

光スイッチング機能を有するコアシェル型近赤外発光低侵襲 血糖値センサの開発

富山大学 学術研究部工学系 菅野 憲

Development of a Core-Shell Type Near-Infrared-Light-Emitting Less-Invasive Blood
Glucose Sensor with Photoswitch

Akira Kanno

Faculty of Engineering, University of Toyama

本研究は、血糖値センサの精度向上を目指し、可視レーザー光照射 / 停止によりセンサ応答の遠隔での on/off が可能で、糖濃度をアップコンバージョン (UC) 近赤外 (NIR) 発光強度変化として読み出す、光スイッチング機能を有する NIR 発光皮下埋め込み型血糖センシングフィルムを開発を目的とした。まず、糖レセプターを固定化したコアシェル型 UC NPs を内包する高分子ゲルを調製し、周辺環境の糖濃度に UC 発光強度が変化することをあきらかにした。次いで、メロシアニンを高分子側鎖に有する高分子ゲルの調製を行い、青色レーザー光を照射すると、糖に対する応答の精度および可逆性の向上に成功した。本研究で開発したこれらのセンシングフィルムを組み合わせることで、高い精度を有する皮下埋め込み型血糖値センシングシステムのプラットフォーム構築が可能であると考ええる。

This study aimed to develop near-infrared (NIR) light-emitting less-invasive sensing films for monitoring blood glucose, using a photoswitch that can remotely turn on/off the responses of the films by irradiating/stopping visible laser light. The resultant changes in the intensities of upconversion (UC) NIR emission is applicable to real-time sensing of blood glucose. First, we prepared a polymer gel containing core-shell type of UC nanoparticles with immobilized sugar receptors, and observed the increase in the intensities of UC emission upon stimulation the increasing concentrations of glucose. Next, we prepared a polymer gel with merocyanine in the polymer side chain, where we improved the precision and reversibility of the sugar sensing films. Combining these the two types of sensing films, we can construct a platform for a highly precise and less-invasive blood glucose sensing system.

1. はじめに

これまで、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) がいくつか開発・報告されてきた。現在、グルコース脱水素酵素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 CGM が認可され市販されている。しかし、この CGM は酵素を使用するためセンサ寿命が 10 日程度と比較的短いという問題点がある。また、皮膚直下に完全に埋め込んだセンサからの光学的特性変化を読み取るかたちの、化学的に安定なボロン

酸レセプターに基づくセンサが報告されてきている^{1,2)}。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、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。

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^{3,4)}。特にフッ化イットリウム YF_4 にトリウム Tm^{3+} をドーピングしたランタノイド UC ナノ粒子(UCNPs)は、980nm の励起光を照射すると皮膚組織による光学的妨害が極めて少ない波長 800nm の UC 近赤外(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。

本研究は、血糖値センサの精度向上を目指し、可視レーザー光照射 / 停止によりセンサ応答の遠隔での on/off が可能で、糖濃度を UC-NIR 発光強度変化として読み出す、光スイッチング機能を有する NIR 発光皮下埋め込み型血糖センシングフィルムの開発を目的とした(図 1)。具体的には、(A)糖レセプターを固定化したコアシェル型 UCNPs を内包する高分子ゲル、および(B)メロシアニンを高分子側鎖に有する高分子ゲルの調製を行った。(A)においては、糖濃度に応じて架橋点が解離 / 再構成・フィルムの膨潤 / 収縮が起こり、コアシェル型 UCNPs の包埋密度が変化する。従って、センシングフィルムからの UC 発光強度(センサシグナル)を測定することで、糖濃度を定量できる(センサ応答 on : 図 1 (a))。(B)においては、青色レーザー光を照射すると、フィルム中のメロシアニンはレセプター不感のスピロピランへと光異性化するため、フィルムは膨潤する(図 1 (b) (b))。この場合、センサシグナルは糖濃度に依存しない(センサ応答 off)。フィルムへの青色レーザー光照射を止めると、スピロピランはメロシアニン型へと自発戻りし、センサ応答 on の状態に戻る。青色レーザー光照射 / 停止を繰り返すことによって(「コンディショニング」)、レセプター及びメロシアニン共重合直鎖ポリマーの流動性が向上すると共に架橋点の分布が均一となり、糖に対する応答の可逆性の向上が見込まれる。

(A)および(B)を組み合わせることで、血糖値をリアルタイムで精度よく定量できるセンシングフィルムの開発が可能であると考えた。

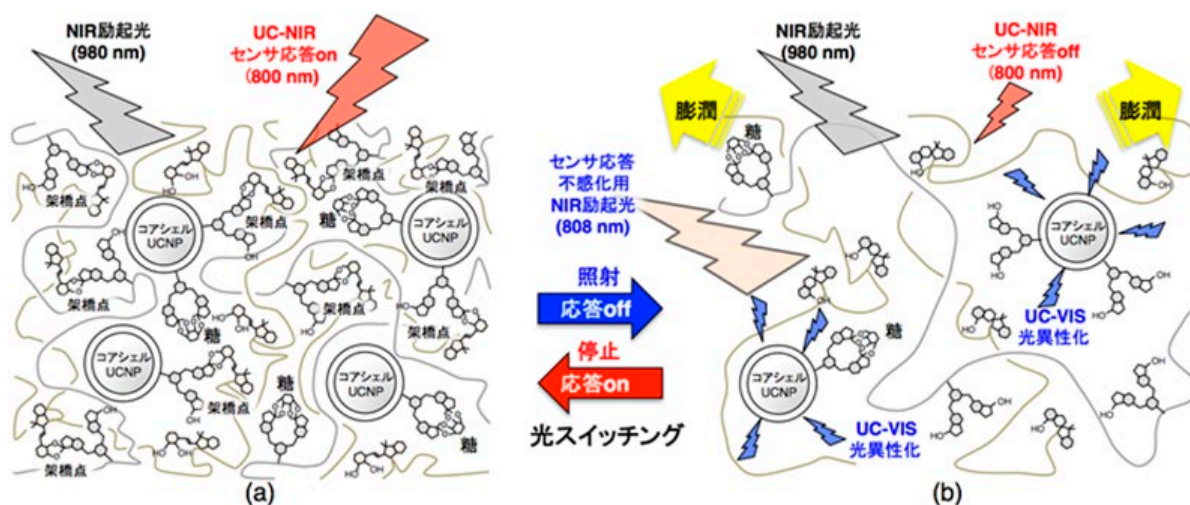


図 1 光スイッチング機能を有するアップコンバージョン近赤外発光(UC-NIR)糖センサの応用機構

2. 実験方法

2.1 糖センシングのためのコアシェル型UCNPs内包フィルムの調製

既報に基づき、UCNPs⁵⁾および糖レセプター**1**(図2)を調製した⁶⁾。また、糖レセプター**1**と錯形成するボロンジピロメテン(BODIPY)系色素⁵⁾の類縁体であるBODIPY系色素**2**も新たに合成した(投稿準備中につき構造は不掲載)。シリカ層で覆ったUCNPsをベンゼンに分散させた溶液に、メタクリル酸3-(トリメトキシシリル)プロピルを添加し加熱還流を行いUCNP表面に重合官能基(メタクリル基)を導入したUCNPsを合成した。重合官能基導入UCNPsをメタクリル酸グリシジルも含むN,N-ジメチルアクリルアミド溶液中に分散させ、共重合することにより、UCNPs固定化フィルムを構築した。その後、アジ化、クリック反応にて色素を固定化し、レセプター**1**含有モノマー溶液を含浸させ熱重合によりUCNPs固定化センシングフィルムを作製した。

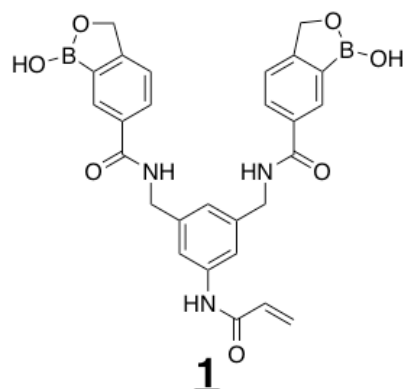


図2 重合性官能基を有するグルコースレセプター**1**の構造

2.2 光スイッチングのためのメロシアニンを含む糖センシングフィルムの調製

重合官能基を有する糖レセプター感受性メロシアニン**3**(投稿準備中につき構造は不掲載)を合成・精製することで、スピロピラン型の色素**3**を得た。この色素**3**と、2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)、ポリエチレングリコールメタクリレート(PEGMA)およびポリエチレングリコール次メタクリレート(PEGDMA)を含むモノマー溶液と混合し、共重合によりセンシングフィルムを作製した。

2.3 センシングフィルムのUC発光強度のおよび吸光度の測定

自作のフローセルにセンシングフィルム切片を組み込み、送液ポンプと接続した。UC発光強度および吸光度変化測定のため、ファイバマルチチャンネル分光器Flame(Ocean Optics社)、UC発光のための赤外線半導体レーザー(CivilLasers社; 980nm, ~2000mW)およびメロシアニンの光異性化のための青色光レーザー(470nm, 10mW)を有する光学系を構築した。異なる濃度の糖を含むPBS(-)を送液しつつ、適宜、UC発光および吸光度を測定した。

3. 結果と考察

3.1 コアシェル型UCNPsからの発光強度変化にもとづく糖濃度の測定

まず、本研究の糖センシングシステムの妥当性を検証するため、色素**2**をレセプター感受性メロシアニンのモデル化合物として用いた。センシングフィルム中ではレセプター**1**と色素**2**が錯形成しているが、色素**2**がレセプター**1**から解離すると、800nmにおける吸光度は大きく低減する。一方、調製したコアシェル型UCNPsは980nmの近赤外光を照射することで、800nmのUC発光を呈する。

調製したコアシェル型UCNPs固定化センシングフィルムの切片をフローセルに組み込み、グルコース含有PBS(-)送液に伴うUC発光強度変化と観察したところ、グルコース濃

度の増加に応じて UC 発光強度の増大が確認された(図 3)。これは、グルコース添加より、グルコース / レセプター **1** / 色素 **2** / グルコース間で競争的錯形成がおり、レセプター **1** から解離した色素 **2** の 800nm における吸光度が減少した結果、見かけ上の 800nm の UC 発光が増大したものと考えられる。また、糖を添加に応じて糖センシングフィルムがわずかに膨潤することを目視にて確認している(投稿準備中につきデータ不掲載)。

以上のことから、本センシングシステムを用いることで、センシングフィルムを取り巻く溶液中の糖濃度を定量することができると考えられる。

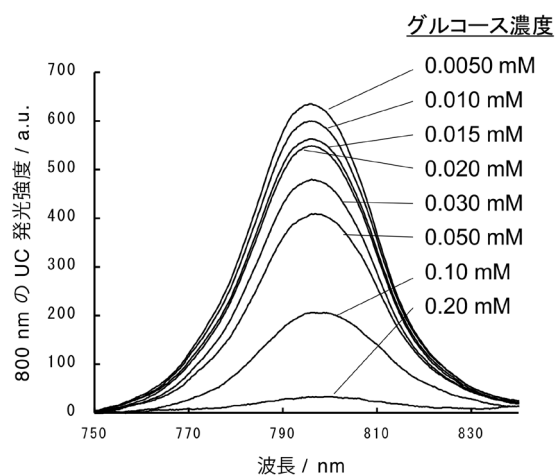


図 3 糖センシングフィルムからの異なるグルコース濃度に応じたアップコンバージョン(UC)発光のスペクトル

3.2 コアシェル型UCNPsからの発光強度変化にもとづく糖濃度の測定

合成したメロシアニン **3** と、糖レセプターのモデル化合物であるフェニルボロン酸(PBA)を含む糖センシングフィルムを調製した。調製したフィルムの切片をフローセルに組み込み、異なる濃度のフルクトース含有 PBS (-)を送液しながら青色光レーザーの3分間照射 / 停止(光スイッチング)を5回行い、センシングフィルムの吸光度変化を測定した。

光スイッチングなしで測定したセンシングフィルムの吸光度変化に対する相対標準偏差および、光スイッチングによる吸光度の差分検出を行った吸光度変化に対する相対標準偏差から精度を評価した結果、各濃度において差分検出の方が良好な精度を示すことが明らかになった(図 4)。前者においては、センシングフィルムを洗浄(フルクトース不含 PBS (-)の送液)する際に、完全にはフィルム中のフルクトース-PBA 錯体の解離が起こらないた

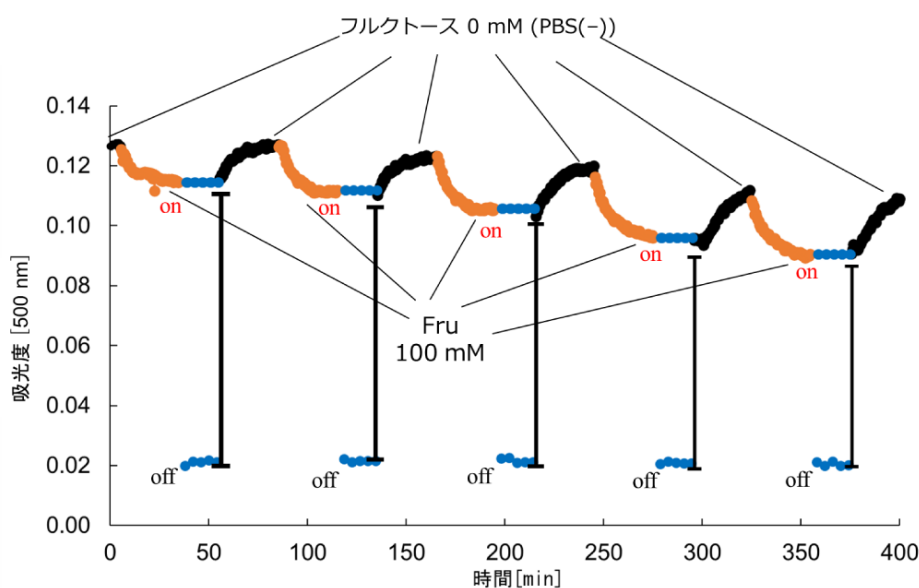


図 4 異なるフルクトース(Fru)濃度に応じたセンシングフィルムの吸光度(500nm)

めに吸光度が完全に回復せず, 吸光度変化の絶対値を読み取る場合にはセンシング精度を低下させる原因となっていると考えられる。一方, 後者の差分検出の場合には光異性化により強制的に色素 **2**-PBA 錯体を解離させた状態で吸光度の差分を検出しているため, センシング精度が向上したものと考えられる。

4. 結論

本研究では, 光スイッチング機能を有するコアシェル型近赤外発光低侵襲血糖値センサの開発を目的とし, (A)糖レセプターを固定化したコアシェル型 UCNP s を内包する高分子ゲル, および(B)メロシアニンを高分子側鎖に有する高分子ゲルの調製を行った。(A)においては, 周辺環境の糖濃度に UC 発光強度が変化することがわかった。また, (B)においては, 青色レーザー光を照射すると, 糖に対する応答の精度および可逆性が向上した。これは, レセプター **1** およびメロシアニン **3** 共重合直鎖ポリマーの流動性が向上すると共に架橋点の分布が均一となったためと考えられる。

本研究で開発した(A)および(B)を組み合わせることで, 高い精度を有する皮下埋め込み型血糖値センシングシステムの構築が可能であると考ええる。

5. 謝辞

本研究は, 令和4年度(第44回)日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けて行ったものです。同助成会に心より感謝致します。

6. 参考文献

- 1) H. Shibata, Y. J. Heo, T. Okitsu, and S. Takeuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17894 (2010).
- 2) Y. J. Heo, H. Shibata, T. Okitsu, and S. Takeuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13399 (2011).
- 3) F. Auzel, *Chem. Rev.*, **104**, 139 (2004).
- 4) J. Zhou, Q. Liu, W. Feng, Y. Sun, F. Li, *Chem. Rev.*, **115**, 395 (2015).
- 5) 原田大輔, 草島佳紀, 菅野憲, 遠田浩司, *分析化学*, **70**, 207 (2021).
- 6) 遠田浩司, 日下部智陽, 山川翔平, 菅野憲, *分析化学*, **70**, 133 (2021).