特集／微小機構とレーザー

微小機構とレーザー Minute Organization and Laser

藤正 巖

東京大学先端科学技術研究センター

〒153 東京都目黒区駒場 4 - 6 - 1

TEL 03-3481-4440, FAX 03-3481-4442

Iwao Fujimasa

Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo, Japan

4-6-1 Komaba Meguro-ku Tokyo Japan 153

要 旨

医学は光技術と共に発達してきた。光技術の歴史は、20世紀の後半になって、3世紀ぶりの新しい光学の技術の登場により一変することになった。ルビーレーザーが発明され、量子光学が始まったのは1960年代で、医学では、主にエネルギーとしてのレーザー利用が盛んだった。最近では、生物細胞の光感受性の利用により波長依存性の利用が漸く盛んとなってきたが、これに加えて導光路としての光ファイバーの技術や、光情報処理の技術、さらには光子計測のような極微弱光計測の技術や超高速光計測が加わり、さらには光を加工プローブとして取り扱う技術も登場し始めている。どの技術もそのキーワードはレーザー技術であり、さらに光技術のみで完成する技術ではなく、光と電子の複合化された領域を作り出している。このような技術の主な対象は、主に生物が持つ微小機構やその機能の計測・解析と操作で、それは丁度、医学の微小技術指向と低侵襲性に見事に適合している。この小特集では、微小機構とその機能を対象とするレーザー技術を取り上げることとしよう。レーザー共焦点顕微鏡と、レーザーピンセットの技術は、それぞれ専門家に解説を依頼し、その他の微小機構関連の技術の現状と未来像を眺めてみることにしよう。生物の機構は微小な要素から成り立っているから、人工物をそれに対応させるには微小機構の造形技術も重要になる。小さな部分から全体を構成しようという考えは、どこか生物のセルフアセンブルの仕組みにつながることがあり、マイクロマシンを初めとして、微小な物体の加工についても言及することとしよう。

キーワード：微小機構，光操作技術，光造形法

Abstract

Development of medical technologies have been supported by optics. Historically optical technology enter a revolutionary era in the latter half of the 20th century. Quantum optics was introduced by the invention of ruby laser in 1960. Application of high energy density of laser light has been frequently used in medicine. Recently, frequency dependent photosensitive characteristics of cells has been applied. Techniques such as optical fiber, light computing and photon detection begin to be applied in

medical domain. These techniques include fundamentally laser technology and opto-electric principles. In the article, I describe short introductions for laser techniques related to microstructures, because the biological systems consist microparts and we must develop the handling technologies in medicine.

key words : microstructure, micromanipulation using laser light, light assisted molding

医学は光技術と共に発達してきた。例えば医学に顕微鏡の果たした役割がどれほど大きかったかを考えてみればよい。17世紀のルネサンスのガリレオの時代に始まった光学技術は、医療ではその対象は主として計測技術で、そこでは波動としての光を扱ってきた。

このような光技術の歴史は、20世紀の後半になって、3世紀ぶりの新しい光学の技術の登場により一変することになった。1960年にルビーレーザーが発明されたのがきっかけで、量子として光を扱う技術が開発され、量子光学が始まったのはよく知られている。この領域で医学では、主にエネルギーとしてのレーザー利用に特化し、最近では波長依存性による利用も、生物細胞の光感受性の利用により漸く盛んとなってきたが、基本的には、レーザー光のコヒーレンシーの良さを応用した高エネルギーの光が最もよく使われている。

最近では医療でも、これに加えて導光路としての光ファイバーの技術や、光情報処理の技術、さらには光子計測のような極微弱光計測の技術や超高速光計測が加わり、さらには光を加工プローブとして取扱う技術も登場し始めている。どの技術もそのキーはレーザー技術であり、さらに光技術のみで完成する技術ではなく、光と電子の複合化された領域を作り出している。

このような技術の主な対象は、主に生物が持つ微小機構やその機能の計測・解析と操作で、それは丁度、医学の微小技術指向と低侵襲性に見事に適合している。ここでは、微小機構とレーザーの関係を眺めてみることにしよう。

1 光技術・レーザー技術の特徴

光を利用する技術は次のような特徴を持っている。

- (1) 光の直進性を利用できる
- (2) 極めて低損失の屈曲性に富む細い導光路を使用できる
- (3) 本質的に非接触測定・操作が可能
- (4) 高速（サブピコ秒短パルス使用）・高感度（1フォトン検知）・高分解能（光波長の1/100）の計測が可能

可能

- (5) 2次元・3次元パターン測定・操作が可能
- (6) パターンマッチング等の光学特有の手法が使える
- (7) 電磁波雑音・高温・電離放射線などの存在する環境下でも使用できる
- (8) 量子光学的効果を利用して他の物理量を計測できる（光電効果、光音響効果、光磁気効果、光非線形現象、電磁波の放射等）
- (9) 光のコヒーレント性を利用すると、極めて高いエネルギーを小さい部位に集中できる

これらの光技術の特色を応用した各種の技術、ことにレーザー技術は、次世代の医療を担う低侵襲あるいは非侵襲の診断と治療の技術のための基盤技術として、次第に脚光をあび始めた。

この小特集では、微小機構とその機構を対象とするレーザー技術を取り上げることとしよう。レーザー共焦点顕微鏡、とレーザーピンセットの技術は、それぞれ専門家に解説を依頼し、その他の技術の現状と未来像を眺めてみることにしよう。

2 微小物体の操作と計測技術

2.1 フローサイトメトリー

細胞のハンドリング技術の中で、医用工学的発想が最も成功した機械がフローサイトメトリーであろう。開発者のHerzenberg夫妻が1976年のScientific American誌で述べているように、このシステムに関する全ての基礎技術は既に全部その時代に存在しており、ただこのような装置を作る必要があるという発想のみ新たに必要であったということだ。セルソータの基本部品となっている液滴のノズルはStanfordで1964年にインクジェット技術として、毎秒4万の均一な液滴が作り得る技術が開発されていたし、細胞希薄懸濁溶液の製法と輸送法は、Coulter counterで実用化されていた。勿論染色体の蛍光染色技術は完成していたし、それを励起するレーザービームもAr-ionレーザーの青色光が使用され、励起光をフィルターし蛍光のみを光電子増倍管で取り出す技術

も使用されていた。これらの技術を組合せ、毎秒10mで滴下する液滴の僅かな飛翔時間内に細胞の吸光あるいは蛍光特性を判別し、液滴の偏向電極へ高圧の電気信号を送るコンピューターシステムも使用可能となっていた。これらを組み合わせた結果、細胞を高速に自動的に選別するシステムとして、今日遺伝子工学や免疫科学などのバイオテクノロジーでなくてはならない機械が登場するに至った。

現在、この手法は完成の域に達し、細胞内のDNA・RNA・タンパクの相対量による分類、細胞の活性、抗体の産生能・酵素活性による分別が可能となっている。さらに最近は、光吸収や蛍光の強度による計測のみでなく、時間・空間的偏向特性、波長特性・散乱光の強度を利用することが始まり、分子レベルでの解析にも使用することが始まっている。新しいタイプの落射蛍光型デュアルフローサイトメータも開発され、今日の極微小光分析手法がフローサイトメトリーに取入れられ始めている。

2.2 近接効果型顕微鏡と生物微小物質操作

レーザー走査型共焦点顕微鏡やプローブ走査型顕微鏡は、観測するプローブの先をできるだけ細かくし、観測対象のごく近傍に近づけて走査して画像を作る方式である。この方式の顕微鏡は、何も光学的な計測に止まるのみでなく、生物でも多くの物理量が計測されてきた(Radmacher, et al, 1992; Arakawa, et al., 1992; Henderson, et al, 1992)。本誌でも谷下一夫等によって解説が行われている。

この顕微鏡の特徴は、計測と同時に対象物に操作を加えることもできる。計測と操作が同時にできるために、微小な生物部品の力学的動特性を計測する手法として、最近急速に多くの技術が登場してきた。その基本は、極微小な細胞構造物質や機能活性物質を蛍光物質でラベルし、観測系を作る手法と、その観測系の中で超微細な操作系を作ることにある。

その一例として横紋筋のモータータンパクであるmyosin分子で最密充填したシリコン被覆ガラスの表面に、蛍光物質のrhodamine phalloidinでラベルしたactin線維をのせ、ATPの添加によって起こるactin線維の滑走速度の計測を高感度のSITカメラで撮影し(5 $\mu\text{m/s}$)、その動作がactin線維の螺旋の半ピッチが機能単位となっていることの発見や、このactin線維を落射式蛍光顕微鏡の下で、サブミクロンのガラスニードルで引っ掛け、actin線維とmyosin頭部とのずり応力が約2 pNであること、actinの分子間結合力が400pNであることなどが始めて計測されている。さらに、この光学系を用いて、actin線維とmyosinの間に発生する、熱分子運動

による発生力の揺らぎの計測も行っており、まさにモータータンパクと細胞骨格の間の動力学計測が光学的に行われるようになり始めた(柳田, 1989; Ishijima, et al, 1991)。

操作対象がDNAやRNAさらには、RNAを転写するpolymeraseとなると、さらに微細な操作手法の開発が必要となる。集積流体回路の中でDNAを強い電界をかけ引き伸ばし、レーザーで一定の長さに切断して、avidinに両端を固定されたDNAの鎖を、polymeraseで読み取り、任意のRNAを複製しようとする試みがある(Kabata, et al, 1993)。最近急速に発展が始まっているDNA増幅器(PCR法)の機械的な手法のアプローチだが、多くの光技術の集積が必要であろう。

2.3 レーザーピンセット (laser tweezer)

光は慣性力を持ち、電気的に中性の物体には力を及ぼすことはKeplerやNewtonの時代から知られていた。その理論的な実証は、Maxwellによって行われたが、その運動量は余りに小さく、顕微鏡下の細胞でもそれは対象物に吸収され、実効的働きはしなかった。しかし、レーザー光が登場し、その電波的な光では、そのコヒーレンシーを生かして、大きな光エネルギーを細かいビーム光に集光し、さらに極めて小さな焦点領域に集光することができるようになった。このような光を小さな物体に照射すると、光の持つ運動量により対象物を動かすことができる。レーザーによる微粒子操作技術はこのような背景から登場した(Ashkin, 1980)。

最初に考えられたのは、光のビームの中に置かれた微粒子の挙動であったが、実際に実用となったのは、光ビームを球状の物質に集光して、吸収した光の運動量変化分で微粒子を動かそうという方法であった。実験では、波長1.06 μm 連続波のNd:YAGレーザーを、波長程度に集光し、油滴の他に二酸化チタンやサルモネラ菌の捕捉に成功し、数 μm のポリメタクリル酸メチル(PMMA)の微粒子を捕捉し、水中で自由な図形を描くことに成功している(喜多村, 1992; Chu, 1992)。

最近、半導体レーザーを用い(波長0.78~0.95 μm)顕微鏡に組込まれたレーザーピンセットとして、生きた細胞や染色体さらにはオルガネラの顕微鏡下での力学的計測に用いられ始めた(Block, 1992; Vale, 1993)。この方法が生物領域で急速に有名になったのは、直径0.055 μm のラテックス樹脂をstreptavidinで被覆し、biotin化した微小管に取り付け、レーザーピンセットでこの微小樹脂球を動かし、単分子のモータータンパクkinesinの分子発生力(1.9 ± 0.4 piconewton)と移動距離(7 nm)を計測した実験で(Kuo and Sheetz, 1993)。今まで、計測不可能であったモータータンパク単分子の動解析が可

能となったことから、急速に細胞機構学が進展するきっかけをあたえることになった。

これらの詳細は松浦弘幸の本誌文献を参照されたい。

3 微小機構のファブリケーション

生物の機構は微小な要素から成り立っている。これに対して人工物は基本的にはかなりの大きさの寸法の素材や部品から成り立っている。小さな部分から全体を構成しようという考えは、どこか生物のセルフアセンブルの仕組みにつながることもあり、マイクロマシン・プロジェクトがわが国で立ち上がってから、微小な物体の加工とオートアセンブルの方法の研究がされ始めた。

3.1 レーザーアシストエッチング

(LAE : laser-assisted etching)

レーザー技術と関連して最初に登場したのはレーザーアシストエッチングと呼ばれる技術だった。シリコンの基板の微小加工（シリコンプロセス）による集積電子回路が、レジスト（光感受性の高分子膜）のマスクでマスクパターンを作り、そのマスクを通じて薬品やイオンビームのエッチングで型通りのパターンを削り出すのと異なり、レーザーによる微細加工では基本的にマスクを使う必要はない。しかし、通常のレーザー光による加工では、被加工物体が局部的に高温になり、溶融や蒸発が爆発的におこるため加工精度があまり良くない。このためシリコンプロセスと類似のエッチング手法を導入したのがレーザーアシストエッチングである。セラミックスや各種半導体化合物、金属の加工に用いられる。

この方法は、レーザー光を光化学反応を起こす励起光として用いたり、材料の温度を局所的に上昇させ、エッチングを促進させる。このためレーザー光単独の加工と比べると遙かに弱い出力で加工可能となり、殆ど全てのレーザー装置を使うことが可能となる。

セラミックスの加工では、例えば圧電セラミック素子のPZT（ PbZrO_3 と PbTiO_3 の固溶体）はNd : YAGレーザーとKOH液で200mm/s程度のエッチング加工ができる。半導体材料でも従来の10~100倍の速度でエッチングができ、逆に金属では、エッチング速度を低く調節するために中性塩溶液内でのエッチングや大気中での酸化反応を利用したりする。レジストの材料のポリイミドやポリエチレンテレフタレートなどの高分子材料はエキシマレーザーによる大気中の酸化加工が主流で、1.0mm/pルス程度の速度で加工されるという（小藪国夫、1988）。

これらの手法を組み合わせ、生物細胞を選別する1~2mmの穴を持つ篩いや、神経インターフェイスに使わ

れる電極の加工が行われ始めていて、この加工専用のエキシマレーザーが市販されている。

レーザー光で表面加工をし、その表面を生体適合性の性質を自由にコントロールできる物質で覆う技術は医療に多くの応用領域を持つ技術となる。松田（1995）はエキシマレーザーで紫外線（KrF : 248nm Ar : 193nm）を発生させ、このレーザー波長を吸収する材料に照射させ、レーザー・アブレーションで微細な3次元回路を材料表面に作る技法を開発している。この方法はマスクをかけられた表面に、光重合により架橋能力のある物質を結合させ、その物質を介在させて任意の材料で表面を被覆する技術と組み合わせることにより、任意の微細3次元表面の生体との反応性を制御することができる。部分的に親水性・疎水性の表面を形成したり、微細な凹部に特定の反応基を持つ物質を固定し、微細なバイオリクターのシステムを構成する技術となると予測されている。これから盛んになる組織工学（tissue engineering）の基礎技術ともなろう。

3.2 レーザー光造形法

光硬化性の樹脂の溶液の薄層に紫外線の細いビームを当てて硬化させ、パターンを作り、液面を僅かに上昇させてさらに光をあて硬化パターンを作る・・・といった行為を繰り返して立体の構造物を作る手法は、任意の立体模型を自動形成することができる。現在は、頭蓋骨の欠損部位を削り出すためのモデルを、コンピュータシミュレーション下で作る手法ともなっていて、高度先進医療の項目とすらなっている。この方法は大阪工業試験所で開発され、米国に流出後、3D Systems Inc. (Santa Clara, California) で実用化され、日本に再輸入された技術で、ステレオリソグラフィ（stereo-lithography）と呼ばれた（永森、1990）。

方法はエキシマレーザー等の紫外線帯域のレーザー光を、エポキシやウレタンなどのオリゴマーに反応性希釈剤と光重合開始剤（ベンゾイン系やアセトフェノン系）を混合した0.2mmの薄層に当てて硬化パターンを作り出すのが原法となっている。この方法が日本に上陸してから、多くの大学の工学部で同様の方法で、もっと微小な加工を目指した開発が行われ、現在最小加工単位は約1mm程度となっていることが報じられている。

特に高木、中島のチームが作り上げた方法は、光の当たる面を従来の方法のように光硬化樹脂の自由液面とせず、硝子の窓を通して行い、硬化樹脂が付着するのを防ぐためにコーティング剤が使用されている。彼らの手法では10mWのHd-Cdレーザー（325nm）を用い、タマネギ状の直径1mmの素子を1秒に40個形成できる。CAD

はパーソナルコンピュータで行い、この方法で数ミリの寸法の櫛状の構造物からタービンやヘリコプターまでを作り出している (Takagi and Nakajima, 1993; 生田, 1995)。

この加工法は任意の形状で任意の寸法のファイン機構を作ることができるから、複雑な回路を持つ流路や (人工の静脈弁が作られている)、圧電素子が付いたマイクロピンセット、マイクロピペットなどが医用応用に試作されている。

4 おわりに

光技術はまさに未来の技術だ。ここでは、微細機構と関連のあるレーザー技術を概説した。われわれは医用工学の領域に、もっと光技術を採り上げなければならない。光で計り、光で操作し、光でコミュニケーションをとり、光で治療するのが未来の医療の重要な一部となることは確かだ。

文 献

- 1) Herzenberg, L. A., R. G. Sweet, et al. (1976). Fluorescence - activated cell sorting. *Scientific American*, 234 : 108-117.
- 2) (1992). *Microbes and man*, *Nature* 357 : 263.
- 3) Radmacher, M., R. W. Tillmann, et al. (1992). From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science* 257 : 1900 - 1905.
- 4) Anderson, F. P. and W. G. Miller (1983). Fiber optic immunochemical sensor for continuous, reversible measurement of phenytoin. *Clin. Chem.* 29 : 1474-1480.
- 5) Arakawa, H., K. Umemura, et al. (1992). Protein images obtained by STM, AFM and TEM. *Nature* 358 : 171-173. 小薮国夫(1988)レーザーアシストエッチング, 精密工学会誌, 54(9), 1673-167
- 6) 柳田敏雄 (1989). 筋肉における滑り運動を分子レベルで直視する. 生物物理のフロンティア: 蛋白質/筋収縮/脳・神経 E d. 日本生物物理学会, 東京, 培風館. 121-133.
- 7) Ishijima, A., T. Doi, et al. (1991). Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin in vitro. *Nature* 352 : 301-306.
- 8) Kabata, H., O. Kurosawa, et al. (1993). Visualization of single molecules of RNA polymerase sliding along DNA. *Science* 262 : 1561-1563.
- 9) Ashkin, A. (1980). Application of laser radiation pressure. *Science* 210 : 1081-1088.
- 10) 喜多村昇 (1992). レーザーによる微粒子マニピュレーションとその応用. 最新医学 47 (6) : 807-812.
- 11) Chu, S. (1992). Laser trapping of neutral particles. *Scientific American*, 266 : 49-54.
- 12) Block, S. M. (1992). Making light work with optical tweezers. *Nature* 360 : 493-495.
- 13) Vale, R. D. (1993). Measuring single protein motors at work. *Nature* 260 : 169-170.
- 14) Kuo, S. C. and M. P. Sheetz (1993). Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers. *Nature* 260 : 232-234. 松田武久 (1995) マイクロマシンの表面加工. *BME*, 9 (8), 45-52
- 15) Stereolithography, unveiled. *Newsweek* 23/11/1987, p. 5.
- 16) 永森 茂 (1990) 紫外線硬化樹脂を用いた加工法によるマイクロマシンの設計・製作. *機械設計*, 34 (15), 50-55.
- 17) Takagi T, Nakajima N (1993) Photoforming applied to fine machining. *Proc IEEE Microelectromechanical Systems (Fort Lauderdale, Florida)*, 173-178.
- 18) 生田幸司 (1995). マイクロ光造形法と医学応用. *BME*, 9 (8), 38-44