

# 複合超短パルスレーザー3次元微細加工技術の開発と 高機能デバイス作製への応用

国立研究開発法人理化学研究所 光量子工学研究センター  
チームリーダー 杉岡 幸次

国立研究開発法人理化学研究所 脳神経科学研究センター  
研究員 河野 弘幸

(平成 29 年度 重点研究開発助成 A グループ研究 AF-2017201)

キーワード：フェムト秒レーザー，3次元加工，バイオチップ

## 1. 研究の目的と背景

近年、3次元造形技術(3Dプリンティング)が注目を集め、レーザーはその主要な加工ツールとなっている。3次元造形技術はAdditive Manufacturingとも呼ばれ、付加工技術に分類される。3次元造形技術により、これまで作製が困難であった複雑な3次元構造体の構築が可能となった。一方超短パルスレーザーは、ピーク強度がきわめて高いため、非線形多光子吸収により透明材料に対しても強い吸収を生じさせることができる。これにより超短パルス秒レーザー光を適当なエネルギーで透明材料内部に集光すると、集光点でのみ効率的に多光子吸収を誘起でき、透明材料内部の改質・加工を行なうことができる。この特長を利用することにより超短パルスレーザーは、付加工(Additive Manufacturing, 3Dプリンティング)だけでなく、除去加工(Subtractive Manufacturing)、無変形加工(Undeformative Manufacturing)の3つの異なる形態の3次元加工を実行することができる。それぞれの加工法の代表例は、除去加工技術がガラス内部への3次元流体構造形成<sup>1), 2)</sup>、無変形加工がガラス内部の屈折率制御による3次元光導波路描画<sup>3)</sup>、付加工が紫外線硬化樹脂を用いた多光子造形<sup>4)</sup>であり、世界の多くの研究者が現在も活発に研究開発を行っている。一方それぞれの加工法には一長一

短があり、一つの加工法であらゆる3次元構造や機能を構築できる訳ではない。そこで本研究では、それぞれの加工法の弱点を補いつつ特長を融合することにより、より複雑かつ高機能な構造を実現する複合超短パルスレーザー3次元加工技術の開発を行った。開発した複合超短パルスレーザー3次元加工技術により微小擬似生体バイオチップを作製することを提案し、がん細胞の侵襲・転移のメカニズム解明等、生体内で起こる現象の観察・解明へ応用した。

## 2. 実験方法

図1に、複合超短パルスレーザー3次元微細加工技術の手順を示す。まず超短パルスレーザーガラス内部3次元加工技術(図1(a)-(c))により、3次元マイクロ流体構造を作製する<sup>1)</sup>。具体的には、透明なガラスに対して超短パルスレーザー3次元直描を行なう(図1(a))。ここでレーザー光を適当な強度でガラス内部に集光すると、集光点でのみ多光子吸収を誘起でき、図1(b)に示すように材料内部の3次元改質を行うことができる。レーザー改質領域はレーザー未照射領域と比較してフッ酸水溶液に対し50倍程度大きいエッチング速度を有する。その結果、フッ酸エッチングによりレーザー照射領域を選択的に除去することができ、図1(c)に示す3次元マイクロ流体構造をガラス内部に形成す

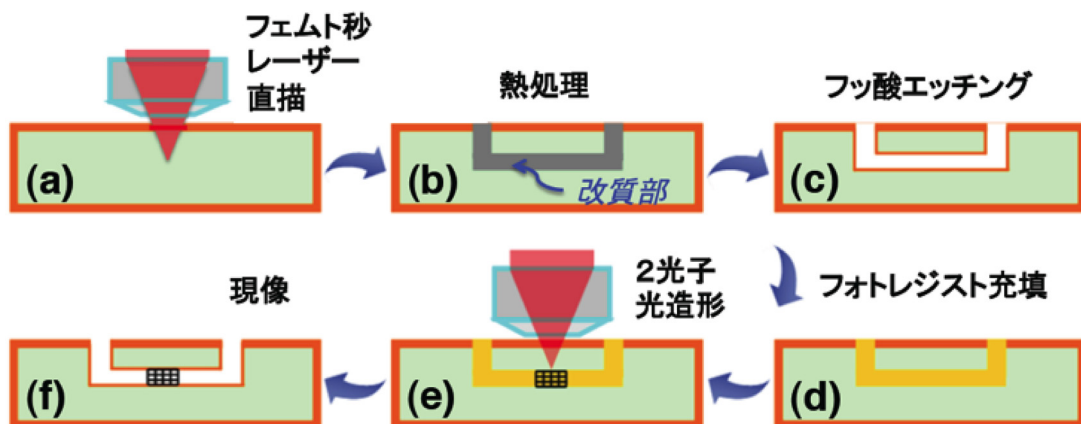


図1 複合超短パルスレーザー3次元微細加工技術の手順

ることができる。作製したマイクロ流体構造にネガ型フォトレジストを充填し(図1(d))、同じ超短パルスレーザーを用いて流体構造内部で多光子造形を行う(図1(e))。それにより図1(f)に示すように、3次元ガラス流体構造内部に3次元ポリマー・マイクロ・ナノ構造を内包した高機能バイオチップを作製することができる。本技術は、ガラス流体構造内部に後から3次元ポリマー構造体を集積化するため、ボトルシップ集積加工技術とも呼ばれる<sup>5)</sup>。

多光子造形の一般的な加工解像度(最小 voxel 寸法)は100nm程度である。一方ボトルシップ集積加工技術では、レーザー光は空気/ガラス/レジストの3つの異なる屈折率媒体中を伝搬するため、各界面で球面収差が生じ、解像度が低下する。実際、ボトルシップ集積の加工解像度は500nm程度であり、ガラスマイクロ流体構造内部に、さらに細いチャンネル構造をポリマーで形成しようとした場合、そのチャンネル幅は最小で2 $\mu\text{m}$ が限界である。そこで本研究では、ガラス流体構造内部で行う多光子造形の加工解像度を改善するため、空間位相変調器(SLM)を用いてレーザー光の波面の制御を行った。

一方、微小擬似生体バイオチップの高機能化を図るため、タンパク質の3次元多光子造形技術を開発し、さらにタンパク質3次元微細構造のボトルシップ集積加工を試みた。タンパク質の3次元造形では、タンパク質分子と光重合開始剤を混合した前駆体質溶液中で超短パルスレーザー3次元直描を行う。前駆体溶液を充填したガラス流体構造内部に超短パルスレーザー光を集光し、ガラスチップを保持したx-y-z ステージをPC制御により3次元走査することで、タンパク質のボトルシップ集積加工を行った。

### 3. 研究成果

#### 3・1 複合超短パルスレーザー3次元微細加工による微小擬似生体バイオチップの作製

図2に示すように、まずT字型のガラスマイクロ流体構造を図1(a)-(c)に示した超短パルスレーザー3次元ガラス加工技術により作製した。続いて直交する2つのチャンネル

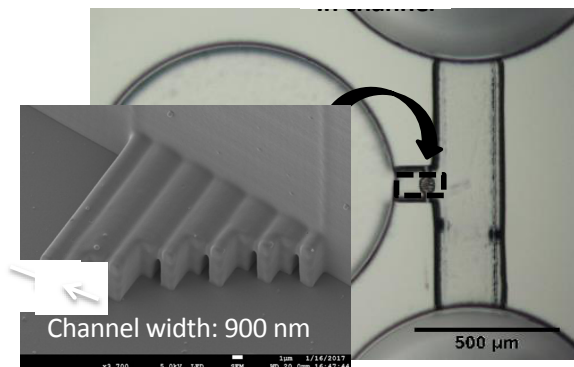


図2 複合超短パルスレーザー3次元微細加工により作製した微小擬似生体バイオチップ

の結合部の手前に、図1(e)-(g)に示した多光子造形を用いた超短パルスレーザーボトルシップ型集積技術により、パンパイプ型のポリマー・ナノチャンネルアレイを配置した。前述のように、通常のボトルシップ集積加工の加工解像度は500nm程度であり、ガラスマイクロ流体構造内部に、さらに細いチャンネル構造をポリマーで形成しようとした場合、そのチャンネル幅は最小で2 $\mu\text{m}$ が限界である。ここではSLMによりレーザー光の波面の制御を行うことにより、加工解像度を約100nmに改善した。その結果、ガラス流体チャンネル中に集積化されたポリマー・ナノチャンネルアレイのチャンネル幅として900nmを実現した<sup>6)</sup>。

#### 3・2 タンパク質の多光子造形とボトルシップ集積

多光子造形では、前駆体としてネガ型フォトレジストが主として用いられ、付加加工によりポリマーの3次元マイクロ・ナノ構造体が構築される。我々は、本手法をタンパク質の3次元造形に拡張することを試みた。前駆体としてネガ型フォトレジストの代わりに、タンパク質分子(ウシ血清アルブミン:Bovine serum albumin (BSA))に、光重合開始剤(Sodium 4-[2-(4-Morpholino) benzoyl-2-dimethyl-amino] butylbenzenesulfonate: MBS)を混合した溶液を用いた。図3に、ガラス基板上に造形したBSAの3次元マイクロ構造を示す。本手法のメカニズムは以下のように考察される。(1) 前駆体溶液中の光重合開始剤分子が超短パルスレーザー多光子吸収により励起される。(2) 励起された光重合開始剤分子がタンパク質分子をさらに励起する。(3) 励起されたタンパク質分子同士が重合し、固体のタンパク質3次元構造が形成される。さらに本手法とボトルシップ集積加工技術を組み合わせることにより、タンパク質本来の性質を利用して、より生体に近い環境をガラスマイクロ流体素子中に創成することを試みた。実験では、ガラスマイクロ流体素子に、タンパク質と光重合開始剤を混合した前駆体溶液を充填し、フェムト秒レーザーの3次元直描を行った。その結果、図4に示すように、ガラ

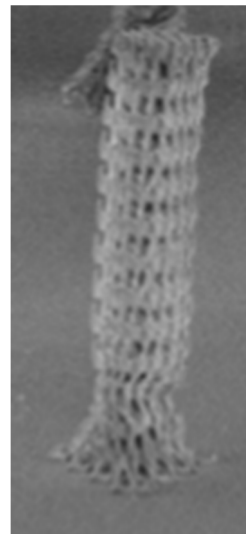


図3 多光子造形法によりガラス基板上に作製されたBSAの3次元マイクロ構造

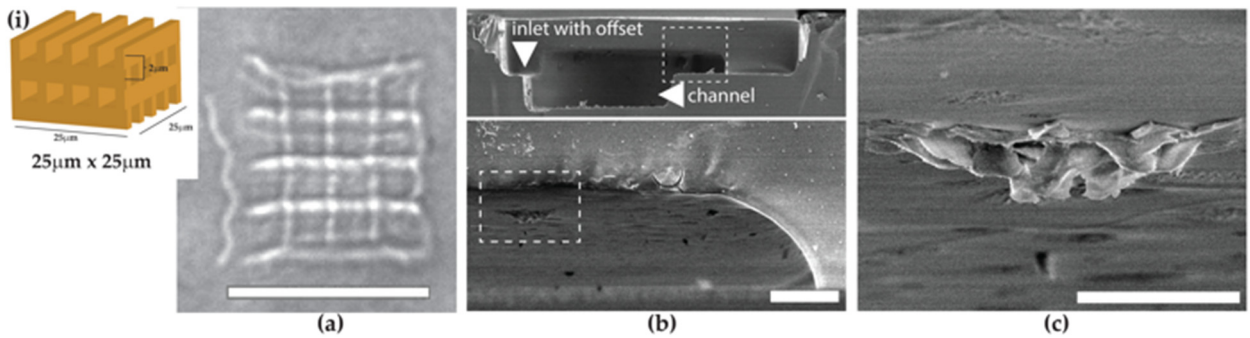


図4 ボトルシップ集積加工技術により、ガラスマイクロ流体構造の天井面に形成されたウッドパイル構造のタンパク質 (BSA)

スマイクロ流体素子中に集積化されたウッドパイル構造のタンパク質 (BSA) を集積化することに成功した<sup>7)</sup>。

さらに副次的な成果として、前駆体中のタンパク質濃度を上げ、かつレーザー光の照射強度を高くすることで、光重合開始剤を使用しない純粋なタンパク質の3次元造形技術を開発した<sup>8)</sup>。光重合開始剤を混合した溶液を前駆体として用いると、光重合開始剤分子が造形した構造体中に混入するという問題点を、ラマン分光法により明らかにした。光重合開始剤は毒性を持つものもあり、そのような汚染の混入は、生体内で起こる現象観察・解明を行う微小擬似生体バイオチップには望ましくない。純粋なタンパク質を3次元造形できることにより、より生体の機能を模したバイオチップが実現できることが期待される。

### 3.3 微小擬似生体バイオチップによるがん細胞マイグレーションの観察

病気の早期診断、発症メカニズムの解明、生体内で起こる様々な現象の観察や理解は、人類の健康・長寿の社会を実現する上で重要であり、今日、生物・医学者が精力的に研究を行っている。日本人の死亡原因の第1位はがんであ

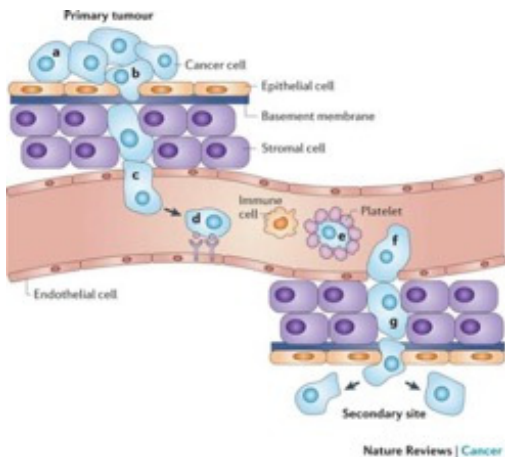


図5 がん細胞の転移の様子

るが、がん細胞の転移を抑制することができれば、がんによる死亡率を劇的に低減することが可能である。図5に示すように、がん細胞の転移はまずがん細胞が基底膜や体内組織を通り抜け、その後リンパ流や血流に沿って他の部位に移動することによって生じる。がんの転移の初期過程においては、がん細胞の大きさが数 $\mu\text{m}$ ~数十 $\mu\text{m}$ であるため、図5に示すように、基底膜や体内組織を通り抜けるために、その形状を大きく変形させる必要がある。実際、がん細胞が自身の大きさより狭い領域を通り抜けることができることは知られている<sup>9)</sup>。一方、その際がん細胞がどのように形状を変化させ、かつその時がん細胞内部の核や小器官がどのようになっているかはほとんど分かってい

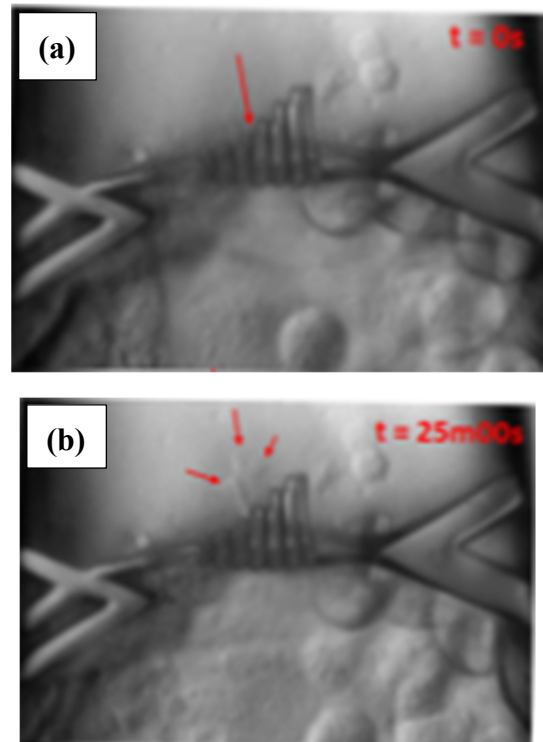


図6 ナノチャンネル中を移動するがん細胞の光学顕微鏡による観察



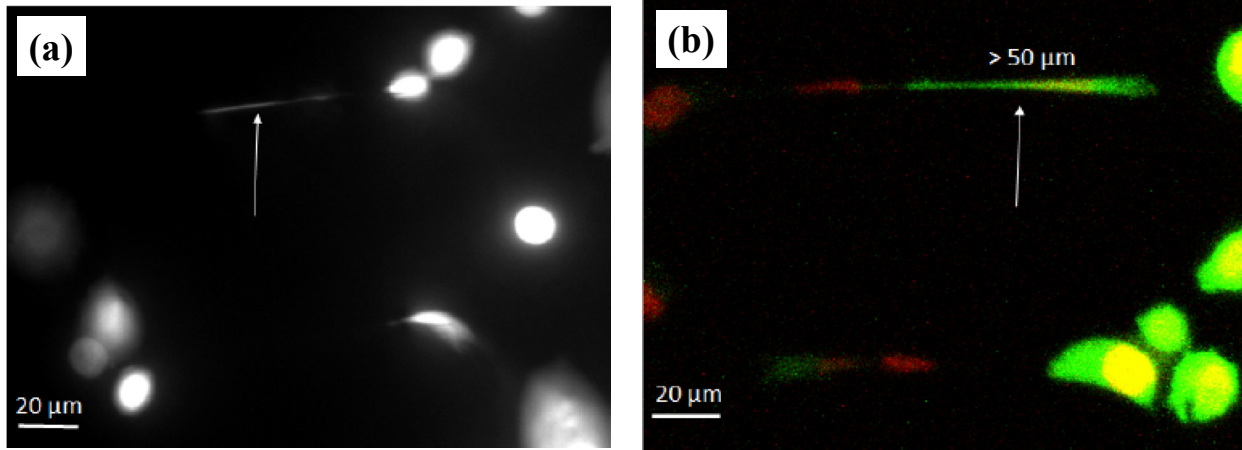


図7 ナノチャンネル中を移動するがん細胞の共焦点蛍光顕微鏡による観察、(a) 細胞核のみを赤色蛍光タンパク質で染色したがん細胞、(b) 核に加えて、細胞体を緑色蛍光タンパク質で染色したがん細胞

ない。がん細胞の転移を抑制するためには、まずがん細胞転移のメカニズムを知る必要があり、その一つとしてがん細胞が自身の大きさより狭い領域をどのようにして通り抜けるのかを調べる必要がある。そこで、複合超短パルスレーザー3次元加工技術を用いて作製した微小擬似生体チップを用い、がん細胞が自身の寸法より狭い領域を通り抜ける際の振る舞いを調べた。

微小擬似生体チップとしては、図2に示したT字型のガラスマイクロ流体構造に、パンパイプ型のポリマーナノチャンネルアレイを集積化したものを用いた。ポリマーナノチャンネルの幅は900 nmであり、観察に用いたがん細胞（ヒト由来前立腺癌：PC3）の平均寸法数十 $\mu\text{m}$ と比較するとはるかに狭い。図6に、ポリマーナノチャンネル中をがん細胞が移動する様子を、光学顕微鏡で観察した結果を示す<sup>6)</sup>。がん細胞は図面下方より、左から3番目のナノチャンネル（チャンネル長11 $\mu\text{m}$ ）に侵入し、反対側（図面上方）に通り抜けようとしている（図6(a)）。25分後、がん細胞が完全にナノチャンネルを通り抜けた後、分裂を生じる（図6(b)）。細胞の分裂は、がん細胞にとっては一般的な現象である。

さらにがん細胞の核や細胞体を蛍光タンパク質で染色し、ナノチャンネルを通り抜ける際の変形の様子を共焦点蛍光顕微鏡により観察を行った<sup>10)</sup>。図7(a)に、細胞核のみを赤色蛍光タンパク質で染色したがん細胞が、ナノチャンネル中を移動している様子を観察した結果を示す。核がナノチャンネル内でその形状を大きく変形させ、50 $\mu\text{m}$ 程度伸長して移動していることを確認した。核に加えて、細胞体を緑色蛍光タンパク質で染色し、その移動の様子を観察した結果を図7(b)に示す。細胞体は、核よりさらに伸長し、核も細胞体内部で変形していることを確認した。

複数のがん細胞のナノチャンネル中での振る舞いを観察することにより、以下の知見を得た。(1) がん細胞は自身

の寸法（～数十 $\mu\text{m}$ ）より1桁以上狭いサブナノメートル幅の領域を通り抜けることが可能である。(2) ナノチャンネルを通過したのちも100%のがん細胞は生存しており、活性を保っている。(3) 細胞核はナノチャンネルを移動中その形状を大きく変形させ、50 $\mu\text{m}$ 程度伸長するが、変形による損傷は生じていない。(4) ナノチャンネルを通り抜けた後も分裂というがん細胞の機能を維持しており、かつ分裂の生じる確率は移動前と変わらない。

#### 4. 結論

超短パルスレーザーを用いると、その超高強度性により透明材料に多光子吸収を誘起でき、付加工、除去加工、無変形加工の異なる形態の3次元加工を実行することができる。本研究では、超短パルスレーザー3次元加工の高度化を図ることを目的とし、異なる形態の3次元加工技術を組み合わせた複合超短パルスレーザー3次元加工技術の開発を行った。開発した技術により、ガラス3次元流体構造内部に3次元ポリマーナノ構造体を集積化させ、微小擬似生体バイオチップの作製を行った。作製したバイオチップは、がん細胞の転移メカニズムの解明のための研究に応用し、いくつかの新しい知見を得た。さらに、本研究ではタンパク質の3次元光造形技術の開発も行った。ガラス3次元流体構造内部に集積化する3次元ナノ構造体を、ポリマーからタンパク質に置き換えることにより、より生体の機能を模したバイオチップが実現され、がん細胞の転移メカニズムの解明のみならず、多様な医学・生理学研究に応用されることが期待される。

#### 謝 辞

本研究は、公益財団法人天田財団平成29年度重点研究開発助成Aグループ研究（AF-2017201）を受けて遂行されたものであり、ここに深く感謝の意を表す。また本研究

テーマの共同研究者である CETAL, National Institute for Lasers, Plasma and Radiation Physics, Romania の Felix Sima 博士に心から感謝する。

### 参考文献

- 1) K. Sugioka, Y. Hanada, and K. Midorikawa, *Laser Photon. Rev.* 3 (2010), 386.
- 2) A. Marcinkevičius, S. Juodkazis, M. Watanabe, M. Miwa, S. Matsuo, H. Misawa, and J. Nishii, *Opt. Lett.* 26 (2001), 277.
- 3) K. M. Davis, K. Miura, N. Sugimoto, and K. Hirao, *Opt. Lett.* 21 (1996), 17291.
- 4) S. Kawata, H. B. Sun, T. Tanaka, and K. Takada, *Nature* 412 (2001), 697.
- 5) D. Wu, J. Xu, L. Niu, S. Wu, K. Midorikawa, and K. Sugioka, *Light Sci. Appl.* 4 (2015), e228.
- 6) F. Sima, H. Kawano, A. Miyawaki, L. Kelemen, P. Ormos, D. Wu, J. Xu, K. Midorikawa, and K. Sugioka, *ACS Appl. Bio Mater.* 1 (2018), 1667.
- 7) D. Serien, H. Kawano, A. Miyawaki, K. Midorikawa, and K. Sugioka, *Appl. Sci.* 8 (2018), 147.
- 8) D. Serien and K. Sugioka, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6 (2020), 1279.
- 9) C. M. Denais, R. M. Gilbert, P. Isermann, A. L. McGregor, M. te Lindert, B. Weigelin, P. M. Davidson, P. Friedl, K. Wolf, and J. Lammerding, *Science*, 352 (2016), 353.
- 10) F. Sima, H. Kawano, M. Hirano, A. Miyawaki, K. Obata, D. Serien, and K. Sugioka, submitted.