

研 究 報 告 書

「移植用培養生体組織に搭載可能なナノエレクトロニクスの創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研 究 者: 藤 枝 俊 宣

1. 研究のねらい

再生医療のような先進医療や医科学研究の高度化に向けて、患者への負担が少なく使用可能な医療機器を開発することは、QOL (Quality of Life) の向上のため、また、QOL 向上を支えるための高精度な生体情報収集を実現するうえで重要な課題である。とりわけ先進医療を誰もが享受できる社会の創成が期待される一方で、安心・安全な医療機器の普及に関しては 2014 年の改正薬事法施行に伴う医療機器承認プロセスの高速化に伴い喫緊の解決すべき課題である。また、我が国の強みであるナノエレクトロニクスや有機エレクトロニクスの進展を鑑みると、低侵襲な医療機器開発への応用が期待される。この点において、埋め込み型や装着型デバイスを用いて無線通信による医療機器の制御・管理が可能になれば、疾病の診断や早期発見、あるいは、日常生活環境下での低侵襲な治療が実現すると期待される。このことは、長期入院の回避や入院期間の短縮化に繋がり、医療費の削減にも有望である。

翻って、我々の生体組織を鑑みると、器官・組織・細胞と階層的に構成され、各階層間は細胞外マトリックス(ECM)が繋いでいる。ECM は生体分子からなる巨大な二次元分子集合体であり、物質拡散や力学特性を変化させることで、隣接する細胞集団の動的な情報(接着・移動・増殖・分化)を伝達する役割を果たす。これに対して、我々は高分子の自己組織化や微細加工技術を駆使することで、人工系において ECM レベルの超薄性(膜厚: 数十～数百ナノメートル)を再現し、医療用途の自己支持性高分子ナノ薄膜を技術体系化してきた。また、高分子ナノ薄膜の柔軟性と密着性を利用すれば、生体組織の物性に適合可能な「柔らかい」エレクトロニクスの創製が期待される。

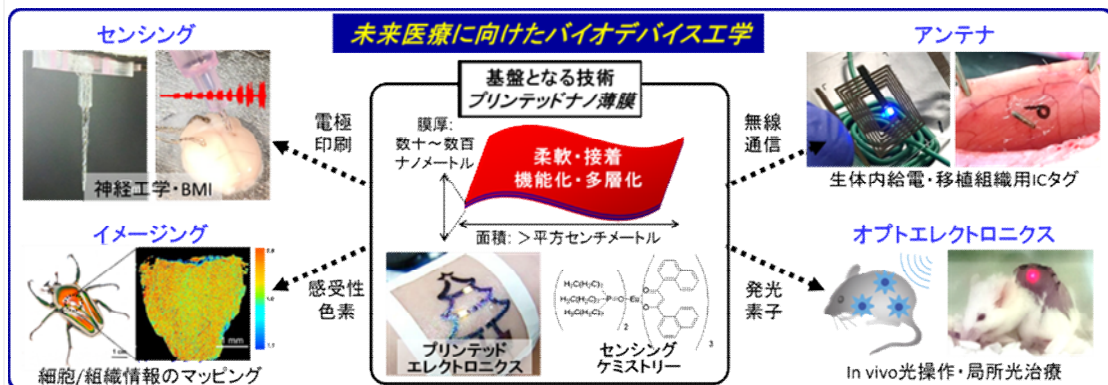
そこで、本研究では高分子ナノ薄膜と機能性インクの印刷技術を融合させることで、生体貼付型デバイスの創製を目指した。すなわち、印刷技術を用いて機能性ナノ薄膜を開発し、これを生体環境下でも作動できるように表面改質することで、生体機能の計測や制御を試みた。具体的には、①高分子の自己組織化と印刷技術を融合させることで、機能性ナノ薄膜の製造方法について検討した。次に、②ナノ薄膜上への電子回路や機能性分子の実装および生体環境下での動作性を評価した。最終的には、③各種ナノ薄膜による生体機能の計測・制御実験を通じて、医療応用に向けた素材・デバイス・システムのそれぞれに係る要件を検証した。

2. 研究成果

(1) 概要

IC や LED に代表されるエレクトロニクス産業は成熟の途を極めており、小型かつ高性能な素子を容易に入手できる時代になった。とりわけ医科学研究の高度化に向けて、患者や動物に低侵襲に使用可能な医療機器の開発において、ナノエレクトロニクスの果たす役割は極めて大きい。例えば、生体外からの医療機器の情報制御や管理が実現すれば、埋込型(インプ

下記の研究成果は、来るべき再生医療社会に向けて、手術、在宅療養、社会復帰後まで生体機能を維持・管理可能な医療機器開発における基盤技術になるものと期待される。



The top part of the figure is a schematic diagram of the experimental setup. It shows a cross-section of skin with a 'Target lesion' indicated by a red, green, and blue cone. Below the skin is a 'PDMS' layer, and an 'LED' is shown emitting light towards the skin. The bottom part of the figure shows two photographs of mice. The left mouse has a red laser-induced skin injury on its back, and the right mouse has a green LED-treated skin area on its back. Both mice have surgical incisions on their backs.

本研究の特筆すべき点として、①今回使用した緑および赤色 LED の光強度($< 100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$)は、従来の PDT で用いられているレーザー光の光強度($> 100 \text{mW}/\text{cm}^2$)の 1000 分の 1 であったこと、②従来の PDT では、組織透過性が低いことから検討されてこなかった緑光源を用いて抗腫瘍効果を示せたことが挙げられる。組織接着性ナノ薄膜を利用した埋め込み

型発光デバイスによる「低出力・長時間」光線力学療法であるメトロノミック PDT(mPDT)は、過度のレーザー光照射による組織温度の過剰上昇や周囲臓器の熱障害に伴う副作用を防ぐだけでなく、光の波長依存的な組織透過性の問題も克服できるため、難治性の深部がんに対する PDT の適用範囲の拡大が期待される。

研究テーマB「ナノ薄膜からなる神経電極の開発」

脳組織に対して神経電極の低侵襲な穿刺を目指すべく、柔らかい高分子ナノ薄膜とインクジェット印刷技術を組み合わせることでフレキシブルな神経電極を開発した(図2)。ナノ薄膜表面にインクジェット印刷にて微細配線(幅約 50 μm)を印刷した。この時、ナノ薄膜の柔軟性を利用して、電極先端部を螺旋状にねじることで、厚さ 6 μm , 幅 3 mm のシート形状を直径 200–300 μm の針状に成型し、脳内に穿刺可能な固さに加工した(図2)。

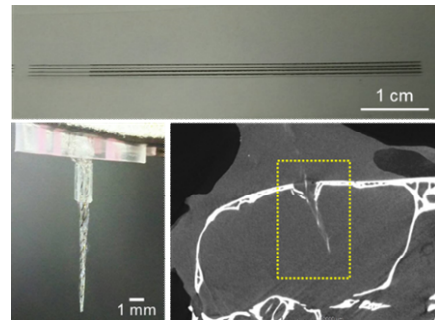


図2 ナノ薄膜から構成されるインジェクタブル神経電極。

次に、針先端部に電極構造を形成するため、刃物(例:ハサミ・カミソリ)による電極作製法を利用して微小電極の露出を試みた(幅約 100 μm , 厚さ約 120 nm)。この時、神経電極のインピーダンスは 800 k Ω –3 M Ω (at 10 Hz)であり、単一神経細胞の計測に求められる値が得られた。次に、神経電極をラット脳内に穿刺し、単一神経細胞の *in vivo* スパイクを計測した。マイクロ CT にて脳内の電極構造を観察したところ、針状の電極構造を維持したまま脳内に留まる様子が認められた。さらに、オプトジェネティクスに向けて、直径 500 μm の光ファイバにシート状神経電極を巻き付けることで、神経細胞への光刺激と活動電位のその場計測が可能なオプトロードを開発した。ChR2 発現ラットの海馬部に穿刺し、青色光(波長:470 nm)にて光刺激したところ、誘起された単一神経細胞の *in vivo* スパイクを計測することに成功した (ACS Appl. Bio Mater, in press (2019).)。

研究テーマC「ナノ薄膜状アンテナコイルからなる無線式発熱デバイスの開発」

電磁誘導や共振現象を利用して金属コイルに起電力を生じさせる無線給電は、導線を媒介することなくデバイスへの電力供給を可能にする電力伝送技術である。

本研究では、層状物質であるグラフェンフレークに着目し、ガラス基板上にインクジェット印刷にてグラフェンフレーク、次いで、金ナノインクを積層させたアンテナコイルを形成した。次に、ガラス基板からアンテナコイルを支持膜法にてポリ乳酸ナノ薄膜(膜厚 182 nm)に転写することで、柔軟性を有する薄膜状アンテナコイル(総膜厚: < 2 μm)を作製した(図3)。

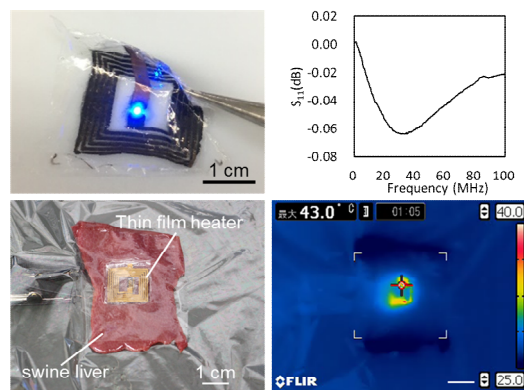


図3 生体組織に搭載可能なナノ薄膜状アンテナコイルと無線給電による加熱

この時、ファンデルワールス力で堆積するグラフェンフレーク層が分離することにより、印刷配線が導電性を維持したままガラス基板からナノ薄膜に転写される現象を見出した(特許出願・論文準備中)。次に、薄膜状アンテナコイルにチップ LED を搭載することで薄膜状の発光

デバイス(共振周波数: 33.0 MHz)を作製した。デバイスは柔軟性に優れ、折り曲げた状態でも無線給電(20 V_{p-p}, 30 MHz)にて青色 LED を点灯できた(放射照度 1.22 W/m², 給電距離 3 mm)。また、印刷配線のみを用いて回路を閉じることで、無線給電式の発熱デバイスを開発した。このデバイスを PDMS 薄膜にて封止したところ、生体組織表面(肝臓)で作動させることにも成功した(発熱温度: 43°C)。本研究は、生体内への光源の設置や生体外からの無線通信による薬剤徐放制御・センサ作動にも有用な技術であり、次世代の診断・治療用デバイスへの応用が期待される。

研究テーマD「ナノシート温度計を用いた *in vivo* 生体イメージング」

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。そこで、ナノシートの構成素材に温度感受性色素と非感受性色素をそれぞれ導入することで、筋組織の発熱をマッピング可能な「ナノシート温度計」を開発した。

具体的には、温度感受性色素である Eu-tris (dinaphthoylmethane)- bis-trioctylphosphine oxide (EuDT)と温度非感受性色素であるローダミン 800 (Rho800)をそれぞれ担持した 2 枚のナノシートを製膜した(各膜厚: 160 nm)。各ナノシートを重ね合わせて対象とする生体組織に貼付することでレシオメトリック型のナノシート温度計を開発した(図4)。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、蛍光実体顕微鏡下にて EuDT および Rho800 の蛍光像を別々取得してレシオメトリックな処理を施すと温度の分布がリアルタイムで計測できた。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。また、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できた(*ACS Appl. Mater. Interfaces*, **8**, 33377–33385 (2016)).

感受性色素の種類は温度以外にも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 や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する新しいセンサが期待される。

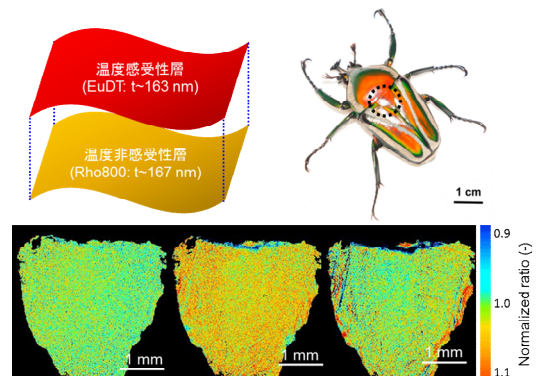


図4 温度計ナノシートを用いた昆虫筋肉組織の温度マッピング(論文4を改題して引用)。

3. 今後の展開

本研究を通じて、「プリンテッドナノ薄膜」という基盤技術を構築できたので、今後は「生体と機械の融合」を目標に、ナノエレ研究者(センサ・無線計測)や情報科学(ICT)分野の研究者と連携して分野横断型の研究に挑戦したい。また、埋め込み型デバイスは生体内という特殊な環境中(湿潤, pH, イオン, 体温)で安全に作動する必要があるため、エレクトロニクスを生体内に実装するための要素技術開発(防水・電源・無線)は引き続き JST 内でも検討すべき課題と考えられる。

4. 自己評価

【研究目的の達成状況】

本研究では、プリントエレクトロニクスと高分子ナノ薄膜を組み合わせることで、生体組織に取り付けて作動可能なデバイス(生体計測・治療・給電・通信技術)の開発を目的とした。研究計画は概ね順調であり、「プリントナノ薄膜」という生体とデバイスの融合技術を構築し、①生体接着性ナノ薄膜の開発と光がん治療応用、②ナノ薄膜からなる神経電極の開発、③ナノ薄膜状アンテナコイルの開発という具体的な成果物が特許出願や論文発表を通じて生まれた。特に、当該デバイスの医療応用に踏み込むことで、がん治療分野における無線給電式発光デバイスの有用性を示し、*Nature Biomedical Engineering* 誌での論文発表や JST からのプレスリリース:「世界初の光がん治療用埋め込みデバイス」に至った。さらに、本研究は埋め込み型デバイスだけでなく、スポーツ科学向けの装着型(ウェアラブル)デバイスにも有用であることを見出し、生体と機械の融合技術の開発がより一層進むものと期待される。

【研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)】

さがけ研究期間を通じて、独立して研究を実施できる体制であった。特に、早稲田大学先進理工学部生命医学科武岡研究室の大学院生に参加してもらった点は研究遂行の上で非常に大きな支援となった。また、期間を通じての研究費は潤沢な状況にあり、必要に応じて追加支援制度を利用することで、研究遂行に必須となる装置類を調達できた。

【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果】

本研究を通じて、「プリントナノ薄膜」という基盤技術を構築できたので、今後は生体と機械の融合を目標に、ナノエレ研究者(センサ・無線計測)や ICT 分野の研究者と連携することで、CREST 研究にも展開してゆきたい。とりわけ、埋め込み型デバイスのように生体と機械(デバイス)が接する界面には、材料・デバイスの設計論や生体反応の制御も含めて整備すべき課題が数多くあり、多様な研究者の参画が求められる。この点において、今後はソフトロボティクスのような柔らかい生体を対象とする素材・デバイス・システムの開発が必要になると考えられ、潜在的に産業的利用価値の高い科学技術が生まれるものと予想される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Yamagishi, K., Takeoka, S., Fujie, T.*(Corresponding). Printed Nanofilms Mechanically Conforming to Living Bodies. *Biomater. Sci.*, in press (DOI: 10.1039/C8BM01290C). Themed Collection: *Biomaterials Science Emerging Investigators 2019*.
2. Yamagishi, K., Kirino, I., Takahashi, I., Amano, H., Takeoka, S., Morimoto, Y.*, Fujie, T.*(Corresponding). Tissue-adhesive wirelessly powered optoelectronic device for metronomic photodynamic cancer therapy. *Nat. Biomed. Eng.*, **3**, 27–36 (2019). Highlighted by “*EurekAlert!*”.
3. Kokubo, N., Arake, M., Yamagishi, K., Morimoto, Y., Takeoka, S., Ohta, H., Fujie, T.*(Corresponding). Inkjet-Printed Neural Electrodes with Mechanically Gradient

Structure. <i>ACS Appl. Bio Mater.</i> , in press (DOI: 10.1021/acsabm.8b00574).
4. Miyagawa, T., <u>Fujie, T.*</u> (Corresponding), Ferdinandus, Vo Doan, T. T., Sato, H.*, Takeoka, S.* Glue-free stacked luminescent nanosheets enable high resolution ratiometric temperature mapping in living small animals. <i>ACS Appl. Mater. Interfaces</i> , 8 , 33377–33385 (2016). Highlighted by “ACS Editors’ Choice”.
5. <u>Fujie, T.*</u> (Corresponding). Development of free-standing polymer nanosheets for advanced medical and health-care applications. <i>Polym. J.</i> , 48 , 773–780 (2016). Focus Review Collection and Selected for Cover Art.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 8件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

1.

発 明 者: 藤枝 俊宣, 鉄 祐磨, 小久保 奈々, 武岡 真司

発明の名称: 生体用電極および生体用電極の製造方法

出 願 人: 早稲田大学

出 願 日: 2017/9/1

出 願 番 号: 特願 2017-168271

2

発 明 者: 藤枝 俊宣, 山岸 健人, 佐藤 信孝, 高橋 功, 武岡 真司

発明の名称: 高い接着性を有する非水溶性自立性薄膜

出 願 人: 早稲田大学

出 願 日: 2017/4/25

出 願 番 号: PCT/JP2017/16283

3.

発 明 者: 藤枝 俊宣, 宮川 拓也, 山岸 健人, 武岡 真司, 新井 敏, 鈴木 団, 佐藤 裕崇, VO DOAN Tat Thang, Ferdinandus

発明の名称: 超薄膜光ルミネッセンスセンサー

出 願 人: 早稲田大学・南洋理工大学

出 願 日: 2016/10/28

出 願 番 号: PCT/JP2016/82056

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会発表(海外招待講演リスト)】

- [1] Fujie, T. Ultra-Flexible Polymer Nanosheet for Bio and Electronics Applications, First International Conference on 4D Materials and Systems. (2018.8.29., Yonezawa).
- [2] Fujie, T. Polymer Nanosheets as Flexible Building Blocks for Bio-Hybrid Systems, The 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS). (2018.7.17., Honolulu).
- [3] Fujie, T. Development of Printed Nanofilms for Bio-Integrated Devices, 35th International Conference of Photopolymer Science and Technology (ICPST). (2018.6.28., Makuhari).
- [4] Fujie, T. Printed Nanofilms for Biomonitoring Technologies, International Conference on Molecular Electronics and Devices (IC ME&D 2018). (2018.5.11., Daegu).

- [5] Fujie, T., Free-Standing Polymer Nanosheet for Bio-Monitoring Technologies. LbL 2017 Conference (2017.6.18., Seoul).

【受賞】

- [1] 平成 30 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞:「プリントドナノ薄膜の創製と生体計測制御に関する研究」(2018 年 4 月 10 日).
- [2] 日本バイオマテリアル学会 2017 年度バイオマテリアル科学奨励賞:「生体計測・制御システムに向けたプリントドナノ薄膜の創製」(2017 年 11 月 20 日).
- [3] 一般財団法人田中貴金属記念財団 貴金属に関わる研究助成金(萌芽賞):「オプトジェネティクスに向けた無線給電式インジェクタブル発光デバイスの開発」(2016 年 3 月 31 日).

【著作物】

- [1] Yamagishi, K., Taccola, S., Takeoka, S., Fujie, T.*(**Corresponding**), 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.

【プレスリリース】

- [1] JSTプレスリリース, シールのように貼れる無線給電式発光デバイスを用いた光がん治療システム～生体内の暗闇に光を灯す新技術:次世代型光がん治療として期待～(2018 年 7 月 14 日). 日経産業新聞・日刊工業新聞・EurekAlert などに掲載

【ニュースレター】

- [1] 藤枝俊宣. 高分子ナノ薄膜による生体電子化技術の開発. **さがけニュースレター**, 4, 13-14 (2018).