

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05540

研究課題名(和文)近赤外発光アップコンバージョンナノ粒子に基づく低侵襲血糖値センサの開発

研究課題名(英文)Development of minimally invasive blood glucose sensors based on near-infrared emitting upconversion nanoparticles

研究代表者

遠田 浩司 (Tohda, Koji)

富山大学・学術研究部工学系・教授

研究者番号：60212065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：グルコースの濃度の情報を近赤外(NIR)発光強度の情報に変換するランタノイドアップコンバージョンナノ粒子(UCNPs)に基づくセンシングフィルムを開発した。これはグルコースレセプター共重合フィルムにレセプター感受性近赤外吸収色素固定化UCNPsを包埋したもので、波長980 nmのレーザーを照射するとグルコース濃度に応じて波長800 nmの近赤外発光強度が変化する。開発したセンシングフィルムは、生理的グルコース濃度範囲で良好な近赤外発光応答を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、糖レセプター共重合フィルム中にレセプター感受性NIR吸収色素固定化UCNPsを包埋したかたちのNIR発光グルコースセンシングフィルムを開発した。このセンシングフィルムの応答機構は我々が独自に考案したものであり、また、UCNPsをグルコースの検出原理として用いるのは本研究が初めてである。本研究で開発したセンシングフィルムは、皮膚組織の光学的妨害の少ないNIR励起光を照射し、異なる波長のNIR発光強度を測定する全く新しい機序に基づくものである。これにより、皮下に長期間滞留可能な光学的持続血糖測定システム(CGMS)の実用化に大きく貢献でき、糖尿病患者への福音という波及効果も大きい。

研究成果の概要(英文)：We have developed an optical glucose sensing film based on lanthanoid-doped upconversion nanoparticles (UCNPs) that convert the information of glucose concentration into near-infrared (NIR) emission intensity. This sensing film incorporates receptor-sensitive NIR-adsorbing dye-immobilized UCNPs into a glucose receptor copolymerized film and emits NIR at 800 nm depending on the glucose concentration when irradiated with a 980 nm laser beam. The developed sensing film showed excellent NIR emission responses to glucose in the physiological concentration range.

研究分野：分析化学

キーワード：低侵襲血糖値センサ グルコースレセプター 近赤外吸収色素 アップコンバージョンナノ粒子 近赤外発光応答

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の厳密な血糖値管理のため、長期にわたり血糖値を連続的かつ精度よく測定でき、患者の負担の少ない持続血糖測定システム(CGM)の開発が切望されてきた。これまで種々の低侵襲 CGM システムが報告、開発されてきており、現在、グルコース酸化酵素(GOX)を固定化した針状のセンサを皮膚に突き刺して用いる電気化学検出に基づく CGM が認可され市販されている。しかし、これらの CGM は皮膚を横切る針状のセンサを用いるため感染症を引き起こす恐れがあり、また酵素を使用するためセンサ寿命が3日から10日程度と比較的短いという問題が依然としてある。これに対し、センサ自身を皮膚直下に完全に埋め込み、皮膚を介してセンサの光学的特性変化を読み取る (transdermal detection) かたちの、化学的安定性の高いポロソ酸レセプターに基づくセンサが報告されてきている。例えば、Takeuchi らは、蛍光性糖レセプターを高分子ゲルに固定したかたちのグルコースセンサを開発し、センサを長期間ヌードマウスの耳に埋め込むことが可能で、血糖値に応じた蛍光強度変化が得られることを示している。また我々は、糖レセプターとレセプター感受性色素に基づく競争的錯形成反応を利用した色変化応答型グルコースセンサの開発研究に取り組んでいる。

このような皮膚を介して血糖値を連続的に読み出す皮下埋め込み型光学センサを実用化するためには、血糖値変化に追従した可逆的な光学的センサ応答を示し、且つセンサシグナル読み出しの際のコラーゲンやヘモグロビンなどの皮膚組織による光学的妨害が無いことが必須となる。しかし、Takeuchi らが開発した蛍光性糖レセプターに基づくセンサでは、グルコースに対して可逆的で優れた蛍光応答を示すものの、励起/蛍光波長が紫外(UV)/可視光(VIS)領域にあるため、皮膚を介してセンサシグナルを読み出すのは困難である(図 1a)。また、我々が開発しているレセプターと機能性

色素に基づくセンサでは、レセプターとの錯形成に伴い NIR 波長領域の吸収スペクトルが変化する色素を用いることにより、皮膚組織による入射光吸収

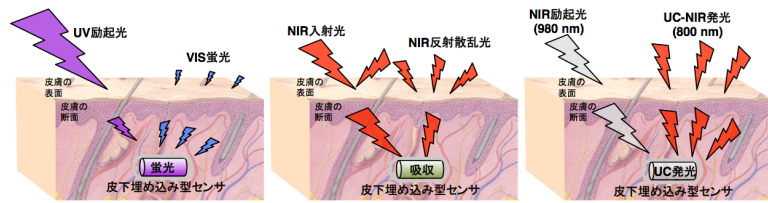


図1 皮下埋め込み型センサの皮膚を介したシグナル検出原理(transdermal detection)の概念図

を避けることは可能ではあるが、センサの光吸収に伴う入射光強度の減少分を測定するため感度が低く、皮膚表面での入射光の反射や散乱を制御する必要もある(図 1b)。従って、NIR 波長領域で励起できる例えばカルボシアニン系機能性蛍光色素を用いるのが最善の策ではあるが、そのような蛍光色素は一般に光安定性に劣り、合成も困難である。

一方、近年励起光より短波長の発光を生じるアップコンバージョン(UC)材料の開発研究が盛んに行われてきている。特にフッ化イットリウムにトリウムをドープしたランタノイドナノ粒子(UCNPs)は、980 nm の励起光を照射すると 800 nm の NIR 光を発する。この UCNPs は光安定性に極めて優れ、生体に対する毒性も報告されていない。そこで我々は、これまで開発してきた糖レセプター/レセプター感受性色素に基づくグルコースセンサにランタノイド UCNPs を組み込めば、980 nm の NIR 励起光によりグルコース濃度に応じた NIR 発光応答するセンサが構築できるものと考えた(図 1c)。

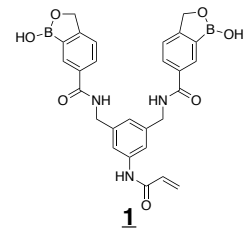
2. 研究の目的

本研究の目的は、NIR を発するアップコンバージョンナノ粒子(UCNPs)に基づく皮下埋め込み型血糖センシングシステムを開発することである。現在市販されている電気化学 CGM システムは、酵素電極の劣化のため 10 日程度でセンサを交換する必要があるが、合成糖レセプター及び色素と堅牢なランタノイド UCNPs を組み合わせることによって、少なくとも数ヶ月間皮下に滞在可能で血糖値の情報を NIR 強度変化として皮膚を介して連続的に読み出し可能な、患者の負担の少ない CGM システムを構築することを目標とする。

3. 研究の方法

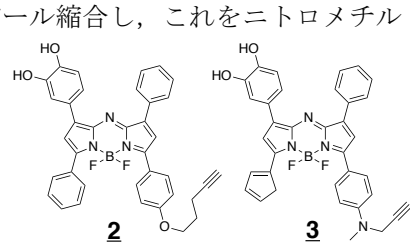
(1) ビスベンゾポロキソール型グルコースレセプター(bis-BB)の合成

ベンゾポロキソールカルボン酸と 5-ニトロ-1,3-ベンゼンジメタンアミンを脱水縮合し、水素ガス置換下 Pd/C で接触還元した。得られた化合物を DMF に溶解し、アクリル酸を加えて脱水縮合することにより、重合性官能基を有するグルコースレセプターbis-BB **1**を得た。



(2) レセプター感受性 NIR 吸収色素の合成

アセトフェノン誘導体とベンズアルデヒド誘導体をアルドール縮合し、これをニトロメチル化した。得られた生成物を過剰の酢酸アンモニウム存在下 1-ブタノール中で還流したのち無水ジクロロメタンに溶解し三フッ化ホウ素・ジエチルエーテル錯体を加え 24 時間攪拌することにより、レセプター認識部位であるカテコールと固定化部位であるアルキンに有するレセプター感受性 NIR 吸収 aza-BODIPY 色素 **2** 及び **3** を得た。



(3) コアシェル型ランタノイド UCNP の合成

塩化イットリウム六水和物および塩化ランタノイド六水和物にオレイン酸、1-オクタデセンを加えアルゴン雰囲気下 160 °C で 1 時間加熱した。室温まで冷却後、メタノールに水酸化ナトリウム、フッ化アンモニウムを溶解させた溶液を添加し、30 分間攪拌した。攪拌後アルゴン雰囲気下 420 °C で 1 時間加熱後、ヘキサンと水で数回洗浄し、遠心分離することで UCNP を得た。

得られた UCNP をヘキサンに分散させ、Igepal CO-520 とアンモニア水を加え 30 分間超音波処理を行った。その後テトラエトキシシランを加え室温で 24 時間攪拌後、エタノールと水で数回洗浄し、遠心分離することでコアシェル型ランタノイド UCNP を得た。

(4) コアシェル型 UCNP 表面へのレセプター感受性近赤外吸収 aza-BODIPY 色素の固定化

合成したコアシェル型 UCNP をベンゼン中に分散させ、3-グリシジルオキシプロピルトリメトキシシランを加えコアシェル型 UCNP 表面にグリシジル基を導入した。得られた UCNP にアジ化ナトリウムおよび塩化アンモニウムを含む水溶液を加え 24 時間還流し、ジメチルスルホキシド中に分散させレセプター感受性 aza-BODIPY 色素を加えた後、アスコルビン酸と硫酸銅 (II) を溶解させた水溶液を加え、室温で 24 時間攪拌することにより色素固定化 UCNP を得た。

(5) コアシェル型 UCNP 分散溶液のアップコンバージョン(UC)発光スペクトル測定

種々の濃度の bis-BB レセプター**1**及びグルコースを含む PBS/DMSO(1 : 1)溶液に色素 **2**または **3** 固定化 UCNP を分散させた溶液を石英セルに加え、NIR 半導体レーザー(波長 980 nm, 500mW)を照射し、光ファイバー分光器で UC 発光スペクトルを測定した。

(6) UCNP 包埋 NIR 発光グルコースセンシングフィルムの構築と応答評価

bis-BB レセプター**1**、ジメチルアクリルアミド(DMAA)、ポリエチレングリコールジメタクリレート(PEGMA, n = 4)、熱重合開始剤(V-65)を含む DMSO 溶液に色素 **2**あるいは**3**固定化 UCNP を分散させ、これを二枚のスライドガラスで厚さ 200 μm のスペーサーを挟み込んだ鋳型に入れ、熱重合することにより UCNP 包埋グルコースセンシングフィルムを構築した。調製したセンシングフィルムを十分に洗浄した後、直径 2 mm のディスクに切り取り、自作のフローセルの組み込んで種々の濃度のグルコース/PBS 溶液を送液しながらレーザー照射(980 nm, 500mW)下での UC 発光スペクトルを測定した。

4. 研究成果

(1) ランタノイド UCNP の発光スペクトル

Er³⁺, Ho³⁺, Tm³⁺をドープした NaYF₄:20% Yb / 2% Ln, (Ln: Er³⁺, Ho³⁺, Tm³⁺) の UC 発光スペクトルを図 2 に示す。Er³⁺をドープすることにより合成したランタノイド UCNP では、511, 542 および 660 nm に極大発光を示し、Ho³⁺をドープし合成したランタノイド UCNP では、540

nmに極大発光を示すことが分かった。Er³⁺およびHo³⁺をドープしたランタノイドUCNPsでは、近赤外領域での発光を示さなかったが、Tm³⁺をドープしたUCNPsは513 nmと近赤外領域である800 nmに極大発光を示した。そこで、最大の近赤外 UC 発光強度が大きい UCNPs を得るために、Tm³⁺をドープしたUCNPs 組成比率の最適化を試みた結果、Y³⁺を用いないタイプの組成比では UC 発光強度は小さいが、Y³⁺にYb³⁺を18%ドープした組成比のUCNPsではUC発光が強いことが分かった。合成した中ではNaYF₄:18% Yb / 1% TmがNaYF₄:20% Yb / 2% Tmと比較し、7.29倍のUC発光強度を示すことが分かった。

更に、UCNPsの発光強度をより増大させることを目的とし、NaYF₄:18% Yb / 1% Tmに基づくUCNPsの合成を360 °C、390 °Cおよび420 °Cと異なる反応温度で行なった結果、反応温度の増加に伴い800 nmにおける発光強度が増大することが分かった。各合成温度におけるランタノイドUCNPsのTEM画像を図3(A)~(C)に示す。反応温度の増加に伴い六方晶系結晶の粒径が大きく成長しており、粒径が大きいほど発光強度が増加するものと考えられる。

図3 (D) に420 °Cで合成したUCNPsをシリカ層で覆ったコアシェル型UCNPsのTEM画像を示す。シリカ層で覆う前のUCNPs (420 °Cで合成)の平均粒径は70 nmであったが、コアシェル型UCNPsでは表面シリカ層の厚みを反映して86 nmと大きくなり、形状が球状に変化することが分かった。

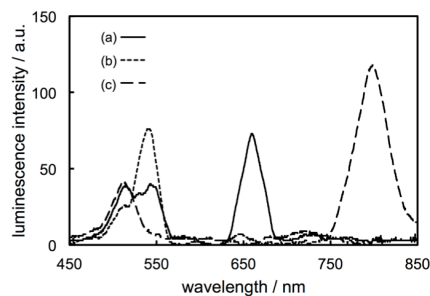


図2 980 nmレーザー励起に伴うUCNPsの発光スペクトル
(a) NaYF₄:20% Yb, 2% Er; (b) NaYF₄:20% Yb, 2% Ho;
(c) NaYF₄:20% Yb, 2% Tm.

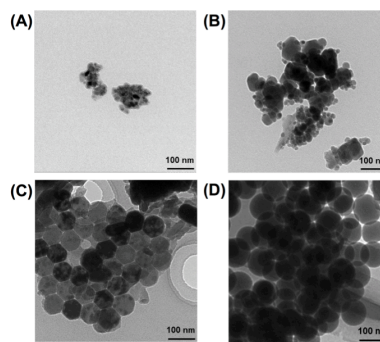


図3 合成したUCNPs (NaYF₄:18% Yb, 1% Tm)のTEM像
焼成温度(A) 360 °C, (B) 390 °C, (C) 420 °C,
(D)コアシェル型UCNPs焼成温度420 °C

(2) レセプター感受性 NIR 吸収色素 2 及び 3 の吸収スペクトル

グルコースレセプターbis-BB1 とレセプター感受性 aza-BPDIPY 色素 2 あるいは 3 の混合溶液([色素]:[レセプター] = 1 : 10) にグルコースを添加した際の吸収スペクトル変化を図4に示す。過剰のレセプターを含む色素 2 溶液は、レセプターと色素 2 の錯体形成を反映して680 nmに吸収極大を持つが、ここにグルコースを添加するとレセプターとグルコース/色素 2 間の競争的錯形成反応により色素 2/レセプター錯体が解離し、吸収スペクトルはブルーシフトする(図4 a)。

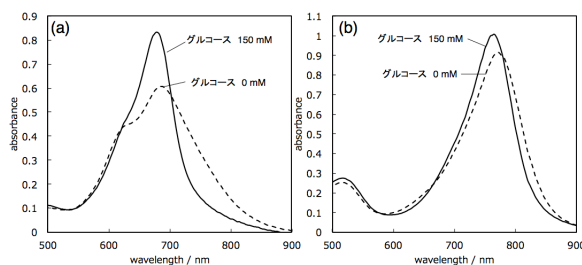


図4 グルコースレセプターbis-BB1とレセプター感受性近赤外吸収aza-BODIPY色素2(a)あるいは3(b)を含む溶液(PBS (-):EtOH=1:1 v/v)のグルコース添加に伴う吸収スペクトル変化 ([aza-BODIPY色素]:[bis-BB 1]=1 : 10)

また、Tm³⁺に基づくUCNPsのNIR発光波長である800 nmにおいては、グルコース添加に伴い吸光度が減少しており、UCNPs/bis-BB/色素 2 に基づくグルコースセンシングでは、グルコース添加による内部フィルター効果の解消によりグルコース濃度増加に伴って800 nmにおける発光強度が増大するものと考えられる。一方、電子豊富なチエニル基とアミノメチル基を導入した色素 3 の吸収スペクトルは色素 2 のものと比べて大きなレッドシフトを示し、グルコース添加に伴う800 nmにおける吸光度減少率も二倍程度大きいことが分かった(図4 b)。これらのグルコースレセプター感受性近赤外吸収色素は、我々が初めて分子設計・合成したものであり、これまで報告例はない。

(3) レセプター感受性色素 2 固定化 UCNPs 分散溶液のグルコースに対する NIR 発光応答

グルコースレセプターbis-BB1を含むレセプター感受性色素 2 固定化 UCNPs 分散溶液にグルコースを添加した際の、NIR 半導体レーザー(波長 980 nm, 500mW)照射に伴う発光スペクトル

変化を図5に示す。グルコース濃度の増加に伴い800 nmにおける NIR 発光強度が増大していることがわかる。グルコース濃度を 0 mM から 112 mM に増大させた際の 800 nm における発光強度増加率は 15.3%であった。このグルコース濃度に応じた NIR 発光強度の増加は、コアシェル型 UCNP に固定化したレセプター感受性色素 2/bis-BB1 レセプター錯体の解離に伴う内部フィルター効果(IFE)の解消に基づくものと考えられる。グルコース濃度の情報を、皮膚組織による光学的妨害の少ない NIR 発光強度変化の情報に変換できることを示したのは、本研究が初めてである。

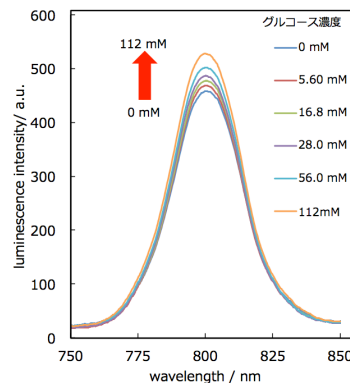


図5 bis-BB1 (1.8×10^{-6} M) を含む NIR 色素 2 固定化 UCNP 分散溶液 (2 mg/mL) のグルコース濃度変化に伴う発光スペクトル変化 (PBS (-):DMSO = 1:1 溶液)

(4) UCNP に基づく NIR 発光型センシングフィルムのグルコースに対する応答

レセプター感受性 NIR 吸収色素固定化 UCNP を bis-BB1 レセプター/単官能モノマー共重合ポリマーで包埋したセンシングフィルムに NIR 半導体レーザー (波長 980 nm) を照射

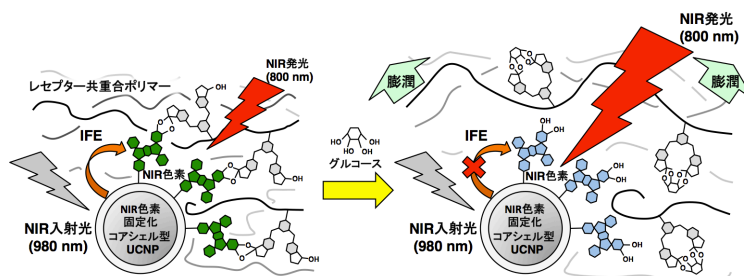


図6 NIR色素固定化UCNP包埋レセプター共重合センシングフィルムのグルコースに対するNIR発光応答

すると波長 800 nm の UC-NIR 発光を生じるが、UCNP に固定化した NIR 色素/bis-BB1 レセプター錯体の吸収スペクトルが UC-NIR 発光とオーバーラップする、いわゆる内部フィルター効果(IFE)のため UC-NIR 発光強度は小さい。ここにグルコースが加わると競争的錯形成反応により NIR 色素/bis-BB1 レセプター錯体が解離し、内部フィルター効果(IFE)の解消に伴ってグルコース濃度に応じた UC-NIR 発光応答を示す (図6)。

我々は、グルコースに対する最大の NIR 発光応答するセンシングフィルムを構築するため、種々の濃度のレセプター感受性 NIR 色素及び bis-BB1 レセプターを含むセンシングフィルムを調製し、そのグルコースに対する NIR 発光応答の詳細を調べた。その結果、センシングフィルム中の色素及びレセプター濃度が低いと IFE が十分に機能せず、グルコース濃度変化に対する NIR 発光強度変化が小さいこと、色素及びレセプター濃度が高いとグルコースに対する競争的錯形成反応が進行せず、NIR 発光強度及びその変化が小さいことがわかった。種々の検討の結果、センシングフィルム中の色素及びレセプター濃度は単官能モノマーに対して 0.63 mol% が最適であることを見出した。

図7に、NIR 色素 2 固定化 UCNP 及び NIR 色素 3 固定化 UCNP に基づくセンシングフィルムの 800 nm におけるグルコースに対する NIR 発光応答の検量線を示す。いずれのセンシングフィルムもグルコース濃度 0 mM から 100 mM の濃度範囲で NIR 発光応答しており、これは血糖値の生理的濃度範囲(3 mM~30 mM : 50 mg/dl~500 mg/dl)をカバーしている。また、色素 3 に基づくセンシングフィルムの方が色素 2 に基づくものよりもグルコースに対する発光応答は若干大きかった。これは、NIR 色素 3 の方が 2 よりも 800 nm における吸光度が大きいことを反映しているものと考えられる。

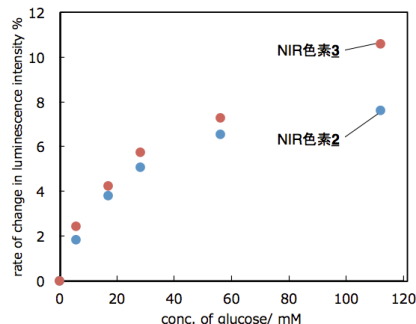


図7 NIR色素2固定化UCNP及びNIR色素3固定化UCNPに基づくセンシングフィルムのグルコースに対するNIR (800 nm)発光応答

本研究で開発したグルコースセンシングフィルムは、皮膚組織の光学的妨害の少ない NIR 励起光を照射し、異なる波長の NIR 発光強度を測定する全く新しい機序に基づくものである。これにより、皮下に長期間滞留可能な光学的 CGM 開発の道が拓けたものと確信している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 遠田浩司, 日下部智陽, 山川翔平, 菅野憲	4. 巻 70
2. 論文標題 高分子ゲルの膨潤をシグナル増幅の原理とするオプティカルグルコースセンシングフィルムの開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bunseki Kagaku (分析化学)	6. 最初と最後の頁 133-140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小林美月, 遠田浩司, 菅野憲	4. 巻 70
2. 論文標題 アントラセン蛍光団を有するビスベンゾポロキソール型グルコースレセプター	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bunseki Kagaku (分析化学)	6. 最初と最後の頁 141-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 水上泰斗, 遠田浩司, 菅野憲	4. 巻 70
2. 論文標題 グルコースセンサ用レセプター感受性近赤外吸収azaBODIPY色素の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bunseki Kagaku (分析化学)	6. 最初と最後の頁 159-164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 原田大輔, 草島佳紀, 菅野憲, 遠田浩司	4. 巻 70
2. 論文標題 ランタノイドアップコンバージョンナノ粒子(UCNPs)に基づく近赤外発光糖センサの開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bunseki Kagaku (分析化学)	6. 最初と最後の頁 207-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田大輔, 菅野憲, 遠田浩司
2. 発表標題 ランタノイドアップコンバージョンナノ粒子(UCNPs) の開発とオプティカルセンサへの応用
3. 学会等名 分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 本山祐, 菅野 憲 , 遠田 浩司
2. 発表標題 フォトクロミズムによる応答 on/off 差分検出に基づくオプティカルセンサの開発
3. 学会等名 分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池戸佑太郎 , 菅野 憲 , 遠田 浩司
2. 発表標題 角度に依存しない構造発色性ゲルを用いた化学センサーの開発
3. 学会等名 分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水上泰斗, 遠田浩司, 菅野憲
2. 発表標題 グルコースセンサ用レセプター感受性近赤外吸収aza-BODIPY色素の開発
3. 学会等名 分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 草島佳紀, 遠田 浩司, 菅野 憲
2. 発表標題 近赤外発光ランタノイドアップコンバージョンナノ粒子 (UCNPs) の合成とセンサへの応用
3. 学会等名 分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 棚橋 祐斗・菅野 憲・遠田 浩司
2. 発表標題 グルコースセンサー用近赤外吸収機能性色素の開発
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 小林 美月・菅野 憲・遠田 浩司
2. 発表標題 ビスベンゾポロキソール型グルコースレセプターの開発
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 津田 翔平・菅野 憲・遠田 浩司
2. 発表標題 フォトクロミズムによる応答差分検出に基づくpH センサの開発
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 桐山 絵美里・松本 浩平・遠田 浩司・菅野 憲
2. 発表標題 生体分子を可視化検出する構造発色性ゲルを用いた化学センサーの開発
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 原田 大輔・遠田 浩司・菅野 憲
2. 発表標題 オプティカルセンサのためのランタノイドアップコンバージョンナノ粒子(UCNPs)の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 糖センサ	発明者 遠田浩司, 草島佳紀, 原田大輔, 水上泰斗, 菅野憲	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-030326	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------