

様 式 Z - 7

平成 2 5 年度科学研究費助成事業 実績報告書 (研究実績報告書)

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 基盤研究(B) 4. 研究期間 平成 2 4 年度 ~ 平成 2 7 年度
5. 課題番号

2	4	3	6	0	0	2	7
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 レーザー過渡力学解析による細胞・組織内の応力テンソルの解明

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
2 0 4 4 8 0 8 8	ホソカワ ヨウイチロウ 細川 陽一郎	物質創成科学研究科	准教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

本年度はまず、植物生理学において代表的な植物試料として用いられているシロイヌナズナを対象として実験を進めた。シロイヌナズナの根の先端（根端）にAFM探針を接触させ、探針の移動量と探針の曲り量の関係（フォースカーブ）から根端の弾性と塑性を評価することに成功した。さらに、AFM探針が接触している根端の直下にフェムト秒レーザーを集光照射することにより、衝撃力を誘起し、それにより根端を過渡的に振動させることに成功し、その振動をAFM探針により検出することができた。AFM探針の振動は、プローブレザーの四分分割フォトダイオード上の電圧変位として検出され、その電圧変位はオシロスコープによりナノ秒の時間分解能で検出される。この電圧変位をAFM探針の位置変位に構成することができ、フェムト秒レーザー誘起衝撃力により根端は数10nm程度振動していることが分かった。この振動データを高速フーリエ変換することにより、根の振動スペクトルを得ることに成功した。ここでバネ定数の異なるAFM探針により計測した結果、振動スペクトルがAFM探針に依存する結果が得られた。この結果は、AFM探針の種類によっては、探針と根とが強く共鳴する場合があることが示しており、試料の弾性に合わせた探針を選択して実験を行うことが重要である。さらに、発生生物学において代表的な試料として用いられるゼブラフィッシュ胚を用いて実験を行い、シロイヌナズナの場合と同様に振動スペクトルを得ることに成功した。細胞壁を持たないゼブラフィッシュ胚は、シロイヌナズナの根に比べて圧倒的に柔らかく、バネ定数の低いAFM探針を使用することにより、適正な振動スペクトルを得ることに成功した。さらに、これらの試料で得られる振動スペクトルが、レーザー集光位置とAFM探針の位置関係に依存することが分かった。

10. キーワード

- (1) フェムト秒レーザー (2) 原子間力顕微鏡 (3) 生体計測 (4) 衝撃波
 (5) 力学作用 (6) (7) (8)

11. 現在までの達成度

(区分)(1) 当初の計画以上に進展している。

(理由)

前年度の交付申請書に記載したとおりシロイヌナズナについては遺伝子改変により根の機械的強度を変化させた試料を用いた実験も行っており、変異体でフォースカーブおよび振動スペクトルに差を見出すことができている。一方で実験を進める中、振動スペクトルの意味が当初予測よりも遥かに複雑で、かつ生体試料の最大の問題である個体差が非常に大きいことから、実験の再現性を含め、その意味を理解するためにはより詳細な実験検証の必要性が生じた。そのため計画していたカルシウムイオン濃度のイメージングの実験を保留し、AFM探針により検出される振動スペクトルのレーザー集光位置依存性を詳細に評価することに注力した。結果として、振動スペクトルがレーザー集光位置に依存することに成功した。この成功により、本実験にトモグラフィー解析を適用し、試料内の弾性応力を推定できる可能性が示された。シロイヌナズナの弾性と塑性をAFMのみを用いたフォースカーブの測定により調べた研究例がこれまでにあるが、この方法では、力の付加と検出の両方をAFM探針により行うため、本研究で提案している方法のように力の付加(レーザー誘起衝撃力)と検出(AFM探針)の位置を分けることができないため、トモグラフィー解析のための情報を得ることが難しい。本実験で得られた結果のトモグラフィー解析までが達成されれば、従来法では得られなかった生体組織内の弾性応力の空間分布が評価できるようになると考えている。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

今後、有限要素法を用いた物理シミュレーションソフトを用いて、シロイヌナズナやゼブラフィッシュなどの生体試料内の応力テンソルの分布を仮定した物体の物理モデルを構築し、そのモデルに過渡的な力を加えたときの振動を計算していきたいと考えている。その結果と実験で得られる結果を照合することにより、生体試料の応力テンソルの分布を推定するトモグラフィー解析の足掛かりを作りたいと考えている。また、このような逆解析を行うためには、応力テンソルが既知であるシンプルな試料を用いた実験による実験データと照合モデルの蓄積が不可欠となる。そのため、生体材料と機械的特性の似た微小なシリコン製の構造物を作製し、その試料に対してAFM探針を接触させ、レーザー誘起衝撃力を加えた際の振動スペクトルのレーザー集光位置依存性について計測し、実際の実験結果と計算モデルの間の整合性についての検討を進めていく必要があると考えている。さらにシロイヌナズナでは、浸透圧を調整することにより細胞内の膨圧を変化させ、機械強度を変化させることができる。ゼブラフィッシュでは、ヨークの膨圧を緩和することによりヨークに接触している杯の機械強度を変化させることができる。このような操作により、同じ形状を持つが、機械強度のみが変化させられている試料を用いて振動スペクトルのレーザー照射位置依存性を調べ、計算モデルと比較することにより、シロイヌナズナやゼブラフィッシュの細胞および組織レベルの応力テンソルを如何にモデル化し、実験で得られる振動スペクトルとの間で整合性をとるかについて検討を進めていきたいと考えている。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

以下の2点の理由で前年度未使用額が生じた。
フェムト秒レーザーが想定外に順調に駆動したため、光学部品の補填や整備の必要が生じなかった。
生物実験のための試料購入を予定していたが、共同研究者からの提供で足りたため、その購入費が少なくて済んだ。

(使用計画)

上記が前年度に必要な分、今年度必要になると想定され、前年度未使用金をそのために使う。

13.研究発表(平成25年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(1)件 うち査読付論文 計(1)件

著者名		論文標題			
Tsuyoshi Hirashima, Yoichiroh Hosokawa, Takanori Iino, Masaharu Nagayama		On fundamental cellular processes for emergence of collective epithelial movement			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Biology Open	有	Vol. 2, No. 7	2 0 1 3	pp.660-666	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1242/bio.20134523					

(学会発表) 計(19)件 うち招待講演 計(1)件

発表者名		発表標題	
細川 陽一郎, 坂口 さや香, 飯野 敬矩		フェムト秒レーザー誘起 衝撃力による筋芽細胞の力学応答の個別解析	
学会等名	発表年月日	発表場所	
2013年光化学討論会	2013年09月11日～2013年09月13日	愛媛大学(愛媛)	

発表者名		発表標題	
上段寛久, 飯野敬矩, 細川陽一郎		フェムト秒レーザー誘起衝撃力による細胞間接着剥離の力学メカニズム(3) 擬似細胞の接着力の制御と運動の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所	
2013年 第74回応用物理学会秋季学術講演会	2013年09月16日～2013年09月20日	同志社大学(京都)	

発表者名		発表標題	
細川陽一郎		バイオ分野におけるレーザープロセッシング	
学会等名	発表年月日	発表場所	
2013年 第74回応用物理学会秋季学術講演会	2013年09月16日～2013年09月20日	同志社大学(京都)	

発表者名		発表標題	
鍋坂恭平, 石河泰明, 土江貴洋, 田口信義, 細川陽一郎, 浦岡行治		超短パルスレーザーを照射した無機ELディスプレイ用ZnS蛍光体の作製	
学会等名		発表年月日	発表場所
2013年 第74回応用物理学会秋季学術講演会		2013年09月16日 ~ 2013年09月20日	同志社大学(京都)

発表者名		発表標題	
丸山彰大, 上段寛久, 飯野敬矩, 細川陽一郎		フェムト秒レーザー誘起衝撃力が基板に接着した微小物体にもたらす力学的作用	
学会等名		発表年月日	発表場所
応用物理学会関西支部講演会		2013年10月09日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良)

発表者名		発表標題	
福嶋亮介, 飯野敬矩, 細川陽一郎		フェムト秒レーザーアブレーションと原子間力顕微鏡による生体微小試料の弾性変形の解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
応用物理学会関西支部講演会		2013年10月09日	奈良先端科学技術大学院大学(奈良)

発表者名		発表標題	
細川陽一郎		レーザー誘起衝撃力による細胞のインパルス力場応答解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
応用物理学会 量子エレクトロニクス研究会「バイオ・メディカルフォトニクス: 基礎と応用の最前線」(招待講演)		2013年12月20日 ~ 2013年12月22日	上智大学軽井沢セミナーハウス(長野)

発表者名	発表標題	
福嶋亮介, 細川陽一郎, 飯野敬矩	フェムト秒レーザー誘起衝撃力と原子間力顕微鏡による微小生体試料の力学的性質の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
電気学会 光・量子デバイス研究会	2014年03月03日	東北大学東京分室(東京)

発表者名	発表標題	
丸山彰大, 上段寛久, 坂口さや香, 飯野敬矩, 細川陽一郎	細胞接着メカニズム解明のためのフェムト秒レーザー衝撃力によって引き剥がした微小物体の運動解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
(社)レーザー学会第459回研究会「レーザーマイクロ・ナノプロセッシング」	2014年03月07日	宮崎市民プラザ(宮崎)

発表者名	発表標題	
河野達也, 澤田晃佑, 飯野敬矩, 上村松生, 細川陽一郎	生体分子添加水溶液にみられる集光フェムト秒レーザー誘起氷結晶成長	
学会等名	発表年月日	発表場所
2014年第61回応用物理学会春季学術講演会	2014年03月17日～2014年03月20日	青山学院大学(神奈川)

発表者名	発表標題	
細川 陽一郎	フェムト秒レーザー誘起衝撃力と原子間力顕微鏡を用いた微小な植物試料の堅さ評価	
学会等名	発表年月日	発表場所
第55回日本植物生理学会年会	2014年03月18日～2014年03月20日	富山大学(富山)

発表者名	発表標題	
Kyohei Nabesaka, Yasuaki Ishikawa, Takahiro Doe, Nobuyoshi Taguchi, Yoichiroh Hosokawa, and Yukiharu Uraoka	Femtosecond Laser Irradiation to ZnS Phosphor for Inorganic Electroluminescent Displays	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 2013 International Meeting for Future of Electron Devices, Kansai	2013年06月05日 ~ 2013年06月06日	Osaka, Japan

発表者名	発表標題	
Kazunori Okano, Ai. Matsui, Yasuyo Maezawa, Mie Matsubara, Yoichiroh Hosokawa, Hiroshi Tsubokawa, FuJen Kao, Yaw-Kuen Li, and Hiroshi Masuhara	Laser-Assisted Control of Protein Adsorption for Dynamically Arranging Viable Cells	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 10th Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim(CLEO-PR 2013)	2013年06月30日 ~ 2013年07月04日	Kyoto, Japan

発表者名	発表標題	
Yoichiroh Hosokawa, Masanobu Takenaka, Takanori Iino	Nanoscale Bending Movement of Biological Micro-Object Induced by Femtosecond Laser Impulse and Its Detection by AFM	
学会等名	発表年月日	発表場所
The 12th International Conference on Laser Ablation (COLA 2013)	2013年10月06日 ~ 2013年10月11日	Ischia, Italy

発表者名	発表標題	
Hirohisa Uedan, Takanori Iino, Yoichiroh Hosokawa	Motion Analysis of Micro-Beads activated by Femtosecond Laser Impulse	
学会等名	発表年月日	発表場所
2013 GIST-NAIST-NCTU International Joint Symposium	2013年11月21日 ~ 2013年11月26日	Nara, Japan

発表者名	発表標題	
Hirohisa Uedan, Takanori Iino, F.C.Chang, R.H.Hung, C.H.Yu, F.J. Kao, Yoichiro Hosokawa	Motion Analysis of Biological Cells and Micro-beads by Femtosecond Laser Impulse	
学会等名	発表年月日	発表場所
The Physical Society of Republic of China (Taiwan) Annual Meeting 2014	2014年01月21日 ~ 2014年01月23日	Taichung, Taiwan

発表者名	発表標題	
Ryosuke Fukushima, Takanori Iino, Yoichiro Hosokawa	AFM detection of vibration of biological micro-object induced by femtosecond laser impulse	
学会等名	発表年月日	発表場所
The Physical Society of Republic of China (Taiwan) Annual Meeting 2014	2014年01月21日 ~ 2014年01月23日	Taichung, Taiwan

発表者名	発表標題	
Hirohisa Uedan, T. Iino, F.C.Chang, R.H.Hung, C.H.Yu, F.J. Kao, Y. Hosokawa	Motion Analysis of Biological Cells by Femtosecond Laser Impulse and Its Formulation	
学会等名	発表年月日	発表場所
NCTU-NAIST-ITRC Joint Workshop on Laser Bio/Nano Science	2014年01月25日	Hsinchu, Taiwan

発表者名	発表標題	
Ryosuke Fukushima, Takanori Iino and Yoichiro Hosokawa	AFM detection of nano-meter vibration of plant root induced by femtosecond laser impulse	
学会等名	発表年月日	発表場所
NCTU-NAIST-ITRC Joint Workshop on Laser Bio/Nano Science	2014年01月25日	Hsinchu, Taiwan

