

機関番号：32689

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05355

研究課題名(和文) 高分子ナノ薄膜とバイオエレクトロニクスの融合による生体計測・制御技術の創製

研究課題名(英文) Integration of Polymer Nanosheet and Bioelectronics for the Development of Bio-Monitoring and Controlling Technology

研究代表者

藤枝 俊宣 (Fujie, Toshinori)

早稲田大学・高等研究所・准教授(任期付)

研究者番号：70538735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では自己支持性高分子ナノシートの製造手法に印刷・分子集合技術を導入することで、生体機能の計測制御を可能にするプリントドナノ薄膜を創製した。導電性高分子やナノインクをナノシートの構成素材に適用することで、皮膚貼付型の生体電極や電子回路を開発した。また、相分離現象を利用することで多孔質ナノシートを調製し、分子から細胞に至る各種物質の透過制御に成功した。この時、多孔質ナノシートの表面で幹細胞を培養することにより細胞移植に応用した。さらに、温度応答性色素を担持したナノシート温度計を開発することで、筋肉組織における細胞から組織の発熱挙動をリアルタイムで蛍光イメージングすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the printed nanofilm was constructed through integration of printing technology and molecular assembly into the preparation of free-standing polymer nanosheets. Introduction of conductive polymers or nanoinks to the building blocks of nanosheets realized skin-contact electrodes and electronics. Then, phase separation led to preparation of porous nanosheets, allowing for permeation of several substances from molecules to cells, on which stem cells were cultured in the application of cell delivery. Furthermore, nanosheet-based thermosensor embedded with thermo-sensitive dyes realized real-time imaging of thermogenesis on the muscle tissue from cells to tissues.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：高分子ナノシート プリントドエレクトロニクス エラストマー 導電性高分子 ナノインク 脂肪  
組織由来幹細胞 細胞移植 バイオイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国において、健康寿命の維持管理を目的とした医療材料やデバイス開発は極めて重要である。近年、生体情報の連続的計測を目的とするウェアラブルデバイスの開発が進み、腕時計型心拍計や体温センサなどが実用化されている。最近、Northwestern 大学の Rogers らによる、生体組織から直接電気信号(例:筋電位、脳波)を計測する EES (Epidermal Electronic System) の開発を皮切りに、デバイス形態はウェアラブル型からシールのような貼付型へ進化しつつあり、当該分野への注目度は一層高まっている(引用文献①)。しかしながら、電子回路の大部分は金属材料から構成されるため、生体内での力学的安定性や異物反応を考慮すると、生体組織に馴染みやすい有機系エレクトロニクス開発は喫緊の課題である。

このような背景のもと、本研究では膜厚数十ナノメートル、面積数平方センチメートル以上からなる、基底膜と同次元の超薄性を有する自己支持性高分子ナノシートに着目した。これまでに、医用高分子からなるナノシートを用いることで、皮膚や臓器に対して高い追従性と密着性を有する創傷被覆材(ナノ絆創膏)や細胞足場材料の開発に成功してきた(引用文献②-④)。また、ナノシートの構成素材には、ポリ(3,4-エチレンジオキシチオフェン):ポリスチレンスルホン酸(PEDOT:PSS)のような導電性高分子や磁性ナノ粒子も導入できるため、電気・磁気的特性を付与することでバイオデバイス分野に応用できる(引用文献⑤-⑥)。さらに、ポリ乳酸(PLA)のような結晶性高分子からなるナノシートをアニーリング処理すると、高分子鎖の動的な結晶化と結晶間に生じる微小な空隙構造によって分子篩効果が発現し、ナノシートを介した物質透過性の制御が可能である(引用文献⑦)。

以上の成果を踏まえ、ナノシートの膜厚と構成する機能性高分子の集合構造や異方性を精密に制御することで、高分子集合体のミクロな動的特性をナノシート全体のマクロな機能発現に変換する発想に至った。すなわち、生体運動時に生じるナノシートの電気・光特性を利用したナノバイオ材料の創製および生体計測・制御技術への応用を想起した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ナノシートの表面および内部空間の機能を拡張するために印刷・分子集合技術を導入し、生体組織との接触界面におけるナノシートの動的な電気・光特性を明らかにすることで、生体機能の計測や制御を可能にする機能性ナノシート「プリンテッドナノ薄膜」の創製を目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 種々のドーパントを配合した PEDOT:PSS を自己支持性ナノシート内部において均一にクラスター化すること

とで、高い導電性と柔軟性を兼ね備えた導電性ナノシートを作製する。また、各種印刷技術(グラビアコーティング、インクジェット印刷)をナノシートの製造方法に導入することで、生体貼付型の電子回路を開発する。

- (2) 組織・細胞レベルで生体情報を制御するために、ミクロ/マクロ相分離現象などの高分子集合技術を利用することで、異なる細孔サイズを有する多孔質ナノシートを創製し、分子レベルから細胞レベルまでの物質透過性を制御する。また、多孔質ナノシートの表面で細胞を培養することで、細胞移植を実践する。
- (3) 各種ナノシートの製造法を基盤技術とするナノシート状センサを開発する。このナノシート状センサを生体表面(例:皮膚・筋肉)に貼付することで、細胞・組織レベルにおける動的な生体機能(例:筋力・発熱)をナノシート内部に導入した機能性分子を通じて物理化学的な信号(例:電位・蛍光)に変換する。

### 4. 研究成果

#### (1) 皮膚貼付型エレクトロニクス開発

生体に装着して健康状態および運動情報を連続的かつリアルタイムに計測できるウェアラブルデバイスの開発は目覚しく、腕時計型・コンタクトレンズ型・シール型など多数のデバイス形態が近年登場している。生体に直接接触して生体電気信号を検出する電極部材には、小型化・薄化・軽量化に加え、柔軟性および皮膚への密着・追従性の向上が求められる。この点において、ナノシートの構成素材に導電性高分子を選択すれば、既存のフレキシブルエレクトロニクス材料を凌ぐ生体への密着・追従性を有するナノシート状電極の創製が期待される。

そこで、導電性高分子として汎用性の高い PEDOT:PSS に着目し、導電性ナノシートの作製について検討した。ロール・ツー・ロール法を用いてポリプロピレン (PP) フィルム上に PEDOT:PSS 分散体を塗布することで、膜厚数十～数百ナノメートルで長さ 5 メートル以上のロール状導電性ナノシートが得られた。この時、PEDOT:PSS の機械的な脆弱性を補強するために PLA ナノシートと二層構造を形成した(各層の膜厚: 120 nm, 計 240 nm)。この導電性ナノシートは、手のひらや間接部に貼付した場合でも安定な導電率(450-500 S/cm)を示し、LED などの電子素子を皮膚上で作動できた(図 1a)。また、皮膚貼付型電極として握力依存的な表面筋電位(sEMG)の変化を計測することにも成功した(図 1b)。装着時に違和感の無い導電性ナノシートを利用すれば、既存のゲル状電極では適用しにくい部位の筋電位(例:手のひら・足裏)も計測することが可能であり、繊細な皮膚感覚を持つ幼児やアスリートに向けた生体センシング用電極への応用が期待される。

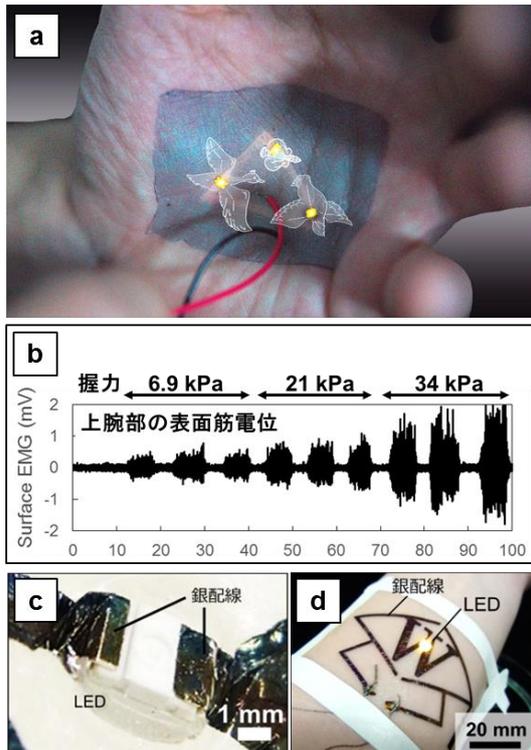


図1 導電性ナノシートとインクジェット印刷により作製した皮膚貼付型デバイス。(a)の星座(デネブ・ベガ・アルタイル)のイラストは撮影後に描き加えた。(発表論文①, ②, ⑤, ⑥を改編して引用)

一方、ナノシートを薄膜状デバイスに発展させるためには、LED、抵抗、ICなどの電子素子を搭載する必要があり、ナノシート本来の柔軟性や密着性を損ねることなく低温にてこれら素子を取り付けなくてはならない。そこで、ナノシートを回路基板または封止膜として応用するために、伸縮性に優れたスチレンブタジエン共重合体(SBS)からなるエラストマーナノシートを調製した。SBSナノシート(膜厚: 383 nm)の表面にカチオン性インク受容層(膜厚: 115 nm)を塗布し、インクジェット印刷にて銀ナノインク(粒径: 15 nm)からなる配線を描画し、ナノシート上に銀配線の回路(抵抗率:  $5.6 \times 10^{-5} \Omega \cdot \text{cm}$ )を形成した。

ここにLEDを載せて上から別のSBSナノシートを被せてこれを固定した。SBSナノシート上のLEDを裏側から観察すると、銀配線がLEDの電極部に密に追従している様子が観察された(図1c)。さらに、3Vの電池を接続して通電させると、SBSナノシート上に取付けたLEDを皮膚上で点灯させることに成功した(図1d)。銀配線と電子素子の接触抵抗は10  $\Omega$ 以下であり、SBSナノシートの高い追従性によって銀配線がLEDと物理的に密着し電氣的接合が得られたためと考えられる。このように、導電性ナノインクを配線化したSBSナノシートはLEDやICなどの表面実装素子を生体組織上に貼付するための回路基板として有用であり、皮膚貼付型エレクトロニクスへの応用が期待される。

## (2) 移植用細胞培養基材の開発

近年、幹細胞工学や細胞解析手法の発展は目覚しく、再生医療分野では移植用組織の作製や臓器チップによる薬物試験デバイスの開発が期待されている。生体組織を人工的に模倣するためには、生体組織では細胞外マトリックス(ECM)が細胞の組織化を司っており、細胞の成長や機能を制御している。なかでも繊維状タンパク質から構成される基底膜(数十~数百ナノメートル厚)は隣接する細胞組織体の分画や連結を介在しており、細胞集団に異方性や階層構造(筋繊維・血管・腸管)を提供している。そこで、基底膜の微細構造に着目して分子集合技術を利用することで、多孔質構造を有するナノシートを調製し、細胞培養基材に応用した(図2a)。

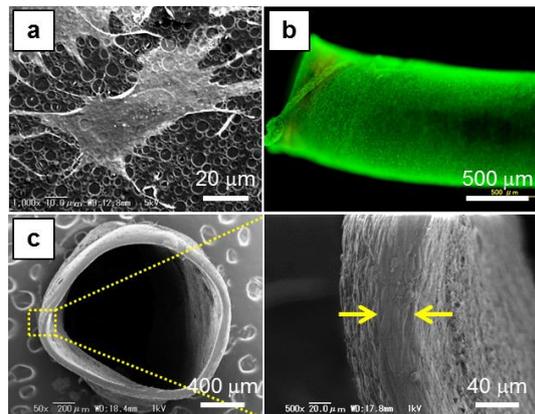


図2 高分子ブレンド法により調製した多孔質ナノシートと細胞培養基材への応用(発表論文①, ④を改編して引用)。

高分子ブレンド法にてナノシート構造中に海島状のマクロ相分離構造(海: ポリ乳酸・島: ポリスチレン)を形成し、任意の溶媒で島部を溶解・除去することで無数の貫通孔(細孔径: 約4.0  $\mu\text{m}$ )を有する多孔質ナノシート(膜厚: 150 nm)を調製した。多孔質ナノシートは液性因子の透過性に優れており、棒状のアルギン酸ゲルに筋芽細胞を担持させた多孔質ナノシートを巻きつけて多層構造にしても細胞はダメージを受けることなく管状の筋組織を形成した(図2b)。この細胞組織体の断面には筋細胞の多層構造が認められ、多孔質ナノシートを介して各細胞層が密に接触する様子も認められた(図2c)。

さらに、多孔質ナノシートを利用して難治性潰瘍に対する脂肪組織由来幹細胞(ASCs)の移植を試みた。多孔質構造を有するナノシート上で培養したASCsは、平滑構造のナノシートと比べると、細孔構造の導入に伴う細胞外分泌物の増加が認められた。このASCs担持ナノシートを積層し、皮膚欠損モデルマウスの背部に貼付したところ、ナノシートを足場とすることで患部に均一にASCsを移植することに成功した。ASCs担持ナノシート群と未処置群で治癒面積を比較したところ、ASCs担持ナノシート群では11日後に有意に

創部が縮小することを見出した。

### (3) ナノシート状発光センサの開発

細胞・組織・器官(臓器)から構成される生体システムの統合的な理解には、生体特有の物理的・機械的性質に馴染んで生体情報を計測するイメージングツールの開発が不可欠である。例えば、筋繊維から構成される骨格筋は、生体の各部において運動や代謝機能を司り、細胞・組織・器官におけるその役割が個々に研究されてきた。他方、多細胞システムとして統合的に理解する技術の開発は未だ黎明期であり、生体機能を *in vivo* にて計測する手法の開発が求められている。そこで、ナノシートの構成素材に温度感受性色素を導入することで、筋組織の発熱をマッピングするナノシート状発光センサを開発した。

スピニング法にてポリビニルアルコール(PVA)からなる水溶性犠牲膜上に温度感受性色素である Eu-tris (dinaphthoylmethane)-bis-trioctylphosphine oxide (EuDT) とポリメタクリル酸メチル (PMMA) の混合溶液を製膜して温度感受性ナノシートを調製した。同様に温度非感受性色素であるローダミン 800 (Rho800) とポリスチレン(PS) の混合溶液を製膜して温度非感受性ナノシートを調製した(各膜厚: 160 nm)。この温度感受性と非感受性ナノシートを重ね合わせることで、生体組織に貼付可能なレシオメトリック型の温度計(ナノシート温度計)を作製した(図 3a)。

このナノシート温度計をカブトムシ(Dicronorrhina derbyana)の背部筋肉(飛翔筋; dorsal longitudinal muscle (DLM))に貼付したところ、蛍光実体顕微鏡下にて EuDT および Rho800 の蛍光像を別々に取得してレシオメトリックな処理を施すことで、筋組織の温度分布をリアルタイムで計測できた(図 3b)。

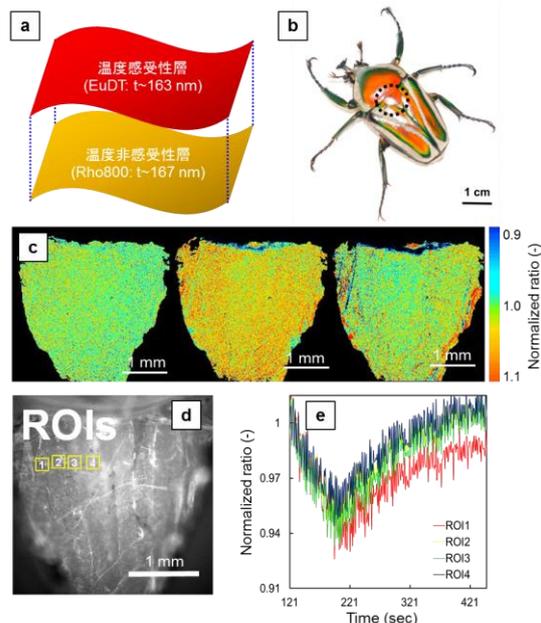


図 3 ナノシート温度計を用いた筋肉の *in vivo* 温度マッピング (発表論文①, ③を改編して引用)。

また、カブトムシに飛翔行動を促したところ、筋繊維によっては最大でおよそ 5°C 近くの発熱が飛翔前に起きていることが明らかとなった。さらに、ナノシートの発光変化を通じて細胞数個から組織全体までを同視野内で計測することに成功し(図 3c, 1 pixel:  $220 \times 220 \mu\text{m}^2$ )、筋繊維の場所(ROIs)によって発熱のタイミングや温度上昇が異なることが見出された(図 3d, e)。

このようなナノシート状発光センサに搭載できる感受性色素の種類は、ナノシートを構成する高分子と相溶する条件を満たせば良いので、ナノシートと色素の組み合わせによって、酸素、pH、代謝物など様々な物理化学的情報を生体組織上でイメージングできる新しい発光センサへの展開が期待される。

### <引用文献>

- ① Rogers, J. et al., *Science*, **333**, 838 (2011).
- ② Fujie, T. et al., *Adv Mater.*, **19**, 3549 (2007).
- ③ Fujie, T. et al., *Adv. Funct. Mater.*, **19**, 2560 (2009).
- ④ Fujie, T. et al., *Nano Lett.*, **13**, 3185 (2013).
- ⑤ Fujie, T. et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **5**, 573 (2013).
- ⑥ Fujie, T. et al., *Adv Mater.*, **26**, 1699 (2014).
- ⑦ Fujie, T. et al., *Macromolecules*, **46**, 395 (2013).

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 30 報中 6 報を抜粋)

- ① 藤枝 俊宣, 武岡 真司. 「高分子ナノ薄膜とバイオ・エレクトロニクスの融合」, *化学と工業*, **70**(6), 494-496 (2017).
- ② Okamoto, M., Kurotobi, M., Takeoka, S., Sugano, J., Iwase, E., Iwata, H., Fujie, T. Sandwich fixation of electronic elements using free-standing elastomeric nanosheets for low-temperature device processes. *J. Mater. Chem. C*, **5**, 1321-1327 (2017) 査読有.
- ③ Miyagawa, T., Fujie, T., Ferdinandus, Vo Doan, T. T., Sato, H., Takeoka, S. Glue-free stacked luminescent nanosheets enable high resolution ratiometric temperature mapping in living small animals. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **8**, 33377-33385 (2016) 査読有.
- ④ Suzuki, S., Nishiwaki, K., Takeoka, S., Fujie, T. Large-scale fabrication of porous polymer nanosheets for engineering hierarchical cellular organization. *Adv. Mater. Technol.*, **1**(6), 1600064 (2016) 査読有.
- ⑤ Fujie, T. Development of free-standing polymer nanosheets for advanced medical and health-care applications. *Polymer J.*, **48**, 773-780 (2016) 査読有.
- ⑥ Zucca, A., Yamagishi, K., Fujie, T., Takeoka, S., Mattoli, V., Greco, F. Roll to roll processing of ultraconformable

conducting polymer nanosheets. *J. Mater. Chem. C*, **3**, 6539-6548 (2015) 査読有.

〔学会発表〕(計50件中6件を抜粋)

- ① 藤枝 俊宣, 「生体計測・制御システムに向けたプリンテッドナノ薄膜の創製」第39回日本バイオマテリアル学会大会(2017.11.20., 東京) 招待講演.
- ② Fujie, T., Free-Standing Polymer Nanosheet for Bio-Monitoring Technologies. LbL 2017 Conference (2017.6.18., Seoul) 招待講演.
- ③ 藤枝 俊宣, 「高分子ナノシートを利用した生体計測技術の開発」日本化学会第97春季年会(2017) (2017.3.16., 日吉) 招待講演.
- ④ Fujie, T., Nanosheet-Based Soft Device for Advancing Active Aging Research. The 4th Institute of Advanced Active Aging Research Symposium. (2017.2.25., Tokyo) 招待講演.
- ⑤ 藤枝 俊宣, 「生体組織と調和する高分子ナノシートの創製と機能化戦略」第65回高分子学会年次大会 (2016.5.25., 神戸) 招待講演.
- ⑥ Fujie, T. Advanced microstructured biomaterials interfaced with living cells. The 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS). (2015.8.25., Milan) 招待講演.

〔図書〕(計3冊)

- ① Yamagishi, K., Taccola, S., Takeoka, S., Fujie, T., Mattoli, V., Greco, F. (2018) Conductive Nanosheets for Ultra-Conformable Smart Electronics (ch. 11), in Flexible and Stretchable Medical Devices (eds Takei, K.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. pp.253-285.
- ② 木下 学, 檜 顕成, 藤枝 俊宣, 武岡 真司. 「医療応用を目的とした癒着防止ナノ絆創膏の可能性 (第1章2節)」手術用シーラント材・癒着防止材の利便化向上を目指した製品開発, 技術情報協会(2016). (ISBN9784861046315).
- ③ 藤枝 俊宣, 武岡真司. 「医療応用に向けた高分子ナノシートの開発」進化する医療用バイオベースマテリアル (大矢裕一, 相羽誠一監修), CMC 出版 pp. 251-263 (2015).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計11件中3件を抜粋)

名称: エラストマーからなる自立性超薄膜  
発明者: 藤枝 俊宣, 山岸 健人, 佐藤 信孝, 武岡 真司  
権利者: 学校法人早稲田大学  
種類: 特許

番号: 特願 2016-086750

出願年月日: 平成 28 年 4 月 25 日

国内外の別: 国内

名称: Ultra Thin Film Luminescence Sensor  
発明者: Sato, H., Ferdinandus., VO DOAN, T. T., Fujie, T., Miyagawa, T., Yamagishi, K., Takeoka, S., Arai, S., Suzuki, M.

権利者: Nanyang Technological University / Waseda University

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/82056 (WO/2017/073728)

出願年月日: 平成 28 年 10 月 28 日

国内外の別: 外国

名称: 電子デバイスおよびその製造方法  
発明者: 藤枝 俊宣, 岡本 麻鈴, 山岸 健人, 村田 篤, 武岡 真司, 岩瀬 英治, 黒飛 みずほ, 岩田 浩康

権利者: 学校法人早稲田大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-96887

出願年月日: 平成 27 年 5 月 11 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.waseda.jp/inst/wias/other/2016/04/01/1861/>

<http://www.takeoka.biomed.sci.waseda.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤枝 俊宣 (FUJIE, Toshinori)

早稲田大学・高等研究所・准教授

研究者番号: 70538735