フェムト秒レーザーにより生細胞を制御する

中村 収, 金子 智行

大阪大学大学院 工学研究科応用物理学専攻 (〒565-0871大阪府吹田市山田丘2-1)

Functional Control of a Living Cell by Femtosecond Laser

Osamu NAKAMURA and Tomoyuki KANEKO

Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

(Received July 2, 2001)

Destructive effect induced by focused ultra-short pulsed laser has been used to perform micro-scale processing of metal or glass materials. Since the destructive effect is based on a multiphoton process and can be localized in the focusing area, the micro-processing can be performed with high three-dimensional resolution. We developed a laser processing system for laser surgery inside of living cells with the high spatial resolution, and monitored the response of the cells during laser surgery. In the experiment, we discovered that laser irradiation can induce physiological activities of cells. Focused laser light from a mode-locked Ti:Sapphire laser (780 nm, 80 fs, 82 MHz) irradiated HeLa cells loaded with fluorescence calcium indicator (fluo-4/AM). Soon after the irradiation, increase of the calcium concentration was seen around the focusing spot, then propagating to the entire cell. This result indicates that the increase of the calcium concentration was induced due to nonlinear optical process such as multiphoton absorption.

Key Words: Mode-locked Ti:Sapphire laser, Ca^{2+} wave, HeLa cell, Nanosurgery, Scanning microscopy

1. はじめに：フェムト秒レーザーと生体

フェムト秒レーザーを生体に対して適用することのおもしろさは、一つは2光子吸収や第2高調波発生などの非線形光学効果を生体を壊さずに実現できることである¹⁾。従来のナノ秒・ピコ秒レーザーや連続発振レーザーではこれは実現し得なかった。例えば、深部の観察、光褪色の少なさ、高分解能観察(以上2光子励起蛍光顕微鏡)²⁻⁵⁾、細胞膜中分子の配向や膜電位の計測(以上第2高調波)⁶⁾などは顕微鏡観察における最近の大きな進歩であり、ある時代は進歩が停滞していた光学顕微鏡が、最新のレーザー技術、微小光学技術、高感度光検出技術、色素プロービング技術、遺伝子操作技術^{7,8)}に後押しされ、方法論的にも応用分野においても一気に展開している感がある。

もう一つのおもしろさは、フェムト秒レーザーで観察するだけでなく、局所刺激や加工を行うことができることである。一般に、観察用より数倍から一桁出力を上げたフェムト秒レーザー光を生体に集光すると、生体内3次元空間の一点において物理的、化学的、構造的な変化が起こり、生きている細胞はそれに応答する。いわば、レーザーによる生命現象の制御である^{9,10)}。あるいは局所的な破壊が起こり、細胞の手術や色素・カプセルなどの細胞内への移入が可能であり、これにより観察可能な現象や部位の範囲は広がる^{11,12)}。ここで重要なことは、回折限界まで集光された

フェムト秒レーザーにより多光子吸収を誘起し、それによって刺激や加工を行う場合、レーザーの焦点における多光子吸収の空間局在性から、焦点の前後の部分に影響を与えることなく、狙った一点のみで刺激・加工を実現できることである。従来の紫外・可視レーザーによる細胞加工やガラスニードルなどを用いる機械的刺激ではこれは実現し得なかった。

本稿では、我々の研究グループが最近得た成果を中心に、フェムト秒レーザーにより生体の刺激と加工について、その将来の展開を含めて紹介する。

2. フェムト秒レーザーが誘起する生命現象

最近、我々は集光フェムト秒レーザーにより生細胞中にカルシウムイオン波を励起できることを発見した^{9,10)}。その実験装置および実験例をFig.1およびFig.2にそれぞれ示す。用いた細胞はヒト子宮頸癌細胞(HeLa細胞)であり、蛍光指示薬としてfluo-4(吸収波長：494nm, 蛍光発光波長：516nm)を用いている。レーザーには、モードロックチタンサファイアレーザー(Spectra Physics Tsunami, 繰り返し82MHz, 発振波長780nm, パルス幅80fs(顕微鏡導入前))を用いた。対物レンズは、オリンパスLUMPlanFI(水浸, NA0.9, 60倍)を用いた。レーザーは細胞内の1点のみに集光され、視野全体の蛍光像を観察するために水銀ランプを

Fig.1 Experimental layout. Ti:Sapphire laser and microscope separation is actually around 2 m to improve beam profile.

Fig.2 Laser-induced Ca^{2+} wave in a live HeLa cell. In this case, the Ca^{2+} concentration rise is observed only in the target cell. The laser was focused in the intracellular space, cytosol, outside of the nucleus.

用いる。Fig.3にHeLa細胞の大まかな側面図を示す。

Fig.2 (a)はフェムト秒レーザーを照射する前の試料の蛍光像であり、いずれの場所にも蛍光が観測されず、すなわち、カルシウムイオン濃度の上昇は見られない。Fig.2 (b)は、ゲート時間500 μ sのレーザー(平均出力37mW)を照射後、約1/30秒後の蛍光像である。レーザー集光点とその近傍のみで蛍光が発生しているのがわかる。ここで蛍光が発生するのは、焦点のみにおいて2光子吸収が起こるからである。細胞の厚さは約5ミクロンあり、焦点はその中心にある。焦点前後の部分ではレーザーの強度が十分でなく2光子吸収が起きず、従って蛍光も発生していない。

Fig.2 (c)~(f)では、焦点位置から発生したカルシウムイオン波(カルシウムイオンの濃度が高い部分の伝搬、画像上では蛍光強度が高い部分)が細胞内に広がり(Intracellular propagation)、やがて隣接する他の細胞へと伝搬していく(Intercellular propagation)のがわかる。

Fig.2の実験と同じ条件で刺激したにもかかわらず、カルシウムイオン波が発生しない場合もある。Fig.4は同一条件で培養した60個のHeLa細胞をそれぞれ刺激し、照射強度とカルシウムイオン波の発生確率の関係を求めたもので

Fig.3 Schematic diagram of the cross section in a HeLa cell.

Fig.4 The probability of Ca^{2+} wave generation depends on laser intensity. The graph shows the Ca^{2+} wave generation probability where the exposure time was 1/8 second. 60 cells were irradiated per data point.

ある。10mW以下ではほぼすべての細胞でカルシウムイオン波は観測されないが、70mW以上ではほぼ全ての細胞でカルシウムイオン波が発生することがわかる。

3. 2光子刺激で何が起こっているのか

細胞中でカルシウムイオンは、外界からの刺激を細胞の応答反応へ伝えるセカンドメッセンジャーの役割を果たしている。筋細胞や神経細胞などの興奮性の細胞は膜電位の変化などによる電気刺激によりカルシウムストアからカルシウムイオンが放出され、筋肉の収縮や神経伝達物質の放出を引き起こす。放出されたカルシウムイオンは回収機構により回収され、細胞内カルシウムイオン濃度は一定に保たれる。すなわち、細胞内カルシウムイオン濃度は細胞内でレギュレーション(平滑化)されるのである。細胞が死ぬとこのレギュレーション機構が働かず、高いカルシウムイオン濃度のままになる。また、心筋細胞では病的な状態に陥ると、カルシウムイオン波が発生する現象も観察されている¹³⁾。また、上皮細胞や内皮細胞などの非興奮性の細胞ではホルモンなどの化学刺激や物理的な刺激により細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇しカルシウムイオン波が発生して遺伝子の転写などの様々な細胞内応答が引き起こされる。

さて、このようなカルシウムイオン濃度や波の発生と観測により、細胞内の多くの活動がわかってきている。カルシウムイオン波を人為的に発生させる場合には、これまで

は、電気刺激、ガラスニードルによる機械的刺激、ヒスタミンなどの化学刺激が用いられてきた。しかしながら、電気刺激や機械刺激では電極やニードルを用いるので、組織第一層の細胞膜しか刺激できず、また化学刺激は空間分解能を持たないという点で不便であった。一方、フェムト秒レーザーによる多光子吸収刺激では、組織内の任意の深さの任意の細胞を狙うことができ、また、一つの細胞内でも細胞膜、核、原形質など、部位を選択して刺激することができる。まさに、画期的な刺激ツールといえる。

問題は、焦点内で何が起き、どのようなメカニズムでカルシウムイオン波の発生へと進展してゆくのかである。これについてはいくつかの説が考え得るが、現時点では確定したことが言えない状況である。ひとつは、細胞内のカルシウムストアの破壊によりカルシウムイオンが細胞内に放出され、それを引き金としてカルシウムイオン波が発生する説である。これには、細胞内カルシウムストアの場所を蛍光色素でラベルし、その部位に狙いを付けてレーザーを発射する実験が必要である。次なる有力な説は、細胞膜に穴をあけて細胞外からのカルシウムイオンの流入が引き金となっていることである。これには、細胞膜を透過しない色素を細胞外に入れレーザー照射により細胞内に流入するか確認する実験が必要である。最後に、可能性は低いが興味深い説として、レーザーの焦点から発生した衝撃波が細胞膜上のメカノレセプターを刺激し、カルシウムイオン濃度の上昇を引き起こすことである。これには、メカノレセプターの単離、同定による詳細な機械刺激によるカルシウムイオン上昇機構の解明が待たれる。逆にこの刺激ツールを利用することによりメカノレセプターの研究が進展することを期待する。

4. 多光子過程によるナノ加工

2光子顕微鏡を用いれば3次元ナノ光造形(加工)や、3次元光記録が可能なることについては既に多くの報告がある¹⁴⁻¹⁸⁾。さらに、3光子以上の過程も含め、同様に細胞などの生体を数十nmから数百nmサイズで加工することも可能である。Koenigらは、モードロックチタンサファイアレーザーを用いて、通常の2光子蛍光観察より数倍以上出力を上げて細胞膜や染色体に照射すると、より多くの光子が介在する多光子過程が発生し生体物質の誘電破壊が起こり、数十nmから数百nmの領域においてレーザーアブレーションによる細胞加工(あるいはsurgery)を実現できることを示した¹²⁾。Fig.5は、われわれによる赤血球の細胞膜のナノアブレーションの結果である¹¹⁾。矢印で示された開口部の大きさが約200nmであることがわかる。この画像は走査型電子顕微鏡で得たものである。実験では、レーザー出力をこれ以上大きくすると開口部はより広がった。これは、おそらく反応の閾値以上の光強度を持つ領域が広がったせいであると考えられる。また、予想としては、フェムト秒でなくピコ秒やナノ秒のパルスを用いると、光吸収による熱の影響で開口部は大きくなる¹⁸⁾。また、コラーゲンを試料に用いても同様の実験をおこなっている¹¹⁾。Fig.6は、反射共焦点顕微鏡により得られたコラー

Fig.5 Three dimensional multi-photon nanosurgery. Localised two-photon absorption allows for high cutting/ablation accuracy in 3D. It is possible to perform micro/nano operations of cutting, welding and other manipulations.

Fig.6 Confocal reflection image with 488nm illumination of 4 damage points in collagen stained with Rhodamine B. Scale bar is 5 μ m. Depth is 2 μ m.

ゲンゲル内におけるレーザーアブレーション部位の像である。コラーゲン内の数百nmの微小領域内でのレーザーアブレーションの効果が現れてることがわかる。また、得られたアブレーションの効果は3次的に局在していることもこの実験からわかる。

5. 今後の展望：フェムト秒光刺激と細胞膜からの第2高調波の計測

生体膜あるいは疑似生体膜であるリポソームからの第2高調波を検出し、膜の表裏間の電位差や膜内分子の配向性を測定するフェムト秒レーザーを光源とする顕微鏡の研究が進みつつある⁶⁾。我々は膜電位信号の経路やイオン波あるいは多光子刺激によって誘起される膜電位のリアルタイム可視化を狙った高速走査第2高調波顕微鏡を、フェムト秒レーザーを光源として開発した。

今後は、光刺激をフェムト秒レーザーで行い、その影響もまたフェムト秒レーザーや非線形光学を駆使した新しい計測法で検出する試みが増え、細胞内の生命活動がこれまでになかった映像で多種多様なアプローチにより明らかになっていくものと思われる。

謝 辞

日頃ご討論いただく、大阪大学河田 聡教授、京都府立医科大学高松 哲郎教授、藤田 克昌博士に感謝する。本稿で紹介した研究例の一部は、日本学術振興会未来開拓推進事業「生体の計測と制御」において実施されたものである。マイクロレンズアレイの開発に関しては横河電機(株)の協力を得た。

参考文献

- 1) 中村 収：レーザー研究 **27** (1999) 812.
- 2) K. Fujita, O. Nakamura, T. Kaneko, M. Oyamada, T. Takamatsu, and S. Kawata: Opt. Commun. **173** (2000) 7.
- 3) K. Fujita, O. Nakamura, T. Kaneko, M. Oyamada, T. Takamatsu, and S. Kawata: J. Microsc. **194** (1999) 528.
- 4) V. Daria, O. Nakamura, C. Palmes-Saloma, and S. Kawata: Jpn. J. Appl. Phys. **37** (1998) L959.
- 5) 中村 収, 藤田 克昌：光技術コンタクト (2001).
- 6) L. Moreaux, O. Sandre, M. Blanchard-Desce, and J. Mertz: Opt. Lett. **25** (2000) 320.
- 7) A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien: Nature **388** (1997) 882.
- 8) R. Y. Tsien and A. Miyawaki: Science **280** (1998) 1954.
- 9) N. Smith, K. Fujita, T. Kaneko, K. Kato, O. Nakamura, T. Takamatsu, and S. Kawata: Appl. Phys. Lett. **79** (2001) 1208.
- 10) スミス ニコラス, 藤田 克昌, 金子 智行, 加藤 健太郎, 中村 収, 高松 哲郎, 河田 聡：第48回春季応用物理学関係連合講演会講演予稿集 (2001) 1031.
- 11) N. Smith, K. Fujita, O. Nakamura, and S. Kawata: Appl. Phys. Lett. **78** (2001) 999.
- 12) K. Koenig, I. Riemann, P. Fischer, and K. -J. Halbhauer: Cellular and Molecular Biology **45** (1999) 195.
- 13) T. Kaneko, H. Tanaka, M. Oyamada, S. Kawata, and T. Takamatsu: Circulation Research **86** (2000) 1093.
- 14) 中村 収, 河田 聡：分光研究 **48** (1999) 27.
- 15) 応用物理学学会シンポジウム (1998年10月および1999年9月).
- 16) 河田 聡(編)：「特集2光子科学：1」, O plus E **20-8** (1998).
- 17) 河田 聡(編)：「特集2光子科学：2」, O plus E **20-9** (1998).
- 18) 緑川 克美：OplusE **21** (1999) 1130.