



Title	Two-photon excitation polymerization using deep-UV absorption
Author(s)	中山, 篤志
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91919
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (中 山 篤 志)	
論文題名	Two-photon excitation polymerization using deep-UV absorption (深紫外域吸収を利用した2光子重合に関する研究)
論文内容の要旨 Two-photon induced polymerization (TPP) enables 3D micro/nano fabrication with a feature size beyond the diffraction limit of light because of the use of two-photon absorption in photopolymerization reaction. Although there has been much research about spatial resolution, materials, and applications in various fields of nanoscience and nanotechnologies, few discussions about the excitation wavelength have been reported, and near-infrared (NIR) femtosecond pulsed laser has been generally used for TPP. In my Ph. D study, I explored TPP using a shorter excitation wavelength. I presented that visible pulse light used can access deep-UV absorption of functional groups in monomers directly without photoinitiators, which have been added to monomers to efficiently induce TPP using NIR. As a proof of concept, I performed photoinitiator-free TPP of acrylate resin by using 400-nm femtosecond pulses. 3D nanostructures of only pure acrylate monomer were fabricated with a feature size of 80 nm. I found that less excitation intensity was required for fabrication than typical NIR-wavelength TPP because the resin consisting of 100% monomer was directly excited. Additionally, findings in the direct deep-UV excitation of monomers expanded materials and chemical reactions available in TPP, such as inorganic materials of metal-oxides, amino acids, and photo-click chemical reactions. I applied the photoinitiator-free TPP to fabricate microstructures using biocompatible materials that can be used for biological applications, which has been hindered by photoinitiators due to their cytotoxicity and low water solubility. I fabricated 3D microstructures from pure poly (ethylene glycol) diacrylate (PEGda) and pure type I collagen without photoinitiators. To understand how those materials chemically changed, I conducted in-situ Raman analysis. By comparing the Raman spectra before and after the irradiation with visible pulses at a wavelength of 400 nm, I confirmed that the chemical reactions were generated by direct two-photon excitation polymerization. I also confirmed the water swelling of the PEGda microstructures and the enzymatic degradation of collagen, which are important hydrogel characteristics in the applications of cell culturing and tissue engineering, in the fabricated structures. I investigated a mechanical property of the fabricated micro-structures because it also affects on adhesion and proliferation of cells under 3D culturing. For <i>in situ</i> measurement of mechanical stiffness 3D microstructures, I introduced a Brillouin spectrometer into the TPP and Raman system. Brillouin/Raman spectra of the hydrogel polymer before and after photopolymerization showed the correlation between the longitudinal modulus obtained from the Brillouin peak shift and the polymerization degree calculated from Raman scattering intensity. To show the potential of photoinitiator-free TPP in biological applications, I fabricated a photoinitiator-free scaffold made of a mixture of PEGda and collagen. The cultured cells were attached to the scaffold and showed their growth and proliferation without numerous deaths because of the absence of photoinitiators. In this research, I proposed chemical modification of proteins with methacrylate group to increase the efficiency of photoinitiator-free TPP in protein. The synthesized BSA-GMA with a concentration of 200 mg/mL in water was polymerized in photoinitiator-free TPP, whereas the same concentration of BSA was not polymerized with the same excitation intensity. Brillouin/Raman analysis of polymerized BSA-GMA revealed that its photopolymerization derived from the cleavage of C=C bonds and caused the increase of its mechanical stiffness and the change of its secondary/tertiary structure. In a micro-well structure with BSA-GMA, HeLa cells formed spheroids by utilizing its cell non-adhesion. It was concluded that TPP using direct excitation monomer in the DUV range provides a photoinitiator-free 3D micro/nanofabrication with smaller feature size, a less excitation intensity, and various available materials and chemical reactions. As a future perspective for regenerative medicine and drug discovery applications, it was discussed that the proposed technique contributes to systematic study of cellular behavior or reproduction of 3D organs with subcellular feature size and precision.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (中 山 篤 志)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤田 克昌
	副 査	教授	吉川 洋史
	副 査	教授	小林 慶裕
	副 査	教授	丸尾 昭二 (横浜国立大学大学院工学研究院)

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、深紫外域での光吸収を利用した2光子重合法(DUV-TPP)を提案し、光重合開始剤を使用しない3次元構造の造形が可能であることの実証と、造形物の分子・機械特性の定量評価法の確立、加えて、その特徴を生かした3次元細胞培養足場構造の構築への応用についての研究をまとめたものである。その成果は以下の通りである。

可視光フェムト秒パルスレーザーを励起光として使用することで、深紫外域において光吸収をもつモノマー単独での2光子重合法(DUV-TPP)を提案している。提案する手法により、光重合開始剤を含まないアクリレートモノマーのみを原料とした3次元構造の造形に成功している。従来法よりも高加工分解能、低光強度での造形が可能であることを実験的に見いだしている。従来法においては重合材料としての利用が困難な金属酸化物、アミノ酸(システイン)や、光化学反応(thiol-ene/yne 反応)を用いた3次元ナノ造形に成功し、2光子重合法を適用できる材料や化学反応の種類の拡張に成功している。

DUV-TPPを用いて生体適合性材料の3次元ナノ造形を行い、細胞足場への応用を想定して造形物の分子特性を調べている。PEGdaとコラーゲンをを用い、光重合開始剤無しで、2光子重合法による3次元構造の造形が可能であることを確認している。2光子重合で造形した構造体を、その場でラマン分光測定できる顕微分光装置を開発し、計測されたラマンスペクトルから、それぞれの材料の重合時で生じた光化学反応を明らかにしている。

PEGdaとコラーゲンをを用いてDUV-TPPで作製された3次元微細構造が変性せず、使用した材料固有の特性を保持していることを確認し、3次元細胞培養足場構造の作製へ応用できることを示している。DUV-TPPにより作製される細胞培養足場構造上に細胞が接着・増殖できることを実験的に確認している。光重合開始剤を含まない材料で構造体を造形することにより、生体適合性や材料の特性を保持する3次元細胞培養足場構造の作製に成功している。

ブリルアン分光分析を用いて、DUV-TPPで作製される3次元微細構造物の機械特性を定量評価している。ブリルアン分光光学系をDUV-TPP・ラマン分光装置に組み込み、その場でブリルアン・ラマン分光測定が可能な装置を構築し、微細構造物の弾性率と重合度の測定に成功している。さらに、それらに正の相関があることを見出し、材料の架橋による弾性率の変化を明らかにしている。

タンパク質に光反応性官能基を化学修飾することによるDUV-TPPの高効率化を提案している。グリシルメタクリレート(GMA)を牛血清アルブミン(BSA)に付加する材料(BSA-GMA)において、低光強度での2光子重合が可能になることを実証している。ブリルアン・ラマン測定から、光反応性官能基を介したタンパク質の架橋により重合反応が起きていることを明らかにしている。BSA-GMAを用いたDUV-TPPにより作製された3次元微細構造を用いて細胞動態を制御し、癌スフェロイドが構築できることに成功しており、提案する手法が細胞構造の制御へ応用可能であることを示している。

以上のように、本学位論文では、深紫外域での光吸収を利用することで2光子重合法を発展させ、モノマー単独での2光子重合法に成功し、従来法と比較して高加工分解能、高効率、多種材料での3次元光造形が可能であることを実証している。重合反応による分子・機械特性の変化を定量評価し、得られるポリマー構造の解明と制御を可能にしている。さらに造形した3次元微細構造上で細胞の培養に成功しており、開発した2光子重合法が再生医療や創薬支援へ応用可能であることを示している。

これらの結果は、応用物理学、特にナノフォトニクス的发展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値のあるものと認める。