

解 説

微小物体・細胞のレーザー光トラッピング

佐藤 俊一・稻場 文男

東北大学電気通信研究所 〒980 仙台市青葉区片平 2-1-1

(1991年11月6日受理)

Laser Trapping of Microscopic Particles and Biological Cells

Shunichi SATO and Humio INABA

Research Institute of Electrical Communication, Tohoku University,
2-1-1, Katahira, Aoba-ku, Sendai 980

1. ま え が き

コヒーレント特性に優れたレーザー光の出現によって初めて実現されたり可能となった新しい技術や、明らかにされた基礎的物理現象は数多い。レーザーの発明以来30年以上経過した現在でもなお、その科学・技術全般への寄与は大きく、常にわれわれの関心を引いてやまない。

これまででは主にレーザー光の単色性、集光性といったエネルギー的ないし時間的特性が大いに利用されてきた。しかし当然のことながら、光には運動量が付随しているわけであり、したがって光が物質と相互作用する際には必ず力学的な作用が働いているはずである。ところが、光子のもつ運動量は極めて小さいため、これまでには実験的議論の対象となることはほとんどなかったといってよい。

最近、Ashkin ら¹⁾によって、一本の強く集光されたレーザー光ビームを水中の微小な誘電体粒子（直径：10 μm～25 nm）に照射することによって、その微小粒子を空間内で3次元的に捕捉できることが明らかにされた。さらにその実験を進める過程において、なかば偶然的に水中の微生物も捕捉できることが見いだされた^{2,3)}。この技術は光トラッピングあるいは光ピンセットと呼ばれ、それ以来、多くの生体細胞や微生物、あるいは高分子化合物、無機物、金属などの微小物体のレーザー光を用いた光トラッピングが報告されるようになった。このような光トラッピング技術は光のもつ力学的な特性を初めて具体的に実証し、応用に結び付けた例であるといふことができる⁴⁾。

本文では、ミクロンオーダーあるいはそれ以下の大きさの微小物体の光トラッピングのうち、特に単一レーザー光ビームを用いた方法について、その原理と特性、および応用例について最新の成果をまじえながら概説する。

2. 単一レーザー光ビームを用いる光トラッピングの原理

誘電体に対して光が及ぼす力には2種類あることが知られている。光の散乱に伴う散乱力と、光の電場勾配に起因する勾配力である。大きさがレーザー光の波長よりも大きいようなミクロン程度以上の微小粒子の場合には、散乱力による力を幾何光学的に説明することができる。

まず、図1に示すように光線が屈折率の異なる媒質の境界面に入射したときには、反射および屈折が生じるため光の進行方向が変化する。このとき光の運動量の向きも変化するため、反射、屈折のいずれの場合にも、光と物体の運動量が保存されるような方向に力が発生することになる。

レーザー光ビームによって微小物体を捕捉するためのレーザー光の照射方法にはさまざまなタイプが考えられるが、まず重力と釣り合う程度の強度のレーザー光を鉛直下方から微小物体に照射するレピテーションと呼ばれる方法がある^{5,6)}。また、2本の対向するレーザー光ビームによって微小物体を押し合うようにして捕捉する方法もある⁷⁾。

これらの方法に対して、単一のレーザー光ビームを微小物体に鉛直上方から照射しても、重力に逆らっての捕

捉が可能であることが明らかにされている¹⁾。その原理を図2について述べる。ここではガウス型の強度分布をもつ1本のレーザー光ビームが上方から入射し、開口数の大きなレンズによって強く絞られた後に、球形で透明な微小物体に照射される場合を考えている。また簡単のために物体の屈折率は周囲の媒質よりもやや大きく、それゆえ物体表面で生じる光の反射率は小さいものとして、屈折光のみを考えることにする。図中Aで示した光線は物体表面において屈折するが、その際図1(b)で記したように、ベクトル \mathbf{F}_{AI} で示された方向に力が働く。光線Aは物体から出射する際にも屈折され、その時 \mathbf{F}_{AO}

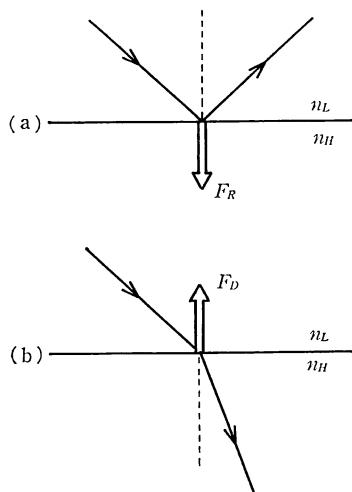


図1 光の反射および屈折に伴う力の発生 (n_L, n_H は上下の媒質の屈折率; $n_L < n_H$)
(a) 反射, (b) 屈折

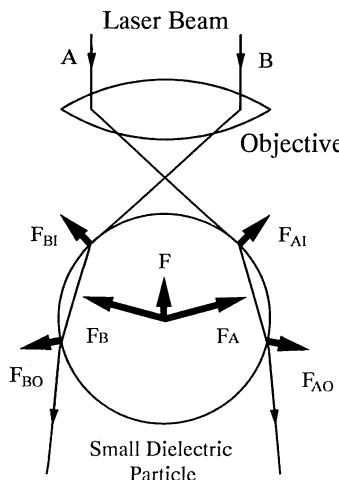


図2 単一レーザー光ビームによる3次元的な光トラッピングの幾何光学的な原理図

の力が働くことになり、その両者の合力は \mathbf{F}_A となる。この場合 \mathbf{F}_A は鉛直上方の成分を持っていること、そしてこの成分の大きさは光線Aの物体への入射角度とともに大きくなることに注意していただきたい。

もう一方の光線Bについても同様でベクトル \mathbf{F}_B で示された力が生じる。したがってレーザー光ビームの強度分布が中心対称で、物体も均一であれば \mathbf{F}_A と \mathbf{F}_B は同じ大きさとなり、両者の合力 \mathbf{F} としては水平成分が打ち消し合い、鉛直上向きの成分だけが残ることになる。このような考察に基づけば球全体について生じる合力はやはり鉛直上向の成分だけを持つことになり、そのためこの力が物体に加わる重力よりも大きければ物体は持ち上げられることになる。

もし、微小物体の中心がレーザー光ビームの中心軸上にない場合には、 \mathbf{F}_A と \mathbf{F}_B の水平成分の大きさに差が生じ、物体を光ビームの軸上に戻す方向に力が働くようになる。そのためこの物体はレーザー光ビーム内の適当な位置で3次元的に安定となり、単一のレーザー光ビームでも光トラッピングが実現されることになる。

3. 微小物体および生体細胞の光トラッピングの実験

図3にわれわれが光トラッピングの実験に用いているレーザー、光学顕微鏡およびモニター系からなる装置の基本的構成を示す^{4,8,9)}。まず連続発振するレーザー光を顕微鏡内に導き、対物レンズで試料に集光する。顕微鏡のステージを移動するなどしてこの焦点のごく近傍まで微小物体を誘導していくと、物体はレーザー光ビーム内に引き込まれるようにして光トラップされる。

波長 $1.064 \mu\text{m}$ の Nd : YAG レーザー光により、直

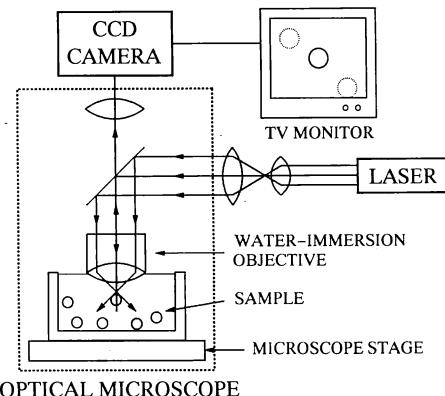


図3 単一レーザー光ビームによる微小物体の光トラッピングの実験装置の基本的構成

径約 $10\text{ }\mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス球を水中で光トラップしている様子を図4に示す。図4の矢印で示した中央付近の球にレーザー光を集光して、光トラッピングを行っている。左右の2個の球はサンプルセルの底に沈んでいてややピントが合っていないことから、レーザー光を照射した球のみが光トラップされて持ち上げられていることがわかる。

捕捉した微小粒子や細胞の操作としては、転送や回転を考えられる。転送は捕捉のために用いたレーザー光ビームを2次元的に走査するか、あるいは相対的な転送としてレーザー光ビームは固定しておいて周囲の媒質を移動することによって容易に実現される。レーザー光ビームの光軸方向の転送には、レーザー光の焦点の位置をレンズなどを用いて移動させればよい。図4は矢印の球の光トラッピングを行った状態で一度露光した後に、顕微鏡ステージを紙面に対して上方に移動してから、さらに再び露光を行ったときの写真であり、底に沈んでいる両側の球はステージとともに上に移動するが光トラップされている球は捕捉されたまま動かず、相対的な転送が実現されていることがわかる。

図5には Nd: YAG レーザー光によって光トラッピングされたマウスのミエローマ細胞の様子を示す。(a)の矢印で示された細胞をトラップしている。この状態で顕微鏡ステージを鉛直下向きに下げるとき、(b)で見られるようにトラップされていない他の細胞の像は焦点がぼけてくる。さらにステージを紙面に対して下方に移動す

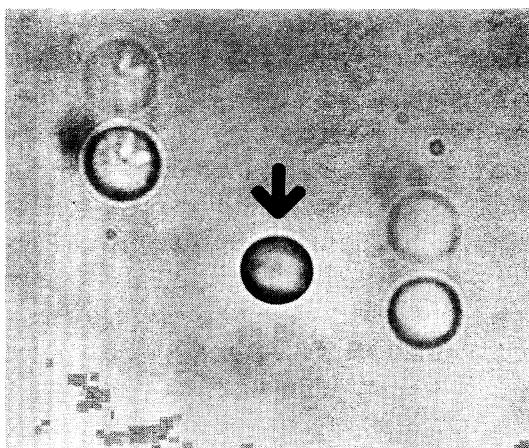


図4 Nd:YAG レーザー光によるポリスチレンラテックス球の光トラッピングの実験
(レーザー光出力: 約 10 mW) (矢印の球をトラップした後、試料をのせた顕微鏡ステージを紙面の上方向に移動する前と後の2重露光による写真)

ると、(c)のように光トラッピングされた細胞は移動しないのに対して、トラップされておらず焦点が合っていない他の細胞は、ステージとともに移動しているのがわかる。

4. 光トラッピング力の特性

単一のレーザー光ビームによる光トラッピングにおいて生じる力の成分としては、レーザー光の光軸に対して

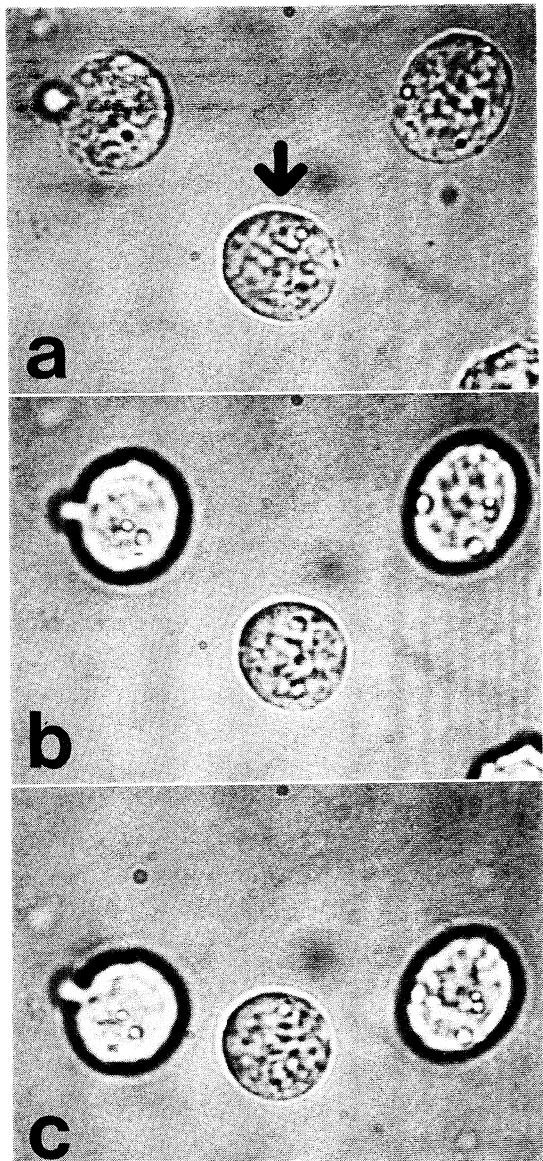


図5 Nd:YAG レーザー光によるマウスのミエローマ細胞の光トラッピングの様子 (レーザー光出力: 約 15 mW , 細胞の直径: 約 $15\text{ }\mu\text{m}$)

平行方向および垂直方向にわけることができる。これらは図3の装置を用いる観測者から見るとそれぞれ鉛直方向および水平方向となるが、その大きさは図2での説明と同様に幾何光学的考察を基にして計算によって求めることができる^{10,11)}。

以下にそれらの主要な事柄について述べることにする。まず当然のことながら、トラッピング力は光の入力強度に比例する。したがってレーザー光強度が大きいほど強いトラッピング力が得られることになるが、實際にはトラップされる物体にはわずかながらも吸収があるため、損傷を受けない程度に入力光強度を制限する必要がある。後で触れるが、このことは特に生体細胞などを扱う場合に重要となる。

次に、レーザー光ビームのスポットサイズは小さいほど、大きな鉛直方向の力が得られる。スポットサイズは用いるレンズの開口数にはほぼ逆比例するため、このことは開口数の大きなものを用いれば強いトラッピング力が得られることを意味している。通常の実験では顕微鏡用の対物レンズが一般に用いられるが、開口数が1.2程度以上のものであれば比較的容易に光トラッピングを行うことができる。また、スポットサイズはレーザー光波長に比例するため、波長の短いレーザーを用いても同様の効果を期待できる。しかしながら、この場合にもトラップしようとする物体の吸収波長領域をできるだけ避けなければならない。

物体の屈折率に関しては、比屈折率が1に近づくに従い鉛直方向の力は大きくなるが、ある値を境に減少し1のとき力は発生しない。図2の説明においては簡単のため屈折光だけを考慮しているため、一見すると比屈折率が大きいほど力が単調に増加するように思われる。しかしながら実際には鉛直下向きの合力を生じる反射光があり、比屈折率が大きいほど反射率も大きくなるため、鉛直上向きの力は小さくなるものと解釈される。ただし、比屈折率が1の場合には力が働くこととは明らかであり、比屈折率を小さくしていった場合ある値を境に発生する力は減少していくものと考えられる。

微小物体の大きさについては、レーザー光ビームの範囲内でその直径が大きいほど鉛直上向きの力は大きくなる。ところが、同時に物体の質量も増加するため、重力に抗して持ち上げることは難しくなる。実験的には、100 mW程度のレーザー光出力で約10数μmのポリスチレンラテックス球をトラップすることができる。物体の大きさが波長よりも小さい場合には、簡単な幾何光学的モデルでは説明できず、光電場の強度勾配に比例する

勾配力で考えなければならないが、小さいものではおよそ25 nm程度までの大きさの誘電体粒子をトラップした実験例が報告されている¹¹⁾。ただし、サブミクロン以下の微小粒子の光トラッピングでは、周囲の媒質(水など)のブラウン運動による擾乱が無視できなくなり、トラッピングを長時間安定に持続することが難しくなる。

物体の中心とレーザー光ビームの焦点の位置との間の距離をパラメータとしたときの鉛直上向きの力は、焦点から下側の方向に離れるにしたがい次第に大きくなり、ある位置で最大となる。さらに距離が大きくなると力の大きさは減少していく。光トラップされる物体は重力と釣り合う位置で安定になるわけであるが、光トラッピング力の最大値が重力を上回る時には、2箇所ある釣合の位置のうち焦点に近い側の方でトラップされることになる。一方、水平方向の力をビームの光軸と物体の中心との距離を変えて計算した場合には、レーザー光ビームの中心方向に引きつけようとする力は距離とともに次第に大きくなるが、ある位置を越えると減少するという結果が得られている。

以上は幾何光学的考察に基づく計算の結果であり、定性的には実験事実とほぼ一致している。しかしながら、計算を行う際に仮定したパラメータの値は実際の実験での値とは必ずしも同じではないため、定量的には一致しない場合も多い。

実際に光トラッピングによって生じる鉛直方向の力の大きさについては、トラップされた球の重量からおおよそ見積ることができる。この値は物体の大きさや比重、レーザー出力や波長、対物レンズの開口数、物体と周囲の媒質との屈折率比などによって大きく異なるが、物体の大きさが数μm程度でレーザー光出力が数mWであるとすると、10⁻¹²N程度となる。これに対して、水平方向の力は、光トラッピングされた球形粒子を等速度で移動させ、トラップ状態からはずれる際の限界速度を実験的に求めて、その値を粘性流体中の球形物体に働く力を与えるストークスの法則に代入することによって算定することができる^{4,8,9)}。この場合もトラップの条件によって力の大きさは異なるが、上述の条件下において10⁻¹²から10⁻¹¹N程度の値が得られている。これらの値は水中において~100 μm/s程度の速度に相当する。

5. 光トラッピングが実現されている

微小物体および生体関連物質

現状で光トラッピングが可能なものは、基本的には大きさが数十μm程度以下の透明な物体である。したがっ

て、レーザー光の出力パラメータを適当に選択すればさまざまな微小物体をトラップすることができる。現在までに報告されているものは、通常の無機物や有機物の微小粒子としては、最も早くから実験が行われているガラス球やポリスチレンラテックス球、シリカ粒子¹⁾のほか、LiNbO₃¹²⁾、金属球¹³⁾などが挙げられる。また、生体細胞などを含む生体関連物質ではウイルスやバクテリア²⁾、コウボ菌³⁾、赤血球^{14,15)}、リンパ球¹⁶⁾、培養細胞^{17,18)}、精子¹⁹⁾、染色体²⁰⁾、ミオシンフィラメント²¹⁾、バクテリアのベン毛²²⁾、ミトコンドリア²³⁾などがある。

前節で述べたように光トラッピング効果を幾何光学的に考察した場合、物体と周囲の媒質との比屈折率が大きいと光トラッピングは難しくなるという結果が得られているが、LiNbO₃ 微小粒子の波長 1.064 μm での屈折率は約 2.2 であり、水との比屈折率は約 1.65 にもなる。このような屈折率の高い物体に対して 3 次元的な光トラッピングが観測された¹²⁾のはこれまでに例がなく、他の高屈折率の微小物体でも光トラッピングができる可能性を示唆している。また、光トラッピングでは常にレーザー光を強く集光しており、物体は非常に強い光エネルギー密度の中におかれている。したがって大きな非線形感受率をもつ物質を光トラッピングすると、同時に各種の非線形光学現象が観測されることが期待される。その最初の実証として光トラッピングされた LiNbO₃ 微小粒子からの Nd: YAG レーザー光の第二高調波の発生が報告されている¹²⁾。金属球の捕捉の例は、レーザー光ビームを円状に走査することによって実現されている¹³⁾。これはレーザー光ビームの外側の部分の球面からの反射によって生じる力を利用したもので、不透明な物体でも 3 次元的にトラップできることが初めて示された。

一方、上述のような細胞などを含む生体関連物質を光トラッピングする場合には、光の吸収による試料の損傷を極力避けるために、主として近赤外域のレーザー光が用いられる。入手のしやすさや比較的大きな出力が容易に得られるなどの理由から多くの場合、波長 1.064 μm の Nd: YAG レーザーが用いられているが、既に市販されている半導体レーザー (0.8~1.3 μm 帯) もコンパクトで低価格なレーザーとして利用できることが報告されている^{4,8,9,14)}。また、最近開発された Ti: Al₂O₃ レーザーは近赤外域の広い範囲で波長可変 (約 0.7~1 μm) であるため、生体細胞などに限らず多種多様な物質に対して、より最適な波長で光トラッピングを行うことができるレーザーとして今後の幅広い応用が期待されている。

6. 光トラッピングの応用例

現在、光トラッピングは生体関連の分野を中心とした応用研究が盛んに行われている。

まず、バクテリアのベン毛のコンプライアンスの測定が報告されている²²⁾。実験ではベン毛を 1 本だけ残して他を全部取り去り、そのベン毛をガラス板に付着させる。次にそのベン毛がついてないバクテリアの他方の端部を光トラッピングで捕捉し、ベン毛を中心にレーザー光ビームを円状に走査することによって、バクテリアを回転させる。そのときの力の測定値からベン毛のコンプライアンスを推定している。

生体細胞内の微小管上をミトコンドリアが輸送される際の力の測定も行われ²³⁾、1 個の分子モーター当たり 2.6×10^{-7} dyne という値の力が発生しているという結果が得られている。In vitro な系での同様な測定も行われている²⁴⁾。

以上のように光トラッピング法の最近の応用としては、主に生体細胞内に関連する微小な機械的運動の力学的特性の測定が試みられているが、光ピンセットといえる光トラッピング技術を紫外域パルスレーザー光を用いた細胞融合法と組み合わせた、全光学的な新しい融合法の開発も行われている^{17,18)}。この方法によれば、所定の細胞の個別的な捕捉、転送、そして接着、融合などの一連の作業を全てそれぞれ適したレーザー光を用いて遠隔的に行うことができるため、選択的で安全な細胞融合法として今後の応用が期待されている。

また、これまでの光トラッピングの実験では、もっぱらガウス型の強度分布をもつ基本モードのレーザー光ビームが利用されていたが、最近高次の横モードをもつレーザー光でも光トラッピングが実現できることが明らかにされている¹⁵⁾。さらに、このような光ビームを用いることによって、より強いトラッピング力が発生することやトラッピングした微小物体の回転操作が可能なことも示された¹⁵⁾。なお、回転操作は円偏光したレーザー光ビームを用いても得られている²⁵⁾。

7. おわりに

レーザー光を用いた光トラッピング法は、現在およそ数十 μm 以下のサイズの微小物体の非接触で非破壊な遠隔操作を行うことができるという特徴を生かして、主に細胞や細胞小器官、生体関連物質などを対象とした応用研究が進められている。しかしながら、最近さまざまな波長やモードのレーザー光、さらにビーム走査法²⁶⁾を用

いた光トラッピング技術が開発されてきており、対象となる物質やその形状などの範囲もますます広がってきている。したがって、今後は生体関連以外の多様な物体の光トラッピングの研究も盛んに行われるものと判断される。特に、マイクロモータやマイクロポンプなどの開発・実用化は世界的にも大きな関心がもたれており、その一環としての光の力学的性質を利用する新しいアクチュエータやマイクロマシーンの実現は大いに期待されるものである。

文 献

- 1) A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm and S. Chu : "Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles," *Opt. Lett.*, **11** (1986) 288-290.
- 2) A. Ashkin and J. M. Dziedzic : "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria," *Science*, **235** (1987) 1517-1520.
- 3) A. Ashkin, J. M. Dziedzic and T. Yamane : "Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams," *Nature*, **330** (1987) 769-771.
- 4) 佐藤俊一, 稲場文男 : "レーザ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** (1991) 576-580.
- 5) A. Ashkin and J. M. Dziedzic : "Optical levitation by radiation pressure," *Phys. Rev. Lett.*, **19** (1971) 283-285.
- 6) 清水 黙 : "レーザー光圧力による微粒子・超微粒子の制御法", 光学, **18** (1989) 196-202.
- 7) A. Ashkin : "Acceleration and trapping of particles by radiation pressure," *Phys. Rev. Lett.*, **24** (1970) 156-159.
- 8) 佐藤俊一, 稲場文男 : "レーザーピンセットによる微粒子, 微生物操作", 光学, **19** (1990) 513-514.
- 9) S. Sato, M. Ohyumi, H. Shibata, H. Inaba and Y. Ogawa : "Optical trapping of small particles using a 1.3-μm compact InGaAsP diode laser," *Opt. Lett.*, **16** (1991) 282-284.
- 10) W. H. Wright, G. J. Sonek, Y. Tadir and M. W. Berns : "Laser trapping in cell biology," *IEEE J. Quantum Electron.*, **QE-26** (1990) 2148-2157.
- 11) T. C. Bakker Schut, G. Hesselsink, B. G. de Groot and J. Greve : "Experimental and theoretical investigations on the validity of the geometrical optics model for calculating the stability of optical traps," *Cytometry*, **12** (1991) 479-485.
- 12) 石榑雅之, 草野文雄, 佐藤俊一, 稲場文男 : "光トラッピングを行なった微小粒子における非線形光学現象の検出 I. LiNbO₃ 微粒子からの第二高調波発生", 第 52 回応用物理学講演会講演予稿集 (応用物理学会, 東京, 1991) p. 952.
- 13) 笹木敬司, 越岡雅則, 三澤弘明, 喜多村昇, 増原 宏 : "レーザー走査マイクロマニピュレーション III. 微小構造物の組立と駆動", 第 52 回応用物理学会学術講演会講演予稿集 (応用物理学会, 東京, 1991) p. 841.
- 14) 佐藤俊一, 稲場文男 : "レーザーによる細胞の非接触マニピュレーション", 医学のあゆみ, **154** (1990) 630.
- 15) S. Sato, M. Ishigure and H. Inaba : "Optical trapping and rotational manipulation of microscopic particles and biological cells using higher-order mode Nd: YAG laser beams," *Electron. Lett.*, **27** (1991) 1831-1832.
- 16) 大弓正志, 佐藤俊一, 稲場文男 : "微生物体のレーザー光トラッピングの実験 III. 830 nm 半導体レーザーの応用", 第 37 回応用物理学関係連合講演会講演予稿集 (応用物理学会, 東京, 1990) p. 1004.
- 17) R. W. Steubing, S. Cheng, W. H. Wright, Y. Numajiri and M. W. Berns, "Single beam optical trapping and micromanipulation of mammalian cells," *Laser-Tissue Interaction*, ed. S. Jacques, Proceedings SPIE **1202** (Bellingham, 1990) pp. 272-280.
- 18) 石榑雅之, 佐藤俊一, 稲場文男 : "All Optical Cell Fusion の実験的検討と実現", 第 52 回応用物理学会学術講演会講演予稿集 (応用物理学会, 東京, 1991) p. 1115.
- 19) Y. Tadir, T. Ord, W. H. Wright, R. H. Asch, O. Vafa and M. W. Berns : "Micromanipulation of sperm by a laser generated optical trap," *Fertil. Steril.*, **52** (1990) 944-947.
- 20) M. W. Berns, W. H. Wright, B. J. Tromberg, G. A. Profeta, J. J. Andrews and R. J. Walter : "Use of a laser-induced optical force trap to study chromosome movement on the mitotic spindle," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86** (1989) 4539-4543.
- 21) 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** (1991) 58-61.
- 22) S. M. Block, D. F. Blair and H. C. Berg : "Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers," *Nature*, **338** (1989) 514-518.
- 23) A. Ashkin, K. Schutze, J. M. Dziedzic, U. Euteneuer and M. Schliwa : "Force generation of organelle transport measured *in vivo* by an infrared laser trap," *Nature*, **348** (1990) 346-348.
- 24) S. M. Block, L. S. B. Goldstein and B. J. Schnapp : "Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers," *Nature*, **348** (1990) 348-352.
- 25) 杉浦忠男, 河田 聰, 南 茂夫 : "円偏光レーザービームを用いた顕微鏡下での粒子の回転操作", 分光研究, **39** (1990) 342-346.
- 26) K. Sasaki, M. Koshioka, H. Misawa, N. Kitamura and H. Masuhara : "Laser-scanning micromanipulation and spatial patterning of fine particles," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **30** (1991) L 907-L 909.