

細胞伸展制御のためのフェムト秒レーザー照射による周期的微細構造形成

大阪大学接合科学研究所

名古屋大学未来材料・システム研究所

東京医科歯科大学学生体材料工学研究所

○塚本 雅裕、篠永 東吾、河 拓弥

黒田 健介

陳 鵬、永井 亜希子、塙 隆夫

Femtosecond laser formed periodic nanostructures for control of cell elongation

by ○Masahiro Tsukamoto, Togo Shinonaga, Takuya Kawa, Kensuke Kuroda, Peng Chen, Akiko Nagai and Takao Hanawa

1. 研究目的

チタン (Ti) は生体材料として広く用いられている金属材料の一種である。我々は Ti 系材料表面への新機能付加を目的とし、材料表面への周期的微細構造形成による細胞伸展制御に関する研究を進めている。周期的微細構造形成にはフェムト秒レーザーの照射が有効な手段の一つである。フェムト秒レーザーを照射することにより形成した周期的微細構造の周期及び溝の方向はレーザー波長及びレーザーの偏光によってそれぞれ制御することができる。これまでの研究において、エアロゾルビームを照射することにより形成した酸化チタン (TiO₂) 膜に対してフェムト秒レーザーの基本波 (波長 775 nm) を照射することで、周期 230 nm の周期的微細構造が形成可能であることを明らかにしてきた。骨芽細胞を用いた細胞培養試験の結果、細胞が周期的微細構造の溝に沿って伸展している箇所が確認できた。本年度は、昨年度に引き続き、Ti に対する周期的微細構造形成による細胞伸展制御に関する研究を行なった。本研究では、レーザー波長によって周期を変化させ、細胞伸展制御に適した周期の領域を調べた。

2 研究成果

本実験で用いたフェムト秒レーザーの波長、パルス幅及び繰り返し周波数はそれぞれ 775 nm、150 fs 及び 1 kHz である。レーザービームは集光レンズを用いて Ti 基板表面に集光照射し、ステージを掃引することで周期的微細構造形成領域を作成した。レーザーの波長は波長変換器を用いて変化させた。レーザー照射後の Ti 基板表面は走査型電子顕微鏡 (SEM) 及び原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて観察した。細胞培養試験後の試料は 8%パラホルムアルデヒドを用いて固定した後、アクチンや核などを免疫染色した。細胞培養試験後の細胞伸展の様子は、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。細胞培養試験にはヒト骨芽細胞 (MG-63) を用いた。

波長 775、388 及び 258 nm で照射した後の Ti 基板表面及びレーザーを照射していない Ti 基板表面の SEM 観察像を Fig.1(a)、(b)、(c)及び(d)にそれぞれ示した。Fig.1中の *E* はレーザーの偏光を示している。Fig.1(a)、(b)及び(c)に示すようにフェムト秒レーザーを照射することでレーザーの偏光 *E* に対して垂直な方向に溝を有する周期的微細構造が Ti 基板表面にそれぞれ形成された。しかしながら、Fig.1(d)に示すように、レーザーを照射していない領域では微細構造は観測されなかった。周期を観測するため、AFM により Ti 基板表面を測定した結果を Fig.2 に示す。Fig.2(a)、(b)及び(c)に波長 775、388 及び 258 nm においてレーザー照射し、形成された周期的微細構造の AFM 観察像、Fig.2 (d)にレーザーを照射していない領域の AFM 観察像を示している。Fig.2(a)、(b)及び(c)から、形成された周

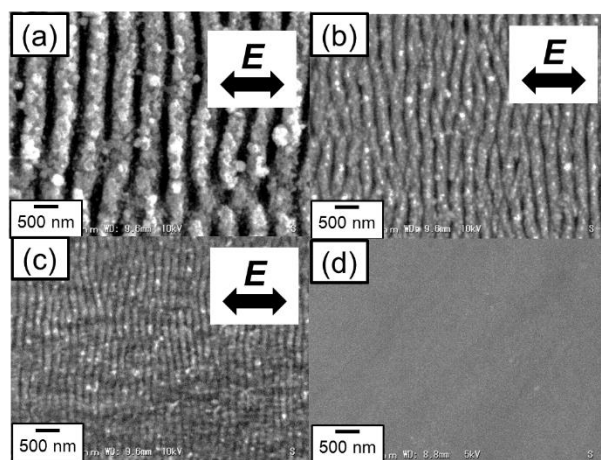


Fig.1 Ti 基板表面 SEM 観察像：(a)波長 775 nm、(b)波長 388 nm 及び(c)波長 258 nm でレーザー照射後、(d)レーザー未照射

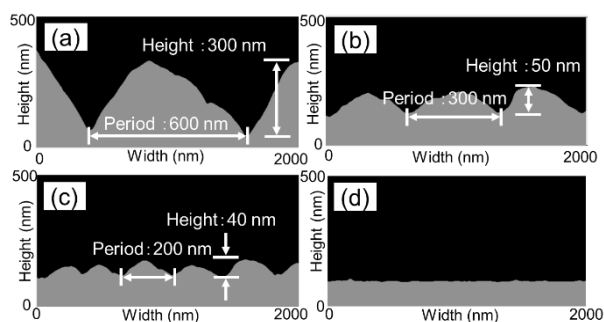


Fig.2 Ti 基板表面 AFM 観察像：(a)波長 775 nm、(b)波長 388 nm 及び(c)波長 258 nm でレーザー照射後、(d)レーザー未照射

期的微細構造の周期は、波長 775、388 及び 258 nm の際、それぞれ約 600、300 及び 200 nm となることが明らかになった。

細胞培養試験後の Ti 基板表面の蛍光顕微鏡観察像を Fig.3 に示す。Fig.3(a)、(b)及び(c)に周期 600、300 及び 200 nm を有する周期的微細構造形成領域に対して細胞培養試験を行った後の Ti 基板表面の蛍光顕微鏡観察像、Fig.3 (d)にレーザを照射していない領域に対して細胞培養試験を行った後の Ti 基板表面の蛍光顕微鏡観察像を示す。周期 200 nm を有する周期的微細構造を形成した領域ではレーザを照射していない領域と同様に細胞が伸展する方向はランダムであった (Fig. 2 (c)、(d))。これに対して、周期 600 及び 300 nm を有する周期的微細構造を形成した領域では、細胞が溝の方向に沿って伸展している箇所が存在した (Fig. 2 (a)、(b))。これらの結果は、細胞が伸展する角度に対する細胞数の割合の統計結果からも示された。

以上の結果より、細胞の伸展方向を制御するためには、周期 300 及び 600 nm の領域における周期的微細構造が有効であることがわかった。

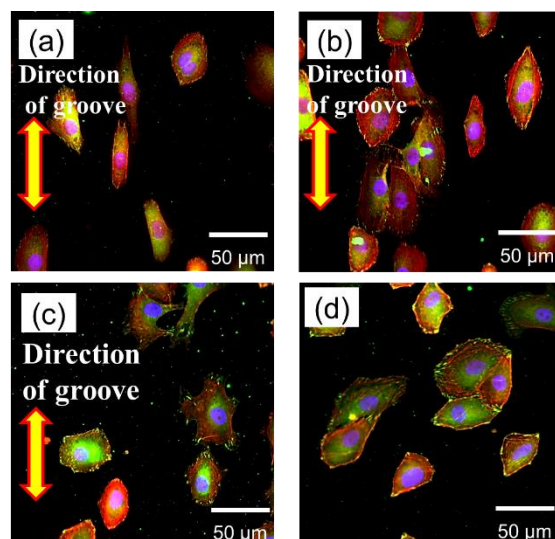


Fig.3 Ti 基板表面蛍光顕微鏡観察像：(a)波長 775 nm、(b)波長 388 nm 及び(c)波長 258 nm でレーザ照射後、(d)レーザ未照射

3. 発表論文等

雑誌掲載論文

- T. Shinonaga, M. Tsukamoto, T. Kawa, P. Chen, A. Nagai and T. Hanawa, “Formation of periodic nanostructures using a femtosecond laser to control cell spreading on titanium”, Applied physics B, 119, (2015) 493-496.

国際会議発表

- T. Kawa, M. Tsukamoto, T. Shinonaga, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa, “Control of Cell Spreading on Ti Substrate with Periodic Nanostructures Formed by Femtosecond Laser Irradiation”, LAMP2015 (The 7th International Congress on Laser Advanced Materials Processing), Kitakyusyu, Japan, May 26th, 2015.
- M. Tsukamoto, T. Shinonaga, T. Kawa, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa, “Control of Cell Elongation on Titanium Materials by Femtosecond Laser Irradiation”, AMDI-6 (The 6th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials), Tokyo, Japan, June 9th, 2015.
- T. Kawa, M. Tsukamoto, T. Shinonaga, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa, “Periodic Nanostructures Produced on Ti Substrate with Femtosecond Laser for Controlling of Cell Spreading in Multi Direction”, COLA2015 (13 th International Conference on Laser Ablation), Cairns, Australia, September 3rd, 2015.
- T. Nakaaze, M. Tsukamoto, Y. Sato, T. Kawa, M. Miyake, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa, “The cell spreading on Ti plate surface with microstructures formed by femtosecond and nanosecond laser”, ISETS'2015 (International Symposium on Ecotopia Science), Nagoya, Japan, November 27-29th, 2015.
- M. Miyake, M. Tsukamoto, Y. Sato, T. Kawa, T. Nakaaze, P. Chen, A. Nagai, T. Hanawa, “Femtosecond laser ablation on Ti plate under controlling atmosphere”, ISETS'2015 (International Symposium on Ecotopia Science), Nagoya, Japan, November 27-29th, 2015.

国内会議発表

- 中畔哲也, 塚本雅裕, 河拓弥, 佐藤雄二, 篠永東吾, 岡田晃, 篠永東吾, 陳鵬, 永井亜希子, 塙隆夫, “フェムト秒レーザにより形成されたナノ及びマイクロ周期構造の細胞伸展への影響”, 溶接学会平成 27 年度秋季全国大会, 北海道科学大学, 2015 年 9 月 3 日。
- 三宅正誓志, 塚本雅裕, 河拓弥, 中畔哲也, 佐藤雄二, 篠永東吾, 陳鵬, 永井亜希子, 塙隆夫, “雰囲気制御下におけるチタン基板へのフェムト秒レーザーアブレーション”, 第 76 回秋季応用物理学会, 名古屋国際会議場, 2015 年 9 月 13 日。