

## 光による細胞の操作

田代 英夫\*・矢内 勝\*\*

顕微鏡という道具によって初めて“見る”ことのできた細胞というマイクロな世界は、最近では対物レンズを通してレーザービームを導入することにより“さわる”ことができるようになってきた。すなわち、光操作機能をもたせることより、分子や細胞の力学的なパラメーターの計測や局所的な応答の直接観測が可能となった。このような能動的な光細胞操作法の活用について、われわれの研究を中心に紹介する。

### 1. 光による細胞操作：光ピンセットと光メス

レーザー光操作顕微鏡の技術によって何ができるかをまとめたものが図1である。

レーザービームを開口数の大きな対物レンズによって鋭く集光することにより集光点近くに小さな粒子を安定に捕捉し、レーザービームとともに移動させる光ピンセット技術が1986年に発明された。光ピンセット法は、機械的なマニピュレーターでは得られない操作上と構造上の大きな自由度を得ることができるのが利点である。すなわち、近赤外域のレーザー光を利用することにより、カバーガラスで封じた細胞サンプルに対して、非接触・非破壊で細胞や細胞小器官を光学顕微鏡下において捕捉・操作することが可能となる。このような光操作においては捕捉した細胞や細胞内の顆粒あるいは小器官に損傷を与えないことが条件となる。このため細胞内の分子や水に吸収されにくい近赤外のYAGレーザーがもっぱら利用される。とはいえ、レーザー光は集光点では $10^7$  W/cm<sup>2</sup>程度のレーザー光強度をもつことになる。このため、光のわずかな吸収、すなわち2光子吸収のような非線形光吸収でも局所的に温度が上

がり、レーザー光の細胞や生体分子活性への影響が常に問題となる。実験的にはYAGレーザー(1.06 μm)では100 mW程度の入力強度までは細胞は死なないとされている。水のオーバートーン吸収のより少ない800 nm付近では、生体分子等の多光子吸収が入力制限となる。

一方、光ピンセットマニピュレーションと同様にレーザー光を利用した技術として、生体試料の微小部位を加工する光メスの技術も、生物学の研究で広く利用されている。紫外～可視域のレーザー光を顕微鏡対物レンズにより集光して生物試料に照射することで、その微細部位に容易に損傷を与えることが可能であり、レーザー光メスとして生物試料の微細加工に利用することができる。神経細胞の突起などはレーザーメスによる収縮や切断が起こる。光損傷の効果は局所吸収加熱によるタンパクの変性によるものと思われるが、正確な解析はなされていない。

### 2. 細胞骨格分子の研究

われわれは、細胞が形態を維持する上で重要な役割をもつ細胞骨格のひとつである微小管(microtubule)の剛性や安定性などのキャラクタリゼーションを行うため、図2に示すようなビデオコントラスト増強微分干渉顕微鏡(DIC)と組み合わせた光ピンセットと光メスを利用した。*In vitro*の実験では、DIC観察によりスライドガラス上で重合させた微小管(約25 nm径)の単一フィラメントを可視化して、光マニピュレーションにより2つのガラスビーズ(直径1.6 μm)を微小管に付着させた。図3に示すように、1本または2本のレーザービームで微小管につけたビーズを通して数pNの力を加えることで微小管を容易にたわませることができる。マクロな系での座屈に関するオイラーの式を直接適用して微小管の曲げ剛性を求めたところ、 $4 \times 10^{-23}$  N/m<sup>2</sup>となった<sup>1)</sup>。この剛性は微小管付随

\*理化学研究所工学基盤研究部(〒351-0198 和光市広沢 2-1)

E-mail: htashiro@postman.riken.go.jp

\*\*東北大学医学部老年・呼吸器内科(〒980-8574 仙台市青葉区星陵町 1-1)

タンパク質の存在により大きく変化する。微小管を均質な物質と仮定してヤング率を求めるとおよそ  $10^8 \sim 10^9 \text{ N/m}^2$  であり、ポリエチレンと同程度の値であった。

*In vivo* の実験でも、同様の実験ができる。ラットの後根神経節細胞を培養してフローセルに封入し、顕微鏡観察下で界面活性剤を含む緩衝液を灌流して細胞膜を除去することで神経突起内の微小管の束を露出させる。この際多くの微小管は脱重合して数分以内に消失するが、一部のものは安定型微小管として数時間にわたって残存した<sup>2)</sup>。安定型微小管のみが残る溶液中に添加したポリスチレンビーズを光操作して微小管に付着させた。このビーズを操作して微小管に直接的に外力を加えると、一部のフィラメントでは、1本に見えるフィラメントでも複数本に分離されるものがあった。再構成系の微小管と同様に、数 pN の力でこれらの微小管を容易に曲げることが可能であり、微小管の曲げ剛性もおよそ  $10^{-23} \text{ N/m}^2$  オーダーであると評価された。

微細加工用の光メスとしてピコ秒モード同期あるいはナノ秒 CW-Q スイッチ Nd:YAG レーザー光の2倍高調波を利用できる<sup>3)</sup>。先に述べた神経細胞から直接抽出した安定型微小管は、溶液中で数時間安定に残存するが、光メスにより切断すると図4に示したように数~数十  $\mu\text{m}/\text{min}$  の速度で脱重合して短くなった。この短くなる過程には3

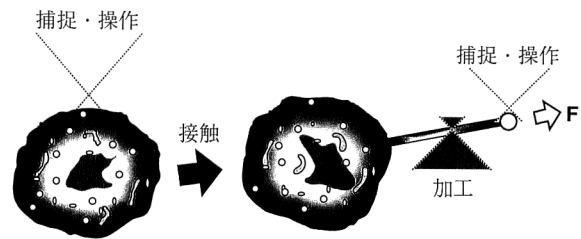


図1 光による細胞間および細胞内操作の基本。

つのパターンがあった。また、カーブしている微小管を切断するとピンとはじけて直線状になることから、曲げて保持するためにとりどころで微小管はアンカーされていることもはっきりした。このように光メスは微小管の安定化についてのキャラクター化に使用できた。

### 3. 白血球の局所粘弾性の測定

肺胞や肺間質に炎症が生じ、白血球が、肺循環の微小血管に集積すると、活性化され血管内皮に接着した後、内皮間をくぐり抜けて間質、肺胞へ遊走する。気管支壁に炎症が生じると、白血球は、毛細管近傍の小静脈で捕捉され、ローリングした後、接着、血管外遊走を行い炎症部位に到達する。

これらの一連のプロセスは、肺炎をはじめ種々の呼吸器感染症から宿主を守る働きをする以外に、成人呼吸促迫症

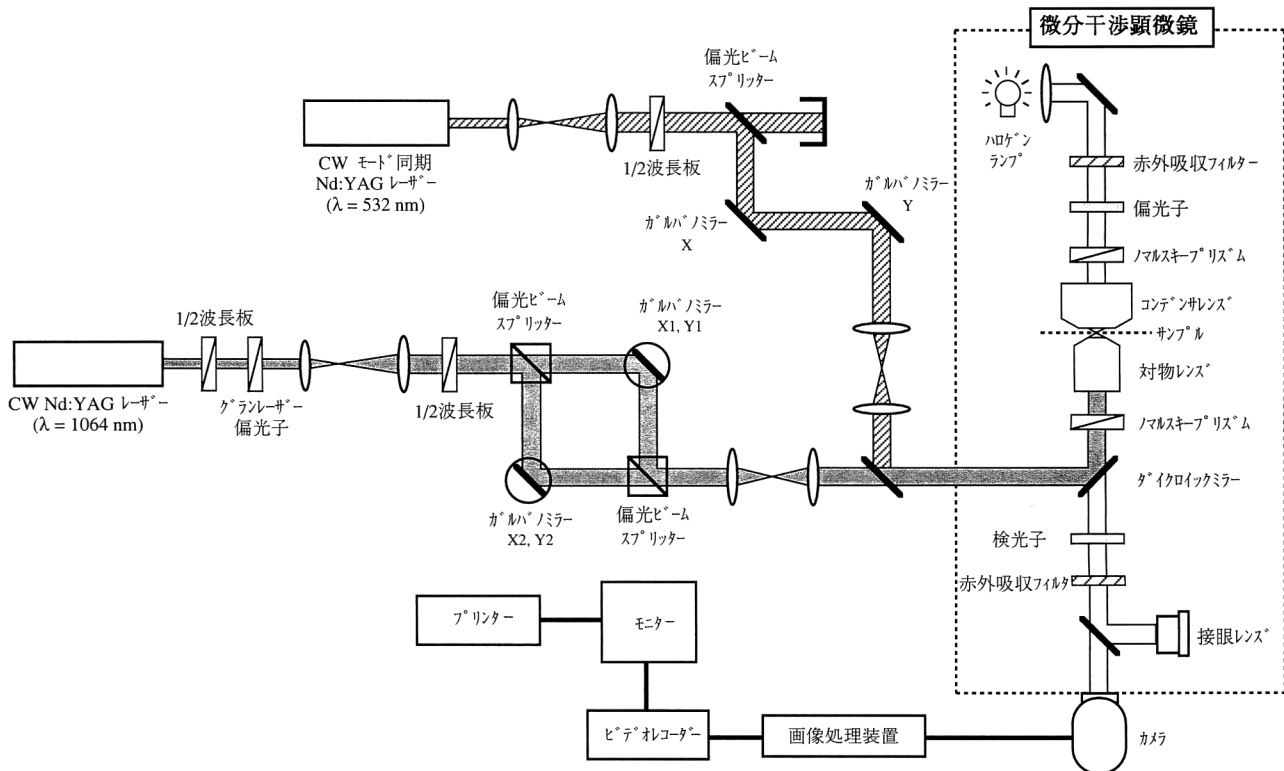


図2 代表的な光操作顕微鏡。

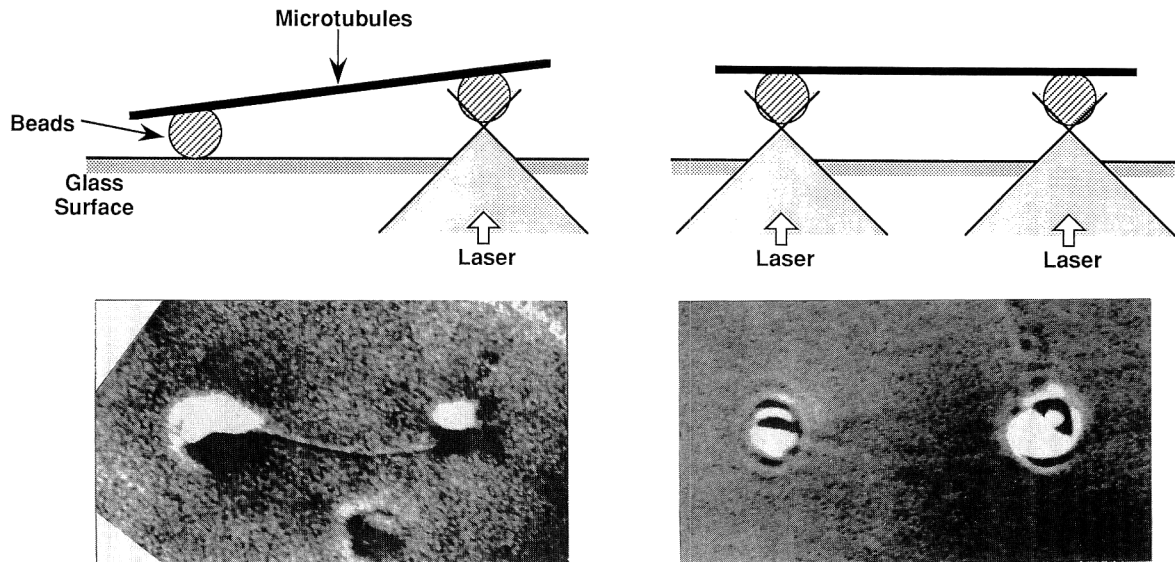


図3 フィラメント状の生体分子（微小管）の操作法。

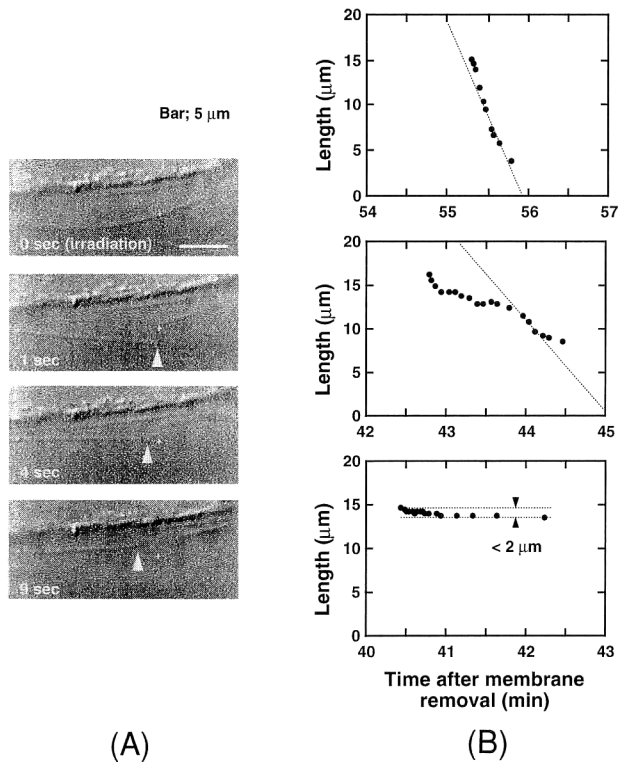


図4 微小管切断後の収縮過程の顕微鏡観察 (A) と時間変化 (B)。

候群や、特発性肺線維症、気管支喘息等の発症、増悪にも深く関与している。血管内皮へ接着した後、血管をくぐり抜け、組織で遊走する際には、白血球は大きく動的な変形を受ける。このとき、細胞骨格は、細胞内の局所で動的に不均等に重合、脱重合され、それに従い、細胞質の粘性と弾性も動的に変化するはずである。これまで、遊走中の白血球で、細胞内の局所粘性、弾性の動的分離測定は、方法

上の制約から成されていない。この粘弾性の測定は、白血球の遊走のメカニズムの解明にも役立つ上に、老人性肺炎を代表とする高齢者の呼吸器感染症、および、成人呼吸促迫症候群、特発性肺線維症や喘息の症例において、白血球の遊走機能の異常の検索や薬物によるその正常化にも利用できる。

遊走メカニズムの解明のため、正常人の遊走中の好中球において局所の細胞質の粘性、弾性を測定する方法論を確立し、細胞内部位による差異を検討するために光操作を用いた<sup>4)</sup>。

好中球の細胞質内には直径  $0.5 \mu\text{m}$  以下の顆粒が多数存在する。これらの細胞内顆粒を光トラップにより捕捉して、 $0.3$ ,  $1$  または  $3 \text{ Hz}$  の正弦波で強制振動を加える (図5)。光トラップ中心から顆粒の重心がずれると、顆粒をトラップ中心に引き戻すように弾性力が働く。顆粒に加わるトラップ力の弾性係数がわかれば、光トラップの振幅、顆粒の振幅、顆粒がトラップから遅れる位相差、およびトラップ中心からの顆粒のずれより強制振動させている顆粒周辺の細胞質の弾性係数および粘性を分離測定できる。

正常人の遊走中の好中球で、仮足進展部、体部、および尾部における細胞質の弾性係数および粘性を測定した。その結果はそれぞれ、 $0.5$ ,  $11$ ,  $8 \text{ dyn/cm}^2$ 、および  $3.5$ ,  $0.6$ ,  $3.5 \text{ dyn s/cm}^2$  であった (図6)。遊走中の好中球の細胞質粘性は、細胞内の部位によって異なり、仮足進展部では、体部、尾部に比べて弾性係数は  $1/20$ 、粘性は  $1/6$  といずれも著明に低下していた。体部、尾部では粘性、弾性ともに有意の差は認めなかった。

時定数は、粘弾性の評価のもうひとつの重要なパラメー

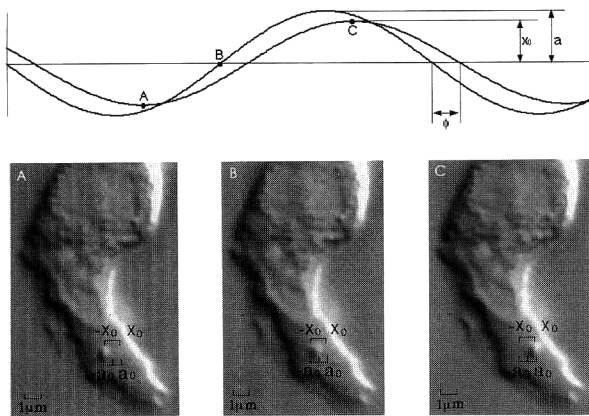


図5 好中球の仮足進展部における細胞内顆粒の強制振動操作。

ターである。純粋な弾性体は時定数はゼロ、純粋な液体は時定数は無限大で表される。今回、われわれが測定した時定数は、体部、尾部では、それぞれ0.3s, 0.5sに対して、仮足進展部では1.7sと延長していた。これは、仮足進展部の細胞質が、体部、尾部に比べて、より液体に近い性質であることを示唆する。

また、光トラップを用いて細胞内顆粒を0.5  $\mu\text{m}$ の振幅で強制振動させたとき、容易に動く顆粒とほとんど動かない顆粒の2群に大別された。細胞質に格子構造があり、ほとんど動かない顆粒は格子に結合したもの、容易に動く顆粒は格子に結合していないものと考えられる。体部、尾部では、3分の2が動かない顆粒であったのに対して、仮足進展部の顆粒は、ほとんどすべてが容易に動く顆粒であった。これは、体部、尾部には、細胞質の格子構造が存在するが、仮足進展部の細胞質には、格子構造がなくなることを示唆する。

次に、細胞骨格の阻害薬が、細胞質粘弾性、細胞質の格子構造に与える効果を調べた。マイクロフィラメント (F-アクチン) の重合阻害薬のサイトカラシンD, または微小管の重合阻害薬のノコダゾールを投与して、光トラップを用いた細胞内顆粒の強制振動の実験を行った。ノコダゾールは、細胞遊走能を変化させなかったが、サイトカラシンDは、細胞遊走を著しく障害して、ほとんど動かなくさせることも多かった。両薬物ともに、好中球の体部、尾部において、細胞質粘弾性の絶対値は変化させなかったが (図6)、ほとんど動かない顆粒の割合を、コントロールでの65%から、ノコダゾール群で40%, サイトカラシンD群で20%とそれぞれ減少させた (図7)。細胞をマイクロピペットに吸引する aspiration 法, 細胞を細い針で突く cell poking 法で測定した粘弾性は、細胞骨格の阻害薬により低下すると従来から報告されていた。従来の方法は、細胞

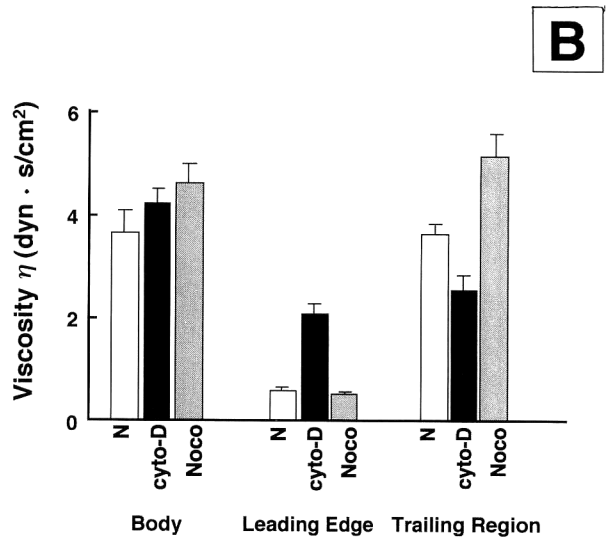
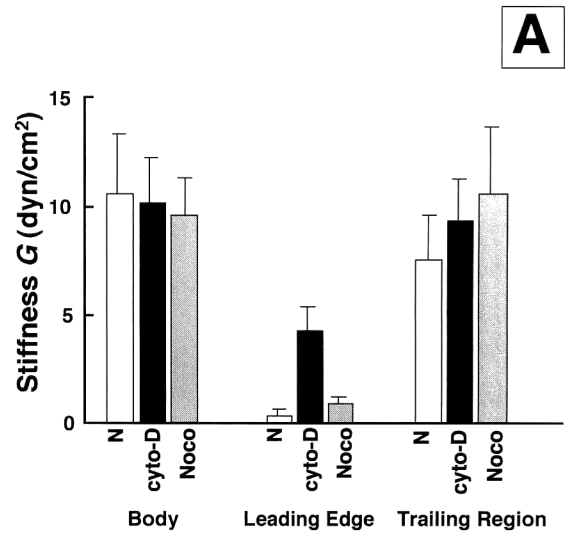


図6 好中球の体部 (B), 仮足進展部 (LE), 尾部 (TR) における弾性  $G$  (A) と粘性  $\eta$  (B)。N: コントロール, cyto-D: サイトカラシンD処理, Noco: ノコダゾール処理。

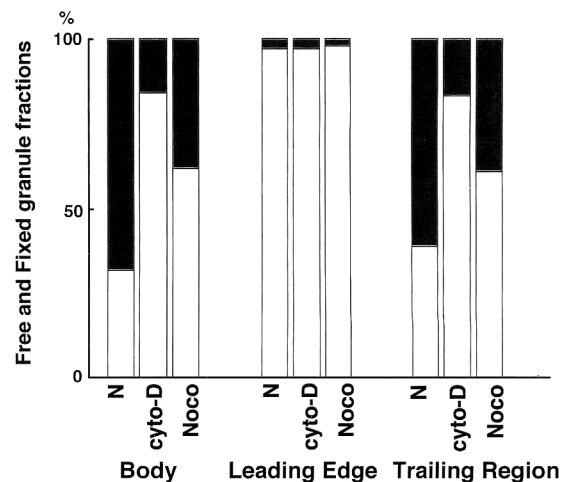


図7 強制振動により容易に動く顆粒 (白部) と動かない顆粒 (黒部) の比率。他は図6と同じ。

皮質も含めた細胞全体の粘弾性測定であり、われわれの細胞局所での測定法とはまったく異なる。今回の結果より、サイトカラシンDやノコダゾールは、局所の細胞質粘弾性を直接には変化させないが、細胞質に存在する格子構造を破壊することにより、細胞皮質も含めた細胞全体の粘弾性を見かけ上、低下させることになると考えられる。

以上より、以下のことがわかった。

1) 遊走中の好中球において、体部、尾部に比べて仮足進展部の細胞質は、さらさらの液状となっている。

2) 体部、尾部では多くの顆粒は細胞質の格子構造に束縛されているが、仮足進展部ではその構造が消失しており顆粒を光操作できる。

3) 細胞骨格阻害薬のサイトカラシンDやノコダゾールは、細胞質の局所粘弾性は変化させないが、細胞質の格子構造を破壊する。

これまで述べてきたように、光マニピュレーションは非接触・無侵襲である特徴を生かして、生体高分子から細胞に至るまでのさまざまな生物研究に広く応用される。このようなレーザートラッピング技術の生物研究への利用は急速に広まっているといえ、レーザー光による細胞障害などのさまざまな解決すべき問題もある。また、トラップ力は数十pN程度に抑えられてしまうことが多く、細胞格子構造の組み換えには力不足である場合が多い。細胞の光操作

ではレーザー損傷をさせるためレーザーパワーを大きくすることができない。したがって、レーザービームの形状の中空化などの工夫によりトラップ効率を上げる、あるいは波長の選択により損傷を抑えることが重要となってくる。

光操作技術の改良に加えて、高精度位置検出、局所分光などの計測技術を導入した総合システムとしての“光操作顕微鏡システム”の開発が今後の課題となる。

## 文 献

- 1) M. Kurachi, M. Hoshi and H. Tashiro: "Buckling of a single microtubule by optical trapping forces: Direct measurement of microtubule rigidity," *Cell Motil. Cytoskeleton*, **30** (1995) 221-228.
- 2) T. Tashiro, Y. Komiya, M. Kurachi, M. Kikumoto and H. Tashiro: "Direct visualization and characterization of stable microtubules from the neurites of cultured dorsal root ganglion cells," *J. Neurosci. Res.*, **50** (1997) 81-93.
- 3) M. Kurachi, M. Kikumoto, H. Tashiro, Y. Komiya and T. Tashiro: "Real-time observation of the disassembly of stable neuritic microtubules induced by laser transection: Possible mechanisms of microtubule stabilization in neurites," *Cell Motil. Cytoskeleton*, **42** (1999) 87-100.
- 4) M. Yanai, J. P. Butler, T. Suzuki, A. Kanda, M. Kurachi, H. Tashiro and H. Sasaki: "Intracellular elasticity and viscosity in the body, leading and trailing regions of locomoting neutrophils," *Am. J. Physiol.*, **227** (1999) c432-c440.

(1999年6月19日受理)