

# フェムト秒レーザーが発生させる熱弾性応力を利用した 生体材料の物理特性改質

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科

助教 安國 良平

(2019年度 奨励研究助成 (若手研究者枠) AF-2019231-C2)

キーワード：生体材料，ソフトマター，熱弾性応力波，ヤング率，分子透過性

## 1. 研究の目的と背景

フェムト秒レーザーを対物レンズで透明な生体試料へ集光すると、多光子吸収イオン化をはじめとする効率的な分子の非線形イオン化現象が生じ、分子に吸収のない波長においても低エネルギーのレーザーパルス照射でプラズマ発生を誘導できる。特にチャープ増幅された低繰り返し・高強度のフェムト秒レーザーパルスを用いると、高繰り返し・低強度のフェムト秒レーザーオシレーターを使用する場合と比較して、熱の蓄積を抑制しながら生体試料を効率よくアブレーション加工できる。その加工特性から、フェムト秒レーザーを利用した視力矯正や白内障治療、発生生物学分野での細胞や胚のナノ手術などに応用されている。近年の比較的安価で安定性の高いフェムト秒 Yb (イッテルビウム) レーザーの普及に伴い、フェムト秒レーザー加工の生体試料への応用がますます盛んになることが予想される。

また上記の生体試料のアブレーション加工の特徴として、熱拡散よりも短い時間スケールで緩和したプラズマのエネルギーが、集光点における熱弾性応力を急激に上昇させ、衝撃波やキャビテーションバブルの発生を誘導することがあげられる。チャープ増幅された高強度のフェムト秒レーザーパルスの集光点では試料の、熱弾性応力の上昇が顕著となり、ナノ-マイクロ秒の時間スケールで数十マイクロメートルのキャビテーションバブルの膨張収縮が生じる<sup>2)</sup>。ゲルのような粘性が大きく柔らかい物質であっても、このような高速な試料の変形には追従できないため、衝撃波やキャビテーションバブルの機械的作用が生体膜の破壊や膜透過性などへ影響を与えることが報告されている<sup>2)</sup>。

以上の背景から、フェムト秒レーザー集光点近傍において熱弾性応力の上昇に伴う高速変形によって生体試料に生じる物理特性の変化を明らかにすることは、加工特性の理解に加えてフェムト秒レーザーの新しい利用方法を開拓するという点で有用である。

そこで本稿では生体試料として細胞外基質として細胞培養などによく使用される水ゲルにフェムト秒レーザーを集光し、集光点近傍で生じる物理特性として試料のヤング率と分子透過性の変化に関して調査した結果を報告する。

## 2. 研究方法

### 2.1 顕微鏡下における水ゲルへのフェムト秒レーザー照射とヤング率測定

図 1 に倒立顕微鏡上で原子間力顕微鏡 (AFM) によるヤング率測定とフェムト秒レーザー照射を同時に行えるシステムの概要を示す。フェムト秒チタンサファイア再生増幅器 (Spectra-Physics, Solstice-Ref-MT5W) からメカニカルシャッターによって切り出した単発のレーザーパルス (130 fs, 800 nm) はビームエキスパンダーで径を拡大して倒立顕微鏡 (Olympus, IX73) に導入し、対物レンズを用いて顕微鏡ステージに設置した試料へ集光した。パルスエネルギーは ND フィルターで調節し、対物レンズ通過後のエネルギーをパワーメーターで測定した。

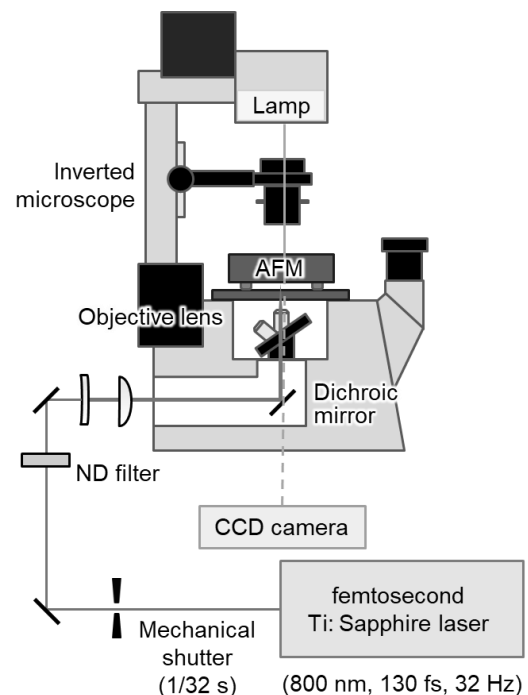


図 1 顕微フェムト秒レーザー照射・AFM 測定システム

AFM (JPK, Nanowizard 4) の QI モードを用いてカンチレバーを試料へ押し込み、その押し込み量に対するカンチレバーのたわみ量を試料からの反力として計測した応力-

ひずみ曲線（フォースカーブ）を測定し、ヘルツの接触理論に基づいて得られたフォースカーブをフィッティングすることでヤング率  $E$  の値を算出した。

$$P = \frac{4}{3} \frac{ER^{\frac{1}{2}}}{(1-\nu^2)} \delta^{\frac{3}{2}}$$

ここで  $P$  は試料からの反力、 $\nu$  はポアソン比、 $R$  は先端半径、 $\delta$  は試料の押し込み量である。用いたカンチレバー（Nanosensors, TL-CONT）は平均的に表 1 に示すような特性を有しており、柔らかいハイドロゲルへカンチレバー先端が突き刺さることを防ぐためにチップレスのカンチレバー先端に直径  $40 \mu\text{m}$  のガラスビーズを接着剤で接着した。

ハイドロゲルとしてはガラスベースディッシュ底面のガラス部に作製した厚さ数百マイクロメートルの 5%アガロースゲル及び 3%コラーゲンゲルを使用した。

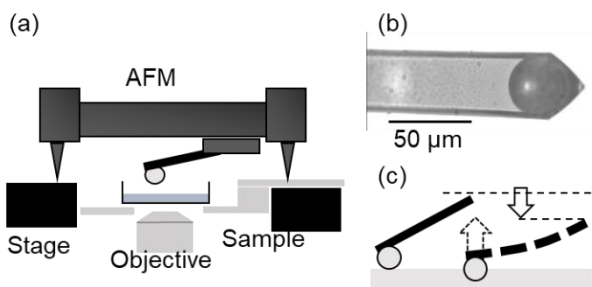


図 2 (a)フェムト秒レーザー集光点におけるアガロースゲルのフォースカーブ測定の概要, (b)  $40 \mu\text{m}$  のガラスビーズを接着した AFM カンチレバー, (c)フォースカーブ測定の概要. カンチレバーを試料へ押し込み、試料からの反力によるカンチレバーのたわみ量を AFM の光てこを用いて計測する。

表 1 AFM カンチレバーの代表的な仕様

AFM probe	TL-CONT
Shape	Beam
Length ( $\mu\text{m}$ )	450
Spring constant (N/m)	0.2
Frequency (kHz)	13
Width ( $\mu\text{m}$ )	50
Thickness ( $\mu\text{m}$ )	2
Material	Silicon

## 2・2 ハイドロゲルの分子透過性の評価

ハイドロゲルの分子透過性は、その上に滴下した蛍光性分子の 3 次元空間分布をレーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡(Olympus, FV-300)で観測することで評価した。分子には蛍光性分子であるフルオロセイン( $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ )を標識した 2 MDa の糖鎖高分子(FITC-デキストラ

ン)を用いた。図 3 のように  $800 \text{ nJ/pulse}$  のフェムト秒レーザーパルスをも 100 倍対物レンズ(NA 1.25)と通じて 1%アガロースゲル表面に 20 箇所集光し、その後に  $2 \mu\text{M}$  の FITC-デキストラ溶液を滴下した。共焦点蛍光観察には 4 倍対物レンズ(NA 0.16)を用いて行った。蛍光分子の励起には波長  $488 \text{ nm}$  の連続発振 DPSS レーザー( $50 \mu\text{W}$ )を用いた。

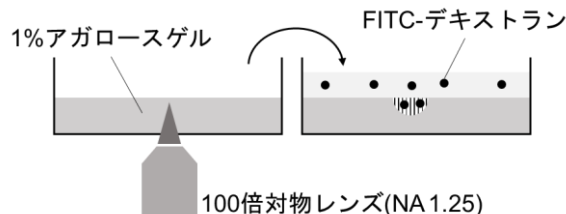


図 3 フェムト秒レーザー照射に伴って変化するアガロースゲル中の FITC-デキストラ透過性評価の概要

## 3. 研究成果

### 3・1 フェムト秒レーザー照射に伴うアガロースおよびコラーゲンゲルのヤング率変化

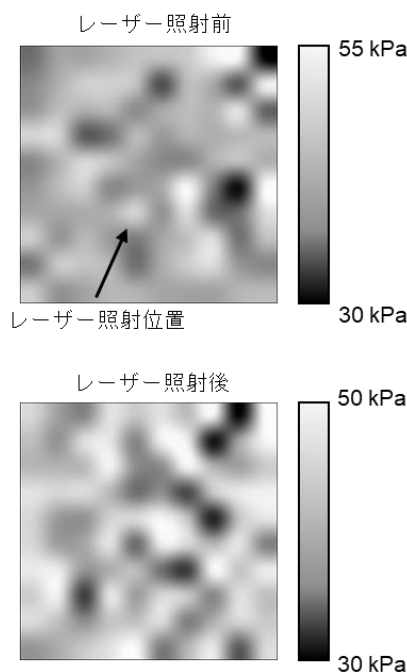


図 4 フェムト秒レーザー照射前後におけるアガロースゲル表面のヤング率マッピング. 像の 1 辺は  $10 \mu\text{m}$ .

$250 \text{ nJ/pulse}$  のフェムト秒レーザーパルスを 5%のアガロースゲル表面に照射し、レーザー照射前後で、集光点を中心とした  $10 \times 10 \mu\text{m}$  の領域のフォースマッピングを実施した代表的な結果を図 4 に示す。得られたヤング率分布を比較した結果、レーザー集光点で特に大きなヤング率の増減は観測されなかった。マッピングを行った 100 点の平

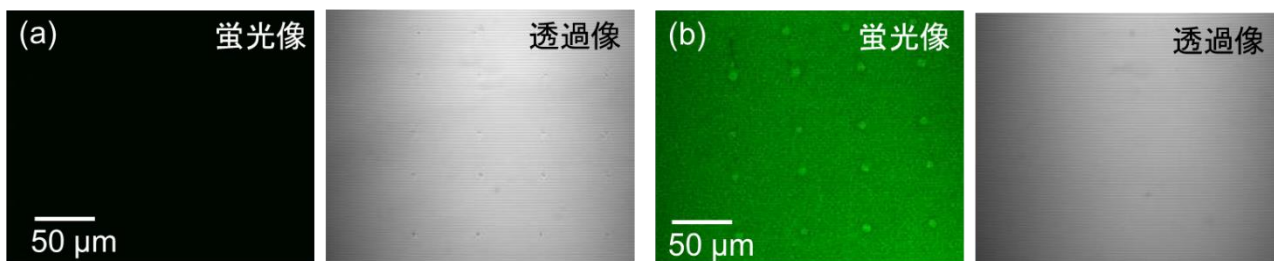


図5 フェムト秒レーザー照射後、2  $\mu\text{M}$  の FITC-デキストランを滴下前(a)および滴下後(b)の共焦点蛍光像と透過像

均値ではレーザー照射前は平均ヤング率が  $47.4 \pm 3.68 \text{ kPa}$  であったのに対し照射後では  $45 \pm 4.08 \text{ kPa}$  となった。このようにレーザーパルス照射後にアガロースゲルの顕著なヤング率変化は生じなかった。またパルスエネルギーを  $500 \text{ nJ/pulse}$  とした場合でも平均ヤング率の減少量に大きな差は見られなかった。しかしながら複数回の実験において平均ヤング率が 5%程度減少する傾向が得られている。同様の実験を 3%コラーゲンゲルで行った場合、レーザー照射前は  $294 \pm 33.0 \text{ kPa}$  であった平均ヤング率が  $260 \pm 32.7 \text{ kPa}$  へと 10%程度減少した。以上の結果より実験の誤差は大きいもののフェムト秒レーザー照射に伴ってハイドロゲルのヤング率は減少する傾向にあると言える。

これらの実験でフォースカーブと同時に測定した試料の高さ情報からはレーザー照射によって試料の表面形状が変化する様子は観察されなかったことから、先端球の接触状態はレーザー照射後に変化していない。従って、レーザー照射に伴うアガロースゲル及びコラーゲンゲルに見られた 5%から 10%程度のヤング率減少は、衝撃波がハイドロゲル中を伝搬<sup>3)</sup>、またはキャビテーションバブルの膨張に伴う高速変形によって、ハイドロゲルのドメイン構造やネットワーク構造が変化したことと起因すると考えられる。

しかしながら、ヤング率の測定値はカンチレバーの先端形状、フォースカーブ測定における押し込み量のようなパラメーターなど多くの要素にも依存するため、定量的な評価を行うことが難しい。またハイドロゲルは粘弾性体としての特性が強いため、ヤング率以外にその機械特性を評価していくことが必要となる。その他レーザー照射条件に関してもパルスエネルギーやパルス数を変え今後の課題となる。

### 3.2 フェムト秒レーザー照射に伴うアガロースゲルの分子透過性変化

前節の結果より、フェムト秒レーザー照射に伴う集光点での熱弾性応力の上昇に起因する機械的作用によって、レーザー集光点近傍でハイドロゲルの構造が変化している可能性が示された。そこでそのような構造変化の指標として分子透過性を測定した。

図 5 に 100 倍の対物レンズを用いてフェムト秒レーザーを照射した後、FITC-デキストランをゲル表面に滴下する前後の共焦点蛍光像および透過像を示す。図 5(a)の透過像にはレーザー集光後アガロースゲル表面に、アブレーションによって生じた直径  $1 \mu\text{m}$  程度の小孔が観察される。一方で蛍光像にはアブレーションで生じた小孔の位置に何も観測されないことから、アガロースゲルによる光散乱や光化学反応による発光性分子の生成などが蛍光像に影響しないことがわかる。

次に  $2 \mu\text{M}$  の FITC-デキストラン溶液をアガロースゲル上に滴下して、滴下前と同じ条件で共焦点蛍光観察を行うと、図 5(b)の蛍光像のように液中の FITC からの蛍光によって像全体の輝度が上昇していることがわかる。さらにレーザー集光点近傍ではゲル表面に生じた小孔のサイズよりも大きい直径  $10 \mu\text{m}$  程度の領域で蛍光強度の顕著な増加が観測された。

今回使用した 1%アガロースゲルはゲル電気泳動などでも標準的に使用される濃度であり、 $2 \text{ MDa}$  の大きさを有する高分子は通常ゲルの中には拡散しない。またゲル表面に窪みなどは透過像では全く観察されないことに加え、前節の AFM 測定でもレーザー集光点近傍の領域でアガロースゲル表面が窪むような挙動が観測されていないことから、蛍光強度が増加した領域で生じた凹みに FITC-デキストランが入っているとは考えにくい。

したがって、蛍光強度の増加はフェムト秒レーザー照射に伴う熱弾性応力によってアガロースゲルのネットワーク構造が破壊され、 $2 \text{ MDa}$  の高分子の透過性が増加したことと起因すると考えられる。蛍光強度が周辺と比べてより大きいのは、ゲル中の分子透過性が増加した部分では分子の拡散速度が溶液中より低下することで局所的に FITC-デキストランの濃度が増加したためと考えられる。

さらに FITC-デキストランがレーザー集光点近傍に保持されるかどうかを確認するために、FITC-デキストラン溶液を滴下後に再び蛍光分子を含まない溶液へと置換して蛍光像を取得したところ、集光点近傍で輝度の高い領域は消失したため、今回使用した  $2 \text{ MDa}$  程度の分子サイズの分子はゲル内に強く保持されず拡散速度は早いと考えられる。

#### 4. 結言

本研究ではフェムト秒レーザー照射によって生じる熱弾性応力の機械的作用がハイドロゲルに与える影響に関して、ヤング率と分子透過性の観点から検証を行った。その結果、フェムト秒レーザー集光点近傍ではハイドロゲルのマクロな構造変化が生じ、数%のヤング率減少や分子透過性の向上が起きることが示唆された。

本稿で報告した成果以外にも実施した、フェムト秒レーザー穿孔法による単一植物細胞への分子導入実験では、高強度のフェムト秒レーザーパルスを単発照射したタバコBY-2細胞の細胞壁・細胞膜の分子透過性が上昇することで、レーザー穿孔法による分子導入効率が改善する可能性を報じている<sup>4)</sup>。

既存の研究の中でハイドロゲルのパターンニングを行う技術は多数報告されているが、ハイドロゲルの機械特性を部分的に変化させる方法はあまりない。近赤外フェムト秒レーザーの三次元空間選択性を生かし、細胞外基質や生体膜の機械特性をナノ・マイクロメートルスケールで局所的に改質することで、これまでにない機能性生体材料の開発へつながることが期待される。

#### 謝 辞

本研究の遂行にあたりご支援いただきました公益財団法人天田財団に厚くお礼申し上げます。また実験に協力をいただきました奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学領域の山田莊平博士、岡野和宣博士、高尾晃平君、Ridho Priyo 君に感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) A. Vogel J. Noack, G. Hüttman and G. Paltauf: *Appl. Phys. B* **81** (2005) 1015.
- 2) 角井泰之・川内聡子・寺川光洋・佐藤俊一：レーザー研究, 709-713(2017), 45.
- 3) R. Yasukuni, D. Minamino, T. Iino, T. Araki, K. Takao, S. Yamada, Y. Bessho, T. Matsui, and Yoichiroh Hosokawa: *Biomed. Opt. Express* **12** (2021) 1366.
- 4) T. I. Rukmana, G. Moran, R. Méallet-Renault, G. Clavier, T. Kunieda, M. Ohtani, T. Demura, R. Yasukuni, Y. Hosokawa: *APL Photonics* **5** (2020) 066104.