



Title	細胞のマイクロ粘弾性解析
Author(s)	永山, 昌史; Nagayama, Masafumi; 芳賀, 永 他
Citation	電子顕微鏡, 38(2), 90-93
Issue Date	2003-07-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17143
Type	journal article
File Information	microscopy_HUSCAP.pdf



細胞のマイクロ粘弾性解析

永山 昌史¹⁾*、芳賀 永¹⁾、田中 芳雄²⁾、平井義彦²⁾、川端
和重¹⁾

(¹北海道大学大学院理学研究科、²大阪府立大学大学院工学
研究科)

キーワード：走査型プローブ顕微鏡、フォースモジュレーション法、弾性率、粘性係数、繊維芽細胞

Masafumi Nagayama : micro-viscoelasticity evaluation of
living cell

*〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目

Tel : 011-706-3810 Fax : 011-706-4926

E-mail : macci@sci.hokudai.ac.jp

1. はじめに

生命体は個体のレベルから分子のレベルまで階層構造をもっており、各階層ごとに特徴的な性質を示す（例えば、タンパク質レベルでは高次構造、細胞レベルでは運動・分裂等）。その中でも、細胞は生命体としての最小単位であり、その機能を解明することは生命現象を理解する上で非常に重要である。細胞に関する主な研究は、分子生物学や生化学に基づいた分子レベルの化学反応やその反応経路に注目して行われてきた。しかしながら、関与する分子の種類が膨大であり、さらに様々な反応経路が複雑に絡み合っているため、この立場から細胞レベルの機能を完全に解明するのは困難である。

そこで、我々は細胞の階層における特徴の一つとして細胞運動に着目した。そのメカニズムを明らかにするために、分子レベルのアプローチではなく細胞全体にわたる力学量（弾性、張力、粘性）の時間的・空間的变化に着目した研究を進めている。

走査型プローブ顕微鏡（Scanning Probe Microscope; 以下 SPM）は、液中環境下において生体試料（細胞、生体高分子、DNA）を固定等の処理することなく表面形状の観察ができる装置である。また、カンチレバーと呼ばれる板ばねの先端についた探針を試料に直接接触しながら測定するため、試料の力学的な性質も測定できるという特徴を持つ。力学量としては弾性（かたさ）についての測定が広く行われ、生体試料の

かたさ分布をサブミクロンスケールで測定した結果が数多く報告されている。現在、SPMを用いたかたさ測定の主流はフォースマッピング法と呼ばれる測定法である¹⁾。フォースマッピング法とは、試料上のある点に探針を徐々に押し込みながらカンチレバーに発生する力と試料の変形量との関係（フォースカーブ）を測定し、弾性率（ヤング率）を定量的に求める測定法である。この測定法を用いて、我々は生きた細胞のかたさが細胞表面において一様ではなく、場所によって数kPaから100kPaの範囲で分布していることと、その分布は細胞表層のアクチンフィラメントの分布に対応していることを明らかにした²⁾。アクチンフィラメントは細胞の力学的なかたさを構築している一方で、細胞運動や形態変化時には、収縮力の発生や重合・脱重合、さらには架橋構造の変化など、かなり動的な性質を示すことが分かっている。このため、細胞運動にともなう粘弾性分布の時間変化を測定することにより、細胞の力学的な運動機構を明らかにできると期待される。しかし、フォースマッピング法では64×64 pixelのすべての点における測定を行うのに40分間もの時間を要し、局所的な伸長や収縮が10分単位で発生する細胞運動を詳細に議論することはできない。

そこで、我々はより高い時空間分解能をもつフォースモジュレーション法に注目した³⁾。この測定法は、フォースマッピング法の報告よりも以前に提案された測定法で、単に高い時空間分解能のみならず試料の粘性も測定できることから、

非常に有用な測定手段である。しかし、液中では液体の粘性および測定系の共振等の影響を強く受けるために、測定条件に実験結果が左右されることがしばしばあった。例えば、測定条件によっては定性的にも異なる結果（ガラスよりも細胞のほうがかたいという結果など）が観測されることもあった。このため、現在はほとんど使われていない。我々は、まず装置系の改良や測定条件の最適化条件を調べ⁴⁾、さらにカンチレバーの機械的振動解析に基づいた粘弾性の解析方法を導入することにより⁵⁾、定量的な粘弾性分布を得ることを可能にした。本解説では、フォースモジュレーション法を用いた粘弾性の測定法と解析法を、生きた繊維芽細胞についての弾性率分布、粘性係数分布の測定結果とあわせて紹介する。

2. SPM による粘弾性測定

2.1 細胞測定のための SPM 装置と細胞培養

SPM はセイコー電子の SPM ユニット SPA400 とプローブステーション SPI3800 を使用した。スキャナーは x - y 方向の可動範囲が $100\ \mu\text{m}$ 、 z 方向が $10\ \mu\text{m}$ のものを用いた。カンチレバーは長さ $200\ \mu\text{m}$ 、幅 $20\ \mu\text{m}$ の長方形で、材質はシリコンナイトライド、ばね定数はカタログ値で $20\ \text{mN/m}$ のもの（サーモマイクロスコープ社製）を用いた。測定中は細胞の培養環境にできるだけ近い温度（ $33\pm 0.5\ ^\circ\text{C}$ ）に温調装置を用いて制御した。SPM の概略図を図 1 に示す。

図 1 横 8.5cm、縦 7cm (14行分)

SPM測定に適した細胞の条件は、基盤上にうすく張り付くことと、探針の走査に耐えるために接着力が強いことが挙げられる。以上の条件を満たす細胞として、セルバンクから購入した繊維芽細胞 (NIH3T3) を継代培養して用いた。ローグルコースのDMEMに10% FBSと適量の抗生物質を加えた培地を使用し、37℃、5% CO₂のインキュベータ内で培養する。コンフルエントに達したところでトリプシン処理をして細胞をはがす。細胞の懸濁液を、前もってフィブロネクチンをコーティングしておいたガラスシャーレにまき、1晩インキュベートする。SPMで測定する際には、メディウムをあらかじめ温めておいたHEPES-buffer (pH 7.2~7.3) と置換し、1時

間ほどインキュベートした後、取り出してそのままSPMにセットした。

2.2 フォースモジュレーション法とは

フォースモジュレーション法は、探針をコンタクトモードで走査しながら試料に周期的な応力を加え、たわみ信号に現れる周期的な応答から試料の粘弾性を評価する測定法である。原理図を図2に示す。

図2 横 8.5cm、縦 5cm (10行分)

カンチレバーに周期応力を印加することにより試料に周期的な変形を与えた場合、加えた応力と試料変形との振幅比から弾性率(ヤング率)が、応力と試料変形の時間的な遅れ(位相のずれ)から粘性係数がそれぞれ測定できる。1点ごとにフォースカーブを測定する従来のフォースマッピング法に比べ、時間分解能が高いことと静的な弾性率だけでなく同時に

粘性係数の測定も可能であることがこの測定法の特徴である。我々は、スキャナーに周期電圧をかけ、試料台全体を振動させることによって、試料に周期的な振動を印加している。フォースモジュレーション法を用いた測定では、たわみ信号の中に、試料の形状によるものと粘弾性を反映した周期的な振動によるものが含まれる。試料の粘弾性測定のためには、たわみ信号から周期振動の成分を抽出する必要がある。我々は、ロックインアンプを使って、周期振動の成分を振幅と位相のデータとして抜き出している。一方、試料の形状像を同時に測定すると、たわみ信号中の周期振動が影響を与える。極端な場合には、印加した振動数に対応するフィードバックが働き、周期的な応力をキャンセルする。この影響を抑えるために、フィードバック系の信号からは、バンドエリミネーションフィルターを使って加振周波数の交流成分を取り除いた。装置系の概略図を図 3 に示す。

図 3 横 8.5cm、縦 8cm (16行分)

2.3 測定条件と解析法

ロックインアンプで検出される信号は、試料のひずみ振動信号そのものではなくカンチレバーのたわみ振動信号である。測定により得られたたわみ振動信号の振幅・位相はそれぞれ試料の弾性・粘性の両方の影響を含んでいるため、計算により弾性・粘性を分離することが必要である。一般に、液中環境下でカンチレバーのような柔らかい（ばね定数 20 mN/m）板状の物体を振動させると、溶液から受ける粘性抵抗が無視できない。加振周波数が大きくなると、この粘性抵抗による影響も大きくなる。1 kHz 以上の周波数では、試料の粘弾性によるカンチレバーのたわみより溶液の粘性抵抗によるたわみのほうが大きくなり、試料の粘弾性を見積もることが難しい。そのため、加振周波数はできるだけ低く設定することが望ましいが、周波数が低くなると、それにともなって時間分解能が落ちてしまう。また、測定系の共振点付近では、位相情報が系の共振状態によって強い影響を受ける。以上を考慮

して加振周波数を 500 Hz、振幅を 10 nm とした。この測定条件下では、128×64 pixel の画像をわずか 6 分間で測定可能である。フォースマッピング法と比較して空間分解能で 2 倍、時間分解能で 5 倍以上の高解像度を実現できた。

次に、我々は試料の粘弾性と溶液の粘性の両方を考慮に入れたカンチレバーにおける 1 次元の振動方程式を導入した⁶⁾ (付録を参照)。この方程式に基づいた数値計算により、カンチレバー振動の振幅・位相から、定量的な 1 次元の弾性・粘性を見積もることができる。ここで求められる弾性・粘性は細胞表面の物性を表している量であるが、いわゆる弾性率(ヤング率)、粘性係数とは長さの次元が異なる量である。そこでフォースカーブから弾性率を求める際に用いられる Sneddon モデル (Hertz の弾性接触理論を粘弾性体と剛体円錐の接触に応用したモデル) を複素弾性率に拡張し、1 次元の弾性 K_s [N/m] と粘性 C_s [Ns/m] から弾性率 E_s [Pa] と粘性係数 η_s [Pa·s] を計算した。このとき、カンチレバーを試料にあらかじめ押し込んでいる量は一定であると仮定し、その値を 200 nm とした。

しかしながら実際には、押し込み量は試料の細かな凹凸による短針先端の接触面積の変化によって異なることが予想される。そのため、弾性率の評価にも影響が出ると考えられる。そこで、試料の形状とかたさの分布の相関を調べた⁵⁾。その結果によると、試料表面の凹凸とかたさ分布の間には明らかな相関はなく、この条件における測定では、弾性率の評価へ

の表面構造の影響は無視できることを確認した。

3. 実験結果とディスカッション

フォースモジュレーション法による実験結果を図4に示す。

図4 横 8.5cm、縦 16.5cm (33行分)

(a) 凹凸像、(b) ディフレクション像、(c) 振幅像、(d) 位相像、(e) 弾性率分布、(e) 粘性係数分布である。細胞は一番高い領域で $3\ \mu\text{m}$ 程度の高さであり、この領域は細胞核に対応する。細胞表面には多くのフィラメント状の構造が細胞全体にわたって張り巡らされている。この構造は、アクチンフィラメントと II 型ミオシンからなるストレスファイバーであることを免疫蛍光染色により確認した。振幅像と位相像をみると、ガラスと比較して細胞内では振幅が小さく、位相の遅れが大きいことが分かる。弾性率分布では、明るい領域が弾性率の大きい（かたい）領域を表す。弾性率は細胞内で一様ではなく、 $10\ \text{kPa}$ から $50\ \text{kPa}$ まで分布している。また

ストレスファイバーはその周囲に比べかたくなっている。この結果は、現在までに報告されているフォースマッピング法による結果と一致している。粘性係数分布では、明るい領域が粘性係数の大きい領域を表す。細胞体の粘性係数は平均で $30 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ 程度であり、仮足部分は細胞体よりも粘性係数が大きいことがわかる。

我々はこの測定法を用いて測定した細胞運動とかたさの変化についての以下の関係を明らかにした⁷⁾。

- ・細胞が停止状態にあるときかたさの分布はほとんど変化しない。
- ・ひとたび運動を開始すると細胞体部分のかたさが劇的に減少する。

これらの結果を考察し、今までアクチンフィラメントの分布だけで議論されてきた細胞のかたさに対し、そこに働く張力も非常に重要であるというモデルを提案した。運動とかたさの関係を明らかにすることは、フォースモジュレーション法の高い時空間分解能により初めて可能になった。細胞運動のような動的な力学構造を明らかにする上で、この測定法がいかに有用であるかを端的に物語っている一例である。

4. 今後の展望

今回の実験は、探針をあらかじめ 200 nm 押し込んだ状態で、 10 nm の振幅を印加して行った。この条件で測定される弾性率は細胞表層のアクチンフィラメントに大きく依存する

結果となった。押し込み量や振幅を変えることにより、さらに内部（もしくは表層）の力学的な構造についても議論できると考える。

細胞の粘性係数に関する実験結果は別の測定法による測定例が少なく、本実験と比較できるような高分解能の結果も報告されていない。また弾性率分布に見られるような特徴的な構造も現れておらず、細胞表面のどのような構造（たとえば細胞骨格など）に起因するかははっきりと議論できない。また本研究では、生体の粘弾性を粘弾性モデルとして代表的な Voigt モデルで表現した。実際の生体がこのモデルで記述できるか否かを判断するためにも、粘性係数については加振周波数に対する依存性を明らかにする必要があると考える。

付録（振動方程式）

カンチレバーのたわみ振動における 1 次元の振動方程式は以下のように記述される。

$$m^* \frac{\partial^2 y(x,t)}{\partial t^2} + c^* \frac{\partial y(x,t)}{\partial t} + E_c I \frac{\partial^4 y(x,t)}{\partial t^4} = p(x,t)$$

$y(x,t)$ 、 $p(x,t)$ はそれぞれ 1 次元カンチレバーの任意の点 x ($0 \leq x \leq L$)、任意の時間 t におけるカンチレバーのたわみと荷重である。 L はカンチレバーの長さ。 m^* 、 c^* 、 E_c 、 I はカンチレバーの力学性質を反映する量でそれぞれ実効質量、実効粘性減衰係数、弾性率、断面 2 次モーメントである。左辺の第 1 項は慣性項、第 2 項、第 3 項はそれぞれカンチレバ

一振動の減衰項、ばね弾性項を表す。一方、カンチレバーはその先端 ($x=L$) で試料に接しており、そこでカンチレバーが発生する荷重と試料のひずみによる粘弾性力はつりあってなければならない。カンチレバーに印加した振動を $\phi(t)$ とすると、つりあいの方程式は以下の式で記述できる。

$$p(L,t) = \left[K_s \{\phi(t) - y(L,t)\} + C_s \frac{\partial \{\phi(t) - y(L,t)\}}{\partial t} \right]$$

K_s [N/m]、 C_s [Ns/m] は、試料の一次元の弾性、粘性である。 $\phi(t) - y(L,t)$ が試料の変形量を表す。この方程式に基づき、カンチレバー振動の振幅・位相から、定量的な一次元の弾性・粘性を見積もることができる。この解析法における詳細は、論文⁶⁾を参照されたい。

参考文献

- 1) Radmacher M, Fritz M, Kacher CM, Cleveland JP, Hansma PK : Biophys. J., 70, 556-567 (1996).
- 2) Haga H, Sasaki S, Kawabata K, Ito E, Ushiki T, Abe K, Sambongi T : Ultramicroscopy, 82, 253-258 (2000).
- 3) Radmacher M, Tillmann RW, Gaub HE : Biophys. J., 64, 735-742 (1993).
- 4) Haga H, Nagayama M, Kawabata K, Ito E, Ushiki T, Sambongi T : J Electron Microsc, 49(3), 473-481 (2000).
- 5) Nagayama M, Haga H, Tanaka Y, Hirai Y, Kabuto M,

Kawabata K : Jpn. J. Appl. Phys., 41(7B), 4952-4955
(2002).

6) 田中芳雄, 平井義彦, 兜 雅章, 川端和重, 芳賀 永, 永山
昌史 : 日本機械学会論文集(C編) 67(663), 3498-3504
(2001).

7) Nagayama M, Haga H, Kawabata K : Cell Motil.
Cytoskel., 50, 173-179 (2001).

図 説明

図 1 SPM の概略図。SPM では、プローブが試料表面をなぞることによって測定を行う。表面の凹凸は、カンチレバーのたわみにより検出され、そのたわみがレーザーを用いた光学系により数値化される。 x - y 方向へ走査と z 方向へのフィードバックは、スキャナーにより制御されている。

図 2 フォースモジュレーション法による粘弾性測定の原理図。カンチレバーを振動させることにより、試料に周期的な変形をあたえる。試料がかたければ(弾性率が大きい)、試料の変形量(振幅)が小さくなる代わりにカンチレバーのたわみ量が大きくなる。また、外力に対する試料の応答の時間的な遅れ(位相のずれ)から、粘性についての情報が得られる。

図 3 形状、粘弾性の同時測定のための装置系。レーザー変位計により数値化されたカンチレバーのたわみ信号は、バンドエリミネーションフィルターとロックインアンプに送られ、それぞれで試料の形状の情報（直流成分）と粘弾性の情報（交流成分）とが抽出される。直流成分は z -コントローラーに送られ、凹凸像、ディフレクション像として画像化されると同時にフィードバック信号をスキャナーに与える。一方、交流成分は振幅像、位相像として画像化される。

図 4 フォースモジュレーション法による形状と粘弾性の同時測定の結果。 z -コントローラーから抽出された凹凸像 (a)、ディフレクション像 (b)。ロックインアンプにより抽出された振幅像 (c)、位相像 (d)。測定終了後に、各測定点における振幅と位相の遅れから計算した弾性像 (e)、粘性像 (f)。

Figure 1

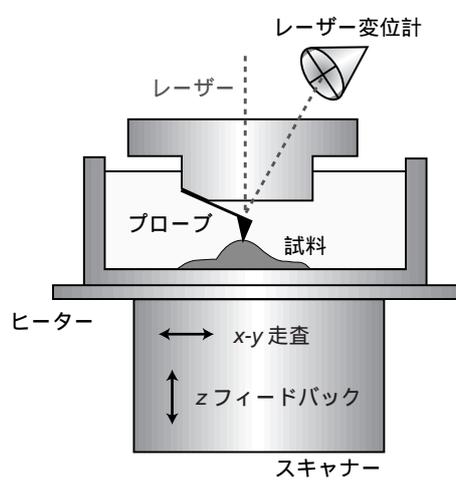


Figure 2

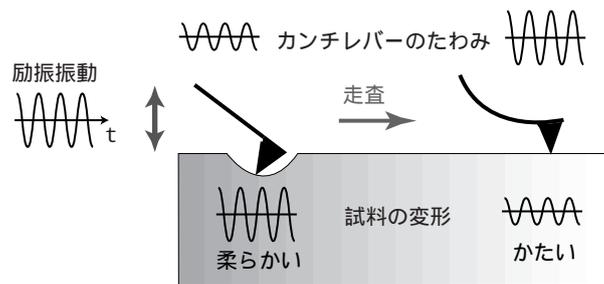


Figure 3

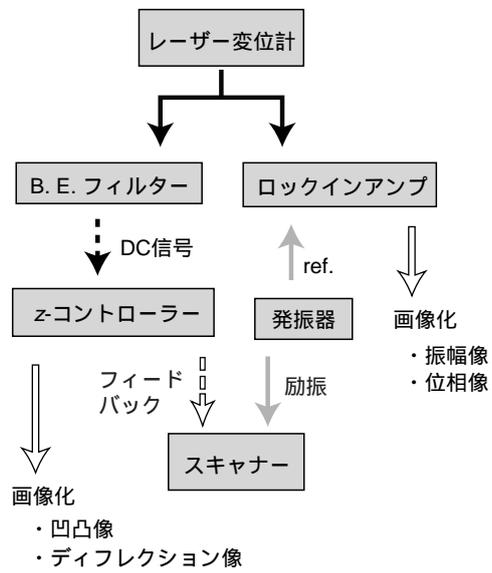


Figure 4

