

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-158580

(P2017-158580A)

(43) 公開日 平成29年9月14日(2017.9.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

審査請求 有 請求項の数 32 O L 外国語出願 (全 62 頁)

(21) 出願番号	特願2017-93726 (P2017-93726)	(71) 出願人	506115514
(22) 出願日	平成29年5月10日 (2017. 5. 10)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(62) 分割の表示	特願2014-510543 (P2014-510543)		ティ オブ カリフォルニア
原出願日	平成24年5月14日 (2012. 5. 14)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(31) 優先権主張番号	61/486, 114		607 オークランド フランクリン ス
(32) 優先日	平成23年5月13日 (2011. 5. 13)		トリート 1111 トゥエルフス フロ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ア
		(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
		(72) 発明者	ペイユ・イー・チョウ
			アメリカ合衆国・カリフォルニア・900
			25・ロス・アンジェルス・マルコム・ア
			ヴェニュー・1921・#101
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞の選択的トランスフェクション用の光熱基板

(57) 【要約】

【課題】本発明は、単細胞に対する新規手術用ツール及び選択された細胞に試薬を送達するための基板／デバイスを提供する。

【解決手段】特定の実施形態では、基板は、一つ以上のオリフィスを備えた表面を有し、ナノ粒子及び／又は薄膜がオリフィスの表面又はオリフィスの近くに堆積されて、ナノ粒子及び／又は薄膜が電磁放射と接触した際に加熱される物質で形成される。特定の実施形態では、細孔が、細胞内に送達される一以上の試薬を含有するマイクロチャンネルと流体連結している。

【選択図】図14

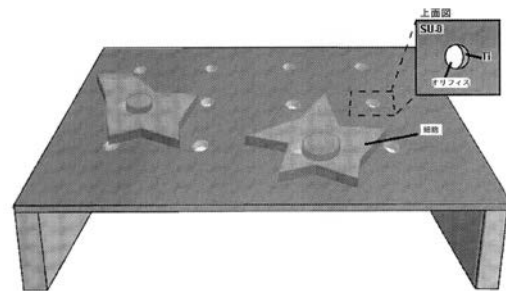


Fig. 14

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内に物質を送達するためのデバイスであって、
電磁放射と接触した際に加熱される物質のナノ粒子及び／又は薄膜を有する表面を備えたデバイス。

【請求項 2】

前記表面がベッセルの表面を備える、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3】

前記ベッセルが細胞培養ベッセルを備える、請求項 2 に記載のデバイス。

【請求項 4】

前記ベッセルがマイクロタイタープレートを備える、請求項 2 に記載のデバイス。

【請求項 5】

前記表面が、マイクロタイタープレートのウェルの、シリコン若しくはガラスウェーハの、顕微鏡スライドの、細胞培養ベッセルの、又はマイクロ流体デバイスのチャンバ若しくはチャンネルの、壁及び／又は床を備える、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 6】

前記表面が、細胞を含むように構成され且つ顕微鏡で観察するように配置されたチャンバの表面を備える、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 7】

前記チャンバが、開放された頂部を有する、請求項 6 に記載のデバイス。

【請求項 8】

前記チャンバが、該チャンバを閉じる頂部を有する、請求項 6 に記載のデバイス。

【請求項 9】

前記表面が、ガラス、鉱物、及びプラスチックから成る群から選択された物質を備える、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 10】

前記表面が一つ以上のオリフィスを備え、前記ナノ粒子及び／又は薄膜が前記オリフィスのうち少なくとも一つの表面に及び／又は前記オリフィスのうち少なくとも一つの近くに堆積されている、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 11】

前記表面が少なくとも二つのオリフィスを備え、前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、前記オリフィスの表面の上に及び／又は前記オリフィスの近くに堆積されている、請求項 10 に記載のデバイス。

【請求項 12】

前記表面が、少なくとも 5 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 20 個、少なくとも 25 個、少なくとも 50 個、少なくとも 100 個、少なくとも 200 個、又は少なくとも 500 個のオリフィスを備え、各オリフィスが、ナノ粒子及び／又は薄膜を有する表面を備え、及び／又は、前記オリフィスの近くに配置されたナノ粒子及び／又は薄膜を有する、請求項 11 に記載のデバイス。

【請求項 13】

前記オリフィスが略 2 cm^2 以下、略 1.5 cm^2 以下、略 1 cm^2 以下、略 0.5 cm^2 以下、又は略 0.1 cm^2 以下の領域内に全て配置されている、請求項 12 に記載のデバイス。

【請求項 14】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、前記オリフィスから略 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以内、略 $50\text{ }\mu\text{m}$ 以内、略 $25\text{ }\mu\text{m}$ 以内、略 $20\text{ }\mu\text{m}$ 以内、略 $15\text{ }\mu\text{m}$ 以内、略 $10\text{ }\mu\text{m}$ 以内、又は略 $5\text{ }\mu\text{m}$ 以内に配置されている、請求項 10 から 13 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 15】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、前記オリフィスの壁に及び／又は縁の全周囲に堆積されている、請求項 10 から 14 のいずれか一項に記載のデバイス。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、前記オリフィスの壁又は縁の一つの領域に優先的に存在している、請求項 10 から 14 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 17】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、細胞が配置されるのと同じ側の前記表面の面の上に及び／又はオリフィスの縁の上に堆積されている、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 18】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、細胞が配置されるのと反対側の前記表面の面の上に及び／又はオリフィスの縁の上に堆積されている、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載のデバイス。

10

【請求項 19】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が薄膜を備える、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 20】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜がナノ粒子を備え、該ナノ粒子のサイズの範囲が略 5 nm から略 500 nm までである、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 21】

前記ナノ粒子が、ナノビーズ、ナノワイヤ、ナノチューブ、ナノドット、ナノコーン、及び量子ドットから成る群から選択されている、請求項 1 から 20 のいずれか一項に記載のデバイス。

20

【請求項 22】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、半導体、金属、金属合金、窒化金属、及び酸化金属から成る群から選択された物質を備える、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 23】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、遷移金属、遷移金属合金、窒化遷移金属、及び酸化遷移金属から成る群から選択された物質を備える、請求項 22 に記載のデバイス。

【請求項 24】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、金、チタン (Ti)、TiN、TiCN、及び TiAlN からなる群から選択された物質を備える、請求項 22 に記載のデバイス。

30

【請求項 25】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、III 族物質又は V 族物質でドーピングされた IV 族物質である半導体を備える、請求項 22 に記載のデバイス。

【請求項 26】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、ホウ素、ヒ素、リン、及びガリウムから成る群から選択された物質でドーピングされたシリコン又はゲルマニウムを備える、請求項 25 に記載のデバイス。

【請求項 27】

前記オリフィスのうち一つ以上が、細胞内に送達される試薬を含むチャンバと流体連結している、請求項 1 から 26 のいずれか一項に記載のデバイス。

40

【請求項 28】

前記デバイスがマイクロチャネルを備え、前記オリフィスのうち一つ以上が、前記マイクロチャネルと流体連結している、請求項 1 から 26 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 29】

前記デバイスが複数のマイクロチャネルを備える、請求項 28 に記載のデバイス。

【請求項 30】

異なる複数のマイクロチャネルが異なる複数のオリフィスと流体連結している、請求項 29 に記載のデバイス。

【請求項 31】

50

前記デバイスが、異なる複数のマイクロチャネルに流体を送達するマニホールド及び／又はバルブを備える、請求項 30 に記載のデバイス。

【請求項 32】

前記マイクロチャネルが、細胞内に送達される試薬を含む、請求項 28 から 31 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 33】

前記試薬が、核酸、リボザイム、タンパク質、ペプチド、酵素、抗体、細胞小器官、染色体、病原体、及びマイクロ粒子、ナノ粒子から成る群から選択されている、請求項 27 又は 32 に記載のデバイス。

【請求項 34】

前記マイクロチャネルがポンプの制御で加圧され、又は重力送りによって供給が行われる、請求項 28 から 33 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 35】

前記デバイスが、前記マイクロチャネル内の流れを監視及び／又は制御し、且つ前記表面の照射のタイミング及び任意で位置を制御する制御装置を更に備える、請求項 28 から 34 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 36】

前記デバイスが、倒立顕微鏡上のステージを置換するように構成されている、請求項 1 から 35 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 37】

細胞が前記表面の上に配置されている、請求項 1 から 36 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 38】

前記細胞が、前記基板のオリフィスの上に又はオリフィスに隣接して配置されている、請求項 37 に記載のデバイス。

【請求項 39】

前記細胞が哺乳類細胞である、請求項 37 又は 38 に記載のデバイス。

【請求項 40】

細胞内に物質を送達する選択的開口用システムであって、

請求項 1 から 34 のいずれか一項に記載のデバイスと、

前記ナノ粒子又は薄膜を加熱する電磁エネルギー源とを備えたシステム。

【請求項 41】

前記電磁エネルギー源がレーザ又は非コヒーレント光源である、請求項 40 に記載のシステム。

【請求項 42】

前記電磁エネルギー源がレーザである、請求項 41 に記載のシステム。

【請求項 43】

前記システムが、レンズシステム、ミラーシステム、マスク、及び／又は、前記表面の特定の領域に電磁エネルギーを向ける位置決めシステムを備える、請求項 40 から 42 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 44】

前記システムが、前記電磁エネルギー源による照射のタイミング及び／又はパターンを制御する制御装置を備える、請求項 40 から 43 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 45】

細胞内に試薬を送達する方法であって、

請求項 1 から 36 のいずれか一項に記載のデバイスの上に及び／又は請求項 40 から 44 のいずれか一項に記載のシステムに細胞を提供するステップであって、前記細胞が前記表面の上に配置される、ステップと、

前記細胞を前記試薬に接触させるステップと、

前記表面の領域を電磁放射に晒すことによって、前記薄膜及び／又は粒子の加熱を誘起

10

20

30

40

50

するステップとを備え、前記加熱が、加熱された領域において又は近くにおいて細胞膜に開口を導入する気泡を形成して、細胞内に試薬が送達される、方法。

【請求項 46】

前記細胞を取り囲む培地に前記試薬を提供することによって、前記細胞を前記試薬と接触させる、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記表面に存在している一つ以上のオリフィスに前記試薬を提供することによって、前記細胞を前記試薬と接触させる、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 48】

前記オリフィスと流体連結している一つ以上のマイクロ流体チャンネルに前記試薬を提供することによって、前記細胞を前記試薬と接触させる、請求項 47 に記載の方法。

10

【請求項 49】

異なる複数の試薬が異なる複数のオリフィスに導入される、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記晒すことが、レーザパルス又は非コヒーレント光源に前記表面の領域を晒すことを備える、請求項 39 から 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

前記試薬が、核酸、染色体、タンパク質、標識、細胞小器官、及び有機小分子から成る群から選択される、請求項 39 から 50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

細胞に対するマイクロマニピュレーションを行う方法であって、
前記細胞をマイクロサージャリーツールと接触させるステップであって、前記ツールが、電磁エネルギーの印加によって加熱される膜（コーティング）又はナノ粒子を先端に及び／又は先端近くに有するマイクロキャピラリを備える、ステップと、
前記ツールに電磁エネルギーを印加することによって、前記金属膜又は金属ナノ粒子の温度を上昇させて、前記細胞の膜に開口を形成するステップとを備え、前記マイクロサージャリーツールと前記細胞との接触角及び／又は前記電磁エネルギーの偏光を変化させて、前記細胞に導入される開口のサイズ及び／又は形状を変更する、方法。

20

【請求項 53】

前記電磁エネルギーを印加することが、光を印加して前記金属膜又はナノ粒子を加熱することを備える、請求項 52 に記載の方法。

30

【請求項 54】

前記マイクロサージャリーツールの先端が導光体として機能するように構成されている、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

前記電磁エネルギーを印加することが、レーザビームを印加して前記膜又はナノ粒子を加熱することを備える、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 56】

前記電磁エネルギーを印加することが、磁場を印加して前記膜又はナノ粒子を加熱することを備える、請求項 52 に記載の方法。

40

【請求項 57】

前記電磁エネルギーを印加することが、電場を印加して前記膜又はナノ粒子を加熱することを備える、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 58】

前記膜又は金属ナノ粒子の温度が、大気温度よりも少なくとも 150℃上昇する、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 59】

前記方法が、前記マイクロキャピラリチューブを介して前記細胞内に試薬を注入するステップを更に備えた、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 60】

50

前記マイクロキャピラリの先端の直径範囲が略0.1 μm から略5 μm までである、請求項52に記載の方法。

【請求項61】

前記ナノ粒子のサイズ範囲が略5 nmから略500 nmまでである、請求項52に記載の方法。

【請求項62】

前記金属膜又はナノ粒子が、半導体を備えるか、又は、貴金属、貴金属合金、窒化貴金属、及び酸化貴金属から成る群から選択された金属を備える、請求項52に記載の方法。

【請求項63】

前記金属コーティング又はナノ粒子が、遷移金属、遷移金属合金、窒化遷移金属、及び酸化遷移金属を備える、請求項52に記載の方法。

【請求項64】

前記金属コーティング又はナノ粒子が、金、チタン (Ti)、TiN、TiCN、及びTiAlNから成る群から選択された物質を備える、請求項52に記載の方法。

【請求項65】

前記マイクロキャピラリが、ガラス、鉱物、セラミック、及びプラスチックから成る群から選択された物質を備える、請求項52に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

〔関連出願の相互参照〕

本願は、2011年5月13日出願の米国特許出願第61/486114号の優先権を主張し、その内容はあらゆる目的のため全体が参照として本願に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

タンパク質、DNA、RNA、染色体、核、無生物粒子（量子ドット、表面増強ラマン散乱 (SERS, surface-enhanced Raman scattering) 粒子、マイクロビーズ等）といった多様なサイズのカーゴ（積荷物質）を哺乳類の細胞に移植することは、生物学の多様な分野において非常に望まれている。エンドサイトーシス等の送達方法では、エンドソーム内にカーゴを取り込ませることができるが、低pH微小環境及びリチック・エンチームがカーゴの劣化をもたらすことが多い（非特許文献1）。ウイルス及び化学的分配方法では、カーゴをウイルス内に充填したり、摂取を増強する化学的錯体を形成する（非特許文献2、非特許文献3）。しかしながら、毒性、細胞型特異的摂取、更に致命的にはカーゴの充填容量の制限によって、カーゴのサイズ及び送達可能なセルの種類に大きな制約が課せられる（非特許文献1）。

【0003】

物理的移植方法として、ランダムに分布したナノスケール細孔を形成するエレクトロポレーション（非特許文献4）及びソノポレーション（非特許文献5）や、レーザの焦点箇所において細胞膜に細孔を形成するオプトポレーション（非特許文献6、非特許文献7、非特許文献8）が挙げられる。こうした細孔を介して、熱拡散又は電場によって、小型カーゴが細胞内に送達される。これらの方法で大型カーゴを送達することは、カーゴの拡散速度が遅いこと、及び細孔のサイズが大きくなると共に細胞の生存率が低くなることのため、効率が悪い（非特許文献9）。マイクロキャピラリインジェクション（非特許文献10）では、送達のために、鋭いチップを用いて細胞膜を機械的に貫く。しかしながら、膜の貫通による機械的外傷によって、細胞の生存率を維持するために、典型的なピペットの先端は直径0.5 μm までに制限される。

【0004】

ピペットの先端よりも大きなカーゴは、ピペットの詰まり及びカーゴのせん断のため、注入不能である。エレクトロポレーションをマイクロキャピラリインジェクションと組み合わせたエレクトロインジェクションを用いて、電場で接触細胞膜を弱めた後に細胞を優

10

20

30

40

50

しく機械的に貫くことによって、RNAやプラスミドDNA等の小分子を生細胞内に送達すること（非特許文献12、非特許文献13）、バクテリアを人工脂質小胞内に送達すること（非特許文献14）が実証されている。他方、SLAM（simple lipid assisted microinjection、単純脂質補助マイクロインジェクション）法（非特許文献15）では、ガラスマイクロキャピラリの先端に合成脂質分子を取り込む。SLAMマイクロピペットと細胞膜との接触は、脂質分子を細胞膜を融合させて、カーゴ送達用の連続的で一時的な経路を形成する。この方法は、細胞膜を介するマイクロピペットの先端のジグザグの穿孔運動を防止する。しかしながら、カーゴ及び細胞膜の脂溶性相互作用は、細胞及び送達カーゴの望ましくない生物学的効果を生じさせる可能性があり、この方法が特定の細胞タイプ及びカーゴ成分に制限される。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第5644048号明細書

【特許文献2】米国特許第5386023号明細書

【特許文献3】米国特許第5637684号明細書

【特許文献4】米国特許第5602240号明細書

【特許文献5】米国特許第5216141号明細書

【特許文献6】米国特許第4469863号明細書

【特許文献7】米国特許第5235033号明細書

20

【特許文献8】米国特許第5034506号明細書

【特許文献9】米国特許出願公開第2007/0164250号明細書

【特許文献10】米国特許出願公開第2006/0269612号明細書

【特許文献11】米国特許出願公開第2005/0118102号明細書

【特許文献12】米国特許第7212284号明細書

【特許文献13】米国特許第7204999号明細書

【特許文献14】米国特許第7147712号明細書

【特許文献15】米国特許第7128891号明細書

【特許文献16】米国特許第6972046号明細書

【特許文献17】米国特許第6688494号明細書

30

【特許文献18】米国特許第5665277号明細書

【特許文献19】国際公開第2007/024323号

【特許文献20】米国特許第6706248号明細書

【特許文献21】米国特許第6485858号明細書

【特許文献22】米国特許第7128891号明細書

【特許文献23】米国特許第7060121号明細書

【特許文献24】米国特許第5958348号明細書

【特許文献25】米国特許第3941567号明細書

【特許文献26】米国特許第6254928号明細書

【特許文献27】米国特許第5958348号明細書

40

【特許文献28】米国特許第6225007号明細書

【特許文献29】米国特許第6200674号明細書

【特許文献30】米国特許第6080337号明細書

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Luo and Saltzman (2000) Nat. Biotechnol. 18:33-37

【非特許文献2】Naldini et al. (1996) Science, 272:263-267

【非特許文献3】Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Ac

50

ad. Sci. USA, 84:7413-7417

【非特許文献4】Chu, et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:1311-1326

【非特許文献5】Mitragotri (2005) Nat. Rev. Drug Discovery, 4:255-260

【非特許文献6】Tirlapur and Konig (2002) Nature, 418:290-291

【非特許文献7】Vogel, et al. (2005) Appl. Phys. B: Laser Opt., 81(8):1015-1047

【非特許文献8】Clark et al. (2006) J. Biomed. Opt., 11:014034 10

【非特許文献9】Stevenson et al. (2006) Opt. Express, 14:7125-7133

【非特許文献10】King (2004) Methods in Molecular Biology 245: Gene Delivery to Mammalian Cells 1; Humana Press Inc.: Totowa, NJ

【非特許文献11】Han et al. (2008) J. Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med., 4:215-225

【非特許文献12】Boudes et al. (2008) J. Neurosci. Meth., 170:204-211 20

【非特許文献13】Kitamura et al. (2008) Nat. Meth., 5:61-67

【非特許文献14】Hurtig and Orwar (2008) Soft Matter, 4:1515-1520

【非特許文献15】Laffafian and Hallett (1998) Biophys. J., 75:2558-2563

【非特許文献16】Beaucage et al. (1993) Tetrahedron 49(10):1925

【非特許文献17】Letsinger (1970) J. Org. Chem. 35:3800 30

【非特許文献18】Sprinzl et al. (1977) Eur. J. Biochem. 81:579

【非特許文献19】Letsinger et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14:3487

【非特許文献20】Sawai et al. (1984) Chem. Lett. 805

【非特許文献21】Letsinger et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4470

【非特許文献22】Pauwels et al. (1986) Chemica Scripta 26:1419

【非特許文献23】Mag et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:1437 40

【非特許文献24】Briu et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:2321

【非特許文献25】Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press

【非特許文献26】Egholm (1992) J. Am. Chem. Soc. 114:1895

【非特許文献27】Meier et al. (1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008 50

- 【非特許文献28】Nielsen (1993) Nature, 365:566
- 【非特許文献29】Carlsson et al. (1996) Nature 380:207
- 【非特許文献30】Denpcy et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097
- 【非特許文献31】Angew. (1991) Chem. Intl. Ed. English 30:423
- 【非特許文献32】Letsinger et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4470
- 【非特許文献33】Letsinger et al. (1994) Nucleoside & Nucleotide 13:1597 10
- 【非特許文献34】Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook;
- 【非特許文献35】Mesmaeker et al. (1994), Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4:395;
- 【非特許文献36】Jeffs et al. (1994) J. Biomolecular NMR 34:17;
- 【非特許文献37】Tetrahedron Lett. 37:743 (1996) 20
- 【非特許文献38】Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook
- 【非特許文献39】Jenkins et al. (1995), Chem. Soc. Rev. pp169-176
- 【非特許文献40】Rawls, C&E News June 2, 1997 page 35
- 【非特許文献41】Lynch and Hunter (1998) Introduction to the data for several metals. In Handbook of Optical Constants of Solids, Vol. III; Academic Press: San Diego, CA 30
- 【非特許文献42】Wiersinga et al. (2006) Nat. Rev. Microbiol. 4:272-282
- 【非特許文献43】Berber et al. (2000) Physical Review B, 62(4):R2291-2294
- 【非特許文献44】Fedlheim and Colby (2001) Metal Nanoparticles: Synthesis Characterization & Applications, Marcel Dekker, Inc., N. Y.
- 【非特許文献45】Baraton (2002) Synthesis, Functionalization and Surface Treatment of Nanoparticles, American Scientific Publishers 40
- 【非特許文献46】Fendler (1998) Nanoparticles and Nanostructured Films: Preparation, Characterization and Applications, Wiley-VCH, N. Y.
- 【非特許文献47】Hirai et al. (1979) J. Macromol. Sci. Chem., A13:727
- 【非特許文献48】Hirai et al. (1976) Chem. Lett., 905 50

- 【非特許文献49】Toshima and Yonezawa (1992) Makromol. Chem., Macromol. Symp., 59:281
- 【非特許文献50】Wang and Toshima (1997) J. Phys. Chem., 97:11542
- 【非特許文献51】Pastoriza-Santos and Liz-Marzan (2000) Pure Appl. Chem., 72(1-2):83-90
- 【非特許文献52】Haggerty et al. (1981) pp165-241 In: Laser Induced Chemical Processes, edited by J. J. Steinfield
- 【非特許文献53】Bi et al. (1993) J. Mater. Res., 8(7) : 1666-1674 10
- 【非特許文献54】Bi et al. (1995) J. Mater. Res. 10(11) : 2875-2884
- 【非特許文献55】Curcio et al. (1990) Applied Surface Science, 46:225-229
- 【非特許文献56】Danen et al. (1984) SPIE, 458:124-130
- 【非特許文献57】Gupta et al. (1984) SPIE, 458:131-139
- 【非特許文献58】Hartland (2006) Annu. Rev. Phys. Chem. 57:403-430 20
- 【非特許文献59】Pitsillides et al. (2003) Biophys. J., 84:4023-4032
- 【非特許文献60】Kotaidis et al. (2006) J. Chem. Phys., 124(18), Art. No. 184702
- 【非特許文献61】Jana et al. (2001) J. Phys. Chem. B, 105(19):4065-4067
- 【非特許文献62】Nikoobakht and El-Sayed (2003) Chem. Mater. 15(10):1957-1962
- 【非特許文献63】Xu et al. (2004) Chem. Mater., 16(11) : 2259-2266 30
- 【非特許文献64】Yao et al. (2005) J. Biomed. Optics, 10(6):064012
- 【非特許文献65】Marmottant and Hilgenfeldt (2003) Nature, 423:153-156
- 【非特許文献66】Lokhandwalla and Sturtevan (2001) Phys. Med. Biol. 46:413-437
- 【非特許文献67】Hellman et al. (2008) Biophoton., 1:24-35
- 【非特許文献68】Peterbauer et al. (2006) Lab Chip, 6:857-863 40
- 【非特許文献69】Watanabe et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25:681-686
- 【非特許文献70】Goetz et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 98:12221-12226
- 【非特許文献71】Stevens et al. (2005) J. Bacteriol., 187:7857-7862
- 【非特許文献72】Benjamin and Weaver (1961) Proc. R. Soc. London, Ser. A, 261:516-531)
- 【発明の概要】 50

【課題を解決するための手段】

【0007】

多様な実施形態において、本発明は、細胞に対する損傷又はストレスを顕著に減らして、細胞の高度に局所的な貫通を達成することができる。特定の実施形態において、細胞マイクロサージャリー（細胞微小手術）ツールは、そのツールが、電磁エネルギーの印加によって加熱可能な金属膜又は複数のナノ粒子を先端に及び／又は先端付近に有するマイクロキャピラリ（例えば、マイクロピペット）を備えるものとして提供される。

【0008】

特定の実施形態では、細胞マイクロサージャリーツールが提供される。典型的には、そのツールは、電磁エネルギーの印加によって加熱可能な金属膜又は複数のナノ粒子を先端に及び／又は先端付近に有するマイクロキャピラリを備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリは中空のボア（孔）を備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリの先端の直径は、略0.01 μm 、0.05 μm 、0.1 μm 又は0.5 μm から、略1 μm 、3 μm 、5 μm 、8 μm 又は10 μm までの範囲に及ぶ。特定の実施形態では、マイクロピペットは、略0.5 μm から略2 μm 又は3 μm までの範囲の外径（OD）を有する。多様な実施形態において、ナノ粒子のサイズ範囲は略50 nmから略500 nmまでである。多様な実施形態において、ナノ粒子のサイズ範囲は略10 nmから略500 nmである。多様な実施形態において、ナノ粒子は、ナノビーズ、ナノワイヤ、ナノチューブ、ナノドット、ナノコーン、及び量子ドットから成る群から選択される。多様な実施形態において、金属膜又はナノ粒子は、貴金属、貴金属合金、窒化貴金属、及び／又は酸化貴金属を備える。多様な実施形態において、金属膜又はナノ粒子は、遷移金属、遷移金属合金、窒化遷移金属、及び／又は酸化遷移金属を備える。多様な実施形態において、金属膜又はナノ粒子は、磁性体、常磁性体、超常磁性体を備える。多様な実施形態において、マイクロキャピラリは、ガラス、鉱物、セラミック、及びプラスチックから成る群から選択された物質を備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリは、先端付近にナノ粒子を有するガラスマイクロキャピラリを備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリは、先端付近に金ナノ粒子を有するガラスマイクロキャピラリを備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリは、ナノ粒子がマイクロキャピラリの先端から100 μm 以内に主に配置されているガラスマイクロキャピラリを備える。

【0009】

また、細胞に対するマイクロマニピュレーション（微小操作）を実施する方法も提供される。本方法は、典型的に、本願で説明されるマイクロサージャリーツールを細胞に接触させることと、ツールに電磁エネルギーを印加することによって、金属膜又は金属ナノ粒子の温度を上昇させて、細胞の膜内へのツールの侵入を促進することを含む。特定の実施形態では、電磁エネルギーを印加することは、光を印加して金属膜又はナノ粒子を加熱することを備える。特定の実施形態では、電磁エネルギーを印加することは、レーザビームを印加して金属膜又はナノ粒子を加熱することを備える。一般的にはレーザ加熱が好ましいが、他の電磁源も想定される。従って、特定の実施形態では、電磁エネルギーを印加することは、電場を印加して金属膜又はナノ粒子を加熱することを備える。特定の実施形態では、電磁エネルギーを印加することは、電場を印加して金属膜又はナノ粒子を加熱することを備える。多様な実施形態において、金属膜又は金属ナノ粒子の温度は、大気温度よりも少なくとも100、150、200、250、300、又は350 $^{\circ}\text{C}$ 上昇する。特定の実施形態では、本方法は、マイクロキャピラリチューブを介して細胞内に物質を注入することを更に備える。特定の実施形態では、本方法は、マイクロキャピラリチューブを介して細胞から物質を取り除くことを更に備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリチューブは、中空の孔を備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリの先端の直径範囲は、略0.1 μm から略5 μm に及ぶ。特定の実施形態では、ナノ粒子のサイズ範囲は、略5 nmから略500 nm、及び／又は略10 nmから略400 nmに及ぶ。特定の実施形態では、ナノ粒子は、ナノワイヤ、ナノチューブ、ナノドット、ナノコーン、及び量子ドットから成る群から選択される。多様な実施形態において、金属膜又はナノ粒

子は、貴金属、貴金属合金、窒化貴金属、酸化貴金属を備える。多様な実施形態において、金属膜又はナノ粒子は、遷移金属、遷移金属合金、窒化遷移金属、酸化遷移金属を備える。多様な実施形態において、金属膜又はナノ粒子は、磁性体、常磁性体、超常磁性体を備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリは、ガラス、鉱物（例えば、石英）、セラミック、及びプラスチック（例えば、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレン、デルリン（登録商標）、テフロン（登録商標）等）から成る群から選択された物質を備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリは、先端付近にナノ粒子を有するガラス又は石英のマイクロキャピラリを備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリは、先端付近に金ナノ粒子を有するガラスマイクロキャピラリを備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリは、ナノ粒子がマイクロキャピラリの先端から100 μm以内に主に配置されているガラスマイクロキャピラリを備える。

10

【0010】

また、細胞に対するマイクロサージャリーを実施するためのシステムも提供され、そのシステムは、本願で説明されるマイクロサージャリーツールと、そのマイクロサージャリーツールを位置決めするためのマイクロマニピュレータ（マイクロポジショナ）とを備える。特定の実施形態では、本システムは、マイクロサージャリーツールによって操作させる細胞を可視化するための顕微鏡を更に備える。特定の実施形態では、本システムは、マイクロサージャリーツールを用いて試薬（例えば、分子、細胞小器官、流体）を送達又は取り除くためのポンプを更に備える。特定の実施形態では、本システムは、マイクロサージャリーツール上の粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜を励起するための電磁エネルギー源（例えば、レーザ）を更に備える。多様な実施形態において、電磁エネルギー源は、磁場発生器、レーザ、RF場発生器等から成る群から選択される。

20

【0011】

多様な実施形態において、本発明は、細胞に対するマイクロサージャリーのためのツールを作製するための方法を提供する。本方法は、典型的に、マイクロキャピラリチューブの先端において又はその付近において複数のナノ粒子をマイクロキャピラリチューブに付着させて、ナノ粒子に対する電磁エネルギーの印加によって局所的に加熱可能なデバイスを提供することを含む。特定の実施形態では、付着させることは、ナノ粒子をマイクロキャピラリに吸着させることを備える。特定の実施形態では、付着させることは、マイクロキャピラリ上に *in situ*（その場、インサイチュ）でナノ粒子を形成することを備える。特定の実施形態では、付着させることは、ナノ粒子をマイクロキャピラリに化学的に結合させることを備える。

30

【0012】

特定の実施形態では、本発明の単細胞手術ツールは、原子間力測定（AFM, atomic force measurement）チップを含む。例えば、ナノ粒子を、細胞手術応用のためにAFMチップと集積させることができる。このナノ粒子集積AFMチップは、チップを走査してレーザパルス印加することによって、細胞膜を所望の形状に切断することができる。

【0013】

特定の他の実施形態では、本発明のツールは、原子間力測定（AFM）チップを明示的に除外する。

40

【0014】

また、細胞内に物質（エージェント）を送達ためのデバイス（トランスフェクションデバイス）も提供される。多様な実施形態において、本デバイスは、粒子及び／又はナノ粒子及び／又は膜（例えば、薄膜）を有する表面（例えば、トランスフェクション基板）を備え、その粒子及び／又はナノ粒子及び／又は薄膜は、エネルギー源（例えば、レーザ等の電磁放射）に晒された（例えば照射された）際に加熱される物質を備える。細胞は、基板上に又はその付近に配置され得て、粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜が加熱された際に、細胞に開口が形成されて（例えば、細胞膜が透過処理されて）、細胞に対する多様な試薬の導入及び除去が可能になる。特定の実施形態では、表面は、ベッセル（例えば、細胞培

50

養ベッセル)、マイクロタイタープレート、マイクロ流体デバイスのチャンバ等の表面を備える。特定の実施形態では、表面は、マイクロタイタープレートのウェル、シリコン又はガラスのウェーハ、顕微鏡スライド、細胞培養ベッセル、マイクロ流体デバイスのチャンバ又はチャンネルの壁及び／又は床を備える。特定の実施形態では、表面は、細胞を含有するように構成され且つ顕微鏡で観察するように配置されたチャンバの表面を備える。特定の実施形態では、表面は、顕微鏡(例えば、倒立顕微鏡)のステージを置換するように構成されたチャンバの表面を備える。特定の実施形態では、チャンバは、開放した頂部を有するが、他の実施形態では、チャンバの頂部は閉じている。特定の実施形態では、表面は、ガラス、鉱物、及びプラスチックから成る群から選択された物質を備える。特定の実施形態では、表面は、I I 族物質、I I I 族物質、I V 族物質、V 族物質、及び／又はV I 族物質から選択された物質を備える。特定の実施形態では、表面はI V 族物質(例えば、シリコン、ゲルマニウム等)を備える。

【0015】

多様な実施形態において、表面は一つ又は複数のオリフィス(孔)を備える。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜は、オリフィスの表面上に又はオリフィス付近に配置される。特定の実施形態では、表面は、少なくとも2個のオリフィス、少なくとも3個のオリフィス、少なくとも4個のオリフィス、少なくとも5個のオリフィス、少なくとも8個のオリフィス、少なくとも10個のオリフィス、少なくとも15個のオリフィス、少なくとも20個のオリフィス、少なくとも25個のオリフィス、少なくとも30個のオリフィス、少なくとも40個のオリフィス、少なくとも50個のオリフィス、少なくとも75個のオリフィス、少なくとも100個のオリフィス、少なくとも200個のオリフィス、少なくとも300個のオリフィス、又は少なくとも500個のオリフィスを備える。特定の実施形態では、それらオリフィスは全て、略 2 cm^2 以下、略 1 cm^2 以下、略 0.5 cm^2 以下、又は少なくとも 0.1 cm^2 以下の前記表面の領域内に配置される。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜は全て、そのオリフィスから略 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以内、略 $50\text{ }\mu\text{m}$ 以内、略 $25\text{ }\mu\text{m}$ 以内、略 $20\text{ }\mu\text{m}$ 以内、略 $15\text{ }\mu\text{m}$ 以内、略 $10\text{ }\mu\text{m}$ 以内、又は略 $5\text{ }\mu\text{m}$ 以内に配置される。特定の実施形態では、粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜は、複数のオリフィスの表面上に及び／又は複数のオリフィス付近に配置される。特定の実施形態では、粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜は、大部分のオリフィスの表面上に及び／又は大部分のオリフィス付近に配置される。特定の実施形態では、粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜は、実質的に全てのオリフィスの表面上に及び／又は実質的に全てのオリフィス付近に配置される。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜は、オリフィスの壁上に及び／又は縁の全周囲に配置される。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜は、オリフィスの壁又は縁の一領域上に優先的に存在する。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜は、細胞が配置されているのと同じ側の表面の面上に及び／又はオリフィスの縁上に配置される。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜は、細胞が配置されているのとは反対側の表面の面上に及び／又はオリフィスの縁上に配置される。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜は薄膜を備える。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜はナノ粒子を備え、そのナノ粒子のサイズ範囲は略 5 nm から略 500 nm に及ぶ。特定の実施形態では、ナノ粒子のサイズ範囲は略 2 nm 、略 5 nm 、略 10 nm 、略 15 nm 、略 20 nm から、略 400 nm 、略 300 nm 、略 250 nm 、略 200 nm 、略 150 nm 、略 100 nm 、略 75 nm 、略 50 nm までに及ぶ。特定の実施形態では、ナノ粒子は、ナノビーズ、ナノスフィア、ナノワイヤ、ナノチューブ、ナノドット、ナノコーン、及び量子ドットから成る群から選択される。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜は、半導体、金属、金属合金、窒化金属、及び酸化金属から成る群から選択された物質を備える。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜は、遷移金属、遷移金属合金、窒化遷移金属、及び酸化遷移金属から成る群から選択された物質を備える。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜は、金、チタン(Ti)、TiN、TiCN、及びTiAlNから成る群から選択された物質を備える。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜は、I I I 族物質又はV 族物質でドーピングされたI V 族物質(例えば

、シリコン、ゲルマニウム等）を備える。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜は、ホウ素、ヒ素、リン、及びガリウムから成る群から選択された物質でドーブされたシリコン又はゲルマニウムを備える。特定の実施形態では、複数のオリフィスのうちの一つ以上が、細胞に送達される試薬を含有するチャンバと流体連結している。特定の実施形態では、本デバイスはマイクロチャネルを備え、複数のオリフィスのうちの一つ以上がそのマイクロチャネルと流体連結している。特定の実施形態では、本デバイスは複数のマイクロチャネルを備える。特定の実施形態では、別々の異なる複数のマイクロチャネルが別々の異なる複数のオリフィスと流体連結している。特定の実施形態では、本デバイスは、流体を別々の異なる複数のマイクロチャネルに送達するためのマニホールド及び／又はバルブを備える。特定の実施形態では、マイクロチャネルは、細胞内に送達される試薬を含む。特定の実施形態では、試薬は、核酸、リボザイム、タンパク質若しくはペプチド、酵素、抗体、細胞小器官、染色体、病原体、及びマイクロ粒子若しくはナノ粒子から成る群から選択される。特定の実施形態では、マイクロチャネル（又はチャンバ）は、ポンプ制御の下で加圧され、重力送りで供給が行われ、又は電動でポンピングされる。特定の実施形態では、本デバイスは、マイクロチャネル内の流れを監視及び／又は制御して、表面の照明タイミングを制御して、また、任意で表面の照明位置も制御する制御装置を更に備える。多様な実施形態において、本デバイスは、倒立顕微鏡上のステージを置換するように構成される。多様な実施形態において、一つ以上の細胞が表面上に配置されて、特定の実施形態では、細胞が基板内のオリフィス上に又はこれに隣接して配置される。特定の実施形態では、細胞は哺乳類細胞（例えば、ヒト細胞、ヒト以外の哺乳類細胞）である。特定の実施形態では、細胞は幹細胞（例えば、胎児幹細胞、臍帯血幹細胞、成体幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC, induced pluripotent stem cell）等）である。

【0016】

特定の実施形態では、一つの細胞又は一組の細胞に開口部を選択的に形成するためのシステムが提供される。特定の実施形態では、本システムは、細胞内に薬剤を選択的に送達するためのものである。本システムは、典型的には、トランスフェクション基板（例えば、上述のもの）を備えたデバイスと、ナノ粒子又は薄膜を加熱可能な電磁エネルギー源とを備える。特定の実施形態では、電磁エネルギー源は、レーザ、又は非コヒーレント光源である。特定の実施形態では、電磁エネルギー源はレーザである。特定の実施形態では、本システムは、レンズシステム、ミラーシステム、又はマスク、及び／又は表面の特定領域に電磁エネルギーを向けるための位置決めシステムを備える。特定の実施形態では、本システムは、電磁放射源による照射のタイミング及び／又はパターンを制御する制御装置を備える。

【0017】

特定の実施形態では、一つの細胞又は一組の細胞に選択的に開口部を形成するための方法が提供される。特定の実施形態では、本方法を用いて、細胞内に一つの試薬（又は多数の試薬）を選択的に送達することができる。多様な実施形態において、本方法は、トランスフェクション基板及び／又は（例えば上述のようなもの）を利用する。従って、特定の実施形態では、細胞内に試薬を送達するための方法が提供される。本方法は、トランスフェクション基板（例えば、上述のようなもの）を備えたデバイス上に、及び／又は細胞をトランスフェクションするためのデバイスを備えたシステム（細胞は表面（トランスフェクション基板）上に配置される）に細胞を提供することと、細胞を試薬と接触させることと、表面の領域を電磁放射に晒すことによって薄膜及び／又は粒子の加熱を誘起することとを備え、その加熱が、加熱された領域において（又はその付近において）細胞膜に開口部を導入する気泡を形成して、試薬が細胞内に送達される。特定の実施形態では、細胞を取り囲む流体（例えば、緩衝剤、培養媒体）内に試薬を提供することによって、細胞を試薬と接触させる。特定の実施形態では、表面に存在している一つ以上のオリフィスに試薬を提供することによって、細胞を試薬と接触させる。特定の実施形態では、オリフィスと流体連結している一つ以上のマイクロ流体チャネルに試薬を提供することによって、細胞

を試薬と接触させる。特定の実施形態では、別々の試薬が別々のオリフィスに送達される。特定の実施形態では、晒すことは、基板の領域をレーザパルス又は非コヒーレント光源に晒すことを備える。特定の実施形態では、試薬は、核酸、染色体、タンパク質、標識、細胞小器官、及び有機小分子から成る群から選択される。

【0018】

特定の実施形態では、マイクロキャピラリの先端を、導光体として及び／又は先端における加熱分布を微調整するものとして利用した、細胞に対するマイクロマニピュレーションを実施するための方法が提供される。特定の実施形態では、本方法は、細胞をマイクロサージャリーツールと接触させること（そのツールは、先端に及び／又は先端付近に電磁エネルギーの印加によって加熱可能な金属膜（コーティング）又は金属ナノ粒子を有するマイクロキャピラリを備える）と、ツールに電磁エネルギーを印加することによって、金属膜又は金属ナノ粒子の温度を上昇させて、細胞膜に開口を形成することを含み、マイクロサージャリーツールと細胞との接触角及び／又は電磁エネルギーの偏光を変化させて、細胞内に導入された開口部のサイズ及び／又は形状を変更する。特定の実施形態では、電磁エネルギーを印加することは、光（例えば、レーザや非コヒーレント光）を印加して、膜又はナノ粒子を加熱することを備える。特定の実施形態では、マイクロサージャリーツールの先端は導光体として機能するように構成される。特定の実施形態では、電磁エネルギーを印加することは、電場及び／又は磁場を印加して金属膜又はナノ粒子を加熱することを備える。特定の実施形態では、金属膜又は金属ナノ粒子の温度は、大気温度よりも少なくとも150℃上昇する。特定の実施形態では、本方法は、マイクロキャピラリチューブを介して細胞内に試薬を注入することを更に備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリの先端のサイズ範囲は略0.1 µmから略5 µmに及ぶ。特定の実施形態では、ナノ粒子のサイズ範囲は略5 nmから略500 nmに及ぶ。特定の実施形態では、金属膜又はナノ粒子は半導体を備え、又は、貴金属、貴金属合金、窒化貴金属、及び酸化貴金属から成る群から選択された金属を備える。特定の実施形態では、金属コーティング又はナノ粒子は、遷移金属、遷移金属合金、窒化遷移金属、酸化遷移金属を備える。特定の実施形態では、金属コーティング又はナノ粒子は、金、チタン（Ti）、TiN、TiCN、及びTiAlNから成る群から選択された物質を備える。特定の実施形態では、マイクロキャピラリは、ガラス、鉱物、セラミック、及びプラスチックから成る群から選択された物質を備える。特定の実施形態では、ナノ粒子又は膜は膜を備える。特定の実施形態では、ナノ粒子又は膜はナノ粒子を備える。

【0019】

[定義]

“ナノ粒子”との用語は、本願において、電子顕微鏡画像及び／又は標準的な2シートX線回折走査の回折ピーク半値幅で測定して、略800 nm、700 nm、600 nm、又は500 nm以下、好ましくは200 nm、150 nm、又は100 nm以下、より好ましくは略50 nm又は20 nm以下の平均サイズの、又は、略10 nm以下の微結晶サイズの、少なくとも一寸法を有する粒子を指称する。特定の実施形態では、好ましくは、サイズ分布の第一標準偏差は、平均粒子サイズの60%以下、好ましくは40%以下、最も好ましくは15から30%である。

【0020】

ナノ粒子のサイズに関する“サイズ範囲”との表現は、ナノ粒子が主に存在するサイズ範囲のことを示す。従って、例えば、特定の実施形態では、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%、99%、又は全てのナノ粒子がそのサイズ範囲内に存在する。

【0021】

“遷移金属”との用語は、周期表のDブロック元素（亜鉛、カドミウム、水銀を除く）を典型的に指称する。

【0022】

“マイクロキャピラリチューブ”、“マイクロキャピラリ”、“マイクロピペット”と

の用語は相互可換に使用される。“マイクロキャピラリ”は、略50 μm 未満、好ましくは略25 μm 未満、より好ましくは略15 μm 若しくは10 μm 未満、最も好ましくは略5 μm 未満の直径の先端を有するチューブである。特定の実施形態では、マイクロキャピラリは、略2 μm 以下の先端直径を有する。特定の実施形態では、マイクロキャピラリはソリッドロッドとなり得る。特定の実施形態では、マイクロキャピラリを、より大きな先端直径（例えば、本願で説明されるように略200 nmを超える）を有するピペット（キャピラリチューブ）と置換することができる。

【0023】

“核酸”、“オリゴヌクレオチド”、又はこれらと文意上等価な用語は、本願において、互いに共有結合した少なくとも二つのヌクレオチドを指称する。本発明の核酸は、好ましくは一重鎖又は二重鎖であり、一般的にはホスホジエステル結合を含むが、場合によっては、以下で概説するように、代替りの主鎖を有する核酸類似体も含まれ、例えば、ホスホアミド（非特許文献16、及びその中の参考文献である非特許文献17、非特許文献18、非特許文献19、非特許文献20、非特許文献21、非特許文献22）、ホスホロチオエート（非特許文献23、特許文献1）、ホスホロジチオエート（特許文献24）、O-メチルホスホラミダイト結合（非特許文献25を参照）、ペプチド核酸主鎖及び結合（非特許文献26、非特許文献27、非特許文献28、非特許文献29を参照）を備える。他の類似核酸として、陽性主鎖（非特許文献30）、非イオン性主鎖（特許文献2、特許文献3、特許文献4、特許文献5、特許文献6、非特許文献31、非特許文献32、非特許文献33、非特許文献34、非特許文献35、非特許文献36、非特許文献37）、非リボース主鎖（特許文献7、特許文献8、非特許文献38に記載されているもの等）が挙げられる。一以上の炭素環糖を含有する核酸も、核酸の定義に含まれる（特許文献39を参照）。いくつかの核酸類似体が非特許文献40に記載されている。リボースリン酸主鎖のこうした修飾を行い、ラベル等の追加的部分を加えることを容易にしたり、生理学的環境におけるこうした分子の安定性及び半減期を増やしたりすることができる。

【0024】

“ポリペプチド”、“ペプチド”、“タンパク質”との用語は、アミノ酸残基のポリマーを指称するものとして本願において相互可換に使用される。これらの用語は、一以上のアミノ酸残基が対応する自然発生アミノ酸の人工化学類似物であるアミノ酸ポリマーに適用され、また、自然発生アミノ酸ポリマーにも適用される。また、これらの用語は、ポリペプチドを構成するアミノ酸を結合する従来のペプチド結合に対する変形例も含む。好ましくは、“ペプチド”、“ポリペプチド”、“タンパク質”は、 α 炭素がペプチド鎖を介して結合しているアミノ酸鎖である。従って、鎖の一端の末端アミノ酸（アミノ末端）が自由アミノ基を有する一方、鎖の他端の末端アミノ酸（カルボキシ末端）は自由カルボキシル基を有する。本願において、“アミノ末端”との用語（N末端と略称される）は、ペプチドのアミノ末端におけるアミノ酸の自由 α アミノ基、又はペプチド内の他の箇所におけるアミノ酸の α アミノ基（ペプチド結合に関与する場合にはイミノ基）を指称する。同様に、“カルボキシ末端”との用語は、ペプチドのカルボキシ末端の自由カルボキシル基、又は、ペプチド内の他の箇所におけるアミノ酸のカルボキシル基を指称する。また、ペプチドは、本質的にあらゆるポリアミノ酸を含み、アミド結合とは対照的にエーテルによって結合されたアミノ酸等のペプチド模倣薬が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0025】

“試薬”との用語は、細胞内に送達される物質に関して用いられる場合、細胞内に送達される（又は細胞から抽出される）あらゆる物質を含む。このような試薬として、核酸（例えば、ベクター及び／又は発現カセットを含む）、抑制RNS（例えばsiRNA、shRNA、miRNA等）、リボザイム、タンパク質／ペプチド、酵素、抗体、イメージング試薬、細胞小器官（例えば、核、ミトコンドリア、核小体、リソソーム、リボソーム等）、染色体、細胞内病原体、無生物粒子（量子ドット、表面増強ラマン散乱（SERS）粒子、マイクロビーズ等）等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】細胞手術ツールの一実施形態を概略的に示す。

【図2】炭素でコーティングされたガラスマイクロピペットのSEM画像（左図）と、合成された金ナノ粒子のTEM画像（右図）とを示す。

【図3】レーザパルス印加前後の細胞を示す。（上）ガラスマイクロピペット（中）炭素でコーティングされたマイクロピペット（下）金ナノ粒子でコーティングされたマイクロピペット

【図4】3.2（A：24時間）及び5.8（C：72時間）のアスペクト比のTEM画像を示す。

【図5】プラスチック基板上に金ナノ粒子を直接衝突させるためのバイオリスティック注入器を用いたトランスフェクション基板の製造を示す（左図）。中央図は基板上的の典型的な粒子を示し、右図は、基板上的の粒子密度を示す。

【図6】A～Dは、薄膜を加熱して（例えば、レーザパルスを用いる）アニーリングされた粒子を形成することによって、表面上にナノ粒子を形成する方法を示す。この例では、2nmのチタン接着層を備えた30nmの金膜が、 113.2 mJ/cm^2 で100回のパルスでのパルスレーザ（532nm、6ns）で加熱された。粒子サイズの範囲は0.1から0.7 μm までであった（例えば、図Cを参照）。粒子密度は略 $0.65\text{ 個}/\mu\text{m}^2 = 1\text{ 細胞あたり } 65\text{ 個の粒子}$ （細胞面積 $\sim 10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ と仮定）であった。

【図7】金ナノ粒子でコーティングされた基板を用いて光パターン化分子送達を行うことのできるデバイスの一実施形態の概略を示す。

【図8】光パターン化分子送達用の実験設定と、キャビテーション気泡の動力学を撮影するのに用いられた時間分解イメージングシステムとの概略を示す。

【図9】金粒子状のパルスレーザ照射によって誘起された気泡を示す。（a）レーザパルス印加前（b）レーザパルス印加の78ns後。バーは50 μm である。

【図10】シャドウマスクを用いたHEK293T細胞内への光パターン化蛍光色素摂取を示す。（a）明視野（b）蛍光画像（マスクが破線の右側を覆っていた。）

【図11】293T細胞に対する準備的な光熱ピペットの試験を示す。左側がレーザパルス印加前で、右側がレーザパルス印加後である。ピペットは異なる厚さのAu/Pd薄膜でコーティングされていた。膜厚は（a）で5nmであり、（b）で13nmであった。両実験で用いられたレーザフルーエンスは 88.3 mJ/cm^2 であった。

【図12】aからcは、金薄膜でコーティングされたピペットを用いた接着性293T細胞内へのGFPEncodeイングプラスミドのマイクロインジェクションを示す。a：マイクロインジェクション手順。b：注入から24時間後の細胞の蛍光画像であり、細胞が生きていてGFPEを発現していることが示されている。c：位相コントラスト画像及び蛍光画像を重ねた画像。

【図13】光ピンセットと組み合わせたプラズモン光熱ピペットを用いた非接着性細胞マイクロインジェクションの概略（上図）と、光熱ピペットの先端に接触しつつ光ピンセットによってトラップされたNaIm-6細胞を示す画像（下図）を示す。

【図14】細胞内への一以上の試薬の並列的で選択的な送達用の基板を概略的に示す。

【図15】細胞内に試薬を選択的に送達するためのマイクロチャネルを備えた“トランスフェクション基板”の一構成を概略を示す。

【図16A】図16Aから図16Cは、細胞内への一以上の試薬の並列的で選択的な送達のための例示的な一基板の動作を概略的に示す。図16Aに示されるように、アレイ中の複数のオリフィスのうち一つの上に細胞が配置されて、そのオリフィスはマイクロチャネルと流体連結している。図示されるように、オリフィスの一方の縁は薄膜（この場合チタン）でコーティングされている。エネルギー源（例えば、レーザパルス）を用いて膜を加熱する。これは、図16Bに示されるように薄膜の加熱をもたらす。膨張する蒸気泡が形成されて、細胞の脂質二重層を介する開口が形成される。図16Cに示されるように、受動的な拡散又は能動的なポンピングによって、送達可能な物質がマイクロチャネルからオ

10

20

30

40

50

リフィスを通して細胞内に入る。

【図 1 6 B】図 1 6 A から図 1 6 C は、細胞内への一以上の試薬の並列的で選択的な送達のための例示的な基板の動作を概略的に示す。図 1 6 A に示されるように、アレイ中の複数のオリフィスのうち一つの上に細胞が配置されて、そのオリフィスはマイクロチャネルと流体連結している。図示されるように、オリフィスの一方の縁は薄膜（この場合チタン）でコーティングされている。エネルギー源（例えば、レーザパルス）を用いて膜を加熱する。これは、図 1 6 B に示されるように薄膜の加熱をもたらす。膨張する蒸気泡が形成されて、細胞の脂質二重層を介する開口が形成される。図 1 6 C に示されるように、受動的な拡散又は能動的なポンピングによって、送達可能な物質がマイクロチャネルからオリフィスを通して細胞内に入る。

10

【図 1 6 C】図 1 6 A から図 1 6 C は、細胞内への一以上の試薬の並列的で選択的な送達のための例示的な基板の動作を概略的に示す。図 1 6 A に示されるように、アレイ中の複数のオリフィスのうち一つの上に細胞が配置されて、そのオリフィスはマイクロチャネルと流体連結している。図示されるように、オリフィスの一方の縁は薄膜（この場合チタン）でコーティングされている。エネルギー源（例えば、レーザパルス）を用いて膜を加熱する。これは、図 1 6 B に示されるように薄膜の加熱をもたらす。膨張する蒸気泡が形成されて、細胞の脂質二重層を介する開口が形成される。図 1 6 C に示されるように、受動的な拡散又は能動的なポンピングによって、送達可能な物質がマイクロチャネルからオリフィスを通して細胞内に入る。

20

【図 1 7】図 1 4 に示されるもののような基板を製造する方法を概略的に示す。

【図 1 8】例示的なトランスフェクション基板の写真を示す。

【図 1 9】試薬送達基板上の並列的な気泡励起を示す。基板にレーザパルス（パルス幅 6 ns、波長 532 nm）を照射することによって、各円形開口に気泡が同期的に発生した。新月状の Ti 薄膜コーティングのため、気泡の破裂は、シリンダー状の側壁の一部に沿ってのみ生じた。

【図 2 0】a 及び b は、膜の開口（a）と、HeLa 細胞への試薬の送達のための試薬送達基板の使用（b）とを示す。膜不透過性緑色蛍光 FITC デキストラン（分子量 = 3 kDa）を、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で細胞培地に担持した。156 mJ/cm^2 のレーザパルス印加後、円形オリフィス上に成長しレーザトリガー気泡破裂に晒された細胞における蛍光色素摂取を観測した。この場合、送達は受動拡散によるものである。

30

【図 2 1】生哺乳類細胞内へのカーゴ送達用の光熱ナノブレードを用いた超高速膜切断のメカニズムを示す。ナノ秒レーザパルスによる励起後、Ti は、熱伝導によって周囲の水薄層と共に急速に加熱される。＜1 μs で膨張及び崩壊する破裂性蒸気ナノ気泡は、マイクロキャピラリ部分の圧力駆動送達と同期して、接触している細胞膜を切断する。

【図 2 2 A】図 2 2 A から図 2 2 D は、Ti でコーティングされたマイクロピペットの構造と、レーザ励起による強度パターンの計算結果とを示す。図 2 2 A 及び図 2 2 B は、引き伸ばされて Ti でコーティングされたマイクロピペットの走査型電子顕微鏡画像である。内側直径 = $1.38 \pm 0.1 \mu\text{m}$ （平均 ± 標準偏差）。外側直径 = $1.88 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 。Ti 薄膜の厚さ = $102 \pm 8 \text{ nm}$ 。（矢印は、マイクロピペット内部を走るガラスフィラメントの縁を示す。）図 2 2 C は、レーザ励起でのマイクロピペットの先端における正規化強度プロファイルである。（ $n_{\text{Ti}} = 1.86 + 2.56i$ （非特許文献 41）、 $n_{\text{glass}} = 1.46$ 、 $n_{\text{water}} = 1.34$ 、 $\lambda = 532 \text{ nm}$ 、 $\theta = 30^\circ$ ）。図 2 2 D は、マイクロピペットの先端における Ti リングの時間平均光吸収プロファイル（ $\propto |E_{\text{ave}}|^2$ ）である。

40

【図 2 2 B】図 2 2 A から図 2 2 D は、Ti でコーティングされたマイクロピペットの構造と、レーザ励起による強度パターンの計算結果とを示す。図 2 2 A 及び図 2 2 B は、引き伸ばされて Ti でコーティングされたマイクロピペットの走査型電子顕微鏡画像である。内側直径 = $1.38 \pm 0.1 \mu\text{m}$ （平均 ± 標準偏差）。外側直径 = $1.88 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 。Ti 薄膜の厚さ = $102 \pm 8 \text{ nm}$ 。（矢印は、マイクロピペット内部を走るガラスフィラメントの縁を示す。）図 2 2 C は、レーザ励起でのマイクロピペットの先端における

50

正規化強度プロファイルである。($n_{Ti} = 1.86 + 2.56i$ (非特許文献41)、 $n_{glass} = 1.46$ 、 $n_{water} = 1.34$ 、 $\lambda = 532\text{ nm}$ 、 $\theta = 30^\circ$)。図22Dは、マイクロピペットの先端におけるTiリングの時間平均光吸収プロファイル ($\propto |E_{ave}|^2$) である。

【図22C】図22Aから図22Dは、Tiでコーティングされたマイクロピペットの構造と、レーザ励起による強度パターンの計算結果とを示す。図22A及び図22Bは、引き伸ばされてTiでコーティングされたマイクロピペットの走査型電子顕微鏡画像である。内側直径 = $1.38 \pm 0.1\text{ }\mu\text{m}$ (平均±標準偏差)。外側直径 = $1.88 \pm 0.1\text{ }\mu\text{m}$ 。Ti薄膜の厚さ = $102 \pm 8\text{ nm}$ 。(矢印は、マイクロピペット内部を走るガラスフィラメントの縁を示す。) 図22Cは、レーザ励起でのマイクロピペットの先端における正規化強度プロファイルである。($n_{Ti} = 1.86 + 2.56i$ (非特許文献41)、 $n_{glass} = 1.46$ 、 $n_{water} = 1.34$ 、 $\lambda = 532\text{ nm}$ 、 $\theta = 30^\circ$)。図22Dは、マイクロピペットの先端におけるTiリングの時間平均光吸収プロファイル ($\propto |E_{ave}|^2$) である。

【図22D】図22Aから図22Dは、Tiでコーティングされたマイクロピペットの構造と、レーザ励起による強度パターンの計算結果とを示す。図22A及び図22Bは、引き伸ばされてTiでコーティングされたマイクロピペットの走査型電子顕微鏡画像である。内側直径 = $1.38 \pm 0.1\text{ }\mu\text{m}$ (平均±標準偏差)。外側直径 = $1.88 \pm 0.1\text{ }\mu\text{m}$ 。Ti薄膜の厚さ = $102 \pm 8\text{ nm}$ 。(矢印は、マイクロピペット内部を走るガラスフィラメントの縁を示す。) 図22Cは、レーザ励起でのマイクロピペットの先端における正規化強度プロファイルである。($n_{Ti} = 1.86 + 2.56i$ (非特許文献41)、 $n_{glass} = 1.46$ 、 $n_{water} = 1.34$ 、 $\lambda = 532\text{ nm}$ 、 $\theta = 30^\circ$)。図22Dは、マイクロピペットの先端におけるTiリングの時間平均光吸収プロファイル ($\propto |E_{ave}|^2$) である。

【図23A】図23Aから図23Cは、光熱ナノブレードによる超高速膜切断と細胞生存率の評価を示す。図23Aは、細胞膜と接触した際のピペットの先端の縁から $0.4\text{ }\mu\text{m}$ までの最大半径を有するナノ気泡を示す。図23Bは、自由懸濁液中の 270 ns 以内の及びHeLa細胞膜としている 170 ns 以内の蒸気ナノ気泡の膨張及び崩壊動力学を示す。図23Cは、光熱送達後の細胞生存率を示す。対照実験を、ガラスのみのマイクロピペットを細胞に接触させて、同一のフルーエンス ($180\text{ mJ}/\text{cm}^2$) のレーザパルス

を照射することによって行った。細胞生存率は $>90\%$ であり、細胞がレーザパルス印加及び膜開口のみを受けた場合には、 $98 \pm 11\%$ (平均±標準偏差) であり、細胞がレーザパルス印加及び液体注入を受けた場合には、 $94 \pm 4\%$ であった。

【図23B】図23Aから図23Cは、光熱ナノブレードによる超高速膜切断と細胞生存率の評価を示す。図23Aは、細胞膜と接触した際のピペットの先端の縁から $0.4\text{ }\mu\text{m}$ までの最大半径を有するナノ気泡を示す。図23Bは、自由懸濁液中の 270 ns 以内の及びHeLa細胞膜としている 170 ns 以内の蒸気ナノ気泡の膨張及び崩壊動力学を示す。図23Cは、光熱送達後の細胞生存率を示す。対照実験を、ガラスのみのマイクロピペットを細胞に接触させて、同一のフルーエンス ($180\text{ mJ}/\text{cm}^2$) のレーザパルス

を照射することによって行った。細胞生存率は $>90\%$ であり、細胞がレーザパルス印加及び膜開口のみを受けた場合には、 $98 \pm 11\%$ (平均±標準偏差) であり、細胞がレー

ザパルス印加及び液体注入を受けた場合には、 $94 \pm 4\%$ であった。

【図24】光熱ナノブレードによって送達可能な多様なカーゴサイズを示す。GF P 発現RNAを、リポフェクタミン耐性IMR90一次ヒト肺線維芽細胞内に送達した。100nmの緑色蛍光ビーズ上にコーティングしたDsRed含有レンチウイルスが、移植後にROCK抑制剤分散ヒト胚性幹細胞内に発現した。直径200nmの蛍光ビーズを詰まらせずにHEK293T細胞内に送達した。HeLa細胞内へのバークホルデリア・タイランデンシス細菌の移植を高効率及び高細胞生存率で達成した。

【図25A】図25Aから図25Cは、光熱ナノブレードによるHeLa細胞内への高効率細菌送達を示す。図25Aは、移植後の細菌接種の過程を示す（非特許文献42）。図25Bは、GF P 標識バークホルデリア・タイランデンシスが、赤色蛍光デキストランテトラメチルローダミンと共に、HeLa細胞内へ移植された様子を示す（平均効率= $46 \pm 33\%$ （平均（標準偏差）））。共焦点z軸走査は、赤色蛍光細胞内部の多数の細菌を示している。図25Cは、HeLa細胞内に移植されたmCherry標識バークホルデリア・タイランデンシスの増殖及びアクチン重合を示す。

10

【図25B】図25Aから図25Cは、光熱ナノブレードによるHeLa細胞内への高効率細菌送達を示す。図25Aは、移植後の細菌接種の過程を示す（非特許文献42）。図25Bは、GF P 標識バークホルデリア・タイランデンシスが、赤色蛍光デキストランテトラメチルローダミンと共に、HeLa細胞内へ移植された様子を示す（平均効率= $46 \pm 33\%$ （平均（標準偏差）））。共焦点z軸走査は、赤色蛍光細胞内部の多数の細菌を示している。図25Cは、HeLa細胞内に移植されたmCherry標識バークホルデリア・タイランデンシスの増殖及びアクチン重合を示す。

20

【図25C】図25Aから図25Cは、光熱ナノブレードによるHeLa細胞内への高効率細菌送達を示す。図25Aは、移植後の細菌接種の過程を示す（非特許文献42）。図25Bは、GF P 標識バークホルデリア・タイランデンシスが、赤色蛍光デキストランテトラメチルローダミンと共に、HeLa細胞内へ移植された様子を示す（平均効率= $46 \pm 33\%$ （平均（標準偏差）））。共焦点z軸走査は、赤色蛍光細胞内部の多数の細菌を示している。図25Cは、HeLa細胞内に移植されたmCherry標識バークホルデリア・タイランデンシスの増殖及びアクチン重合を示す。

【図26】多様なレーザ偏光及びマイクロピペットの向きにおいて光熱ナノブレードによって生成される細胞膜切断パターンを示す。レーザフルエンス= $360 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ 。ピペット先端の直径= $2 \mu\text{m}$ 。Aは直線偏光、Bは円偏光、Cは垂直軸から 30° 傾斜させたマイクロピペットでの直線偏光レーザ励起を示す。バーは $1 \mu\text{m}$ である。

30

【図27】ナノブレードの先端における熱分布に対する照射角度及び偏光の影響を示す。瞬間強度が上の行に示されていて、時間平均強度が下の行に示されている。左の列は直線偏光での垂直な向きの先端を示す。中央の列は、円偏光での垂直な向きの先端を示す。右の列は、直線偏光での傾斜させた先端（ 30° ）を示す。

【図28A】図28Aから図28Cは、細胞内に設けられた開口における照射角度及び偏光の影響を示す。図28Aは、直線偏光を用いて加熱した垂直ピペット（ナノブレード）で設けられた開口を示す。図28Bは、円偏光を用いた加熱した垂直ピペット（ナノブレード）で設けられた開口を示す。図28Cは、傾斜ピペット（ナノブレード）で設けられた開口を示す。

40

【図28B】図28Aから図28Cは、細胞内に設けられた開口における照射角度及び偏光の影響を示す。図28Aは、直線偏光を用いて加熱した垂直ピペット（ナノブレード）で設けられた開口を示す。図28Bは、円偏光を用いた加熱した垂直ピペット（ナノブレード）で設けられた開口を示す。図28Cは、傾斜ピペット（ナノブレード）で設けられた開口を示す。

【図28C】図28Aから図28Cは、細胞内に設けられた開口における照射角度及び偏光の影響を示す。図28Aは、直線偏光を用いて加熱した垂直ピペット（ナノブレード）で設けられた開口を示す。図28Bは、円偏光を用いた加熱した垂直ピペット（ナノブレード）で設けられた開口を示す。図28Cは、傾斜ピペット（ナノブレード）で設けられ

50

た開口を示す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

特定の実施形態では、本発明は、単細胞に対する“手術”用の新規ツール／デバイスに関し、また、細胞操作及び／又は細胞に対する試薬の送達又は抽出用の基板に関する。

【0028】

[細胞に対する手術用の手術ツール]

多様な実施形態において、“単細胞手術ツール”は、最小の細胞損傷で、マイクロインジェクション（微量注入）、マイクロエクストラクション（微量抽出）、及び／又は細胞内操作を行うものとして提供される。これは、脂質二重層によって区切られたあらゆる細胞（例えば、真核細胞、より好ましくは脊椎動物細胞、更に好ましくは哺乳類細胞）に対して使用可能である。特定の実施形態では、本デバイスは、細胞壁を備えた細胞（例えば、植物細胞）に対して利用可能である。

【0029】

特定の例示の実施形態では、本デバイスはマイクロキャピラリチューブ（例えば、マイクロピペット）を備え、そのマイクロキャピラリチューブは、マイクロキャピラリチューブの先端又はその付近に“エネルギー吸収”ナノ粒子及び／又は“エネルギー吸収”薄膜を備える。本デバイスは、マイクロキャピラリ上にコーティングされた金属膜（例えばナノコーティング）及び／又は金属粒子／ナノ粒子の励起／加熱（例えばレーザ誘起加熱）によって、細胞の正確で制御可能なナノスケール修飾を達成する。特定の理論に縛られるものではないが、細胞の表面に近付けると又は接触させると、この極端な局所的加熱が、細胞膜（及び／又は細胞壁）に正確なサイズの孔を穿つと考えられる。このようにして、現状のマイクロインジェクション及びエクストラクション法に伴う機械的及び生物化学的損傷を誘発せずに、マイクロピペットが簡単に細胞膜を貫くことができる。従って、本ツールは、小型で機械的に脆弱な細胞に対する高い成功率での手術を促進する。

【0030】

単細胞マイクロインジェクションは、細胞内に異物を導入するための、細胞間における細胞成分の抽出及び移植のための、及び／又は細胞内に一般的に見られない成分（プローブ、検出器、遺伝子組み換え細胞小器官、遺伝子、タンパク質等）の導入のための強力な多目的技術である。従来のガラスピペット法（遺伝子組み換えマウスを産み出すために使われるもの等）は、細胞に対して大きな機械的及び生物化学的ストレスを課し、特に機械的に脆弱な細胞に対して成功率が低い。

【0031】

現状のレーザ誘起細胞アブレーション法はこの機械的ストレスを排除するが、高度に集束した光を必要として、損傷体積が回折限界となる。対照的に、本願で説明される細胞手術ツールは、ピペット先端における又はその付近での粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜の局所的加熱によって、キャピラリマイクロピペットの先端又はその付近でのナノメートルサイズのスケールでの操作（例えばアブレーション）を達成することができる。粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜は、電磁放射（例えば、電場、磁場、RF場、広帯域又は集束レーザパルス等）を用いて加熱される。

【0032】

多様な実施形態において、本願で説明される細胞手術法は、金属粒子／ナノ粒子及び／又は金属薄膜の光熱効果を利用する。例えば、粒子の幾何学的形状（例えば、アスペクト比）及び／若しくは組成、並びに／又は膜の厚さ又は組成を制御することによって、電磁放射（例えば、レーザエネルギー）が粒子及び／又は薄膜には強力に吸収されるが、その近傍の細胞又は細胞成分には強力に吸収されないようにして、従来のレーザベースの細胞操作法によって生じる細胞又は遺伝子の損傷を回避するように、物質を“微調整”することができる。現状のレーザ細胞法は、アブレーション又はキャビテーション効果を生じさせるために細胞成分によるレーザ出力の強力な吸収に困っているものである。このようなプロセスは細胞を損傷させる可能性があり、細胞成分の望ましくない破壊や、操作されて

いる細胞の生態に影響し得る化学的効果を生じさせる可能性がある。

【0033】

対照的に、本願で説明されるマイクロサージャリーツールを利用すると、レーザ又は他の電磁エネルギー源を用いて、マイクロキャピラリピペットに結合されて細胞膜に局在化した粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜を加熱することができる。従って、エネルギー源（例えば、レーザ）が、操作されている細胞を実質的に損傷しない。

【0034】

物質の選択に応じて、ナノ粒子及び／又は薄膜は、本質的にあらゆる電磁放射の印加によって励起（加熱）可能である。従って、多様な実施形態において、ナノ粒子及び／又は薄膜の加熱は、磁場及び／又は電場及び／又はRF場及び／又は光（例えば、レーザ）の印加によって達成される。

10

【0035】

例えば、金属粒子、ナノ粒子、薄膜は、表面プラズモン周波数に近い周波数（一般的に可視及び近赤外線範囲内）の電磁波を強力に吸収する。粒子、ナノ粒子、薄膜は、吸収されたエネルギーによって急速に加熱され、周囲媒体の蒸発を伴う過熱現象を生じさせる。細胞手術ツールの特定の実施形態では、例えば図1に示されるように、個々の又は多数のナノ粒子がマイクロピペットの先端（チップ）上にコーティングされる。レーザパルス励起によって、ナノメートル直径の蒸気泡がナノ粒子周辺に生成される。細胞表面に近付くか又は接触させると、このプロセスは、細胞膜（及び／又は細胞壁）に制御された正確なサイズの孔を発生させる。このようにして、マイクロピペットは、現状のマイクロインジェクション及びエクストラクション法に付随する機械的及び生物化学的損傷を誘発せずに、細胞膜を簡単に貫くことができる。キャビテーション又は“孔開け”プロセスは数ナノ秒で完了する。結果として、膜の残りの部分には反応する時間がなく、機械的に影響を受けていないままである。ピペットが細胞内の適切な箇所に存在していると、ピペットの中空のボア（孔）を介して通された光ファイバデバイス等のデバイスの操作に、“膜孔”を開いたままにすることができる。特定の実施形態では、マイクロキャピラリの先端に及び／又はその付近に配置された金属薄膜を用いて、同様の効果を得ることができる。

20

【0036】

例示的な一動作モードでは、顕微鏡（例えば、倒立顕微鏡）下で、マイクロマニピュレータ及び／又は自動（例えば、ピエゾ駆動）ステージによって、マイクロピペットを標的細胞の隣に配置することができる。マイクロピペットの先端にレーザ（又は他のエネルギー源）パルスを印加することによって、細胞の顕著な変形を生じさせずに、ピペットが簡単に膜を貫通する。ピペットが細胞内部に存在していると、後続の分子及び細胞成分の注入や抽出を実施することができ、生細胞の細胞内操作が可能となる。

30

【0037】

従って、細胞手術ツールを用いて、単細胞マイクロインジェクション及び／又はエクストラクション及び／又は細胞内操作を実施することができる。接着細胞膜に対する孔開けについて説明してきたが、これは、懸濁液中の細胞に対して、光学ピンセットを用いて固定した細胞に対して、及び／又は標準的な吸引ベースの保持ピペットを用いたクラスター、コロニー又はクランプ内で日々成長している細胞に対して容易に拡張される。例示的な実験結果が図3に示されている。

40

【0038】

多様な実施形態において、ピペット（ナノブレード）の角度を変更することによって、及び／又はレーザ偏光を変更することによって、異なった膜切断を達成することができる。例えば、ピペットが0度（垂直）から30度に傾くと、チタンリング上のホットスポット（高温スポット）が、正反対の位置から互いに近づいて移動する（例えば、図27を参照）。その結果としての膜の切断は、“蝙蝠の眼（バットアイ）”状になる（例えば、図28A～図28Cを参照）。

【0039】

切断パターンを制御する他の要因（Optics Express誌で述べられている

50

）は、ピペット先端のサイズである。ピペットの先端サイズが2マイクロメートルに低下すると、熱が二つのホットスポット間で拡散して、膜状に一つの“猫用ドア（キャットドア）”状の切断部を生じさせることができる。

【0040】

これは図26に示されている。光熱ナノブレードによる切断パターンをイメージング用に保存するため、HeLa（ヒーラ）細胞をグルタルアルデヒドで20分間にわたって前処理して、タンパク質架橋を誘起して、細胞膜が再び閉じることを著しく遅くした。レーザパルス（ $360\text{ mJ}/\text{cm}^2$ のレーザフルーエンス）印加（ $360\text{ mJ}/\text{cm}^2$ のレーザフルーエンス）中に、 $2\text{ }\mu\text{m}$ のサイズの先端直径のTiコーティングマイクロピペットを、細胞膜表面に垂直に軽く接触させて配置した。

10

【0041】

レーザパルス印加後に、細胞膜を走査型電子顕微鏡で撮像した。直線偏光レーザパルスを印加することによって、Tiナノ構造でコーティングされた先端の両側に沿って、二つの孔（各々 $<1\text{ }\mu\text{m}$ ）が細胞膜に切り取られた一方で、円偏光レーザ励起によって、円形切断部（直径略 $1.5\text{ }\mu\text{m}$ ）が形成されて、対応する気泡のパターンと一致している（図26（a）及び26（b））。マイクロキャピラリを傾斜させて、Tiリングの一方の側のみが細胞膜と光接触するようにすることによって、略 $1.5\text{ }\mu\text{m}$ の“猫用ドア”の半月状開口部が膜に形成された（図26（c））。これらの制御させた切断パターンは再現性の高いものであった。

【0042】

20

他の例示的であるが非限定的な構成では、ピペットが、ガラスキャピラリの先端及び外壁の両方にチタンコーティングを有する。この場合、気泡は一般的にチップの全周囲に発生する（ドーナツ状）。膜の切断部は、ピペット先端に接触している領域に制限される。この場合、気泡の形状は、ピペットの傾斜又はレーザの偏光と共に顕著には変化しないので、特定の実施形態では、マイクロインジェクション用により適したものとなる。

【0043】

細胞手術ツールは、作業によって決定される期間にわたって開いたままであるか、必要に応じて急速に閉じる特定のサイズ膜孔によって、生細胞操作に対する細胞損傷を最少にするか又は無くして、正確な細胞内アクセスを提供することができる。本デバイスを用いて、前核DNAマイクロインジェクション、胚盤胞内への胚性幹細胞の移植、体細胞核移植、他の細胞内の細胞小器官の修復や置換を実施することに対する、プローブ等の非細胞物体等の導入に対する効率及び成功率を上げることができる。

30

【0044】

〔試薬の送達及び細胞トランスフェクション用の基板〕

他の実施形態では、物質（エージェント）（例えば、核酸、タンパク質、有機分子、細胞小器官、抗体、他の配位子等）を生細胞内に送達する、及び／又は、それを細胞から抽出するための方法、デバイス、及びシステムが提供される。典型的には、本デバイスは、粒子（例えば、ナノ粒子）及び／または薄膜を有する基板を備える（例えば、上述のようなもの）。細胞をこの基板上に播種することができ、また、任意で、密集培養物が形成されるまで成長させることができる。特定の実施形態では、パルスレーザ（又は他の電磁エネルギー源）を基板全体に照射するか、又は基板の一領域に選択的に照射する（例えば、シャドウマスクに照射して、対応する照射パターンを基板上にうつすことによって）ことができる。エネルギー源（例えば、パルスレーザ）に晒された領域において、吸収されたエネルギーによって、粒子及び／又は薄膜が高温に加熱される。典型的には、数ナノ秒以内で、粒子及び／又は薄膜を取り囲む液体媒体層内に熱が散逸して、蒸気泡を発生させる。蒸気泡の急速な膨張及びその後の崩壊が過渡流体の流れを引き起こして、その近傍の細胞に強力なせん断応力を誘起して、細胞膜（及び／又は細胞壁）に局所的な細孔が形成される。結果として、流体の流れ又は熱拡散によって、膜不透過性分子を細胞内に運ぶことができる。キャビテーション気泡は、粒子及び／又は薄膜がエネルギー源に晒された箇所において優先的に生じるので、細胞培養物の特定の領域において及び／又は特定の時間に

40

50

において、分子摂取を誘起する照射パターンを選択／設計することができる。基板上の摂取領域の位置を、粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜のパターンと、照射パターンとの組み合わせによって決めることができる。同様に、摂取のタイミングを照射のタイミングによって制御することができる。このようにして、基板上の粒子のサイズ、物質及び／若しくは密度、並びに／又は、基板上の膜の物質及び／若しくは厚さ、エネルギー源のタイミング、強度及び頻度、並びに、照射パターンを制御することによって、高スループットで空間的に標的化された及び／又は時間的に標的化された分子送達が可能になる。

【0045】

他の例示的な実施形態では、基板及び／又はマイクロ流体構造上にエネルギー吸収膜及び／又はマイクロ粒子若しくはナノ粒子を集積することによって、試薬送達プラットフォームが提供される。特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜を、基板上に設けられた特定の特徴部（例えば、細孔、隆起部、チャンネル等）に、その上に又はその付近に局在化させることができる。特定の実施形態では、粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜を基板の“頂部側”（細胞が配置されている箇所）に配置するが、他の実施形態では、追加的に又は代替的に、粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜を基板の底部側（例えば、細胞が配置される側の反対側）に配置する。いずれの場合でも、エネルギー吸収膜又は粒子（例えば、金属粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜）は、表面プラズモン周波数に近い周波数を有する電磁波を強力に吸収して、吸収されたエネルギーによって急速に加熱され、周囲媒体を蒸発させる過熱現象を生じさせる。例えば、レーザパルス励起の際に、ナノメートル直径の蒸気泡がナノ粒子又は薄膜の周囲に形成されて、細胞の表面に接触するか又は近づくと、このプロセスが細胞膜（及び／又は細胞駅）に制御された正確なサイズの孔を生じさせて、例えば試薬の出入りを可能にする。キャビテーション又は“孔開け”プロセスは数ナノ秒で完了する。結果として、膜の残りの部分には実質的に反応する時間がなく、機械的に比較的影響を受けていないままである。

【0046】

特定の実施形態では、こうしたデバイスが、一つ以上のマイクロ流体オリフィスを備えることができ（例えば、基板の上／中／貫通して）、エネルギー吸収膜（例えば、Ti膜）又はナノ粒子がオリフィスの縁及び／又は側壁に（又はオリフィスの縁付近に）配置される（例えば、図14及び図18を参照）。特定の実施形態では、本デバイスは、マイクロ流体オリフィスのアレイを備え（例えば、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、10個以上、20個以上、50個以上、100個以上のオリフィス）、エネルギー吸収マイクロ粒子又は膜がオリフィスの縁、側壁、又は近くに配置される。オリフィスは、一つのチャンネル、又はチャンネルのネットワークに接続可能である（例えば、マイクロ流体チャンネル）。細胞をオリフィスの上又は近くに配置することができる。

【0047】

特定の理論に縛られるものではないが、このようなデバイスにおいて細胞膜が開くことには二つのメカニズムが存在していると考えられる。一つは粒子又は膜と細胞膜との直接接触（又は近接近）であり、キャビテーション気泡が細胞膜のすぐ隣に発生して細胞膜を破壊する。もう一つのメカニズムは、細胞膜が粒子及び／又は薄膜と接触していない場合のものである。例えば、細胞及び粒子及び／又は膜が基板の両側に存在している場合、キャビテーション気泡がキャビティ／細孔を介して流体を押し付けて、結果としての液体ジェットが細胞膜に孔を穿つ。

【0048】

このような基板の一つ（例えば、トランスフェクション基板）が図15に概略的に示されている。図示されているように、基板は、オリフィスの列を備え、各列はマイクロチャンネルによって接続されている。この例示的であり非限定的な実施形態では、二本のマニホールドが設けられていて、その各々が試薬を二つのマイクロチャンネルに送達する。オリフィス付近の表面又はオリフィスを備えた表面は、照射された際に選択的に加熱される薄膜（例えば、Tiを備えた薄膜）及び／又はナノ粒子でコーティングされる。基板の選択的領域（例えば、照射領域1及び2）に所望の通りに照射して、照射領域内に配置された細

胞内部に試薬を送達することができる。図15は二本のマニホールドを例示しているが、多様な実施形態においては、これよりも多い又は少ない数のマニホールドが想定される。追加的に又は代替的に、バルブシステムによって、オリフィスへの試薬の送達を制御することができる。特定の実施形態では、マニホールドを省略することができる。

【0049】

例示的であり非限定的な一実施形態では、マイクロ流体構造上にエネルギー吸収膜及び／又はマイクロ粒子若しくはナノ粒子を集積することによって、試薬送達プラットフォームが提供される。このようなデバイスは、一つ以上のマイクロ流体オリフィスを備えることができ（例えば、基板の上／中／貫通して）、エネルギー吸収膜（例えば、Ti膜）又はナノ粒子が、オリフィスの縁及び／又は側壁に（又はオリフィスの縁の近くに）配置される（例えば、図14を参照）。特定の実施形態では、本デバイスは、マイクロ流体オリフィスのアレイを備え（例えば、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、10個以上、20個以上、50個以上、100個以上のオリフィス）、エネルギー吸収マイクロ粒子又は膜をオリフィスの縁、側壁、又は近くに備える。オリフィスは、一つのチャンネル、又はチャンネルのネットワークに接続可能である（例えば、マイクロ流体チャンネル）。細胞をオリフィスの上又は近くに配置することができる。

10

【0050】

図16に概略的に示されるように、オリフィスが加熱／励起されると（例えば、レーザパルスによって）、開口部が細胞膜及び／又は細胞壁に形成されて、拡散によって、又は、マイクロチャンネルを介する流体のポンピング（例えば、外部圧力源を用いる）によって、マイクロ流体チャンネル内に試薬を細胞内に送達することができる。

20

【0051】

多様な実施形態において、オリフィスの直径範囲は、略1 μm から略100 μm 若しくは略50 μm 、略2 μm 若しくは略5 μm から略20 μm 若しくは30 μm 、略1 μm 若しくは2 μm 若しくは略5 μm から略10 μm 若しくは略15 μm 若しくは略20 μm 若しくは略25 μm 若しくは略30 μm 、又は略5 μm から略10 μm 若しくは15 μm 若しくは20 μm である。特定の実施形態では、オリフィスの直径は略10 μm である。

【0052】

多様な例示の実施形態において、マイクロ流体チャンネル（マイクロチャンネル）は、略1000 μm 以下の幅及び／又は深さ、略800 μm 以下の幅及び／又は深さ（又は直径や特徴的寸法）、略500 μm 以下の幅及び／又は深さ（又は直径や特徴的寸法）、略400 μm 以下の幅及び／又は深さ（又は直径や特徴的寸法）、略300 μm 以下の幅及び／又は深さ（又は直径や特徴的寸法）、略200 μm 以下の幅及び／又は深さ（又は直径や特徴的寸法）、略150 μm 以下の幅及び／又は深さ（又は直径や特徴的寸法）、略100 μm 以下の幅及び／又は深さ（又は直径や特徴的寸法）、又は、略20 μm 以下の幅及び／又は深さ（又は直径や特徴的寸法）を有する。

30

【0053】

特定のオリフィスに対して選択的に照射／加熱を行うことによって、試薬（例えば、本願で説明されるようなもの）を、照射／加熱されたオリフィスの頂部又は近傍において細胞に選択的に送達することができる。同様に、適切なマイクロチャンネルに送達されるべき物質を選択的に提供することによって、同じ物質又は異なる物質を同じ基板上の異なる細胞に送達することができる。

40

【0054】

本願で説明される“アドレス可能”送達（デリバリー）デバイス／基板は、広範な状況において使用可能である。例えば、高スループットシステムにおいて、物質（エージェント）を媒体に投与して、細胞を含有する領域（この領域内に物質が届けられる）に（例えばレーザ放射を）照射することによって単純に、異なる複数のウェル又は単一のウェルの異なる複数の領域が、標的細胞内に選択的に送達された試薬を有することができる。そして、第一の物質を洗い出して、第二の物質を適用して、別の領域に対して照射することに

50

よって、培養物中の異なる位置に異なる物質がトランスフェクションされた細胞を生成することができる。これは、細胞の並列処理を大幅に促進して、一以上の試薬のタイミング及び空間的にアドレス可能な送達に対する顕著な制御を可能にする。

【0055】

一方、特定の実施形態では、細胞内にトランスフェクションされる物質が、基板上のオリフィスに流体連結されたマイクロチャネル内に提供されて、そのデバイスをこの方法で動作させる必要がない。例えば、細胞内にトランスフェクションされる物質を培地に提供することができる。細胞の領域又はその近くに領域を選択的に加熱すると、細胞内に細孔が形成されて、細胞内に物質がトランスフェクションされる。従って、ナノ粒子又は薄膜領域が、表面の一部に存在することができて、開口／オリフィスが関係なくなる。

10

【0056】

特定の実施形態では、例えば、本願で説明されるデバイスを、特定の物質を細胞に送達するためのポンプ又はバルブを備えた他のマイクロ流体デバイス（例えば、ラボオンチップ）と集積することができる。

【0057】

本願で説明される実施形態は例示的なものであり限定的なものではない。本願で与えられる教示を用いて、こうした“トランスフェクション基板”及びマイクロ流体デバイスの構成を変更して、例えば、基板上の特徴（例えば、細孔（オリフィス）サイズ、サイズ分布、空間分布）、膜及び／又はナノ粒子の種類、マイクロ流体チャネルの分布及び／又は構成等を変更することができる。

20

【0058】

[エネルギー源及び選択的照射]

物質の選択に応じて、本質的にはあらゆる種類の方法を適用して、本願で説明される手術デバイス及び／又は基板を備えたナノ粒子及び／又は薄膜を励起（加熱）することができる。こうした方法として、マイクロ波、レーザ、非コヒーレント光放射（例えば、赤外線放射）、電気加熱、電子スピン共鳴（ESR, electron spin resonance）加熱、磁氣的加熱の印加等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。特定の例示的实施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜の加熱は、磁場及び／又は電場及び／又はRF場及び／又は光（例えば、レーザ）の印加によって達成される。

【0059】

例えば、金属粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜は、表面プラズモン周波数付近の周波数（一般的に、可視及び近赤外線範囲）を有する電磁波を強力に吸収する。粒子、ナノ粒子及び薄膜は、吸収されたエネルギーによって急速に加熱され、周囲媒体を蒸発させる過熱現象を生じさせる。

30

【0060】

手術デバイス及び／又は基板を選択的に加熱する場合（例えば基板の一部）、デバイス又は基板を局所的／選択的に加熱するあらゆる手段を用いることができると考えられる。従って、例えば、特定の実施形態では、基板の特定の領域の局所的照射を、集束レーザ、集束非コヒーレント光（例えば、赤外線）源を用いて、達成することができる。

【0061】

特定の実施形態では、基板の一つ以上の領域の選択的照射がマスク（シャドウマスク）を用いることによって達成される。特定の実施形態では、局所的照射を、レンズ及び／又はミラーシステムを用いて照射エネルギー源（例えば、レーザ）を特定の領域に集束させることによって単純に達成することができる。特定の実施形態では、エネルギー源を固定領域に集束させ、基板を動かして（例えば、可動ステージ又は他のマニピュレータ）、特定の領域の局所的照射を達成することができる。照射領域は所望の形状をとることができる。例えば、特定の実施形態では、照射領域は、円形、正方形、楕円形、六角形、三日月形、他の規則的な又は不規則な形状である。特定の実施形態では、基板上の多数の領域に対して同時に又は逐次的に照射が行われる。

40

【0062】

50

特定の実施形態では、実施例で実証されるように、静的なシャドウマスクだけではなく、T I社のDMDマイクロディスプレイやLCDディスプレイ等の空間光変調器を用いた動的なマスクによって、エネルギーパルス（例えば、レーザパルス）を成形することができる。これは、標的細胞内へのマイクロインジェクションの実時間でインタラクティブな制御を提供する。

【0063】

[製造]

特定の実施形態では、単細胞手術デバイスが、電磁エネルギー源（例えば、レーザ）を用いて加熱可能な粒子又はナノ粒子及び／又は薄膜をチップに又はその近くに有するマイクロピペットを備えて提供される。多様な実施形態において、細胞トランスフェクション

10

【0064】

本願で説明されるマイクロピペット及び“トランスフェクション基板”を、当業者に既知の方法を用いて製造することができる。例えば、多様な実施形態において、注入マイクロピペットが、例えば、市販のピペットプラー（puller）を用いて製造される一方、半導体業界において既知のマイクロ製造方法を用いて基板を製造することができる。

【0065】

[マイクロキャピラリ／マイクロピペットの製造]

20

マイクロキャピラリ／マイクロピペットを、加熱及び細胞貫通を許容するのに必要な強度及び耐熱性を提供しながら、引き伸ばすことのできる、エッチングすることのできる、又は他の所望の寸法にすることのできるあらゆる物質から製造することができる。また、物質、対象の細胞にとって有毒ではないことが好ましい。特定の実施形態では、マイクロキャピラリは、ガラス、鉱物（例えば、石英）、セラミック、プラスチック（例えば、デルリン（登録商標）、テフロン（登録商標）等）、金属、半導体等の物質を備える。

【0066】

マイクロピペットを製造する場合、ピペットの断面形状は典型的に円形である。しかしながら、これは、円形のピペットのみが細胞手術ツールに使用可能であるという意味ではない。他の断面を有するマイクロピペットも製造することができる。例えば、所望のパターン、円形、矩形、三角形のピペット先端部をまずガラス又はシリコンウェーハ上に形成して、次に、注入ピペットに移して組み立てることができる。

30

【0067】

また、予め引き伸ばされたマイクロピペットが市販されている（例えば、英国ハートフォードシャー州のWorld Precision Instruments社製）。

【0068】

ピペットの直径は、単細胞手術器具によって重要なパラメータである。本願で説明される単細胞手術器具の利点の一つは、細胞の巻き添え損傷を少なくして、細胞膜に略 μm サイズの孔を開けることができる点である。これは、大型のDNA又は他の物質を細胞内に殺さずに送達することを可能にする。巻き添え損傷を減らすため、従来のマイクロピペット法では、典型的に、ガラスピペットの外側の先端直径が200nm未満であることが必要とされ、小さな哺乳類細胞の柔軟な細胞膜に対する貫通を容易にする。この制約は、従来のマイクロピペット法で送達可能な粒子のサイズを大きく制限する。染色体、核、細胞小器官、他の細胞外物質等の物質は、大きな研究価値及び市場価値を有するが、ピペットの開口部の物理的サイズよりも大きなサイズを有することが多く、従来の方法では細胞内に導入することができない。

40

【0069】

本願で説明される“レーザ”細胞手術ピペットは、この問題に対して独創的な解決策を提供し、マイクロピペット業界全体に革命を起こす可能性を有する。一般的に、本発明の方法及びデバイスは、大型のDNA断片（例えば、BACサイズのDNAやこれよりも大

50

きなDNA)、核、細胞小器官、他の大型物質を、他の方法よりも細胞の損傷を少なくして、より効率的に細胞内に導入するのに有効である。従って、特定の実施形態では、本願で説明される単細胞手術ツールを備えたマイクロピペットは、200nmよりも大きな、略300nmよりも大きな、略400nmよりも大きな、略500nmよりも大きな、略600nmよりも大きな、略700nmよりも大きな、略800nmよりも大きな、略900nm若しくは1μmよりも大きな先端直径を有する。

【0070】

[トランスフェクション基板の製造]

同様に、好ましくは細胞に対して有毒ではなく、粒子、ナノ粒子又は薄膜コーティングを有することができて、且つ、粒子、ナノ粒子及び／又は薄膜に対する電磁エネルギーの印加によって生じる局所的加熱に耐えることができるあらゆる従来の物質から、“トランスフェクション基板”を備えた基板を製造することができる。適切な物質として、ガラス／シリコン、ゲルマニウム、鉱物（例えば、石英）、セラミック、プラスチック（例えば、デルリン（登録商標）、テフロン（登録商標）等）、金属、半導体等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0071】

特定の実施形態では、基板は、細胞スクリーニング及び／又は細胞培養に用いられるベッセルの表面を備える。例えば、接着又は担持細胞培養のためのベッセルが挙げられる。また、マイクロタイタープレート（例えば、96個、384個、864個、1536個のウェル等）、マイクロ流体デバイス、高密度（マイクロアレイ）基板、顕微鏡スライド、チャンバ等も挙げられる。

【0072】

特定の実施形態では、細胞トランスフェクション基板を、半導体業界において既知の方法を用いて製造する。一つの方法が図17に概略的に示されている。この例示的な実施形態では、マイクロ流体オリフィス及びチャンネルが、ガラスカバースリップ基板上のSU-8フォトレジストをパターニングすることによって製造される。まず、底部トレンチを、高さ100μmのSU-8 2075フォトレジストの層にフォトリソグラフィで画定する。SU-8 2005フォトレジストの他の薄層（厚さ4μm）を底部層上にスピニングして、第二のフォトリソグラフィステップによって円形の開口部を画定する。二層SU-8構造を現像した後、基板傾斜角60度の電子ビーム蒸着によって、厚さ100nmのTi薄膜をその構造上に堆積させて、円形のオリフィスの頂部及び側壁の両方をコーティングする。最終ステップでは、頂部層のTiをドライエッチングして、マイクロチャンネルを外部の流体ポンプに接続する。例示的な一実施形態では、底部トレンチは幅200μmであり、また300μmで離隔される。円形のオリフィスは、10から20μmの範囲の直径を有する。これらのオリフィスを正方向のアレイに配置して、100μmで離隔する。新月状のTi薄膜を円形のオリフィスの側壁にコーティングする。

【0073】

図示されているオリフィスは円形であるが、これに限定されるものではない。標準的な方法（例えば、エッチング法）を用いて、本質的にはあらゆる形状のオリフィス（例えば、円形、正方形、五角形、六角形、楕円形、台形、不定形等）を形成することができる。同様に、オリフィスのパターニングも、本質的にはあらゆる所望のパターンとなり得る。

【0074】

特定の実施形態では、ナノ粒子及び／又は薄膜がオリフィスの一部にコーティングされるが（例えば、或る角度で膜を堆積させることによって）、他の特定の実施形態では、オリフィス及び／又は残りの表面が、ナノ粒子及び／又は薄膜で均一にコーティングされる。

【0075】

[粒子／ナノ粒子／薄膜の物質]

多様な実施形態において、本願で説明される多様なデバイスを構成する粒子及び／又はナノ粒子又は薄膜は、全て同一の物質で形成される。他の実施形態では、特定のデバイス

の粒子及び／又はナノ粒子又は薄膜は異なる物質を含む。従って、例えば、所定のデバイス（例えば、ピペット、トランスフェクション基板）が、二種、三種、四種、五種、又はそれ以上の異なる種類の粒子（例えば、粒子サイズ、及び／又は形状及び／又は物質が異なる）を有する粒子／ナノ粒子又は薄膜を含むことができる。同様に、本デバイスを構成する薄膜は、多数の膜（例えば、多層や、マイクロピペット又は基板の異なる箇所に異なる膜）を備えることができる。例えば、金属薄膜の上に、他の金属又は誘電体（例えば、酸化シリコン、窒化シリコン等）層をコーティングすることによって、本デバイスを修正して、基板の加熱又はピペットの先端によって損傷を受ける細胞の面積の割合に影響を与えるように微小気泡の膨張パターンを制御することができる。

【0076】

多様な実施形態において、マイクロピペット及び／又は“トランスフェクション基板”上の粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜を、適切な電磁エネルギーの印加によって加熱可能な金属、金属合金、半導体、又は他の物質から製造する。多様な実施形態において、半導体、金属、金属合金、それらの酸化物及び／又は窒化物が想定される。サイズ、アスペクト比、膜厚、及び／又は物質に応じて、多様なエネルギー源（例えば、レーザ光、電場、E F 場、磁場、超音波源等）を用いて、このような金属を容易に加熱することができる。

【0077】

本願で与えられる説明の多くは、半導体又は金属の粒子／ナノ粒子及び／又は膜に関係して、実施例では、金粒子及び／又は金又はチタンの膜について説明しているが、エネルギー源によって加熱される物質はこれらに限定されるものではない。本質的には、適切なエネルギーを吸収し、その結果として加熱を生じさせるあらゆる物質を、本願で説明される方法及びデバイスの加熱物質として使用することができる。従って、特定の実施形態では、金、銀、タンタル、プラチナ、パラジウム、ロジウム、チタン、これらの酸化物、窒化物、合金が想定される。

【0078】

本願で説明されるデバイス及び方法を構成するナノ粒子及び／又は薄膜において有用な物質のうち重要な一つは、チタン（Ti）及び／又はその酸化物、窒化物、合金、ドーパ酸化物、ドーパ窒化物、それらの合金である。特定の実施形態では、本願で説明されるデバイス及び方法を構成するナノ粒子及び／又は薄膜は、非常に硬く物質であり、金の融点よりも三倍高い融点を有するチタン及び／又は窒化チタン（TiN）を備える。ピペット上にコーティングして、40個の細胞を、一つのピペットを用いて連続的に注入したが、ピペットに損傷は見受けられなかった。また、これは、TiNでコーティングされたピペットが、ピペットを交換する必要なく、数百個から数千個の細胞を注入する可能性を有していることを意味している。これは、金でコーティングされたピペット（強力な破裂性気泡及び高温励起によって一、二回又は数回の使用で損傷する可能性がある）と比較すると、顕著な改善である。

【0079】

TiNの他の変形例は当業者には周知である。炭窒化チタン（TiCN）や窒化チタンアルミニウム（TiAlN）が挙げられるが、これらに限定されるものではなく、これらの物質を個別に使用したり、TiNと交互の層にして使用したり、TiN粒子と共に混合粒子群として使用したりすることができる。こうしたコーティングは、耐腐食性及び硬度における同様の又は優れた増強を提供し、また、異なる（更には微調整可能な）吸収特性を提供する。

【0080】

上述のように、本願で説明されるデバイス及び／又は方法を構成する粒子又は膜は、金属を備えた物質に限定されるものではない。例えば、本発明者は、ブラックカーボンも、ピペット近くに破裂性気泡を誘起して、単細胞を殺す又は貫通することができることを実証している。従って、特定の実施形態では、例えば、カーボンナノチューブ（これに限定されるものではない）等の炭素ナノ粒子を、本願で説明される方法及びデバイスにおいて使用することができる。

10

20

30

40

50

【0081】

多様な実施形態において、周期表のⅠⅠ族、ⅠⅠⅠ族、ⅠⅤ族、Ⅴ族又はⅤⅠ族からの一種以上の物質を備えた粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜も想定され、また、それらの酸化物、窒化物、合金、ドーパされたもの、及び／又は、遷移金属、酸化遷移金属、窒化遷移金属、遷移金属を備えた合金又は複合材等も想定される。特定の好ましい実施形態では、ナノ粒子及び／又は膜は、ⅠⅠ族、ⅠⅠⅠ族、ⅠⅤ族、Ⅴ族の物質（例えば、炭素、シリコン、ゲルマニウム、錫、鉛）、ドーパされたⅠⅠ族、ⅠⅠⅠ族、ⅠⅤ族、Ⅴ族、ⅤⅠ族元素、純粋な又はドーパされたⅠⅠ族、ⅠⅠⅠ族、ⅠⅤ族、Ⅴ族、ⅤⅠ族元素の酸化物、遷移金属、酸化遷移金属、又は窒化遷移金属を備える。特定の好ましい実施形態では、粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜は、ⅠⅠⅠ族、ⅠⅤ族、又はⅤ族の半導体を備える。

10

【0082】

本願の教示から、特定の実施形態では、粒子／ナノ粒子及び／又は薄膜が、Si、Ge、SiC、Au、Ag、Cu、Al、Ta、Ti、Ru、Ir、Pt、Pd、Os、Mn、Hf、Zr、V、Nb、La、Y、Gd、Sr、Ba、Cs、Cr、Co、Ni、Zn、Ga、In、Cd、Rh、Re、W、これらの酸化物や窒化物等の一種以上の物質を含むことを理解されたい。

【0083】

上述のように、多様な実施形態において、ナノ粒子及び／又は薄膜を構成するⅠⅠ族、ⅠⅠⅠ族、ⅠⅤ族、Ⅴ族、ⅤⅠ族元素、遷移金属、酸化又は窒化遷移金属は本質的に純粋なものであるか、又は、ドーパされたもの（例えば、pドーパ又はnドーパ）であるか、又は合金化されたものであり得る。ⅠⅠ族からⅤⅠ族元素で使用される、特にⅠⅠⅠ族、ⅠⅤ族及びⅤ族元素で使用される、特にⅠⅤ族元素（例えば、シリコン、ゲルマニウム等）で使用されるpドーパント及びnドーパントは、当業者には周知である。このようなドーパントとして、リン化合物、ホウ素化合物、ヒ素化合物、アルミニウム化合物等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0084】

特定の実施形態では、粒子／ナノ粒子及び／又は膜は、シリコン、ゲルマニウム、炭化シリコン等のⅠⅤ族半導体を備える。このような半導体について最も一般的なドーパントとして、ⅠⅠⅠ族元素のアクセプタや、Ⅴ族元素のドナーが挙げられる。このようなドーパントとして、ホウ素、ヒ素、リン、場合によってはガリウムが挙げられるが、これらに必ずしも限定されるものではない。

30

【0085】

上述のように、多様な実施形態では、粒子／ナノ粒子は半導体を備える。ドーパされたⅠⅠ族、ⅠⅠⅠ族、ⅠⅤ族、Ⅴ族、ⅤⅠ族元素の多くは半導体であり、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、BaSe、BaTe、GaN、GaP、GaAs、GaSb、InP、InAs、InSb、AlS、AlP、AlSb、PbS、PbSe、Cd₃Sb₂、Zn₃P₂、Zn₃As₂、Zn₃Sb₂、TiO₂、TiO₂、TiO₂、Cu₂O、CuO、UO₂、UO₃、Bi₂O₃、SnO₂、BaTiO₃、SrTiO₃、LiNbO₃、La₂CuO₄、PbI₂、MoS₂、GaSe、SnS、Bi₂S₃、GaMnAs、InMnAs、CdMnTe、PbMnTe、La_{0.7}Ca_{0.3}MnO₃、FeO、NiO、EuO、EuS、CrBr₃、Cu(In,Ga)Se₂、Cu₂ZnSnS₄、CuInSe₂、AgGaS₂、ZnSiP₂、As₂S₃、PtSi、BiI₃、HgI₂、TlBr、Se、Ag₂S、FeS₂、Ge、Si、これらの三元混合物、四元混合物等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0086】

レーザエネルギーに加えて、磁場、電場、RF場を用いて、粒子、ナノ粒子及び／又は特定の薄膜を加熱することも容易である。従って、例えば、参照として本願に組み込まれる特許文献9には、磁場中に置かれると、サイズ、組成、又はそれら両方の関数として、

50

磁場の特定の周波数において選択的に加熱される磁性ナノ粒子が開示されている。

【0087】

多様な実施形態において、このようなナノ粒子又は薄膜は、十分な強度の磁場に晒されるとエネルギーを変換する磁性体（F e r r o V 磁性顔料等）を備える。従って、例えば、交番磁場が、粒子内に交流を誘起して、熱を発生させる。多様な磁性体が使用可能である。また、こうした物質として、F e - O₄、F e₂O₃等の磁性体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。また、特定の実施形態では、銀、銅、プラチナ、パラジウム等が、本発明のデバイスに使用される粒子、ナノ粒子及び／又は薄膜を構成する。特定の実施形態では、粒子、ナノ粒子及び／又は薄膜は、T i O₂、C e O₂、A g、C u O、イットリウムアルミニウムガーネット（Y A G, Y t t r i u m A l u m i n u m G a r n e t）、I n O₂、C d S、Z r O₂、またはこれらの組み合わせを備えることができる。他の実施形態では、任意の酸化金属、金属合金、炭化金属及び／又は遷移金属を本発明において使用し得る。一部実施形態では、コーティングが印加場に対する応答性を変更しないようにして、粒子をコーティングすることができる。

10

【0088】

特定の実施形態では、本発明のデバイスで使用される粒子、ナノ粒子、又は薄膜が磁性体製となり得るが、他の実施形態では、常磁性体又は超常磁性体製となり得る。

【0089】

従って、特定の実施形態では、粒子、ナノ粒子及び／又は薄膜は、電子スピン共鳴吸収（S P M）及び／又は強磁性共鳴を用いて加熱可能な常磁性体又は超常磁性体を備えることができる。電子スピン共鳴（E S R）及び強磁性共鳴（F M R, f e r r o m a g n e t i c r e s o n a n c e）については、参照として本願に組み込まれる特許文献10及び特許文献11に記載されている。イットリウム鉄ガーネットY₃F e₅O₁₂及びγ - F e₂O₃は、E S R及び／又はF M R加熱に適した周知の二物質である。多様な応用において、多様なドーパントを追加して、これらの物質のスピン共鳴周波数を低下させることができる。磁性ガーネット及びスピネルも、一般的な環境条件下においては化学的に不活性であり壊れにくい。

20

【0090】

また、周期表のI I族、I I I族、I V族、V族の物質を備えた多様な物質及び／又は半導体も想定される。

30

【0091】

一般的な{c}₃(a)₂[d]₃O₁₂及びスピネルA[B]₂O₄フェライト化合物として考えられるものの例示的な一欄が表1に与えられている。

【0092】

【表 1】

表 1. 例示的なフェライト希釈イオン

ガーネット $\{c\}_3(a)_2[d]_3O_{12}$		スピネル $A[B]_2O_4$	
$\{c\}$ 十二面体	(a) 八面体 [d] 四面体	A 四面体	[B] 八面体
Y^{3+}	Fe^{3+}	Fe^{3+}	Fe^{3+}
La^{3+}	Mn^{2+}	Mn^{2+}	Mn^{2+}
Gd^{3+}	Ru^{3+}	Ru^{3+}	Ru^{3+}
Eu^{2+}	Cu^{1+}	Cu^{1+}	Cu^{1+}
Na^{1+}	V^{3+} [d], Ni^{2+} (a)	V^{3+}	Ni^{2+}
K^{1+}	Cr^{4+} [d], Cu^{3+} (a)	Cr^{4+}	Cu^{3+}
Rb^{1+}	Mo^{4+} [d], Cr^{3+} (a)	Mo^{4+}	Cr^{3+}
Tl^{1+}	W^{4+} [d], Mo^{3+} (a)	W^{4+}	Mo^{3+}
Ag^{1+}	Nb^{3+} [d], W^{3+} (a)	Nb^{3+}	W^{3+}
Au^{1+}	Zn^{2+}	Zn^{2+}	Zn^{2+}
Hg^{1+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}	Mg^{2+}
Ca^{2+}	Al^{3+}	Al^{3+}	Al^{3+}
Sr^{2+}	Ga^{3+}	Ga^{3+}	Ga^{3+}
Ba^{2+}	In^{3+}	In^{3+}	In^{3+}
Hg^{2+}	Sc^{3+}	Sc^{3+}	Sc^{3+}
Pb^{2+}	Ti^{4+}	Ti^{4+}	Ti^{4+}
Bi^{3+}	Zr^{4+}	Zr^{4+}	Zr^{4+}
In^{3+}	Hf^{4+}	Hf^{4+}	Hf^{4+}
Sc^{3+}	Si^{4+}	Si^{4+}	Si^{4+}
	Si^{4+}	Si^{4+}	Si^{4+}
	Ge^{4+}	Ge^{4+}	Ge^{4+}
	Sn^{4+}	Sn^{4+}	Sn^{4+}
	V^{5+}	V^{5+}	V^{5+}
	Nb^{5+}	Nb^{5+}	Nb^{5+}
	Ta^{5+}	Ta^{5+}	Ta^{5+}
	P^{5+}	P^{5+}	P^{5+}
	As^{5+}	As^{5+}	As^{5+}
	Sb^{5+}	Sb^{5+}	Sb^{5+}

【0093】

粒子又はナノ粒子は、考えられる複数の形態のうち任意のものをとることができ、それでも本発明における使用に適してもものとなる。従って、例えば、本発明は、以下の種類のナノチューブを用いることを想定している： ジグザグ型のカイラリティを有する、複数のカイラリティが混じった、ねじれた、真っ直ぐな、曲がった、よじれた、巻かれた、扁平な、丸い、単層、二層、多層ナノチューブ； ナノチューブのロープ、ねじれたナノチューブのロープ、編まれたナノチューブのロープ； ナノチューブの小型バンドル（束）（例えば、特定の実施形態ではチューブの数は略10本未満である）、ナノチューブの中型バンドル（例えば、特定の実施形態では、チューブの数は数百本である）、ナノチューブの大型バンドル（例えば、特定の実施形態では、チューブの数は数千本である）； ナノトリイ（ナノ鳥居）、ナノコイル、ナノロッド、ナノワイヤ、ナノホーン； 中空のナノケージ、中実のナノケージ、多面ナノケージ、中空のナノコクーン（ナノ繭）、中実のナノコクーン、多面ナノコクーン； 薄いナノプレートレット、厚いナノプレートレット、インターカレート型ナノプレートレット、ナノコーン等。多様なナノ粒子（ナノ構造）

は不均一型となり得る。このような不均一型として、構造の一部分が特定の化学組成を有する一方で構造の他の部分が異なる化学組成を有する構造が挙げられるが、これに限定されるものではない。一例は、各層の化学組成が互いに異なり得る多層ナノチューブである。また、不均一型として、多様な型のナノ構造物質も挙げられ、上記のもののうち一つがより大きな不規則構造に結合されている。また、特定の実施形態では、上記物質のうちいずれかが、ひび、転位、分岐、他の不純物及び／又は不完全性を有し得る。

【0094】

特定の実施形態では、本発明において使用される粒子又はナノ粒子のサイズ、並びに／又は薄膜の面積及び／若しくは厚さを調節又は最適化して、ナノ粒子又は膜の物質の選択、励起エネルギーの性質、励起エネルギーの周波数及び／又は強度を反映することができる。特定の実施形態では、ナノ粒子のサイズの範囲（例えば、長さ及び／又は幅及び／又は直径）は略10から略500nmまで、好ましくは略20nmから略200nmまで、より好ましくは、略20nm、30nm、40nm又は50nmから100nm、150nm又は200nmまでである。本発明で使用されるナノ粒子のサイズの範囲は、特定の実施形態では略4nmから略25nmまでであり、他の実施形態では8nmから5nmまでであり、他の実施形態では5nmから100nmまでであり、他の実施形態では10nmから800nmまでであり、他の実施形態では10nmから50nmまでであり、他の実施形態では50nmから200nmまでであり、他の実施形態では150nmから500nmまでである。

【0095】

多様な実施形態において、存在する場合には、金属膜の厚さの範囲は、略1、2、5、10、50、100、150、200、300、400又は500nmから、略800nm、1μm、5μm、10μm、50μm又は100μmまでである。特定の実施形態では、金属膜の厚さの範囲は、略2nm、5nm、10nm、20nm又は30nmから、略100nm、300nm、500nm、800nm又は1μmまでである。特定の実施形態では、金属膜の厚さの範囲は、1nmから150nmまでであり、好ましくは5nmから100nmまでであり、より好ましくは略5nm、10nm又は20nmから、略50nm、75nm又は100nmまでである。特定の実施形態では、金属膜の厚さは略30nmである。

【0096】

多様な実施形態において、本願で説明されるデバイスを構成するコーティングされた層は、連続的な薄膜、若しくは複数の小型領域（例えば、5nm、10nm、20nm、50nm、100nm、200nm、500nmの領域）に分割された薄膜であり得て、又は、本願で説明される離散的な粒子又はナノ粒子を備え得る。粒子の形状及び薄膜の厚さ並びに粒子又は膜の組成は、物質の吸収スペクトル、所望の局所的加熱を生じさせるのに必要なエネルギー源及び強度に影響を与える。

【0097】

一般的に、膜厚及び／又は粒子サイズは、局所的加熱によって生成される気泡のサイズと、気泡付近のマイクロ流体の流れの性質に影響する。これは、細胞内に生じるせん断応力と開口のサイズを決定する。一般的に、粒子が大きいほど、生成される気泡が大きくなり、細胞に与えられる衝撃が大きくなる。薄膜の厚さは、粒子サイズと同様の影響を有する。膜が厚くなるほど、生成される気泡が大きくなり、細胞に生じる孔が大きくなる。

【0098】

[粒子／ナノ粒子の製造と、マイクロキャピラリ及び／又は“トランスフェクション基板”への粒子及び／又は膜の適用]

粒子又はナノ粒子を製造して表面上に堆積させる又はこのような粒子を表面上にin situで合成する方法と、表面上に薄膜を堆積させる方法とは当業者には周知である。

【0099】

例えば、スパッタリング堆積、化学気相堆積（CVD, chemical vapor deposition）、分子ビームエピタキシ（MBE, molecular be

10

20

30

40

50

am epitaxy)、プラズマ支援気相堆積、陰極アーク堆積、アークPVD、電子ビーム蒸着等の適切な方法によって、薄膜を堆積させることができるが、これらの方法に限定されるものではない。単細胞手術デバイスの多様な実施形態においては、膜は、先端から最大100 μm 、50 μm 、25 μm 、10 μm 、又は5 μm までの距離で、先端から最大1 μm までの距離で、より好ましくは先端から最大800nm、好ましくは最大500nm、より好ましくは最大300、200、150、100、50又は25nmまでの距離で、マイクロキャピラリの先端を部分的に又は完全に覆う。

【0100】

粒子及びナノ粒子を製造する方法も当業者には周知である。こうした方法として、燃焼合成（例えば、酸化還元反応において酸化剤（例えば、金属塩）及び燃料（例えば、有機化合物）を用いる）、蒸発／凝縮（EC, evaporation/condensation）発生器、噴霧熱分解（例えば、プラズマ処理及び粉末噴霧）、超臨界流体等の溶液化学を用いた液相法、化学的還元、機械的合金化、テンプレート法（例えば、小さな空隙又は領域内にナノ粒子を形成する。ゼオライト、柱状粘土、ナノ多孔質膜、逆ミセル）等が挙げられるが、これらに限定されるものではない（例えば、参照として本願に組み込まれる特許文献12、特許文献13、特許文献14、特許文献15、特許文献16、特許文献17、特許文献18、特許文献19を参照）。ナノホーンの製造は、例えば、非特許文献43に記載されていて、一方、ナノファイバの製造は、例えば、参照として本願に組み込まれる特許文献20、特許文献21に記載されている。また、非特許文献44、非特許文献45、非特許文献46等も参照されたい。

【0101】

特定の実施形態では、界面活性剤系においてナノ粒子が合成される。このような表面活性剤ベースの方法は当業者には周知である。このような方法の一つは実施例1において例示される。

【0102】

より一般的には、特定の実施形態において、有機溶媒（例えば、エタノール）によって金属塩を還元して金属コロイドを形成することで、ナノ粒子を形成することができる（例えば、非特許文献47、非特許文献48、非特許文献49、非特許文献50等を参照）。例示的な一方法は非特許文献51に記載されている。こうした方法では、 Ag^+ イオンが、安定剤が存在するまたは存在しない状況において、N, N - ジメチルホルムアミド（DMF, dimethylformamide）によって還元される。この反応は、表面上に静電的に付着した銀ナノ粒子の薄膜、又は銀ナノ粒子の安定分散体のいずれかの形成をもたらす。

【0103】

他の例示的方法では、鉄塩を、アルコール、カルボン酸及びアミンと有機溶媒中で混合して、その混合物を200～360 $^{\circ}\text{C}$ に加熱することによって、磁鉄鉱ナノ粒子物質を作製することができる。粒子のサイズは、鉄塩対酸／アミンの比を変更することによって、又は、多数の金属酸化物で小さなナノ粒子をコーティングすることによって、制御可能である。サイズ分布が狭くて、2nmから2nmまでの範囲のサイズの磁鉄鉱ナノ粒子を簡単に得ることができる。この方法は、他の酸化鉄系ナノ粒子物質にも簡単に拡張可能であり、 MFe_2O_4 （ここで、Mは、例えば、Co、Ni、Cu、Zn、Cr、Ti、Ba、Mg等である）ナノ物質や、酸化鉄でコーティングされたナノ粒子物質が挙げられる。また、この方法は、反応混合物においてアルコールをチオールに置換することによって、硫化鉄の合成することができる。磁鉄鉱ナノ粒子は、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 又は $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ に参加可能であり、又は、bcc-Feナノ粒子に還元可能であり、一方で、酸化鉄系物質を用いて、二元鉄系金属ナノ粒子（CoFe、NiFe、FeCoSm_x等）を作製することができる（例えば、参照として本願に組み込まれる特許文献22を参照）。

【0104】

金ナノ粒子を生成する一方法は、金塩溶液を吸着剤と混合することを含む。錯体状の金が吸着剤の表面に吸着される。金担持吸着剤を、スクリーニング、濾過、沈殿又は他の方

法で溶液から分離した後に、灰にする。その灰は、金ナノ粒子と、ナトリウムやカリウムやカルシウムの酸化物等の不純物とを含有する。不純物は、希釈酸を用いた溶解によって、除去可能である。不純物が除去された後に、比較的純粋な金ナノ粒子が得られる。活性炭や金吸着樹脂を吸着剤として用いることもできる。この方法で、銀又は白金族金属ナノ粒子も簡単に生成することができる（例えば、参照として本願に組み込まれる特許文献23を参照）。

【0105】

更に他の方法では、レーザ熱分解を用いてナノ粒子を形成することができる。従来のレーザ熱分解プロセス（光熱プロセスとも称される）は、当業者には周知である（例えば、参照として本願に組み込まれる特許文献24、特許文献25、特許文献26等を参照）。このプロセスでは、放射吸収体又は他の前駆体ガス状種がエネルギー（例えば、レーザ光）を吸収して、反応領域における物質の加熱をもたらし、反応領域内における化学成分間の熱による化学反応を生じさせる。典型的には、レーザ熱分解プロセスは、化学蒸気領域を通過するレーザ光によって発生させる明確に確定された高温領域（ホットゾーン）（典型的には1000～1500℃）を用い、ガスが熱的に反応して、所望のナノスケール微粒子物質が形成される。高温領域に接触する壁が存在しないことによって、汚染が回避される。

【0106】

熱分解反応によって形成される物質は、典型的には重力又は気流による高温領域を残す。物質は、急速に冷却／急冷されて、サイズ及び形状の分布が極めて均一なナノ粒子が形成される。典型的な実施形態では、二酸化炭素（CO₂）レーザを用いて、光吸収によりガス分子を直接加熱する。レーザを用いることの他の利点は、そのスペクトル幅が狭いことであり、これは、正確な吸収波長（消費されるレーザ出力の15%以上）を有する分子前駆体と光との間の効率的な結合を可能にする。この技術を用いて、金属、炭化金属、窒化金属、酸化金属から多様なナノサイズ物質が生成されている（例えば、非特許文献52、非特許文献53、非特許文献54、非特許文献55、非特許文献56、非特許文献57、特許文献27、特許文献28、特許文献29、特許文献30等を参照）。

【0107】

同様に、TiN薄膜を生成する最も一般的な方法は、物理気相堆積（PVD, physical vapor deposition、一般的にはスパッタ堆積、陰極アーク堆積、電子ビーム加熱）及び化学気相堆積（CVD）である。両方の方法において、純チタンを昇華して、高エネルギー真空環境において窒素と反応させる。

【0108】

粉末金属チタンを所望の形状にパッキングして、適切な密度に圧縮し、純窒素雰囲気において燃やすことによって、バルクのセラミック体を製造することができる。金属とガスとの間の化学反応によって放出される熱は、窒化反応生成物を硬い完成品に焼結するのに十分なものである。

【0109】

当業者には既知の複数の方法のいずれかによって、粒子又はナノ粒子を、マイクロキャピラリ又は細胞トランスフェクション基板に付着させることができる。粒子を単純に適所にスパッタすること、金属コロイドの形成中に表面上に形成すること、核形成粒子上の適所に成長させること、表面にイオンの付着させること、又は、表面に共有結合させること等ができる（例えば、直接的に、又はリンカー／官能化剤（例えば、-SH、シラン（例えば、3-アミノプロピルトリメトキシシラン等））を用いて）。

【0110】

実施例で説明されるように、一実施形態では、バイオリスティック細胞注入器（BioRad社製）を用いて金粒子を直接プラスチック基板上に衝突させることによって細胞トランスフェクション基板を製造することができる（例えば、実施例4、図5を参照）。

【0111】

他の方法では、例えばパルスレーザを用いて、基板又はマイクロピペット上の薄膜を加

10

20

30

40

50

熱することによって、薄膜を離散的なナノ粒子にアニーリングすることができることが発見された。従って、図6に示されるように、製造方法は、接着金属（例えば、チタン、クロム）の層、次に金（又は他の金属）膜の層をガラスやプラスチックや石英等の基板上に堆積させることを含み得る。そして、そのサンプルを加熱する（例えば、レーザパルス照射する）。十分に高いレーザエネルギーにおいて、金属フィルムが溶融して、その溶融金属が凝固して、ビーズ状の粒子が基板又はマイクロピペット上に形成される（図6のSEM画像に見て取れるように）。

【0112】

任意の接着金属（例えば、チタン）層を基板と金属との間に挟むことによって、基板に対する金膜並びにアニーリング後の金ビーズのより強力な接着が得られる。接着層が無くても、レーザパルス又は他の加熱方法によって、金を表面上のナノ粒子ビーズにアニーリングすることができる。

10

【0113】

他の方法では、薄膜を有する基板又はマイクロピペットが提供される。そして、薄膜をエッチングして、レーザ又は他のエネルギー源の印加によって加熱可能なナノスケールサイズ領域を残す。

【0114】

粒子アレイ製造方法を、ナノインプリント、電子ビームリソグラフィ等の他のマイクロ又はナノ製造法に拡張することができる。現状のプラスチック基板を、PDMS等の他のポリマー物質や、ガラス基板、シリコン基板等と置換することができる。

20

【0115】

上述の表面上に粒子及びナノ粒子を生成及び付着させる方法及び表面上に薄膜を形成する方法は例示的なものであり限定的なものではない。本願で開示される方法を用いれば、せいぜい通常通りの実験によって、他の粒子、ナノ粒子及び薄膜でコーティングされた表面を形成することができる。

【0116】

〔光ピンセットとの集積〕

非接着性細胞への従来のマイクロインジェクションは、吸引力を印加して細胞を安定化させるために他の保持ピペットを用いる必要があるので、面倒なプロセスである。この方法では、ピペットが細胞膜を貫通する際に注入ピペットによって与えられる力に対抗する支えを細胞が有する。吸気圧力は、注入ピペット及び保持ピペットを相対的に位置決めするものであるが、致命的な細胞の損傷及び脆弱な細胞の死に関与する可能性がある。非接着性細胞のマイクロインジェクション効率を上昇させるための現状の一方法は、注入の前及び基板からの細胞の取り外しの際に表面処理された基板上に細胞を結合させることである。この方法は、細胞に対する追加の化学処理をもたらすだけではなく、時間のかかるものである。光ピンセットについては、ミクロン更にはサブミクロンサイズの物体及び生体学的成分をトラップして操作することができると示されている。光ピンセットのトラッピング力は、典型的にピコニュートンのオーダーである。結果として、一般的には、光ピンセットを用いて、従来のガラスマイクロキャピラリー注入中に非接着性細胞を固定することは不可能である。

30

40

【0117】

これに対して、プラズモン光熱ピペット（本発明の手術ツール）は、容易に光ピンセットと組み合わせる可能である。この場合、操作される細胞は、光学力によって注入位置に自己整列される。注入プロセス中において、細胞は最小のせん断力及び機械的歪み（注入された細胞を生きたままにするための二つの重要なパラメータ）を受ける。光ピンセットと集積させたレーザ手術方法は、非接着性細胞に対する高速高効率マイクロインジェクションの可能性を有する。

【0118】

〔細胞の種類〕

一般的に、本願で説明される方法及びデバイスは、細胞膜を有する本質的にはあらゆる

50

細胞に対して使用可能である。また、本方法及びデバイスは、細胞壁を有する細胞に対しても使用可能である。

【0119】

従って、例えば、N I H 3 T 3 マウス線維芽細胞、H E K 2 9 3 T 胚腎臓線維芽細胞、H e L a 子宮頸がん細胞を含む接着性細胞が、本願で説明されるデバイス及び方法を用いて、G E P 発現プラスミドに注入されている。一般的に、接着性哺乳類細胞型を、本願で説明されるデバイス及び方法を用いて、以下の理由により簡単に注入することができると考えられる：（１）効果的な孔開け及び細胞の生存率の維持に関して最適に決定されるレーザーフルエンスが、試験された全ての種類の細胞に対して比較的狭い範囲内に存在しているから；（２）適切な注入箇所（例えば、核周囲や核自体）を決定するのに用いられる接着性細胞の特徴部が視覚的に容易に識別されるから。

10

【0120】

リンパ球、多様な種類の幹細胞、胚細胞等は非接着性であるが、このような細胞に対して注入又は他の“手術”を行うことが望まれることは多い。本願で説明される細胞手術ツールを光ピンセットと集積すると、これが可能になる。

【0121】

また、本願で説明される方法及びデバイスを用いると、細胞クラスター内に個々の細胞を注入すること（ヒト胚性幹細胞の成長及び多能性の維持に必要とされる）が、特に幹細胞クラスターの表面に対して可能となる。また、クラスター内に特定の細胞を定位的に注入すること（例えば、発育の追跡、勾配の評価等の多様な理由により望まれる）も可能になると考えられる。

20

【0122】

〔送達可能な物質〕

本願で説明される方法及びデバイスを用いて、本質的にはあらゆる所望の物質を細胞内に送達することができると考えられる。このような物質として、核酸、タンパク質、細胞小器官、ドラッグデリバリーナノ粒子、プローブ、標識等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。本願で説明される方法を用いて細胞内にプラスミドDNAを送達することは、既に少なくとも三種類の接着性細胞において実証されている。従って、本願で説明される方法及びデバイスを用いて、あらゆるプラスミドサイズの遺伝物質を簡単にトランスフェクションすることができる。

30

【0123】

B A C（細菌人工染色体，b a c t e r i a l a r t i f i c i a l c h r o m o s o m e）は、細胞を形質導入するのが難しく、大きな遺伝子異常を導入するのにサイズ制限（プラスミド、レトロウイルス、レンチウイルス）を有する送達媒体であり、発育中に特定の遺伝子の制限された発現を追跡するのが望まれている目標である。

【0124】

従って、本願で説明されるデバイス及び方法を用いて、自然の染色体又は合成染色体の全体又は一部を送達することができると考えられる。B A Cと同様に、従来の方法では多くの細胞型内に導入することが不可能な大型の染色体や染色体断片を、本方法によって細胞内に移植することができ、例えば、ヒトトリソミー症のモデル（例えば、ダウン症候群、クラインフェルター症候群）を求めることができる。

40

【0125】

同様に、本方法を、核の移植（例えば、体細胞核移植）に用いることができ、他の細胞小器官（例えば、ミトコンドリア、ナノ加工構造）を細胞内に容易に導入することができる。

【0126】

多様な実施形態において、試薬を構成する送達可能物質として、核酸（例えば、ベクター及び／又は発現カセット）、抑制RNA（例えば、S i R N A、S h R N A、m i R N A等）、リボザイム、タンパク質／ペプチド、酵素、抗体、イメージング試薬、細胞小器官（例えば、核、ミトコンドリア、核小体、リソソーム、リボソーム等）、染色体、細胞

50

内病原体、無生物粒子（量子ドット、表面増強ラマン散乱（SERS）粒子、マイクロビーズ等）等から成る群から選択された試薬が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0127】

[モジュールシステム]

特定の実施形態では、基板（トランスフェクション基板）が、既存の設備と容易に集積可能な“モジュール”として提供される。例えば、特定の実施形態では、トランスフェクション基板が、既存の顕微鏡のステージに対して追加可能な又は置換可能な形態で提供される。特定の実施形態では、基板は、倒立顕微鏡（例えば、Zeiss倒立顕微鏡）上のx/y/zステージを置換するような形態とされる。

10

【0128】

特定の実施形態では、トランスフェクション基板は、マイクロ流体システム（例えば、ラボオンチップシステム）として及び／又はマイクロ流体システムと集積可能なモジュールとして提供される。

【0129】

[細胞手術システム及びパターン化トランスフェクションシステム]

多様な実施形態において、本発明は、細胞手術又は細胞のパターン化トランスフェクションのためのシステムを想定している。特定の実施形態では、細胞手術システムは、本願で説明されるマイクロサージャリーツールと、例えば細胞に対してツールを正確に配置するためのマイクロマニピュレータ／ポジショナとを備える。本システムは、任意で、細胞を保持するための手段（例えば、ピペットや他のマニピュレータ）、手術ツールを介して細胞内に流体及び／又はガス又はデバイスを送達するための手段、例えばツールを介して細胞から流体、細胞小器官等を取り除くための手段等を更に備える。特定の実施形態では、本システムは、視覚化システム（例えば、顕微鏡）、データ／イメージ取得システム、視覚化システム、マイクロマニピュレータ、データ／イメージ取得システムを制御するためのコンピュータ制御システム等を備えることができる。

20

【0130】

同様に、多様な実施形態では、パターン化トランスフェクションシステムは、細胞トランスフェクション基板（例えば、本願で説明される粒子、ナノ粒子及び／又は薄膜を有する一以上の表面を備えた培養ベッセル）を備える。基板は、典型的に、細胞、及び／又は細胞培養物を有する。本システムは、任意で、試薬を送達するための手段、細胞内にトランスフェクションされる物質（エージェント）、電磁エネルギー源から基板の一部をマスキングするための手段等を備えることができる。

30

【0131】

特定の実施形態では、本システムは、任意で、手術ツール又はトランスフェクション基板上の粒子、ナノ粒子及び／又は薄膜を加熱する電磁エネルギー源を更に含む。適切なエネルギー源として、レーザ、磁場発生器、RF場発生器等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0132】

多様な実施形態において、本システムは、制御装置（例えば、レーザ制御装置）を含み得る。制御装置は、照射源の強度及び／若しくは持続期間及び／若しくは波長、並びに／又はマイクロサージャリーツール及び／若しくはトランスフェクション基板の照射パターンを制御するように構成可能である。特定の実施形態では、制御装置は、トランスフェクション基板及び／又はマイクロ流体システム（その中にトランスフェクション基板が配置される）を構成するマイクロチャネルを介する試薬の流れを検出及び／又は制御する。トランスフェクション基板が顕微鏡（例えば、倒立顕微鏡）上に設けられる場合、制御装置は、任意で、顕微鏡ステージ、顕微鏡焦点及び／又は顕微鏡からのイメージ取得を制御することができる。特定の実施形態では、制御装置は、任意で、マイクロキャピラリ（マイクロサージャリーツールを構成する）の充填、細胞表面及び／若しくは照射に対するマイクロサージャリーツールの角度、並びに／又は細胞内に試薬を注入するマイクロキャピラ

40

50

りの操作を制御する。特定の実施形態では、制御装置は、エネルギー源による先端部の照射に対するマイクロサージャリーツールの動作を調整する。

【0133】

[キット]

他の実施形態では、本発明は、単細胞手術、又は細胞内への物質（エージェント）のパターン化送達（パターン化トランスフェクション）を実施するためのキットを提供する。特定の実施形態では、本キットは、本願で説明される単細胞手術ツール及び／又はトランスフェクション基板を含む容器を備える。多様な実施形態において、本キットは、任意で、本願で説明される手術及び／又は細胞のパターン化トランスフェクションを実施するための試薬やデバイス（例えば、試薬、緩衝剤、チューブ、インジケータ、マニピュレータ等）のいずれかを追加的に含むことができる。

10

【0134】

また、本キットは、任意で、本発明の手術ツール及び／又はパターン化トランスフェクション基板を使用するための（例えば、本方法を実施するための）説明（つまり、プロトコル）を提供するラベル及び／又は説明書を含む。特定の実施形態では、その説明書には、物質を注入又は取り除くための及び／若しくは細胞の成分を操作するための本願で説明される細胞手術ツールの使用方法、並びに／又は細胞内に一以上の物質（エージェント）を送達するためのトランスフェクション基板の使用法が記載されている。

【0135】

説明書は典型的には文書又は印刷物を備えるが、これに限定されるものではない。このような説明を記憶してそれをエンドユーザに伝えることができるあらゆる媒体が本発明において想定される。このような媒体として、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えば、CD-ROM）等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。このような媒体は、こうした説明書を提供するインターネットサイトのアドレスを含み得る。

20

【0136】

[実施例]

以下の実施例は例示的なものであり、本願発明を限定するものではない。

【0161】

[実施例1]

30

[細胞手術ツールの製造及び使用]

本実施例は、ナノ粒子光熱効果をマイクロキャピラリ法と集積した新規細胞手術デバイスに関する。ここでは、概念実証のための実験結果を与える。従来のマイクロキャピラリ法は、単細胞の記録及び操作を行うための多目的ツールであるが、マイクロキャピラリが細胞膜に孔を穿つ際に、細胞に対して過度の応力を課す。結果として、この方法は、特に、小型の又は機械的に脆弱な細胞に対して、細胞の死をもたらすことが多い。

【0137】

レーザアブレーションを用いた現状の細胞手術方法（非特許文献7）は、機械的応力をなくすが、しっかり集束した光と、レーザの集束スポットに注入マイクロピペットを正確に位置決めすることとを必要とする。本実施例で説明される細胞手術デバイスは、マイクロキャピラリピペットの先端上のナノ粒子の光熱効果を利用する。ピペットが細胞に当たると、ナノ粒子のレーザ誘起加熱は細胞膜に一時的な孔を生じさせる。加熱は、ナノ粒子と接触している膜領域においてのみ生じるので、本デバイスは、非集束レーザ又は軽く集束したレーザを用いて動作することできる。このようにして、望ましくない応力が最小化される。強力なレーザ強度によって考えられる化学的影響が避けられて、研究されている操作細胞の生態が影響を受けないことが保証される。

40

【0138】

図1は、細胞手術ツールの概略を示す。金ナノ粒子がマイクロピペットの先端上にコーティングされている。貴金属ナノ粒子は、その表面プラズモン周波数に近い周波数を有する電磁波（通常は可視範囲及び近赤外線範囲）を強力に吸収する（非特許文献58）。例

50

えば、直径 30 nm の金ナノ球は、その消光スペクトルの 532 nm 付近の波長にピークを示す。レーザパルス励起により、ナノ粒子は、吸収されたエネルギーによって急速に加熱され、周囲媒体の過熱及び蒸発を生じさせる。この直接加熱又は崩壊する蒸気泡からのキャピテーション力が、細胞膜の透過性の上昇又は膜の“孔開け”をもたらす。損傷体積は、レーザパルスのフルエンス及びナノ粒子のサイズによって制御可能である。加熱される体積は、30 nm の金ナノ球の表面から数十ナノメートル広がり、ナノ粒子は、レーザパルスの印加後数ナノ秒以内に平衡温度まで冷えることが示されている（非特許文献 59、非特許文献 60）。結果として、膜又は細胞の残りの部分には反応するのに十分な時間がなく、機械的に影響を受けていないままである。このようにして、マイクロピペットが、簡単に細胞膜を貫通することができて、細胞の損傷が最少化される。

10

【0139】

〔実験及び結果〕

〔金ナノロッドの合成〕

多様な実施形態において、ナノロッドの合成は、リジッドテンプレート又は表面活性剤の使用のいずれかによって達成可能である。本応用では、比較的容易な合成方法である表面活性剤の方を採用した。概説すると、合成されたナノロッドは、Jana 等（非特許文献 61）によって開発されたシード媒介成長法によって生成され、この方法では、表面活性剤の存在下において、3~4 nm のシードが成長溶液に加えられて熟成されて、特異なアスペクト比を有するナノロッドが得られる。表面活性剤の濃度に加えて、特定の量の銀イオンを加えることによって、アスペクト比が制御されることが示されている（非特許文献 62）。結果物のナノロッド溶液を、炭素でコーティングされた銅グリッド上で TEM により特性評価した。図 4 は、アスペクト比が 3.2 及び 5.8 の合成されたナノロッドを示す。

20

【0140】

〔合成プロセス〕

ベンジルジメチルアンモニウムクロライドハイドレート（BDAC, Benzyl dimethyl ammonium chloride hydrate）、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB, hexadecyl trimethyl ammonium bromide）、L-アスコルビン酸、硝酸銀（ AgNO_3 ）、水素化ホウ素ナトリウム（ NaBH_4 ）、テトラクロロ金酸（ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ）を、シグマアルドリッチ社から入手した。脱イオン水（18 M）を実験全体を通して使用した。

30

【0141】

〔シード溶液〕

5.0 ml の 0.20 M CTAB を、5.0 ml の 0.0005 M HAuCl_4 と混合して、25℃で攪拌した。0.60 ml の良く冷えた 0.01 M NaBH_4 をその混合物に加えた。結果物の溶液は、金の還元により、茶色がかった黄色に変わった。結果物の溶液を二分間激しく攪拌して、全ての Au が Au^0 に還元されていることを保証した。

【0142】

〔成長溶液〕

20.0 ml の 0.15 M BDAC 及び 0.40 g の CTAB を組み合わせて、40℃で 20 分間超音波処理して、CTAB を完全に溶解させた。四つの別々の小瓶に、200 μl の 0.004 M AgNO_3 を分配して、続いて、5 ml の BDAC/CTAB 表面活性剤溶液を分配した。これによって、異なるように熟成される四つの異なる成長溶液が得られた。成長溶液はオレンジ色を帯びていた。各小瓶に対して、5.0 ml の 0.0010 M HAuCl_4 を加えて穏やかに混合し、続いて、70 μl の 0.9778 M L-アスコルビン酸を加えた。 Au^{3+} から Au^0 への還元中にオレンジ色は消えた。12 μm のシード溶液を各小瓶に加えた。これによって、赤みがかった色が生じ、これは、少なくとも 60% の Au が還元したことを示す。結果物の溶液を、1 時間、24 時間、48 時間、72 時間熟成した。

40

50

【0143】

シードAuがガラス上に直接成長して、続いて、成長溶液中にピペットを浸漬して、Au粒子を大きくした。

【0144】

[細胞手術ツールの使用]

ここで説明される実験では、波長532nmで持続時間5ナノ秒のパルスレーザを用いた。レーザは、 $5 \times 3 \text{ mm}^2$ の非集束スポット上に 883 J/m^2 のフルエンスを伝えた。非特許文献63で報告された方法を用いて、金ナノ粒子をガラスマイクロピペット上に直接合成した(図2)。RPMI中で培養したNALM-6細胞を使用した。ガラスマイクロピペット上のナノ粒子の光熱効果によって、細胞膜に高度に局在化させた一時的な開口を生じさせ、典型的な開口の寸法は、マイクロピペットの先端サイズに近く、 $2 \mu\text{m}$ 程度であった(図3C)。このプロセスの後において、細胞は生きたままであった。金ナノ粒子を有さない同じサイズのガラスマイクロピペットを用いた対照実験も行った。細胞膜はその形状を瞬間的に復元して、レーザパルスの印加後において孔が開いた兆候を示さなかった。また、導電性及び熱伝導性アモルファスカーボンコーティングのレーザ誘起光熱効果についても調べた。アモルファスカーボンの薄膜をガラスマイクロピペット上にスパッタリングした。実験結果は、同一のレーザ影響下において、細胞を瞬間的に溶解して殺す破裂性効果が大きな体積にわたって広がっているというものであった(図3B)。

【0145】

[結論]

この実験は、金属ナノ粒子の光熱効果を利用した新規細胞手術ツールを例示し、概念を立証する実験を与えるものである。アモルファスカーボンでコーティングされたマイクロピペットが瞬間的に細胞を溶解して殺すことと比べると、金ナノ粒子でコーティングされたマイクロピペットを用いると、細胞膜に対して局在化された一時的な孔開けが得られる。

【0146】

[実施例2]

[プラスミドDNAのトランスフェクション及び発現]

本プラズモン光熱ピペットを用いて、細胞膜に対する孔開けを実証した。ここで説明される実験では、Qスイッチ周波数二倍Nd:YAGパルスレーザを532nmの波長及び6nsのパルス持続期間で用いた(Continuum社のMillilite I)。レーザは、 11.8 mm^2 の非集束スポット上に 88.3 mJ/cm^2 のフルエンスを伝えた。スパッタリングによって、金/パラジウム薄膜をガラスマイクロピペット上に堆積させた。DMEM内で培養したヒト胚腎臓HEK293T細胞を用いた。ガラスマイクロピペット上のAu/Pd薄膜の光熱効果によって、細胞膜の崩壊を生じさせた。5nmの膜厚に対して、膜の開口の寸法は、マイクロピペットの先端サイズに近く、 $2 \mu\text{m}$ 程度であった(例えば、図11のaを参照)。厚さ13nmの膜に対しては、大きな体積にわたって広がっている破裂性効果が、同一のレーザ影響下において、細胞を瞬間的に溶解して殺した(図11のb)。コーティングを有さない同じサイズのガラスマイクロピペットを用いた対照実験も行った。細胞膜は、レーザパルス印加後において孔開け又は損傷の兆候を示さなかった。

【0147】

また、HEK293T細胞内にプラスミドをエンコードする緑色蛍光タンパク質(GFP, green fluorescence protein)のマイクロインジェクションも実証した。プラスミドは、DNAの環状鎖であり、細胞内へ注入されると、細胞にGFPを生じさせて緑色蛍光発光する。図12のaは、マイクロインジェクションプロセスを示す。光熱ピペットが細胞膜に優しく接触すると、プラスミド含有緩衝剤の連続流がピペットの先端から放出された。レーザパルスの印加後、細胞全体にわたって緩衝剤を挿入して、ピペットを細胞から直ちに外した。注入後24時間にわたって注入された細胞は生きていて、GFPを発現した。別途対照実験を行い、レーザパルスを印加せずに細胞膜

に接触させつつプラスミドを含有する緩衝剤の流れをピペットが放出した。24時間後に、GFPを発現している細胞は発見されなかった。これは、プラズモン光熱ピペットが細胞膜に孔を開けて、その中にプラスミドを流し込むことに成功したことの直接的な証拠である。また、細胞はこのプロセスから生き延び、24時間後において生きたままであった。

【0148】

[実施例3]

[光ピンセットとの集積]

図13には、開口数(N.A.)1.3 100×の油浸レンズの焦点(集束点)における50mWで1064nmのレーザービームによってトラップされ、光熱ピペットの先端に接触しているNa1m-6細胞が示されている。この光ピンセットは、光熱細胞手術プロセスの時間分解イメージを撮るために用いられるZeiss社の倒立顕微鏡の上に構築されている。これは、光学トラッピング、細胞手術、時間分解イメージングを同時に行うことができる集積光学システムを提供する。光熱ピペットは、細胞膜に孔を開けるのにナノ気泡の破裂を用いるものであるので、ピペットの先端が細胞に優しく接触するだけでよい。この場合、光ピンセットは、そのプロセス中に細胞を適所に保持するのに十分なトラッピング力を有する。保持ピペット及び注入ピペットの両方から細胞に印加される接触力を最少化することに加えて、光ピンセットを組み込むことの他の利点は、操作中の細胞の選択、トラッピング、放出のし易さという点である。

【0149】

[実施例4]

[金粒子でコーティングされた基板を用いた生細胞への光イメージパターン化分子送達]

オプトポレーションは、細胞内に分子及び遺伝子を送達する方法であり、強く集束したパルスレーザービームを利用して、細胞膜に細孔を生成する(非特許文献7)。この方法は、無接触送達を可能にし、フェムト秒レーザーを用いて、単細胞を標的にした100%のトランスフェクション効率を実証されている(非特許文献6)。この方法の欠点の一つは、サイト特定又はパターン化細胞トランスフェクションを得るために、レーザービームが全細胞を走査しなければならない点であり、これは、大型のパターン化細胞トランスフェクションが望まれる場合には、複雑さの問題等により時間がかかる。

【0150】

細胞膜の透過性を増大させる他の無接触法は、光吸収マイクロ粒子又はナノ粒子を使うことである(非特許文献59)。短パルスレーザーの照射によって、粒子は、過渡性で局在化された破裂性気泡を生成し、粒子に隣接する細胞膜の一部を崩壊させて、残りの細胞構造を無傷のままにする。粒子のサイズ、密度、レーザーフルエンスを制御することによって、細胞の透過性上昇及びトランスフェクションが高効率で達成可能である(非特許文献64)。

【0151】

ここでは、光イメージパターンニングによって分子送達に対して細胞を空間的に選択及び標的化することができる単純なデバイスについて説明する。本方法は、複雑な単層混合物内における特定の細胞への明確なパターンのイメージベース分子及び遺伝子の大規模送達を達成する可能性を有する。

【0152】

[原理及びデバイス構造]

特定の実施形態では、本デバイスは、表面上に固定した粒子(例えば、金粒子)を備えたプラスチック基板で構成される(例えば、図7を参照)。例えば、密集培養物が形成されるまで、細胞をこの基板上に播種する。パルスレーザーをシャドウマスクに照射して、対応する照射パターンを基板上に写す。パルスレーザーに晒された領域において、吸収された光エネルギーによって、金粒子が高温に加熱される。数ナノ秒以内に、熱は金粒子を取り囲む液体媒体薄層に散逸して、破裂性の蒸気泡を発生させる(非特許文献60)。蒸気泡の急速な膨張及びその後の崩壊が、過渡流体流れを生じさせて、接着性細胞に強力なせん

断応力を誘起して、細胞膜に局在化した細孔が形成される。結果として、流体流れ又は熱拡散によって、膜不透過性分子を細胞内に運ぶことができる。キャビテーション気泡が、金粒子がレーザに晒された箇所においてのみ生じるので、細胞培養物の特定の領域における分子摂取を対象とするように、光学パターンを設計することができる。このようにして、基板上的金粒子のサイズ、密度、励起レーザフルーエンスを制御することによって、高スループットで空間的に標的化された分子送達が可能になる。

【0153】

[実験及び結果]

一実験では、2200 psiの衝突圧力でバイオリスティック注入器（Bio-Rad社のPDS-1000）を用いて、0.6 μm の金ナノ球（Bio-Rad社製）をプラスチックペトリ皿に衝突させた。そして、DMEM内で培養した不死化ヒト胚肝臓細胞（HEK293T）を皿の上に置いて、略70～80%の細胞密集度が得られるまで一晩培養した。Qスイッチ周波数二倍の波長532 nmのNd:YAGレーザ（Continuum社のMinilite I）を用いて、デバイスに照射を行った。レーザは、6ナノ秒のパルス幅及び9.4 mm^2 のスポットサイズを有する。シャドウマスクをビーム経路に配置して、所望の光学パターンを投射して、0.83 $\times$ の縮写で、デバイス上に写した。金粒子から誘起されたキャビテーション気泡を、図8に示される時間分解イメージングシステムを用いて撮影した。高速増感CCDカメラ（Princeton Instrument社のPI-MAX II）によって、500 psの短さの露光時間が得られた。撮影された気泡のイメージと励起レーザパルスとの間のナノ秒の時間遅延を、光ファイバ遅延ラインの長さによって制御した。レーザパルス印加中、1 mg/mlの膜不透過性蛍光色素カルセイン（Invitrogen社製で、分子量622.5）を含有する媒体中に細胞を浸漬した。キャビテーション導入後、細胞培養物をリン酸緩衝食塩水で洗浄し、蛍光染色を調べる前に、新品の媒体中に再び浸漬した。

【0154】

図9は、シャドウマスクを用いずにレーザパルスを印加した78ナノ秒後に加熱金粒子によって誘起されたキャビテーション気泡を示す。粒子の密度は略0.004個/ μm^2 である。これは、一細胞当たり0.9個の気泡に対応する（HEK293T細胞の面積を略15 $\mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$ と仮定する）。図10では、シャドウマスクを用いて、デバイスの左半分のみレーザパルスを照射した（破線がシャドウマスクの境界に対応する）。レーザのインフルーエンスは128.2 mJ/cm^2 であり、7回のパルスを印加した。蛍光イメージは、色素摂取パターンが照らされた領域と一致していることを明確に示している。

【0155】

[結論]

光パターン化分子送達を可能にするデバイスがここで説明された。蛍光分子の送達の成功が、接着性細胞培養物において実証された。標的とされる送達領域をシャドウマスクによって制御した。このデバイスは、生細胞における大規模な、光パターン化分子及び遺伝子送達を達成する可能性を有する。

【0156】

[実施例5]

[標的細胞への試薬の並列送達]

マイクロ流体構造上に光吸収金属ナノ構造を集積させることによって他の並列送達プラットフォームを開発した（例えば、図14を参照）。図示されるデバイスは、側壁にチタンコーティングを有するマイクロ流体オリフィスのアレイで構成される。オリフィスは、その可能のマイクロ流体チャネルのネットワークに接続される。レーザパルスを印加して細胞膜を開口すると、マイクロ流体チャネル中に担持されたカーゴを、外部圧力源によって流体をポンピングすることによって、オリフィスの上の細胞内に積極的に送達することができる。

【0157】

このデバイスで、並列気泡励起を試験した。レーザパルス（パルス幅 6 ns、波長 532 nm）を構造に照射することによって、核円形の開口に気泡を同時に発生させた。新月型の Ti 薄膜コーティングによって、シリンダー状の側壁の一部に沿ってのみ気泡の破裂が生じる（例えば、図 19 を参照）。

【0158】

細胞膜の開口及びカーゴの送達を試験するため、HeLa 細胞をこのデバイス上に播種した。例によって、細胞は SU-8 基板及びオリフィスの上に成長して分裂した。膜不透過性緑色蛍光 FITC-デキストラン（分子量 = 3 kDa）を、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で細胞培地に担持させた。 $156 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ のレーザパルス印加後、円形のオリフィスの上に成長してレーザ誘起気泡破裂に晒された細胞において、蛍光色素の摂取が観測された（例えば、図 20 を参照）。この場合、送達は、受動拡散によるものであった。

【0159】

[実施例 6]

[哺乳類細胞内への大型カーゴ送達のための光熱ナノブレード]

弾力的で機械的に脆弱で直ぐに再び閉じてしまう哺乳類細胞膜の制御された切断を達成することは難しい。本実施例では、短レーザパルスエネルギーを取り込んでそれを高度に局在化した破裂性蒸気泡（この気泡は、高速流体流れ及び誘起される一時的なせん断応力によって軽く接触している細胞膜に急速に孔を穿つ）に変換する金属ナノ構造を利用した光熱ナノブレードについて説明する。キャビテーション気泡パターンは、金属構造の構成並びにレーザパルスの持続期間及びエネルギーによって制御される。マイクロピペットと金属ナノ構造を集積させると、ナノブレードが、高濃度カーゴ（ 5×10^8 個の生細菌/mL）を高効率（46%）且つ高い細胞生存率（>90%）で哺乳類細胞内に送達するためのマイクロメートルサイズの膜アクセルポートを発生させる。三桁のサイズ範囲にわたる追加的な生物学的カーゴ及び無生物カーゴ（DNA、RNA、200 nm のポリスチレンビーズから $2 \mu\text{m}$ の細菌等）が、多種の哺乳類細胞内に送達されている。全体として、光熱ナノブレードは、哺乳類細胞内に多様なカーゴを送達するための効果的方法である。

【0160】

本実施例は、マイクロキャピラリピペットと集積させた金属ナノ構造である光熱ナノブレードに関する（図 21）。光熱ナノブレードは、光パルスエネルギーを取り込んで空間的にパターン化され時間的に同期されたキャビテーション気泡を生じさせて、それが高速で局在化した流体流れを生じさせる。細胞膜等の柔らかい物質又は脆弱な構造は、光熱ブレードと接触すると、超高速で局在化した流れが、構造の残りの部分にはほとんど影響を与えずに、接触領域付近で膜に孔を穿つことができる。膜の切断は、レーザ誘起キャビテーション気泡からの強力な渡過性の機械的せん断応力によって生じる（非特許文献 65、非特許文献 66、非特許文献 67）。従って、細胞内にマイクロピペットを進ませずに細胞内への送達ポータルが生じる。切断中においてブレードは細胞に優しく接触するので、膜の下方における強力な機械的支持体の必要性がなくなる。この新規デバイスは、高効率且つ高い細胞生存率で、哺乳類体細胞内への多様なサイズの物体（生体分子から細菌まで）の細胞内送達を可能にする。

【0161】

光熱ナノブレードを実演するため、厚さ 100 nm のチタン（Ti）薄膜を、先端直径 $2 \mu\text{m}$ のガラスマイクロキャピラリピペットの先端に堆積させた（図 22 A 及び図 22 B）。Ti でコーティングされたマイクロピペットを、倒立顕微鏡ステージ上の電動マイクロマニピュレータアームに取り付けた。マイクロピペットの先端を細胞膜に軽く接触させて配置し、波長 532 nm の Nd:YAG レーザの 6 ns のパルスで、対物レンズを介して幅 260 nm のフィールドに対して照射を行った。パルスレーザへの露出は、Ti 及び隣接する水薄層を急速に加熱して、リング状の Ti 薄膜に沿って局在化した蒸気泡破裂を誘起して、接触している細胞膜を切断する。レーザパルス、Ti 加熱、キャビテーション気泡膨張そしてその崩壊というこのプロセスには、数百ナノ秒しかかからない。マイクロピペット内部の流体及びカーゴの圧力制御された送達は、レーザパルスの印加及び膜の切

断と同期される。

【0162】

[物質及び方法]

[デバイスの製造及び実験設定]

チタン (Ti) でコーティングされたマイクロピペットを、直径1mmのボロシリケートガラスキャピラリチューブ (Sutter Instruments社のP-97) を加熱して引き伸ばし、マグネトロンスパッタ堆積システムを用いて、テーパ状の端部にTi薄膜を堆積させることによって製造した。Tiコーティングの厚さ及びマイクロピペットの先端直径を、走査型電子顕微鏡を用いて定量化した。レーザパルスシステムとして、Qスイッチ周波数二倍Nd:YAGレーザ (Continuum社のMinilite I 10)

【0163】

レーザビームを偏光ビームスプリッタで分裂させて、一方のアームを倒立顕微鏡 (Zeiss社のAxioObserver) の蛍光ポートに送り、対物レンズ (40×、0.6 NA) 幅260 μmのレーザスポットをサンプル平面上に発生させた。カーゴ送達用に最適化されたレーザフルエンスは180 mJ/cm²であった。電気スイッチを設けて、励起レーザパルスを液体注入システム (Eppendorf社のFemtoJet) と同期させた。キャビテーション気泡の動力学を特性評価するための時間分解イメージングシステムを、500 psという短い露光時間を有する増感CCDカメラ (Princeton Instruments社のPI-MAX2) を用いて構築した。レーザトリガー 20
信号の受信とカメラのシャッター開放との間のプログラム可能な遅延を、カメラ制御ユニットによって設定した。偏光ビームスプリッタの後方において、レーザビームの他方のアームを蛍光色素細胞に送った。励起蛍光パルス (略698 nmに波長の中心がある) をマルチモードファイバに結合して、顕微鏡の集光レンズに送り、カメラのシャッターと同期させてサンプルに照射した。撮影された気泡イメージとサンプル励起レーザパルスとの間のナノ秒の時間遅延を、光ファイバ遅延ラインの長さによって制御した。

【0164】

[Tiコーティングされたマイクロピペット上の強度パターンの数値計算]

3次元有限差分時間領域 (FDTD, finite difference time domain) 法を用いて、電磁強度パターンをシミュレーションした (RSoft 30
Design GroupのFullWAVE)。シミュレーション領域を、水媒体領域 ($n_{\text{water}} = 1.34$) 及び、先端及び外側の側壁がTi ($n_{\text{Ti}} = 1.86 + 2.56i$) 薄膜でコーティングされたガラスマイクロピペット ($n_{\text{glass}} = 1.46$) で構築した。全領域を、完全整合境界層で取り囲んで、無限に広がる空間を再現した。ピペットの先端に対して30度の角度を成す波数ベクトルk及びyに沿って偏光した電場での平面波励起 ($\lambda = 532 \text{ nm}$) を用いた。Tiの時間平均強度プロファイル $|E_{\text{ave}}|^2$ を、電磁波振動に対して正規化した電気エネルギー密度によって得た。

【0165】

[膜切断用の光熱ナノブレードの最適なレーザフルエンスの決定]

最適なレーザフルエンス、膜開口、高い細胞生存率の維持についての基準について検討した。レーザパルス印加前に、ヨウ化プロピジウム (PI, propidium iodide) 色素を細胞培地に加えた。マイクロピペットを細胞膜に接触させて、特定のフルエンスレベルのレーザパルスを照射した。レーザパルス印加後、加熱された細胞を直ちに調べてPIの摂取を評価した。別途、細胞生存率を、レーザパルス印加の90分後にPIを加えて同様に決定し、また経時的に視覚的成長検出を行った。 40

【0166】

[細胞生存率の評価]

細胞生存率を、光熱ナノブレードでの切断の90分後にAnnexin V (アネキシンV) 及びヨウ化プロピジウム (PI) 細胞染色によって決定した。注入された細胞を正確に追跡するため、化学的にパターン化されたガラスカバースリップ基板上に細胞を播種 50

した（非特許文献68）。円形領域（直径略200 μ m）を画定して、その領域内に細胞の接着及び成長を制限した。各実験に対して、同一の円形パターン（一つのパターン内に略60個の細胞）内の全ての細胞について、同一のレーザパルス及びカーゴ送達条件とした。パターン化基板上に培養されている細胞の生存率の影響を排除するため、処理パターン内で生きている細胞のパーセンテージを、同一のガラス基板上の隣接する未処理パターン内で生きている細胞のパーセンテージで正規化した。送達後の生存率を、三つの別々の実験の平均によって決定した。

【0167】

〔免疫イメージングを用いた生体分子、カルボン酸ビーズ、細菌の送達〕

GFP発現RNAを、1 $\times$ の（1倍の）PBS（pH7.4）中に希釈して、IMR90一次ヒト肺線維芽細胞内に注入した。カチオン性の100nmの緑色ポリスチレンビーズで、DsRedエンコーディングレンチウイルスDNAを培養して、球表面にDNAを吸着させた。ビーズを1 $\times$ のPBS（pH7.4）中に懸濁させて、ヒト胚性幹（hES, human embryonic stem）細胞内に注入した。マトリゲル（BD Biosciences社製）の薄層の上でROCK抑制剤（非特許文献69）を用いて、hES細胞を解離させて培養した。DsRedの発現を注入の24時間後に評価した。緑色カルボン酸修飾ポリスチレンビーズ（200nm）を1 $\times$ のPBS（pH7.4）（0.1体積%の固体）に懸濁させて、HEK293T細胞内に注入した。蛍光バークホルデリア・タイランデンシス（Burkholderia thailandensis）細菌を、1 $\times$ のPBS（pH7.4）（ $10^8 \sim 10^9$ /mLの濃度）に懸濁させて、HeLa細胞に注入した。ダルベッコ修飾イーグル培地（DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium）を用いて、ペニシリン及びストレプトマイシンを用いずに、チャンバ顕微鏡スライド（Nunc LabTek）中で細胞を培養した。注入後直ちに、PBSで3回、細胞を洗浄して、1000mg/mLのカナマイシンを含有する新品の培地内で2時間にわたって培養して、細胞外細菌を殺した。そして、成長培地を、5mg/mLのセフトジジムを含有するDMEMに交換して、細胞外細菌の成長を抑制し、5%のCO₂中で37 $^{\circ}$ Cにおいて更に16~24時間にわたって培養した。注入後15~24時間後において、細胞を4%のバラホルムアルデヒドで固定して、Aluxa Fluor標識化ファロイジンで染色して、アクチン細胞骨格を視覚化した（Invitrogen）。そして、細胞を、LeicaのSP2 AOB Sレーザ走査共焦点顕微鏡設備を用いて視覚化した。

【0168】

〔細菌の染色及び成長条件〕

バークホルデリア・タイランデンシス及び変異派生物をL培地で培養した。必要に応じて、クロラムフェニコール（25 μ g/mL）又はテトラサイクリン（20 μ g/mL）を加えた。

【0169】

Lブロス中で、バークホルデリア・タイランデンシスE264を、1.0の光学密度（OD₆₀₀）（ 4×10^8 CFU/mL）に成長させた。全体として、37 $^{\circ}$ Cで2時間にわたって、10:1の感染多重度（MOI, multiplicity of infection）で、12ウェルのプレート中に成長させた 1×10^5 個のHeLa細胞を細菌に感染させた。感染細胞を、PBSで洗浄して、400 μ g/mLのカナマイシンを含有する新品の培地で15分間にわたって培養して、細胞外細菌を殺し、PBS中の1%のTriton X-100で溶解した。感染HeLa細胞溶解物の複数の希釈物を、L寒天上に分布させて、細胞内細菌の数を、CFUアッセイによって決定した。

【0170】

〔結果及び検討〕

〔光熱ナノブレード上の光強度パターンのシミュレーション〕

キャビテーション気泡パターンは、薄膜の組成及び構成、並びにレーザ励起パラメータ（波長、パルス持続期間、エネルギー等）によって制御される。図22Cは、レーザ励起

10

20

30

40

50

されたTiでコーティングされたマイクロピペットの3次元有限差分時間領域(FDTD)シミュレーションを用いた計算結果を示す。Tiでコーティングされたマイクロピペットに対して、先端に対して30°の角度で照射を行った。直線偏光では、プラズモン増強光吸収($\propto |E_{ave}|^2$)は、幅2μmのTiリングに対して不均一である(図22D)。高強度領域は、波の偏光方向に沿ってリングの縁に集中している。Tiリングの温度分布は、高強度領域に発生した熱だけではなく、レーザパルス印加中に低温の金属領域及び周囲媒体に向かう熱拡散によっても支配される。マイクロピペット上のTi膜において、熱拡散帳($\sim (D_\tau)^{1/2}$)の見積もりは、6nsにおいて230nmである。これは、リング状のピペットの先端全体に沿って滑らかな温度プロファイルをもたらす。従って、Ti膜からの熱エネルギー伝導が、隣接する水薄層を臨界温度以上に加熱して(非特許文献60)、リング状のマイクロピペットの先端に蒸気ナノ気泡を発生させる(図23A)。

10

【0171】

[キャビテーション気泡誘起膜切断及びそれに対応する細胞生存率]

生哺乳類細胞内へのマイクロメートルサイズのカーゴの送達については、過渡性の膜ポータルがカーゴのサイズに適合していることが望まれる。更に、細胞の修復を可能にして生存率を維持するように損傷領域が制限されることが好ましい。図23Aは、レーザパルスの照射の70ns後における傾斜させたTiでコーティングされたマイクロピペットの先端におけるキャビテーション気泡を示す。先端が細胞膜に接触すると、その相互作用が気泡の膨張を抑制するので、気泡サイズの劇的な減少が観測された。この場合、70nsで、気泡が、先端の縁から最大400nmの半径にまで成長し、レーザパルスの印加後200nm以内に完全に崩壊する(図23A及び図23B)。染色細胞の生存率(図23C)によって証明されているように、ブレードの先端は、セル内には決して入っていかず、細胞内構造の完全性が保たれて、迅速で修復可能なように細孔が再び閉じるのに有用となる。細胞生存率を、レーザパルス印加の90分後におけるAnnexin V及びヨウ化プロピジウム(PI)排他的染色によって決定した。こうした条件下において、レーザパルス及び破裂のみの場合(180mJ/cm²の最適フルエンス)、また、HeLa細胞又はHEK293T細胞内への緩衝剤注入と組み合わせた場合において、>90%の細胞生存率が得られた。光熱ブレードで処理された細胞を24時間にわたってモニタリングしたが、細胞は生きたままで、通常通りに成長及び分裂を続けた。

20

30

【0172】

[光熱ナノブレードによる生体分子及び細菌の送達]

多様な種類の細胞に対して光熱ナノブレードを用いて送達されるカーゴのサイズを調べた。GFP発現RNAが、リポフェクタミン耐性IMR90一次ヒト肺線維芽細胞内に効率的に送達され、また、注入後に、ROCK38抑制剤を分散させたヒト胚性幹細胞内における緑色蛍光ポリスチレンビーズ上にコーティングされたDsRed含有レンチウイルスの発現にも成功した。直径200nmの蛍光ビーズが詰まらずに送達され、マイクロメートルサイズのバクテリアについても同様であった。更に、最も大きくて脆弱なカーゴとして細胞内細菌の送達についてこの方法で試した(図25)。パークホルデリア・タイラデンシスは、略0.7μm×2μmのロッド状の細菌である。注入効率を決定するため、GFP標識細菌を、略5×10⁸/mLの濃度(従来のマイクロインジェクション(非特許文献)よりも2桁高い濃度)で緩衝剤中に懸濁させた。細胞内に送達される液体体積は略1pLに制限されるので、高いカーゴ濃度は、高い送達効率を達成するのに非常に重要である。高濃度にしないと、1回の注入で1個の細菌が放出される確率が低くなる。本実験では、レーザパルス照射及び細胞開口において、1~5pLの細菌溶液がピペットから放出されて、略1個の細菌/1回の注入の平均に対応している。ピペットの先端は細胞膜に軽く接触して、切断後においてピペットのボアが細胞で完全には密封されていなかったため、放出された溶液の全てが細胞内に送達された訳ではない。この条件下における複数回の別個の実験から、46%の平均送達効率を得られた。

40

【0173】

50

更に、パークホルデリア・タイランデンススを有する細胞を2時間培養することによって、H e L a細胞内への自然細胞感染効率を調べた。光熱注入による送達効率は、0.8%のパークホルデリア・タイランデンススの自然H e L a細胞感染率よりも2桁高い。重要なのは、細菌増殖及びアクチン重合（非特許文献71）によって確かめられるように、移植から24時間後の注入細胞において、細菌が生き残って、ガラスピペット内部での気泡サイクル中の破壊及び大型ボアの先端開口による注入中のせん断から保護されたことである（図25C）。

【0174】

〔光熱ナノブレードの信頼性評価〕

ロバストな動作のためには、金属薄膜が、高温、衝撃波からの過度な圧力、キャビテーション気泡によって生じる高速流に耐えられることが望ましい。Tiが、金等の他の不活性金属と比較して、その高い融点及びガラス基板に対する強い接着性のため、コーティング物質として選択された（非特許文献72）。本発明者の実験では、金でコーティングされたマイクロピペットが、数回のレーザパルス印加後に、薄膜の損傷のために壊れた。Tiでコーティングされたマイクロピペットは、少なくとも50回のレーザパルス及び気泡破裂サイクルに対して機能を保ったままであることが確かめられた。

【0175】

〔結論〕

本実施例で説明される光熱ナノブレードは、現状では送達不能な大型カーゴ（現状の送達方法のサイズ制限を超えている染色体、細胞小器官、細胞内病原体等）を哺乳類細胞内に送達する可能性を有する。光熱ナノブレードの追加的な利点はその使い易さである。膜切断がレーザパルスのエネルギー及びTiコーティングの構成によって制御させるので、ユーザは、送達を行うためにマイクロピペットの先端を細胞膜に優しく接触させて配置するだけでよい。対照的に、従来のガラスマイクロキャピラリーマイクロインジェクションでは、送達効率及び細胞生存率が、ガラスニードルを細胞内に挿入する仕方（例えば、速度、力、角度）に大きく左右される。結果として、従来の方法は、ユーザが熟練するのにかなりの訓練及び経験を要する。また、光熱ナノブレードを用いると、マイクロピペットを細胞に貫通させてまた細胞から抜くための高速“ジグザグ”運動が必要でなくなるので、脆弱なマイクロピペットの先端が壊れる確率が減る。光熱ナノブレードは、今回の実演では、特定の表面プラズモン共鳴モードで動作しているものではない。励起レーザ波長に整合するための金属ナノ構造の更なる最適化は、キャビテーション気泡を励起するための閾値レーザエネルギーを低下させ得る。

【0176】

本願で説明される実施例及び実施形態は例示的なものであり、そこから多様な修正や変更が当業者には想定されるものであり、それらは本願の精神及び範囲並びに添付の特許請求の範囲内に含まれるものである。本願で引用される全ての文献は、あらゆる目的のためその全体が参照として本願に組み込まれるものである。

【図 1】

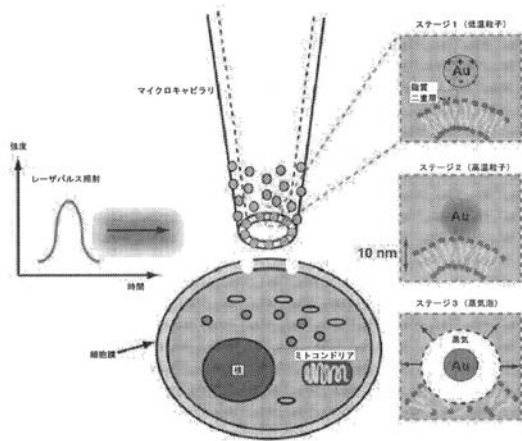


Fig. 1

【図 2】

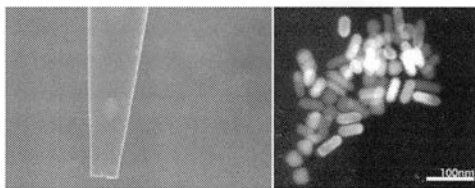
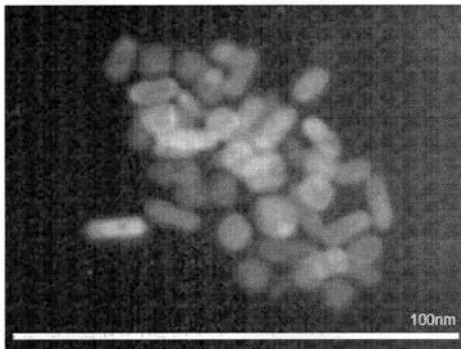


Fig. 2

【図 4】

サンプル A



サンプル C



Fig. 4

【図 3】

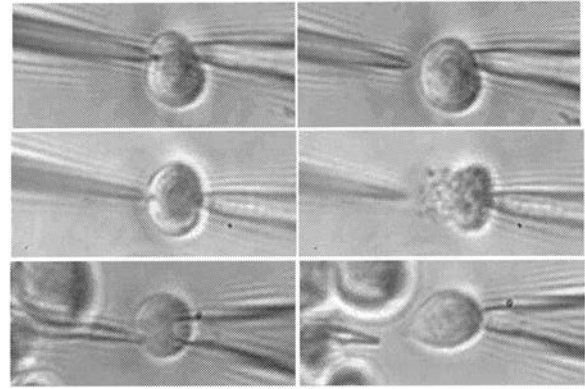
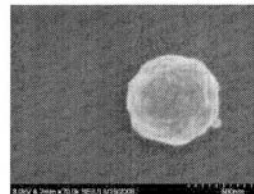
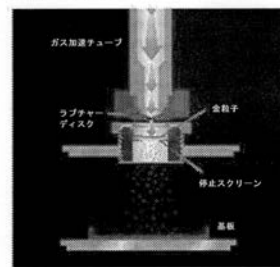


Fig. 3

【図 5】

パリスティック注入器を用いた
ガラス及びプラスチック基板への
金粒子の衝突



金粒子の直径
= 0.6 μm



金粒子の密度
= 0.01 個 / μm^2
= 1 細胞当たり 1 粒子
(細胞の面積 $\sim 10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ と仮定)

Fig. 5

【図 6】

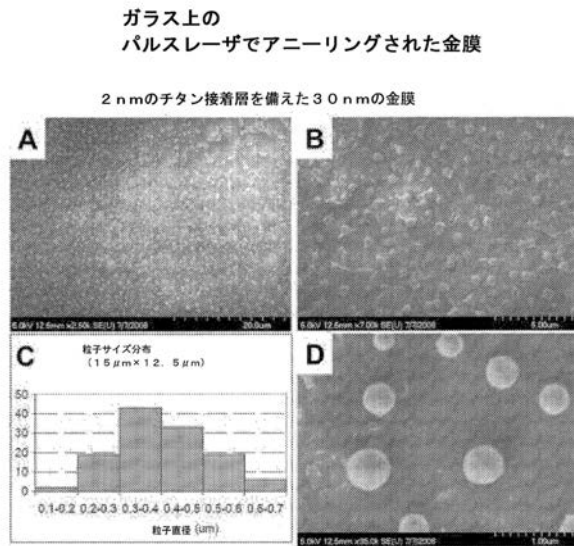


Fig. 6

【図 7】

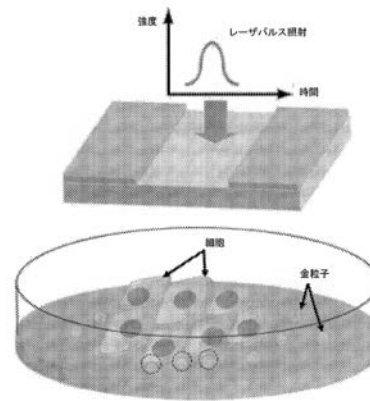


Fig. 7

【図 8】

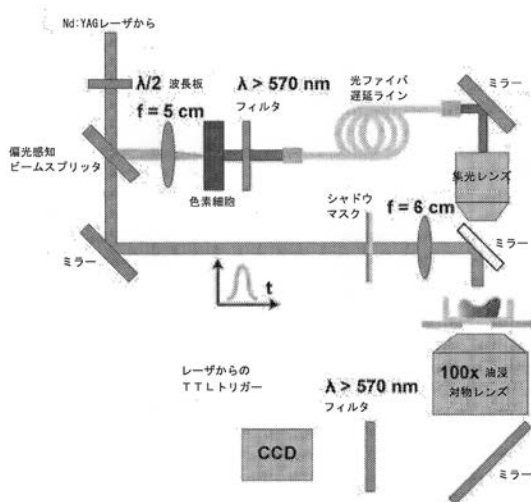


Fig. 8

【図 9】

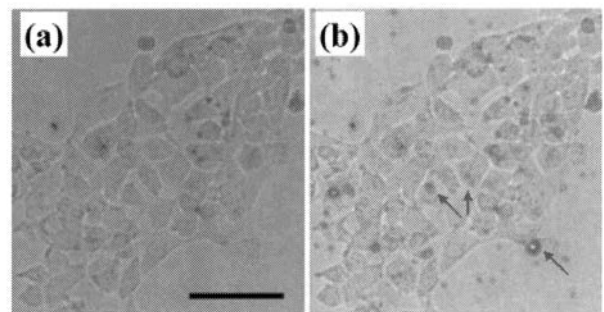


Fig. 9

【図 10】

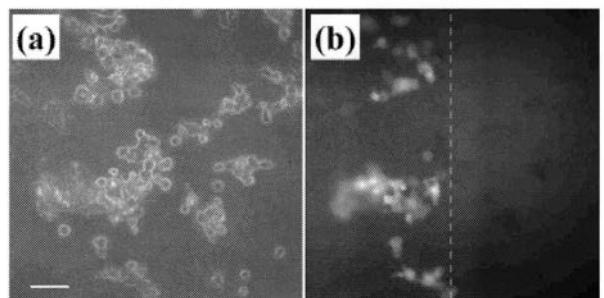


Fig. 10

【図 1 1】

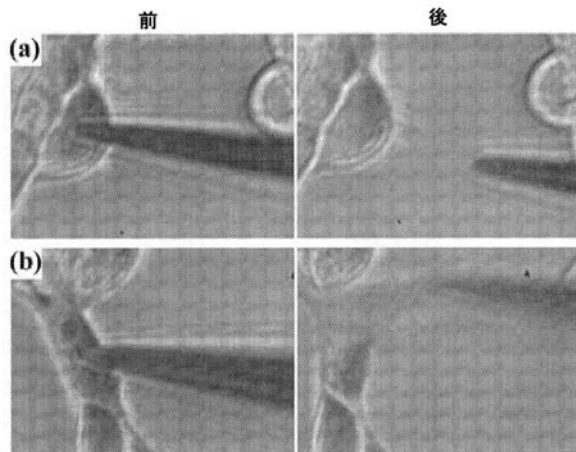


Fig. 11

【図 1 2】

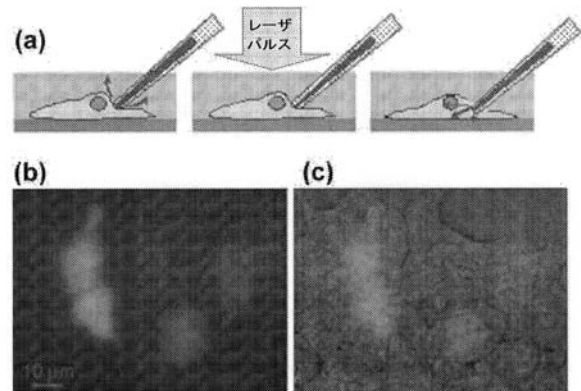


Fig. 12

【図 1 3】

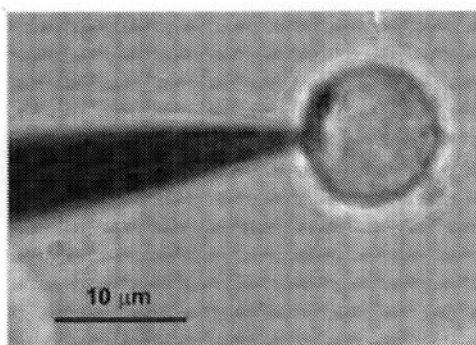
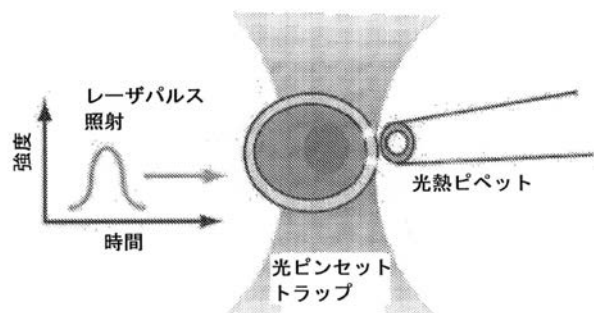


Fig. 13

【図 1 4】

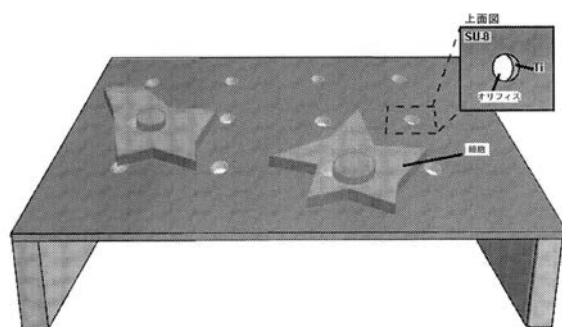


Fig. 14

【図 15】

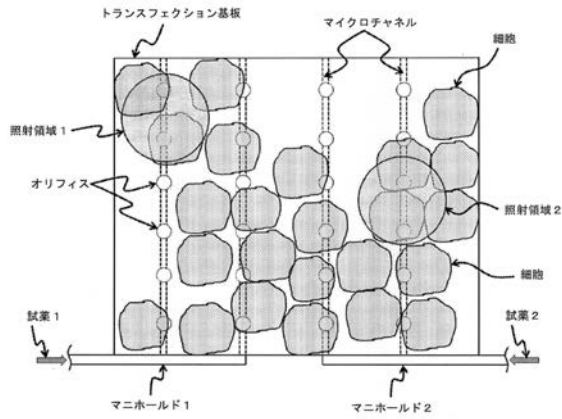


Fig. 15

【図 16 A】

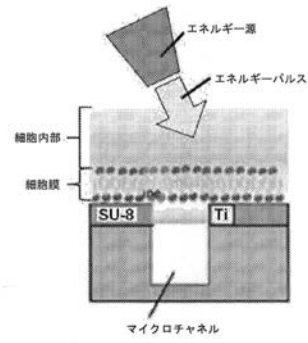


Fig. 16A

【図 16 B】

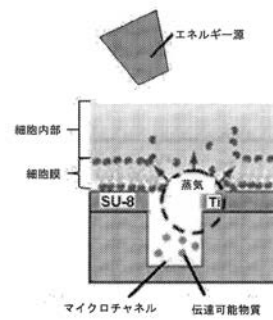


Fig. 16B

【図 16 C】

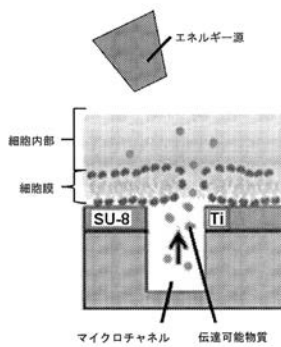


Fig. 16C

【図 17】

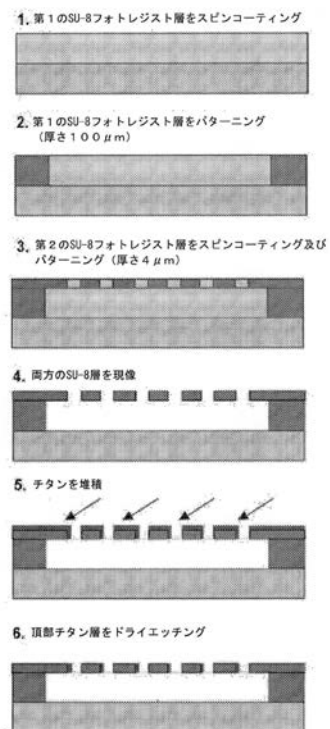


Fig. 17

【図 18】

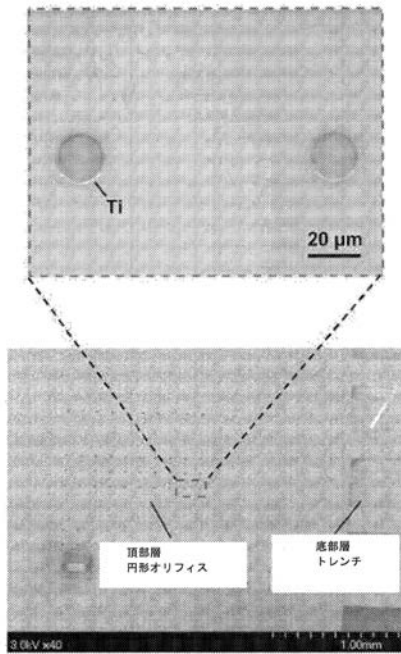


Fig. 18

【図 19】

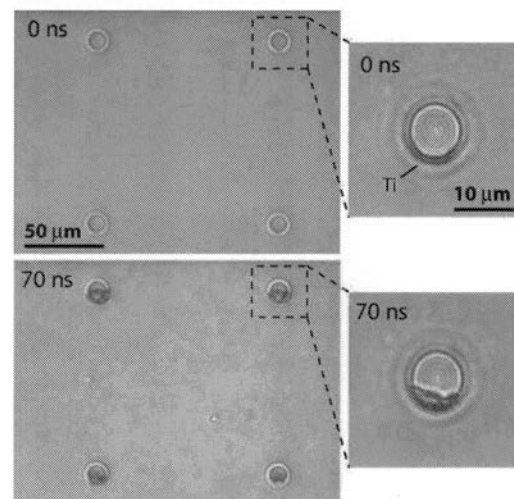


Fig. 19

【図 20】

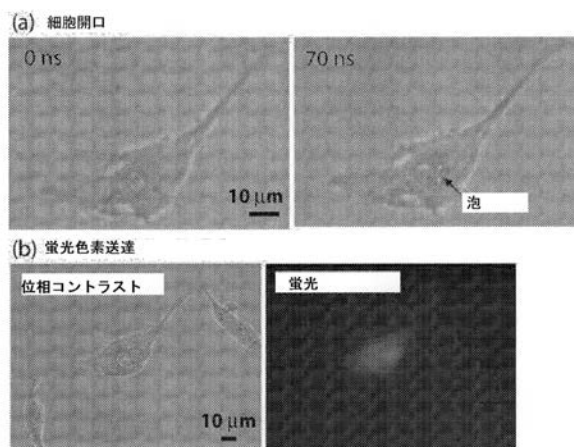


Fig. 20

【図 21】

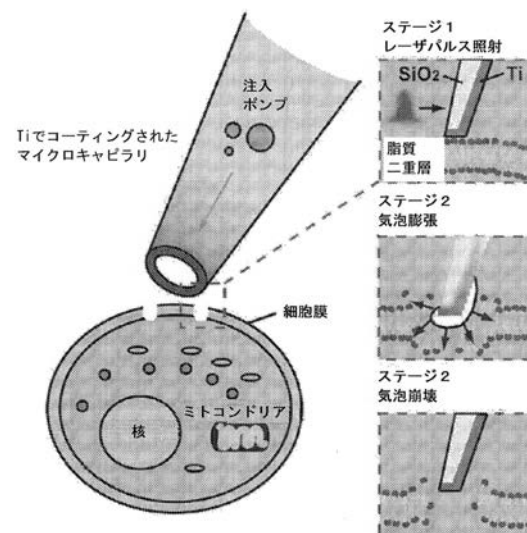


Fig. 21

【図 2 2 A】

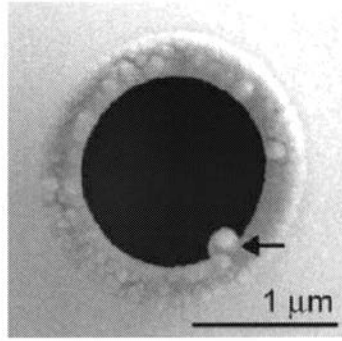


Fig. 22A

【図 2 2 B】

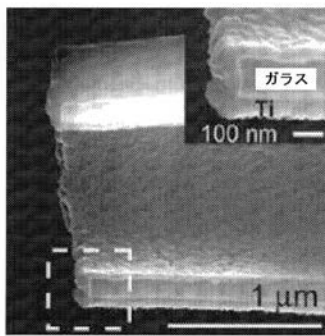


Fig. 22B

【図 2 2 D】

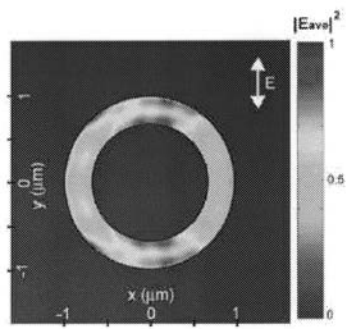


Fig. 22D

【図 2 2 C】

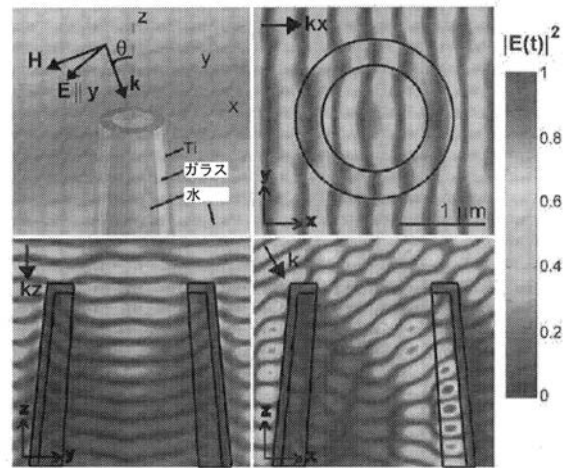


Fig. 22C

【図 2 3 A】

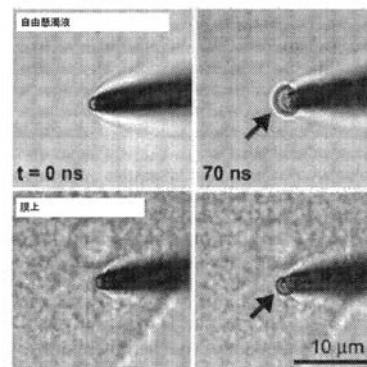


Fig. 23A

【図 2 3 B】

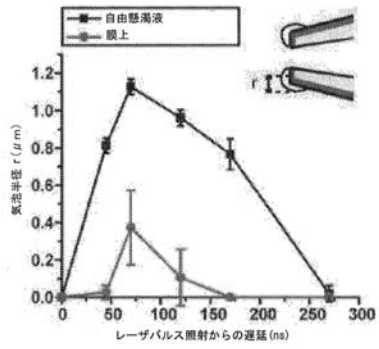


Fig. 23B

【図 2 3 C】

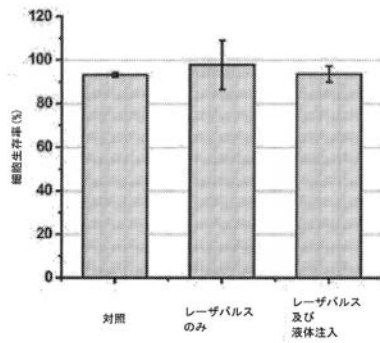


Fig. 23C

【図 2 5 B】

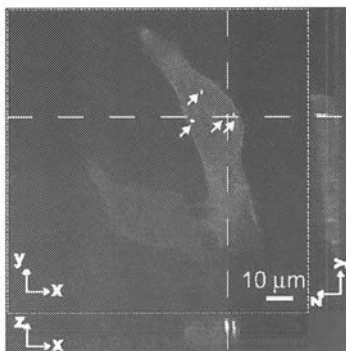


Fig. 25B

【図 2 4】

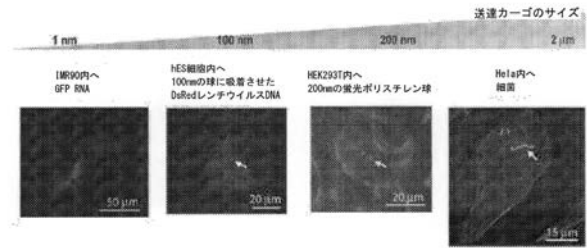


Fig. 24

【図 2 5 A】

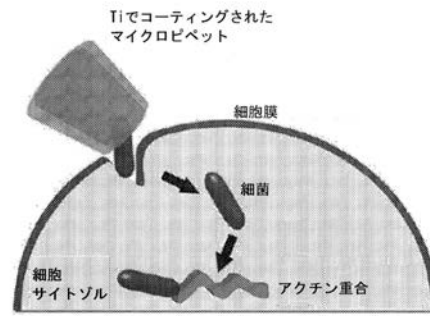


Fig. 25A

【図 2 5 C】

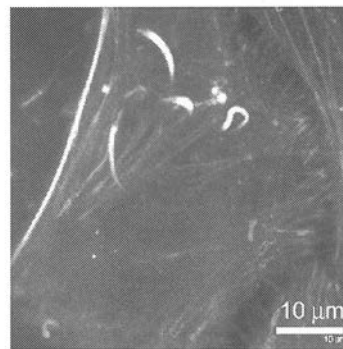


Fig. 25C

【手続補正書】

【提出日】平成29年6月7日(2017.6.7)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞に対するマイクロマニピュレーションを行う方法であって、

前記細胞をマイクロサージャリーツールと接触させるステップであって、前記マイクロサージャリーツールが、電磁エネルギーの印加によって加熱されるコーティングの膜又はナノ粒子を先端に及び／又は先端近くに有するマイクロキャピラリを備える、ステップと

、

前記マイクロサージャリーツールにレーザパルスを印加することによって、前記膜又はナノ粒子の温度を上昇させて、前記細胞の膜に開口を形成するステップとを備え、前記マイクロサージャリーツールと前記細胞との接触角及び／又は前記電磁エネルギーの偏光を変化させて、前記細胞に導入される開口のサイズ及び／又は形状を変更する、方法。

【請求項 2】

前記マイクロサージャリーツールに直線偏光レーザパルスを印加して、前記マイクロキャピラリの先端の両側に沿って前記細胞の膜に二つの孔を開ける、請求項 1 に記載の方法

。

【請求項 3】

前記マイクロサージャリーツールに円偏光レーザパルスを印加して、前記細胞の膜に円形切断部を形成する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記マイクロキャピラリを傾斜させて、前記先端の一方の側のみを前記細胞と接触させて、前記細胞の膜に半月状開口を形成する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記マイクロサージャリーツールの先端が導光体として機能するように構成されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記膜又はナノ粒子の温度を大気温度よりも少なくとも 150℃上昇させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記マイクロキャピラリのチューブを介して前記細胞内に試薬を注入するステップを更に備える請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記マイクロキャピラリの先端の直径が略 0.1 μm から略 5 μm の範囲内にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ナノ粒子のサイズが略 5 nm から略 500 nm の範囲内にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記膜又はナノ粒子が、半導体、貴金属、貴金属合金、窒化貴金属、及び酸化貴金属から成る群から選択された物質を備え、及び／又は、

前記膜又はナノ粒子が、遷移金属、遷移金属合金、窒化遷移金属、及び酸化遷移金属から成る群から選択された物質を備え、及び／又は、

前記膜又はナノ粒子が、金、チタン (Ti)、TiN、TiCN、及びTiAlNから成る群から選択された物質を備える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記マイクロキャピラリが、ガラス、鉱物、セラミック、及びプラスチックから成る群から選択された物質を備える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

制御装置を提供して、

前記レーザパルスの印加と、

前記マイクロサージャリーツールの充填と、

前記細胞の表面に対するマイクロキャピラリの角度と、

レーザ照射に対する前記マイクロキャピラリの角度と、

前記マイクロキャピラリの運動と、

前記細胞に試薬を注入するための前記マイクロキャピラリの操作と、

レーザによる前記先端の照射に対する前記マイクロキャピラリの動作の調整と

のうち一つ以上を制御する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

細胞内に物質を送達する選択的開口用のシステムであって、

レーザ又は非コヒーレント光源によって照射される際に加熱される物質のナノ粒子及び／又は薄膜を有する表面を備えるベッセルであって、前記表面が複数のオリフィスを備え、前記ナノ粒子及び／又は薄膜が前記複数のオリフィスのうち少なくとも一つの表面上に及び／又は付近に堆積している、ベッセルと、

前記ナノ粒子及び／又は薄膜を加熱するためのレーザ又は非コヒーレント光源と、

前記レーザ又は非コヒーレント光源による前記ベッセルの表面の照射のタイミング及び／又は位置を制御するように構成された制御装置とを備えるシステム。

【請求項 1 4】

前記システムがマイクロチャネルを備え、前記複数のオリフィスのうち一つ以上が前記マイクロチャネルと流体連結している、請求項 1 3 に記載のシステム。

【請求項 1 5】

前記システムが複数のマイクロチャネルを備える、請求項 1 4 に記載のシステム。

【請求項 1 6】

異なる複数のマイクロチャネルが異なる複数のオリフィスと流体連結している、請求項 1 5 に記載のシステム。

【請求項 1 7】

前記システムが、異なる複数のマイクロチャネルに流体を送達するマニホールド及び／又はバルブを備える、請求項 1 6 に記載のシステム。

【請求項 1 8】

前記システムが二つ以上のマニホールドを備え、各マニホールドが異なるマイクロチャネルに流体を送達するように構成されている、請求項 1 7 に記載のシステム。

【請求項 1 9】

前記二つ以上のマニホールドの各々が複数のマイクロチャネルに接続されている、請求項 1 8 に記載のシステム。

【請求項 2 0】

前記マイクロチャネルが、ポンプの制御で加圧され、又は重力送りによって供給が行われる、請求項 1 5 から 1 9 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 1】

前記制御装置が、

一つ以上のマイクロチャネル内の流れを制御し、及び／又は、

前記レーザ又は非コヒーレント光源の強度及び／又は持続期間及び／又は波長を制御し、及び／又は、

前記表面の照射の位置及び／又はパターンを制御し、及び／又は、

前記マイクロチャネルを介する試薬の流れを検出及び／又は制御するように構成されていて、

前記ベッセルが顕微鏡の上に配置され、前記制御装置が、前記顕微鏡のステージ、前記顕微鏡の焦点、及び／又は、前記顕微鏡からのイメージ取得を制御する、請求項 13 から 20 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 22】

前記ベッセルが、細胞を含有するように構成され且つ顕微鏡で観察するように配置されたチャンバであり、及び／又は、

前記ベッセルがマイクロタイタープレートのウェルであるか、又は、前記ベッセルが細胞培養ベッセルであるか、又は、前記ベッセルがマイクロ流体デバイスの一部である、請求項 13 から 21 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 23】

前記表面が、少なくとも 5 個、少なくとも 10 個、少なくとも 15 個、少なくとも 20 個、少なくとも 25 個、少なくとも 50 個、少なくとも 100 個、少なくとも 200 個、又は少なくとも 500 個のオリフィスを備え、各オリフィスが、ナノ粒子及び／又は薄膜を有する表面を備え、及び／又は前記オリフィスの付近に配置されたナノ粒子及び／又は薄膜を有する、請求項 13 から 22 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 24】

前記オリフィスが全て、 2 cm^2 以下、 1.5 cm^2 以下、 1 cm^2 以下、 0.5 cm^2 以下、又は 0.1 cm^2 以下の前記表面の領域内に配置され、及び／又は、

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が前記オリフィスから略 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以下、略 $50\text{ }\mu\text{m}$ 以下、略 $25\text{ }\mu\text{m}$ 以下、略 $20\text{ }\mu\text{m}$ 以下、略 $15\text{ }\mu\text{m}$ 以下、略 $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下、又は略 $5\text{ }\mu\text{m}$ 以下に配置され、及び／又は、

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が前記オリフィスの壁上に及び／又は縁の全周囲に配置されている、請求項 23 に記載のシステム。

【請求項 25】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、細胞が配置されるのと同じ側の前記表面の面上に及び／又は前記オリフィスの縁上に配置されている、請求項 13 から 24 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 26】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、細胞が配置されるのと反対側の前記表面の面上に及び／又は前記オリフィスの縁上に配置されている、請求項 13 から 24 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 27】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜を有する表面が、薄膜を有する表面である、請求項 13 から 26 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 28】

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、半導体、金属、金属合金、窒化金属、及び酸化金属から成る群から選択された物質を備え、又は、

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、遷移金属、遷移金属合金、窒化遷移金属、及び酸化遷移金属から成る群から選択された物質を備え、又は、

前記ナノ粒子及び／又は薄膜が、金、チタン (Ti)、TiN、TiCN、及び TiAlN から成る群から選択された物質を備える、請求項 13 から 27 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 29】

細胞内に試薬を送達する方法であって、

請求項 13 から 28 のいずれか一項に記載のシステムに細胞を提供するステップであって、前記細胞が前記表面上に配置される、ステップと、

前記細胞を前記試薬と接触させるステップと、

前記表面の領域を前記レーザ又は非コヒーレント光源に晒すことによって、前記ナノ粒子及び／又は薄膜の加熱を誘起するステップとを備え、前記加熱が、加熱された前記領域において又は近くにおいて前記細胞の膜に開口を導入する気泡を形成して、前記細胞内に

前記試薬を送達する、方法。

【請求項 30】

前記細胞を取り囲む培地に前記試薬を提供することによって、前記細胞を前記試薬と接触させ、

前記表面に存在している一つ以上のオリフィスに前記試薬を提供することによって、前記細胞を前記試薬と接触させ、及び／又は、

前記オリフィスと流体連結している一つ以上のマイクロ流体チャンネルに前記試薬を提供することによって、前記細胞を前記試薬と接触させる、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

異なる複数の試薬が異なる複数のオリフィスに導入される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

前記試薬が、核酸、リボザイム、タンパク質、ペプチド、酵素、抗体、細胞小器官、染色体、病原体、有機小分子、マイクロ粒子、及びナノ粒子から成る群から選択される、請求項 29 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

フロントページの続き

(72)発明者 ティンシーアン・エス・ウー
アメリカ合衆国・カリフォルニア・90034・ロス・アンジェルス・ローズ・アヴェニュー・1
1140・アパートメント・212

(72)発明者 シェラーズ・カリム・バット
アメリカ合衆国・カリフォルニア・91766・ポモナ・ローリング・リッジ・ドライブ・61

(72)発明者 マイケル・エー・タイテル
アメリカ合衆国・カリフォルニア・91356・ターザーナ・ベックフォード・アヴェニュー・5
945

Fターム(参考) 4B029 AA25 BB11 CC01 DG10
4B065 AA01X AA90X AA93X AA95X AB01 BA02 BA04

【外国語明細書】
2017158580000001.pdf