

研究種目：若手研究（A）
研究期間：2007～2010
課題番号：19686007
研究課題名（和文） 集光フェムト秒レーザーが蛋白質溶液および細胞に引き起こす非線形現象の制御
研究課題名（英文） Control of nonlinear processes of protein solution and biological cells induced by focused femtosecond laser
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・特任准教授
研究者番号：20448088

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学 基礎工学・応用光学 量子光工学

キーワード：フェムト秒レーザー，原子間力顕微鏡，蛋白質，細胞，衝撃波

1. 研究計画の概要

高強度の近赤外フェムト秒レーザーパルスを水に集光すると、多光子吸収によりその集光点で爆発的な水の形態変化が誘起され、衝撃波およびキャビテーションバブルが発生する。細胞の70%以上の成分は水であり、同様の現象が生細胞内でも引き起こされる。本研究は、原子間力顕微鏡(AFM)を利用した新規な微小領域圧力測定方法を駆使し、フェムト秒レーザーを蛋白質溶液および細胞に集光したときに発生する衝撃波およびキャビテーションバブルの時間的・空間的発展を明らかにし、それを利用した単一細胞および蛋白質溶液の高度な制御方法の確立を目指す。

2. 研究の進捗状況

本研究により、衝撃波およびキャビテーションバブルの発生過程で生じる衝撃力を原子間力顕微鏡(AFM)により検出できるシステムを構築し、その評価が行えるようになった。その詳細を下記に示す。

(1)AFM 探針の挙動観察

フェムト秒レーザー誘起応力波により誘起される AFM 探針の揺れを、光テコにより四分分割フォトダイオード(QPD)で検出した。次に探針をガラス基板に押しつけて、探針の変位と QPD の電位変化の関係を求め、応力波による QPD の電位変化を探針の移動量に変換した。さらに探針のバネ定数から、力の変位を求めた。

(2)AFM 探針の振動解析による衝撃力の定量

AFM探針の振動挙動を質点モデルに基づく運動方程式により解析し、レーザー集光点で発生する衝撃力を力積として評価することに成功した。細胞の引きはがしに必要なレーザー強度で発生する力積は、 10^{-12} [Ns]オーダーであると見積もられた。高速カメラによる観察結果より、探針に衝撃力が付加される時間は μ s オーダーであり、これらの結果は、細胞が μ s の時間に μ N オーダーの力を受けたことを意味している。一般にレーザトラッピングで細胞に付加される力は pN オーダーであり、フェムト秒レーザーにより誘起される衝撃力により付加される力は、瞬間ではあるがその百万倍に相当することが明らかになった。

(3)細胞の接着力評価

AFM探針の代わりに、実験で用いた培養動物細胞を配置した幾何モデルを構築し、その時に細胞が受ける力を評価した。動物細胞の培養系として、①神経細胞の神経軸策にマスト細胞が接着した系、②血管内皮細胞に白血球が接着した系、③上皮細胞がタイトパッキングした系を準備し、フェムト秒レーザーにより発生させた衝撃力を付加した細胞の引きはがし実験を行い、引きはがしのしきい値となるレーザー強度でその集光点で発生する衝撃力を見積もった。②の血管内皮細胞と白血球の接着力については、これまでに Cell force spectroscopy により調べられており、その結果と相関のとれる力が、本手法で評価できていることを示した。①と③の培養系における細胞間の接着力は、Cell force spectroscopy で評価することは不可能であり、本研究により初めてその接着力を定量評価することに成功した。

3. 現在までの達成度

②おおもむね順調に進展している。

(理由) 上記に示した研究結果は、フェムト秒レーザーにより誘起される非線形現象が新しい細胞操作や細胞評価の方法として利用できることを示す結果であり、本研究の主目的はほぼ達成されたと言える。一方で、新しい方法であるが故に、衝撃力の定量化の精度や、さらにその奥に潜む物理現象や生理現象については、まだまだ未知の可能性を感じており、本研究を完成させていくと同時に、さらにその応用の可能性を広げていきたいと考えている。

4. 今後の研究の推進方策

これまでの研究で明らかにしてきた物理現象をもとに有限要素法に基づくシミュレーションを行い、フェムト秒レーザーにより水中に誘起される非線形現象をより詳細に明らかにしていくと共に、現象予測を試みる。この計算では、AFM探針の形状をPC上でモデリングし、それを微小要素に分割して、それぞれの要素に対して運動方程式を代入し、初期条件として応力波により想定される荷重を探針に付加し、その後の振動ダイナミクスをPC上で再現する。その計算結果と実測されたAFM探針の振動データを照合し、上記の質点モデルに基づく解析の妥当性、さらには応力波伝搬挙動の詳細について検証を進める。さらに細胞の接着力測定の際の細胞配置をモデリングし、AFM探針の挙動の再現に用いた応力波の荷重を初期条件として与え、細胞間の接着力を求める。これまでに求められている細胞接着の引きはがしに必要とされる力は応力波の荷重の初期条件に相当するものであり、この解析により細胞間の接着力を初めて求められる。さらに応力波により生じる水溶液中の過渡的な流動や圧縮について計算し、応力波がタンパク質の凝集にもたらす効果についても考察する。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計6件)

- ① Y. Hosokawa, S. Iguchi, R. Yasukuni, Y. Hiraki, C. Shukunami, H. Masuhara, Gene Delivery Process in a Single Animal Cell after Femtosecond Laser Microinjection, Appl. Surf. Sci., Vol. 255, pp.9880-9884, 2009, 査読有
- ② M. Takagi, T. Kitabayashi, S. Koizumi,

H. Hirose, S. Kondo, M. Fujiwara, K. Ueno, M. Hiroaki, Y. Hosokawa, H. Masuhara, S. Wakitani, Correlation between cell morphology and aggrecan gene expression level during differentiation from mesenchymalstem cells to chondrocytes, Biotechnol. Lett., Vol. 30, pp. 1189-1195, 2008, 査読有

③ A. Yamaguchi, Y. Hosokawa, G. Loit, T. Asahi, H. Masuhara, Nanoparticle injection to single animal cells using femtosecond laser-induced impulsive force, Appl. Phys. A, Vol. 93, pp. 39-43, 2008, 査読有

[学会発表] (計5件)

① 細川陽一郎, CREST 講演会「光で拓く細胞から染色体の世界」, 基礎医学のためのフェムト秒レーザー衝撃力による異種細胞間の個別接着力評価, 2009.8.20, 東京, 招待講演

② 細川陽一郎, 第31回日本生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会(BMB2008), フェムト秒レーザー衝撃波を利用した新しい細胞操作と生命科学研究への展開, 2008.12.9, 兵庫, 招待講演

③ Y. Hosokawa, H. Masuhara, 6th International Conference on Photo-Excited Processes and Applications (ICPEPA2008), Micro-activation of Cultured Animal Cells by Focused Femtosecond Laser, 2008.9.9, 北海道, 招待講演

[その他]

ホームページアドレス

<http://hskw.jp>