

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288070

研究課題名(和文) 近赤外差動型レーザー誘起表面変位顕微鏡の開発と単一生細胞レオロジー計測への応用

研究課題名(英文) Development of the Near-infrared Differential Laser-induced Surface Deformation Microscope and its Application to the Measurements on Rheological Properties of Single Living Cells

研究代表者

由井 宏治 (Yui, Hiroharu)

東京理科大学・理学部・教授

研究者番号：20313017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：生きた細胞1個のレオロジーを非破壊・非接触で計測するために、近赤外レーザー誘起表面変位(NIR-LISD)顕微鏡を開発した。LISD法によって、細胞の動的な緩和応答を観測可能な最大周波数が、従来法である原子間力顕微鏡やオプティカルストレッチャーでは1 kHz程度だったのに対し、300 kHzまで拡張することで、LISD法によって正常細胞とがん細胞の区別ができる可能性が示された。可視光を細胞に照射するときは、光による熱損傷を注意する必要があったが、近赤外光を用いることで熱損傷が軽減された。さらに、検出を反射型配置にすることによって、細胞1個からの動的粘弾性パワースペクトルの計測に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a near-infrared laser-induced surface deformation (NIR-LISD) microscope to measure the rheological properties of single living cells in non-destructive and non-contact manner. The LISD method enabled us to extend the upper limit of the frequency for the dynamic viscoelastic measurements of single cells up to 300 kHz compared to c.a. 1 kHz in the use of the conventional methods such as atomic force microscope and optical stretcher. By the extension of the frequency, it was indicated that the LISD method had the potential to discriminate in viscoelastic properties between normal and cancerous cells. Although we needed to pay attention to the thermal damage of the cells in the irradiation of the visible laser, it was shown that the damage was diminished by the application of the infrared laser. Furthermore, we successfully measured the power spectra of single cells by the reflection-type arrangement of the detection system in the NIR-LISD microscope.

研究分野：分析化学

キーワード：細胞 力学応答 近赤外光 顕微鏡 光圧 パワースペクトル

1. 研究開始当初の背景

目的の形状の組織を構築する再生医療工学や、がんの転移機構の解明など医療・生命科学において、近年、細胞の粘弾性や流動性などのレオロジー計測の重要性がとみに高まりつつある。例えば、同一組織内の細胞の部位別のかたさや柔らかさの僅かな違いが、目などの高次構造を有する組織の自発的形成を促す例や (*Nature*, vol. 472, 51–56 (2011)) 同一細胞内における粘弾性の違いと細胞移動機構との深い関係を示す研究成果 (*Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, 512–522 (2011)) が報告されている。しかし、組織内または遊離した単一の細胞における粘弾性を非破壊・非接触で計測できる手段はなく、新たな計測ツールの開発が求められている。

我々はこれまで、液体界面にレーザー光を照射し、その光散乱スペクトルを計測することで、界面の張力や粘性を非破壊・非接触でリアルタイム追跡できる「時間分解弾性レーザー散乱 (TR-QELS) 法」を開発してきた (*Anal. Sci.*, vol. 20, 1501–1507 (2004) (総説))。我々はこの手法を、モデル生体膜におけるリン脂質の加水分解酵素反応や、脂質分子の輸送に伴う非線形発振現象の計測に応用してきた (*Anal. Chem.*, vol. 76, 2314–2320 (2004), *J. Phys. Chem. B.*, vol. 106, 2314–2318 (2002), *J. Phys. Chem. B.*, vol. 107, 8433–8438 (2003) など)。

上述の TR-QELS 法は、熱揺らぎに基づく表面変位の時間変化を計測しているため、実質的には流体的な性質が支配する液体界面に浮かべた分子膜など、熱揺らぎが界面変位として顕在化する柔らかい試料に測定対象が限定されてきた。そのため裏打ち膜蛋白質が発達した細胞膜や、細胞壁や細胞外マトリックスなど比較的弾性の高い構造を有する細胞膜の粘弾性を計測したりすることは困難であった。

そこで我々は以下の工夫を新たに導入することで上記の難点を克服できる「レーザー誘起表面変位 (LISD) 顕微鏡」の開発を着想した。当該装置は、

(1) 自発的な熱揺らぎではなくレーザー光が屈折率差のある媒質の界面を透過する際に界面に働く輻射圧を駆動力にして膜表面の変位を誘起する。

(2) 光強度を広周波数帯域で変化させながら応答を測定する事で動的粘弾性を計測する。

(3) さらに(1)、(2)を光学顕微鏡下で行うことで、単一細胞レベル内における任意の部分における粘弾性を計測できる高空間分解能を達成する。

我々はこれまでに上記の着想で試作機を作成し、実際に細胞レベルのスケールの粘弾性を計測できることを実証してきたが、さらに医療診断計測といった実用レベルにまで昇華させるには、以下に示すような解決すべき具体的課題が見つかった。

(1) 診断精度の向上のための S/N 比の改善、もしくは測定時間の短縮を目指して励起光強度を強めに設定すると、基本的に透過される可視光励起でも細胞は光ダメージを受けるケースがある。

(2) 表面変位量の相対値は比較できるが、その絶対値が求まらず、細胞間を比較するための定量的指標を確立する必要がある。

(3) 医療診断に用いるためには、表皮の細胞だけでなく、組織深部の計測もできることが望ましい。そのためには励起光を、生体組織の透過性が高い励起光を用いる必要がある。

そこで本研究では、(1)~(3)の課題を克服し、単一生細胞のレオロジーの実用的研究に充分耐えうる新たな近赤外差動型 LISD 顕微鏡の開発を着想した。

まず当該装置では、表面変位を誘起する光に近赤外光を用いることで、細胞の損傷を最小限にし、長時間追跡を可能にする。また、細胞の粘弾性を定量比較・評価するために、二つの方法を考案した。一つは、測定周波数帯域を拡張することによって、power-law を適用し、そのべき指数から定量比較する。二つ目は、測定中の溶液の熱対流や長時間測定による細胞自体の運動・変位の影響を考慮し、差動型光学配置などの導入により、変位量の絶対値計測から、まず弾性を定量評価する。そこで、本研究では、この二つの工夫を順次試みることを着想した。

2. 研究の目的

生きた細胞 1 個のレオロジーを非破壊・非接触で計測できる新規計測技術を開発する。この目的の実現のため、生体への光ダメージの少ない近赤外光を用いた差動型 LISD 顕微鏡を作成する。また、測定周波数帯域を拡張することで、power-law のべき指数から細胞の粘弾性を定量比較する。さらに、差動型光学配置などを導入することで、表面変位量を絶対値で計測する。

3. 研究の方法

上述の目標を達成するため、下記の順番で研究を推進した。

(1) 測定周波数帯域を拡張し、種々の細胞の power-law のべき指数の定量比較

(2) 近赤外光を用いた LISD 顕微鏡の開発
表面変形を誘起するためのレーザー光源の検討

近赤外光による細胞の熱損傷の軽減の確認

細胞 1 個からのパワースペクトルの検出のために、信号の検出配置を透過型および反射型で検討

差動型光学配置の導入

4. 研究成果

(1) 測定周波数帯域を拡張することで、種々の細胞の power-law のべき指数の定量比較

Power-law のべき指数の定量比較のためには、広範な周波数帯域での測定結果が求められる。さらに一般的に物体の動的粘弾性計測において、与える周期的外力の周波数領域が高くなるにつれて、応答する領域がより局所になる。よって、細胞の局所領域の応答を観測できるようにするためには、より高い周波数領域まで応答が計測可能であることが望まれる。この二つの改善が進めば、もし細胞膜に粘弾性の観点から局所的な複数の不均一構造が含まれれば、それらを見極めることも可能になる。

しかし従来の原子間力顕微鏡やオプティカルストレッチャーでは、細胞の動的な緩和応答の周波数依存性が約 1 kHz までの観測であった。そこで、LISD 顕微鏡によって、細胞の動的な緩和応答の周波数依存性が観測可能な周波数領域を拡張し、power-law のべき指数から種々の細胞を定量比較することを試みた。

テスト細胞として、繊維芽細胞 (3T3)、表皮細胞、がん細胞 (HeLa) を用いた。3T3 は、アクチン骨格および微小管が発達した細胞である。表皮細胞は、別な種類の細胞骨格である中間径フィラメントを豊富にもつ細胞である。そして、HeLa は代表的ながん細胞であり、アクチン繊維が発達していない。

各細胞の LISD パワースペクトルの結果を図 1 に示す。どの細胞においても、励起光強度の変調周波数が 1 kHz 程度までは、信号強度がプラトーな領域が観測され、その周波数領域では表面変位が外力に追従した。より高周波数領域では、信号強度が減少し、表面変位が外力に追従できなくなった。さらに、300 kHz より高い周波数領域では、周波数に対する信号強度の傾きが -2 と観測された。これは励起光によって誘起された表面変位は、熱揺らぎに埋もれたことを示している。この結果は、我々の細胞測定用の実験条件下では測定周波数帯域が 300 kHz まで拡張されたことを示している。

これまで、HeLa 細胞のようながん細胞と、3T3 のような正常細胞との間の動的な緩和応答が原子間力顕微鏡によって計測されてきたが、明らかな差異は観測されなかった。一方、LISD 顕微鏡による緩和応答の計測は、1 kHz から 300 kHz の周波数領域の各細胞のパワースペクトルに関して、それぞれ特徴的な周波数依存性が観測された。3T3 細胞では、周波数に対する信号強度の傾きが -0.59 で、HeLa 細胞では -0.51 で減少した。すなわちがん細胞は正常細胞に比べて、周波数依存性が小さいことを明らかにした。

さらに、表皮細胞では、他の二つの細胞と異なり、1 kHz から 4 kHz までは傾き -0.31

で、より高い周波数領域では -0.75 で強度が減少した。この結果から、表皮細胞の膜は、少なくとも 2 つの粘弾性が異なる層がカップリングした階層構造から構築されていることを明らかにした。

以上から、粘弾性パワースペクトルの周波数領域を 300 kHz まで拡張することにより、正常細胞、がん細胞の区別ができる可能性が示された。

(2) 近赤外 LISD 顕微鏡の開発

まず励起光の波長を近赤外に切り替えた。このとき、一般に近赤外光は 700 nm–2.5 μ m の波長域の光を指し、特に、700–900 nm の波長域は、「生体の窓」と呼ばれている。光の散乱は波長が長いほど少ないため、近赤外光は可視光より深部まで到達することが可能なため、生体深部に埋もれた界面を計測するのに適している。また、700–900 nm の波長域では、可視域に比べて、水の吸収は大きい、生体を構成する分子による吸収は小さいため、光による熱損傷の軽減が期待できる。そこで、励起光を近赤外光に切り替えた近赤外 LISD 顕微鏡を開発することを目的とした。

表面変形を誘起するための近赤外レーザー光源の検討

初めに、マイクロ秒オーダーで光照射が可能な近赤外波長変換フェムト秒パルスレーザー (パルス幅: 140 fs, 光源の出力: 4 W, 繰り返し周波数: 80 MHz) を (変位を励起する) 励起光として用いた。励起光の波長は、第一の生体の窓とされる 800 nm とした。また、そのパルスレーザーを励起光に用いることで、従来の励起光 (532 nm, 光源の出力: 0.8 W) よりも瞬間的にはハイパワーかつ照射時間を短くすることができる。出力は 4 W でパルス幅 140 fs, 繰り返し周波数が 80 MHz であることから、パルスの尖頭値は 3.5×10^5 W となり、従来の 4×10^5 倍以上のパワーである。さらに照射時間については、例えば duty 比 1:1 で励起光を ON/OFF すると仮定すると、

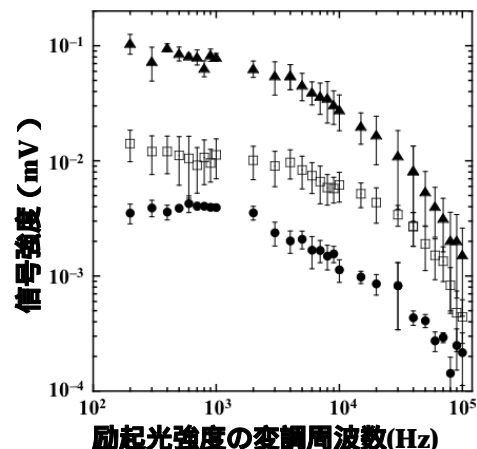


図 1. 3T3 (□)、表皮 (△) HeLa (●) 細胞のパワースペクトル

連続 (CW) 光では 1 s あたり 0.5 s 光を照射する。一方、今回用いたパルスレーザーでは、パルス幅 140 fs、80 MHz で繰り返す光を変調し擬似 CW 光とするため、1 s あたり 5.6×10^{-6} s の照射時間となる。そのため、従来の CW 光に比べて照射時間は 10^{-5} 倍と短く、細胞の熱損傷は小さいと考えられる。

パルス光源からの 800 nm の光は、音響光学素子 (AOM) に通し、矩形波に変調した。プローブ光は従来の LISD 顕微鏡と同様、He-Ne レーザー (633 nm、光源の出力 0.5 mW) を用いた。励起光とプローブ光をダイクロイックミラーによって合波し、同軸に合わせた。2 本のレーザーを顕微対物レンズに入射し、試料界面に絞り込んで照射した。このときの焦点における直径は約 $4 \mu\text{m}$ であった。界面の変位量の検出は、従来機同様、反射光の光子密度変化をフォトダイオードで検出した。検出された信号は、フーリエ変換アナライザで、周波数ごとの信号強度を取得した。

試料として、従来機で LISD 信号の取得が容易であったテトラデカンを用いた。計測原理から、試料界面で励起光とプローブ光の両方が合わさった時のみ、励起光強度の変調周波数と同周波数成分をもつ信号が検出されると予想できる。

しかし結果として、極短パルスレーザーによる励起ではテトラデカンから LISD 信号を取得することができなかった。その原因として、パルス幅が短く界面が光圧で変形される前に、パルス間の光が照射されない状態になり、界面の変形を観測することが出来なかったと考えられる。このことから、界面の変形にはある程度レーザーの照射時間が必要であると考へた。

そこで次に、励起光の光源として、近赤外 CW レーザーを用いた装置を開発した。ここでは励起光源として、近赤外波長変換 CW レーザー (光源の出力: 3.5 W、波長範囲: 700–1030 nm) を用いた。励起光の波長は、同じく 800 nm を選んだ。励起光を AOM を用いて強度変調させ、プローブ光 (633 nm) と同軸に試料に入射し、その反射プローブ光の光子密度変化からパワースペクトルを検出した。このとき、励起光を対物レンズで絞り、試料に照射することで、水平方向に対して $4\text{--}5 \mu\text{m}$ の空間分解能を達成した。近赤外 CW レーザー光を用いた LISD 顕微鏡の光学系を図 2 に示す。

試料としてテトラデカンを用い、信号の検出を試みた。励起光強度の変調周波数を 80 kHz または 100 kHz、120 kHz に設定し計測したところ、それぞれのレーザー光のみの場合では信号は検出されず、両方の光を照射した時のみ同周波数成分をもつ信号が検出された。さらに、パワースペクトルを計測したところ、変調周波数が 100 kHz までのプラトー領域、100 kHz から 700 kHz までの遷移領域、700 kHz 以上の信号が熱揺らぎに埋も

れて傾きが -2 となる典型的なパワースペクトルが観測された (図 3)。本スペクトル形状は、従来の可視光を励起光源とする LISD 顕微鏡の場合と同様であったことから、近赤外光を用いてもパワースペクトルが検出された。以上より、近赤外 LISD 顕微鏡の開発に成功した。

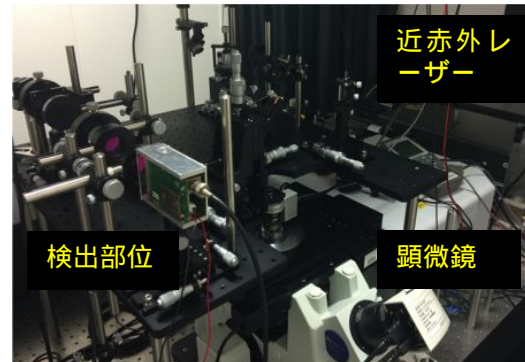


図 2. 近赤外 CW レーザー光源を用いた LISD 顕微鏡の光学系

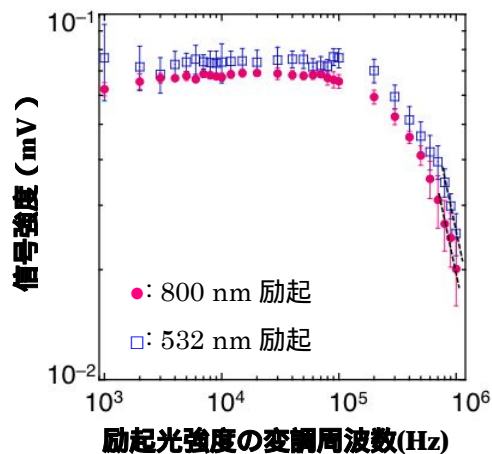


図 3. テトラデカンのパワースペクトル

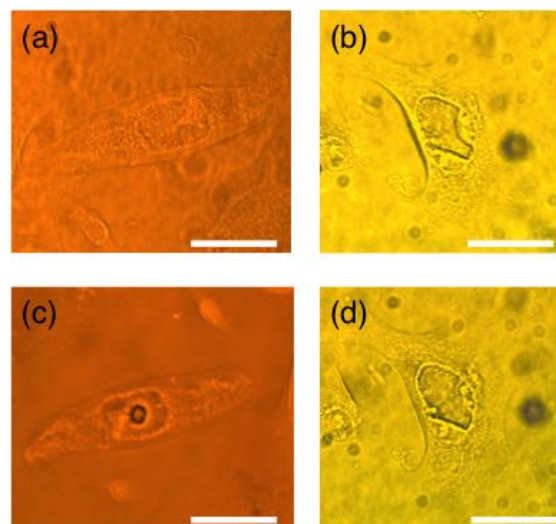


図 4. 532 nm または 800 nm のレーザー照射前後の表皮細胞の光顕像。(a)照射前, 532 nm (b)照射前, 800 nm (c)照射後, 532 nm (d)照射後, 800 nm。スケールバー: $20 \mu\text{m}$

近赤外光の利用による細胞の熱損傷の軽減の確認

従来法の可視光を用いたときは、信号の S/N 比改善や測定時間の短縮のため、励起光強度を上げると、光照射後に、細胞の膜に穴が空くことがときおり観測された(図 4c)。そこで近赤外励起に変更したことで、細胞の熱損傷が軽減できるか観測した。

そこで、532 nm と 800 nm の光をともに約 100 mW で表皮細胞に照射し、損傷の度合いを比較した。そのとき、532 nm では観測されたような膜に穴が空くことは観察されなかった(図 4d)。以上、近赤外光を用いることで、細胞の熱損傷が軽減された。

近赤外 LISD 顕微鏡による細胞のパワースペクトル計測と検出配置の検討

800 nm の近赤外光を用いて、細胞 1 個からパワースペクトルを計測した。テスト試料として表皮細胞を用いた。信号の検出方法として、透過プローブ光の広がりを検出する透過型配置と、反射プローブ光の広がりを検出する反射型配置の二通りを検討した。前者では、励起光強度は変調周波数に対して、信号

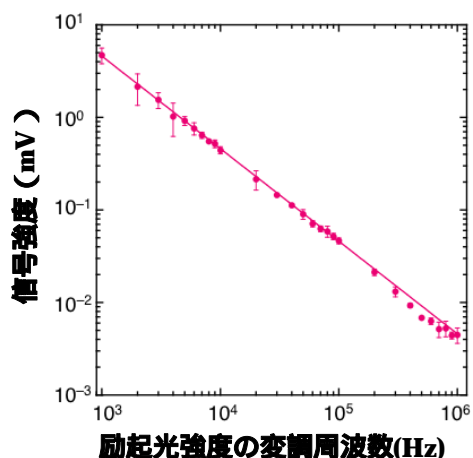


図 5. 表皮細胞 1 個のパワースペクトル (透過型配置)

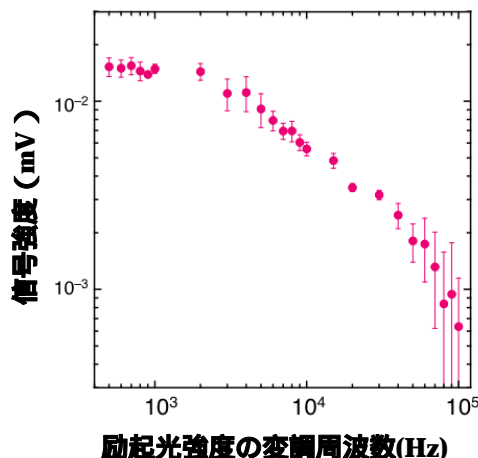


図 6. 表皮細胞 1 個のパワースペクトル (反射型配置)

強度は傾き約-1.0 を示し、熱レンズ信号が支配的だった(図 5)。その原因は、励起光の照射により細胞内に熱が発生したことによるものと考えられた。そこで、細胞内の熱レンズの影響を受けない反射型配置で検出を試みた。その結果、表皮細胞 1 個からのパワースペクトルの検出に成功した(図 6)。

以上より、細胞 1 個からのパワースペクトルの計測には、反射型配置での信号検出が不可欠であることが分かった。

以上、近赤外 LISD 顕微鏡を開発に成功し、細胞ダメージが少ない条件下で、細胞 1 個からの動的粘弾性パワースペクトルが計測できるようになった。さらに、300 kHz 程度まで測定周波数帯域を拡張したことで、べき指数による細胞間の定量比較の道が拓かれ、実際に正常細胞とがん細胞でのべき指数の差異を計測できた。

現在は、差動型光学配置や偏光特性を用いて変位量の絶対値評価の検討を進めており、弾性の絶対値が求まると、メカノバイオロジーなど生物物理学分野等への貢献も期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 18 件)

森作俊紀、由井宏治

レーザー誘起表面変位顕微鏡の開発と単一細胞における膜の粘弾性特性の非接触計測への応用、第 25 回日本 MRS 年次大会、2015 年 12 月 9 日、万国橋会議センター(神奈川県、横浜市) 招待講演

由井宏治

レーザー誘起表面変位顕微鏡の開発と細胞膜粘弾性計測への展開、「ナノメディシン分子科学」+「超高速バイオアセンブラ」合同若手の会、2015 年 10 月 31 日、不死王閣(大阪府、池田市) 招待講演

森作俊紀、和田悠平、由井宏治

Study on the Role of Cytoskeletal Networks in Single Cells to Their Viscoelastic Properties with the Laser-induced Surface Deformation Microscope、第 24 回バイオイメージング学会、2015 年 9 月 28 日、東京理科大学葛飾キャンパス(東京都、葛飾区)

石原雅史、森作俊紀、由井宏治

AFM とレーザー誘起表面変位顕微鏡を用いた正常細胞とがん細胞の粘弾性による識別、第 66 回コロイドおよび界面化学討論会、2015 年 9 月 12 日、鹿児島大学群元キャンパス(鹿児島県、鹿児島市)

森作俊紀、由井宏治

近赤外レーザー誘起表面変位顕微鏡の開発と細胞膜の粘弾性計測への応用、第 64 回分析化学学会年会、2015 年 9 月 10 日、九州大学

伊都キャンパス（福岡県、福岡市）

Toshinori Morisaku and Hiroharu Yui
Development of the Near-infrared Laser-induced Surface Deformation Microscope (NIR-LISD)、RSC Tokyo International Conference 2015、2015年9月4日、幕張メッセ（千葉県、千葉市）

Yuhei Wada, Toshinori Morisaku, and Hiroharu Yui

Contribution of Cytoskeletal Network in a Fibroblast Cell to its Viscoelastic Properties Studied by Laser-Induced Surface Deformation Microscope、RSC Tokyo International Conference 2015、2015年9月3日、幕張メッセ（千葉県、千葉市）

Masashi Ishihara, Toshinori Morisaku, and Hiroharu Yui

Discriminating between normal and cancer cells by viscoelastic properties with the AFM and laser-induced surface deformation microscope、RSC Tokyo International Conference 2015、2015年9月3日、幕張メッセ（千葉県、千葉市）

石原雅史、森作俊紀、由井宏治

レーザー誘起表面変位顕微鏡を用いた正常細胞とがん細胞の粘弾性による識別、第75回分析化学討論会、2015年5月24日、山梨大学甲府キャンパス（山梨県、甲府市）

森作俊紀、由井宏治

近赤外レーザー誘起表面変位顕微鏡の開発、第75回分析化学討論会、2015年5月23日、山梨大学甲府キャンパス（山梨県、甲府市）

森作俊紀、和田悠平、城戸優梨子、由井宏治

レーザー誘起表面変位顕微鏡を用いた細胞膜粘弾性計測への展開、第63回分析化学会年会、2014年9月17日、広島大学東広島キャンパス（広島県、東広島市）

和田悠平、森作俊紀、由井宏治

レーザー誘起表面変位顕微鏡を用いた単一生細胞における細胞膜の粘弾性に対する細胞骨格の寄与に関する研究、第63回分析化学会年会、2014年9月17日、広島大学東広島キャンパス（広島県、東広島市）

Toshinori Morisaku, Yuhei Wada, Yuriko Kido, Kei Asai, and Hiroharu Yui

Development of the laser-induced surface deformation microscope and its application for the non-contact viscoelastic measurements of cell membranes in single living cells、RSC Tokyo International Conference 2014、2014年9月4日、幕張メッセ（千葉県、千葉市）

和田悠平、森作俊紀、由井宏治

レーザー誘起表面変位顕微鏡を用いた単一生細胞粘弾性に対する細胞骨格の役割と研究、第74回分析化学討論会、2014年5月24日、日本大学工学部（福島県、郡山）

Hiroharu Yui, Toshinori Morisaku, Yuriko Kido, Yuhei Wada, and Kei Asai

Development of the Laser-Induced Surface Deformation Microscope and its Application for Non-Contact Measurements on the Rheological Properties of Single Living Cells、第23回日本MRS年次大会、2013年12月11日、横浜市開港記念会館（神奈川県、横浜市）招待講演

Hiroharu Yui

Development of the Laser-Induced Surface Deformation Microscope and its Application to Noncontact Measurements on Viscoelastic Properties of Biological Membranes in a Single Living Cell、第86回日本生化学会、2013年9月13日、パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）招待講演（他2件）

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

(受賞)

Toshinori Morisaku and Hiroharu Yui
RSC Tokyo International Conference 2015, Best poster award

Development of the Near-infrared Laser-induced Surface Deformation Microscope (NIR-LISD)

2015年9月4日、2015年9月4日、幕張メッセ（千葉県、千葉市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

由井 宏治 (YUI HIROHARU)

東京理科大学理学部・教授

研究者番号：20313017

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鳥越 秀峰 (TORIGOE HIDETAKA)

東京理科大学理学部・教授

研究者番号：80227678

中村 岳史 (NAKAMURA TAKESHI)

東京理科大学生命医科学研究所・教授

研究者番号：60362604

朝井 計 (ASAI KEI)

埼玉大学理工学研究科・准教授

研究者番号：70283934