目 次

1 序論 **2**
1.1 はじめに . . . 2
1.2 細胞について . . . 3
1.2.1 細胞周期の発見 . . . 3
1.2.2 GFP 蛍光色素 . . . 4
1.2.3 細胞周期インディケータ Fucci . . . 4
1.2.4 Fucci を用いた実験例 . . . 6
1.2.5 NIH3T3 細胞 . . . 8
1.2.6 細胞周期解析の意義 . . . 8
1.3 光共振器について . . . 9
1.3.1 光共振器と Q 値 . . . 9
1.3.2 WGM 共振器 . . . 9
1.3.3 微小光共振器を用いた単一ウィルス検出 . . . 10
1.4 本研究の目的 . . . 11

2 理論 **13**
2.1 光共振器 . . . 13
2.1.1 Q 値について . . . 13
2.1.2 光共振器における共振周波数 . . . 14
2.1.3 WGM 共振器を用いた微小粒子検出器 . . . 15
2.2 液中測定に適したファイバの検討 . . . 18
2.3 細胞について . . . 24
2.3.1 核 . . . 24
2.3.2 細胞骨格 . . . 24
2.3.3 ゴルジ体 . . . 25
2.3.4 ミトコンドリア . . . 25
2.3.5 葉緑体 . . . 26
2.3.6 細胞分裂 . . . 26
2.3.7 細胞周期 . . . 27

3 シリカトロイド微小光共振器の液中測定実験 **29**
3.1 シリカトロイド共振器作製手順 . . . 29
3.1.1 XeF ドライエッチング . . . 29
3.1.2 レーザリフロー . . . 30

3.1.3 実験装置 30
3.1.4 実験方法 31
3.1.5 シリカトロイド共振器の作製結果 31
3.2 透過スペクトル測定 33
3.2.1 テーパファイバ作製 33
3.2.2 空気中測定 34
3.2.3 液中測定 35
3.2.4 理想的なテーパファイバの純水中測定 38

4 シリカトロイド共振器上における細胞培養 40
4.1 実験環境 40
4.2 使用した薬品や器具 40
4.2.1 培地 40
4.2.2 PBS(-) 41
4.2.3 トリプシン 41
4.2.4 CO_2 インキュベータ 41
4.3 NIH3T3 細胞の継代方法 42
4.4 細胞接着時間測定実験 44
4.4.1 透過型位相差顕微鏡の原理 44
4.4.2 目的 44
4.4.3 実験方法 45
4.4.4 実験結果 45
4.5 共振器上への細胞培養実験 46
4.5.1 目的 46
4.5.2 実験方法 47
4.5.3 実験結果 48
4.6 Disk 共振器上への追加細胞播種実験 49
4.6.1 目的 49
4.6.2 実験方法 50
4.6.3 実験結果 50

5 結論 52
5.1 液中光学測定 52
5.2 細胞培養 52
5.3 まとめ 52

1　序論

1.1　はじめに

生命というのは大変身近であるにも関わらず, 他のどんな分野の学問よりも未知であふれている. 人類は恒星の年齢を測定して寿命の計算は出来るが, 人の寿命が 80 年であるのにマウスの寿命が 2 年程度しかないことを説明できない.[1] 35 億年前の地球でいったい何が起きて, 生命が誕生したのかを説明できず, ダーウィンの進化論で進化の全てを説明できない. だからこそ生命や細胞に関する研究は人々の心を魅了し, 有史以前から人類は生命に関する説明を宗教的であったりあるいは超自然的な事物を用いて説明し, 知的欲求を埋めることによる安息を得てきた. 細胞生物学はそうしたはるか昔からの人類の知的欲求に, より現実的かつ科学的に答えるために発展してきたと言えよう. 本研究は細胞生物学のさらに基礎的な部分, 細胞周期解析をテーマにおいた. 生物の最小の単位である細胞がどのように増殖, 分化していくのかを知ることはそれを構成する生命体の, 組織, 器官, 構造, 果ては寿命さえも知るための手掛かりとなるかもしれない.

近年になって目覚ましく発展を遂げたとはいえ, 細胞生物学における課題はまだまだ山積みである. 本研究は, そんな人類に課された数多くの課題に対して, 先人たちとは全く違ったアプローチ, すなわち共振器を用いたアプローチをしているところにオリジナリティを持っている. かつての研究者が持っていなかったこの新しい超高感度なセンサーは, 今までとは全く違う形で私たちに生命について数多くのことを教えてくれるだろう. 偉大な先人たちが残した課題に, 私の研究が少しでも貢献出来ればと考えている.

1.2　細胞について

1.2.1　細胞周期の発見

細胞周期とは, 1 つの細胞が成長して 2 つの娘細胞に分裂していく一連の過程である. 細胞周期のなかで順序正しく染色体が複製された後に等分配され, 遺伝的に全く同じ組成からなる細胞のコピーが作られる. 元来, 細胞周期という呼称はこの細胞複製の過程そのものを指していた. しかし現在において細胞周期解析研究の意味するところは, 単なる細胞複製の素過程を知ることだけではなく, その実施を指令しかつその正確さを保障するための細胞制御にまで及んでいる.

20 世紀前半では division stage あるいは mitotic-phase (M 期) と呼ばれた分裂期と, resting stage あるいは interphase と呼ばれた休止期もしくは間期だけしか区別されていなかった細胞周期の過程であるが, Haward と Pelc (1953 年) はマメ科の植物の根の分裂組織において染色体 DNA への ^{32}P の取り込みをオートラジオグラフィで検出しようとして, DNA の合成が起こるのは間期のうちの中間あたりの特定の時期であることを見出した. つまり間期は均一の時期からなるのではなく, DNA 合成前の G1 期 (Gap1)・合成中の S 期 (Synthesis)・合成後の G2 期 (Gap2) という 3 つの異なった位相に分けられるという発見である. これによって M 期→ G1 → S 期→ G2 期→ M 期という位相が初めて認識され, 「細胞周期」(cell cycle)(Fig. 1.1) の概念が成立した. 細胞分裂において染色体が分配される以上, それに先立って染色体が複製されなければならないのは論理的必然であったが, 染色体と DNA の連関に基づいて初めて, 染色体複製の時期が確立されるに至ったわけである.

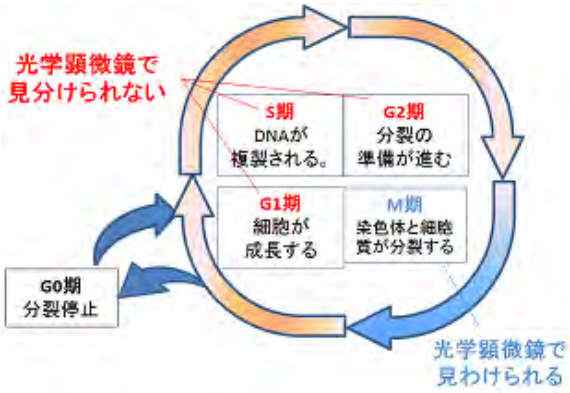

Fig. 1.1:　cell cycle

1.2.2 GFP 蛍光色素

1960 年代の下村 脩 (ボストン大学名誉教授) 博士のよる緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP)(Fig. 1.2)[4, 5]の発見, 単離, 精製に始まり, Martin Chalfie 博士 (コロンビア大学) による GPF の発現, そして Roger Y. Tsien 博士 (カルフォニア大学サンディエゴ校教授) による GFP 開発が, 2008 年にノーベル賞を受賞されたことは記憶に新しい. その恩恵を受けて, 20 世紀後半から 21 世紀にかけて細胞周期の研究は飛躍的に進められ, 細胞に周期が存在することをはじめ細胞分裂について形状的な要素だけでなく, 分子レベルで様々なことがわかってきた. GFP は細胞内の目的タンパク質と融合させて細胞内に発現させることで, タンパク質の細胞内局在や特定細胞の体内分布を観察するためのレポータータンパク質として利用されている. この GFP タンパク質と細胞周期に特異的なタンパク質との融合タンパク質は, 生きた細胞で S 期と G2 期を区別して観察するためのマーカーとして開発されてきた. 例えば, S 期に特異的に発現し DNA 複製に関与する proliferating cell nuclear antigen (PCNA), S 期後期から G2 初期に発現し複製された DNA の結合に関与する DNA ligase 1, そして S 期後期に発現し DNA の 2 重らせんをほどいていく DNA helicaseB などの GFP 融合タンパク質がこれまでに作られてきた. しかし, これらの GFP 融合タンパク質は細胞内で蛍光の発現が微弱で短時間であることが多く, 蛍光シグナル明暗差の検出がしばしば困難であるため, 細胞周期移行を観察するインディケータとして実用性に欠ける.

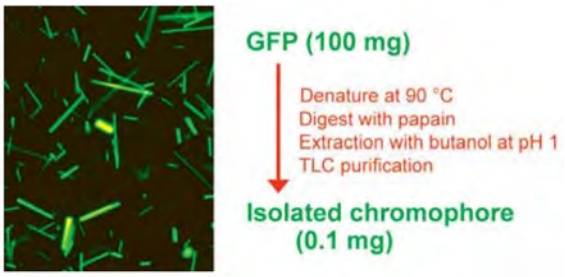

Fig. 1.2: Clrystal of GFP (left), and the figure swows process of isolating the chromophore of GFP (right). (From O. Shimomura, “Discovery of green fluorescent protein, GFP, ” Nobel Lecture, December 8, (2008))

1.2.3 細胞周期インディケータ Fucci

従来までの GFP 融合タンパク質に代わる蛍光タンパク質を用いた細胞周期インディケータ技術として, Fucci(Fluorescent ubiquitinaition-baced cell cycle indicator)

技術[7, 8]が挙げられる．Fucci とは, 蛍光タンパクを用いて細胞周期の進行を時空間的にリアルタイムで可視化する技術で G1 期と S/G2/M 期を見分けることが出来る. Fucci 技術が開発されたことにより, 今まで良くわかっていなかったさまざまな生物現象と細胞周期の相互関係を生きた状態で観察することが出来るようになった．[9]

Fucci 技術は, 細胞周期の特定の時期だけに発現する 2 つの制御タンパク質である cdt1 と geminin を利用している．これらの制御タンパク質は, ユビキチン化を介して細胞周期依存的に分解を受ける．cdt1 は DNA 複製の開始因子であり, DNA 合成準備期である G1 期に発現が最大になり S/D2/M 期には分解される．一方, geminin は cdt1 機能の抑制因子であり, DNA 複製を抑制している．geminin の発現は S/G2/M 期に最大となり G1 期には分解され存在しない．この異なる発現パターンを示す 2 つのタンパク質に, それぞれ異なる色の蛍光タンパク質を融合させて細胞周期マーカーを作成し, 蛍光顕微鏡下の細胞の蛍光色の違いで簡単に細胞周期を見分けることが出来るようにしたのが Fucci 技術である.

具体的には cdt1 と geminin の全長遺伝子を用いると細胞分裂が進行しないので, 細胞分裂が進行するための最適配列に蛍光タンパクを融合させている．ヒト cdt1 遺伝子の部分配列にヒラタクサビライシから単離された赤色蛍光タンパク質 (monometric Kusabira-Orange 2: mKO2) の遺伝子を, ヒト geminin 遺伝子の部分配列にアザミサンゴから単離された緑色蛍光タンパク質 (monotric Azami-green: mAG) の遺伝子を融合させ作成した mKO-hcdt1 と mAG-hGem を, レンチウィルスを使って HeLe 細胞内へ同時に導入すると, Fig. 1.3 のように G1 期の位相にある細胞の核は赤色の蛍光を示し, S/G2/M 期の位相にある細胞の核は緑色の蛍光を発する.[6]

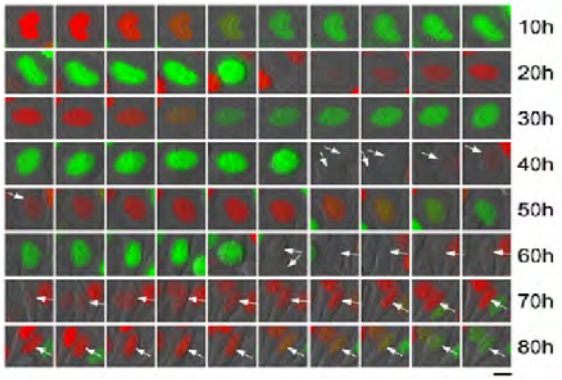

Fig. 1.3: Cell cycle-dependent changes in fluorescence of mKO2-hCdti(30/120) and mAG-hGem(1/110) in HeLa cells. Arrows indicate cells that were tracked. The scale bar represents 10μm. (From A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. MIyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, and A. Miyawaki, "Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression," Cell, **132**, 487-498 (2008).) (From A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. MIyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, and A. Miyawaki, "Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression," Cell, **132**, 487-498 (2008))

1.2.4 Fucci を用いた実験例

Fig. 1.4 は実際に Fucci 技術を用いて生きた細胞を観察した実験である.[6] A は Fucci を恒常的に発現することの出来る良性腫瘍細胞 (NMuMG 細胞) をヌードマウスの乳腺皮下に移植し, B と C は Fucci の蛍光を日を追って観察したものである. D は Fucci を恒常的に発現する悪性腫瘍細胞 (HeLa) をヌードマウスの乳腺皮下へと移植したもので, Fucci 技術による蛍光を日を追って観察したものが E と H である. G は 27 日後に血管を可視化する Angiosense-IVM750 をもちいて血管と増殖腫瘍細胞を同時に観察したものである. H は G の腫瘍を切片にし, 周囲の増殖細胞と同時に観察したものである.

このように Fucci 技術を用いれば腫瘍細胞の細胞周期を観察しながら生体内での腫瘍細胞の挙動をリアルタイムで観察出来る. しかし, 全ての細胞が等しく Fucci を恒常的に発現するということはなく, さらに細胞周期の全ての位相で違う色を発現させる技術も未開発であり, Fucci 技術にも改良が求められる.

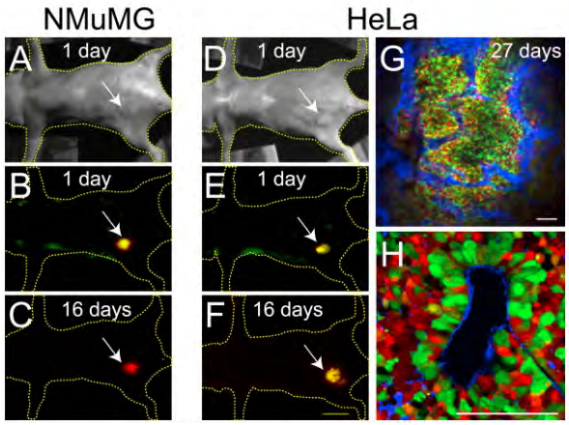

Fig. 1.4: (A-H) Observation of Fucci-expressing cultured cells subcutaneously inoculated into the mammary fat pad of nude mice. (A-C) Fucci-expressing NMuMG cells. (D and H) Fucci-expressing HeLa cells. (A-F) Whole-body images were acquired using the Olympus OV100 Imaging System with a 0.14 × objective lens and F-View II camera (Soft Imaging System). The scale bar represents 1 cm. (A, B, D, and E) 1 day postinoculation. (C and F) 16 days postinoculation. (A and D) bright-field images. (B, C, E, and F) Red and green fluorescence images were merged. The yellow mass (B, E, and F) consisted of both red and green nuclei, while the red mass (C) consisted predominantly of red nuclei. (G) A triple-color intravital cellular image of the expanded mass of HeLa cells 27 days post inoculation. Tumorvessels were visualized (blue) after loading the mouse with AngioSense750. Image acquisition was performed using an IV100 intravital laser scanning microscope(Olympus). The scale bar represents 100 mm. (H) A triple-color image of a section of the fixed mass. Vessels were stained for CD31 and displayed in blue. Image acquisition was performed using an FV1000 confocal microscope system.(From A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. MIyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, and A. Miyawaki, "Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression," Cell, **132**, 487-498 (2008).) (From A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. MIyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, and A. Miyawaki, "Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression," Cell, **132**, 487-498 (2008))

1.2.5 NIH3T3 細胞

本研究で用いた NIH3T3 細胞 (マウス胚繊維芽細胞) はチャイニーズハムスターの卵巣の細胞で, 1962 年に樹立され, 標準的な繊維芽細胞モデルとして広く用いられている. 3T3 という命名は ” 3-day transfer. Inoculum 3×10^5 cells (3T3 protocol) からとられたものである. マウス胚の初代培養細胞を, 20 cm^2 dish に 3×10^5 密度で 3 日ごとに継代し, およそ 30 代目で自然発生的に現れた不死化細胞である. 不死化細胞とは正常細胞でありながら癌のように無限に増殖する性質を持つ細胞のことである. 遺伝子導入実験に有用であるとされており, 分子生物学の分野においては扁平に大きく広がる形態であるため細胞内構造を詳細に観察しやすいことや, 創傷治癒において形態が強く極性化する利点を生かし, 各種遺伝子導入や RNAi 法と組み合わせた細胞骨格の再配置や細胞極性形成のプロセスを調べる実験に多用されている. 本研究において NIH3T3 細胞を用いたのは, 細胞分裂が盛んに行われることと, 扁平に大きく広がる形態がトロイド上に細胞を生やしたときに観察が容易であるということが理由である.

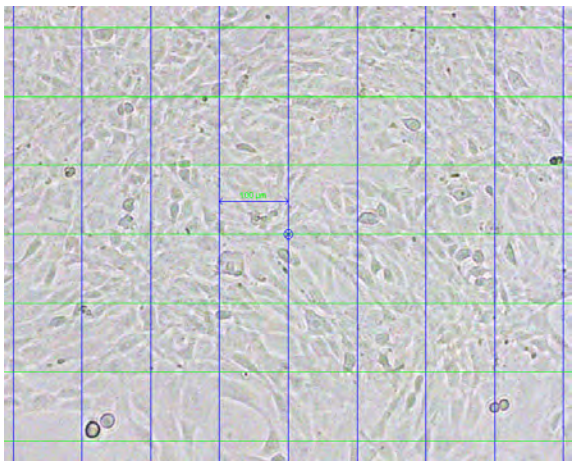

Fig. 1.5: The NIH3T3 cell incubated on the dish

1.2.6 細胞周期解析の意義

近年になって細胞周期解析は目覚ましい進歩を遂げ, 細胞周期に関して分子レベルで非常にさまざまなことがわかってきた. 組織, 器官, 固体において細胞はさまざまな外的要因の影響を受けて細胞周期の進行, 分化をしていることが明らかになってきたのである. しかし, 発生や再生における形態形成, 癌の浸潤や転移など様々な

現象の中で細胞周期の進行がどのように影響するのかは, 今までほとんどわかっていない. 組織や器官, 固体において各々の細胞で「いつ, どこで, どのように」細胞周期が制御されているのかを理解することは, 基礎生物学の理解を深めるだけでなく, 癌研究などの医療分野においても非常に重要な意味をもっている.

さらに 2012 年度に山中教授がノーベル生理学・医学賞を受賞された iPS 細胞の研究のような再生医療分野等, 分化の仕組みを理解するための基礎研究において, 細胞が細胞周期のどのタイミングでどのように分化を始めるかを知ることが出来れば, 再生医療において更なる発展が期待できる.

1.3 光共振器について

1.3.1 光共振器と Q 値

光共振器[10]とは簡単に言えば光をある期間に一定期間閉じ込めることが出来るデバイスである. 例えば反射率の高い二枚の鏡を用意して合わせ鏡を作る. その間で鏡に垂直に光を入射すると, 共振条件を満たす光は鏡の間を一定時間反射し続けることとなる. 1896 年に Charles Fabry と Alfred Perot によって発表されたファブリ-ペロー干渉計に端を発するこのデバイスはこうした原理を用いている. 共振条件を満たす特定の光のみが共振し, それ以外の光は消失していくため, この干渉計は分光器として用いることが出来る. さらに鏡の間に利得媒質を設置したものは半導体レーザの基本構造として現在でも広く利用されている.

共振器の性能を表す指標に Q 値というものがある. Q 値とは共振器内の光子寿命がどれだけ長いかという指標である. 光共振器内部では光が同じ光路を何度も通り, 光路を一周した後の光の位相と新たに入射された光の位相が揃うような波長の光は共振器内で共振することが出来る. 共振器に接続した導波路にプローブ光を入射すると, その透過スペクトルは共振波長のパワーが著しく落ちることとなり Q 値が高いほどそのスペクトル形状は鋭くなる.

1.3.2 WGM 共振器

Whispering Gallery Mode(WGM) 共振器とは直訳すると「ささやき回廊型」共振器である. これはちょうど回廊の中でのささやき声が遠くまで共鳴して聞こえてくるのと同じように光が共振する共振器である. Whispering Gallary とは, もともとロンドンのセントポール寺院や北京の回音壁のような特殊な現象が起きる場所を指している. 光路長がリング型をしており, その中を光は光ファイバと同じように全反射しながら進んでいく. したがって損失が少なく性能が良く高 Q 値である. 例えばシ

リカで微小な球を作りその球の円周上で光を共振させる微小球共振器[11]は最大 8×10^9 もの高 Q 値が実験で得られている．しかし, テーパファイバを用いるので集積化が難しいことやモード体積[14]が 3×10^3 μm^3 程度と比較的大きいことから共振器内の電場密度が小さくなってしまうという欠点がある．

それに対し, 同じ WGM の共振器に Disk 共振器[12]とトロイド共振器[13]というものがある．Disk 共振器とは Si 基板の上に SiO_2 を薄くパターニングし, エッチングすることによって Si 部分を削り, SiO_2 を Disk 上に浮かせた構造になっている．Disk 共振器はその Disk の縁の部分で光を共振させる．この Disk 共振器の Q 値は 10^4 程度と極めて高いわけではないが, モード体積が 6 $(\lambda/n)^3$ と微小球共振器に比べて小さいので高い電場密度で光を共振させることが出来る．この Disk 共振器の上からさらにレーザを照射することによって SiO_2 部分を溶融させた共振器がトロイド共振器である．SiO_2 よりも Si の方が, 熱伝導率が高いので Disk の軸部分付近の SiO_2 は溶融せずに縁部分の SiO_2 が溶融する．縁部分は溶融したとき表面張力によって滑らかに丸くなる．この滑らかさが共振時に光の損失を抑えることによって高い Q 値を生み出す．モード体積は Dsik 共振器と変わらないにも関わらずその Q 値は 10^8 を誇る．

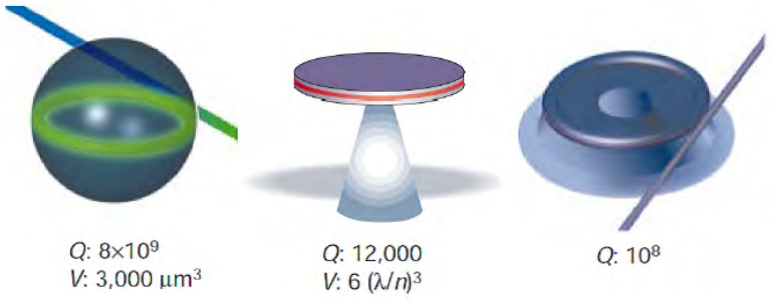

Fig. 1.6: Microsphere cavities (left), microDisk cavities (center), microtoroidal cavities (right) (From K. J. Vahala, “Optical microcavities,” Nature, **424**, 14, 839-846 (2003))

1.3.3 微小光共振器を用いた単一ウィルス検出

微小光共振器は, 外的要因が極めて繊細に Q 値や共振周波数に影響を与えることから高感度のセンサーとしても応用される．例えば 2008 年に F.Vollmer らが発表した論文において Vollmer は微小光共振器を用いて液中の, 5.2×10^{16} g の質量のポリスチレン粒子の検出に成功した．これは, 微小球共振器をポリエチレン粒子を含んだ PBS 中に入れ, テーパファイバを接続して透過スペクトルを測定する方法である．

共振器を接続しているため光は共振し, 共振波長の光が共振器中で多く吸収される. そのため透過スペクトルにおいて共振波長のパワーが著しく低下する. 光の光路は共振器の半径が最大の箇所, いわゆる赤道であり, この部分にポリエチレン粒子が付着すると光の光路はポリエチレン粒子を通過した光路となる. それゆえに共振する波長がシフトし, そのシフト量に応じてどの程度の大きさの粒子が付着したかがわかるという仕組みである.[16]

彼らはこの技術で, 半径 250 nm 以下の物質が微小球共振器の赤道に付着すれば精度よく検出できると述べている. インフルエンザ A ウィルスは平均的な半径が 50 nm であり, シリカに良く吸着することが知られているため, この検出器で測定可能である.

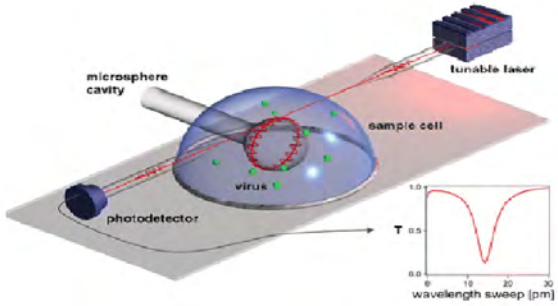

Fig. 1.7: Excitation of an equtorial WGM of a microshere by evanscent coupling to a guided wave in a tapered optical fiber. Resonance positions are detected as dips in the transmitted light T at particular laser wavelengths. (From F. Vollmer, S. Arnold and D. Keng., "Single virus detection from the reactive shift of a whispering-gallery mode," PNAS, **105**, 20701-20704 (2008))

1.4 本研究の目的

従来, 生きた細胞や組織における細胞周期進行は光学顕微鏡を用いた観察により解析されてきた. 細胞周期の M 期から G1 期への移行は染色体や紡錘体の出現, 細胞分裂などの形態的変化が起こるため光学顕微鏡で識別することが出来る. しかし, 細胞周期の開始ポイントである G1 期から S 期への移行は形態変化を伴わないため光学顕微鏡で識別することが出来ない. そこで nuclear remodeoxyuridine(BrdU) を用いた細胞染色が行われてきたが, この方法では生きた細胞をリアルタイムで観察ことが出来ない. そして先に述べた Fucci 技術のような蛍光による細胞周期解析の研究が行われてきたが, 蛍光を用いた細胞周期解析ではウィルスベスター—による蛍

光タンパクの導入時や, 蛍光タンパクが与える細胞周期や細胞の性質への影響など, 細胞に対する 2 次的な影響をゼロにすることは出来ない. そこで, 本研究では label free 細胞周期解析を目的とし, 蛍光タンパクによる細胞周期解析の指標となる使い方や, 細胞周期研究に対し新たなツールを提供したいと考えている.

2　理論

2.1　光共振器

2.1.1　Q 値について

ここでは最も基本的な共振器ファブリ-ペロー共振器 (Fabry-Perot resonator) について, その共振波長条件と Q 値の定義について記述する.

ファブリ-ペロー共振器とは, Fig. 2.1 のように半透明鏡を二枚向い合せた構造をしている. 光軸を z 軸として半透明鏡の間の媒質の屈折率を n, 半透明鏡の電界反射率を r(位相変化の場合も考えて複素数) とする. 空間ビームは半透明鏡 1 で 1 部が反射されて残りが半透明鏡 2 に到達するが, そこでさらに反射された成分は半透明鏡 1 にまで戻り, そしてさらに反射された成分は, 二つの反射鏡の間を往復し始める. 空間ビームはコヒーレントな光波であるので, 半透明鏡の間隔 L が波長の半整数倍の場合に定在波が生じて共振が起こる.

共振器内で光が共振するためには, 波長が以下のような式を満たすことが必要である.

$$m\lambda_m = 2nL, \qquad m = 1, 2, 3... \tag{2.1}$$

ただし, λ_m は共振波長である.

これはリング型共振器でも同じで光が共振する経路長 L が, リング型共振器の半径を R として

$$L = 2\pi R \tag{2.2}$$

となるため, 共振条件が

$$m\lambda_m = 2n\pi R, \qquad m = 1, 2, 3... \tag{2.3}$$

となる. 共振波長に一致しない波長の光は，共振器中を往復する間に一致しない位相の光との干渉で消えてしまうため，共振器中には安定に存在できない.

序論で述べたが光共振器の性能を決める一つの指標に Q 値と呼ばれるパラメータが存在する. Q 値の定義は

$$Q = \omega_0 \times \frac{\text{共振器に蓄えられているエネルギー}\,[J]}{\text{単位時間あたりに散逸するエネルギー}\,[J/s]} \tag{2.4}$$

である. しかし, 実際は式 (1.4) を変形した以下の形で使用されることが多い.

$$Q = 2\pi f_0 \tau_{ph} \tag{2.5}$$

$$Q = \frac{\lambda_0}{\Delta\lambda_{FWHM}} \tag{2.6}$$

ここで, λ_0 および f_0 はそれぞれ共振波長および共振周波数, τ_{ph} は共振器内の光エネルギーが $\frac{1}{e}$ になるまでの時間をしめす光子寿命であり, Δ_{FWHM} は共振スペクトルの半値全幅 (FWHM:Full width half maximum) である. 式 (1.5) の式の通り, Q 値は光子寿命に比例しており, Q 値が高いほど光子が長く共振器内にとどまることを示している. 式 (1.6) は共振スペクトルの形状と Q 値との関係を示し, Q 値が高ければ高いほど共振スペクトル形状が鋭いということを意味している.

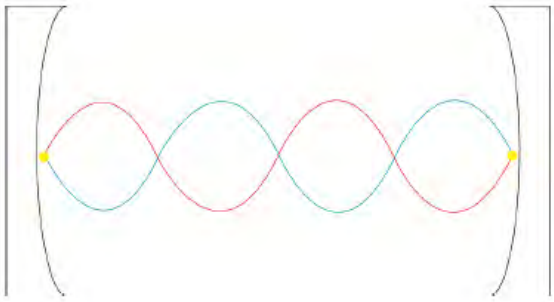

Fig. 2.1: Illustration of a Fabry-Perot resonator.

2.1.2 光共振器における共振周波数

共振周波数を f, 光の速さを c とすると

$$c = f\lambda \tag{2.7}$$

であるから式 (1.1) と合わせて

$$\nu = m\frac{c}{2L}, \qquad m = 1, 2, 3... \tag{2.8}$$

となるので, その共振周波数の間隔は

$$\nu_{FSR} = f\frac{c}{2L} \tag{2.9}$$

と表され, これは FSR(free spectral range) と呼ばれる.

2.1.3 WGM 共振器を用いた微小粒子検出器

ウィスパリングギャラリーモードは共振器の表面を回り続ける光であり, 共振器と導波路がエバネッセントカップリングによって共鳴している. 整数倍するとぴったり共振器の光路長になる波長 λ_r の光だけが微小球円周の周りに存在することが出来る. この共振波長は微小球の半径 R もしくは屈折率 n にわずかな変化が訪れるだけで変化する. 半径 R, 屈折率 n, 共振波長 λ の関係式は以下の式で表される.

$$\frac{\delta\lambda_r}{\lambda_r} = \frac{\Delta R}{R} + \frac{\Delta N}{N} \tag{2.10}$$

この関係式は微小球共振器の周りにタンパク質の層を薄く重ねた時にも適応可能である (Fig. 2.2b). テーパファイバは共振出来る光を提供するだけでなく, 透過スペクトルも同時に観察しているので微小球の光路長変化により, 新たにチューニングされた波長の光は Fig. 2.3a のようにその波長だけパワーが著しく落ちる. その前後のシフトを観測することによって光路長変化度合いを観測することが出来る.

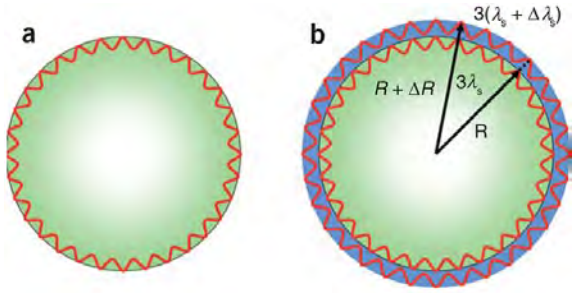

Fig. 2.2: (a) Bare sphere supporting a WGM. (b) WGM after the addition of a layer of thickness Δ R. The geometry shows that the wavelength increases in proportion to the increase in radius (that is, $\Delta\lambda_s/\lambda_s = \Delta$ R/R). (From F. Vollmer and Stephen Arnold, "Whispering-gallery-mode biosensing: label-free detection down to single molecules" Nature Methods **5** 591-596 (2008))

波長シフトによる光路長変化の観測限界は, (Fig. 2.3a) のディップの狭さに大きく依存する. (Fig. 2.3a) のディップにおける線幅は $\delta\ \lambda$ r=0.0006 nm 程度でこれは蛍光分子による室温における分光法の 10 nm に比べて著しく狭く, 従って高感度である. しかもこの値は理想からは程遠く, 水による光の吸収が一番抑えられる 1300 nm 付近の波長の光の場合, 水中における Q 値の理論的限界は

$$Q = 2 \times 10^6 \tag{2.11}$$

であり, Q 値は

$$Q = \frac{\lambda_r}{\delta\lambda_r} \tag{2.12}$$

で表される. $\delta\ \lambda_r$ が小さいほど Q 値は高くなるのだから, 検出限界はいかに $\delta\lambda_r$ を小さくし, Q 値を大きく出来るかにかかっている. 仮に $\delta\lambda_r$ を 100 分の 1 程度に出来たとすると, その線幅は 6 pm まで小さくすることが出来る.

(5.1) 式からもわかるとおりの関係式からもわかるとおり, 共振波長の変化は半径の変化に比例する. 微小球の平均半径は粒子がどれだけ付着したかに依存している. 元の半径が 100 μ m の微小球に 1300 nm の波長の光を共鳴させた場合, 線幅が 6 pm であるとすると, 検出できる増加した半径 ΔR の限界は

$$\Delta R_{min} \geq 0.5 \times 10^{-12} \tag{2.13}$$

であり, 典型的なタンパク質分子の大きさ約 10 nm と比べると極めて小さな分子の検出が出来るであろう見積もりである. もちろんこれは理想的な見積もりであって, 実際の実験とは異なるが, 実際の実験で波長の平行シフトにより 0.3 nm の単一層の検出を実現している.

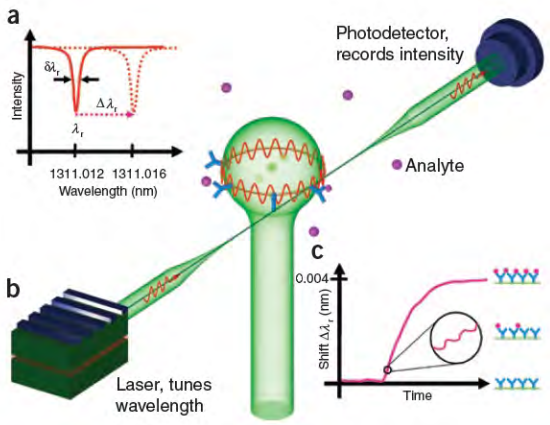

Fig. 2.3: Concept of the WGM biosenser. (a) Resonance is identified at a specific wavelength from a dip in the transmission spectrum acquired with a tunable laser. The resonance wavelength, λ, is measured by locating the minimum of the transmission dip within its linewidth(arrows). A resonance shift associated with molecular bindeng, $\Delta\lambda$, is indicated by the dashed arrow. (b) WGM in a dielectric sphere driven by evanescent coupling to a tapered optical fiber. The light wave (red) circumnavigates the surface of the glass sphere (green) where binding of analyte molecules (purple) to immobilized antibodies (blue) is detected from a shift of resonance wavelength. (c) Binding of analyte is identified from a shift $\Delta\lambda_r$ of resonance wavelength (also see a). Single-molecule binding is theorized to appear for the 'reactive' effect in the form of steps in the wavelength shift signal (magnified inset). For microtoroid experiments using a 'thermo-optic' effect such steps have already been reported. (From F. Vollmer and Stephen Arnold, "Whispering-gallery-mode biosensing: label-free detection down to single molecules" Nature Methods **5** 591-596 (2008))

2.2　液中測定に適したファイバの検討

空気中での測定に適したテーパ光ファイバでは細すぎて水による吸収の影響が大きく, 透過率が大きく下がってしまった. ここで, 水中での測定に適したテーパファイバ径を求める.

まず, 純水中でのシングルモード条件を求める. ファイバは円筒形をしているので, 円筒座標を用いるため Fig. 2.4 のように条件を仮定する.

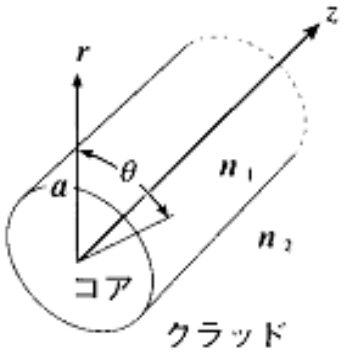

Fig. 2.4: cylindrical coordinates in the optical fiber (From 國分 泰雄, “光波工学” 協立出版株式会社, (1999))

界分布の z 方向依存性を $e^{-j\beta z}$ と仮定して波動方程式の z 方向成分を円筒座標系で書くと,

$$\frac{\partial^2 E_z}{\partial r^2} + \frac{1}{r}\frac{\partial E_z}{\partial r} + \frac{1}{r^2}\frac{\partial E_z}{\partial \theta} + (k_0^2 n_i^2 - \beta^2)E_z = 0 \tag{2.14}$$

$$\frac{\partial^2 H_z}{\partial r^2} + \frac{1}{r}\frac{\partial H_z}{\partial r} + \frac{1}{r^2}\frac{\partial^2 H_z}{\partial \theta^2} + (k_0^2 n_i^2 - \beta^2)H_z = 0 \tag{2.15}$$

で表される.

屈折率分布がコア内で一様な階段屈折率ファイバ (step-index round optical fiber) を考えると, 式 (2.14) と (2.15) の n^2 はコアとクラッドに分けて以下のように表される.

$$n = \begin{cases} n_1^2 & (r \le a) \\ n_2^2 = n_1^2\sqrt{1-2\Delta} & (r > a) \end{cases} \tag{2.16}$$

式 (2.16) を式 (2.14) と (2.15) へ代入して第 1 種ベッセル関数 $J_\nu(x)$ と第第 2 種ベッセル関数 $K_\nu(x)$ を用いて以下の式で表される.

コア内： $(r \leq a)$

$$E_z = A_l J_l(\kappa r)\cos(l\theta + \phi_l) \tag{2.17}$$
$$H_z = B_l J_l(\kappa r)\cos(l\theta + \psi_l) \tag{2.18}$$

クラッド内： $(r > a)$

$$E_z = A_l \frac{J_l(\kappa a)}{K_l(\gamma a)} K_l(\gamma r)\cos(l\theta + \phi_l) \tag{2.19}$$
$$H_z = B_l \frac{J_l(\kappa a)}{K_l(\gamma a)} K_l(\gamma r)\cos(l\theta + \psi_l) \tag{2.20}$$

ここで, 境界条件を満たす式は次の通りである.

$$E_\theta(r \to a_{+0}) = E_\theta(r \to a_{-0}) \tag{2.21}$$

$$H_\theta(r \to a_{+0}) = H_\theta(r \to a_{-0}) \tag{2.22}$$

式 (2.21) と (2.22) を満たす条件より, 二つの振幅係数 $\mathrm{A_l}$ と $\mathrm{B_l}$ に関する 2 元連立同時法定式が得られる. この同時法定式が恒等的に零でない解をもつには, その係数の行列が零になる必要があるので, 次の方程式が得られる.

$$\frac{k_0^2\left[\frac{J_l'(\kappa a)}{\kappa a J_1(\kappa a)} + \frac{K_l'(\gamma a)}{\kappa a J_l(\kappa a)}\right]\left[n_1^2\frac{J_l'(\kappa a)}{\kappa a J_1(\kappa a)} + n_2^2\frac{K_l'(\gamma a)}{\kappa a J_l(\kappa a)}\right]}{l^2\beta^2\left(\frac{1}{(\kappa a)^2} + \frac{1}{(\gamma a)^2}\right)^2} = -\frac{\sin(l\theta + \phi_l)\sin(l\theta + \psi_l)}{\cos(l\theta + \phi_l)\cos(l\theta + \psi_l)} \tag{2.23}$$

この式は境界条件を満たしているいるが, この境界条件はコアとクラッドの境界 (r=a) のいたる所で成り立たなければならないので, 式 (2.23) の右辺は θ に依存してはならない. このためには次の関係が成り立つ必要がある.

$$\phi_l - \psi_l = \pm\frac{\pi}{2} \tag{2.24}$$

この式は, $\mathrm{E_z}$, $\mathrm{H_z}$ の角度 θ 依存性が $\frac{\pi}{2}$ だけずれている. この条件を式 (2.23) に代入すると, 式 (2.23) の右辺は+1 になるので, 境界条件は β を含む超越方程式に帰着される.

$$\left[\frac{J_l'(\kappa a)}{\kappa a J_1(\kappa a)}+\frac{K_l'(\gamma a)}{\kappa a J_l(\kappa a)}\right]\left[\frac{J_l'(\kappa a)}{\kappa a J_1(\kappa a)}+(1-2\Delta)\frac{K_l'(\gamma a)}{\kappa a J_l(\kappa a)}\right]=\left(\frac{l\beta}{k_0 n_1}\right)^2\left(\frac{1}{(\kappa a)^2}+\frac{1}{(\gamma a)^2}\right)^2 \tag{2.25}$$

これが階段屈折率円筒光ファイバの固有値方程式である.

(2.25) 式において，クラッドとコアの屈折率差が非常に小さい，つまり

$$\Delta=\frac{n_1^2-n_2^2}{2n_1^2}\cong\frac{n_1-n_2}{n_1}\ll 1 \tag{2.26}$$

が成り立つとき，弱導波近似として $\beta\cong k_0 n_1$ とおける.
すると，以下のベッセル関数の公式を用いると, 次のように書き直すことが出来る.

$$\frac{J_l'(\kappa a)}{\kappa a J_l(\kappa a)}=\frac{J_{l-1}(\kappa a)}{\kappa a J_l(\kappa a)}-\frac{l}{(\kappa a)^2}=-\frac{J_{l+1}(\kappa a)}{\kappa a J_l(\kappa a)}+\frac{l}{(\kappa a)^2} \tag{2.27}$$

$$\frac{K_l'(\gamma a)}{\gamma a K_l(\gamma a)}=-\frac{K_{l-1}(\gamma a)}{\gamma a K_l(\gamma a)}-\frac{l}{(\gamma a)^2}=\frac{K_{l+1}(\gamma a)}{\gamma a K_l(\gamma a)}+\frac{l}{(\gamma a)^2} \tag{2.28}$$

よりこれは

$$\left[\frac{J_l'(\kappa a)}{\kappa a J_l(\kappa a)}+\frac{K_l'(\gamma a)}{\gamma a K_l(\gamma a)}\right]=\chi l\left(\frac{1}{(\kappa a)^2}+\frac{1}{(\gamma a)^2}\right) \tag{2.29}$$

となる. ただし $\chi=\pm 1$ である.
$\chi=-1$ のとき：HE モード

$$\frac{J_{l-1}\kappa a}{\kappa a J_l(\kappa a)}-\frac{K_{l-1}(\gamma a)}{\gamma a K_l(\gamma a)}=0 \tag{2.30}$$

$\chi=-1$ のとき：EH モード

$$\frac{J_{l+1}\kappa a}{\kappa a J_l(\kappa a)}+\frac{K_{l+1}(\gamma a)}{\gamma a K_l(\gamma a)}=0 \tag{2.31}$$

これらの固有方程式は式 (2.25) に比べればかなり簡略化されている.
次にこれらの固有方程式で記述されるモードがどのように分類されるかを述べる.
光ファイバの固有値方程式式 (2.25) は全て境界条件と

$$E_r=\frac{-j}{\omega^2\epsilon\mu-\beta^2}\left(\beta\frac{\partial E_z}{\partial r}+\omega\mu\frac{1}{r}\frac{\partial H_z}{\partial\theta}\quad\right) \tag{2.32}$$

$$E_\theta = \frac{-j}{\omega^2\epsilon\mu - \beta^2}\left(\beta\frac{1}{r}\frac{\partial E_z}{\partial\theta} - \omega\mu\frac{\partial H_z}{\partial r}\right) \tag{2.33}$$

$$H_r = \frac{-j}{\omega^2\epsilon\mu - \beta^2}\left(\omega\epsilon\frac{1}{r}\frac{\partial E_z}{\partial\theta} + \beta\frac{\partial H_z}{\partial r}\right) \tag{2.34}$$

$$H_\theta = \frac{-j}{\omega^2\epsilon\mu - \beta^2}\left(\beta\frac{1}{r}\frac{\partial E_z}{\partial r} + \omega\mu\frac{\partial H_z}{\partial\theta}\right) \tag{2.35}$$

によって結び付けられているので, 一般解として TE モードと TM モードに分解することが出来ない. 従って光ファイバのモードは一般に 6 つの電磁界成分を全て持ったモードでこのようなモードを一般にハイブリッドモードと呼ぶ.

$\chi = -1$ のとき：HE モード

$$\frac{J_{l-1}\kappa a}{\kappa a J_l(\kappa a)} - \frac{K_{l-1}(\gamma a)}{\gamma a K_l(\gamma a)} = 0 \tag{2.36}$$

$\chi = -1$ のとき：EH モード

$$\frac{J_{l+1}\kappa a}{\kappa a J_l(\kappa a)} + \frac{K_{l+1}(\gamma a)}{\gamma a K_l(\gamma a)} = 0 \tag{2.37}$$

光ファイバ内では, EH, HE の 2 つのモードが伝搬される. それぞれ $E_r, E_\theta, E_z, H_r, H_\theta, H_z$ をすべて含むモードで, ハイブリッドモードと呼ばれる.

$\chi = -1$ で $l \geq 1$ のとき, モード番号を新たに $v = l - 1$ とすると, (2.36) 式は次のようにに変形できる.

$$\frac{J_{v-1}(\sqrt{1-b}V)}{J_v(\sqrt{1-b}V)}\frac{K_v(\sqrt{b}V)}{K_{v-1}(\sqrt{b}V)} = -\sqrt{\frac{b}{1-b}} \tag{2.38}$$

この固有値方程式を解いて得られる固有値 b に (あるいは伝搬定数 β) を値の大きい固有値から順にの大きいものから $m = 1, 2, 3, \ldots$ と番号を振ると, この番号は半径 r 方向のモード番号になっている.

そこでこのモードを一般に $\mathrm{HE}_{l,m}$ モードと呼ぶ.

$l = 0$, モードは TE・TM モードとなり, 以下の式のように表せる.

$$\frac{J_0(\sqrt{1-b}V)}{J_1(\sqrt{1-b}V)}\frac{K_1(\sqrt{b}V)}{K_0(\sqrt{b}V)} = -\sqrt{\frac{b}{1-b}} \tag{2.39}$$

$\chi = +1$ で $l \geq 1$ の場合，モード番号を新たに $v = l + 1$ とふると，HE モードの場合と同様に次式を得る．

$$\frac{J_{v-1}(\sqrt{1-b}V)}{J_v(\sqrt{1-b}V)} \frac{K_v(\sqrt{b}V)}{K_{v-1}(\sqrt{b}V)} = -\sqrt{\frac{b}{1-b}} \tag{2.40}$$

さて, これらのモードはそれぞれの固有値方程式を比べてみると, すべて同じ形をしていることがわかる．すなわち, 方位各方向のモード番号 l を変換して

$$v = \begin{cases} l-1 : HE_{l,m}\text{mode} \\ l+1 : TE_{0,m}, TM_{0,m}, EH_{l,m}\text{mode} \end{cases}$$

と置くと, 同じ ν を持つ $\mathrm{HE}_{\nu+1,m}$ モードと $\mathrm{EH}_{\nu-1,m}$ モードは伝搬定数が等しくなることを意味する．ただし, m は半径 r 方向のモード番号である．このように異なる固有関数の固有値が等しくなることを “縮退” と呼ぶ．互いに縮退を起こしている固有関数は線形結合で新しい固有関数を作ることが出来るので, これらの固有モードを組み合わせると, 横方向断面内で一方向に直線偏光したモードを作ることが出来る．このモードを LP(Linearly Polarrized) モードと呼び, モード番号を付けて $\mathrm{LP}_{\nu,m}$ のように表示する．$\mathrm{LP}_{\nu,m}$ モードの固有方程式を解いて分散曲線を描くと

$\mathrm{LP}_{\nu,m}$ モードの固有方程式を解いて分散曲線を描くと Fig. 2.5 のようになる．

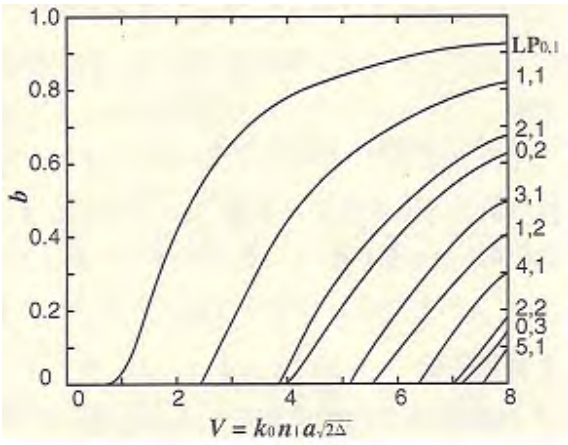

Fig. 2.5: LP mode dispersion of step-wise refractive index (From 國分 泰雄, “光波工学” 協立出版株式会社, (1999))

光ファイバの単一モード条件は $\mathrm{LP}_{1,1}$ モードのカットオフ V 値で与えられる．その解を求めると $J_0(V_c) = 0$ の一番目の解 $\mathrm{V}_c = 2.405$ となる．すなわち階段屈折率円筒光ファイバの単一モード条件は $V \leq 2.405$

従って, 空気中のシングルモード条件は

$$\begin{aligned} V &= k_0 n_1 a\sqrt{2\Delta} \\ n_1 &= 1.44 \\ n_2 &= 1 \\ k_0 &= \frac{2\pi}{\lambda} \\ \lambda &= 1550 \times 10^{-9} \end{aligned} \tag{2.41}$$

より, 半径 a は $a \leq 0.57$ μm

水中のシングルモード条件は水の屈折率を 1.33 として同様に求めると

$a \leq 1.07$ μm

となる. 吸収による損失はファイバの直径が大きいほど少ないので, 水中における理想的なファイバの直径は

$a = 2.15$ μm

と求められる.

2.3　細胞について

本研究の最終目標としてラベルフリー細胞周期解析を置いている. 理論は後述するがその際に細胞の構造と大きさ, そして個々の小胞体の働きは非常に重要な意味を持っている. ここでは細胞内の基本的な構造を示し, 各器官の細胞内における簡単な役割を示す.

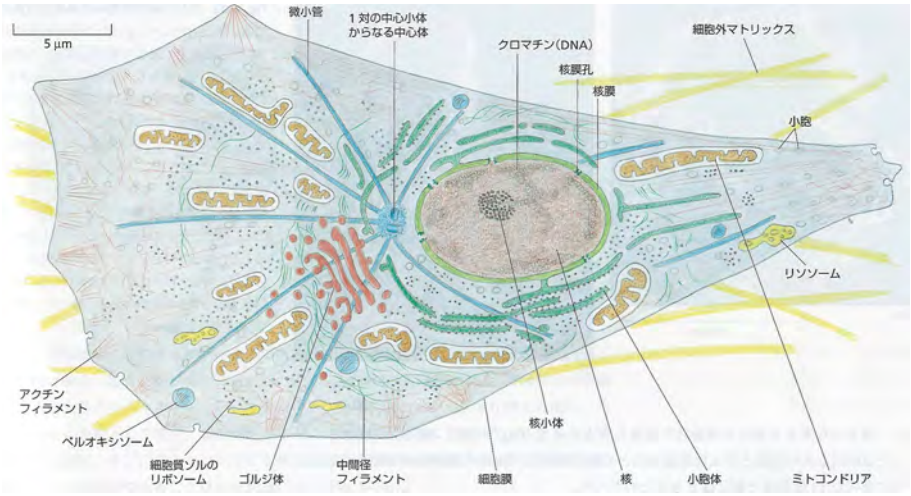

Fig. 2.6: The internal anatomy of a cell(From B. Alberts, A. Jhonson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. “Molecular Biology of THE CELL Fifth Edition” Newton Press. (2009) (アルバート他 中村桂子 松原謙一 他 (訳) “THE CELL 細胞の分子生物学 第 5 版” ニュートンプレス) (2010))

2.3.1　核

定義上, DNA が核という独立した内部区画に収納されているのが真核生物である. 核膜 (nuclear envelope) という二重の幕が核を囲み, DNA を細胞質から隔てている.

2.3.2　細胞骨格

細胞が機能するためには空間的に自己を組織化し, 周囲の環境と物理的に関係し合わなくてはならない. また, あるべき形態をとり頑丈で内部の構造を適切に整える必要がある. その上, 細胞の多くは形を変えたり動いたりもしなくてはならない. また, 細胞は成長し, 分裂し, 環境変化に適応するのであ伴ってその構成成分を再編

しなければならない. 真核細胞では, この空間的, 同的な機能が高度に発達しており, それを支えるのが見事な線維系, 細胞骨格なのである.

細胞骨格は, 分裂の際に染色体を引き離し, 細胞を二つに分ける役割を持つ. また, 細胞内の物質を輸送し, 小器官を適当な場所に運ぶ. 弱い細胞膜を支え, 環境の変動によって加わる応力やひずみに細胞がちぎれずにいられるような機械的結合を作っている. 精子などは細胞骨格を使って泳ぎ, 繊維芽細胞や白血球などは面上をはい回る. 筋細胞の収縮, 神経細胞の軸索や樹状細胞の伸長も細胞骨格による. 植物細胞の細胞壁の成長を誘導し, 真核細胞の多様な形態を作り出すのも細胞骨格である.

2.3.3 ゴルジ体

ゴルジ体は糖を合成する場所であり, また, 小胞体の産物を選別し配送する場所でもある. 植物の細胞壁を作るペクチンやヘミセルロースなど, また動物細胞の細胞外マトリックスを作るグリコサミノグリカンなど, 細胞に存在する多糖の大半はゴルジ体で合成される. 一方, ゴルジ体は小胞体から物を運び出す経路にも当たり, 合成される糖のほとんど小胞体からくるタンパク質や脂質にオリゴ糖側鎖として付加する. オリゴ糖類の中には特定のタンパク質を小胞に入れてリソソームに運ばせるための荷札となるものがあるが, 大部分のタンパク質や脂質には適切なオリゴ糖が付加され, 別のやり方で識別されて, ゴルジ体からそれぞれの目的地に向かう輸送小胞に詰められる.

2.3.4 ミトコンドリア

真核細胞の起源は捕食者であるという説が有力である. その証拠の一つと考えられているのがミトコンドリアの構造である. ほとんどの真核細胞にはミトコンドリア (mitochondrion, 複数形は mitochondoria) がある. 二重の膜で包まれたこの小器官は細胞質に存在し, 酸素を取り込み, 糖などの食物分子を参加してエネルギーを生み出し, そのエネルギーで細胞活動の動力となる ATP の大半を作る. 小型の細菌と同じくらいの大きさで, 内部に細菌と同じ環状の DNA 分子としての自前のゲノムを持っている. 真核細胞の他の場所にあるものとは違うリボソームがあり, 運搬 RNA も自前である. ミトコンドリアの起源が自由生活をしていた酸素代謝型の好気性 (aerobic) 細菌であり, 酸素の利用手段を持たなかった嫌気性 (anaerobic) 真核細胞がそれを飲み込んだと考えて間違いないだろう. 飲み込まれた細菌は消化を免れ, 自分を飲み込んだ細胞やその子孫と共生して進化し, エネルギーを生み出して提供する代わりに宿主から安全な囲いと栄養分を提供してもらったのである. 嫌気性の捕

食者であった原子的な真核細胞と好気性細菌細胞との協力関係は, 地球大気が初めて酸素に富むようになった 15 億年ほど前に確立されたと考えられている.

2.3.5 葉緑体

真核細胞, なかでも植物や藻類の細胞には, 膜で囲まれミトコンドリアに似ているが別種の細胞小器官, 葉緑体 (chloroplast) があるのも多い. 葉緑体は太陽光のエネルギーを用いて大気中の二酸化炭素と水から炭水化物を合成する光合成をし, それを宿主に提供する. 葉緑体もミトコンドリアと同様に自前のゲノムを持つ. 葉緑体の起源はすでにすでにミトコンドリアを取り込んでいた細胞に捕獲され, 共生するようになった光合成細菌であることにほぼ間違いないだろう. 葉緑体を備えた真核細胞は, 祖先が取り込んだ葉緑体が栄養分をくれるので獲物細胞を追う必要がない. このため, 植物細胞は運動用の細胞骨格装置を持ちながら素早く変形し食作用で他の細胞を飲み込む能力を失った代わりに, 頑丈な細胞壁を身の回りに作ったのである.

2.3.6 細胞分裂

新しい細胞は既存の細胞の複製によってのみ作り出される.[3] この単純な事実は 19 世紀半ばになって確率したものだがこれは生命の連続性という意義深い真実に直結している. あらゆる生き物は単細胞の細菌から多細胞の哺乳類に至るまで 30 億年以上前に地球上に生命が始まったときから延々と繰り返された細胞の増殖と分裂の産物である.

一個の細胞は秩序立った一連の過程の中で, まずその中身を倍加し, 二分して増殖する. この細胞周期 (cell cycle) という倍加と分裂の循環は, あらゆる生物の増殖に不可欠な機構である. 細菌や酵母などの単細胞生物では, 細胞分裂のたびに完全な新しい個体が出来る. 多細胞分裂の場合, 機能を持つ体を作るには長く複雑な一連の細胞分裂を繰り返す必要がある. 成体になってからも失われる細胞の補充に細胞分裂が必要である. 実際, ヒトが生きていくためには毎日何百万個もの細胞が作られなくてはならず, 大量の x 線を浴びるなどして全細胞の分裂が止まると, 数日以内に死んでしまう.

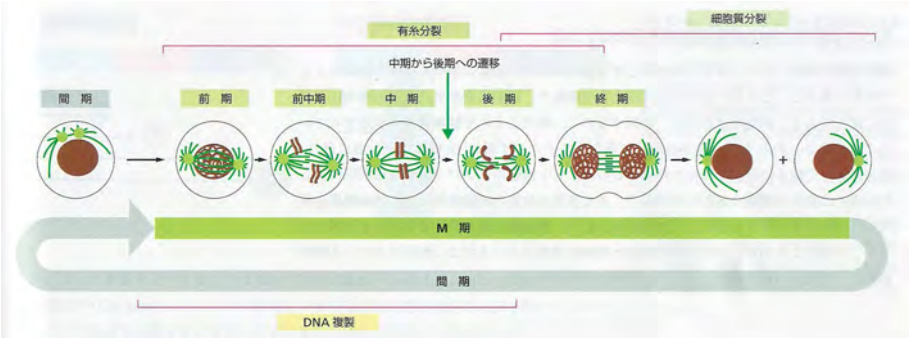

Fig. 2.7: This fig shows a image of cell division.(From B. Alberts, A. Jhonson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. “Molecular Biology of THE CELL Fifth Edition” Newton Press. (2009) (アルバート他 中村桂子 松原謙一 他 (訳) “THE CELL 細胞の分子生物学 第 5 版” ニュートンプレス) (2010).)

2.3.7 細胞周期

細胞周期のもっとも基本的な機能は, 染色体の中の莫大な量の DNA を正確に倍加し, 出来たコピーを正確に分離して遺伝的に同一な 2 つの娘細胞を作ることである. この 2 つの事象が細胞周期における 2 つの重要な時期を規定する. DNA の倍加は S 期 (Synthesis phase) に起こる. 典型的な哺乳類の細胞では S 期に 10 12 時間を要し, 細胞周期の時間の約半分を占める. S 期の後, 染色体の分離と細胞分裂が M 期 (Mitosis phase) に起こる. M 期に必要な時間ははるかに少なく, 哺乳類細胞では 1 時間もかからない. M 期には 2 つの重要な事象が起こる. 1 つは核の分裂, すなわち有糸分裂 (mitosis) であり, 複製した染色体は 2 つの娘細胞に分配される. もう 1 つの細胞疾分裂で細胞が二分する.

ほとんどの細胞ではタンパク質と細胞小器官の量を倍加しつつ成長するのに必要な時間は染色体の倍加と分離に要する時間よりはるかに長い. 細胞の成長に時間をかける必要もあり, ほとんどの細胞周期にはさらに “間の時期 ’’ (gap phase) がある. M 期と S 期の間の G_1 期 (G_1 phase), S 期と有糸分裂の間の G_2 期 (G_2 phase) である. すなわち真核生物の細胞周期は 4 つの時期, すなわち G_1 期, S 期, G_2 期, M 期に区分され, G_1 期, S 期, G_2 期をまとめて間期 (inter phase) という. . 通常のヒト培養細胞の場合, 24 時間ほどの周期のうち 23 時間を間期がしめ, 1 時間が M 期となる. 有糸分裂以外の細胞周期の間ずっと, 細胞は成長する.

G_1 期と G_2 期は単なる待ち時間ではなく, この間に S 期および有糸分裂という大変動に突入する前に, 細胞は内外の環境を監視し, 状況が適切で準備が完了している

ことを確認する. G_1 期はこの点で特に重要で, 外部の状況や他の細胞からのシグナルによってその長さは大いに変わりうる. 例えば細胞外の状況が好ましくない場合, 細胞は G_1 期の進行を遅らせ, "G_0" という特殊な休止状態に入り, 数日, 数週, あるいは数年にもわたって増殖せずにいることもある. 実際, 差の細胞あるいは個体が死ぬまで永続的に G_0 にとどまっている細胞も少なくない. 細胞外部の条件が好ましく, 成長と分裂を促すシグナルが存在すれば, G_1 初期または G_0 の細胞は酵母では開始点 (start), 哺乳類では制限点 (restriction point) とよばれる G_1 期の末期の臨界点を通過して先に進めるのである.

3　シリカトロイド微小光共振器の液中測定実験

3.1　シリカトロイド共振器作製手順

本実験において重要なツールであるシリカトロイド微小光共振器の作製手順を以下に記述する.

3.1.1　XeF ドライエッチング

あらかじめ直径 100 μm のシリカパターンの基板を, なるべく全ての共振器が等方, 同程度にエッチングされるようパターンを縦 10 行, 横 2 列の計 20 個程度になるように割った基板を用意した. エッチングには XeF_2 ガスドライエッチング装置 (Samco VPE-4F) を用いた. チャンバ—の中にセットした Si 基板に一定量の XeF_2 ガスをさらす仕組みになっている. XeF_2 ガスの圧力, ガスとチャンバ—を接続する充填時間, XeF_2 をさらすエッチング回数をそれぞれ選択することによってシリカパターンのエッチング度合いを調節することが出来る. 実験方法は以下の通りである.

1. 排気ルートを開け, 窒素ガスの元栓を開けて, を起動した
2. の準備が完了し, エンジン音が停止したら XeF_2 ドライエッチング装置を起動させた.
3. チャンバ—の真空状態が解かれるので, 準備した基板をなるべくチャンバ—の中央にくるようにセットした.
4. XeF_2 ガスの圧力, ガスとチャンバーを接続する充填時間, XeF_2 ガスにさらすエッチング時間, エッチング回数を設定し, エッチングを開始した.
5. 終わったら基板を取り出し, XeF_2 ドライエッチング装置を立ち下げた.

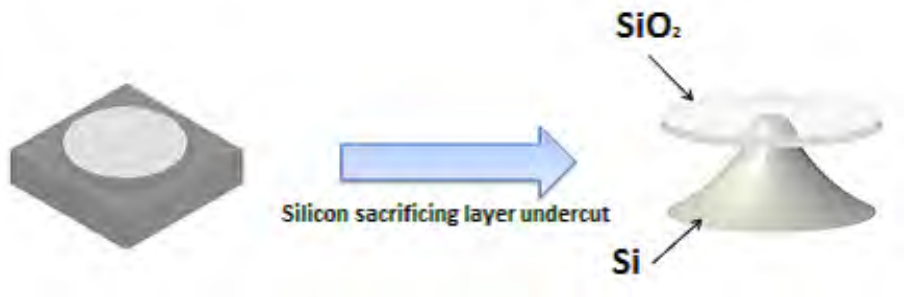

Fig. 3.1: Illustration of sacrificing etching

3.1.2 レーザリフロー

この章では本研究で行ったレーザリフローについて記述する.

3.1.3 実験装置

実験で使用したレーザリフロー系の構造は以下の Fig. 3.2 の通りである.

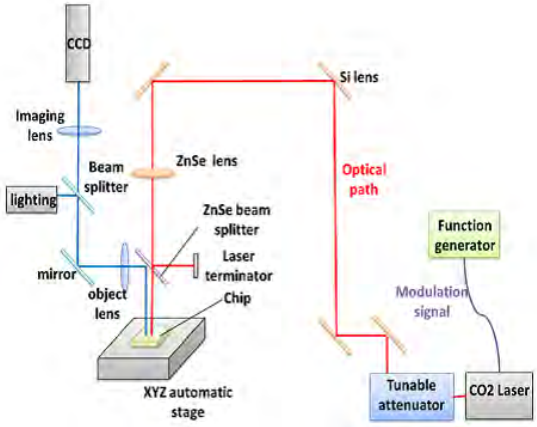

Fig. 3.2: Experimental set-up of the reflow process.

CO_2 レーザから出射された光は偏光可変アッテネータに入り, Au コートされた Si ミラーによって光路を変え, ZnSe 非球面レンズによって絞られた後ビームスプリッタにより, 二つに分岐される. 二つに分けられた一方の光は基板に達し, ディスク共振器をリフローする. そしてもう一方の光はレーザターミネータにより遮断される. 同時に CCD カメラを設置し, レーザの軸合わせと焦点合わせを行っている.

3.1.4　実験方法

レーザリフロー系の実験方法は以下の通りである.

1. 冷却層値を起動し, シャッターコントローラ電源を入れ, シャッターが閉まっていることを確認した後 CO_2 レーザの電源を入れた.
2. アッテネータを最大まで絞り, レーザのスイッチを入れたあとレーザの出力を CW にし, パワーを調節して 50mW になるように調節した.
3. 感熱紙を試料台に乗せ, バキュームによって固定した.
4. 試料台の Z 軸を感熱紙の焦点距離-2.5 に合わせ, アライメント光が見えていることを確認した.
5. もしアライメント光が見えなければビームスプリッタを調節してアライメント光が画面内で視認できるようにした.
6. 感熱紙に対して 1 パルス波を出射した.
7. 感熱紙に円形のバーンパターンが残るので, そこにターゲットを設置した. 以後このターゲットに共振器を合わせることでリフローを行う.
8. アッテネータの効率が 5% であることを考慮し, 必要な分だけレーザの出力を上げ, パワーを安定させるために 1 時間ほどそのままの状態に保った. 以後, パワーの微調整はアッテネータを用いた.
9. 試料台に基板を置き, ディスク共振器のシリカ部分にカメラの焦点を合わせ, スポット径印の中心にディスク共振器が来るように設置した.
10. CCD カメラにレーザ光が入らないよう絞りを閉め, CO_2 レーザの強度を共振器に適切な強度になるようアッテネータを調整することで合わせ, ディスク共振器に向かってレーザを出射した.
11. 光学顕微鏡によってトロイド共振器が作成されていることを確認した.

3.1.5　シリカトロイド共振器の作製結果

上記の方法で作成したシリカトロイド共振器の光学顕微鏡写真を以下に示す.

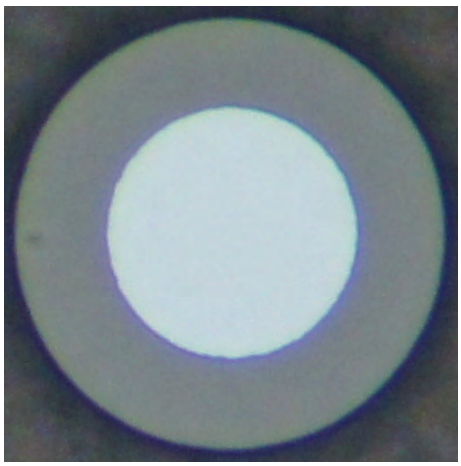

Fig. 3.3: Before reflow

Fig. 3.4: After reflow

Fig. 3.1.5, Fig. 3.1.5 を見ると, リフローすると共振器の縁に輪上の線が表れることが光学顕微鏡でも十分認識出来ることがわかる. この輪は Disk 共振器の縁が, レーザの熱により丸まったために生成したものであるが, それらをより詳細に観察したものが以下の ESEM による画像 Fig. 3.5, Fig. 3.7 であり, それらを横からみたものが Fig. 3.6, Fig. 3.8 である.

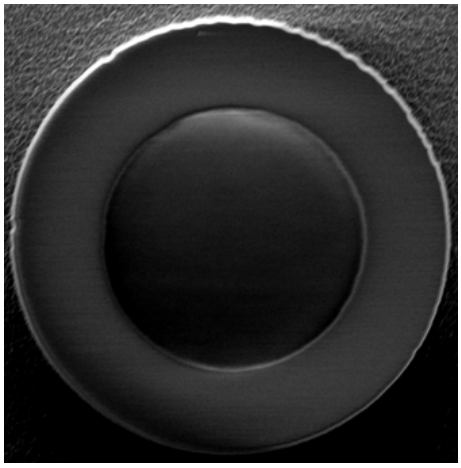

Fig. 3.5: ESEM view:Before reflow

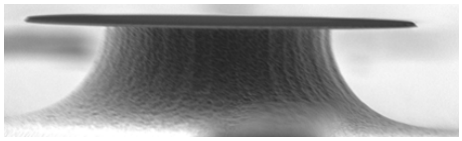

Fig. 3.6: ESEM view:Before reflow

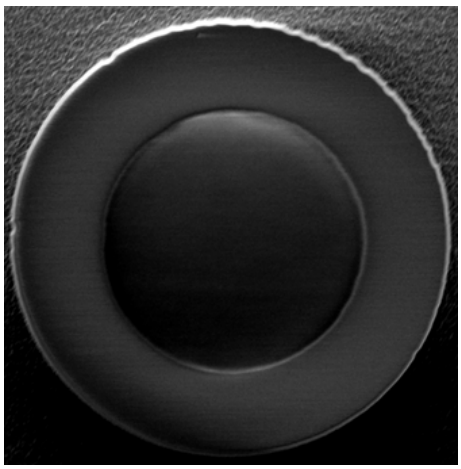

Fig. 3.7: ESEM view:After reflow

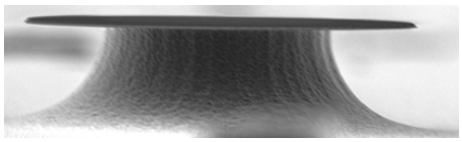

Fig. 3.8: ESEM view:After reflow

3.2 透過スペクトル測定

3.2.1 テーパファイバ作製

測定に使用するテーパ光ファイバの作製方法を以下に示す.

1. まず, ファイバを固定するためのジグを用意し, ファイバをセットし, テーパファイバ作製装置に固定した.
2. テーパ光ファイバを左右に引っ張りながら上から LP ガスバーナーでファイバを加熱することによってテーパファイバを作製した.
3. 光ファイバの両端に $\lambda = 1548$ nm のレーザおよびパワーメータを接続し, 透過率の時間変化を見ながらファイバを作製した.
4. ファイバを引きながら透過スペクトルを観測 (Fig. 3.9) し, 透過スペクトルが大きく乱れた後に落ち着いた瞬間を見計らって引きを止めた.

なお, 両方のステージ移動速度は一定であり, 一定速度で光ファイバを引くことが出来, ガスバーナーに使用する LP ガス及び O2 ガスはマスフローコントローラーによって制御している.

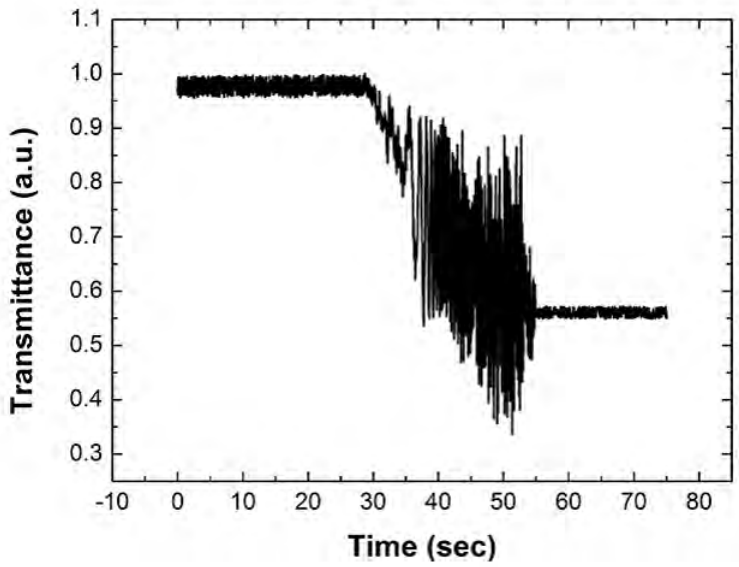

Fig. 3.9: Transmission of a taper fiber.

Fig. 3.9 においてシングルモードファイバを用いた. 最初の透過率の安定している状態は, もともとファイバ内に存在していたコアとクラッドが作り出す導波路によってシングルモードの光が透過している状態である. その後, ファイバを温めながら引き延ばすことにより, コアがつぶれ, クラッドと空気中との屈折率差によって光が閉じ込められる. しかし, その際, その屈折率差の大きさゆえに導波路が一時, マルチモードになる. その後さらにクラッドも引き延ばされて 1 μm ほどの直径になったとき, クラッドと空気中でシングルモードの導波路が生成し, 再び透過スペクトルが安定するのである.

3.2.2 空気中測定

上記の方法で作製したテーパファイバを空気中でシリカトロイド微小光共振器とカップリングさせ, 透過スペクトルを測定した.

透過スペクトルは共振器とテーパファイバがあまり遠すぎるとファイバと共振器の結合が弱くなり, ファイバの光が共振器に入らないので高 Q 値は望めない. 反対にあまり近づけすぎると今度は結合が強くなりすぎてしまい, せっかく共振器に入った光もすぐに出て行ってしまい, これもまた高 Q 値を出すことが出来なくなってしまう. そこで, 近すぎず, 遠すぎないカップリングを見つけるために, 一度ファイバ

を共振器に接触させてファイバと共振器の距離を確認した後, 1 µm ほど遠ざけてから, 透過スペクトルを測定し, そこから 100 nm ずつ近づけて高 Q 値を望めるカップリングを探した. Fig. 3.10 の空気中測定結果は, 赤居グラフが共振器とテーパ光ファイバがカップリングした時の透過スペクトルを表し, 黒いグラフが空気中でのリファレンスを表している.

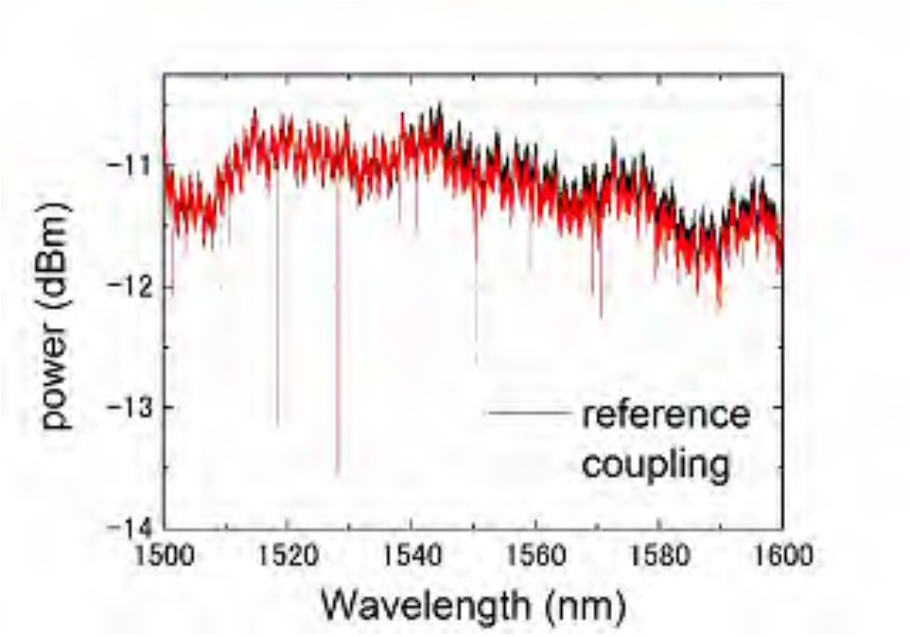

Fig. 3.10: Coupling transmission spectrum of taper fiber and micro toroidal cavity in air.

3.2.3 液中測定

上記の方法で, 空気中での透過スペクトルを測定した後, 共振器からテーパ光ファイバを 2 µm 遠ざけ, 完全に接触していないことを確かめ, 純水をガラスピペットで少量滴下した. 共振器とファイバが完全に水中に沈んでいるのを確認し, 水中でのファイバの透過スペクトルのリファレンスを取ってから, 共振器に 100 nm ずつ近づけて空気中測定時と同じように高 Q 値の出るカップリングを探した.

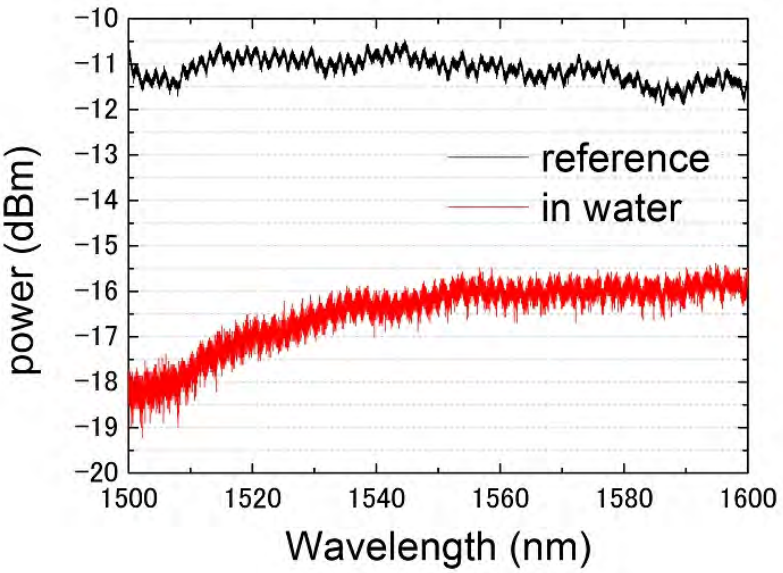

Fig. 3.11: Transmission spectrum of taper fiber in air and in water.

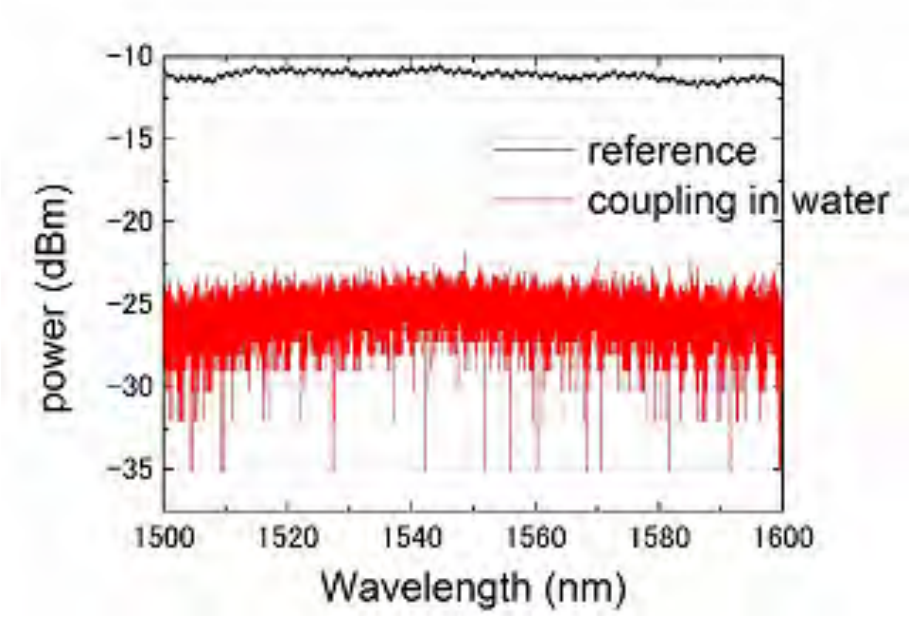

Fig. 3.12: Coupling transmission spectrum of taper fiber and micro toroidal cavity in water.

Fig. 3.12 を見ると, 共振波長を測定する以前に, 透過スペクトルのパワーが全体的に大きく下がっているのがわかる. これは, 空気中でのシングルモード条件を満たすファイバでは, 直径が細すぎて水の吸収による光の損失が大きいからである. 従って水中に適したファイバを作製するために, 理論で述べたように計算を行い, 水中での測定に適したファイバの直径を求め, 実際に透過率を測定した.

3.2.4　理想的なテーパファイバの純水中測定

理論で前述したように, 水中測定に適したテーパファイバの直径は 2 μm である. テーパファイバの直径は作製の際の引き時間に関わる. テーパファイバ引き時間とファイバ直径の関係図は以下の通りである.

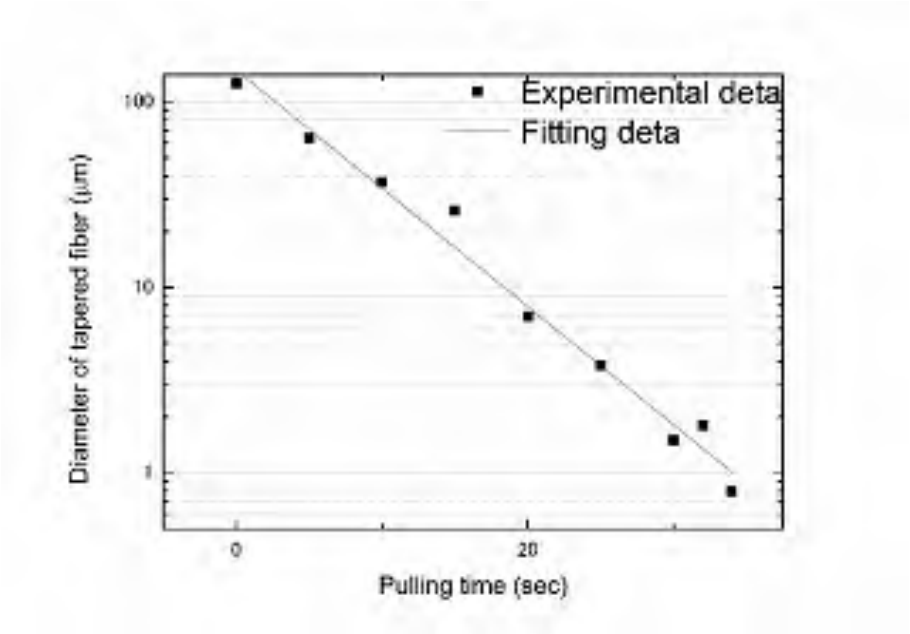

Fig. 3.13: The relation between pulling time and diameter of tapered fiber.

Fig. 3.13 を見るとファイバの直径を 2 μm にするには引き時間をおよそ 30 秒にすれば良いことがわかる. 従って引き時間を 30 秒にしたファイバを先ほどまでの実験と同じように純水中につけて空気中と比べてどのように透過率が変化するかを調べた. 2 μm ファイバを用いた実験の結果は以下のようになった.

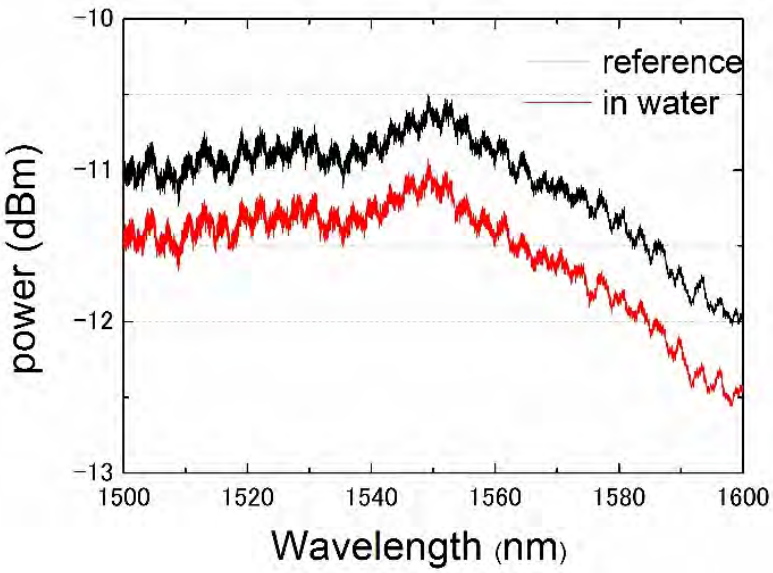

Fig. 3.14: The relation between pulling time and diameter of tapered fiber.

Fig. 3.14 より, 作製したファイバならば透過率の損失を空気中に比べて 0.5 dBm に抑えることが可能であることがわかった. 今後の液中での測定はこのファイバを用いて行う.

4　シリカトロイド共振器上における細胞培養

4.1　実験環境

本研究において使用した実験室や, 細胞, NIH3T3 の継代について説明する. 継代はクリーンルーム内にある以下の Fig. 4.1 のようなクリーンベンチ内で行う. 手を肘までハンドソープで洗い, その後イソジン溶液で消毒し, 水で洗い流す. ペーパータオルで水けを良く拭きとった後, エタノールを吹きかけて消毒をする. このように, 実験前には手についた雑菌やウィルスが dish や培地などに入るのを防ぐためにしっかりと消毒をした. さらに, クリーンベンチ内に器具を導入するときは必ず 70%エタノールで全体を拭いて消毒してから導入することや, 1 種類の液体に対しては必ず 1 本のガラスピペットを用いること, そしてガラスピペットで液体に触れるときは, 毎回ガスバーナーであぶって消毒してから触れるなど, 目に見えない微生物を避けるためには常に気を付けなければならない. これは, 動物細胞を培養中に余計な雑菌が入ること (コンタミネーション (contamination) という) を防ぐためである.

Fig. 4.1: This is clean bench I used.

4.2　使用した薬品や器具

4.2.1　培地

細胞培養実験をする前に以下の溶液を準備し, 配合した.

- DMEM 45 ml
- Bovine serum 5 ml

- Pen strep 1 ml

これを培地という. 培地とは細胞にとっての “栄養素” のことであり, 中にはアミノ酸, ビタミン, ミネラル, ブドウ糖その他の栄養素を豊富に含まれている. 従って扱い方を間違えるとバクテリアやカビなどが非常に良く生えてしまう. 扱うときは, 一切の雑菌を混入させないように細心の注意を払わなければならない. これからの実験で細胞を培養するときや, 観察, 撮影するときは細胞への負担を最小限に抑えるために, この培地中にて行うこととする.

4.2.2 PBS(-)

食塩で等張にしたリン酸緩衝液で, Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) をもとにし, 2 価イオンを含まない (Ca^2+, Mg^2+ -free) の物を PBS(-) という. 細胞同士の接着や細胞と基質との接着にはカルシウムを介した物があるため, 細胞浮遊液を作るときは PBS(-) で洗浄する. 細胞が剥がれた後も細胞同士の接着を防ぐためにしばしば PBS(-) を用いるが, 細胞の生存には良い条件ではないので, 30 分以上浮遊液として保存するときは培地の方が良い. 細部の種類によって PBS の耐性に違いがあるので, 弱い細胞の場合は注意が必要である.

4.2.3 トリプシン

dish に付着して増殖する細胞を継代するには, 細胞と細胞どうし, 細胞と dish との間の接着をはがして, 単一細胞からなる浮遊液 (cell suspension) を作り, これを希釈してまく. この時, タンパク質による接着をはがしてバラバラにする作用があるのがトリプシンである. これらを溶かす緩衝液には, 生理的な濃度の食塩を含み, 二価イオンを含まないリン酸緩衝液 PBS(-) を用いる.

細胞によってトリプシンの感受性に大きな差があり, トリプシンを加えてすぐに吸い取ったとしても, 残ったわずかのトリプシンによって速やかに剥がれてしまう細胞がある一方で, トリプシンを加えたままでインキュベータに 5 分から 10 分入れてようやく剥がれ始める細胞もある. 本実験で用いた NIH3T3 細胞の感受性ははちょうど中間ぐらいでトリプシンを滴下した後 3 分ほどインキュベータに入れておく必要がある.

4.2.4 CO_2 インキュベータ

細胞を培養する際の標準的な培養器が CO_2 インキュベータである. dish のような開放系 (dish 内の気相が dish 外と通じている) で培養する際, 培地の標準的な緩衝剤

である重炭酸緩衝液によって pH を 7.4 に保つには, 気相の CO_2 濃度を 5% に保つ必要がある. このため, 炭酸ボンベガスから炭酸ガスを供給して培養するのが CO_2 インキュベータである. また, 温度 37 ℃, 湿度 100%に保つのが標準である.

4.3 NIH3T3 細胞の継代方法

細胞を適切な方法で増やせなければ, 同じ条件で実験を行ったとは言えず, 正確な実験を行うことは出来ない. 細胞の継代方法, すなわち細胞の増やし方について, 以下に記述した.

1. 37 ℃ に温めた倍地 4 ml を 6 cm dish に滴下した.
2. 液体窒素タンクから p3 の NIH3T3 細胞を一本取り出し, 温浴層で素早く解凍し, すぐに dish に偏りが出ないようにまんべんなく播種した.
3. dish を 37 ℃ , CO_2 濃度 5% に保ったインキュベータの中に導入し, その状態で 1 日から 2 日ほど培養して dish の中全体に細胞を増殖させた.
4. 細胞が dish いっぱいに広がったことを顕微鏡で確認した後, アスピレータで古い培地を除去した.
5. 細胞をはがしてしまわないように dish の壁に PBS をぶつけて dish 内の細胞を PBS で残留している培地を洗浄し, 再びアスピレータで PBS を除去した.
6. PBS 洗浄を 2 回以上繰り返した後, 冷凍してあるトリプシンを 37 ℃に保ってある温浴層で解凍し, 1 ml dish 全体にいきわたるよう撒き, 再びインキュベータ内に導入した.
7. 3 分後, トリプシンの酵素の働きにより NIH3T3 細胞との接着が弱くなった dish をインキュベータ内から取り出し, すぐに培地を 4 ml 滴下した.
8. 今度は細胞を dish からはがすために dish に滴下した培地をガラスピペットで吸い込んでは dish にぶつける作業を何度も繰り返した.
9. 細胞を dish からはがした後, 10 ml 遠沈管に入れ, 1000 rpm で 100 秒間遠心分離を行い, 培地, トリプシン, 細胞を完全に分けた.
10. 沈んでいる細胞を吸い込まないように気をつけながら培地, トリプシンをアスピレータで吸引し除去した後, 3 ml の培地を入れ再びピペッティングした. この作業をトリプシン処理という.

11. 37 ℃ に温めた培地を 4 ml ずつ滴下した 6 cm dish 三枚に, ピペッティングした培地を 1 ml ずつまんべんなく滴下しインキュベータの中に導入した.

以上の作業を細胞継代といい, この作業を行うことで細胞の p つまり passage の数が増加する. passage というのは培養した回数のことで dish から細胞をはがし, 他の dish で培養すると数字が増える. passage の数字が大きいほど老化した細胞といえる.

6 cm dish 三枚に細胞を播種し, 2 日から 3 日ほどインキュベータ内で培養した後, トリプシン処理を行い 10 cm dish 三枚に細胞をまんべんなく播種し, インキュベータ内で 2 日から 3 日ほど培養した. 10 cm dish 三枚に接着させた細胞をトリプシン処理で剥離させたあと, 遠心分離にかけ培地とトリプシンを除去した後, 37 ℃ に温めた cervation を 5 ml 滴下し, ピペッティングをした. あらかじめ 0.5 ml の cervation を入れた細胞入れにぴペッティングした細部を 0.5 ml ずつ滴下し, 温度がゆっくり下がるようイソプロパノールに浸した容器に入れ, -80 ℃で 24 時間保存した. その後, 液体窒素タンクに保存することによって半永久的に細胞を保存することが可能となる.

NIH3T3 細胞は不死化細胞であると前述したが, 正確には完全なる不死化細胞ではなく継代を重ねると trans formation が起きる細胞である. trans formation とは細胞同士が重なり合う現象で一般的に老化した細胞で見られるようになる現象である. p20 (passage 20) を超えるとそのリスクが高まるので本実験では最高でも p15 を超えないような若い細胞を用いて実験をした. なぜなら trans formation が起きると細胞は正常な状態であるとは言えなくなり, 細胞周期に影響を起こさないとも限らないからである.

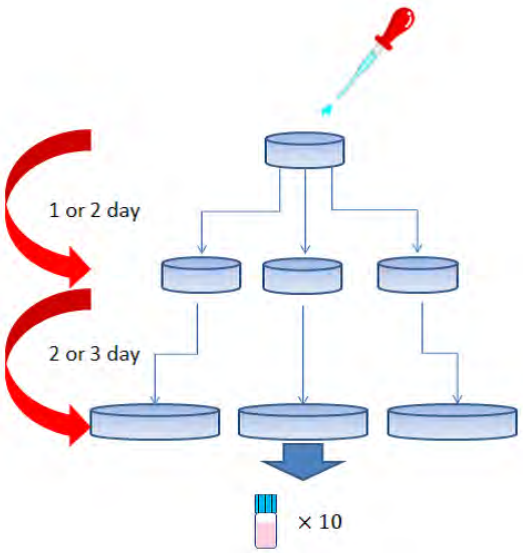

Fig. 4.2: The process of cell cultivation.

4.4 細胞接着時間測定実験

4.4.1 透過型位相差顕微鏡の原理

長年, 顕微鏡の専門家は, 試料を調整する間に細胞成分が失われたりゆがめられたりする可能性に悩まされてきた. これを解決するには, 細胞になんの処理も施さず, 生きたまま観察する必要がある. 通常, ほとんど無色透明である細胞を生きたまま観察する際は, 透過型の位相差顕微鏡を用いる. 透過型位相差顕微鏡とは, 反射光ではなく透過光を利用して細胞を観察する顕微鏡である. 細胞の内部には細胞内組織により, その屈折率は微妙に異なっている. 特に核のように相対的に密な部分では光の遅れが生じ, それが光の位相差を生む. 位相差が大きい部分ほど暗く, 小さいほど明るく見えるので, 結果的に細胞の内部構造が良く観察できるのである.

4.4.2 目的

本実験の最終的な目的は細胞周期を詳細に解析することにある. したがって細胞が細胞分裂を開始し, 終えてから次の細胞分裂が始まるまでの時間を知っておく必要がある. dish に播種するときの NIH3T3 細胞は dish に接着するまで (Fig. 4.3(a)) のような浮遊状態と呼ばれる形で液中を浮遊している. この状態では細胞周期は進

まず, 細胞はトリプシン処理をされた直前の位相で停止していると考えられる. この浮遊状態の細胞が (Fig. 4.3(b)) のように dish 上に接着して初めて細胞周期が再開し, 細胞分裂が始まるのであるが, 接着に至るまでの時間を知ることで細胞が接着してからどれくらいの時間で細胞分裂を始めるかを観測し, さらに, 接着直後の細胞を時間的に観察することで NIH3T3 細胞の細胞周期が一周するおおよその時間を調べることが本実験の目的である.

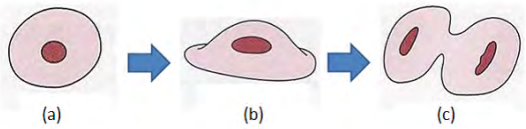

Fig. 4.3: The transformation of a cell. (From 秋山徹, 河府和義 (編), “細胞・培地活用ハンドブック” 羊土社.)

4.4.3 実験方法

細胞接着時間測定実験の実験方法は以下に示すとおりである.

1. 35 ml dish を 10 枚用意し, それぞれに 1 から 10 までの番号を蓋に記述した.
2. それぞれの dish に NIH3T3 細胞をまんべんなく播種し, 37 度, CO_2 濃度 5% のインキュベータ内で培養した.
3. 10 時間経過するまで 1 時間ごとに dish を取り出し, 細胞の接着する様子を透過型位相差顕微鏡で撮影した.
4. 1 時間後は番号 1 の dish, 2 時間後は番号 1 と番号 2 の dish を撮影するというように, 1 度観察した dish はその後も 1 時間ごとに撮影することで, 撮影による接着への影響も同時に観察した.
5. 最後に, 接着直後の細胞を観察し続けることにより, NIH3T3 細胞の細胞周期が一回りするおおよその時間を調べた.

4.4.4 実験結果

以上のような実験を行うことで得られた実験結果を記す.

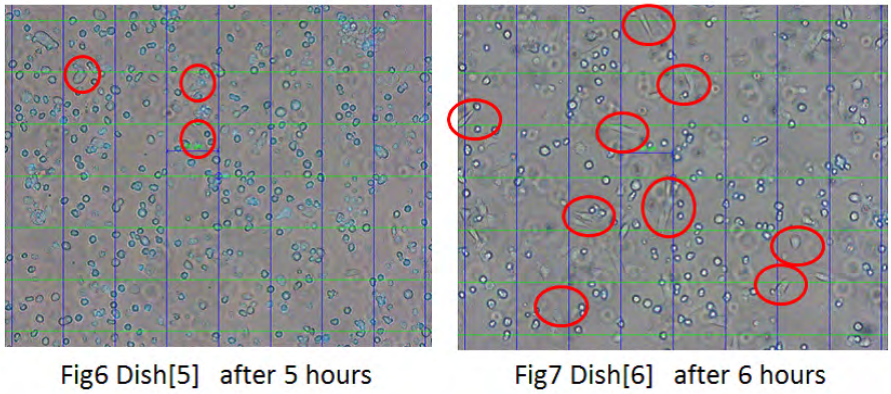

Fig. 4.4: The cell on a dish. Red rings are pointing gleed cells.

Fig. 4.4 を見ると播種後 5 時間ほど経過した細胞でいくらか接着した細胞が見られはじめ, 6 時間経過するとその数はかなり増えていた. この結果から細胞接着にかかる時間は最低でも 5 時間から 6 時間程度と見積もってこれからの実験に臨む.

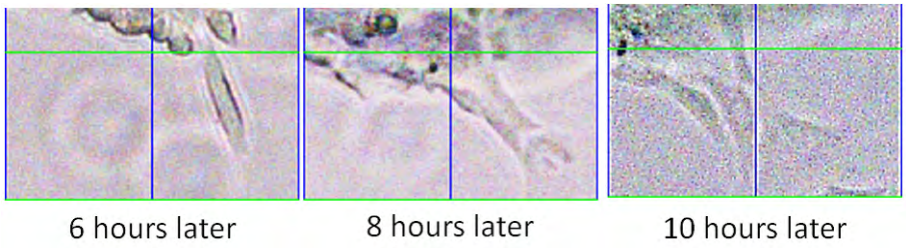

Fig. 4.5: I can make sure that cells divide in 2 or 3 hours.

さらに Fig. 4.5 より, 細胞は接着後 2 時間から 3 時間の間で細胞分裂を起こしていることも確認できた.

以上の結果より, 細胞播種から早ければ 8 時間から 9 時間程度で NIH3T3 細胞は分裂を開始することがわかった. 共振器上で細胞分裂を観察するためには播種後, 遅くとも 9 時間後には観察しなければ細胞分裂が進みすぎてしまう可能性がある.

4.5 共振器上への細胞培養実験

4.5.1 目的

dish 上において接着までの時間を測定することに成功したが, そもそも共振器上に細胞を接着させることは可能であるか調べる必要がある. さらに, 仮に細胞が共振

器に接着することが可能であるとしても, 先に述べたように透明な dish の上に細胞を接着させる場合には位相差顕微鏡を用いるが, 本実験では不透明な Si 基板上の透明な SiO2 上に細胞を播種し, 接着させる必要があり, この場合, Si 基板を光が透過出来ないので透過型顕微鏡を用いることが出来ず, 反射型光学顕微鏡を用いるしかなく, 不透明基板の上に無職透明な細胞を接着させて反射型顕微鏡で観察できるかどうかは不明である. そこで以下のような実験を行い, 共振器上に細胞を接着させることを試み, 接触させた細胞を観察するための染色実験を行った.

4.5.2 実験方法

1. この実験において共振器の軸径を揃えることは重要な要素ではないので, 共振器への細胞接着確率がどの程度であるかを調べるために, 多くの共振器 (トロイド共振器と Disk 共振器合わせて 80 個程度) 乗せた基板を用意した.

2. 基板を紫外線に 15 分ほど当て, その後エタノール洗浄することで細胞培養時に邪魔となる基板に付着している物理的ゴミであるシリカやシリコン破片, 生物的な付着物である空気中の浮遊ウィルスや細菌などを洗い流した.

3. 以上で滅菌は完了とし, 培地を敷いた 6 cm dish 上に基板を置き, その上から NIH3T3 細胞を播種し, 37 度, CO_2 濃度 5% に保ったインキュベータの中で培養した.

4. ある程度時間が経過した後に細胞が共振器にどれくらい接着しているか, 反射型光学顕微鏡を用いて観察した.

5. 反射型顕微鏡で観察した際に, 細胞と思われる像が本当に細胞であるのかを調べるために, エオジン染色液を用いて染色した.

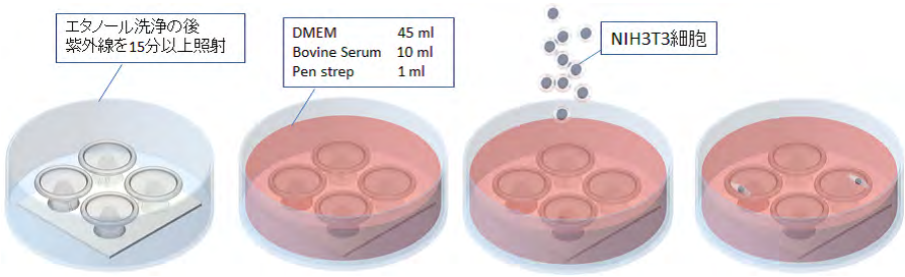

Fig. 4.6: Process of the cell plantation experimentation.

4.5.3 実験結果

細胞が接着したと思われる共振器と, それをエオジン染色液で染色した物は以下のように観察された.

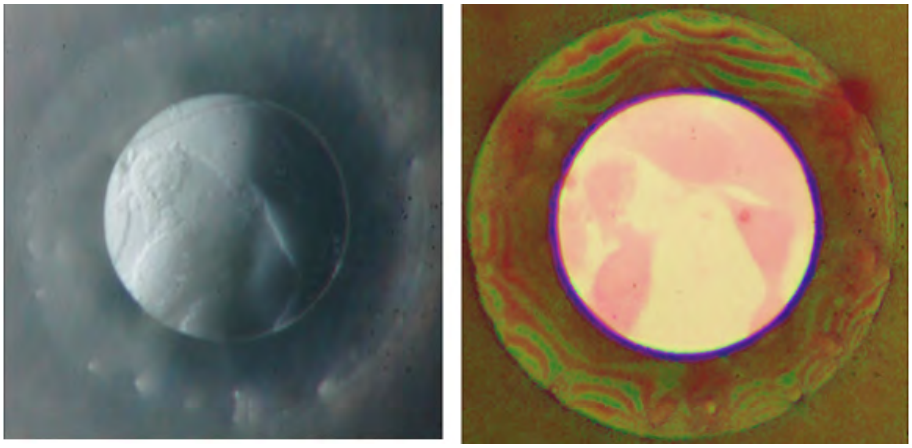

Fig. 4.7: The dyed cells.

以上の結果から, 半透明の帯状の物体が共振器に付着していれば, 共振器上の細胞接着に成功したと言えることがわかった.

ここで, トロイド共振器を Disk 共振器のそれぞれで細胞接着割合に差異が表れたかを調べ, その割合を Table. 4.1 にまとめた.

Table. 4.1: The ratio of glueing cell

種類	共振器数	細胞接着した共振器数	接着割合
Disk	52	11	21.2
トロイド	51	2	3.92

Table. 4.1 を見ると細胞接着の割合に大きな差が生まれているのがわかる. トロイド共振器の方が接着割合が 20%以下となっている. これにはさまざまな要因が考えられるが, 一番大きな原因は共振器の表面積の違いであると考えられる. トロイド共振器の方がリフローする分, 表面積が小さいのでその分細胞が接着する割合も下がってしまうのだと考えられる. しかし, 20%という割合は表面積の違いだけでは説明できない. トロイド共振器と Disk 共振器の表面積比に 5 倍もの差はないことは明らかである. では, 表面積以外に共振器に対する接着割合を支配しているのは何か. これは予測の域を出ないが, 共振器と細胞の大きさ比によるものだと考えられる. 細胞は浮遊状態で直径が数十 μm ほどであり, 場合によっては共振器の直径と同等かそ

れよりも大きくなり得る. 従って, 今回直径 100 μm の Disk 共振器を用いたので, トロイドにすると細胞と共振器の大きさに差がなくなり, 乗りづらくなってしまったのだと考えられる.

さらに, 接着した細胞が共振器上で細胞分裂を進行させるか調べるために, 一昼夜インキュベータの中で培養した結果が以下の 4.8 である.

Fig. 4.8: lonely cell on the cavity

Fig. 4.9: After the 24h a cell gleued on the microcavity

Fig. 4.9 より細胞は, 単独では細胞分裂を起こしにくいことがわかった. 従って細胞接着確率を上げることが本実験において至急求められることである. 細胞接着率を上げるために実験方法の検討を行い以下のような実験を行うこととした.

4.6 Disk 共振器上への追加細胞播種実験

4.6.1 目的

細胞には細胞間コミュニケ―ションと呼ばれる細胞同士で情報を交換し, 自らの環境を知り, 細胞周期を制御する機構が備わっている. 細胞間コミュニケーションには培地を介して行われるものと細胞同士が直接結合して行われるものがある. 今回の細胞播種実験において, 前者の細胞間コミュニケーションを推進するために dish 上には常に同じ細胞を接着させていたが, 培地を介する細胞間コミュニケーションでは細胞分裂は起きないようであった. 従って, 後者の細胞間コミュニケーションである細胞同士の接触によるコミュニケーションを促進するために, 以下の実験を行い, その後の細胞分裂が起こるかどうか検討した.

4.6.2 実験方法

1. 今までと同様に 200 µm シリカディスク共振器の乗った基板の上に NIH3T3 細胞を播種し, 共振器の上に細胞を接着させた.
2. 8 時間から 9 時間経過したあたりで, dish にある古い培地を除去し, 反射型顕微鏡で NIH3T3 細胞の有無を確認した.
3. 細胞が一つの共振器に密度高く接着していない場合, もう一度播種実験を行い, 共振器の上に細胞を接着させた.
4. 以上の操作を 3 回から 4 回程度行った後, 密度高く細胞が乗った共振器をインキュベータで培養し, その後細胞分裂が起こるかを調べた.

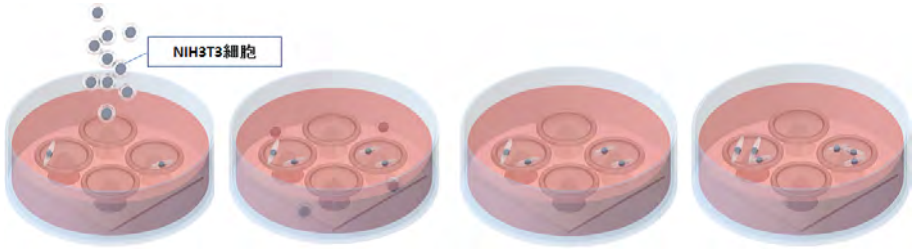

Fig. 4.10: Process of the cell additional plantation experimentation.

4.6.3 実験結果

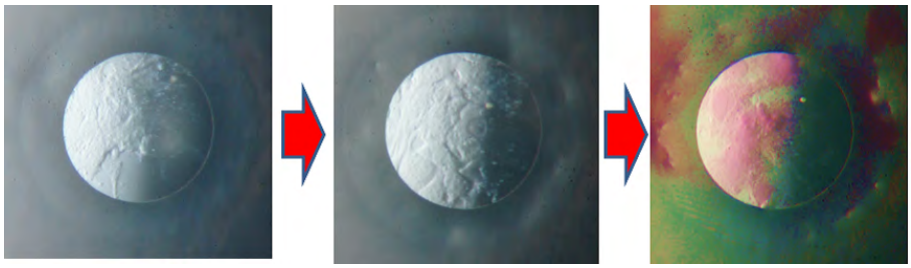

Fig. 4.11: This fig shows the cell division on a 200 µm Disk micro cavity.

Fig. 4.12 より, 追加播種実験によって密度高く細胞を接着させることが出来た. そしてある程度の細胞が乗った共振器ならばその後の細胞分裂が行われることも明らかとなった. 以下は同様の実験を 200 µm トロイド共振器を用いて行った結果である.

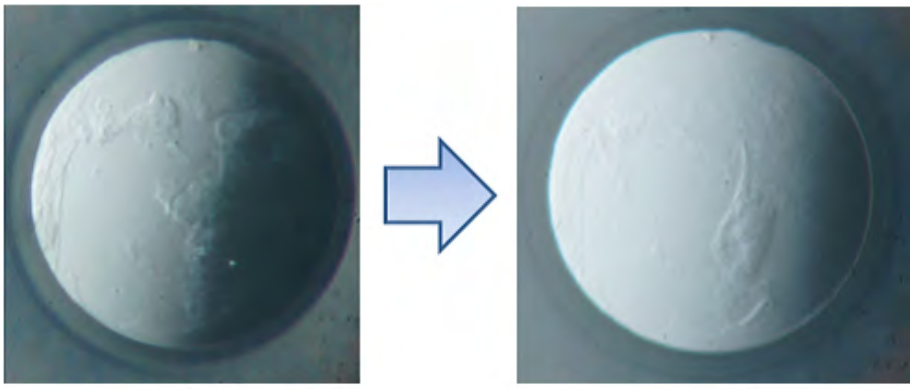

Fig. 4.12: This fig shows the cell glueing division on a 200 μm toroidal micro cavity.

残念ながらトロイド上では細胞分裂を確認することは出来なかった. しかし, Disk 共振器で細胞分裂を観察できたということは実験を繰り返せばトロイド共振器でも分裂させることは出来るはずである. トロイド共振器での細胞分裂が確認でき次第, 研究は次の段階へ移行できるであろう.

5　結論

5.1　液中光学測定

シリカトロイド微小光共振器を比較的安定して作製することが出来るようになった. 空気中でのシングルモード条件を満たしたファイバは水の吸収により水中では著しく透過率が落ち込み, 実質的に水中でトロイド共振器の透過スペクトルを測定することは困難だが, 水中でのシングルモード条件を満たしたファイバ, すなわち, 直径 2 μm 程度のファイバを作製することによって水の吸収による損失を-0.5 dBm にまで抑えられることを実験的に確認した.

5.2　細胞培養

Disk 光共振器とシリカトロイド微小光共振器との間で細胞接着確率が大きくことなったが, Disk 共振器, シリカトロイド微小光共振器ともに細胞を接着させることが可能であることがわかった. その際, 細胞分裂を進行させるために密度高く細胞を接着させることが必要であり, そのためには追加播種実験が有効であることがわかった. 追加播種実験により, Disk 光共振器上において細胞分裂をさせることに成功したが, トロイド共振器では細胞分裂の様子を確認することはまだ出来ていない. 原因は二つの共振器の表面構造の違いにより接着のしやすさに違いがあるためと考えられる.

5.3　まとめ

以上大きく二つの実験結果より, 細胞周期解析のための土台を固めることが出来た. しかし, 最後までまとめ切ることが出来なかったので本研究において残ってしまった課題を詰める必要がある. そしてここから, 実際に測定を行うに当たり実験系の更なる見直し, 新たな実験器具の作製, 導入を中心に行っていきたい.

参考文献

[1] B. Alberts, A. Jhonson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. “Molecular Biology of THE CELL Fifth Edition” Newton Press. (2009) (アルバート他 中村桂子 松原謙一 他 (訳) “THE CELL 細胞の分子生物学 第 5 版” ニュートンプレス) (2010).

[2] 秋山徹, 河府和義 (編), “細胞・培地活用ハンドブック” 羊土社.

[3] B. Lewin, L. Cassimeris, V. R. Lingappa, G. Plopper, “CELLS” Jones and Bartlett Pub (2006) (ルーイン他 永田和宏 中野明彦 他 (訳) “ルーイン細胞生物学” 東京科学同人) (2008).

[4] O. Shimomura, “Discovery of green fluorescent protein, GFP, ” Nobel Lecture, December 8, (2008).

[5] J. F. Head, S. Inouye, K. Teranishi, and O. Shimomura “The crystal structure of the photoprotein aeQuorin at 2.3 Åresolution” Nature, **405**, 372-376 (2000).

[6] A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. MIyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, and A. Miyawaki, “Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression,” Cell, **132**, 487-498 (2008).

[7] A. Miyawaki, “Development of Probes for Cellular Functions Using Fluorescent Proteins and Fluorescence Resonance Energy Transfer,” Annual Reviews, **80**, 357-373 (2011).

[8] A. Sawano, A. Miyawaki “細胞周期インディケータ Fucci-細胞周期を多角的に理解する-” 生化学, **84** 47-52 (2012).

[9] A. Kaida, M. Miura, “Differential dependence on oxygen tension during the maturation process between monomeric Kusabira Orange 2 and monomeric Azami Green expressed in HeLa cells” Biochemical and Biophysical Research Communications, **421**, 855-859 (2012).

[10] K. J. Vahala, “Optical microcavities,” Nature, **424**, 14, 839-846 (2003).

[11] D. W. Vernooy, V. S. Ilchenko, H. Mabuchi, E. W. Streed, and H. J. Kimble, “High-Q measurements of fused-silica microspheres in the near infrared,” Optics Letters, **23**, 247-249 (1998).

[12] B. Gayral, J. M. Gerard, A. Lemaitre, C. Dupuis, L. Manin, et al, “High-Q wet-etched GaAs microdisks containing InAs Quantum boxes,” Applied Physics Letters, **75**, 1908-1910 (1999).

[13] D. K. Armani, T. J. Kippenberg, S. M. Spillane, and K. J. Vahala, “Ultra-high-Q toroid microcavity on a chip,” Nature, **421**, 925-927 (2003).

[14] I. Razdolskiy, S. Berneschi, G. Nunzi Conti, S. Pelli, T. V. Murzina, G. C. Righini, and S. Soria, "Hybrid microspheres for nonlinear Kerr switching devices," Optics Express, **19**, 9523-9528 (2011).

[15] 國分 泰雄, "光波工学" 協立出版株式会社, (1999).

[16] F. Vollmer and Stephen Arnold, "Whispering-gallery-mode biosensing: label-free detection down to single molecules" Nature Methods **5** 591-596 (2008).

[17] F. Vollmer, S. Arnold and D. Keng., "Single virus detection from the reactive shift of a whispering-gallery mode," PNAS, **105**, 20701-20704 (2008).

[18] S. Arnold, D. keng, S. I. Shopova, S. holler, W. Aurasky, and F. Vollmer "Whispering gallery mode carousel a photonic mechanism for enhanced nanoparticle detection in biosensing" Optics Express, **17**, 8, 6320-6238 (2009).