

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06984

研究課題名(和文) ナノポア計測に基づく薬剤分析技術の確立

研究課題名(英文) Development of drug analysis method based on nanopore measurement

研究代表者

佐藤 勝彦 (Sato, Katsuhiko)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80400266

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)：この研究では、ナノメートルサイズのナノポアピペットに化学修飾を施し、イオン電流変化を指標とした薬剤センシングシステムの確立を目指した。イオン電流計測により、リアルタイムかつ高感度に生体試料中の薬剤を定量することが可能となる。分子認識機構として、電解質多層膜、フェニルボロン酸およびニトロキシラジカル誘導体を検討し、特にバンコマイシンでは、0.01-1 mMの範囲で濃度依存的なイオン電流応答が確認された。さらに、ナノポア先端に合成高分子を修飾し、pHセンサーおよび酵素センサーとしての応用も検討した。しかし、得られたシグナルの再現性に課題があり、微小空間への修飾操作が困難であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療効果の最大化、副作用の回避、個別化医療の実現、薬物相互作用の管理などのために薬物モニタリングが行われる。一般的に薬剤類の血中濃度はELISA法やLC/MSで測定されるが、これらの手法は高コストであり、複雑な前処理・操作を必要とする。一方、電気化学計測は簡便な手法であり、特にイオン電流計測は、様々な薬剤に対するプローブを安価に作製できる可能性があり、微小化や簡便なリアルタイム計測が可能である。このイオン電流変化を指標としたセンシングシステムを確立できれば、医療の現場での効率的な薬物モニタリングが行が実現する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish a drug sensing system based on ion current changes by chemically modifying nanopore pipettes with nanoscale tips. Ion current measurement enables real-time, high-sensitivity quantification of drugs in biological samples. We explored molecular recognition mechanisms using phenylboronic acid (PBA) and nitroxyl radical derivatives. Particularly for vancomycin, a concentration-dependent ion current response was observed in the range of 0.01-1 mM. Additionally, we modified the nanopore tip with synthetic polymers to explore applications as pH and enzyme sensors. However, challenges were found in signal reproducibility and the difficulty of modifications in such small spaces.

研究分野：分析化学

キーワード：薬物モニタリング フェニルボロン酸 ニトロキシラジカル ナノポア イオン電流

### 1. 研究開始当初の背景

薬物モニタリングは、治療薬の血中濃度を管理し、有効性を最大化し副作用を最小化するために不可欠である。特に有効域が狭い薬剤では、適切な投与量の調整が重要であり、副作用を防ぎながら患者の安全と治療効果を確保するために必須となっている。一方、電気化学分析は、取り扱いが容易でリアルタイム計測が可能のため、医療や産業分野で広く利用されている。特に、酵素反応を利用したバイオセンサーは高い選択性と感度を持ち、糖尿病患者の血糖値測定用グルコースセンサーなどで成功を収めている。しかし、基本的に酵素反応の基質にならない化合物は電気化学的に検出できないため、シクロスポリンやバンコマイシンなどの治療薬の血中濃度モニタリングには対応できない。これらの薬剤のモニタリングには ELISA 法や LC/MS などが用いられるものの、これらの手法は計測時間が長く高コストである。したがって、電気化学手法によるより効率的で正確な測定法の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

この研究の目的は、少量の血液中に存在する治療薬をナノポア計測技術を用いてリアルタイムで高感度に定量する技術を確立することにある。ナノポアによるイオン電流計測はナノポア周辺のさまざまな物理的状態変化をとらえることが可能である(図1)。したがってナノポアピペット先端を機能性分子で化学修飾し、薬剤の結合によるイオン電流変化を指標としたセンシングシステムが構築可能である。これにより多様な薬剤のリアルタイム分析が可能となり医療現場での応用が期待される。

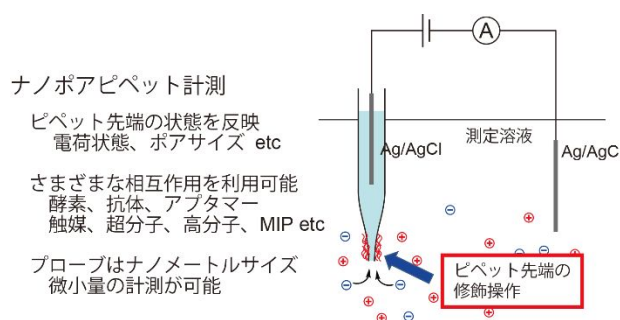


図1 ナノポアピペット計測

### 3. 研究の方法

本研究では、先端径が数十～数百ナノメートルサイズのナノポアピペット先端への化学修飾方法を確立するために(図2) Layer-by-Layer (LbL)法による高分子電解質の被覆、フェニル硼酸(PBA)のAu-S結合による修飾、およびニトロキシラジカルの電解重合法を検討する(図3)。これらの手法を用いて、種々の機能性分子をナノポアピペットの先端に修飾し、薬剤が結合するとにより引き起こされるイオン電流変化を検出する。まず、LbL法を用いて高分子電解質を順次積層し、ナノポアピペット先端に安定した薄膜を形成する。pKaが中性付近にあるポリマーを合成しpHセンシングを行う。これにより、機能性分子の効果的な修飾が可能となる。次に、金ナノ薄膜を光還元により析出させAu-S結合を利用して修飾することで機能性分子の固定化を行う。機能性分子としてフェニル硼酸(PBA)を用いてジオール部位を有する薬剤の検出を行う。さらに、電解重合法を用いて、高活性なニトロキシラジカル触媒をナノポア空間に固定化し、水酸基を持つ薬剤の電気化学的検出を試みる。ニトロキシラジカル触媒が水酸基により還元されイオン電流の変化が生じる。これらの修飾ナノポアピペットを用いて、リドカイン、アプリンジン、バンコマイシン、シクロスポリンなどの対象薬剤のセンシングを行う。

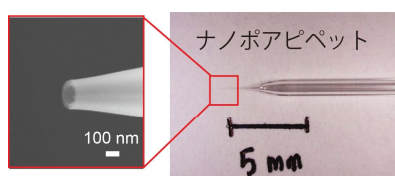


図2 ナノポアピペット

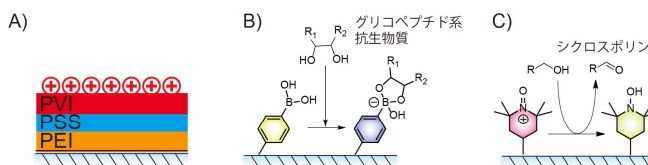


図3 ナノポアピペット先端の化学修飾、A) Layer-by-Layer法による高分子電解質、B) フェニル硼酸のジオール認識、C) ニトロキシラジカルの水酸基認識

### 4. 研究成果

国内外でナノポアを利用したイオン電流計測はすでに広く研究されており、DNA シークエンスや特定の生体分子の検出に成功している。しかし、特定の薬剤の血中濃度をリアルタイムで測定する技術は確立されていない。本研究は、そのようなナノポア計測技術を薬剤モニタリングに応用する新しいアプローチであり、既存の技術に対する革新的な貢献をもたらす。特に、酵素や抗体を使用しない非酵素的な電気化学センサーの分野において、ナノポア計測を利用すること

で、幅広い薬剤の検出が可能となり、研究の進展に大きく寄与することが期待される。

### (1) 微小 pH センサーの構築

ナノポアセンサーは、数十～数百ナノメートルの細孔（ポア）を物質が通過する際に生じるイオン電流の変化を測定することで、DNA、エクソソーム、タンパク質などのラベルフリー測定を可能にする。この原理に基づくセンサーは簡単で使いやすく多くの分野で応用されている。ナノポアの表面は様々な機能性分子やポリマーで修飾されておりセンシングに利用されている。しかし、ナノポアの表面修飾状態や表面電荷の正確な評価は困難であり従来の方法ではイオン電流応答のみを指標としていた。さらにナノポア計測は再現性に乏しく正しく界面の状態を解析することは困難であった。

この研究の目的は、はじめに修飾されたポリ(1-ビニルイミダゾール) (PVI) の表面電荷の見かけの解離定数 ( $pK_{aapp}$ ) を電気化学的手法で定量的に評価し、ナノポア pH センサーとして応用することである。pH 変化に伴うイミダゾール基の電離状態をイオン電流変化としてとらえる (図 4)。PVI は LbL 法を用いてポリスチレンスルホン酸 (PSS) と静電的相互作用を駆動力として PEI/PSS/PVI 多層フィルムとして作成した。まず、積層条件による LbL 多層膜形成の確認には石英結晶マイクロバランズ (QCM) を使用し製膜の効果的な方法を確立した。QCM のリアルタイムでモニタリングした結果、PEI/PSS/PVI 多層フィルムの形成により、フィルムの安定性と修飾効率が確認された。PVI の単層フィルムに比べて多層フィルムでの吸着量が大きく、これが pH 応答の向上に寄与することが示された。また、サイクリックボルタンメトリー (CV) 測定により、PVI 多層フィルムの  $pK_{aapp}$  を定量的に評価した。得られた LbL 界面の  $pK_{aapp}$  は約 5.3 であり、これは PVI のイミダゾール残基の溶液中の  $pK_a$  (約 6.0) よりも低かった。この差は、PVI フィルムの電荷状態や内部層 PSS の影響によるものであると考えられる。これらの結果から、pH 測定用ナノポアセンサーを構築するためのガイドラインを提供することができた。

マクロな系での応答が確認できたため PVI 多層フィルムをナノポアピペットの先端に修飾し、その pH 応答を評価した。PEI/PSS/PVI 多層フィルムが修飾されたナノポアピペットは、pH 5 から 8 の範囲で pH 依存性のイオン電流変化を示した。特に、 $pK_{aapp}$  近傍で顕著な応答が観察され、pH 変化に対する感度が高いことが確認された。一方、未修飾のナノポアピペットでは pH 応答がほとんど見られず pH センサーとしての実用性が示された (図 5)。

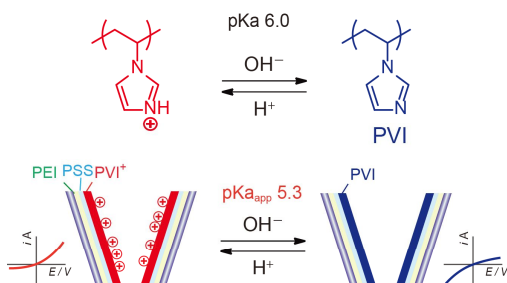


図 4 ポリビニルイミダゾールの化学構造と pH 応答原理

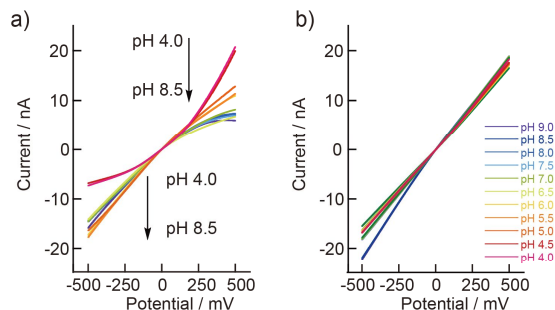


図 5 a) PEI/PSS/PVI 修飾ナノポアピペットと b) 未修飾ピペットの pH 応答

### (2) フェニルボロン酸修飾ナノポアピペットによるバンコマイシンの定量

本研究は、フェニルボロン酸 (PBA) 修飾ナノポアピペットを用いたバンコマイシン (VCM) 検出法を行った。従来のバンコマイシンの定量法は、操作が複雑で高価な機器が必要であるため、簡便で安価な方法の開発が求められていた。本研究では、PBA のチオール誘導体 (DTBA-PBA) を用いてあらかじめ金ナノ薄膜を析出させたナノポアピペット先端に Au-S 結合を介して修飾した。PBA と VCM との結合により生じるの負電荷をイオン電流変化として計測した。PBA は VCM のジオール部位と自発的にエステル結合を形成し、このときボロン酸の  $pK_a$  が低下するため負電荷を帯びる。

まず、DTBA-PBA 修飾 Au 電極の VCM 応答を評価するために、直径 3 mm の金電極を用いてサイクリックボルタンメトリー (CV) を行った。この CV 測定により、 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  の酸化還元反応を指標として DTBA-PBA 修飾 Au 電極の表面特性と電流応答の評価を行った。PBA と VCM の結合により電極表面が負電荷となり  $Fe(CN)_6^{3-/4-}$  が反発し応答電流が減少したことから PBA 修飾界面は、VCM に対して高い感度を持つことが確認された (図 6 a)。

次に、ナノポアピペットの作製には、ホウケイ酸ガラスキャピラリーを使用し、プラー装置を用いてナノポアを形成した。形成したナノポアピペットの先端を光還元法により Au を析出させてコーティングし、さらに DTBA-PBA で修飾した。ナノポアピペットを用いたイオン電流測定では、0.01 ~ 1 mM の VCM 濃度範囲で濃度依存性の電流応答が観察された。特に、-400 mV での電流応答が VCM 濃度に応じて減少し、この応答が VCM の濃度を反映していることが確認

された(図6b)。対照実験として、無修飾ナノポアピペットを用いた測定ではVCMに対する応答が見られなかったことから、PBA修飾が特異的な応答を引き起こすことが示された。また、フルクトースを用いた測定でも類似の応答が観察されたが、VCMに比べて応答は小さかった。これにより、VCMがPBAに対して強い親和性を持ち、複数のジオール基を持つために特異的な結合が起こることが示唆された。このように、DTBA-PBA修飾ナノポアピペットはVCMに対して高い選択性と感度を持ち、迅速かつ高感度な定量が可能であることが実証された。これにより、従来の高価で複雑な定量法に代わる、簡便で低コストな方法として、医療現場での薬剤モニタリングに応用できる可能性が示された。

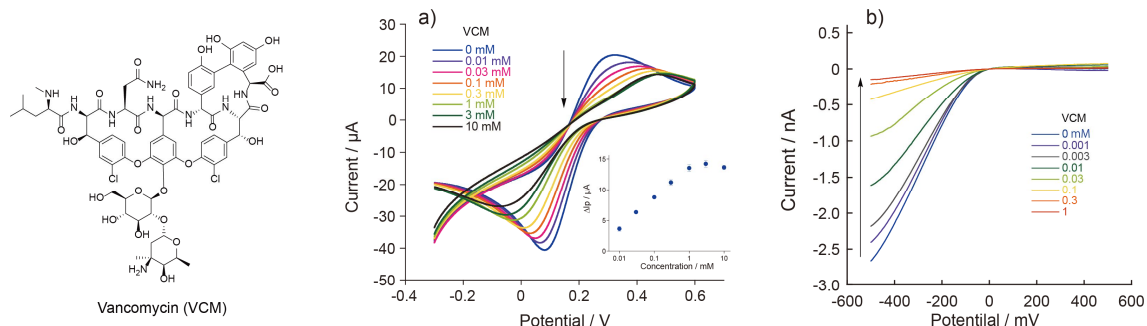


図6 バンコマイシンの構造と a) PBA 修飾電極と b) ナノポアピペットのバンコマイシン応答

### (3)ニトロキシルラジカル化合物の修飾なピペット

ニトロキシルラジカルとしてを2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル (TEMPO) をペンダントしたフェノール誘導体を合成し電解酸化重合によるピペットへの修飾を試みた。TEMPO は安定なラジカル体として固定化した後に、共酸化剤により活性体であるオキソアンモニウム体としてピペット上に配置する。水酸基を有する薬物により還元されヒドロキシルアミン体となりピペット先端の電荷が消失することでイオン電流変化が生じる。上記と同様に初めに直径3mmの電極においてTEMPO誘導体の固定化および薬物応答を観察したところ、電子吸引基により活性化されたアセトアミドTEMPOにおいて種々の薬物の検出に成功した。そこでナノポアへの適用を試みたものの再現性のあるイオン電流計測は困難であった。これはオキソアンモニウム体を効率よく生成できなかったもしくは不安定であるためと考えられる。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tetsuya Ono, Kyoko Sugiyama, Sachiko Komatsu, Masayuki Kumano, Kentaro Yoshida, Takenori Dairaku, Tsutomu Fujimura, Yusuke Sasano, Yoshiharu Iwabuchi, Yoshitomo Kashiwagi and Katsuhiko Sato	4. 巻 11
2. 論文標題 Catalysis of electro-oxidation of antibiotics by nitroxyl radicals and the electrochemical sensing of vancomycin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 21622-21628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1ra03681e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Katsuhiko Sato, Fumiya Sato, Masayuki Kumano, Toshio Kamijo, Takaya Sato, Yuanshu Zhou, Yuri Korchev, Takeshi Fukuma, Tsutomu Fujimura, Yasufumi Takahashi	4. 巻 33
2. 論文標題 Electrochemical Quantitative Evaluation of the Surface Charge of a Poly(1-Vinylimidazole) Multilayer Film and Application to Nanopore pH Sensor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electroanalysis	6. 最初と最後の頁 1633-1638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/elan.202100041	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 該当する

1. 著者名 Fumiya Sato, Haruka Nakano, Toshio Kamijo, Kazuhiro Watanabe, Tsutomu Fujimura, Yasufumi Takahashi, Katsuhiko Sato	4. 巻 35
2. 論文標題 Vancomycin sensing using a phenylboronic acid-modified nanopore pipette	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Electroanalysis	6. 最初と最後の頁 e202300173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/elan.202300173	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 史也, 中野 遥香, 渡邊 一弘, 藤村 務, 佐藤 勝彦
2. 発表標題 ナノポア計測に基づくバンコマイシンの検出
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊野征行, 佐藤勝彦, 小野哲也, 笹野裕介, 岩淵好治, 柏木良友, 藤村務
2. 発表標題 高活性ニトロキシラジカルとチオール化合物の電気化学応答
3. 学会等名 第61回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○今橋良太, 渡邊一弘, 大野瑞季, 吉田健太郎, 小野哲也, 佐藤勝彦, 柏木良友
2. 発表標題 ニトロキシラジカル置換フェノールの水溶液中での電気化学的重合とその電気化学的分析への応用
3. 学会等名 第61回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2022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