

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24360027

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Elucidation of stress tensor inside cell and tissue by kinetic analysis using femtosecond laser impulse

研究代表者

細川 陽一郎 (Hosokawa, Yoichiroh)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：20448088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：高強度のフェムト秒レーザーを顕微鏡で水媒体に集光すると、集光点では効率的な多光子吸収により爆発現象が誘導され、衝撃波が発生し、その力は近傍にある微小物体に衝撃力として作用する。本研究課題では、この衝撃力により、ゼブラフィッシュや培養細胞層などの生体組織試料およびその疑似試料に弾性変形を引き起こし、その弾性変形の時間変化を原子間力顕微鏡(AFM)により検出する手法を開発した。その計測感度が細胞レベルであることを実証した。さらに、実験結果を有限要素法による数値シミュレーションと照合し、生体組織に潜在する応力の起源を同定し、その振動挙動からその形状や弾性を推定する新手法を考案した。

研究成果の概要(英文)：When an intense femtosecond laser is focused on a water medium under microscope, an explosive phenomenon is induced at the laser focal point, and then shock and stress waves due to the explosion propagate and act to small object near the laser focal point as an impulsive force. We developed a new method to elucidate stress tensor inside cell and tissue by utilizing the impulsive force. In this method, vibrational deformation of small biological object, such as zebrafish, cultured cell layer, and their phantom, was induced by the impulsive force and detected by atomic force microscope (AFM) as time course of the bending movement of the AFM cantilever. It was possible to detect even the deformation of single cell. Furthermore, the experimental results were compared with numerical simulation using finite element method (FEM) and the origin of the vibrational deformation was analyzed. We succeeded in evaluation of shape and elasticity of the small sample based on the vibration behavior.

研究分野：レーザー応用工学

キーワード：フェムト秒レーザー 原子間力顕微鏡 生体計測 衝撃波 力学作用

1. 研究開始当初の背景

発生段階・成長段階にある生体組織には、細胞の増殖・成長・移動と呼応する応力が発生する。この応力の時々刻々の変化を非破壊に評価することができれば、例えば、実際の形態変化を待たずして、その方向性を知ることができる。近年、このような生体組織内の力学により誘導される生体機能創発のメカニズムが注目されており、“メカノバイオロジー”という新しい研究分野が創設されている。この分野の発展に伴い、細胞やその集合体である生体組織内の力学情報を明らかにしたいという要請が増している。

発生段階・成長段階にある組織の形成メカニズムを明らかにするためには、その駆動力となる組織内の内部応力の時間的変遷(ダイナミクス)を明らかにすることが不可欠である。細胞・組織は、細胞内骨格、細胞膜、細胞間接着に関係する分子の支え合いにより形成され、遺伝子により誘導されるこの支え合い構造の組み替えが細胞・組織内で応力を生みだし、力学的構造変化の原動力となる。発生段階・成長段階にある生体試料に潜在する応力テンソルの時間的な変遷を解析することにより、これまで不可能であった細胞や組織内に潜在する応力ダイナミクスをナノ・マイクロレベルで調べることができるようになると考えられる。

これまで、弾性変形する細胞培養容器(ストレッチチャンバー)を利用した生理活性変化のイメージングで生体組織の形成における力学作用を評価したり、原子間力顕微鏡(AFM)の探針を細胞表面で振動(タッピング)させ、その振動の共鳴周波数のずれから細胞内の内部応力を調べたりすることが試みられている。しかしながら、これらの手法で得られる情報は、連続的な外力を加えたときの力学的性質が主である。粘弾性体であり、複雑な階層構造をもつ細胞・組織の力学的性質を明らかにするためには、衝撃加振を加えたときの力学的性質を測定することが重要であるが、その手法は、未だ確立されていない。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者がこれまで開発してきたフェムト秒レーザー衝撃力を摂動として生体組織の動態を AFM により検出する技術をさらに発展させ、AFM 探針の時間変動挙動を検出することにより、レーザー誘起衝撃力により生体組織に引き起こされる弾性変形を直接的に調べ、試料内の応力テンソルを評価しようとしたものである。

高強度のフェムト秒レーザーを顕微鏡で水媒体に集光すると、集光点では効率的な多光子吸収により爆発現象が誘導され、衝撃波が発生し、その力は近傍にある微小物体に衝撃力として作用する。本研究課題では、この衝撃力により、ゼブラフィッシュや培養細胞層などの生体組織試料およびその疑似試料

に弾性変形を引き起こし、その弾性変形の時間変化を原子間力顕微鏡(AFM)により検出する手法を開発した。さらに、実験結果を有限要素法による数値シミュレーション結果と照合し、生体組織に潜在する応力の組成を同定し、その振動挙動からその形状や弾性を推定する新手法を考案した。

3. 研究の方法

(1) 実験システムの全体構成

実験における光学系の模式図を図1に示す。倒立顕微鏡と実体顕微鏡を組み合わせ、実体顕微鏡により試料全体と AFM 探針の位置を観察しながら、倒立顕微鏡からフェムト秒レーザーを集光照射できるシステムを構築した。このシステムに、再生増幅フェムト秒レーザーによるレーザーパルス(800 nm, 150 fs)を、倒立顕微鏡の裏面より入射し、対物レンズによってステージ上に集光照射した。レーザーパルスの発振繰り返し周波数は 20 ~ 1000 Hz で調整可能であり、本実験では 20 Hz に調整してシャッター速度 1/32 秒のシャッターの開閉により単発パルスを得た。顕微鏡の電動ステージ上に、手動ステージ及び AFM を配置した。電動ステージは、レーザー集光点の XY 方向の位置調整に、手動ステージは試料と AFM 探針の相対位置の微調整に用いた。

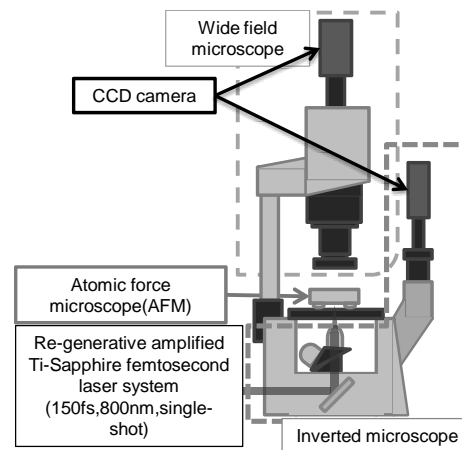


図1 実験システムの概要図

(2) 検出系の構成

フェムト秒レーザーを試料近傍に集光照射して引き起こされる衝撃力による試料の過渡振動を、電動ステージ上に設置した AFM (Pacific Nanotechnology 社製 Nano-R) により検出した(図2(a))。本実験に使用した AFM 探針の変位は、AFM 探針の裏面に照射された検出レーザーの変位を4分割フォトダイオード(QPD)で検出することにより行われた(図2(b))。AFM 探針が変位すると、QPD 上での検出レーザーの位置が変化し、その変位が光起電力の差として検出される。本実験では AFM 探針から得られる縦方向と横方向の起電力差を、オシロスコープに直接出力でき

るようにシステムアップし、AFM 探針のたわみに対応する縦方向の信号より試料の上下方向の変位を、AFM 探針のねじれに対応する横方向の変位より、試料の横方向の変位を検出した。この方式により、試料の数 nm の振動を数 10 ns の時間分解能で検出することが実現できた。

測定ではまず、水中に静置した生体試料を準備し、手動ステージにより、顕微鏡上でのその設置を調整する。つぎに、生体試料の上面に AFM の探針を降下し、接触させた。試料と探針が接触した状態で、試料近傍の水に単発のフェムト秒レーザーを集光照射し、試料に衝撃力を作用させた。衝撃力により誘導される試料の形状変化（振動）により AFM 探針は変位し、その変位は QOD の電圧変化の時間変化として、オシロスコープにより検出された。

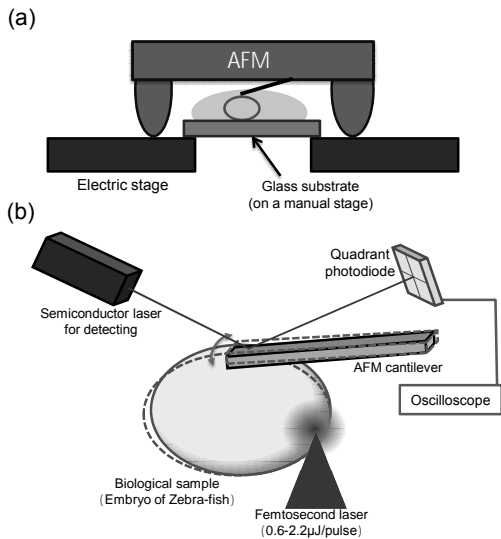


図2 実験の概略:(a)顕微鏡ステージ上での試料と AFM の関係と (b) 振動の誘導と検出の概略図

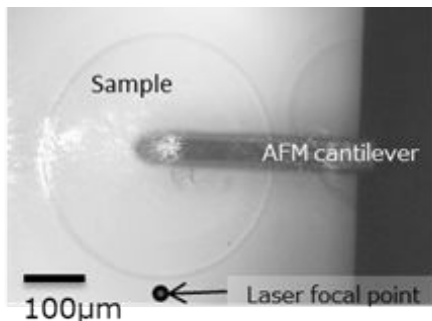


図3 アルギン酸カルシウム球に探針を接触させた状態の顕微鏡写真

4. 研究成果

(1) 球状モデル試料による実験

計測データを理解するためのモデル試料

として、アルギン酸カルシウム球（直径 300 ~ 1000 μm）を用意し、実験を行った。図3に示す様に、試料を顕微鏡のステージ上に配置し、水中で AFM 探針に接触させた。この試料近傍の水中にパルスエネルギーが 1 μJ/pulse の単発パルスを 10 倍の対物レンズ (NA : 0.25) により集光照射し、試料に衝撃力を作用させた。

図4(a)に計測された振動の時間波形を示す。波形の 30 - 100 μs 付近に、周期の長く比較的振幅の大きい特異な波が観測された。この波の検出時間は、試料の直径に比例して遅くなった(図4(c))。有限要素法(FEM)を用いたシミュレーションにより、球体モデルによる実験結果の再現を試みた。シミュレーションでは、体積弾性率 K 及び、ずれ弾性率 G の最適値を検討し、 $K = 1 \times 10^6$ [Pa]、 $G = 2 \times 10^4$ [Pa]の条件において、実験結果とほぼ同じ時間スケールで直径に比例する時間変動波形の再現に成功した(図4(b))。このシミュレーション結果から、この波が球体の表面を伝播する横波に帰属されることが強く示唆された。固体を伝播する横波の速度は、ずれ弾性率 G に依存することから、この波の検出時間を測定することで、試料表面のずれ弾性率 G が推定できたと考えられる。

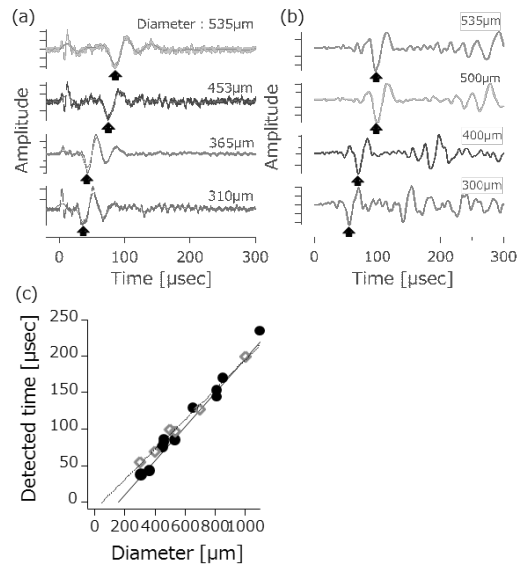


図4 (a)球状モデル試料による振動計測実験結果と(b)シミュレーションによる振動波形の再現結果、(c)横波検出時間と直径の関係 (a,bの矢印はそれぞれcの黒丸：実験結果と灰丸：シミュレーションに対応する。)

また、この K と G を用いて、レーザー照射せずに AFM 探針を試料に押し付けて引き上げることにより得られるフォースカーブも計算し、実験結果を再現することができた。通常の AFM のみを用いた力学作用の検出方法であるフォースカーブ計測では、計算および実験で、明らかな形状依存性は見られな

った。これはフォースカーブが探針周辺の局所的な弾性を測定するためと考えられ、本手法により、通常の AFM による力学作用計測では得られない、試料の形状に依存した力学情報を得られることが示された。

(2) ゼブラフィッシュ胚による実験

水中にあるゼブラフィッシュの発生初期胚（直径約 1 mm）をガラス基板に配置し、電動ステージ上に静置し、探針を試料の上部に接触させた。そこにパルスエネルギー 2.0 $\mu\text{J}/\text{pulse}$ の単発パルスを試料から 100 μm 離れた距離に集光照射し、試料に生じた振動を AFM 探針により検出した（図 5）。実験で用いた胚に、胚の細胞内で細胞骨格を形成するアクチンフィラメントの状態を変化させる薬剤（formin 阻害剤、arp2/3 阻害剤、actin 阻害剤）を胚に浸透させることにより、胚の剛性を変化させ、通常の胚と比較した。AFM によるフォースカーブ計測も同時に行い、その結果とも比較した。

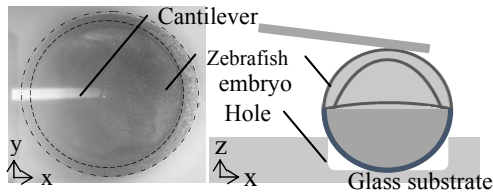


図 5 AFM 探針が接触したゼブラフィッシュの発生初期胚の顕微鏡写真（左）と模式図（右）

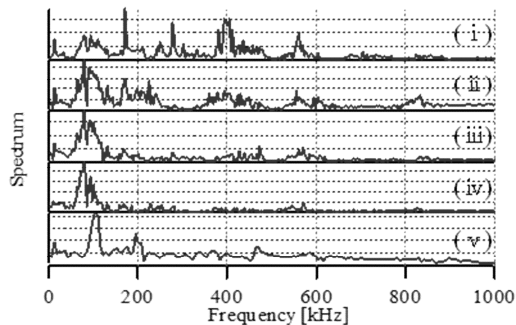


図 6 ゼブラフィッシュの発生初期胚の振動波形をフーリエ変換することにより得られた周波数ベクトル。() arp 阻害剤を含んだ胚、() 通常の胚、() formin 阻害剤を含んだ胚、() actin 阻害剤を含んだ胚、() AFM 探針のみ、の振動スベクトル

図 6 に得られた振動波形をフーリエ変換した周波数スペクトルを示す。試料 () から () に向かって、400 kHz から 600 kHz の高周波成分が減少し、300 kHz 以下の低周波成分が支配的になることが分かる。これは、試料の剛性が () から () に向かって低下していることを示唆している。試料 ()

に添加した arp 阻害剤は、細胞内のアクチンフィラメントの形成時に分岐を促進すると考えられ、細胞が通常の胚 () よりも硬化している可能性が高い。試料 () と () に添加した formin 阻害剤と arp 阻害剤は共に、アクチンフィラメントの形成を阻害するものであり、それらの細胞は、通常の胚 () よりも軟化している可能性が高い。またフォースカーブの計測においても同様の結果を得ている。数 100 kHz 付近の振動は、胚全体ではなく、個々の細胞に由来する振動を検出していると考えられ、本実験の結果は、本手法により細胞単体に起因する剛性に関する力学情報が得られることが示された。

(3) 疑似生体組織を用いた実験

細胞大（直径 14 μm ）の空孔がハニカム状に配列した 1,2-ブタジエン製のフィルム（ハニカムフィルム）を任意の大きさに切断し、空孔を純水で満たした後、カバーガラスで蓋をし、疑似細胞組織試料とした。試料を倒立顕微鏡のステージ上に配置し、AFM 探針に接触させ、パルスエネルギー 1.5 $\mu\text{J}/\text{pulse}$ の単発パルスを、10 倍対物レンズ（NA : 0.25）により集光照射した。衝撃力の作用により生じたハニカムフィルムの弾性振動を、AFM 探針の曲げとねじれの時間変化として検出した。さらに、この振動伝搬におけるフィルムの形状依存性を評価するために、フィルムにフェムト秒レーザー加工を施し、空孔が一次元および二次元に配列した短冊フィルム（図 7）、400 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ の領域を切抜いたフィルム（図 9）を作製し、実験を行った。

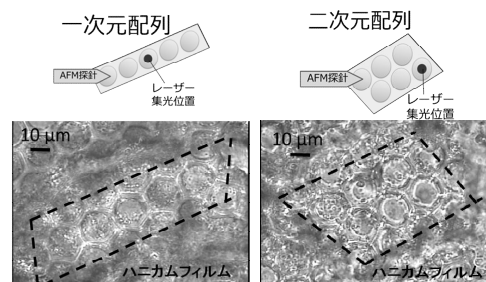


図 7 一次元（左）と二次元（右）に空孔が配列した短冊状のハニカムフィルム。（破線に沿ってレーザーによりフィルムは切断されている。）

短冊型ハニカムフィルムの振動挙動

図 8 に空孔が一次元および二次元配列したフィルム上での AFM 探針のねじれ振動の時間波形を示す。一次元配列型のフィルム上では、40 - 130 μs の時間に、二次元配列型のフィルムよりも顕著な振幅が観察された。この振動は、フィルム全体の伸縮振動に対応する。一方で、フィルムの表面弾性波に対応する AFM 短針の曲げ振動は、40 μs 以内に観測され、フィルムの形状に依存しなかった。この結果は、一次元配列型のフィルムの方が、表面弾性波の緩和によるフィルム全体の伸

縮振動が効率的に誘導されることを示している。

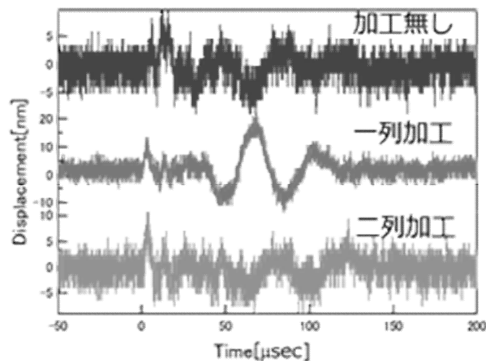


図8 短冊型フィルムのねじれ振動

欠損型ハニカムフィルムの振動挙動
 フィルム上のレーザー集光位置から 200 μm 離れた位置に AFM 探針を接触させ、集光点と探針の間に欠損を設けたときの振動挙動について調べた。図 10 に、欠損がないとき(上)と、あるとき(下)の AFM 探針の曲げ振動の時間波形を示す。10 μs 以内の初期振動は体積波の伝搬によるフィルムの縦波、その後の振動は表面弾性波によるものと考えられる。フィルムの欠損の有無で、表面弾性に由来する振動の始点(図 10 中の矢印)が変化し、その時間差は 3.54 μs であった。図 9 に示す欠損がないとき(右上)と、あるとき(右下)に生じる弾性波の伝搬距離の差 Δl は、約 300 μm になると見積もられる。フィルムの物性より見積もられる表面弾性波の伝搬速度は 100 m/s であり、表面弾性波の伝搬の時間差は約 3 μs と見積もられ、図 10 の矢印の時間差とほぼ一致する。

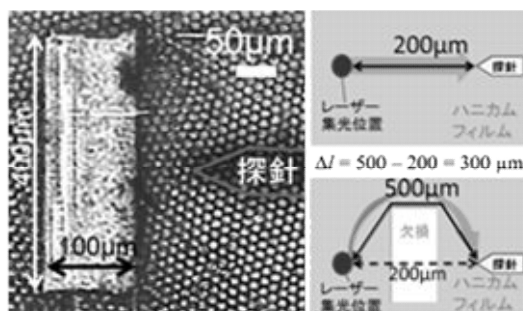


図9 400 × 100 μm の領域を切り抜かれた欠損型フィルムの顕微鏡写真(左)と無欠損フィルムとの振動伝搬の違いを示す模式図(右)

本実験により、微小試料の形状に依存した振動情報を本手法により検出できることが、明らかになった。その振動挙動を体積波と表面弾性波に基づき説明することができ、その結果は FEM 法による数値シミュレーションにおいても再現されている。つまり、実験と

シミュレーションを合わせたトモグラフィ解析に本手法を拡張することで、不均一な細胞組織の構造情報と力学情報を検出できる可能性が示された。

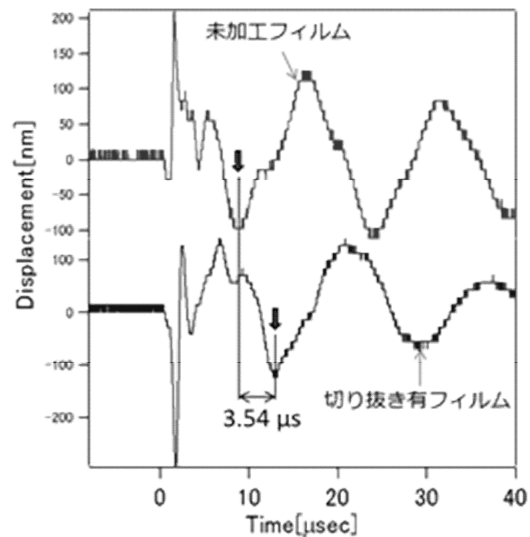


図10 400 × 100 μm の領域を切り抜かれた欠損型フィルムの顕微鏡写真(左)

(4) 培養細胞組織を用いた実験

ガラス基板上に培養されたイヌ腎臓尿管上皮細胞由来の細胞株(MDCK)を用いて実験を行った。図 11 に示すように MDCK 培養細胞上に AFM 探針を接触させ、探針先端から 10 μm 離れた位置にフェムト秒レーザーを集光照射し、その時に誘導される振動を AFM 探針により検出した。

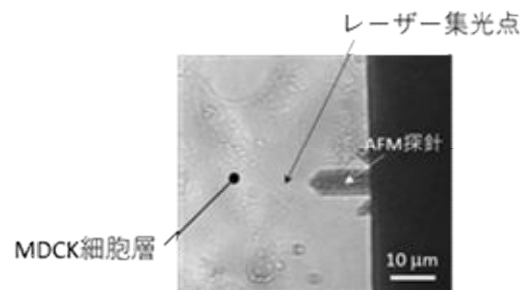


図11 AFM 探針が接触した培養動物細胞の顕微鏡写真(左)

図 12 に MDCK 培養細胞の力学応答の計測結果を示す。細胞がない培養液中でフェムト秒レーザーを集光した場合でも、培養液に誘導される爆発現象により衝撃力は発生し、それによる AFM 探針の振動が観察された。しかしながら、細胞がある場合とない場合で観察された。振動波形を高速フーリエ変換により周波数展開し(図 12(a)から図 12(b))、その振動周波数を比較し

た結果、両者に、有意な差を見出すことができた(図12(c))。本実験におけるフェムト秒レーザーパルスのエネルギー(数10 nJ)は十分に小さなものであり、透過像として観察できるほどの形状変化を細胞にもたらずものではなかった。この結果は、今手法の適用範囲が、細胞組織1層にまであることを示している。

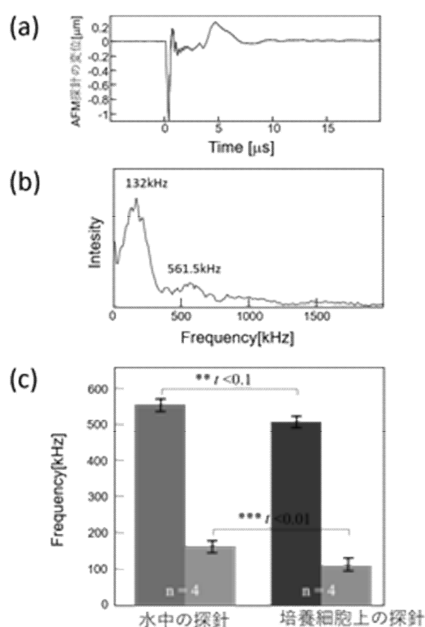


図12 レーザー誘起衝撃力によるMDCK培養動物細胞の力学応答

以上の結果より、本研究で開発された実験システムにより、微小生体試料に潜在する応力テンソルに起因する情報を、フェムト秒レーザー誘起衝撃力により顕在化し、従来法とは異なる動的な振動情報を得ることにより、試料に起因する形状や物性の情報を検出できることが明示された。この計測手法を発展させ、トモグラフィ解析や高速イメージングによる画像解析を組み合わせていくことにより、細胞レベルの組織に内在する応力分布を明らかにできる画期的な手法が開発されることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

T. Iino, T. Furuno, M. Hagiwara, A. Ito, Y. Hosokawa, Mechanical response of single nerve cells estimated by femtosecond laser-induced impulsive force, Proceeding of SPIE, 査読有, 9355, Frontiers in Ultrafast Optics: Biomedical, Scientific, and Industrial Applications XV, Proc. SPIE, 93550B (2015)

DOI:10.1117/12.2078664

細川陽一郎, 上段寛久, 飯野敬矩, フェムト秒レーザー有期衝撃力への作用の力学モデル, レーザ加工学会誌, 査読有, .21, .3,

163-169 (2014)

T. Iino, P.-L. Lin, W.-Z. Wang, J.-H. Deng, Y.-C. Lu, F.-J. Kao, Y. Hosokawa, Contribution of stress wave and cavitation bubble in evaluation of cell-cell adhesion by femtosecond Laser-induced impulse, Appl. Phys. A, 査読有, 117, 1, 389-393 (2014)

DOI:10.1007/s00339-014-8498-9

M. Takenaka, T. Iino, A. Nagatani, Y. Hosokawa, Nanoscale bending movement of biological micro-object induced by femtosecond laser impulse and its detection by AFM, Appl. Phys. Express, 査読有, 7, 8, 087002 (2014)

DOI:10.7567/APEX.7.087002

T. Hirashima, Y. Hosokawa, T. Iino, M. Nagayama, On fundamental cellular processes for emergence of collective epithelial movement, Biology Open, 査読有, 2, 7, 660-666 (2013)

DOI:10.1242/bio.20134523

[学会発表](計40件)

Y. Hosokawa, Quantification of calcium ion response of single animal cells revealed by femtosecond laser-induced impulsive force, The 26th CDB Meeting Mechanistic Perspectives of Multicellular Organization, September 8-9, 2015, 理化学研究所多細胞システム形成研究センター(兵庫県神戸市)

Y. Hosokawa, T. Iino, A. Shigemasa, K. Oikawa, J. Kobayashi, M. Nishimura, A. Nagatani, Femtosecond Laser Processing and Manipulation of Plant Cells for Investigation of Plant Physiology, The 7th International Congress on Laser Advanced Materials Processing, May 26-29, 2015, 北九州国際会議場(福岡県北九州市)

T. Kono, T. Iino, Y. Miki, D. Takahashi, Y. Kawamura, M. Uemura, Y. Hosokawa, Freezing process of plant extract solution by femtosecond laser impulse, PSROC 2015 Annual Meeting, January 28-30, 2015, Hsinchu (Taiwan)

Y. Hosokawa, M. Takenaka, T. Iino, Nanoscale Bending Movement of Biological Micro-Object Induced by Femtosecond Laser Impulse and Its Detection by AFM, The 12th International Conference on Laser Ablation (COLA 2013), October 6-11, 2013, Ischia (Italy)

[その他]

ホームページ等

http://mswebs.naist.jp/LABs/env_photo_greenbio/Index/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 陽一郎 (HOSOKAWA Yoichiroh)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号: 20448088