

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05172

研究課題名(和文) 生体試料測定のための生体適合性化合物を化学結合したイオンセンサー用感応膜の開発

研究課題名(英文) Development of Ion-sensing Membranes Modified Chemically with Biocompatible Materials for Analysis of Biological Samples

研究代表者

矢嶋 摂子 (YAJIMA, Setsuko)

和歌山大学・システム工学部・教授

研究者番号：80272350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イオンセンサーはイオン濃度の定量に使用されるが、その感応膜は生体適合性に乏しいため、生体試料の測定のためには、生体適合性化合物でイオン感応膜を作製する必要がある。

本研究では、生体試料測定のために、生体適合性を有するイオンセンサーの開発を行うことを目的とし、従来のイオン感応膜に生体適合性材料としてスルホベタイン誘導体を化学結合した。得られた感応膜は、従来のイオン感応膜と同程度のセンサー性能を示し、生体適合性が向上していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イオンセンサーは、溶液中のイオン濃度の定量が可能な装置で、様々な優れた性能を示すため、臨床分析において血液の分析に使用されている。しかし、その感応部分が生体適合性に乏しいため、タンパク質などの付着により次第に性能が低下する。それを防ぐために通常は前処理などの煩雑な作業を行うために余分な時間がかかっている。本研究で開発した生体適合性の感応膜を用いれば、生体由来物質の付着が防げるため、より迅速に臨床分析の結果を得ることが可能になる。

研究成果の概要(英文)： Ion sensors are used for determination of ion concentrations. Since the ion-sensing membranes are less biocompatible, it is necessary to prepare the membranes consisting of biocompatible materials in order to use them for analysis of biological samples.

In this study, I have prepared ion-sensing membranes whose surfaces were chemically modified with sulfobetaine derivatives as biocompatible materials.

The membranes showed good sensor properties, which are comparable to conventional membranes, and improved biocompatibility.

研究分野：分析化学

キーワード：イオン感応膜 スルホベタイン誘導体 化学結合 生体適合性 センサー性能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医療の現場においては、血液、尿などの生体試料の検査が常時行われており、患者を早く診断するためには、検査結果を迅速に得る必要がある。血中の無機イオンは、体内において重要な役割を果たすため、その濃度がわかれば、診断・治療に役立てられる。血中のイオン濃度の測定装置として、臨床分析ではイオンセンサーが使用されている。イオンセンサーとは、先端にイオンを検出するための膜(イオン感応膜)を取り付けてある電極で、これを試料溶液に浸すと、目的イオンの濃度に応じた電位がイオン感応膜界面に発生する。この電位を読み取ることで、試料中のイオン濃度が定量できる。イオンセンサーは、目的イオンに対して高い選択性を示すため、試料中に他の物質が共存していても定量できる。さらに、数十秒程度の迅速な応答、簡便な操作性などの優れた性能をもっている。一般的なイオン感応膜は、イオン感応物質である「イオノフォア」、イオノフォアを溶解するための「膜溶媒」、感応膜を取り扱いやすくする「支持体」、応答の感度を上げるための「イオン性サイト」の4つの成分からなっている。「支持体」としては、ほとんどの場合、ポリ塩化ビニル(PVC)が使用される。PVCを用いた膜(可塑化PVC膜)は非常に容易に作製可能で、得られた膜は取り扱い易く、優れたセンサー性能を示す。しかし、膜作製に使用される膜材料は、ほとんどが有機物質であり、生体適合性が低い。その結果、イオンセンサーを血液の分析に使用すると、イオン感応膜表面に生体由来の汚れ(タンパク質や血栓など)が付着し、装置の感度が次第に低下する。このため、血中のイオン濃度を測定する場合、血液の前処理などの操作や装置の頻繁なメンテナンスが必要になる。臨床分析では、検査結果を迅速に知る必要があることが多いため、できるだけ煩雑な作業に時間をかけずにすむのが望ましい。生体適合材料を用いたイオン感応膜でセンサーを作製すれば、生体試料由来の汚れにより感度が下がることがなくなるため、より迅速に臨床分析の結果を得ることが可能になると考えられる。しかし、新規の膜材料を用いて感応膜を作製した場合、従来の感応膜の様々な利点が失われてしまう可能性が考えられた。

2. 研究の目的

イオンセンサーによる臨床分析では、迅速に検査結果を得る必要から、試料を前処理せずに、そのまま分析できるのが望ましいが、上記の通り、生体試料由来の汚れがイオン感応膜に付着することが大きな問題となる。イオンセンサーの分析感度と精度を保つためには、生体適合性材料を用いてイオン感応膜を作製してタンパク質などの付着を防ぐ必要がある。そこで、本研究では、生体適合性をもつ化合物を設計・合成し、イオン感応膜材料に用いることで、長期にわたって生体試料を測定可能な新しいイオンセンサーを開発することを目的とした。従来の感応膜(可塑化PVC膜)の利点を活かすために、生体適合性材料を可塑化PVC膜に化学結合することにし、これにより、生体適合性が長く持続することを期待した。

3. 研究の方法

PVCは反応性が乏しい化合物であること、また、生体適合性の化合物は親水性の官能基を含むため、親油性の高い可塑化PVC膜とはなじみが悪いという理由から、これらを組み合わせて感応膜を作製する試みは、ほとんど行われてこなかった。本研究では、生体適合性化合物の末端に炭素-炭素三重結合を導入し、アジド基を有するPVCに化学結合することで、従来のイオン感応膜に生体適合性を付与することを考えた。そして、得られた感応膜の同定を行ったのち、センサー性能と生体適合性について調べた。

(1) 生体適合性化合物の設計・合成

生体適合性を示すと言われているスルホベタイン誘導体に着目し、炭素-炭素三重結合をもち、アミド基からスルホベタイン基までのアルキル鎖長が異なる2種類の化合物(Fig. 1)を設計・合成した。

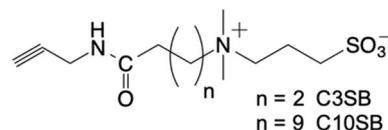


Fig. 1 本研究で用いたスルホベタイン誘導体の化学構造

(2) 生体適合性化合物を化学結合したイオン感応膜作製

アジド基を導入したPVC(N₃PVC)を支持体とし、膜溶媒としてセバシン酸ビス(2-エチルヘキシル)、イオノフォアとしてカリウムイオン選択性のバリノマイシン、イオン性サイトとしてテトラキス(4-クロロフェニル)ホウ酸カリウムを用いたイオン感応膜を作製した。そして、ヒュスゲン環化付加反応(クリック反応)によって、イオン感応膜表面にスルホベタイン誘導体を化学結合させた。この時、クリック反応の溶媒として用いるTHF水溶液のTHFの割合を0~20%と変化させて反応させた。また、比較のためにPVCを支持体とした従来の膜も作製した。

(3) イオン感応膜の同定

作製した膜の同定を元素分析、FT-IR測定(ATR法)、接触角測定により行った。まず、元素分析によりアジド基の導入率を求めた。その後、アジド基の導入率が異なるN₃PVC膜を用いて、スルホベタイン誘導体を化学修飾し、膜のFT-IR測定を行った。そして、アジド基の導入率に対するアジド基由来の吸光度の検量線を作成した。スルホベタイン誘導体を修飾したイオン感応膜のアジド基の吸光度から、未反応のアジド基の量を求め、反応前のアジド基の量から差し引くことでスルホベタイン誘導体の修飾量を算出した。さらに、接触角測定を行い、膜の濡れ性について評価した。

(4) センサー性能の評価

得られたイオン感応膜を用いて、カリウムイオンに対する電位応答を測定し、応答の傾き、直線範囲、イオン選択性を求め、従来のイオン感応膜の値と比較を行った。

(5) 生体適合性の評価

生体適合性の評価を血小板粘着試験により行った。実験動物の血液を遠心分離(1500 rpm, 10 分間)し、その上澄み(多血小板血漿, PRP)にイオン感応膜を 37 °C にて浸漬後、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。さらに、グルタルアルデヒド水溶液に 25 °C にて浸漬し、PBS 水溶液およびイオン交換水で洗浄後、凍結乾燥し、走査型電子顕微鏡(SEM)により膜の様子を観察した。

4. 研究成果

(1) 生体適合性化合物の設計・合成

アミド基とスルホベタイン基との間のアルキル鎖長が 3 の化合物(C3SB)については、ジメチルアミノブタン酸塩を出発化合物として、塩化オキサリルと反応後、プロパルギルアミンを反応させて炭素-炭素三重結合を導入した。さらに、プロパンスルトンと反応させることで目的物を得た。また、アミド基とスルホベタイン基との間のアルキル鎖長が 10 の化合物(C10SB)は、11-プロモウンデカン酸をベンジル基で保護した後、ジメチルアミン塩と反応させてから水素添加により保護基を外した。その後の反応は、C3SB の合成法と同様に、塩化オキサリル、プロパンスルトンと反応した。¹H NMR スペクトルにより、目的物の生成を確認した。

(2) 生体適合性化合物を化学結合したイオン感応膜作製

N₃PVC の合成

水を含む DMF 中で、PVC をアジ化ナトリウムと 60 °C にて反応させた。反応時間を 29~168 時間の間で変化させることで、アジド基の導入率を変化させた。得られた化合物の元素分析を行い、PVC の Cl に対して、アジド基が 9.3~27.4 mol% 導入されたことがわかった。

N₃PVC を用いたイオン感応膜の作製

合成した N₃PVC を用いて膜を作製した。膜材料をテトラヒドロフラン(THF)に溶解後、シャーレに移し、室温で数日間静置して膜を得た。PVC は THF に溶解しやすいが、N₃PVC のアジド基の導入率が増えるに従い、THF への溶解度が小さくなり、15 mol% 以上導入された N₃PVC は、この方法による膜作製が困難であることがわかった。

スルホベタイン誘導体のイオン感応膜への化学結合

合成した C3SB, C10SB は水への溶解度が高く、一方、N₃PVC 膜は水に溶解しないため、クリック反応の溶媒として、THF を添加した水を用いた。反応時に触媒として用いた銅イオンが残留した場合、センサー性能に影響することが考えられたため、反応後、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム水溶液で繰り返し洗浄することで取り除いた。

(3) イオン感応膜の同定

接触角測定

作製したイオン感応膜の濡れ性を調べるために、N₃PVC を支持体とするイオン感応膜の接触角を測定し、従来の PVC を支持体とする膜と比較した。まず、N₃PVC を支持体とし、スルホベタイン誘導体を化学結合していない膜の接触角は、88.9 ± 1.6 ° であった。スルホベタイン誘導体を化学結合した場合、化学結合していない膜とほぼ同じ値を示し、クリック反応時の溶媒である水に含まれている THF の割合を変化させても、また、用いるスルホベタイン誘導体の種類によっても、ほとんど違いは見られなかった。また、PVC を支持体とする従来の膜の接触角は、87.5 ± 0.4 ° であり、N₃PVC を支持体とする膜とほぼ同じ値であった。

以上より、イオン感応膜表面に化学結合したスルホベタイン誘導体が膜の濡れ性にほとんど影響を与えていないことがわかった。これは、スルホベタイン誘導体の修飾量があまり多くないためであると考えられる。

FT-IR スペクトル測定

スルホベタイン誘導体が膜に修飾されていることを確認するために、FT-IR スペクトル測定(全反射法)を行った。作製した膜のままスペクトルを測定すると、膜溶媒由来のピークが大きく観察されるため、膜をヘキサンで処理することで膜表面の膜溶媒を取り除いたのちに測定した。

まず、C3SB を化学結合した膜では、クリック反応時の溶媒(水)中の THF の割合が増加するに従い、アジド基由来のピーク(2100 cm⁻¹ 付近)の吸光度が減少し、スルホン基由来のピーク(1050 および 1150 cm⁻¹ 付近)の吸光度が増加する傾向があった(Fig. 2)。これは、C10SB を化学結合した膜についても同様の結果であった。これよ

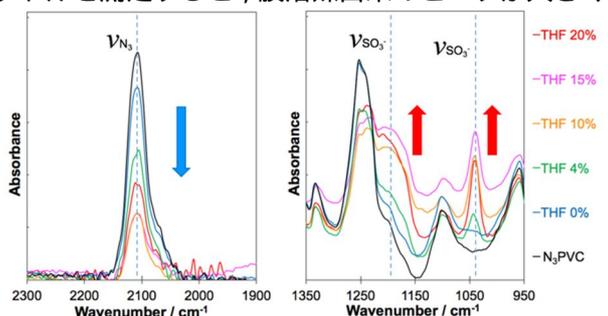


Fig. 2 C3SBを化学結合したイオン感応膜のFT-IRスペクトル

り、アジド基にスルホベタイン誘導体が化学結合しており、THF の割合が増加するに従い、スルホベタイン誘導体の修飾量が増加していることがわかった。

次に、このスペクトルよりスルホベタイン誘導体の修飾量を見積もることとした。スルホン基由来のピーク付近は、スペクトルが複雑なため、スルホン基の正確な吸光度を求めることは困難であった。そこで、アジド基の吸光度の減少を利用することにした(減少分が修飾されたスルホベタイン誘導体に相当)。アジド基の導入率の異なる N₃PVC 膜を用いて、元素分析より求めたアジド基の導入率に対して、アジド基由来の吸光度の検量線を作成したところ、良好な直線関係が得られた。この検量線を用いて、C3SB または C10SB を化学結合した N₃PVC 膜のスペクトルより修飾量を見積もったところ、C3SB の場合は約 2~6 mol%、C10SB の場合は約 1~7 mol% 修飾されており、クリック反応時の溶媒(水)中の THF の割合が多い方が、修飾量が多かった。また、スルホベタイン誘導体のアルキル鎖長の違いによる大きな差は見られなかった。

(4) センサー性能の評価

C3SB または C10SB を化学結合した N₃PVC 膜のカリウムイオンに対する電位応答を、 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ の範囲で測定したところ、低濃度から感度よく応答し、ほぼネルンスト応答を示したが、C3SB で修飾した場合と比較して、C10SB で修飾した膜は電位応答の傾きと直線範囲のばらつきがやや大きくなった。また、これらの結果を従来の PVC 膜で測定した結果と比較すると、応答の傾きはほぼ同じであったが、直線範囲が低濃度側でやや狭い傾向があった。また、ナトリウムイオンに対するカリウムイオンの選択係数を求めたところ、従来の PVC 膜よりやや大きな値を示したが、センサー性能として問題ない程度であった(Table 1)。

以上より、スルホベタイン誘導体のアルキル鎖長やクリック反応時の溶媒中の THF の割合を変えても、センサー性能に対してほとんど影響がないことがわかった。

Table 1 スルホベタイン誘導体を修飾したバリノマイシン含有イオン感応膜の Na⁺に対する K⁺の選択係数

THF /vol%	log $k_{K,Na}^{pot}$	
	C3SBN ₃ PVC	C10SBN ₃ PVC
0	-3.75 ± 0.14	-3.94 ± 0.17
4	-3.88 ± 0.13	-3.49 ± 0.08
10	-3.93 ± 0.02	-4.23 ± 0.59
15	-4.08 ± 0.17	-4.11 ± 0.08
20	-4.44 ± 0.29	-3.98 ± 0.13
PVC	-4.56 ± 0.05	
N ₃ PVC	-4.55 ± 0.04	

(5) 生体適合性の評価

PRP に浸漬したイオン感応膜の様子を SEM で観察した。5 μm 程度の円形の物質が観察されれば血小板であると考えられる。表面に付着した血小板は、フィブリノーゲンなどの血液凝固因子と相互作用し、次第に血栓への成長するため、血小板の付着が少ないほど望ましく、生体適合性が高いと判断できると考えた。生体適合性の評価には、C3SB または C10SB を化学結合した N₃PVC 膜(クリック反応時の溶媒中の THF の割合が 4 または 20%)を用い、従来の PVC 膜の場合と比較した(Fig. 3)。その結果、従来の PVC 膜には血小板が多く付着している様子が観察された。また、スルホベタイン誘導体を化学結合した膜は、THF の割合が低い条件で反応させた場合には、血小板がほとんど付着していなかった。一方、高濃度の THF を含む条件で反応させた場合には、多くの血小板の付着が観察された。また、物理的な凹凸と考えられる溝状のものも観察された。これは、THF を高濃度で含む場合には、イオン感応膜表面が一部溶解して凹凸が生じることで、血小板が付着しやすくなったのではないかと考えられる。

以上より、スルホベタイン誘導体を低濃度の THF を含む水中で化学結合した膜は、アルキル鎖長に関わらず、比較的良好な生体適合性を示すことがわかった。

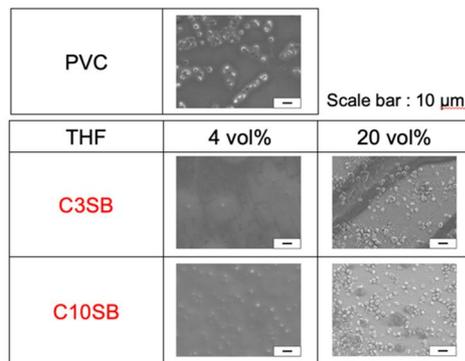


Fig. 3 PRP浸漬後のイオン感応膜のSEM観察

以上の結果より、本研究で目的としていた生体適合性をもつイオン感応膜を作製することができた。ただ、得られたイオン感応膜の寿命などについては、検討を行うことができていないので、今後の課題である。また、生体適合性の評価については、さらに条件を調べ、定量的な評価ができるように検討する必要がある。また、他の種類の生体適合性化合物についても検討することで、より良い性能を示すイオンセンサーの開発が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澁谷 薫, 藤井 愛美, 田中 陸生, 矢嶋 摂子
2. 発表標題 スルホベタイン誘導体化学修飾ポリ塩化ビニルを膜材料とするイオンセンサーの性能と生体適合性
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢嶋 摂子
2. 発表標題 生体試料の測定を目指した生体適合性材料を用いるイオンセンサーの開発
3. 学会等名 日本分析化学会 第67年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澁谷 薫, 田中 陸生, 矢嶋 摂子
2. 発表標題 スルホベタイン誘導体化学修飾ポリ塩化ビニルを膜材料とするイオンセンサーのアルキル鎖長がセンサー性能へ及ぼす影響
3. 学会等名 日本分析化学会 第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澁谷 薫, 田中 陸生, 矢嶋 摂子
2. 発表標題 スルホベタイン誘導体を化学修飾した可塑化ポリ塩化ビニル膜の同定とイオンセンサー性能の評価
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井愛美, 澁谷薫, 田中睦生, 矢嶋棋子
2. 発表標題 スルホベタイン誘導体を化学修飾したイオン感応膜のイオンセンサー性能と生体適合性の評価
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------