

整理番号	H29-J-004	報告者氏名	久本 秀明
------	-----------	-------	-------

研究課題名

完全液状化発色性酵素基質分子液体の創製と極限感度健康診断デバイスへの展開

<代表研究者> 機関名：大阪府立大学大学院工学研究科 職名：教授 氏名：久本秀明

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

本提案では、従来固体粉末状であることが常識だった化学センサー用疎水性色素分子を「分子として完全液状化」することによってセンサー液膜への溶解度の限界を打破し、これまで視認検出が困難だったマイクロ診断デバイスを極限まで高感度化・高速化することを目的としている。これは視認診断精度の向上に直結する。

上記の目標達成に向け、以下の研究項目を実施した。

研究項目 1) 発色性酵素基質分子液体の設計・合成と油水界面酵素反応効率評価

研究項目 2) 凹凸組み合わせ型キャピラリーバイオセンサーの作製と分析性能評価

研究項目 1 では酵素反応後に生成する色素分子を液状化した薄膜作製と変色特性の基礎検討から着手した。ここではアニオン応答の基礎検討の結果、酸・塩基溶液に対する高速・高感度な応答を示すことを明らかにした。この成果をこれまで応答時間が長く感度が悪いことが問題だった血清中へパリン測定へ展開したところ、従来は過渡的な応答を取らざるを得なかったへパリンに対して平衡応答をとることができ、しかも応答時間も 60 秒程度と、極めて迅速であることを明らかにした。また、最終的に当初目的である発色性酵素基質分子液体の合成を試みたところ、その合成に成功し、液状となることを明らかにした。現在、合成量が少量であるために追加合成を試みており、合成が終了次第、油水界面酵素反応効率の評価を進める。

研究項目 2 は研究項目 1 と同時並行で実施した。ここでは我々が過去に開発した凹凸組み合わせ型キャピラリーバイオセンサーを、目視検出に適した形状に改良したデバイス作製を試みた。直径約 3mm 程度の見やすい円形状でありながら、流路深さを 100 ミクロン程度にすることによってマイクロ空間の特性を生かしたデバイス作製に成功した。また、この構造体上に、色素液体膜を固定化する方法の開発を試みた。ここでは犠牲層となるポリビニルアルコール (PVA) 基板の上にスピコート法で作製した超薄センサー液膜を凸型基板の凸部のみに選択的に固定することに成功した。これは多様な形状の凸型基板の上に極めて薄いセンサー膜を作製できる極めて有用な手法である。また、そのデバイスを用いた分析性能評価も行った。

これらの成果は口頭発表・ポスター発表・英文論文・英文学会プロシーディングとしてまとめた。特に論文については Hot Article に選定され、高い評価を得ている。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

（口頭）

極限濃度色素液体薄膜の開発と高感度・高速マイクロ分析デバイスへの展開(依頼講演)
日本分析化学会第67年会 2018年9月12日-14日(宮城県仙台市)
久本秀明

（ポスター）

疎水性色素液体: 多種同時検出を指向した可溶性膜固定化マイクロ流路デバイスへの応用
日本分析化学会第67年会 2018年9月12日-14日(宮城県仙台市)
水田巽, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明

疎水性色素液体: 高速ヘパリン応答マイクロデバイスの開発と血清試料測定への応用
日本分析化学会第67年会 2018年9月12日-14日(宮城県仙台市)
西畑俊輝, 水田巽, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明

疎水性色素液体: 極限色素濃度PVC膜センサーの開発とマイクロ流路デバイスへの展開
日本分析化学会 第78回分析化学討論会 2018年5月26日-27日(山口県宇部市)
水田巽, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明

疎水性色素液体・可塑化PVC・イオン選択性オプトード・アニオンセンサー・マイクロ流路アレイ型デバイス
日本化学会第98春季年会 2018年3月20日-23日(千葉県船橋市)
水田巽, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明

疎水性色素液体: 高速・高感度ヘパリン検出への応用
日本化学会第98春季年会 2018年3月20日-23日(千葉県船橋市)
西畑俊輝, 水田巽, 高居周生, 末吉健志, 遠藤達郎, 久本秀明

（誌上）

Regioselective immobilization of a PVC membrane composed of an ionic liquid-based dye on convex-shaped PDMS surface for multiplexed microanalytical devices
Tatsumi Mizuta, Kenichi Maeno, Kenji Sueyoshi, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto
Analytical Sciences, 2018, 34(5), pp. 517-519 (**Hot Article に選定**)

"Dyed plasticizer": application to rapid and highly sensitive heparin detection based on PDMS microchannel array devices
Toshiki Nishihata, Tatsumi Mizuta, Kenji Sueyoshi, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto
Proceedings of Micro Total Analysis Systems 2018, pp.884-885

Position-selective immobilization of sensor membranes on convex-shaped PDMS chip for naked eye-based multiplexed detection
Tatsumi Mizuta, Kenichi Maeno, Kenji Sueyoshi, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto
Proceedings of Micro Total Analysis Systems 2018, pp.994-995

<研究の目的、経過、結果、考察（5000 字程度、中間報告は 2000 字程度）>

（目的）

本提案の目的は、従来固体粉末状であった化学センサー用疎水性色素分子を「分子として完全液状化」することによってセンサー液膜への溶解度の限界を打破し、これまで視認検出が困難だったマイクロ診断デバイスを極限まで高感度化・高速化することにある。これは視認診断精度向上に直結する。

現在の癌・心疾患簡易診断デバイスは操作が簡便である一方、多種同時検出は困難であり、診断精度向上に不可欠な検出下限改善の努力も限界にきている。一方、我々はごく最近、マイクロ流路を活用した簡便な 1 ステップ健康診断デバイスを開発した。しかしこのデバイスは容易に多種同時検出へ適用できる一方、検出は蛍光法に頼っていたために大型検出装置が必要であり、本技術の普及には至っていない。この問題解決にはデバイスの検出部に用いている蛍光基質含有疎水性ポリマー膜に多量の発色性基質分子を包括して視認感度を向上させることが有効であるが、通常発色性基質分子は固体粉末状のため、高濃度化すると析出してしまいう問題があった。

そこで本研究ではこの疎水性蛍光酵素基質分子を完全に液状化した「発色性酵素基質分子液体」を新規に創製する。これは極限濃度の色素分子液体と考えられ、従来比数百倍の色素分子を包含できるため、極限感度を有する化学センシング液膜を作製できる。

本研究はこの化学センシング液膜を作製して油水界面酵素反応の超高感度化・高速化を達成し、申請者が開発してきた 1 ステップ健康診断デバイスに適用してこの方法の普遍的有用性を明らかにすることが最終目標である。

（経過）

上記の目標達成に向け、以下の研究項目を実施した。

研究項目1) 発色性酵素基質分子液体の設計・合成と油水界面酵素反応効率評価

研究項目2) 凹凸組み合わせ型キャピラリーバイオセンサーの作製と分析性能評価

研究項目 1 では酵素反応後に生成する色素分子を液状化した薄膜作製と変色特性の基礎検討から着手し、その過程で見出したアニオン応答の基礎検討と、これまで応答時間が長く感度が悪いことが問題だった血清中ヘパリン測定への展開も行った。また、最終的に当初目的である発色性酵素基質分子液体の合成も達成した。

研究項目 2 は研究項目 1 と同時並行で実施した。ここでは我々が過去に開発した凹凸組み合わせ型キャピラリーバイオセンサーを、目視検出に適した形状に改良したデバイス作製および、色素液体膜を固定化する方法の開発に成功した。また、そのデバイスを用いた分析性能評価も行った。

以下、その成果について詳細をまとめる。

（結果・考察）

研究項目1) 発色性酵素基質分子液体の設計・合成と油水界面酵素反応効率評価

ここではまず酵素反応後に生成する色素分子（図 1）を液状化した薄膜作製および性能評価の基礎検討から着手した。図 1 の色素液体とポリ塩化ビニル（PVC）を 9 : 1 の割合で含むテトラヒドロフラン溶液をスピコートし、膜厚約 140nm の超薄膜を作製した。この膜は液膜としての性質を示し、酸・塩基溶液に対して迅速かつドラスティックな変色をすることがわかった。

図 2 に典型的なスペクトル変化の挙動を示す。酸性では基本骨格となるフルオレセイン分子がプロトン化した際に現れるスペクトルを示し、水溶液の pH 上昇に伴って色素部位の脱プロトンが進み、約 530nm 付近のピークが上昇していくことがわかる。この膜ではテトラアルキルホスホニウムカチオン、色素部位ともに疎水性が極めて高いことから、変色応答機構はプロトンとアニオンの協同抽出メカニズムを考える必要がある。つまり、変色挙動は水溶液中の pH およびアニオン濃度によって支配されるため、pH を一定にした緩衝液を用いれば、アニオン濃度測定に応用できる。図 2 でもう一つ注目すべき点は、縦軸の吸光度の値である。この膜は膜厚が

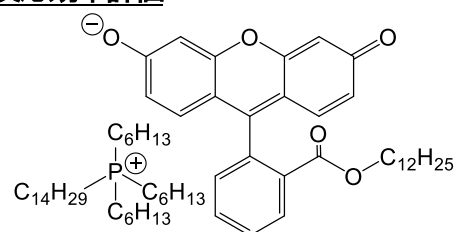


図1 色素液体

140nm しかないにも関わらず、酸・塩基溶液接触時の吸光度差が約 0.6 ほどもあり、極めて高感度であることがわかる。この膜では、膜内色素濃度は約 915 mmol/kg となり、通常の可塑化 PVC 膜を使ったセンサーでは約 5 mmol/kg 程度しか色素を含まないことを考えると、単純計算で約 180 倍もの高感度化が達成されている。さらに、この膜は超薄膜であるため、迅速な応答も期待できる。図 3 は色素液体薄膜の酸・塩基溶液に対する可逆応答性と、応答時間を示す。この場合の相対標準偏差は RSD=0.24% (n=5) であり、極めて高い可逆応答性を示している。これはホスホニウム部位・色素部位ともに疎水性が十分に高く、水相への漏れ出しがほとんどないことを示しており、また、疎水性の高い色素を用いる有用性を示している。応答時間も約 0.6 秒と極めて迅速であった。色素液体を用いる膜では、色素濃度が極めて

高いために膜厚を極限まで薄くすることができ、それでも上述のように高い吸光度が得られるため、応答時間と感度に関しては、この色素液体膜を用いた極限の性能を引き出しているといえる。

このように迅速な応答を示す超薄膜の応用として抗血液凝固薬として知られるヘパリン測定への応用を試みた。ヘパリンは水溶性の高分子電解質アニオンであり、これまで多数のセンサーが報告されてきている。中でも可塑化 PVC 膜を用いたセンサーでは高分子アニオンの遅い拡散のために応答時間が極めて長く、平衡応答をとれないために 10 分程度の時間で区切って過渡的な応答を見る、という方法が報告されていた。本研究で作製した膜を用いた結果を図 4 に示す。縦軸は吸光度から計算される脱プロトン化度である。この結果から、本研究で開発したセンサー膜は、高分子アニオンの測定であるにもかかわらず、約 60 秒程度の迅速な応答を示し、しかも、これまで過渡的な応答を取らざるを得なかったのに対し、ほぼ平衡応答をとれていることがわかる。吸光度の変化量も過去の報告では 10% 足らず (つまり α の値で 0.1 程度) であったのに対し、0.35 程度の変化量を示すことから、高感度化も達成された。

これらの基礎的な検討を踏まえ、発色性酵素基質分子液体の合成を試みた。いくつかの合成方法を試みたところ、図 5 に示すように、当初予定のアルカリフォスファターゼ (ALP) に応答する色素液体の合成に成功した。現在、得られた絶対量が少量であったため、追加合成を試みている。一定量の発色性酵素基質分子液体が得られ次第、その評価を行う。

これら

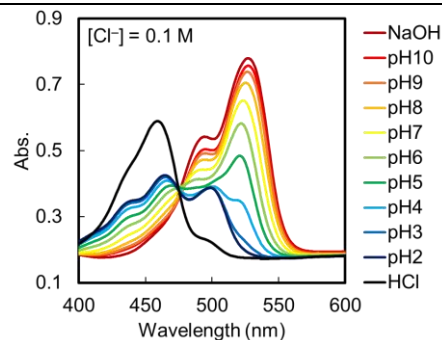


図2 色素液体薄膜の吸収スペクトル変化

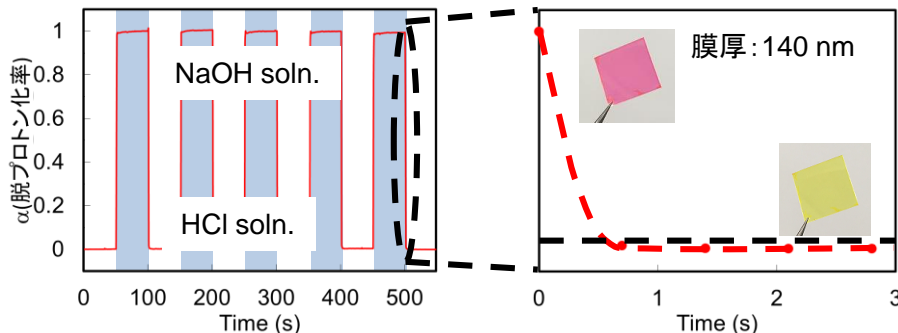


図3 色素液体薄膜の可逆応答性と応答速度

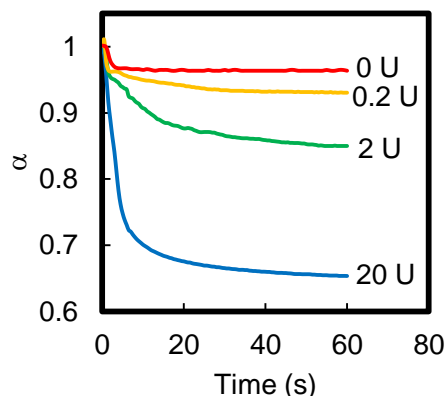


図4 色素液体薄膜のヘパリンへの応答

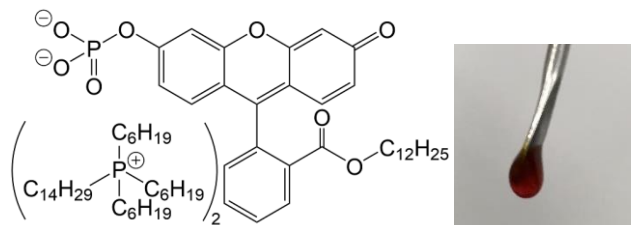


図5 合成に成功した発色性酵素基質分子液体

研究項目2)凹凸組み合わせ型キャピラリーバイオセンサーの作製と分析性能評価

研究項目2では凹凸組み合わせ型キャピラリーバイオセンサーの作製を試みた。これは凹型と凸型のポリジメチルシロキサン (PDMS) 基板にあらかじめ多様な分析試薬や高機能薄膜を固定化しておき、それらを組み合わせで作製する。凹凸サイズのデザインで、様々なサイズの高機能性キャピラリー状空間を作製できる。ここに試料溶液を毛細管現象で吸い上げるだけで内壁に固定された機能分子・試薬に基づく多段階反応が自発的に進行するため、簡便な1ステップ測定ができるデバイスである。あらかじめ

キャピラリーを二つに分割している構造から、多様な分析試薬を非接触で固定化できるため、酵素—基質の組み合わせや抗原—抗体の組み合わせのように、互いに反応する試薬も独立して同じ空間内に固定でき、タンパクや酵素、電解質検出など、多様な検出系を1ステップにデザインできる利点がある (Lab Chip 2012, 12, 204. Lab Chip 2012, 12, 1522. Analyst 2013, 138, 3158. Lab Chip 2013, 13, 4304. RSC Adv. 2014, 4, 7682. Anal. Sci. 2017, 33, 969.参照)。このデバイスは蛍光顕微鏡検出用にデザインされたものであるために流路幅が約 500 ミクロンと狭く、視認する際には少々見づらかった。そこでここでは検出部位のサイズを直径 3mm 程度とし、検出部の流路深さを 100 ミクロン程度とすることによって、視認性とマイクロ空間の利点を併せ持つデバイス作製を実施した。また、色素液体膜は膜厚が数百 nm と極薄であるため、当初想定していたスタンピング法では一定の固定化はできるものの色ムラが出る等の問題もあり、この方法による凸型 PDMS 基板上的凸部への均一な固定化は、歩留まりの上では効率が悪いことが予備実験でわかったため、ここではこの問題を解決するために図6に示す新固定化法を開発した。この方法では、あらかじめ色素液体 PVC 膜をポリビニルアルコール (PVA) の基板上にスピンコート法によって作製しておく。凸型 PDMS 基板上的円柱状構造のレプリカ型のポリエチレンテレフタレート (PET) 基板をマスクとして用い、その上から PVC 面を下にして PVA 基板を貼り合わせる。その状態で水に浸漬すると PVA 基板が水に溶解し、スピンコートで作製した PVC 膜が露出する。その後 PET マスクをはがす際、PVC 膜と PDMS 基板の密着性の強さにより、PVC 膜がきれいな円形に残存する。つまり本法は、PVA 基板を犠牲層として用いることによって、スピンコート法で膜厚を制御して作製した色素液体 PVC 膜を、膜厚を維持したまま固定できる極めて有用な手法である。図6に示すように、多様な形状、あるいは多種類の膜も1枚の基板に作製できることも明らかにした。また、図7にはソフトウェアとして Image J を用い、決められた一定ピクセル数の色強度を検出 (右図では円形破線内の直径 20 mm 分 316 ピクセルを検出) して、色の平均強度 (Ave)、相対標準偏差 (RSD) を評価した結果を示す。ピクセルごとの RSD が極めて小さいことから、ここで開発した固定化法が極めて有用なほうほうであることを示すことができた。

本提案の研究は現在も継続中であるが、以上の成果を基に、診断デバイス開発につなげていきたい。最後になりますが、本研究を行うにあたり、助成いただいた泉科学技術振興財団に厚く御礼申し上げます。

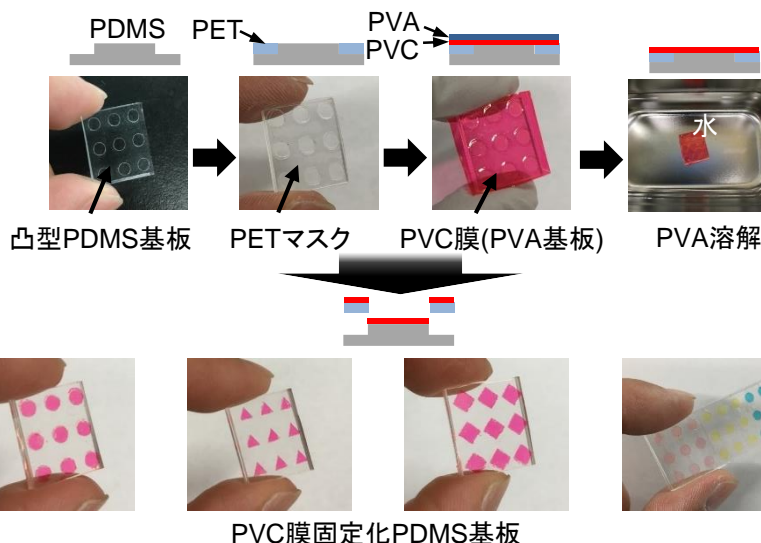


図6 凸型PDMS基板上へのPVC膜固定化

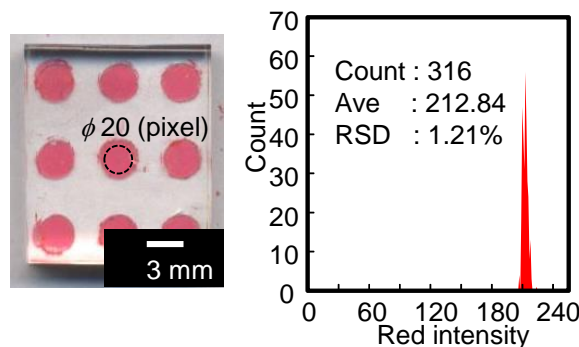


図7 凸型PDMS基板上に固定したPVC膜の色強度分布