



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Intracellular pH Monitoring at Individual Single Cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	張, 強
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(情報科学)
Dissertation Number	甲第14750号
Issue Date	2021-12-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/83864">https://hdl.handle.net/2115/83864</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Qiang_Zhang_review.pdf, 審査の要旨



## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (情報科学) 氏名 張 強

審査担当者 主 査 教 授 雲林院 宏  
副 査 教 授 岡嶋 孝治  
副 査 教 授 平田 拓  
副 査 准教授 平井 健二

### 学位論文題名

## Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Intracellular pH Monitoring at Individual Single Cells

(単一細胞内 pH 分析を指向した表面増強ラマン分光法)

張強氏は、表面増強ラマン散乱を用いた細胞内 pH センサーの開発に関する研究を遂行した。第一章では、がん組織を例に細胞内 pH 変化を時系列で追従する意義を述べ、細胞内 pH センサーの現状について述べた後、本学位論文の目的を「増強ラマン散乱を利用した単一細胞内時系列 PH センシングの開発」と設定した。第 2 章では、ナノ粒子を用いた細胞内 pH センサーの改良を行った。ナノ粒子 pH センサーは、ナノ粒子表面に pH 感受性分子を修飾し、pH 変化に伴う感受性分子のラマン散乱変化を解析することで実現される。その際、pH 感受性分子の見かけの pKa 値がナノ粒子の曲率によって依存することに着目し、粒子の曲率を上げることで pH センサー能力の向上が図れると考え、局所的に大きな曲率を有するフラワー状の銀ナノ粒子の合成法を新たに開発した。また、長時間 pH センシングを実現するため、銀ナノ粒子の細胞 (光) 毒性を低下させる必要があることを見出し、銀ナノ粒子表面を数 nm の金原子層でコーティングする方法を最適化した。その結果、(1) 曲率を増加させることにより生化学的に重要である pH4~8 の範囲でのセンサー感度を著しく向上し、(2) 金原子層で覆うことで細胞毒性を顕著に低下させることに成功した。このフラワー状金コート銀ナノ粒子を用いることで、24 時間以上単一細胞内 pH を継続的に測定することが可能であることを示した。これは、低い細胞毒性と高い pH センシング能の両方を有しているからこそ可能であり、がん細胞組織内の複雑な pH 挙動の長時間に渡る追従に有益であり、さらなる応用が期待される技術の開発である。第 3 章では、上記ナノ粒子を用いた細胞内センシングの限界を解決すべく、細胞内にナノワイヤーを物理的に挿入する細胞内内視鏡法を用いた新たな pH センシングの開発に取り組んだ。ナノ粒子を用いた場合、ナノ粒子はエンドサイトシスにより細胞に取り込まれ、小胞体 (エンド・ライソソーム) 内部にとどまるため、細胞質や核内の pH 測定は困難である。この課題を解決すべく、先鋭化した針を物理的に細胞内に挿入する手法が提案されているが、針の経が大きく細胞膜を大きく傷つけてしまうため生きた細胞の pH 測定を継続的に行うことは未だ困難であるのが現状である。そこで本学位論文では、直径 100 150nm の 1 次元銀ナノワイヤーをプローブとして用いることを提案し、第 2 章で得られた知見をもとに、pH5 8 で感度を有する新たな 1 次元 pH プローブを開発した。具体的には、レーザー光をナノワイヤーの先端部に集光することで、集光部分にのみ金ナノ粒子を析出させる「光デポジション法」を利用して、高曲率を有した金ナノ粒子群を局所的に析出させた 1 次元銀ナノワイヤープローブを新たに開発した。このプローブが、第 2 章のフラワー状ナノ粒子と

同程度の pH 感受性を pH5.8 の範囲で示すことを確認した。これを用いて抗がん剤を与えた細胞質または核内の pH 変化を時系列で追従することに初めて成功した。得られた結果を、広く用いられている蛍光分子を用いた細胞内 pH センサーと比較することで、本研究で開発した手法では、(1)pH の絶対値が得られ、(2) 細胞の任意位置での pH センシングが可能である点で優れていることを実験的に示した。第 4 章では、新たに開発した単一細胞内 pH センサーを用いることで今後追求できうる生化学的問題について述べて結論としている。本学位論文の内容は査読あり国際科学雑誌 2 篇に出版されている。

これを要するに、著者は表面増強ラマン散乱を利用した細胞内 pH センシング開発に関する研究を行い、従来困難であった細胞内任意位置での pH 検出を初めて可能とし、生化学分野やセンシング分野に多大なる貢献をした。よって、筆者は北海道大学博士 (情報科学) の学位を授与される資格があるものと認める。