

極限効率発光型/化学センシング 蛍光色素液体ナノ油滴の開発と 超高感度簡易マルチ診断デバイスの創製

大阪公立大学 大学院工学研究科□□物質化学生命系専攻
久本 秀明

1. はじめに

近年、政府の総合科学技術・イノベーション会議にて、ムーンショット目標が複数提示されており、「2030年までに、小型・迅速・高感度な診断・治療機器や、医師の医学的所見・診断能力をさらに引き上げる技術基盤を構築する。」ことが国家課題となっている。この実現に向けた取り組みの一つとして、高齢者の在宅医療現場で要求される「各種診断マーカーの数値が、その場でわかるツール（簡易検査ツール）開発」が日本医療研究開発機構（AMED）の注目領域ともなっており、重要視されている。ここでは簡易検査ツールから得られたマーカー濃度情報を、スマートホンカメラ・アプリを介して情報伝達し、医療機関からの適切なアドバイス受信や、ドローンを用いる物資送達システムによる処方箋医薬品自動配布につなげる構想など、今後の高齢化社会を支える医療システムが多数提案されている（図1）。



図1. 簡易マルチ診断デバイスに基づく在宅診療と画像情報伝達に基づくアドバイス受信・薬物送達

したがって、在宅医療の普及が進む現在、家庭用検査キットの多項目化・高感度化による診断信頼性向上は、高齢者の日常的健康維持のみならず、未病検出による健康寿命延長にも直結する重要課題である。

そこで本研究では、過去に我々が開発したマイクロ流路アレイ型マイクロ分析デバイスへの実装を想定し、近年我々が開発を進める「極限効率発光型蛍光色素液体材料」に多様な診断項目を検出できる選択性の付与および、ナノ油滴（エマルション）化・酵素ゲルとの複合化を試みた。

2. 簡易診断デバイスの課題

簡易検査ツールはドライケミストリー・イムノクロマトグラフィー・試験紙など既に多くの診断薬メーカーから実用化されている。しかしながら、擬陽性・擬陰性の割合が高く、信

頼性が課題なことはよく知られている。また、診断項目ごとに異なる検出装置類・消耗品が多数必要であり、医者が大量の医療器具を持ち歩く必要のある在宅医療現場ではそれほど普及していない。したがって、より高感度で信頼性が高く、多種同時測定できる簡易検査ツール開発が強く望まれている。

3. 化学センシング蛍光色素液体ナノ油滴の開発

本研究では上記の背景を踏まえ、極限的フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) 効率の実現に基づく高感度化が期待できる「蛍光色素液体」の利用とマイクロ流路アレイを活用した簡便・迅速な1ステップマルチ診断デバイス開発を着想した。

「色素液体」とは「色素の溶けた液体」ではなく、「色素が液体」という材料であり、ごく最近応募者らが

見出し、開発を進めている高感度センシング材料である。この色素液体含有薄膜は理論上極限濃度の発色色素分子濃度をもつため、光吸収分析の高感度化に多数成功し¹⁾⁻⁶⁾、薄膜のナノエマルジョン (ナノ油滴) 化による応答の超高速化も示してきた⁷⁾⁻¹⁰⁾。

一方、蛍光分子を使った色素液体の場合、色素の高濃度化に伴う濃度消光で、ほぼ発蛍光を示さない色素液体もあるが、分子構造・官能基の選択で著しい発蛍光を示す蛍光色素液体が存在することもわかってきた。これらの研究の中で我々は、蛍光性色素液体の蛍光波長に励起波長のマッチするアクセプター蛍光色素をドープすると波長マッチングの効果のみならず、液状であることによるドナー/アクセプター間距離の著しい短縮・多様な配向かつ液状に密集した多数のドナー蛍光色素液体分子からアクセプター色素分子へ高効率エネルギー移動が起こり、数十倍の高感度

化ができることを見出した (図2)¹¹⁾。

そこで本研究では図2で薄膜として使用したアクセプター蛍光色素 (アルキル化フルオレセインアニオンのテトラアルキルホスホニウムカチオン塩

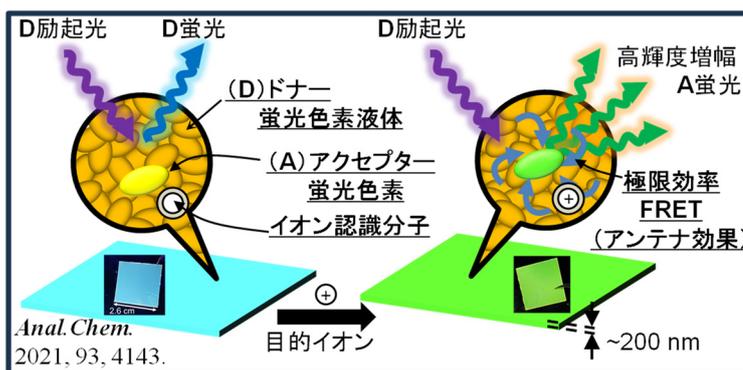


図2. 過去に報告した蛍光色素液体FRET薄膜イオンセンサー

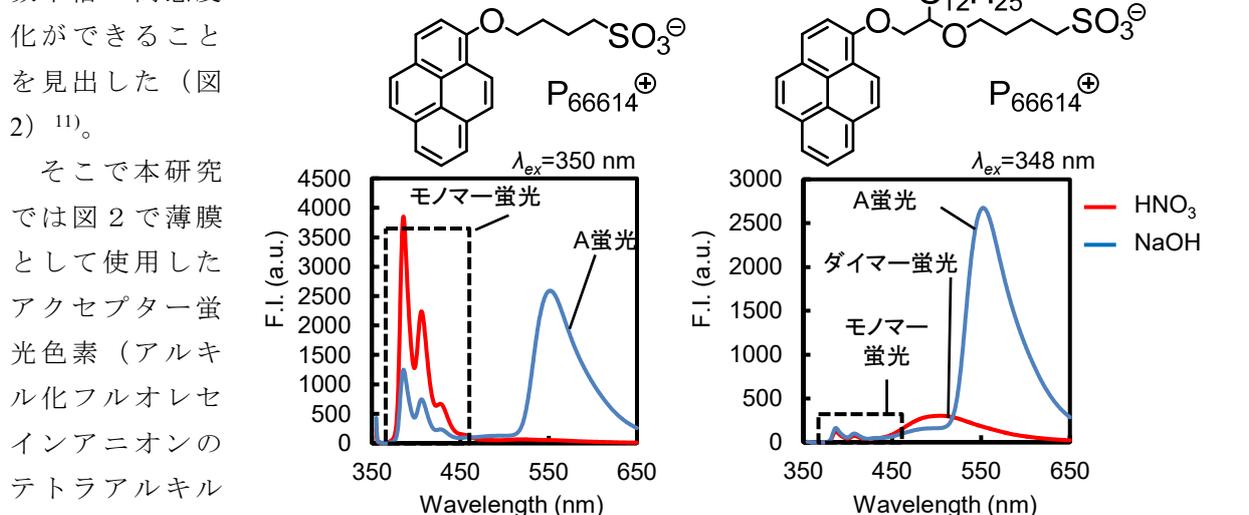


図3. 従来型 (左) および今回新規合成したドナー蛍光色素液体 (右) に基づくFRETナノ油滴の蛍光スペクトル

(P₆₆₆₁₄⁺) およびドナー蛍光性色素液体材料に基づくナノ油滴化を検討した (図 3 左)。しかしながらこの色素液体から調製したナノ油滴では、アクセプターのプロトン化状態のスペクトル測定を行うために硝酸水溶液に分散したところ、ナノ油滴中でエキシマー (ダイマー) として存在するはずのピレン基を持つスルホン酸アニオンのモノマー蛍光が観察された。これは疎水性の硝酸アニオンとピレン基を持つスルホン酸アニオンが予想に反してイオン交換してしまったことを示す。そこで、図 3 右に示すように、類似の分子構造を持ちながら疎水性側鎖を持つ分子を新たに設計・合成した。図 3 右にはこのドナー蛍光色素液体にアクセプターとして上記の疎水性フルオレセインをドープして作製したナノ油滴の蛍光スペクトルを示す。ここでは従来型の蛍光性色素液体を用いた場合とは異なり、硝酸水溶液と接触してもピレンのモノマーに帰属される蛍光は確認されず、ダイマー蛍光のみが確認された。このことは、従来用いていた可塑化ポリ塩化ビニル (PVC) 膜のように、PVC を含む場合には膜が固く、長鎖アルキルを持たない従来のドナー色素液体でも測定可能であったが、ナノ油滴のようにポリマーを含まない“柔らかい”材料の場合には、分子の持つ疎水性が極めて重要な役割を果たすことを示している。

次に、この色素液体ナノ油滴にドープするアクセプター蛍光色素量を検討した。図 4 に蛍光スペクトルを示す。アクセプター蛍光色素の添加に伴い、ドナー蛍光色素液体のエキシマ発光 (ダイマー

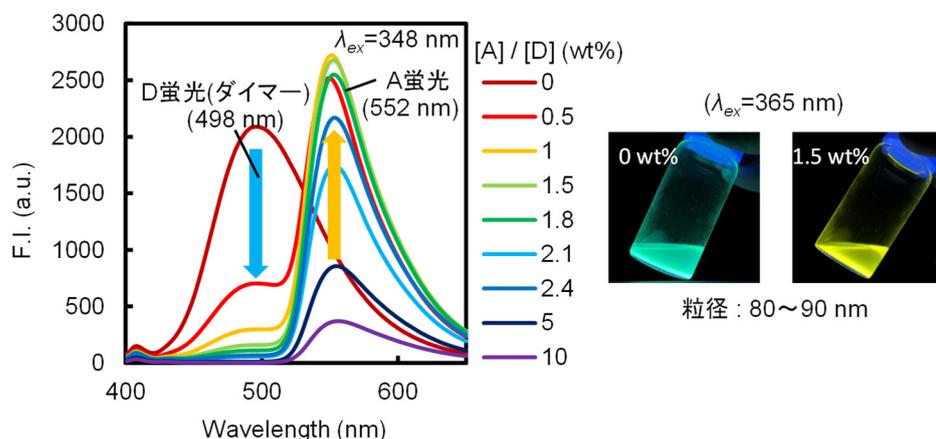


図 4. ドナー蛍光色素液体ナノ油滴へのアクセプター蛍光色素添加量の検討

ー蛍光) に対応する 498 nm の蛍光強度が減少し、アクセプター蛍光色素の発光 (552 nm) が大きくなっており、ドナーからアクセプターへのエネルギー移動が起こっていることがわかる。実際の発光色は図 4 の写真のとおりである。蛍光強度から計算される FRET 効率はアクセプター添加量として 1.5% のときにはほぼ 1 に近い効率が得られることが分かった。

アクセプター添加量と得られる蛍光強度の関係を、従来から用いられているアクセプター分子直接励起による蛍光強度と比較した。その結果、図 5 に示すようにアクセプターの励起波長である 517 nm

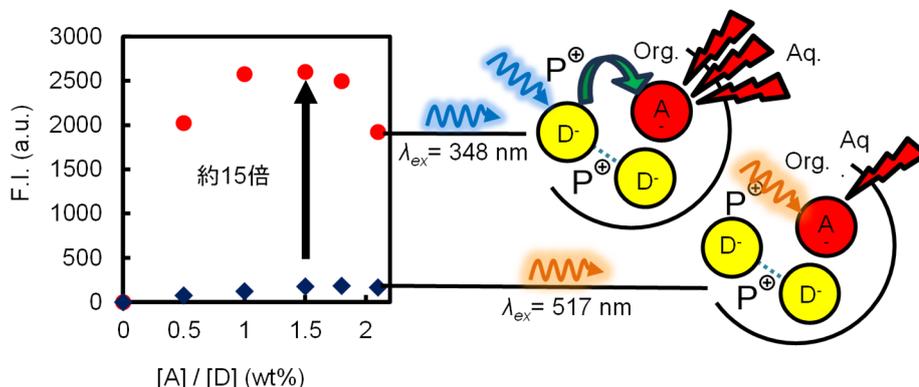


図 5. 従来法 (◆) および本法 (●) による蛍光強度比較

の励起光を用いた場合と比較して、ドナー蛍光色素液体を 348 nm で励起した場合には、[A]/[D]

比が約 1.5 wt%の場合に約 15 倍の蛍光強度となることがわかった。このことは、蛍光色素液体 FRET に基づく高感度化が薄膜同様にナノ油滴でも実現できた初めての例である。

4. アニオン応答性ナノ油滴作製の基礎検討

ここでは、上記で検討した FRET 色素液体ナノ油滴に適用できるアニオンセンシング系の基礎検討を行った。アクセプター色素としては上記同様にアルキル化フルオレセインアニオンの P_{66614}^+ 塩を用い、ナノ油滴用の溶媒としては電氣的に中性なナノ油滴作製用疎水性溶媒の代表としてセバシン酸ジオクチル (DOS) および、ドナー蛍光色素液体同様にイオン性の疎水性溶媒であるテトラデシルトリヘキシルホスホニウムビス (2,4,4-トリメチルペンチル) ホスフィナート (PTP) を用いた。これらの溶媒を用いて作製したナノ油滴に含まれるアクセプター蛍光色素の酸塩基特性を調べるため、ナノ油滴を硝酸水溶液、NaOH 水溶液および 50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) に分散し、蛍光スペクトルを測定した。結果を図 6 に示す。

電氣的に中性な DOS をナノ油滴の溶媒として用いた場合、酸・塩基溶液に対する特性は予想通りであったが、緩衝液の場合には蛍光が大きく低下し、アニオン測定時にバックグラウンド信号となってしまふことがわかった。これはアクセプター蛍光色素として用いたアルキル化フルオレセイン分子が界面活性剤のような構造となっているために、フルオレセインアニオン部位がナノ油滴と水溶液の油水界面で水相と接触し、色素のプロトン付加が起こってしまったために蛍光強度が低下したと考えられる。そこで、次に疎水性のイオン性溶媒である PTP を用いて検討したところ、図 6 下に示すように、NaOH の場合と比較して蛍光強度の低下が見られなかった。これは、PTP 溶媒には P_{66614}^+ カチオンが大量に含まれるために、アニオン性のフルオレセイン分子との強い静電相互作用を示し、フルオレセイン分子が油水界面に局在化してしまうのを抑制したためと考えている。

このことは、今回検討を進めている FRET 蛍光性色素液体がイオン性であることを考えると、アニオン測定においてバックグラウンド信号が現れることなく、感度的に有利なアニオン測定に適用できることを示唆している。

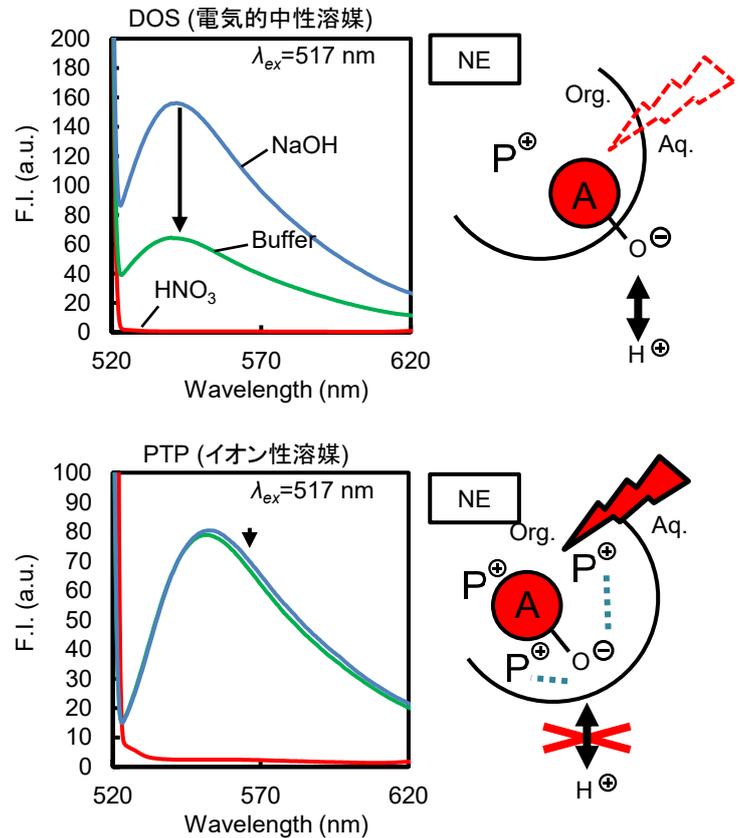


図 6. 電氣的に中性溶媒 (DOS) およびイオン性溶媒 (PTP) で作製したナノ油滴分散液の蛍光スペクトル (酸塩基特性比較)

次に、PTP を溶媒として作製したナノ油滴を用い、各種アニオンの測定を行った。ここではNaOHおよび硝酸水溶液に対する蛍光強度を最大および最小の蛍光強度として規格化し、アクセプター色素分子の脱プロトン化率 (α) を縦軸として、検量線を作成した。図7に結果を示す。Cl⁻, Br⁻, NO₃⁻, SCN⁻, ClO₄⁻に対する応答を比較すると、応答性の序列は予想通りほぼアニオンの疎水性の序列 (ClO₄⁻ > SCN⁻ > NO₃⁻ > Br⁻ > Cl⁻) になっていることがわかる。これはアニオンとプロトンの共同抽出を原理とし、DOSのような電気的中性溶媒を汎用する光検出型イオンセンサー(イオン選択性オプトード)ではよく見られる挙動であり、PTPのようなイオン性の溶媒を用いた場合にも同様の挙動が見られたのは大変興味深い。ここでは予備実験として、色素を用いた場合のイオン選択性を示しているが、今後、特定イオンに対するイオン認識分子の添加で選択性向上が期待できる。

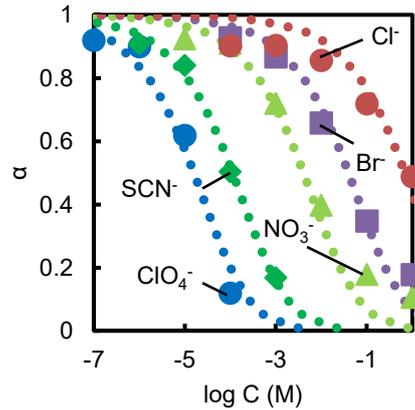


図7. PTPで作製したナノ油滴分散液を用いた各種アニオン測定の検量線

5. 過酸化水素応答性ナノ油滴の開発とゲルの試作

ここでは各種診断マーカー分子の検出に適用できるナノ油滴を開発するため、過酸化水素 (H₂O₂) 応答性ナノ油滴の作製を検討した。グルコースや尿酸など、多くの診断マーカー分子は各種オキシダーゼ系酵素との反応で H₂O₂ を生成する。したがって、H₂O₂ 応答性ナノ油滴の開発は、それらのマーカー分子検出に直結する。

図8に、用いた H₂O₂ プロブ分子の構造と応答機構のコンセプト図を示す。

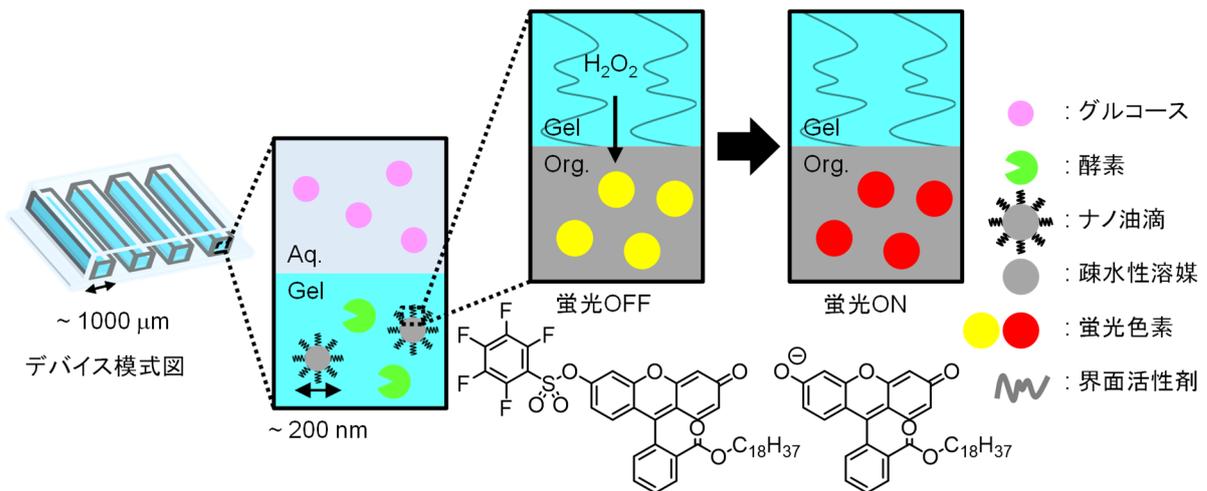


図8. 過酸化水素応答性ナノ油滴・酵素含有ゲルを用いた診断マーカー分析デバイスのイメージ図 (グルコースの例)

プローブ分子としてはペンタフルオロベンゼンスルホン基を導入したアルキル化フルオレセイン (18-FLS) を用いた。これは H₂O₂ 用蛍光プローブとして報告のある分子を FRET 蛍光ナノ油滴に適用できる分子として構造改変した分子である。H₂O₂ との反応でフルオレセイ

ンを遊離することが知られている¹²⁾。この分子をナノ油滴に含有させ、酵素とともにゲルに包埋すれば、マイクロ分析デバイスも作製できると考えた。

ナノ油滴は 18-FLS および疎水性溶媒として P₆₆₆₁₄⁺カチオンの塩化物イオン塩を用いて作製し、粒径約 150 nm 程度のナノ油滴分散液を得た。この分散液に H₂O₂ を添加する

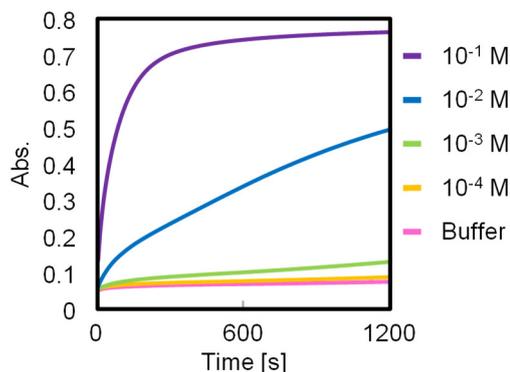


図 9. 過酸化水素応答性ナノ油滴分散液への過酸化水素添加に伴う変色および吸収スペクトル変化

と、図 9 に示すように明らかな変色が見

られた。523 nm での吸光度の経時変化を測定すると、応答時間 20 分程度で mM オーダーの H₂O₂ に応答することが分かった。

そこで、予備実験として、アルギン酸ハイドロゲルへの酵素・ナノ油滴の包埋を試みた。アルギン酸ナトリウム水溶液にナノ油滴とグルコースオキシダーゼを溶解し、50 mM の塩化カルシウム水溶液に滴下し、このゲルを超純水で 2 回洗浄したところ、直径 3 mm 程度のナノ油滴・酵素含有ハイドロゲルを作製できた。図 10 に、作製したハイドロゲルの写真および、グルコース溶液添加後の蛍光画像を示す。グルコース濃度の上昇とともに蛍光強度が強くな

ってきていることがわかる。これらの結果から、本研究で提案した H₂O₂ 応答性ナノ油滴と酵素の組み合わせが酵素反応に基づくマーカー分子検出に有用であることが明らかとなった。

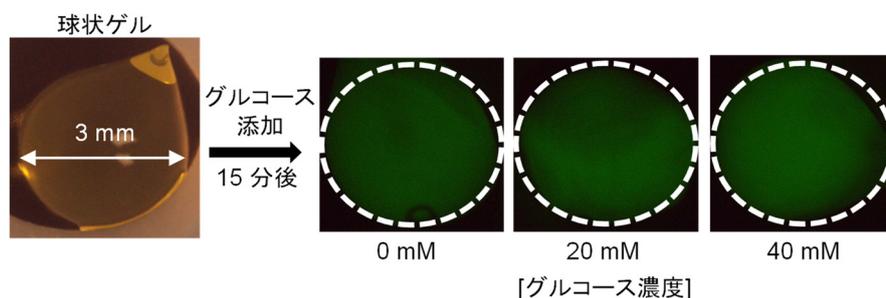


図 10. 試作したナノ油滴・酵素含有アルギン酸ハイドロゲルおよびグルコース溶液添加後の蛍光画像

6. まとめ

本研究では、超高感度診断マーカー検出材料の創製と、それに基づくマイクロ分析デバイス作製に向け、種々検討を行った。

FRET 蛍光色素液体ナノ油滴の開発では、従来可塑化 PVC 薄膜で使われていた蛍光色素液体分子では材料のイオン交換に伴う応答劣化が起こったが、分子に長鎖アルキル基を導入することによって、安定した蛍光信号を取得できることを明らかにした。また、ドナー色素液体にドープするアクセプター分子の量を検討し、ドナー分子に対して約 1.5 wt% のアクセプター分子を添加した際、FRET のエネルギー移動効率が 1 に近い値となり。その際に得られる蛍光強度は、アクセプター分子を直接励起した場合と比較して約 15 倍高感度になることを

明らかにした。したがって、この検出系に適用できる診断マーカーアニオン・カチオン・中性分子の適用で、高感度診断への適用が期待できる。

アニオン応答性ナノ油滴開発の基礎検討では、ナノ油滴の溶媒として電氣的に中性な従来型分子および、蛍光性色素液体同様にイオン性の分子を検討した。その結果、イオン性の分子を使う方が、色素アニオンと溶媒カチオンの静電相互作用が強くなり、バックグラウンド信号が少なく、相対的に高感度な測定に適用できることを明らかにした。また、各種アニオンへの応答選択性はアニオンの疎水性の序列であり、今後、アニオンイオノフォアの添加により、選択性の改善が期待できる。

最後に、過酸化水素応答性ナノ油滴の開発とゲルの試作では、過酸化水素プローブ分子を改変した新規分子を合成し、過酸化水素応答性ナノ油滴の開発に初めて成功した。また、酵素および過酸化水素応答性ナノ油滴を含むアルギン酸ハイドロゲルを試作した結果、グルコースの添加に伴う蛍光強度増加の観察に成功した。この成果は過酸化水素応答性ナノ油滴の反応系をハイドロゲルに閉じ込めても応答することを示した初めての例であり、今後マイクロ分析デバイスへの集積化に新たな一步を踏み出した成果である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) 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”, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 258, pp. 1125–1130, 2018.
- 2) 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*, vol. 68, No. 12, pp. 945–951, 2019.
- 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*, vol. 144, No. 23, pp. 6858–6861, 2019.
- 4) Oishi, R., Mizuta, T., Sueyoshi, K., Endo, T., Hisamoto, H., “Enzyme-responsive fluorescent ionic liquid”, *Analytical Sciences*, vol. 36, No. 2, pp. 143–145, 2020.
- 5) Mizuta, T., Takai, S., Nishihata, T., Sueyoshi, K., Endo, T., Hisamoto, H., “A lipophilic ionic liquid-based dye for anion optodes: Importance of dye lipophilicity and application to heparin measurement”, *Analyst*, vol. 145, No. 16, pp. 5430–5437, 2020.
- 6) Kawasaki, D., Oishi, R., Kobayashi, N., Mizuta, T., Sueyoshi, K., Hisamoto, H., Endo, T., “Highly sensitive optical ion sensor with ionic liquid-based colorimetric membrane/photonic crystal hybrid structure”, *Scientific Reports*, vol. 10, No. 1, Article number 16739, 2020.

- 7) Oishi, R., Maki, K., Mizuta, T., Sueyoshi, K., Endo, T., Hisamoto, H., “Enzyme-responsive fluorescent nanoemulsion based on lipophilic dye liquid”, *Analyst*, vol. 146, No. 13, pp. 4121–4124, 2021.
- 8) Maki, K., Oishi, R., Mizuta, T., Sueyoshi, K., Endo, T., Hisamoto, H., “Chloride ion-selective dye liquid nanoemulsion: improved sensor performance due to intermolecular interactions between dye and ionophore”, *Analyst*, vol. 147, No. 8, pp. 1529–1533, 2022.
- 9) Oka, S., Sueyoshi, K., Endo, T., Hisamoto, H., “Nanoemulsion-based silver ion-selective optode based on colorimetrically silver ion-responsive ionic liquid-based dye”, *Analytical Sciences*, vol. 39, No. 8, pp. 1249–1256, 2023.
- 10) Iwamoto, S., Sueyoshi, K., Endo, T., Hisamoto, H., “Fundamental investigation on fluororous nanoemulsion optodes: effect of matrix fluorination on selectivity”, *Analytical Sciences*, vol. 40, No. 9, pp. 1787–1792, 2024.
- 11) Mizuta, T., Sueyoshi, K., Endo, T., Hisamoto, H., “Lipophilic Fluorescent Dye Liquids: Förster Resonance Energy Transfer-Based Fluorescence Amplification for Ion Selective Optical Sensors Based on a Solvent Polymeric Membrane”, *Analytical Chemistry*, vol. 93, No. 9, pp. 4143–4148, 2021.
- 12) Maeda, H., Fukuyasu, Y., Yoshida, S., Fukuda, M., Saeki, K., Matsuno, H., Yamauchi, Y., Yoshida, K., Hirata, K., Miyamoto, K., “Fluorescent probes for hydrogen peroxide based on a non-oxidative mechanism”, *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 43, No. 18, pp. 2389–2391, 2004.