

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14009

研究課題名(和文) 蛍光ナノシートによる生物環境センサーの創製と専用デバイスの開発

研究課題名(英文) Fabrication of Sensors for Bio-environments by Fluorescence Nanosheets and Development for Devices

研究代表者

武岡 真司 (Takeoka, Shinji)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20222094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生物にとって快適な生存環境では、温湿度、酸素濃度、pHなどが適度に調節されているが、この保持には複数箇所で複数因子をリアルタイムで計測する煩雑で高価なシステムが必要となる。本研究では、対象表面に貼付できるナノシート型蛍光センサーと実用的な計測デバイスを開発することを目的としている。報告者は、温度・酸素用蛍光分子候補をナノシートに封入した温度・酸素用蛍光センサーに参照蛍光ナノシートと複合させたシステムとレシオ値の時間分解能が膜厚に影響を受けることに着目してpH用蛍光高分子を設計した。合成したpH用蛍光高分子と交互積層法、参照蛍光ナノシートを用いてナノシート型蛍光pHセンサーの構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：The temperature, humidity, oxygen density and pH are controlled comfortably for creatures in the living environment. However, we need expensive systems to keep this due to the complexity by which more than one factors should be measured for more than one points in real time. In this study, the reporter aimed to develop the nanosheet-type fluorescence sensors, adhesive on the target surface, and a device for practical measurements. The temperature and oxygen sensors were successfully prepared by introducing fluorescence molecules sensing temperature and oxygen into polymer nanosheets and combining with a standard fluorescence nanosheet insensitive to those factors. The reporter designed a pH sensor by considering time resolution influenced by membrane thickness. Then, the reporter successfully prepared a nanosheet-type fluorescence pH sensor by synthesizing fluorescence-conjugated polymers, using a layer-by-layer method, and combining with the standard fluorescence nanosheet.

研究分野：高分子化学、バイオマテリアル、バイオイメージング、

キーワード：高分子薄膜 デバイス ナノシート レシオ型計測 蛍光センサー pHセンサー 酸素センサー 温度センサー

(1) 研究開発当初の背景

温度は熱電対温度計や赤外線センサー、湿度は湿球式湿度計、酸素は酸素電極や化学プローブのりん光寿命によって計測される。また、pHは電極法やISFET法によって計測される[1]。更に、最近ISFETセンサーを地中に埋め込み環境情報をリアルタイムで無線通信するシステムが注目されている。

既に報告者は、ナノ粒子に温度応答性の蛍光色素と標準用蛍光色素を共封入させたレシオ型ナノ温度計を開発し、細胞内エンドソームの温度を蛍光顕微鏡で計測することに成功した[2]。これを報告者が独自開発した高分子薄膜(ナノシート)に展開して生体組織の温度マップを顕微的に観測できることをDr. Sato(NTU)との共同研究から予備的に明らかにしている[3]。蛍光色素はナノシート内部に封入され温度以外の因子の影響は受けず、ナノシートは表面密着性が高いため高い時空間分解能にて表面温度を計測できる。さらに、酸素応答性ポルフィリン誘導体[4]を導入した薄膜型センサーをナノシート化したところ酸素濃度の変化を感度良く捉えることもできている。

他方、NaClストレスによって植物の葉アポプラストpHが上昇することが明らかとなっている[5]。これは、アポプラスト空間に流入してきたCl⁻イオンが細胞膜内外の濃度差に従ってシンプラスト空間に取り込まれる際に、細胞膜のCl⁻/2H⁺共輸送体によってH⁺イオンと一緒にくみ出されるためだと考えられている。そこでこの現象を本センサーの応用対象とした。

(2) 研究の目的

報告者は、環境因子の変化を蛍光色の変化として捉えるナノシートを開発して、これを

環境因子の影響を受けない参照用蛍光性ナノシート上にそれらのセンサーをパターン化して積層したシステムを構築、複数の環境因子を同時に観察して数値化できるセンシング部ならびに専用デバイスの開発を企図した。既にナノシート型蛍光温度センサー、酸素センサー部は予備的な検討は終わっているので、ここではナノシート型蛍光pHセンサーの開発を目的とした。また、応用として開発したpHセンサーにて葉のアポプラストpHの変化をセンシングする。

(3) 研究の方法

pH応答性ナノシートの構築

pH感受性蛍光色素 Fluoresceinamine (fluoresceinamine isomer I) をDCC法にてPoly(acrylic acid) (PAA)の側鎖にアミド結合させた。SiO₂基板上に犠牲膜となるPVA (2.0 wt%)をスピコートし、支持膜となるPDLLA (2.0 wt%)をスピコートした。この上にPoly(allylamine hydrochloride) (PAH)と合成したFluorescein修飾Poly(acrylic acid) (0.1 wt%)を交互積層させて、その後加熱架橋(100℃, 5時間)した。基板ごと水中に浸漬させてPVA層を溶解させ、自己支持性を有するpH応答性ナノシートを得た。

pH非応答性ナノシートの構築

PVA (2.0 wt%)を製膜したSiO₂基板上にPDLLA (2.0 wt%)とNile red (0.001 wt%)の混合溶液をスピコートし、水中で剥離させることによって自己支持性を有するNile red内包PDLLAナノシートをpH非応答性ナノシートとして得た。

ナノシート型蛍光pHセンサーの構築

のpH非応答性ナノシートの上に同じ条件にてPAHとPAAの交互積層膜を5対層形成させ、その後PAHとFluorescein修飾PAA

を 30 対層交互積層させた。その後加熱架橋 (100 °C, 5 時間)させた。その後水中に浸漬させて自己支持性を有するレシオ測定用蛍光 pH センサーを構築した。

植物葉のアポプラスト pH のイメージング
表皮組織を剥離した葉の向軸面にナノシート型 pH センサーを貼付し、葉柄から 100 mM に調製した塩化ナトリウム水溶液を与えた。NaCl ストレスによってアポプラスト pH が上昇する様子を、蛍光顕微鏡を用いて観察し 5 分ごと蛍光像を取得した。NaCl ストレスは観察開始から 20 分後に行い、その後 40 分間にわたって観察を続けた。

(4) 研究成果

pH 応答性ナノシートの構築

交互積層法の積層数によって膜厚を厳密に制御でき (3.9 nm/pairs, $R^2 = 0.99$)、表面粗さ 5.69 nm の平滑な薄膜が形成された。ガラス基板に移し取って乾燥させた後各 pH の緩衝液に基板毎浸漬させて蛍光測定 ($\lambda_{ex}=493$ nm, $\lambda_{em}=520$ nm)を行ったところ、pH4.5-9.0 の領域でシグモイド型の pH 依存的蛍光強度の変化を示した。Boltzmann fitting により pK_a 6.83 ($R^2 = 0.97$)であった。加熱架橋した後は pH9 の緩衝液に 24 時間浸漬させても蛍光物質の漏出は一切認められなかった。また、10 分間の励起光を連続照射しても退色は殆ど認められなかった。pH 応答性ナノシートの積層数により調節したセンサー層の膜厚と pH 変化に対するナノシートの応答時間には正の相関関係 (0.12 s/nm, $R^2=0.98$)を認めた。本センサー部の応答時間は 11.0 ± 4.9 秒であり、マイクロ厚のセンサー [6]と比較して 5-50 倍の時間分解能であった。

pH 非応答性ナノシートの構築

作製した pH 非応答性ナノシートの構築は、pH4.5-9 の領域で pH 非依存的 蛍光強度変化を示した (0.12 %/pH)。

ナノシート型蛍光 pH センサーの構築

Nile red 内包 PDLLA 層上 (118 nm) に LbL 層 (35 nm) と Fluorescein 修飾 LbL 層 (93 nm) を積層させてナノシート型蛍光 pH センサーを構築した。本センサーは、ナイロンメッシュを用いて指先や表皮組織を剥離したユリ (*Lilium L.*) の葉表面に貼付することができた。蛍光顕微鏡を用いて取得された Nile red 及び Fluorescein の蛍光像からナノシートの貼付箇所が確認できた。これを表皮組織を剥離したユリの葉 (向軸面) に貼付したところ、自家蛍光は Nile red 及び Fluorescein の蛍光よりも小さく無視できた。また、貼付されたナノシートのセンサー面に pH4.5-9 に調製した緩衝液を滴下することで、葉の上で検量線の作製に成功した。蛍光強度の Ratio 値 (ROI サイズ; $500 \times 500 \mu m^2$) から、シグモイド型の pH 依存的蛍光強度変化 (pK_a 6.83, $R^2=0.97$) が確認された。

植物葉のアポプラスト pH のイメージング

NaCl ストレスを与えた後、中央部帯状の剥離した箇所では、コントロール群にはない顕著な蛍光強度変化が認められた。剥離箇所を ROI ($500 \times 500 \mu m^2$, 5 箇所) で囲み Ratio 値を経過時間に対してプロットした結果、コントロール群に比べて有意に Ratio 値が上昇していることが確認された。Ratio 値を検量線に当てはめた結果、刺激前は pH4.5 以下で推移していたのに対し、40 分後には約 pH6.1 にまで上昇したことが示唆された。これは、蛍光プローブを用いた同様の実験における結果 [7] を支持するものであった。

得られた成果の位置づけと今後の展望

本研究によりレシオ測定ができるナノシート型蛍光 pH センサーが構築でき、植物組織に密着させて貼付し、葉のアポプラスト pH 変化を感度高く捉えることに成功した。これに関しては論文投稿中である。pH の測定は、温度や酸素と異なり液体中のプロトン濃度の測定であるために、親水性の高い高分子に検出用蛍光物質を共有結合で固定する必要がある。しかし、この状態では水中で安定なナノシートを構築できないので、ポリカチオンとの静電的なコンプレックスの形成ならびに熱架橋によって水中で安定な pH センサー部の構築に成功した。また、膜厚はプロトン拡散に影響を及ぼすため、薄膜化することで応答速度が速くなることを本研究で実証し、時間分解能の点からナノシートの有用性を示すことに成功した。

申請当初は、温度センサー、酸素センサーに本 pH センサーを組み込んだナノシートを積層法ならびに印刷法を組合わせて構築し、既に開発されている画像処理システムに組み込んだ専用デバイスを開発するところまで到達目標としていた。既に報告者の研究室では、インクジェット印刷法、スクリーン印刷法やステンシル法を用いて、ナノシートに任意のパターニング法を施す方法も確立している。後は多色の LED 光源とフィルターを組合わせて写真撮影するシステムの開発を残しているものの、既存の技術の組合せで可能であると考えている。

従って、本ナノシート型蛍光 pH センサーを温度センサー、酸素センサーと一体化させたパターン化ナノシート型マルチセンサーが構築できれば、センサー被着生体組織の代謝状態を時空分解能高く蛍光色で捉えることができる。

<参考文献>

- [1] D. Wencel *et al.*, *Anal. Chem.*, 86, 15-29 (2014),
- [2] Y. Takei *et al.*, *ACS Nano*, 8, 198-206 (2014).
- [3] T. Miyagawa *et al.*, *ACS Appl. Mater. Inter.*, 8, 33377-33385, (2016).
- [4] E.R. Carraway *et al.*, *Anal. Chem.*, 63, 337-342 (1991).
- [5] H.H. Felle *et al.*, *J. Exp. Bot.* 49, 987-995 (1998),
- [6] W. Fenglin *et al.*, *Adv. Healthc. Mater.*, 3, 197-204 (2014),
- [7] C.M. Geilfus, C. M. *et al.*, *Plant Science*, 223, 109-115 (2014).

(5) 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

藤枝俊宜、武岡真司、“高分子ナノ薄膜とバイオ・エレクトロニクスとの融合”、*化学と工業*、査読有、70(6)、494-496 (2017)。

Takuya Miyagawa, Toshinori Fujie, Ferdinandus, Tat Thang Vo Doan, and Hiroataka Sato, Shinji Takeoka "Glue-Free Stacked Luminescent Nanosheets Enable High-Resolution Ratiometric Temperature Mapping in Living Small Animals", *ACS Applied Materials and Interfaces*, 査読有、49(8), 33377-33385 (2016). 10.1021/acsami.6b06075

[学会発表] (計9件)

武岡真司、“温度・pH 蛍光イメージング用高分子薄膜 (ナノシート) の開発” 日本膜学会第 39 年会、招待講演 2018 年 5 月 9 日

Shinji Takeoka, “Development of Nanomaterials Functionalized by 3D Collaboration”, 4th Core-to-Core International Symposium “3D Lab-Exchange Program”, Keynote Lecture, 2018年3月6日

Fujie, T., Miyagawa, T., Ferdinandus, F., Thang, V. D. T., Sato, H., & Takeoka, S. “Thermo-sensitive dye laden polymer nanosheets for ratiometric temperature mapping of living muscle tissues.”, In ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (Vol. 254). 1155 16TH (2017, August, Washington DC).

Fujie, T., Miyagawa, T., Ferdinandus, F., Thang, V. D. T., Sato, H., & Takeoka, S., “Ratiometric Temperature Mapping of Living Tissues Using Ultra-Conformable Polymer Nanosheets Loading Thermo-sensitive Dyes”, 2017 MRS Fall Meeting & Exhibit (2017, September, Boston)

Shinji Takeoka, Takuya Miyagawa, Toshinori Fujie, Ferdinandus, Tat Thang Vo Doan, and Hirotaka Sato, “Luminescent Nanosheets for Ratiometric Temperature Mapping”, European Advanced Materials Congress, invited (2017, August, Stockholm)

染谷大地、山岸健人、藤枝俊宣、武岡真司、「pH マッピングを可能とするナノシート型蛍光センサーの構築」、日本化学会第97回春季年会（2017年3月、東京）

Shinji Takeoka, “Luminescent Temperature Imaging by Polymeric

Nanosheets”, The 11th SPSJ International Polymer Conference, invited (2016年12月、福岡)

Shinji Takeoka, “Ratiometric Fluorescent Temperature Sensing for Mitochondria and Muscle”, 3rd Core-to-Core International Symposium “3D Lab-Exchange Program”, invited (2016年9月、Pisa)

武岡真司、「温度・酸素感受性高分子ナノ材料によるバイオイメージング」、第65回高分子討論会（2016年9月、神奈川）

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武岡 真司 (TAKEOKA, Shinji)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：20222094

(2) 連携研究者

藤枝 俊宜 (FUJIE, Toshinori)
早稲田大学・高等研究所・准教授（任期付き）
研究者番号：70538735

(3) 研究協力者

佐藤 裕崇 (SATO, Hirotaka)
Associate Professor
School of Mechanical & Aerospace Engineering, College of Engineering, Nanyang Technological University, Singapore
染谷 大地 (SOMEYA, Daichi)
早稲田大学・大学院先進理工学研究科・修士2年（2017年度）