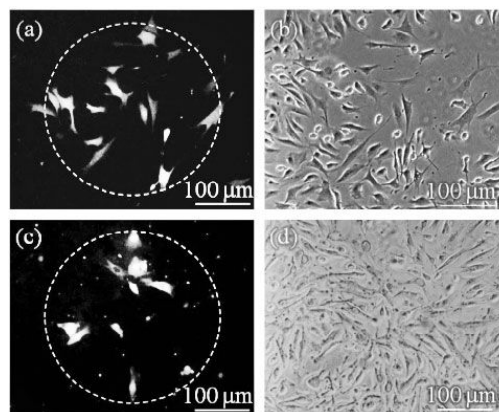


図3 ポリスチレン粒子へのフェムト秒レーザー照射により小孔形成した NIH 3T3 細胞の蛍光像(a, c)および位相差画像(b, d)。(a, b) FITC-dextran を細胞内に導入したもの。(c, d) Alexa Fluor 標識 siRNA を細胞内に導入したもの。

抗体による細胞への PLA 粒子の結合がないもの、3. レーザー未照射の細胞、4. 粒子を使用せずレーザー照射のみ行ったものの4条件にて実験を行い比較した。

4. 研究成果

図2に、フェムト秒レーザー照射前の細胞の位相差画像を示す。図中の黒い点がポリスチレン粒子を示す。細胞膜表面に多数のポリスチレン粒子が結合していることがわかる。1細胞あたりの結合粒子数は12個以下であった。図3に、本方法により FITC-dextran もしくは Alexa Fluor 標識 siRNA を導入した NIH 3T3 細胞の蛍光画像および位相差画像を示す。細胞内に導入分子由来の蛍光が観察された。照射スポット内における FITC-dextran および Alexa Fluor 標識 siRNA が導入された細胞数の割合の平均値は、それぞれ 38% および 21% であった。以上の結果より、誘電体粒子がマイクロレンズの役割を果たし、細胞膜に小孔を形成したと考えられる。以上より、本研究にて提案した方法による細胞への外来分子導入を実験実証した。

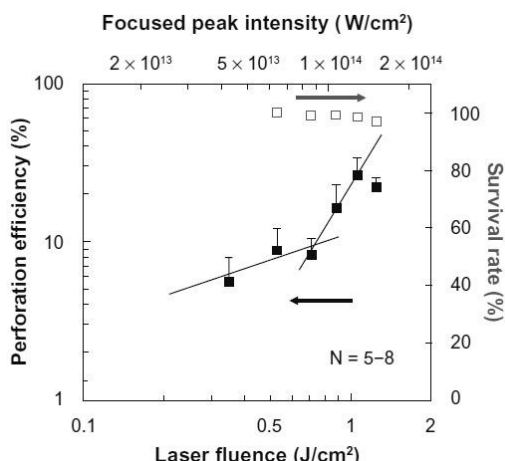


図4 A431 細胞への導入効率および生存率のレーザーフルエンス依存性。

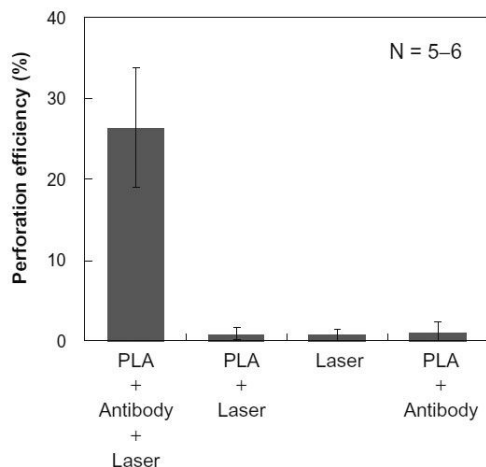


図5 四条件における導入効率平均値。

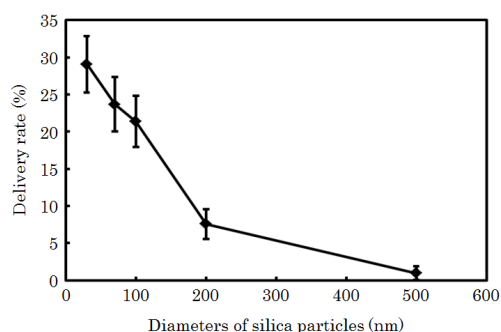


図6 直径の異なる蛍光シリカ微粒子の細胞への導入効率。レーザーフルエンス 1.06 J/cm²、パルス数 1。

照射領域において蛍光分子の導入が確認された A431 細胞の割合と細胞生存率のレーザーフルエンス依存性を図4に示す。レーザーフルエンス 0.8 J/cm² 以下では、導入効率は 10% 以下であった。レーザーフルエンス 0.88 J/cm² を超えると、導入効率は急激に上昇した。このときの光強度は粒子下において 1.08×10^{14} W/cm² と見積もられる。フェムト秒レーザーを水または透明材料に照射するとき、 10^{13} W/cm² から 10^{14} W/cm² の光強度では多光子イオン化、自己収束、光学的絶縁破壊といった多様な非線形相互作用を生じる。従って、小孔形成にはアブレーションに加えてキャビテーションバブルや衝撃波も寄与していると考えられる。

図5に異なる4条件における外来分子導入効率を示す。抗体を利用して PLA 粒子を細胞に結合した後レーザー照射を行った条件のみにおいて導入効率の増大がみられ、本方法が抗原選択性を有することを示している。また、間接的ではあるが、細胞膜に形成される小孔の大きさを見積るため、直径の異なる緑色蛍光シリカ微粒子を導入粒子として使用して実験を行った。細胞周囲の温度を 23 とし、PLA 粒子を細胞膜に結合した後、フルエンス 1.06 J/cm² として単一パルス照射した。図6に結果を示す。シリカ微粒子の直径が大きくなるに伴い導入効率は低下したものの、直径 100 nm の微粒子までは 20% 以上の導入効率を示した。この結果から、粒子下に生成される小孔は 100 nm 程度であることが示唆された。

本方法の特長は、非集光単一パルス照射で細胞選択的に多数の細胞の一括プロセッシングが出来ることである。細胞膜に抗原抗体反応により誘電体粒子を結合し、フェムト秒レーザーを走査することにより抗原選択的に細胞膜に小孔を形成できる。1 cm² の面積に適用するために必要なパルス数は約 1400 パルスであり、これは繰り返し周波数 1 kHz のチタンサファイアレーザーでは 1.4 秒で実施可能である。以上より、(1)熱影響層が極めて小さいナノスケールでのプロセッシングと、(2)多数の粒子の同時励起による高いスループットを兼備した新規細胞サージェリー方

法を実現した。2009年以降、粒子とレーザーの相互作用を活用した外来分子導入に関する報告例が国内外に置いて相次いでいるが、生体安全性の高い生分解性ポリマーを利用して実現したものは2014年3月現在、本研究による成果のみであり、今後のさらなる展開が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

- (1) T. Mitsuhashi, M. Terakawa, "Evaluation of parameters influencing the molecular delivery by biodegradable microsphere-mediated perforation using femtosecond laser," 査読有, Journal of Biomedical Optics 19, 2014, 015003/1-7, Doi:10.1117/1.JBO.19.1.015003
- (2) M. Terakawa, T. Mitsuhashi, T. Shinohara, H. Shimizu, "Near-infrared femtosecond laser-triggered nano-perforation of hollow microcapsules," 査読有, Optics Express 21, 2013, 12604-12610, Doi: 10.1364/OE.21.012604
- (3) M. Terakawa, Y. Tsunoi, T. Mitsuhashi, "In vitro perforation of human epithelial carcinoma cell with antibody-conjugated biodegradable microspheres illuminated by a single 80 fs near-infrared laser pulse," 査読有, International Journal of Nanomedicine 7, 2012, 2653-2660, Doi: 10.2147/IJN.S31768
- (4) M. Terakawa "Biodegradable microsphere mediated membrane permeabilization and transfection using femtosecond laser," 査読無, Proceedings of CLMS 8-4, 2012, 92-93
- (5) M. Terakawa, Y. Tanaka, "Dielectric microsphere mediated transfection using femtosecond laser," 査読有, Optics Letters 36, 2011, 2877-2879, Doi: 10.1364/OL.36.002877

[学会発表](計20件)

- (1) 発表者: 寺川光洋, "Femtosecond laser processing for biomedical applications," International Workshop on the Fabrication and Application of Microstructured Optical Devices, 2014年2月27日, 横浜
- (2) 発表者: 三橋龍樹, "Microfluidic perforation system using femtosecond laser and biodegradable microspheres," International Workshop on the Fabrication and Application of Microstructured Optical Devices, 2014年2月28日, 横浜
- (3) 発表者: 三橋龍樹, "Biodegradable microsphere-mediated perforation using low-intensity femtosecond laser pulses

for microfluidic perforation system," SPIE Photonics West 2014, 2014年2月2日, サンフランシスコ(米国)

(4) 発表者: 寺川光洋, "Femtosecond laser-triggered nano-perforation of polymer hollow microsphere," 12th International Conference on Laser Ablation (COLA 2013), 2013年10月7日, イスキア(イタリア)

(5) 発表者: 寺川光洋, "フェムト秒レーザー励起光増強場によるドラッグデリバリー," 分子デリバリー研究会, 2013年9月24日, 東京

(6) 発表者: 三橋龍樹, "Size-dependent nanoparticle delivery by biodegradable microsphere-mediated perforation using femtosecond laser," SPIE Optics + Photonics 2013, 2013年8月26日, サンディエゴ(米国)

(7) 発表者: 寺川光洋, "Femtosecond laser nanoablation by enhanced optical field," The 6th International Congress on Laser Advanced Materials Processing (LAMP 2013), 2013年7月25日, 新潟

(8) 発表者: 三橋龍樹, "生分解性ポリマー微粒子を用いたレーザー薬剤導入における導入分子サイズの検討," 第29回日本DDS学会学術会議, 2013年7月4日, 京都

(9) 発表者: 寺川光洋, "Femtosecond laser-triggered local destruction of polymer microcapsules for drug delivery," European Conferences on Biomedical Optics (ECBO 2013), 2013年5月14日, ミュンヘン(ドイツ)

(10) 発表者: 寺川光洋, "誘電体粒子レンズを用いたフェムト秒レーザー細胞プロセッシングとドラッグデリバリーへの応用," 第79回レーザー加工学会講演会, 2013年5月7日, 大阪

(11) 発表者: 寺川光洋, "多微粒子レンズ集光場によるフェムト秒レーザー細胞プロセッシング," 電気学会 光・量子デバイス研究会, 2013年3月8日, 松江

(12) 発表者: 寺川光洋, "Biodegradable microsphere mediated perforation of cells using femtosecond laser for theranostics," 招待講演, SPIE Photonics West 2013, 2013年2月3日, サンフランシスコ(米国)

(13) 発表者: 三橋龍樹, "Enhanced cell membrane permeability by using multi-microsphere lens focusing of burst mode of low-intensity 80 MHz femtosecond lasers," 第73回応用物理学会学術講演会, 2012年9月12日, 松山

(14) 発表者: 寺川光洋, "Dielectric microsphere mediated cell perforation using a single shot femtosecond laser pulse," The 8th Asia Pacific Laser Symposium (APLS 2012), 2012年5月28日, 黄山(中国)

(15) 発表者: 寺川光洋, "Biodegradable

microsphere mediated membrane permeabilization and transfection using femtosecond laser,” Conference on Laser Surgery and Medicine 2012 (CLMS2012), 2012年4月27日, 横浜

(16) 発表者：寺川光洋, “フェムト秒レーザーの多微粒子レンズ集光場による細胞膜の単一パルスプロセッシング,” 講演奨励賞受賞記念講演, 第59回応用物理学関係連合講演会, 2012年3月16日, 東京

(17) 発表者：三橋龍樹, “低強度多パルスフェムト秒レーザーの多微粒子レンズ集光場を用いた細胞への物質送達,” 第12回レーザー学会東京支部研究会, 2012年3月6日, 東京

(18) 発表者：寺川光洋, “Biodegradable microsphere mediated cell perforation using femtosecond laser pulse,” SPIE Photonics West 2012, 2012年1月22日, サンフランシスコ(米国)

(19) 発表者：寺川光洋, “Polystyrene microsphere mediated cell perforation using a single femtosecond laser pulse,” 11th International Conference on Laser Ablation, 2011年11月18日, プラヤデルカルメン(メキシコ)

(20) 発表者：寺川光洋, “フェムト秒レーザーの多微粒子レンズ集光場による細胞膜の単一パルスプロセッシング,” 第72回応用物理学学会学術講演会, 2011年8月31日, 山形

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：レーザーを用いた薬剤放出方法

発明者：寺川光洋

権利者：慶應義塾大学

種類：特許

番号：特願 2013-46732

出願年月日：2013年3月8日

国内外の別：国内

〔その他〕

“Femtosecond laser pulses for smart drug delivery,” Mitsuhiro Terakawa, 2014年3月21日, SPIE Newsroom. DOI: 10.1117/2.1201403.005377

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺川 光洋 (TERAKAWA MITSUHIRO)

慶應義塾大学・理工学部・専任講師

研究者番号：60580090

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし