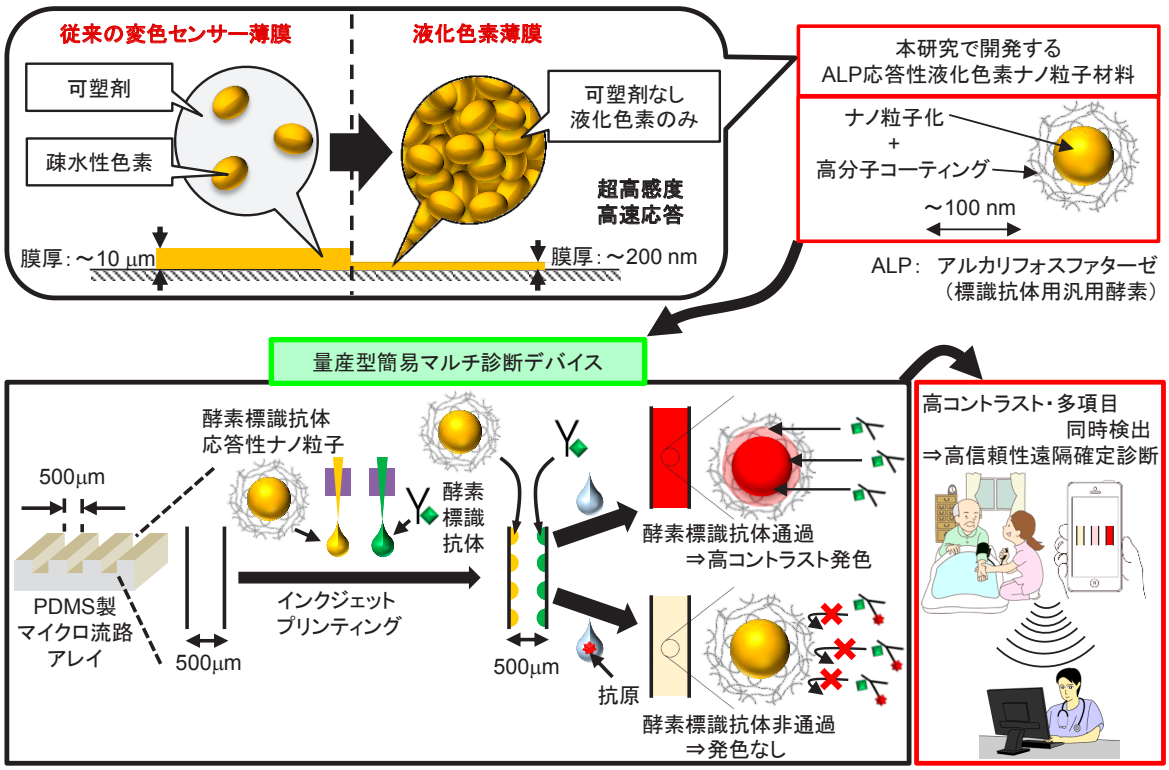
92　液化色素ナノ粒子によるマルチ診断デバイス開発	久本　秀明

【目的】今後の普及が予想される遠隔、在宅での血液検査に基づく確定診断精度向上に寄与できる「超高感度1 ステップイムノアッセイ用液化色素ナノ粒子材料」の創製とマルチ診断デバイスを開発する。
【方法】1. 分子サイズ選択透過性・酵素基質液化色素ナノ粒子の創製・評価：酵素標識抗体の標識酵素として汎用性の高いアルカリフォスファターゼ（ALP）に変色応答する液化色素を合成した。高速攪拌下の水溶液に分散させて液化色素ナノ粒子を作製し、蛍光強度変化を系統的に評価した。また、従来型のナノ粒子も同時に作製し、感度の違いを評価した。2. インクジェットプリントに基づく超高感度・量産型 1 ステップ診断デバイスの作製・評価：本項目ではインクジェットプリント技術でポリジメチルシロキサン（PDMS）製流路内の両サイドにスポッティング固定したデバイスを作製し、診断マーカー（CRP）への蛍光応答を評価した。
【結果】1. 分子サイズ選択透過性・酵素基質液化色素ナノ粒子の創製・評価：ALP 応答性液化色素ナノ粒子の作製に初めて成功した。粒子サイズは約 165 nm 程度であった。ALP に対する著しい蛍光強度の増加が確認され、従来型と比較したところ、約 3.8 倍高感度であることが明らかとなった。2. インクジェットプリントに基づく超高感度・量産型 1 ステップ診断デバイスの作製・評価：インクジェットプリント法に基づく試薬固定化法を確立した。流路内両サイドに固定する方法が再現性良い固定に重要であることを明らかにした。試薬固定化時の添加剤濃度を最適化し、カットオフ値を含む濃度範囲の CRP に応答するデバイス作製に成功した。

本研究のコンセプト図



92. 液化色素ナノ粒子によるマルチ診断デバイス開発

久本　秀明

大阪府立大学 大学院工学研究科 応用化学分野

Key words：液化色素，酵素応答性イオン液体，ナノエマルション，イムノアッセイ，マイクロ分析デバイス

緒　言

遠隔診療における血液診断として最近、血糖自己測定のように自分の指先から微量の血液を採取し、サービス提供会社に送付すると数週間後に結果が送られてくる「血液検査キット」を用いる方法が普及し始めている。しかしながら、厚生労働省が実施した「在宅医療における医療機器等ニーズ調査」の報告書・資料によると、容態が変化しやすい高齢者の在宅医療現場では、血糖自己測定と同じ要領で「CRP」「HbA1c」「クレアチニン」「生化学などの他項目」等が、その場でわかるツール開発の強い要望がある［1］。

一方、我々はごく最近、従来固体粉末状であることが常識であった化学センサー用疎水性色素分子を、溶媒に溶解することなく液化した「液化色素」を開発してセンサー液膜とし、溶解度の限界を打破した極限的な高感度化ができることを明らかにした［2〜4］。そこでこの高感度な液化色素材料を微細なナノ粒子材料として、安価な量産に直結するインクジェット固定できるデバイスとするアイディアを着想した。このデバイスは、高コントラスト変色に伴う定量感度向上・多項目同時検出できることから、在宅検査の変色画像をスマートホンカメラで医師に送ればその場で確定診断できるデバイスとなることが期待される。

本研究では研究項目を 1. 分子サイズ選択透過性・酵素基質液化色素ナノ粒子の創製・評価、2. インクジェットプリントに基づく超高感度・量産型 1 ステップ診断デバイスの作製・評価、の二つに分けて研究を進めた。1 では酵素基質液化色素ナノ粒子の創製に成功した。また、2 ではインクジェットプリント型 1 ステップ診断デバイス試作を同時進行させるため、抗体試薬を用いて診断マーカータンパク（C-reactive protein：CRP）検出を試みた結果、診断濃度域の CRP 検出に成功した。

方　法

1. 分子サイズ選択透過性・酵素基質液化色素ナノ粒子の創製・評価

ここでは酵素標識抗体の標識酵素として汎用性の高いアルカリフォスファターゼ（ALP）に変色応答する疎水性色素材料を合成し、テトラアルキルホスホニウム塩とイオン交換させて酵素標識抗体応答性液化色素合成から着手した。液化色素とポリエチレングリコール（PEG）系界面活性剤の F127 を混合したテトラヒドロフラン溶液を一定流量で、高速攪拌下の水溶液に分散させ、液化色素ナノ粒子を得た。粒子サイズは動的光散乱装置・透過型電顕（TEM）で評価した。ALP 溶液を液化色素ナノ粒子溶液に混合し、ナノ粒子溶液の蛍光強度変化を系統的に評価した。また、従来型のナノ粒子も同時に作製し、感度の違いを評価した。

2. インクジェットプリントに基づく超高感度・量産型 1 ステップ診断デバイスの作製・評価

本項目では蛍光標識 CRP および、抗 CRP 抗体修飾酸化グラフェンを用い、インクジェットプリント技術でポリジメチルシロキサン（PDMS）製流路内の両サイドにスポッティング固定したデバイスを作製した。ここでは固定化マトリックスとして用いるトレハロース量が再溶解時の拡散に及ぼす影響を蛍光顕微鏡で強化した。また、ここに CRP 溶液を導入した際の蛍光強度から応答濃度範囲を評価した。

結果および考察

1.　分子サイズ選択透過性・酵素基質液化色素ナノ粒子の創製・評価

酵素基質液化色素ナノ粒子を作製した。その ALP に対する応答機構を図 1 に示す。作製したナノ粒子は疎水性であるため、油水界面が存在する。その油水界面で ALP とナノ粒子中の蛍光基質部位にあるリン酸基が反応し、親水性の高いリン酸は水相に放出されるが、ナノ粒子中に過剰に存在する脂溶性ホスホニウムカチオン（以下 P_{66614}と略記）との電荷バランスを保つために水相中のアニオンを抽出する機構で発蛍光する。

実際の ALP に対する応答は図 2 の写真に示す通りであり、ALP の存在により、強く発蛍光することがわかる。このナノ粒子は動的光散乱（DLS）法で評価した結果、平均粒径が約 165 nm であり、図 2 に示す TEM 画像からも妥当な数値と考えている。

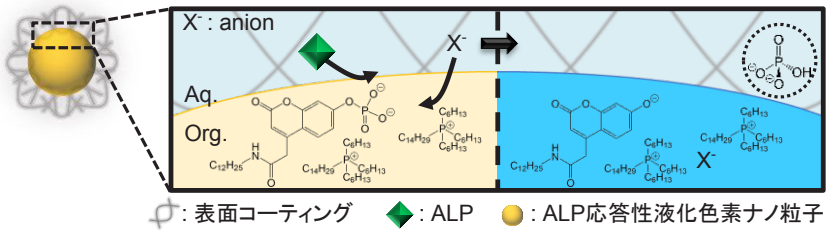


図 1.　ALP 応答性液化色素ナノ粒子表面での酵素反応機構

・ナノ粒子ー水溶液界面でのALP分子ー酵素基質部位のリン酸基との酵素反応。

・リン酸基の水相脱離および水相中アニオン（X^-）の抽出を伴う酵素基質部位の発蛍光。



図 2.　作製した ALP 応答性液化色素ナノ粒子の蛍光応答および TEM 画像

ナノ粒子分散液（左）へのALP添加に伴う発蛍光増強および、ナノ粒子溶液乾燥後のTEM画像。

次に、従来型のナノ粒子を同じ酵素基質液化色素で作製し、その ALP に対する応答挙動を比較検討した。ここでは従来法でナノ粒子の主成分として使われていた可塑剤（セバシン酸ジオクチル：DOS）に酵素基質ナノ粒子を溶解させ、同様の実験を試みた結果を図 3 に示す。本法（PC-NE）の結果同様に、従来法（DOS-NE）でも ALP 活性の上昇とともに蛍光強度は増加するが、圧倒的に本法で作製したナノ粒子の方が高感度（約 3.8 倍）に応答することが分かった。

現在、このナノ粒子の表面修飾の評価を継続しており、ALP 標識抗体の選択透過を検討している。抗原抗体複合体および ALP 標識抗体の分離条件が確立次第、免疫診断の評価を実施する。

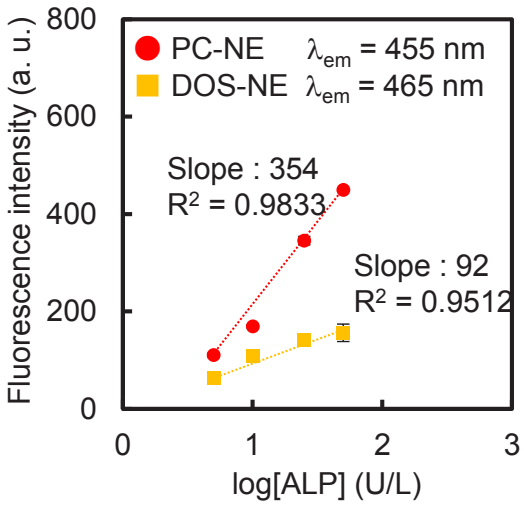


図 3. 作製した ALP 応答性液化色素ナノ粒子（PC-NE、蛍光波長 455 nm）および従来型ナノ粒子（DOS-NE、蛍光波長 465 nm）の蛍光応答比較

Slope：傾き（蛍光強度/ALP濃度の対数）、R^2：相関係数。

2. インクジェットプリントに基づく超高感度・量産型 1 ステップ診断デバイスの作製・評価

ここではまず、インクジェットプリントに基づく試薬固定法を検討した。今回、2 種類の異なる反応性試薬を同じ流路内に固定する必要があることから、流路に沿って交互に固定する方法を当初試みた。しかしながら、図 4A に示す通り、試薬液滴の乾燥過程で試薬液滴が壁面付近に移動してしまう現象が見られたことから、その現象を逆手に取り、敢えて壁面付近に吐出する方法を試みたところ、非常に再現性良く壁面付近に試薬が付着し、固定化できることを見出した（図 4B）。

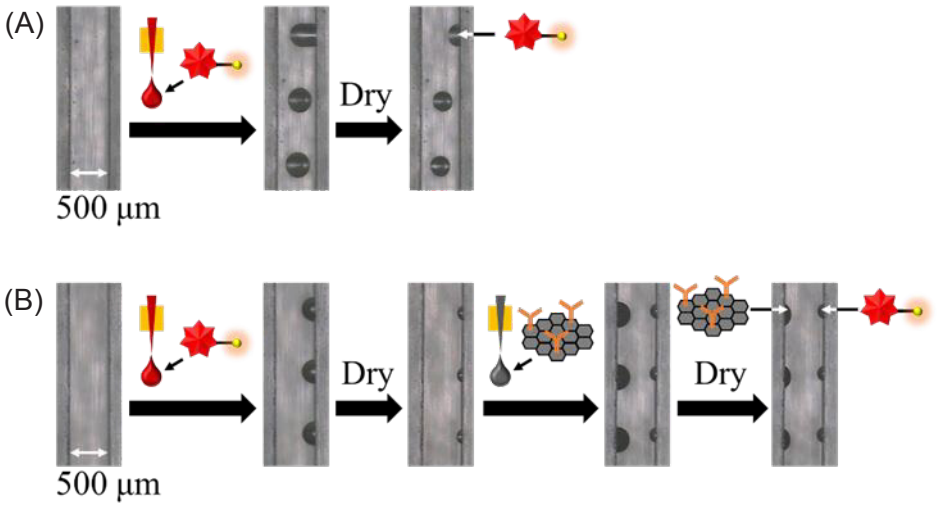


図 4. インクジェットプリント位置の検討

A） 流路中央部へのインクジェットプリント。

B） 流路壁面付近へのインクジェットプリント。

次に、固定化試薬の試料溶液導入時の再溶解を促進させるため、試薬溶液へのトレハロースの添加を試みた。トレハロースは食品の保存時にも汎用される親水性の高い材料であり、固定化試薬の再溶解促進が期待できる。

代表例として、図 5 に異なるトレハロース濃度（2～8%）で固定化した蛍光標識 CRP の再溶解挙動を示す。ここではインクジェットプリント後の乾燥時間を 2 通り検討したが大きな差異は見られず、いずれも約 8%の添加によって、迅速な均一溶解が確認された。さらなる濃度増加は吐出試薬溶液の粘性増加につながり、吐出困難となるため、この濃度で使用した。

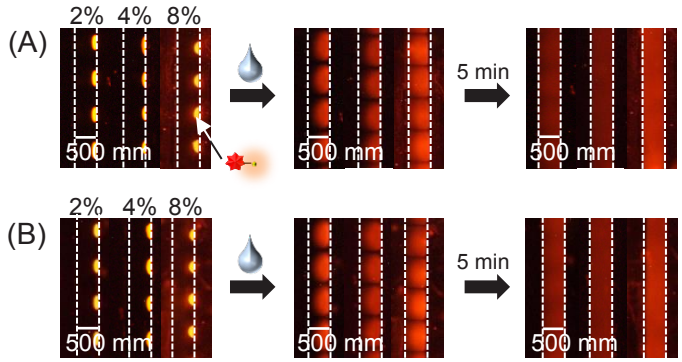


図 5. トレハロース濃度が試薬再溶解に及ぼす影響

A) 乾燥時間：4h。

B) 乾燥時間：Overnight。

この検討を踏まえ、1 ステップ診断デバイスを作製した。図 6A は作製したデバイスの上面図と断面図である。蛍光標識 CRP は色が薄く目視で確認できないが、抗 CRP 抗体修飾酸化グラフェンは流路の左壁面に黒色の点として観察でき、等間隔に並んでいることがわかる。このマイクロデバイスを蛍光画像と明視野画像で観察したのが図 6B である。蛍光標識 CRP は蛍光物質のため蛍光顕微鏡でしか観察できず、抗 CRP 抗体修飾酸化グラフェンは蛍光を発さず明視野でしか観察できないため 2 種類の画像に分けている。図 6B では 2 種類の反応試薬が混合せず同一マイクロ流路内の左右に固定化されていることが確認できる。実際に試料溶液を導入したところ、バッファーのみの場合には蛍光が消光したのに対し、CRP を含む場合には発蛍光を確認でき、コンセプト通りの応答となることがわかった。このマイクロデバイスに異なる濃度の CRP 試料を導入し、60 分後の蛍光強度を測定した結果を図 6C に示す。ブランクにおける標準偏差の 3 倍の信号として算出した検出限界は 2.5 μg/mL となり、応答濃度範囲は 2.5～10 μg/mL の範囲で直線的な応答が得られた。CRP のカットオフ値は 3 μg/mL であることから、診断用途での濃度範囲をカバーできていることがわかる。

以上、本研究では酵素基質液化色素ナノ粒子の創製およびインクジェットプリント型デバイスに関する新たな知見を得た。今後、現在進めているナノ粒子の表面修飾・評価を経てマルチ診断デバイス開発へ展開する。

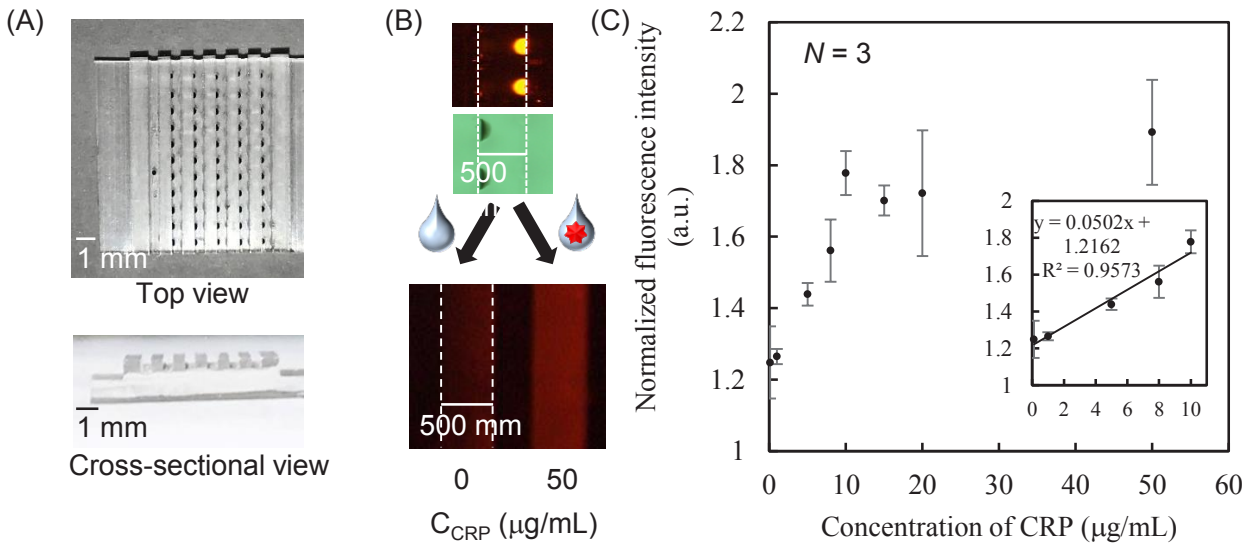


図 6. インクジェットプリンティングで試作した 1 ステップ診断デバイスとその応答挙動

A) 1 ステップ診断デバイスの外観。

B) 流路内固定化試薬の蛍光・明視野画像。

C) CRP に対する蛍光応答。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪府立大学大学院工学研究科応用化学分野分析化学研究室の遠藤達郎准教授、末吉健志准教授である。また、大阪府立大学大学院工学研究科マテリアル工学分野の森茂生教授、中島宏特認助教、大迫明弘氏には TEM 画像撮影にてお世話になった。この場を借りて感謝申し上げる。

文　献

1) 在宅医療における医療機器等ニーズ調査 報告書 - 厚生労働省 https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/zaitaku1.pdf

2) Mizuta T, Sueyoshi K, Endo T, Hisamoto H. Ionic liquid-based dye: A "Dyed plasticizer" for rapid and highly sensitive anion optodes based on a plasticized PVC membrane. Sens. Actuators B. 2018 258:1125-1130. DOI: 10.1016/j.snb.2017.11.183

3) Niwa Y, Mizuta T, Sueyoshi K, Endo T, Hisamoto H. An ionic liquid composed of purely functional sensing molecules: a colorimetrically calcium responsive ionic liquid. Analyst. 2019 144:6858-6861. DOI: 10.1039/C9AN01769K

4) Mizuta T, Sueyoshi K, Endo T, Hisamoto H. Development of a rapid and highly sensitive plasticized PVC membrane optode utilizing an ionic liquid material composed of bromothymol blue. BUNSEKI KAGAKU. 2019 68:945-951. DOI: 10.2116/bunsekikagaku.68.945