



Title	Mechanism and dynamics of laser cell-stimulation
Author(s)	岩永, 茂樹
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/46841">http://hdl.handle.net/11094/46841</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	岩永茂樹
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 20293 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用物理学専攻
学位論文名	Mechanism and dynamics of laser cell-stimulation (レーザーによる細胞刺激の機構とダイナミクス)
論文審査委員	(主査) 教授 河田 聡 (副査) 教授 小倉 明彦 教授 萩行 正憲 助教授 朝日 剛

#### 論文内容の要旨

本論文は、生きた細胞の内部を起点としたカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 濃度の変化を誘起する手法の開発、及びその物理現象の理解するために行った実験結果に関してまとめたものである。 $\text{Ca}^{2+}$  は、細胞内での情報伝達物質としてよく知られており、細胞間、細胞内での挙動について古くから研究されてきた。細胞内で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を誘起するには、これまでガラスニードルや化学物質を利用して細胞膜に存在する刺激受容体を刺激していた。レーザーを用いることにより、細胞膜の刺激受容体を刺激することなく、細胞内部を起点とした  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を誘起できる。既存の刺激手法と異なる刺激により、細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  の新しい振る舞いを調査することが可能となる。

第 1 章では、細胞内での情報伝達機構について、特に  $\text{Ca}^{2+}$  が関与した情報伝達機構について概説した。生きた細胞内で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を誘起するために、これまで用いられてきた刺激手法をいくつか述べ、レーザーを用いた刺激手法の利点を述べた。

第 2 章では、近赤外超短パルスレーザーを利用した細胞刺激により、細胞内で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を誘起できることを実験的に示した。生きた細胞、特に癌細胞を刺激するために必要なレーザーの特性を実験的に検証した。レーザーの強度、波長、繰り返し周波数に対する依存性があることを確認した。また、薬理的に  $\text{Ca}^{2+}$  の発生源を阻害することで、レーザー照射によって誘起される  $\text{Ca}^{2+}$  の発生源を特定した。レーザー照射により焦点近傍で活性酸素種が生成しており、それが  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇に関与している事を確認した。

第 3 章では、レーザーを用いた生きた細胞の刺激メカニズムについて説明した。 $\text{Ca}^{2+}$  が  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵器官から放出される機構には、下記の 3 つがあることを発見した。1)  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵器官が直接的に多光子イオン化され、 $\text{Ca}^{2+}$  が放出される場合、2) 水分子の多光子イオン化により生成される活性酸素種による  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵器官の膜の過酸化の結果、 $\text{Ca}^{2+}$  が放出される場合、3) 活性酸素種により  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵器官に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの開閉により、 $\text{Ca}^{2+}$  が放出される場合。

第 4 章では、レーザー刺激によって細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を制御できることについて述べた。癌細胞、神経細胞、心筋細胞においてもレーザー刺激によって  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を誘起できた。 $\text{Ca}^{2+}$  トランジェントや  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションといった異なる  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を誘起できることも確認した。

第 5 章では、レーザー照射による細胞膜電位の変化の測定について述べた。レーザー細胞刺激装置に細胞膜電位測

定用のパッチクランプ装置を組み込んだ装置を作製した、レーザー刺激による細胞膜電位の変化を確認した。

総括では、本論文で得られた結果をまとめて考察し、本論文の結論および今後の展望について述べた。

### 論文審査の結果の要旨

カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は、細胞内での情報伝達物質としてよく知られており、細胞間、細胞内での挙動について古くから研究されている。細胞内で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を誘起するには、これまでガラスニードルや化学物質を利用して細胞膜に存在する刺激受容体の刺激を介して行われてきた。レーザーを用いることにより、細胞膜の刺激受容体を刺激することなく、細胞内部を起点とした  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を直接誘起できれば、細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  の振る舞いをより詳細に調査することが可能となる。本論文は、生きた細胞の内部を起点とした  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を誘起する手法の開発、及びその物理現象の理解を目的とした研究に関してまとめたものである。以下に本論文の研究成果をまとめる。

本論文では、近赤外超短パルスレーザーを利用した細胞刺激により、細胞内で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を誘起できることを提案している。フェムト秒モード同期チタンサファイアレーザーを細胞内の一点に集光し、非線形光学効果による局所的な光吸収を誘起することにより、細胞内を起点とした  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を実現している。HeLa 細胞、ラット単離心筋細胞、ラット神経細胞において、本手法により  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を誘起できることを確認している。レーザーの集光位置を変化させることで、異なった種類の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化 ( $\text{Ca}^{2+}$  トランジェント、 $\text{Ca}^{2+}$  オシレーション、 $\text{Ca}^{2+}$  波など) を誘起できることも確認している。生きた細胞を刺激するために必要な光学条件を実験的に検証し、レーザーの強度、波長、繰り返し周波数に対する依存性があることを確認している。

また、レーザー照射による  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化のメカニズムについて説明している。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化の機構については、1)  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵器官の多光子イオン化による  $\text{Ca}^{2+}$  の放出、2) 水分子の多光子イオン化により生成される活性酸素種が  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵器官の膜を過酸化した結果による  $\text{Ca}^{2+}$  の放出、3) 活性酸素種に去る  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵器官のチャネルの開閉を通じた  $\text{Ca}^{2+}$  の放出の3つが示されている。

レーザー刺激による細胞膜電位の変化を確認しており、神経細胞、心筋細胞における細胞間情報伝達も本手法により制御できることを示している。

以上のように、本論文は非線形光学を細胞刺激技術に応用することにより、細胞内の分子の濃度の変化を局部的に誘起することができることを実験的に示し、さらに、その発生メカニズムについて言及している。結果は応用物理学、特にバイオフォトニクスに寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。