

令和元年5月25日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01372

研究課題名(和文) 皮膚や臓器に貼付できるフレキシブル酸素イメージングフィルム

研究課題名(英文) Flexible film-type oxygen sensor for measurement of skin and organ surfaces

研究代表者

塚田 孝祐 (Tsukada, Kosuke)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授

研究者番号：00351883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体の皮膚や臓器など凹凸を有する部位でも酸素センシングが可能な貼付型の酸素センサデバイスの開発を行った。酸素センサは酸素感受性色素を含むセンシング層、励起光源層、受光層の3層で構成した。酸素感受性色素をポリスチレンナノ粒子に封入することで、測定精度の向上に成功した。励起光源には電気化学発光を採用し、その電気的条件を決定した。校正実験から有効に酸素計測が可能であることを実証した。将来的には素子を高密度で配列することで酸素濃度の二次元イメージングへの応用が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸素濃度を計測する必要性は臨床のみならず、基礎医学研究においても益々増加しているが、現在普及している方法は測定部位に限られるなど利便性に欠けている。そこで従来測定が困難であった立体的な生体組織や培養細胞まで応用できる新たな酸素濃度計測法を提案した。得られた成果を発展させることにより、将来的には手術中に臓器表面に貼付して酸素モニタリングを行うなど、従来不可能であった酸素濃度測定を簡便かつ高精度に測定できると期待された。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new oxygen sensor device that can be attached to the surface of curved skin and organs. The oxygen sensor consisted of three layers, a sensing layer containing an oxygen sensitive dye, an excitation light source layer, and a light receiving layer. By encapsulating oxygen sensitive dye in polystyrene nanoparticles, we succeeded in improving the measurement accuracy. We adopted electrochemiluminescence as the excitation light source and determined its electrical condition. The calibration experiment showed the possibility of measuring oxygen concentration with high sensitivity. In the future, by arranging the elements at high density, application to two-dimensional imaging of oxygen concentration is expected.

研究分野：生体医工学

キーワード：酸素センサ 生体計測 生体医工学 細胞培養

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

医療分野における生体の酸素濃度測定は長らく近赤外光を利用したパルスオキシメトリ法が酸素電極法が主流であり、酸素濃度計測の広い需要に対して満足に答えられていないと思われる。パルスオキシメトリ法は生体に無侵襲で計測できる利点が多い一方、ヘモグロビンの吸光度を利用するため、指先や額など測定部位が限られ、プローブ付近の体動が外乱になる。また一酸化炭素 (CO) が結合したヘモグロビンと酸素化ヘモグロビンの吸収スペクトルは近似するため、CO 中毒患者の酸素管理には不向きである。酸素電極法は主に実験レベルで利用されているが、電極の刺入によって侵襲を伴う；気体中で測定できない；参照電極を要する；毎度の校正を要するなど、用途が限定される。

近年酸素濃度を計測する必要性は臨床のみならず、基礎医学研究においても益々増加している。例えば、再生医療の分野では幹細胞周囲の酸素濃度がその分化を決定し、また腫瘍生物学では低酸素状態が新生血管や腫瘍細胞の転移をトリガーすることは良く知られている。従って細胞培養においては酸素濃度を厳密に管理する必要があるが、培地中の細胞が常時酸素を消費するため、培養器で設定した酸素濃度と細胞周囲の酸素濃度が異なることはあまり知られていない。その理由は、細胞周囲の酸素濃度を直接実測する手法が存在しないため、培養器の設定値に頼らざるを得ないからである。このような背景のもと、従来測定が困難であった立体的な生体組織や培養細胞まで応用できる新たな酸素濃度計測法を開発する必要があると考えた。

### 2. 研究の目的

前項の背景のもと、生体の組織や臓器に直接貼付可能なフレキシブルフィルム型の酸素分圧センサを新規に開発することを目的とした。電気化学発光 (Electrochemical Luminescence: ECL) の発光原理と酸素消光作用を利用することで、光学的に非侵襲に測定でき、また立体的な臓器・組織に貼付可能な点が特長である。この実現のために、酸素感受性色素およびそれを励起する光源、受光部、配線のための電極材料をフレキシブル材料で構成する必要がある。本研究では電極材料の選定、ECL 材料を励起するための電圧印加条件を決定し、既知の酸素分圧に対する構成実験を行った。最終的には ECL 素子を多数配列することによって酸素分圧イメージングデバイスに発展させることを目指す。この技術の実現は、手術中の組織・臓器酸素モニタや救急医療といった臨床応用のみならず、細胞培養において厳密な酸素濃度管理を要する再生医学をはじめとする基礎医学分野など、様々な応用展開が期待される (図 1)。

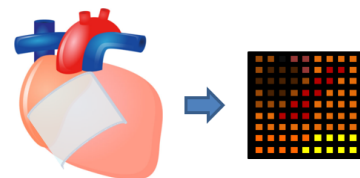


図 1 フレキシブル酸素センサの応用例

### 3. 研究の方法

#### (1) フレキシブル基板と電極材料の決定

酸素センサは酸素感受性色素層、それを励起する ECL 層、受光層の 3 層で構成される。実質的なセンサ部となる酸素感受性色素からの発光は ECL 層を通過して受光層に至るため、電極のパターンと透過性が測定精度に関わることになる。そこで各層の基板および電極材料の組合せとして ITO/PET, PEDOT:PSS/PET, Graphene/PET を検討した。酸素感受性色素を励起する波長帯の透過率を分光光度計で計測し、電極材料の抵抗率を van der Pauw 法を用いて測定した。

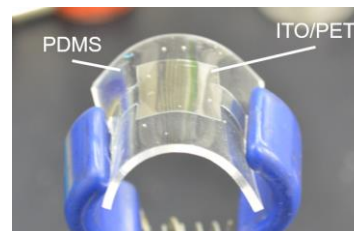


図 2 フレキシブル電極・基板の試作

#### (2) ECL 素子の電圧印加条件の決定

ECL 素子は有機色素 DPA (9, 10-diphenyl-anthracene) と支持電解質 Tetrabutylammonium をトルエンに溶解した溶液を 2 枚の ITO (indium tin oxide) ガラス電極で挟むことで作製した。酸素感受性色素の励起に最適な ECL 波形を生成する為に、交流電圧 150 Hz, 18 Vpp に 1 V のオフセットを加えた矩形波で、duty 比を 30-34% 間で 1% ずつ変化させ、ECL 波形を光電子増倍管 (PMT) を用いて取得した (図 3)。



図 3 ECL 発光素子の試作

#### (3) ECL 光源を用いたリン光寿命測定

酸素感受性色素 Pd-TCPP (Pd(meso-tetra (4-carboxyphenyl) porphine) をガス透過性が高いポリマー PDMS (polydimethylsiloxane) に混合し、スピニングによってフィルム型の酸素センサフィルムを作製した。その酸素センサフィルムと ECL 素子を重ねてガスタイトチャンバー内に設置し、酸素分圧を 0-159 mmHg まで 40 mmHg ずつ変化させた。前項で決定した電圧印加条件を用いた ECL で酸素センサフィルムを励起し、酸素分圧に依存して発光するリン光の減衰波形を取得した。その発光寿命から Stern-Volmer 式 (式 1) を用いて酸素分圧値に変換した。

$$\frac{\tau_0}{\tau} = K_{SV}[pO_2] + 1 \quad (1)$$

ここで  $\tau$ ,  $\tau_0$  はそれぞれ酸素下, 無酸素下でのリン光寿命,  $K_{SV}$  は Stern-Volmer 定数である.

#### (4) Laguerre Deconvolution を用いたリン光寿命の解析

ECLによって励起されたリン光波形  $y(n)$  は ECL光源の波形  $x(n)$ とリン光のインパルス応答  $h(n)$ との畳み込みとして表現され, 式(2)で記述される.

$$y(n) = T \cdot \sum_{m=0}^{K-1} h(m)x(n-m), \quad n = 0, \dots, N-1 \quad (2)$$

ここで,  $T$  はサンプリング周波数,  $K$  はインパルス応答の時間,  $N$  はサンプル数である. 続いて, Laguerre deconvolution で用いる離散時間ラゲール関数  $b_j^\alpha(n)$  は

$$b_j^\alpha(n) = \alpha^{\frac{n-j}{2}} (1-\alpha)^{\frac{1}{2}} \sum_{k=0}^j (-1)^k \binom{n}{k} \binom{j}{k} \alpha^{j-k} (1-\alpha)^k \quad (3)$$

で表され, リン光のインパルス応答  $h(n)$ は式(4)で表される.

$$h(n) = T \cdot \sum_{j=0}^{L-1} c_j^\alpha b_j^\alpha(n) \quad n \geq 0 \quad (4)$$

$L$  はラゲール離散時間ラゲール関数の次数,  $\alpha$  はラゲールパラメータである.  $c_j^\alpha$  はラゲール展開係数であり式(3)と  $x(n)$ の畳み込みと  $y(n)$ の最小二乗近似で算出される. リン光波形と ECL 波形を同時取得し, それぞれを入力として ECL 成分を除去したリン光波形を出力した.

### 4. 研究成果

#### (1) 電極材料と ECL 素子の電圧印加条件の決定

ITO/PET, Graphene/PET については ECL 発光が得られ, フレキシブル光源の基板および電極材料に適していることが明らかになった. 一方, PEDOT:PSS/PDMS を電極材料としたセンサでは, 十分な発光が得られず, これは PEDOT:PSS の仕事関数が 5.2 eV と大きいため ECL の励起子が発生するための電子移動が起こりにくい状態であるためと考えられた. ECL を発光させる duty 比における ECL 波形から, duty 比の変化に応じて ECL の強度及び発光時間が異なることが確認された. duty 比 31%において発光時間の半値全幅が 80  $\mu$ s と最も小さく, Pd-TCPP を励起する電圧印加条件として決定した.

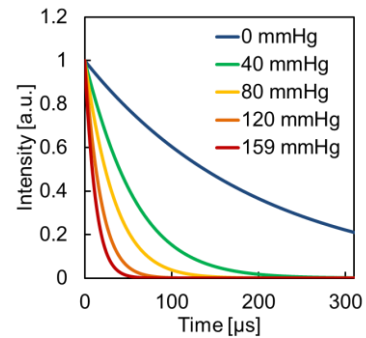


図4 酸素濃度による発光波形の変化

#### (2) ECL 素子を用いた Pd-TCPP 励起実験

前項で決定した電圧印加条件を用いた ECL を光源として用い, 各酸素分圧下で励起された Pd-TCPP から発光するリン光減衰波形の変化を図4に示した. この結果より, 酸素分圧変化に応じたリン光寿命の変化が認められたが, その Stern-Volmer プロットは線形を示さず, 高酸素側で感度が低下することが示唆された(図5, 赤プロット). これは ECL の減衰時間 80  $\mu$ s が高酸素側の Pd-TCPP のリン光寿命と比較して長いいため, ECL の波形成分が受光信号に混入していることが原因として考えられた.

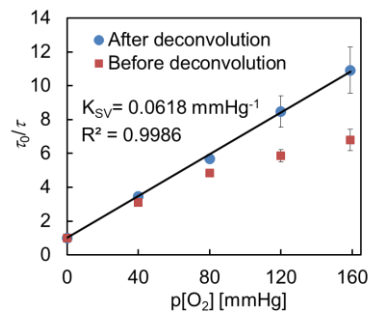


図5 校正結果(Stern-Volmer プロット)

そこで Laguerre Deconvolution を用いて Pd-TCPP の検出光から ECL 成分を除去し, 同様に Stern-Volmer プロットを作成した(図5, 青プロット). 酸素分圧の変化に対して線形性を示したことから, 受光信号からリン光の成分のみを抽出できており, また  $K_{SV} = 0.0618 \text{ mmHg}^{-1}$  と高い測定感度を得た. 本結果より, Laguerre deconvolution を適用することで減衰時間が長い ECL を光源とした場合でも, 高感度なリン光寿命計測が可能であることが示唆された.

以上より, 皮膚や臓器など凹凸を有する部位でも酸素センシングが可能な新たなセンサデバイスの開発を行った. 励起光源として ECL を採用し, その電氣的条件を決定した. また, 校正実験ではリン光波形解析に Laguerre deconvolution を導入し, 特に高酸素領域の感度が向上した. 今後, この成果を基に ECL 素子を高密度で配列することで, 酸素濃度の二次元イメージングが可能になると期待される.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

① Yabuki Y., Iwamoto Y. and Tsukada K., Micro/nano particle-based oxygen sensing film for monitoring respiration of cells cultured in a microfluidic device, Japanese Journal of Applied Physics, vol. 58, SDDK03, 2019.

〔学会発表〕（計 7 件）

① Yabuki Y., Yokoyama J. and Tsukada K., Micro/nano particle based-oxygen sensing film for continuous and non-invasive measurement of oxygen partial pressure around cells, IEEE EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference 2018, 2018-12, (Hawaii, USA).

② Yabuki Y., Yokoyama J. and Tsukada K., Micro/nano particle-based oxygen sensing film for monitoring respiration of cells cultured in a microfluidic device, 31st International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2018), 2018-11, (Sapporo, Japan).

③ Fujioka Y., Katayama Y., Tsukada K., Development of Flexible Oxygen Sensor for Direct Measurement of Vital Oxygen Partial Pressure, IEEE Life Sciences Conference (LSC), 2018-10, (Montreal, Canada).

④ 塚田孝祐, MEMS 型細胞培養装置：培養層の酸素と物質濃度を制御・モニターする技術, LIP 横浜オープンカンファレンス(次世代のライフサイエンス産業を拓く最先端のリサーチツール), 2018-9 (横浜)

⑤ Fujioka Y., Katayama Y., Tsukada K., Development of a flexible sheet-type sensor for direct measurement of oxygen partial pressure in vivo and in vitro, 生体医工学シンポジウム 2018, 2018-9(名古屋)

⑥ 片山祐太, 藤岡佑太, 塚田孝祐, 電気化学発光を利用した生体貼付型酸素センサの開発, 第 55 回日本生体医工学会, 2018-6 (札幌)

⑦ 藤岡佑太, 片山祐太, 塚田孝祐, 生体に貼付し酸素濃度を直接測定するフレキシブル酸素センサの開発, 第 21 回酸素ダイナミクス研究会, 2017-9 (東京)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。