

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19940

研究課題名（和文）生体深部の見えない力を可視化する蛍光ポリマー素材の開拓

研究課題名（英文）Fluorescent Polymer for Making Invisible Strain Visible

研究代表者

曽我 公平（SOGA, Kohei）

東京理科大学・基礎工学部材料工学科・教授

研究者番号：50272399

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：生体の力に対する応答の利用は医療診断・治療において重要な役割を果たしている。ひずみゲージ等は信号入出力にリード線を利用するため、生体内での計測には制約が多い。一方で、機械的刺激による可逆的な色の変化を利用したメカノクロミックセンサは、非接触で簡易かつ低コストで、光学的なひずみ計測を可能とする。本研究では、生体適合性のあるシリコン系高分子シートに含有したドナー・アクセプターに相当する2種類の有機蛍光色素の相対距離の変化に伴う蛍光強度比の変化によって2次元のひずみの可視化を実証するとともに、デジタル画像相関法を併用した2次元歪解析により2次元歪イメージングの妥当性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メカノバイオロジーの効果が話題の現在において、生体に及ぼされる見えない情報である「力」を、非接触、簡便に可視化することを可能にした本研究は、将来的に診断や治療へ展開することにより、これまでにない医療における診断や治療を可能にする可能性を秘めている。これまで施術者の勘に頼っていた生体に働く実際の力の可視化は、特に高齢化社会において立つ、座る、歩くなどの基礎的な運動において重要な整形外科分野をはじめとする様々な医療分野に応用することにより、健康で幸福な国民の生活の実現に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Utilization of the response to the force of the living body plays an important role in medical diagnosis and treatment. Since currently used methods including strain gauges use lead wires for signal input and output, there are many restrictions on in vivo measurement. On the other hand, a mechanochromic sensor that utilizes reversible color change due to mechanical stimulus enables non-contact, simple and low-cost optical strain measurement. In this study, we demonstrated the visualization of two-dimensional strain by analyzing the fluorescence intensity ratio with the change in the relative distance between two types of organic fluorescent dyes corresponding to the donor-acceptor contained in a biocompatible silicone-based polymer sheet. In addition, the validity of the 2D strain imaging was verified by the 2D strain analysis combined with the digital image correlation method.

研究分野：材料工学

キーワード：力のイメージング 蛍光 高分子 変形 近赤外

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体の力に対する応答の積極的利用は、医療の様々な局面における診断や治療の重要なカギとなりつつある。本研究では生体深部における高分子のひずみを、生体透過性の高い近赤外蛍光を用いて可視化することにより、生体深部で働く力を可視化するポリマー素材を開発するとともに、生体深部の力の可視化の方法を確立することを目的とする。

本研究では特定のポリマー素材に一方の蛍光波長がもう一方の励起波長に相当するように2種の色素を均一に溶解し、ポリマーの変形に伴う分子間距離の変化を敏感に反映して変化する両色素の蛍光強度比から、ポリマー素材のひずみの変化を定量的に検出する。したがって、2種の色素の蛍光波長に相当するフィルターを用いて撮像を行い、画素の輝度値の比を求めるだけで、ポリマー素材に生じているひずみを容易に画像として可視化することができる。さらにこの素材の変形特性を材料力学的見地から十分に検証すれば、ポリマー素材に生じている応力の分布を2次元画像で可視化することが可能である。

この際に、従来の可視蛍光による数 mm と比べて約 10 倍の数 cm におよぶ観察深度を特徴とする 1000 nm を超える近赤外(OTN-NIR)蛍光を検出光として用いることにより、皮下数 cm の深部に存在する糸状やシート状のポリマー素材からの蛍光を検出でき、上記の原理に基づき生体深部のポリマー素材の応力分布を画像として可視化することができる。これらは外科手術において患部に働く力の可視化を可能にするばかりでなく、近年話題が高まっているメカノバイオロジー、メカノセラピーにおいて定量的な力の画像計測を可能にすることにより、医療や生命科学の発達に大きく寄与する新たな力のイメージングの手段を与えると期待される。

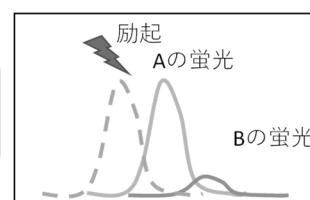
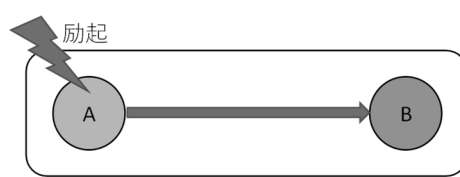
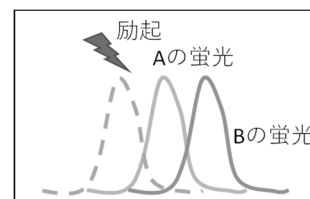
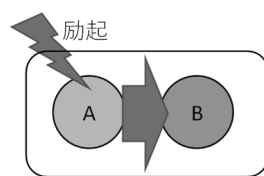
2. 研究の目的

本研究では生体深部における高分子のひずみを、生体透過性の高い近赤外蛍光を用いて可視化することにより、生体深部で働く力を可視化するポリマー素材を開発するとともに、生体深部の力の可視化の方法を確立することを目的とする。

本研究では、まず可視光蛍光を発する色素(フルオレセイン(FL)とローダミン B(RB))の色素を医療用ポリマーに溶解した場合の歪の2次元描出を試み、さらにその結果をデジタル画像相関法(DIC: digital image correlation)により検証し、その計測と解析の妥当性を検証するとともに、より生体深部の観察を可能にする、近赤外蛍光にて歪の可視化を行う可能性について検討を行った。

3. 研究の方法

蛍光波長が異なる2種の蛍光色素において、短波長蛍光を示す色素の蛍光波長が、長波長蛍光を示す色素の励起波長に相当するとき、以下の原理に基づき短波長蛍光を示す色素を励起すると、長波長蛍光を示す色素の蛍光を観察することができる。一つの原理は蛍光再吸収であり、蛍光強度が蛍光分子からの距離の2乗に反比例して減少することから、この現象は両色素の距離の2乗に



反比例して観察される。二つ目の原理はFRET(フォルスター共鳴エネルギー移動)として知られる現象であり、蛍光を介さない双極子双極子相互作用の場合は両分子の距離の6乗に反比例して蛍光強度が減少する。いずれにおいてもその短波長蛍光の強度に対する長波長蛍光強度の比は、両分子間の距離にたいして線形よりもさらに敏感に応答する。特定のポリマー素材にこれらの色素を均一に溶解した場合は、ポリマーの変形に伴う分子間距離の変化を敏感に反映して蛍光強度比が変化し、蛍光強度比からポリマー素材のひずみの変化を定量的に検出できる。さらに、この蛍光を、生体透過性の高い近赤外光とすることにより、従来観察が不可能であった、生体深部の観察が可能になるため、長波長蛍光を示す色素や希土類含有セラミックスナノ粒子(RED-CNP)による歪の可視化の可能性について検討を行った。

4. 研究成果

4-1. 二次元応力分布の可視化とその検証

ポリジメチルシロキサン (PDMS: polydimethyl siloxane) に有機蛍光色素 fluorescein (FL; Em.: 512 nm) と rhodamine B (RB; Em.: 610 nm) を包埋溶解し、ポリマーシート(縦横 70 mm×70 mm; 厚さ 5 mm) を作製した。シートで覆われた金属剛球(直径 20 mm) をシートに対して垂直方向に押し出ししながら、Fig. 1a に示す撮像系を用いて蛍光強度比 IFL/IRB の分布を計測した。ただし、IFL と IRB はそれぞれ波

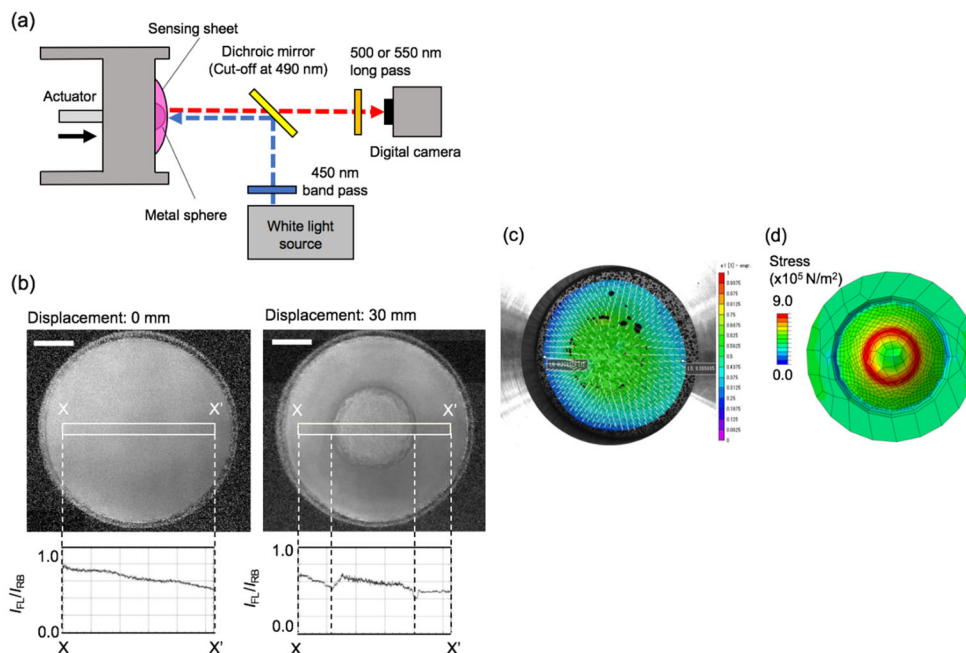


Fig. 1 応力分布計測 (a) 蛍光強度比の撮像系, 変位30 mmにおける (b) 蛍光強度比画像(スケールバー10mm), (c) 3D-DIC計測結果, (d) 二次元ひずみのシミュレーション解析結果。

長 500-550 nm、550-700 nm の蛍光強度の積分値とした。また、同配置におけるデジタル画像相関法 (DIC: digital image correlation) を用いた非接触ゆがみ・変位計測および有限要素法 (FEM: finite element method) による変形解析を実行し、それぞれ蛍光強度比分布との比較を行った。

垂直方向の金属球変位 0-30 mm の範囲で、最大 10%程度 の蛍光強度比の増加を確認した(Fig. 1b)。さらに、DIC によるひずみ計測結果(Fig. 1c)および FEM による変形解析結果(Fig. 1d)が示すように、中心から半径 7 mm の円環状に応力集中が発生すると予想され、蛍光強度比分布と大部分が一致した。一方、高分子の厚みの変化を考慮した三次元的な考察の必要性が示唆された。

4-2. 近赤外蛍光による歪の可視化

可視光域で FL と RB で行った可視化を近赤外域で行うべく、短波長側の 800nm 励起で 900-1000nm の蛍光を示す色素としてインドシアニングリーン(ICG)と長波長側の 980nm 励起で 1100nm 付近の蛍光を示す IR-1061 の組み合わせによる歪の可視化を試みた(Fig. 2)。

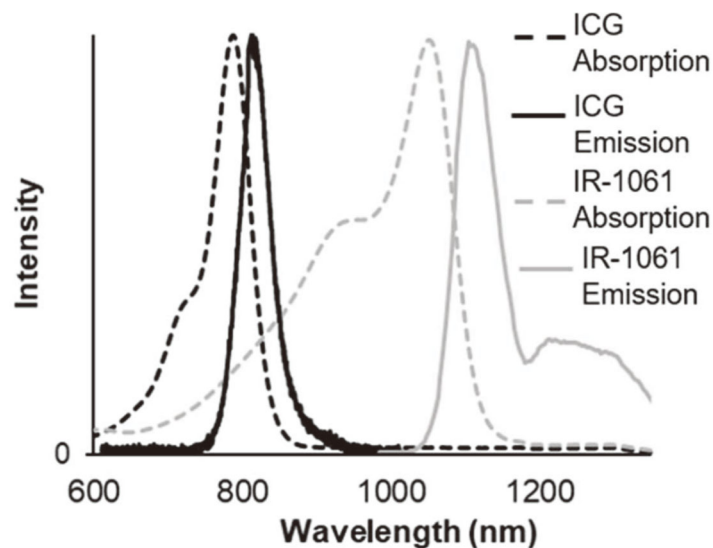


Fig. 2 ICGとIR1061の吸収スペクトルと蛍光スペクトル

これらの色素の組み合わせによって、確かに 800nm 励起で長波長蛍光を得ることはできた。しかし、ICG は光照射による劣化が激しく、消光の抑止が重要な課題となった。

ICG が励起光の照射により激しく退色する理由は、光化学反応により一重項酸素が生成するためである。このため蛍光バイオイメージングに用いる上でもその抑制方法は種々検討されてきた。本研究では

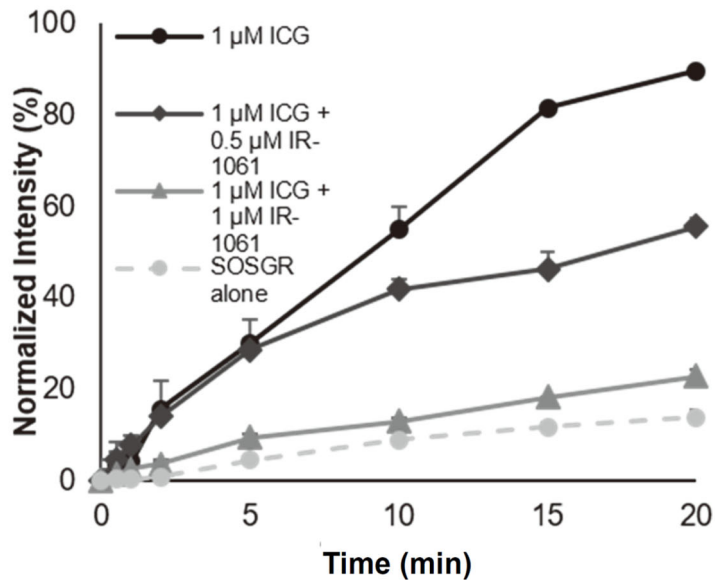


Fig. 3 IR-1061添加によるICGからの一重項酸素生成抑制。

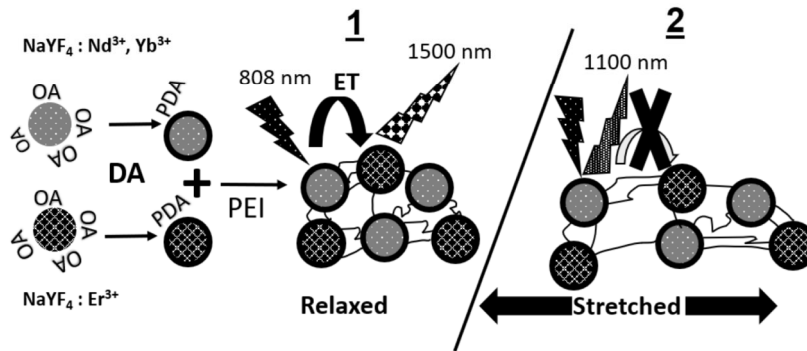


Fig. 4 ドーパミンでリンクしたRED-CNP間のエネルギー移動による近赤外蛍光歪検出[2]。

IR-1061 の添加により、励起エネルギーが一重項酸素の生成に使われる前に IR-1061 にエネルギー移動することにより失われるため、ICG の退色を抑制できることが明らかになった(Fig. 3)[1]。

4-3. ポリドーパミンでリンクした希土類含有セラミックスナノ粒子における粒子間エネルギー移動

4-2. で述べたように、近赤外蛍光色素では退色が深刻な問題となる。そこで退色しない近赤外蛍光体として知られる、希土類含有セラミックスの粒子(RED-CNP)をリンカーとしてドーパミンでリンクした粒子を作製し、粒子間のエネルギー移動を検証した(Fig. 4)。

Fig.5 に示すように、ポリドーパミンでリンクした場合のみエネルギー移動による長波長蛍光が観察されたため、今後 Fig.4 に示したような機構により、RED-CNP の近赤外蛍光による歪の可視化が可能になると期待される。

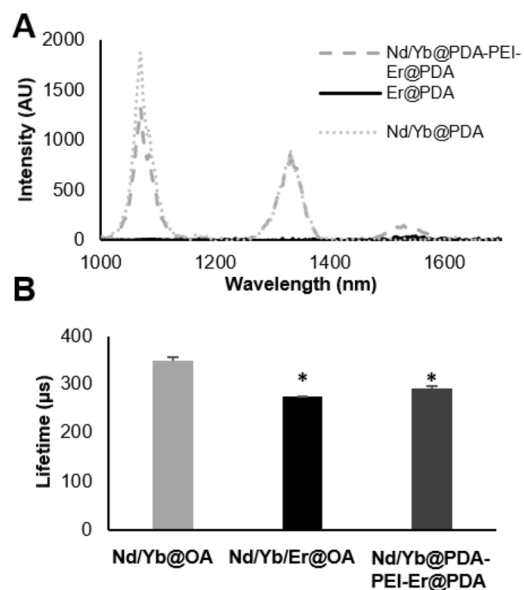


Fig. 5 ドーパミンでリンクしたRED-CNP間のエネルギー移動による近赤外蛍光[2]。

引用文献

- [1] Gil Yeroslavsky, Masakazu Umezawa, Kyohei Okubo, Karina Nigoghossian, Doan Thi Kim Dung, Masao Kamimura, Kohei Soga, "Photostabilization of Indocyanine Green Dye by Energy Transfer in Phospholipid-PEG Micelles," *J. Photopolym. Sci. and Tech.*, **32** (2019) 115-121, doi [<https://doi.org/10.2494/photopolymer.32.115>].
- [2] Gil Yeroslavsky, Kyohei Okubo, Masakazu Umezawa, Karina Nigoghossian, Doan Thi Kim Dung, Keiji Miyata, Koki Nomura, Masao Kamimura and Kohei Soga, "Energy Transfer between Rare Earth-Doped Ceramic Nanoparticles for Gauging Strain and Temperature in Elastic Polymers," *J. Photopolym. Sci. and Tech.*, **33** (2020) 129-137, doi [<https://doi.org/10.2494/photopolymer.33.129>].

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yeroslavsky Gil, Kamimura Masao, Inoue Ryo, Kogo Yasuo, Soga Kohei	4. 巻 31
2. 論文標題 Visualization of Strain in Elastic Silicone Polymers Using Fluorescence Energy Transfer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Photopolymer Science and Technology	6. 最初と最後の頁 533 ~ 540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2494/photopolymer.31.533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yeroslavsky Gil, Umezawa Masakazu, Okubo Kyohei, Nigoghossian Karina, Dung Doan Thi Kim, Kamimura Masao, Soga Kohei	4. 巻 32
2. 論文標題 Photostabilization of Indocyanine Green Dye by Energy Transfer in Phospholipid-PEG Micelles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Photopolymer Science and Technology	6. 最初と最後の頁 115 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2494/photopolymer.32.115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Gil Yeroslavsky, Kyohei Okubo, Masakazu Umezawa, Karina Nigoghossian, Doan Thi Kim Dung, Keiji Miyata, Koki Nomura, Masao Kamimura and Kohei Soga	4. 巻 33
2. 論文標題 Energy Transfer between Rare Earth-Doped Ceramic Nanoparticles for Gauging Strain and Temperature in Elastic Polymers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Photopolymer Science and Technology	6. 最初と最後の頁 129-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2494/photopolymer.33.129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Gil Yeroslavsky, Masao Kamimura, Ryo Inoue, Yasuo Kogo, Kohei Soga
2. 発表標題 Visual Mapping of Strain in Elastic Silicone Polymers Using Fluorescence Energy Transfer
3. 学会等名 The 35th International Conference of Photopolymer Science and Technology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大久保 喬平 (Okubo Kyohei) (20822951)	東京理科大学・基礎工学部材料工学科・助教 (32660)	
研究分担者	上村 真生 (Kamimura Masao) (80706888)	東京理科大学・基礎工学部材料工学科・講師 (32660)	
研究分担者	向後 保雄 (Kogo Yasuo) (60249935)	東京理科大学・基礎工学部材料工学科・教授 (32660)	
研究分担者	井上 遼 (Inoue Ryo) (60756295)	東京理科大学・工学部機械工学科・講師 (32660)	