フェムト秒レーザーによる微粒子を用いた極微細加工と生体応用

寺川 光洋^{1,2}, 石井 敦浩²

¹慶應義塾大学 理工学部電子工学科 (〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1)

²慶應義塾大学大学院 理工学研究科総合デザイン工学専攻 (〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1)

Femtosecond Laser Nanoprocessing and Bio-Applications

Mitsuhiro TERAOKAWA^{1,2} and Atsuhiko ISHII²

¹Department of Electronics and Electrical Engineering, Keio University 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku, Yokohama, Kanagawa 223-8522

²School of Integrated Design Engineering, Keio University 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku, Yokohama, Kanagawa 223-8522

(Received July 26, 2016)

The use of small particles has expanded the capability of ultrafast laser processing and provides precise processing in nanometer-scale space that overcomes the theoretical diffraction-limited spatial resolution. Recently precise laser processing is showing attractive developments in biomedical applications including drug delivery and cell stimulation. This review gives the fundamentals of laser processing by enhanced optical fields and its calculational studies. We also describe the recent progresses in bio-applications that use femtosecond lasers and small particles.

Key Words: Ultrafast laser processing, Nanoprocessing, FDTD, Bioapplication

1. はじめに

超短パルスレーザー加工に関係する研究者であれば誰もが知っているであろうChichkovらによるフェムト秒レーザーとナノ秒レーザーによるアブレーションを比較した論文¹⁾から既に20年が過ぎた。今日では、フェムト秒レーザーを用いた加工は、金属はもちろんのこと、透明材料を含む誘電体、高分子材料、生体組織、細胞、といったあらゆるものを対象とし、基礎研究から産業応用まで広く進められている。除去加工だけでなく、付加(additive)加工も展開されており、重合もしくは還元といった相互作用を利用した造形法が知られている^{2,3)}。

生体組織もしくは細胞を対象としたフェムト秒レーザープロセッシングは、冒頭で述べた論文から時を経ずして報告されている。例えば、1999年に細胞核内の染色体をフェムト秒レーザーにより切断する論文が発表された⁴⁾。細胞のレーザーアブレーションでは、培養細胞は可視から近赤外域においてほぼ透明であることから、水中に集光したフェムト秒レーザーが誘起する現象を基に相互作用が議論されている⁵⁾。後述するように、培養細胞は軟らかいため集光点近傍に生じるプラズマ、キャビテーション、衝撃波による影響を受けやすい。

フェムト秒レーザー加工では、ビームの空間強度分布と加工しきい値の関係、多光子過程による非線形相互作用、等への着眼点により現在では100 nmよりも小さい解像度の加工が実現している。一般に、レーザー加工で

は回折限界により決定される集光径および周囲に生じる熱影響層により加工解像度が決まる。サブミクロンからナノスケールの微細加工は、熱影響層が極めて小さい利点を伴ってはじめて実現する。すなわち、フェムト秒レーザー加工では、相互作用領域を小さくすることと加工の微細さは直結するとも言える。著者らを含めいくつかのグループは、回折限界を超えて相互作用領域を小さくする方法のひとつとして、微小構造近傍に生じる増強光を利用した研究を行っている。

本稿では、回折限界を超えた微小領域に生じさせた高強度光、すなわち局在増強光によるフェムト秒レーザーアブレーションとその光強度計算について述べ、続いてその生体応用に関して報告事例を取り上げながら概説する。また、著者らが行っている誘電体粒子を用いた細胞のアブレーションに関する研究について紹介する。

2. 局在増強光によるレーザープロセッシングと光強度計算

金属微粒子もしくは誘電体微粒子にレーザーを照射すると、微粒子近傍に近接場光が生じる。生じた非伝搬性の光はナノスケールで局在し、その電界振幅は距離 r^{-3} 乗に比例して減衰するが、入射電界よりも数倍以上高い光電界を局所領域に得ることができる。微粒子への光照射により得られる散乱場はMie散乱理論により求められ、粒子寸法と誘電率、周囲の誘電率から粒子の散乱断面積を計算することができる。微粒子近傍に生じる散乱場は

微粒子内部の分極モードに依存し、入射光の波長が共鳴モードに対応しているときに散乱断面積のピークが得られる。金属微粒子では、レーザーが照射されると微粒子表面の電子の集団振動、すなわちプラズモンが励起され、金属微粒子周囲に新たな電磁界分布を誘起する。金属微粒子ではこのプラズモン近接場光に加え、加工対象基板の鏡像電荷との結合による電界増強も寄与する。

局在増強光を加工に用いると、回折限界よりも小さい寸法の加工が可能となる。局在増強近接場光は連続光やナノ秒レーザー等の照射によっても当然生じるが、フェムト秒レーザーを用いると(1)非熱的プロセスによる熱影響層のほとんどない加工、および(2)ワイドバンドギャップを持つ透明材料も非線形相互作用により加工可能、といった特長を、回折限界よりも小さい寸法で実現できる。Fig. 1に、シリコン基板上に配置した直径200 nmの酸化チタン微粒子に波長400 nmのフェムト秒レーザーを照射することにより得られたシリコン基板表面の構造を示す。波長よりも大幅に小さい直径100 nm以下のナノホールが得られている。

微粒子に光を照射した際に生じる近接場はMie散乱理論とMessingerらによる近接場効率により表すことができるが、近年の計算機の発展に伴い、Maxwellの方程式を時間的・空間的に差分化して逐次計算をする有限差分時間領域(Finite-Difference Time-Domain: FDTD)法により、微細構造周囲の電磁界強度分布を容易に求められるようになっている。三次元FDTD法では、解析領域を空間的に微小な単位セルに分割し、時間を離散化して座標を

$$(x, y, z, t) = (i\Delta x, j\Delta y, k\Delta z, n\Delta t) \quad (1)$$

の格子点に割り当てる。電界は各辺の中心点にて辺に沿って、磁界は各面の中心点にて面に垂直に与えられる。ファラデーの法則とアンペールの法則を基本方程式

Fig. 1 SEM image of fabricated nanohole by using amorphous TiO_2 particle with the irradiation of 400 nm femtosecond laser. Dashed circle indicates the size of the particle.⁶⁾

とし、逐次計算することで電磁界を求める。Fig. 2は、シリコン基板上に配置した直径200 nmの酸化チタン微粒子に波長400 nmの平面波を照射した際に発生する局在増強光をFDTD法により求めたものである。

このように、微小構造にレーザーを照射することにより生じる光増強度およびその分布はFDTDにより求めることができるものの、この計算には非線形相互作用は含まれていない。すなわち、多光子吸収、トンネルイオン化、等、超短パルスレーザーアブレーションにおいて顕著となる現象は含まれていない。実験により得られるナノホールの直径と計算により求められる光増強領域の直径は近い値となるものの、ナノホールの深さは計算値により求められる侵入長と差が生じる。

3. ナノ粒子を使った細胞膜プロセッシング

微粒子へのレーザー照射により生じる光増強場は、大面積への一様照射により複数の微粒子近傍に同時多発的に微小相互作用領域を得られる。このため、レンズを用いた伝搬光の集光による単一細胞処理とは異なり、複数の細胞を同時に処理できる。多くの関連報告例では生体・細胞における線形吸収が小さい近赤外の波長が使用されている。すなわち、微粒子と接触もしくは結合された細胞のみ、微粒子近傍に生じる非線形相互作用によって処理できる。例えば、ドイツの研究グループは、金微粒子へのフェムト秒もしくはピコ秒レーザー照射により細胞膜に小孔を形成し、プラスミドDNAを細胞内に導入できることを示した⁷⁻¹⁰⁾。また、カナダのMeunierらのグループも同様に金微粒子へのフェムト秒レーザー照射による細胞への外来分子導入を行っている¹¹⁻¹³⁾。最近では、この方法は細胞膜への小孔形成だけではなく、細胞刺激への展開もみせている^{14,15)}。

こうした細胞プロセッシングでは、上述した局在増強光による加工とはほぼ同様の方法であるものの、液体中にて実施していることが特徴である。また、プロセッシングの

Fig. 2 Optical intensity distribution in the vicinity of 200 nm TiO_2 particle on Si substrate simulated by 3D FDTD method. A linearly polarized 400 nm plane wave is illuminated to the particle with wave vector in z direction. Dashed circle indicates lineation of the particle.⁶⁾

対象が極めて軟らかいため、容易に変形や損傷等が生じる。このため、集光点におけるアブレーションだけでなく、発生する衝撃波等による影響も大きい。金ナノ粒子を用いたフェムト秒レーザーによる細胞膜プロセッシングでは、流体力学等を水中に適用する理論計算が報告されている。Meunierらは、水中の金ナノ粒子にフェムト秒レーザーを照射した際に生じる衝撃波およびキャビテーションバブルの理論計算を行っている¹⁶⁻¹⁸⁾。近赤外フェムト秒レーザーを照射した際に生じる近接場光、プラズマ生成から粒子周囲の水分子へのエネルギー伝達、衝撃波とキャビテーションバブルの影響を理論的に統合モデルとして計算し、実験結果と比較した。直径100 nmの金ナノ粒子に非共鳴波長800 nmのフェムト秒レーザーを照射すると、発生するプラズマの電子密度は最大 $4 \times 10^{22} \text{ cm}^{-3}$ に達し、プラズマは粒子表面からわずか30 nmの範囲に閉じ込められる。衝撃波の最大圧力はおよそ80 GPaに達するが、粒子中心から200 nm伝搬した位置の圧力は1 GPaまで低下することを状態方程式から説明した¹⁵⁾。また、生成するキャビテーションバブルの最大平均直径がレーザー照射から72 ns経過後に1.2 μm となることを計算より求め、さらに実験結果ではレーザー照射から80 ns経過後に813 nmとなることを述べている。

4. 生分解性ポリマー粒子を使った細胞膜プロセッシング

我々は、光増強場を得るための粒子として生分解性ポリマーを用いた研究を行っている¹⁹⁻²¹⁾。生分解性ポリマーは生体内において無毒な成分に分解されて代謝もしくは吸収されるため、生体適合性と安全性に優れる。Fig. 3に、方法の概念図を示す。細胞膜に生分解性ポリマーの微粒子を結合し、フェムト秒レーザー照射により微粒子下に光増強場を発生させる。細胞と細胞膜は波長800 nmの線形吸収は小さく、粒子下の集光点において局所的に非線形相互作用を生じさせ、細胞膜を局所的に穿孔する。実験では、粒子にポリ乳酸(Poly Lactic Acid: PLA)もしくは乳酸グリコール酸共重合体(Poly Lactic co-Glycolic Acid: PLGA)を用いた。PLAは生体適合性に優れていることから、既に一部の医療用途に実用化されている。また、PLGAは組成比率により分解速度を制御することが可能である。Fig. 4に、FDTD法により求めた直径2 μm のPLA粒子およびPLGA粒子によって得られる光増強強度分布を示す。入射光は波長800 nmの直線偏光とした。PLAとPLGAの屈折率はそれぞれ1.45と1.60とし、水中(屈折率1.33)に配置した系の計算を行った。光強度の最大値はいずれも粒子より少し離れた位置に得られ、粒子直径が波長より大きいことから、近接場光より実効焦点距離が長い伝搬光が主体の光増強場であることがわかる。こうした光強度分布は最近photonic jetと呼ばれることも多い。

平均直径2 μm のPLA粒子およびPLGA粒子を用いて、浮遊状態の細胞に蛍光分子を導入した実験結果をFig. 5に示す。横軸をレーザーフルエンスとしたFig. 5(a)では、PLGA粒子の方が高い細胞内輸送効率(照射領域内

Fig. 3 Conceptual diagram of biodegradable microsphere-mediated cell perforation using femtosecond laser.

Fig. 4 Optical field distributions on the xz plane simulated by the 3D FDTD method for (a) PLA microsphere and (b) PLGA microsphere of 2 μm diameter.

の細胞のうち、蛍光分子が細胞内に取り込まれた細胞の割合)を示した。ただし、Fig. 4に示したように、粒子下に得られる最大光強度は粒子屈折率により異なり、PLGA粒子の方がPLAよりも増強度が高い。FDTDにより求めた粒子下における最大光強度を横軸として、得られた細胞内輸送効率を正規化した結果をFig. 5(b)に示す。細胞内輸送効率は、光増強場における最大光強度に依存していることがわかる。

PLAとPLGAの比較では粒子下の最大増強度のみにより議論を行ったが、最近、光増強場の光強度分布、特に

(a)

(b)

Fig. 5 Optoinjection ratios to cells in relation to (a) laser fluence and (b) estimated optical peak intensity under the microspheres calculated by FDTD method. Dashed lines and solid lines indicate results with PLA microspheres and PLGA microspheres, respectively.²¹⁾

粒子と集光点の距離の違いを利用できないか、試みている。Fig. 6に、直径0.75 μm と3.0 μm のポリスチレン粒子下の光強度分布を示す。直径0.75 μm の粒子ではレーザーフルエンス0.7 J/cm²、直径3.0 μm の粒子では0.081 J/cm²とし、粒子下における増強されたピーク強度が同じとなるようにした。この条件において実験を行ったところ、ピーク強度が同一であっても、粒子径により細胞核内導入効率が異なった。この結果から、細胞内における相互作用領域を変化させ、異なる効果を得られるのではないかと期待している。

5. おわりに

微粒子へのフェムト秒レーザー照射により励起される光増強場を用いた加工について、その基礎から加工の特徴、光強度分布を求めるためのFDTD法について概説

Fig. 6 Estimated optical intensity under polystyrene microspheres of 3 μm (solid line) and 0.75 μm (dashed line) in diameters along the Z-axis under the spheres.

し、細胞プロセッシングへの応用および計算の報告事例を紹介した。ナノスケールの構造への光照射により生じる光増強およびその強度分布は計算により容易に求められる。熱影響層が極めて小さいフェムト秒レーザー加工では、計算により求められる光強度分布と相互作用領域は近い関係を示すものの、FDTD法は加工が開始される前段階までの光の挙動を求めるため、非線形相互作用は含まれていない。このため固体材料のレーザーアブレーションでは、特に深さ方向において、計算上の光増強場のアスペクト比と加工の深さに違いが生じる。最大光強度に加えその分布の違いを利用した研究はまだ端緒が開けたばかりであるものの、細胞操作および細胞内標的化だけでなく、透明材料も対象として今後の研究の展開が期待できる。

謝 辞

局在増強光に関して多大なるご助言を頂きました慶應義塾大学名誉教授小原 實先生に心より感謝いたします。また、研究を進めたNikolay Nedyalkov博士(ブルガリア科学アカデミー)、田中 悠人博士(現・トヨタ自動車株式会社)、三橋 龍樹氏(現・東京ガス株式会社)に感謝いたします。

本研究の一部は、科研費(26560263)の助成を受けて実施されました。

参考文献

- 1) B. N. Chichkov, C. Momma, S. Nolte, F. V. Alvensleben, and A. Tünnermann: Appl. Phys. A **63** (1996) 109.
- 2) 丸尾 昭二: Optonics **5** (2016) 132 (in Japanese).
- 3) T. Baldacchini edited: *Three-Dimensional Microfabrication using Two-Photon Polymerization* (Elsevier, Oxford, 2016).
- 4) K. König, I. Riemann, P. Fischer, and K. J. Halbhauer: Cell. Mol. Biol. **45** (1999) 195.
- 5) A. Vogel, J. Noack, G. Hüttman, and G. Paltauf: Appl. Phys. B **81**

- (2005) 1015.
- 6) Y. Tanaka, G. Obara, A. Zenidaka, N. N. Nedyalkov, M. Terakawa, and M. Obara: *Opt. Express* **18** (2010) 27226.
 - 7) M. Schomaker, J. Baumgart, A. Ngezahayo, J. Bullerdiek, I. Nolte, H. M. Escobar, H. Lubatschowski, and A. Heisterkamp: *Proc. SPIE* **7192** (2009) 71920U.
 - 8) D. Heinemann, M. Schomaker, S. Kallies, M. Schieck, R. Carlson, H. M. Escobar, T. Ripken, H. Meyer, and A. Heisterkamp: *PLoS ONE* **3** (2013) e58604.
 - 9) S. Kalies, T. Birr, D. Heinemann, M. Schomaker, T. Ripken, A. Heisterkamp, and H. Meyer: *J. Biophotonics* **7** (2014) 474.
 - 10) D. Heinemann, S. Kalies, M. Schomaker, W. Ertmer, H. Murua-Escobar, H. Meyer, and T. Ripken: *Nanotechnology* **24** (2014) 24501.
 - 11) J. Baumgart, L. Humbert, E. Boulais, R. Lachaine, J. Lebrun, and M. Meunier: *Biomaterials* **33** (2012) 2345.
 - 12) E. Bergeron, C. Boutopoulos, R. Martel, A. Torres, C. Rodriguez, J. Niskanen, J. Lebrun, F. M. Winnik, P. Sapienza, and M. Meunier: *Nanoscale* **7** (2015) 17836.
 - 13) C. Boutopoulos, E. Bergeron, and M. Meunier: *J. Biophotonics* **9** (2016) 26.
 - 14) S. Kalies, G. C. Antonopoulos, M. S. Rakoski, D. Heinemann, M. Schomaker, T. Ripken, and H. Meyer: *PLoS ONE* **10** (2015) e0124052.
 - 15) S. Kalies, S. Keil, S. Sender, S. C. Hammer, G. C. Antonopoulos, M. Schomaker, T. Ripken, H. M. Escobar, H. Meyer, and D. Heinemann: *J. Biomed. Opt.* **20** (2015) 115005.
 - 16) E. Boulais, R. Lachaine, A. Hatef, and M. Munier: *J. Photochem. Photobiol. C-Photochem. Rev.* **17** (2013) 26.
 - 17) E. Boulais, R. Lachaine, and M. Munier: *Nano Lett.* **12** (2012) 4763.
 - 18) R. Lachaine, E. Boulais, and M. Meunier: *ACS Photonics* **1** (2014) 331.
 - 19) M. Terakawa, Y. Tsunoi, and T. Mitsuhashi: *Int. J. Nanomed.* **7** (2012) 2653.
 - 20) T. Mitsuhashi and M. Terakawa: *J. Biomed. Opt.* **19** (2014) 015003.
 - 21) A. Ishii, K. Ariyasu, T. Mitsuhashi, D. Heinemann, A. Heisterkamp, and M. Terakawa: *J. Biomed. Opt.* **21** (2016) 055001.