特集／微小機構とレーザー

レーザーピンセットとレーザーシザーズの マイクロ世界への応用

An application of Laser tweezers and Laser scissors

松浦 弘幸

東京大学先端科学技術研究センター

〒153 東京都目黒区駒場 4 - 6 - 1

TEL 03-3481-4441 FAX 03-3481-4442

Hiroyuki MATSUURA

Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo, Japan

4-6-1 Komaba Meguro-ku Tokyo Japan 153

要 旨

Ashkinにより開発されたレーザーマニピュレーション技術は、マイクロマシン・マイクロ化学の領域、さらにDNAや細胞の操作、細胞融合、筋肉の分子の生み出す力の測定等に 응용されている。レーザー捕足の原理は、光の屈折の際の光子の運動量変化を利用している。この時、発生する力の大きさは、 pN （ピコニュートン）のオーダーであり、マイクロメートル法の物体に作用する力の大きさに匹敵している。また、最近、この技術は、筋収縮のメカニズムの解明に、大きく貢献している。

キーワード：レーザーマニピュレーション技術、光子の運動量変化

Abstract

Laser manipulation technique which is developed by Ashkin is widely applied to various branch of studies ; for example, the region of micro-machine, micro-chemistry, manipulating of cell and DNA, the experiment of cell fusion, and measurement of the generating power of actin myosin complex, a principle of laser trapping is based on the momentum transfer of refraction of light. In the other word, refraction of light yields the force of trapping, and its magnitude is roughly estimated piconewton (pN), since, the magnitude of power which acts on micro-objects has as same order as that of laser trapping force, we can use this power in order to manipulate various small objects, and recently, this technique is greatly contributing to analyzing the mechanism of muscle contraction.

Key words : Laser manipulation technique, the momentum transfer of refraction of light

1. はじめに

マイクロ領域の微小物体を、非接触、非破壊的に操作する技術は、マイクロマシンや超微細加工の分野では、必須の基本技術である。また、バイオテクノロジーの分野においては、マイクロピペットの技術が存在していた。しかし、このピペットの作成には高度の熟練を要すること、ピペットが資料に接触するために資料を傷める等の点が問題であった。

近年、このような機械的操作法に代わるマイクロ資料の操作法として、レーザーマニピュレーション法が注目されている。この操作法では、微小物体の操作・加工に、レーザーピンセット (Laser tweezers; レーザー光を用いて微小物体を捕捉したり、運搬したりする) 及び、レーザーシザース (Laser scissors, レーザー鉗; レーザー光を利用して物体を切断・穿孔したりする) が用いられる (写真1)。基本的加工過程は、レーザー捕捉 (レーザートラッピング) とレーザー爆蝕 (レーザーアブレーション) に基づいている。生物学の分野においては、バクテリア、ウイルス、細胞、染色体、精子 (写真2)、DNA等の操作及び、細胞融合、細胞内小器官の輸送、バクテリアの鞭毛や筋肉の分子が生み出す力出力の測定等に活用されている。また、マイクロマシン・マイクロ化学の領域では、部品の作成 (光造形法) 加工及び、微小な反応空間の作成にも利用され始めている¹⁾。

第1部 レーザーピンセットとレーザーシザースの基礎

2. レーザー捕捉の原理

2.1 歴史的背景

光の粒子説を唱えたニュートンは、「物体に光が当たると、その物体に力を及ぼす」と考えた。また、古典電磁気学の完成者であるマックスウェルは、この力 (放射圧) の存在を理論的に証明した。この理論に基づくと、1 mWのレーザー光が、鏡によって全て逆方向に反射された場合に、鏡が光よりうける力は、約 7×10^{-12} N 程度である。これは、比重1で半径 $5.5 \mu\text{m}$ の液滴に作用する重力と同程度だ (付録1)。これは、筋肉中のアクチン・ミオシン分子の相互作用から生じる張力と同程度であり、AFMで測定される力のレベルもこの領域に存在している。従って、マイクロ領域では、光により微小物体を動かす事ができ、さらに、コヒーレント性に優れたレーザー光を用いると微小な空間 (数 μm) に光線を集中する事で、微小物体を非接触的に精密に操作する事が可能となる^{2) 3) 4) 5)}。Ashkin は、顕微鏡の対物レン

写真1 レーザーピンセットとレーザーシザース
(三井造船・CELL ROBOTICS INC提供)

レーザーピンセットを用いることで、細胞、細胞内小器官、染色体の操作及び、バクテリアの鞭毛や筋肉の分子が生み出す力出力の測定等を、非接触かつ損傷を与えずに行うことが可能となる。また、レーザーシザースは、マイクロメータ単位で細胞や染色体等の生体微粒子の切断・穿孔などのマイクロサージェリーを行う装置である。

写真2 レーザーピンセットを用いてレーザー捕捉された精子 (三井造船・CELL ROBOTICS INC 提供)

レーザーピンセットを用いれば1個の精子を捕捉することが可能となる。この技術を用いて不妊治療に活用しようとする動きがある。

ズを用いてレーザー光線を絞込み微粒子がどの位置に存在しても、焦点の近傍に微粒子が捕捉される事を示し、集光点近傍にこの微粒子を捕捉するレーザーピンセットを開発した。これは、三次元的な操作法に優れ、最も広く普及している。

2.2 レーザー捕捉原理の説明

図1 光の反射により生ずる力（放射圧）

鏡により光線が反射さ光の運動量が、 $\delta p = p_2 - p_1$ だけ変化する。この変化分の $(-\delta p)$ が、鏡が1個の光子より受ける放射圧となる。

a) 微粒子径が光の波長より大きい場合

光は粒子と見なすことができ、レーザー捕捉の原理は、光の屈折（粒子の運動量の変化）から説明できる。

図1のように光が、鏡で反射した場合の鏡の受ける放射圧を考える。光子の運動量が、この反射により p_1 から p_2 に変化したとすれば、光子の運動量の変化は

$$\delta p = p_2 - p_1$$

となる。そこで、鏡の受ける力積は、 $(-\delta p)$ となる。光の速度を c 、波長を λ 、光のパワーを P 、単位時間平均の放射圧を F 、単位時間あたりの光子数を n 、プランク定数を h 、入射角・反射角を共に θ とすれば、

$$F \cdot t = n \cdot (-\delta p) = 2 \cdot \frac{nh}{\lambda} \cos \theta \dots\dots\dots(1)$$

式(1)の両辺に光速 c を掛けて、

$$P = \frac{nhc}{\lambda} \dots\dots\dots(2)$$

を用いると、放射圧 F (N) は、

$$F = \frac{2P}{c} \cdot \cos \theta \dots\dots\dots(3)$$

と表現される。つまり、式(3)によりレーザー光線のパワー P (joules/s)を、光が微小物体に及ぼす力(N)に変換できる。次に、ガウス型の強度分布を持つレーザー光を開口径の大きな対物レンズで集光した後、透明な微小物体に照射された場合を考える。微粒子の屈折率が周囲の媒質の屈折率よりも大きい場合、微粒子内で光は図2のように屈折する。光の屈折は、光子の

図2 光の屈折により生ずる力

内部の屈折率が周囲の媒質より高く、透明な球状の粒子に光が入射した場合、光の屈折により光子の運動量 P_0 は、 P_1 に変化する。つまり、光の運動量変化分は、 $\delta p = p_1 - p_0$ となる。微粒子は、これと反対方向に $(-\delta p)$ の力積を光子より受けることになる。

図3 光軸方向に沿った捕捉力の発生の説明⁶⁾

光は、透明な粒子に入射した時及び、粒子から出射時の2回屈折する。光線Aは、物体の表面で屈折し、 F_{A1} で表される力を物体に与える。また、光線Aは、物体からの出射時にも屈折されて力 F_{A2} を物体に及ぼす。この2つの力の合力は、 F_A となり図の上方への成分を持つことになる。光線Bに対しても同様な考察が成り立ち、合力は F_B となる。

従って、力 F_A と F_B の合力の垂直成分 F_y は、図の鉛直上方（焦点）の方向に向き、微粒子は、焦点の近傍に捕捉されることになる。

図4 光強度が最も高い場所に微粒子が捕捉される
説明

この図には、光の強度分布と、その光線が、それぞれの屈折した点において粒子に与える力を示してある。光線bの方が光軸に近く光束密度が高いために、光線Bの屈折により生じる力 F_b は、光線aにより生じる力 F_a よりも大きくなる。光軸に垂直な方向の2つの力は、互いに反対方向に働く。しかし、光線bによる力の方が優勢であるため、結局、光軸に垂直な方向の力は常に光軸中心へ向かう向きに働き、粒子は光軸に引きつけられる。このようにして、ガウス分布に代表される様に、光軸の光強度が最も高い一般の光線中では粒子は光軸に引きつけられ、光線中に閉じこめられる。

- (4) 運動量の変化を意味する。逆に、微粒子は、この光子の運動量の変化分に相当する力積を光子より受けることになる。他方、収束された光線中では、光軸方向に強度の勾配が形成されるために、光軸方向の捕捉力が発生する(図3)。さらに、レーザービームの強度分布が、中心対称を示す場合には、微小粒子は、光強度が最も強い光軸上に捕捉される(図4)。一般的に言えば、微粒子は、光強度の最も強い場所(この場合は、焦点の近傍)に、捕捉される。

b) 微粒子径が光の波長より小さい場合

この場合には、光は波としての性質を示し、光の電磁場により微粒子は分極をおこす。これにより、多重極子が生じるが、多くの場合、双極子のみを考察すれば十分である。レイリー散乱の理論によると、電磁場内に置かれた電機双極子が受けるローレンツ力 F は、

$$F = (P \cdot \text{grad}) \cdot E + \frac{dP}{dt} \times B \dots\dots\dots(4)$$

と表される。微粒子の分極率を α とすれば、双極子モーメント P は、

$$P = \alpha E \dots\dots\dots(5)$$

であり、式(4)、(5)、マクスウェルの方程式とベクトル解析の公式を用いると、

$$F = \alpha \left(\frac{\text{grad } E^2}{2} + \frac{d(E \times B)}{dt} \right) \dots\dots\dots(6)$$

となる。微粒子の半径 r 、屈折率 n_1 及び媒質の屈折率 n_2 とすれば、微粒子の分極率 α は、

$$\alpha = r^3 \cdot \frac{(n_1/n_2)^2 - 1}{(n_1/n_2)^2 + 2} \dots\dots\dots(7)$$

と表される。式(6)の第1項は電場の強度の勾配に比例した力であり、勾配力と呼ばれ、第2項は光の運動量が時間的に変化するために生じる力(散乱力)である。レーザー捕捉では、勾配力は焦点方向を向き、散乱力は光の進行方向を向いている。一般には、勾配力の方が散乱力より十分大きいために、微粒子は光強度の大きい場所に引き寄せられる。一般的に言えば、光の強度が強いほど、粒子の屈折率が大きいほど、粒子の直径が大きいほど捕捉力は強くなる。

3. レーザー捕捉に使用されるエネルギー

放射圧を利用すれば、微粒子を焦点近傍で捕捉できることが分かった。微粒子がレーザー光の焦点近傍で安定的に捕捉されている場合、レーザー光エネルギーの一部は、媒質分子の熱エネルギーとして散逸するのみである。

図5 レーザー捕捉システムの概略図¹⁾

狭い領域に光を集中させ、大きな光の強度勾配を形成するために、ビームの中心にピークを持つガウス型の単一モード(TEM₀₀)を開口数の大きなレンズで集光した装置が良く用いられる。レーザー源としては、CW Nd:YAGレーザーの基本波長の1064nm(赤外領域)が使用される。

しかし、微粒子が焦点に引き寄せられる場合には、その際、微粒子は粘性抵抗を受けながら光のエネルギーの一部を消費する。このために、ドップラーシフトが生じ光の振動数が減少する。この変化は、高々1 Hz程度であり、エネルギーに換算すればプランク常数のオーダーである。

4. 微粒子捕捉装置の概略

狭い領域に光を集中させ、大きな光の強度勾配を形成するために、ビームの中心にピークを持つガウス型の単一モード (TEM₀₀) を開口数 ((NA), $NA = n \sin A$, n : 媒質の屈折率, A : 光軸と焦点-レンズを結んだ直線のなす角度) の大きなレンズで集光した装置が良く用いられる。レーザー源としては、CW Nd:YAGレーザーの基本波長の1064nm (赤外領域) が使用される。1064nmの光のみを反射する (他の波長の光を透過させる) ダイクロイックミラーでレーザー光を顕微鏡の光軸に一致させ、100倍の油浸対物レンズ (開口数1.3) により試料上で約1 μ mの範囲まで絞込む。Nd:YAGレーザーの基本波長 (1064nm) は、ポリマーや液体にはほとんど吸収されず、集光しても微粒子を損傷することはない。一般的には、試料は微粒子を分散した水をスライドガラス上に滴下した物を用い、レーザー光は紙面に対して垂直方向から入射して、微粒子を3次元的に捕捉する。

5. 放射圧の性質

5.1 最大放射圧の測定

放射圧の大きさは、レーザー光線中で微粒子が捕捉される位置により変化する。顕微鏡のステージの移動速度を徐々に増加させて行くと、ある速度 v で微粒子を捕捉しておく事が困難になる。微粒子の半径を r 、媒質の粘性率を η 、微粒子の質量 m 、重力加速度を g とすれば、ストークスの法則が成り立ち、滞在放射圧 F_{max} は、

$$F_{max} = 6 \pi r \eta v + mg \dots\dots\dots (8)$$

で計算できる。増原のグループは、エチレングリコールに分散した大きさ6.8 μ mのPMMA (ポリメタクリル酸メチル) 微粒子に作用する光軸方向の最大放射圧を測定した (図6)。放射圧は、 10^{-12} Nのオーダーであり、レーザー光線の出力に比例する¹⁾。この現象は、光線中の光子数の増加の反映による。また、粒子径が大きいほど放射圧は増加する。これは、対物レンズの収差に起因する。

5.2 熱運動による捕捉の限界

粒子径10 μ mの微粒子に30mWのレーザー光を照射した場合の最大放射圧は、約 5.5×10^{-12} joulesとなる。こ

図6 エチレングリコールに分散した大きさ6.8 μ mのPMMA (ポリメタクリル酸メチル) 微粒子に作用する光軸方向の最大放射圧¹⁾

光子の放射圧は 10^{-12} Nのオーダーであり、レーザー出力に比例して大きくなる。これは、照射される光子の数の増加による。

の粒子を捕捉からはずすには、約 1.4×10^{-17} joulesの仕事が必要である。この仕事の値は、 10^6 Kに相当する。つまり、常温 (300 K) では、レーザー光線の熱作用で捕捉が妨害される事はない (熱ゆらぎは、3.5nm程度である)。一般的には、レーザーパワーを100mWにすれば、熱ゆらぎの範囲は1 nm程となる。また、単一ビームとレンズによるレーザー捕捉システムでの捕捉可能な粒子径は、20nm~数十nmが限界である。

6. 各種のレーザー捕捉法の概略

6.1 レーザー光の干渉を利用する

レーザー光は高いコヒーレンスを持つために干渉を起こしやすい。そこで、このレーザー光による干渉を捕捉技術に応用すれば、複数の粒子の捕捉及び、干渉縞に沿って粒子を配列する事ができる。つまり、光強度の高い方向に放射圧が作用し、微粒子は干渉縞の明部に引き寄せられる。

6.2 レーザー走査マイクロマン્યピューレーション法

レーザー光の干渉を利用する方法では、少数のパターンにしか粒子を配列できない。そこで、自由な形に微粒子を配列する方法として、このレーザー走査マイクロマン્યピューレーション法が開発された¹⁾。これは、試料面上に集光したレーザー光をコンピュータ制御の電動鏡で走査し、任意のパターンを繰り返し描画する事によって微粒子を配列させる技術である。集光スポットの走査速

度は、微粒子が集光スポットに追従できなくなる速度より十分高速にする。すると、微粒子には、時間的に平均化された放射圧が作用し、粒子が集光スポットの軌跡上に配列する。増原のグループは、レーザー出力100~300 mWで毎秒13回程度走査している。また、走査速度と光の強度を調整することにより、パターンに沿って微粒子を輸送することができる。つまり、レーザースポットが微粒子に近づく場合、最初は微粒子を引き寄せる方向に力が作用する。しかし、このスポットの通過後は力の作用する方向が逆転する。この際、微粒子が、わずかに動くために、この2つの力の釣り合いがくずれて走査の進行方向に駆動力が生じる。増原のグループにより、この時の最大放射圧は、光軸方向に 64×10^{-12} N、平面方向に 160×10^{-12} N、微粒子と基板の摩擦係数は0.1と推定された。走査速度が速くなるに従って、レーザーの速い動きに微粒子が追従できなくなり、粒子の動きが遅くなる。逆に、走査速度が $520 \mu\text{m}$ を下回ると、1個の粒子だけが捕捉されレーザースポットに完全に追従するために、パターンが形成されなくなる¹⁾。

6.3 金属微粒子・屈折率の低い粒子の捕捉

屈折率の低い微粒子にレーザー光を照射すると、光子の運動量変化が逆になり、全体の放射圧は、光焦点から遠ざかる方向に作用する。波長が、物体の寸法より、大きい場合には式(7)の分極率が負になり、放射圧は電場の弱い方向を向く。金属のように微粒子が光を反射する場合、光子の衝突による力が、微粒子を弾きとばす働きをする。この様な場合にも、レーザー走査マイクロマンニピュレーション法を用いれば捕捉が可能となる。つまり、図7の様に集光したレーザー光を円形に繰り返し走査して微粒子を光で取り囲む。つまり、微粒子は、この過程

図7 レーザー走査マイクロマンニピュレーション法による金属微粒子・屈折率の低い粒子の捕捉¹⁾

で全ての方向より斥力を受け、3次元的な井戸型ポテンシャルがこの粒子の周囲に形成される。結局、走査速度が十分速い場合、この井戸型ポテンシャルの中に微粒子が捕捉される。増原のグループは、 $3 \mu\text{m}$ の鉄の微粒子を捕捉するために、直径 $10 \mu\text{m}$ の円を毎秒50回走査している。

7. レーザー爆蝕(アブレーション ablation)

レーザーマニピュレーション法の展開として、レーザー爆蝕がある²⁾。これは、短波長のパルスレーザー光を微粒子に照射して、物体を切断・穿孔及び、化学反応を誘起させる方法である。一般には、レーザー捕捉用のCW Nd:YAG (1064nm)とレーザー爆蝕(レーザー銲, パルスNd:YAGレーザー355nm)とセットで使用するにより微粒子を加工・計測等の操作が可能となる。増原のグループは、PMMAのレーザー爆蝕に際して増感剤としてピレンをドーピングしている。微粒子に増感剤をドーピングすることにより、レーザー爆蝕の起こる閾値を低下させる事ができる。例えば、ピレンの濃度が、 $1.81 \times 10^{-4} \text{mol/dm}^3$ の時には、爆蝕閾値は、 $0.3 \text{joules/cm}^2/\text{pulse}$ であるが、濃度が $9.52 \times 10^{-4} \text{mol/dm}^3$ に低下すれば、閾値が $6.0 \text{joules/cm}^2/\text{pulse}$ に増加する。増感剤は、レーザー光を吸収し、その励起状態を高密度に発成する。この励起状態の増感剤から微粒子(高分子)へのエネルギー移動や、励起状態から基底状態への遷移時に生じる熱により高分子の主鎖が切断され、最終的に高分子のフラグメントが飛び出し表面に穴があく、と考えられている。ピレン(増感剤)の濃度と光強度を適切に選択すれば、粒子径が $10 \mu\text{m}$ のPMMAに $1 \mu\text{m}$ 以下の微細な穴を開ける事ができる。これは、光軸中心が光子密度であるために、この領域で増感剤の作用(多光子吸収反応)が現れるためである。また、レーザー爆蝕では約 $1 \sim 40 \text{joules/cm}^2/\text{pulse}$, 半値幅7 nsのパルスレーザーを微粒子に照射している。これは、平均エネルギーに換算すれば、 $100 \text{MW/cm}^2 \sim \text{数GW/cm}^2$ に達し非線形効果(自己収束)が生じている可能性がある。これらの効果は、微粒子に細い穴を開ける方向に作用する。

8. 微細な構造物の組立

2本のレーザー捕捉装置とレーザー銲を用いれば、微細加工工場としての機能を持ちうる。捕捉用のCW Nd:YAG (1064nm)の直線偏光を $\lambda/4$ 板を通して円偏光に変換した後偏光ビームスプリッターによって縦偏光と横偏光に分離する。分離したレーザービームを用いて走査するのは、二つに分けたビームが重なった場合の干

渉を防ぐためである。通常、レーザー銃としては、ピコ秒パルス（半値幅 $\sim 30\text{ps}$ ）を与えるQスイッチモード同期Nd:YAGレーザー、またはQスイッチNd:YAGの第2高調波（532nm）あるいは第3高調波（355nm）を用いる。具体的な活用例としては、レーザー光を絞り込んで焦点の付近のみ光重合反応を起こさせる3次元ヒテオリソグラフィ法（光造形法）がある。

第2部 レーザーピンセットとレーザーシザーズの生物学・医学への応用例

9. 筋収縮のステップサイズの問題

9.1 歴史的背景^{8),9)}

1986年、柳田のグループは、カバーガラス上にミオシンを一様に吸着させ「ミオシンの芝生」を作成し、この芝生上を蛍光ラベルしたアクチンフィラメントを滑走させる実験を行った。彼らは、アクチンフィラメントの長さが40nm（最低限の長さ）以上であれば、滑り速度はほぼ一定値 $7\mu\text{m/s}$ となる、という結論を得た。つまり、アクチンとミオシンの接触時間は6ms程度であり、ATPが加水分解される時間（30ms）より短い。このためにアクチンはATPの分解が完了しない間に滑ってしまうことになる。そこで、柳田は、「ATP1個分の自由エネルギーが酵素反応のエネルギーの最小単位ではなく、ミオシンは、ATPのエネルギーを小出しにしてアクチンを動かしている。」と結論づけた。これは、ミオシンの1回の首振りとATPの加水分解の共役を否定する立場であり、ミオシンの首振りモデルの本質に関わる問題であった⁸⁾。彼らは、滑りのメカニズムの無矛盾な説明をするために、duty ratioと伝達係数と呼ばれる任意のパラメータを導入した。しかし、duty ratioと伝達係数の本質的な意味は、全く不明であった。そこで、滑りの機構の素過程での解析（ステップサイズの問題）が求められるようになった。

9.2 レーザー捕捉による超微細操作

「ステップサイズの問題」の解明には、アクチン・ミオシン・ATPの素過程の空間的・時間的広がり、素過程に関わるエネルギーのサイズを決定することが重要である。このために、空間的にはナノメータ、時間的にはミリ秒、エネルギーは $k_B T$ オーダー、力はpNオーダーの水準の測定技術が求められた。そこで、柳田のグループは、細いマイクロ・ガラスニードルの先端にアクチンフィラメントを結合させ、スライドガラスに吸着させたミオシン芝生のうえを滑らせ、ガラスニードルの曲がりから発生する張力を測定した^{10),11)}。次に彼らは、アク

図8 ミオシンの滑り速度の測定¹²⁾

柳田のグループは、アクチンフィラメントの両端に結合したラテックスビーズをレーザー捕捉し、この間に張られたアクチンフィラメントに沿った1本のミオシンフィラメントの滑り運動を観察する運動アッセイシステムを作った。

「アクチンの処理」

直径7nmのアクチンは、単独では捕捉できない。そこで、N-エチルマレイミドで処理したミオシンをビーズに結合させ、それにアクチンを不可逆的に結合させた。

「装置の概要」

- ・Nd:YAGレーザー、最大出力8W（Lee Laser model, 708T, 波長1064nm, CW, TEM₀₀, ビーム径1.2mm）
- ・2ヵ所にレーザーの焦点を作り、異なる場所で同時に捕捉するために、ビームスプリッターを用いて2つに光線を分離した。
- ・蛍光標識をしたタンパク質を観察するために、落射蛍光顕微鏡を用いた。
- ・対物レンズ、N.A.=1.3

「捕捉力」

- ・ミオシンの最大出力（ $\sim$ 数pN）よりかなり大きく100mWで、約50pNである。
- ・長さ1 $\sim$ 10 μm のミオシンフィラメントをかなり強く捕捉・操作できた。

チンの両端にラテックスビーズを結合し、このビーズをレーザー捕捉した。この捕捉法を用いて、アクチンの上をミオシンフィラメントが滑る速度を測定し、duty ratio, ステップサイズを求めた¹²⁾（図8）。この実験により、duty ratio 0.24 $\sim$ 0.36, ステップサイズ93 $\sim$ 169nmと結論づけた。また、鈴木は光ピンセットでミオシンと綱引きをする実験を行っている¹³⁾（図9）。その結果、アクチンフィラメント1 μm 当たり約1pNの力を生じ、そ

図9 光ピンセットによるミオシンとの綱引き⁽¹⁴⁾

カバーガラスの上をミオシンでコートし、その上に蛍光ラベルしたアクチンフィラメントとATPの入った溶液をのせて、蛍光顕微鏡下でミオシンの分子上を滑らせた。つまり、ミオシンと光ピンセットの間で綱引きをさせてミオシン1分子の出力を測定した。

「アクチンの処理」

直径1 μm のポリスチレンビーズにゲルゾリンをコートし、このタンパク質にアクチンを選択的に結びつけた。

「装置の概要」

- ・Nd:YAGレーザー（波長1064nm, 出力350mW, TEM₀₀）とNd:YAGレーザー（波長1047nm, 出力1W）
- ・落射蛍光顕微鏡を使用
- ・対物レンズ, N.A. = 1.3

「捕捉力」

- ・数 μm のビーズを捕捉した場合、最大1 pN/mW程度であった。
- ・アクチンフィラメント1 μm 当たり約1 pNの力を生じ、その力はかなり大きく揺らいでいる。

の力はかなり大きく揺らいでいる事が判明した。これらの実験と前後して、スタンフォード大学のグループもミオシン1分子によるアクチンの動きを見る実験を行っている⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。アクチンの収縮時の変位から、彼らはステップサイズ11nm, 1パワーストローク3~4 pNと決定した。この実験の結果は、従来の首振り説と矛盾していないと主張した。現在、この説をめぐる主張は、依然として平行線であり、消滅場を用いた新しい光ピンセットによる実験が期待されている。

10. レーザー捕捉法による細胞の操作

細胞の懸濁液に高電圧パルスまたは、ショックウェーブを加えると細胞が破壊できたり、細胞膜に穴を開ける事が可能となる⁽¹⁶⁾。これに対しレーザー捕捉法は、細胞を運搬したり並べる事ができる。この独立した2つの細胞操作法を組み合わせた光圧静電微小操作法が提案された⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾。この方法を用いれば細胞の選択的融合、染色体の電界方向への配列による形状計測、交叉ビームに

よる細胞選別、細胞内への微粒子導入と運搬等の操作が可能となる。

10.1 細胞の個別供給・選別

水中で、細胞を電気泳動技術を用いて高濃度で特定の領域に閉じこめておき、そこからレーザー捕捉術を用い1個ずつ細胞を取り出して処理をするのだ。水野らは、イースト菌を閉じこめ輸送するのに、1Vの直流電圧を印加し、80mWのアルゴンレーザーを使用している⁽⁸⁾。さらに、捕捉用レーザー光を2本用いれば細胞選別装置としても利用できる。

10.2 ラテックス粒子の細胞内導入と輸送

レーザー捕捉法を用いて細胞の表面近くに、ラテックス粒子を輸送後、パルス電圧を印加することで、高率に細胞内に粒子を導入する事ができる。導入後にレーザー光を操作する事で、この粒子を細胞内で自由に操る事が可能となる。この方法は、DNAをコートしたラテックス粒子を核まで運ぶ技術として有効である。

10.3 非球形構造物の形状測定と配列

図10 1分子のミオシンが発生する張力の測定¹⁴⁾

アクチンの両端をラテックスビーズで固定し、ビーズの両端をレーザー捕捉する。できるだけまばらにH-ミオシンでコートしたシリカビーズをカバーガラスに固く接着する。これを、両端を捕捉されたアクチンに近づけて、H-ミオシンと反応させ、ATPの加水分解時の両端のビーズの移動から1分子のミオシンが発生する張力を測定した。

「アクチンの処理」

N-エチルマレイミドで処理したミオシンをビーズに結合させ、それにアクチンを不可逆的に結合させた。

「装置の概要」

- ・Nd:YLFレーザー（波長1047nm）
- ・落射蛍光顕微鏡を使用
- ・対物レンズ, N. A. =1.4

物体が棒状の形状（例えば、大腸菌）を持つ場合、物体の長軸が、レーザー光の光軸方向と一致する方向に捕捉される。このために、非球形物体の形状観察や操作に支障を来す場合が生じる。ここで、先に述べたレーザー走査マニピュレーション法¹¹⁾や、電圧をレーザー捕捉された構造物に印加（1MHzの交流電圧を電極に加える¹⁸⁾）してやる必要が生ずる。すると、構造物は、操作しやすい姿勢へと位置を変える。

10.4 DNA分子の切断

一般に、DNAの塩基配列の解析には、制限酵素でDNA分子を切断する方法が用いられている。このために、酵素で切断された各断片の順序に関する情報が失われてしまう。そこで、DNA分子を特定の位置で、順次切断し回収する事ができれば解析が容易になる。西岡らは、窒素パルスレーザー（波長337nm, 250 μ joules/pulse）を用いて、一連のDNAの伸長固定・切断・回収の実験を行っている¹⁹⁾。DNAは、紫外線レーザー（窒素パルスレーザー）の1パルスにて2つに切断できたが、DNA切断端がレーザー光により熱変性を起こすために、改良が待たれている。

11. レーザー光照射による細胞の損傷

レーザー光を細胞の操作に利用する場合、操作後の細

表1 レーザー光照射による大腸菌が不活化されるまでの時間¹⁹⁾

YAGレーザー（100mW）で7200秒以上照射しても大腸菌は、分裂能を有していた。他方、アルゴンイオンレーザーでは、50mWの出力で照射した場合、10秒以内に動作が停止した

Laser power [mW]	10	20	30	40	50	100
Ar 488nm	120	20	10	8	7	—
Ar 514nm	120	25	12	9	7	—
YAG	—	—	—	—	—	>7200

表2 レーザー光照射によるミドリムシが不活化されるまでの時間¹⁹⁾

200mWのYAGレーザーを300秒照射しても活動可能であるが、アルゴンイオンレーザーの場合、1秒以内に活動を停止してしまう。大腸菌より、感受性が高いのは、ミドリムシの葉緑素にアルゴンイオンレーザー光が吸収されるためと考えられる。

Laser power [mW]	10	20	30	40	50	200
Ar 488nm	5.4	2.7	1.8	1.0	0.7	—
Ar 514nm	16	1.5	1.5	1.2	0.8	—
YAG	—	—	—	—	—	>300

胞の損傷が問題となる。水野のグループは、アルゴンイオンレーザー（波長488nm, 514nm）及び、YAGレーザー（波長1060nm）をミドリムシ、大腸菌に照射し損傷の程度・生存率を検討した（Table 1, Table 2）。大腸菌は、100mWのYAGレーザー光を2時間照射後も生存し、分裂を繰り返す能力を保持していたが、アルゴンイオンレーザーでは、50mWの出力で照射した場合、10秒以内に動作が停止した。他方、ミドリムシは、200mWのYAGレーザーを300秒照射後も活動可能であるが、アルゴンイオンレーザーの場合、1秒以内に活動を停止してしまう。細胞・生物に対するレーザー捕捉装置として、YAGレーザーは、かなり安全性が高いといえる。

12. おしまいに

光操作技術は、始まったばかりの若い計測・操作・切断技術である。上述した以外にも、多くの可能性を持ち、また、多彩な使われ方をしている。まだまだ、研究者の

創意と工夫で面白いことが可能な領域であると言える。

・我が研究室のレーザーピンセットとレーザー鉗の仕様

a) レーザーピンセット

半導体レーザー 波長820-860nm

最大出力 750mW

b) レーザー鉗

窒素励起ダイレーザー 波長450nm

エネルギー 22microjoules

ピークパワー 7 kw

レーザースポット径 0.5 μ m

CELL ROBOTICS, INC.・三井造船製

参考文献

- 1) 増原宏, 喜多村昇, 三澤弘明, 玉井尚登, 笹木敬司:
マイクロ化学, 増原極微変換プロジェクト編, 化学
同人, 1-245, 1993.
- 2) Ashkin A : Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure, *Phy. Rev.Lett.*, 24-4, 156, 1970.
- 3) Ashkin A : Application of Laser Radiation Pressure, *Science*, 210-4474, 1081-1088, 1980.
- 4) Ashkin A, Dziedzic J M, Bjorkholm J E, and Chu S : Observation of Single-beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles, *Opt. Lett.*, 11 - 5 288, 1986.
- 5) Block S M : Making light work with optical tweezers, *NATURE*, 360 (3), 493 - 495, 1992.
- 6) 佐藤俊一, 稲場文男: レーザー光による微小物体のアクチュエーション, *日本機械学会誌*, 94 (872), 576 - 580, 1991.
- 7) Masuhara H, and Fukumura H : Molecular and Dynamic Studies on Laser Ablation of Doped Polymer systems, *Polymer News*, 17, 5-10, 1991.
- 8) 御橋廣真: 筋肉の動きを探る, 丸善, 1-147, 1994.
- 9) 柳田敏雄: 「光る標識をつけてみる (蛍光顕微鏡)」, 限界を越える生物顕微鏡 第2章 (日本分光学会測定法シリーズ21, 日本分光学会出版センター, 1919.
- 10) 柳田敏雄: 科学, 岩波書店, 58, 477-485, 1991
- 11) Ishijima A, Doi T, Sakurada K, and Yanagida T : Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin in vitro, *NATURE*, 352 (25) 301-306, 1991.
- 12) 斎藤究, 柳田敏雄: 光ピンセット法によるモータータンパク質の超微操作, *生物物理*, 31 (5), 58-61, 1991.
- 13) Suzuki N : in Ann.Meeting of Physics Dept, Nagoya Univ., 1993.
または,
鈴木直哉, 木下一彦: 光ピンセット, 生体の科学, 医学書院44, 78-84, 1993.
- 14) Funder J T, Simmons R M, and Spudis J A : Single myosin molecule mechanics : piconewton force and nanometer steps, *NATURE*, 368 (60), 113-119, 1994.
- 15) Vale R D : Measuring Single Protein Motors at Work, *SCIENCE*, 169-170, 1993.
- 16) 速水光浩, 天満孝昌, 水野彰: 高電圧パルスによるイースト菌の破壊, *静電気学会誌*, 13 (4), 322-331, 1989.
- 17) 水野彰, 川上友則, 坂野博英: 光圧静電微小操作法による細胞・微粒子の制御, *ケミカル・エンジニアリング*, 41 - 45, 1990.
- 18) 水野彰, 大野雄司, 坂野博英: レーザー光圧と静電気力を組み合わせた細胞等のマイクロマニピュレーション, *レーザー研究*, 19 (9), 27-32, 1991.
- 19) 西岡将輝, 谷添智樹, 桂進司, 水野彰: アガロースゲル中でのDNA分子の切断・回収操作, *静電気学会講演論文集*, 115-117, 1994.

【付 記】

写真・資料提供

CELL ROBOTICS INC, 三井造船株式会社

（付 録）参考数値

- ・ 1 mWのレーザー光の放射圧 $\sim$ 約 7×10^{-12} N $\sim$ 半径 5.5 μ mの液滴に作用する重力
- ・ 1 μ m³の水滴に作用する重力 $\sim 5 \times 10^{-15}$ N
- ・ 半径 1 μ mの粒径を 1 μ m/sの速度で動かした時の粘性抵抗 $\sim 9 \times 10^{-15}$ N
- ・ 細胞, 細胞内小器官の捕捉に要する出力 $\sim$ 100mW