

令和元年度 修士論文

フェムト秒レーザー誘起衝撃力が動物細胞膜
に与える作用の蛍光染色による評価

田中 幸宏

奈良先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科 物質創成領域

生体プロセス工学研究室

(主指導教員 細川 陽一郎 教授)

令和2年3月17日提出

目次

第1章 序論.....	1
1-1 はじめに	1
1-2 フェムト秒レーザーアブレーション	1
1-3 フェムト秒レーザー誘起衝撃力	2
1-4 本研究の目的	3
1-5 本論文の構成.....	4
第2章 実験系と試料	5
2-1 はじめに	5
2-2 フェムト秒レーザー	5
2-3 蛍光観察用フェムト秒レーザー照射システム	6
2-4 試料	8
2-4-1 動物筋芽細胞 (C2C12)	8
2-4-2 蛍光分子.....	9
2-4-2-1 FM1-43.....	9
2-4-2-2 FITC dextran	10
第3章 フェムト秒レーザー誘起衝撃力による細胞膜への小孔形成機構.....	11
3-1 はじめに	11
3-2 実験方法	11
3-3 浮遊状態と接着状態における細胞への蛍光分子導入確率	12
3-4 考察・まとめ	16
第4章 パルス数の変化やパルス間隔が形成される小孔のサイズや修復時間に与える影響の調査.....	17
4-1 はじめに	17

4-2 実験方法.....	17
4-3 パルス数やパルス間隔が形成される小孔のサイズに与える影響	18
4-4 パルス数やパルス間隔が形成される小孔の修復時間に与える影響.....	20
4-5 パルス間隔 10 sec で複数パルス照射による小孔の維持.....	23
4-6 パルス間隔 50 sec の照射による小孔の再形成	24
4-7 考察・まとめ	25
 第 5 章 高分子 FITC dextran の導入.....	27
5-1 はじめに	27
5-2 実験方法.....	27
5-3 レーザー照射前後の蛍光画像.....	27
5-4 導入確率および導入量	28
5-5 考察・まとめ.....	29
 第 6 章 総括	30
 参考文献	32
業績リスト	34
謝辞	35

第一章 序論

1-1 はじめに

レーザーは20世紀最大の発明の一つとされ、今の最先端の科学研究・技術開発に欠かせない要素となっている。中でも近年バイオ分野への応用が注目を浴びており、共焦点顕微鏡、超解像顕微鏡といった細胞をより詳しく見る技術から、光ピンセットに代表される細胞を操る技術までに発展している^[1,2]。レーザーによる微細加工操作・測定技術の発展は、今後もバイオ分野の研究に大いに貢献することが予想される。

このような技術開発において、我々はフェムト秒レーザーパルスを液中に集光照射した時に誘起される、微小な爆発現象（フェムト秒レーザー誘起衝撃力）を用いた細胞操作・測定技術の開発を進めている。フェムト秒レーザー誘起衝撃力はマイクロメートルスケールの微小領域のみに誘起されるので、単一細胞レベルの細胞操作技術として期待出来る。これまでに我々は本手法により、細胞の生理応答誘導や接着力の測定、細胞の分取などを報告してきた^[3-6]。そこで次項ではフェムト秒レーザー集光点において生じる物理化学過程に関して概説する。

1-2 フェムト秒レーザーアブレーション

まずここでは、フェムト秒レーザーを対物レンズで固体に集光照射した場合に発生する、レーザーアブレーションについて説明する。フェムト秒レーザーアブレーションの発生過程を図 1-1 に示す^[7]。フェムト秒レーザーが集光照射されると、フェムト秒レーザーパルスの高い光子密度から、集光点で多光子吸収が起きる。この多光子吸収により分子の電子が励起され、この励起エネルギーが分子の格子振動エネルギーへと変換される。このエネルギーの変換の時間スケールはピコ秒オーダーであり、分子の膨張・収縮といった、分子の移動はさらにナノ秒オーダーの時間が必要となる。したがって、フェムト秒レーザーを集光照射した場合は、集光点での微小領域の分子の原子骨格のみが振動し、分子は動かないという現象が起きる。これはつまり、集光点での急激な圧力上昇を意味している。この局所的な圧力が、ナノ秒オーダーで周囲に一気に緩和することで衝撃波が伝播する。フェムト秒レーザーアブレーションとは、この衝撃波による物質の破壊と飛散であると考えられる。

ナノ秒レーザーやピコ秒レーザーを集光照射した場合は、パルス幅が十分に長いことから、電子振動エネルギーから分子自身の振動エネルギーへの変換が、

パルスが物質に到達する時間スケールで行われる。よって、熱が発生した状態となる。一方、フェムト秒レーザーの場合は電子振動エネルギーが熱として蓄積されずに、物質の併進運動に効率的に変換され衝撃波として過ぎ去る。よってフェムト秒レーザーアブレーションでは、熱的損傷が少ない材料の微細加工に適しており、生体材料や細胞のプロセッシングに応用する研究が行われている^[8]。

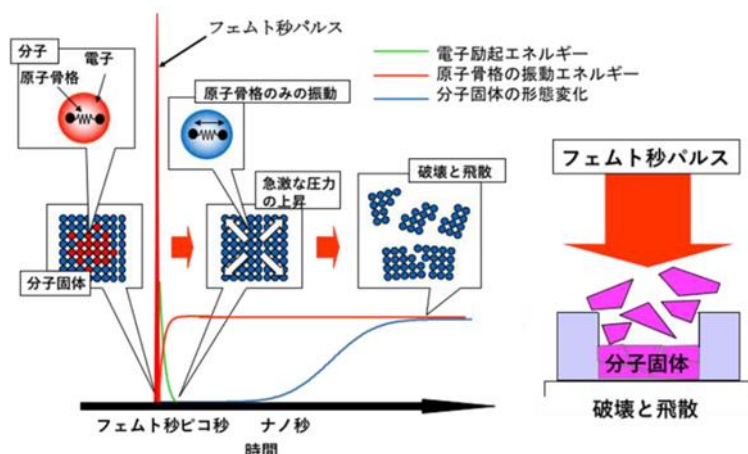


図 1-1 フェムト秒レーザーアブレーションの発生過程
(参考文献 [7]より引用)

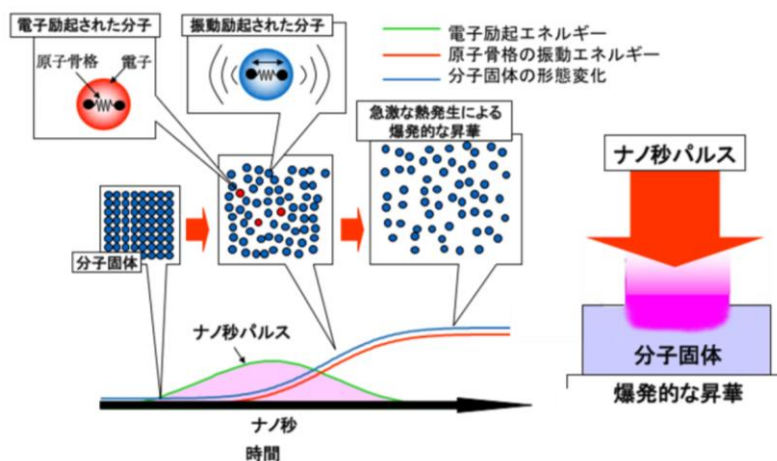


図1-2 ナノ秒レーザーアブレーションの発生過程
(参考文献[7]より引用)

1-3 フェムト秒レーザー誘起衝撃力

フェムト秒レーザーを水中に集光照射した場合においても、前述と同様に、集光点での水分子の多光子吸収と急激に上昇した圧力の緩和によって衝撃波が発生する。この衝撃波が水中に伝搬し、集光点から水が押しのけられる。すると集光点近傍は過渡的に低圧状態となり、沸点が低下することで集光点にキャビテ

ーションバブルと呼ばれるバブルが発生する。このキャビテーションバブルが膨張・収縮し、応力波が伝搬する^[5]。また、キャビテーションバブルが崩壊すると、直径1 μm ほどの小さなガスバブルが発生する。図1-3に液中にフェムト秒レーザーを1 パルス集光したときに生じるキャビテーションバブル（左）とガスバブル（右）を示す。キャビテーションバブルの発生から崩壊までがマイクロ秒オーダーであるのに対し、ガスバブルは数ミリ秒のオーダーで存在する。

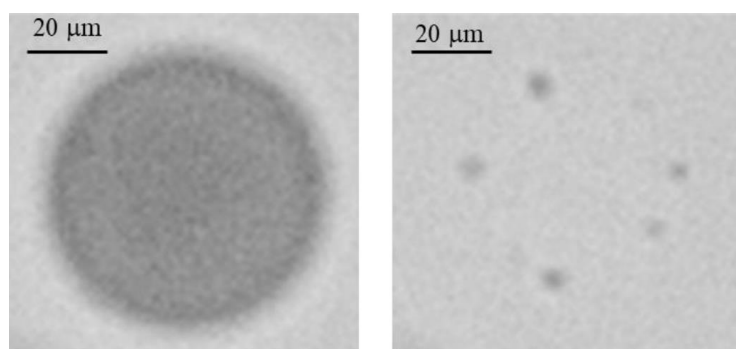


図1 -3 水中に集光照射したフェムト秒レーザーにより集光点で発生するキャビテーションバブル（左）とガスバブル（右）

(参考文献[5]より引用)

1-4 本研究の目的

上記のフェムト秒レーザー誘起衝撃力を単一細胞の操作技術として応用するためには、キャビテーションバブルの膨張・収縮や、さらに発生したガスバブルがそれぞれ細胞へ与える影響の詳細を明らかにする必要がある。特にこれらの直接的な作用として細胞膜への小孔形成が考えられ、これまでにフェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した細胞への蛍光分子導入も報告している^[9]。しかしながら、フェムト秒レーザー誘起衝撃力によって細胞膜に小孔が形成されるメカニズムや形成した小孔のサイズなどは不明であった。

そこで本研究では、フェムト秒レーザー誘起衝撃力によって細胞膜に生じる小孔形成の機構を細胞培養液中に添加した蛍光分子の導入効率や導入量から評価した。照射するレーザーのパルス数やパルス間隔、細胞の接着状態などに依存する蛍光分子の導入量から、衝撃力の発生過程における衝撃波の伝搬とキャビテーションバブルの発生、さらにキャビテーションバブル崩壊に伴うガスバブルの発生に関して、細胞膜への小孔形成の寄与を議論した。

1-5 本論文の構成

第1章ではフェムト秒レーザーを固体物質上に集光照射した場合に引き起こされるフェムト秒レーザーアブレーションと、水溶液中に集光照射した場合に引き起こされるフェムト秒レーザー誘起衝撃力について述べ、本研究の目的について述べる。

第2章では、本研究で用いたフェムト秒レーザー装置や実験系について述べる。さらに本研究で用いたC2C12細胞、FM1-43、FITC dextran について述べる。

第3章では、フェムト秒レーザー誘起衝撃力を作用させる細胞の接着の有無による蛍光分子の導入確率の差から、衝撃力の発生過程におけるキャビテーションバブルの小孔形成の寄与について述べる。

第4章では、複数パルス照射によってフェムト秒レーザー誘起衝撃力を作用させたときの高速カメラによる観察結果と、パルス数やパルス間隔変化による蛍光分子の導入量変化から、キャビテーションバブルとガスバブルの相互作用とその小孔形成の寄与を述べる。また、レーザー照射後の蛍光分子の導入量の時間変化から、小孔の修復時間や維持、再形成などの各照射条件による小孔の挙動変化について述べる。

第5章では、3,4章で用いた低分子のFM1-43以外に、高分子FITC dextranの細胞内への導入効率や導入量も調査したため、これを報告する。

第6章では、本研究結果を総括し、今後の展望を述べる。

第二章 実験系と試料

2-1 はじめに

本章では、レーザー光源として使用した再生増幅器付きチタンサファイアレーザーと、これを顕微鏡に導入した顕微フェムト秒レーザー照射システム、さらに使用した試料や試薬について述べる。

2-2 フェムト秒レーザー

本研究ではレーザー光源として再生増幅器付きチタンサファイアレーザーシステム (Solstice, Spectra Physics) を用いた。本節ではフェムト秒レーザーの構成および原理を述べる。図2-1 にフェムト秒レーザーの発振器の模式図を示す。パルス幅がフェムト秒のような短パルス光を発振させるためにモード同期という手法を用いている。モード同期法とは、短い時間幅で高いピークのパルスを、複数の波長の光を発振させ位相を揃えて重ね合わせることで得る手法である。図2-2 にモード同期の概念図を示す。また、波長ごとに光路長を変えて、様々な波長の発振モードを揃えている。そのために分散補償プリズムが発振器内に設置されている。図2-3 に分散補償プリズムの概念図を示す。

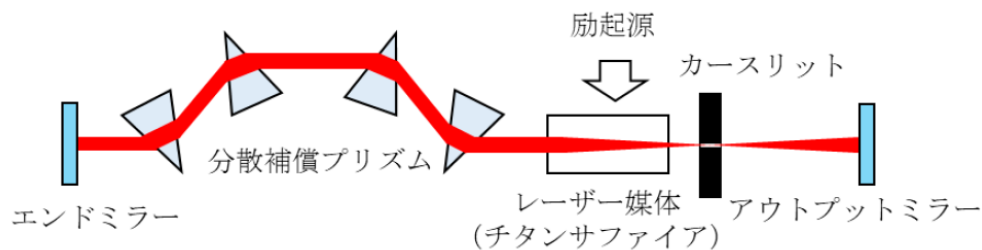


図2-1 フェムト秒レーザー発振器の模式図

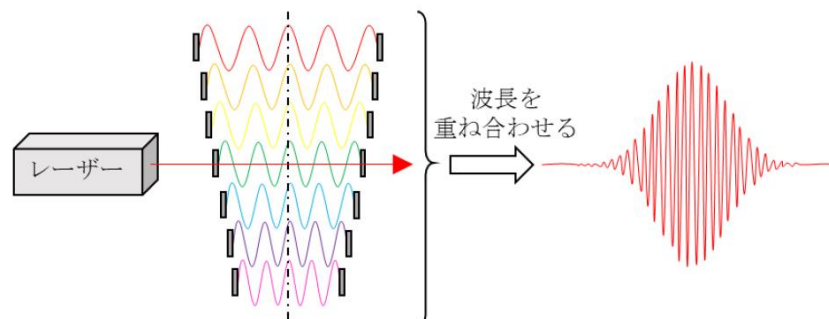


図2-2 モード同期の概念図

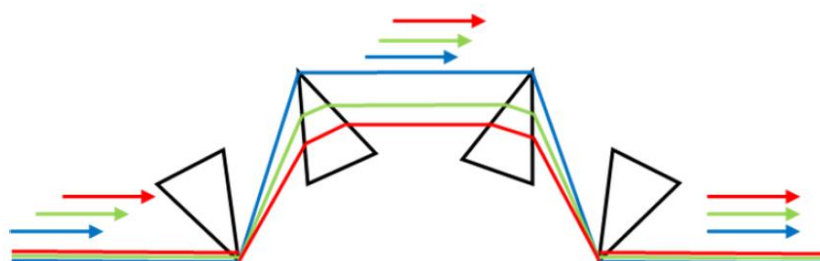


図2-3 分散補償プリズムの概念図

さらに、フェムト秒レーザーは、発振されたパルスを再生増幅器で増幅することにより高強度のレーザーパルスを発生させることが出来る。そのシステムの概略図を図2-4 に示す。フェムト秒レーザー発振器から出力された光をパルス伸長器に導入し、ピコ秒パルスに伸長させる。これは、再生増幅器内でのパルスの滞在時間を長くし増幅効率を高くするため。また、フェムト秒レーザーは高いピークエネルギーを有しており、そのまま増幅すると、レーザー媒体を破壊する可能性がある。そこで、パルスを伸長させることでピークエネルギーを減少させ、素子へのダメージを軽減している。その後、伸長された光はチタンサファイア結晶をレーザー媒体とした再生増幅器内に導入され、エネルギーが増幅される。最後にパルス圧縮器によりパルスを圧縮させることで、高強度のフェムト秒レーザーが発振される。

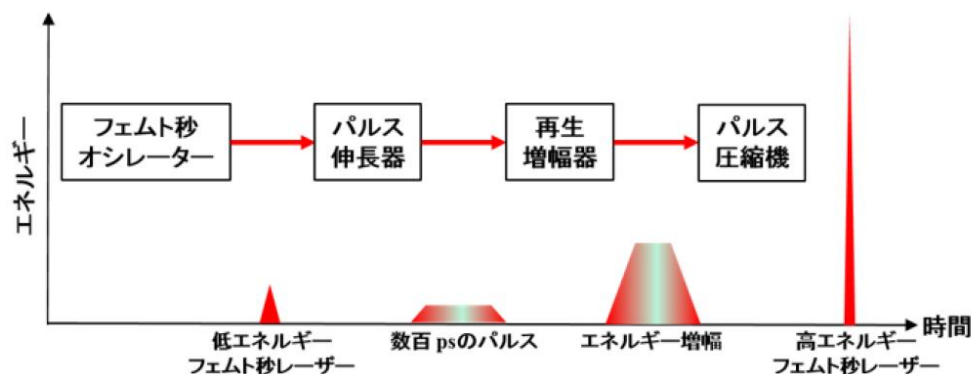


図2-4 再生増幅器付きチタンサファイアレーザーシステム

2-3 蛍光観察用顕微フェムト秒レーザー照射システム

本研究では、顕微鏡に前述のフェムト秒レーザーを導入し、対物レンズを通して溶液中に集光照射した。図2-5 に蛍光観察に用いた顕微フェムト秒レーザー照射システムを示す。レーザー光源から発振されたパルス光のパルスエネルギーはND フィルターによって調整した。またパルス数は、機械式シャッターによ

りレーザー照射のタイミングが制御される。シャッターの駆動時間とレーザーの繰り返し周波数を調整することで任意のパルス数を選択できる。対物レンズに導入された際に効率的に集光されるように、平凹レンズと平凸レンズの組み合わせによりレーザーのビーム径を0.5 cm に広げた。コリメーターレンズ間の距離を調整することでレーザーの集光位置をカメラの像平面より10 μm 上に設定した。顕微鏡に導入されたフェムト秒レーザーはダイクロイックミラーで反射され20x の対物レンズ(N.A. 0.5)を通して細胞近傍に集光される。試料上部に水銀ランプを配置し、コンデンサーレンズを用いて試料に照射した。透過した光が対物レンズを通して高感度CMOS カメラに入ることによって試料の様子が観察される。フェムト秒レーザー照射前後の細胞の蛍光観察には波長が473 nm のブルーレーザー(DPSS 473 nm Blue Laser)を励起光として用いた。ブルーレーザーの強度はNDフィルターによって調整し、ビームディフューザーと平凹レンズの組み合わせによってビーム径を約1 cm に広げた。顕微鏡に導入されたブルーレーザーは対物レンズを通して試料に集光され、培地に添加された蛍光分子を励起した。本研究では、ブルーレーザーにより励起され発した580 nmの蛍光を共焦点蛍光システムによって蛍光画像として取得した。蛍光画像は画像解析ソフトであるImage J により解析し、レーザー照射前後の蛍光強度の変化量 (ΔI) を算出し、細胞への分子導入を判断した。また、フェムト秒レーザーが水中に集光された際の様子を、高輝度照明による明視野顕微画像として高速カメラ(820 ,512 or 240, 00 0 frame /s, Phantom, Vision Research, USA)で撮影した。この高速撮影によってフェムト秒レーザーが集光されたときに発生するキャビテーションバブルの生成・収縮・崩壊、及びガスバブルの発生の詳細な観察を行った。

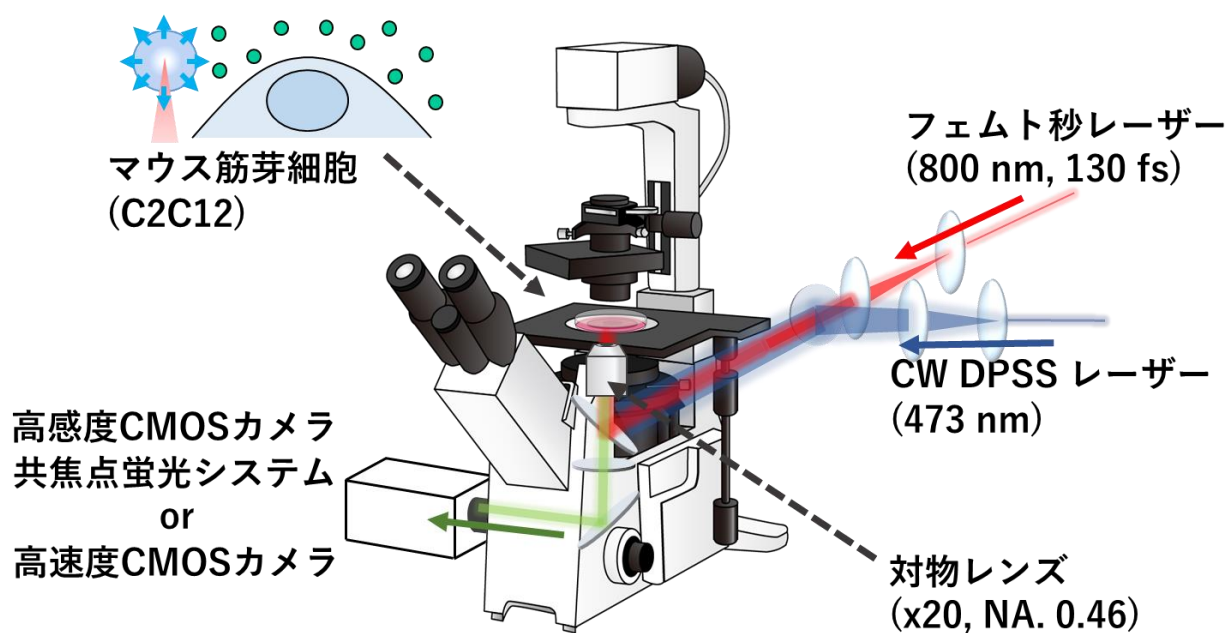


図2-5 蛍光観察および高速撮影用顕微レーザーシステム

2-4 試料

2-4-1 動物筋芽細胞 (C2C12)

本研究では、動物細胞の代表としてマウス横紋筋由来の培養細胞株C2C12を使用した。図2-6にφ12ガラスボトムディッシュに播種したC2C12の透過像を示す。

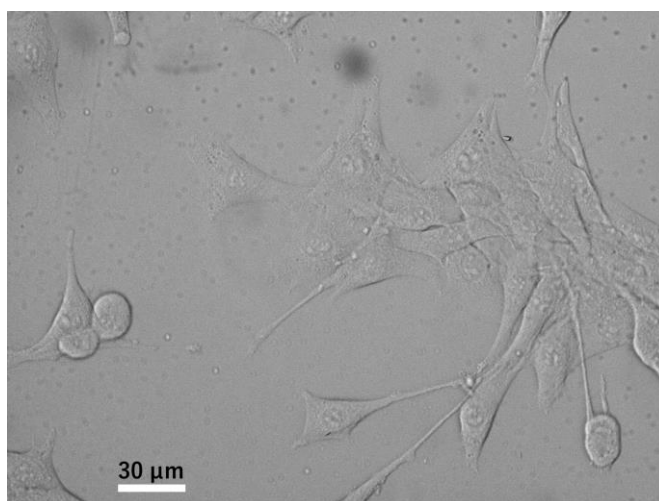


図2-6 C2C12 細胞

C2C12細胞の培養に使うDMEM 培地は、以下の試薬を混合して作製する。DMEM 培地を保存する場合は、冷蔵保存した。

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ナカライテスク) 500 ml
- Fetal bovine Serum (FBS) (Invitrogen Corporation) 50 ml
- Penicillin -Streptomycin (Pen strep) (GIBCO) 5 ml

C2C 12 細胞の継代方法を示す。C2C 12 細胞の継代は、トリプシン-EDTA を用いてC2C 12 細胞を培養ディッシュから引き剥がして行う。フラスコにC2C 12 細胞を播種してから顕微鏡で培養ディッシュの底面を確認し、接着したC2C 12 細胞が培養ディッシュで7〜8割コンフルエントになった時点で継代を行う。

- 1)培養ディッシュ内のDMEM 培地を吸い出す。
- 2) PBS をフラスコに1 ml 加え、細胞を数秒PBSに浸し、フラスコを傾けてPBSを吸い出す。
- 3)トリプシン-EDTA を1 ml とり、培養ディッシュに添加し、トリプシン-EDTA をC2C 12 細胞になじませ、37°CのCO2 インキュベーターで5 分間インキュベートする。顕微鏡で細胞を観察し、細胞が剥離していることを確かめる。うまく剥離していなかった場合は、インキュベートの時間を長くした。
- 4) DMEM 培地9 ml をフラスコ内に加え、ピペッティングで攪拌し細胞懸濁液とした。
- 6) 残った細胞にDMEM 培地を1 ml 加え、ピペッティングする。この溶液10 μ L を血球計算盤に流し込み細胞の濃度を計算した。
- 7) フラスコに継代する場合は培養ディッシュに9 mL のDMEM 培地を加え1 mLの細胞懸濁液を加えた。実験に使用する場合は、実験日に70%〜80%のコンフルエントの状態になるように、 ϕ 12 のディッシュに実験日が翌日なら8000 cells/dish、翌々日なら6000 cells/dish、3日後なら4000 cells/dishの割合になるように調製した細胞懸濁液500 μ Lを加えた。
- 8) 培養ディッシュまたは ϕ 12のディッシュをインキュベーター(温度:37°C 、CO2 濃度:5%)に戻し培養する。

2-4-2 蛍光分子

本研究では、FilmTracer™ FM™ 1-43 Green Biofilm Cell Stain(以下FM1-43)とFluorescein Isothiocyanate Dextran(以下FITC dextran)の2種の蛍光分子を用いた。この節では、この2種の蛍光分子について説明する。

2-4-2-1 FM1-43 (LOT:1890572, Thermo Fisher Scientific)

図2-7 にFM1-43 の構造式を示す。FM1-43は分子量612の蛍光分子で、細胞膜に結合すると量子収率が増加し強い蛍光を発する。また通常は細胞膜透過性がなく細胞外膜にのみに結合する。このような特徴により、エンドサイトーシスあるいはエクソサイトーシス動態を光学的に画像にて描出することに用いられている^[10-11]。さらに、細胞内に導入されると細胞内膜にも結合し細胞内の蛍光強度が強くなる。本研究ではこの蛍光強度の変化から分子導入を判断した。

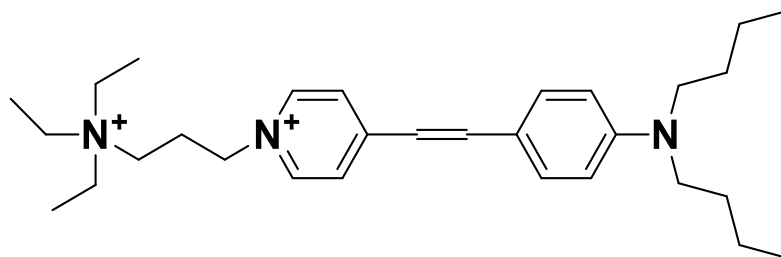


図2-7 FM1-43の構造式

2-4-2-2 FITC dextran(LOT:SLBH1156V, SIGMA)

図2-8にFITC dextranの構造式を示す。FITC dextranは糖鎖であるデキストランにFITCの蛍光標識がされた高分子の蛍光分子で、消化管や血管の障害評価などに使用されている^[12-13]。標識されるデキストランの分子量によって様々な分子量を持つ。本研究では20,000のものを使用した。FITC dextranは前述のFM1-43と異なり、細胞膜と相互作用はせず培養液中で蛍光を発する。

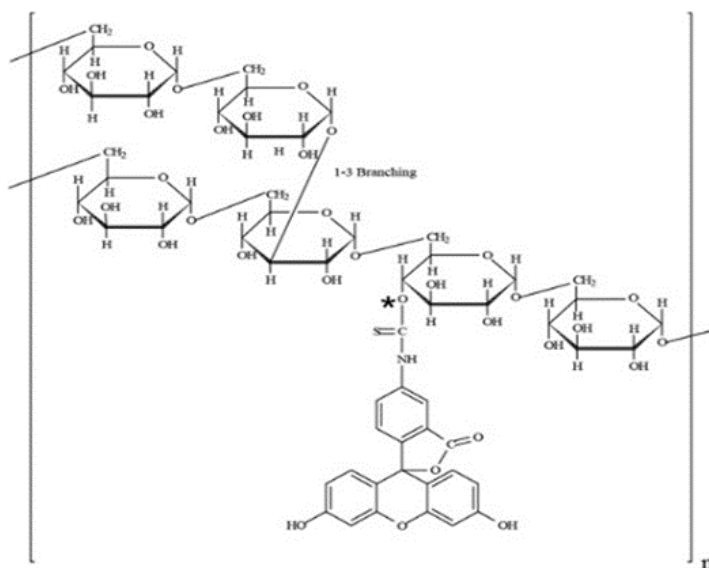


図2-8 FITC dextranの構造

第3章 フェムト秒レーザー誘起衝撃力による細胞膜への小孔形成機構

3-1 はじめに

第1章で示したようにフェムト秒レーザー誘起衝撃力により、衝撃波の伝搬とそれに続いて生じるキャビテーションバブルの膨張・収縮を伴う一連の現象が周辺に作用する。本章では、細胞の基板への接着状態を変えて、細胞がレーザー誘起衝撃力から受ける機械的作用の大きさを変化させることで、フェムト秒レーザー誘起衝撃力が細胞膜上に小孔を形成する機構を考察した。

3-2 実験方法

C2C12が70～80%コンフルエント状態になったφ12 ガラスボトムディッシュを、2-4-1で記した方法で用意した。ガラスボトムデッシュ中の培養時の培地(DMEM)を取り除き、100 μ Lのトリプシン-EDTAを加え、細胞がガラスボトムデッシュから剥がれて浮遊状態となるまで約5分間、CO₂ インキュベーター内で培養した。C2C12が剥がれたのを確認したら、FM1-43が実験用の培地中（フェノールレッド不含、FBS、HEPES 含有のDMEM）に5 μ Mとなるよう調製した溶液を、400 μ Lガラスボトムディッシュに加えた。培養時のDMEMと実験時のDMEMの組成が異なるのは、DMEM にはフェノールレッド(吸収波長432 nm)が含まれており励起光を吸収し蛍光を発する可能性があるためである。FM1-43溶液を添加後、細胞膜と相互作用するまでCO₂ インキュベーター内で30 分程度培養し、浮遊状態の細胞試料とした。30分後、2-3で述べた倒立顕微鏡上に設置した。CO₂ インキュベーターから取り出してからの実験時間は1 時間以内に統一した。レーザーの条件はパルスエネルギーをND フィルターにより150、300、600 nJ/pulse に設定し、機械式シャッターにより1 パルスのみを切り出し単パルスを液中に集光照射した。細胞とレーザー集光位置の距離は20 μ mとした。また、100 nJ/pulseの単パルスを直接、浮遊状態の細胞に集光した実験も行った。

接着状態の細胞試料は、ガラスボトムデッシュ中の培養時のDMEMを取り除いた後、上記と同様に調製したFM1-43溶液500 μ Lをガラスボトムデッシュに添加し、細胞膜と相互作用するまでCO₂ インキュベーター内で30 分程度培養し、接着状態の細胞試料とした。接着細胞には150 nJ/pulseの単パルスを細胞とレーザー集光位置の距離20 μ mの所に集光照射した。

浮遊、接着いずれの状態の細胞も蛍光画像は波長473 nm のCW DPSS レーザ

ーで励起して観察した。励起レーザーのパワーはND フィルターにより1 mW に、露光時間を500 ms に設定して蛍光画像を観察した。蛍光画像はレーザー照射前と照射後120秒後のものをそれぞれ取得した。

3-3 浮遊状態と接着状態における細胞への蛍光分子導入確率

図3-1に浮遊状態と接着状態に関してレーザー照射120秒後に蛍光輝度が上昇した細胞の蛍光画像を示す。この蛍光輝度の上昇は細胞膜に小孔が形成して培養液に導入したFM1-43が細胞内に導入されたことによると考えられる。

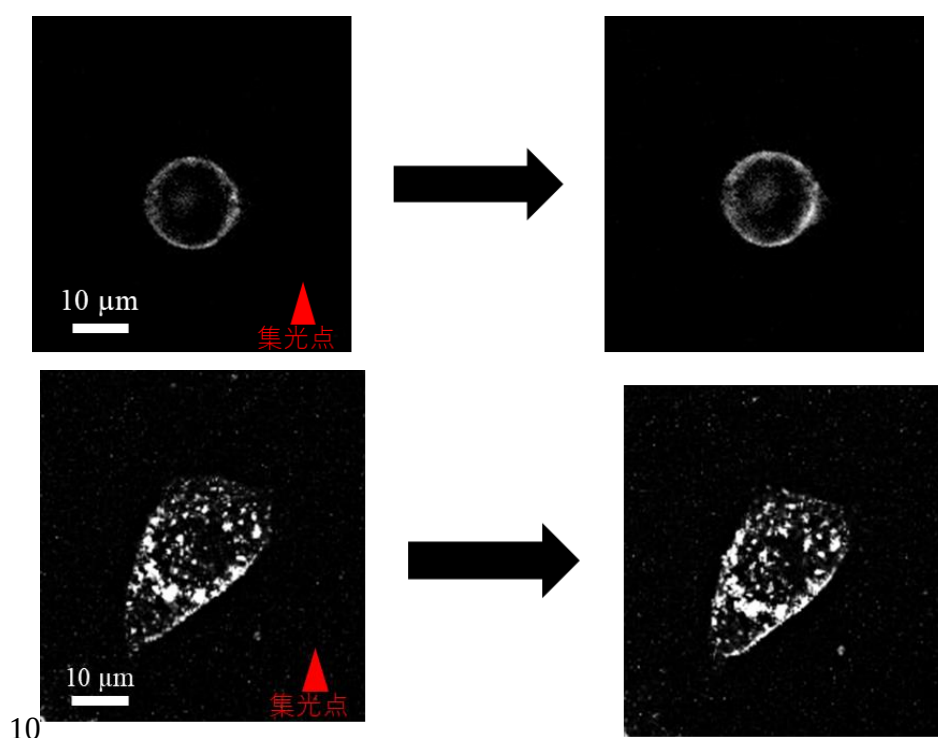


図3-1 浮遊細胞（上図）と接着細胞（下図）のレーザー照射前後の蛍光画像

ここで、FM1-43の導入量を定量的に評価するために細胞内の蛍光強度の変化量 (ΔI) を以下の式①を用いて算出した。フェムト秒レーザー照射前後の励起光の揺らぎを考慮して、フェムト秒レーザー照射前のバックグラウンドに対するレーザー照射後のバックグラウンドの蛍光強度の比率 k を補正係数とした。蛍光強度の値は画像解析ソフトである Image J を用いて抽出し、

$$\Delta I = I_{\text{after}} - k \cdot I_{\text{before}} \quad \text{①}$$

①式によって、各レーザー照射条件の ΔI を算出した。またコントロール条件とし

てフェムト秒レーザーを照射していない細胞の ΔI も算出した。その結果、接着状態と浮遊状態の細胞のコントロール条件の最大 ΔI がそれぞれ 0.5と1であったので、各レーザー照射条件のサンプルにおいて、接着状態の細胞では $\Delta I = 0.5$ 以上、浮遊状態の細胞では $\Delta I = 1$ 以上のものを蛍光分子が導入されたと判断した。

この判断基準をもとに、算出した浮遊状態の細胞と接着状態の細胞の蛍光分子導入確率を図3-2に示す。浮遊状態の細胞では、接着細胞では導入確率が70%であるのに対し、浮遊細胞では10%と接着細胞と比較して大きく低下した。

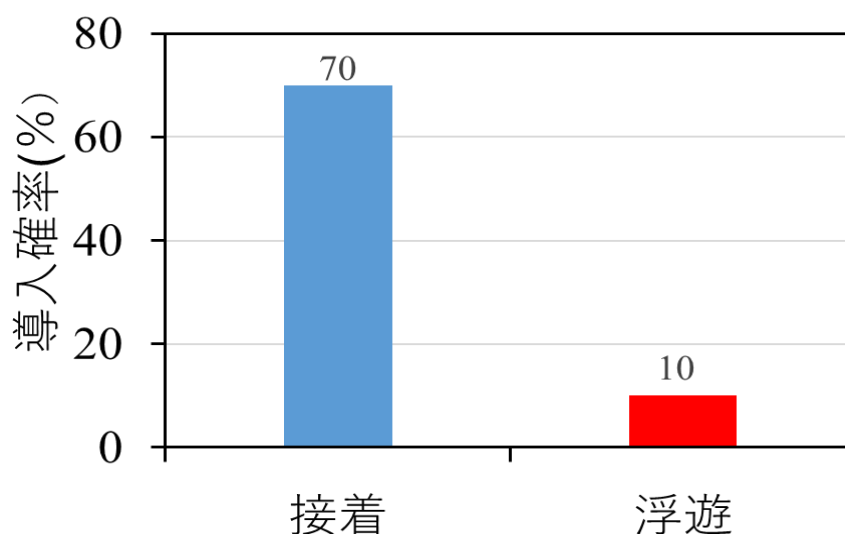


図3-2 細胞接着の有無と蛍光分子導入確率の依存性（接着 $n = 30$,浮遊 $n = 10$ ）

図3-3に接着、浮遊状態のそれぞれ細胞において、レーザー照射前を紫、照射前をととして蛍光画像を重ね合わせた図を示す。浮遊状態の細胞において、レーザー照射後に位置が変化している様子が観察された。一方、接着状態の細胞では、赤と緑が重なって白色になっていることから、レーザー照射前後で位置変化はないことがわかった。また先行研究における高速カメラの観察によって、接着状態の細胞では照射後、細胞膜が変形している様子が観察されたのに対し、浮遊細胞では明確な変形は見られず細胞の移動がみられたことが報告されている^[3,14]。

これらのことから、浮遊状態の細胞ではキャビテーションバブルの膨張・収縮に伴う応力波の作用により細胞そのものが移動してしまい、膜の変形量が小さいことが考えられる。すなわち、浮遊状態の細胞と接着状態の細胞にフェムト秒レーザー誘起衝撃力を作用させる時、細胞に対する応力波の作用が接着状態の

細胞では膜変形に使われた一方、浮遊状態の細胞では細胞の移動に使われたことが示唆された。

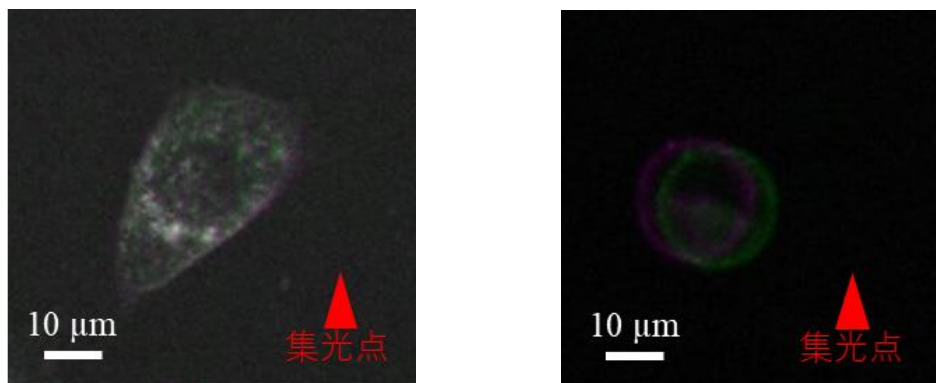


図3-3 レーザー照射前後の蛍光画像の重ね合わせ（左図:浮遊、右図:接着）

照射するレーザーパルスのパルスエネルギーを300 nJ、600 nJ/pulseに増加して、同様に浮遊状態の細胞で実験を行い、150 nJ/pulseでの実験も含めてパルスエネルギーごとの ΔI をヒストグラムにした結果を図3-4に示す。また図3-5に各照射条件での導入確率を示す。

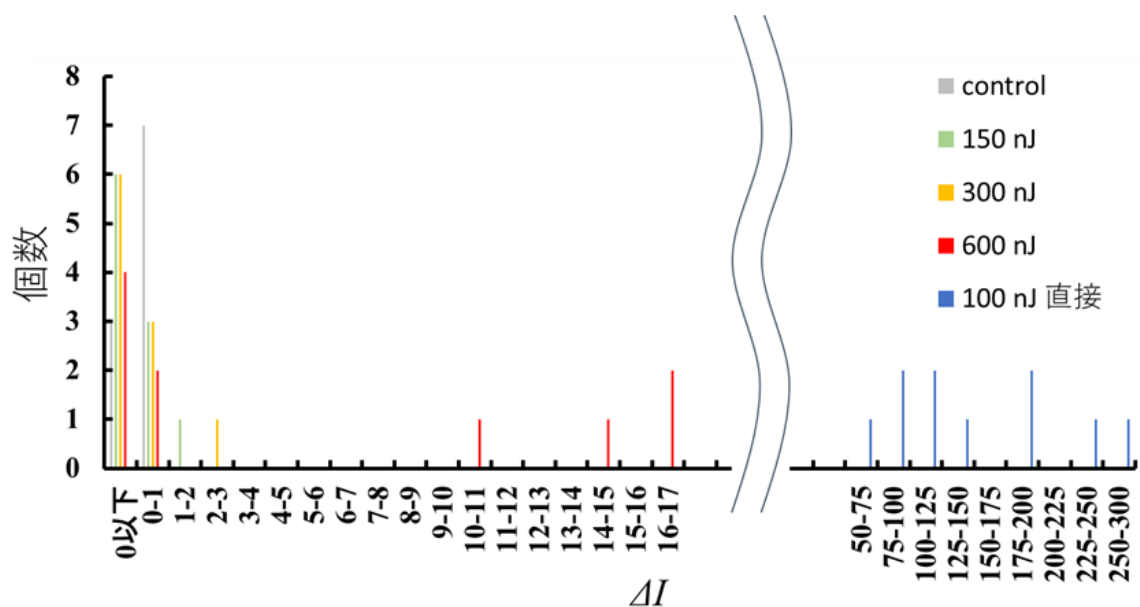


図3-4 各照射条件における浮遊細胞の蛍光分子導入量のヒストグラム

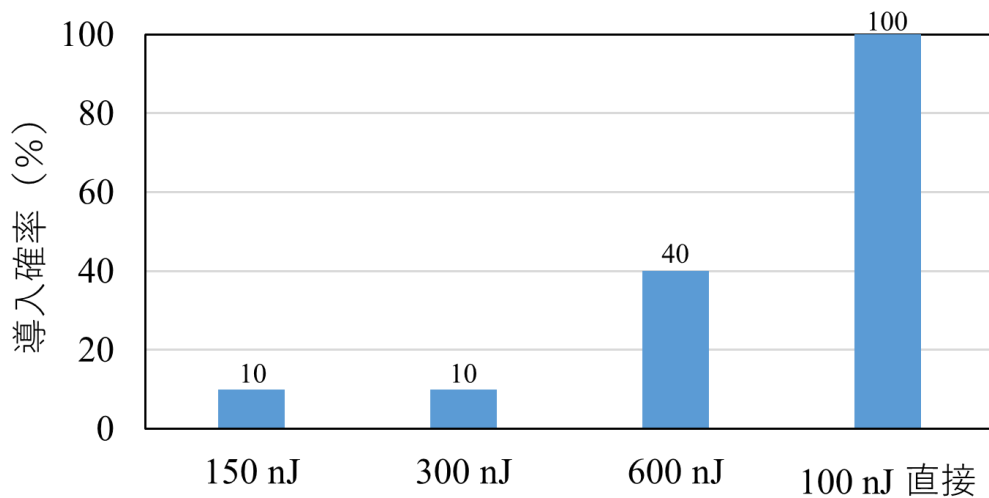


図3-5 各照射条件における浮遊細胞の蛍光分子導入確率
(各n=10)

図3-4および図3-5によると、150 nJから300nJ/pulseにパルスエネルギーを増加させても、導入確率はともに10%のままであった。また600 nJ/pulseまで増加させると、導入確率は40%まで上昇したが、図3-2で接着状態の細胞が150 nJ/pulseで70%であったことを考えると、依然低い値であった。

また浮遊細胞ではトリプシン処理によって細胞膜に小孔が形成し、フェムト秒レーザー誘起衝撃力を作用させる前に、既に細胞内にFM1-43が飽和している可能性も考えられる。そこで100 nJ/pulseの弱いレーザーパルスを浮遊状態の細胞に直接照射して ΔI を算出したところ、導入確率は100%で、 ΔI の値も非常に高い値を示したことから、浮遊細胞でFM1-43が飽和していた可能性は排除された。

3-4 考察およびまとめ

接着状態と浮遊状態の細胞に、パルスエネルギーを150 nJ/pulse、細胞とレーザー集光位置の距離20 μm の照射条件でフェムト秒レーザー誘起衝撃力を作用させると、同じ照射条件で接着状態の細胞に衝撃力を作用させた場合と比べて浮遊細胞の導入確率が大きく低下した。

この要因について、レーザー集光点で発生した衝撃波とキャビテーションバブルは、接着、浮遊の状態に関わらず同様に接触するので、衝撃波やキャビテーションバブルの界面接触による化学的作用の小孔形成への寄与は小さいと考えられる。図3-3に関して議論したように浮遊状態と接着状態の細胞にフェムト秒レーザー誘起衝撃力が作用した場合、細胞に対する応力波の作用強度に差が生

じていることが示唆されており、応力波の作用強度の差による細胞膜の変形量の違いが、小孔形成に起因する分子導入量に差をもたらしたと考えられる。すなわちキャビテーションバブルの膨張・収縮に伴う応力波の力学的作用が小孔形成の主な原因であることが本実験により見出された。

第4章 パルス数の変化やパルス間隔が形成される小孔のサイズや修復時間に与える影響の調査

4-1 はじめに

前章において、細胞膜の孔の形成にはキャビテーションバブルの膨張・収縮による応力波の作用が重要であると見出した。複数パルス照射の場合は、各パルスによって生じるキャビテーションバブルの応力波が繰り返し作用することになる。また後述するように、パルス間隔によってはキャビテーションバブルとガスバブルの相互作用も生じている。本章では、これらの作用が細胞膜に形成する孔の挙動にどのように作用するかを調査した。

4-2 実験方法

C2C12が70～80%コンフルエント状態になったφ12 ガラスボトムディッシュを、2-4-1で記した方法で用意した。ガラスボトムデッシュ中の培養時の培地 (DMEM) を取り除き、FM1-43が実験用の培地中 (フェノールレッド不含、FBS、HEPES 含有のDMEM) に5 μ Mとなるよう調製した溶液を、400 μ Lガラスボトムディッシュに加えた。培養時のDMEMと実験時のDMEMの組成が異なるのは、DMEM にはフェノールレッド (吸収波長432 nm) が含まれており励起光を吸収し蛍光を発する可能性があるためである。FM1-43溶液を添加後、細胞膜と相互作用するまでCO₂ インキュベーター内で30 分程度培養し、細胞試料とした。30分後、2-3で述べた倒立顕微鏡上に設置した。CO₂ インキュベーターから取り出してからの実験時間は1 時間以内に統一した。レーザーの条件はパルスエネルギーをND フィルターにより150 nJ/pulseに設定し、細胞とレーザー集光位置の距離は20 μ mに固定した。パルス数は各実験条件に合わせて、機械式シャッターにより1、2、4、8 pulseのレーザーを切り出し液中に集光照射した。パルス間隔も4 ms、30 ms、500 ms、10 sec、50 secと変化させた。蛍光画像は波長473 nm のCW DPSS レーザーで励起して観察した。励起レーザーのパワーはND フィルターにより1 mWに、露光時間を500 ms に設定して蛍光画像を観察した。

4-3 パルス数やパルス間隔が形成される小孔のサイズに与える影響

図4-1にパルス間隔4 msで2 pulseのレーザーを、細胞とレーザー集光位置の距離20 μm の条件で照射した時を、高速カメラによって観察した画像を示す。1 pulse目のキャビテーションバブルが崩壊後、細胞膜上に残ったガスバブルが2 pulse目のキャビテーションバブルと相互作用している様子が観察された。

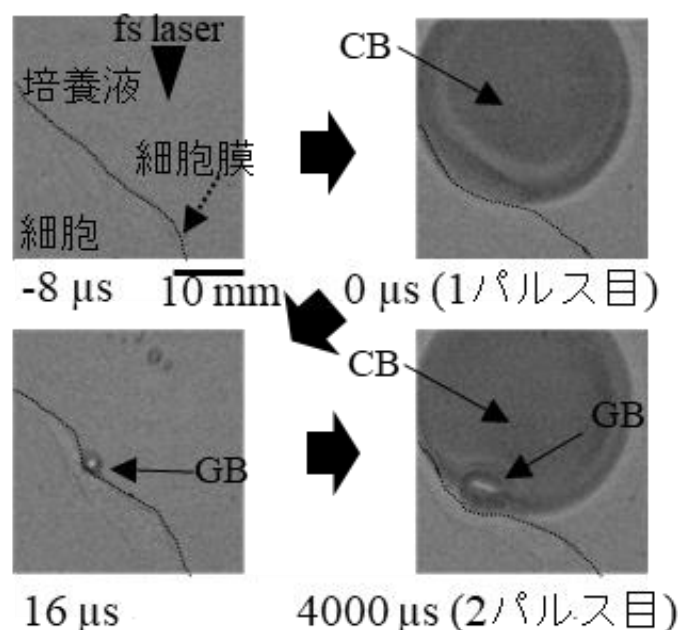


図4-1 細胞近傍に4 ms間隔で集光した2発のフェムト秒レーザーパルスが誘起するキャビテーションバブルとガスバブルの相互作用の高速イメージング

次に、パルス間隔4 msで1、2、4、8 pulseとパルス数を増加させて衝撃力を細胞へ作用させた時の、FM1-43の導入量を比較した結果を図4-2に示す。横軸に照射パルス数、縦軸に ΔI をとり、各照射条件において該当する ΔI の値の細胞を黒点で示している。 ΔI の算出方法は3-3と同様に行った。図4-2によると、パルス数の増加に伴って蛍光分子の導入量が極端に高い細胞の頻度が増加する傾向が観測された。パルス数の増加に伴ってガスバブルとキャビテーションバブルの相互作用が生じる確率も増加することから、このような相互作用により小孔のサイズが増加する可能性が示された。

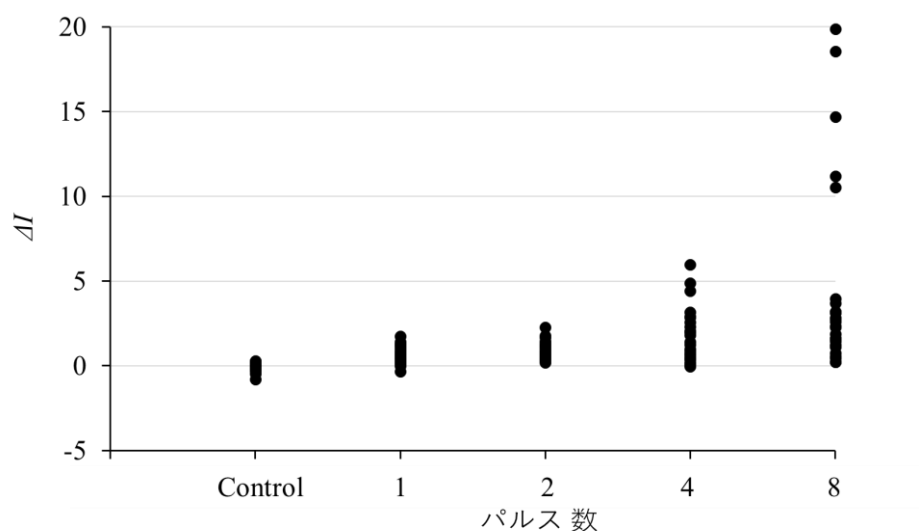


図4-2 パルス数増加による蛍光分子導入量の変化
(各n=30)

次に、図4-3に照射パルス数を2パルスに固定し、パルス間隔を4 ms、30 ms、500 ms、10 secと変化させた時の導入量を4-2と同様に比較した。図4-3から、パルス間隔がガスバブルの存在時間に近いほど、蛍光分子の導入量が増加する傾向がみられた。この結果はキャビテーションバブルとガスバブルの相互作用によってより小孔のサイズが上昇することを支持している。

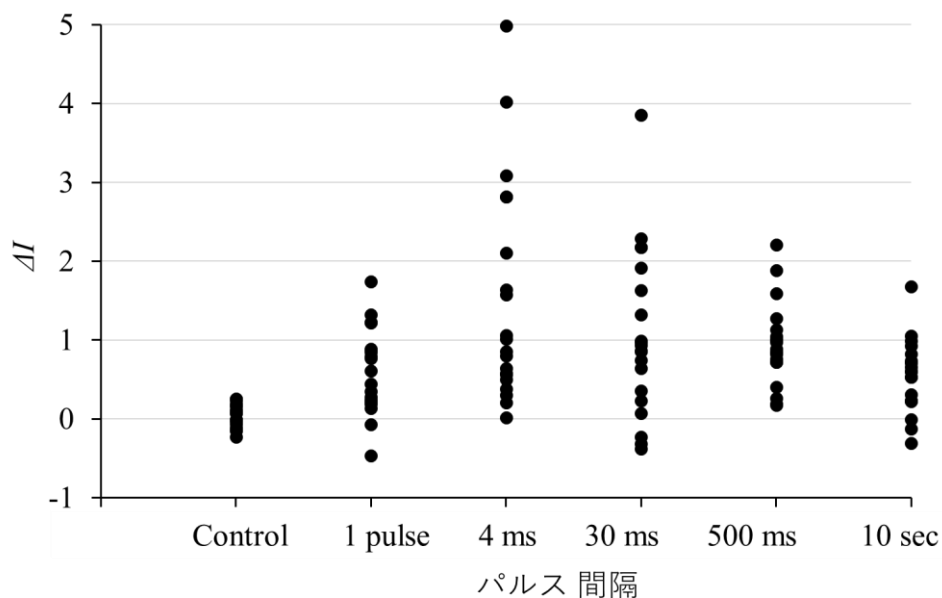


図4-3 パルス間隔変化による蛍光分子導入量の変化
(各n=20)

4-4 パルス数やパルス間隔が形成される小孔の修復時間に与える影響

4-3と同様にパルス数を変化させる実験を行い、レーザー照射後から10秒毎に120秒経過まで蛍光画像を取得した。得られた各蛍光画像から、 ΔI 算出することで、レーザー照射後から120秒までの蛍光分子の導入量の時間変化を調べた。

図4-4にその結果を示す。図4-4をみると、レーザー照射後120秒後の ΔI は、図4-2に示したように、パルス数の増加に伴い大きくなる傾向にあるが、パルス数に関係なく、120秒で ΔI の値がほぼ一定となった。そこで、各パルス数における照射120秒後までの ΔI の変化の挙動を分かりやすくするため、各パルス数において120秒後の ΔI を1とした、グラフをノーマライズして再び作製した。これを図4-5に示す。図4-5をみると全てのパルス数で、ほぼ同じ挙動を示した。

以上のことから、パルス数を増加させて小孔のサイズを増加させても、小孔は生じたサイズに対して同じ割合で修復されることが示唆された。

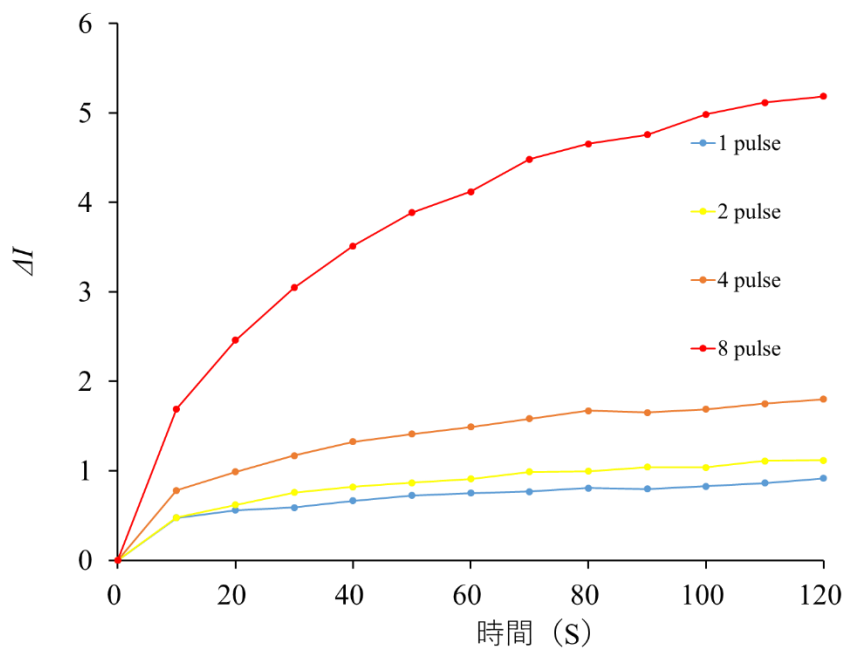


図4-4 各照射パルス数における蛍光分子の導入量の時間変化
(1pulse n=15, 2 pulse n=14, 4pulse n=12, 8 pulse n=18)

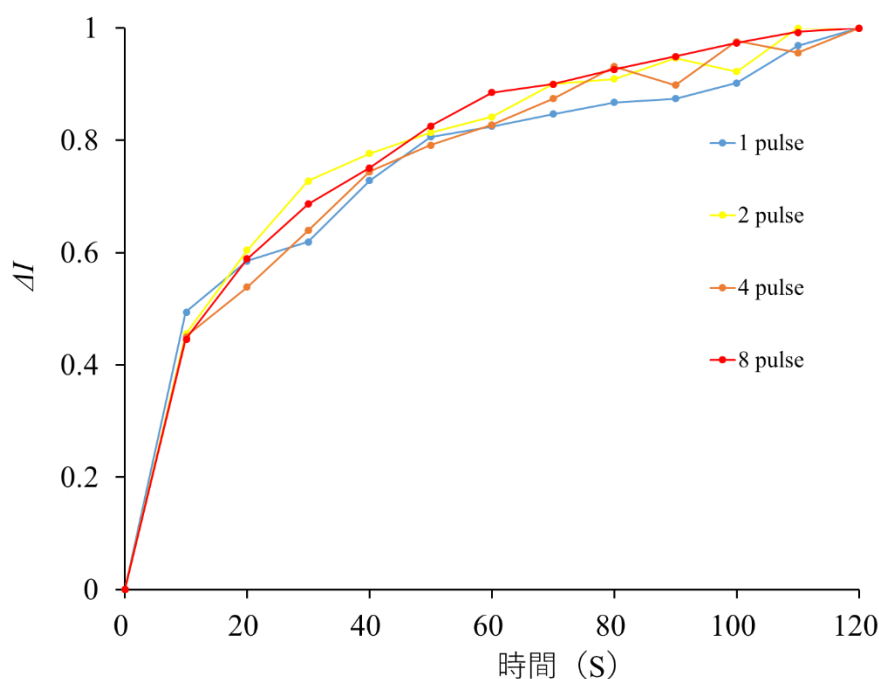


図 4-5 120 秒後の ΔI で規格化した図 4-4 の時間変化

次に、パルス間隔を変化させて行った実験についても、同様に照射後 120 秒後までの ΔI を算出し、蛍光分子の導入量の時間変化を調べた。その結果を図 4-6 に示し、図 4-5 同様ノーマライズを行ったものを図 4-7 に示す。図 4-3 に示したように、レーザー照射後 120 秒後の ΔI は、パルス間隔が短いほど大きくなる傾向にあるが、パルス間隔に関係なく、120 秒で ΔI の値がほぼ一定となった。一方で、図 4-7 をみると、パルス間隔 10 sec のものだけが、0~20 秒の間で、 ΔI の増加割合が大きくなった。以上より、10 sec のパルス間隔では、120 秒後の ΔI の値は 4 ms~500 ms より小さくなるので、小孔の大きさはこれらより小さくなるが、小孔が生じている時間が長くなることが示唆された。

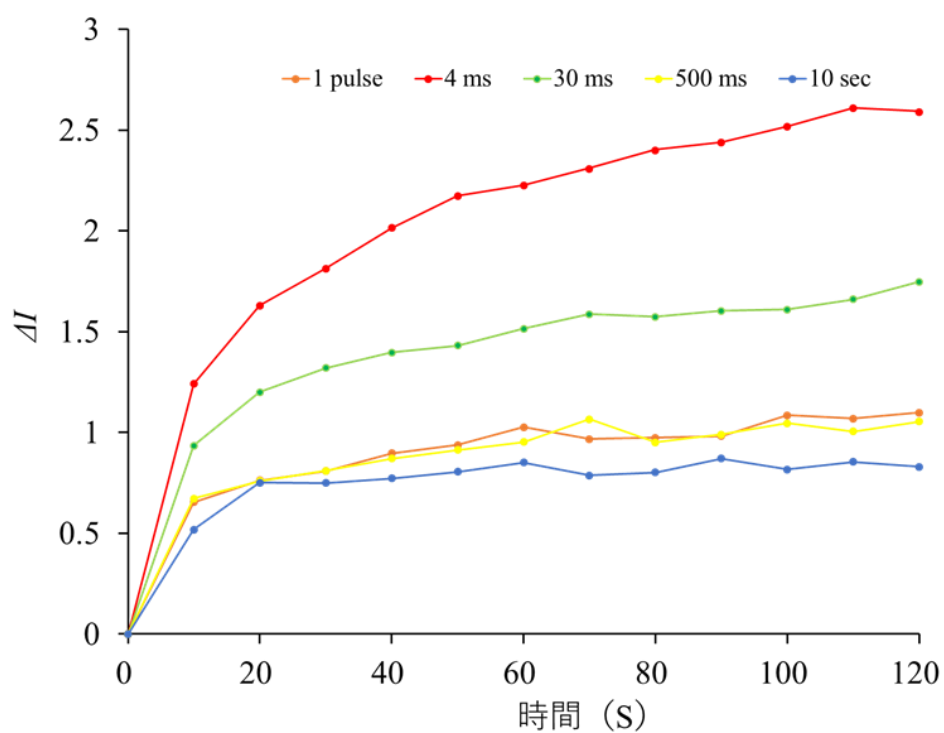


図 4-6 各パルス間隔における蛍光分子の導入量の時間変化
(1pulse n=8, 4 ms n=9, 30 ms n=9, 500 ms n=9, 10 sec n=5)

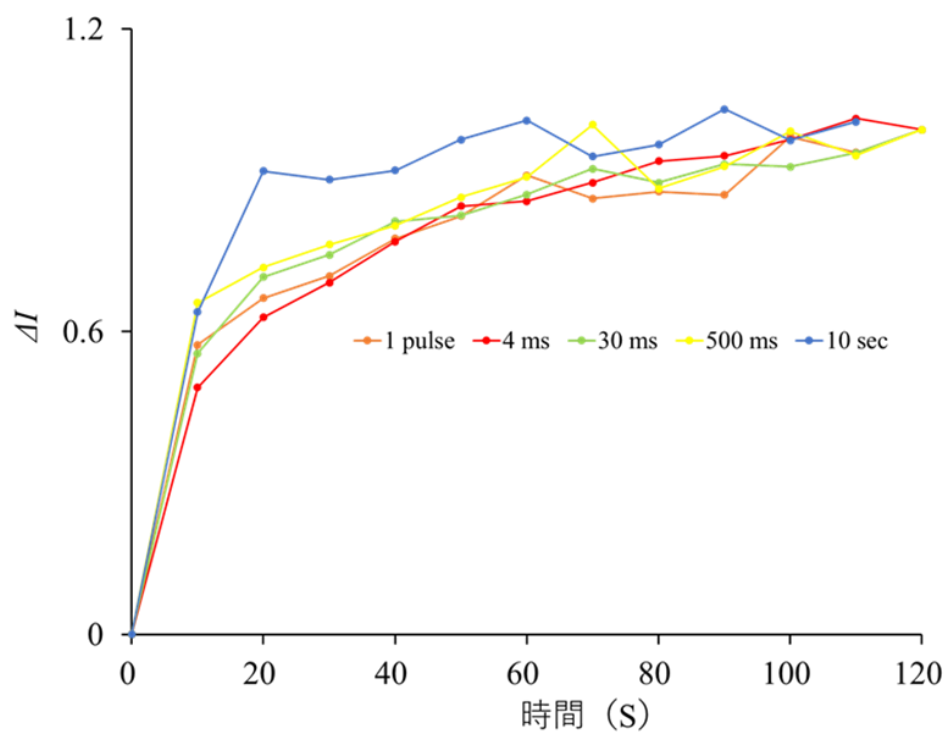


図 4-7 120 秒後の ΔI で規格化した図 4-6 の時間変化

4-5 パルス間隔 10 sec で複数パルス照射による小孔の維持

8 pulse をパルス間隔 10 sec で照射した場合の蛍光分子導入量の時間変化を、4-5 同様 ΔI を算出して調べた。その結果を図 4-8 に、さらに図 4-5 同様ノーマライズした結果を 4-9 に示す。なお、比較として 4-5 の 8 pulse をパルス間隔 4 ms で照射した場合のグラフも併せて表示している。図 4-8 をみると、パルス間隔 10 sec で 8 pulse のほうが照射後 120 秒後の ΔI は小さくなったが、4 ms の時と同様、照射 120 秒後で ΔI の値は一定となった。ここで図 4-9 をみると、パルス間隔 10 sec の場合は照射している間は緩やかに上昇し続けた。この結果から、パルス間隔 10 sec でレーザーパルス照射し続けることで、小孔のサイズは増加しないが、小孔が常に維持されることが示唆された。

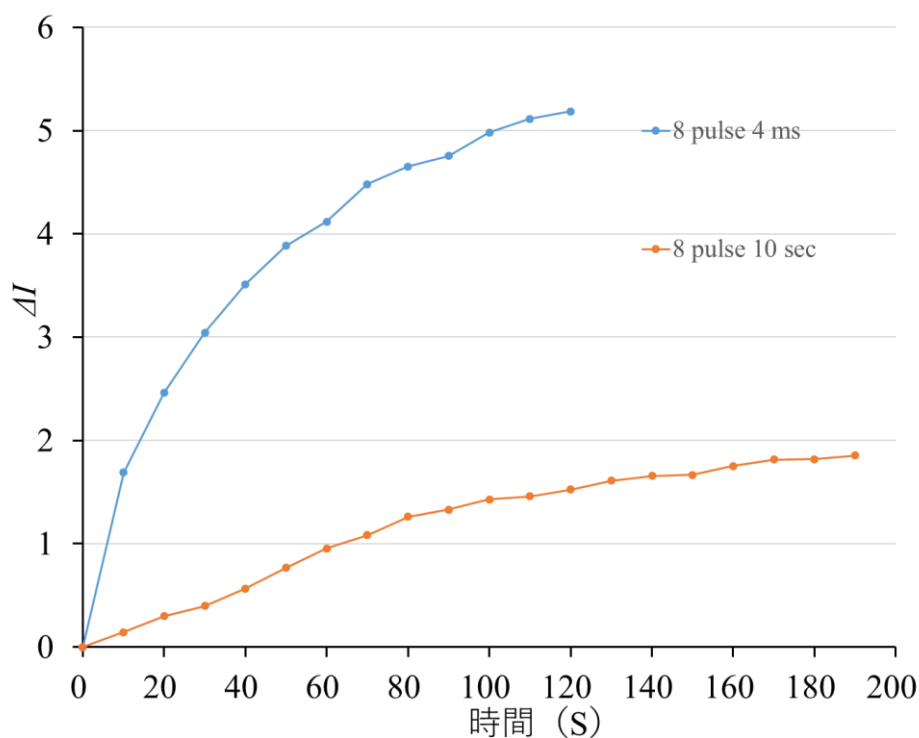


図 4-8 8 pulse 照射における、異なるパルス間隔での蛍光分子導入量の時間変化の比較(8 pulse 4 ms n=18, 8 pulse 10 sec n=10)

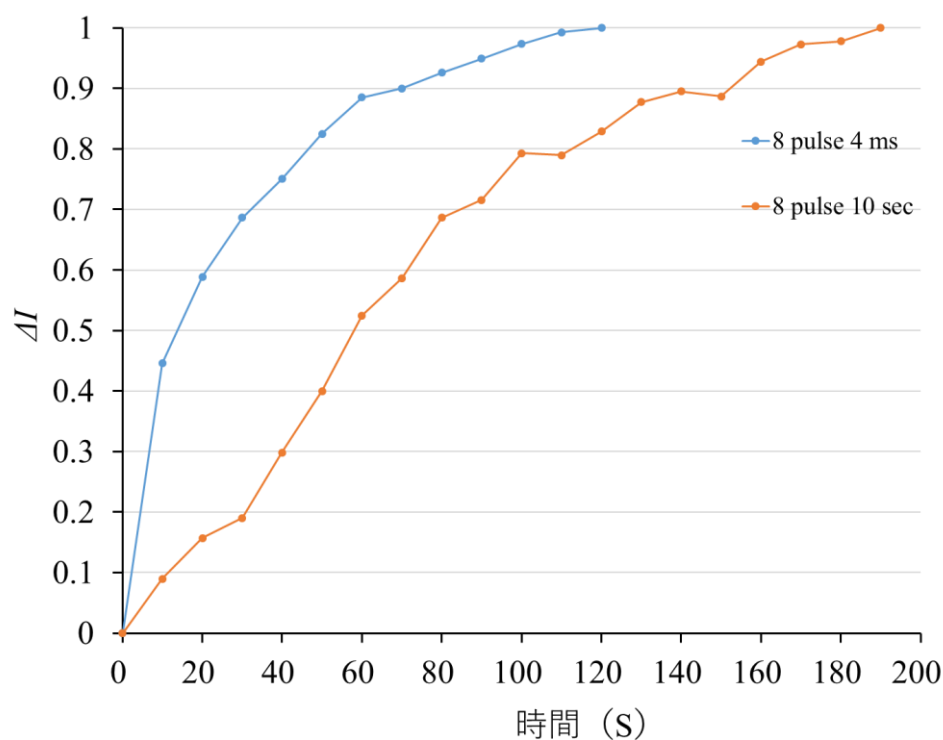


図 4-9 測定 of 最終時間における ΔI で規格化した図 4-8 の時間変化

4-6 パルス間隔 50 sec の照射による小孔の再形成

パルス間隔 50 sec で 2 pulse で照射した場合の蛍光分子導入量の時間変化を、4-5 同様 ΔI を算出して調べた。その結果を図 4-10 に示す。1 pulse 目の照射から 50 秒で ΔI の上昇が緩やかになってきたところに、2 pulse 目のレーザーが照射されることで、再び ΔI の増加速度が大きくなったのが分かった。この結果から、50 sec で 2 pulse 照射することで、一度修復された小孔が再び生じるのが示唆された。

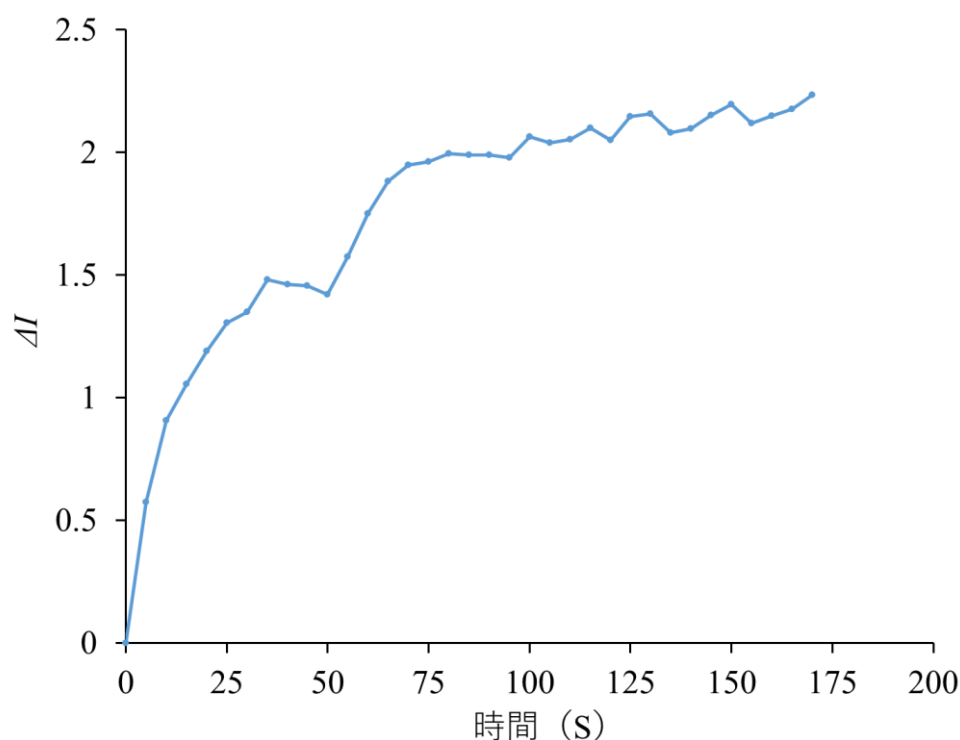


図 4-10 パルス間隔 50 sec での蛍光分子導入量の時間変化 (n=6)

4-7 考察・まとめ

複数パルス照射によってフェムト秒レーザー誘起衝撃力を作用させると、高速カメラによってキャビテーションバブルとガスバブルの相互作用が観察された。さらに、パルス数増加に伴って蛍光分子導入量が極端に増加する場合はみられた。このようなバブルの相互作用について、ナノ秒レーザーパルスで誘起させた2つのバブルが相互作用することで、ジェット流が生じるという報告がなされている^[15]。本実験においても、キャビテーションバブルとガスバブルの相互作用によってジェット流が生じている可能性が考えられ、パルス数が多いほど2つのジェット流が生じる確率と回数が多くなり、小孔のサイズの増加に繋がったと考えられる。パルス間隔を変化させた実験においては、パルス間隔が短いほど蛍光分子の導入量が増加し、500 ms や 10 sec のパルス間隔においては殆ど 1 pulse と差がなかった。これは、ガスバブルの存在時間はミリ秒単位であるので、パルス間隔が長くなると、2 pulse 目のキャビテーションバブルが発生する前にガスバブルが消滅もしくは消滅し始めており、上記の相互作用が起きにくいからであると考えられる。

一方で、蛍光分子の導入量の時間変化をみると、パルス間隔が 500 ms までの長さであれば、パルス数やパルス間隔を変化させても 120 秒程度で ΔI がほぼ一定となり、ノーマライズしたグラフをみると各条件の 120 秒後の ΔI の値に対して同じ割合で ΔI が増加しているのがわかった。これらのことから、小孔のサイズを増加しても、小孔は生じたサイズに対して同じ割合で修復されることが示唆された。よって、パルス数やパルス間隔によって小孔のサイズを増加させても、それに比例して細胞へのダメージは増加しないことが示唆された。

また 10 sec のパルス間隔で照射し続けることで、照射している間は ΔI が緩やかに上昇し続けた。さらにこの場合でも照射後 120 秒では ΔI がほぼ一定となった。この結果から、10 sec のパルス間隔の照射の場合は小孔のサイズの増加はしないが、照射し続けることで常に小孔が維持されることが示唆された。さらに、このように小孔が長い時間維持された場合でも、修復される時間は変わらないことが示唆された。

さらにパルス間隔 50 sec で 2 pulse 照射した場合、1 pulse 目の照射から 50 秒で ΔI の上昇が緩やかになってきたところに、2 pulse 目のレーザーが照射されることで、再び ΔI の増加速度が大きくなったのが分かった。この結果から、50 sec で 2 pulse 照射することで、一度修復された小孔が再び生じるのが示唆された。

以上をまとめると、パルス間隔を 4 ms 以下にして複数パルス照射することで、キャビテーションバブルとガスバブルの相互作用によって細胞膜に生じる小孔のサイズが増加し、逆にパルス間隔を 10 sec や 50 sec など長くすることで、小孔の維持や再形成が起きることが示唆された。また、このように照射条件によって、小孔のサイズや維持時間が変化しても、小孔の修復時間は大きく変化せず細胞のダメージへの影響は小さいと思われる。

第5章 高分子 FITC dextran の導入

5-1 はじめに

第 3,4 章まで、蛍光分子 FM1-43 の細胞内への分子導入挙動から、フェムト秒レーザー誘起衝撃力によって形成される細胞膜上の小孔について議論した。この章では、高分子である FITC dextran の細胞内の導入も調査したため報告する。

5-2 実験方法

C2C12 が 70~80%コンフルエント状態になった $\phi 12$ ガラスボトムディッシュを、2-4-1 で記した方法で用意した。ガラスボトムデッシュ中の培養時の培地 (DMEM) を取り除き、分子量 20,000 の FITC dextran を PBS 中に $0.5 \mu\text{M}$ となるよう調製した溶液を、 $50 \mu\text{L}$ ガラスボトムディッシュに加えた。(3,4 章で加えた液量より少ないのは、FITC dextran の発する蛍光が FM1-43 より強く、液量が多いと鮮明なコントラストの蛍光画像が取得できないためである。)そして、ガラスボトムデッシュを 2-3 で述べた倒立顕微鏡上に設置した。レーザーの条件はパルスエネルギーを ND フィルターにより 150 nJ もしくは 300 nJ/pulse に設定し、パルス間隔は 4 ms で細胞とレーザー集光位置の距離は $20 \mu\text{m}$ に固定した。パルス数は機械式シャッターにより 1 もしくは 2 pulse のレーザーを切り出し液中に集光照射した。蛍光画像は波長 473 nm の CW DPSS レーザーで励起して観察した。励起レーザーのパワーは ND フィルターにより 1 mW に、露光時間を 500 ms に設定して蛍光画像を観察した。

5-3 レーザー照射前後の蛍光画像

図 5-1 にレーザー照射前後の蛍光画像を示す。レーザー照射前は FITC dextran が培養液中で蛍光を発し、その蛍光の中で細胞が影のように存在していた。レーザー照射後 FITC dextran が細胞内に導入されると、蛍光の中に細胞が溶け込むような形で、細胞全体の蛍光強度の上昇がみられた。このレーザー照射前後の蛍光画像から、3-3 示した式①から ΔI を算出し、3-3 同様に各照射条件における導入確率と導入量を調べた。

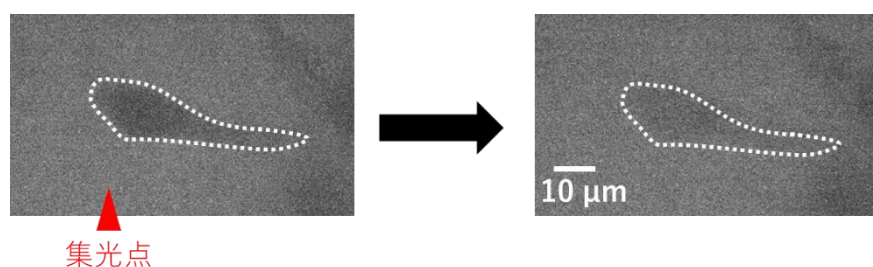


図 5-1 FITC dextran 添加時のレーザー照射前後の蛍光画像

5-4 導入確率および導入量

図 5-2 に、各レーザー照射条件で算出した ΔI をヒストグラムにしたものを示す。150 nJ/pulse では、1 pulse、2 pulse とともに導入がみられず、パルスエネルギーを 300 nJ/pulse にすると、1pulse、2 pulse とともに導入がみられたものの、両者の間に導入確率および導入量に殆ど差はなかった。

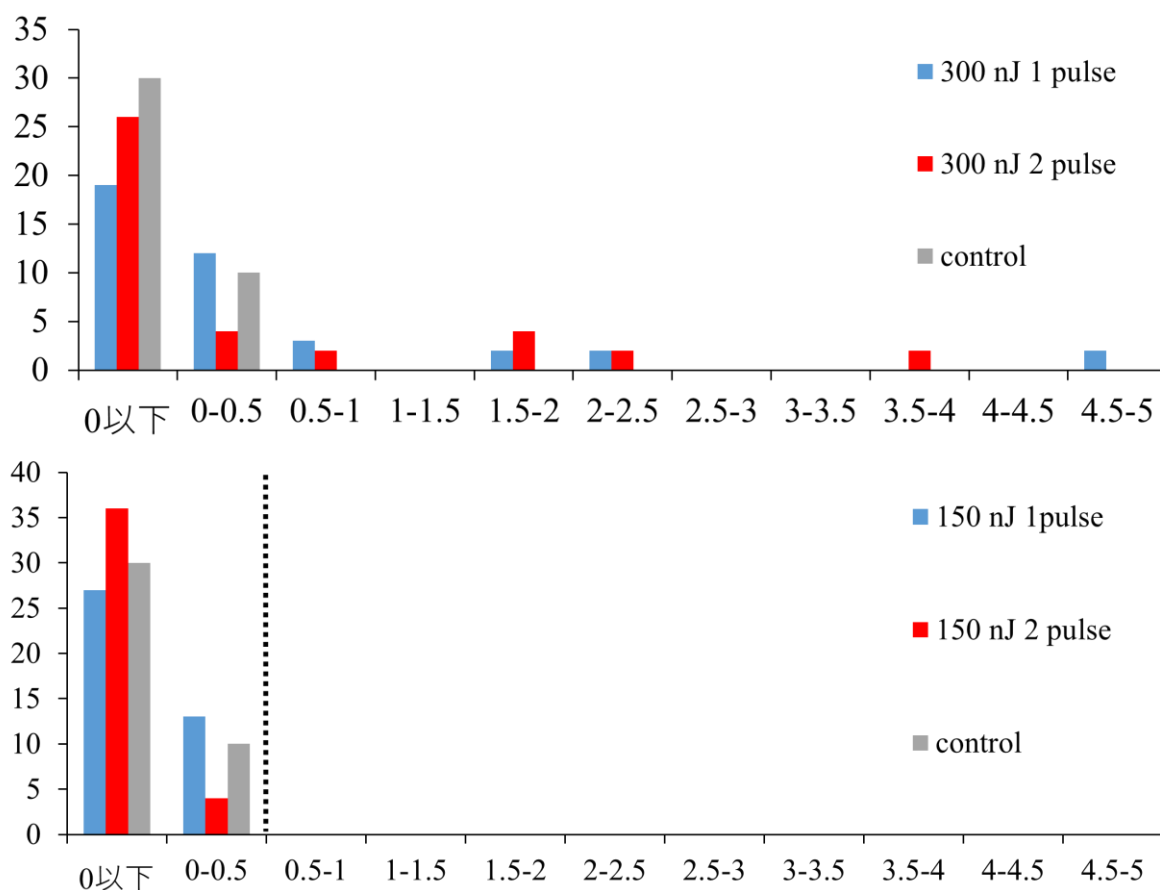


図 5-2 各照射条件における FITC dextran の導入量のヒストグラム
(各 n=40)

5-5 考察・まとめ

4-3 では、パルス間隔 4 ms で複数パルス照射することで、2 つのバブルの相互作用から小孔の増加を示唆したが、今回の結果ではこのような複数パルスによる効果が得られなかった。このことは、FM1-43 と FITC dextran との粒子径の大きさと、分子の荷電状態が影響していると考えられる。3、4 章で使用した FM1-43 の構造式から類推される粒子径は 2~3 nm であり、さらに 2-4-2 で説明したように FM1-43 は細胞外膜に結合することから、細胞膜と逆のプラスの電荷を帯びている。一方、分子量 20,000 の FITC dextran の粒子径は 6 nm 程度であるとされ^[16]、細胞膜と同じマイナスの電荷を帯びており、細胞膜と反発した状態で液中に存在している。これらのことから、4-3 でみられたような複数パルスの効果が得られなかったと考えられる。一方、300 nJ/pulse では 1 pulse でも FITC dextran の導入がみられたことから、細胞膜の小孔の形成において、4-3 で示唆した複数パルス照射による効果よりも、パルスエネルギーの増加による効果による効果のほうが寄与が大きいといえる。

第6章 総括

フェムト秒レーザーを液中に集光照射すると、多光子吸収などに起因する急激な圧力上昇の緩和により、衝撃波が発生し、キャビテーションバブルの膨張と応力波の伝搬が誘起される。さらにキャビテーションバブルの崩壊の後、ガスバブルが発生する。本研究では、この一連の現象によるフェムト秒レーザー誘起衝撃力を単一細胞の操作技術として応用するため、衝撃力の作用により形成される細胞膜上の小孔形成を蛍光分子の導入効率や導入量から評価した。

基板に接着していない浮遊状態の細胞では、接着している細胞より蛍光分子の導入確率が大きく下がった。また、レーザー照射後に浮遊状態の細胞の位置が変化しており、接着状態の細胞と比べ応力波の作用強度に差が生じていることが分かった。以上から、細胞膜の小孔形成において、衝撃波やキャビテーションバブルの界面接触による化学的作用の寄与は小さく、キャビテーションバブルの膨張・収縮に伴う応力波の作用が重要であることが見出された。

複数パルスを集光照射すると、1 pulse目のキャビテーションバブルの1 pulse目のキャビテーションバブルが崩壊後、細胞膜上に残ったガスバブルが2 pulse目のキャビテーションバブルと相互作用している様子が高速カメラによって観察された。この相互作用による小孔の形成のサイズの増加が、集光照射するパルス数やパルス間隔を変化させた時の、蛍光分子の導入量の極端な上昇によって示唆された。

蛍光分子の導入量の時間変化を調べると、蛍光分子の導入量がパルス数やパルス間隔といった照射条件に関わらず、照射後からすべて同じ時間でほぼ一定になっていることがわかった。この結果から、照射条件によって、小孔のサイズが変化しても、小孔の修復時間は大きく変化せず細胞のダメージへの影響は小さいと思われる。

また、パルス間隔 10 sec で照射し続けると、照射している間は導入量が緩やかに上昇し続けた。この結果から、10 sec のパルス間隔の照射の場合は小孔のサイズの増加はしないが、照射し続けることで常に小孔が維持されることが示唆された。さらに、このように小孔が長い時間維持された場合でも、修復される時間は変わらないことから、細胞へのダメージへの影響は小さいと示唆された。また 50 sec というさらに長いパルス間隔では、一度修復された小孔が再び生じたのが示唆された。

一方で、導入する蛍光分子を高分子の FITC デキストランに変えて実験におい

ては、複数パルス照射しても細胞内への導入がみられなかった。またパルスエネルギーを倍にすると導入がみられたものの、FM1-43 でみられたような複数パルス照射による導入量の増加はみられなかった。

以上本研究では、照射するレーザーのパルス数やパルス間隔、細胞の接着状態などに依存する小孔形成の挙動を蛍光分子の導入から調査した。衝撃力の発生過程において、小孔形成に最も寄与するのは衝撃波の伝搬とキャビテーションバブル膨張・収縮に伴う応力波の作用であり、パルス数やパルス間隔を変化させることで、キャビテーションバブルとガスバブルの相互作用による小孔サイズの増加や、小孔の維持、再形成などが示唆された。また小孔のサイズや維持される時間にかかわらず、細胞へのダメージへの影響は小さいことが示唆された。これらの結果は、フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した細胞操作技術における細胞損傷・細胞刺激に関する基礎的な知見となることに加え、細胞膜の物理特性測定への応用も期待される。また、フェムト秒レーザー衝撃力による小孔形成を細胞への分子導入技術として利用する際には、FITCデキストランを用いた導入実験から、高分子の導入への利用には向かないと考えられる。しかしながら、低分子のFM1-43においては上記で記したように、照射するレーザーのパルス数やパルス間隔を変化させることによって、細胞への導入挙動をコントロール出来ることが示唆された。よって、低分子に特化した分子導入技術としては、フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した分子導入技術の開発は発展の余地あるといえる。

参考文献

- [1] 藤田克昌. 超解像顕微鏡の進展, 生物物理,**50**, 174-179,2010.
- [2] Arthur Ashkin, Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers, PNAS, 94, 10, 4853-4860, 1997.
- [3] 押川悠城. フェムト秒レーザー誘起衝撃力に対する単一動物細胞のカルシウム応答解析, 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文, 2018.
- [4] 植栗陽一. フェムト秒レーザー誘起衝撃力による細胞内 pH 変化の誘導, 修士論文, 2019.
- [5] 飯野敬矩. フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した細胞間接着の定量化に関する研究, 奈良先端科学技術大学院大学 博士論文, 2013.
- [6] 萩原宏規. フェムト秒レーザー誘起衝撃力を用いた超高速細胞分取に関する研究, 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文, 萩原宏規.
- [7] 増原宏, 細川陽一郎. “レーザーが拓くナノバイオ”, 化学同人, 2005.
- [8] 渡辺歴, 伊東良一. 超短パルスレーザーによる透明材料・細胞内部プロセスング, レーザー研究, **35**, 101 -102, 2007.
- [9] 小柳朱里. 細胞近傍へのフェムト秒レーザー照射による分子導入方法の開発, 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文, 2019.
- [10] David A Richards, Ji hong g Bai & Edwin R Chapman. Two modes of exocytosis at hippocampal synapses revealed by rate of FM1 -43 efflux from individual vesicles. *The Journal of Cell Biology* **168**, 929 -939 ,2005.
- [11] 君 付 隆 , 小 宗 静男, Jonathan F.Ashmore. モルモ ッ ト蝸牛内有毛細胞のシナプス小胞動態の光学的計測, *Otol Jpn* **11**,87-91, 2001
- [12] 今村健志,疋田温彦,大嶋佑介,古賀茂宏. 血管新生生体蛍光イメージング解析, 血栓止血誌 **24**,582-587,2013.
- [13] Michihiko Nakamaru, Yasuhiro Masubuchi, Shizuo Narimatsu, Shoji Awazu & Toshiharu Horie. Evaluation of damaged small intestine of mouse following methotrexate administration, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **41**, 98–102, 1997.

[14] 吹田啓介. フェムト秒レーザー誘起衝撃力による単一細胞への分子導入評価, 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文, 2017.

[15] G. N. Sankin, F. Yuan, and P. Zhong. Pulsating Tandem Microbubble for Localized and Directional Single-Cell Membrane Poration, PRL 105, 078101, 2010.

[16] Yuichi Imura, Naoki Choda, and Katsumi Matsuzaki. Magainin 2 in Action: Distinct Modes of Membrane Permeabilization in Living Bacterial and Mammalian Cells, Biophysical Journal, **95**, 5757–5765, 2008.

業績リスト

国際学会・シンポジウム・研究会発表

“Molecular Delivery to Target Cells Driven by Focused Femtosecond Laser Pulses in Water”

Yukihiro Tanaka, Akari Koyanagi, Sohei Yamada, Kazunori Okano, Ryohei Yasukuni, Yoichiroh Hosokawa

2019 Annual Meeting of the Physical Society of Taiwan, 新竹（台湾）, 23 Jan, 2019

"Molecular Delivery to Target Cells Driven by Focused Femtosecond Laser Pulses in Water,"

Yukihiro Tanaka, Akari Koyanagi, Sohei Yamada, Kazunori Okano, Ryohei Yasukuni and Yoichiroh Hosokawa

M&BE2019, 奈良春日野国際フォーラム（奈良市）, 26 Jun. 2019

国内学会・シンポジウム・研究会発表

"フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した細胞への分子導入における複数パルス照射効果"

田中幸宏, 山田壮平, 岡野和宣, 安國良平, 細川陽一郎

第 80 回応用物理学会秋季学術講演会, 北海道大学（札幌）, 2019 年 9 月 19 日

"フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した、標的細胞への分子導入"

田中幸宏, 小柳朱里, 山田壮平, 岡野和宜, 安國良平, 細川陽一郎

OCU 先端光科学シンポジウム, 大阪市立大学（大阪市）, 2019 年 10 月 29 日

謝辞

本研究は奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科物質創成科学専攻生体プロセス工学研究室にて行われました。本研究の遂行にあたり多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました。ここに、すべての方々に心より厚く御礼申し上げます。

本研究科 教授 細川陽一郎先生には本研究の全過程において始終懇切丁寧なご指導ご鞭撻を賜りました。また、学生生活においてもご配慮いただきました。心より感謝申し上げます。

本研究科 教授 中村雅一先生には本研究の遂行及び本学位論文の作成にあたり、懇切丁寧なご教示を賜りましたことを心より厚く御礼申し上げます。

本研究科 准教授 香月浩之先生には本研究の遂行及び本学位論文の作成にあたり、懇切丁寧なご教示を賜りましたことを心より厚く御礼申し上げます。

本研究科 准教授 Yalikun Yaxiaer 先生には本研究の遂行及び本学位論文の作成にあたり、懇切丁寧なご教示を賜りましたことを心より厚く御礼申し上げます。

本研究科 准教授 松井貴輝先生には本研究の遂行及び本学位論文の作成にあたり、懇切丁寧なご教示を賜りましたことを心より厚く御礼申し上げます。

本研究室 助教 安國良平先生には実験、論文作成、研究の遂行にあたり、様々な面で親身にご助言を賜りました。心より厚く御礼申し上げます。

本研究室 特任助教 山田壮平先生には実験、論文執筆、研究の遂行にあたり、様々な面で親身にご助言を賜りました。心より厚く御礼申し上げます。

本研究室 博士研究員 岡野和宣博士には実験、論文執筆、研究の遂行にあたり、様々な面で親身にご助言を賜りました。心より厚く御礼申し上げます。

本研究室の先輩である植栗陽一氏、小柳朱里氏、鈴木智之氏、高島喜也氏、名本美寿氏、洪振益氏、Taufiq Indra Rukmana 氏、Dian Anggraini 氏、唐滔氏、張天龍氏、郝彦升氏には研究遂行にあたり、研究遂行及び日々の研究生活に関して様々

なご助言とご協力を賜りました、ここに深く感謝いたします。

本研究室の同期である阿路川雄介氏、井出敬祐氏、竹林竜氏、吉村薫子氏、方超穎氏には研究遂行及び日々の研究生活において大変お世話になりました、ここに深く感謝いたします。

本研究室の後輩である荒木崇志氏、伊藤賢四郎氏、上田勇真氏、杉田龍紀氏、氏、寺西教裕氏、間瀬亮太氏、山本将也氏には研究遂行及び日々の研究生活において大変お世話になりました、ここに深く感謝いたします。

本学研究室 研究技術員 秋田絵理氏には、研究遂行及び日々の研究生活において大変お世話になりました、ここに深く感謝いたします。

本学研究室 秘書 多田敬子氏には事務手続き及び日々の学生生活においてご助力を賜りました、ここに深く感謝いたします。