

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26702019

研究課題名(和文)超高速ミー散乱増強光の多光子過程による再生医療用薬剤放出技術の研究

研究課題名(英文)Molecular release for tissue engineering based on ultrafast Mie scattered light

研究代表者

寺川 光洋(Terakawa, Mitsuhiro)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授

研究者番号：60580090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、再生医療用足場への応用に向け、超高速ミー散乱増強光を用いて近赤外光照射による薬剤放出制御技術を創出することを目的とした。ゲスト分子内包カプセルの作製、フェムト秒レーザー照射をトリガーとする内包分子放出の実験実証、生分解性ポリマーの分解速度変化および相互作用物理探索を目的とした分析、三次元足場を想定した蛍光分子内包カプセルを含有した三次元構造の作製、そして、三次元構造へのレーザー照射により蛍光分子放出が増大することを実証した。以上より、生体組織への透過性が高い近赤外光の多光子過程を利用した内包分子放出方法を実現した。

研究成果の概要(英文)：Stimuli-responsible controlled release of molecules was investigated by using near-infrared light toward the realization of efficient scaffold in tissue engineering. The method investigated was based on the ultrafast phenomena of intense Mie scattered light. Fabrication of guest-molecule-embedded capsules, experimental demonstration of femtosecond laser pulse-triggered molecular release, investigation on biodegradability of the polymers, fabrication of 3D structures as well as demonstration of molecular release were carried out. In summary, demonstration of molecular release via multi-photon process of near-infrared light was achieved.

研究分野：レーザープロセッシング

キーワード：フェムト秒レーザー ドラッグデリバリー 生分解性ポリマー レーザー医工学

1. 研究開始当初の背景

再生医療において効率の高い細胞組織構築および組織再生は重要な技術的課題である。例えば気管・血管・心筋組織・皮膚など軟組織欠損の修復において、足場(スキャフォールド)と自家細胞・組織からなる移植用組織を迅速に構築できれば、大幅な治療効果の向上と完治までの時間短縮が期待できる。足場表面の細胞接着・増殖・分化の促進には、必要な時に必要な場所にサイトカイン・遺伝子等の薬剤を送達する技術が必要不可欠である。組織・細胞の要求に応じた時間に、外部刺激により薬剤の放出出来れば、細胞組織構築・組織再生の速度および質は飛躍的に向上する。

生分解性ポリマーに含有もしくは内包した薬剤の放出は、熱、pH 変化、超音波、光を外部トリガーとして利用する研究が進められている。それらの中で光刺激による方法は、作用部位の標的化・制御性が高く、また、光ファイバを用いた経内視鏡的・経カテーテル的適用が容易である。生体組織への透過性が高い近赤外光を外部刺激として、安全に生分解性ポリマーから薬剤を放出するコア技術が実現できれば、高効率の組織再生・構築が達成できる。

研究代表者は研究開始当初までに、誘電体微小構造に近赤外波長の非集光フェムト秒レーザーを照射すると、超高速ミーム散乱増強光がナノスケールで局在し、局在増強光を得るためのナノ構造自体が増強光と非線形相互作用することを発見した。具体的事例として、中空ポリマーカプセルに波長 800 nm のフェムト秒レーザーを照射すると、カプセルが入射光を局在・増強し、その外殻に小孔が形成された。この申請者の技術を外部刺激応答薬剤放出システムに展開させるためには、レーザー光をトリガーとする薬剤放出を実験実証すること、フェムト秒レーザーと生分解性ポリマーの相互作用を明らかにすること、薬剤内包カプセルを含有する足場構造を作製することが課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、再生医療用足場への応用に向け、超高速ミーム散乱増強光を用いて近赤外光照射による薬剤放出制御技術を創出することを目的とした。具体的には、生分解性ポリマーカプセルに薬剤を内包してレーザー光をトリガーとする放出技術を実験実証し、さらに、当該技術を活用して薬剤放出機能を備えた三次元構造を作製した。生体組織への透過性が高い近赤外光の多光子吸収過程を用いた薬剤放出を実現することで、細胞組織構築、組織再生、および埋め込み型薬剤放出デバイスの革新的基盤技術の創出、再生医療、生命科学、バイオフォトニクス、および最終目標の患者の QOL 向上に貢献する。

3. 研究の方法

(1) フェムト秒レーザー照射をトリガーとする薬剤放出の実験実証を目的とした実験を行った。蛍光分子(ゲスト分子)を内包した乳酸・グリコール酸共重合体 (poly(lactic-co-glycolic acid, PLGA)カプセルを作製した。作製には、同軸二重管を使用したエマルジョン法を用いた。ガラスベースディッシュに作製したカプセルを散布し、近赤外のフェムト秒レーザーパルス照射した。フェムト秒レーザー照射直後のバーストリリースだけでなく、レーザー照射後数時間の徐放の評価も行った。

(2) 生分解性ポリマーの分解速度はポリマーの結晶化度および表面構造により変化する。フェムト秒レーザーとポリマーの相互作用を評価するために、レーザー照射後の結晶化度評価を X 線光電子分光(XPS)およびフーリエ変換赤外分光法(FTIR)により行った。また、カプセルの形状変化を走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。分解速度の変化は、デジタルマイクロスコープによる加工形状の観察ならびに質量変化の評価により行った。

(3) 足場を想定した薬剤放出機能を備えた三次元構造を作製するため、蛍光分子内包カプセルをゼラチン内に分散し、ゼラチンを重合することで構造を作製した。作製した三次元構造にフェムト秒レーザーパルス照射し、放出された蛍光分子を測定した。

4. 研究成果

図1に蛍光分子を内包したPLGAカプセル作製の概略図を示す。同軸二重管を使用し、外側のノズルに PLGA を、内側のノズルに FITC-dextran を流した。ノズルを超音波により振動させることで液滴を作製した。この方法により、直径 10 - 80 μm の蛍光分子内包 PLGA マイクロカプセルの作製が可能となった。

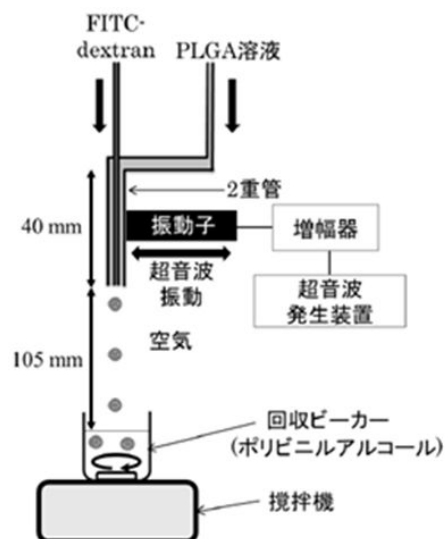


図1 蛍光分子内包カプセル作製装置概要

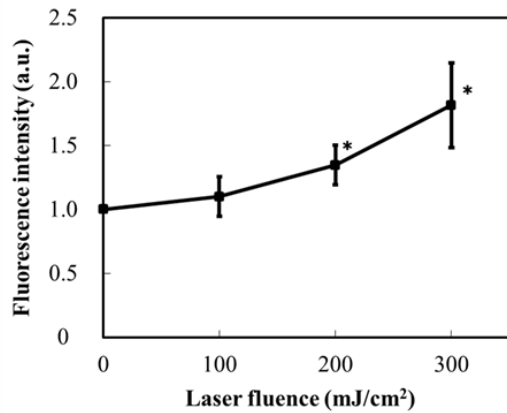


図2 放出された蛍光分子とレーザーフルエンスの関係

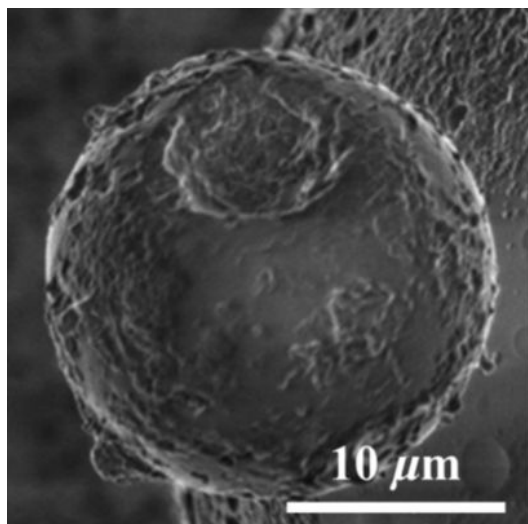


図3 レーザー照射後のPLGAカプセルの電子顕微鏡画像

内包分子放出の実験では、ガラスベースディッシュ内の蒸留水に PLGA カプセルを散布し、フェムト秒レーザーパルスを走査しながら照射した。照射後、周囲の蒸留水に放出された蛍光分子量の測定を行った。図2にレーザー照射によって PLGA カプセルから放出された分子由来の蛍光強度を示す。非照射カプセルと比較して、レーザー照射を行った条件ではカプセル周囲に放出された蛍光分子が多いことが分かる。光学顕微鏡により観察できる PLGA カプセルの残存数は、レーザー照射によって大幅に減少するため、PLGA カプセルの顕著な破壊が生じて内包分子が放出されたと考えられる。残存したカプセルにおいては、図3のように表面形状が変化した。近赤外のレーザー照射時に生分解性ポリマーカプセルから薬剤放出を行うバースト放出が可能であることを実証したことに加え、PLGA 殻の改質による徐放の可能性も示唆された。

カプセルに用いている PLGA の生分解性

が変化すると、蛍光分子内包カプセルの残存時間、すなわち内包分子が放出されるまでの時間は大きく変化する。フェムト秒レーザーと生分解性ポリマーの相互作用を調べるため、レーザー照射後の PLGA の生分解性を詳細に調べた。図4に、フェムト秒レーザーの中心波長 800 nm にて作製した加工痕(a)および中心波長 400 nm にて作製した加工痕(b)の顕微鏡画像を示す。レーザー照射直後の加工痕が同程度の直径となるよう、レーザーフルエンスを調整した。波長 800 nm によるレーザー加工痕は 48 時間浸漬後も大きさの顕著な変化は観察されなかった。一方で、波長 400 nm によるレーザー加工痕は、照射 12 時間後から加工痕直径の拡大が見られた。すなわち、生分解が速いことを示している。XPS および FTIR の結果から、化学結合の切断による分子量の低下が生分解性の違いに影響を与えていることが示唆された。

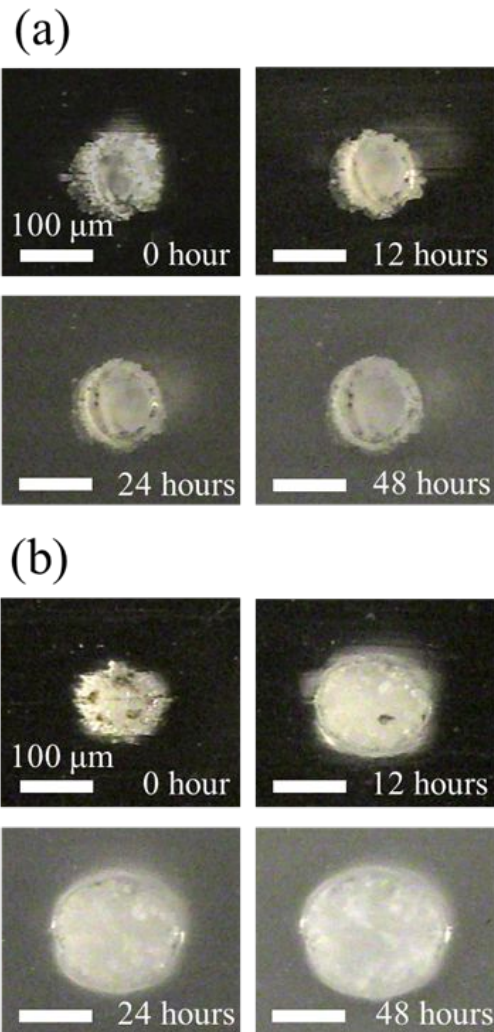


図4 フェムト秒レーザー照射により作製した加工痕。PBS 中に 0、12、24、48 時間浸漬後の顕微鏡画像。(a) 800 nm、1.0 J/cm²、15000 パルス、(b) 400 nm、0.15 J/cm²、15000 パルス

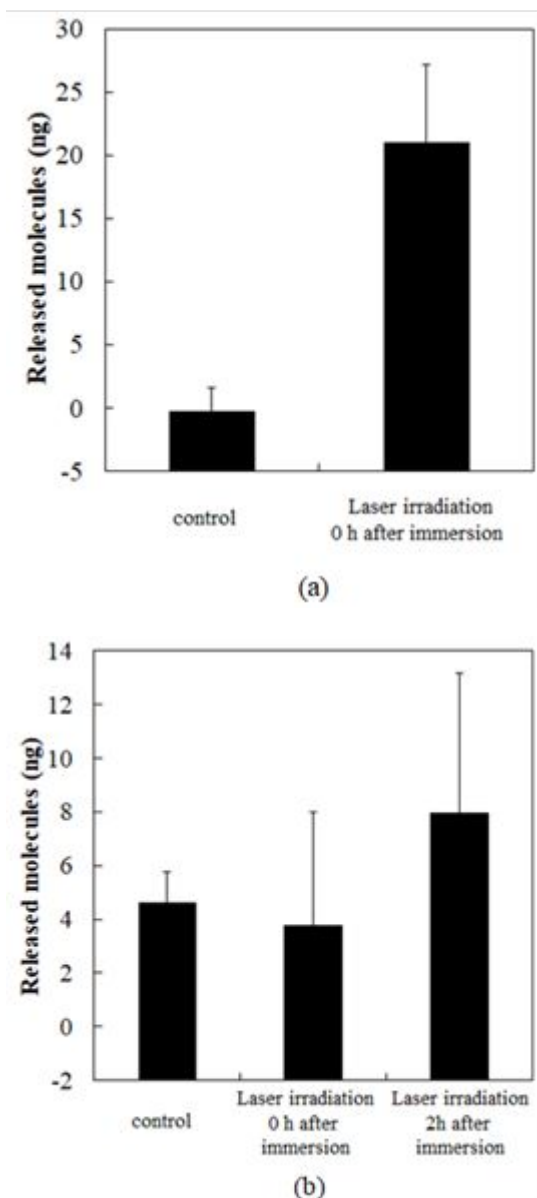


図5 PLGA カプセル含有ゼラチンから放出され蛍光分子量。(a) 上澄み液を加えた直後にレーザーを照射し、1時間経過した後に回収した蛍光分子放出量。(b) 上澄み液を加えて3時間経過後の蛍光分子放出量。いずれもcontrolはレーザー未照射の条件を示す。

薬剤放出機能を備えた足場構造作製に向けて、蛍光分子内包 PLGA カプセルをゼラチンに含有させてゼラチンを重合した。このゼラチンにフェムト秒レーザーパルスを照射し、一定時間毎に PLGA カプセル含有ゼラチンから放出された蛍光分子を含む上澄みの溶液を回収して蛍光光度を測定することで放出された蛍光分子量を評価した。図5に、上澄み液を加えた直後にレーザーを照射し、1時間経過した後に回収した蛍光分子放出量(図5a)ならびにレーザー照射の時間を変化させ、上澄み液を加えて3時間経過後の蛍光分子放出量(図5b)を示す。レーザー照射直後から1時間後までに放出された蛍光分子量は、レーザー照射をしていない条件と比較して

高い値を示した。さらに、レーザー照射のタイミングによって、薬剤放出が開始される時間が変化することが示された。以上より、レーザーをトリガーとした三次元構造からの蛍光分子放出が実験実証された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計12件)

Taiga Umemoto, Mitsuhiro Terakawa, "Femtosecond laser-triggered molecular release from biodegradable polymer microcapsules incorporated in gelatin hydrogel," *Proceedings of SPIE*, 査読無, 10522, 1052203/1-5 (2018). DOI: 10.1117/12.2287651

Akimichi Shibata, Manan Machida, Naonari Kondo, Mitsuhiro Terakawa, "Biodegradability of poly(lactic-co-glycolic acid) and poly(L-lactic acid) after deep-ultraviolet femtosecond and nanosecond laser irradiation," *Applied Physics A*, 査読有, 123, 438/1-7 (2017). DOI: 10.1007/s00339-017-1055-6

寺川光洋, "バイオ・ソフトマテリアルのフェムト秒レーザー加工," *OPTRONICS*, 査読無, Vol. 36, 149-153 (2017).

Taiga Umemoto, Akimichi Shibata, Mitsuhiro Terakawa, "Femtosecond laser irradiation of the fluorescent molecules-loaded poly(lactic-co-glycolic acid)," *Applied Surface Science*, 査読有, 417, 165-169 (2017).

DOI:10.1016/j.apsusc.2017.02.145

Akimichi Shibata, Shuhei Yada, Naonari Kondo, Mitsuhiro Terakawa, "Acceleration of biodegradation by ultraviolet femtosecond laser irradiation to biodegradable polymer," *Proceedings of SPIE*, 査読無, 10094, 10941T/1-6 (2017). DOI: 10.1117/12.2250028

Akimichi Shibata, Shuhei Yada, Mitsuhiro Terakawa, "Biodegradability of poly(lactic-co-glycolic acid) after femtosecond laser irradiation," *Scientific Reports*, 査読有, 6, 27784/1-9 (2016). DOI: 10.1038/srep27884

Kazumasa Ariyasu, Atsuhiko Ishii, Taiga Umemoto, Mitsuhiro Terakawa, "Laser-triggered release of encapsulated molecules from polylactic-co-glycolic acid microcapsules," *Journal of Biomedical Optics*, 査読有, 21, 085003/1-7 (2016). DOI: 10.1117/1.JBO.21.8.085003

寺川光洋, 矢田周平, "生分解性ポリマーのレーザープロセッシングとそのバイオ・メディカル応用," *電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌)*, 査読有, 135,

1043-1048 (2015).

DOI: 10.1541/ieejieiss.135.1043

Shuhei Yada, Mitsuhiro Terakawa, "Femtosecond laser induced periodic surface structure on poly-L-lactic acid," Optics Express, 査読有, 23, 5694-5703 (2015).

DOI: 10.1364/OE.23.005694

Shuhei Yada, Mitsuhiro Terakawa, "Optical and thermal properties in ultrafast laser surface nanostructuring on biodegradable polymer," Proceedings of SPIE, 査読無, 9355, 935503/1-7 (2015).

DOI: 10.1117/12.2080483

寺川光洋, "フェムト秒レーザーを用いた生分解性ポリマーの微細加工," O plus E, 査読無, 第 37 巻, 第 2 号, pp. 115-118 (2015).

寺川光洋, 三橋龍樹, 有安和優, "フェムト秒レーザーと微粒子を利用したドラッグデリバリー," レーザ加工学会誌, 査読有, 第 21 巻, 第 3 号, pp. 24-29 (2014).

[学会発表] (計 29 件)

(招待講演) 寺川光洋, 柴田明道, 近藤直柔, 石井敦浩, Dag Heinemann, "超短パルスレーザーによる生体材料の微細加工," レーザ学会学術講演会第 38 回年次大会, 2018 年 1 月, 京都市勧業館みやこめっせ (京都市)

(招待講演) Mitsuhiro Terakawa, Akimichi Shibata, Manan Machida, Yasutaka Nakajima, "Subtractive and additive processing of biocompatible materials using femtosecond laser," The 25th International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT'17), 2017 年 9 月, 釜山 (韓国)

(招待講演) Mitsuhiro Terakawa, "Ultrafast laser processing of biomaterials," European Materials Research Society (E-MRS) Spring Meeting 2017, 2017 年 5 月, ストラスブル (フランス)

(招待講演) Mitsuhiro Terakawa, "Subtractive and additive processing of biomaterials using femtosecond laser," International Congress on Applications on Lasers & Electro-Optics (ICALEO) 2016, 2016 年 10 月, サンディエゴ (米国)

(招待講演) Mitsuhiro Terakawa, Akimichi Shibata, Shuhei Yada, Manan Machida, Maria Leilani Torres-Mapa, Dag Heinemann, Alexander Heisterkamp, "Femtosecond laser-based subtractive and additive processing for bioapplications" 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会 JSAP-OSA

Joint Symposia, 2016 年 9 月, 朱鷺メッセ (新潟県新潟市)

(招待講演) Mitsuhiro Terakawa, Shuhei Yada, Akimichi Shibata, "Femtosecond laser surface nanoprocessing of biodegradable polymers," European Materials Research Society (E-MRS) Spring Meeting 2015, 2015 年 5 月, リール (フランス)

(招待講演) Mitsuhiro Terakawa, Yasutaka Nakajima, Akihiro Takami, Shuhei Yada, Akimichi Shibata, Nikolay Nedyalkov, "Ultrafast laser-induced scattered far-field for fabrication of nanostructures," 17th International Conference on Transparent Optical Networks (ICTON2015), 2015 年 7 月, ブダペスト (ハンガリー)

(招待講演) Mitsuhiro Terakawa, "Femtosecond laser nanoablation of biodegradable polymer," Advanced Laser Technologies'14, 2014 年 10 月, カシ (フランス)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺川 光洋 (TERAKAWA, Mitsuhiro)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号: 60580090