

Title	<技術ノート>光ピンセット
Author(s)	西山, 雅祥; 岡本, 憲二
Citation	低温物質科学研究センター誌 : LTMセンター誌 (2005), 7: 26-31
Issue Date	2005-11-01
URL	https://doi.org/10.14989/153159
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	publisher

光ピンセット

Optical tweezers.

西山 雅祥, 岡本 憲二

京都大学 大学院理学研究科 化学専攻

M. Nishiyama & K. Okamoto

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

光ピンセット (Optical Tweezers) とは、光を回折限界に集束させることで、溶液中の微粒子などをその集光点に捕捉する光技術である。この光学系を光学顕微鏡に導入することで、研究対象となる微小物体を顕微鏡で観察しながら、非接触・非侵襲で捕捉し、三次元的に自由に動かすことが可能となる。この「光の手」は、マイクロメートルスケールの物体の物性評価や生体分子の1分子計測、細胞の顕微操作など様々な分野で利用されている。本稿では、光ピンセットの原理と装置の概略を説明した後、生命科学分野での応用例について紹介したい。

1. 光ピンセットの原理

光は運動量を持つ。このことは、光を電磁波としてとらえる電磁気学の立場からも、質量を持たない光子としてとらえる量子力学の立場からも容易に示すことができる。したがって、光が反射や屈折などにより、その進行方向を変化させた場合や、光の吸収・放出が起きた場合には、運動量保存の法則により、その反作用として光の放射圧 (radiation pressure) が生じる。この放射圧は身の回りのいたるところで生じているはずだが、日常生活でそれと感ずることはない。というのも、この光の圧力は極めて小さいからである。例えば、レーザーポインターの光 (1 mW) をミラー表面に対して垂直に入射させて反射させた場合、ミラーにかかる放射圧は約 7 pN である。これは、1 気圧の気体が 70 nm² の面積に及ぼす力と同じである。この微弱な力を巧みに利用する方法を考案したのが、米国ベル研究所の Ashkin であった。

1970 年代、Ashkin は、レンズで光を集束させると、その集光点に直径がマイクロメートル程度の微粒子を捕捉する力が発生することを発見した [1]。この手法を用いると、あたかも、ピンセットでつまむように、微粒子を捕まえ、三次元的に自由に動かすことができる。今日では、この光捕捉技術は、光ピンセット、または、光源としてレーザーが通常用いられるので、レーザー・トラッピング (laser trapping) と呼ばれている。対象物を“直接”捕まえるマイクロピペットのような手法とは異なり、光ピンセットには、1) 非接触・非侵襲で対象物の捕捉・操作をおこなえる、2) トラップ光を遮断すれば容易に放すことができる、3) 多数の粒子を同時にそれぞれ干渉することなく制御できる、などのメリットがある[2-6]。

放射圧は光の運動量保存則に則り、反作用としてはたらくのだから、通常はモノを「押す力」として作用するように思える。ところが、光を集束させることで「引き寄せる力」へと変化するのである。この放射圧による捕捉原理について、微粒子の屈折率が溶媒よりも大きい場合を例として説明する。

微粒子が波長よりも大きい場合は、幾何光学を用いる。レンズで光を集光すると、微粒子に照射される光線は、微粒子内に入射する際と、射出する際において、二度屈折することになる(図1 a)。こうした光の進行方向の変化は、放射圧として微粒子に力を及ぼすことになる。詳細は省くが、様々な角度から入射する光の放射圧を足しあわせると、微粒子を集光点へと引き寄せられる力が生じるようになる。その一方で、光線には微粒子の表面で散乱される成分もあり、その合力は集光点から微粒子を遠ざける方向に力がはたらく。その結果、微粒子は、光の集光点よりも若干ずれた所を中心として捕捉される。溶液中での熱揺らぎなどの影響で微粒子が捕捉中心から遠ざかったとしても、(ある一定の範囲内であれば)図1 bに示すような復元力がはたらき、焦点付近へと引き戻される。微粒子の大きさが波長程度の場合にも、同様の説明がなされる。

次に、光の波長より十分に小さいナノメートルサイズの粒子の場合を考える。Rayleigh の光散乱理論に則り、ナノ粒子を1個の電気双極子として近似すると、周囲の電場から受ける力は Lorentz 力として得られる。Lorentz 力は、ナノ粒子と媒質の比誘電率に依存し光強度勾配に沿った方向にはたらく勾配力と、光の進行方向にはたらく散乱力の2つの成分からなる(図1 c)。レンズを用いて十分に大きい角度から光を集光させると、勾配力を散乱力よりも大きくすることができるため、ナノ粒子

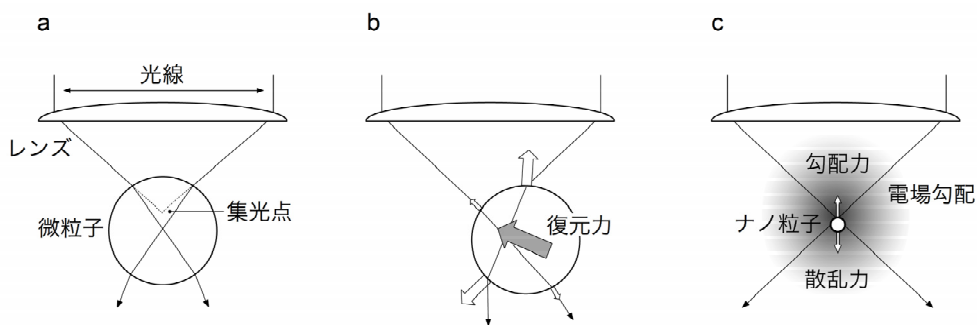


図1 光ピンセットの捕捉原理 微粒子の屈折率(誘電率)が溶媒よりも大きい場合を作図している。a, b 光の波長よりも大きな微粒子が捕捉される場合。なお, bにおける白抜き矢印は、光の進行方向が変わることで微粒子に及ぼす反作用の力を表している。c 光の波長よりも小さな物体が捕捉される場合。

Box.1 電磁波エネルギーの立場からみた光ピンセットの捕捉原理[7]

誘電率 ϵ_0 の溶媒中でレーザー光を集光させた時、集光スポット近傍にある座標での電場強度を $E_0(x, y, z)$ とする。誘電率 ϵ_p の微粒子を集光点付近に侵入させた場合、電場は擾乱を受けないと仮定すると、系のエネルギー変化 W は、電場エネルギー密度を微粒子の体積で積分し、

$$W = -\alpha \cdot \int_{\text{Particle Volume}} \frac{\epsilon_0}{8\pi} \cdot E_0^2 \cdot dV, \alpha = \frac{\epsilon_p}{\epsilon_0} - 1$$

となる。系全体のエネルギーを下げるには、電場強度の高い領域を誘電率の高い物質で埋めれば良いことになる。つまり、捕捉対象が溶媒よりも大きな誘電率(屈折率)をもつ場合は捕捉され、逆の場合は捕捉できないと解釈できる。また、集光スポットは光軸にそって細長い形状であるので、回転楕円体やチューブ構造などのアスペクト比の大きな物体が、顕微鏡下で立ち上がり光軸に沿った方向でより安定して捕捉されることも、簡潔に説明される。

を焦点付近に引き寄せトラップすることができるようになる。

一般的に、光ピンセットで集光点に捕捉できる物体の条件として、レーザー光の波長に対して透過率が高く、溶媒よりも屈折率が高いことが挙げられる。以上のような条件を満たせば、細胞なども捕捉できる。また、金属粒子に関しては、粒径が大きい場合は表面での散乱力が大きく捕捉できないが、ナノメートル程度の粒子では捕捉可能となる。最後に、電磁波エネルギーの観点からみた捕捉原理について、Box.1 にまとめておく。

2. 光ピンセットの装置

一般的に、光ピンセットを用いた実験では、光学顕微鏡下で溶液中の微粒子を観察しながら、捕捉や操作が行われるので、市販の光学顕微鏡を基にして装置を構築することが多い。光ピンセットでは、回折限界にまで光を絞り込むため、焦点付近の光密度は極めて大きくなる。そこで、装置開発に際しては、光反応や熱による捕捉対象の損傷を防ぎつつ、かつ、必要な捕捉力を確保するため、光源となるレーザーと対物レンズの選択が重要となる。まず、レーザーの波長については、測定試料や溶媒が吸収を持たない領域を選ばなければならない。近赤外域の波長であれば水や有機物質による吸収がほとんどないため、一般的には Nd:YAG レーザーなど近赤外波長を持つレーザーが用いられることが多い。吸収が問題にならない場合にはグリーン系の Ar イオン・レーザーや固体レーザー等も用いられる。十分な平均出力が得られるなら、パルスレーザーを用いても差し支えない。

捕捉力を向上させるには、一般的には、レーザーの出力をあげればよい。しかしながら、先ほど触れた光吸収にともなう損傷の問題や予算的な問題を考慮すると、低いレーザー・パワーで高い捕捉力をもたらす光学系の構築が望ましい。図2に、無限焦点系の対物レンズを用いた場合の光ピンセットの装置図を示す。レーザー光をビームエキスパンダーや複数のレンズなどを組み合わせてビーム径を拡げた後、顕微鏡に入射させ、大きな開口数の対物レンズで集光させる。これは、光軸に対して深い角度で入射する光線成分が多いほど、大きな捕捉力へとつながるからである（対物レンズの中央付近を通る光は主に散乱力としてはたらく）。なお、通常の対物レンズでは、可視領域と比べて、近赤外領域における光の透過率や結像能は大きく劣ることが多いので、選択の際には注意を要する。最適の対物レンズを選ぶためには、顕微鏡本体とは異なるメーカーの製品や特注も視野にいれることをおすすめする。筆者らは、近赤外光の透過率を向上させた特注の対物レンズ（オリンパス：Plan Apo, 1.4 oil）を用いている。この対物レンズを用いて光ピンセットの装置を構築したところ、蒸留水中にあるポリスチレン球（直径 $1\mu\text{m}$ ）を 5mW のレーザー強度（ $\lambda = 1064\text{nm}$ ）でトラップできた。ただし、十分な捕捉力を得るために必要となるレーザーパワーは、実験内容により大きく異なるので、注意を要する。

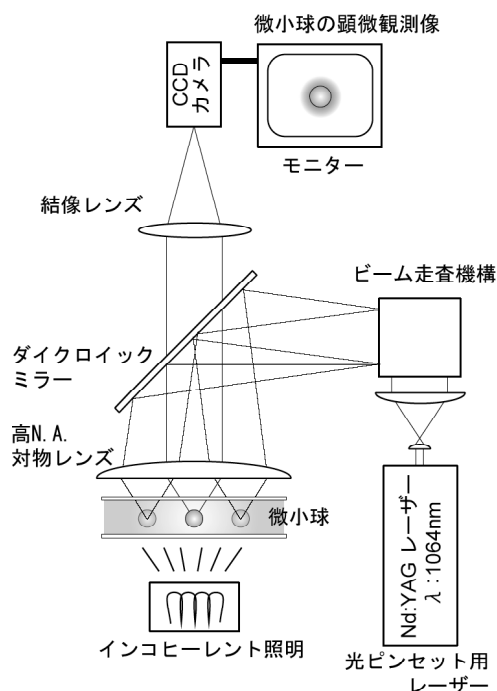


図2 光ピンセットの装置図

次に、光ピンセットを用いたマニピュレーション技術について紹介する。顕微鏡下で微粒子を捕捉する位置を変えたり、捕捉した後に自由に動かしたりするには、トラップ光の集光位置を変えればよい。そのためには、ガルバノ・ミラーでレーザー光の反射角度をかえる方法や、音響光学素子 (Acousto-Optic Modulator; AOM) でレーザー光を回折させる方法がよく用いられている。また、“1つの手”で捕まえるよりも、“2つの手”で捕まえたほうが、向きを変えたり、回転させたりできるので便利である。2つの集光スポットをつくるには、一本のレーザー光を光学偏光素子などで分岐させたのち、顕微鏡下で異なる場所に焦点を結ばせることが多い。図3は、熊崎助教授の研究グループ(京大・理)から提供して頂いた藍藻細胞(アナベナ)を顕微鏡下で捕捉・操作している連続写真である。この場合、2つの細胞をそれぞれトラップしてから(矢印)、右側の細胞を動かすことで、数珠つなぎになった細胞全体を回転させている。

それでは、より多くの微粒子について、捕捉・操作を行うにはどうすればいいのだろうか？ 集光スポットの数が3つ以上になると、光学系が複雑になりすぎるので装置開発は容易ではない。そこで、集光スポットの数を増やすかわりに、1つの集光スポットでスキャンすることが多い。スキャン速度を十分に速くすると、微粒子は、その動きに追従できなくなり、むしろ、走査軌道全体が連続的なポテンシャルとして存在するかのように振る舞いはじめる。その結果、集光スポットの走査線上に沿って、微粒子を配列させることができる。溶液中の微粒子をアルファベット文字程度のパターンに並べる程度ならばさほど困難なことではない。その他に、スキャン速度に緩急をつけることで、走査線上にある任意の場所に微粒子を捕捉する手法もある。これは、一時的にスキャン速度を緩めると、光強度を増加させたのと同じ効果が生まれるため、その場所でのみ捕捉力が強まるからである。

さらに高度な手法として、空間位相変調器 (spatial light modulator: SLM) を用いた例を挙げたい。

SLMとは、2次元マトリックス状に配置された微小ミラーや液晶パネルから構成された光デバイスであり、それぞれのピクセル毎に透過率や位相遅れを任意に設定することができる。コンピューター制御により SLM 上に任意形状の回折格子をつくりだし、透過した光の波面を自在に変化させることができるようになる。近年では、SLMで形成させた複数の回折格子を組み合わせることで、数百個の粒子を同時に捕捉・制御を行ったり、他の手法では難しい光軸方向へのスキャンも実現されている。

最後に、入射ビームとして Laguerre-Gaussian ビームを用いる技術を紹介しよう。Laguerre-Gaussian ビームは高次の Hermite-Gaussian ビームとシリンドリカル・レンズの組み合わせで作ることができる。光軸を回転軸とした螺旋状の波面を持つのが特徴で、位相整合がとれない光軸上で光強度が0となるドーナツ状のビーム・プロファイルを持つ。通常のトラッピングでは反発される低誘電率物質をドーナツ内にトラップする試みがなされている他、Laguerre-Gaussian ビーム自体が角運動量を持つことから、トラップしたものを回転させる試みなどがなされている。

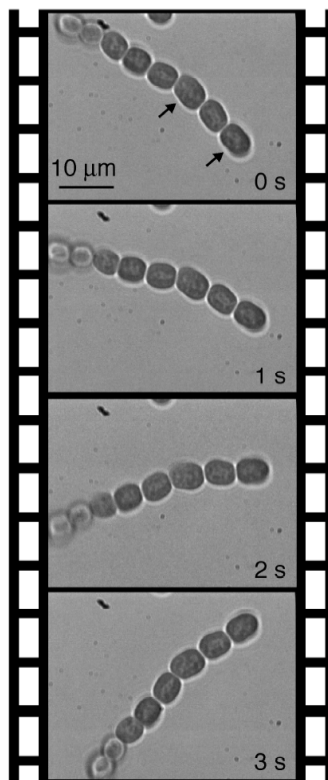


図3 植物細胞の光操作

3. 光ピンセットの応用例

光ピンセットの生命科学分野への応用例として、細胞内での物質輸送などを担っているキネシンの1分子力学計測に関して紹介する。キネシンは、チューブリン分子の重合体である微小管に沿って、ATPの加水分解反応を行いながら滑り運動を発生させており、その化学・力学エネルギー変換効率は最大40%にも達している。西山らは、この優れたエネルギー変換メカニズムを明らかにするため、キネシン1分子が発生する変位と力を高感度検出できる顕微鏡の開発を行ってきた[8]。

図4 aに、西山らが開発したキネシン1分子の運動計測の概念図を示す。一般に、タンパク質1分子は10ナノメートル程度の大きさであり、また、誘電率が小さいため、光ピンセットで直接捕まえることはできない。そこで、本研究では、キネシン1分子をビーズ（ポリスチレン製ラテックス球）表面に吸着させておき、このキネシンつきビーズを光ピンセットで捕捉、操作することになる。キネシンがガラス表面にある微小管と結合すると、滑り運動を発生しはじめる。集光したレーザー光で斜めからビーズを照明し、その散乱光を暗視野像として四分割光ダイオードに投影する。つまり、キネシンつきビーズの運動を4つある光センサーに入射する光量の変化として検出するわけである。この手法をもちいると、キネシン1分子が発生するナノメートルの変位をマイクロ秒の時間分解能（世界最高の分解能）で計測できるようになる[8]。

図4 bは、キネシン1分子が微小管に沿って発生する変位の測定例である。キネシンがトラップされたビーズを引っ張りながら運動すると、捕捉中心からの変位に比例した力が加わるので（フックの法則）、キネシン分子の運動速度は徐々に低下していく。キネシン1分子が負荷に逆らって発生できる最大力は約7 pNである（もし、ビーズに複数のキネシンが吸着していると、最大力はより大きな値となるので、「1分子」の確認を行う際には良い指標となる）。変位トレースの一部を拡大すると、キネシンがステップ状の変位を繰り返し発生しながら運動する様子がみとれる。このステップの大きさは、ATP濃度や力の大きさに依存せず、常に8 nmであった。それでは、キネシンのステップサイズは、どのようにして決められているのだろうか？ヒトの歩幅は足の長さで決められるのだが、キネシンの場合は滑り運動の際にレールとなる微小管によって決められている。微小管の構成単位はチューブリンダイマーであり、その長さはちょうど8 nmである。以上のような実験結果をもとにすると、「キネシンは微小管によってあらかじめ定められた次の結合部位へと規則正しく移動する」「決定論的な」運動モデルがふさわしいように思える。

しかしながら、その一方で、力の大きな領域 (>5 pN) では、進行方向とは逆向きのステップや、

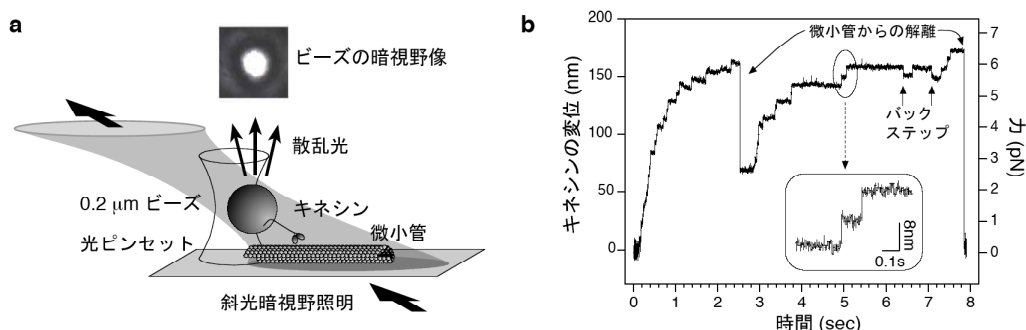


図4 キネシン・モーターの1分子ナノメートル計測 a 実験系の概念図, b キネシン1分子が発生する変位と力。キネシンは、8nmのステップ状変位を繰り返しながら運動しており、時々、後にステップすることもある。これらの前進運動や後退運動は、確率的なステップ生成過程から発生しており、その運動特性はファインマンの熱ラチェットモデルによく似ている[9,10]。

キネシンが微小管から解離する（ビーズは光ピンセットの捕捉中心に戻る）現象が頻繁に生じている（Fig.4b）. 詳細は省くが，ステップの方向性やステップ間の時間間隔を解析したところ，「キネシンはATPを加水分解する毎に，前か後ろのどちらかにステップする」という“確率的な”モデルが浮かび上がってきた [9, 10]. これは，キネシンはATPの加水分解反応から，常に同じ力学反応を行っているのではなく，化学・力学エネルギー変換過程に確率性が介在することで，力学反応は一意に決められていないことを意味している．キネシンは，周囲の熱揺らぎを巧みに利用することで，高いエネルギー効率を達成させていると，筆者らは考えている．

4. おわりに

本稿では，溶液中で微粒子を捕捉・操作する光ピンセット法について紹介してきた．現在では，光ピンセット法は，ナノメートルやマイクロメートル・スケールの世界を操る「光の手」として，物理，化学，生物学にわたる幅広い研究領域で利用されている．例えば，フォトリソグラフィを用いて作製した羽根型回転体を光ピンセットで捕捉・回転させる光ミキサーの開発や，トラップしたタンパク質の微結晶を基盤上に固定してプロテインチップを作製する試みなどもなされている[4,6]．

また，今回本文では取り上げなかったが，原子光学と呼ばれる分野では，放射圧の原理は原子の運動制御にも用いられている．単一原子を相手にする場合には，光の吸収および放出による運動量変化や，ドップラー効果などを巧みに利用することで，光ピンセットとは毛色の異なる独自の技術体系が確立されている．代表的な応用例として，真空中の原子ビームを減速させほぼ停止させる技術がある．原子ビームでは速度分布が温度で表されることから，この技術は原子のレーザー冷却（laser cooling）と呼ばれており，1997年にはノーベル物理学賞の授賞対象分野となった．また，磁気トラップと組み合わせることで絶対温度で μK 以下の低温が実現されており，2001年ノーベル物理学賞が授賞されたボーズ-アインシュタイン凝縮（Bose-Einstein condensation）の実現にも大きな貢献を果たした．それ以外にも原子光学の工業的応用の一例として，レーザー冷却と Lorentz 力を組み合わせることでナノ構造体の形成を実現する試み [11] などもなされている．我々が日常生活をおくるなかでは体感することもない光の圧力も，ナノ・マイクロメートルスケールの世界では大きな力へと転化する．今後のさらなる発展に期待したい．

参考文献

- [1] A. Ashkin, *Phys. Rev. Lett.*, **40**: 729-732 (1978).
- [2] 増原極微変換プロジェクト編 マイクロ化学 化学同人 (1993).
- [3] K. Svoboda, & Block S.M., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 247-85 (1994).
- [4] 浮田宏生 マイクロメカニカルフォトニクス 森北出版株式会社 (2002).
- [5] M. P. Sheets, *Methods in Cell Biology* 55 Laser Tweezers in Cell Biology (1998).
- [6] 増原宏，細川陽一郎 レーザーが拓くナノバイオ ケイ・ディー・ネオブック (2005).
- [7] T. Tlusty, A. Meller & R. Bar-Ziv, *Phys. Rev. Lett.*, **81**: 1738-1741 (1998).
- [8] 西山雅祥 生体分子の光捕捉と運動測定 光学 **30**: 445-450 (2001).
- [9] M. Nishiyama, H. Higuchi, & T. Yanagida, *Nature Cell Biol.* **4**: 790-797 (2002).
- [10] 西山雅祥，樋口秀男 生物物理 **44**: 75-80 (2004).
- [11] H.B. Sun, H. Inouye, Y. Inouye, K. Okamoto, & S. Kawata, *Jpn. J. Appl. Phys.* **40**: L711-L714 (2001).