



A. Narazaki

レーザー転写による物質デリバリー ～微粒子からタンパク質担持マイクロチップまで～

奈良崎 愛子*

キーワード：レーザー転写, 微粒子, マイクロチップレーザー, 光スタンプ, タンパク質担持マイクロチップ

1. レーザー転写の基礎と応用

レーザー転写法は、一般にレーザー誘起前方転写 (Laser-Induced Forward Transfer, LIFT) とも呼称されることが多く、レーザーアブレーション等のレーザー誘起現象による推進力を利用して、ドナー物質を別の基板に移す手法である。これまでに報告されているドナー物質は、金属[1,2]、半導体[3-5]、酸化物[5-7]、銀ナノインク[8-10]、グラフェン[11]、バイオインクやタンパク質などのバイオマテリアル[12-16]と多様なことが魅力の一つである。

産総研では、主に2種類のレーザー転写法を開発している(図1)。どちらの場合も、移す対象となるドナー物質は透明キャリア上に調製される。キャリア側からレーザーパルスを照射、キャリア/ドナー界面で光吸収が起きる結果、レーザーアブレーションなどの過渡的なレーザー誘起現象に至り、これを推進力としてレーザー照射部のドナーが対向配置されたレシーバー上に射出・堆積される。レーザー誘起現象において、物質が瞬間的・局所的に熔融する場合、図1(a)に示すような微小な熔融液滴の射出・堆積が起こる。これを我々はレーザー誘起ドット転写 (Laser-Induced Dot Transfer, LIDT)法と呼び[2,4,5]、直径百ナノメートルから数マイクロメートルのいわゆるナノドット・マイクロドットの2D・3Dプリンティングが報告されている[1,2,4,5]。この手法の魅力は微細化であり、集光径より一桁ほど微小なドットを描画することも可能となる[4]。対照的に図1(b)に示す手法では、ドナー物質への熱影響を最小化し、膜形状・特性を維持した状態で膜転写を実現する。

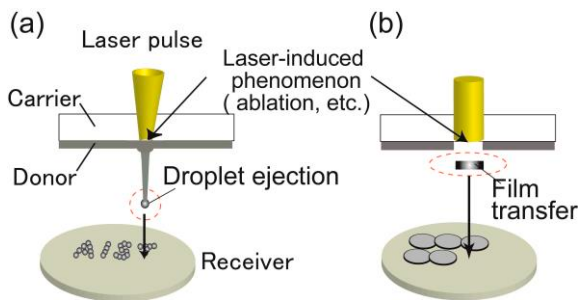


図1 レーザー転写法による
(a) ナノ/マイクロドット描画と(b)膜転写。

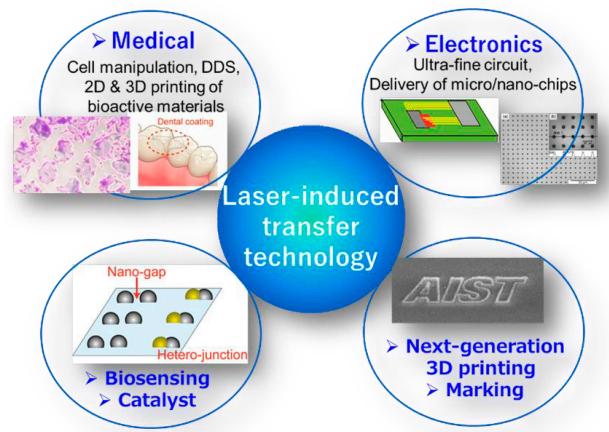


図2 レーザー転写技術の応用例。

近年ではレーザー転写の応用として、金属、導電性酸化物や銀ナノインク等の配線描画やチップの配列積層によるエレクトロニクス応用に加え、他技術では難しい高粘性バイオインクや細胞の2D・3Dプリンティングによるバイオ・医療応用[12-16]なども注目を集めている(図2)。

2. レーザー転写による物質デリバリー

2.1 レーザー誘起ドット転写(LIDT)法によるナノ・マイクロドット描画

LIDT法を用いると、インクジェットのように微細化に伴うノズルの詰まりが問題とならず、原理的により微小な粒子(以下、ドット)を描画可能である。図3にLIDT法でSiウェハに描画した FeSi_2 マイクロドットアレイの(a)SIMイメージとFIB加工により形成した断面試料の(b)TEMイメージを示す。直径 $1.9\ \mu\text{m}$ 、高さ $1.5\ \mu\text{m}$ の底面にテラス構造を有する擬似球状構造が、高い位置精度で堆積されている。この結果から、レーザー集光スポットに局所的・過渡的に熔融部が形成、フェムトリット程度の単一液滴が射出される。さらに対向基板上へ液滴の状態で堆積が起こり、基板上で固化することで、高い位置精度と密着性でマイクロドット描画が実現していることを示唆している(図1(a))。

* 国立研究開発法人産業技術総合研究所 電子光基礎技術研究部門
先進レーザープロセスグループ 研究グループ長

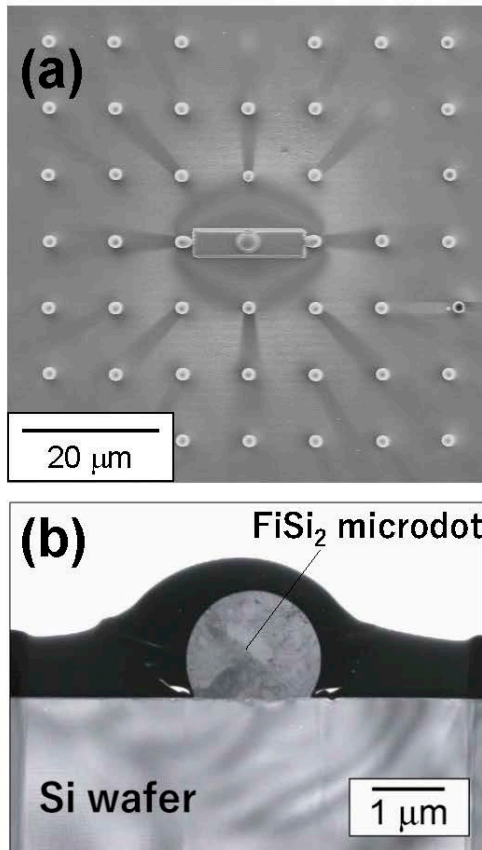


図3 レーザー誘起ドット転写法により Si ウェハ上に転写堆積した FeSi_2 マイクロドットアレイの (a)SIM イメージと (b)断面 TEM イメージ.

図4に産総研で開発中のレーザー転写プロトタイプ機を示す。LIFT技術の産業応用に向けた取り組みの一環として、LIFT法をベースとした金属の微細パターン描画のためのプロトタイプ機を開発している。特徴として、小型化のためマイクロチップレーザー(株式会社オプトクエスト、波長1064 nm、パルス幅<1 ns、最大パルスエネルギー~2 mJ、最大繰り返し100 Hz、ヘッドサイズ30 mm × 40 mm × 125 mm)をレーザー転写用光源として導入した。さらに、レーザー転写制御因子で重要となるドナー-レシーバー間距離を計測できるシステムを導入、ドナー-レシーバー間距離を最小50 μm程度からマイクロメートル精度で計測・制御可能である。また、ドナーとなる金属膜の供給を連続的に行うことでプロセスを効率化するため、樹脂フィルムとして耐熱性の高いポリイミド(Polyimide, PI)を透明キャリアとして、キャリア上に厚さ数百ナノメートルのCu膜等を積層したCuドナーフィルムを利用できるように転写原料フィルム巻き取りシステムを試作した。現在は開発した本プロトタイプ機を用いたCuマイクロドット・配線描画について検討を進めている。

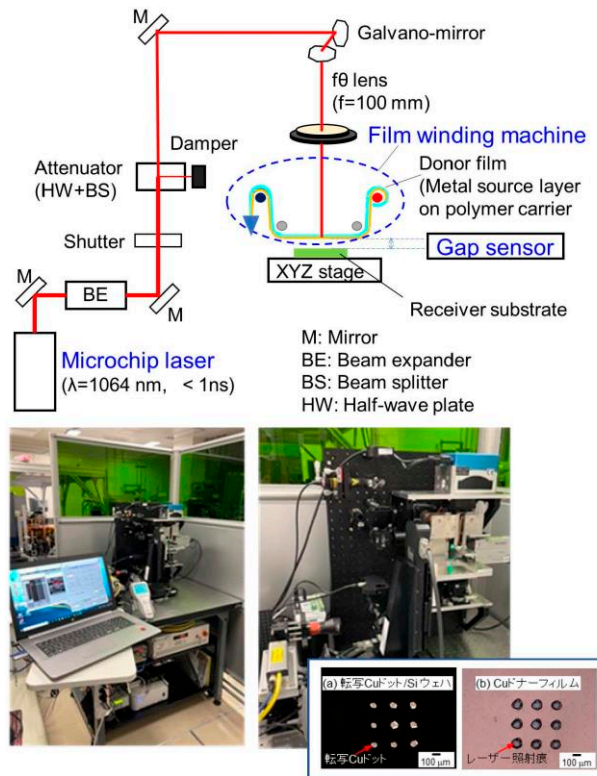


図4 産総研で開発中のAIST-LIFTプロトタイプ機の (上)システム概要と (下)装置写真. システム小型化のため、マイクロチップレーザーを導入. 挿入図はプロトタイプ機でSiウェハ上に転写した(a)Cuドットと(b)原料のCuドナーフィルム.

2.2 レーザー光スタンプ転写 (Laser-Induced Forward Transfer with OPTical stamp, LIFTOP) 法による膜転写

レーザー転写のチップ積層技術としての応用が進む中、次世代ターゲットとして2D材料であるグラフェンをはじめ各種機能性薄膜を他基板・デバイスへ積層する技術への展開[3,5,6,8,11]や、細胞・バイオインクの転写などバイオ・医療分野への適用[12-16]も期待される。

そのような背景のもと、固体ドナー膜を射出、レーザー基板に衝突・堆積させる転写プロセスにおいて、膜が破砕など低品位化することが、レーザー膜転写の課題となっている。そこで、膜の飛翔挙動をハイスピードカメラで観察しプロセス条件を最適化[18]、またドナー膜とレシーバーに圧力をかけ密着させることで転写フルエンス閾値とレシーバーへの衝突速度を低減し膜破砕を抑制する[6]など効果的な取り組みも報告されている。さらに、衝突堆積時に生じる衝撃力低減のため、ポリマーで表面コートしたガラス平板をレシーバーとして用い、実験ならびに有限要素法による応力シミュレーションによりレシーバー表面状態を最適化するという報告もある[3]。いずれの取り組みも膜の転写形状において顕著な改善が見られているが、レシーバーへの圧力印可や表面コーティングが必要であり、任意の基板への転写は難しい。

そこで我々は、ガラスの様な硬い表面を有する部材から人間の歯のような凹凸のある表面への“自在な膜転写”の実現を目指し、光スタンプレーザー転写(Laser-Induced Forward Transfer with Optical stamp, LIFTOP)法を開発した(図5)[5,15,16]. LIFTOP法では、機能性薄膜の高品位転写を実現するため、転写堆積時のドナーとレシーバーの密着性を高め、さらに衝撃を吸収できるポリジメチルシロキサン(polydimethylsiloxane, PDMS)のような樹脂で表面コートした光スタンプを利用する。最初に、光スタンプをドナーにコンタクトさせる(図5上段)。その後、1段目の転写プロセスとして、ドナーの微細パターンを光スタンプ表面に転写する(中段)。2階目の転写プロセスでは、光スタンプ表面に堆積させたドナーの微細パターンを最終レシーバーに転写する(下段)。シンプルな手法であるが、その効果は大きく、通常は転写が難しい硬い表面を有するPETやガラス基板についても、転写堆積可能である。例えば、本手法をAg金属膜に適用した結果を図5に示すが、LIFTOP法の2段階転写を経て、Ag膜をガラス表面に微細パターン転写した。

今回は、天田財団平成29年度重点研究開発助成B課題研究AF-2017202「早期治癒を支援するレーザー生理活性コーティング技術開発」としてご支援いただいた中で研究開発を実施した、生理活性タンパク質担持リン酸カルシウム膜のLIFTOP法を基盤としたレーザー転写技術について紹介する。

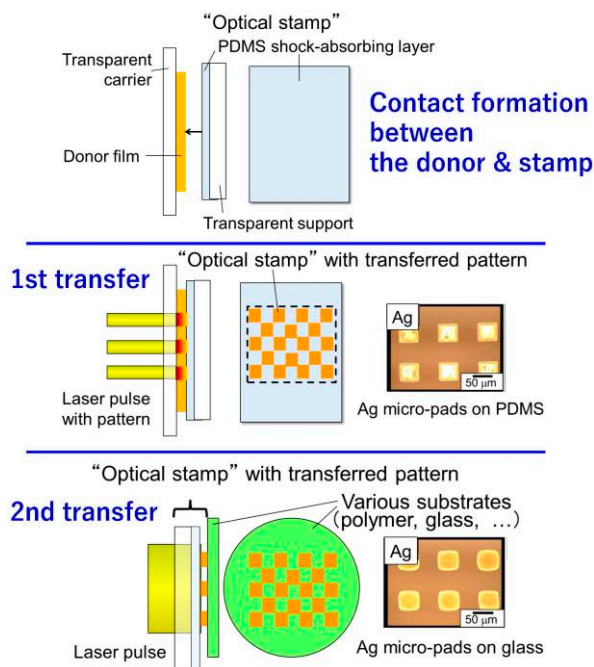


図5 光スタンプレーザー転写(LIFTOP)法のコンセプトと金属薄膜(Ag, 厚さ200nm)への適用例。

3. LIFTOP法のバイオ・医療応用：タンパク質担持マイクロチップへの適用例

3・1 新たな歯周病治療法を目指した医工連携

日本の成人の約8割が罹患しているといわれる歯周病治療では、歯周ポケット周囲の感染部を除去後、ペリオドンタルアタッチメントの再形成を試みる。しかし、歯周病に罹患した歯は、本来の歯に比べ、ペリオドンタルアタッチメントが再構築されにくく、再度の細菌感染・増殖により歯周病が再発し易い。そこで、歯面にヒトの歯や骨の主要無機成分であり優れた生体親和性と骨結合能を有するハイドロキシアパタイト(Hydroxy apatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 以下アパタイト)などのリン酸カルシウム膜をコーティングできれば、ペリオドンタルアタッチメント形成を促進できる。さらに、細胞接着性や骨形成促進能などを有する生理活性タンパク質をアパタイトに担持できれば、ペリオドンタルアタッチメント形成にかかる時間を短縮化、その結果術後の細菌感染リスクも低減できるため、患者のQOLに大きく貢献する。一方、従来のリン酸カルシウムコーティング技術は、非位置選択的であり、高温や長時間処理を必要とする。その中で、過飽和リン酸カルシウム溶液中でアパタイトを基材表面に析出させるバイオミネティック法[19]は、非熱コーティング技術であり、タンパク質などの熱に弱い生理活性物質も高い生理活性を保持した状態で膜中に担持できる。しかしソフトプロセスであるがゆえ数百ナノメートルからミクロン厚の膜形成に数時間かかる。このような背景のもと、我々産総研と北大歯学部グループでは、生理活性タンパク質担持リン酸カルシウム膜のレーザー転写技術開発に取り組んでいる[14-16].

3・2 生理活性タンパク質担持リン酸カルシウムのレーザー転写

レーザー転写用ドナー膜は、タンパク質の失活なく担持させる必要があるため、ソフトな溶液プロセスであるバイオミネティック法を利用した。フィブロネクチン(fibronectin, 以下Fn)は、細胞接着性タンパク質の一種であり、細胞の接着・伸展を促進する機能を有する。このFnを担持させたリン酸カルシウム膜(以後、Fn-CaP)を光スタンプ上に調製した。ただしFn-CaPは近赤外から紫外波長にわたり大きな光吸収を有しないため、レーザー光を効率的に吸収するカーボン薄膜を犠牲層として光スタンプとFn-CaPドナー膜の間に調製、失活を防ぐために凍結乾燥処理を実施した。

LIFTOPセットアップを図6に示す。レーザー光源に波長1064nmのDPSSナノ秒パルスレーザー(fwhm 40 ns, 10 kHz)を用い、上記で形成したFn-CaP/C/光スタンプをレシーバーにコンタクトさせた状態で、光スタンプ側からレーザーパルス照射を照射、Fn-CaP膜をレシーバーへ転写した。ガルバノミラー/fθレンズを用いてビーム集光走査し、2次元パターンニングについても検討した。

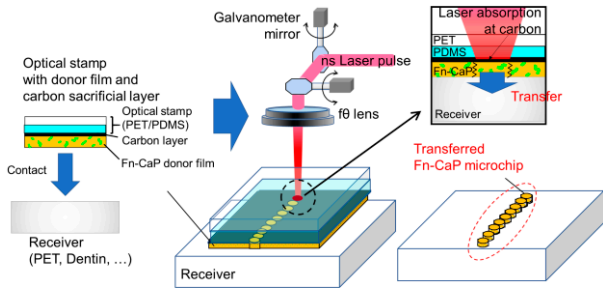


図6 LIFTOP システム. Fn 担持リン酸カルシウム (Fn-CaP) ドナー膜を, カーボン犠牲層/光スタンプ上に調製, レシーバー基板と接触させる(左). レーザーパルス照射により犠牲層でレーザー吸収が発生, その推進力により Fn-CaP チップがレシーバーに転写(右). 参考文献[15]より引用.

図7 (a) に LIFTOP プロセスにより PET 基板に転写された Fn-CaP マイクロチップの共焦点レーザー顕微鏡イメージを示す. 比較のため (b) に光スタンプを用いない場合を示すが, 光スタンプを用いた場合のみ膜破砕を低減することに成功した. これは衝撃吸収性の高い PDMS を表面コートしたことによる膜転写時の衝撃低減とともに, 柔軟性にも優れる PDMS は, ドナー膜とギャップなく接触しやすく, 膜のフライト距離を低減できるため, フライト時の応力付加を低減できる効果もあるためと考えている. 以上より, PDMS レシーバーの利用により, アパタイトのような脆性材料も転写可能であることを基礎実証できた.

図8 に Fn を担持しないアパタイト膜について, PDMS レシーバーに連続パターン転写した様子を示す. 光スタンプは利用していないが, レシーバー基板に衝撃吸収性を有する PDMS を用いたことにより, 基板表面約 80% の被覆率で, 膜破砕を低減した連続転写堆積を確認できた.

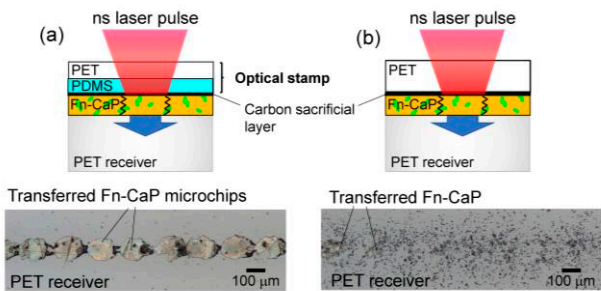


図7 (a) LIFTOP プロセスにより PET 基板に転写された Fn-CaP マイクロチップ. 比較のため (b) 光スタンプを用いない場合を示す. 参考文献[15]より引用.

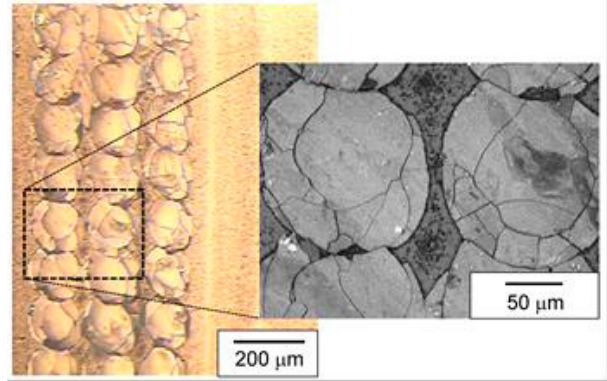


図8 アパタイトコーティングの共焦点レーザー顕微鏡イメージ.

3・3 タンパク質の生理活性評価

レーザー転写プロセスがタンパク質の生理活性に与える影響を検討するため, 細胞培養試験による細胞接着性を評価した. ドナー原料膜ならびに転写堆積した試料表面に CHO-K1 細胞を播種後 24~27 時間培養, クリスタルバイオレットにより細胞を固定化・染色し, 光学顕微鏡観察を実施した結果を図9に示す[14]. (c,d)中の直径約 100 μm の円形ディスクパターン (淡い紫色) は, 転写堆積したマイクロチップに相当する. (c,d)において, マイクロチップ上に細胞が密集する様子が確認された一方で, PDMS 上ではまばらであった. この結果は, アパタイトマイクロチップが, PDMS に比べて, CHO-K1 細胞に対して優れた細胞適合性を有することを示す. さらに, Fn 担持マイクロチップ上の細胞の多くが進展している様子が確認できることから, Fn の細胞接着性が, レーザー転写後も保持されていると推察される. これらに加え, 細胞の多くがアパタイトチップの周囲に沿って局在・整列する傾向がみられることから, 本手法によるパターンニングが細胞操作能力を有する可能性が示唆される.

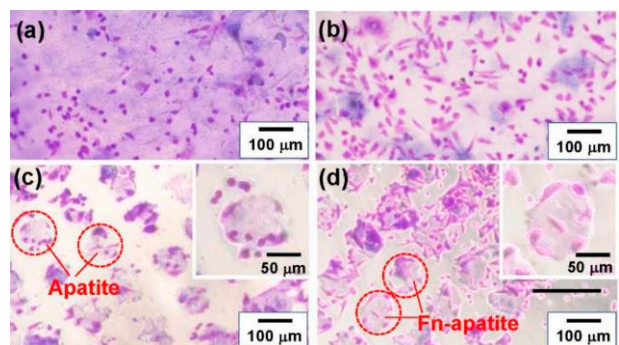


図9 CHO-K1 細胞 (10~数十マイクロメートルの濃い紫色スポット) 播種後 24-27 時間の光学顕微鏡イメージ. (a) Fn 非担持および(b)Fn 担持アパタイトドナー膜, PDMS 上にレーザー転写堆積した (c) Fn 非担持アパタイトおよび (d) Fn 担持アパタイトマイクロチップ. 参考文献[14]より引用.

3・4 ヒト象牙質(天然歯)への転写と界面評価

本手法の歯面への適用を基礎実証する目的で, Fn-CaP 膜のヒト象牙質基材(インフォームドコンセント後, 提供された抜去歯牙より作製)への転写を実施した. 象牙質は, 硬組織の無機成分であるアパタイトが 70%と残りはコラーゲンなどの軟組織で構成され, 外部から歯の中心の歯髄まで無数の象牙細管が走っている. 歯周病や加齢などにより歯茎が下がりセメント質が薄れるなどすると, この象牙細管が露出する. このヒト象牙質へのレーザー転写を LIFTOP 法により検討した結果, クラックレスな Fn-CaP マイクロチップの転写堆積に成功した(図 10(a)). さらに, 転写した Fn-CaP と象牙質の界面を観察するため, FIB 加工により試料を薄片化(図 10(b,c)), 断面 SEM 観察を実施した結果を図 10(d,e)に示す. Fn-CaP 膜と象牙質界面に大きなギャップのない界面形成を確認できた.

4. 結言

本稿では, 2 種類のレーザー転写法について紹介した. ナノ/マイクロドットの描画に適したレーザー誘起ドット転写(LIDT)法と, 機能性膜の高品位転写に利用可能な光スタンプ転写(LIFTOP)法である. 前者では, AIST-LIFT プロトタイプ機として, マイクロチップレーザーを用いて小型化した転写システム開発を行っている. 後者については, バイオ・医療応用を目指した医工連携テーマとして, 生理活性タンパク質担持マイクロチップのレーザー転写に関する取り組みを紹介した. レーザー転写用犠牲層と衝撃吸収性レシーバー基材を用いることで, 脆性材料である CaP 膜においても膜形状を維持した良好な膜転写を実現できた. 今後, 細胞接着などに加え細胞の局在化や伸展方向など自在な細胞制御が可能なレーザー生理活性コーティング技術を展開したい. 今後も, 微粒子から機能性薄膜, 熱に弱いタンパク質担持材料まで, 他手法では難しい物質

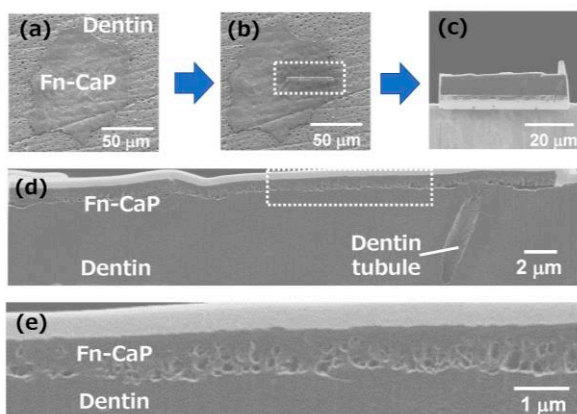


図 10 (a-c)象牙質上に転写した Fn-CaP マイクロチップの SEM イメージ. (b) の白い点線で囲まれた領域の一部を FIB 加工し断面観察試料を作製. (d,e) 象牙質上の Fn-CaP マイクロチップの断面 SEM イメージ. 参考文献[15]より引用.

デリバリーにレーザー転写技術を活用・挑戦し, 社会課題解決に少しでも貢献できればと考えている.

謝辞

本研究に多大なご協力をいただいた多くの共同研究者皆様に, 謝意を表します. 特に, タンパク質担持膜の調製・評価にあたりご尽力いただいた, 産総研 大矢根綾子博士, 北海道大学 宮治裕史先生に, また金属ナノ粒子のレーザー転写にあたり先進的なフェムト秒レーザー転写システムを構築いただいた, 大阪大学 中田芳樹先生に心より謝意を表します. 本研究の実施にあたり, 公益財団法人天田財団より重点研究開発助成 B (AF-2017202) を賜りました. ここに深甚なる謝意を表します.

参考文献

- 1) M. Feinaeugle, R. Pohl, T. Bor, T. Vaneker, and G. Römer, *Additive Manufacturing* **24**, 391-399 (2018).
- 2) Y. Nakata, K. Tsubakimoto, N. Miyanaga, A. Narazaki, T. Shoji, and Y. Tsuboi, *Nanomaterials* **11**, 305 (2021).
- 3) M. Feinaeugle, P. Horak, C. L. Sones, T. Lippert, R. W. Eason, *Appl. Phys. A* **116**, 1939-1950 (2014).
- 4) A. Narazaki, T. Sato, R. Kurosaki, Y. Kawaguchi, and H. Niino, *Appl. Phys. Express* **1**, 057001 (2008).
- 5) 奈良崎愛子, *オプトロニクス* **433**, 127-131 (2018).
- 6) J. Ihlemann and R. Weichenhain-Schriever, *Thin Solid Films* **550**, 521-524 (2014).
- 7) A. Narazaki, R. Kurosaki, T. Sato, and H. Niino, *Appl. Phys. Express* **6**, 092601 (2013).
- 8) E. Breckenfeld, H. Kim, R.C.Y. Auyeung, N. Charipar, P. Serra, and A. Piqué, *Appl. Surf. Sci.* **331**, 254-261 (2015).
- 9) D. Tsakona, I. Theodorakos, A. Kalaitzis, and I. Zergioti, *Appl. Surf. Sci.* **513**, 145912 (2020).
- 10) J. Lim, Y. Kim, J. Shin, Y. Lee, W. Shin, W. Qu, E. Hwang, S. Park, and S. Hong, *Nanomaterials* **10** (2020) 701.
- 11) S. Papazoglou, D. Kaltsas, A. Logotheti, A. Pesquera, A. Zurutuza, L. Tsetseris, and I. Zergioti, *2D Mater.* **8**, 045017 (2021).
- 12) A. Sorkio, L. Koch, L. Koivusalo, A. Reiwick, S. Miettinen, B. Chichkov, and H. Skottman, *Biomaterials* **171**, 57-71 (2018).
- 13) I. Zergioti, A. Karaiskou, D. G. Papazoglou, C. Fotakis, M. Kapsetaki, and D. Kafetzopoulos, *Appl. Phys. Lett.* **86**, 163902 (2005).
- 14) A. Narazaki, A. Oyane, S. Komuro, R. Kurosaki, T. Kameyama, I. Sakamaki, H. Araki, H. Miyaji, *Opt. Mater. Express* **9**, 2807-2816 (2019).
- 15) A. Narazaki, A. Oyane, H. Miyaji, *Applied Sciences* **10**, 7984 (2020).
- 16) 宮治裕史, 大矢根綾子, 奈良崎愛子, *NEW GLASS* **36**, 15-17 (2021).

- 17) Y. Nakata, E. Hayashi, K. Tsubakimoto, N. Miyanaga, A. Narazaki, T. Shoji, Y. Tsuboi, *International Journal of Extreme Manufacturing* **2**, 025101 (2020).
- 18) T. Mattle, J. Shaw-Stewart, A. Hintennach, C. W. Schneider, T. Lippert, A. Wokaun, *Appl. Surf. Sci.* **278**, 77–81 (2013).
- 19) A. Oyane, X.P. Wang, Y. Sogo, A. Ito and H. Tsurushima, *Acta Biomater.* **8**, 2034-2046, (2012).