Femtosecond laser processing in water for single living cell and solid phase protein

○細川陽一郎^{A,D}、安國良平^A、梶貴博^B、開祐司^{C,E}、森肇^{D,E}、増原宏^{A,E}

(^A 大阪大学・大学大学院工学研究科、^B 大阪大学・大学院基礎工学研究科、^C 京都大学・再生医科学研究所、^D 京都工芸繊維大学・昆虫バイオメディカル研究センター、^E 科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業)

○Yoichiro Hosokawa^{A,D}, Ryohei Yasukuni^A, Takahiro Kaji^B, Yuji Hiraki^{C,E}, Hajime Mori^{D,E}, Hiroshi Masuhara^{A,E}

(^A Graduate School of Engineering, Osaka University, ^B Graduate School of Engineering Science, Osaka University, ^C Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, ^D Insect Biomedical Research Center, Kyoto Institute of Technology, ^E CREST, JST)

1. はじめに

近年、生体材料に対する理解は、単一細胞・単一蛋白質レベルに及んでおり、それに伴い単一細胞や蛋白質集合体を加工し、人工的に制御しようとする試みが注目を集めている。このような生体試料の微細加工の手段として、フェムト秒レーザーの利用が、現在検討されている。光子が高密度に集中したフェムト秒レーザーでは、多光子過程が効率的に誘起されるため、赤外光のフェムト秒レーザーを用いた場合でも紫外光照射に相当する電子励起が起こり、物質にエネルギーは吸収される。さらに高強度のフェムト秒レーザーを生体材料に集光した場合、その集光点で電子励起が起こるに留まらず、材料の急激な形態変化、さらには衝撃波やキャビテーションバブルの発生に至る。これらの現象は、ピコ秒やナノ秒レーザーでも誘起されるが、効率的な多光子吸収の引き起こされるフェムト秒レーザーでは、その発生しきい値となるレーザーパルスエネルギーが極めて低く、これらの現象を局所領域に小規模に引き起こすことができる。我々は、これまで、このフェムト秒レーザーが誘起する局所的な衝撃波やキャビテーションバブルの発生過程を利用して、基板上で単層培養した細胞を個々に単離することに成功している。¹⁾ 本講演では、このフェムト秒レーザーが誘起する衝撃波とキャビテーションバブルの発生過程および細胞との相互作用について述べ、これらの現象を利用した新しい細胞と蛋白質固体のパターニング方法を紹介する。

2. 実験システム

フェムト秒再生増幅チタンサファイアレーザーより出力されるパルス列(波長 800 nm、パルス幅 120 fs、125 Hz)から、機械シャッターによってその1パルスを抽出し、倒立顕微鏡(Olympus, IX71)へ導入した。このレーザーパルスを顕微鏡の像面にある生体試料に対して、対物レンズにより集光した。レーザー強度の調整は、検光子と半波長板を用いておこなった。生体試料の加工の様子は、ハイスピード CMOS カメラ (Photron, FASTCAM)、ビデオレートの CCD カメラ (IKEGAMI, ICD-8718, 33 frame/sec.)、高感度冷却 CCD カメラ (ROPER Scientific, Cool snap HQ) により観察した。また、本実験ではマーカー蛋白質として、緑色

蛍光蛋白質 (Green fluorescence protein: GFP) を用いており、その蛍光観察用の励起光源として、半導体励起固体レーザー (CW、波長 473 nm) を用いた。数時間におよぶ断続的な蛍光像観察の際の GFP の退色を防ぐため、蛍光励起用レーザーの直前に配置された機械シャッターが、撮影タイミングと同期して開くようになっている。

図1 フェムト秒レーザーを集光照射したときに誘起される水の形態変化

3. フェムト秒レーザー誘起衝撃波

極めて短い時間で電子が励起されるフェムト秒レーザー励起の場合には、レーザー照射直後に分子固体内で原子骨格が激しく振動しているのに、固体自身が動けないという状況ができる。これは、物質内の圧力が瞬間的に上昇したことに相当し、フェムト秒レーザーでは、この圧力が衝撃波として物質を伝搬するために破壊を導く。図1に、ハイスピードカメラにより撮影された水中の衝撃波の発生過程を示す。水中には、その流れを可視化するためにポリスチレン微小球が添加されている。フェムト秒レーザー照射直後に、発光が観察され、それと同時に微小球の輪郭がぼけた。この輪郭のぼけは、フェムト秒レーザーにより誘起された衝撃波が微小球に衝突し、微小球の位置が高速に変動していることを示している。その後、レーザー集光点に黒い像が観察された。これは衝撃波の伝搬に伴い、レーザー集光点の圧力が低下し、急激に水の気化が進んだために発生した気泡 (キャビテーションバブル) であると考えられる。キャビテーションバブルは、数 10 マイクロ秒で消失し、新たな気泡が形成された。この気泡は、キャビテーションバブルの消失の際に、水が断熱圧縮され、それにより水蒸気が発生したことによると考えられる。微小球は、

このキャビテーションバブルの生成・消滅に追従して移動した。フェムト秒レーザーが溶液に与える力は、この微小球の移動速度から見積もられ、その大きさは数 μN におよぶ。一方、光圧によるレーザートラッピングにより微小球に印可できる力は数 pN であり、このフェムト秒レーザーの衝撃波発生に伴う力は、瞬間ではあるが、それよりも遙かに大きい。この力を利用することにより、これまで難しかった細胞や蛋白質固体の操作が実現すると考えられ、次にその例を示す。

4. フェムト秒レーザー衝撃波と細胞の相互作用

基板上に単層培養した細胞の近傍の細胞培養液にフェムト秒レーザーを集光照射することにより、細胞を基板から引き剥がすことができる。このような細胞の引き剥がしは、機械式のマイクロピンセットでは、対象が小さすぎて困難である。また、レーザートラッピングではその力が弱く、おこなうことができない。このような培養細胞の単離は、特定の細胞の遺伝子解析をおこなう際の前処理として注目されている。

図2に、GFP結合アクチンによって蛍光染色した細胞の全反射蛍光像を示す。全反射照明により、細胞は基板との界面の数百ナノメートルの領域のみが励起されており、ここでは基板に接着しているアクチンストレスファイバーを選択的に可視化していることになる。この細胞の近傍の培養液にフェムト秒レーザーを集光し、衝撃波を発生させると、レーザー集光点近傍のアクチンストレスファイバーが消失した。一方、レーザー集光点から遠い位置では、アクチンからの蛍光強度の増大が見られた。これらの結果は衝撃波が付加されることにより細胞骨格構造の再編成が誘起された可能性を示唆している。このようにフェムト秒レーザーを用いることにより、細胞に直接レーザーを照射せずして、細胞活性を制御できる潜在能力を秘めている。

図2 フェムト秒レーザーを細胞培養液に集光照射したときに誘起される細胞の培養基板からの剥離の様子

5. 細胞と蛋白質固体の非破壊パターンニング

集光フェムト秒レーザーが発生する衝撃波やキャビテーションバブルを利用して、細胞および蛋白質固体のパターンニングを行った。図3に集光フェムト秒レーザーによるマイクロパターンニングの原理図を示す。転写元となるソー

ス基板に細胞もしくは蛋白質結晶を接着させ、水層を介して、転写先となるターゲット基板を配置する。このソース基板とターゲット基板間の水層にフェムト秒レーザーを集光照射した。レーザー集光点では衝撃波やキャビテーションバブルが発生し、レーザーをソース基板近傍に集光した場合、これらにより発生した力により、ソース基板上の細胞や蛋白質固体が振り落とされる。レーザーの集光位置を移動させることにより、ターゲット基板上に任意のパターンを作製できる。

図3 フェムト秒レーザーにより誘起される衝撃波とキャビテーションバブル発生過程を利用した細胞および蛋白質固体のパターンニング方法

図4にこの方法を用いて NIH3T3 細胞をパターンニングした結果を示す。この方法により、約 $100\mu\text{m}$ の線幅で秒速 $90\mu\text{m}$ 以上の速度で細胞を配列することができた。図は配列3時間後のパターンであり、細胞が基板に接着して正常に仮足を伸長させる様子が観察されている。つまり、細胞の生理活性を保持した状態でパターンニングできることが示された。また、これと同様のパターンニングを蛋白質固体においても成功している。²⁾ これらの結果は、このフェムト秒レーザーによる配列方法が、生体材料を熱的・化学的な損傷を与えずに、また乾燥させることなく水中において、高精度にパターンニングすることができる汎用的な方法であることを示している。

図4 パターンニングされた細胞の3時間後の様子

- 1) Y. Hosokawa, J. Takabayashi, S. Miura, C. Shukunami, Y. Hiraki, and H. Masuhara, *Appl. Phys. A* **79** (2004) 795.
- 2) Y. Hosokawa, T. Kaji, C. Shukunami, Y. Hiraki, E. Kotani, H. Mori, H. Masuhara, *Biomed. Microdev.* in press (2006).