

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21130

研究課題名（和文）生体内駆動マイクロマシンの実現のための基礎技術開発

研究課題名（英文）Developments of basic technologies for realizing in vivo micro-machines

研究代表者

藤田 克昌（Fujita, Katsumasa）

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80362664

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体内で駆動可能なマイクロマシンの開発にするための微細構造造形技術、およびその機械的な駆動技術に関する研究を行った。微細構造造形法として、重合開始剤を用いない2光子光重合造形法を開発し、実際に生体適合性をもつ材料を用いて微細な立体構造が造形可能であることを確認した。重合による材料の特性変化の把握のため、分子構造の変化、力学特性の変化、生体適合性の変化を実験的に確認した。微細構造の駆動方法としては、音波により振動を付加し、構造の形状に依存した機械的特性を利用した駆動方法を考案した。異なる形状の微細構造は、異なる周波数依存性を示し、音波により微細構造の運動を制御できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、光重合法により造形された微細構造を生体内で利用するための課題であった生体毒性の問題を、生体毒性を示す重合開始剤を用いない光造形法を開発することで、解決した。また、光重合前後における、生体材料の機械的、化学的的特性の変化を定量的に計測できる造形分析装置を新たに開発することで、光重合法により造形される微細構造の特性を詳細に理解することが可能となった。マイクロ領域ではマクロ領域の材料の力学特性をそのまま適用できないため、その場での特性評価技術の開発は今後のマイクロマシン技術の発展に貢献できる成果である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted research on microstructure modeling technology and its mechanical driving technology for the development of micro-machines that can be driven in vivo. As a microstructure modeling method, we developed a two-photon photopolymerization method that does not use polymerization initiators, and confirmed that microstructures can actually be formed using biocompatible materials. To understand the changes in material properties due to polymerization, changes in molecular structure, mechanical properties, and biocompatibility were experimentally confirmed. A driving method for the microstructures was developed using vibration added by sound waves and the mechanical properties dependent on the shape of the structure. Microstructures of different shapes showed different frequency dependence, indicating that the motion of microstructures can be controlled by sound waves.

研究分野：ナノフォトニクス

キーワード：光造形 2光子造形 マイクロマシン 生体適合性

## 1. 研究開始当初の背景

生体内において様々な活動を可能とするマイクロサイズの機械制御は、生体内の計測や機能制御などを実現する技術となり得る。その実現には、構築に用いる材料が、生体内に導入され、滞在するための安全性や、使用後の排出のための生分解性などの生体適合性を有している必要がある。また、生体内での機械駆動のためには、生体外から生体に害の無いようにエネルギーを供給する必要がある。生体内で駆動可能なマイクロマシンの実現には、これらの2つの条件を同時に満足させる必要があり、そのための方法論の構築や、それを実現する基礎技術の開発が必要となっている。

## 2. 研究の目的

生体内で制御可能なマイクロマシン開発のための基礎技術として、本研究では、生体内で利用可能な生体毒性の無い微細構造の造形技術、造形された微細構造の力学特性および化学的性質の評価法の開発、微細構造のリモート駆動技術の開発、の三つの目的を設定した。

生体内で利用可能な生体の毒性無い微細構造の造形技術の開発においては、造形された立体構造を生体内で使用する際において従来の光造形技術の問題であった、使用する重合開始剤に起因する生体毒性の問題を解決することを目的としている。

造形された微細構造の力学特性および化学的性質の評価法の開発においては、造形された構造体を使用するにあたり、造形物の力学特性(弾性率等)や化学的性質を把握しておく必要があるため、その評価法を新たに開発する。また、この力学特性の評価は、光造形において材料に光を照射する条件(強度、露光時間)の最適化にも利用できる。

微細構造のリモート駆動技術の開発では、生体内にある微細構造体に対してリモートかつ非侵襲的にエネルギーを供給し、機械的に微細構造体を駆動するための技術を開発する。

## 3. 研究の方法

生体内で利用可能な生体毒性無い微細構造の造形技術の開発では、生体毒性の強い重合開始剤を用いない光重合法を開発した。従来の光造形法においては、重合反応により硬化する光硬化性材料に対し、光を吸収し重合反応を誘起する重合開始剤を混合させたものが材料として利用されてきた。この光感受性をもつ重合開始剤は細胞毒性を持つことが知られており、従来の手法では、造形後にこの重合開始剤をいかに取り除くか、またその毒性をいかに低下させるかが課題であった。しかしながら、それらの手法によっても完全に毒性を除去することは困難であった。

そこで本研究では、重合開始剤を用いない光造形法を開発することにより、生体内へ導入しても毒性を示さない微細構造体の造形を試みた。開発した手法では、重合開始剤を添加していない光硬化性材料に対して、波長400nmのフェムト秒パルスレーザーを照射し、2光子吸収による硬化性材料(モノマー)への直接の光吸収を介して重合反応を誘起する。波長400nmの2光子吸収は、モノマーの有する二重結合や三重結合、またベンゼン環のような分子構造が示す光吸収であるため、モノマー自体が光を吸収する。このため、光感受性をもつ重合開始剤を添加することなく、光造形をおこなうことができる。

造形された微細構造の力学特性および化学的性質の評価法の開発では、パルス光を照射した材料の化学的、力学的性質を評価するために、光造形装置にラマン分光、光学系およびブリルアン分光光学系を組み込んだ、光学システムを構築した。上記1)に示した2光子重合光学系に、波長532nmの連続発振レーザーを組み込み、材料中の光重合させた箇所と同じ箇所を照明できるよう調節した。材料から発せられたラマン散乱光、およびブリルアン散乱光は、それぞれ回折格子を用いた分光光学系、およびVIPA (Virtually Imaged Phased Array)分散素子による分光光学系に導入され、ラマン分光スペクトル、ブリルアン分光スペクトルの測定が可能な光学系を構築した。ラマン分光スペクトルにより光照射前後の分子構造の変化を計測し、光重合度の評価を実施した。一方、ブリルアン分光スペクトルからは、ブリルアン散乱ピークから材料の縦弾性率を測定した。これらのふたつの分光光学系を組み合わせることで、光重合を生じた材料の特定変化を、その場で、正確に計測することが可能となる。

さらに、重合させた材料の化学的・物理的性質の評価としては、材料の物性変化を確認するため、水吸収性が光照射の前後でどのように変化するかを確認した。また、タンパク質等の生体分子としての特性保持の評価には、光重合後に酵素反応が生じるかどうかにより判断した。

微細構造のリモート駆動技術の開発においては、微細構造体をリモートに駆動する機構として、音響波による振動により造形した立体構造を機械的に変形させる手法を考案した。片持ち梁

のような振動可能な構造を有する立体構造を光造形法により構築し、それに対して圧電素子により発生させた振動を与えることで、構造体の形状変化を生じさせた。構造体の形状変化は、高速カメラにより動画を撮像し、動画の画像をもとに与えられた振動の周波数と、形状変化の周波数が一致するかを確認した。また、異なるパラメータをもつ片持ち梁形状の微細構造を造形し、与える振動の周波数に対して異なる運動を示すことを確認した。

#### 4. 研究成果

生体内で利用可能な生体毒性無い微細構造の造形技術の開発の研究成果を以下に示す。波長 800nm のフェムト秒パルスレーザー光 (パルス幅 80fs、繰り返し周波数 80MHz) の出力光を BBO 結晶に導入した際に生じる波長 400nm の第 2 高調波を、光重合のためのパルスレーザー光として用いた。対物レンズを用いてこのレーザー光を光硬化性材料に照射し、レーザー集光点の材料の硬化を試みた。硬化させるレーザー集光点を走査させながら露光することで、走査の経路における材料を硬化させ、立体構造を造形することが可能となる。レーザー集光点の 3 次元的な走査は、xy 走査ステージによる試料の移動、および z 走査デバイスによる対物レンズの移動によりおこなった。

図 1 に、生体適合性をもつ PEG-DA (図 1 a) を用いて造形した立体微細構造の例を示す。ウッドパイル状の立体構造を造形し、未硬化の部位を洗い流した後、電子顕微鏡で観察した。約 100nm の微細構造をもつ 3 次元的な立体構造が作製可能であることが確認された。また、図 2 a は Type-I コラーゲンに波長 400nm のパルス光を照射して構築した立体構造を示す。コラーゲンを材料に用いた場合は、重合後の強度が低かったため、コラーゲンゲル内に構造体を保持したまま蛍光顕微鏡により観察した。重合したコラーゲンが生じる自家蛍光を利用することで、ゲル中に構造体を保持したまま観察できることを見いだした。ひとつのレーザー集光点で硬化させたコラーゲンを蛍光顕微鏡で観察したところ、その Voxel の大きさは面内方向に約 340nm、光軸方向に約 610nm であり、少なくとも 1 $\mu$ m 以下の空間分解能で造形が可能であることが示された (図 2 b)

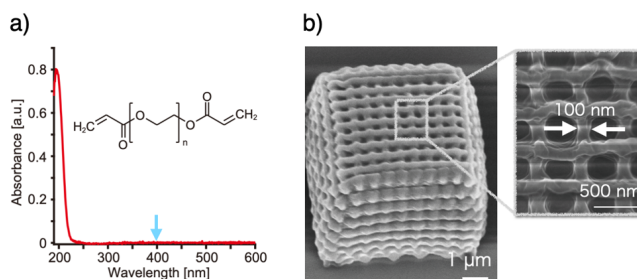


図 1 a) PEG-DA の構造と吸収スペクトル。b) PEG-DA の光重合により造形した立体構造 (電子顕微鏡像)。

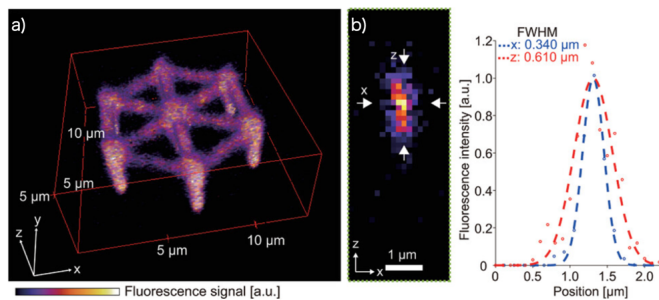


図 2 a) コラーゲンの光重合に造形した立体構造 (重合後のコラーゲンの自家蛍光により観察)。b) ひとつのレーザー集光点により重合させたコラーゲンとその空間プロファイル。

次に、造形された微細構造の力学特性および化学的性質の評価法の開発の研究成果を示す。図 3 に、波長 400nm のパルスレーザー光を異なる強度で照射し重合させた PEG-DA の明視野像、およびその場で計測したラマン散乱スペクトルを示す。NA1.45 の対物レンズによりレーザー光を 99-708  $\text{kW}/\text{cm}^2$  の強度で照射したところ、436  $\text{kW}/\text{cm}^2$  以上の強度で光重合が明視野像より確認された。それぞれの光強度を照射した部位のラマン散乱スペクトルを確認したところ、この強度以上では、炭素-炭素間および炭素-酸素間の二重結合が減少し、炭素-炭単結合が増加することが確認された。これは、PEG-DA 分子の有する二重結合が紫外光の 2 光子吸収により解離し、それらが他の分子の炭素と結合したことを示唆している。ラマン散乱スペクトルは、493  $\text{kW}/\text{cm}^2$  以上の強度で変化していないことから、500  $\text{kW}/\text{cm}^2$  程度の照射により最大の重合度が得られていると考えられる。明視野像で確認した重合の様子とラマン散乱スペクトルの変化に強い相関が見られており、ラマン散乱スペクトルから重合度を定量的に評価できることが示された。また重合後の PEG-DA の物性評価として吸水による膨潤特性の比較を行った結果、550  $\text{kW}/\text{cm}^2$  以上では、水の吸収による膨脹度が変化しなかったところから、ラマン分光法で計測される重合度の変化と膨潤特性が示す物性変化とも強い相関が得られることを確認できた。

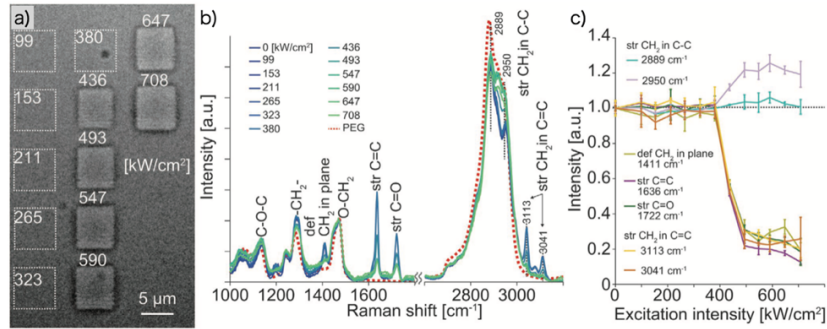


図3 強度を変化させながら重合したPEG-DAの明視野像とラマン散乱スペクトル。

同様に作製したPEG-DA重合体の同一箇所のブリルアン散乱スペクトル、およびラマン散乱スペクトルを図4aに示す。この結果では、ラマン散乱スペクトルの変化が重合による分子構造の変化を示しており、それにもなう材料の縦弾性係数の変化がブリルアン分光により計測されている。その変化を纏めたものが図4b-eであり、ブリルアン散乱ピークの変化と、ラマン散乱スペクトルの変化に強い相関が確認された。各信号の変化の飽和点は一致していることから、最大の重合度が得られた際に、弾性係数の変化も最大になることが示された。この結果から、造形した微細構造の重合度に依存した力学特性の変化を定量的に評価できること、また、それはラマン散乱スペクトルの変化によっても評価できることが示された。

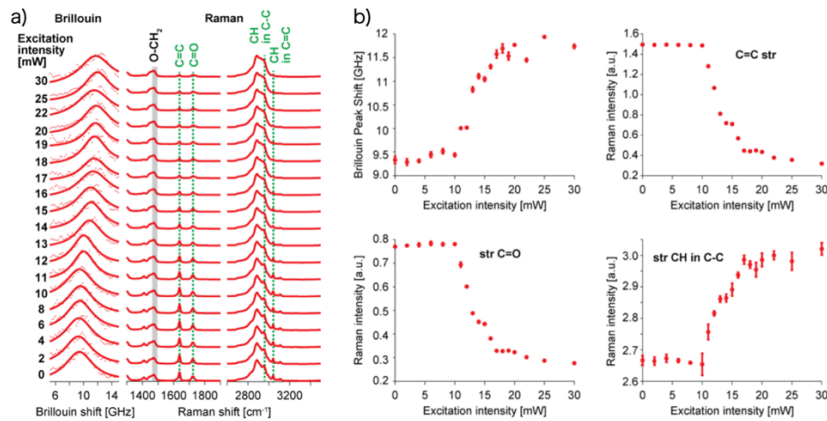


図4 光強度を変化させながら重合したPEG-DAのa)ブリルアン散乱およびラマン散乱スペクトル、およびb)各ピークの光強度依存性。

光重合させたコラーゲンにおいても、ラマン分光スペクトルを用いて、分子構造の変化の把握を試みた。図5に、異なる強度で重合させたコラーゲンの明視野像、およびラマン散乱スペクトルを示す。ラマン分光法の結果では、照射する光強度を大きくすると背景光が増大することが確認できた。これは、コラーゲンの重合により自家蛍光が増大しており、これはコラーゲンに含まれるチロシンの構造変化によりもたらされていると解釈できる。また、カルボキシ基の炭素-酸素間2重構造に由来すると考えられるラマン散乱ピーク強度がレーザー光強度と共に増加しており、断裂したペプチドの再重合が重合に関与していることが示唆された。

コラーゲンのタンパク質2次構造への光重合の影響を確認するため、光強度を変化させながら重合させたコラーゲンにコラーゲン分解酵素であるコラゲナーゼを付加した。コラゲナーゼによる分解が生じれば、コラーゲン本来のタンパク質構造を保持していると考えられる。450 kW/cm²以上で重合させたコラーゲンにおいては分解反応が見られず、タンパク質が大きく変性してしまっていることが示唆された。この結果から、タンパク質としての特性を保持したまま光重合を生じさせることに必要な露光条件を求めることができた。

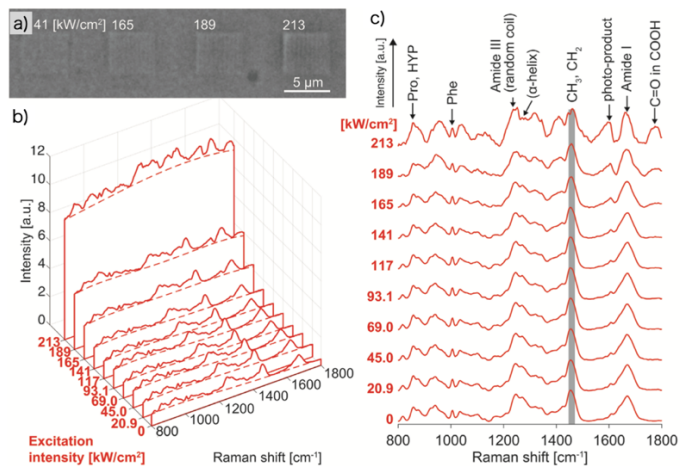


図5 光重合させたコラーゲンのa)明視野像、およびb, c)発光スペクトル。



また、重合させた材料への細胞毒性の確認のため、PEG-DA および Type-I コラーゲンを混合した材料を光重合させた。ここでは、構造の強度と細胞接着性のバランスをとるため、混合材料を用いた。作製した微細構造上に細胞を培養したところ、構造上での通常通りに細胞が成長、分裂をしており、用いた材料による毒性は特に確認されなかった。また、細胞接着性を示さない牛血清アルブミンを用いて同様の実験を行ったところ、細胞は基板上に接着をせず、スフェロイド状の細胞塊が形成された。これらの結果から、開発した手法により作製した微細構造は細胞毒性を示すことは確認出来ず、また細胞接着性に関するタンパク質の性質を保持したまま微細構造を構築可能であることが示された。

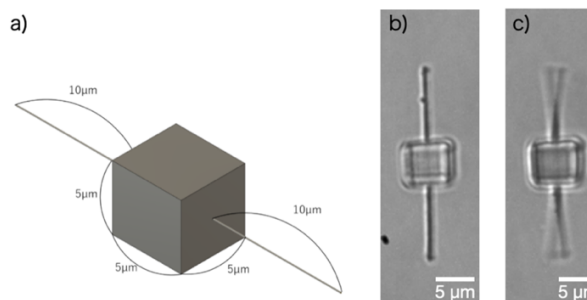


図6 a) 光重合で構築した片持ち梁構造のデザイン、および b) 明視野観察像。c) 片持ち梁構造が振動している様子。

最後に、光重合により構築した微細構造の運動を音響波により制御する技術について検討した結果を示す。図6 a, b)は、光重合開始剤を含まないアクリレート系樹脂に上述の波長 400nm のパルスレーザー光を照射して構築した、2つの片持ち梁をもつ微細構造である。この構造に対し、圧電素子を用いて発生させた音響波 (1-10kHz) を付加し、その振動を明視野顕微鏡で観察した様子を図6 c)に示した。明視野像により振動を確認した後、音響波の振動数を変化させながら、高速カメラを用いて20000 フレーム/秒の撮像速度で観察し、運動の周波数を測定した。その結果、構築した微細構造は与えられた音響波の振動数と同じ振動数で振動していること、またその振幅も振動数により変化することが確認された (図7 a)。

微細構造の形状に依存した運動特性の変化の確認のため、図6 に比べて2倍の太さの片持ち梁構造を作製し、上記と同様の方法で、その運動の振動数依存を撮像したが、与えた音波に強く関連した運動は確認できなかった (図7 b)。

上記の実験結果により、光重合により造形した3次元構造の運動を、外部から与えられた音響波により制御できる可能性が示された。微細構造のデザインとその運動の振動特性を把握することで、音波で制御可能なマイクロマシンが構築できる可能性が示唆された。

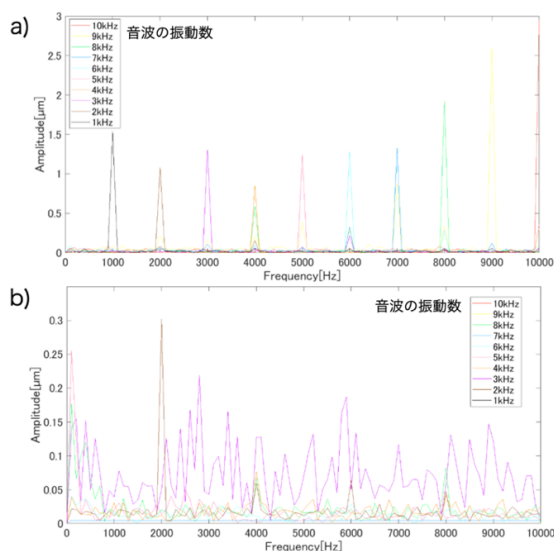


図7 音響波の振動数と微細構造の振動の周波数の関係。太さが a) 1 µm 程度、b) 2 µm 程度の片持ち梁構造による結果。

上記の研究成果においては、生体内で駆動可能なマイクロマシンの造形に利用できる、低細胞毒性の生体適合材料を用いた微細構造物の造形法の確立、またその造形物のその場での評価方法の確立に新たに成功しており、光微細造形の応用範囲をバイオ分野に拡大するインパクトの高い研究成果が得られた。これらの技術はこの研究により初めて示されたものである。マイクロマシンとの駆動方法としての超音波の利用についてもその可能性が示され、立体微細構造の形状や使用材料の最適化により、より複雑な運動を示す構造体の構築も可能であることが示唆された。細胞毒性の低い光造形法の開発に関しては、マイクロマシンへの応用以外にも、細胞形状の制御や、再生医療に利用される生体組織構築にも活用できるため、今後幅広い分野に貢献する光造形技術の実現に向けた基礎研究成果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Atsushi Nakayama, Yasuaki Kumamoto, Masafumi Minoshima, Kazuya Kikuchi, Atsushi Taguchi, and Katsumasa Fujita	4. 巻 10
2. 論文標題 Photoinitiator-Free Two-Photon Polymerization of Biocompatible Materials for 3D Micro/Nanofabrication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Optical Materials	6. 最初と最後の頁 2200474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adom.202200474	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teng Li, Jie Liu, Min Guo, Fan-Chun Bin, Jian-Yu Wang, Atsushi Nakayama, Wei-Cai Zhang, Feng Jin, Xian-Zi Dong, Katsumasa Fujita, Mei-Ling Zheng	4. 巻 -
2. 論文標題 Synthesis of biocompatible BSA-GMA and two-photon polymerization of 3D hydrogels with free radical type I photoinitiator	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Bioprinting	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18063/ijb.752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中山篤志, 熊本康昭, 田口敦清, 藤田克昌
2. 発表標題 可視光 2 光子励起による添加剤不要の 3 次元マイクロナノ造形
3. 学会等名 電気学会 光・量子デバイス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Nakayama, Yasuaki Kumamoto, Atsushi Taguchi, Katsumasa Fujita
2. 発表標題 Photoinitiator-free micro/nano fabrication of biomaterials with nonlinear deep UV excitation
3. 学会等名 SPIE Photonics West 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katsumasa Fujita
2. 発表標題 Photo-initiator free two-photon polymerization using nonlinear deep-UV excitation
3. 学会等名 SPIE Optics + Photonics 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田克昌
2. 発表標題 高次非線形な光学応答の誘起と超解像イメージングへの利用
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田克昌
2. 発表標題 表面増強ラマン散乱を用いた細胞内ケミカルイメージング
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田克昌
2. 発表標題 自発ラマン顕微鏡
3. 学会等名 日本分光学会 秋期セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Nakayama, Yasuaki Kumamoto, Menglu Li, Teng Li, Meiling Zheng, Katsumasa Fujita
2. 発表標題 Photoinitiator-free two-photon polymerization for 3D cell-scaffold fabrication
3. 学会等名 SPIE Photonics West 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田克昌
2. 発表標題 可視光フェムト秒レーザーを用いた顕微観察および造形技術の開発
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第42回年次大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>ナノフォトニクス領域、大阪大学 大学院工学研究科 物理学系専攻  <a href="https://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/home_j.html">https://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/home_j.html</a></p>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
中国	中国科学院			