

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19038

研究課題名（和文）単一細胞内マイクロ共振器レーザー発振

研究課題名（英文）Microcavity laser oscillation inside single cell

研究代表者

榎波 康文（Enami, Yasufumi）

福井大学・産学官連携本部・客員教授

研究者番号：90377474

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：マイクロ共振器内部に緑色蛍光微粒子を導入するためにリポソームを使用して実験を行った。リポソームは脂質二重層からなる閉鎖小胞であり、生体膜モデルなど利用されてきた。リポソームとは細胞を構成する有機物の中で細胞膜や生体膜の構成成分であるリン脂質を用いて水中で作製可能なカプセルであり、真球に近い形状とすることができる。リポソーム内部に緑色蛍光微粒子を含有できるためマイクロ共振器型生体レーザーに適したものであることを見いだした。波長488nmレーザーを用いて本リポソームに照射しリポソーム疑似細胞からの緑色蛍光測定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体細胞を用いた生体レーザー研究は挑戦的でまだその実証例が十分になされていないことにより更なる実験と計算が必要であるが、リポソームが微小共振器を構成する微小球として有望な候補であることを見出した。さらにリポソームを用いた緑色蛍光測定を行ったことから今後の最適化により生体レーザー発振実験へと展開可能であることも見出した。実験再開できる時期までは計算等を主体に行い将来へと発展させる。

研究成果の概要（英文）：We proposed and proceeded the experiment to find the optimized the microcavity to realize the living cell laser oscillation. Experiments were performed using liposomes to incorporate green fluorescent particles inside the microresonator. Liposomes are closed vesicles composed of lipid bilayers, and have been used as biomembrane models. A liposome is a capsule that can be produced in water by using phospholipid, which is a constituent component of a cell membrane or a biological membrane. It has also been experimentally shown that cells with various shapes of cells grow by the remodeling of cells encapsulating cytoskeletal proteins in liposomes. Furthermore, we have found that it is suitable for a microcavity biomedical laser because it can contain green fluorescent protein inside. The liposomes were irradiated with a wavelength 488 nm laser to measure green fluorescence from liposome pseudo cells.

研究分野：光科学、光導波路、バイオセンサ、レーザー

キーワード：生体レーザー 単一細胞観測 マイクロ共振器レーザー 緑色蛍光微粒子 リポソーム 疑似細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

代表研究者らは緑色蛍光タンパク質(GFP)を光導波路に用いたバイオセンサ研究を行ってきた。半導体材料と生体はその融合が困難であるが、GFP 生体を光導波路コアに混入した光導波路を初めて報告した。青色レーザー光で本光導波路を励起し緑色蛍光を光導波路から出射することに成功した。さらに本光導波路を用い有機リン化合物の1分以内の検出を行うだけでなく、新型インフルエンザ H1N1 ウィルスを検出するために抗原をゾルゲルシリカ光導波路に付着してそのウィルスの超高速検出も成功するなど生体による蛍光やレーザリングについて深い洞察を行ってきた。本研究はそれを発展させ細胞内部でマイクロ共振器によるレーザ発振を行い医学、生物学で障壁となっている蛍光顕微鏡解像度を飛躍的に向上させるための障壁突破になると考える。

生体レーザを細胞内部で発振させることにより1細胞の挙動を解明するための研究へと発展させる。量子ドットは抗体と結合させることにより細胞分化の際にも抗体抗原反応を利用して必要な1細胞に対して量子ドットを付着させることができる。同様にして GFP を修飾させたマイクロビーズも抗体と結合することにより1細胞を所望の場所に移動させることができるのでその細胞を追跡することが可能である。このような分化する細胞に対しても生体レーザ発振させることも可能である。GFP は医学生物学に広く用いられており、蛍光強度波長幅をレーザリングにより nm オーダーにすれば、細胞1個毎の弁別も可能となりより蛍光顕微鏡観測ではなしえない正確で再現性の高い測定や観測が可能となるため医学生物学に大きなインパクトを持つ。本研究により数十万から数千万の細胞の中からがん細胞1個レベルでの希少な単一細胞を正確に解析できればこれまで困難で有った細胞機能解析や各種疾患の発症前の早期診断にも寄与すると考える。

## 2. 研究の目的

生体観測やイメージングのために緑色蛍光タンパク質(GFP)をはじめとする蛍光タンパク質が使用されてきたが蛍光顕微鏡下での回折限界から約 200nm 以下の領域の細胞を弁別することは困難であった(図1参照)。これを克服するために(1)量子ドット又は(2)プラズモンナノ粒子等を細胞内部に配置し生体のラベリングに用い主に蛍光顕微鏡下で解像度を向上させた観測が一般的である(図1(a)参照)。しかしながら蛍光顕微鏡下での観測はその解像度にも限界があり量子ドットにおいてもその蛍光波長範囲は広く(100nm程度)細胞内部を観測する際に細胞からの蛍光が重畳する。したがって、現在の方法ではその蛍光の解像度の比較的拡大、蛍光の定量的評価、安定性及び再現性において解決すべき多くの問題を有している。本研究においては我々の研究において実績のある GFP を用い1細胞内部での生体レーザを発振させるとともにこれらを光導波路に用いて高強度のレーザ発振を実証し、発振レーザ幅を数 nm とすることにより蛍光顕微鏡による手法に比べ 100倍以上に弁別能力(解像度)を向上させる(図2(b)参照)。さらに1細胞からのレーザ光の長期安定的で定量的な評価を行い1細胞の挙動を観測する。本研究において細胞内部の(i)マイクロビーズ表面への GFP や蛍光色素配置や(ii)酵母や人細胞内部に油脂球を導入すると共に GFP を取り込み、(iii)これらの微小球を外部レーザ波長 488nm で励起することによりウィスパーリング・ギャラリ・モードによるレーザ発振を行う。これにより生体レーザを細胞内部で発振させ1細胞内部のラベリングを行い医学生物学への応用を実現する。さらにこれらの細胞を光導波路に混入することにより医学応用やバイオセンシング応用を行う。

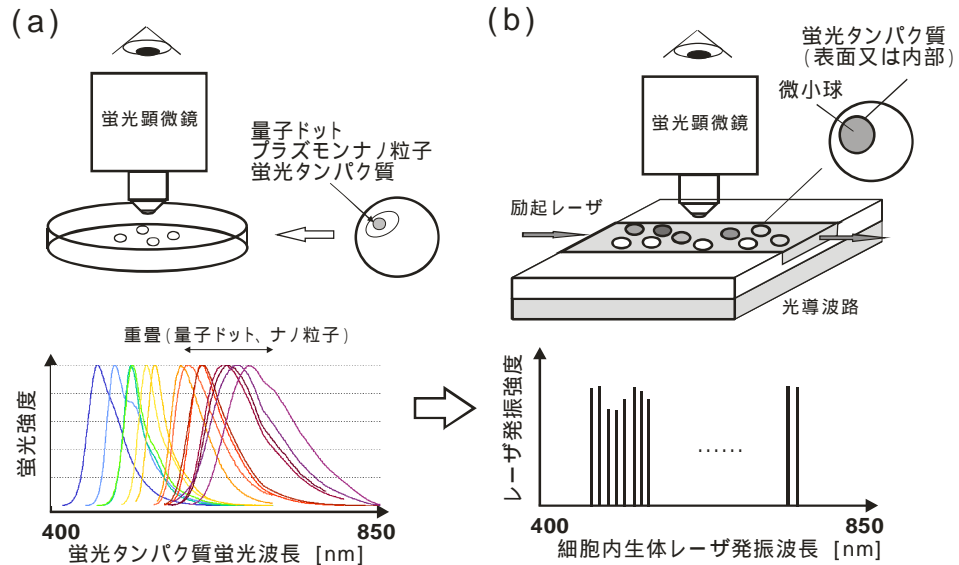


図 1 蛍光タンパク質を用いた単一細胞内生体レーザー発振による 1 細胞からの出力するレーザー光の波長スペクトラム(a) 従来の GFP を細胞に組み込んだ場合の蛍光顕微鏡での蛍光観測と量子ドットや金属プラズモンナノ粒子を使用して蛍光波長を狭くした場合(100nm)の限界。(b)細胞内部に蛍光タンパク質を有する微小球内部においてウィスパーリングギャラリモードを励起してレーザー発振した場合のレーザー発振強度スペクトラム

### 3. 研究の方法

細胞トレース用緑色蛍光色素で修飾したポリスチレン微小球(3 - 10  $\mu\text{m}$  径)をマイクロ共振器として使用し、図 2 に示すヒト細胞や酵母細胞内部にインジェクションすることで配置する。その後これらの細胞をペトリディッシュ等に置き波長 488nm のレーザー光を細胞に照射する。図 1(a)に示す蛍光顕微鏡を利用し 1 細胞に対しては波長 488nm パルスレーザー光(10nJ) を焦点し、微小球マイクロ共振器内部でウィスパーリングギャラリモードを生起させ波長 500-580 nm のいずれかの波長でのレーザー発振を行うとともにレーザー発振閾値等のレーザーパラメータを測定する。次に酵母やヒト細胞内部に存在する油脂と同様の油脂に蛍光色素を混入し(図 2(b)参照)その後細胞内部に油脂を導入する。油脂量と油脂径の関係を求めた後、波長 488nm で本マイクロ共振器を励起して蛍光顕微鏡下での発振測定を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 脂質二重層からなる閉鎖小胞内部への緑色蛍光粒子による微小共振器作製

本研究においては図 2 に示すようなマイクロ共振器内部に緑色蛍光分子で修飾した微粒子を混入するためにリポソームを使用して実験を行った。リポソームは脂質二重層からなる閉鎖小胞であり、生体膜モデルなど利用されてきた。リポソームとは細胞を構成する有機物の中で細胞膜や生体膜の構成成分であるリン脂質を用いて水中で作製可能なカプセルであり、真球に近い形状とすることができる。リポソームに緑色蛍光修飾した微粒子を閉

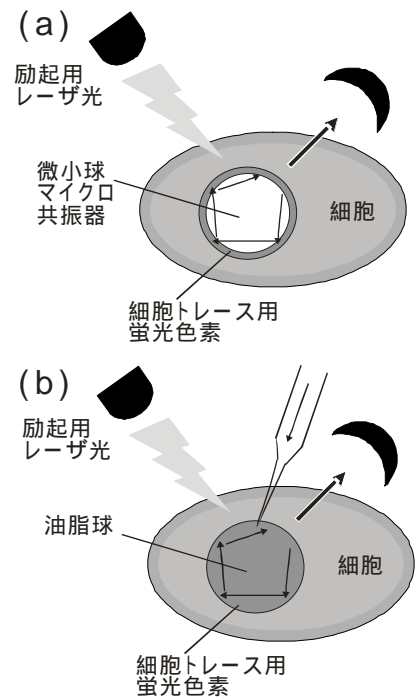


図 2 細胞内に配置したマイクロ共振器型レーザー (a) 細胞内に蛍光色素で修飾したポリスチレン微小球を配置したマイクロ共振器構造 (b) 細胞内に細胞色素を混入した油脂球を注射により導入

じ込め細胞構造を模倣することにより細胞のもつ多様な形状へ成長可能であることも実験的に示されている。さらに内部に緑色蛍光粒子を含有できるためマイクロ共振器型生体レーザーに適したものであることを見いだした。リポソームは細胞に類似した構造であるため本生体レーザーに成功すればその後実際の細胞への適用も容易である。リポソームは水溶液のコアを持ち、脂質二重層の疎水的な膜に囲まれている。コア中の親水性の溶質は、脂質二重層を容易に通過することはできない。疎水的な化学物質は二重層に結合する。したがって、リポソームには親水的な分子も疎水的な分子も搭載することができる。脂質二重層は細胞膜などの他の二重層と融合することができるため、リポソームの内容物を作用部位へと輸送することができる。

## (2) 共振器型レーザー発振実験

リポソームに緑色蛍光粒子を含有した水滴を2枚の顕微鏡スライドガラス間に挟みこみ、このスライドガラスに対して垂直に波長488nmレーザー光を入射した。中心波長510nmの蛍光をスペクトラムアナライザで解析し、共振波長を求めるための実験を行った。その結果、微小共振器に使用した微小球半径が最適されていなかったため、共振波長を見出すことが困難であった。今後はリポソームの光損失と緑色蛍光粒子の蛍光を定量的に調べることで研究を進展させ、生体レーザー発振をおこなうための実験を予定している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Enami Yasufumi	4. 巻 2017
2. 論文標題 Fabricating 90nm Resolution Structures in Sol-Gel Silica Optical Waveguides for Biosensor Applications	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Sensors	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2017/4198485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Jouane Youssef, Luo Jingdong, Jen Alex K-Y, Enami Yasufumi	4. 巻 19
2. 論文標題 Increased electro-optic effect in a guest?host electro-optic polymer by adding PEDOT:PSS as an interfacial barrier layer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Optics	6. 最初と最後の頁 045503 ~ 045503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/2040-8986/aa598b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Jouane Youssef, Enami Yasufumi	4. 巻 94
2. 論文標題 Nanolayer-transfer method of TiO <sub>2</sub> slot layers and its application for fabricating hybrid electro-optic polymer/TiO <sub>2</sub> vertical slot waveguide modulators	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Optics & Laser Technology	6. 最初と最後の頁 146 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.optlastec.2017.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhang Dan, Enami Yasufumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Simulation for Optical Response of High-Speed Traveling Wave Electro-Optic Polymer/TiO <sub>2</sub> Multilayer Slot Waveguide Modulators	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 IEEE Photonics Journal	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1109/JPHOT.2017.2700870">https://doi.org/10.1109/JPHOT.2017.2700870</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang Jih-Cheng, Tung Yu-Ching, Ichiki Keishi, Sakamoto Hiroaki, Yang Tai-Hua, Suye Shin-ichiro, Chuang Han-Sheng	4. 巻 148
2. 論文標題 Culture-free detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by using self-driving diffusometric DNA nanosensors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 111817 ~ 111817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2019.111817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Enami Yasufumi, Seki Atsushi, Masuda Shin, Joichi Tomoki, Luo Jingdong, Jen Alex K-Y.	4. 巻 36
2. 論文標題 Bandwidth Optimization for Mach-Zehnder Polymer/Sol-Gel Modulators	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Lightwave Technology	6. 最初と最後の頁 4181 ~ 4189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/JLT.2018.2860924	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Y. Enami
2. 発表標題 " 130GHz bandwidth based on ultrafast electro-optic polymer/sol-gel modulators
3. 学会等名 Bit's 6th Annual World Congress of Advanced Materials-2017(WCAM-2017), Xian China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Enami, A.Seki, S. Masuda, J. Luo, A. K-Y. Jen
2. 発表標題 " Demonstration of 130 GHz ultra-broadband Mach-Zehnder intensity modulators based on hybrid polymer/sol-gel waveguide "
3. 学会等名 EMN Photonics 2017, Budapest Hungary (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Enami, A.Seki, S. Masuda, J. Luo, A. K-Y. Jen,
2. 発表標題 “ Ultra-broadband Mach-Zehnder hybrid electro-optic polymer/sol-gel silica waveguide modulators ”
3. 学会等名 Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) 2017, SM20.5 San Jose, USA ( 国際学会 )
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Enami, A.Seki, S. Masuda, J. Luo, A. K-Y. Jen,
2. 発表標題 “ 130 GHz broadband Mach-Zehnder hybrid electro-optic polymer/sol-gel silica waveguide modulators ”
3. 学会等名 Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) pacific rim 2017s1341, Singapore ( 国際学会 )
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松島雛子, 一木啓志, 童兪静, 莊漢聲, 高村映一郎, 里村武範, 坂元博昭
2. 発表標題 “ プローブ粒子液中拡散挙動に基づいた画像解析によるMRSA DNAセンサの構築 ”
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂元博昭, 一木啓志, 松島雛子, 童静, 莊漢聲, 高村映一郎, 末信一朗
2. 発表標題 “ 画像解析によるナノ粒子拡散を指標としたDNAセンサの開発 ”
3. 学会等名 2019年電気化学秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Enami, J. Luo, and A. K-Y. Jen,
2. 発表標題 “ Analysis and demonstration of 130 GHz bandwidth for Mach-Zehnder hybrid polymer/solgel modulators
3. 学会等名 2018 Collaborative Conference on Materials Research (CCMR), Seoul Korea, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Enami, A. Seki, S. Masuda, J. Luo, A. K-Y. Jen,
2. 発表標題 “ Ultra-broadband Mach-Zehnder hybrid electro-optic polymer/sol-gel silica waveguide modulators ” ,
3. 学会等名 World Congress on Semiconductors, Optoelectronics and Nano structure 2018(WCSON-2018), Kuala Lumpur, Malaysia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Enami,
2. 発表標題 “ Ultra-broadband hybrid polymer/sol-gel waveguide modulators ”
3. 学会等名 IEEE CPMT Symposium Japan 2018(Formerly VLSI Packaging Workshop in Japan), Kyoto University. Kyoto Japan. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Enami
2. 発表標題 “ Ultra-Broadband Hybrid Polymer/Sol-gel Waveguide Modulators ”
3. 学会等名 Optical Fiber Communication Conference (OFC) 2020, San Diego, California, USA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Y. Enami, A.Seki, S. Masuda, J. Luo, A. K-Y. Jen
2. 発表標題 " 130 GHz broadband Mach-Zehnder hybrid electro-optic polymer/sol-gel silica waveguide modulators "
3. 学会等名 Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) pacific rim 2017, s1341, Singapore (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Enami, A.Seki, S. Masuda, J. Luo, A. K-Y. Jen
2. 発表標題 " Analysis of ultra-high speed Mach-Zehnder hybrid polymer/sol-gel waveguide modulators "
3. 学会等名 Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) pacific rim 2018, Th2J. 5, Hong Kong (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 S. Suye	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Ueda, Mitsuyoshi (Editor), Springer	5. 総ページ数 13
3. 書名 "Yeast Cell Surface Engineering", Biological Mechanisms and Practical Applications, Application of Cell Surface Engineering to Biosensing System	

1. 著者名 末 信一朗, 高山 勝己	4. 発行年 2020年
2. 出版社 植田充美監修 シーエムシー出版	5. 総ページ数 246
3. 書名 細胞表層工学の進展	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	末 信一郎  (Suye Shin-ichiro)  (90206376)	福井大学・学術研究院工学系部門・教授    (13401)	
連携 研究者	藤田 聡  (Fujita Satoshi)  (60504652)	福井大学・学術研究院工学系部門・准教授    (13401)	