



Y. Hosokawa

医学医療分野への応用を目指した 細胞・生体材料のフェムト秒レーザープロセッシング

細川 陽一郎*

1. まえがき

顕微鏡下で、近赤外のフェムト秒レーザーパルスを高開口数の対物レンズを通して水媒体に集光照射すると、衝撃波が水中を伝搬し、キャビテーションバブルと呼ばれる気泡が発生する。これは、集光点における多光子吸収に起因し、フェムト秒レーザーを用いると非熱的なプロセスによってこれが引き起こされる。また、キャビテーションバブルの膨張、収縮にともなう応力波が水中に発生し、伝搬する。この応力波は、マイクロメートル程度の微小物体に撃力として作用し、物体を変位させる（図1）。

我々は、数〜数十マイクロメートルの空間に局在するこの撃力に注目し、高い空間選択性を利用して、その大きさに相当する物体である動物・植物細胞の操作手法を開発してきた¹⁾。この撃力をフェムト秒レーザー誘起衝撃力と称し、細胞パターンの形成²⁻⁴⁾、光穿孔による細胞への分子導入⁵⁻⁸⁾、マイクロチップ内での細胞選別^{9, 10)}といった応用研究を展開してきた。

さらに、互いに接着している細胞の近傍にフェムト秒レーザーを集光照射することで、細胞を破壊することなく分離することに成功している¹¹⁾。このときにレーザー誘起衝撃力によって付加された力を定量化できれば、細胞間の接着強度を定量化できると考えた。しかし、従来の手法では、微小領域に局在するレーザー誘起衝撃力を定量化することは非常に困難であった。たとえば、撃力を定量化する代表的な手法にマイクロフォンを用いた計測があるが^{12, 13)}、そのヘッドの大きさは最小でも数百マイクロメートル程度であるため、レーザー誘起衝撃力の定量化には不適である。また、高速カメラを用いて衝撃波のフロントを観測することによって衝撃波を定量化する手法もあるが¹⁴⁾、衝撃波だけでなくキャビテーションバブルの発生と消失による力学的作用を含むレーザー誘起衝撃力に対しては、この手法も不適である。

そこで原子間力顕微鏡（AFM）の探針（カンチレバ）に注目し、独自の局所応力計測システムを開発した¹⁵⁻¹⁸⁾。このシステムでは、AFMカンチレバを微小な板バネとみなし、水媒質中に浸漬した状態で、レーザー誘起衝撃力をカンチレバの振動として直接検出する。その振動に基づき、カンチレバに作用したレーザー誘起衝撃力およびレーザー集光点において発生した衝撃力を定量化する。本手法を用い

ることにより、細胞間の接着強度の評価が可能となっている^{16, 17)}。

このようにフェムト秒レーザー誘起衝撃力を細胞の外で発生させ、細胞を操作する手法として適用してきており、現在その医療技術への展開を模索している。本稿では、このフェムト秒レーザーとAFMを用いた細胞・生体材料の操作・計測技術を診断技術と治療技術へ展開しようとする試みについて紹介する。

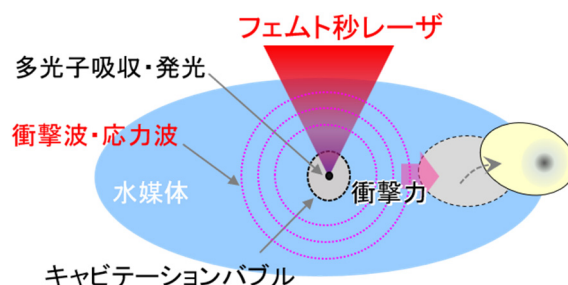


図1 フェムト秒レーザー誘起衝撃力の概略図

2. 診断技術への展開

我々は、診断技術へのフェムト秒レーザー誘起衝撃力の適用技術として、超高速セルソータの開発を進めている^{9, 10)}。細胞群から特定の細胞を高速に分取し、個別に細胞を解析することを可能にしたセルソータは、近年の細胞生物学の研究において不可欠な装置であり、より高速かつ高純度な細胞分取技術の確立が望まれている。現在、マイクロキャピラリー中を流れる細胞を液滴に閉じ込め、その液滴を振り分ける方法が分取に用いられているが、この方法では高速化と高純度化に限界がある。マイクロチップ中を流れる細胞を極めて短時間の外力で直接操作して分取することができれば、この限界を超えられると考え、我々はその外力としてフェムト秒レーザー誘起衝撃力を用いることに挑んでいる。

図2にそのシステム構成を示す。蛍光活性型セルソータ（Fluorescence activated cell sorter）では、回収したい細胞を蛍

* 奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科
物質創成科学領域 教授

光標識し、蛍光検出された細胞に外力を加え、その細胞を分取する。本システムでは、顕微鏡ステージ上に配置されたマイクロ流体チップに、蛍光励起用レーザを集光し、マイクロチップ中を流れる細胞の蛍光が、光検出器で検出されると、その検出信号をトリガとしてフェムト秒レーザを射出するようになっている。

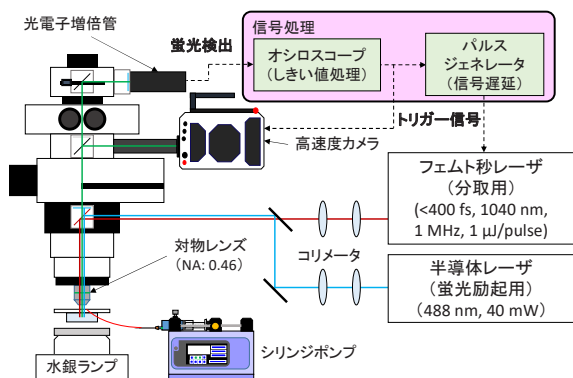


図2 フェムト秒レーザ誘起衝撃力を用いた高速細胞分取システム

図3に示すように、マイクロ流体チップは3分岐になっており、蛍光を発しない細胞は中央の流路 (Waste) に流れるが、蛍光を発する細胞は、フェムト秒レーザ誘起衝撃力により、右下側の流路 (Collection) に導かれる。フェムト秒レーザ光源として、1 MHz の繰り返し周波数を持つイッテルビウムフェムト秒レーザ増幅器を用い、このパルス列から単発のフェムト秒パルスを抽出し、細胞近傍に照射することで分取をおこなった。

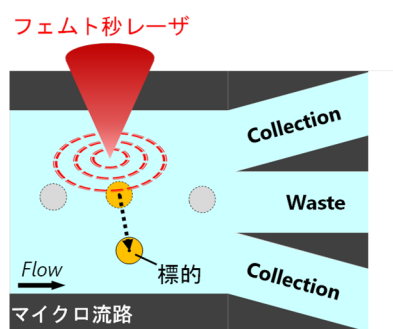


図3 マイクロチップ内の流路での細胞分取の概要

図4に疑似細胞試料として $10\ \mu\text{m}$ の蛍光ポリマー微小球を試料として用いた実験例を示す。蛍光励起用レーザにより検出された微小球の近傍にフェムト秒レーザが照射され、集光点で発生した衝撃力により微小球は押しされ、下側の回収用 (Collection) 流路に導かれた。このような分取の成功率を蛍光検出からフェムト秒レーザ照射までの信

号遅延時間 (Δt) の依存性とレーザ強度依存性を調べ、流路中にある微小球の空間選択性を評価した (図5)。この示す条件では、フェムト秒レーザが蛍光励起用レーザの下流 $13\ \mu\text{m}$ に集光されており、 $1\ \text{m/s}$ の微小球の速度から予測される理想条件の $\Delta t = 13\ \mu\text{s}$ で分取成功率が最大となり、 $\Delta t = 10 - 20\ \mu\text{s}$ の間で、微小球は回収用流路に導かれることが示された。 $10\ \mu\text{s}$ の時間で、微小球はその直径に相当する $10\ \mu\text{m}$ の距離を流れるため、この結果は前後にある微小球にほとんど影響を及ぼさず、標的となる微小球のみに衝撃力を作用させて分取できることを示している。

微小球の流速は $1\ \text{m/s}$ であり、本実験結果よりフェムト秒レーザ誘起衝撃力によりマイクロチップ中で、1秒間に最大10万個の微小球から標的微小球を分取できることが実証された。本手法でより小さな物体を高速に流すことにより、さらなる高速分取性能が期待でき、その潜在性能はマイクロキャピラリを用いた従来法を遥かに上回っている。

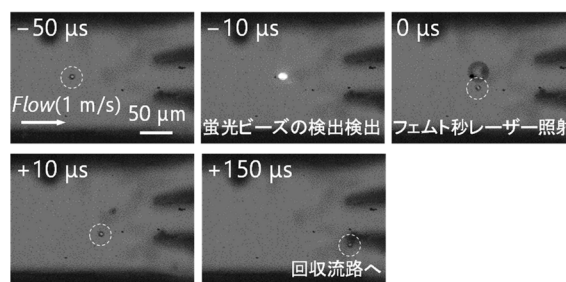


図4 蛍光微小球分取の高速撮影像

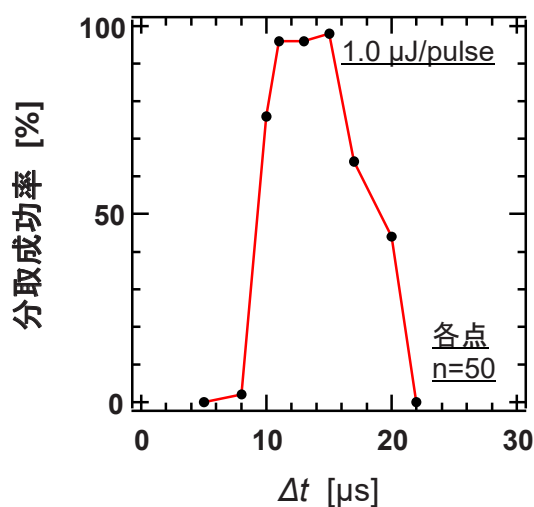


図5 蛍光検出からレーザ照射までの信号遅延時間 (Δt) と分取成功率の関係

3. 治療技術への展開

レーザーの治療技術への最たる応用はレーザーメスであるが、レーザーメスの欠点として、術者である医師に、メスで生体を切断している感覚が返らないことが指摘されている。術者が油断するとレーザーは目的としない部位まで切断してしまう危険性がある。それを避けるために近畿大学の橋新らは、レーザーが生体に照射された際に発する音響波を検出し、その情報が術者に帰還されることを提案している。一方で我々は、これまでにレーザーが生体材料を切断した際に生じる音響波をAFMにより高感度に検出する手法を開発しており¹⁹⁻²⁰⁾、この技術をレーザーメスの機能向上に結びつける検討を始めている。

図6にAFMによるフェムト秒レーザー誘起衝撃力計測の概要図を示す。顕微鏡上に据え付けたAFMヘッドによってカンチレバ(バネ定数: 0.2 N/m)を肉組織表面に接触させた。チタンサファイアフェムト秒レーザー増幅器(800 nm, 150 fs)から射出されるパルス光を、メカニカルシャッタにより切り出し、20倍対物レンズを通してAFM探針近傍に照射した。レーザー照射により誘導される肉組織の振動をAFM探針により検出する。探針の先端には検出用レーザーが照射されており、探針の変位によるレーザー光線の進行方向の変位を4分割フォトダイオードで検出し、その振動をオシロスコープにより検出する。

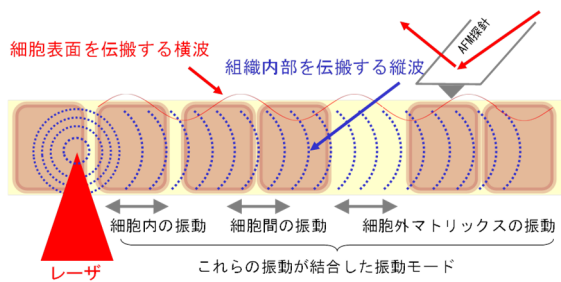


図6 フェムト秒レーザー誘起衝撃力により肉組織を伝搬すると考えられる振動とAFMによるその振動計測

集光点とカンチレバ間の距離を変化させてパルス光を集光照射し、振動挙動をAFMカンチレバによって検出した結果を図7に示す。集光点とカンチレバの距離が遠くなるにつれて振幅が小さくなり、衝撃力の強さが減衰していることが分かる。振動波形の概形から、振動波形は複数の周波数成分を含んでおり、各測定点においてレーザー集光点を起点とする同一の振動伝搬を計測できていることが分かる。衝撃力が伝搬する速度を測定するために、初めて測定場所に到達する振動に着目し(図中の矢印)、図8に示す振動波の到達時間のレーザー集光点とAFM探針の距離依存性について調べた。伝搬波が到達するまでの時間は、距離が遠くなるにつれて伝搬するまでの速度が遅れており、傾きから、試料中の振動伝搬速度は約 2.0×10^3 m/s であることが分かる。

本実験で測定された衝撃力の伝搬速度は、筋組織中の応力波の速度約 $1.5 - 1.7 \times 10^3$ m/s と概ね一致した。骨中の振動伝搬速度は $3.0 - 4.0 \times 10^3$ m/s 程度であると報告されており、このような振動伝搬速度の解析により、レーザーが肉組織に照射されているか、骨組織に照射されているかを見分けることができる。

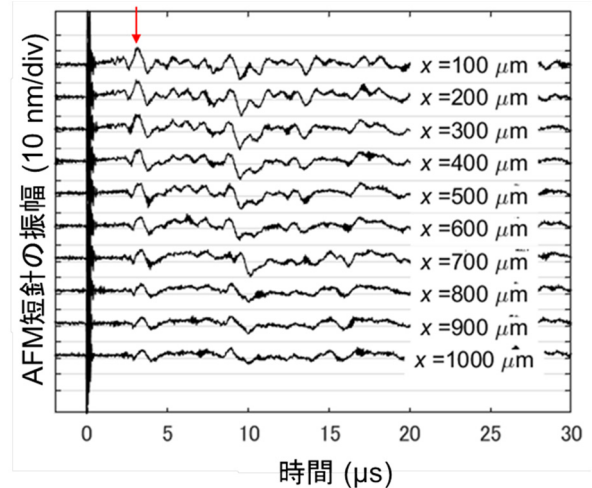


図7 フェムト秒レーザー誘起衝撃力による生体組織の振動挙動。xは、レーザー集光点とAFM探針の距離

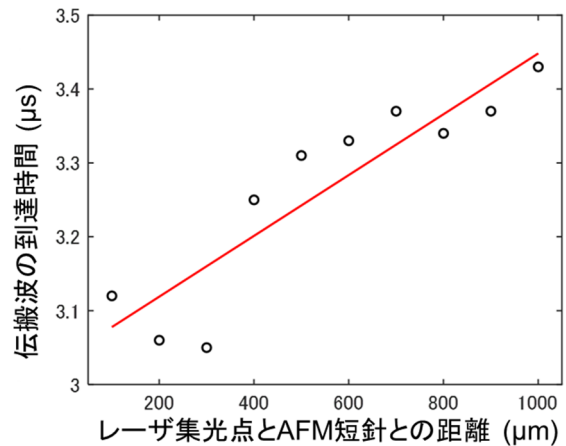


図8 振動波の到達時間のレーザー集光点とAFM探針の距離依存性

今後さらに、周波数成分の分析に取り組み、部位などによって硬さや弾力が異なる種類の試料に対して同様の実験を行うことで、より高速かつ高精度に生体組織の機械特性から見分ける手法の開発に取り組んでいこうと考えている。

謝 辞

本研究の一部は、公益財団法人天田財団の一般研究開発助成 AF 2016225 によっておこなわれたものであり、ここに感謝の意を表します。本研究の遂行にあたり、本実験を実際に遂行いただきました飯野敬矩博士、山川健氏、萩原宏規氏、荒木崇志氏、前田祐希氏、井上一輝氏、釣優香博士、および関係諸氏に感謝します。

参考文献

- 1) Y. Hosokawa: Applications of the femtosecond laser-induced impulse to cell research, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 58, (2019), 110102.
- 2) T. Kaji, S. Ito, H. Miyasaka, Y. Hosokawa, H. Masuhara, C. Shukunami and Y. Hiraki: Nondestructive micropatterning of living animal cells using focused femtosecond laser-induced impulsive force, *Appl. Phys. Lett.*, 91, (2007), 23904.
- 3) C. Hosokawa, M. Suzuki, T. Taguchi, A. Kiyohara, S. N. Kudoh, Y. Hosokawa, K. Okano, and H. Masuhara: Micro-channel fabrication by femtosecond laser to arrange neuronal cells on multi-electrode arrays, *Appl. Phys. A*, 101, (2010), 423–428.
- 4) Y. Maezawa, K. Okano, M. Matsubara, H. Masuhara, and Y. Hosokawa: Morphological evaluation of cell differentiation after the isolation of single cells by a femtosecond laser-induced impulsive force, *Biomed. Microdevices*, 13, (2011), 17–122.
- 5) A. Yamaguchi, Y. Hosokawa, G. Louit, T. Asahi, C. Shukunami, Y. Hiraki, and H. Masuhara: Nanoparticle injection to single animal cells using femtosecond laser-induced impulsive force, *Appl. Phys. A*, 93, (2008), 39–43.
- 6) Y. Hosokawa, S. Iguchi, R. Yasukuni, Y. Hiraki, C. Shukunami, and H. Masuhara: Gene delivery process in a single animal cell after femtosecond laser microinjection, *Appl. Surf. Sci.*, 255, (2009), 9880–9884.
- 7) Y. Hosokawa, H. Ochi, T. Iino, A. Hiraoka, and M. Tanaka: Photoporation of Biomolecules into Single Cells in Living Vertebrate Embryos Induced by a Femtosecond Laser Amplifier, *PloS One*, 6, (2011), e27677.
- 8) T. Maeno et al.: Targeted delivery of fluorogenic peptide aptamers into live microalgae by femtosecond laser photoporation at single-cell resolution, *Sci. Rep.*, 8, (2018), 8271.
- 9) Z. Y. Hong, K. Okano, D. Di Carlo, K. Tanaka, Y. Yalikul, and Y. Hosokawa: High-speed micro-particle manipulation in a microfluidic chip by directional femtosecond laser impulse, *Sens. Actuators A*, 297, (2019), 111566.
- 10) T. Iino et al.: High-speed microparticle isolation unlimited by Poisson statistics, *Lab on a Chip*, 19, (2019), 2669–2677.
- 11) Y. Hosokawa, J. Takabayashi, T. Omoto, T. Adachi, K. Fujiyama, T. Seki, and H. Masuhara: Nondestructive Manipulation of Single Live Plant Cell by Laser Induced Micro Shockwave, *Proc. Int'l Colloq. on Plant Biotech.*, (2013), 53–57.
- 12) A. Vogel and V. Venugopalan: Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues, *Chem. Rev.*, 103, (2003), 577–644.
- 13) T. Ando, S. Sato, S. Takano, H. Ashida, and M. Obara: Propagation characteristics of laser-induced stress wave in deep tissue for gene transfer, *Appl. Surf. Sci.*, 255, (2009), 9898–9901.
- 14) A. Vogel et al.: Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond to femtosecond time scales, *Appl. Phys. B*, 68, (1999), 271–280.
- 15) T. Iino and Y. Hosokawa: Direct Measurement of Femtosecond Laser Impulse in Water by Atomic Force Microscopy, *Appl. Phys. Express*, 3, (2010), 107002.
- 16) Y. Hosokawa, M. Hagiwara, T. Iino, Y. Murakami, and A. Ito: Noncontact estimation of intercellular breaking force using a femtosecond laser impulse quantified by atomic force microscopy, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 108, (2011), 1777–1782.
- 17) T. Iino and Y. Hosokawa: Controllability of femtosecond laser-induced impulse in water evaluated by local force measurement system using atomic force microscopy, *J. Appl. Phys.*, 112, (2012), 66106.
- 18) T. Iino, P. L. Lin, W. Z. Wang, J. H. Deng, Y. C. Lu, F. J. Kao, and Y. Hosokawa: Contribution of stress wave and cavitation bubble in evaluation of cell–cell adhesion by femtosecond laser-induced impulse, *Appl. Phys. A*, 117, (2014), 389–393.
- 19) R. Yasukuni, R. Fukushima, T. Iino, and Y. Hosokawa: Pulsed-laser-activated impulse response encoder: Sensitive detection of surface elastic waves on biomimetic micro-sized gel spheres, *Appl. Phys. Express* 10, (2017), 117007
- 20) R. Yasukuni, D. Minamino, T. Watanabe, S. Yamada, T. Iino, Y. Bessho, T. Matsui, Y. Hosokawa: Pulsed-laser-activated impulse response encoder (PLAIRE): Detection of core–shell structure of biomimetic micro gel-sphere, *Appl. Phys. A* 124, (2018), 594.