



Title	Study on High-Speed Measurement of Cell Rheology Using Atomic Force Microscopy
Author(s)	高橋, 亮輔
Citation	北海道大学. 博士(情報科学) 甲第12404号
Issue Date	2016-09-26
DOI	10.14943/doctoral.k12404
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/63342
Type	theses (doctoral)
File Information	Ryosuke_Takahashi.pdf



[Instructions for use](#)

平成28年度 博士論文

原子間力顕微鏡による細胞レオロジー測定の高
速化に関する研究

**Study on High-Speed Measurement of Cell Rheology
Using Atomic Force Microscopy**

北海道大学 大学院情報科学研究科

生命人間情報科学専攻

細胞生物工学研究室

高橋亮輔

目次

第1章 序論

1.1 本研究の背景	1
1.1.1 細胞の構造	1
1.1.2 細胞の力学特性	2
1.1.3 細胞の力学モデル	5
1.1.4 細胞の弾性率の測定方法	10
1.1.5 AFMによる細胞計測	13
1.1.5.1 イメージング法	13
1.1.5.2 マッピング法	17
1.1.6 AFMによる多数細胞計測	22
1.2 本研究の目的	24
1.3 本論文の構成	25

第2章 実験の原理

2.1 原子間力顕微鏡(AFM)	27
2.2 AFM測定の原理	27
2.3 フォースカーブ測定	31
2.4 バネ定数の校正	32
2.5 弾性接触モデル	32
2.6 フォースモジュレーション法	37
2.7 時間領域と周波数領域	43
2.8 Soft Glassy Rheology(SGR)理論	46
2.9 ロックインアンブ	47

第3章 フォースモジュレーション法の高速化

3.1 背景と目的	52
3.2 実験方法	52
3.2.1 実験装置	52
3.2.2 実験手順	56
3.3 結果と考察	57

3.3.1	ソフトウェアロックインアンプの妥当性	57
3.3.2	多重化による各周波数の振幅・位相差への影響	58
3.4	結論	61

第4章 多重周波数フォースモジュレーション法による細胞レオロジー測定

4.1	背景と目的	62
4.2	実験方法	62
4.2.1	細胞培養およびサンプル作成	62
4.2.2	実験装置と測定	63
4.2.3	細胞の免疫染色	65
4.3	結果と考察	66
4.3.1	細胞高さと言率像と蛍光染色画像	66
4.3.2	各測定周波数における複素弾性率マッピング像	67
4.3.3	レオロジーパラメータマッピング像	68
4.4.4	細胞核部と細胞核部以外でのレオロジー	69
4.4	結論	70

第5章 時間および周波数領域の細胞レオロジーの比較

5.1	背景と目的	72
5.2	実験方法	72
5.2.1	細胞サンプル	72
5.2.2	実験装置	73
5.2.3	実験方法	74
5.2.4	データ解析	76
5.3	結果と考察	78
5.3.1	時間・周波数領域でのべき指数 α_S と α_M の比較	78
5.3.2	細胞押し込みにかかる遅れ時間 t_L の影響	78
5.3.3	時間・周波数領域での弾性率 g_0 と $G_0/(2\pi)^{\alpha_M}$ の比較	82
5.4	結論	83

第6章 細胞レオロジー測定的高速化

6.1 背景と目的	84
6.2 実験方法	85
6.2.1 広範囲移動可能ステージの開発	85
6.2.2 マイクロパターン金基板	86
6.2.3 細胞培養およびサンプル作成	91
6.2.4 実験装置と測定	92
6.2.5 データ解析	94
6.3 結果と考察	94
6.3.1 マイクロパターン上細胞の複素弾性率の細胞数分布	94
6.3.2 マイクロパターン上細胞の複素弾性率の周波数特性	95
6.3.3 多重周波数フォースモジュレーションによる細胞レオロジー測定	96
6.4 結論	99

第7章 本研究の結論

7.1 本研究の結語	100
7.2 今後の展望	101
参考文献	103
謝辞	107
研究業績	108

第1章

序論

1.1 本研究の背景

1.1.1 細胞の構造

真核生物の細胞の内部には細胞核, ミトコンドリア, 小胞体, ゴルジ体といった細胞小器官の他に細胞骨格と呼ばれる種々のタンパク質からなる繊維上あるいは網目状の構造物が存在する (Fig. 1.1) [1]. 細胞核の内部には遺伝情報を保持する役割を持つデオキシリボ核酸 (DNA) と DNA の遺伝情報を複製・伝達する役割を持つリボ核酸 (RNA) が存在している. 細胞核外部には Nuclear envelope spectrin repeat protein (Nesprin), Sad1p-UNC84 (SUN), Lamin といった Linker of nucleus and cytoskeleton (LINC) 複合体と呼ばれる分子群が存在し, 細胞核が細胞骨格と物理的に結合していることが示唆されている. 細胞骨格はアクチンフィラメント (外径約7 nm), 中間径フィラメント (外径約10 nm), 微小管 (外径約25 nm) の三つに分類される. アクチンフィラメントは2本のアクチン重合体が螺旋状に重なった線維であり, モータータンパク質であるミオシンと複合体を形成することでストレスファイバーを形成する. ストレスファイバーは, 主にインテグリンという細胞膜表面の細胞接着分子で構成される焦点接着斑 (Focal Adhesion, FA) を介して, 細胞外基質 (Extra Cellular Matrix, ECM) と結合している. ストレスファイバーはミオシンとの相互作用によってアデノシン三リン酸 (ATP) 依存の収縮力を発生させ, 細胞遊走や形態変化を引き起こす. また, アクチンフィラメントは網目状構造で細胞膜の直下にも存在することが知られており, 細胞膜の裏打ち構造をなすアクチンフィラメントはアクチン皮層と呼ばれている. アクチン皮層は細胞膜に構造としての強度を与え, 形態維持に寄与すると考えられている. このように, アクチンフィラメントは細胞形態の維持・変化や細胞運動の制御において重要な役割を果たしている. 微小管はチューブリンというタンパク質の重合体で, 細胞周辺に向かってネットワーク構造を広げる. 微小管にはキネシンとダイニンというモータータンパク質が結合し, それらは微小管上を移動して細胞内小器官を輸送する働きを持つ. ECM で発生した力が細胞骨格を介して細胞核に伝わることで, 遺伝子発現の調整に関与していると考えられている (Fig. 1.2) [2].

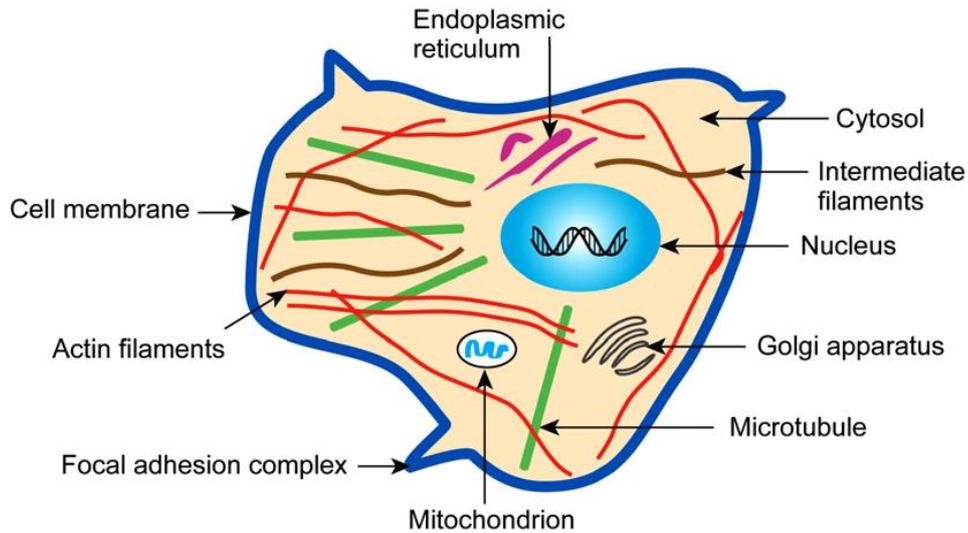


Fig. 1.1 細胞内構造の模式図[1].

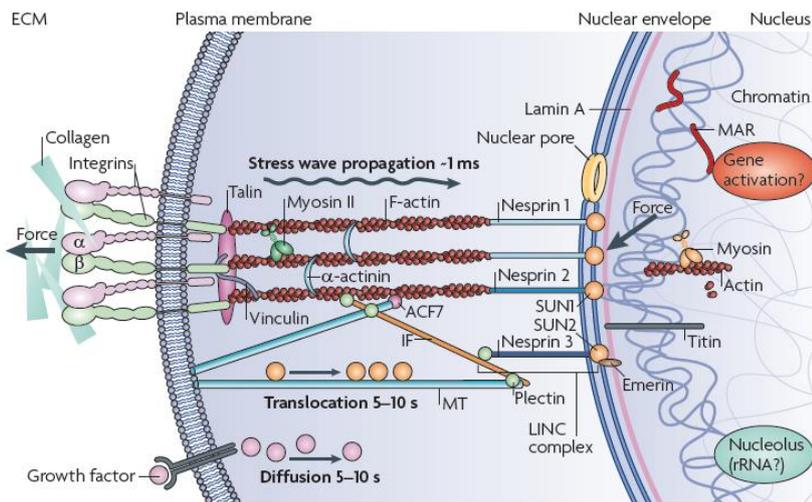


Fig. 1.2 細胞骨格の介在によって細胞外マトリックスで発生した力が核に伝播する模式図[2].

1.1.2 細胞の力学特性

細胞の力学特性は、牽引力（細胞骨格の張力）と弾性率に大別できる。牽引力は、ストレスファイバーの収縮によって発生する。接着性の細胞は移動する際、アクチンフィラメントの重合により細胞前端を伸長させ新たなFAを形成して、牽引力を発生させることで移動を行う (Fig. 1.3)。また、牽引力は細胞-ECM間だけでなく細胞間接着結合 (Adherens Junction, AJ) によって、隣接する細胞間でも生じている。細胞が集団

で移動する際、細胞間の牽引力によって細胞運動の方向が決定される (Fig. 1.4).

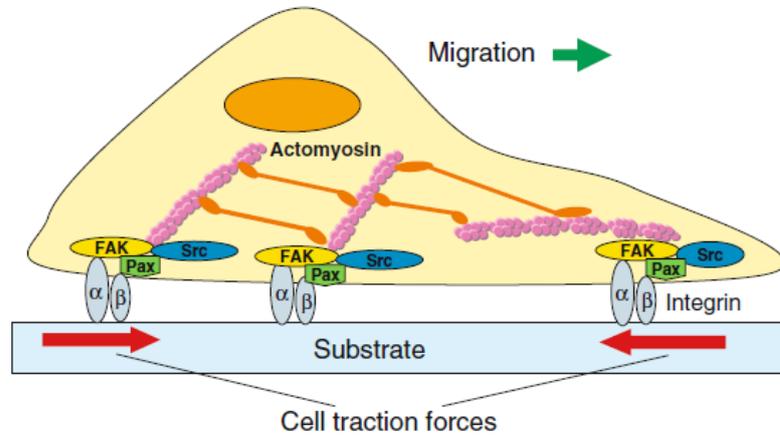


Fig. 1.3 細胞-ECM 間の接着構造と牽引力による細胞移動の模式図.

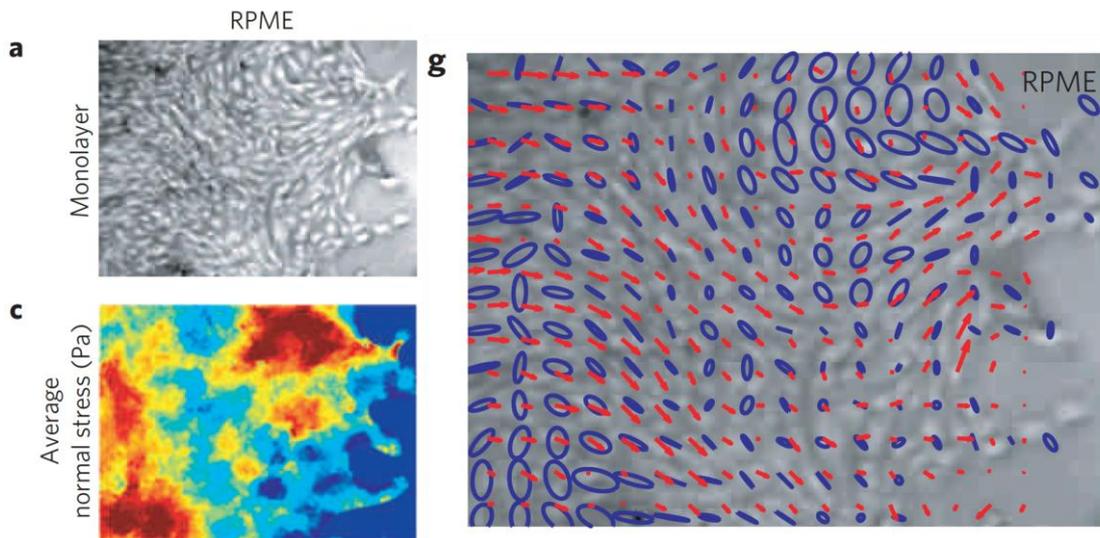


Fig. 1.4 (a) RPME 細胞の明視野像. (c) 細胞-細胞間の平均牽引力分布. (g) 赤矢印が細胞運動の速度ベクトル, 青い楕円が細胞間牽引力を示している[3].

細胞の弾性率は、細胞核などの細胞小器官や細胞骨格、細胞膜などの細胞構造の不均一性に対応して空間的に不均一である (Fig. 1.5). 弾性率の1つであるヤング率は等方的な材料において一軸方向の力による単位歪当たりの応力 (応力/ひずみ) で定義される.

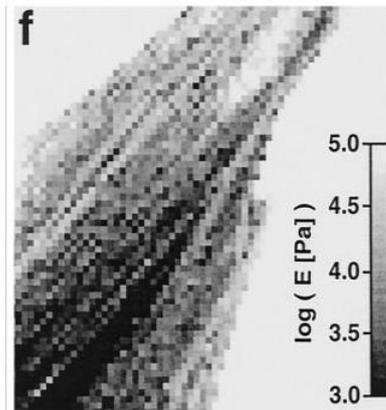


Fig. 1.5 細胞の弾性率像.

実際の細胞は形状を維持する弾性の性質だけでなく変形流動する粘性の性質を併せ持つ粘弾性体である. 物質の粘性は, ニュートン粘性係数や動粘性係数で表される. ニュートン粘性係数は, 単位歪速度当たりの応力(応力/歪速度)で定義される. 動粘性係数は, ニュートン粘性係数と物質の密度によって定義される(ニュートン粘性係数/密度).

粘弾性体は, ひずみや応力が時間に依存して変化する. 細胞に一定のひずみを加え続けると応力が時間とともに減少していく. 一定歪 ε_0 を与えた時の応力の時間変化を $\sigma(t)$ とすると, 線形領域において, 以下の式で定義される.

$$\sigma(t) = E(t)\varepsilon_0$$

ここで, $E(t)$ は緩和弾性率と呼ばれる.

また, 細胞に角周波数 ω の振動ひずみを加えると, ひずみに応答して振動応力が観測される.

$$\varepsilon(t) = \varepsilon_0 e^{i\omega t}$$

$$\sigma(t) = \sigma_0 e^{i(\omega t + \delta)}$$

ここで, ε_0 はひずみの振動振幅, σ_0 は応力の振動振幅, i は虚数単位, δ は応力とひ

ずみとの位相差を表している. これらの式より複素弾性率 E^* はこのように定義される.

$$E^* = \frac{\sigma(t)}{\varepsilon(t)} = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} e^{i\delta} = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} (\cos\delta + i \sin\delta) = E' + iE''$$

ここで, E' と E'' はそれぞれ貯蔵弾性率, および損失弾性率と呼ばれる.

1.1.3 細胞の力学モデル

細胞力学測定では, 細胞の機械的挙動を表すために様々な力学モデルが提唱されている. 接着細胞の力学モデルは, 具体的な細胞骨格等の内部構造を考慮しているか否かで大きく二つに分けられる. 内部構造に基づいたモデルには Open-cell form model[4-6], Tensed cable networks[4, 5], および Tensegrity model[4, 5, 7]がある. 一方で, 内部構造に基づかないモデルには, 有限のバネやダッシュポットの組み合わせで表される Linear viscoelastic model[8]や Power-law structural damping model[8]がある. 以下にそれぞれのモデルの概要を述べる.

(a) Open-cell form model

細胞のアクチン骨格構造を弾性柱のネットワーク構造と見なしたモデル化である. Satcherらは, 細胞の変形を弾性柱のたわみと考え, アクチン骨格のヤング率を以下のように表した[6].

$$E^* = CE\phi^2,$$

ここで, C は定数, E はアクチンフィラメントのヤング率を表している. ϕ はフォーム密度と呼ばれ, フォーム全体の体積に対する弾性柱の体積分率で, $0 < \phi < 1$ の値をとる. この Open-cell form model は細胞骨格に働く初期張力(プレストレス)は考慮されておらず, 細胞骨格のモデルとしては適用が限られているモデルである[4].

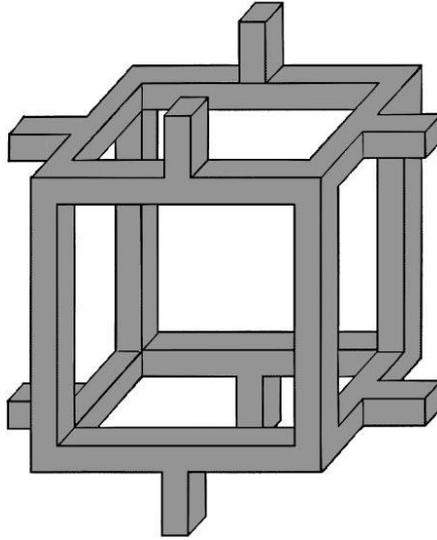


Fig. 1.6 Open-cell form 構造の一例[5].

(b) Tensed cable networks

細胞のアクチン骨格構造をケーブルの網目構造と見なしたモデル化である. このケーブルにはプレストレスが加わっており, この網目構造を安定に保つように形状を変化させる. 細胞骨格が持つプレストレスの概念図を Fig. 1.7に示す. 図中で網目ネットワークを横断する平面を S , 断面積を A として, N は細胞核を表している.

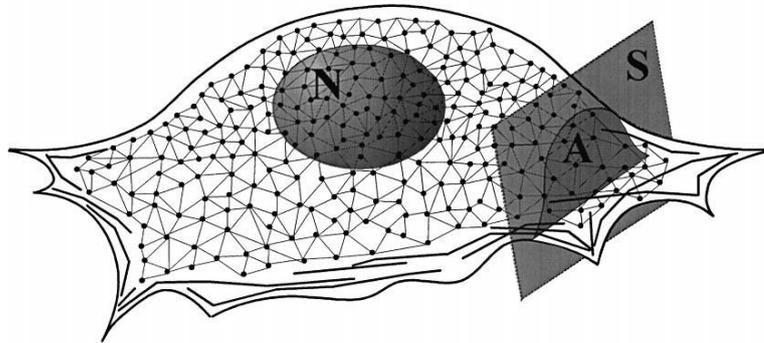


Fig. 1.7 プレストレスの概念図[5].

プレストレス P は, 断面積 A の単位面積を横断するケーブルが伝える張力の合計として定義され, 次の式で表される.

$$P = \frac{\sum_{i=1}^n F_i \cos\theta_i}{A} = \frac{n \langle F \cos\theta \rangle}{A}$$

ここで、 F_i は*i*番目のケーブルの張力を、 θ_i は断面 A の単位ベクトルとの角度を表している。また、 $\langle \rangle$ は平均を表している。全てのケーブルの張力が等しく、かつそれらの方向も等しい場合、 $n\langle F\cos\theta\rangle/A=\varphi\sigma_c/3$ となる。ここで φ 、 σ_c はそれぞれ構造内のケーブルの密度、単位断面積あたりの張力である。したがって、プレストレスは次式のように表される。

$$P = \frac{1}{3}\varphi\sigma_c$$

(c) Tensegrity model

細胞骨格構造を、圧縮力を受ける不連続な支柱と、プレストレスを有する連続的なケーブルと見なしたモデル化である。この構造は自己安定で、外力に対して自己の構造を維持しようとする。細胞骨格をこのモデルに適用させると、アクチン骨格がプレストレスを有し、細胞の形状を安定に保つ役割をもつ。アクチンネットワーク内のプレストレスを平衡に保つ役割は微小管が担う。中間径フィラメントは微小管とアクチンフィラメントを結び、細胞膜や細胞核と結合する役割を果たす。細胞に局所的な荷重を与えると、内部の構成要素が移動や変形を引き起こし、新たな平衡状態になる。そのため、局所的な荷重は構造全体の再配列を引き起こすことになる。Ingberらは細胞骨格にこの Tensegrity model を適用させて細胞の力学を議論した。このモデルを基にした細胞構造の模式図を Fig. 1.8に示す。

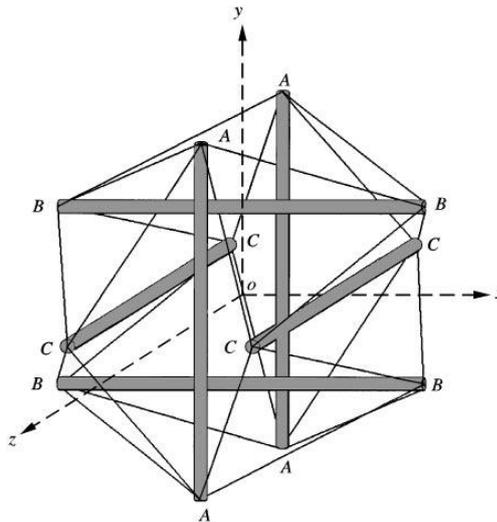


Fig. 1.8 Tensegrity model の一例[9].

(d) Linear viscoelastic model

細胞の粘弾性を、弾性要素であるバネと粘性要素であるダッシュポットとの組み合わせと見なしたモデル化である。このモデルでは、弾性率と粘性率、緩和時間の3つのパラメータで表すことができる。これらのパラメータは定数であり、加える応力やひずみに依存しない線形性を持つ。これらのパラメータを用いることで、細胞レオロジーを定量的に評価できるが、応力を増すと硬くなるといったひずみ硬化の影響や、細胞力学の非線形な挙動の特徴は、このモデルでは説明出来ない。

(e) Power-law structural damping model

細胞の複素弾性率の周波数依存性は、Fig.1.9で示すような周波数のべき乗則 (power-law) に従うことが知られている[10-15]。このような小さなべき指数に則った挙動はスラリーやコロイド懸濁液といったソフトガラス材料で観察されており[16]、べき関数で表される power-law structural damping model[10, 11]が適用されている。

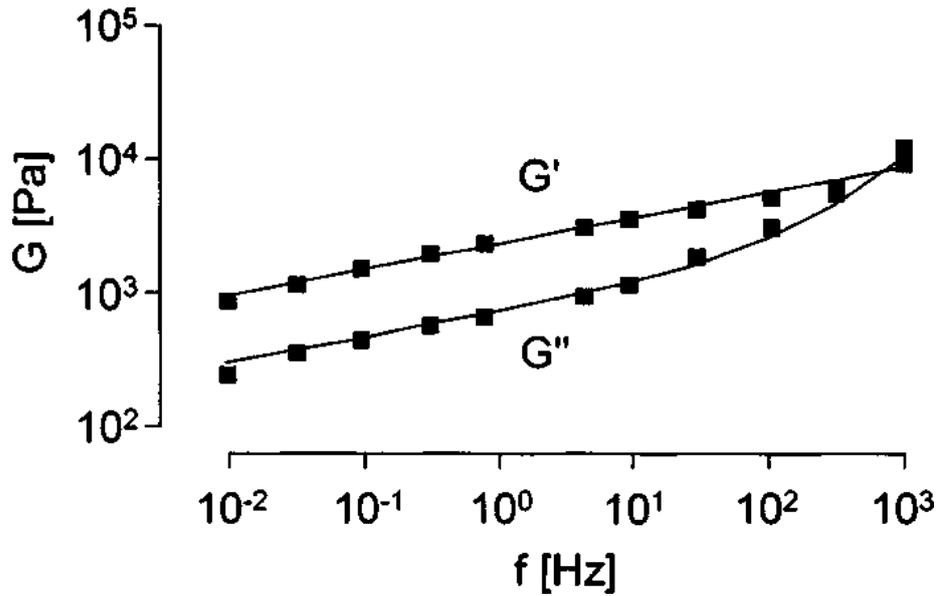


Fig. 1.9 貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' の周波数依存性. 実線は power-law structural damping model 式によるフィット[11].

このモデルでは複素弾性率 $G^*(f)$ が以下の式で表される.

$$G'(f) = G_0 \left(\frac{f}{f_0} \right)^\alpha g(\alpha) \quad (1.1)$$

$$G''(f) = G_0 \left(\frac{f}{f_0} \right)^\alpha \bar{\eta} g(\alpha) + \mu f \quad (1.2)$$

$$G^*(f) = G'(f) + iG''(f) \quad (1.3)$$

$$\bar{\eta} = \tan(\alpha\pi/2), \quad g(\alpha) = \Gamma(1-\alpha) \cos(\alpha\pi/2)$$

ここで, f は周波数, G_0, f_0 はそれぞれ弾性率と周波数のスケールファクター, Γ はガンマ関数を表している. η は hysteresivity や structural damping 係数などとも呼ばれており, 貯蔵弾性率 G' はべき指数 α の値によって周波数依存的に変化する. 損失弾性率 G'' の α も G' と同じものでなくてはならない. すなわち, G' と G'' がお互いに関連しあっているということであり, このことが structural damping model の特徴である. 更に G'' の項はニュートン粘性項 μf が含まれている. この項により, 高周波数領域においてニュートン粘性による効果をうまく示すことができる. べき指数 α が 0 に近づくとき, すなわ

ちべき乗則の傾きが0に近づくとき、 G' および η はそれぞれ G_0 および0に近づく固体様 (solid-like) の挙動をする。反対に α が1に近づくとき、すなわちべき乗則の傾きが1に近づくとき、 G'' は液体様 (liquid-like) の挙動を示す。細胞において α は細胞骨格構造に強く依存していることが明らかにされており、細胞骨格構造の安定化によって α の減少、逆に細胞骨格構造の破壊によって α の増加が引き起こされる[10]。

また、このような細胞レオロジーの周波数特性は1 kHz 以下の周波数で観察されており、このような周波数領域のタイムスケールは細胞内の多くの構造変化のタイムスケールと同じオーダーである。従って、この周波数領域における細胞レオロジーを明らかにすることは、細胞内構造のダイナミクスを明らかにする上で重要と考えられる。

1.1.4 細胞の弾性率の測定方法

細胞の弾性率を測定するために様々な方法が開発されてきた。ここでは接着細胞を対象とした主な測定方法を述べる。

(a) Laser tracking microrheology[17]

この方法は細胞に接着させたビーズにレーザー光を照射し、フォトダイオードに当たるレーザー光の位置変化からビーズの動きを検出する。ビーズの接着位置を制御することができないが、外部応力を与えずビーズのブラウン運動を観察することで細胞の粘弾性特性を調べられるため、他の手法と比べて非侵襲な測定方法である。

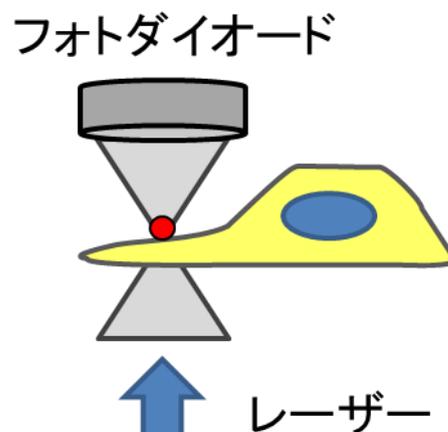


Fig. 1.10 Laser tracking microrheology 法の概略図.

(b) Microplate rheometer[18]

この方法は、厚さ数 μm の薄く変形しやすいガラス平板と厚く変形しにくいガラス平板との間に細胞を挟み込むことで、圧縮または引っ張り時の薄いガラス平板のたわみ量から力や歪み、緩和挙動から粘弾性特性を計測する。他の手法と違い、細胞の局所的な粘弾性特性は測定できないが、細胞全体の粘弾性を測定することが可能である。

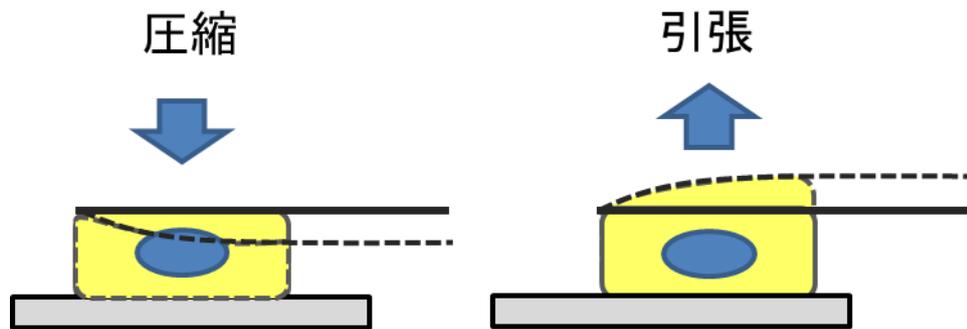


Fig. 1.11 Microplate rheometer 法の概略図.

(c) Cell poking with fine glass needle[9, 19]

この方法は、直径数 μm の細いガラスニードルの先端を細胞に押し込んで、そのたわみから細胞の弾性特性を測定する。細胞の局所領域に力を与えることが可能であるが、力分解能が低いため、細胞への負荷が他の手法と比較して大きい。また、空間分解能はガラスニードルの先端径によって決定される。

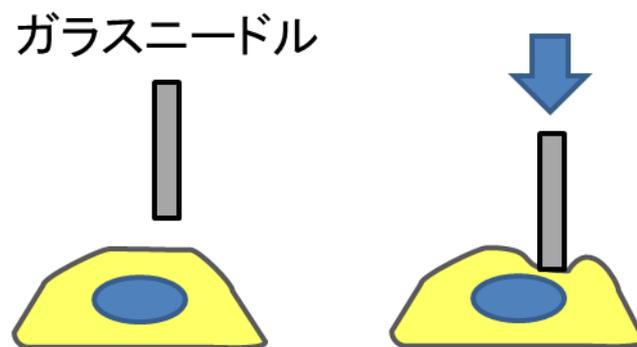


Fig. 1.12 Cell poking with fine glass needle 法の概略図.

(d) Magnetic Twisting Cytometry (MTC)[10, 11, 20]

この方法は、細胞表面に接着させた微小な磁性ビーズに外部から磁場をかけて、ビーズの変位から細胞の粘弾性特性を測定する方法である。ビーズと細胞の接着面積を制御すること、また測定で決定することができないため個々のビーズから得られる数値の精度は高いとは言えない。更に細胞とビーズを接着させる接着タンパク質によって細胞内部の骨格構造を変化させている可能性がある。しかしながら、同時に多数個のビーズの動きを観察できることから、集団平均(アンサンブル)測定に適しており、細胞の局所領域内の平均的な粘弾性特性の測定に広く用いられている[20]。

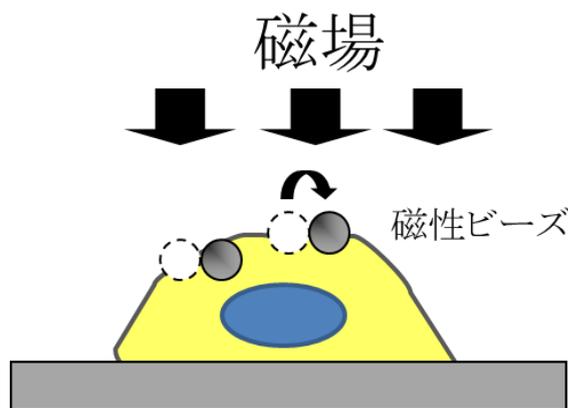


Fig. 1.13 MTC 法の概略図.

(e) Atomic Force Microscopy (AFM)[21-23]

原子間力顕微鏡(AFM)は nm オーダーの空間分解能と pN オーダーの力分解能を持ち、細胞表面形状測定、細胞力学測定に広く用いられている。AFM は、力センサーとしてのカンチレバー先端の微小探針をサンプル表面に接触させ、その時のカンチレバーの撓み d 、押込距離 δ から力を測定する装置である。一般的な AFM 測定では、平面基板上にランダムに培養された細胞を個々に測定するのは操作が煩雑となり、多数細胞計測には適していない。この問題に対して近年では、微細加工基板技術によって細胞位置を制御することによって、統計的な測定が行われている[13-15]。

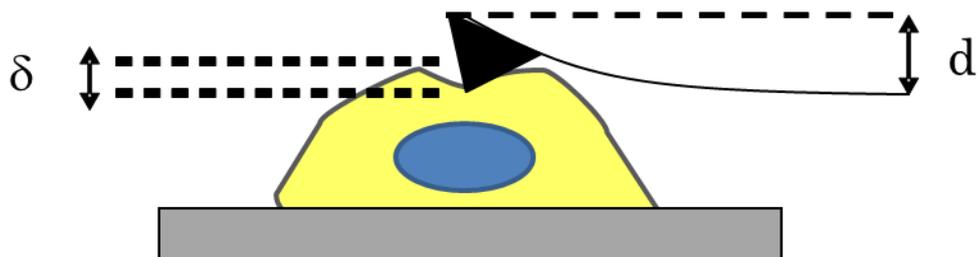


Fig. 1.14 AFM 法の概略図.

細胞の力学測定のために様々な手法が開発されてきたが、中でも AFM は細胞内の力学特性分布を測定するのに最も適した方法である。

1.1.5 AFM による細胞計測

AFM は探針で試料表面を水平走査することによって、探針と試料表面の間に働く力を検出して、表面形状や内部構造をイメージングすることが出来る。近年ではイメージング測定の高速度が進められており、静的な構造観察だけでなく、分子の運動といった動的な観察も行われるようになってきている。また、前節で述べたように AFM は力学計測にも広く用いられている。細胞内の力学特性分布を観察するために、測定領域を細かく分割し、各点で弾性率を測定することでその分布を画像化するマッピング法が用いられている。

1.1.5.1 イメージング法

(a) コンタクトモード

コンタクトモードには、カンチレバーの高さを一定にする **Constant Height** モードとカンチレバーにかかる力を一定にするようにフィードバック制御を行いカンチレバーの位置を変化させる **Constant Force** モードがある。**Constant Height** モードでは試料の高さが大きいと、それに応じて働く力も大きくなるため、柔らかい試料では変形が大きくなってしまう。一方で、**Constant Force** モードでは試料の高さによらず一定の小さい力のかけた状態を維持することが出来る。しかし、探針が試料に常に接触しているため水平走査の際に水平摩擦力がかかってしまう。

(b) ダイナミックモード

コンタクトモードが静的に力検出を行うモードであるのに対して、ダイナミックモードはカンチレバーを共振周波数付近でZ方向に振動させる手法である。ダイナミックモードではカンチレバーの振動振幅は通常、表面付近で減少するので、フィードバック制御によって振動振幅を一定に保つようにカンチレバー位置を調整する。また、水平走査中にカンチレバーが常に上下振動しているため、水平摩擦力を減らすことが出来る。サンプルへのダメージが少ないため、生体試料などの柔らかいサンプルの測定に適している。

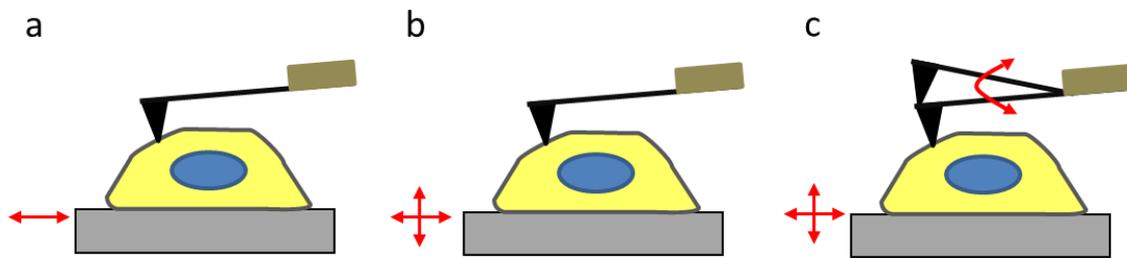


Fig. 1.15 (a) Constant Height モード (b) Constant Force モード (c) ダイナミックモードの概略図.

近年、ダイナミックモードにおいてカンチレバーの共振周波数帯で振動させた時の高調波成分を取得することで、粘弾性を高速にイメージングする手法が提案された[24, 25]. Fig. 1.16に示す測定では、15分間で $70\ \mu\text{m} \times 70\ \mu\text{m}$ の範囲を 256×256 pixelsの分解能(約 $270\ \text{nm} / 1\ \text{pixel}$)で測定された。

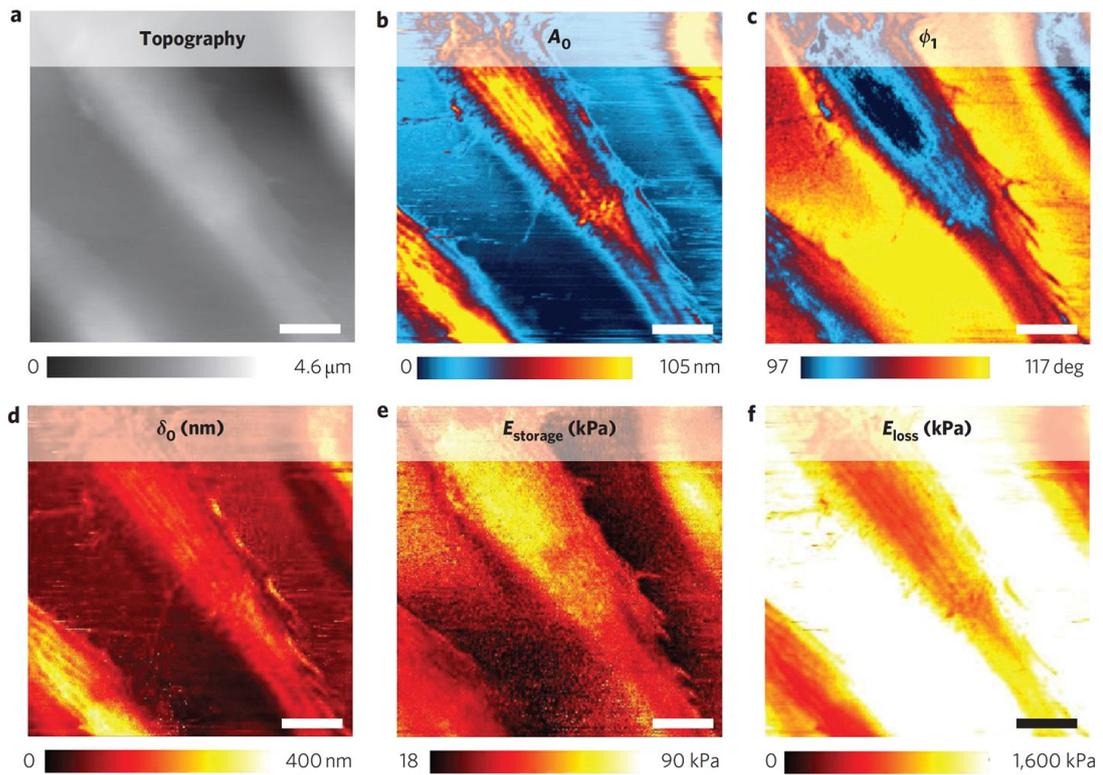


Fig. 1.16 カンチレバーを共振周波数帯で振動させながら細胞のイメージングを行うことで、形状だけでなく振動振幅の変化や押し込み量，貯蔵弾性率，損失弾性率像が得られる[24].

更に、数 MHz という超音波帯域でサンプルとカンチレバーをそれぞれ異なる周波数で振動させて、それらのうなり信号像から細胞内部の構造を観察する scanning near field ultrasonic holography (SNFUH)法が提案された (Fig.1.17) [26]. この手法によって細胞内部が可視化されることが示された. しかしながら、なぜ内部構造が可視化されるのかその原理については不明である.

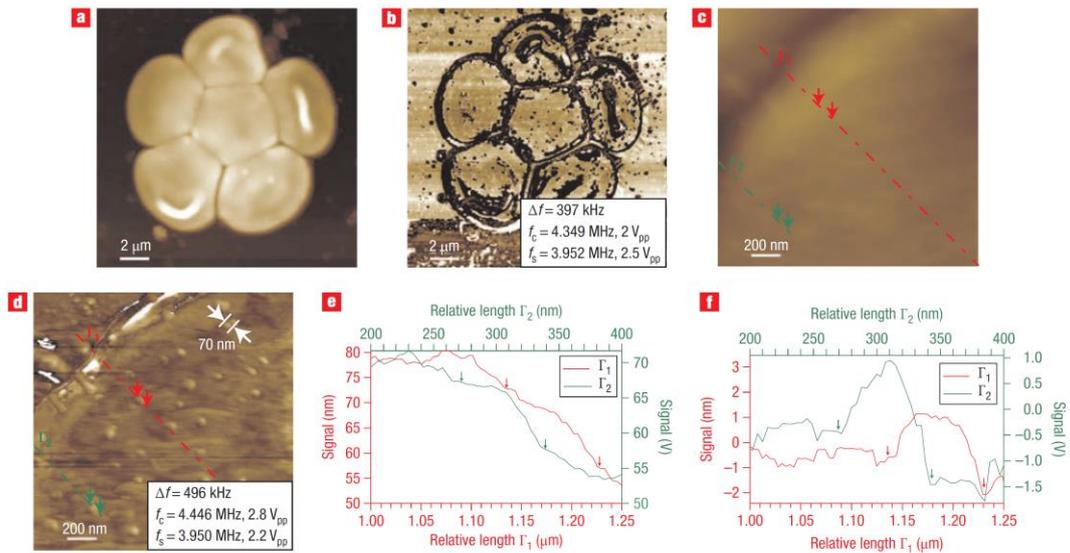


Fig. 1.17 赤血球内部のナノ粒子イメージング. (a, c)AFM 形状像. (b, d)SNFUH によって得られる像. (e, f) c と d 内の点線で示された領域のプロファイル. ナノ粒子の存在がプロファイルの変化から示されている[26].

また、周波数が異なる2種類の周波数成分を重ね合わせた多重周波数でカンチレバーを振動させることで、それぞれの周波数成分から得られる特性を同時に取得する手法が提案されている. カンチレバーとサンプルをそれぞれ異なる周波数を重ねた多重周波数で振動させることで、探針とサンプル間の相互作用が新たな振動モードを作り、サンプル表面下の構造の情報が得られたという報告がある (Fig. 1.18).

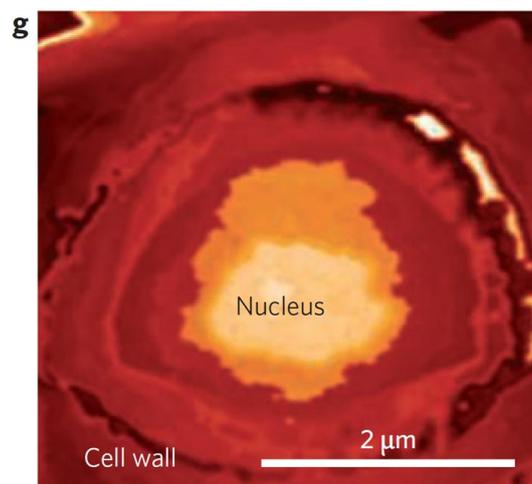


Fig. 1.18 多重周波数振動による細胞核構造のイメージング[27].

また、イメージング法においては高速 AFM が開発され、nm 以下の高い空間分解能で1枚の画像をビデオレートで撮影することができる[28]. 高速 AFM によって細胞表面の動的な構造変化が観察されている(Fig. 1.19).

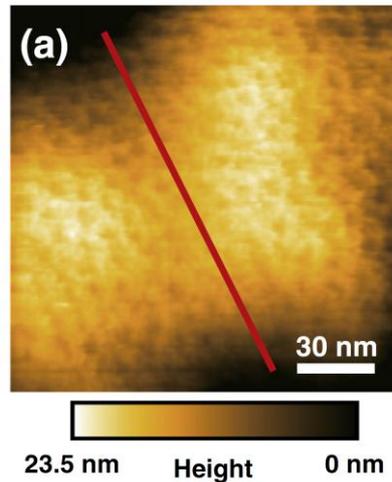


Fig. 1.19 High-Speed AFM (HS-AFM)による細胞の高空間分解能イメージング測定 [28].

1.1.5.2 マッピング法

(a) フォースカーブ測定法

フォースカーブ測定法では、カンチレバーを細胞表面の離れた位置から徐々に近づけて押し込み、この際に発生する力の変化をカンチレバーのたわみ量から測定する。カンチレバーの位置と細胞からの応力との関係からフォースカーブが得られる(Fig. 1.20). この曲線をもとに、サンプルの高さや弾性率、接着力などが評価される。また、マッピング測定法と組み合わせることで Fig. 1.21のような細胞の形状像や弾性率分布を得ることが出来る。

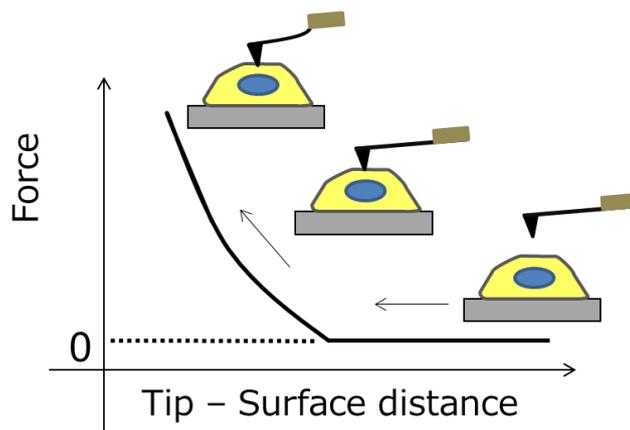


Fig. 1.20 フォースカーブ測定法の概略図.

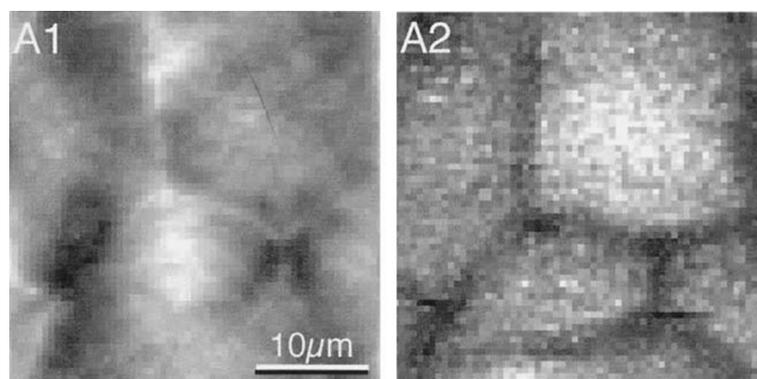


Fig. 1.21 フォースカーブマッピング測定による (A1) 形状マッピング像と(A2) 弾性率像[29].

(b) 応力緩和・クリープ測定法

応力緩和測定法とクリープ測定法は時間領域における細胞の粘弾性を測定する手法である。Fig. 1.22で示すように応力緩和測定法は一定ひずみを与えて、応力が緩和していく様子を測定する手法である。AFMを用いた応力緩和測定法ではカンチレバーで細胞を押し込んだ後、カンチレバーの位置を一定にし、応力の時間変化を測定する。一方で、クリープ測定法は一定の応力を保持するようにひずみを変化させていく手法である。AFMを用いたクリープ測定法では一定の力がかかるまでカンチレバーで細胞を押し込んだ後、力を保持するようにカンチレバーの位置を制御することで、カンチレバー変位の時間変化を測定する。経過時間 t における応力/ひずみを緩和弾性

率 $g(t)$ といい, ひずみ/応力をクリープコンプライアンス $J(t)$ という. クリープコンプライアンスと緩和弾性率の積は1である. 近年の研究で生細胞の緩和弾性率およびクリープコンプライアンスはそれぞれ単一のべき的挙動で変化することが明らかにされている (Fig. 1.23)[30].

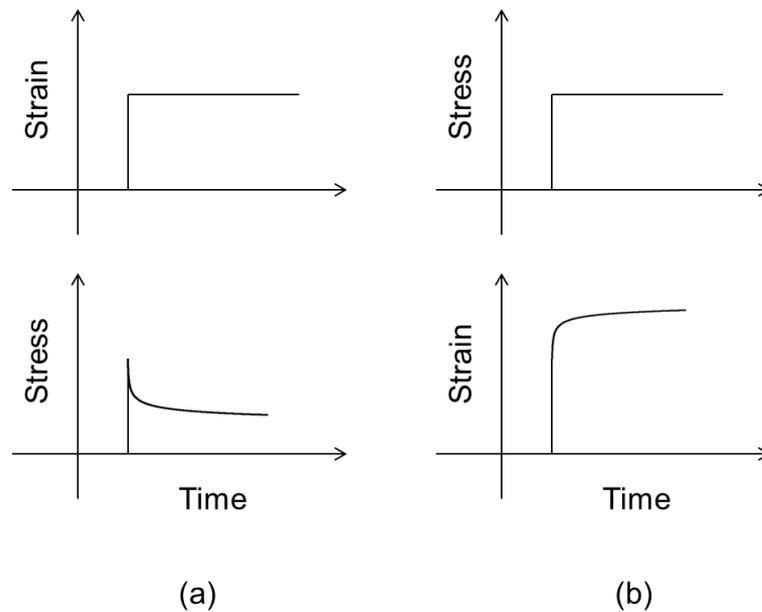


Fig. 1.22 (a)一定ひずみ下での応力緩和. (b)一定応力下でのクリープ変形.

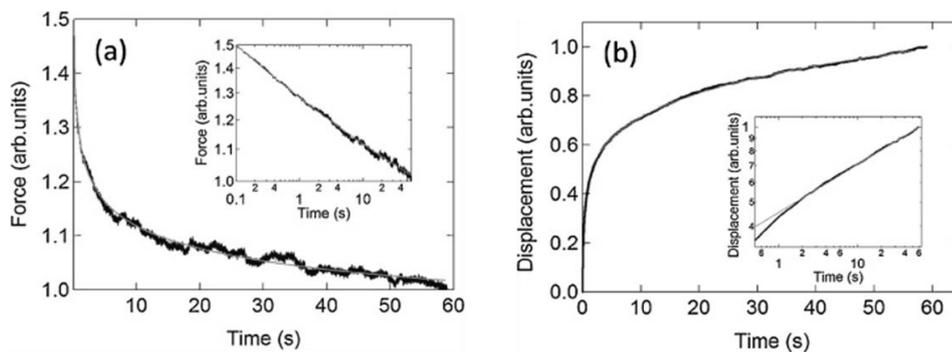


Fig. 1.23 細胞の(a)応力緩和測定と(b)クリープ測定のべき的挙動[30]

Hechtらは数10 ms という短い時間スケールでのクリープ挙動の観測によって, 弾性率のスケール因子とべき指数の細胞内マッピング測定を行った[31]. 時間領域測定ではこのように観測時間を短くすることによる測定的高速化によって細胞レオロジーの

マッピング測定が可能となっている。

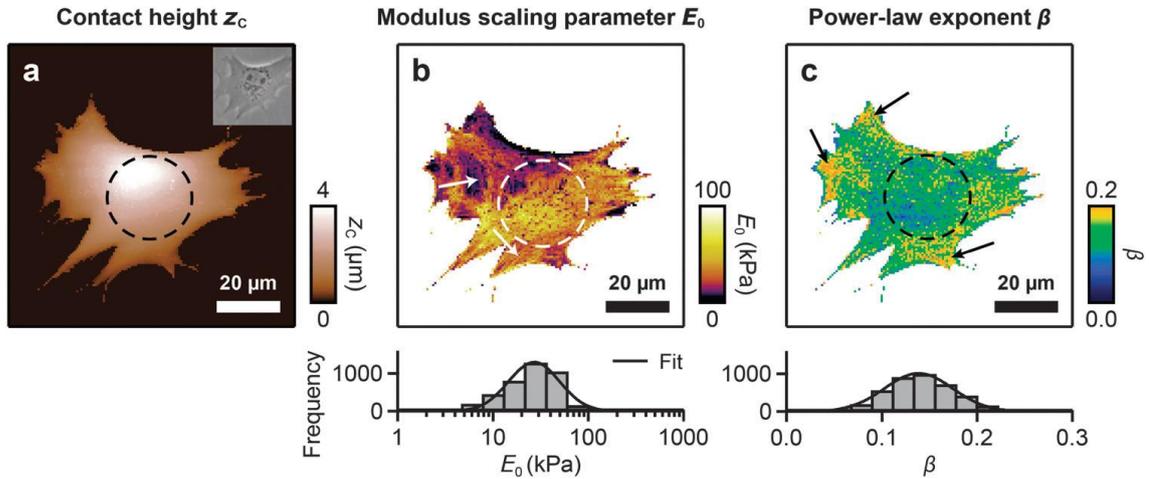


Fig. 1.24 AFM クリープ測定による細胞の(a)高さ, (b)弾性率のスケール因子, (c)べき指数のマッピング像[31].

(c) フォースモジュレーション測定法

フォースモジュレーション測定法は、試料に正弦波的に応力やひずみを加えてその応答を観測する測定方法である。フォースモジュレーション測定法は周波数領域における物質の粘弾性を測定する手法である。細胞測定では、カンチレバー探針を細胞に押し込んだ後、ピエゾを用いて時間の正弦関数で表されるひずみ(または応力)を細胞に印加して、それに対応する応力(またはひずみ)を測定する(Fig.1.25)。硬く変形しづらい試料ではカンチレバーが接触部位に入り込まずピエゾの振動振幅とカンチレバーの振動振幅は同程度となるが、柔らかい試料では接触部位に入り込むことで、カンチレバーの振動振幅は押し込み量に応じて減少する。更に、粘性によってピエゾの振動と細胞の振動応答の間に位相差が生じる。これらのカンチレバーの振動振幅の変化と位相差から複素弾性率を算出することができる。マッピング測定法と組み合わせることで、細胞の形状像や弾性像、粘性像を得ることが出来る(Fig.1.26)[32].

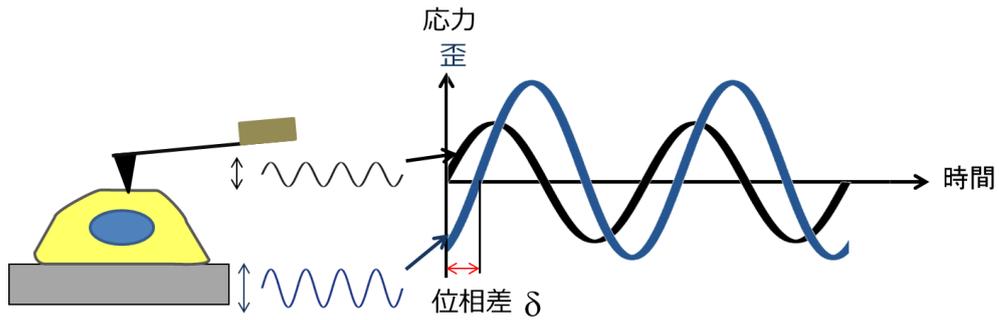


Fig. 1.25 フォースモジュレーション法の概念図[33].

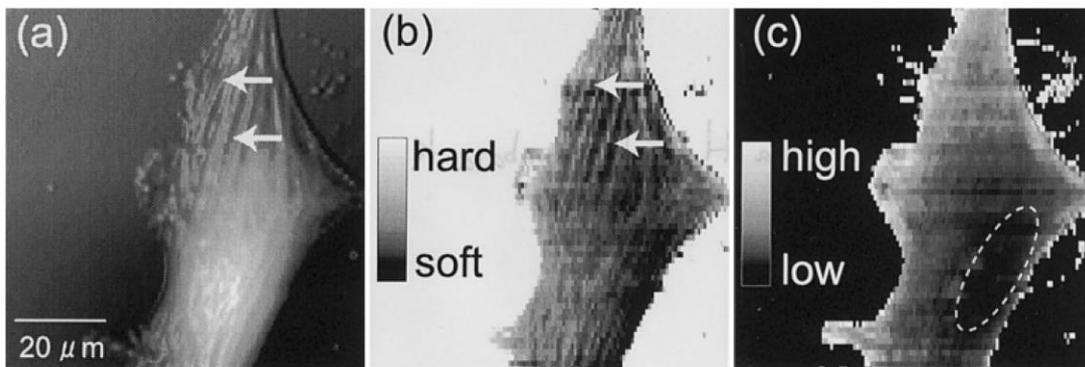


Fig. 1.26 フォースモジュレーションマッピング測定による(a)形状像, (b)弾性率像, (c)粘性率像[32].

また、周波数を段階的に変化させることで粘弾性の周波数特性を測定する周波数掃引フォースモジュレーション法が近年広く用いられている[13, 14, 34-36]. Rotherらは、細胞で周波数掃引フォースモジュレーション法を用いてマッピング測定を行ったとする報告をした (Fig. 1.27) [36].

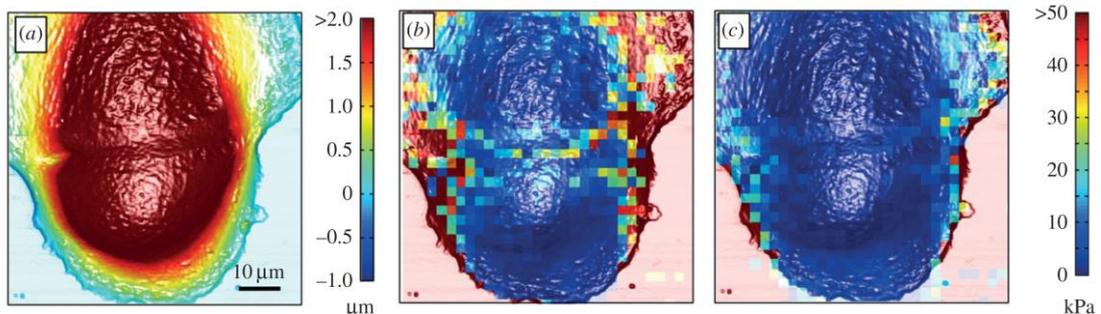


Fig. 1.27 細胞の(a)高さ像と20 Hz における(b)貯蔵弾性率 G' , (c)損失弾性率 G'' をそ

れぞれ重ねたマッピング像[36].

このように時間領域において、クリープ測定を用いた細胞レオロジーマッピング測定が行われている。一方で、周波数領域において、フォースモジュレーション法を用いた細胞レオロジーマッピング測定は、測定時間が問題となっており未だ行われていない。

1.1.6 AFM による多数細胞計測

AFMはその測定手法上、ランダムに位置する細胞の測定において、手動で位置補正を行う必要があり、その煩雑さから多数細胞計測には適していない。その問題に対して、Hiratsukaらはマイクロアレイ基板技術を用いることで細胞を配列化し、測定を自動化することによって多数細胞レオロジー計測を可能とした。その結果、細胞は同じ環境下で培養された同じ細胞種のものであっても、そのレオロジー特性は個体差を持つことが示された (Fig. 1.28) [13]。しかしながら、マイクロアレイ基板は深さ8 μm のウェルがつながった構造であるため、隣接する細胞との細胞間接触による細胞間牽引力といった力学的相互作用を起こしている可能性がある。また、隣接するアレイへの移動や広がりなどの可能性を完全に無視できないため、細胞形状の制御も完全とは言えない。

また、異種細胞間においては、正常細胞とがん細胞の弾性率に有意差があることが示されたが、それと共に細胞種によって個体差が異なることも示された (Fig. 1.29) [37]。近年ではがん細胞の浸潤性の違いによって弾性率に差がなくとも個体差に差が現れることも示唆された (Fig. 1.30) [38]。これらの結果は細胞機能のメカニズムの解明や細胞疾患診断技術において、多数の細胞を計測することの重要性を示している。

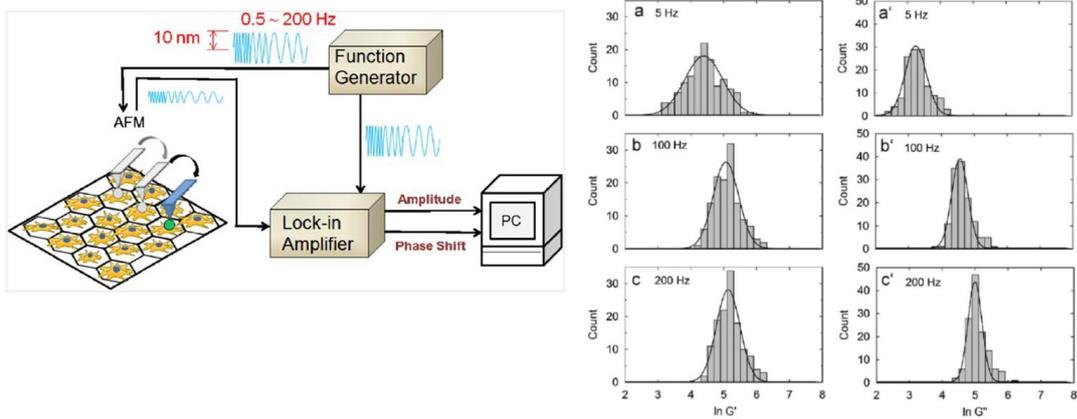


Fig. 1.28 (左) マイクロアレイ基板上細胞のフォースモジュレーション測定の模式図。(右) 測定周波数5, 100, 200 Hz での貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' の細胞数分布。実線は対数正規分布関数でフィッティングしたもの[13]。

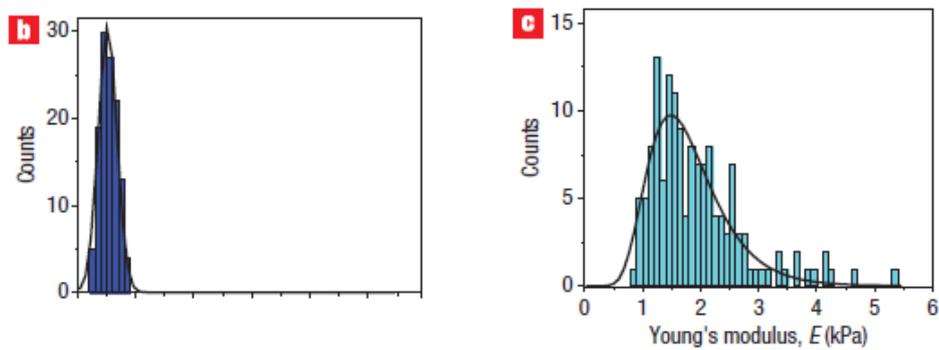


Fig. 1.29 (b) がん細胞の弾性率のヒストグラム。(c) 正常な細胞の弾性率のヒストグラム[37]

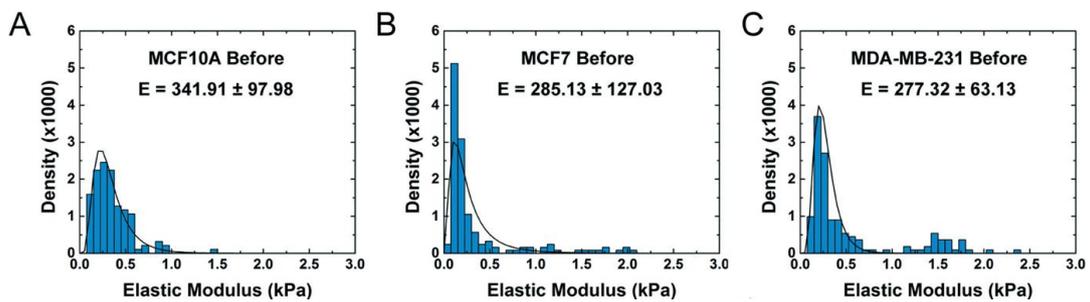


Fig. 1.30 悪性度の異なるがん細胞2種 (MCF7, MDA-MB-231) と正常細胞 (MCF-10A) の弾性率分布。がん細胞2種の間には弾性率の平均値に差は見られなかったが、その分布に違いが見られた[38]。

1.2 本研究の目的

AFM によるイメージング測定やマッピング測定によって、細胞内弾性率の不均一性を観察することが出来る。AFM イメージング測定では現在、1点当たり10 ms 程度で細胞の弾性率を測定することが可能となっている[24]。しかしながら、その弾性率は、カンチレバーの共振周波数の高い周波数値(> 数 kHz)に限定されており、細胞のようなソフトマテリアルに特徴的な弾性率を示す低周波数領域(< 1kHz 程)でイメージングすることは難しい。

一方でマッピング測定は、低周波数領域における弾性率測定が可能である。周波数掃引フォースモジュレーション法を用いた細胞内レオロジーマッピング測定が行われたとの報告はあるが[36]、複数の周波数成分を計測する本手法は、一般に、1点あたりの測定に10 s から数10 s を要する[12-14, 39, 40]。フォースモジュレーション測定の高速度が可能になれば、高い空間分解能での細胞レオロジーの周波数特性計測によって、細胞構造と細胞レオロジーとの関係を明らかにすることが可能となると期待される。従来の単一周波数フォースモジュレーション測定と同程度の速度で弾性率の周波数特性のマッピングを行うことができれば、生細胞のレオロジーマッピングが可能になる。そこで、(1)周波数成分を同時に計測することが出来る多重周波数フォースモジュレーション法の開発を行う。

細胞の緩和挙動は数10 ms から数10 s といった長いタイムスケールで単一のべき挙動として観察される[30]。時間領域における細胞レオロジー測定では、単純に測定時間を短くすることで測定の高速度が行われている。近年の研究で、数10 ms の短い観測時間での細胞レオロジーマッピング測定がクリープ測定によって行われた[31]。しかしながら、観測時間を短くすることによる測定精度への影響は明らかとなっていない。そこで、本研究では多重周波数フォースモジュレーション測定と応力緩和測定の同時測定によって周波数および時間領域の細胞レオロジーを比較する。

多くの市販 AFM 装置は局所領域で高い空間分解能イメージングを実現するために設計・最適化されている。従って、広範囲の走査が可能な市販 AFM においても100 μm 程である。そのため、さらに広範囲(数100 μm ~ 数 mm)の領域に存在する多数の細胞を測定する場合、測定位置を何度も手動で調整する必要があり、測定時

間が冗長であった。特に、細胞物性の統計性を評価する場合、時間の短縮化は測定細胞を等価に扱うために重要である。従って、AFM の高精度位置制御の機構を損なわずに広範囲計測を行うシステムの開発が求められる。そこで本研究では、(2)多数細胞計測を高速化するために広範囲自動測定が可能な AFM 計測システムの開発を行う。本研究では数百個の細胞の自動計測を目標とした。

細胞の力学物性には大きな個体差があり、その物性の平均と偏差は細胞種や細胞疾患の状態によって異なる[37, 38]。従って、細胞力学物性の個体差を精密に定量化することで、1細胞単位で細胞疾患を診断することが可能になると期待されている。AFM とマイクロアレイ基板を組み合わせた先行研究において、多数細胞の統計性の評価がなされた[13, 14]。しかしながら、この研究で用いたマイクロアレイ基板は隣接する細胞と接触していたので、細胞間の力学的相互作用が顕著に表れる細胞種では、理想的な1細胞計測とは言い難い。また、隣接するウェルへの細胞移動や伸展も完全に抑えることはできていなかった。この問題を解決する手段としてマイクロパターン基板技術が考えられる。実際に、マイクロパターン基板技術は AFM による細胞計測にも用いられている[41]。しかしながら、従来の方法ではパターンの位置が可視化されていないため、細胞計測位置制御が困難である。そこで本研究では、(3)1細胞を透明基板上に孤立してパターン化出来るマイクロアレイ基板に代わる細胞培養基板の開発を行う。

1.3 本論文の構成

第1章では本研究の背景および目的について述べた。第2章では原子間力顕微鏡の原理および研究に関わる理論について述べる。第3章ではフォースモジュレーション測定の高速度化として、多重周波数フォースモジュレーション法の開発について述べ、第4章では多重周波数フォースモジュレーション法による細胞レオロジー測定について述べる。第5章では応力緩和測定法と多重周波数フォースモジュレーション法を組み合わせた時間・周波数領域同時マッピング測定を行い、両者の細胞レオロジー特性を比較した。第6章では多数細胞計測を高速化するために広範囲自動測定が可能な AFM 計測システムの開発と1細胞を透明基板上に孤立してパターン化出来るマイクロアレイ基板に代わる細胞培養基板の開発について述べる。第7章では、本論文に

おける研究全体の結論を述べる。最後に参考文献を掲載し、本研究において助言助力を頂いた方々への謝辞、著者の研究業績を記載した。

第2章

実験の原理

2.1 原子間力顕微鏡

原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy: AFM)は1986年に Binnig らによって開発された走査型プローブ顕微鏡(Scanning Probe Microscopy: SPM)の一種であり、その起源は走査型トンネル顕微鏡(Scanning Tunneling Microscopy: STM)である[21]. STM は鋭く尖った探針を導電性の物質の表面または表面上の吸着分子に近づけ、その時に流れるトンネル電流からサンプル表面の電子状態や構造等を原子レベルで観測する装置である. この STM も Binnig らによって開発されたものである. 一方で AFM は探針とサンプル表面間の原子間力を利用するため絶縁性を持つサンプルの測定も可能である. また、高い力分解能を持っており探針とサンプル間の相互作用を pN 以下の力で測定することができる. 更に測定に使用する探針を鋭いものに変えることで、局所的なトポグラフィーや粘弾性、接着性、電荷密度、磁場、温度など様々な表面状態を調べることが可能である. AFM は原子分解能での表面イメージングやナノデバイス開発における原子操作、分子の結合力の測定などに用いられている. 更に液中での測定が可能な面から、最近では生理学的条件下での様々な生体分子や細胞の物理的特性や化学的特性を調べるのにも用いられている.

2.2 AFM の測定原理

AFM は力センサーとしてサンプルと接触する部位となるカンチレバー(cantilever)、カンチレバーにレーザー光を照射するレーザー装置、カンチレバーからの反射光を検出するフォトディテクター(photodetector)、位置を制御する圧電素子(piezo)の三つで構成される (Fig. 2.1). 圧電素子を用いてカンチレバー先端の探針とサンプル表面との距離を制御し、探針とサンプル間に働く力を測定する. 探針がサンプル表面に十分に近づくと、相互作用力を受けてカンチレバーがたわむ. そのカンチレバーのたわみをフォトディテクターで検出する. バネ定数の異なるカンチレバーを使用することで、pN から nN 単位での力の測定が可能であり、カンチレバーの特性によっては磁力や静電

気力などの相互作用力を測定することが可能になる。細胞などの柔らかい物質をサンプルとして測定するには、一般的には窒化シリコン製のカンチレバーを用い、硬い物質ではシリコン製のカンチレバーが用いられる。市販のカンチレバーの多くはレーザー光の反射を増幅させるためにカンチレバーの背面に金などで膜をコートしている。

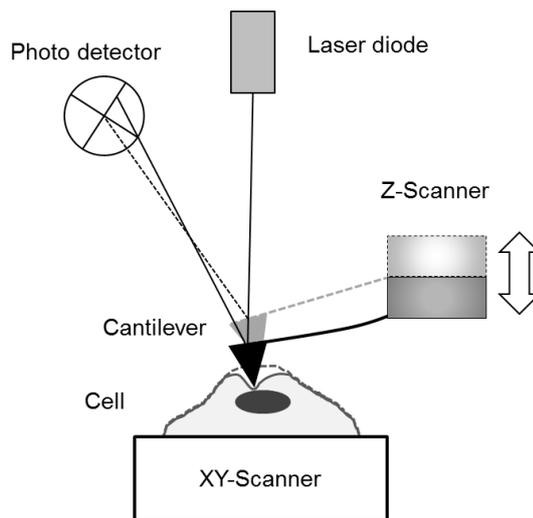
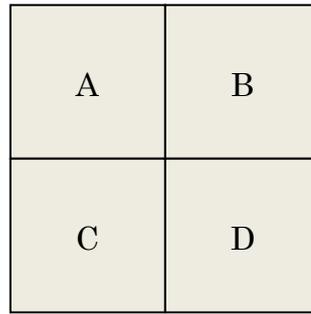


Fig. 2.1 一般的な AFM の構成.

探針とサンプル間に働いている力 F はフックの法則 ($F = kd$) から導かれる。ここで k はカンチレバーのバネ定数を表し d はカンチレバーのたわみである。このカンチレバーのたわみ量の測定には光てこ法が用いられる[42]。光てこ法は、光源から出たレーザー光をカンチレバー先端に反射させ、その反射光の位置をフォトディテクターで検出する方法である。フォトディテクターは4つの部位に分かれており、それぞれの部位で当たった光の量に比例して電圧が生じる。カンチレバーのたわみ量である Deflection はフォトディテクターの上部二箇所が生じた電圧と下部二箇所が生じた電圧の差で表わされる (Fig. 2.2)。



$$\text{Deflection} = (V_A + V_B) - (V_C + V_D)$$

Fig. 2.2 フォトディテクターの模式図.

そして、力が探針に加わるとカンチレバーが撓み、反射レーザー光はカンチレバーの撓み $\alpha = \Delta \left(\frac{d(d)}{dx} \right)$ の2倍だけ移動する。検出器がカンチレバーから D だけ離れているとすると反射レーザー光の移動距離 Δ_{PSD} は、探針とサンプルに働く力を F 、カンチレバーの全長を L 、ヤング率を E 、断面2次モーメントを I とすると、撓み角が以下になる。

$$\alpha = \Delta \left(\frac{d(d)}{dx} \right) = \frac{FL^2}{2EI} \tag{2.1}$$

よって、

$$\Delta_{PSD} \approx 2D \tan \alpha = \frac{FL^2 D}{EI} \tag{2.2}$$

となる。カンチレバー先端の撓み d は

$$d = \frac{FL^3}{3EI} = \frac{\Delta_{PSD} L}{3D} \tag{2.3}$$

で与えられる。

この式よりカンチレバーのたわみを精度良く測定するにはカンチレバーとフォトディテクターとの距離 D に比べてカンチレバーの全長 L が短いほど良いということがわかる。

撓んだカンチレバーの模式図を Fig. 2.3 に示す。カンチレバーの幅を w 、全長を L 、厚さを t としたときカンチレバー先端での撓み角は、

$$\frac{d(d_x)}{dX} = \frac{FL^2}{2EI} = \frac{6FL^2}{Ewt^3} \quad (2.4)$$

と表される。また、 $X=L$ でのカンチレバーの撓みは、

$$d_L = \frac{4FL^3}{Ewt^3} = \frac{2}{3}L \frac{d(d_x)}{dX} \quad (2.5)$$

となる。この式より、 d は撓み角に比例することがわかる。

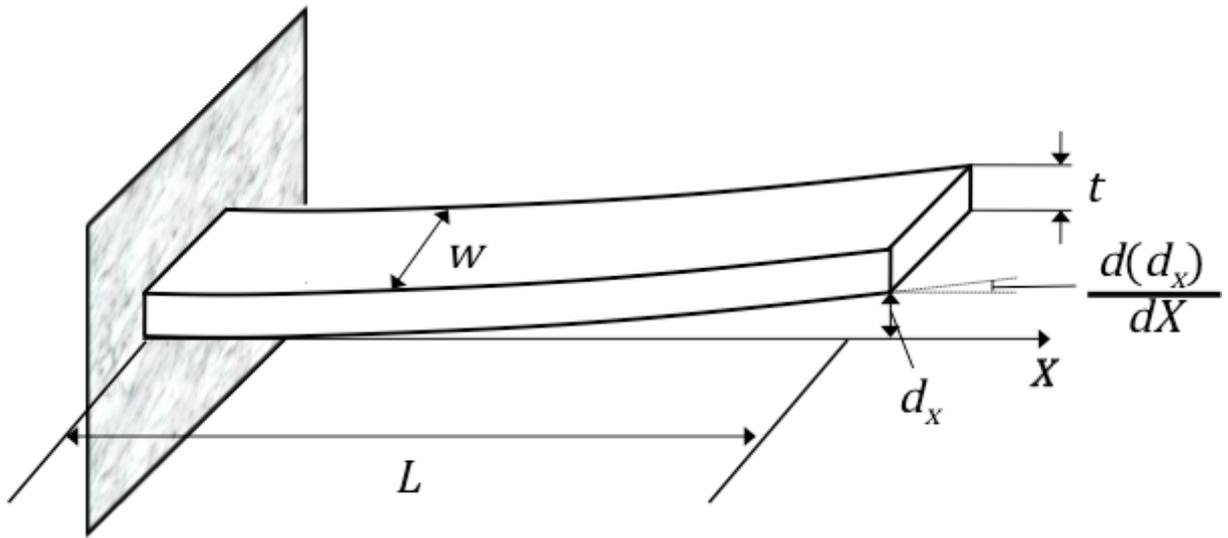


Fig. 2.3 カンチレバー撓みの模式図。左端は固定端。

細胞などの柔らかいサンプルを測定する際は、一般的に、測定サンプルが柔らかくまたそこに働く力も小さいことが多いためバネ定数の小さい窒化シリコン製のカンチレバーが用いられる。

2.3 フォースカーブ測定

フォースカーブとは探針の先端とサンプル表面の接触—退避過程で発生する相互作用力に応じたカンチレバーのたわみを、その時の探針とサンプル表面間の距離との関係でプロットした曲線である。このフォースカーブを解析することでサンプルの硬さやサンプルへのカンチレバー押し込み量など種々の物理特性が求められる。

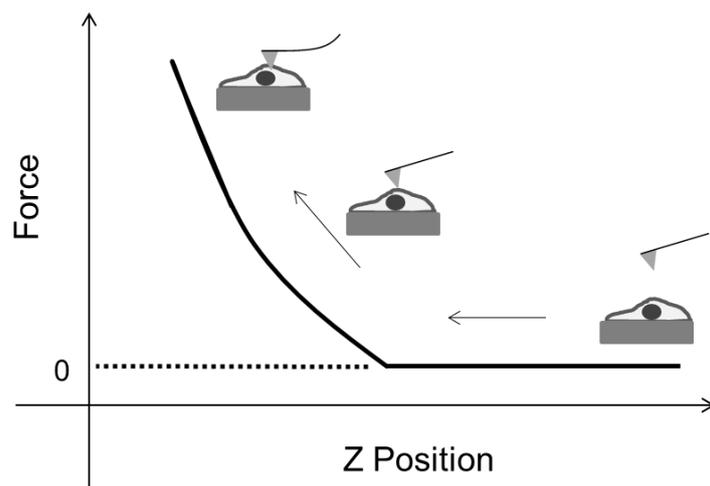


Fig. 2.4 フォースカーブの模式図.

この図はフォースカーブの概念図である。このフォースカーブはピエゾの変位に対するカンチレバーのたわみを測定することで得ることができる。サンプルにカンチレバーが接触するまではカンチレバーのたわみは発生せず、カンチレバーとサンプルが接触するとカンチレバーがたわみ始める。

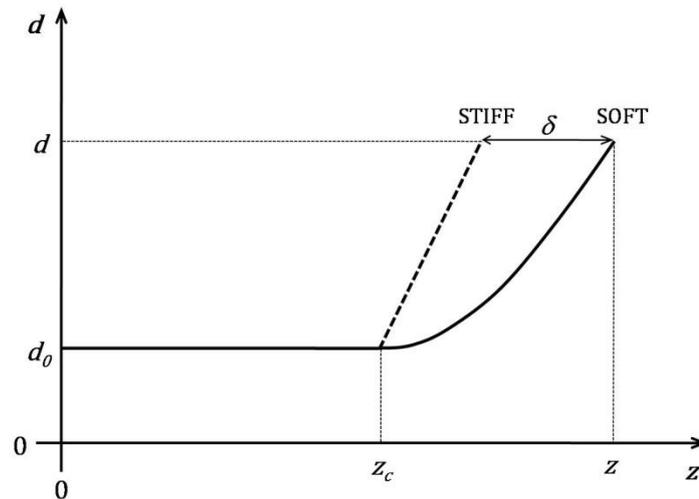


Fig. 2.5 サンプルの硬さの違いによるフォースカーブの変化.

Fig. 2.5にサンプルが柔らかくて変形する場合と硬くて変形しない場合のフォースカーブを示す. 硬く変形しないサンプルとのカーブの差 δ がサンプルの変形量を表している.

2.4 バネ定数の校正

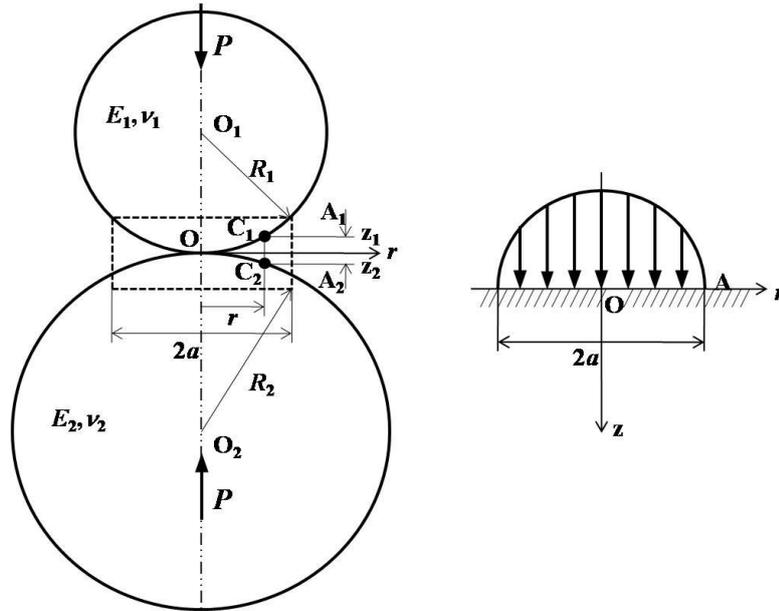
市販のカンチレバーのバネ定数は種類ごとに公称値が示されている. しかし, 実際のバネ定数の値は個々のカンチレバーごとに異なっており, その値の差は無視できるものではない. そのため, より正確な測定を行うためには測定のたびに事前にカンチレバーのバネ定数を校正する必要がある. 本研究では, カンチレバーの熱振動のパワースペクトルを利用した熱振動法と呼ばれるバネ定数較正法を用いてバネ定数を校正する[43, 44].

2.5 弾性接触モデル

荷重が加わったときの弾性体の変形量の理論的解析は, Hertz によって2つの弾性球体で示された[45]. その後, Sneddon によって球以外での形状にも使用できるように拡張された[46].

(a) Hertz 弾性接触論

2つの物体が共に弾性変形する場合の接触応力の理論解の導出は難しく、便宜的に2つの弾性球の接触としてのヘルツの弾性接触論が用いられている[45]. 以下にヘルツの弾性接触理論についての図を示す.



(a)球と球との接触. (b)分布圧力を受ける半無限体.

Fig.2.6 球と球のヘルツの弾性接触.

Fig.2.6に示すように, 2つの弾性球の半径を R_1, R_2 , 縦弾性係数を E_1, E_2 , ポアソン比を ν_1, ν_2 とする. 押し付け力 P によって2つの弾性球は点 O で接触し, 接触面は半径 a の円形領域になる. 接触圧力 $p(r)$ は半球上に分布すると仮定して,

$$p(r) = p_{\max} \sqrt{1 - \left(\frac{r}{a}\right)^2} \quad (2.6)$$

となる. 圧力 $p(r)$ の合力は押し付け力 P に等しいので,

$$P = \int_0^a 2\pi r p(r) dr = \frac{2\pi a^2}{3} p_{\max} \quad (2.7)$$

である. a は R_1, R_2 に対して小さいとすれば, いずれの球についても接触面近傍の状態は半無限表面に $p(r)$ が作用する場合の応力状態で近似することができる.

Fig.2.6のような接触面内の表面変位 $(w_z)_{z=0}$ は次式のように与えられ,

$$\begin{aligned} (w_z)_{z=0} &= \frac{(1-\nu)\pi}{4Ga} p_{\max} \left(a^2 - \frac{1}{2} r^2 \right) \\ &= \frac{3P}{4a^3} \frac{1-\nu^2}{E} \left(a^2 - \frac{1}{2} r^2 \right) \end{aligned} \quad (2.8)$$

Fig.2.6(a)の C_1, C_2 点の $p(r)$ による変位 δ_1, δ_2 はそれぞれ

$$\delta_1 = \frac{3P}{4a^3} \frac{1-\nu_1^2}{E_1} \left(a^2 - \frac{1}{2} r^2 \right) \quad (2.9)$$

$$\delta_2 = \frac{3P}{4a^3} \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \left(a^2 - \frac{1}{2} r^2 \right) \quad (2.10)$$

である. また, r 軸から C_1, C_2 までの距離 z_1, z_2 は幾何学的関係から,

$$z_1 = R_1 - \sqrt{R_1^2 - r^2} \approx \frac{r^2}{2R_1} \quad (2.11)$$

$$z_2 = R_2 - \sqrt{R_2^2 - r^2} \approx \frac{r^2}{2R_2} \quad (2.12)$$

である. 接触による C_1, C_2 点の2つの球の接近量 $h(r)$ は,

$$h(r) = (z_1 + \delta_1) + (z_2 + \delta_2) \quad (2.13)$$

であるから

$$h(r) = \frac{r^2}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) + \frac{3P}{4a^3} \left(a^2 - \frac{1}{2} r^2 \right) \left(\frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \right) \quad (2.14)$$

となる. 接触面は平面になると仮定して $h(r) = \delta$ とおくと, この式は任意の $r (\leq a)$ について成立しなければならないので,

$$\delta = \frac{3P}{4a} \left[\frac{3}{4} \frac{1}{(1/R_1) + (1/R_2)} \left(\frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \right) P \right]^{\frac{1}{3}} \quad (2.15)$$

$$0 = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} - \frac{3P}{4a^3} \left(\frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \right) \quad (2.16)$$

となる. ここで, δ は両球の接近量を表す. この式から

$$a = \left[\frac{3}{4} \frac{1}{(1/R_1) + (1/R_2)} \left(\frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \right) P \right]^{\frac{1}{3}} \quad (2.17)$$

$$\delta = \left[\frac{9}{16} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \left(\frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \right)^2 P^2 \right]^{\frac{1}{3}} \quad (2.18)$$

$$P = \frac{4\delta^{\frac{3}{2}}}{3} \left[\left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \left(\frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2.19)$$

$$p_{\max} = \frac{3}{2\pi} P^{\frac{1}{3}} \left[\frac{3}{4} \frac{1}{(1/R_1) + (1/R_2)} \left(\frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \right) P \right]^{\frac{2}{3}} \quad (2.20)$$

ここで、半径 R_1 と R_2 は凸面で正の値、凹面で負の値とする。最大接触圧力 p_{\max} は $p^{1/3}$ に比例する関係にあり、これらが球と球の接触に関するヘルツの公式である。次に、本実験で用いたコロイドプローブカンチレバーのような剛球体で半無限弾性体を圧縮する場合には、

$R_1 = R_0, R_2 \rightarrow \infty, E_1 \rightarrow \infty, E_2 = E, \nu_2 = \nu$ とおくと、

$$a = \left[\frac{3}{4} R_0 \frac{1-\nu^2}{E} P \right]^{\frac{1}{3}} \quad (2.21)$$

$$\delta = \left[\frac{9}{16} \frac{1}{R_0} \left(\frac{1-\nu^2}{E} \right)^2 P^2 \right]^{\frac{1}{3}} \quad (2.22)$$

$$p_{\max} = \frac{3}{2\pi} P^{\frac{1}{3}} \left[\frac{3}{4} R_0 \frac{1-\nu^2}{E} \right]^{\frac{2}{3}} \quad (2.23)$$

となる。

コロイドプローブカンチレバーを用いた場合の弾性変形量は

$$F = \frac{3}{4} \frac{ER^{\frac{1}{2}}}{(1-\nu^2)} \delta^{\frac{3}{2}} \quad (2.24)$$

となる。ここでは押付力 P を F と表した。

(b) Sneddon 弾性接触論

Hertz の弾性接触論は Sneddon らによって球以外の形状の場合にも使用できるよう拡張された[46]. AFM 測定においては, 探針の形状は放物状, 円錐などでよく近似される. それぞれの場合での式を以下に示す.

(1) 放物状

$$a = \sqrt{R\delta} \quad (2.25)$$

$$F = \frac{3}{4} \frac{ER^{\frac{1}{2}}}{(1-\nu^2)} \delta^{\frac{3}{2}} \quad (2.26)$$

上式は Hertz の球状の場合の弾性理論と等しい.

(2) 円錐

$$a = \frac{2}{\pi \tan\alpha} \delta \quad (2.27)$$

$$F = \frac{2 \tan\alpha}{\pi} \frac{E}{(1-\nu^2)} \delta^2 \quad (2.28)$$

ここで, α は円錐先端の半角を表している.

2.6 フォースモジュレーション法

粘弾性を持つ物質の測定には時間の正弦関数で表わされるひずみや応力を与えて変形させた時の応答を測定する動的粘弾性測定が用いられる. 特に AFM を用いた動的粘弾性測定を一般にフォースモジュレーション法という[12-14, 33, 39, 40, 47-49]. フォースモジュレーション法では, AFM のカンチレバーを外部のオシレーターにより強制的に任意の周波数で正弦振動をさせることでサンプルに周期的な力を加え,

この振動がサンプルの粘弾性によって変化することを利用している。サンプルが硬い場合はカンチレバーの探針は大きくたわみ振動振幅は大きくなる、サンプルが柔らかい場合はカンチレバーの探針がサンプル表面の接触部位に入り込んでしまい、カンチレバーの振動振幅が押し込んだ量に対応して減少する。更にサンプルが粘性の要素を含んでいると振幅信号に時間的な遅れ(位相差)が生じることになる。この振動振幅の変化と位相差の情報から複素弾性率を算出する。

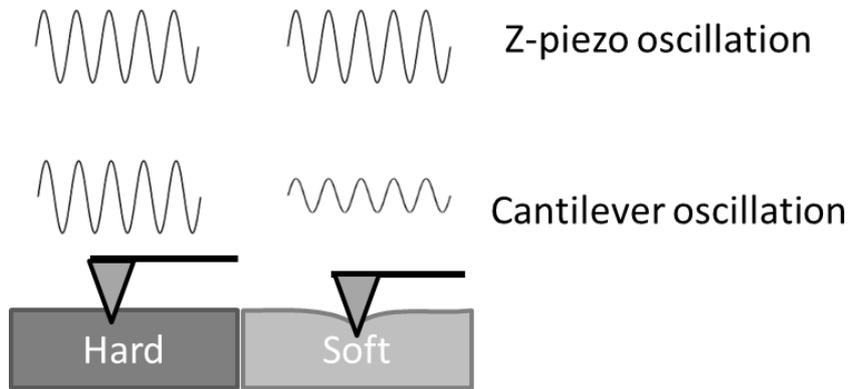


Fig. 2.7 フォースモジュレーション法の概念図.

2.5で示したヘルツモデルは軟質試料の弾性挙動を表わすが、細胞骨格のような複雑な内部構造を有する細胞は変形に対する応答として弾性特性と共に粘性特性を示す。このような粘弾性物体においては、次に示すようにヘルツモデルを拡張させることで周波数依存挙動を扱うことが可能となる[39, 40].

球状形状のヘルツの接触弾性論は前述したように

$$F = \frac{3}{4} \frac{ER^{\frac{1}{2}}}{(1-\nu^2)} \delta^{\frac{3}{2}} \quad (2.24)$$

となる。

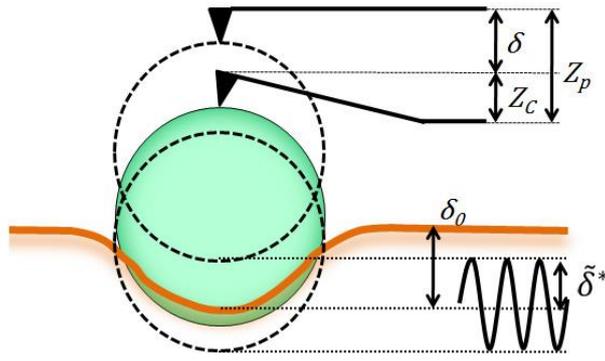


Fig 2.8 カンチレバーを振動させた時の押し込み量とピエゾ変位の関係図.

ここで δ_0 , $\delta^* e^{i\omega t}$ をそれぞれ Fig 2.8 に示すようにオフセット押し込み量, 振動押し込み量を表わすとすると, 全押し込み量 δ を次のように表すことができる.

$$\delta = \delta_0 + \delta^* e^{i\omega t} \quad (\delta^* = \delta' + i\delta'') \quad (2.29)$$

式(2.1)を δ_0 周りでテイラー展開をして拡張すると,

$$F \approx \frac{4R^2}{3(1-\nu^2)} (E_0 \delta^{\frac{3}{2}} + \frac{3}{2} E_1^* \delta_0^{\frac{1}{2}} \delta^*) \quad (2.30)$$

$$F \equiv \frac{4E_0 R^2}{3(1-\nu^2)} \delta^{\frac{3}{2}} \quad (2.31)$$

$$F_1^* \equiv \frac{2E_1^* R^2}{(1-\nu^2)} \delta_0^{\frac{1}{2}} \delta^* \quad (2.32)$$

となる. 式(2.30)の右辺第1項は元のヘルツモデルを表している項であり F_0 とおく. また, 右辺第2項は粘弾性定数を含む項であり F_1^* とおく. また, E_0 は振動周波数が0であるときの弾性率を表している. 一方, E^* は周波数依存性をもつ動的弾性率を表している.

通常、レオロジー測定では物体にせん断力を加える事で、物体の粘弾性挙動を複素せん断弾性率 G^* を用いて表している。そのようなレオロジーの慣習に則って、フォースモジュレーション法では E^* を G^* に変換して表される。細胞を等方性材料と仮定することで、 E^* と G^* との間に

$$E^* = 2(1+\nu)G^* \quad (2.33)$$

の関係が成り立つため、 G^* は

$$G^*(\omega) = \frac{(1-\nu)F_1^*}{4(R\delta_0)^2 \frac{1}{\delta^*}} \quad (2.34)$$

と表わすことができる。

ここで、全押し込み量 δ は Z 方向のピエゾ変位 Z^P とカンチレバーのたわみ Z^C の差であるので次式で表せられる。

$$\delta = Z^P - Z^C \quad (2.35)$$

同様に、オフセット押し込み量 δ_0 はピエゾのオフセット変位 Z_0^P とカンチレバーオフセット変位 Z_0^C の差となる。

$$\delta = Z_0^P - Z_0^C \quad (2.36)$$

δ_0 を中心に正弦振動を加えたとき、試料とカンチレバー探針の正確な位置はオフセット変位と振動を足し合わせ、それぞれ次式のようになる。

$$Z_P = Z_0^P + \tilde{Z}_P^* e^{i\omega t} \quad (2.37)$$

$$Z_C = Z_0^C + \tilde{Z}_C^* e^{i\omega t} \quad (2.38)$$

ここで、 \tilde{Z}_P^* と \tilde{Z}_C^* はそれぞれピエゾの振動変位とカンチレバーの振動変位を表わしている。

ピエゾの強制振動振幅を A_{drive} , カンチレバーの振動振幅を A_{res} とすると \tilde{Z}_P^* と \tilde{Z}_C^* はそれぞれ次式のようになる(Fig 2.9).

$$\tilde{Z}_P^* e^{i\omega t} = A_{drive} e^{i\omega t} \quad (2.39)$$

$$\tilde{Z}_C^* e^{i\omega t} = A_{res} e^{i(\omega t + \varphi)} \quad (2.40)$$

上記の関係式を式(2.34)に代入することで、フォースモジュレーション測定での複素横弾性率を得ることができる。

$$G^*(f) = \frac{1-\nu}{4(R\delta_0)^2} \frac{KA_{res}(\cos\varphi + i\sin\varphi)}{A_{drive} - A_{res}(\cos\varphi + i\sin\varphi)} \quad (2.41)$$

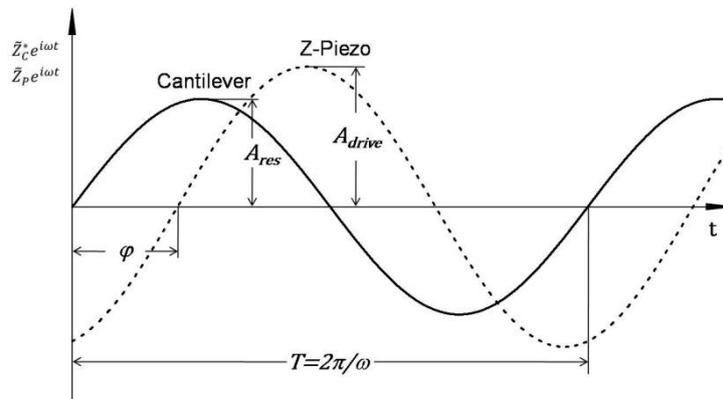


Fig 2.9 カンチレバーとピエゾの振動振幅および位相差の関係図.

液中でフォースモジュレーション測定を行う場合、カンチレバーをある周波数で振動させているため、カンチレバーとサンプル表面間に流体的な抗力が発生してしまう。そのため、正確な複素弾性率を得るにはこの流体的抗力の影響を差し引く必要がある。流体的抗力の影響を含めた複素弾性率の式は、

$$G^*(f) = \frac{1-\nu}{4(R\delta_0)^2} \left[\frac{KA_{res}(\cos\varphi + i\sin\varphi)}{A_{drive} - A_{res}(\cos\varphi + i\sin\varphi)} - ib(0)f \right] \quad (2.42)$$

と表される[50]。 b はドラッグファクターと呼ばれ、サンプルと探針間の距離が h で振動押し込み量が δ^* であるとき流体的抗力 F_d^* は $F_d^*/\delta^* = ib(0)f$ で定義される。従来のフォースモジュレーション法では、バネ定数の小さな柔らかいカンチレバーや三角形状のカンチレバーが用いられており、流体的抗力の影響を受けやすかった。しかし、本実験で用いたカンチレバーは、他のカンチレバーと比べ比較的短い矩形型で、バネ定数が大きなものを使用した。さらに探針先端に微小なビーズを取り付けることでサンプルとカンチレバー間の距離が十分に離れていた。これらにより本実験系での流体抗力は微小なものとなり、その影響は十分に小さいことが確認されている。以下の図は本実験で用いた矩形カンチレバー(赤)と過去の研究で用いられていた V 字形カンチレバー(青)のドラッグファクターの距離依存性を示している。

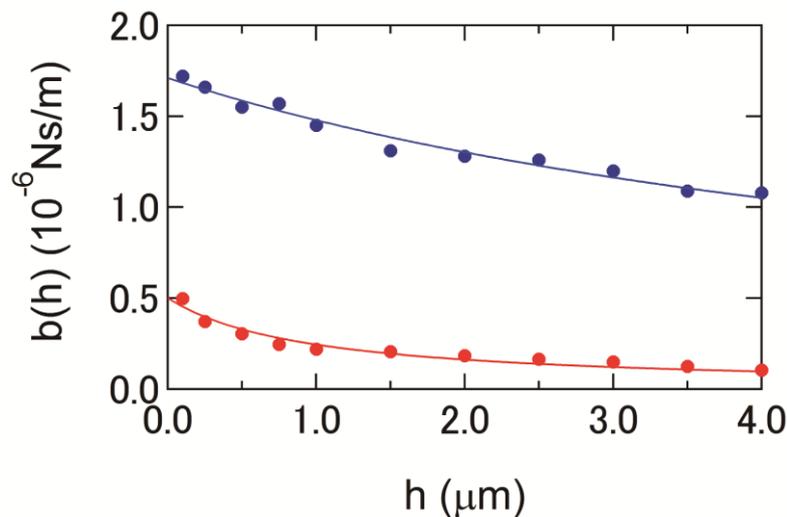


Fig 2.10 矩形カンチレバー(赤)と V 字形カンチレバー(青)のサンプルまでの距離 h に対する流体抗力の変化。

2.7 時間領域と周波数領域

前節の式(2.42)で算出される複素弾性率 $G^*(f)$ は前章の1.1.3で述べた Power-law structural damping model を用いて式(1.1), (1.2), (1.3)で表される. 一方で応力緩和法によって測定される緩和弾性率 $g(t)$ も同様に Power-law structural damping model 式を用いて以下のように表される.

$$g(t) = \mu\delta(t) + g_0 \left(\frac{t}{t_0} \right)^{-\alpha} \quad (2.43)$$

ここで, μ はニュートン粘性係数, $\delta(t)$ はディラックのデルタ関数, g_0, t_0 はそれぞれ弾性率と時間のスケールファクター, t は時間を表している.

緩和弾性率 $g(t)$ と複素弾性率 $G^*(f)$ は粘弾性挙動をそれぞれ時間領域と周波数領域で示したものであり, 原理上これらの値は等価である. 式(1.1), (1.2), (1.3)は式(2.43)をフーリエ変換することで得られるため, これら時間領域と周波数領域での Power-law structural damping model 式も等価である. 以下に時間領域の Power-law structural damping model 式(2.43)から周波数領域の Power-law structural damping model 式(1.1), (1.2), (1.3)の導出過程を述べる.

応力緩和測定では一定ひずみ ε_0 を与え, 応力の時間変化 $\varepsilon(t)$ を測定する. ここで, ひずみは単位ステップ関数 $u(t)$ を用いて次式で表すことが出来る.

$$\varepsilon(t) = \varepsilon_0 u(t) \quad (2.44)$$

式(2.17)をラプラス変換すると

$$\varepsilon(s) = \varepsilon_0 \int_0^{\infty} u(t) \cdot e^{-st} dt = \frac{\varepsilon_0}{s} \quad (2.45)$$

ひずみを入力、応力を出力とした時にその間の伝達関数 $g(s)$ は

$$g(s) = \frac{\sigma(s)}{\varepsilon(s)} = \frac{s\sigma(s)}{\varepsilon_0} \quad (2.46)$$

と表される.

式(2.43)をラプラス変換することで,

$$\frac{\sigma(s)}{\varepsilon_0} = \mu \int_0^{\infty} \delta(t) \cdot e^{-st} dt + \frac{g_0}{t_0^{-\alpha}} \int_0^{\infty} t^{-\alpha} \cdot e^{-st} dt \quad (2.47)$$

となる.

ここで, 右辺第1項目と第2項目の積分項はそれぞれ

$$\int_0^{\infty} \delta(t) \cdot e^{-st} dt = 1 \quad (2.48)$$

$$\int_0^{\infty} t^{-\alpha} \cdot e^{-st} dt = \frac{1}{s^{-\alpha}} \int_0^{\infty} (st)^{-\alpha} \cdot e^{-st} dt \quad (2.49)$$

となる.

ここで, $st = \tau$ と置くことで,

$$\frac{1}{s^{-\alpha}} \int_0^{\infty} (st)^{-\alpha} \cdot e^{-st} dt = \frac{1}{s^{-\alpha}} \int_0^{\infty} \tau^{-\alpha} \cdot e^{-\tau} \cdot \frac{1}{s} d\tau = \frac{1}{s^{-\alpha+1}} \int_0^{\infty} \tau^{-\alpha} \cdot e^{-\tau} d\tau \quad (2.50)$$

と変換することができる.

ここで, 積分項はガンマ関数で定義され, 以下で表される.

$$\int_0^{\infty} \tau^{-\alpha} \cdot e^{-\tau} d\tau = \Gamma(1-\alpha) \quad (2.51)$$

従って、式(2.47)は以下のように表される。

$$\frac{\sigma(s)}{\varepsilon_0} = \mu + \frac{g_0}{t_0^{-\alpha}} \cdot \frac{\Gamma(1-\alpha)}{s^{1-\alpha}} \quad (2.52)$$

ここで、 s を虚数 i と角周波数 ω で置換してフーリエ変換することによって、時間領域から周波数領域に変換すると、式(2.52)は

$$g(\omega) = i\mu\omega + \frac{g_0}{t_0^{-\alpha}} \cdot \Gamma(1-\alpha) \cdot (i\omega)^\alpha \quad (2.53)$$

と変換される。

ここで、オイラーの公式を用いることで、

$$i^\alpha = (e^{i(\pi/2)})^\alpha = \cos(\alpha\pi/2) + i \sin(\alpha\pi/2) \quad (2.54)$$

と表されるので、式(2.53)は

$$\begin{aligned} g(\omega) &= i\mu\omega + \frac{g_0}{t_0^{-\alpha}} \cdot \Gamma(1-\alpha) \cdot \omega^\alpha \{ \cos(\alpha\pi/2) + i \sin(\alpha\pi/2) \} \\ &= i\mu\omega + g_0 \cdot \Gamma(1-\alpha) \cdot \omega t_0^\alpha \cos(\alpha\pi/2) (1 + i \tan(\alpha\pi/2)) \end{aligned} \quad (2.55)$$

と表される。

ここで、 $t_0 = \frac{2\pi}{\omega_0}$, $\tan(\alpha\pi/2) = \eta$ と置くことで

$$g(\omega) = (2\pi)^\alpha \cdot g_0 \cdot \left(\frac{\omega}{\omega_0}\right)^\alpha \cdot \Gamma(1-\alpha)(1+i\eta)\cos(\alpha\pi/2) + i\mu\omega \quad (2.56)$$

周波数領域での Power-law structural damping model 式に変換される.

2.8 SGR (Soft Glassy Rheology)理論

Solich は Bouchaus と Monthus のガラスモデル[51]を基本とした Soft Glassy Rheology (SGR)理論を提案した[52, 53]. この SGR 理論はシステム内の個々の要素が, エネルギーランドスケープの周辺の要素から定義される深さをもったトラップ内に存在し, それぞれの要素がこれらのエネルギートラップから抜け出すためには, 熱的なブラウン運動だけでは抜け出すことができず, 代わりに, 隣接する要素との相互作用によって攪拌されたり押し出されたりすると考えられる. それらの非熱的な攪拌の物理的起源は不明であるが, SGR 理論では, それらの現象をノイズ温度(noise temperature) x という無次元パラメーターで特徴付ける. $x=1$ では要素はエネルギートラップから抜け出すことができず, 物質は完全弾性体を示す. このときの状態はガラス転移として知られている. $x > 1$ では要素はトラップから抜け出し, 構造が無秩序な状態になり, 物質は流動性を示す. $x = 2$ は, ニュートン性流体を示す. 要素低周波での線形反応領域では, SGR 理論から structural damping model 式という本質的な式が導かれ, べき指数 α は $\alpha = x - 1$ と表され, ノイズ温度と直接的な関係が示されている [52].

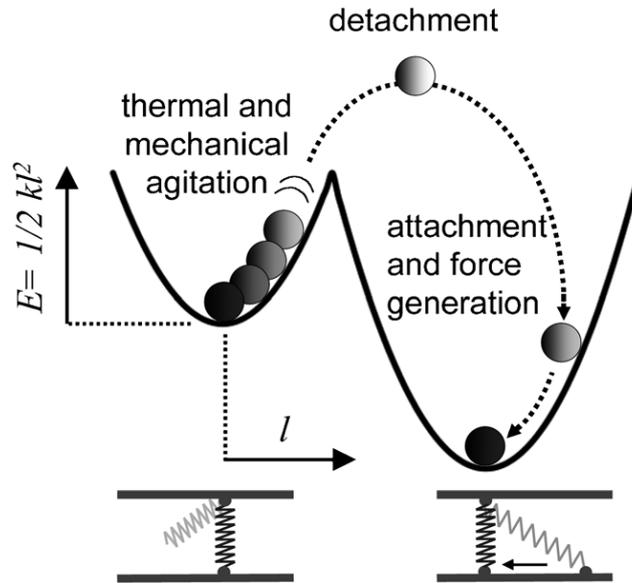


Fig2.11 SGR モデルに基づくポテンシャル井戸の概略図. 要素が異なる深さ E のエネルギートラップに移る際に力が発生する[54].

これを細胞に対応させて考えると、個々の要素は細胞内ネットワークを形成して、細胞形状の決定や細胞の運動性を発生させている細胞骨格を構成しているタンパク質などであると考えられている。

2.9 ロックインアンプ

ロックインアンプは雑音に埋もれた微小な交流波形信号を検出する装置である。

Fig.2.12はロックインアンプの概要図である。入力信号と同じ周波数を持つ参照信号で乗算して、ローパスフィルターに通すことで入力信号の振幅が得られる。以下にその原理を詳述する。

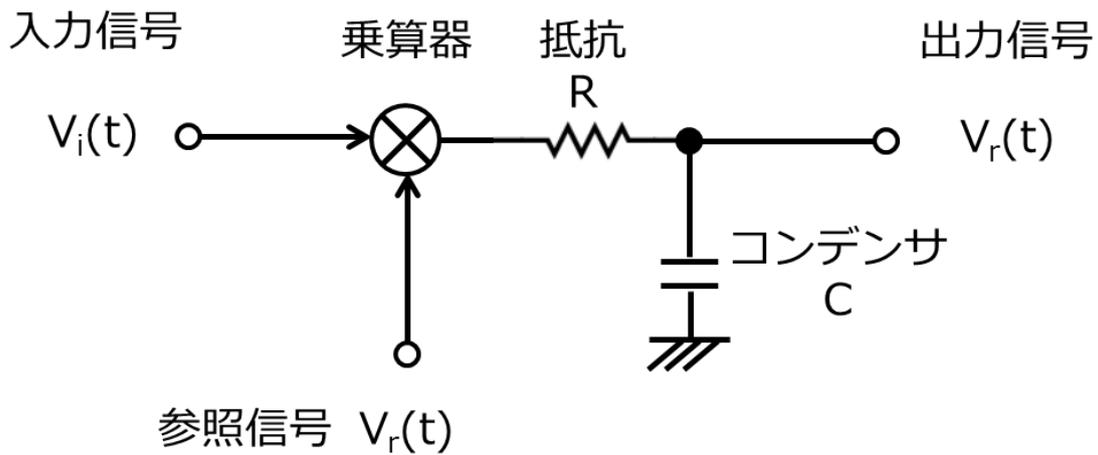


Fig. 2.12 ロックインアンプの概要図.

入力信号 $V_i(t)$, 参照信号 $V_r(t)$ をそれぞれ以下のおく.

$$V_i(t) = A \cos \omega_1 t \quad (2.57)$$

$$V_r(t) = \cos \omega_1 t \quad (2.58)$$

ここで, A は入力信号の振幅, ω_1 , ω_1 はそれぞれ入力信号と参照信号の周波数である.

これらの信号は乗算器によって乗算され, 以下の波形が出力される.

$$V_m = V_i \times V_r = A/2 \cos[(\omega_1 - \omega_1)t] + \cos[(\omega_1 + \omega_1)t] \quad (2.59)$$

ここで, 入力信号と参照信号の周波数を合わせると

$$V_m = V_i \times V_r = A/2 (1 + \cos 2\omega_1) \quad (2.60)$$

となる. 従って, 参照信号と同じ角周波数をもつ入力信号は, 乗算によって, 式(2.60)の第1項目の直流成分に変換される. 第2項目の倍波成分とそれ以外の雑音は周波数成分を保持するため, 抵抗 R とコンデンサ C で構成されたローパスフィルタで周波数成分を除去することによって, 測定信号の振幅 A を含む直流成分のみを測定す

ることが可能となる。

また、入力信号と参照信号の位相差を検出するために、2位相ロックインアンプが用いられる。2位相ロックインアンプの概要図を Fig.2.13に示す。乗算器を二つ設け、それぞれ 90° 位相差のある参照信号で乗算することで入力信号をそれぞれ極座標上の X 成分と Y 成分に分けて検出する。信号 X と Y をベクトル演算することによって、入力信号の振幅だけでなく、入力信号と参照信号の位相差も検出することが可能である。

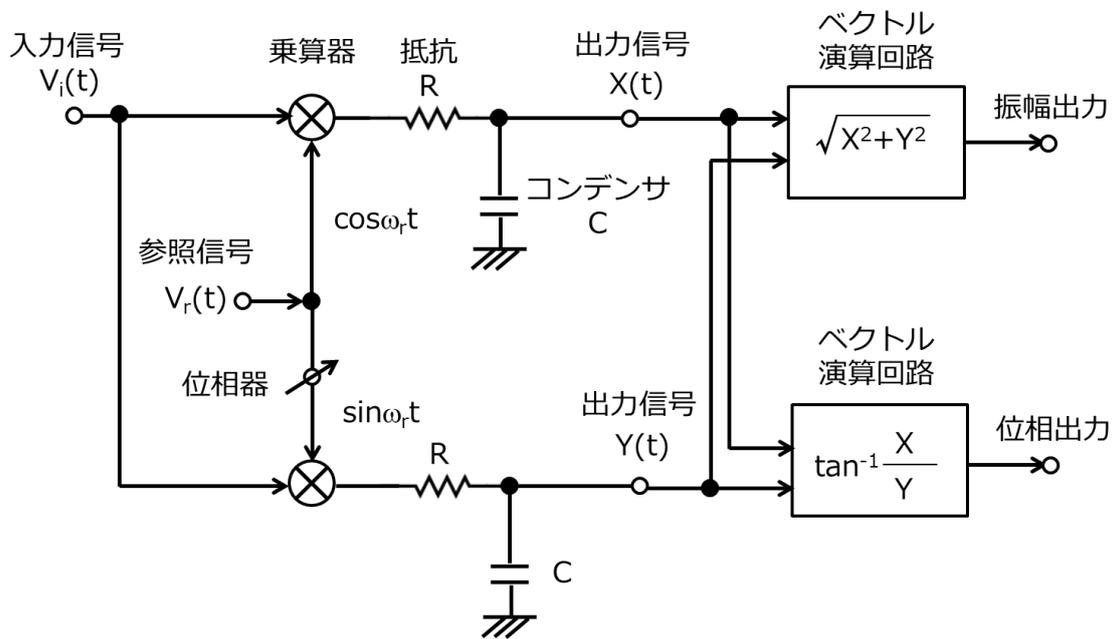


Fig. 2.13 2位相ロックインアンプの概要図。

最も単純なローパスフィルタは入力信号に対して抵抗 R を直列に、コンデンサ C を並列に接続することで構成される。抵抗は周波数によってインピーダンスが変化しないが、コンデンサのインピーダンスは $1/(2\pi fC)$ により変化するため周波数が高くなるほど小さくなる。従って、回路の分圧特性から周波数による出力の減衰が起こる。 RC ローパスフィルタにおいてフィルタ通過前の電圧を V_1 、通過後の電圧を V_2 とすると、フィルタ内を通る電流 i は以下のように導出される。

$$i = \frac{V_1 - V_2}{R} = \frac{V_2}{\frac{1}{j\omega C}} \quad (2.61)$$

これを伝達関数の式で表すと,

$$T(j\omega) = \frac{V_2}{V_1} = \frac{1}{1 + j\omega CR} \quad (2.62)$$

式(2.62)より

$$T(j\omega) = \frac{\frac{1}{CR}}{j\omega + \frac{1}{CR}} \quad (2.63)$$

$$\omega_0 = \frac{1}{CR} \text{とおくと}$$

$$T(j\omega) = \frac{\omega_0}{\omega_0 + j\omega} \quad (2.64)$$

ここで, 式(2.64)を正規化すると

$$T(j\omega) = \frac{1}{1 + j\frac{\omega}{\omega_0}} \quad (2.65)$$

となる. これより ω_0 を遮断周波数と呼び, 周波数に変換すると

$$f = \frac{1}{2\pi RC} \quad (2.66)$$

式(2.66)より RC ローパスフィルタの遮断周波数が決定される。なお、 R と C の積で表される定数を時定数 τ と呼ぶ。

$$\tau = RC \quad (2.67)$$

ロックインアンプではフィルタの特性を遮断周波数ではなく時定数で表す場合が多い。フィルタに信号が通過してから出力が最終値の99%に到達するためには、1次フィルタの場合、時定数の4.59倍の時間が必要となる。従って、連続的な周波数変化の観測を行う場合、フィルタの時定数に注意しなくてはならない。

第3章

フォースモジュレーション法の高速化

3.1 背景と目的

これまでの AFM を用いたフォースモジュレーション測定では、カンチレバーに印加する振動周波数を段階的に変化させる周波数掃引フォースモジュレーション法が広く用いられてきた[12-14]. しかしながら、従来法では、対象とする測定周波数の数に依存して測定時間が単調に増大するため、1回当たりのフォースモジュレーション測定にかかる時間は数 s～数10 s 程度であった. そのため、細胞内マッピング測定や多数細胞計測の高速化において律速となっていた.

そこで、本研究では互いに異なる測定周波数成分を足しあわせた多重周波数を用いることで、全ての測定周波数成分を同時に測定する手法を開発する. これによって、細胞内マッピング測定にも用いられている単一周波数フォースモジュレーション測定と同程度の測定時間で、細胞の複素弾性率の広範囲な周波数特性を計測するシステムを確立することを目的とする. 本実験ではそのために必要な装置系の開発を最初に行い、従来の周波数掃引フォースモジュレーション法と多重周波数フォースモジュレーション法でそれぞれレオロジー測定を行い、その性能を評価する.

3.2 実験方法

3.2.1 実験装置

本実験で用いた装置は、AFM(MFP3D-Bio, Asylum Research), 倒立型光学顕微鏡(TE2000-E, Nikon)を基本として、多重周波数フォースモジュレーション測定に DAQ(Data acquisition)デバイス(USB-6259, NI9234, National Instruments), 周波数掃引フォースモジュレーション測定に振動振幅印加用のファンクションジェネレータ(WF1946, nF Corp.), 応答波形の振動振幅の変化と応答波形と振動波形の位相差を検出するためのロックインアンプ(7260, EG&G Instruments)をそれぞれ組み合わせて使用した. 多重振動波形は LabVIEW プログラムを用いて複数の周波数の波形を重

畳することで作成し、USB-6259を用いて Z ピエゾへと出力した (Fig. 3.1). Fig. 3.2はガラス基板上で振幅10 nm で振動させた時の、カンチレバーの振動振幅と位相差の周波数特性である。本実験で用いた装置の共振周波数は280 Hz 付近にあるため、重畳周波数は共振周波数帯を避けて48, 80, 96, 120, 152, 180, 200, 500Hz を選択した。また、周波数成分を単純に重ね合わせるとそれによって重畳波形の振動振幅は大きくなるため、各振動波形の位相を適切にずらすことで振動振幅が最小となるようにした。カンチレバーのたわみ量の応答波形は24bit のハイダイナミックレンジの NI9234 (National Instruments) で取得した。また、多重周波数波形の各周波数成分の振幅および位相差の解析において、従来のハードウェアロックインアンプでは1周波数ずつの解析しかできないため、ソフトウェアロックインプログラムを LabVIEW で設計した (Fig. 3.3). 作成したソフトウェアプログラムを多重化することで、各周波数成分の振幅と位相差の同時解析を行った (Fig. 3.4).

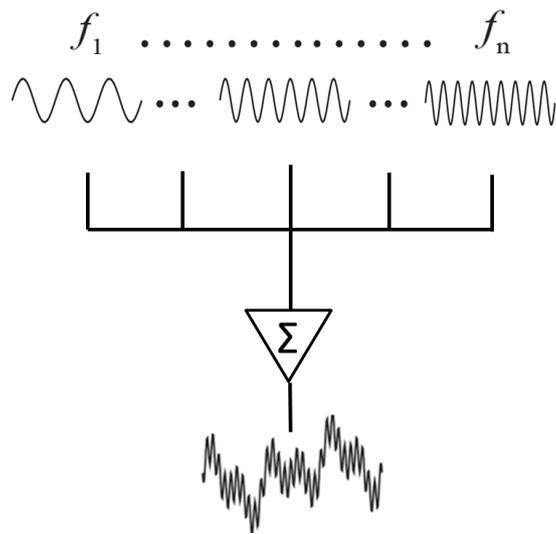


Fig. 3.1 多重周波数の概念図.

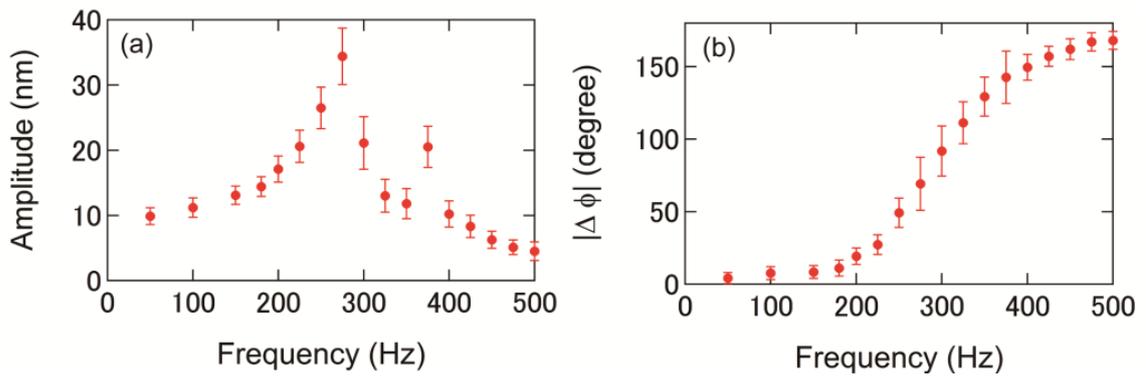


Fig. 3.2 ガラス基板上で10 nm の振動振幅を与えた時のカンチレバーの(a)振動振幅と(b)位相差の周波数依存性.

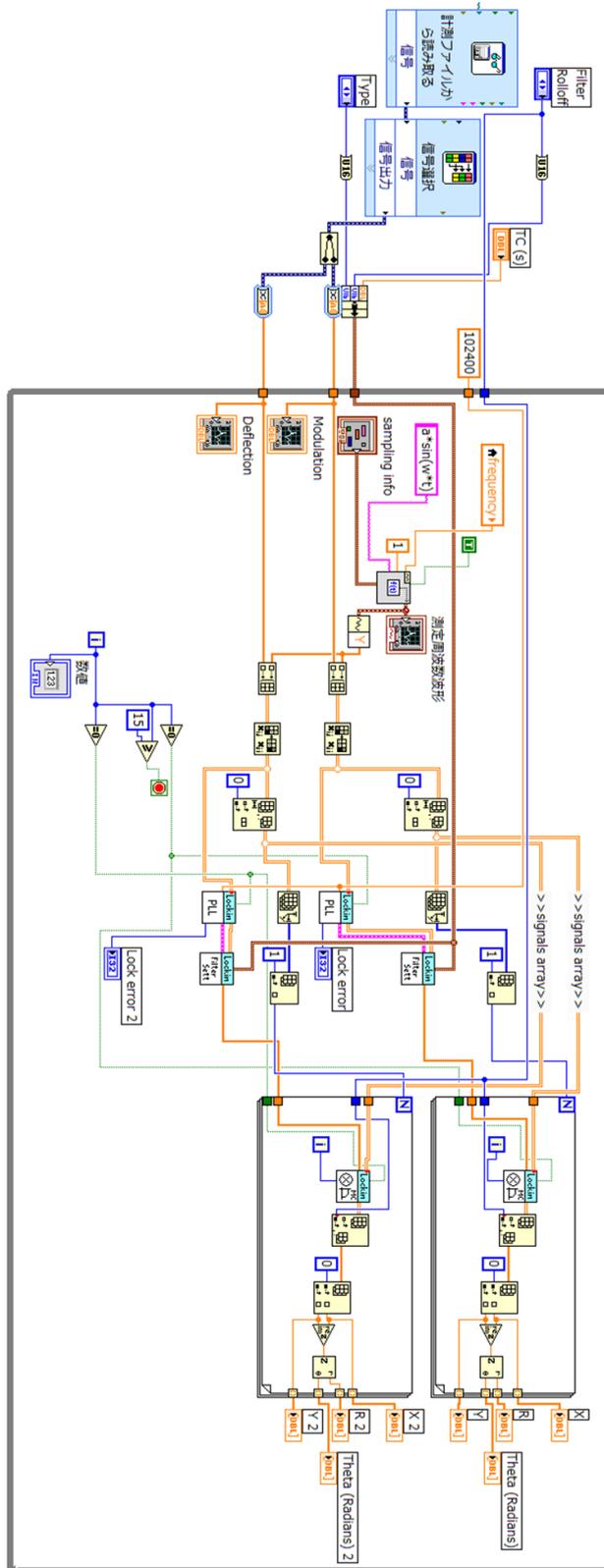


Fig. 3.3 自作ロックインプログラム

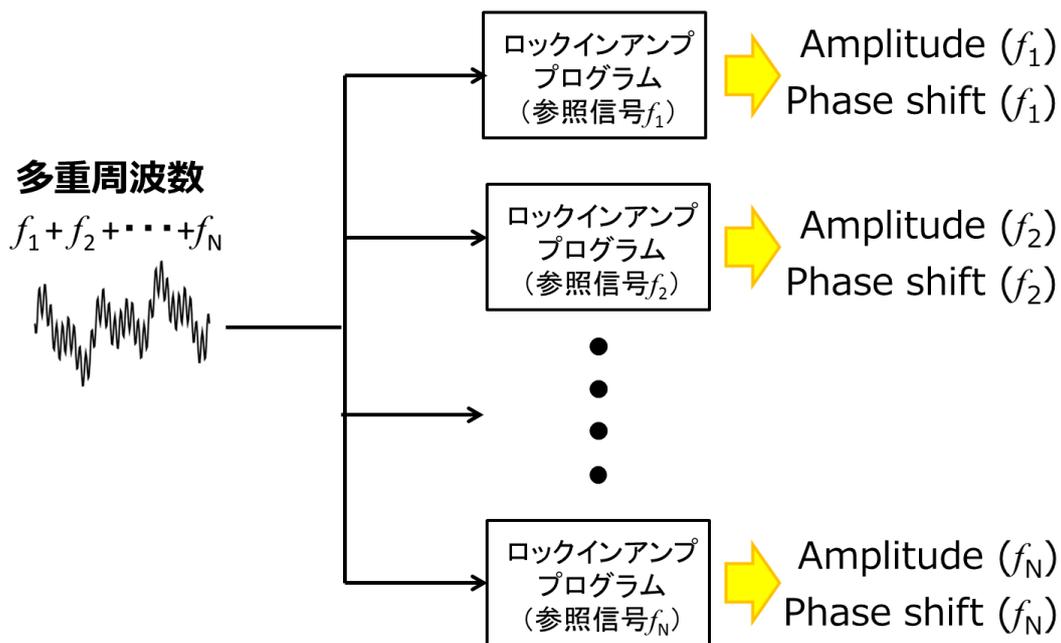


Fig. 3.4 多重ロックイン解析の概念図.

また、本実験では市販のカンチレバー (BL-AC40TS, Olympus) を用いた。このカンチレバーはバネ定数 $< 0.1 \text{ N/m}$ 、長さ $37 \mu\text{m}$ 、幅 $16 \mu\text{m}$ 、厚さ 200 nm の窒化シリコン製の矩形カンチレバーである。このカンチレバーは通常のカンチレバーよりも低いバネ定数を有しながら、大気中で 110 kHz 、液体中で 25 kHz という高い共振周波数をもつという特徴がある。Fig.3.3は実際の BL-AC40TS の画像である。

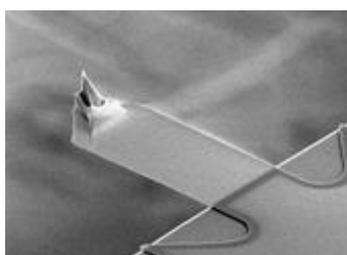


Fig. 3.5 BL-AC40TS [Olympus. Co. HP より]

3.2.2 実験手順

まず初めにソフトウェアロックインプログラムの性能を検証するために、同じ波形を用いて従来のハードウェアロックインアンプとロックインプログラムでそれぞれ解析を行い、比較した。更に、周波数の多重化による各周波数間のクロストーク及び非線形性の有

無を検証するために、周波数掃引フォースモジュレーション法と多重周波数フォースモジュレーション法を用いて連続測定を行い比較した。連続測定には、レオロジー特性を示し長時間でも安定しているシリコン基板を用いた。実験に用いたシリコン基板は CY52-276A, CY52-276B(Dow Corning, Toray)をそれぞれ5:4の重量比で混ぜて作成した。その後、より柔らかい生細胞を用いて、周波数掃引フォースモジュレーション法と多重周波数フォースモジュレーション法での比較を行った。

3.3 結果と考察

3.3.1 ソフトウェアロックインアンプの妥当性

ソフトウェアでのロックインプログラムによる解析が妥当なものであるかどうか、従来のハードウェアロックインアンプとの比較を行った。Fig.3.6に周波数掃引と多重周波数それぞれの測定におけるソフトウェアロックインとハードウェアロックインによる振幅と位相差解析の周波数依存性を示す。振幅、位相差共にソフトウェアとハードウェアの平均と偏差が良い一致を示し、両者に有意差は見られなかった。また、単一の周波数と多重周波数で比較したところ、両者は良い一致を示した。従って、本研究で開発されたソフトウェアロックインプログラム解析が妥当であることが示された。

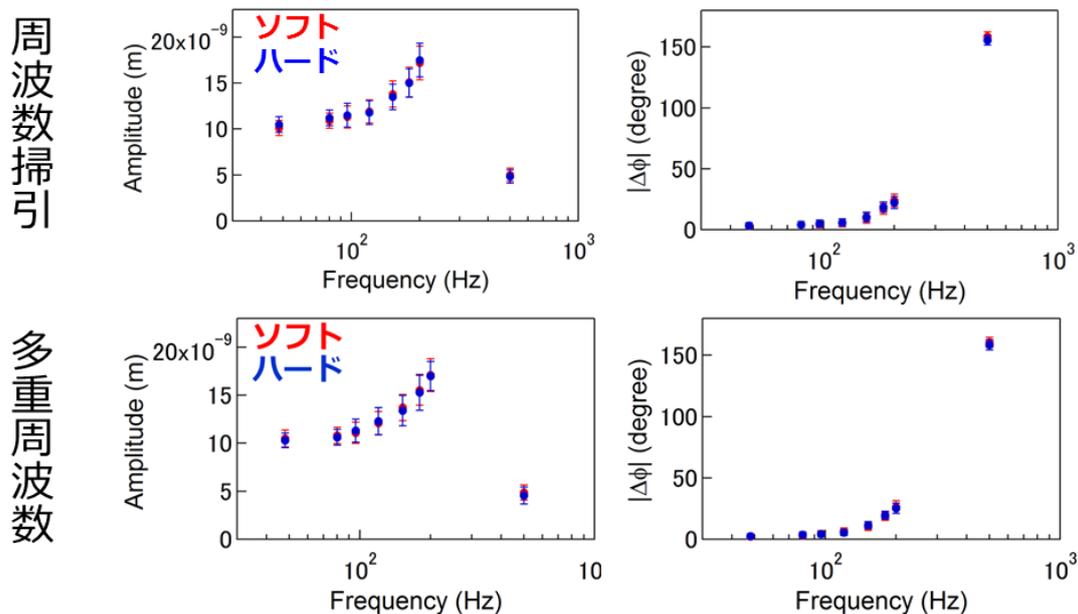


Fig. 3.6 カンチレバーを振幅10 nm, 周波数48 – 500 Hz の掃引波形(上段), 多重周波数波形(下段)で加振させた時のたわみ量信号の応答波形を LabVIEW によるソフトウェアロックインプログラム(赤)とハードウェアロックインアンプ(青)でそれぞれ解析した振幅(左)と位相差(右).

3.3.2 多重化によるクロストーク及び非線形性の有無

次に, 実際の測定において多重化によるクロストーク及び非線形性があるかどうかを調べるためにシリコン基板上で周波数掃引, 多重周波数フォースモジュレーションを用いてマッピング測定を行った. Fig.3.7にシリコン基板上レオロジーマッピング測定の模式図を示す. Fig.3.8にそれぞれの測定で得られた複素弾性率の周波数依存性を示す. 弾性成分 G' , 粘性成分 G'' 共に良い一致を示し, 各周波数間でのクロストーク及び非線形性は無視できるほど小さいことが明らかとなった.

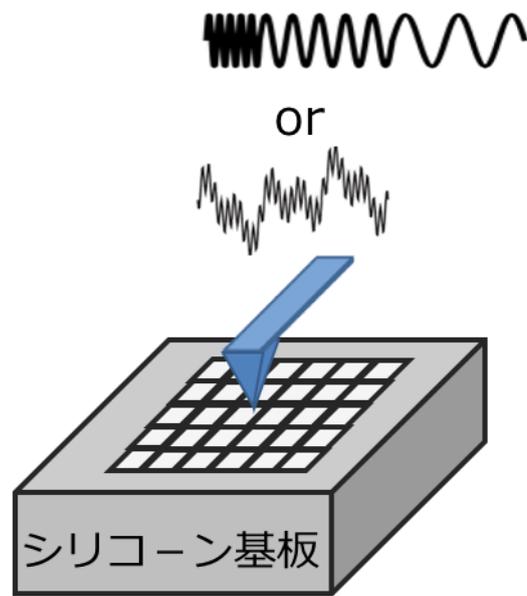


Fig. 3.7 シリコン基板上での周波数掃引と多重周波数フォースモジュレーションマッピング測定模式図.

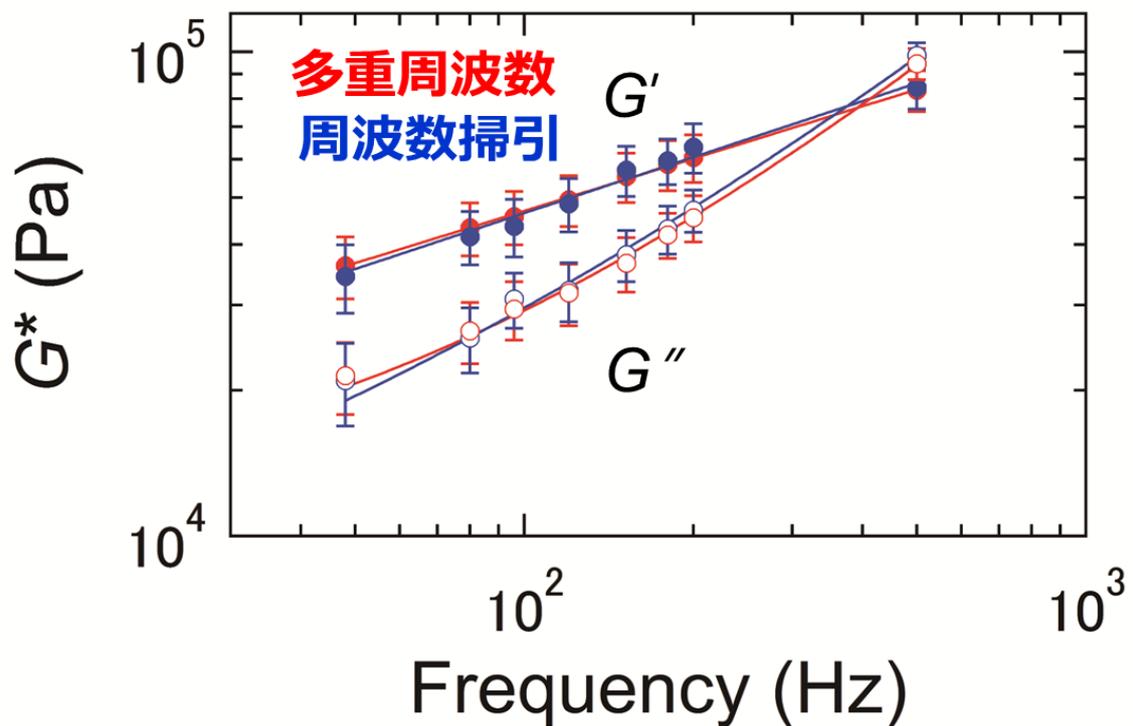


Fig. 3.8 シリコン基板上で、周波数掃引(青)と多重周波数(赤)でフォースモジュレーション測定を行った時の貯蔵弾性率 G' (●)と損失弾性率 G'' (○)の周波数特性. 実線は式(1.1),(1.2)でフィットしたもの.

更に, Fig.3.9に周波数掃引, 多重周波数それぞれでのレオロジー変数マッピング像を示す. 多重周波数フォースモジュレーション法では, 同じ測定範囲内で再度測定を行った. 測定範囲内でレオロジーの空間分布は良い一致を示しており, 安定な測定が可能であることがわかった.

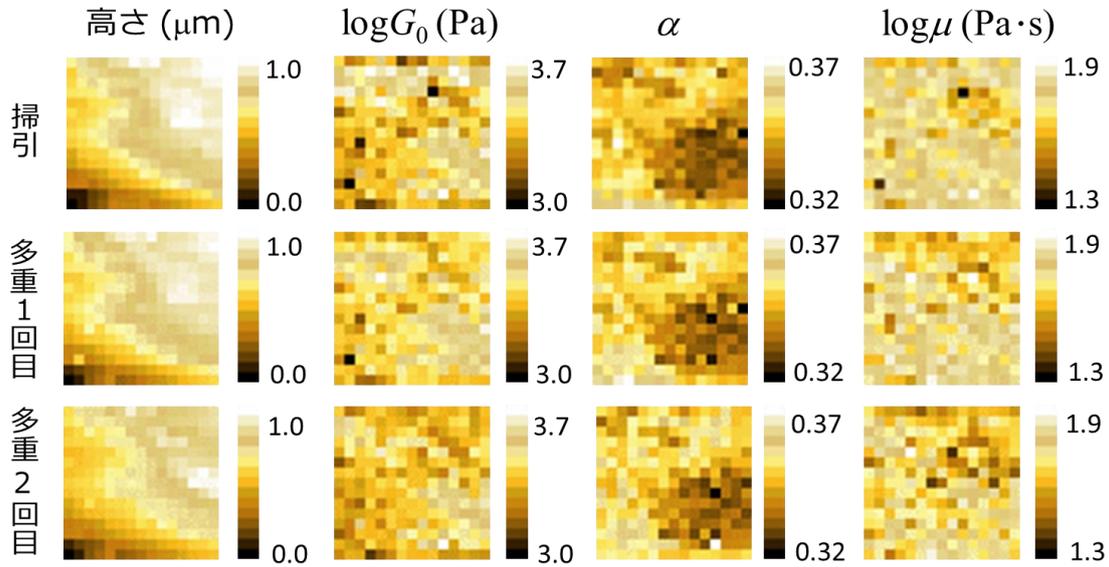


Fig. 3.9 シリコン基板上的での周波数掃引, 多重周波数フォースモジュレーション測定を連続で行った時の高さ, べき乗レオロジー変数 G_0 , α , μ のマッピング像. 測定範囲は $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ を 15×15 pixels とした.

シリコン基板を用いた測定によって多重周波数フォースモジュレーション法が従来の周波数掃引フォースモジュレーション法と同様にレオロジー測定に用いることが可能であることを実証した. そこで, 実際に生細胞を用いて周波数掃引フォースモジュレーション法と多重周波数フォースモジュレーション法で比較を行った. Fig.3.10にそれぞれの測定で得られた複素弾性率の周波数依存性を示す. 弾性成分 G' , 粘性成分 G'' 共に良い一致を示し, シリコン基板同様に細胞のレオロジーも多重周波数フォースモジュレーションによって測定可能であることを示した. また, 本研究では従来の単一周波数でのフォースモジュレーション測定と同程度の測定時間である1 s 程度での測定を達成した.

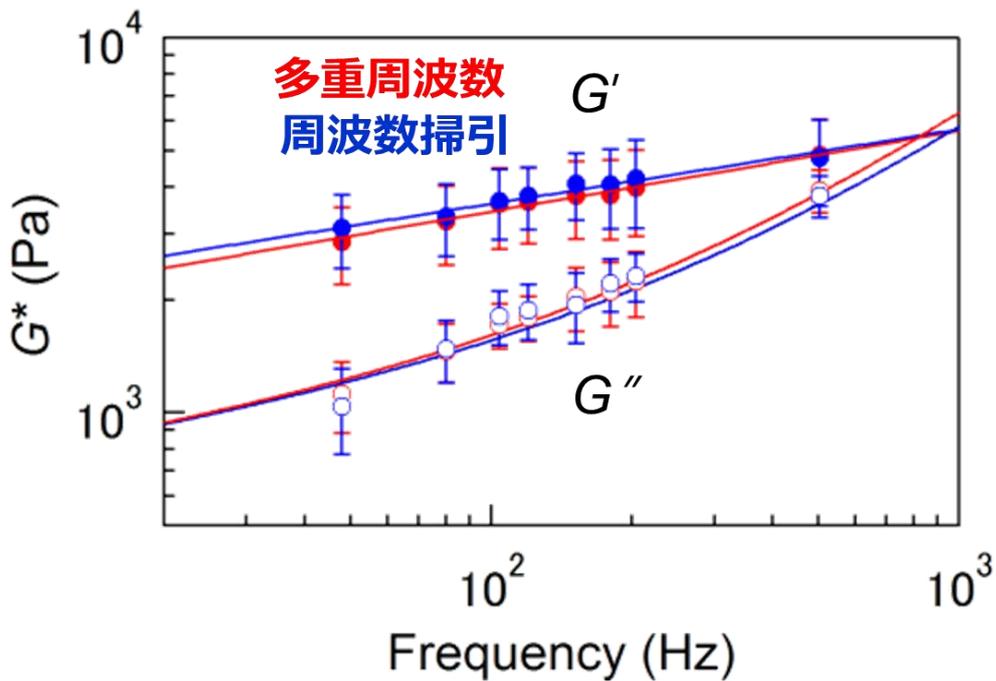


Fig. 3.10 細胞上で、周波数掃引(青)と多重周波数(赤)でフォースモジュレーション測定を行った時の貯蔵弾性率 G' (●)と損失弾性率 G'' (○)の周波数特性. 実線は式(1.1),(1.2)でフィットしたもの.

3.4 結論

本章ではフォースモジュレーション測定を高速化するための多重周波数フォースモジュレーション法の開発と多重周波数の同時解析法として多重ロックインアンププログラムの開発を行った. 多重周波数フォースモジュレーション法の性能を評価するために、シリコン基板を用いて周波数掃引フォースモジュレーション法と多重周波数フォースモジュレーション法の比較を行った. 多重周波数フォースモジュレーション法と周波数掃引フォースモジュレーション法の複素弾性率の周波数特性は良い一致を示した. また、実際の生細胞測定においても両者の複素弾性率は良い一致を示したため、多重周波数フォースモジュレーション法による細胞レオロジー測定の妥当性が検証された. 多重周波数フォースモジュレーション法の開発によって、従来の周波数掃引フォースモジュレーション法では、1回のレオロジー測定に10 s～数10 sかかっていたのが、1 s程度まで短縮することが可能となった. これは従来の単一周波数フォースモジュレーション法と同程度の測定時間であり、多重周波数フォースモジュレーション法がマッピング測定に十分適用可能であることを示している.

第4章

多重周波数フォースモジュレーション法による

細胞レオロジー測定

4.1 背景と目的

AFMによるイメージング(走査)測定やマッピング測定によって、細胞内部の弾性率の空間分布が観察されている[14, 20, 24, 29, 55-57]。Radmacherらはフォースモジュレーション法を開発し、AFM粘弾性マッピング技術を確立した[33]。近年の研究では、周波数掃引フォースモジュレーション法を用いてポリマー基板でのレオロジーマッピング測定が行われてきている[34, 35]。また、細胞で周波数掃引フォースモジュレーション法を用いてマッピング測定を行ったとする報告もされている[36]。しかしながら、周波数掃引フォースモジュレーション法は、複数の周波数成分を計測するため、1点あたりの測定に数sから数10sを要する。従って、従来の単一周波数でのフォースモジュレーションマッピングよりも測定が長時間となってしまうため、生細胞のマッピング測定には適していない。

そこで本章では第3章で述べた多重周波数フォースモジュレーション法を用いて単一細胞レオロジーマッピング測定を行うことを目的とする。本実験では複素弾性率マッピング像の周波数特性を測定し、べき乗レオロジー変数である G_0, α, μ の細胞内空間分布を測定する。また、得られたレオロジー分布像と免疫染色による細胞内構造観察像と比較する。

4.2 実験方法

4.2.1 細胞培養およびサンプル作成

本実験では細胞力学測定に広く用いられているマウス胎児性由来線維芽細胞(NIH3T3)を用いて実験を行った。細胞は接着タンパク質であるフィブロネクチンをコートしたカバーガラスに単一細胞となるように 1×10^4 cells の濃度で細胞を播種して18時間インキュベートしたものを測定に用いた。以下に NIH3T3細胞の培養手順を示す。

- ① インキュベータから培養ディッシュを取り出しサブコンフルエントな状態であることを確認する.
- ② ディッシュ内の培地をアスピレータで吸い取り, PBS 1 ml で3回洗浄する.
- ③ PBS を800 μ l, 0.25% Trypsin EDTA を200 μ l 加えてインキュベータ内で3分間置く.
- ④ 10%FBS,1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM 培地(D6046,SIGMA)を3 ml 加えてピペッティングし, 遠沈管に移す.
- ⑤ 遠心分離機に入れ1000 rpm で2分間遠心を行う. 底面に細胞を沈殿させるため, 遠沈管を180度回転させて, もう一度遠心を行う.
- ⑥ 遠心後の上澄み液をアスピレータで吸引し, DMEM 1 ml を加えてピペッティングする.
- ⑦ 遠沈管から10 μ l 吸い取り, トリパンプルー20 μ l を入れたエッペンドルフチューブに移しピペッティングする.
- ⑧ エッペンドルフチューブから10 μ l 取り出し, 血球計算盤に入れて, 細胞数を数える.
- ⑨ 新しい60 mm ディッシュに2 ml の DMEM を加えて, それぞれ 1×10^5 cells/dish となるように細胞数を調整した細胞懸濁液を播種し, インキュベータで培養する.

4.2.2 実験装置と測定

測定装置は第3章と同じものを用いた. 多重周波数フォースモジュレーション法とフォースマッピング法を組み合わせることで細胞内複素弾性率の周波数依存性のマッピング測定を行い, power-law structural damping model[10, 11]を用いて解析した (Fig. 4.1). マッピング測定は $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ の範囲を 64×64 pixels で測定し, フォースモジュレーション測定における測定周波数は48, 80, 96, 120, 152, 180, 200, 500 Hz で振動振幅は全て15 nmとした. 実際の多重周波数フォースモジュレーション測定によるフォースカーブの一例を Fig. 4.2に示す.

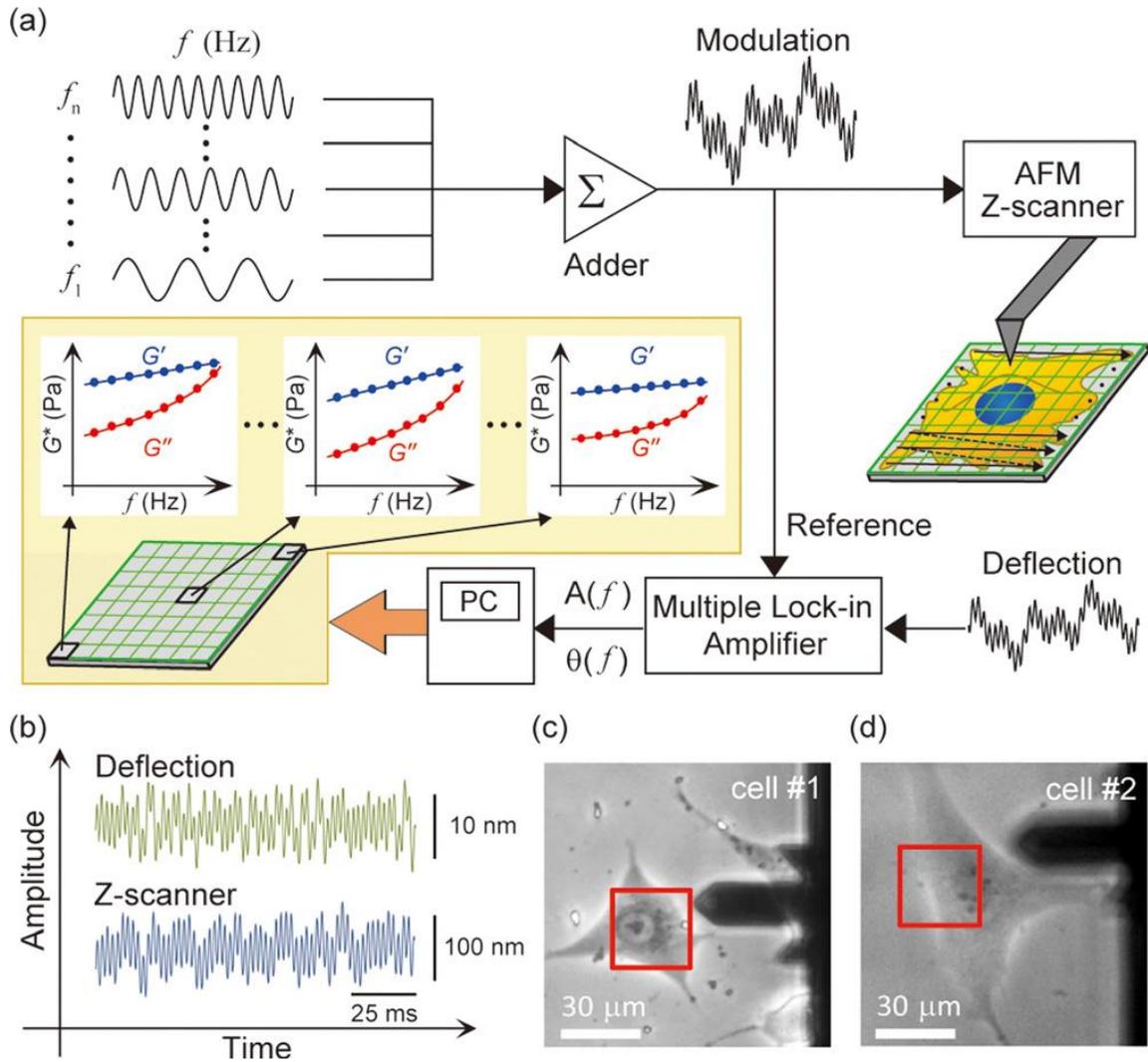


Fig. 4.1 (a) 多重周波数フォースモジュレーションマッピング測定の様式図. 各測定点毎に細胞の複素弾性率の周波数特性が得られ, 式(1)によるフィッティングによってレオロジーパラメータが算出される. (b) Z スキャナに印加している振動振幅波形(青)とカンチレバーのたわみ量の応答波形信号(緑)の一例. (c, d) マウス線維芽細胞の位相差画像. 赤枠は測定領域($30 \times 30 \mu\text{m}^2$ の範囲を 64×64 pixels)

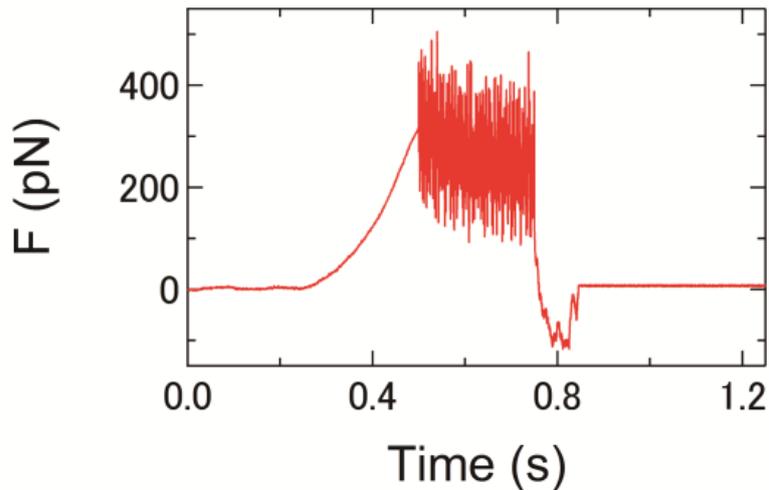


Fig. 4.2 多重周波数フォースモジュレーション法を用いた細胞測定におけるフォースカーブの時間変化

4.2.3 細胞の免疫染色

AFM 測定後、免疫染色によって細胞の核及び細胞骨格であるアクチンフィラメントと微小管を染色した。本研究ではアクチンフィラメントに特異的に結合するファロイジンを用いてアクチンフィラメントを染色した。微小管の染色には β -チューブリンに結合する一次抗体とその一次抗体に結合する蛍光分子で標識された二次抗体を用いた。細胞核の染色には退色防止剤に含まれている DAPI によって染色した。以下に詳細な手順を示す。

- ① AFM 測定後のガラス上細胞を PBS で3回洗浄を行う。
- ② 4%パラホルムアルデヒドで30分間固定処理を行う。
- ③ PBS で3回洗浄を行う。
- ④ PBS で0.02%希釈した Triton X-100で10分間膜透過性増加処理を行う。
- ⑤ PBS で3回洗浄を行う。
- ⑥ 1%BSA で30分間非特異的結合防止処理を行う。
- ⑦ PBS で3回洗浄を行う。
- ⑧ Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin で37°C 下で1時間アクチン染色を行う。
- ⑨ PBS で3回洗浄を行う。

- ⑩ モノクローナル β -チューブリン抗体を含んだ PBS で37°C下で1時間一次抗体処理を行う。
- ⑪ PBS で3回洗浄を行う
- ⑫ Alexa Fluor 568マウス由来ヤギ抗体で37°C下で1時間二次抗体処理を行う。
- ⑬ PBS で3回洗浄を行う
- ⑭ 蛍光退色防止剤である VECTASHIELD with DAPI(H-1000, Vector Laboratories)をスライドガラスに滴下し、カバーガラスを乗せて封入する。

蛍光観察は共焦点レーザー顕微鏡(C1, Nikon)を用いて行った。

4.3 結果と考察

4.3.1 細胞高さと言グ率像と蛍光染色画像

Fig. 4.3は、二つの細胞(cell#1, cell#2)の高さと見かけ上の言グ率 E のマッピング像と蛍光染色画像をそれぞれ示したものである。それぞれ高さと E は Fig. 4.2で示したフォースカーブから見積もられる。細胞の高さは細胞核の位置する中心部が高く、 E も細胞中心部に沿って増加している。また、cell#2の E 像では縦方向に並んだ構造が見られており、蛍光画像によるアクチンフィラメント構造と対応している。一方で、cell#1ではフィラメント構造は見られなかった。

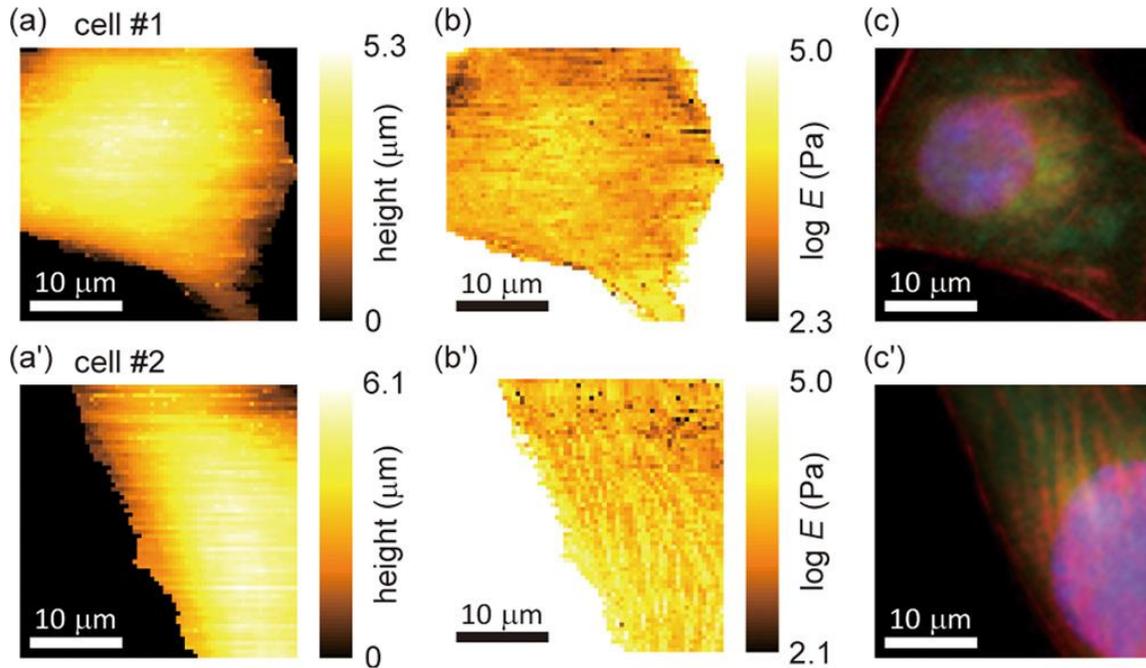


Fig. 4.3 NIH3T3細胞の高さ(a, a')とヤング率 E (b, b')のマッピング像と免疫染色画像(c, c'). 細胞核(青), アクチンフィラメント(赤), 微小管(緑).

4.3.2 各測定周波数における複素弾性率マッピング像

Fig. 4.4は各測定周波数における貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' のマッピング像を示している. 同じ測定周波数において, G' と G'' では空間分布が大きく異なることが明らかとなった. また, 各周波数での G' のマッピング像を見ると, 絶対値が周波数の増加に伴って増加しており, 一方で G'' のマッピング像においても絶対値は周波数の増加に伴って増加するが, 特に150 Hz 以上で急激な増加を示した. 更に G' の空間的なばらつきは周波数によってほとんど変化しなかったが, G'' では周波数の増加に伴って空間分布が均質になっていく傾向を示した(Fig. 4.5). Fabry らは細胞内部の骨格構造が異なる状況において, 高周波帯では G'' が収束する, つまり高周波帯における G'' は細胞骨格構造に依存しないということを示した[10]. 本研究で観察された周波数の増加に伴う G'' の空間的な力学不均一性の減少は, 細胞内部の骨格構造による影響が反映されなくなったために均質的に見えていると示唆される.

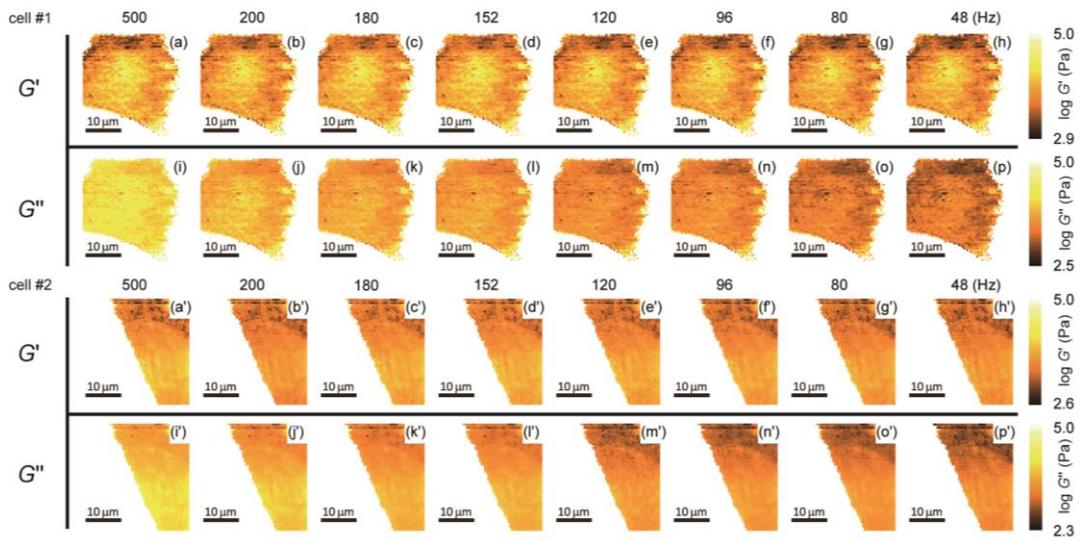


Fig. 4.4 NIH3T3細胞の貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' の各周波数マッピング像.

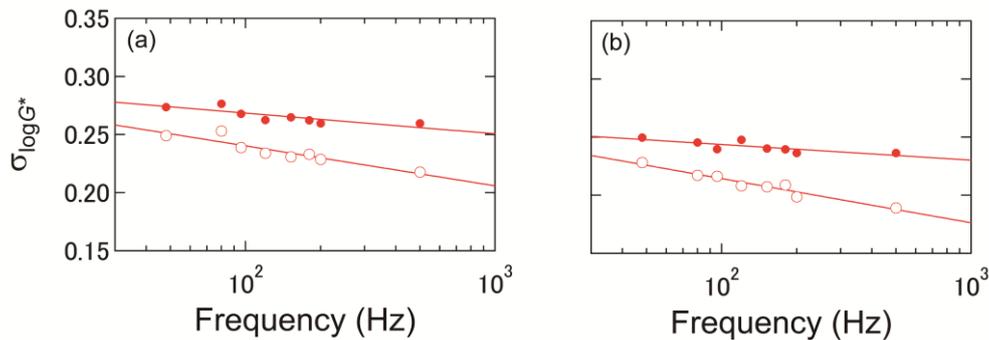


Fig. 4.5 貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' の標準偏差の周波数依存性.

4.3.3 レオロジーパラメータマッピング像

各測定点における複素弾性率の周波数依存性を(1.1),(1.2)式を用いて解析することで Fig.4.6に示すようなレオロジーパラメータ(G_0 , α , μ)のマッピング像が得られる. Fig. 4.3 (b, b')の E 像と比べると G_0 像は定量的に等価であった. 驚くことに, cell#1において α 像はヤング率像, G_0 像とは明らかに異なっており, 細胞核部で急激な減少が観察された. このような特徴的なマッピング像は, これまでのフォースカーブマッピング像や単一周波数フォースモジュレーションマッピング像では観察されておらず, α 像は細胞内部の構造についての情報を含んだものであることを示唆している. 一方で, cell#2では細胞内構造を反映したような分布は観察されず, 細胞核部では α が増加し

ている。 α の値は細胞骨格、特にアクチンフィラメントのリモデリングと密接に関連していると考えられている。本実験で見られた細胞核部での α の差異は、細胞間で細胞核上のアクチンフィラメントの動的な振る舞いが大きくばらつくことを示唆している。

μ 像と Fig. 4.3 (c, c') の蛍光染色像を見比べると、 μ が微小管の密度と関連していることが示唆された。微小管の密度が高い細胞核部では μ が大きく、微小管の密度が低い細胞核から離れた部分では μ が小さくなっている。この結果より密集した微小管ネットワークはニュートン粘性に起因する流動性に影響を与えていることが示唆される。

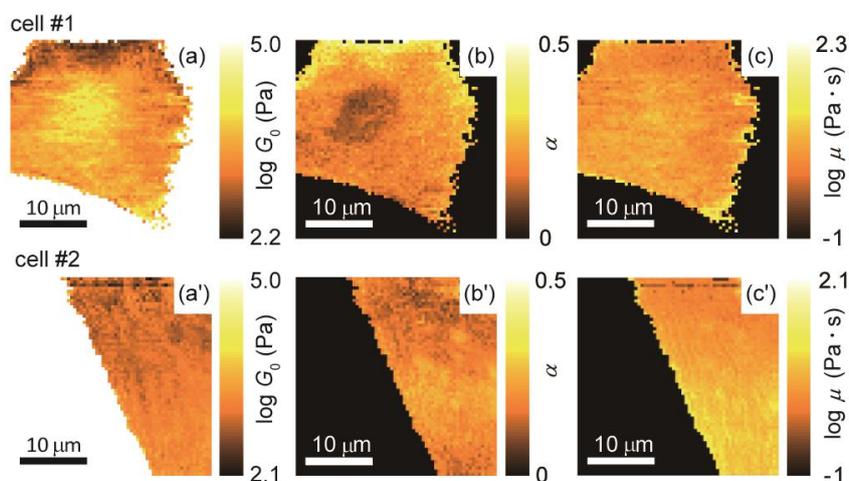


Fig. 4.6 NIH3T3細胞のレオロジーパラメータ G_0 , α , μ のマッピング像。

4.3.4 細胞核部と細胞核部以外でのレオロジー

レオロジーマッピング像によって細胞核部において特徴的な空間分布が観察された。そこで、細胞核部と細胞核部以外での平均複素弾性率をプロットしたものを Fig. 4.7 に示す。cell#1 と cell#2 では絶対値が大きく異なり、細胞間で複素弾性率が大きなばらつきを持つことを示している。更に $\log G_0$ と α でプロットすると cell#1 では細胞集団でも観察されていたような負の相関が見られたが、cell#2 ではそのような相関が見られなかった。これは $\log G_0$ と α における関係が単一細胞レベルでは必ずしも成立しないことを示唆している。

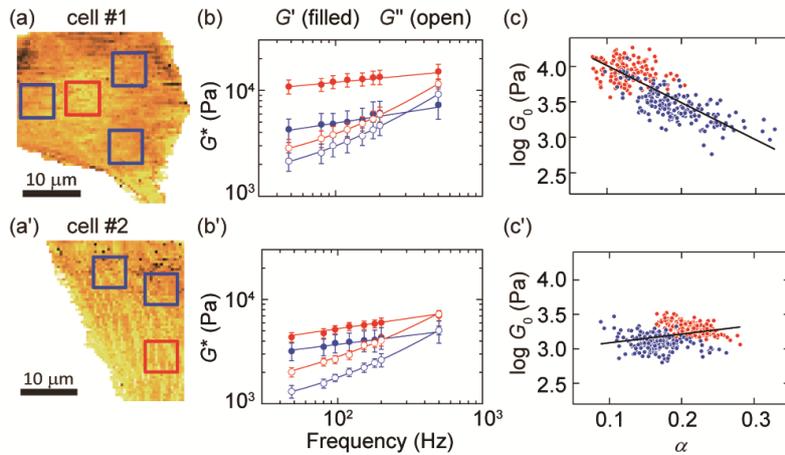


Fig. 4.7 (a) 各細胞ごとの細胞核領域(赤)と細胞核から離れた領域(青). (b) それぞれの領域での平均貯蔵弾性率 G' (●)と平均損失弾性率 G'' (○). 実線は式(1.1),(1.2)でフィットしたもの. (c) 各細胞での $\log G_0$ と α の関係. 実線は線形関数でフィットしたもの.

4.4 結論

本実験では多重周波数フォースモジュレーション法を用いて、細胞内レオロジーマッピング測定を行った。本実験で初めて広周波数帯域(50~500 Hz)における細胞の複素弾性率のマッピング像の周波数特性が示された。また、power-law structural damping model 式による解析によって、べき乗レオロジー変数のマッピング像が示され、弾性率 G_0 像において内部のアクチンフィラメント構造、粘性係数 μ 像において微小管とわずかに対応が観察された。また、べき指数 α の像において cell#1で内部の細胞核を反映しているような局所的な変化が見られた。しかしながら、一方で cell#2ではそのような内部構造を反映した変化は見られなかった。これらの結果より、個々の細胞でレオロジーの空間分布が大きく異なることがわかった。また、特に、これまでのフォースカーブマッピング測定や単一周波数フォースモジュレーションマッピング測定では示されていない変数であるべき指数 α の像が、特定の細胞の内部構造(細胞核)を強く反映することがわかった。このような細胞内部構造の可視化は、過去に超音波振動(MHz)を利用した SNUFM-AFM によって行われた。一方で、本研究では1kHz以

下の低い周波数でレオロジー変数から細胞の内部構造を可視化出来る可能性を示唆した. しかしながら, どのようなメカニズムで内部構造を可視化できているのかは未だ不明な点が多く, 今後, その解明が課題となるだろう.

第5章

周波数および時間領域の細胞レオロジーの比較

5.1 背景及び目的

AFMを用いた細胞レオロジー測定では、フォースモジュレーション法[12-15]による周波数領域測定のほか、応力緩和[30]・クリープ測定[30, 31]による時間領域測定も広く行われている。近年の研究によって細胞のせん断弾性率、緩和弾性率、クリープコンプライアンスがそれぞれ単一のべき関数に則ることが示されている[11, 30]。

HiratsukaらはAFMを用いて60 s程度の長時間領域で単一細胞の応力緩和・クリープ測定を行い、それぞれの測定から得られたべき指数が良い一致を示し、またそれらの値は周波数領域測定で得られた値と非常に近い値を示すことを明らかとした[30]。

周波数領域における細胞レオロジーと時間領域における細胞レオロジーはフーリエ変換の関係でつながっており、数学的に等価となる。しかしながら、これらを実験的に示した例は未だない。細胞レオロジーの時間領域測定においては、緩和挙動の観測時間を短くすることによって測定を高速化することができる。しかしながら、AFM時間領域測定において、観測時間を短くすることによる測定精度への影響は明らかとなっていない。そこで、本研究では多重周波数フォースモジュレーション法と応力緩和測定法の同時測定系を構築し、周波数および時間領域それぞれのレオロジー特性の比較を行うことを目的とする。

5.2 実験方法

5.2.1 細胞サンプル

本実験ではイヌ腎臓尿細管由来の上皮細胞であるMDCK (Mardin-Darby Canine Kidney)細胞を使用した。この細胞をFibronectinでコート処理を行ったカバーガラス上に 1.0×10^5 cells 播種し、37°C, 5%CO₂の環境下で48時間培養した。AFM測定を行う直前にPBSで洗浄を行った後に、CO₂-independent mediumを4 ml 加えたものを用いた。以下にMDCK細胞の培養手順を示す。

- ⑩ インキュベータから培養ディッシュを取り出しサブコンフルエントな状態であることを確認する.
- ⑪ ディッシュ内の培地をアスピレータで吸い取り, PBS 1 ml で3回洗浄する.
- ⑫ 0.25% Trypsin EDTA を1 ml 加えてインキュベータ内で3分間置く.
- ⑬ 10%FBS,1%ペニシリン/ストレプトマイシン, 1%NEAA(非必須アミノ酸)を含む MEM 培地(M4655,SIGMA)を3 ml 加えてピペッティングし, 遠沈管に移す.
- ⑭ 遠心分離機に入れ1000rpm で2分間遠心を行う. 底面に細胞を沈殿させるため, 遠沈管を180度回転させて, もう一度遠心を行う.
- ⑮ 遠心後の上澄み液をアスピレータで吸引し, MEM 1 ml を加えてピペッティングする.
- ⑯ 遠沈管から10 μ l 吸い取り, トリパンプルー20 μ l を入れたエッペンドルフチューブに移しピペッティングする.
- ⑰ エッペンドルフチューブから10 μ l 取り出し, 血球計算盤に入れて, 細胞数を数える.
- ⑱ 新しい60 mm ディッシュに2 ml の MEM を加えて, それぞれ 1×10^5 cells/dish となるように細胞数を調整した細胞懸濁液を播種し, インキュベータで培養する.

5.2.2 実験装置

本実験で用いた装置は AFM(MFP3D-Bio, Asylum Research), 倒立型光学顕微鏡(TE2000-E, Nikon), DAQ デバイス(USB-6259, National Instruments), ハイダイナミックレンジ DAQ デバイス(NI9234,National Instruments)で構成された. 本実験では応力緩和測定用に USB-6259を一台追加することで, カンチレバーのたわみ信号を連続的に測定することを可能とした.

また, 本実験ではコロイドプローブカンチレバーを用いた. コロイドプローブを用いることで, Hertz モデルへの近似がより正確に行える利点とともに, 細胞へのダメージを低減することができる. コロイドプローブカンチレバーは市販のカンチレバー(BL-AC40TS, Olympus)探針先端にエポキシ樹脂(ARALDITE, ニチバン)を用いて直径5 μ m のビーズを付着させて自作した. Fig. 5.1はカンチレバー先端にコロイドプローブを取り付けたものの画像である.

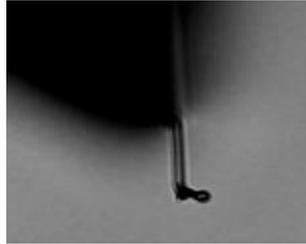


Fig. 5.1 BL-AC40TS 先端にコロイドプローブを取り付けた光学観察像.

5.2.3 実験方法

多重周波数フォースモジュレーション測定

本実験では多重周波数フォースモジュレーション測定における測定周波数はそれぞれの倍波を避けるように48, 80, 104, 120, 152, 180, 204, 504 Hzと設定した. それぞれの振幅は10 nmとした. 多重周波数フォースモジュレーション測定の詳細な手順は3.2.1に示す. 振幅及び位相のキャリブレーションは, 細胞のいないシャーレ表面上で行った.

応力緩和測定

本実験では応力緩和の挙動を計測するために, 近づけ動作~押し込み動作~退避動作を全て含めたフォースカーブの経時変化を2台目のDAQを用いて測定した(Fig. 5.2). AFMを用いた応力緩和測定では探針にトリガーとして設定した任意の荷重力がかかるまで押し込み, カンチレバー変位を一定に保ち, このときのカンチレバーたわみ信号の変化を時間の関数として計測する. 本実験では多重周波数フォースモジュレーション測定も同時に行うため, Fig.5.2で示すように緩和過程にモジュレーション信号が含まれてしまう. 緩和によるたわみ信号の変化のみを抽出するためにノッチフィルタでモジュレーション信号の周波数成分を除去した

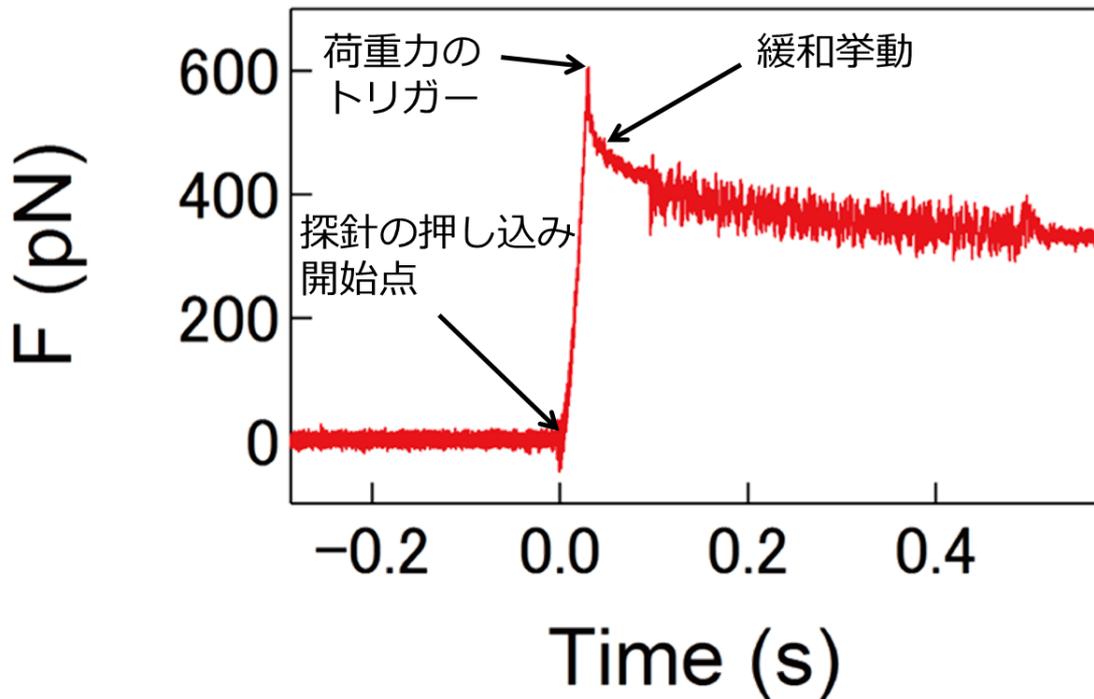


Fig. 5.2 多重周波数フォースモジュレーションと応力緩和法の同時測定におけるフォースカーブの時間変化

フォースマッピング測定

多重周波数フォースモジュレーション測定と応力緩和測定の同時マッピング測定は $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ の範囲を $48 \times 48 \text{ pixels}$ で行った. 測定は LabVIEW を用いた自作プログラムで行った. それぞれの測定点でのフォースカーブからヤング率 E_0 を算出した (Fig. 5.3).

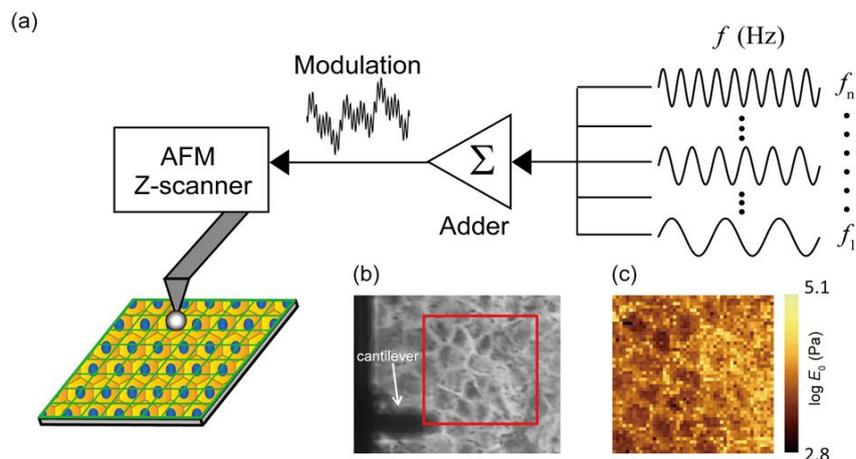


Fig. 5.3 (a) コンフルエント細胞上での多重周波数フォースモジュレーションマッピング測定の様式図. (b) MDCK 細胞の位相差画像. 赤枠は測定領域 ($90 \times 90 \mu\text{m}^2$ の範囲を 48×48 pixels). (c) 測定領域におけるヤング率 E_0 マッピング像.

5.2.4 データ解析

多重周波数フォースモジュレーション測定による各周波数の振幅と位相差の値は、LabVIEW の多重ロックインアンププログラムを用いて解析した. 得られた細胞複素弾性率の周波数特性は式(1.1),(1.2)を用いて解析され, 弾性率のスケールファクター G_0 , フォースモジュレーション法から算出されるべき指数 α_M を算出した.

また, 緩和弾性率の時間特性は式(2.16)を用いて解析され, g_0 は $t = 1\text{s}$ における緩和弾性率のスケールファクター, α_S は応力緩和カーブから算出されるべき指数である. 式(2.16)の第一項は AFM の応力緩和測定においては, 荷重力の印加と緩和挙動の測定開始の間に時間遅れが生じてしまうため, 見積もることが困難である. 従って, AFM の応力緩和測定では, 近似的に以下の式を用いた.

$$g(t) = g_0 t^{-\alpha_S} \quad (5.1)$$

これら周波数領域におけるレオロジー変数 G_0 , α_M と時間領域におけるレオロジー変数 g_0 , α_S は数学的に以下のような関係となる.

$$\frac{G_0}{(2\pi)^{\alpha_M}} = g_0 \quad (5.2)$$

$$\alpha_M = \alpha_S \quad (5.3)$$

Fig. 5.4 は、フォースカーブの経時変化の一例と応力緩和測定とフォースモジュレーション測定それぞれの解析領域を示したものである。1点当たりの測定時間は1 s 以下であり、荷重力のトリガーがかかった時間から多重周波数フォースモジュレーション測定の終わりまでの緩和挙動を解析に用いた。本実験の時間・周波数領域同時測定において、緩和弾性率、複素弾性率共に単一のべき関数に則ることを示した。

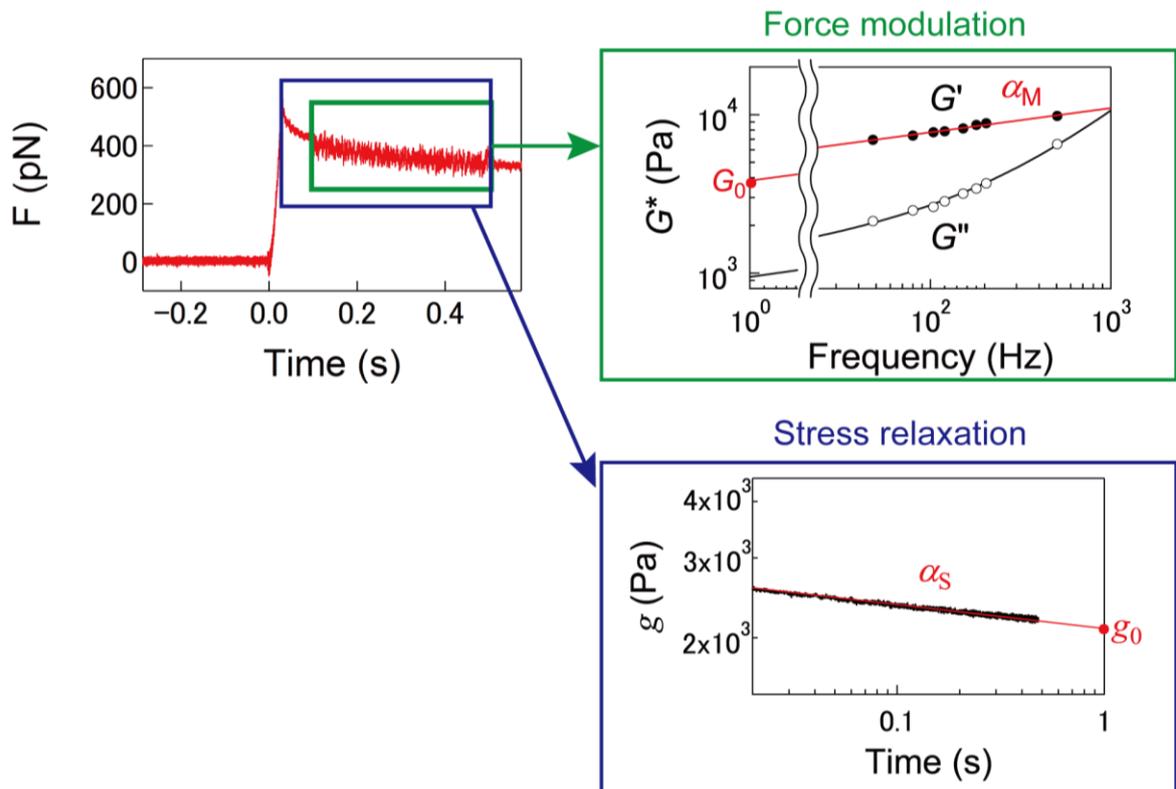


Fig. 5.4 応力緩和測定とフォースモジュレーション測定の同時測定におけるフォースカーブの経時変化の一例と解析に用いた領域をそれぞれ青枠、緑枠で示したものである。応力緩和のデータからは g_0 , α_S が算出され、フォースモジュレーションのデータからは G_0 , α_M が算出される。

5.3 結果と考察

5.3.1 周波数・時間領域でのべき指数 α_M と α_S の比較

理論上、べき指数 α_M と α_S は同じ値となる。そこで、これらの関係が満たされているかどうか比較を行った。Fig. 5.5はコンフルエント MDCK 細胞のマッピング測定によって得られた α_M と α_S の空間分布像である。両者の空間分布は細胞内領域で α が高く、細胞間領域では低くなるという傾向において良い一致を示している。しかしながら、画像内の白矢印で示したように細胞内領域において α_S が α_M より低い値を示しており、それによって α_M の空間分布像に比べて細胞間領域がはっきりとは示されていない。

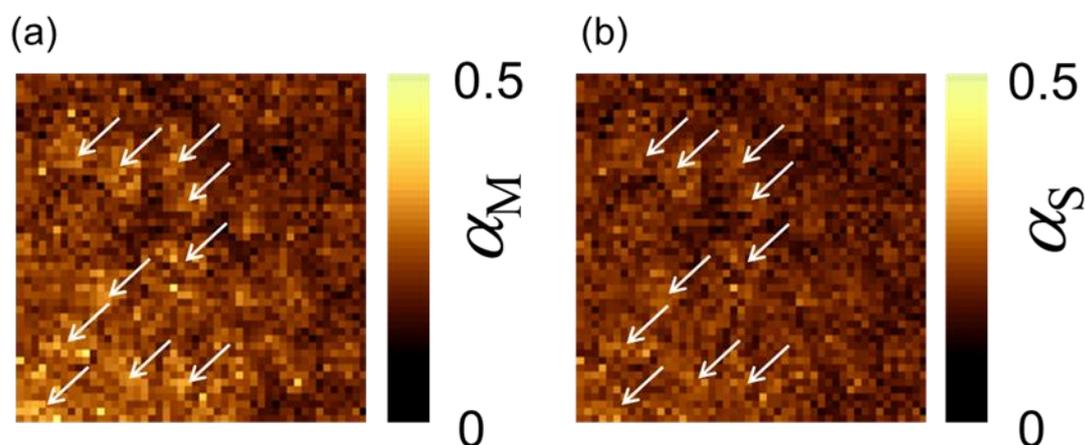


Fig. 5.5 応力緩和測定、フォースモジュレーション測定それぞれから算出されるべき指数 α_M , α_S のマッピング像。(a, b)内の矢印は α_S が α_M よりも低い細胞内の領域を示している。

5.3.2 細胞押し込みにかかる遅れ時間 t_L の影響

α_M と α_S の関係を定量化するために、同じ位置で測定された α_M 及び α_S をプロットしたものを Fig. 5.6に示す。 α が低い領域(およそ0.1程度)では α_M と α_S の値は同程度を示しているが、一方で α が高い領域ではほとんど全ての測定点で α_M が α_S よりも小さい値を示している。この結果は α_S が絶対値に依存して過小評価されていることを示唆している。その原因として AFM 時間領域測定において避けることの出来ない、トリガーがかかるまでの押し込みにかかっている時間の存在が考えられる。本研究では、押しこみ開始からトリガーがかかるまでの時間を遅れ時間 t_L と定義した(Fig. 5.7)。本実

験では t_L は 10-50 ms 程度であり、その長さは細胞の硬さや流動性に依存している。
 t_L が α_S の値にどのように影響するかを明らかにするために、理想的な緩和曲線を遅
 れ時間分ずらした場合に α の値がどのように見積られるかをシミュレートした。理想的
 な緩和曲線 $g_1(t)$ はフォースモジュレーション法から得られたパラメータ α_M と $G_0/(2\pi)^{\alpha_M}$
 の値をそれぞれ α_S と g_0 の値として式 (5.1) に代入することで作成した。作成した緩和
 曲線を時間 t_L 分だけずらした $g_2(t)$ を、再度式 (5.1) を用いてフィッティングすることで、
 遅れ時間による影響を考慮した値 α_T と g_T を算出した。Fig. 5.8 に示すように $g_2(t)$ は
 速い緩和領域 (~ 数 10 ms) では、べき挙動からずれており、長時間側の領域では元の
 $g_1(t)$ の緩和挙動と合うようになっていく様子が見られた。従って、時間領域測定では長
 時間側でのデータの解析が必要であると考えられる。

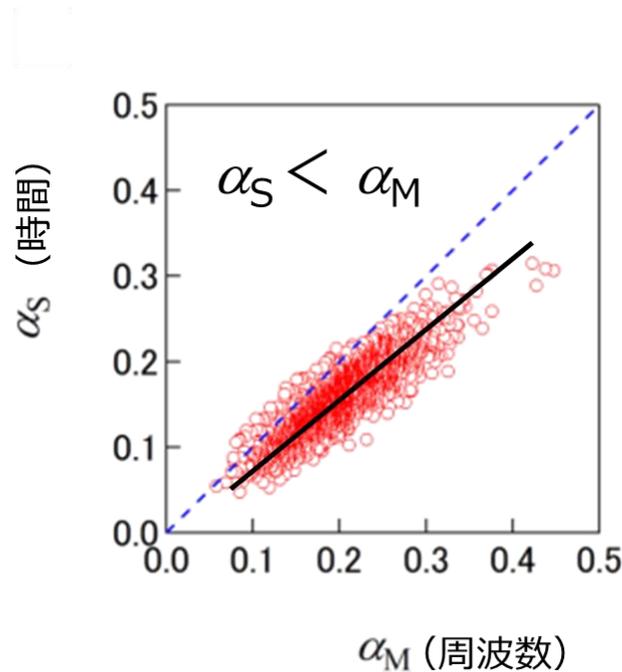


Fig. 5.6 α_M と α_S のプロット。青い点線は $\alpha_M = \alpha_S$ を示しており、黒い直線は線形フィ
 ットしたもの。

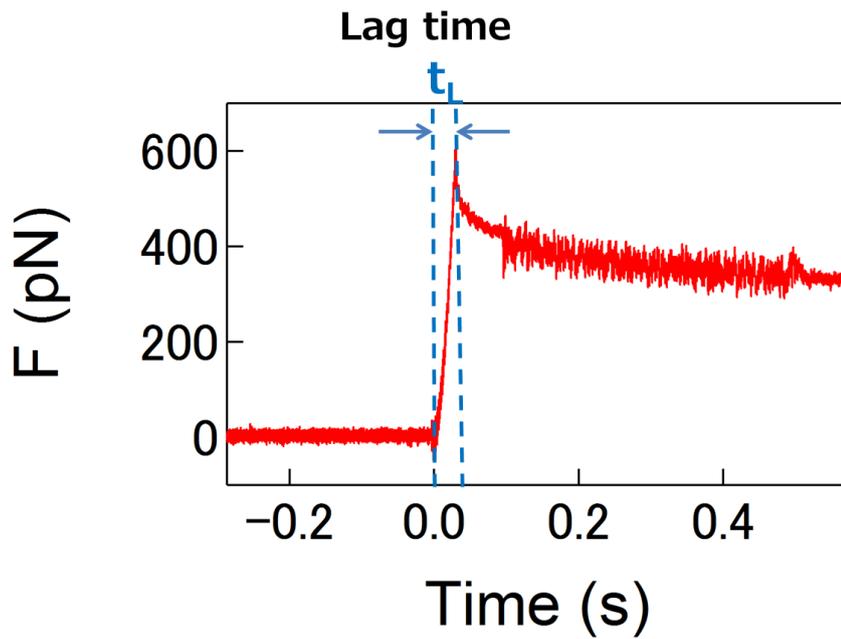


Fig. 5.7 フォースカーブ測定における遅れ時間 t_L

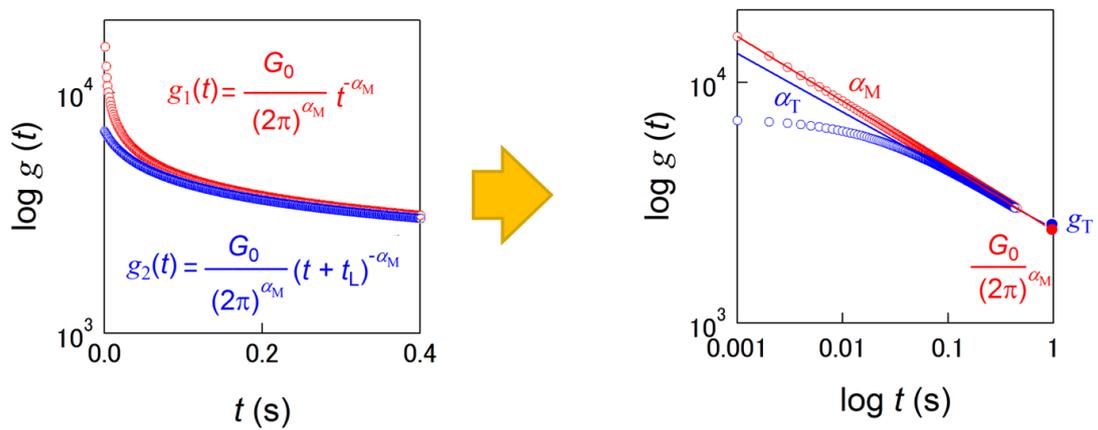


Fig. 5.8 周波数領域測定から算出された G_0 , α_M の値を式(5.1)の g_0 , α_S に代入して作成した緩和曲線 $g_1(t)$ を遅れ時間 t_L だけずらした $g_2(t)$ を再度式(5.1) でフィッティングすることで遅れ時間を考慮した g_T , α_T を算出した。

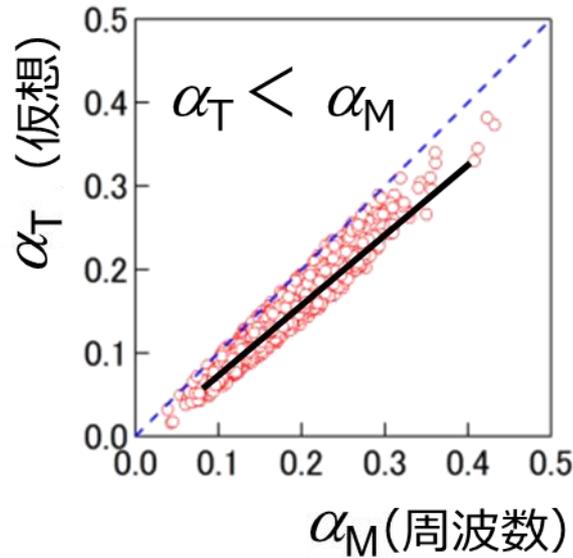


Fig. 5.9 α_M と α_T のプロット. 青い点線は $\alpha_M = \alpha_T$ を示しており, 黒い直線は線形フィットしたもの.

Fig. 5.9 は明確に $\alpha_T < \alpha_M$ であることを示しており, 遅れ時間 t_L が α_S の過小見積りの主要な役割を担っていることを示唆している. また, Fig. 5.6と比べると α_T と α_M の差は α の絶対値に依存せず収束している. これは α_S の大きなばらつきは t_L のばらつきを反映しているものだと考えられる. なぜならば, 前述したように t_L は細胞の流動性や硬さに依存しているため, 同程度の α_M の値を示す細胞でも異なる t_L を示すからである. しかしながら, α_S と α_M 間での大きな差は単なる遅れ時間の存在だけでは説明できない. 本実験のシミュレーションでは, 遅れ時間の中に起こっているボルツマンの重畳原理で考えられる多重緩和過程を除外しているが, より正確に α_S の値を見積もるためには, 遅れ時間中の応力緩和過程のモデル化も必要と考えられる.

5.3.3 周波数・時間領域での弾性率 $G_0/(2\pi)^{\alpha_M}$ と g_0 の比較

前節では周波数・時間領域でのべき指数の差異について言及したが、弾性率のスケール因子 $G_0/(2\pi)^{\alpha_M}$ と g_0 はどのような差となるかを Fig. 5.10(a) に示す。ほとんど全てのデータにおいて $g_0 < G_0/(2\pi)^{\alpha_M}$ となることを示した。更に、その差は $G_0/(2\pi)^{\alpha_M}$ の絶対値が低いところで僅かに増加している傾向が見られた。前述の Fig. 5.6 では α_S は絶対値が大きいところで過小見積もりされていた。過去の研究でべき指数は弾性率と負の相関となることが明らかとなっている[14]。これらの結果より、 g_0 の過大見積もりは α_S の過小見積もりによって起こっていることが示唆された。実際に Fig. 5.10(b) は明確に $g_T > G_0/(2\pi)^{\alpha_M}$ となることを示しており、 g_0 の過大見積もりが主に α_S の過小見積もりによるものであることを示している。

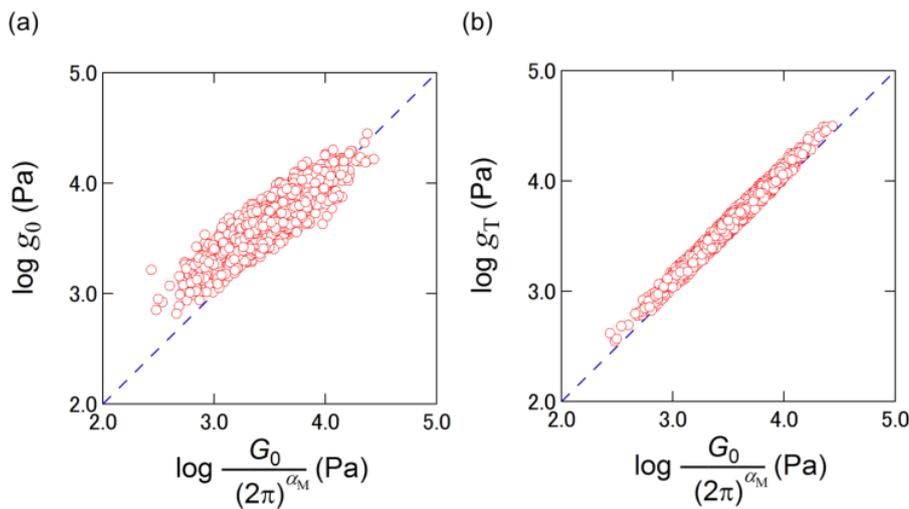


Fig. 5.10 (a) g_0 と $G_0/(2\pi)^{\alpha_M}$ のプロット. (b) g_T と $G_0/(2\pi)^{\alpha_M}$ のプロット. 点線はそれぞれ $g_0 = G_0/(2\pi)^{\alpha_M}$, $g_T = G_0/(2\pi)^{\alpha_M}$ を示している。

次に G_0 と g_0 のマッピング像を Fig. 5.11 に示す。 g_0 の過大見積もりによって g_0 像のコントラストは G_0 像と比べ低くなっている。しかしながら、 G_0 像、 g_0 像共に特徴的な空間分布は共通しており、像の左側では細胞一個単位がはっきりと認識できるが、右側では単一細胞レベルでの空間不均一性が見られなかった。本実験ではこのような弾性率が空間的に異なる像が得られたが、細胞の弾性率を空間的に制御しているメカニズムについては未だ明らかとなっていない。

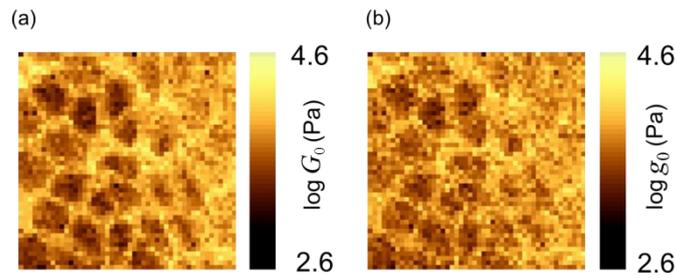


Fig. 5.11 応力緩和測定, フォースモジュレーション測定それぞれから算出される弾性率(a) G_0 と(b) g_0 のマッピング像.

5.4 結論

本実験では, 多重周波数フォースモジュレーション測定法と応力緩和測定との同時測定系を構築し, 周波数領域と時間領域それぞれのレオロジー特性を比較した. AFM 時間領域測定においては遅れ時間の存在によって, 時間領域でのべき指数が周波数領域に比べて過小見積もりされること, それによって弾性率が過大評価されてしまうことを明らかとした. 本実験の応力緩和測定では $t < 1\text{s}$ のスケールで行ったが, 過去に細胞の応力緩和のべき的な挙動が 60 s といった長時間のスケールで周波数領域と同等に観測されることが示されている[30]. 遅れ時間の影響を最小にするためには, より長時間で緩和過程を測定する, あるいは遅れ時間自体を減らさなければならない. 前者はデータ数を増やすことでより精度の高いフィッティングにつながるが, 測定的高速化とは相反するものになってしまう. 後者は細胞への押し込みを高速化することで達成される. 本研究の結果から細胞レオロジー測定的高速化には周波数領域測定がより適している可能性があることが明らかとなった.

第6章

広範囲自動計測システムの開発

6.1 背景と目的

一般に広範囲操作可能とされている市販 AFM においても, 操作範囲は100 μm 程度である. そのため, 数100 μm から数 mm の領域に存在する多数の細胞を測定する場合, 手動で測定位置を何度も調整する必要があるため, 測定時間は冗長であった. 第3章で述べた多重周波数フォースモジュレーション法の開発によってフォースモジュレーション測定は高速化されたが, 多数細胞計測の高速化にはこの問題を解決する必要がある. 従って, AFM の高精度位置制御の機構を損なわずに広範囲計測を行うシステムの開発が求められる.

また, 細胞の力学物性には大きな個体差があり, その物性の平均と偏差は細胞種や細胞疾患の状態によって異なる[37]. 従って, 細胞力学物性の個体差を精密に定量化することは, 細胞疾患診断技術の確立に重要であると考えられる. 先行研究において AFM とマイクロアレイ基板を組み合わせることで細胞力学物性の統計的測定が行なわれた[14, 15, 30]. しかしながら, マイクロアレイ基板は連続したウェル構造となっているため, 隣接する細胞との力学的相互作用があり, 理想的な1細胞計測とは言い難い. また, 隣接するウェルへの細胞移動や伸展を完全に抑えることは出来ていなかった.

そこで本章では, (1) 多数細胞計測を高速化するために広範囲自動測定が可能な AFM 計測システムの開発, (2) 1細胞を透明基板上に孤立してパターン化出来るマイクロアレイ基板に代わる細胞培養基板の開発を目的とする. これらの装置系を用いて細胞間接触による細胞間レオロジーへの影響を定量的に評価する. 更に, 多重周波数フォースモジュレーション法を用いて, 本研究による細胞レオロジー測定の高速化を評価する.

6.2 実験方法

6.2.1 広範囲移動可能ステージの開発

多数の細胞を自動で計測するためには、既存の AFM 装置のスキヤナーの走査範囲 ($90\ \mu\text{m} \times 90\ \mu\text{m}$) では不十分である。そこで、AFM 装置の XY ステージに取り付けられている手動位置調整用マイクロメータ ($1.3\ \text{cm} \times 1.3\ \text{cm}$) にステッピングパルスモーター (CSA-UC28D, シナノケンシ) を接続することで広範囲なステージ移動を電動化した (Fig. 6.1)。

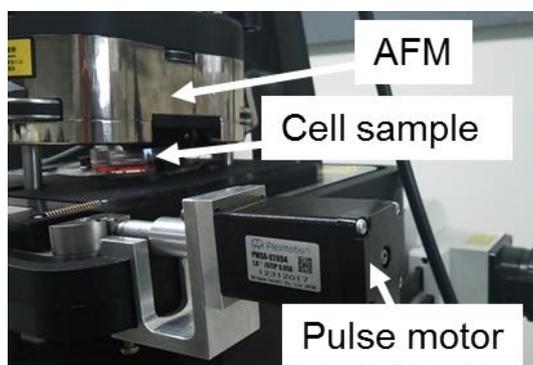


Fig. 6.1 AFM 装置のステージに取り付けたステッピングパルスモーターの写真。

ステッピングパルスモーターによる回転量を制御することでステージを $\text{nm} \sim \text{cm}$ オーダーで正確に動かすことが可能となる。しかしながら、実際にはステージの機械的ドリフトによって移動量は最大で数 μm オーダーの誤差を生じることがある。その誤差を補正するために既存のスキヤナーも同時に用いることで位置の微動制御を行った。移動量の誤差は移動前と移動後の画像を撮影し2値化したものを用いて、4つのガラス領域パターンの重心位置の変化から算出した (Fig. 6.2)。

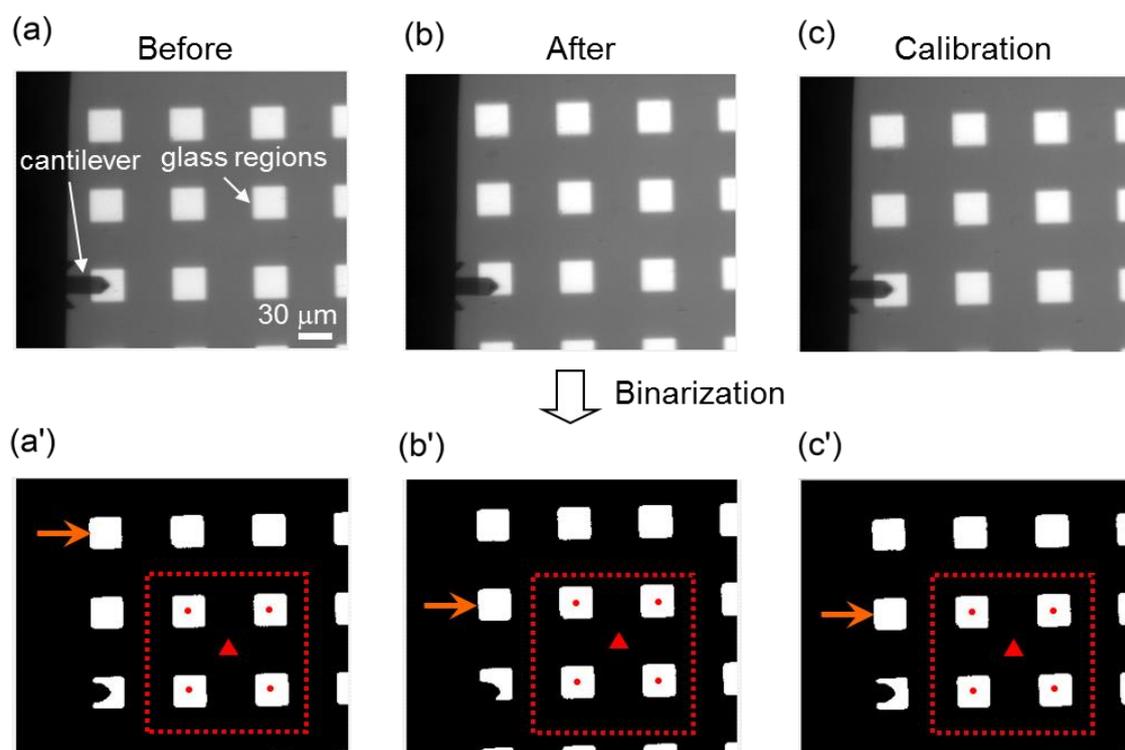


Fig. 6.2 移動量誤差の算出方法. (a-c) マイクロパターン基板のパルスモーターによるステージの(a)移動前, (b)移動後, (c)移動量誤差補正後の明視野像. (a'-c')それぞれの明視野像の二値化画像. 各画像内の矢印は同じガラス領域を示している. 各画像内の点線で囲んだ領域を ROI(関心領域)とし, 領域内に4つのガラス領域を持つ. 各ガラス領域の点は重心を示しており, 三角はその4点の重心を示している. 移動前後の三角のピクセル位置のずれを移動量誤差とし, XY スキャナで補正する.

6.2.2 マイクロパターン金基板

マイクロパターンニング技術は, 特定の形状を有する細胞外基質 (ECM) のパターンを基板上に作成することで細胞を任意の形状に成形することができる技術である. マイクロパターンニング技術にはマイクロコンタクトプリンティング法[58, 59], フォトリソグラフィパターンニング法[60, 61], ステンシルパターンニング法[62, 63]などがあり様々な材質の細胞接着基板と組み合わせて用いられている.

本研究ではフォトリソグラフィ法を用いてマイクロパターン金基板を作成した. ガラス上に微細なパターン形状を持つ金のコートを作り, 金表面に自己組織化単分子膜 (SAM: Self-Assembled Monolayer) を形成して, 細胞外基質を特異的に定着させる.

SAMとは、有機分子の末端基を金属基板に結合させることで自発的に形成される組織化された膜のことであり、有機分子の末端基によって様々な金属表面にSAM膜を形成する。末端基がチオール基・ジスルフィド基の場合は金、銀、銅、白金などが用いられる。本実験では広く用いられている金基板を採用した。薄膜蒸着装置はEBX-8C(ULVAC)を用いた。以下にその作製方法の詳細な手順を示す。

- ① ガラス基板をアセトン・IPA・超純水で満たしたビーカーに沈めそれぞれ3分間ずつ超音波洗浄する。
- ② 洗浄したガラス基板をビーカーに入れ、120°Cに熱したホットプレート上で1時間乾燥させる。
- ③ 薄膜蒸着装置のメインチャンバーの真空度が 1.0×10^{-4} Pa以下になっていることを確認する(装置内部の酸化反応を防ぐために非使用時は真空状態になっている)
- ④ タッチ操作画面の「リセット」を押してメインバルブを閉める
- ⑤ 「ベント」→「スタート」の順で押して、メインチャンバー内に窒素ボンベから窒素が流れるようになり、メインチャンバー内が大気圧になるまで待つ。
- ⑥ 試料台にガラスを乗せ、電子ビーム蒸着のターゲットがCrになっていることを確認する。
- ⑦ メインチャンバー内が大気圧になり開くようになったら試料台を蒸着器内にセットし、抵抗加熱蒸着のポートにAuを入れる。
- ⑧ 蒸着器を閉めて、「真空排気」→「スタート」の順で押して、メインチャンバー内の真空脱気を開始する。
- ⑨ メインチャンバー内の真空度が 3.0×10^{-4} Pa以下になったら、Crの蒸着を開始する。
- ⑩ EB蒸着メイン電源を入れて電圧とエミッション電流を調節して膜厚レートを $0.2 \sim 0.3 \text{ \AA}/\text{sec}$ に設定する。
- ⑪ レートが安定したら、膜厚が 0.05 k\AA に達するまでプレ蒸着を行う(プレ蒸着はCr表面についている汚れなどを基板につけないようにあらかじめ表面を蒸発させておくために行う)。

- ⑫ 膜厚計の表示をリセットし、蒸着器のシャッターを開け、膜厚が0.02kÅ に達するまで待ち、必要な膜厚に達したらシャッターを閉める。
- ⑬ EB 蒸着メイン電源を落として、チャンバー上部のホルダ回転レバーを回して抵抗加熱蒸着位置に試料台を移動させる。
- ⑭ 抵抗加熱蒸着装置を立ち上げ、電圧と電流を設定して膜厚レートを0.4~0.5Å/sec に設定する。
- ⑮ レートが安定したら膜厚が0.01kÅ に達するまでプレ蒸着を行う。
- ⑯ 膜厚計の表示をリセットし、蒸着器のシャッターを開け、膜厚が0.13kÅ に達するまで待ち、必要な膜厚に達したらシャッターを閉める。
- ⑰ チャンバー内部の温度が十分に下がるまで30分間程度待ち、再度チャンバー内部に窒素を通して大気圧にしたら試料台を取り出す。
- ⑱ 試料台を取り出した後は再度「真空脱気」を行い、内部を真空状態にしておく。

次に、フォトリソグラフィを行う上で特異的に紫外線を照射するために必要なフォトマスクについて述べる。フォトマスクとは、ガラス基板上に Cr を蒸着させたもので、これに EB レジストを塗布し、CAD で作成したパターンの描画データを電子線描画装置で書き込む。その後、現像液とリンス液で処理し、電子線が照射された部分のレジストを除去する。最後に Cr エッチャント液で Cr を削ることでレジストが除去された部分のみガラスが露出する。このフォトマスク越しに紫外線を照射することでガラス部分のみが紫外線を通すようになる。電子線描画装置は ELS-3000 (ELIONIX) を使用した。以下にその作成方法の詳細な手順を示す。

- ① EB レジストは冷蔵庫内に保存されているので使用前に冷蔵庫から取り出し室温に戻しておく(冷えた状態で開けると内部に水滴が付き EB レジストが使用できなくなってしまう)。
- ② Cr を蒸着させたガラスを窒素ブローして表面の埃を除去する。
- ③ スピンコータ (MA-S150 ミカサ) にセットして EB レジストを8割程度の面積に垂らす。
- ④ EB レジスト塗布用の回転数と時間でスピンコータを回転させる。

- ⑤ 185°Cのホットプレートで2分間ベイクしてレジストをマスクに定着させた後、室温になるまで冷ます。
- ⑥ CADを用いてマスクに描画するパターンを描く。
- ⑦ 描画装置内にEBレジストを塗布したマスクをセットし、真空ポンプを作動し、装置内お $3.0 \times 10^3 \text{Pa}$ 以下にする。
- ⑧ 描画装置のReadyランプが点灯したら、EBの照射設定(TILT, FOCUS, TRANS, 電流量)を行う。
- ⑨ 設定が完了したら、描画を行う。
- ⑩ EB描画が完了したら、現像液ZED-N50(日本ゼオン)入れたシャーレを22°Cに設定した恒温槽に入れ、EBレジストを塗布した面を上にしてマスクを5分浸す。
- ⑪ 現像が完了したら、リンス液ZMD-B(日本ゼオン)に30秒間浸すことで現像液を除去し、窒素ブローで乾かす。
- ⑫ 135°Cのホットプレートで2分間ベイクすることで水分を飛ばすことと同時にマスクとレジストとの密着度を上げる。
- ⑬ マスクをクロムエッチング溶液に浸して超音波洗浄を70秒間行う。
- ⑭ 超純水にマスクを浸して超音波洗浄を70秒間行った後、窒素ブローで水分を飛ばす。
- ⑮ DMF, アセトン, IPAの順にそれぞれ3分間ずつ超音波洗浄をかけ、EBレジストを除去する。
- ⑯ 最後に95°Cのホットプレートで2分間ベイクし、水分を飛ばす。

次にフォトマスクを用いてCr/Au基板のエッチングを行う。以下にその詳細な手順を示す。

- ① フォトレジスト(OFPR-800 LB, 東京応化工業)を冷蔵庫から取り出し室温に戻しておく。
- ② 作成したCr・Au蒸着基板をスピコータにセットし、フォトレジストを8割程度の面積に垂らす。
- ③ フォトレジスト塗布用の回転数と時間でスピコータを回転させ、フォトレジストを基

板上に均一に塗布させる。

- ④ 110°Cのホットプレートで1分30秒間ベイクする。
- ⑤ 基板とクロムマスクを光リソグラフィー装置(MA6)にセットし、クロムマスク越しに紫外線を3秒間照射する。
- ⑥ 基板を現像液(NMD-3, 東京応化工業)に1分間浸し、紫外線照射によって変性したフォトレジストを除去する。
- ⑦ 基板を金エッチング溶液(Gold-etchant TFA, Transene Co.)に6秒間浸し、露出した Au 薄膜領域をエッチングする。
- ⑧ 超純水でリンスする。
- ⑨ 更に Cr エッチング溶液(硝酸二アンモニウムセリウム(IV)と過塩素酸(60%)の混合液, 関東化学)に10秒間浸し、露出した Cr 薄膜領域をエッチングする。
- ⑩ 超純水でリンスする
- ⑪ 90°Cに温めた剥離液に基板を5分間浸して、フォトレジストを除去する。
- ⑫ 剥離液・IPA・超純水の順に5分間ずつ超音波洗浄を行う。

最後に、細胞を特異的な領域に接着させるための SAM 膜の形成について述べる。本研究では SAM 膜の形成に、末端基に親水基を持つヘキサエチレングリコール(EG6, 同仁化学)を用いた。従って、金薄膜表面には親水基膜が形成されるため、細胞や細胞外基質がガラス領域のみに接着するようになる。Fig. 6.3に SAM 膜の形成と細胞外基質のコーティングの詳細な手順を示す。

- ① オゾンクリーナーで金基板を洗浄する。
- ② EG6を溶解させた特級アルコール(濃度0.25 µg/ml)に金基板を浸し、一晩静置する。
- ③ 特級アルコール・超純水・PBS の順で基板を洗浄した後、PBS に溶解させたフィブロネクチン(濃度20 µg/ml)を基板上に滴下し、常温で30分間静置する。
- ④ アスピレーターでフィブロネクチン溶液を吸い取り、PBS で洗浄後細胞を播種する。

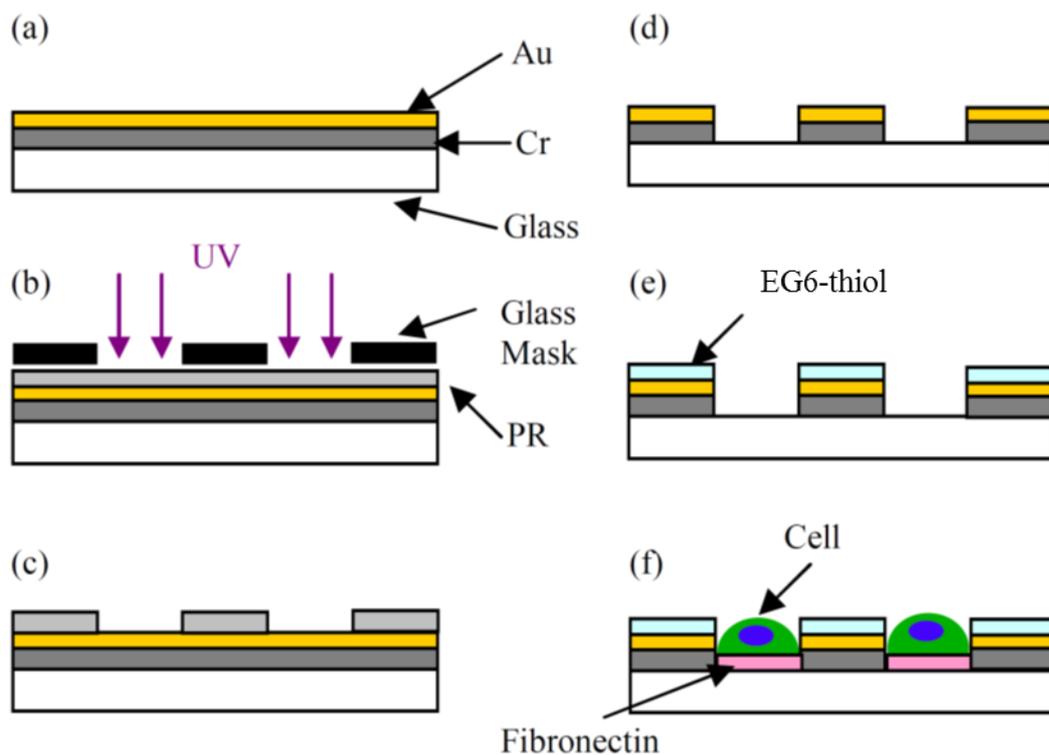


Fig. 6.3 マイクロパターン金基板作製フロー図. (a)ガラスに Cr と Au の層をそれぞれ 3 nm, 25nm の厚さに蒸着する. (b)フォトレジストを表面に塗布し, 作成したいパターンのガラスマスクを通して UV で暴露する. (c)残ったフォトレジストを現像する. (d)Au と Cr をそれぞれエッチングする. (e)金が残っている領域に自己組織化単分子膜を作るために EG6 溶液に基板を浸す. (f)ガラスが露出している領域にのみ Fibronectin がコートされ, 細胞が接着する.

6.2.3 細胞培養およびサンプル作成

本実験ではマウス胎児性由来線維芽細胞 (NIH3T3) を用いて実験を行った. NIH3T3細胞の培養手順は4.2.1に示す.

本実験ではマイクロパターン金基板上に NIH3T3細胞を 5.0×10^4 cells/ml の濃度で播種した. 播種して3時間後に接着しなかった細胞を washout して培地交換を行い, 播種後8時間後のものを測定に用いた. Fig.6.4に金基板上に播種した NIH3T3細胞を示す. マイクロパターンのサイズは $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ とした.

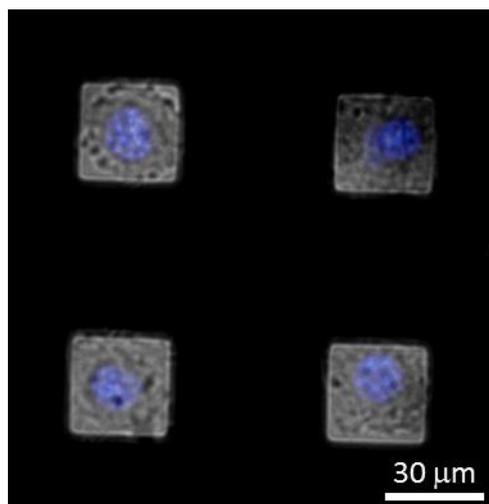


Fig. 6.4 金基板上に播種した NIH3T3細胞の微分干渉像と細胞核染色像の重ねあわせ像.

6.2.4 実験装置と測定

ステッピングモーターによる広範囲ステージ移動, 画像処理による移動量誤差算出, スキャナーによる位置補正, AFM によるフォースモジュレーション測定は LabVIEW の自作プログラムによって行われた.

本研究で用いた装置は AFM (MFP3D-Bio, Asylum Research), 倒立型光学顕微鏡 (TE-2000E, Nikon), ピエゾ, パルスモーターの制御とピエゾ位置, たわみ量信号取得のために DAQ デバイス (USB-6259, National Instruments), 振動振幅印加にファンクションジェネレータ (WF1946, nF Corp.), 応答波形の振動振幅の変化と応答波形と振動波形の位相差を検出するためにロックインアンプ (7260, EG&G Instruments) を組み合わせて使用した. 本実験の測定周波数は 10, 50, 150 Hz とし, それぞれ振動振幅は 10 nm とした. ファンクションジェネレータの振幅電圧, 振幅周波数の変更とロックインアンプの時定数の変更は, LabVIEW によって GPIB 制御で行われた.

カンチレバーは第5章と同様に直径 5 μm のシリカビーズ (Funakoshi) をカンチレバー (BL-AC40TS, Olympus) 先端にエポキシ系接着剤で取り付けたものを使用した. コロイドプローブの詳細な作成方法は 5.2.2 に示す.

以下に測定手順のフローチャートと模式図 (Fig. 6.5) を AFM 測定装置全体の模式図 (Fig. 6.6) を示す. また, 本章では周波数掃引フォースモジュレーション法による測定

結果と多重周波数フォースモジュレーション法による測定結果をそれぞれ示す。

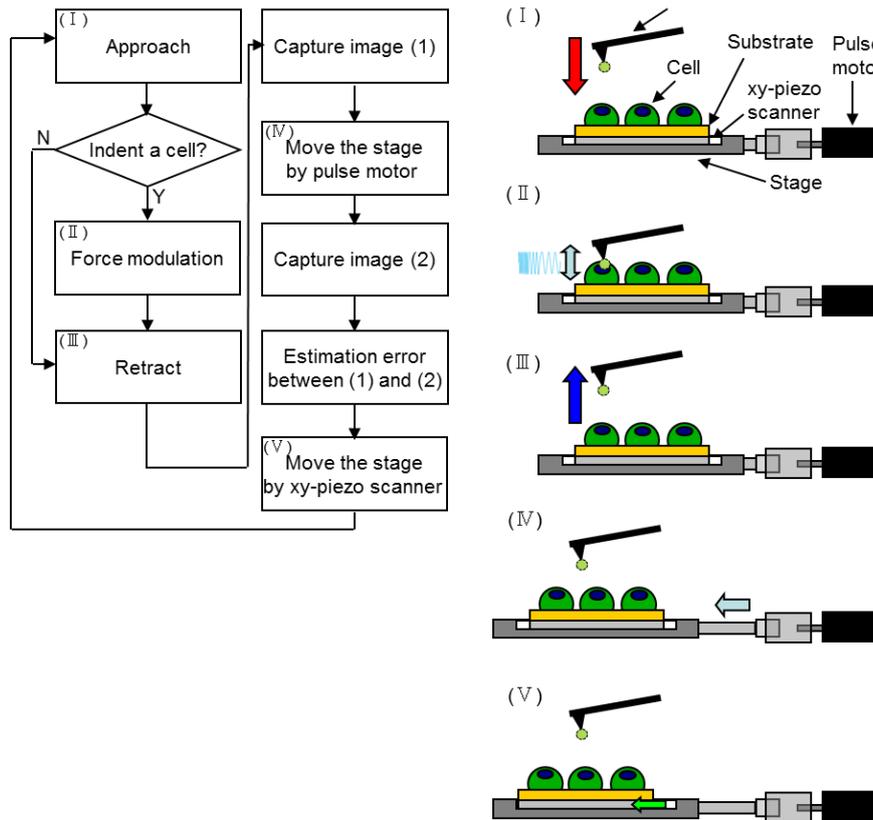


Fig. 6.5 (左) AFM 測定のプロックダイアグラムと(右) 模式図.

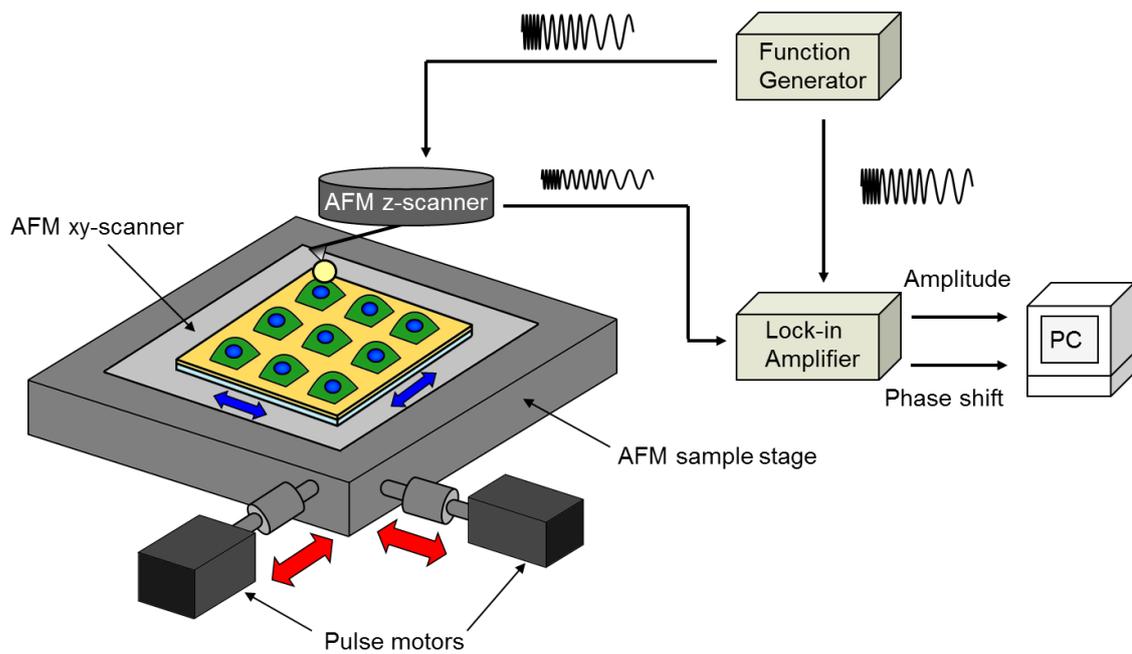


Fig. 6.6 AFM 装置の模式図.

6.2.5 データ解析

本実験で測定された各周波数の振幅と位相差の値は, 150 Hz, 50Hz では3s, 10 Hz では5s 間のデータの平均値をそれぞれの値とした. 細胞の複素弾性率 G^* は power-law structural damping model の式(1.1)(1.2)によって解析され, レオロジーパラメータ G_0, α, μ をそれぞれ算出した.

6.3 結果と考察

6.3.1 マイクロパターン上細胞の複素弾性率の細胞数分布

Fig. 6.7に異なる測定周波数におけるパターン上細胞の貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' を示す. それぞれの分布は対数正規分布に則り, 周波数の増加に伴って幾何平均の値は増加した. このような振る舞いは細胞間接触があるマイクロアレイでの測定において見られたものと同様であった[13, 14]. 細胞の弾性率は細胞骨格の一つであるアクチンネットワークと密接に関連しており[20, 64], 本実験でもアクチンの重合阻害剤である cytochalasinD(cytoD)を2 μm 投与することによって弾性率が劇的に減少した. 更に G' では cytoD の投与によってばらつきが大きく減少した, 一方で G'' では有意差は見られなかった.

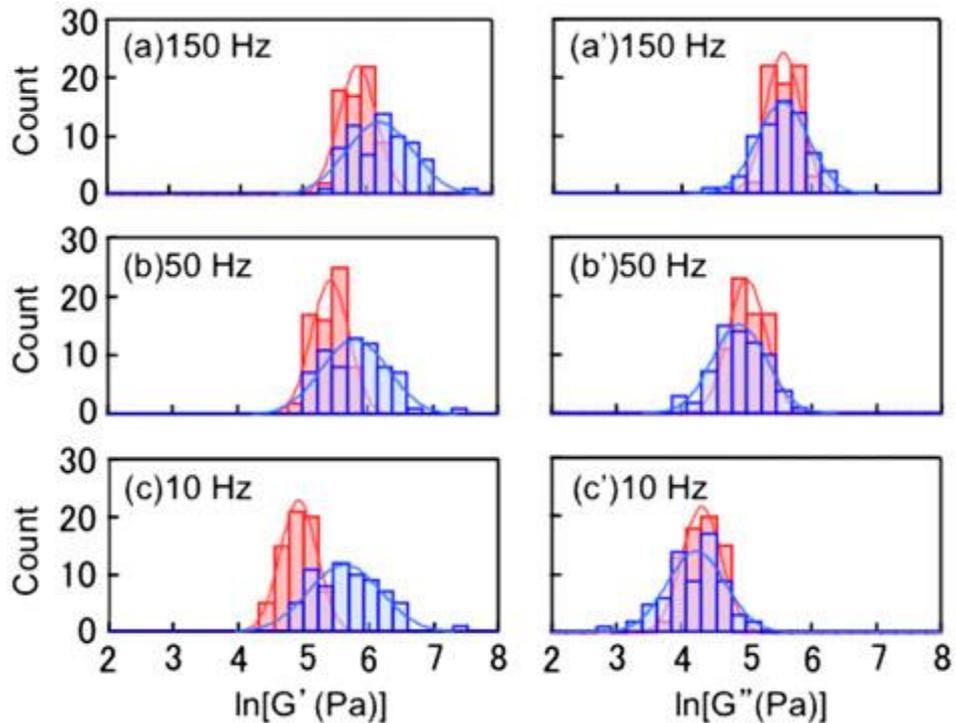


Fig. 6.7 ControlとcytoD処理後の細胞の各周波数での貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' の細胞数分布. 実線は対数正規分布関数でフィッティングしたもの.

6.3.2 マイクロパターン上細胞の複素弾性率の周波数特性

Fig. 6.8に平均貯蔵弾性率の周波数依存性を示す. 貯蔵弾性率は structural damping 式に則って増加した. アクチンの重合阻害によって弾性率のスケール因子 G_0 は138.4 Pa から46.37 Pa まで減少し, 一方でべき指数 α は0.23から0.36まで増加した. これらのアクチンネットワーク構造変化による弾性率の周波数特性の変化は過去の報告と同様のものではあった. control と cytoD での G' をそれぞれ外挿した直線の交点は G' が 1.0×10^3 Pa であり f が 4.73×10^3 Hz であった.

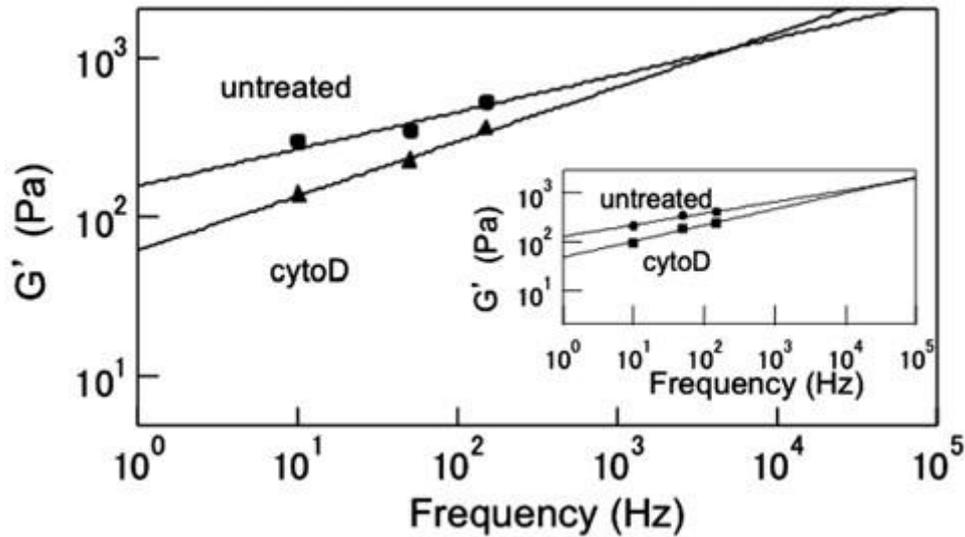


Fig. 6.8 Control(●)と cytoD 処理後(▲)のマイクロパターン基板上細胞の平均貯蔵弾性率の周波数依存性. 挿し込み図はマイクロアレイ基板上細胞で測定されたもの. 実線は式(1.1)でフィッティングしたもの.

先行研究において、細胞にどのような薬剤処理を施したかに関わらず、同種の細胞で同じ測定方法であれば、これらの外挿直線はある固有の点で結ばれることが明らかになっている[10, 11]. 本実験では細胞間接触の有無が交点の位置に依存するかどうかを明らかにするために、マイクロアレイ上での細胞測定の結果と比較した. マイクロアレイ上細胞で測定された交点は G' が 1.0×10^3 Pa であり f が 4.87×10^4 Hz であった. これらの値はマイクロパターン基板上細胞での測定で得られたものと近い値となった. これらの結果から AFM で測定される線維芽細胞のレオロジー特性において細胞間接触が大きな役割をしていないことを示した.

6.3.3 多重周波数フォースモジュレーションによる細胞レオロジー測定

本章で開発した多数細胞計測装置に第3章で開発した多重周波数フォースモジュレーション法を組み合わせることで、234個の細胞が20分間で測定された. Fig. 6.9に平均貯蔵弾性率の周波数依存性を示す. 過去の研究結果と同様に複素弾性率が対数正規分布に則ることが示されており、周波数の増加にともなって分布が鋭くなっていくことが示された.

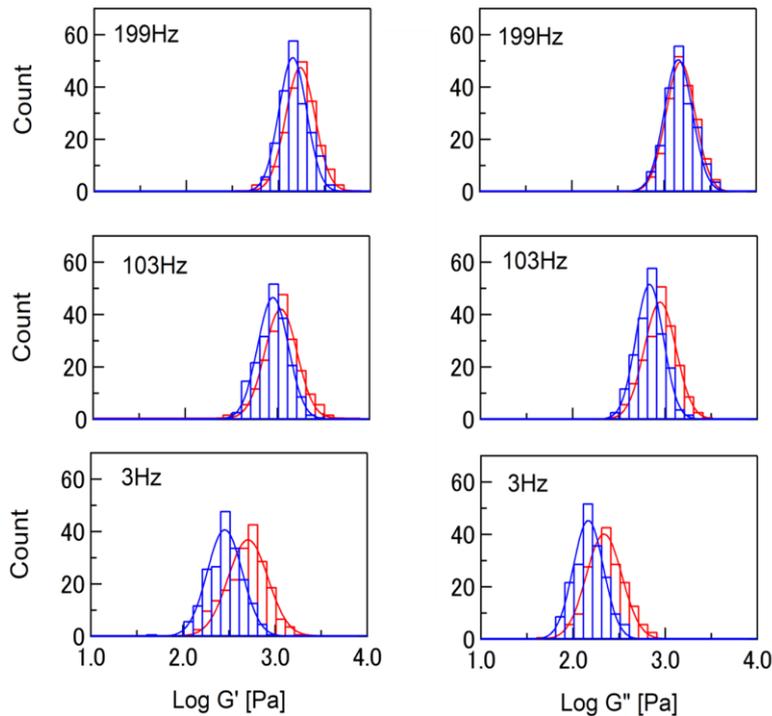


Fig. 6.9 NIH3T3細胞で、多重周波数フォースモジュレーション測定を行った時の異なる周波数の貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' の細胞数分布 ($N = 234$). 赤は control で青は cytoD 処理を行ったもの. 実線は対数正規でフィットしたもの.

平均複素弾性率の周波数依存性を Fig.6.10に示す. Power-law structural damping model によくフィットされていることが示され, 各測定毎のフィットによる G_0 , α , μ の細胞数分布を Fig. 6.11に示す. G_0 と μ が対数正規分布に則り, α が正規分布に則ることが示され, 細胞内部のアクチン骨格構造変化によるレオロジーの変化も示された. これらは過去の研究と良い一致を示している. したがって, 本研究によって構築された多数細胞計測系によって, 多数細胞レオロジーを短時間で測定することが可能であることが示された.

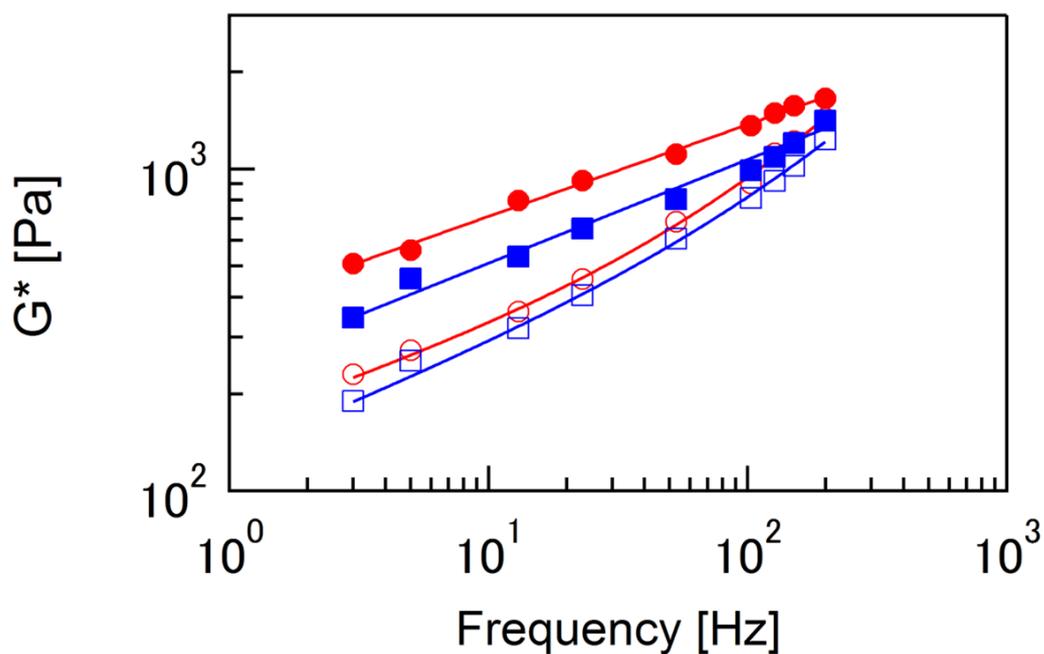


Fig. 6.10 NIH3T3細胞の平均貯蔵弾性率 G' (●)と平均損失弾性率 G'' (○)の周波数依存性. 赤は Control で青は CytoD 処理を行ったもの. 実線は式(1.1),(1.2)でフィットしたもの.

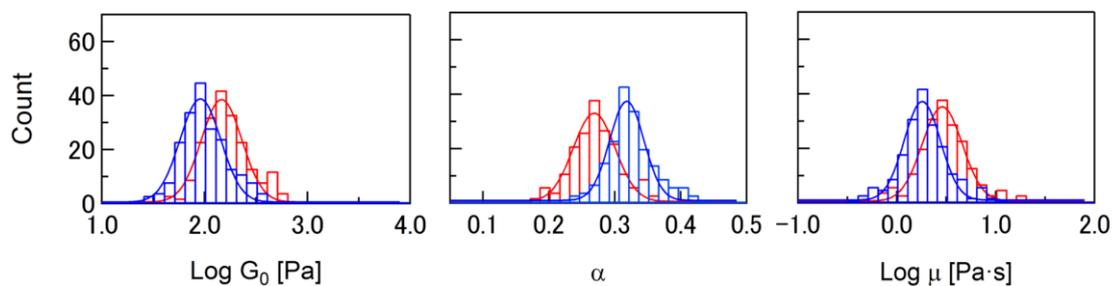


Fig. 6.11 NIH3T3細胞のレオロジーパラメータ G_0 , α , μ の細胞数分布. 赤は control で青は cytoD 処理を行ったもの. G_0 と μ は対数正規分布に則り, α は正規分布に則る.

6.4 結論

本章では(1) 多数細胞計測を高速化するために広範囲自動測定が可能な AFM 計測システムの開発, (2) 1細胞を透明基板上に孤立してパターン化出来るマイクロアレイ基板に代わる細胞培養基板の開発を行った. これらの技術開発によって, 多数の単一細胞レオロジーを自動測定することが可能となった. また, マイクロパターン基板上とマイクロアレイ基板上での細胞レオロジーを比較することで, 線維芽細胞において, 細胞間接触が個々の細胞レオロジー特性には大きな役割を持っていないことを示した. 更に, 多重周波数フォースモジュレーション法と組み合わせることで, 200個超の単一細胞を20分程で測定することができた. 過去の AFM 細胞レオロジー測定では, 同程度測定するためには数時間かかっていた. 本研究によって, 単一細胞レベルでの細胞疾患診断装置の開発を目指した多数単一細胞計測系の基礎が構築された.

第7章

結論

7.1 本研究の結語

細胞の力学特性が様々な細胞機能のメカニズムの解明や単一細胞疾患診断技術の確立につながるということが間接的な実験事実に基づいて指摘されつつある昨今の状況において、本研究では原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた細胞レオロジー測定を高速化する技術の開発を目的とした。そのための技術として従来の周波数掃引フォースモジュレーション法に代わる(1) 多重周波数フォースモジュレーション法を開発した。そして、(2) 多数細胞計測を高速化するために広範囲自動測定が可能な AFM 計測システムを開発した。また、先行研究で用いられたマイクロレイ基板は隣接する細胞間での接着や細胞運動制御が不完全なため、単一細胞計測として理想的ではなかった。そこで、(3) 1細胞を透明基板上に孤立してパターン化出来るマイクロレイ基板に代わる細胞培養基板を開発した。これらの技術開発によって、細胞内レオロジーマッピング測定、周波数領域および時間領域の細胞レオロジーの同時測定、多数の単一細胞レオロジー測定が可能となった。以下に本研究で得られた各章の結論を示す。

第3章では、フォースモジュレーション測定を高速化するために、多重周波数フォースモジュレーション法を開発を行った。全ての周波数成分を同時に計測できる多重周波数フォースモジュレーション法によって、単一周波数でのフォースモジュレーション測定と同程度の時間で細胞レオロジーが測定されることを示した。

第4章では、多重周波数フォースモジュレーション法とフォースマッピング法を用いて単一細胞内レオロジーマッピング測定を行った。本研究で初めて広周波帯域 (50~500 Hz) における複素弾性率のマッピング像の周波数特性が示された。更に power-law structural damping model 式による解析によって、レオロジーマッピング像が示され、細胞レオロジーの空間的な不均一性が個々の細胞で大きく異なることを明らかにした。また、特に、これまでのフォースカーブマッピング測定や単一周波数マッピング測定では示されていない変数であるべき指数像が特定の内部構造 (細胞核) を強く反映することを明らかとした。

第5章では、多重周波数フォースモジュレーション法と応力緩和測定の同時測定によって、短時間測定における周波数領域と時間領域それぞれのレオロジー特性を比較した。本研究によって、短い時間スケール(1 s 以下)での測定では時間領域におけるべき指数が周波数領域におけるべき指数に比べて過小見積もりされることを示した。また、その原因として AFM 測定の押し込み時にかかる遅れ時間が強く影響していることを示した。遅れ時間の影響を軽減するためには時間領域測定では長時間の観測によるデータの解析が必要であるが、周波数領域測定では遅れ時間の影響を受けないため、レオロジー測定的高速化には周波数領域測定がより適していると考えられる。

第6章では、(1) 多数細胞計測を高速化するために広範囲自動測定が可能な AFM 計測システムの開発、(2) 1細胞を透明基板上に孤立してパターン化出来るマイクロアレイ基板に代わる細胞培養基板の開発をそれぞれ行った。これらの技術開発によって、細胞間接触の有無による個々の細胞レオロジー特性への影響を定量的に示した。線維芽細胞において、細胞間接触によるレオロジー特性の変化は見られなかった。また、多重周波数フォースモジュレーション法を用いることで、200個超の細胞が20分程度で測定され、従来の AFM 細胞測定に比べ、十数倍の細胞数が高速に測定可能となった。本研究によって、単一細胞レベルでの細胞疾患診断装置の開発を目指した多数単一細胞計測系の基礎が構築された。

本研究で行われた(1)~(3)の技術開発によって、多数細胞計測、細胞内レオロジーマッピング測定を従前手法と比べて(数倍~数十倍)高速化することに成功した。多数細胞計測においては、これまで100個測定するのに1~2時間かかっていたのが、10分で測定出来るようになり、将来的に細胞疾患診断技術として、医工学分野への貢献が期待される。また、細胞内レオロジーマッピング測定的高速化によって、べき乗レオロジー変数から細胞内構造が可視化される可能性が示唆された。

7.2 今後の展望

本研究のレオロジー測定的高速化によって、細胞内レオロジーマッピング測定が可能となり、レオロジー変数が特定の細胞の内部構造を強く反映することがわかった。しかしながら現在のところ、どのような原理で細胞核構造を反映したレオロジー変数像が測定されたのかは未だ不明である。そこで、本研究で開発したマイクロパターン基

板を用いて細胞形状や内部骨格構造を制御することでより詳細に細胞内部構造とレオロジーの関係について明らかに出来ると考えられる。更に、細胞膜と細胞核の間に存在する骨格構造による力伝搬をモデル化することによって、本研究で観察された細胞核部での急激な流動性の変化の原因を明らかにすることが出来ると考えられる。

また、多重周波数フォースモジュレーション法によって従来の単一周波数フォースモジュレーションと同程度の測定時間で細胞レオロジーが測定可能となった。これまで、単一周波数フォースモジュレーション測定で行われてきた細胞運動などのゆっくりとした細胞変化のレオロジー特性を解明することが出来ると考えられる。

更に、多重周波数フォースモジュレーション法によるレオロジーマッピング測定は、今後より大きな組織や発生胚などへの広範囲マッピング測定への適用も考えられ、レオロジーと細胞機能との関係の解明にもつながることが期待される。

ここまでは現状の技術で可能であることを述べたが、今後より早い細胞変化(細胞分裂など)のレオロジー特性を解明するためには、更なる高速化が求められる。そのために現在 AFM イメージング測定で発展してきている高速 AFM のピエゾ走査の高速化技術などを本 AFM に採用することで、細胞レオロジー測定をより高速化することが出来ると考えられる。

参考文献

1. G. Bao and S. Suresh, *Cell and molecular mechanics of biological materials*. Nature Materials, 2003. **2**(11): p. 715-725.
2. N. Wang, J. D. Tytell, and D. E. Ingber, *Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009. **10**(1): p. 75-82.
3. D. T. Tambe, C. Corey Hardin, T. E. Angelini, K. Rajendran, C. Y. Park, X. Serra-Picamal, E. H. Zhou, M. H. Zaman, J. P. Butler, D. A. Weitz, J. J. Fredberg, and X. Trepat, *Collective cell guidance by cooperative intercellular forces*. Nature Materials, 2011. **10**(6): p. 469-475.
4. D. Stamenović and D. E. Ingber, *Models of cytoskeletal mechanics of adherent cells*. Biomechanics and modeling in mechanobiology, 2002. **1**(1): p. 95-108.
5. D. Stamenović and M. F. Coughlin, *The Role of Prestress and Architecture of the Cytoskeleton and Deformability of Cytoskeletal Filaments in Mechanics of Adherent Cells: a Quantitative Analysis*. Journal of Theoretical Biology, 1999. **201**(1): p. 63-74.
6. R. L. Satcher and C. F. Dewey, *Theoretical estimates of mechanical properties of the endothelial cell cytoskeleton*. Biophysical Journal, 1996. **71**(1): p. 109-118.
7. D. E. Ingber, *Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology*. Journal of cell science, 2003. **116**(7): p. 1157-1173.
8. C. T. Lim, E. H. Zhou, and S. T. Quek, *Mechanical models for living cells—a review*. Journal of Biomechanics, 2006. **39**(2): p. 195-216.
9. S. R. Heidemann, S. Kaeck, R. E. Buxbaum, and A. Matus, *Direct observations of the mechanical behaviors of the cytoskeleton in living fibroblasts*. The Journal of cell biology, 1999. **145**(1): p. 109-122.
10. B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, and J. J. Fredberg, *Scaling the Microrheology of Living Cells*. Physical Review Letters, 2001. **87**(14): p. 148102.
11. B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, and D. Navajas, *Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells*. Physical Review E, 2003. **68**: p. 041914.
12. B. A. Smith, B. Tolloczko, J. G. Martin, and P. Grütter, *Probing the Viscoelastic Behavior of Cultured Airway Smooth Muscle Cells with Atomic Force Microscopy: Stiffening Induced by Contractile Agonist*. Biophysical Journal, 2005. **88**(4): p. 2994-3007.
13. S. Hiratsuka, M. Yusuke, M. Tsuchiya, K. Kawahara, H. Tokumoto, and T. Okajima, *The number distribution of complex shear modulus of single cells measured by atomic force microscopy*. Ultramicroscopy, 2009. **109**(8): p. 937-941.
14. P. G. Cai, Y. Mizutani, M. Tsuchiya, John M. Maloney, B. Fabry, Krystyn J. Van Vliet, and T. Okajima, *Quantifying Cell-to-Cell Variation in Power-Law Rheology*. Biophysical Journal, 2013. **105**(5): p. 1093-1102.
15. P. G. Cai and T. Okajima, *Precision of cell-to-cell variation in power-law rheology characterized by atomic force microscopy*. Japanese Journal of Applied Physics, 2015. **54**(3): p. 037001.
16. M. R. Mackley, R. T. J. Marshall, J. B. A. F. Smeulders, and F. D. Zhao, *The rheological characterization of polymeric and colloidal fluids*. Chemical

- Engineering Science, 1994. **49**(16): p. 2551-2565.
17. S. Yamada, D. Wirtz, and S. C. Kuo, *Mechanics of Living Cells Measured by Laser Tracking Microrheology*. Biophysical Journal, 2000. **78**(4): p. 1736-1747.
 18. N. Desprat, A. GUIROY, and A. Asnacios, *Microplates-based rheometer for a single living cell*. Review of Scientific Instruments, 2006. **77**(5): p. 055111.
 19. R. Bernal, P. A. Pullarkat, and F. Melo, *Mechanical Properties of Axons*. Physical Review Letters, 2007. **99**(1): p. 018301.
 20. C. Y. Park, D. Tambe, A. M. Alencar, X. Trepate, E. H. Zhou, E. Millet, J. P. Butler, and J. J. Fredberg, *Mapping the cytoskeletal prestress*. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2010. **298**: p. 1245.
 21. G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, *Atomic Force Microscope*. Physical Review Letters, 1986. **56**(9): p. 930-933.
 22. L. Wilson, P. T. Matsudaira, B. P. Jena, and J. H. Horber, *Atomic force microscopy in cell biology*. Vol. 68. 2002, New York: Academic Press.
 23. V. J. Morris, A. R. Kirby, and A. P. Gunning, *Atomic force microscopy for biologists*. 2nd ed. 2009: Imperial College Press.
 24. A. Raman, S. Trigueros, A. Cartagena, A. P. Z. Stevenson, M. Susilo, E. Nauman, and S. A. Contera, *Mapping nanomechanical properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy*. Nature Nanotechnology, 2011. **6**(12): p. 809-814.
 25. A. Cartagena and A. Raman, *Local Viscoelastic Properties of Live Cells Investigated Using Dynamic and Quasi-Static Atomic Force Microscopy Methods*. Biophysical Journal, 2014. **106**(5): p. 1033-1043.
 26. L. Tetard, A. Passian, K. T. Venmar, R. M. Lynch, B. H. Voy, G. Shekhawat, V. P. Dravid, and T. Thundat, *Imaging nanoparticles in cells by nanomechanical holography*. Nature Nanotechnology, 2008. **3**(8): p. 501-505.
 27. R. Garcia and E. T. Herruzo, *The emergence of multifrequency force microscopy*. Nature nanotechnology, 2012. **7**(4): p. 217-226.
 28. T. Ando, *High-speed AFM imaging*. Current Opinion in Structural Biology, 2014. **28**: p. 63-68.
 29. E. A-Hassan, W. F. Heinz, M. D. Antonik, N. P. D'Costa, S. Nageswaran, C.-A. Schoenenberger, and J. H. Hoh, *Relative Microelastic Mapping of Living Cells by Atomic Force Microscopy*. Biophysical Journal, 1998. **74**(3): p. 1564-1578.
 30. S. Hiratsuka, Y. Mizutani, A. Toda, F. Norichika, K. Kawahara, H. Tokumoto, and T. Okajima, *Power-Law Stress and Creep Relaxations of Single Cells Measured by Colloidal Probe Atomic Force Microscopy*. Japanese Journal of Applied Physics, 2009. **48**(8S2): p. 08JB17.
 31. F. M. Hecht, J. Rheinlaender, N. Schierbaum, W. H. Goldmann, B. Fabry, and T. E. Schaffer, *Imaging viscoelastic properties of live cells by AFM: power-law rheology on the nanoscale*. Soft Matter, 2015. **11**(23): p. 4584-91.
 32. M. Nagayama, H. Haga, and K. Kawabata, *Drastic change of local stiffness distribution correlating to cell migration in living fibroblasts*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2001. **50**(4): p. 173-179.
 33. M. Radmacher, R. Tillmann, M. Fritz, and H. Gaub, *From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope*. Science, 1992. **257**(5078): p. 1900-1905.
 34. T. Igarashi, S. Fujinami, T. Nishi, N. Asao, Nakajima, and Ken, *Nanorheological mapping of rubbers by atomic force microscopy*. Macromolecules, 2013. **46**(5):

- p. 1916-1922.
35. H. K. Nguyen, M. Ito, S. Fujinami, and K. Nakajima, *Viscoelasticity of inhomogeneous polymers characterized by loss tangent measurements using atomic force microscopy*. *Macromolecules*, 2014. **47**(22): p. 7971-7977.
 36. J. Rother, H. Nöding, I. Mey, and A. Janshoff, *Atomic force microscopy-based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malignant and benign cell lines*. *Open Biology*, 2014. **4**(5).
 37. S. E. Cross, Y.-S. Jin, J. Rao, and J. K. Gimzewski, *Nanomechanical analysis of cells from cancer patients*. *Nature nanotechnology*, 2007. **2**(12): p. 780-783.
 38. E. A. Corbin, F. Kong, C. T. Lim, W. P. King, and R. Bashir, *Biophysical properties of human breast cancer cells measured using silicon MEMS resonators and atomic force microscopy*. *Lab on a Chip*, 2015. **15**(3): p. 839-847.
 39. J. Alcaraz, L. Buscemi, M. Grabulosa, X. Trepas, B. Fabry, R. Farré, and D. Navajas, *Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy*. *Biophysical Journal*, 2003. **84**(3): p. 2071-2079.
 40. R. E. Mahaffy, S. Park, E. Gerde, J. Käs, and C. K. Shih, *Quantitative Analysis of the Viscoelastic Properties of Thin Regions of Fibroblasts Using Atomic Force Microscopy*. *Biophysical Journal*, 2004. **86**(3): p. 1777-1793.
 41. P. Roca-Cusachs, J. Alcaraz, R. Sunyer, J. Samitier, R. Farré, and D. Navajas, *Micropatterning of single endothelial cell shape reveals a tight coupling between nuclear volume in G1 and proliferation*. *Biophysical journal*, 2008. **94**(12): p. 4984-4995.
 42. S. Alexander, L. Hellemans, O. Marti, J. Schneir, V. Elings, P. K. Hansma, M. Longmire, and J. Gurley, *An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever*. *Journal of Applied Physics*, 1989. **65**(1): p. 164-167.
 43. J. L. Hutter and J. Bechhoefer, *Calibration of atomic-force microscope tips*. *Review of Scientific Instruments*, 1993. **64**(7): p. 1868-1873.
 44. H. J. Butt and M. Jaschke, *Calculation of thermal noise in atomic force microscopy*. *Nanotechnology*, 1995. **6**(1): p. 1.
 45. L. D. Landau and E. M. Lifshitz, *Theory of elasticity*. 3rd ed. 1986, Oxford: Pergamon Press.
 46. I. N. Sneddon, *The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile*. *International Journal of Engineering Science*, 1965. **3**(1): p. 47-57.
 47. P. Roca-Cusachs, I. Almendros, R. Sunyer, N. Gavara, R. Farré, and D. Navajas, *Rheology of Passive and Adhesion-Activated Neutrophils Probed by Atomic Force Microscopy*. *Biophysical Journal*, 2006. **91**(9): p. 3508-3518.
 48. R. E. Mahaffy, C. K. Shih, F. C. MacKintosh, and J. Käs, *Scanning Probe-Based Frequency-Dependent Microrheology of Polymer Gels and Biological Cells*. *Physical Review Letters*, 2000. **85**(4): p. 880-883.
 49. R. Takahashi and T. Okajima, *Mapping power-law rheology of living cells using multi-frequency force modulation atomic force microscopy*. *Applied Physics Letters*, 2015. **107**(17): p. 173702.
 50. J. Alcaraz, L. Buscemi, M. Puig-de-Morales, J. Colchero, A. Baró, and D. Navajas, *Correction of Microrheological Measurements of Soft Samples with Atomic Force Microscopy for the Hydrodynamic Drag on the Cantilever*. *Langmuir*, 2002. **18**(3): p. 716-721.

51. M. Cécile and B. Jean-Philippe, *Models of traps and glass phenomenology*. Journal of Physics A: Mathematical and General, 1996. **29**(14): p. 3847.
52. P. Sollich, F. Lequeux, P. Hébraud, and M. Cates, *Rheology of soft glassy materials*. Physical Review Letters, 1997. **78**: p. 2020.
53. P. Sollich, *Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials*. Physical Review E, 1998. **58**: p. 738.
54. P. Kollmannsberger and B. Fabry, *Active soft glassy rheology of adherent cells*. Soft Matter, 2009. **5**: p. 1771.
55. C. Braunsmann, J. Seifert, J. Rheinlaender, and T. E. Schäffer, *High-speed force mapping on living cells with a small cantilever atomic force microscope*. Review of Scientific Instruments, 2014. **85**(7): p. 073703.
56. Y. F. Dufrene, D. Martinez-Martin, I. Medalsy, D. Alsteens, and D. J. Muller, *Multiparametric imaging of biological systems by force-distance curve-based AFM*. Nature Methods, 2013. **10**(9): p. 847-854.
57. C. Heu, A. Berquand, C. Elie-Caille, and L. Nicod, *Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a Peak Force Tapping study on living cells*. Journal of Structural Biology, 2012. **178**(1): p. 1-7.
58. R. Singhvi, A. Kumar, G. Lopez, G. Stephanopoulos, D. Wang, G. Whitesides, and D. Ingber, *Engineering cell shape and function*. Science, 1994. **264**(5159): p. 696-698.
59. M. Théry, A. Pépin, E. Dressaire, Y. Chen, and M. Bornens, *Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2006. **63**(6): p. 341-355.
60. S. N. Bhatia, M. L. Yarmush, and M. Toner, *Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: hepatocytes and 3T3 fibroblasts*. Journal of biomedical materials research, 1997. **34**(2): p. 189-199.
61. K. Kuribayashi, Y. Tsuda, H. Nakamura, and S. Takeuchi, *Micro-patterning of phosphorylcholine-based polymers in a microfluidic channel*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010. **149**(1): p. 177-183.
62. S. B. Carter, *Haptotactic islands: a method of confining single cells to study individual cell reactions and clone formation*. Experimental cell research, 1967. **48**(1): p. 189-193.
63. S. Selvarasah, S. Chao, C.-L. Chen, S. Sridhar, A. Busnaina, A. Khademhosseini, and M. Dokmeci, *A reusable high aspect ratio parylene-C shadow mask technology for diverse micropatterning applications*. Sensors and Actuators A: Physical, 2008. **145**: p. 306-315.
64. C. Rotsch and M. Radmacher, *Drug-Induced Changes of Cytoskeletal Structure and Mechanics in Fibroblasts: An Atomic Force Microscopy Study*. Biophysical Journal, 2000. **78**(1): p. 520-535.

謝辞

本研究は2013年4月より2016年9月にかけて、北海道大学大学院情報科学研究科細胞生物工学研究室において行われました。

本研究室、岡嶋孝治教授には本研究を遂行するに当たって、研究に対する姿勢や研究の進め方、学会発表、論文作成などの研究面だけでなく、日々の生活面においても多くのご指導、ご助言を頂きましたこと、心より感謝申し上げます。

北海道大学新渡戸スクールの繁富香織特任准教授には本研究を行うに当たり、微細加工基板技術の原理や作成手技について丁寧なご指導を頂いたこと、心より感謝申し上げます。

細胞生物工学研究室の皆様方には様々な面でご助言やご助力いただき、本論文を執筆することができました。この場を借りて感謝の意を述べさせていただきます。

最後に、細胞情報工学研究室の皆様、今後の多岐にわたるご活躍をお祈りし、謝辞と致します。

研究業績

1. 主著学術論文

I. 論文(学位論文関係)

- (1) **Ryosuke Takahashi**, Satoshi Ichikawa, Agus Subagyo, Kazuhisa Sueoka and Takaharu Okajima: “Atomic force microscopy measurements of mechanical properties of single cells patterned by microcontact printing”, *Advanced Robotics*, Vol. 28, No. 7, pp. 449-455 (2014) (IF=0.572).
- (2) **Ryosuke Takahashi** and Takaharu Okajima: “Mapping power-law rheology of living cells using multi-frequency force modulation atomic force microscopy”, *Applied Physics Letters*, Vol. 107, No. 17, pp. 173702-1 - 173702-4 (2015) (IF=3.302).
- (3) **Ryosuke Takahashi** and Takaharu Okajima: “Comparison between power-law rheological parameters of living cells in frequency and time domains measured by atomic force microscopy”, *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 55 08NB22 (2016) (IF=1.127).

II. 査読付国際会議プロシーディング

- (1) **Ryosuke Takahashi**, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Agus Subagyo, Kazuhisa Sueoka and Takaharu Okajima, “Quantitative rheological measurements of confluent cell using atomic force microscopy” *Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS)*, 2014 International Symposium on, DOI: 10.1109/MHS.2014.7006113, IEEE.
- (2) **Ryosuke Takahashi**, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Masahiro Tsuchiya, Agus Subagyo, Kazuhisa Sueoka and Takaharu Okajima: “High-throughput Measurements of Cell Mechanics Using Atomic Force Microscopy with Micro-patterned Substrates”, *Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS)*, 2013 International Symposium on, DOI: 10.1109/MHS.2013.6710471, IEEE.

2. 講演(学位論文関係)

- (1) **Ryosuke Takahashi** and Takaharu Okajima: “Multi-frequency force modulation atomic force microscopy: Simultaneous measurements of living cells in frequency and time domains”, 23rd International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM23), Niseko, Dec. 10-12 (2015).
- (2) **Ryosuke Takahashi**, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Agus Subagyo, Kazuhisa Sueoka and Takaharu Okajima: “Quantitative rheological measurements of confluent cell using atomic force microscopy”, 25th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Nov. 9-12 (2014).
- (3) **高橋亮輔**, 繁富(栗林)香織、スバギョ・アグス, 末岡和久, 岡嶋孝治: “多重周波数モジュレーション原子間力顕微鏡: 単一細胞レオロジーの高速測定”, 第52回日本生物物理学会年会, 札幌, 9.25-27 (2014).
- (4) **Ryosuke Takahashi**, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Masahiro Tsuchiya, Agus Subagyo, Kazuhisa Sueoka and Takaharu Okajima: “High-throughput Measurements of Cell Mechanics Using Atomic Force Microscopy with Micro-patterned Substrates”, 24th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Nov. 11-13 (2013).
- (5) **高橋亮輔**, 繁富(栗林)香織, 岡嶋孝治: “細胞間力学変化量の空間不均一性: 原子間力顕微鏡測定”, 第51回日本生物物理学会年会, 京都, 10.28-30 (2013).
- (6) **高橋亮輔**, 市川諭, 岡嶋孝治: “原子間力顕微鏡を用いた単一細胞レオロジーの高速・精密測定法の開発”, 第51回日本生物物理学会年会, 名古屋, 9.22-24 (2012).

3. 書籍

(1) Kaori Kuribayashi-Shigetomi, **Ryosuke Takahashi**, Agus Subagyo, Kazuhisa Sueoka and Takaharu Okajima: “High-throughput measurements of single cell rheology by atomic force microscopy”, Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, Chapter 4 (57-67), Springer, 2015.

(2) **高橋亮輔**, 岡嶋孝治, “原子間力顕微鏡による超高速細胞メカニクス計測技術”, ケミカルエンジニアリング (先端計測技術開発の展望:9月号) (2015).

4. 特許

本論文に関係した特許1件

岡嶋孝治, **高橋亮輔**, “細胞の複素弾性率の計測方法および計測システム”, 特願2014-136721 (2014.7.2).