

フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した細胞間接着の定量化に関する研究

飯野敬矩

Takanori Iino

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科

Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and
Technology (NAIST)

2013 年

目次

第1章 序論

1-1	フェムト秒レーザーの特徴とその生命科学への応用の可能性	1
1-1-1	フェムト秒レーザーとその特徴	1
1-1-2	フェムト秒レーザーが水にもたらす作用とその応用	4
1-3	単一細胞の接着力評価	7
1-4	本論文の目的と意義	10
1-5	本論文の構成	10

第2章 実験装置と細胞試料の調製

2-1	実験装置	15
2-1-1	フェムト秒レーザーシステム	15
2-1-2	顕微フェムト秒レーザー照射システム	16
2-1-3	原子間力顕微鏡	17
2-1-4	局所応力計測システム	18
2-2	試料の作製	19
2-2-1	疑似細胞系の作製	19
2-2-2	神経-マスト細胞共生培養系の作製	20

第3章 原子間力顕微鏡を利用したフェムト秒レーザー誘起衝撃力の定量化

3-1	従来の定量手法とAFMによる定量化のアイデア	24
3-2	AFM探針に誘導された振動挙動の解析	26
3-2-1	AFM探針に誘導された振動の挙動	26
3-2-2	AFM探針振動の駆動力	28
3-3	AFM探針振動の解析とレーザー集光点で生じた衝撃力の定量化	29
3-3-1	AFM探針上でレーザー誘起衝撃力が付加される領域の計算	29
3-3-2	AFM探針振動の解析	32
3-3-3	レーザー集光点で発生した衝撃力の定量化	35
3-4	レーザー誘起衝撃力の制御性	36
3-4-1	レーザー誘起衝撃力のパルスエネルギー依存性	36
3-4-2	レーザー誘起衝撃力の制御性1：パルスエネルギー依存性	38
3-4-3	レーザー誘起衝撃力の制御性2：対物レンズの開口数依存性	39
3-5	まとめ	40

第4章	レーザー誘起衝撃力と細胞の相互作用についての現象論的考察	
4-1	フェムト秒レーザーが水にもたらす作用	42
4-2	キャビテーションバブルとレーザー誘起衝撃力の挙動の比較	43
4-2-1	キャビテーションバブル最大径のパルスエネルギー依存性	43
4-2-2	AFM探針が受ける衝撃力を支配する現象	45
4-3	接着解離実験方法の妥当性検討	47
4-3-1	実験手法	48
4-3-2	各手法による実験結果の比較	50
4-3-3	レーザー誘起衝撃力の積算の効果についての考察	50
4-4	細胞とレーザー誘起衝撃力の相互作用	51
4-4-1	細胞が受けるレーザー誘起衝撃力の検証	51
4-4-2	細胞が受ける衝撃力を支配する現象	52
4-5	レーザー誘起衝撃力の付加が生細胞に及ぼす効果	53
4-5-1	レーザー集光後に細胞に観察された変化	53
4-5-2	レーザー誘起衝撃力の付加が生細胞に及ぼす効果	55
4-6	まとめ	56
第5章	レーザー誘起衝撃力による神経-マスト細胞間の接着の定量化	
5-1	神経とマスト細胞の相互作用	59
5-2	神経-マスト細胞間の接着の定量化	60
5-3	神経-マスト細胞間の接着力の時間変化	62
5-3-1	神経-マスト細胞間の接着力の分布の時間推移	64
5-3-2	接着形成のメカニズムについての考察	66
5-4	まとめ	68
第6章	総括	
6-1	総括	71
6-2	展望	72
補足	レーザー誘起衝撃力の定量化におけるレーザー集光点の分散の考慮	74
	業績リスト	76
	謝辞	81

第1章 序論

光は物理、化学、生物といった基礎科学のみならず、私達の日常生活においても「光で伝える」、「光で観る」、「光で創る」など様々な形で随所に応用され、現代社会を支える基盤の1つとなっている。

こうした光応用の発展にはレーザーが大きく貢献しており、1960年のメイマンによるその発振以来、光ファイバ通信、精密測定、レーザー加工、レーザー医療など未知の領域を拓いてきた。レーザーの特徴の1つに、光を非常に短い時間に閉じ込めることができる（パルス化）点が挙げられ、フェムト秒（ 10^{-15} 秒）の時間領域にまで光を閉じ込めることができるようになった（フェムト秒レーザー）。フェムト秒の時間領域には光波の周期は数えられる程度しか含まれず、光を極めて精密に制御する技術によって作られた極限的な光であるといえ、その調整には熟練の技術が求められてきた。しかし、近年のレーザーダイオード技術の急速な進歩により、フェムト秒レーザーであっても比較的簡単に扱えるようになってきており、生命科学や医科学において観察用の光源としてだけでなく、組織や細胞を微細に加工・操作するためのツールとして注目を集めている。本章では、こうしたフェムト秒レーザーの特徴及びそれが生体材料に及ぼす諸現象とこれまでの実験背景について述べ、それを細胞間の接着力測定に応用した場合の可能性について、これまでの研究背景と照らし合わせて述べる。その上で本研究の研究目的と意義について述べる。

1-1 フェムト秒レーザーの特徴とその生命科学への応用の可能性

1-1-1 フェムト秒レーザーとその特徴

フェムト秒レーザーはコヒーレントな波長の異なる光を時間的に干渉させることでフェムト秒の時間領域に凝縮された光であり（Fig. 1-1）、フェムト秒オーダーの時間領域に光を閉じ込めることで瞬間的にナノ秒・ピコ

秒レーザーに比べて非常に高いピーク強度を得ることができる。さらに、フェムト秒レーザーを高開口の対物レンズに導入し、レーザーをその焦点に空間的にも集中させることで、集光点での光子密度を飛躍的に増加させ、他のパルス光に比べて圧倒的に高いピーク強度を得ることもできる（Fig. 1-2）。

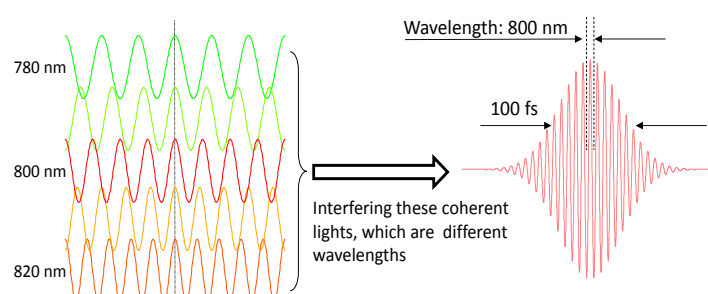


Figure 1-1 Representation of femtosecond laser.

この集光フェムト秒レーザーにより引き起こされる代表的な現象として、まず多光子吸収が挙げられる[1-3]。対物レンズを用いて高強度のフェムト秒レーザーを物質に集光照射すると、光子が豊富に含まれているため、レーザー集光点では1つの吸収サイトに複数の光子が衝突する状況が実現される (Fig. 1-3)。この現象が多光子吸収であり、集光点で複数の光子を足し合わせたエネルギーにより光励起を誘導することができる。対物レンズの開口数 (NA) やパルスエネルギーにもよるが、フェムト秒レーザーの集光径は1～数マイクロメートルであるため、三次元的に選択した微小領域にのみ光吸収を誘導することができる。ピコ秒・ナノ

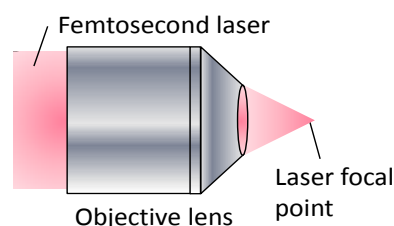


Figure 1-2 Spatial concentration of femtosecond laser by an objective lens.

秒パルスを用いた場合にも多光子吸収を引き起こすことはできるが、フェムト秒レーザーと同等のピーク強度を得るにはフェムト秒レーザーに比べて遥かに高いパルスエネルギーが必要となり、フェムト秒レーザー程の空間選択性を得ることはできない。

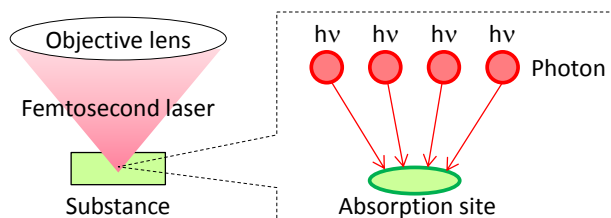


Figure 1-3 Multiphoton absorption induced by focused femtosecond laser.

多光子吸収とは異なるもう1つの特色として、レーザーアブレーションが機械的過程により誘導される点が挙げられる。レーザーアブレーションは、物質が高強度レーザーのエネルギーを吸収して引き起こされるマクロな形態変化であり[4]、多光子吸収による電子励起状態の生成とその急激な緩和による絶縁破壊 (レーザー誘起ブレイクダウン) として説明されている[2]。フェムト秒パルスを用いた場合、電子励起状態あるいはイオン化状態の生成とその緩和は非常に短い時間に一斉に起こるため、格子振動エネルギーが物質の膨張よりも遥かに早い時間で増加する。その結果、分子間平衡距離の増加に局所膨張が追いつかず、集光点近傍で圧力の急激な上昇が引き起こされる。この圧力の緩和に伴い衝撃波が集光点からその周囲に向かって伝搬することで集光点近傍に形態変化が誘導される[5-9] (Fig. 1-4)。一方、ナノ秒・ピコ秒パルスの場合、分子間平衡距離の増加と局所膨張が同調的に起こる為、分子のランダムな振動が誘起され、熱的過程により形態変化が引き起こされる[8, 10-21]。加えて、多光子吸収を引き起こすにはフェムト秒パルスを用いた場合よりも遥かに高いエネルギーが必要であるため、形態変化が誘導される領域がフェムト秒パルスを用いた場合よりも非常に広がる。

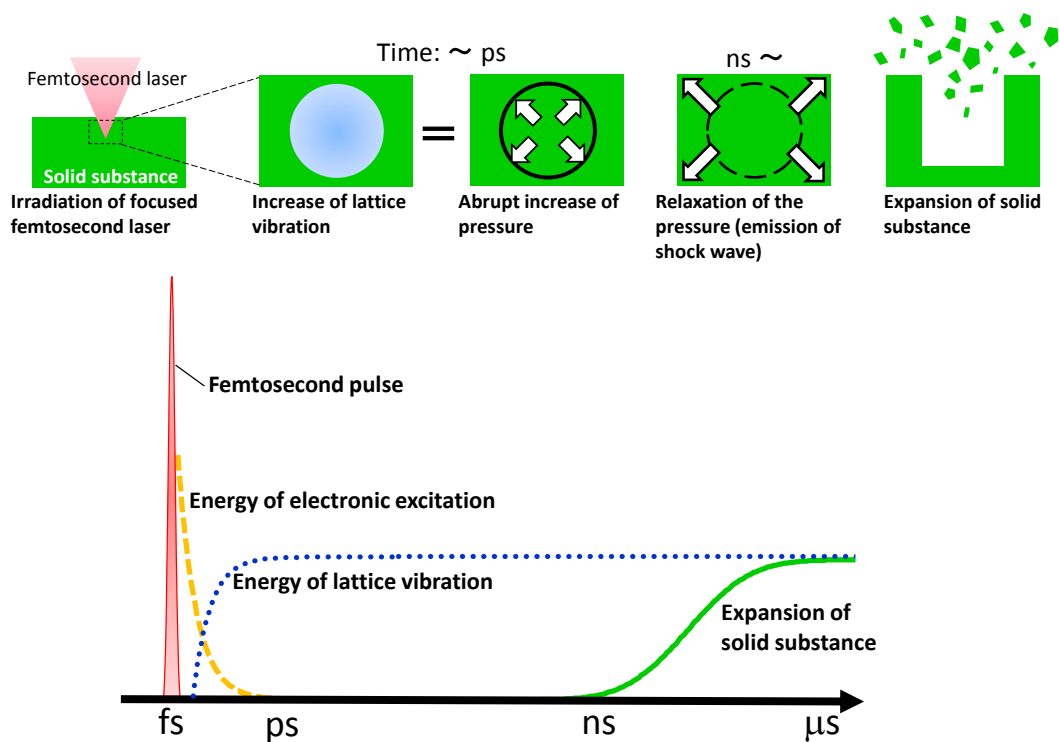


Figure 1-4 Mechanical laser ablation by focused femtosecond laser.

さらに、多くのフェムト秒レーザーは生体への透過性が高い近赤外に中心波長をもつため、生体試料内部への光の到達性が高く、生体試料の深部でも多光子吸収を引き起こすことができる[2] (Fig. 1-5)。こうした特徴を持つフェムト秒レーザーを用いて細胞や組織内部に微細な加工を施し、その機能を改変する研究が多数報告されており[22-29]、フェムト秒レーザーの生体試料への適性が示唆されている。現在、フェムト秒レーザーによる非熱的な生体加工を端緒に生命科学におけるその潜在性に関心が集まっており、これまでにない方法論の開発に期待が寄せられている。

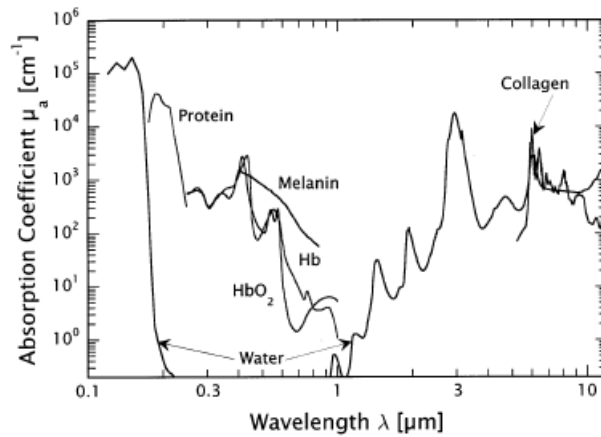


Figure 1-5 Optical absorption coefficients of principal tissue chromophores in the 0.1-12 mm spectra region.

1-1-2 フェムト秒レーザーが水にもたらす作用とその応用

高強度の近赤外のフェムト秒レーザーを高開口数の対物レンズを用いて水中に集光照射すると、集光点で多光子吸収が引き起こされ、急激な圧力上昇が起こる。その緩和に伴って衝撃波が水中を伝搬し、集光点から水が押し出される。同時に、集光点近傍は過渡的に低圧状態となり、水の気相への転移が起こり、キャビテーションバブルと呼ばれる気泡が発生する[1-3]。低圧状態はすぐに解消され、キャビテーションバブルは崩壊する (Fig. 1-6)。

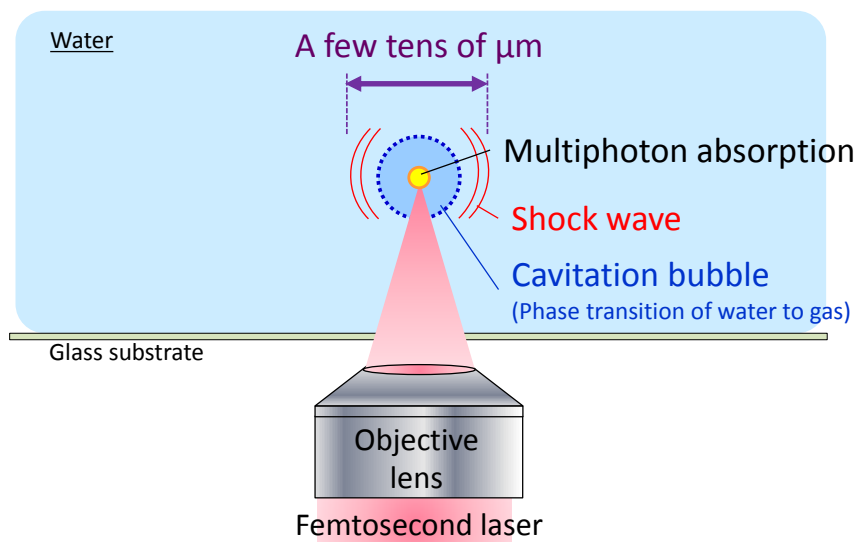


Figure 1-6 Phenomena induced by focusing femtosecond laser in water through an objective lens.

衝撃波の発生から始まるこの一連の現象により集光点近傍の数～数十マイクロメートルの領域に応力が過渡的に伝搬することが知られている[2,3]。過渡応力の現象的描像は明確に示されていないものの、集光点の近傍に数十マイクロメートルの物体が存在した場合、過渡応力は微小物体に撃力として作用し、微小物体を移動させることができる (Fig.1-7)。撃力を発生させる方法には、火薬、電極のスパーク、ナノ秒・ピコ秒レーザーによるブレイクダウンなどが挙げられるが、数～数十マイクロメートルの空間に局在した撃力を発生させることは極めて難しく、フェムト秒レーザーに特有な現象であるといえる。

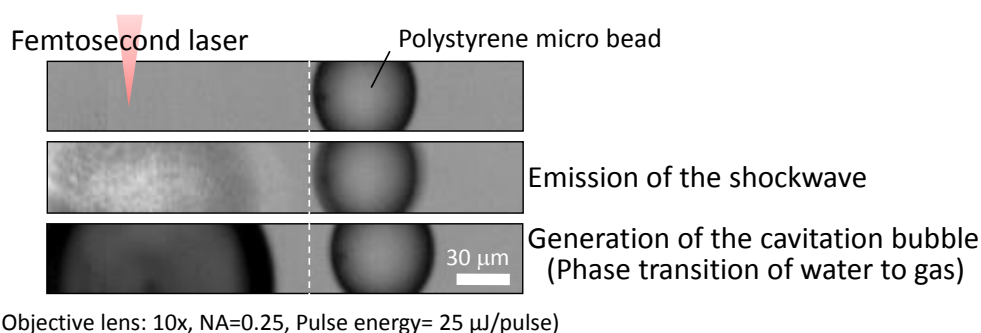


Figure 1-7 High-speed images after focusing a femtosecond laser in water. The micro bead was moved by focusing the femtosecond laser near the bead.

私達のグループでは、数～数十マイクロメートルの物体を操作するための外力として集光フェムト秒レーザーが誘起する過渡応力に着目してきた。一般に、微小な物体の操作には光ピンセット[30]や機械式のマニピレーターが用いられるが、数～数十マイクロメートルの大きさの物体の操作は難しい (Fig. 1-8)。数～数十マイクロメートルの大きさに相当する物体の1つに動物細胞が挙げられ、単一細胞解析の実現のために、それらを個々に操作する手法の開発が求められていた[31]。そこで、私達のグループではこの過渡応力を「フェムト秒レーザー誘起衝撃力」(以降、レーザー誘起衝撃力と記載)と名付け、単一細胞操作手法を開発してきた。

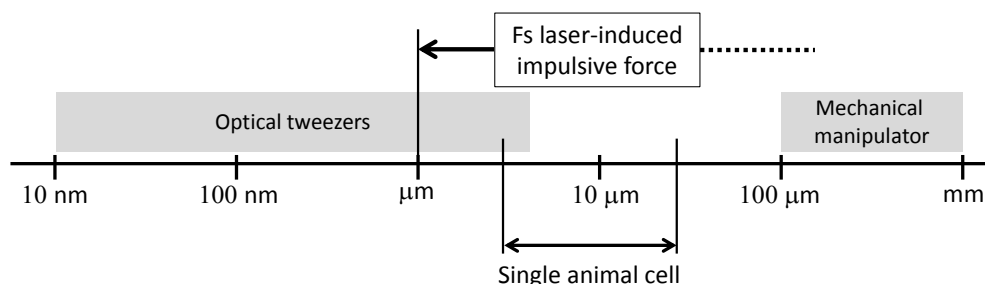


Figure 1-8 Manipulation manners of a small object and its applicable size.

Fig. 1-9 にレーザー誘起衝撃力を細胞に適用した結果の一例を示す。互いに接着している細胞の近傍にフェムト秒レーザーを集光照射することでレーザー誘起衝撃力を細胞に付加した。その結果、細胞を破壊せずに 1 細胞レベルで解離させることに成功した。この操作に要した時間は 10 秒程度であり、非常に素早く行うことができた。また、実験に用いた細胞対は培養基板には接着しておらず、浮遊した状態であったが、細胞に対する付加的な操作を加えずに非接触に細胞を解離させることができた。同様に、培養基板に接着した細胞を基板から剥離させることにも成功した[32]。光ピンセットでも接着性の細胞の操作を試みたが、力が弱く細胞を動かすことができなかった。また、機械式のマニピレーターでは操作精度が低く、直径が 10 μm 程度の細胞を 1 つずつ扱うことはできなかった。この単一細胞操作手法により細胞をパターンニングできること (Fig. 1-10) [33, 34]やレーザー誘起衝撃力を細胞に付加しても細胞機能 (分化、増殖、遊走) が保持されることを示してきており[35-37]、これまではレーザー誘起衝撃力を駆使することで任意の位置に細胞を配置させ、その機能や細胞間の相互作用を制御することができる細胞チップの作製を指向した生物工学的課題[38, 39]を中心にレーザー誘起衝撃力の応用研究を展開してきた。

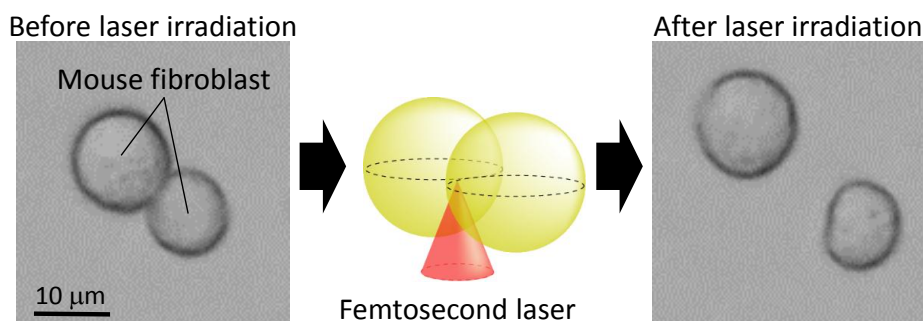


Figure 1-9 Detachment of adherent cells by femtosecond laser-induced impulsive force.

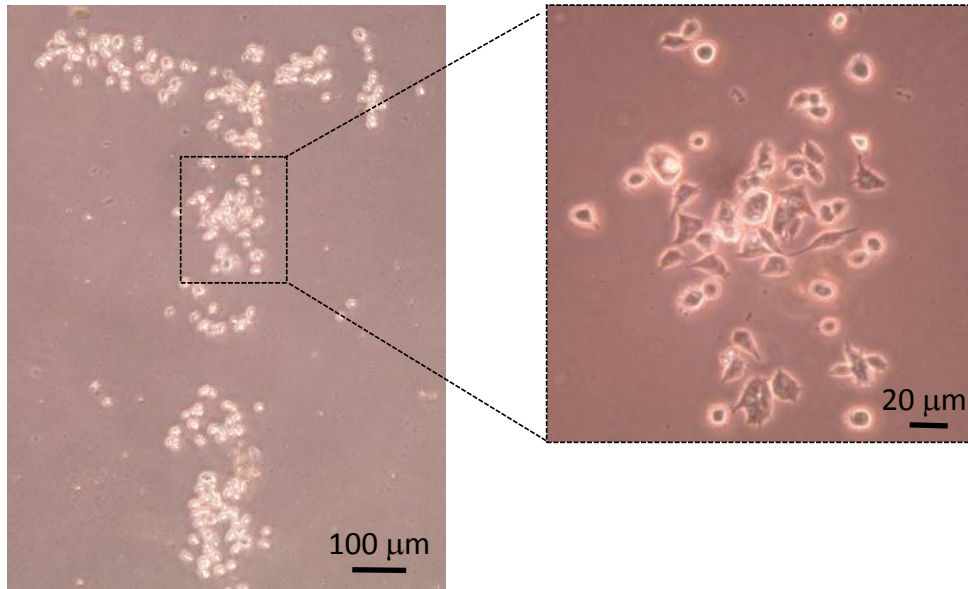


Figure 1-10 Micro-patterning of the cell by femtosecond laser-induced impulsive force.

1-3 単一細胞の接着力評価

Fig1-8 で示した細胞の解離において、細胞が解離した時に細胞に付加されたレーザー誘起衝撃力を定量化できれば、細胞間の接着力を個別に定量化できるようになると考えた。細胞間の相互作用に直接的に関与する細胞間接着は、生命科学において古くから関心を集めてきた。分子生物学の近年の急速な発展により、細胞間接着が織りなす生命現象についての理解が進み、器官や組織の形態形成運動、創傷の治癒、癌の浸潤・転移などにおいては細胞間の力学的連結の時々刻々の変化が細胞機能の発現に重要であることが明らかになってきており、組織構築に基づく細胞間接着力の空間依存性や生理作用の時間的变化に伴って細胞間接着力がどのように変化するかを明らかにすることが求められている。加えて、近年では細胞機能と外力の相互作用に基づいて生命現象を理解しようとするメカノバイオロジーに関心が集まっており、細胞間の接着力や細胞膜の張力などの力学情報と細胞機能発現とを関連付けて体系的かつ定量的に理解することがより強く求められてきている。

その実現には、まず、細胞間接着の分子機構と力学機構を統合的に明らかにすることが重要である。接着の分子機構については、細胞内のリアルタイムイメージングなどにより接着に関与する分子の細胞内挙動は多数報告されており、その理解が深まってきている。その一方で、接着の力学機構について生命科学は積極的には答えてこなかった。その理由としては、個体差の大きい細胞試料

を迅速に1細胞レベルで操作する手法がなく、短時間で多数の細胞の接着力を定量化できる計測手法が確立されていないことが挙げられる。以下、既存の代表的な細胞間接着の評価手法について概説し、接着の力学機構を解明するための研究に適用しようとした場合の問題点について述べる。

1) セルアグリゲーションアッセイ

細胞を溶液中に単分散させ、回転しながら培養を行うことで細胞を凝集させる (Fig.1-11)。細胞の接着能が高い程、早く大きな凝集塊が形成されるという前提の下、凝集塊に含まれる細胞数や凝集塊が形成されるまでの時間により細胞の接着能を評価する手法[40, 41]。

問題点：細胞の接着能を簡便に評価することができるが、接着力を個々に定量評価することはできない。

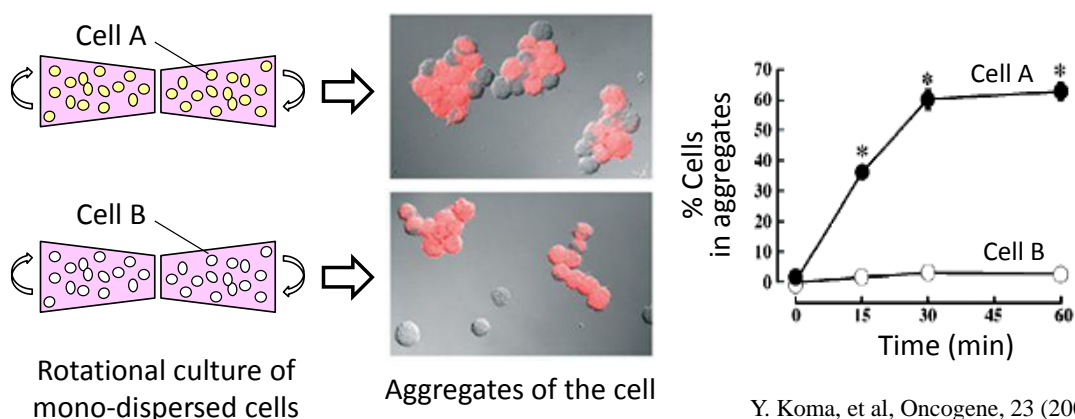


Figure 1-11 Representation of cell aggregation assay.

2) マイクロ流路の中で培養する方法

基板上で細胞を培養し、培養液に流れを与えることで細胞にズリ応力を付加する。培養系全体を血管内腔とみなすことができる為、血管内皮細胞の培養系に用いられることが多く、内皮細胞とがん細胞、内皮細胞と白血球の接着力の評価などが行われている。

問題点：ズリ応力が細胞培養系全体に付加される為、細胞の接着力を個別に測定することが困難。また、基板との接着が細胞同士の接着よりも強いことが前提であり、接着が強固になると細胞を解離させることが非常に困難であるとの指摘がなされている。

3) Single cell force spectroscopy

近年、細胞間の接着力の測定によく用いられている手法[ref]。Fig.1-12 に測定手法を示す。生細胞を2つ用意し、1つを原子間力顕微鏡（AFM）の AFM 探針の先端に、もう1つを基板に固着する。AFM 探針を降下して、AFM 探針に固着した細胞を基板に固着した細胞と接触させ、両者の間に接着を形成させる。その後、細胞が解離するまで AFM 探針を引き上げ、その時に生じた AFM 探針のたわみから解離に要した力を見積もり、接着力として評価する手法。この手法により接着分子の1分子の接着力をナノ秒のオーダーで評価することもでき、その接着力が pN 程度であることも報告されている[42-44]。

問題点：細胞の接着力を1細胞レベルで定量評価できるが、細胞の AFM 探針と基板への固着の方が細胞同士の接着よりも強いことが前提であるため、細胞に外来性の分子（ストレプトアビジンなど）を発現させて細胞を基板・AFM 探針に人工的に強固に固着させている。細胞同士の接着も人工的に誘導されており、生理条件からかけ離れた状態下での接着力を測定しているとの指摘がなされている。また、AFM 探針の引き上げ速度によって測定値は変化すると考えられ、測定した接着力の解釈が複雑である。

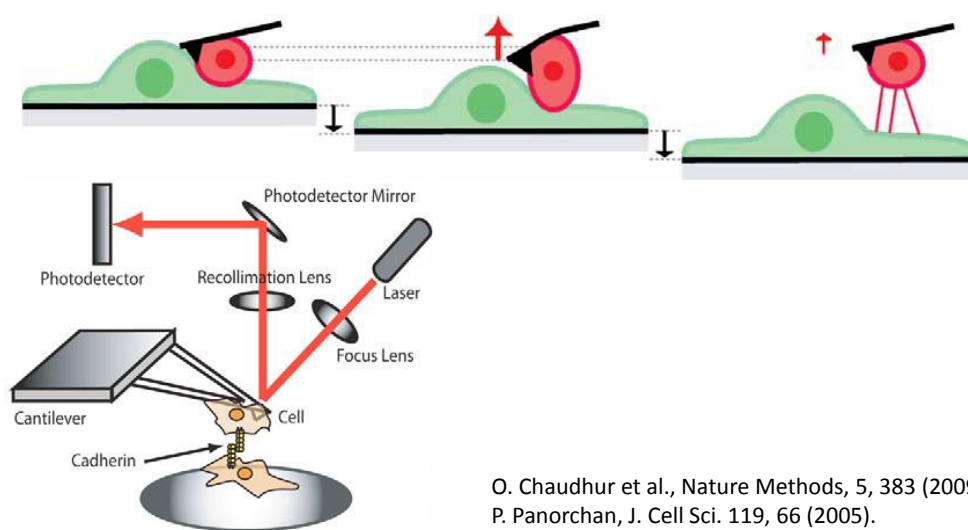


Figure 1-12 Representation of single cell force spectroscopy.

1-4 本研究の目的と意義

既存の細胞間接着の評価手法には無いレーザー誘起衝撃力の特色は、①非接触に力を付加できる、②細胞を解離させるための操作時間が短い（10秒程度）点に集約される。①は顕微鏡下で光学的に観察できる試料であれば非接触に扱えることを意味し、培養条件を乱さずに細胞間の接着力を測定できることを示唆する。加えて、顕微鏡下で見えれば、細胞培養系だけでなく動物胚や植物試料など、多様な生物試料を幅広く扱えることが期待できる。②は短時間で多数の試料を扱えることを意味し、生理作用の時間的変動に伴う接着力の変化や組織内の位置に基づく接着力のばらつきやなど、接着力の時間・空間依存性を調べることができる手法に成り得ると考えられた。そこで、本研究では、レーザー誘起衝撃力を用いて細胞間の接着力を定量化するための新しい方法論を確立することを目的とし、レーザー誘起衝撃力により生命現象の一端を解明することを目指した。

1-5 本論文の構成

レーザー誘起衝撃力を用いた細胞間接着力測定の新規な方法論を確立するためには、まず、レーザー誘起衝撃力と細胞間の相互作用を理解することが重要である。そのためには、レーザー誘起衝撃力、即ちフェムト秒レーザーが水にもたらす作用を理解することが不可欠である。しかし、数～数十マイクロメートルの領域に局在する撃力を測定できる手法は無く（詳細は3章で述べる）、その理解にはレーザー誘起衝撃力を直接検出できる手法を開発することが必要であった。そこで、本研究では、まずレーザー誘起衝撃力を定量化するための手法を開発し、その手法を用いてフェムト秒レーザーが水にもたらす作用及びレーザー誘起衝撃力と細胞の相互作用を現象論的に考察した後、細胞培養系中の細胞に対してレーザー誘起衝撃力を付加して細胞間の接着力を定量化した。以下に本論文の構成を示す。

第1章では、フェムト秒レーザーとその特色を概説し、フェムト秒レーザーの生体試料への適性を示した。さらに、集光フェムト秒レーザーが水中で誘起する諸現象とそれによりもたらされるレーザー誘起衝撃力について説明した。その上で、レーザー誘起衝撃力を応用したこれまでの生物工学的研究を鑑み、生命科学において期待されるレーザー誘起衝撃力の有用性と新規性を説明し、本研究の目的を示した。

第2章では、本研究で用いたフェムト秒レーザーシステム、顕微フェムト秒レーザー照射システム、原子間力顕微鏡（AFM）、AFMを利用した局所応力計測システムについて説明する。また、細胞間の接着力の定量化に用いた細胞培

養系の作製方法についても述べる。

第3章では、細胞間の接着力を定量化するために、計測学的立場から研究を進め、レーザー誘起衝撃力を定量化するための新規な手法を開発し、レーザー誘起衝撃力をどのように、どのくらいの精度で制御することができるかを示した。微小な領域に局在するレーザー誘起衝撃力を定量化するために原子間力顕微鏡（AFM）を利用し、その AFM 探針の振動として水中を伝搬するレーザー誘起衝撃力を直接検出し、定量評価しようとした。さらに、その計測からレーザー集光点で発生した衝撃力をパルスエネルギー毎に求めることで、その制御性を示した。

第4章では、細胞間の接着力の定量化におけるレーザー誘起衝撃力の適用範囲の指針を示すために、細胞とレーザー誘起衝撃力の相互作用について現象論的に考察した。そのために、AFM を利用したレーザー誘起衝撃力の定量化手法を利用して、フェムト秒レーザーが水に及ぼす作用をキャビテーションバブルの挙動と比較することで光物理学・光化学的立場から現象論的に考察した。これに基づき、細胞とレーザー誘起衝撃力の相互作用についても考察し、レーザー誘起衝撃力が細胞に及ぼす効果についても検証し、その適用範囲の指針を示した。

第5章では、本手法の生命科学における有用性と新規性を示すために、定量化したレーザー誘起衝撃力を細胞培養系中の細胞に適用し、細胞間の接着力を個別に定量化した。さらに、モデル系に用いた細胞の生理作用に変化が生じると予測される時間スケール（数時間）で接着力の時間変化を調べた。この時間推移をもとに接着形成の分子的機構を推測し、細胞生理作用と接着力の相関性を推察した。

第6章では、本研究において得られた結果を総括し、今後の展望を述べる。

参考文献

- [1] A. Vogel, J. Noack, G. Hüttman, and G. Paltauf, *Appl. Phys. B* **81** (2005) 1015.
- [2] A. Vogel and V. Venugopalan, *Chem. Rev.*, **103** (2003), 577.
- [3] A. Vogel, N. Linz, S. Freidank, and G. Paltauf, *Phys. Rev. Lett.*, **100** (2008) 038102.
- [4] 例えば、藤原久志, 大阪大学博士論文 (1995)
- [5] 細川陽一郎, 大阪大学博士論文 (2000)
- [6] Y. Hosokawa, M. Yashiro, T. Asahi, H. Fukuhara, and H. Masuhara, *Appl. Surf. Sci.*, **154** (2000) 192.
- [7] Y. Hosokawa, M. Yashiro, T. Asahi, and H. Masuhara, *J. Photochem. Photobiol. A*, **142** (2000) 79.
- [8] L. V. Zhigilei, and B. J. Garrison, *Appl. Surf. Sci.*, **127** (1998) 142.
- [9] G. Paltauf and P. E. Dyer, *Chem. Rev.*, **103** (2003) 487.
- [10] H. Fujiwara, H. Fukumura, and H. Masuhara, *J. Phys. Chem.*, **99** (1995) 11844.
- [11] H. Fujiwara, Y. Nakajima, H. Fukumura, and H. Masuhara, *J. Phys. Chem.*, **99** (1995) 11481.
- [12] H. Fujiwara, H. Fukumoto, H. Fukumura, and H. Masuhara, *Res. Chem. Intermed.*, **24** (1998) 879.
- [13] 古谷浩志, 大阪大学博士論文 (1996)
- [14] H. Furutani, H. Fukumura, and H. Masuhara, *Appl. Phys. Lett.*, **65** (1994) 3413
- [15] H. Furutani, H. Fukumura, and H. Masuhara, *J. Phys. Chem. Intermed.*, **100** (1996) 6871
- [16] H. Furutani, H. Fukumura, H. Masuhara, S. Kambara, T. Kitaguchi, H. Tsukada, and T. Ozawa, *J. Phys. Chem. B*, **102** (1998) 3395.
- [17] 細田昌宏, 古谷浩志, 福村裕史, 増原宏, 西井正信, 一之瀬暢之, 河西俊一, レーザ一研究, **25** (1997) 306

- [18] L. V. Zhigilei, P. B. S. Kodali, and B. J. Garrison, *J. Phys. Chem. B*, **102** (1998), 2845.
- [19] L. V. Zhigilei, P. B. S. Kodali, and B. J. Garrison, *J. Phys. Chem. B*, **101** (1997), 2028.
- [20] L. V. Zhigilei, P. B. S. Kodali, and B. J. Garrison, *Chem. Phys. Lett.*, **276** (1997) 269.
- [21] L. V. Zhigilei, and B. J. Garrison, *Appl. Phys. Lett.*, **74** (1999) 1341
- [22] K. König, *Cell Biol.*, **114** (2000) 79.
- [23] U. K. Tirlapur, and K. König, *Plant J.*, **31** (2002) 365.
- [24] W. Watanabe, N. Arakawa, S. Matsunaga, T. Higashi, K. Fukui, K. Isobe, and K. Itoh, *Opt. Exp.*, **12** (2004) 4203.
- [25] R. Yasukuni, J. Spitz, R. Meallet-Renault, T. Negishi, T. Tada, Y. Hosokawa, T. Asahi, C. Shukunami, Y. Hiraki, and H. Masuhara, *Appl. Surf. Sci.*, **253** (2007) 641.
- [26] A. Heisterkamp, I. Z. Maxwell, E. Mazur, J. M. Underwood, J. A. Nickerson, S. Kumar, and D. E. Ingber, *Opt. Express*, **13** (2005) 3690.
- [27] S. Kumar, I. Z. Maxwell, A. Heisterkamp, T. R. Polte, T. P. Lele, M. Salanga, E. Mazur, and D. E. Ingber, *Biophys. J.*, **90** (2006) 3762.
- [28] M. F. Yanik, H. Cinar, H. N. Cinar, A. D. Chisholm, Y. Jin, and A. Ben-Yakar, *Nat.*, **432** (2004) 822.
- [29] C. Hosokawa, S. N. Kudoh, A. Kiyohara, Y. Hosokawa, K. Okano, H. Masuhara, and T. Taguchi, *Appl. Phys. A*, **93** (2008) 57.
- [30] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, and T. Yamane, *Nat.* **330** (1987) 769.
- [31] 例えば、細胞分離・操作技術の最前線, シーエムシー出版, 2008年
- [32] Y. Hosokawa, J. Takabayashi, S. Miura, C. Shukunami, Y. Hiraki, and H. Masuhara, *Appl. Phys. A.*, **79** (2004) 795.
- [33] Y. Hosokawa, T. Kaji, C. Shukunami, Y. Hiraki, E. Kotani, H. Mori, and H. Masuhara, *Biomed. Microdev.*, **9** (2007) 1387.

- [34] T. Kaji, S. Ito, H. Miyasaka, Y. Hosokawa, H. Masuhara, C. Syukunami, and Y. Hiraki, *Appl. Phys. Lett.*, **91** (2007) 023904.
- [35] Y. Maezawa, K. Okano, M. Matsubara, H. Masuhara, and Y. Hosokawa, *Biomed Microdevices* **13** (2011) 117.
- [36] Y. Maezawa, Y. Hosokawa, K. Okano, M. Matsubara, and H. Masuhara, *Appl. Phys. A*, **13** (2011) 117.
- [37] 前澤安代, 奈良先端科学技術大学院大学博士論文 (2010)
- [38] K. Okano, D. Yu, A. Matsui, Y. Hosokawa, A. Kira, M. Matsubara, I. Liau, H. Tsubokawa, and H. Masuhara, *ChemBioChem.*, **12** (2011) 795.
- [39] H. Yamamoto, K. Okano, T. Demura, Y. Hosokawa, H. Masuhara, T. Tanii, and S. Nakamura, *Appl. Phys. Lett.*, **99** (2011) 163701
- [40] M. Miura, H. Asou, M. Kobayashi, and K. Uyemura, *J. Biol. Chem.*, **267** (1992) 10752.
- [41] Y. Koma, A. Ito, T. Wakayama, K. Watabe, M. Okada, N. Tsubota, S. Iseki, and Y. Kitamura, *Oncogene*, **23** (2004) 5687.
- [42] M. Benoit, D. Gabriel, G. Gerisch, and H.E. Gaub, *Nat. Cell Bio.*, **2** (2000) 313.
- [43] P. Panorchan, *J. Cell Sci.*, **66** (2005).
- [44] C. Ovijit, H.P. Sapun, A.L. Wilbur, and A.F. Daniel, *Nat. Meth.*, **6** (2009) 383.

第2章 実験装置と細胞試料の調製

本研究では、近赤外のフェムト秒レーザー単パルスを励起光源として高開口数の対物レンズを通して水中に集光照射し、水の多光子励起を経て発生するレーザー誘起衝撃力を定量化し、細胞間の接着力を定量化するための外力として用いるための方法論を開発した。本章では、実験系の概要、基礎的実験手法、試料の作製方法について述べる。

2-1 実験装置

2-1-1 フェムト秒レーザーシステム

レーザー光源には、再生増幅器付きチタンサファイアフェムト秒レーザーシステム (Hurricane, Spectra Physics) を用いた。Fig. 2-1 にそのシステム構成を示す。シード光としてモード同期チタンサファイアレーザー (Maitai, Spectra Physics) を使用した。この装置では、ストレッチャーにより正の分散を与えてチャープ光にした後、チタンサファイア結晶をレーザー媒体とした再生増幅器により増幅し、コンプレッサーにより負の分散を与えてフェムト秒レーザーパルス (中心波長: 800 nm) に再度圧縮する。繰り返し周波数は可変であり、単発照射~1000 Hz での調整が可能である。再生増幅されたレーザーパルスの自己相関関数は、オートコリレーターにより計測した。この自己相関関数から見積もられたパルス幅は 150 fs であった。最大のパルスエネルギーは約 1 mJ/pulse であった。

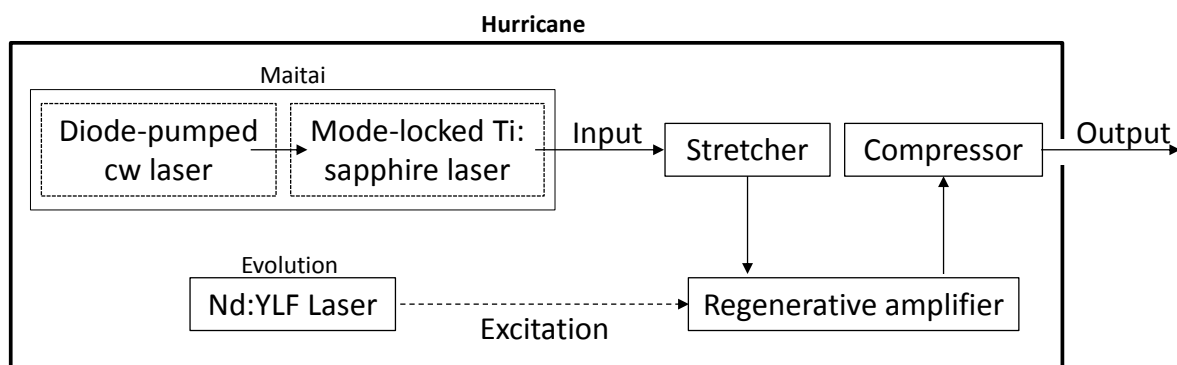
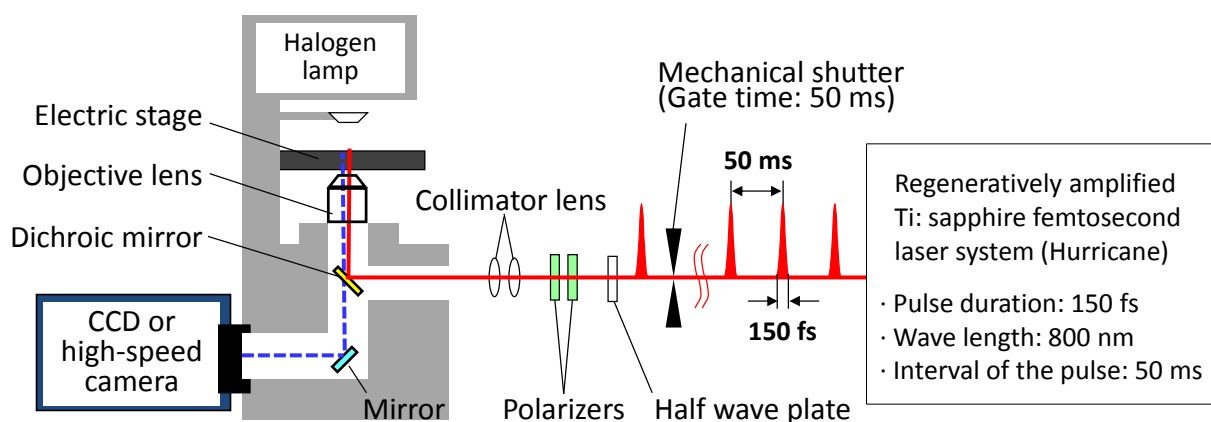


Figure 2-1 Regeneratively amplified Ti: sapphire femtosecond laser system (Hurricane).

2-1-2 顕微フェムト秒レーザー照射システム

上述の Hurricane から発振されたパルス光を倒立顕微鏡に通して対物レンズに導入し、顕微レーザーシステムとして主に細胞計測に用いた。実験系の概略を Fig. 2-2 に示す。50 ms のゲートタイムを持つメカニカルシャッター (Σ -65 GR, SIGMA KOKI) を用い、20Hz のパルス列から単発のパルス光を切り出した。パルス光は、凸レンズ 2 枚からなるビームコリメーターによりビーム径を最適化して倒立顕微鏡 (IX-71, Olympus) に導入した。パルスエネルギーは、半波長板・偏光子とアルミ蒸着可変 ND フィルターを用いてそのエネルギーを調節した。顕微鏡内に導入されたパルス光は、対物レンズを用いて水中あるいは細胞培養液中に集光照射した。原則的には、パルス光は対物レンズの焦点に集光されるが、必要に応じてコリメーターレンズ間の距離を変化させてパルス光の光軸 (Z) 方向の集光位置を調整した。Z 方向における像面から集光位置までの距離は、対物レンズの像面をガラス基板上に合わせた後に対物レンズを何マイクロメートル動かした時にガラス基板がレーザーアブレーションされるかを調べることで見積もった。また、ガラス基板上にカーボンをドーブした高分子材料を塗布し、高分子材料にレーザーを集光照射した。そのエッチング跡から集光径を見積もったところ、2-3 μm であった。



細胞や疑似細胞を用いた実験では、卓上インキュベーターを顕微鏡のステージ上に設置し、細胞試料に望ましい環境 (37°C、湿度 90%、CO₂ 濃度 5%) を保持した。細胞試料の観察には CCD カメラを用いた。レーザー集光照射前後の様子を詳しく観察する為、CCD カメラの映像からレーザー集光照射前と集光直後に相当するコマ画像を抽出し、且つ、それらを写真データとして保存するためのプログラムを Visual Basic を用いて作成した。抽出された画像は、本プロ

グラムを搭載したパソコンのモニターに表示される (Fig. 2-3)。CCD カメラの映像は映像分配器により観察用モニターと上述のパソコンに分配されており、CCD カメラ映像の実時間観察と集光照射前後の試料の観察を並行して行うことができる。また、顕微鏡のポートには高速カメラ (FASTCAM, Photoron) が取り付けられており、キャビテーションバブルの挙動の観察に用いた。

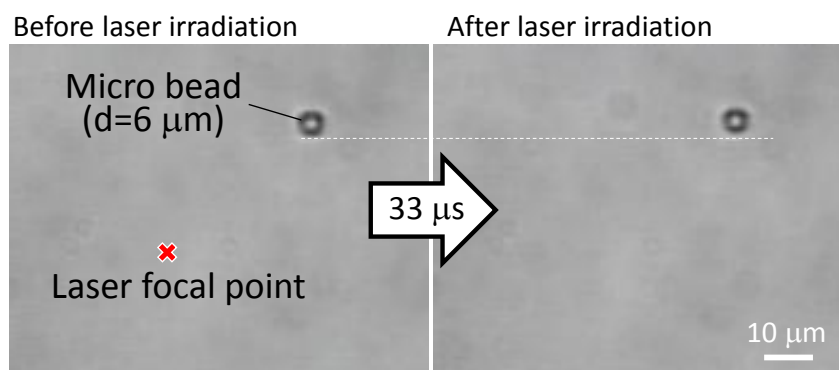


Figure 2-3 CCD images to capture appearances before and after the laser irradiation, which were extracted by the image recording program.

2-1-3 原子間力顕微鏡

本研究で用いた原子間力顕微鏡 (Atomic force microscope, AFM) (Nano-R2, Pacific Nano technology) は、AFM 探針側が piezo 素子によりコントロールされる。AFM 探針部は、ステンレス板、ガラス板 (水除け)、シリコン単結晶から切り出された AFM 探針により構成され、ステンレス板の上下にガラス板と AFM 探針が接着されている。AFM 探針部分は AFM のヘッドに磁石により取り付けられ、その取り付け角は 7° である。AFM 探針の背面には位置検出用のプローブ光が照射され、AFM 探針からの反射光を四分割フォトダイオード (QPD) で受光している。AFM 探針に変位が生じると、QPD 上で反射光のスポット位置が初期位置 (= 平衡位置) から移動して QPD のフォトダイオード間に電圧差が生じる。本研究では、上下のフォトダイオード間に生じた電圧差の時間変化のみを抜き出した。piezo 素子を用いて AFM 探針をガラス基板に押し付け、その際に QPD に生じた電圧差 (mV) と piezo 素子の押し込み量 (nm) との関係性を調べた。両者は比例関係にあり、その線形係数は 10 nm/mV 程度と見積もられた。この値を用いて、AFM 探針の変位の時間変化を見積もった。

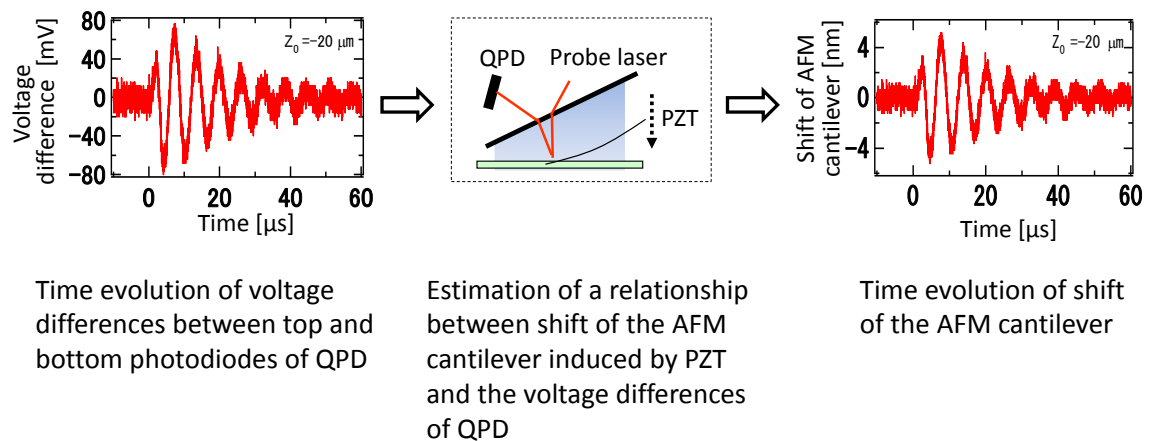


Figure 2-4 Estimation of shift of the AFM cantilever from the time evolution of voltage differences between top and bottom photodiodes of QPD.

2-1-4 局所応力計測システム

顕微レーザー照射システムに AFM を組み込むことで局所応力計測システムとして利用し、レーザー誘起衝撃力の定量化を行った。Fig. 2-5(a) に実験系の概略を示す。AFM を倒立顕微鏡の電動ステージ上に設置し、親水処理を施したガラス基板の上に水を滴下し、電動ステージ上、AFM ヘッドの下部に配置した。AFM ヘッドを降下させ、ヘッドに取り付けられた AFM 探針を水に浸漬させた。

Fig. 2-5(b) にレーザー集光点と AFM 探針の位置関係を示す。対物レンズの機械的上下動と電動ステージにより集光位置を制御し、AFM 探針の先端と同じ像面上で先端から $10\ \mu\text{m}$ 離れた位置を原点と定めた。対物レンズを用い、Z 軸上で $5\text{--}10\ \mu\text{m}$ 毎にフェムト秒レーザーを集光照射し、Z 方向集光位置の関数として AFM 探針の変位を調べた。AFM 探針の変位は、オシロスコープ (DP104, Tektronix) を用い、四分割フォトダイオード (QPD) の上下のフォトダイオード間の電圧差の時間変化として検出し、Fig. 2-4 の方法により AFM 探針の変位の時間変化を見積もった。

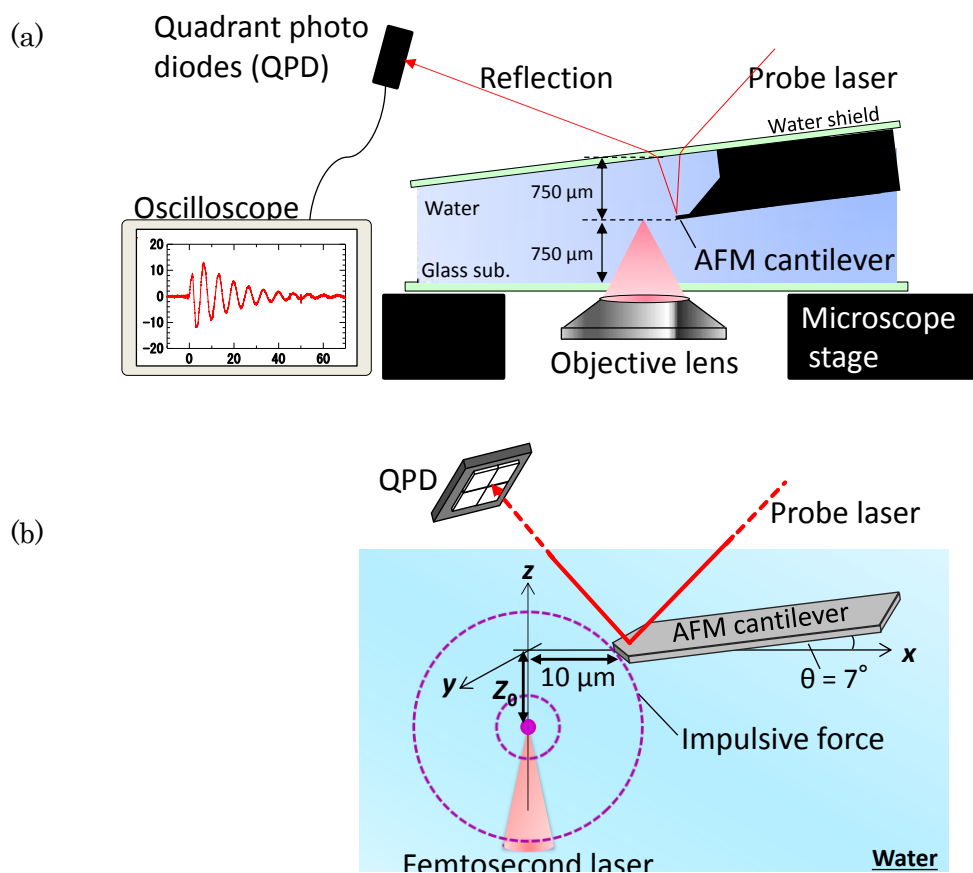


Figure 2-5 (a) Experimental set up of local force measurement system utilizing atomic force microscopy. (b) Coordination of the laser focal point and the AFM cantilever.

2-2 試料の作製

2-2-1 疑似細胞系の作製

レーザー誘起衝撃力の性質を調べる実験などにおいては、個体差が大きい細胞試料は不適切であると考え、実際の細胞試料よりも個体差が小さいと考えられる疑似細胞試料を用いた。疑似細胞系には、ストレプトアビジン修飾微小球 (Solids-Latex, $d=6 \mu\text{m}$, Polyscience) とビオチン修飾基板 (React-Bind™, Thermo) を用いた。ビオチン修飾ウェルの基板を切り取り、ビオチン修飾基板として利用した。ストレプトアビジン修飾微小球の懸濁液を PBS で約 10,000 倍希釈し、約 30 分ソニケーションした。希釈した微小球の懸濁液 $80 \mu\text{l}$ をビオチン修飾基板上に滴下し、インキュベーター内 (37°C) に約 20 時間静置した。この間に、微小球はビオチン修飾基板に接着する。ビオチン修飾基板を PBS でリンスし、基板に接着しなかった微小球を除去した。ビオチン修飾基板をガラスボトムディッシュ上にひっくり返して配置し、ビオチン修飾基板とガラス基

板の間を PBS で満たした後、ガラスボトムディッシュを電動ステージ上設置した卓上インキュベーター内に設置して実験に用いた。

ストレプトアビジンとビオチンは特異的に結合することが知られており [1,2]、微小球と基板間の接着の形成には多点のストレプトアビジン-ビオチン間の特異的な結合が大きく寄与していると考えられる。一般に、細胞間接着の形成には、多点のタンパク質（接着分子）間の特異的な結合が大きく寄与していると考えられている。よって、微小球と基板の接着は細胞間接着に構造上類似していると考えられ、接着力を調べる上では疑似細胞として成立すると判断した。

2-2-2 神経-マスト細胞共生培養系の作製

細胞間接着力の評価のモデル系には神経-マスト共生培養系を用いた (Fig. 2.6(a))。マスト細胞は免疫に関与する細胞であり、呼吸器や消化管の粘膜、真皮、大脳など様々な組織で神経突起の近傍に存在する [3-8]。マスト細胞は浮遊細胞であるが、基板上に神経突起が存在すると相当数のマスト細胞が神経突起に接着する [9-11]。神経とマスト細胞は接着を介して相互に情報伝達している [12-14]。神経とマスト細胞の接着は両者に発現している CADM1 (Cell adhesion molecule-1) と呼ばれるタンパク質（接着分子）のホモフィリック・ヘテロフィリックな結合により形成されており (Fig. 2.6(b))、接着分子の形質転換や蛍光標識を行うことが可能である [15-18]。

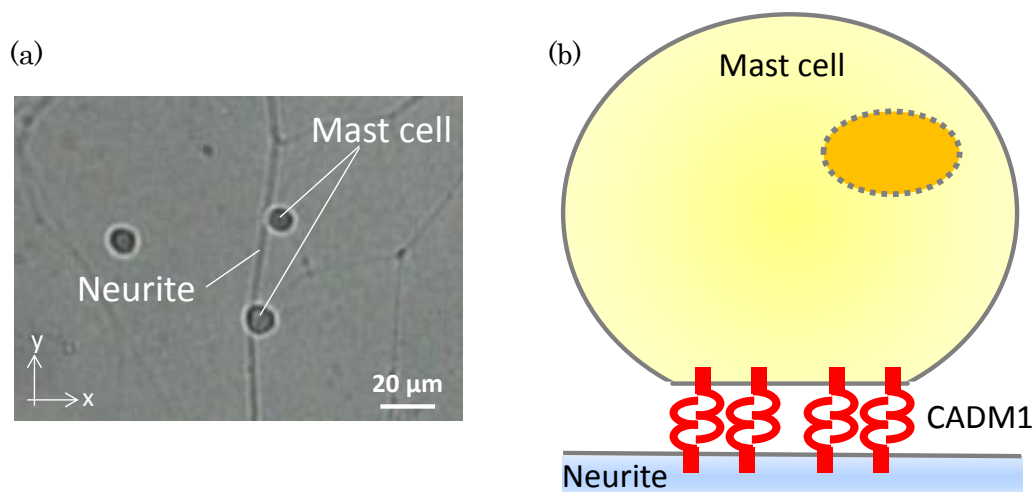


Figure 2-6 (a) Microphotograph of the mast cell adhering to the neurite. (b) Representation of the adhesion between the neurite and the mast cell, which is mediated by the adhesion molecule named “Cell Adhesion Molecule-1 (CADM1)”.

C57BL/6J マウス（日本 SLC）の脛と大腿骨から骨髄を採取し、PBS で3回洗浄後、 α -minimum essential medium に 10%ウシ胎児血清、100 units/ml ペニシリン、100g/ml ストレプトマイシン、5 ng/ml マウスインターロイキン 3 を添加した培地中で 4 週間培養し、マスト細胞を単離した（マウス骨髄由来培養マスト細胞、Bone marrow-derived cultured mast cell; BMMC) [17, 19]。尚、BMMC と CADM1 をノックアウトしたマスト細胞 (CADM1-KO) は共同研究者からご提供頂き、その維持管理を当研究室にて行った。

2) 神経芽腫細胞株その神経細胞への分化誘導

神経芽腫細胞株 (Neuro2a、) を用いた。Dulbecco's modified eagle's minimum essential medium に 10%ウシ胎児血清、100 units/ml ペニシリン、100g/ml ストレプトマイシンを加えた培地を用い、一般的な方法で培養した。マトリゲルを塗布したマイクロディッシュ (ibd) に 6.0×10^4 cells/ml の Neuro2a を含む懸濁液を 600 μ l 播種し、40 ng/ml BDNF (Brain derived neurotropic factor; 脳由来神経因子) と 2.0 μ g/ml RA (all-trans retinoic acid; オールトランスレチノイン酸) を含む無血清の DMEM で 36 時間培養した。この間に、Neuro2a は神経突起を伸長し、神経様に分化する [20]。

3) 神経-マスト細胞共生培養系の作製

神経様に分化した Neuro2a 上に BMMC と CADM1-KO をそれぞれ播種し、Neuro2a と一緒に培養した (共生培養)。この間にマスト細胞は神経突起に接着する。実験の直前に 37°C に温めた DMEM で共生培養系を注ぎ、神経突起に接着していないマスト細胞を除去してから実験に用いた。

参考文献

- [1] K. Hofmann, M. F. Finn, Y. Kiso, *J. Am. Chem. Soc.*, **100** (1978) 3585.
- [2] K. Hofmann, Y. Kiso, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73 (1976) 3516.
- [3] F. K. Austen, and A. J. Boyce, *Leuk Res.*, **25** (2001) 511.
- [4] Y. Kitamura, M. Shimada, K. Hatanaka, and Y. Miyano, *Nature*, **268** (1977) 442.
- [5] Y. Kitamura, M. Yokoyama, H. Matsuda, T. Ohno, and J. K. Mori, *Nature*, **291** (1981) 159.
- [6] Y. Kitamura, *Annu. Rev. Immunol.*, **7** (1989) 59.
- [7] T. Nakahata, and M. Ogawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79** (1982), 3843.
- [8] M. Khali, J. Ronda, M. Weintraub, K. Jain, R. Silver, and J. A. Siverman, *Brain Res.*, **1171** (2007) 18.
- [9] H. Selye, *The mast cells*, Butterworths, Washington D. C., USA, 1965.
- [10] H. R. Stead, F. M. Dixon, H. N. Bramwell, H. R. Riddell, and J. Binestock, *Gastroenterol.*, **97** (1989) 575.
- [11] H. R. Stead, M. Tomioka, G. Quinonez, T. G. Simon, Y. S. Felten, and J. Binestock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** (1987) 2975.
- [12] T. Furuno, A. Ito, Y. Koma, K. Watabe, H. Yokozaki, J. Binestock, M. Nakanishi, and Y. Kitamura, *J. Immunol.*, **174** (2005) 6934.
- [13] T. Furuno, D. Ma, P. H. Van der Kleij, M. Nakanishi, and J. Binestock, *Neurosci. Lett.*, **372** (2004) 185.
- [14] A. Suzuki, R. Suzuki, T. Furuno, R. Theshima, and M. Nakanishi, *Biol Pharm Bull*, **27** (2004) 1891.
- [15] A. Ito, T. Jippo, T. Wakayama, E. Morii, Y. Koma, H. Onda, H. Nojima, S. Iseki, and Y. Kitamura, *Blood*, **101** (2003) 2601.
- [16] M. Masuda, M. Yageta, H. Fukuhara, M. Kuramochi, T. Maruyama, A. Nomoto, and Y.

Murakami, *J. Biol. Chem.*, **277** (2002) 31014.

[17] M. Takai, J. Miyoshi, W. Ikeda, and H. Ogita, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9** (2008) 603.

[18] T. Wakayama, H. Koami, H. Ariga, D. Kobayashi, Y. Sai, A. Tsuji, M. Yamamoto, and S. Iseki, *Biol. Reprod.*, **68** (2003) 1755.

[19] A. Ito, M. Hagiwara, J. Oonuma, Y. Murakami, H. Yokozaki, and M. Takaki, *J. Neuroimmunol.*, **184** (2007) 209.

[20] M. Hagiwara, N. Ichihara, B. K. Kimura, Y. Murakami, and A. Ito, *Am. J. Pathol.*, **174** (2009) 2278.

第3章 原子間力顕微鏡を利用したフェムト秒レーザー誘起衝撃力の定量化

レーザー誘起衝撃力により細胞間の接着力を測定するためには、数～数十マイクロメートルの領域に局在するレーザー誘起衝撃力を定量化することが不可欠である。しかし、従来法ではその定量化は極めて困難であり、新しい定量化手法の開発が必要であった。また、様々な生理条件下での細胞間の接着力を定量化し、その時間・空間依存性などを明らかにすることを考慮すると、レーザー誘起衝撃力をどのように、どのくらいの精度で制御できるかを明らかにすることも重要となる。

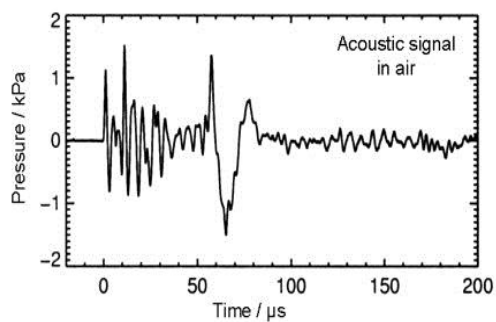
本章では、まず、従来の撃力の評価手法をレーザー誘起衝撃力の計測に用いた場合の問題点について述べた。その後、原子間力顕微鏡 (AFM) を利用したレーザー誘起衝撃力の定量化のアイデアを示したうえで、レーザー誘起衝撃力を求める手法について述べた。さらに、定量化したレーザー誘起衝撃力のパルスエネルギーと対物レンズの開口数依存性を明らかにし、その制御性を示した。

3-1 従来の撃力の定量手法と AFM による定量化のアイデア

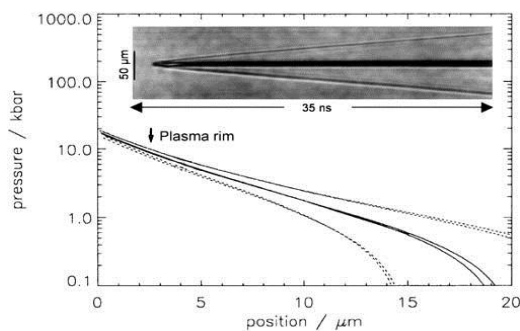
撃力を定量評価する代表的な方法にハイドロフォンを用いた計測が挙げられる (Fig.3-1(a)) [1, 2]。しかし、ハイドロフォンのヘッドサイズは最小でも直径300マイクロメートル程度であり、数～数十マイクロメートルの領域に局在するフェムト秒レーザー誘起衝撃力を定量化するには不適切であった。他にも、ストリークカメラを用いて衝撃波のショックフロントを観測し、その伝搬速度に基づいて衝撃波が定量評価されているが (Fig.3-1(b)) [3]、レーザー誘起衝撃力には衝撃波だけではなくキャビテーションバブルの発生に起因する力学作用なども含まれていると考えられるため、この方法もレーザー誘起衝撃力を定量化するには不適切であり、水中を伝搬するレーザー誘起衝撃力を直接検出し、細胞大の領域に付加される撃力を定量化することができる新規な手法の開発が必要であった。

そこで、微小な板バネとみなすことができる原子間力顕微鏡 (AFM) の AFM 探針に着目し、細胞の代わりに AFM 探針を水溶液中に配置して、レーザー誘起衝撃力をその振動として直接検出し、その振動強度に基づいて AFM 探針に付加されたレーザー誘起衝撃力を定量化することで細胞に付加された衝撃力を求めようとした。しかし、この方法では、レーザー誘起衝撃力により細胞を解離させた時のレーザー集光点と細胞の位置関係を細胞試料ごとに再現する必要があり、解析が非常に煩雑になり、レーザー誘起衝撃力の特色の1つである迅速な測定を活かすことが難しくなる。そこで、AFM 探針に付加された衝撃力を計測し、

その計測によりレーザー誘起衝撃力の空間分布を調べ、その空間分布に基づいてレーザー集光点で発生した衝撃力を求めるというアイデアの下で開発を行った。



A. Vogel et al., Chem. Rev., 103 (2003).



A. Vogel et al., Appl. Phys. B, 68 (1999).

Figure 3-1 (a) Measurement of an impulsive force by a hydrophone. (b) Measurement of shockwave by a streak camera.

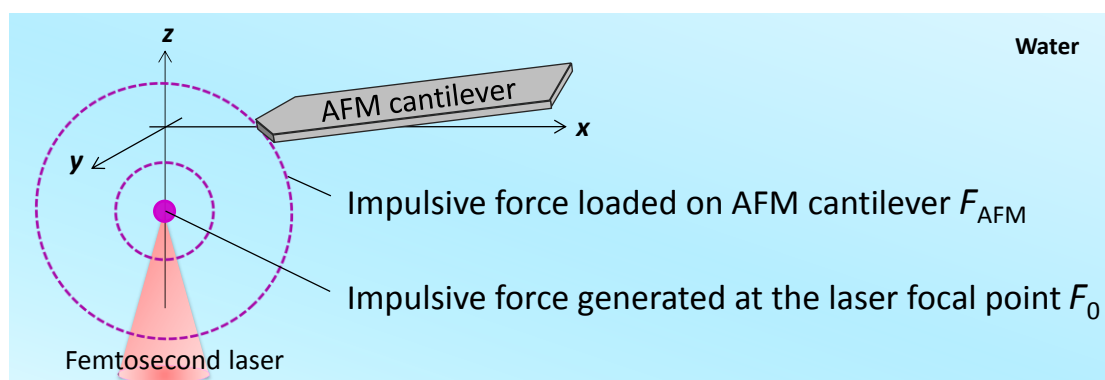


Figure 3-2 The idea of the quantification of femtosecond laser-induced impulsive force utilizing atomic force microscopy.

3-2 AFM 探針に誘導された振動挙動の解析

3-2-1 AFM 探針に誘導された振動の挙動

Fig. 3-3 に各レーザー集光位置における AFM 探針の振動を示す。 $Z = 0 \mu\text{m}$ の場合、AFM 探針に明瞭な振動は観測されなかった。その他の集光位置においては、AFM 探針は、フェムト秒パルスの集光照射直後、数十マイクロ秒間、約 10 nm の振幅で過渡的に振動した。フェムト秒パルスを AFM 探針の上方に集光照射した際には、AFM 探針は下方方向に最初に振れた (Fig. 3-3, (a),(b))。一方、AFM 探針の下方方向に集光照射した際には、上方に最初に振れた (Fig. 3-3, (d),(e))。また、最初のシフト (Fig. 3-3, (A)) よりもその次のシフト (Fig. 3-3, (B)) の方が大きくなった。全てのレーザー照射条件において、約 160 KHz の周波数成分が含まれていた。この周波数は、水中で AFM 探針をタッピングさせて確認した AFM 探針の共鳴周波数とほぼ一致した。

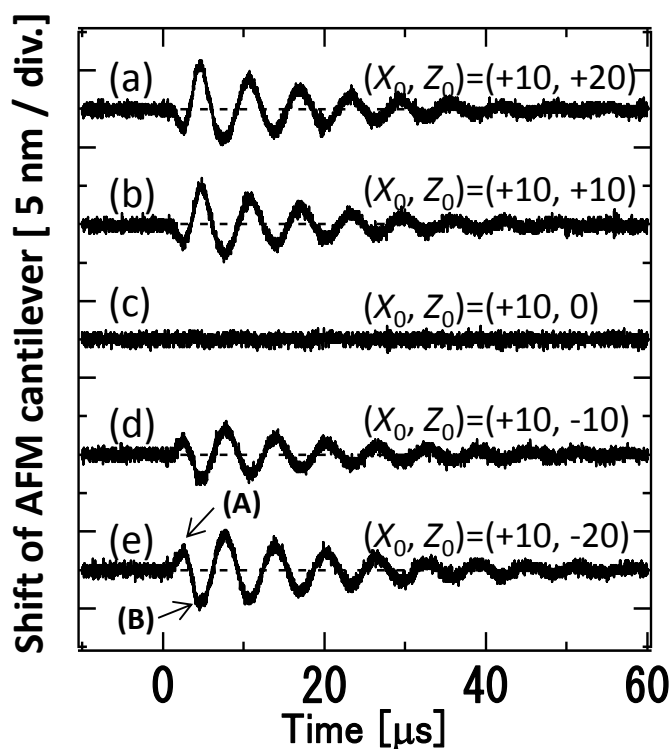


Figure 3-3 Z position dependence of the transient oscillation of the AFM cantilever due to the irradiation of the laser pulse with the energy of 170 nJ/pulse.

レーザー誘起衝撃力により生じた AFM 探針の振動挙動を考察する為の比較参照実験として、フェムト秒単パルス (25, 35, 45, 65, and 80 nJ/pulse) を対物レンズ (10x, NA=0.25) を通して、水中に配置した AFM 探針に直接集光照射し、振動を観測した。Fig. 3-4 に結果を示す。先の直接集光照射しなかった場合、150 nJ/pulse を下回るとレーザー誘起衝撃力による AFM 探針の振動は検出できなかったが、直接集光照射した場合には、25 nJ/pulse で振動が検出された。35 nJ/pulse 以上で観測された振動は、約 10 nm の振幅で数十マイクロ秒間過渡的に振動し、最初のシフトよりもその次のシフトの方が大きくなり、レーザー誘起衝撃力による振動と同様の特徴を示した。一方で、基本振動とは異なる振動モードが明瞭に確認され、パルスエネルギーと共に顕著になる傾向がみられた。

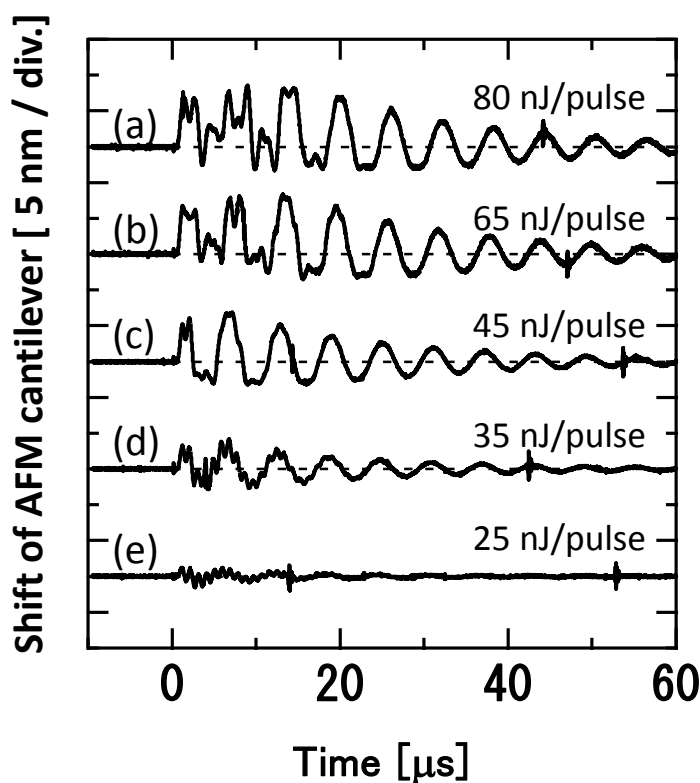


Figure 3-4 Pulse energy dependence of the oscillation of the AFM cantilever induced by the direct irradiation of the laser in the top of the cantilever.

3-2-2 AFM 探針振動の駆動力

水中でレーザー誘起衝撃力により誘起される AFM 探針振動の最初の変位の方向は、 $Z_0=0 \mu\text{m}$ を除く全ての集光位置で、レーザー集光点から離れる方向であった。これは、レーザー集光点から発散したレーザー誘起衝撃力に AFM 探針が押されたことを意味する。集光位置 $Z_0=0 \mu\text{m}$ では明確な振動は観測されなかったのは、主に横方向 (x 方向) からの衝撃力が AFM 探針に付加された為と考えられる。

また、水中で観測された振動は、最初のシフト (A) よりも次のシフト (B) の方が大きくなった。仮に、AFM 探針が振動周期よりも十分に短い時間で AFM 探針が加振されたとすると、最初のシフトが最大になると考えられる。AFM 探針がこのような挙動をとらなかった理由として次の2つの可能性が考えられる。①AFM 探針はキャビテーションバブルの生成に伴い発生する応力波[4]により振動周期と同程度の時間で加振された。②AFM 探針に高次の振動モードの励起と緩和が起きた。可能性①は、キャビテーションバブルの発生から崩壊までの過程を高速カメラにより観察することで検証した (結果については第4章の一節で述べる)。②は、AFM 探針へフェムト秒レーザーを直接集光照射することにより検証した。

キャビテーションバブルの発生から崩壊までの過程を高速カメラにより観察した結果、崩壊するまでの時間はレーザー集光照射後 4-8 μs であった。

水中でフェムト秒レーザーを AFM 探針に直接集光照射した結果、基本振動以外の振動モードが明瞭に観測された。Fig. 3-5 (i)にフーリエ変換により振動の周波数成分を調べた結果を示す。どの振動も水中での基本周波数である 160 KHz に最大のピークを示し、レーザー強度の増加に伴って倍音、三倍音、五倍音に相当する 330、490、760 KHz にピークが現れ、より顕著になっていった。この結果は、フェムト秒レーザーパルスの直接集光照射により AFM 探針に高次の振動モードが励起され、付加される力の増加に伴い高次モードの振動の効果がより大きくなることを示唆している。Fig. 3-5 (ii)には、レーザー誘起衝撃力に誘起された振動に対してフーリエ変換を行った結果を示す。基本周波数 (160 KHz) 以外では 330 KHz 付近にブロードなピークが確認され、倍音がわずかながら含まれていることが示された。この結果は、AFM 探針の振動には、①と②の両方が関与しているものの、①の寄与の方が大きいことを示唆する。

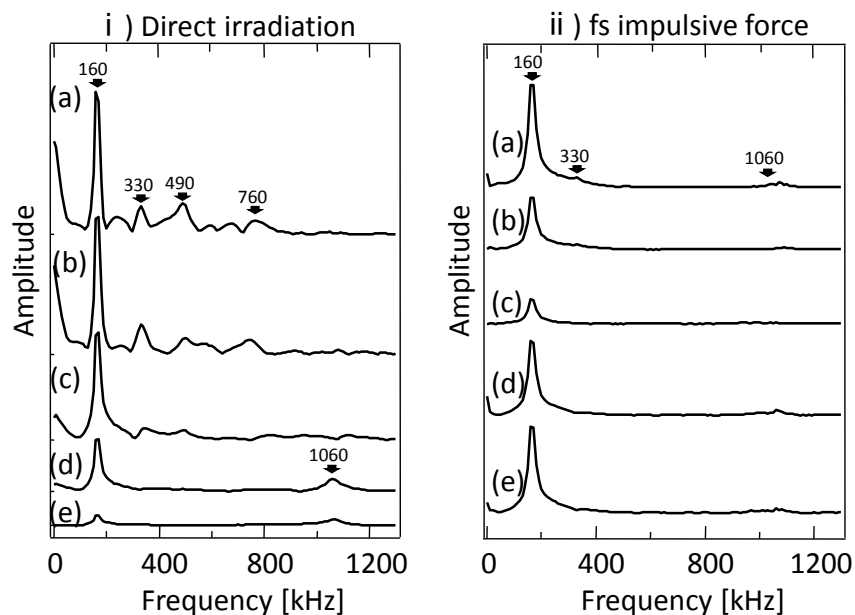


Figure 3-5 Frequency domain spectra of the oscillation of the AFM cantilever. i) and ii) are the case of the direct irradiation of the laser and the loading of the impulsive force, respectively. (a)-(e) in the graphs correspond to (a)-(e) in Fig. 3-3 and 3-4.

3-3 AFM 探針振動の解析とレーザー集光点で生じた衝撃力の定量化

3-3-1 AFM 探針上でレーザー誘起衝撃力が付加される領域の計算

レーザー集光点と AFM 探針の位置関係を幾何学モデル化し (Fig. 3-6)、集光点で発生した衝撃力 F_0 が球面状に伝搬して AFM 探針に衝突するという仮定の下、AFM 探針上でレーザー誘起衝撃力が付加される領域を計算した。

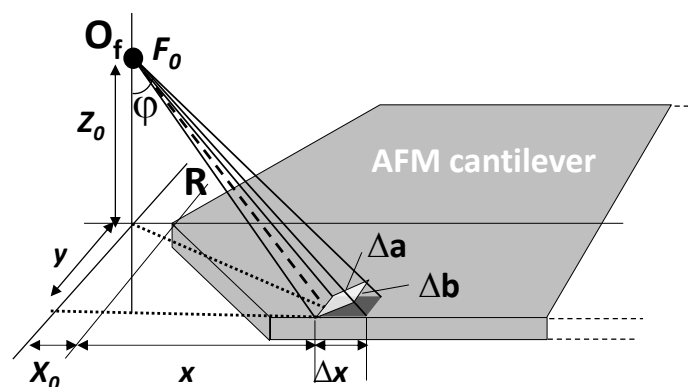


Figure 3-6 Geometrical model constructed on the basis of spatial relationship between the laser focal point O_f and the AFM cantilever.

レーザー誘起衝撃力は、Fig. 3-6 に示したレーザー集光点 O_f と AFM 探針間の距離 R の二乗に反比例するので、AFM 探針の微小領域に付加される衝撃力は Eq. (1) で表せる。

$$\Delta f(x, y) = -F_0 \frac{\Delta a \cdot \Delta b}{4\pi R^2} \quad (1)$$

$\Delta a \Delta b$ は AFM 探針上の微小領域 $\Delta x \Delta y$ と Eq. (2), (3) により結びつけられる。

$$\Delta a = \cos\varphi' \cdot \Delta x = \frac{|z_0|}{\sqrt{(X_0+x)^2+Z_0^2}} \Delta x, \quad (2)$$

$$\Delta b = \cos\varphi'' \cdot \Delta y = \frac{|z_0|}{\sqrt{y^2+Z_0^2}} \Delta y \quad (3)$$

AFM 探針を押し方向にかかるレーザー誘起衝撃力（衝撃力の Z 方向成分）は、Eq. (4) により表される。

$$\Delta b = \cos\varphi'' \cdot \Delta y = \frac{|z_0|}{\sqrt{y^2+Z_0^2}} \Delta y \quad (4)$$

Eq. (4) に Eq. (1), (2), (3) を代入すると Eq. (5) が得られる。

$$\Delta f(x, y) = -\frac{F_0}{4\pi} \cdot \frac{Z_0^3}{\{(X_0+x)^2+y^2+Z_0^2\}^{\frac{3}{2}}} \cdot \frac{\Delta x}{\sqrt{(X_0+x)^2+Z_0^2}} \cdot \frac{\Delta y}{\sqrt{y^2+Z_0^2}} \quad (5)$$

さらに、AFM 探針の取付角 $\theta=7^\circ$ を考慮すると、

$$\begin{pmatrix} X'_0 \\ Z'_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos\theta & -\sin\theta \\ \sin\theta & \cos\theta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} X_0 \\ Z_0+z \end{pmatrix}$$

となる。

Eq. (5) により、AFM 探針上の力の分布を計算した結果を Fig. 3-6 に示す。ここで、フェムト秒レーザーは、 $X_0=10 \mu\text{m}$ の光軸上に集光照射されている。Z 軸上で、レーザー集光点が AFM 探針近傍にある時には、AFM 探針の先端部分のみにレーザー誘起衝撃力が付加されるが、X 方向成分の衝撃力が多く、Z 方向 (AFM 探針を振動させる方向) 成分の衝撃力は小さくなる。レーザー集光点が AFM 探針から離れると、Z 方向成分の衝撃力が増加し、約 $20 \mu\text{m}$ 離れた位置で最大と

なる。20 μm より離れると、衝撃力が AFM 探針全体に分散し、Z 方向成分の衝撃力の総量も低下する。また、AFM 探針が 7° 傾いている為、AFM 探針の上方向に集光した時の方が、下方向に集光した場合よりも大きな衝撃力が AFM 探針に付加される。

Fig. 3-7 に AFM 探針が受ける衝撃力の総和の集光位置依存性を示す。AFM 探針に付加された衝撃力の方向が $Z_0=0 \mu\text{m}$ を境に入れ代わり、 $Z_0= \pm 20 \mu\text{m}$ で最大を示すことが分かる。Fig. 3-6 に示したように、 $-30 \mu\text{m} < Z_0 < +30 \mu\text{m}$ の範囲では AFM 探針の先端部のみに衝撃力が加わるとみなせる。このような条件下では、AFM 探針の変位は質点の振動として近似でき、バネ定数に基づいて AFM 探針に付加された衝撃力 F_{AFM} を見積もることができると考えられる。 F_{AFM} の集光位置依存性を実験により求め、Eq. (5)の F_0 のみを比例係数として Fig. 3-7 に示した曲線でフィッティングすることで、 F_0 を実験的に求めることが可能になると考えられる。次項では、AFM 探針の解析手法とそれにより求めた F_{AFM} の集光位置依存性を示し、次々項でその集光位置依存性から F_0 を見積もった結果を示す。

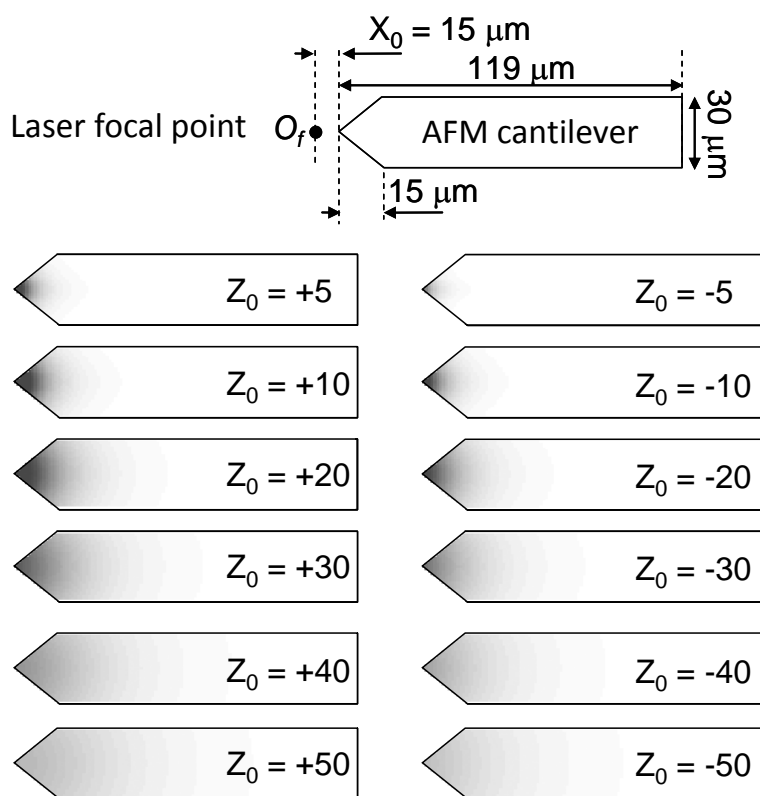


Figure 3-6 Distribution of the impulsive force on the cantilever calculated by Eq. (5).

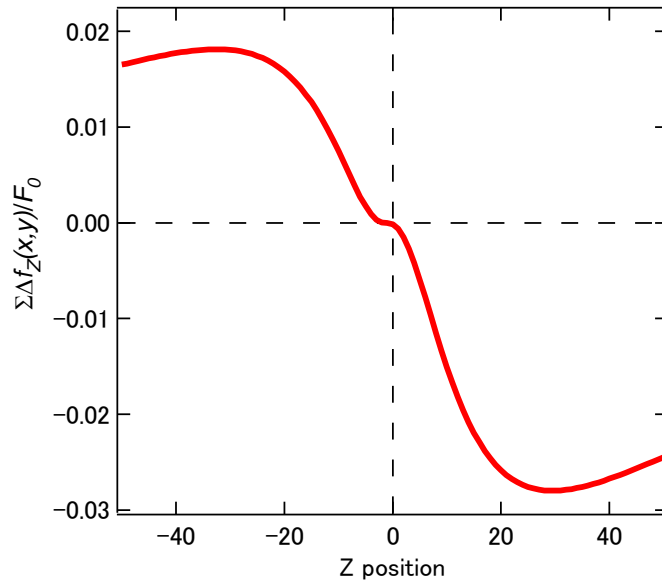


Figure 3-7 Z position dependence of F_0 calculated by Eq. (5).

また、ここではレーザー集光点は点源と仮定し、その空間的分散を考慮しなかった。しかし、フェムト秒レーザーを対物レンズを通して集光すると、自己収束効果や収差により、集光点が Z 方向に分散することが知られている。Z 方向への空間的分散を考慮した計算については、補足 1 に詳細を記した。この計算の結果からは、本実験条件下ではレーザー集光点を点源とみなせることが示唆された。

3-3-2 AFM 探針振動の解析

本実験条件下では、AFM 探針の振動を Eq.(6)で表される質点の過渡減衰振動として近似的に解析することができる[4]。

$$m \frac{\partial^2 Y(t)}{\partial t^2} + c \frac{\partial Y(t)}{\partial t} + kY(t) = F(t) \quad (6)$$

$Y(t)$ の特殊解は、デュアメル積分と呼ばれ、

$$Y(t) = \frac{\omega^2 + \alpha^2}{\omega} \int_0^t \frac{F(\tau)}{k} e^{-\alpha(t-\tau)} \cdot \sin\{\omega \cdot (t - \tau)\} d\tau \quad (7)$$

で示される式になる。

今、外力 $F(t)$ は AFM 探針に作用する衝撃力なのでデルタ関数で表せると考えると、衝撃力の時間積分である力積 F と $F(t)$ の関係は、Eq. (8) で表せる。

$$F(t) = F \cdot \delta(t) \Leftrightarrow \int F(t) dt = F \quad (8)$$

Eq. (7) に Eq. (8) を代入することで、衝撃力による過渡減衰振動を示す Eq. (9) が得られる。ここで、 F 、 ω 、 α 、 k は、それぞれ衝撃力（力積）、角速度、減衰係数、AFM 探針のバネ定数である。

$$Y(t) = \frac{\omega^2 + \alpha^2}{\omega} \frac{F}{k} e^{-\alpha(t-\tau)} \cdot \sin\{\omega \cdot t\} d\tau \quad (9)$$

Eq. (9) により実験結果を最小二乗フィッティングした結果の一例を Fig. 3-8 (a) に青線で示す。初期振幅には上述の①と②の効果が含まれる為、初期振幅を無視してフィッティングを行った。初期振幅以外の挙動は、 $Y(t)$ により非常に良く再現でき、また、 $Y(t)$ をフーリエ変換した結果、衝撃力による振動のスペクトルとも良く一致した。このフィッティングは、①・②の効果を含む初期振幅がその後の振動挙動より外挿可能できると仮定したものであるが、ここに示した結果は、その妥当性を示唆する。

この近似により得られた各変数の値を Fig. 3-8 (b)-(d) の青い点で示す。衝撃力 F のみが距離 Z_0 の増減に伴って変化を示した。振動の周波数 $\omega/2\pi$ は、 Z_0 の変化によらず、水中での AFM 探針の基本周波数である 160 KHz を示した。水の粘性抵抗に依存すると考えられる減衰時間 $1/\alpha$ も、18 μ s とほぼ一定の値を示した。次に、衝撃力 F のみを変数とし、周波数及び減衰時間を 160 KHz、18 μ s に固定して近似を行った。Fig. 3-8(a)-(d) の緑の線及び緑の点で示すように 3 変数近似の場合とほぼ同様の近似曲線を得ることができた。

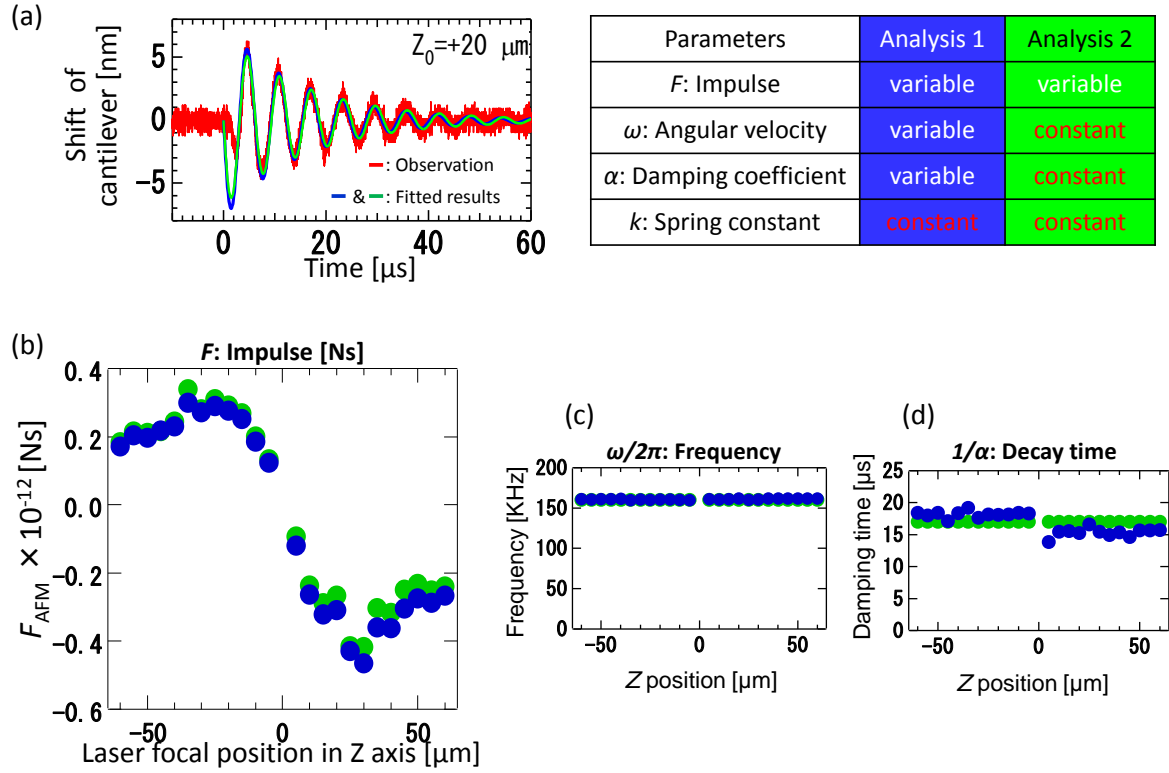


Figure 3-8 (a) Representative fitted result of transient oscillation of the cantilever. The red line and the blue line show observation data and fitted result by Eq. (9), respectively. (b)-(d) Z position dependence of impulsive force loaded on the cantilever F_{AFM} (b), oscillation frequency of $\omega/2\pi$ (c), and decay time of $1/\alpha$ (d) that were estimated from oscillation of the cantilever. The blue dots indicate the result of at least square fitting by Eq. (9) when F , ω , and α were treated as variable parameters. The green dots indicate the result when ω and α were treated as constants.

3-3-3 レーザー集光点で発生した衝撃力の定量化

Eq. (9)により、 F_0 のみを変数として F_{AFM} の集光位置依存性をフィッティングした結果を Fig. 3-10 の黄色線で示す。 F_{AFM} の集光位置依存性は良く再現され、この時の F_0 の値は 20×10^{-12} Nsであった。これにより、パルスエネルギーが170 nJ/pulseの時にAFM探針により定量化されるレーザー集光点で発生した衝撃力 F_0 は 16×10^{-12} Nsと規定し、細胞間接着の定量化に利用しようと考えた。

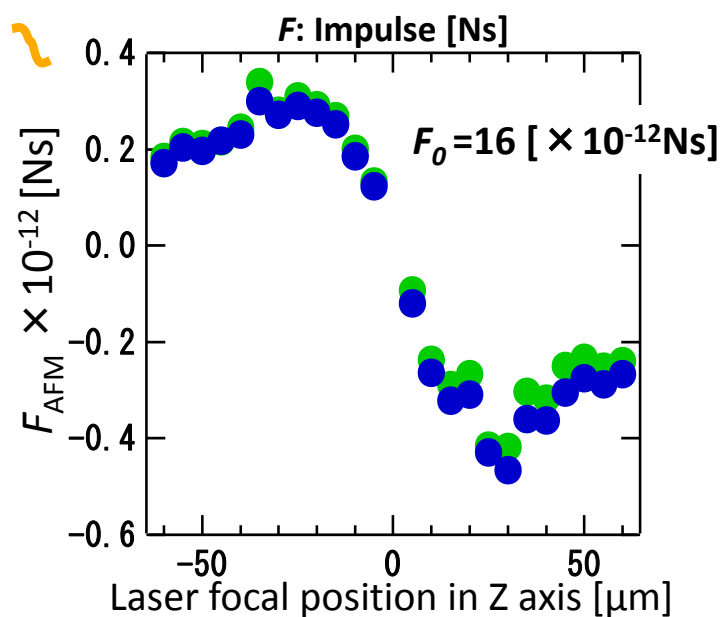


Fig. 3-10. Fitted result of Z position dependence of F_{AFM} by Eq. (9), where only F_0 is treated as a variable parameter.

3-4 レーザー誘起衝撃力の制御性

3-4-1 レーザー誘起衝撃力のパルスエネルギー依存性

Fig. 3-11 に、20 倍の対物レンズ (NA=0.40) を用いた際に観測された AFM 探針振動のパルスエネルギー依存性を示す。AFM 探針の振幅はパルスエネルギーと共に増加したが、110nJ/pulse 以上では、振幅は約±30 nm で飽和した。

Fig. 3-12 に振動の解析結果を示す。AFM 探針の振動の周波数は、Z 方向集光位置、パルスエネルギーによらずほぼ一定の値を示した。減衰時間は、Z 方向集光位置によらずほぼ一定の値を示した。パルスエネルギーに対しては、100 nJ/pulse まではほぼ一定の値を示したが、110 nJ/pulse 以上で増加し、ばらつきが大きくなる傾向を示した。Fig. 3-12 (b)に F_{AFM} の集光位置依存性及を示す。どの集光位置においても、 F_{AFM} はパルスエネルギーと共に増加した。また、どのパルスエネルギーにおいても、 F_{AFM} の集光位置依存性は同程度にフィッティング可能であった。

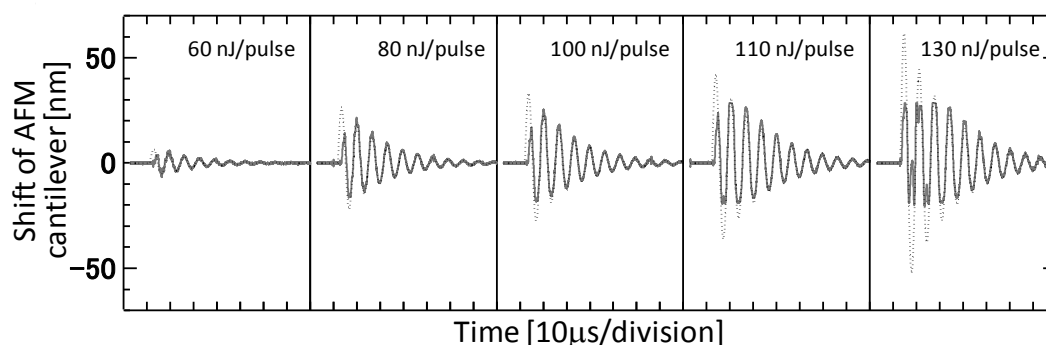


Figure 3-11 Solid line shows the oscillation of the cantilever resulted from irradiation of the laser pulse with the pulse energy of 60, 80, 100, 110, and 130 nJ/pulse. The laser pulses were focused at 25 μm below the cantilever. Dotted line is fitted result.

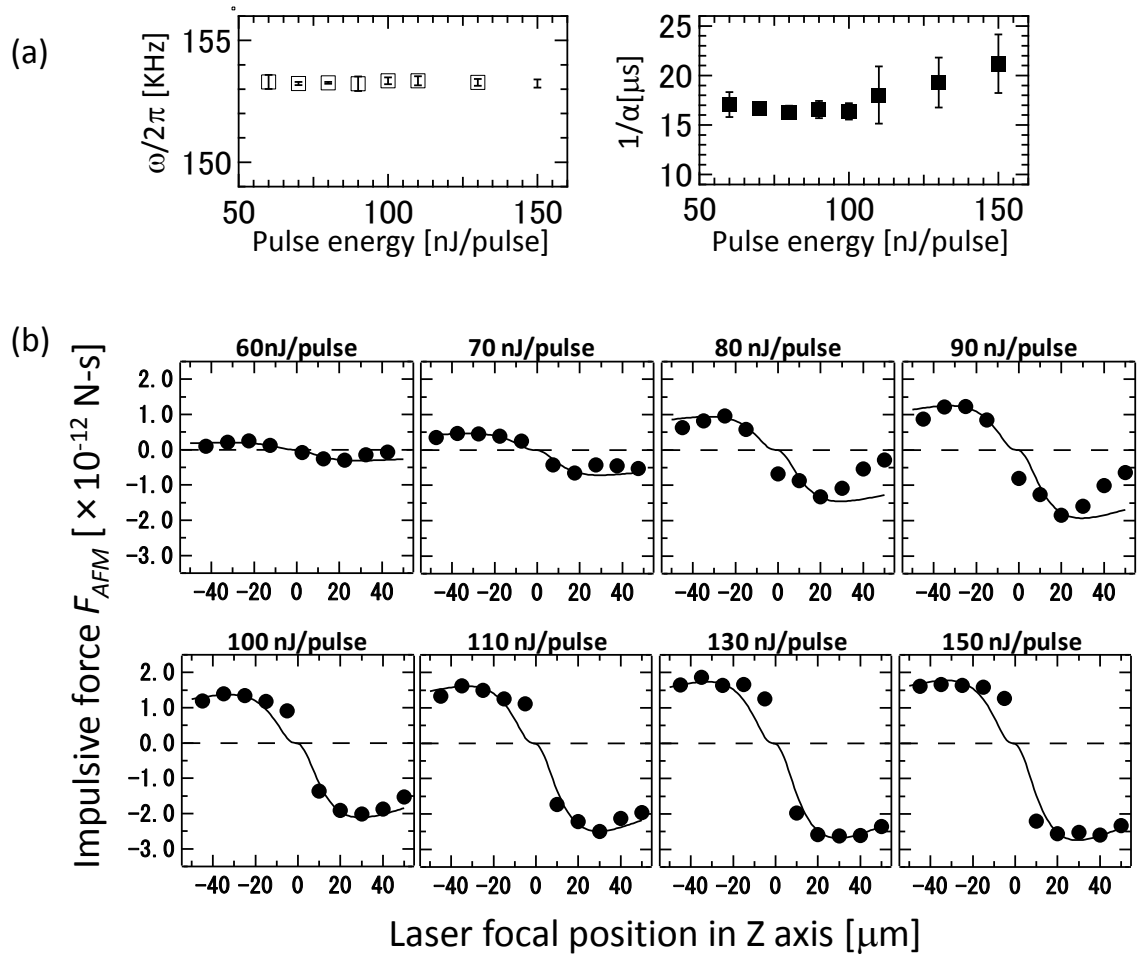


Figure 3-12 (a) Pulse energy dependence of frequency of the oscillation ($\omega/2\pi$) and decay time ($1/\alpha$). (b) Z position dependences of F_{AFM} at the pulse energy of 60, 80, 100, 110, 130, and 150 nJ/pulse. Black lines are Z position dependence of F_0 .

Fig. 3-13 にレーザー集光点で発生した衝撃力の総和 (F_0) のパルスエネルギー依存性を示す。衝撃力 F_0 は、50nJ/pulse をしきい値に発生し、衝撃力発生なしきい値 (E_{th}) からしきい値の 2 倍のパルスエネルギー ($2 \times E_{th}$) で直線的な増加を示し、 $2 \times E_{th}$ 以上で飽和に至る傾向を示した。

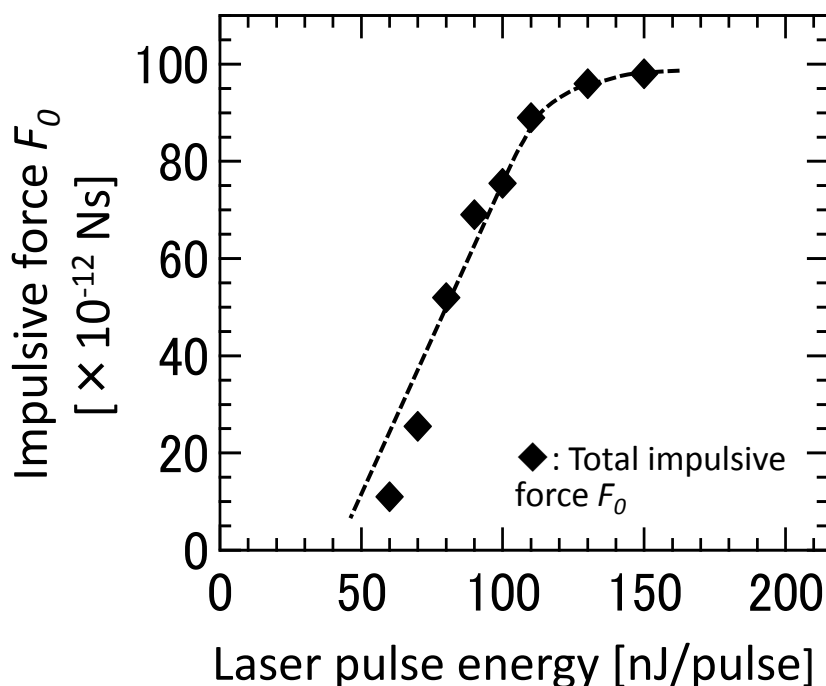


Figure 3-13 Pulse energy dependence of total impulsive force F_0 .

3-4-2 レーザー誘起衝撃力の制御性 1 : パルスエネルギー依存性

AFM 探針の振幅がパルスエネルギーと共に実際に大きくなったことが確認された。110 nJ/pulse 以上では、AFM 探針の振幅は約 ± 30 nm で飽和する傾向が見られたが、AFM 探針は幅 : 30 μm 、厚さ : 4 μm 、長さ : 119 μm であり、その振幅が ± 30 nm で飽和に至るとは考えにくい。そこで、四分割フォトダイオード (QPD) の検出限界を調べた結果、振幅の飽和は QPD の検出限界によるものであることが示された。従って、AFM 探針自体は ± 30 nm 以上の振幅で実際に振動していたと考えられるため、3 章同様、初期の振幅を無視し、過渡減衰振動を外挿することで AFM 探針振動を解析した。Fig.3-12 に示したように 110nJ/pulse 以上においても F_{AFM} の集光位置依存性は 110nJ/pulse 未満の場合と同程度にフィッティングされたことから、初期振幅を無視した振動の解析手

法により F_{AFM} の定量評価が妥当に行われたことが示唆された。

本実験により、パルスエネルギーを調整することで衝撃力の大きさを制御し、検出できることが示された。また、パルスエネルギーは 5 nJ/pulse の精度で制御することができる為、衝撃力が直線的増加を示す領域では、 $10 \times 10^{-12} \text{ Ns}$ の精度で衝撃力を線形的に制御できることが示された。実際に細胞に付加される衝撃力は、標的細胞とレーザー集光点間の距離により付加される衝撃力の大きさが変わる。接着細胞を解離させる予備実験において、レーザー集光点と標的細胞は最低でも $20 \text{ }\mu\text{m}$ 程度は離れているため、衝撃力は $0.025 \times 10^{-12} \text{ Ns}$ の精度で制御できると考えられる。この衝撃力の制御精度は細胞間の接着力の不確実性と同程度あるいはそれよりも小さいと推測され[5]、衝撃力を駆使すれば細胞間接着を定量化できることが示唆された。

3-4-3 レーザー誘起衝撃力の制御性 2：対物レンズの開口数依存性

光の回折限界 (Fig. 3-14) は、波長が同じであれば、対物レンズの開口数 (NA) によって規定される。

$$d = \frac{1.22\lambda}{NA} \quad (10)$$

ここで、 d は光の回折限界、 λ は光の波長である。上述の式は、同じエネルギーのパルスを導入した場合には NA が高いほど集光点での光子密度が高くなることを示しており、多光子吸収のしきい値が低くなると考えられる。多光子吸収のしきい値の低下は衝撃力発生のしきい値の低下をもたらすと考えられ、衝撃力がより効率的に発生することを示唆する。従って、NA が変われば、衝撃力の制御性も変化をきたす可能性があると考えられる。レーザー誘起衝撃力の幅広い系への適用を考慮すると、系に合わせて様々な対物レンズを使用することが想定される。そこで、NA の異なる対物レンズ毎に衝撃力のパルスエネルギー依存性を調べた。

対物レンズは、3-3-2 までの実験で用いた 20 倍のレンズ (NA=0.40) に加え、10 倍 (NA=0.25)、40 倍 (NA=0.90) のレンズを用いた。図 3.14 に衝撃力 F_0 のパルスエネルギー依存性を NA 毎に示す。NA が高い程、衝撃力発生のしきい値は低下した。しかし、どの NA においても、 F_0 は $E_{th} - 2 \times E_{th}$ において直線的増加を示し、 $2 \times E_{th}$ 以上で飽和に至る傾向を示した。この結果から、高

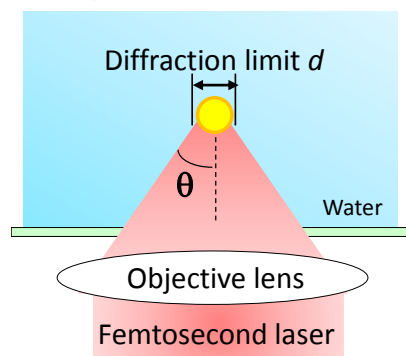


Figure 3-14 Representation of diffraction limit.

NA になるほど衝撃力の発生効率 ($F_0 / \text{pulse energy}$) は増加するが、パルスエネルギーに対する挙動及びその実体は NA により顕著に変化しないことが確認された。また、 $E_{th} - 2 \times E_{th}$ においては、どの NA でも、衝撃力は、 10×10^{-12} Ns の精度で線形的に制御可能であった。

NA 間における E_{th} の比は NA 間の比とほぼ同等であったことから、集光点におけるレーザーの収束の度合いは NA 比に依存していると推察されるが、その定量的理解には自己レンズ効果等の検証も重要であり、より詳細に調べる必要がある。

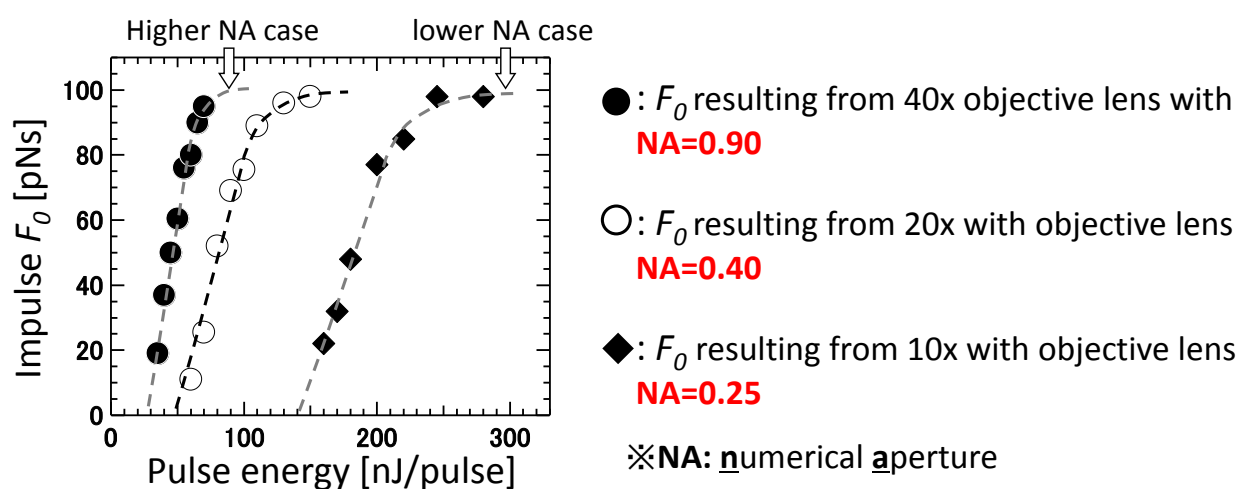


Figure 3.15 Neumerical aperture dependence of F_0 .

3-5 まとめ

集光フェムト秒レーザーが水中に誘起する衝撃力を AFM 探針の振動に基づいて定量化する手法について述べた。まずは、AFM 探針に生じた振動が衝撃力により誘導された振動であることを検証した。ここでは、レーザー集光位置に対する振動の挙動、AFM 探針へのレーザーの直接の集光照射により誘導された振動の挙動との比較に基づいて振動の特性を考察し、AFM 探針近傍へのレーザーの集光照射により生じた振動が衝撃力により誘導されたことを示した。AFM 探針の先端から $10 \mu\text{m}$ 離れた位置の Z 軸上に集光した場合には衝撃力が AFM 探針先端部のみに付加されることが計算により示され、その条件下で誘導された振動であれば、衝撃力によりインパルス加振された質点の過渡減衰振動として解析できることを示した。

過渡減衰振動の運動方程式を用いて AFM 探針振動を解析し、AFM 探針に付加された衝撃力 (F_{AFM}) を力積 [Nxs] として見積もった。その結果、 F_{AFM} は光

軸 (Z) 方向のレーザー集光位置に対して依存性を示すことを見出した。レーザー集光点と AFM 探針の位置関係を幾何学モデル化し、 F_{AFM} の集光位置依存性から集光点で発生した衝撃力の総和 F_0 を求めることに成功した。この手法により F_0 を定量化し、細胞間接着の定量化に利用しようとした。

さらに、 F_0 のパルスエネルギー依存性に基づいて F_0 の制御性を検証した。その結果、 $E_{th} - 2 \times E_{th}$ では、パルスエネルギーの調整により $10 \times 10^{-12} \text{Ns}$ の精度で衝撃力を線形に制御することが可能であることが示された。衝撃力はレーザー集光点と標的間距離によってもその大きさが変化する為、距離の調整により制御性がどのように変化するかを調べた。その結果、距離を調整した場合には、 $0.025 \times 10^{-12} \text{Ns}$ の精度で制御可能であった。この場合、衝撃力の制御精度は細胞間の接着力の不確実性と同程度あるいは小さいと考えられ、衝撃力を駆使すれば接着力の相違を検出できることが示唆された。

参考文献

- [1] A. Vogel and V. Venugopalan, *Chem. Rev.*, **103** (2003), 577.
- [2] T. Ando, S. Sato, S. Takano, H. Ashida, and M. Obara, *Appl. Surf. Sci.*, **255** (2009) 9898.
- [3] A. Vogel, J. Noack, K. Nahen, D. Theisen, S. Busch, U. Parlitz, DX. Hammer, GD. Noojin, BA. Rockwell, and R. Birngruber, *Appl. Phys. B*, **68** (1999) 271.
- [4] Emil-Alexandru Brujan and Alfred Vogel, *J. Fluid Mech.* 558, 281 (2006).

第4章 レーザー誘起衝撃力と細胞の相互作用についての現象論的考察

レーザー誘起衝撃力により細胞間の接着力を定量化するためには、3章で示したレーザー誘起衝撃力の計測学的理解に加え、細胞とレーザー誘起衝撃力の相互作用を考察し、その適用範囲を示すことが重要である。そのためには、レーザー誘起衝撃力の現象としての描像を示すことが不可欠となる。

本章では、まず、集光フェムト秒レーザーの水中への照射により誘起される諸現象とそれらによる力学作用について整理した。その上で、キャビテーションバブルの挙動に基づいてレーザー誘起衝撃力について現象論的に考察した。これに基づき、細胞とレーザー誘起衝撃力の相互作用について現象論的に考察を行い、細胞間接着力の測定におけるレーザー誘起衝撃力の適用範囲の指針を示した。

4-1 キャビテーションバブルとレーザー誘起衝撃力の挙動の比較

フェムト秒レーザーを水中に集光照射すると、集光点で多光子吸収が引き起こされ、応力閉じ込めが起こる。レーザー集光後、ナノ秒の時間で応力が緩和されることで衝撃波が形成され、集光点の周囲に向かって伝搬する。この伝搬に伴い水分子に並進運動エネルギーがもたらされ、集光点からその周囲に向かって応力が伝搬する。同時に、衝撃波の発生によって集光点近傍は過渡的に低圧状態になり、水の気化が起こり、キャビテーションバブルと呼ばれる気泡がマイクロ秒の時間で生成される[1-3]。パルスエネルギーにもよるが、キャビテーションバブルは10 μs 程度で最大径に達し、崩壊する。このキャビテーションバブルの拡大によっても応力が集光点からその周囲に向かって伝搬する。

これらの一連の現象により微小物体にもたらされる力学作用を1次元モデルにより示す (Fig. 4-1)。力学作用の観測には、3章と同様にAFM探針を用いるとする。レーザー集光照射後、まずは10 ns程度の時間で衝撃波が、次いで応力波、キャビテーションバブルの界面が10 μs の時間でAFM探針に衝突すると考えられる。実際には、衝撃波によりもたらされる応力波とキャビテーションバブルによりもたらされる応力波を分けて扱うことは不可能であり、応力はキャビテーションバブルが崩壊するまで付加され続けられると考えられる。AFMを利用した3章での定量化実験では衝撃波、応力波、気液界面の衝突によってもたらされる力学作用の総和を力積として評価したといえる。

ここで、AFM探針を動かすという観点から、これらの力学作用について考えると、衝撃波がAFM探針に作用する時間は非常に短いことから、AFM探針の移動において衝撃波は大きく寄与しないと推測される。よって、AFM探針の移動においては、応力波とキャビテーションバブルの界面の寄与が高いと推測さ

れるため、キャビテーションバブルの挙動とレーザー誘起衝撃力の挙動を比較することで、レーザー誘起衝撃力の描像を現象論的に得ようと考えた。

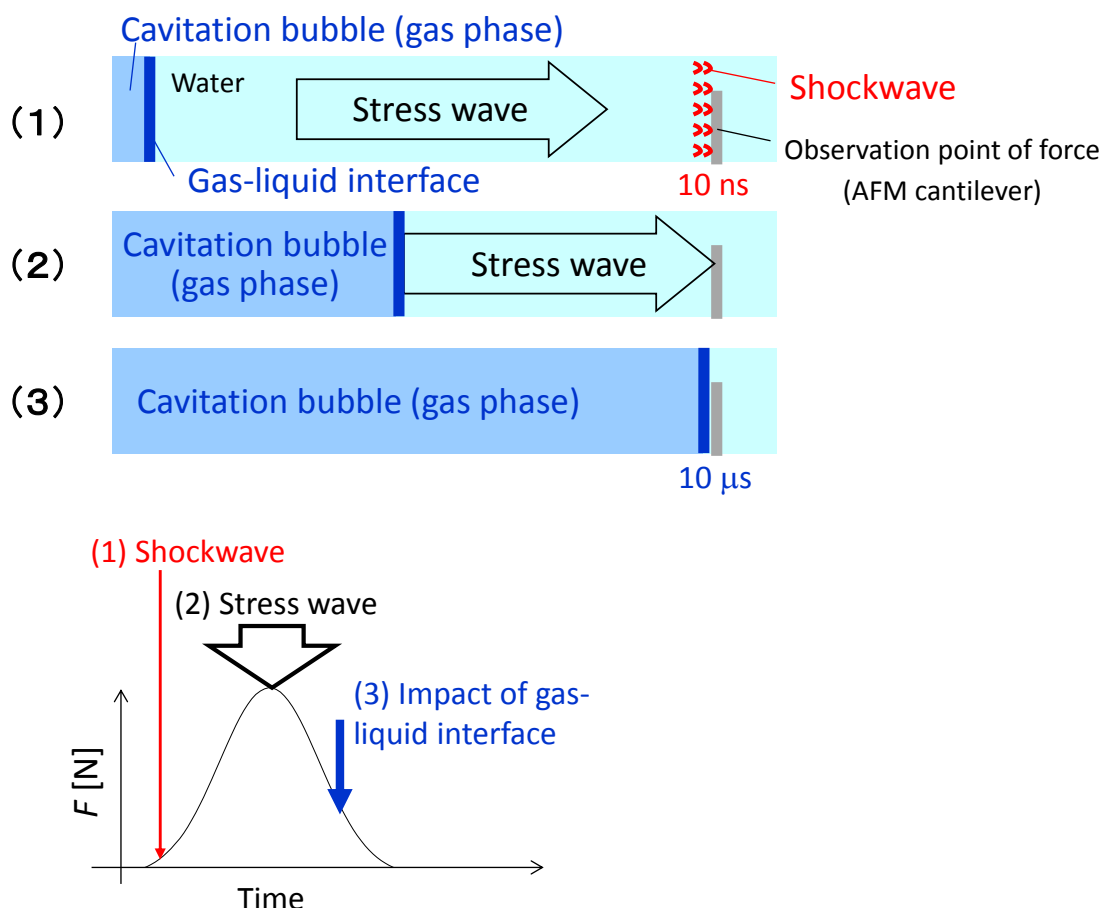


Figure 4-1 One dimensional representation of the femtosecond laser-induced impulsive force.

4-2 キャビテーションバブルとレーザー誘起衝撃力の挙動の比較

4-2-1 キャビテーションバブル最大径のパルスエネルギー依存性

Fig. 4-2 に、上述の対物レンズ・パルスエネルギー下におけるキャビテーションバブルの生成から崩壊までの過程を高速カメラ (250,000 fps, equiv. 4 μ s/frame) により観察した結果の一例を示す。キャビテーションバブルは、60 nJ/pulse の場合にはレーザー集光後 4 μ s 以内に、その他のパルスエネルギーの場合には 4-8 μ s の間に最大径に到達し、最大径はパルスエネルギーと共に増加した。これらの画像からキャビテーションバブルの最大半径を見積もり、その

パルスエネルギー依存性を調べた。結果を Fig. 4-3 (○) に示す。キャビテーションバブルは 50 nJ/pulse をしきい値に発生し、その値は E_{th} とほぼ同じであった。キャビテーションバブル最大半径は、 E_{th} - $2 \times E_{th}$ の間で直線的な増加を示した後、 $2 \times E_{th}$ 以上で飽和に至る傾向を示し、衝撃力 F_0 のパルスエネルギー依存性と良い一致を示した (Fig. 4-3)。

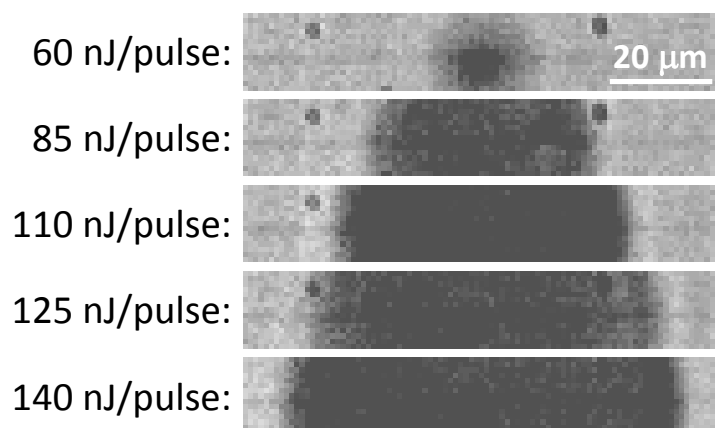


Figure 4-2 High-speed images of the cavitation bubble generated by the laser pulses with the energy of 60, 85, 110, 125, and 140 nJ/pulse .

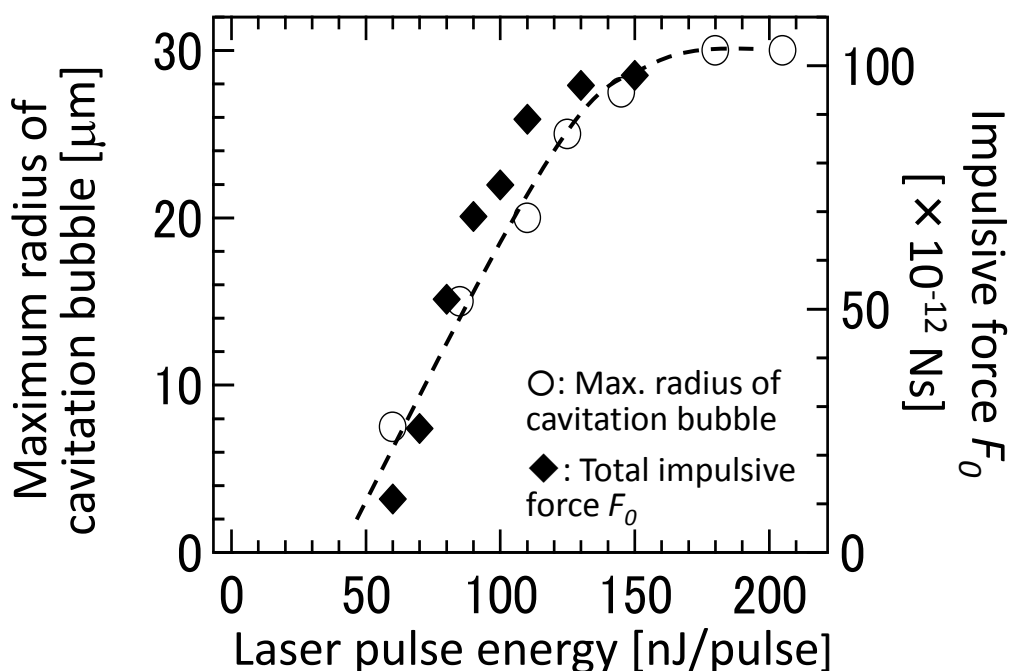


Figure 4-3 Pulse energy dependence of maximum radius of the cavitation bubble (○) and total impulsive force F_0 (◆).

4-2-2 AFM 探針が受ける衝撃力を支配する現象

AFM 探針に衝撃力をもたらすと考えられる主な要因に、衝撃波、応力波、キャビテーションバブルが挙げられる。本章での冒頭でも述べたように、衝撃波が AFM 探針に衝突するまでの時間スケールはレーザー集光後 10 ns 程度と考えられ、AFM 探針に作用する時間が非常に短い。また、AFM 探針の振動周期 (6.5 μs) に比べて非常に速いことから、AFM 探針が受ける衝撃力を支配しているとは考えにくく、Fig. 4-3 の結果は、これを支持するものと考えられる。

衝撃力 F_0 の発生のしきい値とキャビテーションバブルの発生のしきい値が同程度であり、両者の間に相関性がみられたことからレーザー誘起衝撃力の形成にキャビテーションバブルが大きく寄与することが示唆された。先の述べたように、レーザー誘起衝撃力の形成には、応力波とキャビテーションバブルの寄与が高いと推測されるため、ここで、AFM 探針に付加される応力波とキャビテーションバブルの関係を簡単のために 1 次元モデルにより考える (Fig. 4-4)。キャビテーションバブルの界面をピストンとして考えると、キャビテーションバブルの拡大はピストンを押し込むことに相当し、キャビテーションバブルの半径はピストンを押し込んだ距離とみなすことができる。さらに、ピストンを押し込む速度と AFM 探針に単位時間あたりにかかる力が一定であると仮定すると、ピストンの押し込み距離とピストンを押し込む時間は比例し、AFM 探針が受ける力積 (衝撃力) はピストンの押し込み距離、即ち、キャビテーションバブルの最大半径に比例することになり、衝撃力 F_0 とキャビテーションバブル半径の相関性を説明することができる。また、Fig. 4.5 に示したように、キャビテーションバブルが直接 AFM 探針に接触しない場合でも F_{AFM} を支障なく定量評価できたことから、AFM 探針が受ける衝撃力は、キャビテーションバブルそのものではなく、キャビテーションバブルの生成に伴って生じる応力波により支配されていると考えられる。

キャビテーションバブル最大径に到達する時間がレーザー集光後 4-8 μs であることから、応力波が AFM 探針に付加される時間スケールも 4-8 μs であると考えられる。この時間スケールは、AFM 探針の振動周期 (6.5 μs) と同程度であることから、キャビテーションバブルの生成に伴って生じる応力波が AFM 探針の振動を支配していると考えられる。

3 章で述べた最初の振幅よりも次の振幅の方が大きくなったのも、応力により AFM 探針が 4-8 μs の間加振されたことがその主な要因と考えられる。こうした条件下において、 F_0 とキャビテーションバブルの最大径の挙動が同調するのは妥当であり、3 章で述べた定量化手法が妥当になされたことを示す。また、衝撃力のオーダーである 10^{-12} Ns は $\mu\text{s} \times \mu\text{N}$ と解釈でき、レーザートラッピングで付加される力 (pN) [4] の 10^6 倍程度であることが示唆された。

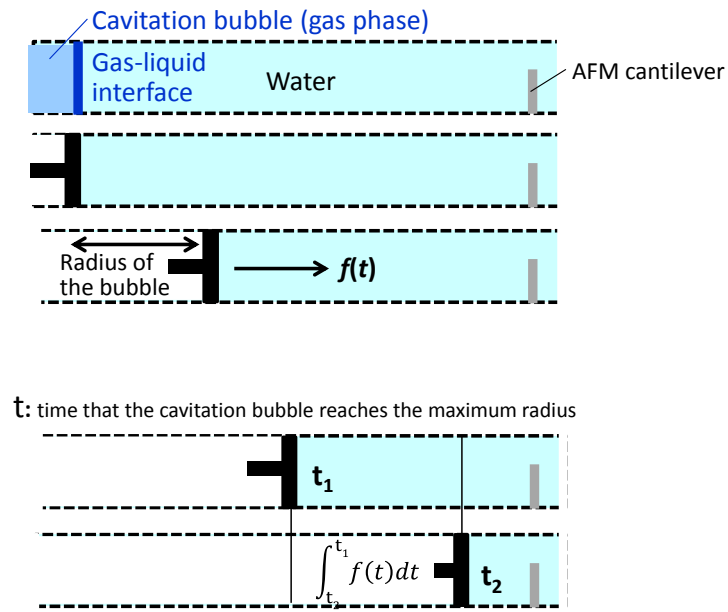


Figure 4-4 One dimension model for considering a relation among the laser-induced impulsive force and the stress wave, and the cavitation bubble.

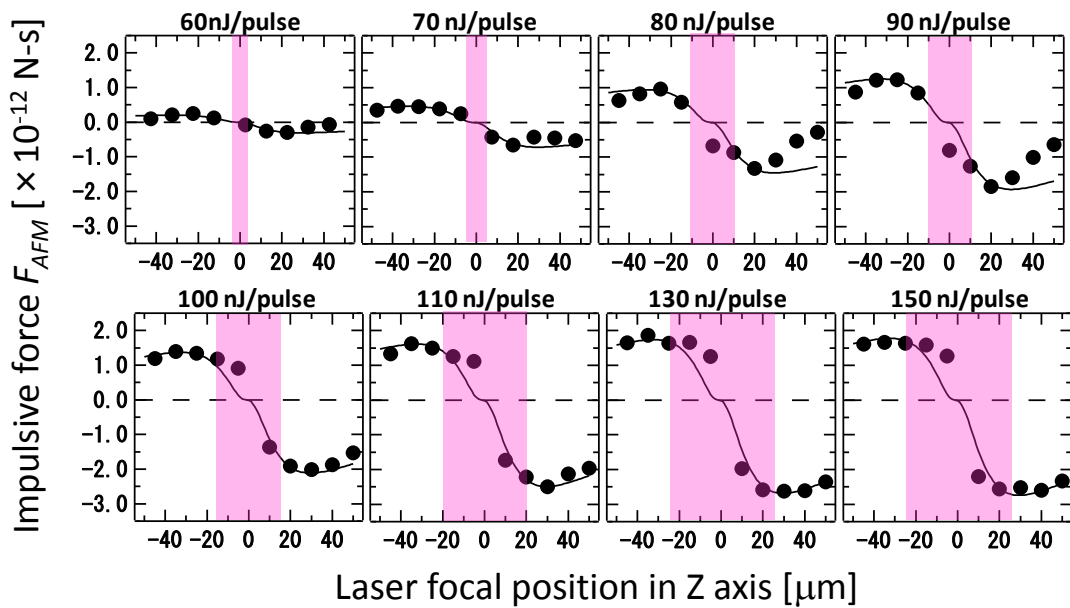


Figure 4-5 Z position dependence of F_{AFM} indicated with the region in which the cavitation bubble could directly contact the cantilever. Pink colored area in each graph means the region. These graphs show that the cantilever oscillated by the impulsive force in a case that the cavitation bubble did not contact the cantilever.

また、一般にフェムト秒レーザーが誘起する現象には非線形性が強く表れると考えられており、キャビテーションバブル最大径のパルスエネルギーに対する直線性は興味深い。キャビテーションバブルは多光子吸収により電子励起された水の緩和過程で発生すると考えられており、その発生は多光子吸収の支配を受けると推測された。水のバンドギャップに対応するエネルギーは約 6.2 eV であるのに対し、近赤外の光子のエネルギーは約 1.5 eV であるので、近赤外のフェムト秒レーザーにより水を電子励起するには4つ以上の光子が必要となる。1光子の存在確率を I とすると、4光子が同時に存在する確率 I^4 と記述でき、その存在確率はパルスエネルギーに対して強い非線形性を示すことから、キャビテーションバブル最大径もパルスエネルギーに対して非線形的な挙動を示すと推察された。しかし、実際にはバブル最大径は直線的増加を示した。仮に、多光子吸収により吸収されたエネルギーの内のある一定の割合のエネルギーがバブル発生の駆動力になっているとすれば、バブルはパルスエネルギーの増加に対して非線形な挙動を示すはずであり、上述の直線的増加を説明することはできない。

一方で、パルスエネルギーが非常に高い場合には、多光子吸収の非線形性が飽和することが知られている[5]。この現象は、集光点において多光子励起された分子が大勢を占め、高次の励起状態間での一光子吸収と緩和の早い繰り返しが支配的になる結果と説明されている[6]。このような状態では、水が吸収するエネルギーは集光照射されたパルスエネルギーと同程度になると考えられる。本実験で得た結果は、約 50 nJ/pulse のパルスエネルギーで上述の状態が生成されたと考えることができ、 E_{th} ・ $2 \times E_{th}$ におけるバブル最大径の直線的増加は水の励起状態吸収により説明されると推察される。 $2 \times E_{th}$ 以上でみられた衝撃力の飽和傾向は、この一光子吸収も飽和し、他の非線形効果が強く現れた結果と思われる。

4-3 接着解離実験方法の妥当性検討

細胞間の接着を定量化するには、接着の解離に要するミニマムな衝撃力を求める必要がある。その為の方法として、標的の十分遠方から標的に向かってレーザー集光点を漸近的に近づけ、標的が基板から解離した時の標的とレーザー集光点間の距離の関数として標的に付加された衝撃力を見積もる方法が挙げられる (Fig. 4-7(b))。しかし、この方法では標的に対して衝撃力を複数回付加することになる。本項では、疑似細胞系を用い、衝撃力の積算の効果の有無を調べた。

4-3-1 実験手法

衝撃力の積算の効果を評価するには、試料間の個体差がより小さい方が望ましい。そこで、細胞よりも個体差が小さいと考えられる疑似細胞系を用いた。疑似細胞系をインキュベーター内に配置した。レーザーアブレーションによるビオチン修飾基板からの反跳を避けるため、レーザーの集光位置を対物レンズ (20x, NA=0.40) の像面から光軸 (Z) 方向に 20 μm 下げた状態でフェムト秒パルス (110 nJ/pulse) を PBS 中に集光照射し、衝撃力を微小球に付加した (Fig. 4-6)。本実験では、次の 2 通りの方法で衝撃力を微小球に対して付加した。

1) 複数の微小球が存在する場所にレーザーを 1 回だけ集光照射し、衝撃力を 1 回だけ複数の微小球に付加した。これを複数個所で行い、約 300 個の微小球について衝撃力を 1 回だけ付加した後の挙動を調べた。実験後、画像抽出プログラムにより取得した画像を用い、微小球を「解離した微小球」と「解離しなかった微小球」に分類した。分類した全ての微小球に対してレーザー集光点-微小球間の距離を測定し、各距離における微小球の解離確率を調べ、その距離依存性を明らかにした (Fig. 4-7(a))。

2) 標的の遠方から標的に向かってレーザー集光点を漸近的に近づけ、標的が基板から解離した時の標的とレーザー集光点間の距離を測定した。この評価を微小球 1 個毎に、約 200 個の微小球に対して行った。微小球の解離は画像抽出プログラムにより判断し、同プログラムにより保存した写真データから距離を測定した。測定結果は、距離のヒストグラムとしてまとめた (Fig. 4-7(b))。

細胞培養系を用いた場合であっても疑似細胞のように計測に適した試料を大量に用意できれば、衝撃力を 1 回だけ付加した時の解離の確率分布に基づいて細胞間接着を定量化でき、1 細胞に複数の衝撃力を付加する必要はなくなる。しかし、実際の細胞培養系を用いた場合には多数の適切な試料を確保するのが困難であることも十分に想定され、計測に適した試料の接着を確実に定量化する必要が生じることが予測された。この点を考慮し、本研究では 2) の方法により細胞間の接着を定量化しようとした。

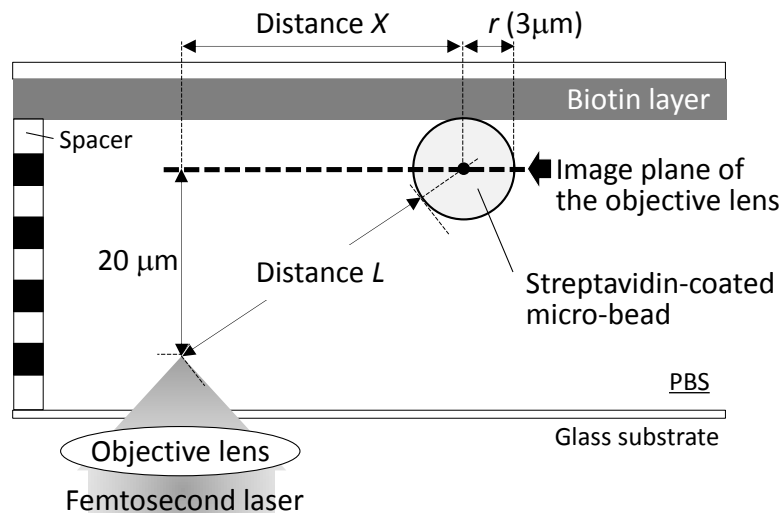


Figure 4-6 Spatial relationship between the laser focal point and the streptavidin-coated micro bead.

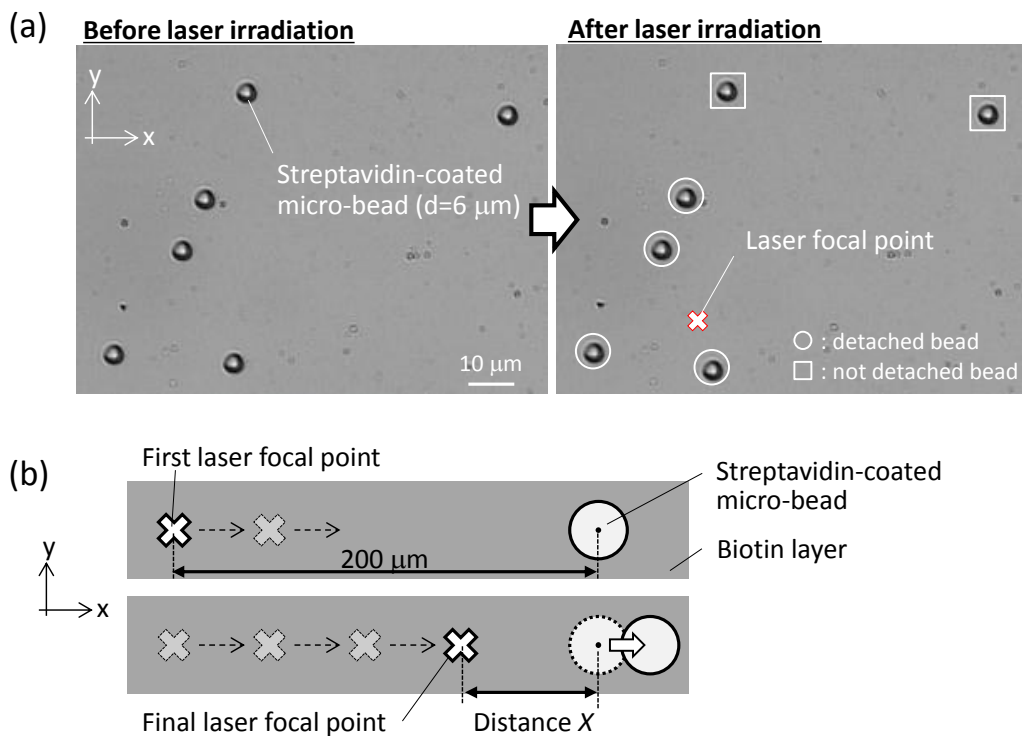


Figure 4-7 (a) and (b) are experimental procedures to confirm the effect of accumulation of the impulsive forces.

4-3-2 各手法による実験結果の比較

Fig. 4-8 (■) に1回の衝撃力の付加により調べた微小球の解離確率の距離依存性を示す。距離 X が $20\ \mu\text{m}$ 未満の場合、微小球はほぼ100%の確率で解離した。解離確率は、距離 X が約 $20\ \mu\text{m}$ を超えると解離確率は徐々に低下し始め、 $55\ \mu\text{m}$ 以降ではほぼ0%になった。Fig. 4-8 に示したヒストグラムは集光位置を漸近的に標的に近づけた場合の解離時の距離 X のヒストグラムである。ヒストグラムはガウス関数で近似でき、その中央値は $36\ \mu\text{m}$ であった。

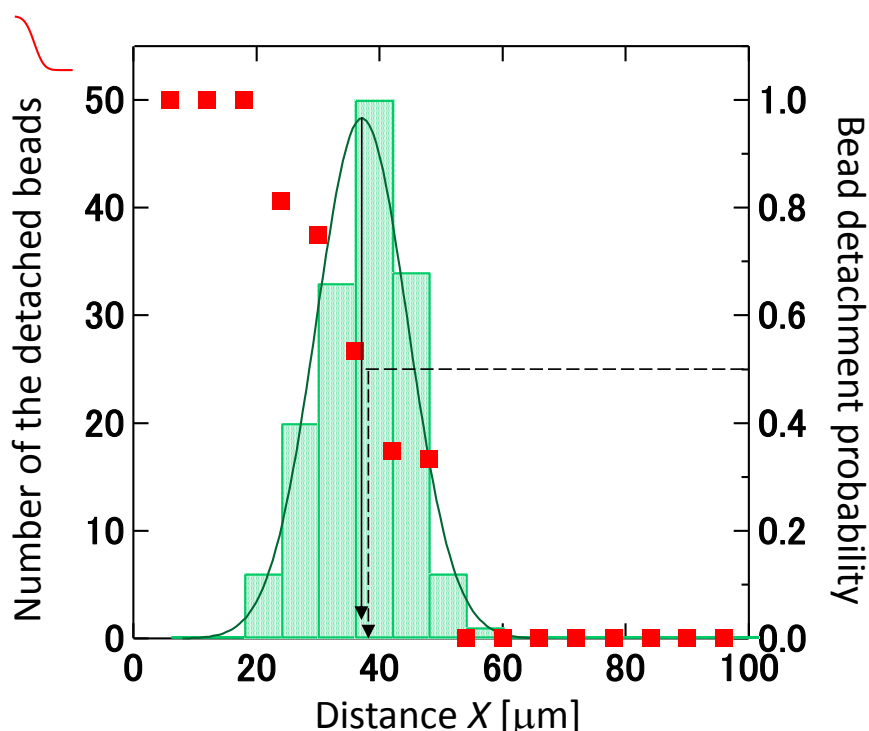


Figure 4-8 Histogram is the result by the procedure (b) depicted in Fig.4-7. The red squares show distance X dependence of the probability of the beads detachment estimated by the procedure (a) in Fig.4-7.

4-3-3 レーザー誘起衝撃力の積算の効果についての考察

仮に、衝撃力の積算の効果が無視できるとすると、中央値は半値に相当することから、1) の解離の確率分布において解離確率 50%を示す距離と一致するはずである。Fig. 4-8 に示したように、両者の距離は非常に良い一致を示しており、衝撃力を複数回付加した場合においても、細胞の解離にクリティカルであるのは最後に付加した衝撃力であると考えられ、衝撃力の積算の効果は無視できる程度であることが示唆された。

衝撃力の付加時間は大きく見積もっても $10\ \mu\text{s}$ 以下と考えられる。その時間スケールでは、接着分子や細胞の変形が起こる前に解離に至ると考えられ、接着分子や細胞を剛体に近似できると考えられ、接着の解離が接着部位の脆性破壊により誘導された推測される。一般に、脆性破壊は応力集中点での破壊を契機に一気に進行すると考えられている[7]。従って、応力集中点の破壊が起こるしきい値未満の衝撃力が数回付加されても解離に至る可能性は低いと推測できる。その為、衝撃力の積算の効果が無視できる程度であったと考えられる。

4-4 細胞とレーザー誘起衝撃力の相互作用

4-4-1 細胞が受けるレーザー誘起衝撃力の検証

レーザー集光点を標的に漸近的に近づけ、衝撃力により疑似細胞を基板から解離させた時の距離 L (Fig. 4-6) のパルスエネルギー依存性を Fig. 4-9 に示す。20倍対物レンズを使用し、パルスエネルギーは $110\text{--}310\ \text{nJ/pulse}$ に調整した。距離 L は、パルスエネルギーと共に長くなる傾向を示し、その分布はガウス関数として近似可能であった。距離 L の平均値を求め、距離 L のパルスエネルギー依存性を見積った。その結果をキャビテーションバブル最大半径のパルスエネルギー依存性とともにより Fig. 4-10 に示した。どのパルスエネルギーにおいても、距離 L はキャビテーションバブル最大半径よりも長かった。

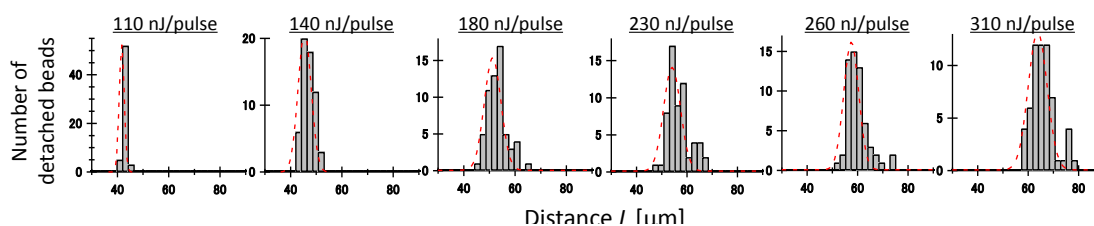


Figure 4-9 Pulse energy dependence of distance L when the streptavidin-coated micro bead was detached from the biotin-coated substrate. The red broken line is the fitted result by Gaussian function.

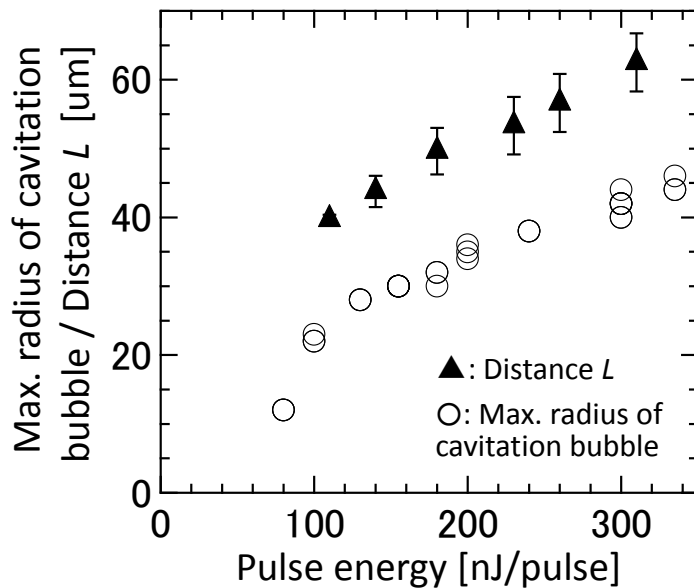


Figure 4-10 Pulse energy dependence of distance L (▲) and maximum radius of the cavitation bubble (○). This graph indicates that the micro beads were detached from the substrate without direct contact of the cavitation bubble.

4-4-2 細胞が受ける衝撃力を支配する現象

微小球と基板間の接着が一定であるとする、パルスエネルギーの増加に伴い発生する衝撃力は大きくなる。従って、距離 L がパルスエネルギーと共に長くなることは妥当であり、測定が妥当に行われたことが示唆された。各パルスエネルギーにおける距離 L とキャビテーションバブル最大半径との比較から、どのパルスエネルギーにおいても、微小球の解離はキャビテーションバブルが微小球に直接接触せずに誘導されたことが示された。また、Fig. 4-10 に示すように、距離 L とキャビテーションバブル最大径のパルスエネルギー依存性には相関性がみられた。これは、微小球に付加された衝撃力（力積）はキャビテーションバブルの最大径により規定されることを示唆し、キャビテーションバブルの発生に伴い生じる応力波により微小球の解離が誘導されたと考えられる。

これにより、AFM 探針が受ける衝撃力と同様、微小球の解離がキャビテーションバブルに起因する応力波により支配されていることが示された。また、AFM 探針振動の挙動とキャビテーションバブルのライフタイムを考慮すると、応力波の付加時間は $< 10 \mu\text{s}$ であると見積もられる。この時間スケールでは、細胞の変形が無視できると考えられ、AFM 探針や微小球同様、剛体的な振る舞いを示すと考えられる。これらは、AFM を利用した衝撃力の定量化手法を細胞間接着の定量化に適用することがリーズナブルであることを示唆する。

4-5 レーザー誘起衝撃力の付加が生細胞に及ぼす効果

ゼブラフィッシュ胚の表層近傍にフェムト秒レーザーを集光照射し、レーザー誘起衝撃力が生細胞に及ぼす効果を検証した。細胞膜が損傷すれば、細胞外にある物質が細胞内に入り込むという推察の下、ゼブラフィッシュ胚の周囲を蛍光分子で満たした状態でレーザーを集光照射し、集光点近傍の細胞のその後の様子を観察した。

4-5-1 レーザー集光後に細胞に観察された変化

受精後 25-26 時間 (25-26 hpf, hpf: hours post-fertilization) 及び 30 時間 (30 hpf) のゼブラフィッシュ胚に麻酔をかけ、その漿膜腔をデキストラン (Mini-ruby dextran, FITC dextran) で満たした (Fig. 4-12(a))。その直後に 10 倍対物レンズ (NA=0.25) を用いてフェムト秒レーザー (200, 400, 800 nJ/pulse) を胚の表層近傍に集光照射した (Fig. 4-12(b))。レーザー集光照射後すぐに、集光点近傍の様子を蛍光顕微鏡により観察した。この実験を各パルスエネルギーにおいて 10-15 程度の 25-26 及び 30 hpf の胚に対して行った。その結果、集光点近傍の細胞の様子は主に次の 3 つに分類できた。1) 顕著な変化が観察されなかった、2) 細胞の核内にまでデキストランが導入された (Fig. 4-13(a))、3) 表層の細胞が飛び散った。飛び散った細胞にデキストランが導入されていたこともあったが、その場合には 3) として扱った。飛散した細胞も含めてデキストランが導入された細胞は、その後、分裂し (Fig. 4-13 (b))、正常な発生過程を辿る様子が観察できた。Fig. 4-14 に Mini ruby デキストランを用いた際の①~③の割合のパルスエネルギー依存性を示す。

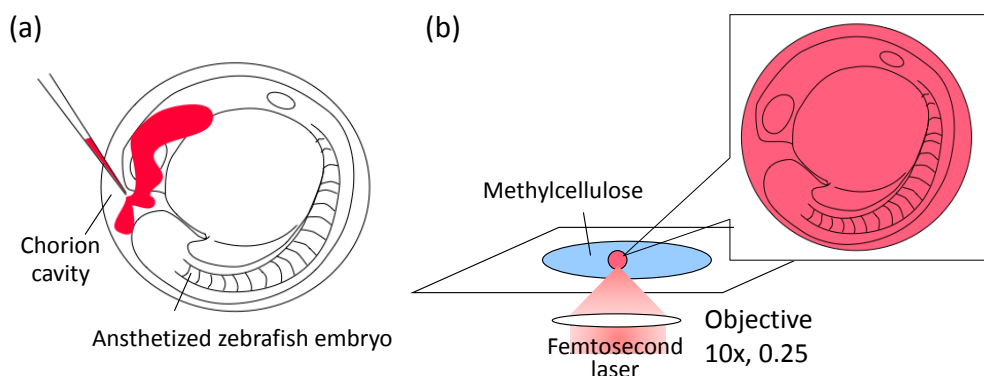


Figure 4-12 Schematic representation of evaluation of the physical effect of the impulsive force on the cell. (a) FITC-dextran, or mini-ruby dextran was injected into chorion cavity of anesthetized embryos mounted in methylcellulose solution. (b) The laser pulse was focused near the cell at the surface of the embryo.

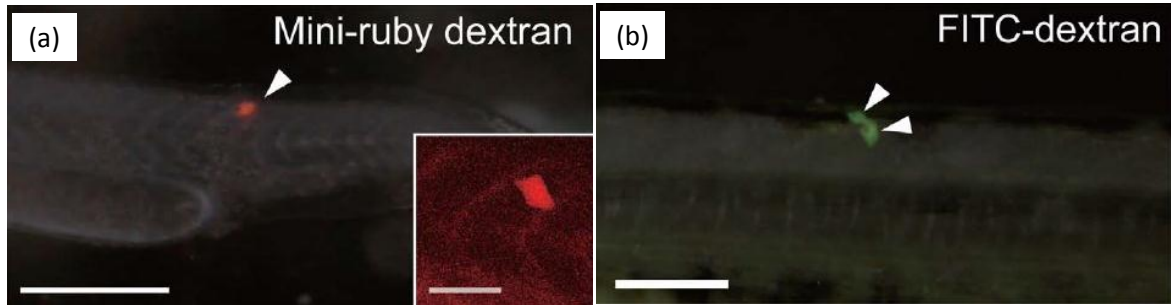


Figure 4-13 (a) Microphotograph of the introduction of the mini-ruby dextran into a single cell. (b) Microphotograph to indicate the division of the cell, which was introduced FITC dextran. Scale bars are 250 μm (a) and 100 μm (b).

1) 25-26 hps 胚

パルスエネルギーが 200 nJ/pulse の場合には、ほとんどの胚で細胞に顕著な変化は観察されなかった。400 nJ/pulse では、約 70 %の胚で Mini-ruby dextran が導入された細胞が観察され、約 20 %の胚で細胞が飛び散る様子が観察された。800 nJ/pulse では、全ての胚において、集光点近傍の細胞が周囲に飛び散った。

2) 30 hps 胚

25-26 hps 同様、200 nJ/pulse の場合には、ほとんどの胚で細胞に顕著な変化は観察されなかった。400 nJ/pulse では、Mini-ruby dextran が導入された細胞が観察されたが、その割合は 35 %程度であり、25-26 hps 胚の半分程度であった。細胞の飛散は、同程度の割合で観察された (約 20 %)。800 nJ/pulse では、細胞の飛散が観察された割合が 10 %未満であり、25-26 hps 胚に比べて大きく低下した。その代わりに、25-26 hps 胚では観察されなかった Mini-ruby dextran が導入された細胞が 50 %程度の割合で観察された。

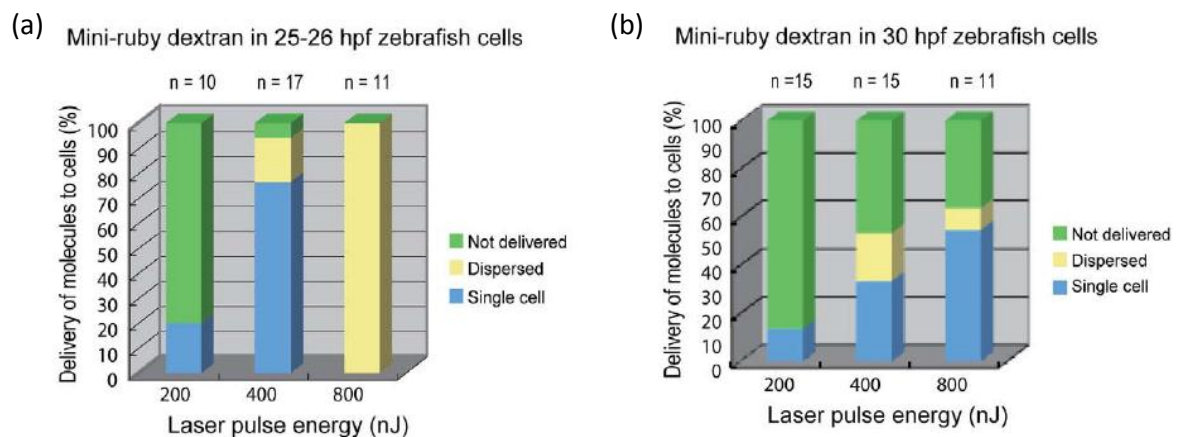


Figure 4-14 Pulse energy dependence of the event observed in the cell after the laser irradiation.

4-5-2 レーザー誘起衝撃力の付加が生細胞に及ぼす効果とその応用

デキストランは、10,000 Da の巨大な分子であり、細胞内輸送により細胞内に取り込まれる可能性は極めて低いと考えられ、細胞近傍へのレーザーの集光照射により細胞内へのデキストランの導入が引き起こされたといえる。ここで、レーザーは胚表層の近傍に集光照射したことから、レーザーが細胞に直接照射された可能性は低いと考えられ、デキストランの導入にはレーザー誘起衝撃力が大きく寄与したと考えられる。デキストラン導入のメカニズムとして次の2つが推測される。① 力学的作用 (=衝撃力) により細胞膜に微細な物理的損傷が生じ、その間隙からデキストランが入り込んだ、② 衝撃力によって集光点からその周囲に向かって加速されたデキストランが細胞膜に衝突し、細胞膜を破って細胞内部へ入り込んだ。①、②のいずれか、あるいは両方によりデキストランが細胞内・核内に導入されたと考えられる。

また、細胞が飛び散った場合でも、細胞が潰れた様子は観察されず、飛散後も細胞分裂が観察された。よって、細胞の飛散は、レーザー誘起衝撃力により細胞が潰されて組織から抜け出たのではなく、レーザー誘起衝撃力により細胞が生きたまま解離した結果であると考えられる。細胞の解離にはデキストランの導入よりも高いパルスエネルギーが必要であったが、デキストランが導入された細胞 (飛散した細胞も含む) でも、その後、細胞分裂する様子が観察されたことから、胚中の細胞近傍にフェムト秒レーザーを集光照射してレーザー誘起衝撃力を付加しても細胞の生命活動に支障をきたさないことが示唆された。

細胞の飛散は、受精後の時間が経過するほど起こりにくくなる傾向が見られた。一般に、発生が進むにつれて細胞間の接着は強固になっていくと考えられ

ており、30 hps 胚における細胞飛散の割合の低下は、細胞間の接着力の増加によりもたらされたと考えられる。これは、接着力が増大すれば細胞の解離に要するレーザー誘起衝撃力も増加させる必要があることを示しており、レーザー誘起衝撃力により実際の細胞間の接着力の定量化が可能であり、それを動物胚にも適用できることが示唆された。

本実験では、レーザー誘起衝撃力によりゼブラフィッシュ胚だけではなく、鶏胚、マウス胚、サメ胚にも細胞外物質が1細胞レベルで細胞内に導入された。これは、本研究の主旨とは異なるが、レーザー誘起衝撃力による細胞外物質の導入技術とみなすことができる。

生物学において、細胞外物質の導入にはエレクトロポレーション (Electroporation) と呼ばれる手法がよく用いられる。この手法では、細い金属針を動物胚に近づけ、電場を印可することで細胞外物質を導入するが、1細胞レベルの精度で導入を行うことは困難であった。近年では、高い繰り返し周波数 (50 MHz) で低エネルギー (<1 nJ/pulse) のフェムト秒レーザーを培養細胞に集光照射することで細胞外物質を特定の細胞に導入するフォトポレーション (Photoporation) と呼ばれる方法も活用されている [8-10]。この手法を用いれば、選択的に特定細胞に細胞外物質を導入できるものの、動物初期胚のような、厚くて透明度の低い試料においては導入が難しかった。

本実験の結果は、レーザー誘起衝撃力を用いれば遺伝物質などを動物胚中の任意の1細胞に導入し、その機能を時間・空間的に制御できる可能性を示唆しており、発生や再生についての理解を促進する技術になり得ると期待される。また、接着力の定量化と組み合わせることで、生命現象と接着の力学機構を直接関連付けることも可能になると考えられ、今後の開発が期待される。

4-6 まとめ

本章では、レーザー誘起衝撃力及びキャビテーションバブル最大径のパルスエネルギー依存性を明らかにした。両者は良く一致し、AFM 探針の振動周期 (6.5 μ s) とキャビテーションバブルが最大径に到達するまでの時間 (4-8 μ s) が同程度であったことから、AFM 探針が受ける衝撃力へのキャビテーションバブルの寄与が高いことが示された。さらに、AFM 探針にキャビテーションバブルが接触しない場合でも定量化に支障のない振動挙動が確認されたこと、バブルの生成と崩壊に伴って応力波が伝搬することが報告されていることから、AFM 探針が受ける衝撃力はキャビテーションバブルの発生に伴って生じる応力波により支配されていることが示唆された。

想定された細胞間接着の定量化手法の妥当性を確認した。この手法では、接

着を解離させるミニマムな衝撃力を見積もるまでに、標的に対して衝撃力が数回付加されることになる。この積算の効果を細胞よりも個体差が小さいと考えられる疑似細胞を用いて評価した。その結果、本手法では、接着の解離における衝撃力の積算の効果が無視できる程度であったことが実験的に示され、細胞間接着の定量化手法の妥当性が示唆された。

AFM を利用した定量化手法の細胞間接着の定量化への応用の妥当性を調べた。接着の定量化に適用する手法を用いて、基板から疑似細胞を解離させ、その時の疑似細胞-レーザー集光点間距離のパルスエネルギー依存性を調べ、キャビテーションバブル最大径と比較した。その結果、どのパルスエネルギーにおいても、疑似細胞の解離はキャビテーションバブルが疑似細胞に接触しない距離で起こったことが明らかになった。これにより、疑似細胞が受ける衝撃力もキャビテーションバブルに起因する応力波により支配されていることが示唆され、細胞間接着の定量化に AFM による衝撃力の定量化手法を応用することの妥当性が示された。

レーザー誘起衝撃力の付加が細胞に与える効果を調べた。ゼブラフィッシュ胚の周囲を蛍光分子で満たした。レーザー集光後、細胞膜が損傷した場合、その蛍光分子が細胞内に入り込むと考えた。胚の表層近傍にレーザーを集光照射し、その直後の細胞の様子を観察した。その結果は、顕著な変化がない場合、集光点近傍の細胞に蛍光分子が導入された場合、集光点近傍の細胞が飛び散った場合の3つに分類できた。レーザー集光後、蛍光分子が導入された細胞と飛散した細胞は、分裂して増殖し、死に至ることはなかった。このことから、レーザー誘起衝撃力を胚中の細胞に付加しても、その生命活動に支障が出ないことが示唆された。また、同じパルスエネルギーのレーザーを集光照射した場合でも細胞は受精後の経過時間が長くなるほど飛散しにくくなる傾向が示された。一般に、受精後の時間が経過するほど接着は強固になると考えられており、上述の傾向は接着の強固さの増大によりもたらされたといえる。同時に、接着が強固になった場合には、解離に要する衝撃力を増加させる必要を示しており、解離に要した衝撃力により細胞間接着を定量化できることが強く示唆された。

参考文献

- [1] A. Vogel, J. Noack, G. Hüttman, and G. Paltauf, *Appl. Phys. B* **81** (2005) 1015.
- [2] A. Vogel and V. Venugopalan, *Chem. Rev.*, **103** (2003), 577.
- [3] A. Vogel, N. Linz, S. Freidank, and G. Paltauf, *Phys. Rev. Lett.*, **100** (2008) 038102.
- [4] J. Noack and A. Vogel, *IEEE J. Quantum Electron.* 35, 1156 (1999).
- [5] H. Fukumura and H. Masuhara, *Chem. Phys. Lett.* 221, 373 (1993).
- [6] 例えば、破壊と材料 第6版, 日本材料科学会編, 裳華房 (1995)
- [7] U.K. Tirlapur, and K. König, *Nat.*, **418** (2001) 290.
- [8] K. Uchugonova, K. König, R. Bueckle, A. Isemann, and G. Tempea, *Opt. Express*, **16** (2008) 9357.
- [9] Y. Hosokawa, S. Iguchi, R. Yasukuni, Y. Hiraki, C. Shukunami, and H. Msuhara, *Appl. Surf. Sci.*, **255** (2009) 9880.

第5章 レーザー誘起衝撃力による神経-マスト細胞間の接着の定量化

生物学におけるレーザー誘起衝撃力の有用性・新規性を示すためには、組織構築に基づく細胞間接着力の空間依存性や生理作用の時間的变化に伴って細胞間接着力がどのように変化するかを明らかにすることが重要となる。

本章では、接着力評価のモデル系に神経-マスト細胞共生培養系を用い、接着を介した神経とマスト細胞間の生理作用が変動すると予測される時間オーダーで神経とマスト細胞間の接着力を調べ、その時間変化を明らかにすることを試みた。まずは、神経とマスト細胞の相互作用について概説し、接着力の時間変化を調べる意義を述べた。そのうえで、神経とマスト細胞の接着を定量化する手法について示し、その手法により両者間の接着力の時間推移を調べた結果について述べた。

5-1 神経とマスト細胞の相互作用

マスト細胞は免疫に関与する細胞であり、呼吸器や消化管の粘膜、真皮、硬膜、大脳などの様々な組織で神経突起の近傍に存在する[1-9]。マスト細胞の神経突起への接着は神経原性炎症（過敏性腸炎、喘息、脱毛症など）の発症時に観察され、接着を介した両者の相互作用が病態形成に寄与すると考えられている[10-12]。生体内でマスト細胞が神経突起に接着した時の解剖学的な位置関係を再現した系が神経-マスト共生培養系である。この系を用いた研究により、両者が接着を介して相互に情報伝達することが示されており (Fig. 5-1) [13-15]、情報伝達の強度と病状の強弱との間に相関性があると考えられている。

神経とマスト細胞間の情報伝達は、神経を薬剤により刺激し、その後の神経とマスト細胞の細胞内カルシウム濃度の時間変化を蛍光カルシウム指示薬によりモニターすることで評価されている[16]。しかし、細胞内のカルシウム濃度変化は細胞試料間の個体差が大きく、神経とマスト細胞間の情報伝達の有無を評価することはできるものの、濃度変化に基づいて情報伝達の強度を定量的に評価し、細胞対ごとのばらつきを体系的に調べることは極めて難しい。

Fig. 5-1 に示したように、神経とマスト細胞間の情報伝達は化学メディエーターなどが担っているため、その強度は化学メディエーターなどの濃度や拡散、それらのレセプターの密度などにより議論されると考えられる。一方で、経験的知見ではあるが、「共生培養時間が長いほど情報伝達が起こりやすくなる」、「接着が強固になる」ともいわれており、時間経過と共に接着による神経とマスト細胞間の空間の局在化、接着分子の周囲へのレセプターの集積が進むといった効果が生じ、情報伝達が促進されると推測される。両者の接着力は接着が

情報伝達にもたらす効果の指標になると考えられ、接着力を指標として情報伝達の強度を定量的に評価することができるようになると考えられる。

加えて、神経とマスト細胞間の接着分子は同定されており、Cell Adhesion Molecule-1 (CADM1)と名付けられている[17]。CADM1は遺伝子的に操作することが可能であり、蛍光標識することで細胞内挙動を調べることができる。よって、接着力を定量化し、接着分子の細胞内挙動と照らし合わせることで接着の力学機構と分子的機構を統合的に捉え、その分子機構に基づいて情報伝達を定量的に捉えることができるようになると考えられる。

そこで、神経とマスト細胞の接着力を定量化し、接着を介した神経とマスト細胞間の生理作用（情報伝達）が変動すると予測される時間オーダーで神経とマスト細胞間の接着力の時間変化を調べ、本手法の生命科学における有用性と新規性を示した。

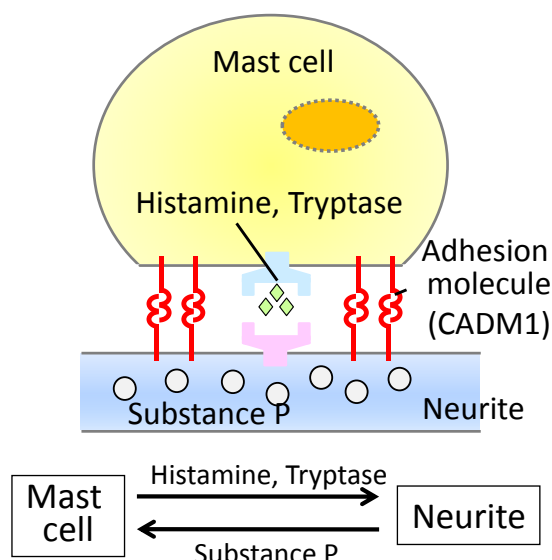


Figure 5-1 Communication between the neurite and the mast cell.

5-2 神経-マスト細胞間の接着力の定量化

マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) を神経と7時間共生培養し、神経-共生培養系を作製した。10倍の対物レンズ (NA=0.25) を用いてフェムト秒レーザー (700 nJ/pulse) を培地中に集光照射し、4章の第2節で述べた方法により、神経突起に接着したマスト細胞を解離させた (Fig. 5-2)。マスト細胞が解離した時のレーザー集光点とマスト細胞間の距離 X (Fig. 5-2 及び Fig. 5-3) を測定し、レーザー集光点とマスト細胞の位置関係に基づいて作成した幾何学モデル (Fig. 5-3) を用い、解離時にマスト細胞に付加された衝撃力を計算した。計算には、以下に示した Eq. (7) を用いた。尚、神経突起に接着したマスト細胞

の SEM 画像 (Fig. 5-4) [13]から、mast 細胞は神経突起にのみ接着し、培養基板には接着していないとみなした。

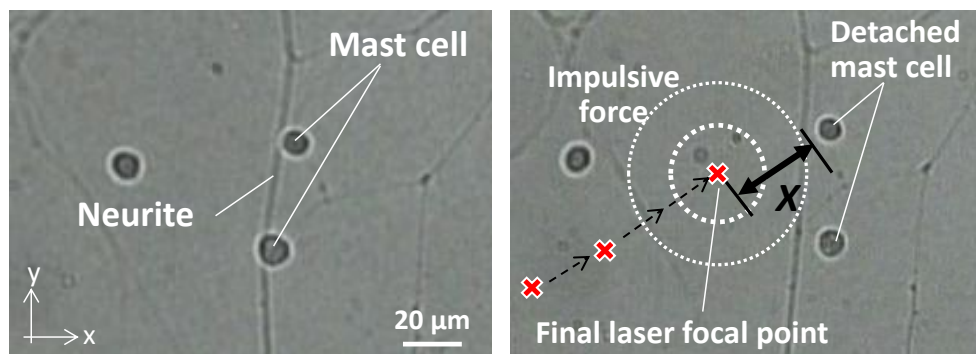


Figure 5-2 Experimental procedure to estimate the minimum impulsive force to detach the adhesion between the mast cell and the neurite.

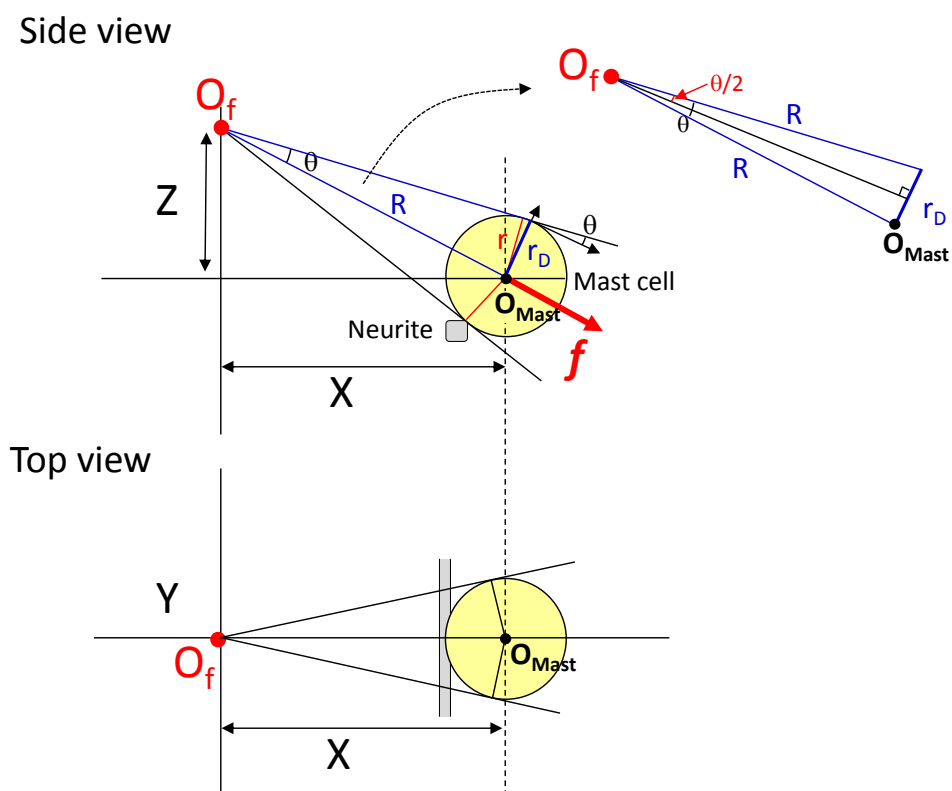


Figure 5-3 Geometric model constructed on the basis of spatial relationship between the laser focal point O_f and the mast cell.

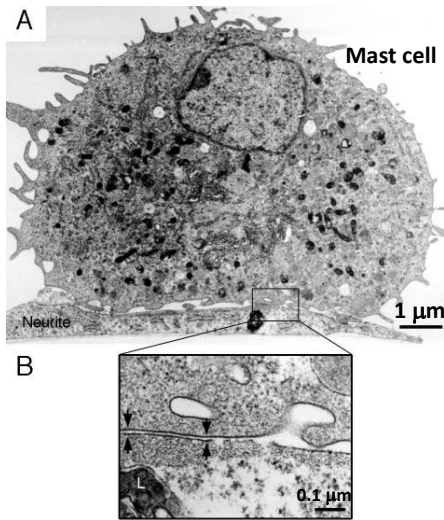


Figure 5-4 SEM image of the mast cell adhering to neurite of superior cervical ganglion neuron.

レーザー集光点で発生した衝撃力 F_0 が波束として球状に伝搬してマスト細胞に衝突すると、マスト細胞に付加された衝撃力は、**Fig. 5-3** 中のベクトルで示したように、 O_f から O_{Mast} に向かって進む。この進行方向に対して垂直な方向にかかる衝撃力は、マスト細胞の対称性のために打ち消しあう。従って、マスト細胞に付加された衝撃力は **Eq. (1)** で表される。

$$f = F_0 \cdot \frac{\int_0^{r_D} 2\pi r'_D \cos\theta' dr'_D}{4\pi R^2} \quad (1)$$

ここで、 r'_D は

$$r'_D = 2R \sin \frac{\theta'}{2} \quad (2)$$

さらに、

$$r_D = 2R \sin \frac{\theta}{2} \quad (3)$$

Eq. (2), (3) より

$$f = \frac{F_0}{4} \cdot \sin^2 \theta \quad (4)$$

さらに、

$$\sin\theta = \frac{r}{R} \quad (5)$$

$$R^2 = X^2 + Z^2 \quad (6)$$

これを考慮に入れると、衝撃力は Eq. (7) で表せる (以上、[7]を参考にした)。

$$f = F_0 \frac{r^2}{4(X^2+Z^2)} \quad (7)$$

AFM を利用した実験により、本実験で用いた衝撃力 F_0 は 300×10^{-12} Ns と定量化され、マスト細胞の半径は $5 \mu\text{m}$ であった。また、90 分間の測定で約 150 個のマスト細胞の接着力を調べることができた。Eq.(7)により求めた接着力は、ヒストグラムとしてまとめた (Fig. 5-5)。細胞毎にばらつきはあったものの、神経-マスト細胞間の接着力は $0.4 - 2 \times 10^{-12}$ Ns であった。

序論で述べた、Single cell force spectroscopy により「力」として定量化された接着力がナニュートン [nN]であり、その時の AFM 探針の引き上げ速度がミリ秒 [ms]である[18]ことを考慮すると、力積としては[nN] ×[ms]= [10⁻¹² Ns]のオーダーとなる。これは、本手法により定量化した神経-マスト細胞の接着力は同程度のオーダーであり、本手法による細胞間接着の定量化が妥当に行われたことを示唆する。また、90 分間で 150 個の細胞の接着力を個別に定量化できたことから、神経とマスト細胞の情報伝達の強度が変化すると予測される数時間単位の時間スケールで両者の接着力を追跡できることが示された。また、90 分間で 150 個の細胞の接着力を個別に定量化する手法は他には無く、接着力を分布として調べることのできる唯一の手法といえる。

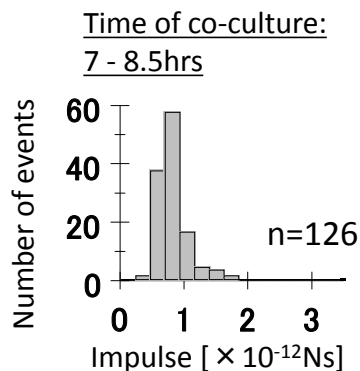


Figure 5-5 Representative results of the quantification of the adhesion force between the neurite and the mast cell.

5-3 神経-マスト細胞間の接着力の時間変化

5-3-1 神経-マスト細胞間の接着力の分布の時間推移

300×10^{-12} Ns のレーザー誘起衝撃力 (10 倍対物レンズ (NA=0.25), 700 nJ/pulse) を用いて、神経-マスト細胞間の接着力の共生培養時間依存性を調べた。複数の共生培養系を準備し、共生培養 7-30 時間の間で 3 時間おきに接着力を測定した。測定時間は 90 分とし、この間に約 150 個の細胞の接着力を測定した。比較参照の為に、接着分子 CADM1 が存在しないマスト細胞 (CADM1-KO) と神経の間の接着力も調べた。それぞれの結果を Fig. 5-6 (CADM1-KO) と Fig. 5-7 (BMMC) に示す。

1) 神経と CADM1 ノックアウトマスト細胞 (CADM1-KO) の間の接着力

接着力の分布はガウス関数で良くフィッティングされた。共生培養時間が 24 時間程度までは接着力はほぼ一定の値を示し、28 時間近傍で緩やかに増加したものの顕著な時間推移は観測されなかった。また、共生培養 28 時間前後から、突起様の構造が伸展しているマスト細胞が散見されるようになり、基板に接着しているような遊離のマスト細胞が観察された。

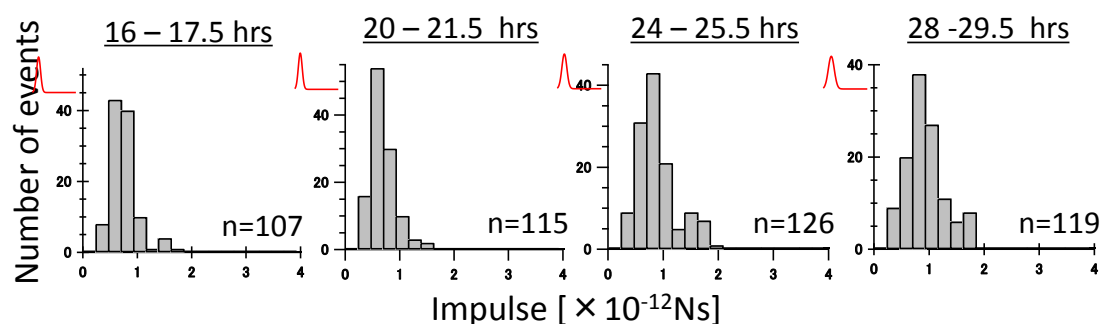


Figure 5-6 Distribution of the adhesion force between the CADM1-KO mast cell and the neurite of neuro2a cell. Time described in top of the graph means time to culture the mast cell and neuro2a cells together (time of co-culture). The red lines in the graphs are the fitted results by Gaussian function.

2) 神経と骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC) 間の接着力

どの時間においても、CADM1-KO よりも接着力が強い細胞が多かった。共生培養時間が 7~14 時間程度までの接着力の分布は指数関数で良くフィッティングされ、その時定数は時間経過と共に増加した。16.5 時間以降はガウス関数でフィッティングされる分布を示し、その分散と中央値は時間が経過しても顕著な変化は示さなかった。尚、CADM1-KO で観察された細胞形状の変化や遊離のマスト細胞の基板への接着は観察されなかった。

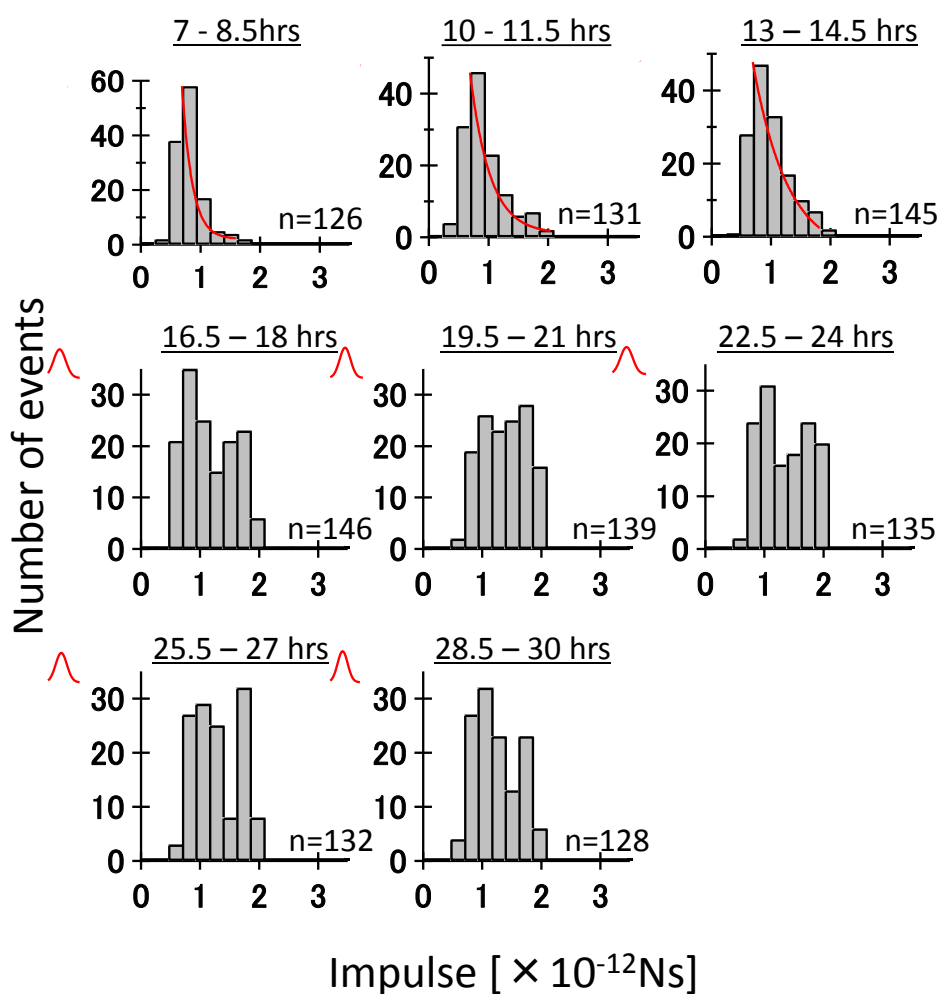


Figure 5-7 Distribution of the adhesion force between the BMMC and the neurite. The red lines show the fitted results. The distributions from co-culture of 7 hrs to 14.5hrs were fitted by exponential function. The distributions after co-culture of 16.5 hrs were fitted by Gaussian function.

5-3-2 接着形成のメカニズムについての考察

一般に、細胞間の接着は接着分子の寄与により形成されると考えられており、**CADM1-KO**の接着力が**BMMC**よりも低かったことは妥当な測定結果であるといえる。接着分子が存在しない**CADM1-KO**と神経間の接着は、細胞膜間のアンカー効果や静電相互作用などによる非特異吸着により形成されたと推測される。ブラウン運動している**CADM1-KO**と神経の非特異吸着は、両者がある距離にある時間安定して存在できた時に偶然形成されると考えられる。よって、最も安定しやすい両者間の距離に相当する接着力が分布のピークとして現れたと考えられる。ここで、非特異吸着の形成は確率に支配されていると考え、ピークを示す接着力からの接着力が増加する速度と減少する速度は等価であると考えられ、接着力はガウス分布を示し、その分布は時間的に大きく推移しないと考えられる。**CADM1-KO**の時間変化はこの仮説と符合しており、仮説の妥当性を示唆すると共にレーザー誘起衝撃力による測定の妥当性を示唆すると考えられる。

接着分子が発現している場合でも、接着力の増加速度と減少速度は平衡した状態にあると考えられる。**BMMC**では、共生培養7-14時間程度までは指数分布を示したことから、接着力の増加速度が接着力の減少速度を上回る状態にあり、且つ、その増加速度が一定であったと考えられる。接着力を規定する主要な要素に、接着面積、単位面積あたりの接着分子数、接着分子の親和性が挙げられる。ここで、接触面積にある一定の割合で接着を形成する箇所が生じ（接着サイト）、接着分子の密度が同程度であったとすると、**BMMC**と神経の接触面積がある一定の速度で広がっていけば、接着サイトも一定の割合で増加すると考えられる。その結果、接着力がある一定の割合で増加することになり、上述の指数分布が説明できる。実際には、**CADM1**はターンオーバーの為、その密度に増減が生じていたと推測されるが、接触面積の拡大の方が高次の要因であると考えられ、その密度は同程度とみなすことができると考えられる。

共生培養16時間以降では、この接触面積の拡大が止まり、一定の面積が保たれた結果であると考えられる。この接触面積が飽和した状態においては、**CADM1**のターンオーバーによる密度の増減が接着力の増減に直接的な効果を及ぼすと考えられ、そのヒストグラムが時間毎に少しずつ異なると考えられる。しかし、分布の分散、中央値に顕著な変化はみられなかったことから、両者の接着は共生培養16時間で成熟した状態に至ったと考えられる。

これらは、接着形成の初期には接触面積の拡大によりダイナミックに接着力を増加させて構造上の安定性を確保した後、**CADM1**の増減により接着力と生理活性（情報伝達効率）が制御されるものと推察される。

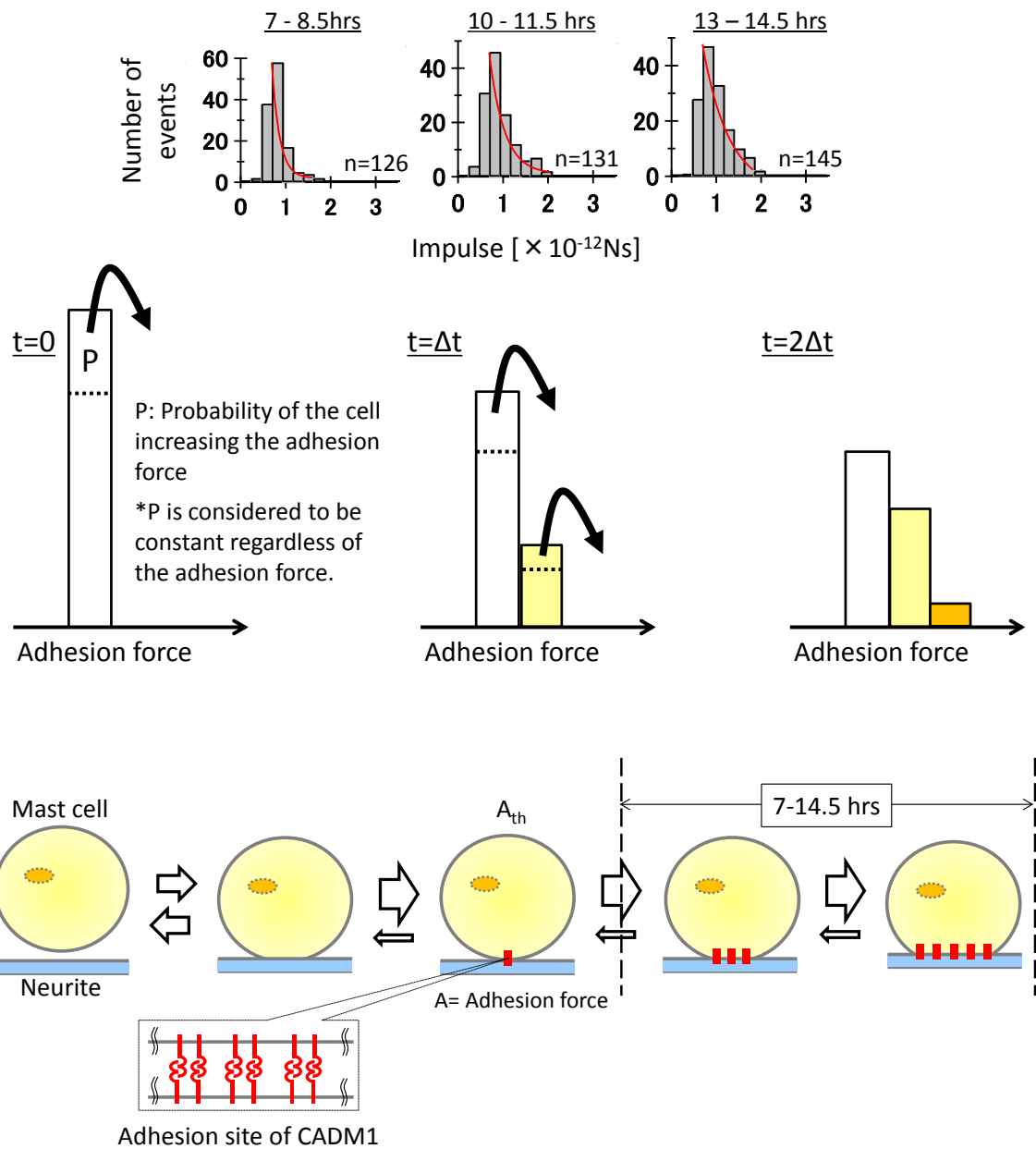


Figure 5-8 Possible mechanism of formation of the adhesion

これまで、系内における接着力の分布の時間推移を定量的に報告した例はなく、非常に新規性の高い結果であるといえる。現在、予備的知見ではあるが、免疫染色により神経とマスト細胞の接触面に接着分子 CADM1 が集積していることを確認している。さらに、細胞膜を併せて免疫染色（CADM1 との二重染色）することで、両者の接触面、接触面に集積する接着分子を蛍光観察できると考えられる。この方法を用いることで接着サイトの時間変化を定量的に評価

し、接着力の時間変化と比較することで、接着力の変化を接着分子の挙動に基づいて考察できるようになると考えられる。これを各アイソフォームに対しても行うことで、定量化した接着力が接着面積、接着分子の密度、接着分子の会合状態の変化のどの要因に支配され、支配要因がどのように変化していくのかを時間軸に沿って明らかにできるようになると考えられ、生命現象における接着の意義が議論されるようになると期待される。

5-4 まとめ

本章では、接着の定量化のモデル系に神経-マスト細胞共生培養系を用い、その接着力を評価した。その結果、3時間共生培養を行った時の神経とマスト細胞間の接着力は 0.11×10^{-12} Ns程度であった。接着における力積の意味を考察し、その考察に基づいて定量値の妥当性を確認した。接着の解離に要する力積の最小値が保存されるとすると、定量値は **Single cell force spectroscopy** により評価された接着力と同程度のオーダーであることが示された。

さらに、神経-マスト細胞の接着力の時間変化を見出すことに成功した。その結果、共生培養 7~14 時間ではダイナミックな接着力の変化が観測され、その要因は神経とマスト細胞の接触面積の拡大によりもたらされていることが示唆された。共生培養 16 時間以降では、接触面積の拡大は止まり、接着分子の密度の増減により接着力が変化したことが推察された。これまで接着力の分布の時間推移を明らかにした報告例はなく、新規な結果であり、生物学的手法と併せた詳細な研究により接着の分子的機構や接着力と生理活性との相関の解明が期待される。

参考文献

- [1] F. K. Austen, and A. J. Boyce, *Leuk Res.*, **25** (2001) 511.
- [2] Y. Kitamura, M. Shimada, K. Hatanaka, and Y. Miyano, *Nature*, **268** (1977) 442.
- [3] Y. Kitamura, M. Yokoyama, H. Matsuda, T. Ohno, and J. K. Mori, *Nature*, **291** (1981) 159.
- [4] Y. Kitamura, *Annu. Rev. Immunol.*, **7** (1989) 59.
- [5] T. Nakahata, and M. Ogawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79** (1982), 3843.
- [6] M. Khali, J. Ronda, M. Weintraub, K. Jain, R. Silver, and J. A. Siverman, *Brain Res.*, **1171** (2007) 18.
- [7] H. Selye, *The mast cells*, Butterworths, Washington D. C., USA , 1965.
- [8] H. R. Stead, F. M. Dixon, H. N. Bramwell, H. R. Riddel, and J. Binestock, *Gastroenterol*, **97** (1989) 575.
- [9] H. R. Stead, M. Tomioka, G. Quinonez, T. G. Simon, Y. S. Felten, and J. Binestock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** (1987) 2975.
- [10] C. T. Theoharides, *Int. J. Tissue React*, **18** (1996) 1.
- [11] G. Babara, V. Stanghellini, R. De, Girogio, C. Cremon, S. G. Cottrell, D. Statini, G. Pasquinelli, M. A. Moreselli-Labate, F. E. Grady, W. N. Bunnet, M. S. Collins, and R. Corninaldesi, *Gastroenterol*, **126** (2004) 693.
- [12] C. T. Theoharides, and E. D. Cochrane, *J. Neuroimmunol.*, **146** (2004) 1.
- [13] T. Furuno, A. Ito, Y. Koma, K. Watabe, H. Yokozaki, J. Binestock, M. Nakanishi, and Y. Kitamura, *J. Immunol.*, **174** (2005) 6934.
- [14] T. Furuno, D. Ma, P. H. Van der Kleij, M. Nakanishi, and J. Binestock, *Neurosci. Lett.*, **372** (2004) 185.
- [15] A. Suzuki, R. Suzuki, T. Furuno, R. Theshima, and M. Nakanishi, *Biol Pharm Bull*, **27**

(2004) 1891.

[16] T. Furuno, A. Ito, Y. Koma, K. Watabe, H. Yokozaki, J. Binenstock, M. Nakanishi, and Y. Kitamura, *J. Immunol.*, **174** (2005) 6934.

[17] A. Ito, T. Jippo, T. Wakayama, E. Morii, Y. Koma, H. Onda, H. Nojima, S. Iseki, and Y. Kitamura, *Blood*, **101** (2003) 2601.

[18] M. Benoit, D. Gabriel, G. Gerisch, and H.E. Gaub, *Nat. Cell Bio.*, **2** (2000) 313.

第6章 総括と展望

6-1 総括

本研究では、集光フェムト秒レーザーが水溶液中で誘起する衝撃力を細胞間接着の定量化に応用すべく、衝撃力の定量手法の開発や評価研究を行った。その結果、神経-マスト細胞間の接着力を1細胞レベルで非侵襲に測定することに成功した。また、この測定を短時間に多数の試料に対して行うことで、神経とマスト細胞間の接着力の系内における分布の時間変化を初めて定量的に示し、接着形成のメカニズムを考察した。以下、本研究を総括し、細胞間接着及び衝撃力応用の今後の展望について述べる。

第1章では、現状の研究に基づき既存の細胞間の接着の定量手法の課題について考察し、フェムト秒レーザー誘起衝撃力の有用性を指摘した。そのうえで、本研究の目的と意義について述べた。

第2章では、本研究に用いたフェムト秒レーザーシステム、顕微レーザーシステム、原子間力顕微鏡 (AFM)、局所応力計測システム、細胞試料の調製方法について述べた。

第3章では、AFM 探針に生じた振動の解析結果からレーザー集光点で発生した衝撃力 (F_0) を定量化する手法を示し、そのパルスエネルギー依存性に基づいて衝撃力の制御性を考察した。レーザーを AFM 探針近傍に集光照射した直後、AFM 探針は過渡的に振動した。この振動は衝撃力により誘導された振動であり、衝撃力は AFM 探針の先端部分にのみ付加されることが計算的に示され、振動の解析に質点モデルを適用することができた。AFM 探針振動を過渡減衰振動として近似的に解析し、AFM 探針に付加された衝撃力 (F_{AFM}) を AFM 探針のバネ定数に基づいて見積もった。 F_{AFM} は、Z 方向集光位置に対する依存性を示した。レーザー集光点と AFM 探針の位置関係を幾何学モデル化し、 F_0 のみを比例係数として変化させることでこの集光位置依存性を再現することに成功した。衝撃力の制御精度は細胞間の接着力の **uncertainty** と同程度あるいはそれよりも小さく、衝撃力により細胞間接着を定量化可能であることが示唆された。

第4章では、AFM 探針が受ける衝撃力を支配する現象を調べた。次に、想定された細胞間接着の定量化の実験手法の妥当性を検証し、細胞が受ける衝撃力の実体を調べた。さらに、ゼブラフィッシュ胚表層の細胞に衝撃力を付加し、その後の細胞の様子を観察して衝撃力が生細胞に及ぼす影響を考察した。

AFM 探針が受ける衝撃力はキャビテーションバブルの生成に伴って生じる応力波に支配されていることを明らかにし、そのフォースローディングタイムは 10 μ s 未満と見積もられた。想定された接着の定量化実験手法では、標的細胞に衝撃力が数回付加される。そこで、疑似細胞を用い、接着の解離における衝撃力の積算の効果を調べた。その結果、衝撃力の積算の効果は無視できる程度であり、実験手法が妥当であることが示唆された。この実験手法により疑似細胞間の接着を解離させた結果、疑似細胞はキャビテーションバブルの生成に伴って生じる応力波により解離したことが示された。これは、疑似細胞が受ける衝撃力もキャビテーションバブルによる応力波に支配されていることを意味し、3章の手法を細胞間接着の定量化に応用することの妥当性が示された。

ゼブラフィッシュ胚の表層近傍にレーザーを集光した結果、衝撃力によって集光点近傍の細胞が飛び散った。衝撃力の付加により細胞膜に損傷が生じたことが推測されたが、細胞の活動には支障のない程度であることが示された。また、細胞間接着が強固になると、その解離にはより強い衝撃力を付加する必要がある。これは解離に要した衝撃力が接着の強度を反映することを意味し、解離に要した衝撃力を求めることで接着を定量化できることが示された。

第5章では、衝撃力により細胞間接着の相違を検出できることを示した。その上で、神経マスト細胞の接着を定量化し、その値が 0.11×10^{-12} Ns であることを見出した。この定量値は、Single cell force spectroscopy による接着力評価と同程度のオーダーであることが示唆され、定量値の妥当性が示唆された。この定量化手法により、神経マスト細胞間の接着力の時間推移を調べ、時間推移を定量的に明らかにすることに初めて成功した。この時間推移から接着形成の機構が推察された。今後、生物学的手法による評価を行うことで、接着の分子的機構や接着力と生理活性の相関について明らかにしていくことが期待される。

6-2 展望

レーザー誘起衝撃力は、近赤外のフェムト秒レーザーパルス光が届けば、動物胚から細胞培養系内の1細胞、植物組織や植物細胞とその細胞内小器官など様々な階層の試料に対して非接触な細胞操作・計測を行うことが可能であり、異なる階層の生物試料を同じ基準で評価することができると考えられる。本手法の特徴として、計測時間が非常に短いことも挙げられ、本研究で示した数時間単位での接着力の推移だけでなく、短い時間で起こる接着力の変化の追跡も

できると考えられる。例えば、細胞を刺激し、活性化させた直後の接着力を測定することで、生理活性が接着力に及ぼす効果を直接調べられると考えている。他にも、レーザー誘起衝撃力を付加した時の細胞内カルシウム濃度の変化をモニターすることで、細胞の力学応答を調べる方法としても応用できると考えられ、細胞機能の力学的側面からの理解に貢献するものと期待される。

また、近年、形態形成や創傷治癒などにおける細胞の集団運動をシミュレーションにより解析する試みが多く行われている。非常に複雑な細胞の集団運動の全容を実験のみで明らかにするのは難しく、シミュレーションによる逆解析的なアプローチが重要であると考えられる。こうしたシミュレーションにレーザー誘起衝撃力により得た定量値を実験パラメーターとして組み込むことで、より実態に即したシミュレーションを行うことが可能になると予測される。フェムト秒レーザー誘起衝撃力を用いることで細胞培養系においても、動物胚中の細胞においても同様に実験パラメーターを得ることができると考えられ、**in vivo** と **in vitro** の垣根を低くする効果も期待される。今後、こうした分野融合的研究が促進され、新規な知見をもとに生命現象についての理解が進むことが期待される。

補足 レーザー誘起衝撃力の定量化におけるレーザー集光点の分散の考慮

対物レンズを通してフェムト秒レーザーを集光すると、自己収束効果や収差により、集光点が Z 方向に伸びると考えられている (Fig.1)。ここで、レーザー集光点の Z 方向の分布が、

$$f_0(z) = \frac{F_0}{l\sqrt{\pi}} \exp(-(z/l)^2) \quad (1)$$

で表せるとする。ここで、 $2l$ がレーザーの集光長に相当する。集光点で発生する衝撃力の強度分布もこの分布で近似できると仮定すると、(式#) には (式# 1) の分布が与えられ、AFM 探針に付加される衝撃力の総和はこの Z 方向の積分として Eq. (2) で与えられる。

$$\begin{aligned} \Delta f_z^G(x, y, l) = & \\ -\frac{F_0}{4l\pi^{3/2}} \int_{-\infty}^{\infty} \exp(-(z/l)^2) & \frac{Z'_0{}^3}{\{(X'_0+x)^2+y^2+Z'_0{}^2\}^{3/2}} \cdot \\ \frac{\Delta x}{\sqrt{(X'_0+x)^2+Z'_0{}^2}} \cdot & \frac{\Delta x}{\sqrt{y^2+Z'_0{}^2}} \quad (2) \\ \begin{pmatrix} X'_0 \\ Z'_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \theta & -\sin \theta \\ \sin \theta & \cos \theta \end{pmatrix} & \begin{pmatrix} X_0 \\ Z_0+z \end{pmatrix} \end{aligned}$$

さらに、AFM 探針に付加される衝撃力の総和は、この面積分になるので、

$$F_{AFM}^G(l) = \iint_S f_z^G(x, y, l) dx dy \quad (3)$$

として表すことができる。

Eq. (3) を用いて、AFM 探針に付加される衝撃力の総和を集光長の関数として計算した結果を Fig. 2 に示す。ここでは、 l を 0 から 30 μm まで変化させた。集光長 (l) の増加に伴い、Z 集光位置を変えた時の衝撃力の変化が緩やかになり、最大値と最小値が低くなる傾向がみられた。

本研究での実験条件では、 $2l$ は最大でも 30 μm 程度と見積もられており、 l の最大値は 15 μm 程度と考えられる。 $l=15 \mu\text{m}$ の時、衝撃力の総和の変化はレ

レーザー集光点が点源である時の結果とほぼ一致しており、これらのカーブ間の差は実際の実験操作に起因する誤差よりも小さいと考えられる。よって、第2節で述べた方法により実験結果を解析するに当たり、レーザー集光点の伸長は優先的に考慮すべき要素ではないといえる。

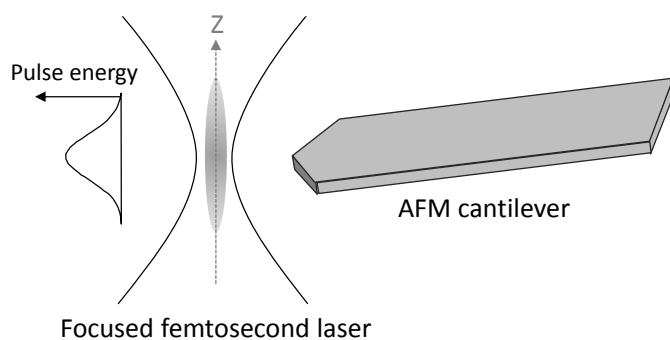


Figure 1 Distribution of the focused laser in Z direction.

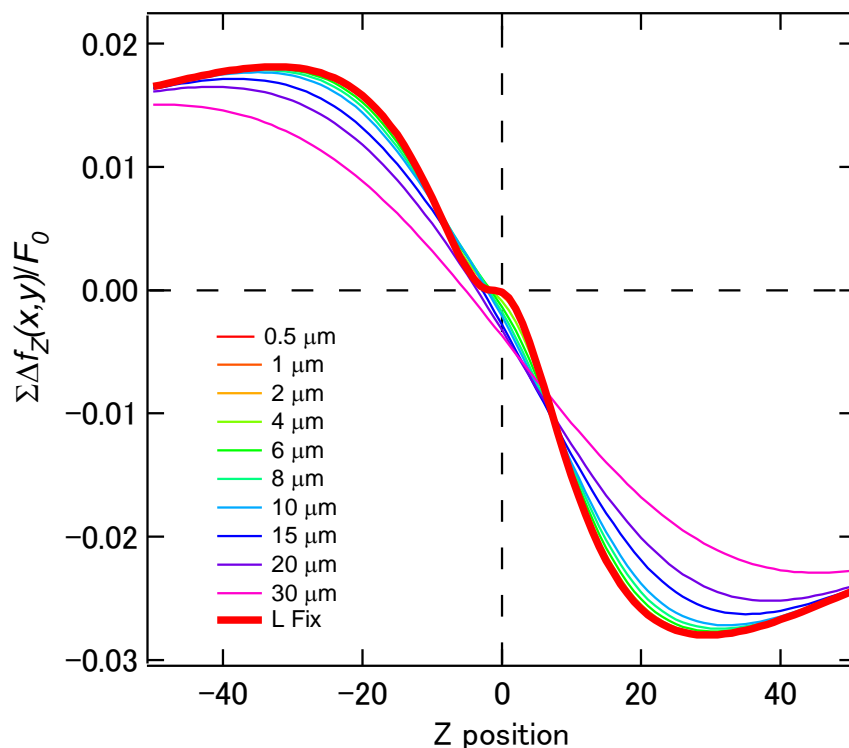


Figure 2 Z position dependence of F_0 calculated by Eq. (3) taking into consideration the distribution of the focused laser in Z direction.

【業績リスト】

原著論文

(筆頭著者)

1. Direct Measurement of Femtosecond Laser Impulse in Water by Atomic Force Microscopy, T. Iino, and Y. Hosokawa, Oct. 2010, Appl. Phys. Express, Vol. 3, pp. 107002-1 – 107002-3
2. Controllability of femtosecond laser-induced impulse in water evaluated by local force measurement system using atomic force microscopy, T. Iino, and Y. Hosokawa, Sep. 2012, J. Appl. Phys., 112, pp. 066106-1 – 066106-3

(共同著者)

1. Noncontact estimation of intercellular breaking force using femtosecond laser impulse quantified by atomic force microscopy, Y. Hosokawa, M. Hagiwara, T. Iino, Y. Murakami, and A. Ito, Jan. 2011, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 108, pp. 1777 – 1782
2. Photoporation of biomolecule into single cells in living vertebrate embryos induced by a femtosecond laser amplifier, Y. Hosokawa, H. Ochi, T. Iino, A. Hiraoka, and M. Tanaka, Nov. 2011, PLoS ONE, Vol. 6, pp. e27677_1 – e27677_7

関連論文

1. Enhanced nerve-mast cell interaction by a neural short isoform of cell adhesion molecule-1, M. Hagiwara, T. Furuno, Y. Hosokawa, T. Iino, T. Ito, T. Inoue, M. Nakanishi, Y. Murakami, May 2011, J. Immunol., Vol. 186, pp. 5983 – 5992
2. Increased expression of cell adhesion molecule 1 by mast cells as a cause of enhanced nerve-mast cell interaction in a hapten-induced mouse model of atopic dermatitis, M. Hagiwara, T. Inoue, T. Furuno, T. Iino, S. Itami, M. Nakanishi, H. Asada, Y. Hosokawa, and A. Ito, Oct. 2012, Br. J. Dermatol., Published Online (IOD: 10.1111/bdj.12108)

3. Effect of the distance between adherent mesenchymal stem cell and the focus of irradiation of femtosecond laser on cell replication capacity, *Cytotechnology*, J. Sakai, D. Roldan, K. Ueno, H. Misawa, Y. Hosokawa, T. Iino, S. Wakitani, and M. Takagi, May 2012, Vol. 64, pp. 323 – 329

総説・解説・紀要

1. 「リアルタイム計測による生命現象の解析 –Real-time Measurements on In situ Analysis of Life、第4章 フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した細胞接着力の非接触計測」、細川陽一郎、飯野敬矩、2011年3月、シーエムシー出版
2. 「原子間力顕微鏡を用いたフェムト秒レーザー誘起衝撃力の定量化 - バイオメカニクスへの新しいアプローチ方法 -」、細川陽一郎、飯野敬矩、萩山満、伊藤彰彦、*バイオイメージング*、2011年4月、Vol. 20、pp. 7-12
3. 「フェムト秒レーザー誘起衝撃力が誘起する原子間力顕微鏡 AFM 探針の過渡振動の解明」、飯野敬矩、細川陽一郎、増原宏、2010年1月、電気学会 光・量子デバイス研究会資料、資料番号 0QD-10-14、pp19-22
4. 「フェムト秒レーザーが水中に誘起する局所応力波の非接触計測」、細川陽一郎、飯野敬矩、増原宏、2010年1月、電気学会 光・量子デバイス研究会資料、資料番号 0QD-10-14、pp23-26

国際学会発表リスト

1. "Local Force Analysis of Transient Stress Induced by Focusing Femtosecond Laser in Water: Toward Its Application for Biotechnology", Takanori Iino, Yoichiroh Hosokawa, Kazunori Okano, Hiroshi Masuhara, International Conference on Laser Applications in Life Science (LALS2008), December 4-6, 2008, Taipei(Taiwan)
2. "Transient Oscillation of AFM cantilever Induced by Femtosecond laser-induced Stress", Takanori Iino, Yoichiroh Hosokawa, Kazunori Okano, Hiroshi Masuhara, 10th Conference of Laser Ablation 2009 (COLA2009), November 22-27, 2009, Singapore

3. "Elucidation of Characteristics of Femtosecond Laser-induced Impulsive Force", Takanori Iino, Yoichiroh Hosokawa, The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, March 19-21, 2012, Nara (Japan)
4. "Evaluation of controllability of Femtosecond Laser-induced Impulse in Water utilizing Atomic Force Microscopy", Takanori Iino, Yoichiroh Hosokawa, The 8th International Conference on Photo-Excited Processes and Applications (ICEPEPA-8), August 12-17, 2012, Rochester (USA)

国際シンポジウム

1. "Quantitative Analysis of Femtosecond Laser-induced Impulsive Force Utilizing Atomic Force Microscope", Takanori Iino, Yoichiroh Hosokawa, Kazunori Okano, Hiroshi Masuhara, The 1st NCTU-NAIST Workshop on Molecular/Nano Science, November 11-13, 2009, Hsinchu (Taiwan)
2. "Femtosecond Laser-induced Estimation of the Intercellular Adhesion Strength between Mast cell and Neurite", Takanori Iino, Yoichiroh Hosokawa, Man Hagiwara, Tadahide Furuno, Akihiko Ito, Hiroshi Masuhara, GIST-NCTU-NAIST Joint Symposium 2010, November 15-16, 2010, Nara (Japan)

国内学会発表リスト

1. 「原子間力顕微鏡によるフェムト秒レーザー誘起過渡応力の評価」, 飯野敬矩, 細川陽一郎, 岡野和宣, 増原宏, 2009年3月30-4月2日, 第56回応用物理学関係連合講演会, 筑波大学 筑波キャンパス (茨城)
2. 「原子間力顕微鏡を用いたフェムト秒レーザー誘起応力波の定量化」, 飯野敬矩, 細川陽一郎, 岡野和宣, 増原宏, 2009年9月8-11日, 第70回応用物理学学会学術講演会, 富山大学 五福キャンパス (富山)
3. 「フェムト秒レーザー誘起衝撃力による神経 - マスト細胞間接着の力学的評価」, 飯野敬矩, 細川陽一郎, 萩山満, 伊藤彰彦, 岡野和宣, 増原宏, 2010年3月17-20日, 第57回応用物理学関係連合講演会, 東海大学 湘南

キャンパス（神奈川県）

4. 「集光フェムト秒レーザーが誘起する原子間力顕微鏡 AFM 探針の過渡振動の解明」, 飯野敬矩, 細川陽一郎, 岡野和宣, 増原宏, 2010年3月5日, 電気学会 光・量子デバイス研究会(レーザーマイクロ・ナノプロセッシング), 尾道商業会議記念館(広島)
5. 「フェムト秒レーザー誘起衝撃力による神経 - マスト細胞間接着の力学的評価2」, 飯野敬矩, 細川陽一郎, 萩山満, 伊藤彰彦, 岡野和宣, 増原宏, 2010年9月14-17日, 第71回応用物理学会学術講演会, 長崎大学 文教キャンパス(長崎)
6. 「Femtosecond Laser Estimation of Intercellular Adhesion Strength between Neurite and Mast Cell」, 飯野敬矩, 萩山満, 古野忠秀, 伊藤彰彦, 細川陽一郎, 2010年9月20-22日, 日本生物物理学会第48回年会講演, 東北大学 青葉台キャンパス(宮城)
7. 「Femtosecond Laser Estimation of Intercellular Adhesion Strength between Neurite and Mast Cell Part2」, 飯野敬矩, 萩山満, 古野忠秀, 伊藤彰彦, 細川陽一郎, 2011年9月16-18日, 日本生物物理学会第49回年会講演, 兵庫県立大学 書写キャンパス(兵庫)
8. フェムト秒レーザー誘起衝撃力を用いた新しい細胞操作・計測」, 飯野敬矩, 日本学術会議第二回先端フォトンクスシンポジウム, 2011年10月7日, 日本学術会議講堂(東京)
9. 「原子間力顕微鏡を用いた水中フェムト秒レーザー誘起衝撃力の制御性評価」, 飯野敬矩, 細川陽一郎, 2012年3月15-18日, 第59回応用物理学関係連合講演会, 早稲田大学 早稲田キャンパス(東京)
10. 「Relationship between Intercellular Adhesion Strength and Communication Detected by Femtosecond laser-induced Impulsive Force」, 飯野敬矩, 萩山満, 古野忠秀, 伊藤彰彦, 細川陽一郎, 2012年9月22-24日, 日本生物物理学会第50回年会講演, 名古屋大学 東山キャンパス(愛知)

受賞

1. 中間審査会優秀学生発表賞, 平成 23 年度奈良先端科学技術大学院大学中間審査会, 2011 年 11 月 10 日, 舞子 (兵庫)
2. The ICPEPA-8 Outstanding Poster Award, Inter, The 8th International Conference on Photo-Excited Processes and Applications (ICEPEPA-8), August 15, 2012, Rochester (USA)

助成金

1. 奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 平成 21 年度競争的研究支援 「フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した 2 細胞間の接着力の統計的評価と接着機構の検討」
2. 奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 平成 22 年度競争的研究支援 「フェムト秒レーザーを駆使した細胞間接着機構とその生物学的機能の力学的解明」
3. 日本学術振興会特別研究奨励費 (平成 23 年度及び平成 24 年度) 「フェムト秒レーザーを駆使した細胞間接着機構とその生物学的機能の力学的解明」

謝辞

本研究は奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科にて行われた。研究の遂行にあたっては、多くの方々に様々なご支援を賜りました。ここに、心より厚く御礼申し上げます。

本研究科 特任准教授 細川陽一郎先生には5年間の長きにわたり真摯なご指導とご鞭撻を賜りました。心より深謝申し上げます。

本研究科 特任教授 増原宏先生には研究の遂行にあたり温かいご指導とご討論を賜りました。また、博士前期課程及び後期課程1年次までの3年間、主指導教員としてもご指導とご鞭撻を賜りました。謹んで深謝申し上げます。

本研究科 教授 浦岡行治先生には本研究の遂行及び本学位論文の作成にあたり多くの貴重なご教示を賜りました。心より厚く御礼申し上げます。

本研究科 准教授 上久保裕生先生には本研究の遂行にあたり懇切丁寧なご指導とご討論、温かいご支援を賜りました。また、本学位論文作成にあたっては多くの貴重なご助言を賜りました。心より深く御礼申し上げます。

近畿大学 医学部 病理学講座 教授 伊藤彰彦先生、同 助教 萩山満先生には神経細胞及びマスト細胞をご提供頂きました。また、本研究の遂行にあたり多くの貴重なご助言と温かいご支援を賜りました。心より深く御礼申し上げます。

愛知学院大学 薬学部 薬品分析化学研究室 准教授 古野忠秀先生には神経とマスト細胞の相互作用について多くの有益なご教示を賜りました。心より厚く御礼申し上げます。

東京工業大学 大学院生命工学専攻 准教授 田中幹子先生、本学 バイオサイエンス研究科 越智陽城博士にはゼブラフィッシュ胚を用いた実験とその解析にあたり多大なご協力とご助言を賜りました。深く御礼申し上げます。

本研究科 助教 山崎洋一先生には本研究の遂行にあたり有益なご助言とご協力を頂きました。深く感謝申し上げます。

台湾國立交通大學 應用科學系 博士研究員 岡野和宣博士、台灣國家研究院 儀器科技中心 副研究員 杉山輝樹先生、城西大學 理學部 助教 宇和田貴之先生には研究について多くの有益なご助言とご提案を賜りました。厚く御礼申し上げます。

研究室の先輩であった台湾國立交通大學 應用科學系 博士研究員 柚山健一博士、本研究科 前澤安代博士、株式会社 P&G Thitiporn Rungsimanon 博士、本学 バイオサイエンス研究科 松原美絵氏には研究のみならず、日々の研究生生活においても多くのご助言とご支援を頂きました。厚く御礼申し上げます。

(所属は 2013 年 3 月現在)

研究室の後輩である石黒慶氏、平岡彰宏氏、松井愛氏、熊野悟氏、重政彰徳氏、竹中将信氏、上段寛久氏、澤田晃佑氏、新屋龍太郎氏には研究のみならず、日々の研究生生活においても様々な形でご支援とご協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。(石黒氏、平岡氏、松井氏は 2011 年 3 月に卒業)

本研究室 秘書 栗栖真美氏、本研究室 技術補佐員 坂口さや香氏には日々の研究生生活において様々なご支援を頂きました。厚く御礼申し上げます。

さきがけ技術参事 中桐伸行氏、さきがけ秘書 多田敬子氏には日々の生活において様々なご支援を頂きました。厚く御礼申し上げます。

北里大学 一般教育部自然科学教育センター 元教授 横井洋太先生、同 講師 坂田剛先生には本学への進学にあたり多大なご支援を賜りました。心より御礼申し上げます。

鈴木弘樹氏を始めとするかつての同僚の方々には本学への進学にあたり多大なご支援と励ましを頂きました。謹んで厚く御礼申し上げます。

本学への進学に理解を示し、温かく見守ってくれた家族に感謝します。