

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550088

研究課題名(和文) ボロン酸を用いた糖検出チップの高速応答化とマルチカラーセンサーアレイへの展開

研究課題名(英文) Multicolor saccharide-sensing chips based on boronic acid-containing thin films

研究代表者

兼清 泰正 (Kanekiyo, Yasumasa)

北見工業大学・工学部・准教授

研究者番号：40435748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：簡便な操作により明瞭かつ多彩な色調変化を示す糖センシングチップの開発を行った。まず、糖に対する応答速度の向上を図るため、センサーを構成する薄膜の厚さをナノサイズにまで減少させることに取り組んだ。その結果、交互吸着法を用いることにより従来の1/10程度の薄さを実現し、その結果として応答時間を10分程度にまで短縮することに成功した。また、様々な糖の中で特定の糖を選択的に検出する機能を持たせるため、異なるボロン酸構造を有するモノマーを合成し薄膜作製に用いた。その結果、分子内にヒドロキシメチル基を有するボロン酸モノマーを用いることにより、グルコースに対する応答選択性を改善できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Novel saccharide-sensing chips that show distinct color changes were developed. The saccharide-responsive thin films were obtained on a pattern-printed microscope slide via a layer-by-layer method utilizing a boronic acid-containing polycation. After adsorption of anionic dyes, the thin films were immersed in aqueous saccharide solutions. As the saccharide concentration increased, the thin films showed a multi-patterned color change that enabled the quantification of saccharides using multi-colorimetric sensing.

研究分野：分子認識化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：ボロン酸 糖センサー 薄膜 色素 フルクトース グルコース 交互吸着 交互積層

1. 研究開始当初の背景

グルコースをはじめとする糖類は、生体内反応のエネルギー源として生命活動に不可欠な物質である。一方、炭水化物や脂肪の過剰摂取に起因する糖尿病や肥満などの生活習慣病が、我が国のみならず世界的な規模で拡大し深刻化している。国際糖尿病連合によると、世界の糖尿病人口は現在 2 億 8500 万人にのぼるが、20 年後には 4 億 3500 万人を超えると予測されている。とりわけアジアやアフリカの発展途上国における患者数の増加が著しく、これらの地域では 20 年で患者数が倍増する勢いである。このような事態に対処するためには、糖尿病を予防し早期に発見・治療する体制を、経済的に恵まれない地域も含めて世界規模で整備する必要がある。それには、体液中のグルコース濃度を低コストで簡便かつ正確に測定できる新たな手法の構築が必要不可欠である。

従来、グルコース検出法としては、グルコースオキシダーゼなどの酵素反応を利用した電気化学法や比色法が用いられてきた。しかし、酵素は温度や湿度の変化によって容易に活性が低下するため、耐久性や再現性に乏しいことが最大の欠点となっている。また、酸化還元物質などの共存物質による妨害を受け易いことや、糖に反応した色調変化の視認性が十分でない点なども問題点として挙げられる。このような欠点を克服し得る次世代の糖質インターフェースとして、ポロン酸の機能が近年注目を集めており、ポロン酸を用いた糖センサーの開発が、新海征治教授のグループをはじめとして世界各地で活発に行なわれている。しかしながら現在のところ、測定に大掛かりの装置を必要とせず、目視により容易に判別可能な「色」を指標とするポロン酸センサーの開発例は数少なく、色調変化の程度も小さいことから、実用化には至っていない。そこで、ポロン酸を用いて顕著な色調変化を示すグルコースセンサーを開発するためには、従来に無い新規方法論を導入することが必要である。

2. 研究の目的

本研究代表者は、新海教授の研究グループに所属して以来、ポロン酸を活用して糖やヌクレオチドをターゲットとするセンシングシステムの開発を行ってきた。最近研究代表者は、ポロン酸基とカチオン基を含む架橋ポリマーにアニオン性色素を吸着させることにより、糖に反応して色素を放出する機能をもつ“糖応答性色素放出ポリマー”を開発することに成功している。これは、糖との結合によりポロン酸基が負に帯電して、アニオン性色素を置換するメカニズムによるものである。ここで、色調の異なる複数の色素を吸着させたポリマーを糖水溶液に投入すると、糖の濃度に応じた色素の段階的な放出が起こり、溶液が明敏な多色変化を示す現象を見出している。この糖応答性色素放出ポリマー

を基板上に薄膜化することにより、明瞭かつ多彩な色調変化を示す糖センシングチップが実現できると考え、現在研究を進めている。これまでの研究の結果、ガラス基板上にモノマー溶液をキャストして重合し、得られた薄膜に複数のアニオン性色素を吸着させることにより、糖濃度に応じて顕著な色調変化を示すチップの作製に成功している。例えば、黄と青の二種類のアニオン性色素を吸着させたチップは緑色を示すが、これをフルクトース溶液に浸漬すると、最初に青色色素の脱離が生じて薄膜は黄色へと変化し、フルクトース濃度を高めると黄色色素も脱離して、薄膜は無色になる。さらに、溶液中に赤色のカチオン性色素を一定量添加しておく、フルクトース濃度の上昇につれて赤色色素の薄膜への吸着が生じ、チップは緑→黄→赤と“交通信号式”の色調変化を示す。一方、生体サンプル測定の際に主な測定対象となるグルコースに関しては、ポロン酸との親和性が低いために応答が小さく、明瞭な色調変化が見られなかった。そこでさらに検討を続けた結果、薄膜のモノマー組成や応答時の pH を最適化することにより、グルコースに対しても顕著な色調変化を示す糖検出チップを作製することに成功した。しかしながら、これらの糖に反応した色調変化が明瞭に現れるには 1 時間以上の応答時間を要することから、応答速度の大幅な向上が実用的な糖検出チップ開発へ向けた最大の課題として残されているのが現状である。

そこで以下に述べる取り組みにより、糖水溶液に短時間浸漬することにより応答し、多彩な変色パターンを示す糖センサーが実現可能であることを明らかにする。まず、糖に対する応答速度の大幅な向上に取り組む。そのためには、糖応答性ポリマーの比表面積を増大させて、糖や色素分子のポリマー内外の移動速度を高めることが必要である。従来の製膜法では、二枚の基板でモノマー溶液を挟み込んだ状態で重合し、膜厚は基板間に挟み込むスペーサーにより制御していた。この手法で得られる薄膜は比較的厚みが大きく(40~50 μm)、なおかつ無孔性の緻密な膜であり、これらの点が応答速度低下の要因であると考えられる。そこで本研究では、次の三通りのアプローチにより高い比表面積を有するポリマーを作製し、糖に対する応答速度の飛躍的な向上を図る:(1)膜厚をナノレベルまで低下させた薄膜を作製する、(2)基板上に微細なポリマードットを作製する、(3)多孔性の薄膜を作製する。(1)に関しては、ポリカチオンとポリアニオンを基板上に一層ずつ積層していく交互吸着法を用いる。これにより、従来法では実現困難なナノスケールで厚みの制御された薄膜が得られる。(2)に関しては、モノマーを溶解した微小液滴を基板上に等間隔に滴下して重合することにより、微細なドット状のポリマーが配列した基板を作製する。(3)に関しては、テンブ

レートとなる微粒子やブロックコポリマーなどをモノマー溶液に混合し、重合後にテンプレートを除去して多孔質化する手法を用いる。以上の検討の後、各々の手法で糖に対する応答速度がどの程度向上するかを明らかにする。次に、糖に応答して多様な色調変化を示すマルチカラーセンサーアレイの実現に取り組む。まず、同一基板上に応答特性の異なるポリマーを複数配列させる手法を確立する。その後、ポリマー毎に異なる色素で染色し、糖の濃度や種類に応答した変色パターンを詳細に検討する。

3. 研究の方法

(1) 応答速度の向上を図るには、膜厚を薄くすることが有効と考えられる。しかし、従来の手法で作製される薄膜は 10 μm 程度の膜厚を有しており、同様の手法でこれを大幅に薄膜化することは困難である。そこで、ナノスケールの薄膜を作製する新たな手法として、基板上にポリカチオンとポリアニオンを交互に積層していく交互吸着法を用いた。最初に、ボロン酸基を含有するポリカチオンとポリアニオンを合成した。次に、ガラス基板をポリカチオン溶液とポリアニオン溶液に交互に浸漬し、静電的相互作用を利用してポリマーを一層ずつ積層していった。生成した薄膜の厚みは、SEM 観察により決定した。また、水晶振動子マイクロバランス (QCM) を用いて、薄膜の成長プロセスを詳細に解析した。

(2) 基板上に多数の糖応答性薄膜をアレイ状に配列させるため、松浪硝子工業(株)製の高撥水性印刷スライドガラスを用いた。このスライドガラスには、直径 4~15 mm、深さ 10 μm のウェルが 2~24 個ほど配置されており、種々の配列パターンが利用可能である。薄膜の作製法としては、モノマー溶液をウェル内にキャストして重合する方法と、交互吸着法により製膜する手法の双方を用いた。糖応答性薄膜を作製した後、ウェル間が撥水性の素材で隔てられている特性を利用し、ウェル毎に別々の色素溶液を滴下して染色した。その後、基板を糖溶液に浸漬して、糖の種類や濃度に応じて各ウェルがどのような変色挙動を示すかを、積分球を用いた拡散透過吸収スペクトルの測定により解析した。

(3) ボロン酸は、一般的傾向としてグルコースに対する親和性が他の糖と比較して低いため、グルコースに対する高感度センサーの開発は困難であるとされてきた。ところが最近、ボロニル基のオルト位にヒドロキシメチル基を導入することにより、グルコースに対する親和性が大幅に向上することが報告された。そこで本研究では、オルト位にヒドロキシメチル基を有するボロン酸モノマーなどの合成を行った。ヒドロキシメチル基を有するボロン酸モノマーの合成は、5-アミノ-2-ヒドロキシメチルフェニルボロン酸を塩化アクリロイルと反応させて行った。反応条

件は、従来のボロン酸モノマーの場合と同様に、アミノ基を含有するボロン酸誘導体を水/アセトニトリル混合溶媒に溶解し、炭酸水素ナトリウムを添加した後、塩化アクリロイルと反応させる方法を用いた。次に、合成したボロン酸モノマーをアミンモノマー、アクリルアミド、メチレンビスアクリルアミドと共に DMSO/水混合溶媒に溶解し、重合開始剤 (AIBN) を添加した後、ガラス基板 (印刷スライドガラス) 上に滴下して、紫外線 (365 nm) を 3 時間照射した。以上の操作は、グローブボックス中で窒素雰囲気下に行った。その後、種々のアニオン性色素で薄膜を着色した。用いた色素はいずれも 4 価のアニオン性色素である。このようにして作製した薄膜 (糖検出チップ) を、pH 7.4 のグルコース水溶液に 25 °C で 1 時間浸漬し、薄膜の色調変化を観測した。

4. 研究成果

(1) ボロン酸モノマーとアミンモノマーのラジカル共重合により、ボロン酸含有ポリカチオン (図 1) を合成することに成功した。ここで、重合に用いたボロン酸とアミンのモル比は 1:2 である。得られたポリカチオンとポリアニオン (ポリアクリル酸) を用いて、印刷スライドガラス上に 10.5 層の交互吸着膜を作製した。薄膜の断面を SEM により観察した結果、膜厚は約 1000 nm であることがわかった。また QCM 測定により交互吸着膜の成長プロセスを解析したところ、平均膜厚は 978 nm であり、その内ポリカチオン層とポリアニオン層が占める部分はそれぞれ 900 nm と 78 nm であることがわかった。

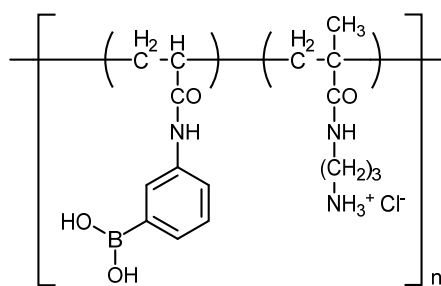


図 1. ボロン酸含有ポリカチオン

(2) 交互吸着膜上にアニオン色素の水溶液を滴下して色素を吸着させた。基板上的各スポットは、それぞれ色調の異なる 6 種類の色素を用いて着色した。このようにして得られたセンシングチップを種々の濃度の糖水溶液に浸漬し、一定時間経過後の薄膜の色調変化を観測した。フルクトースに対する応答挙動の検討を行った結果を図 2 に示す。いずれの薄膜においても、アニオン色素に由来する吸収が時間と共に減少していったが、その減少速度は色素によって大きく異なっていた。例えば、Sunset Yellow を用いたスポット 3 や Tartrazine を用いたスポット 5 では急速に色素の脱離が進行し、3 分後には薄膜は無色となった。一方、Acid Blue 92 を用いたス

ポット1や Brilliant Yellow を用いたスポット2では色素の脱離速度が遅く、10分経過後も薄膜には着色が見られた。このように色素によって脱離挙動が異なることから、フルクトース濃度を変化させることによって多彩な変色パターンが出現した。このような特性を利用すると、複数のスポットの変色を総合的に判断して糖濃度を決定することが可能となり、単一色素の変色によるセンサーと比べて測定精度や測定濃度範囲の格段の向上が実現できるものと期待される。

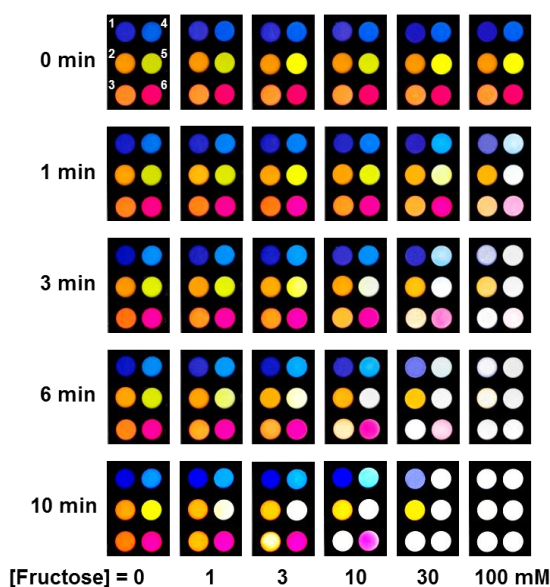


図2. フルクトース濃度に依存したセンシングチップの色調変化

(3) 従来のボロン酸モノマー1に加え、2種類の新規ボロン酸モノマー2,3の合成法を確立することに成功した(図3)。これらの反応は、従来と同様の反応条件を適用できることがわかった。生成物の同定はプロトン NMR スペクトルの測定により行い、いずれも高い純度で目的物を得られることが確認できた。得られたボロン酸モノマーを用いて製膜を行ったところ、どのボロン酸モノマーを用いた場合でも、良好な性状を有する薄膜を作製することができた。この薄膜を、青、黄、赤の3種類のアニオン性色素で着色し、以後の糖応答実験に供した。3種類のボロン酸モノマーを用いて作製した薄膜(糖検出チップ)をグルコース水溶液に浸漬した場合の薄膜の色調変化を

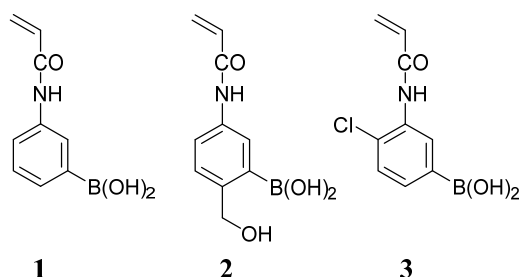


図3. ボロン酸モノマーの分子構造

図4に示す。サンプル HMB-21 は、ボロニル基(-B(OH)₂)のオルト位にヒドロキシメチル基(-CH₂-OH)を導入したボロン酸モノマー2を用いて製膜したものである。このサンプルに関する結果を、従来のボロン酸モノマー1を用いたサンプル(B-21)の場合と比較すると、グルコース濃度の低い領域での色調変化が促進されていることがわかる。例えばグルコース濃度が10 mMの時に、B-21では青、黄、赤の何れのスポットでも目立った変色が見られないのに対し、HMB-21では青色のスポットがほぼ無色へ変化するなど、明瞭な色調変化が認められる。一方、ボロニル基のパラ位に塩素基(-Cl)を導入したモノマー3を用いて製膜したサンプル(CB-21)の場合は、B-21に類似した応答挙動を示している。薄膜の吸収スペクトルを測定し、糖濃度に応じた吸光度変化を解析した結果、新規ボロン酸モノマーを用いたサンプル(HMB-21)では、従来のサンプル(B-21)と比べてグルコースに対する応答感度が3~10倍程度向上したと見積もられた。また、目視による検出下限はおよそ3 mMであった。

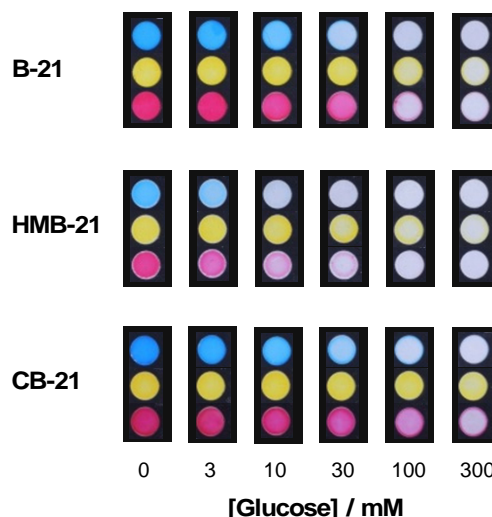


図4. 様々なボロン酸モノマーを用いた糖センシングチップのグルコースに対する応答挙動

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件、すべて査読有)

W. Takayoshi, M. Imajo, M. Iijima, M. Suzuki, H. Yamamoto, Y. Kanekiyo, Multicolor saccharide-sensing chips created via layer-by-layer adsorption of boronic acid-containing polymers, *Sensor. Actuat. B-Chem.* **2014**, 192, 776-781

DOI: 10.1016/j.snb.2013.11.008

Y. Iwami, H. Yamamoto, Y. Kanekiyo, Multicolor sensor arrays for saccharide analysis based on boronic acid-containing

thin films combined with various anionic dyes, *Chem. Lett.* **2013**, 42, 1214–1216
DOI: 10.1246/cl.130599

Y. Iwami, T. Yokozawa, W. Takayoshi, Y. Kanekiyo, Multicolor saccharide-sensing chips based on boronic acid-containing thin films showing stepwise release and binding of dyes, *Talanta* **2011**, 85, 829–833
DOI: 10.1016/j.talanta.2011.04.068

〔学会発表〕(計36件)

山本浩樹, 兼清泰正, 新規ボロン酸構造の導入による色調変化型糖センサーの高感度化, 日本化学会第94春季年会, 2014年3月29日, 名古屋大学

H. Yamamoto, C. Konishi, Y. Kanekiyo, Effect of boronic acid structure on the responsiveness of saccharide-sensing chips, *ASIANALYSIS XII*, 2013年8月22日, 九州大学

山本浩樹, 兼清泰正, 糖応答性薄膜の変色挙動に及ぼすボロン酸構造の影響, 第73回分析化学討論会 2013年5月18日, 北海道大学

兼清泰正, 糖尿病予防・管理に向けたパーソナルユース糖センサー, 日本化学会第93春季年会, 2013年3月23日, 立命館大学

Y. Kanekiyo, W. Takayoshi, M. Iijima, A Multicolor saccharide sensing chip created by layer-by-layer adsorption of a boronic acid-containing polymer, *SISYS2012*, 2012年11月21日, 産業技術総合研究所(つくば)

兼清泰正, 高吉若菜, 鈴木茉莉奈, 飯島瑞貴, ボロン酸含有交互吸着膜を用いた糖センサーが示す迅速かつ明瞭多彩な色調変化, 日本分析化学会第61年会, 2012年9月21日, 金沢大学

Y. Kanekiyo, W. Takayoshi, A multicolor saccharide sensing chip created by layer-by-layer adsorption of a boronic acid-containing polymer, *Eurosensors2012*, 2012年9月10日, クラクフ(ポーランド)

高吉若菜, 鈴木茉莉奈, 今庄満幸, 兼清泰正, 交互吸着法により作製した糖応答性薄膜が示す迅速かつ明瞭多彩な色調変化, 第61回高分子学会年次大会, 2012年5月30日, パシフィコ横浜

鈴木茉莉奈, 高吉若菜, 兼清泰正, 交互吸着法による糖応答性薄膜の作製と色調変化挙動の解析, 第9回ホスト・ゲスト化学シンポジウム 2012年5月26日, 北海道大学

兼清泰正, 岩見雄人, 木村聖弥, ボロン酸含有薄膜を用いたマルチカラー糖センサーアレイの構築, 日本分析化学会第60年会, 2011年9月14日, 名古屋大学

高吉若菜, 鈴木茉莉奈, 今庄満幸, 兼清泰正, ボロン酸含有交互吸着膜を用いた多色変化型糖センシングチップの作製と応答特性の解析, 日本分析化学会第60年会, 2011年9月14日, 名古屋大学
兼清泰正, 岩見雄人, ボロン酸含有ポリマーを用いたマルチカラー糖センサーアレイの構築, 第60回高分子討論会, 2011年9月29日, 岡山大学

Y. Kanekiyo, Y. Iwami, A multicolor saccharide sensor array based on boronic acid-containing thin films stained with anionic dyes, *ISACS6*, 2011年9月3日, 北京大学

〔図書〕(計2件)

兼清泰正 他, エヌ・ティー・エス, パーソナル・ヘルスケアユビキタス、ウェアラブル医療実現に向けたエレクトロニクス最前線, 2013, pp. 245–252

R. J. White, T.-P. Fellinger, S. Kubo, N. Brun, M.-M. Titirici, *Wiley, Sustainable Carbon Materials from Hydrothermal Processes*, 2013, pp. 37–100

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

新聞報道：“糖の濃度変化、色で検出”, 日経産業新聞, 2012年8月2日, p. 11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼清 泰正 (KANEKIYO, Yasumasa)
北見工業大学・工学部・准教授
研究者番号: 40435748

(2) 研究分担者

青木 寛 (AOKI, Hiroshi)
独立行政法人産業技術総合研究所・主任研究員

研究者番号: 00392580

(3) 連携研究者

久保 史織 (KUBO, Shiori)
独立行政法人産業技術総合研究所・主任研究員

研究者番号: 20435770