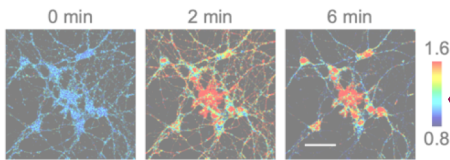
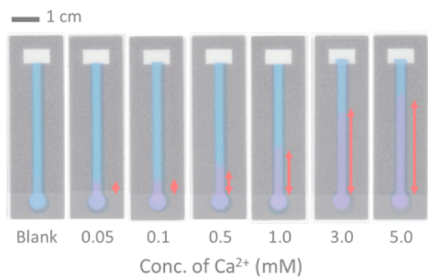
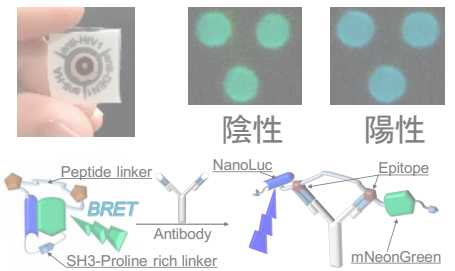


慶應義塾大学 応用化学科 分析化学（チツテリオ）研究室

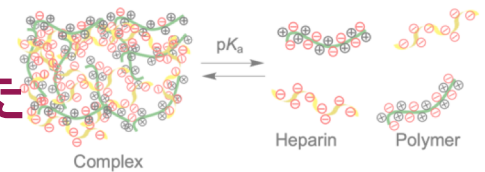


マイクロ流体 紙基板センサーチップ

安価に誰にでも扱える
分析デバイスの開発

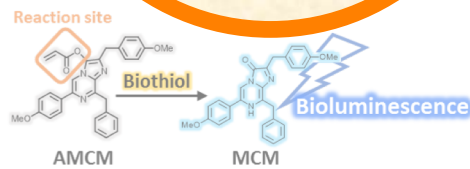


健康・環境・医療に向けた 化学センサーと バイオセンサーの開発



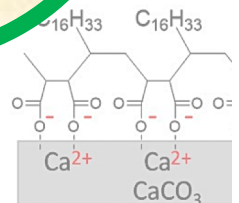
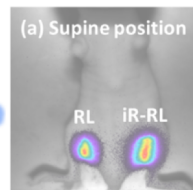
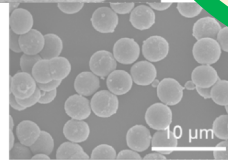
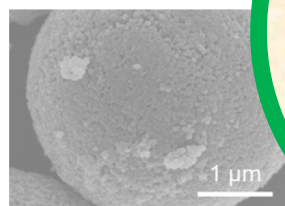
蛍光・発光 機能性色素

様々なニーズに応える
色素の開発



機能性 マテリアル

分析応用のための
機能性マテリアルの開発



研究室所在地・連絡先

〒223-8522
横浜市港北区日吉 3-14-1
慶應義塾大学理工学部応用化学科
チツテリオ研究室
Phone : 045-566-1568
Email: citterio@applc.keio.ac.jp

Web: <http://www.applc.keio.ac.jp/~citterio/>



バイオチオール検出のための生物発光基質セレンテラジン誘導体の開発

—バイオチオール検出セレンテラジン誘導体 AMCMの創製—

Nomura N. et al., *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 9546-9553.

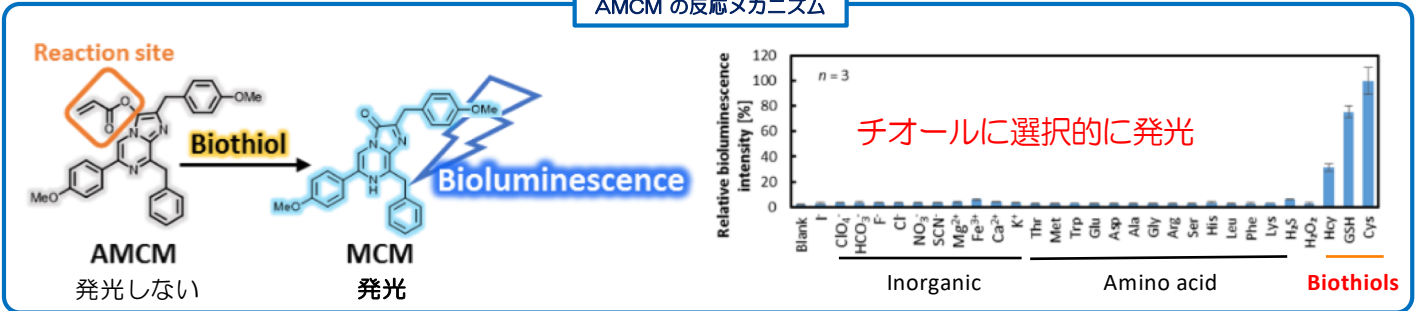
特長 酵素反応による生物発光は励起光源を必要としないため、高感度で簡便な分析が可能

測定対象物質: **バイオチオール**

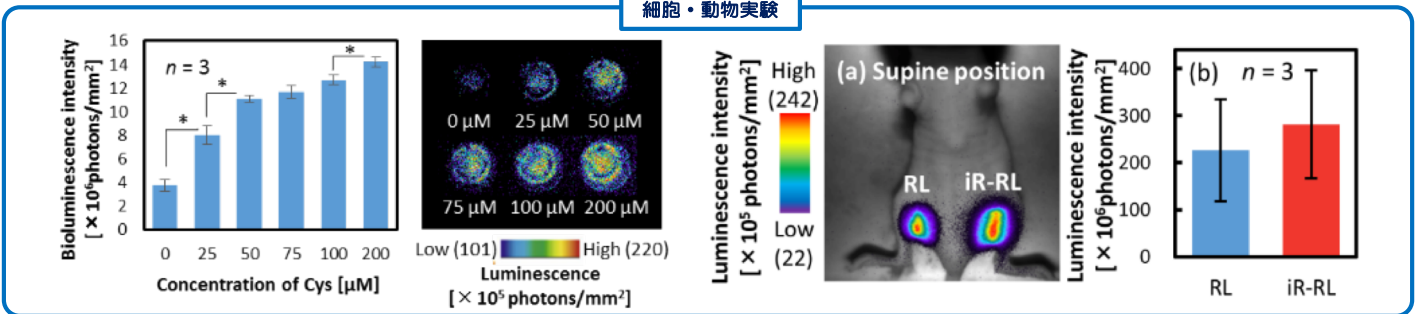
既存の蛍光分子による分析では、励起光が必要なため散乱や自家蛍光により高感度測定が困難

励起光不要で高感度な検出が可能な
新規生物発光プローブ**AMCM**の創製

AMCMの反応メカニズム



細胞・動物実験



結果 細胞・動物内において、バイオチオールの選択的なイメージングに成功

長時間の生体イメージングを志向したセレンテラジン誘導体の開発

—セレンテラジンの類縁体であるフリマジン (FMZ) をケージド化した安定発光基質の創製—

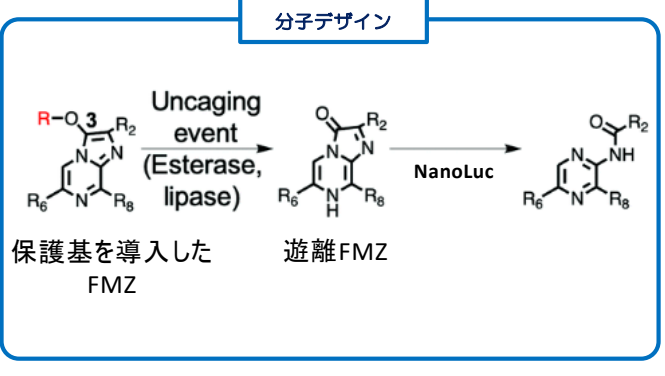
Mizui, Y. et al., *Org. Biomol. Chem.* **2020** in press.

特長 C3位に保護基を導入したケージドFMZによって、Native FMZよりも6倍以上長時間の生物発光イメージングを1細胞レベルで達成

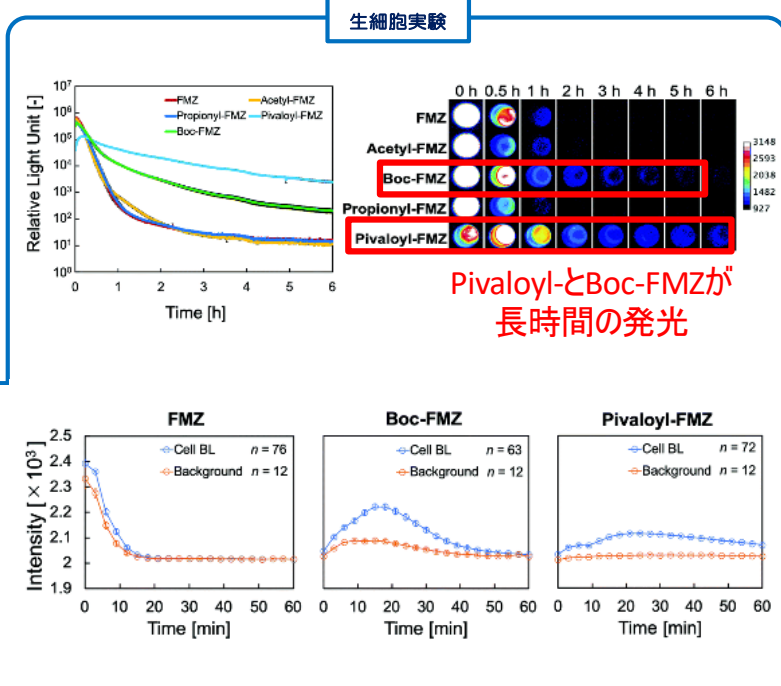
最高水準の発光輝度を示すFMZ/NanoLuc発光系はNative FMZの不安定な性質により、短い時間でシグナルが低下する。

Native FMZに保護基を導入する事で
持続的な発光を実現

分子デザイン



生細胞実験



1細胞レベルでも長時間の発光を確認

結果 PivaloylとBocを導入したケージドFMZによって、FMZよりも長時間の1細胞イメージングに成功

pH 応答性を示す両性イオンポリマーの開発

—生体物質分離技術を志向したpH応答両性イオンポリマーの創製—

特長 pHの変化に反応して、生体物質への吸着能を向上させることが可能

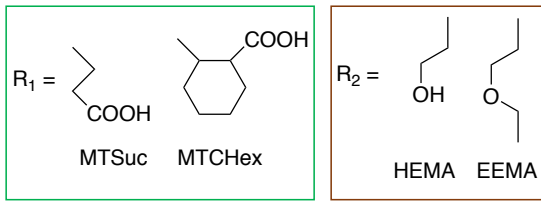
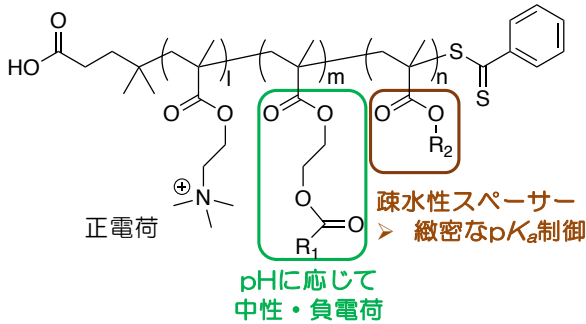
測定対象物質：生体物質・薬

Hiruta, Y. et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2020**, 93 (4), 547–552.

pHに反応し、生体物質への吸脱着を制御することができる両性イオンポリマーの創製

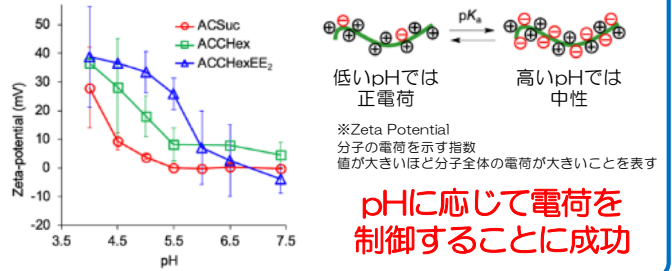
細胞をはじめ、生体内の多くの物質は表面に負電荷を帯びている

分子デザイン

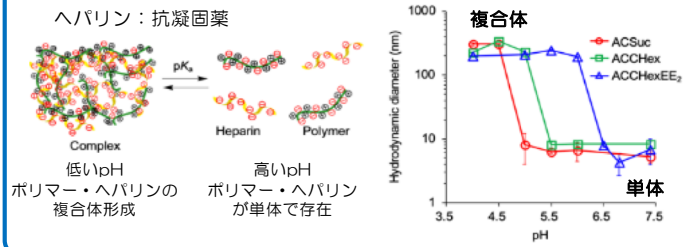


pKaの違いにより吸脱着するpHの制御

pHによる電荷の変化



薬物を用いた吸脱着実験



結果 pHに反応して、生体物質との相互作用を制御できる高分子マテリアルの開発に成功

細胞内Mg²⁺イメージングのための近赤外蛍光プローブの開発

—細胞内Mg²⁺を蛍光により測定する近赤外蛍光色素 KMG-501の創製—

Murata, O. et al., *Anal. Chem.* **2020**, 92 (1), 966–974.

特長 細胞内で近赤外光蛍光を用いたMg²⁺イオンのイメージングに成功

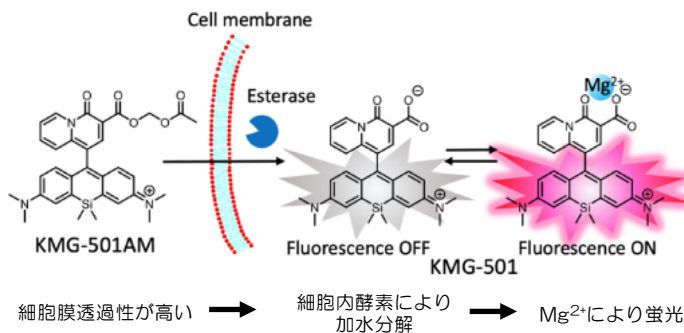
測定対象物質：細胞内のMg²⁺

既存の蛍光色素を用いたMg²⁺の分析では以下のような問題があげられる

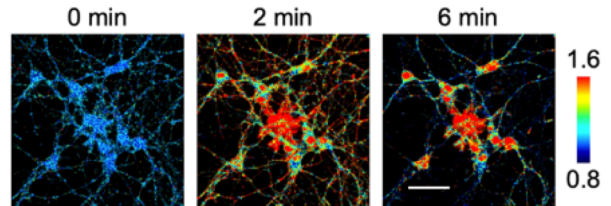
1. 他金属イオン (Ca²⁺) との選択性が低い
2. カラーバリエーションが乏しい

近赤外領域の蛍光を示すシリコンローダミンを用い、Mg²⁺イオン選択的な蛍光プローブを実現

Mg²⁺ イメージングの反応メカニズム

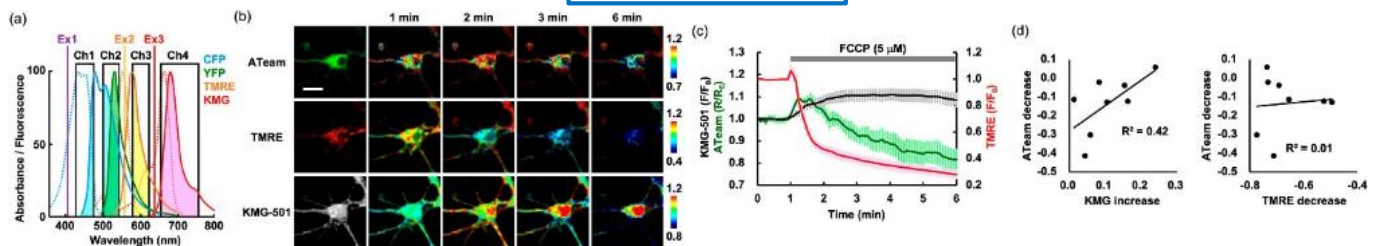


細胞実験



Mg²⁺ 応答を近赤外蛍光で観察することに成功

マルチカラーイメージング



既存のプローブとは異なる波長帯を有する Mg²⁺ 蛍光プローブ

Mg²⁺, ATP, ミトコンドリア内膜電位のマルチカラーイメージングに成功

結果 近赤外蛍光を持つKMG-501と可視光域の蛍光プローブによるMg²⁺関連物質の同時イメージングに成功

高アルカリ耐性を実現するCaCO₃ベースの逆相HPLC充填剤の開発

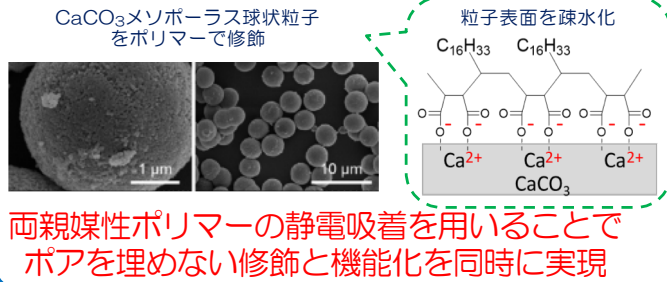
—交互ポリマーとCaCO₃メソポーラス球状粒子のハイブリッドマテリアル—

Mochida M. et al., *J. Mater. Chem. B*, 2019, 7, 4771-4777.

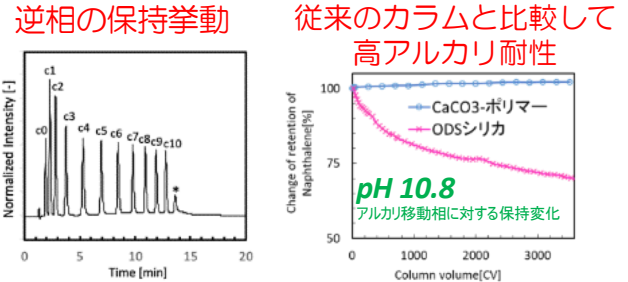
特長 アルカリ塩であるメソポーラスCaCO₃球状粒子を担体に用いることで従来のシリカゲル系カラムが抱えるアルカリ耐性を克服

特許出願 2017

マテリアルデザイン

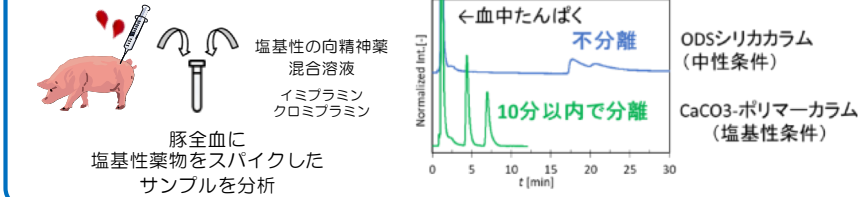


逆相保持およびアルカリ耐性の評価



実サンプルへの応用

シリカゲルカラムでは使用できないアルカリ性移動相を用いて測定



全血サンプル (n=3)	回収率			
	ピークエリアから算出		ピーク高さから算出	
	[%]	誤差[%]	[%]	誤差[%]
イミプラミン	96.4	0.2	95.6	0.3
クロミプラミン	97.6	0.7	96.2	0.7

豚全血中の塩基性薬物を好分離

結果 CaCO₃とポリマーのハイブリッドマテリアルの作製により、高アルカリ耐性の逆相充填剤の開発に成功

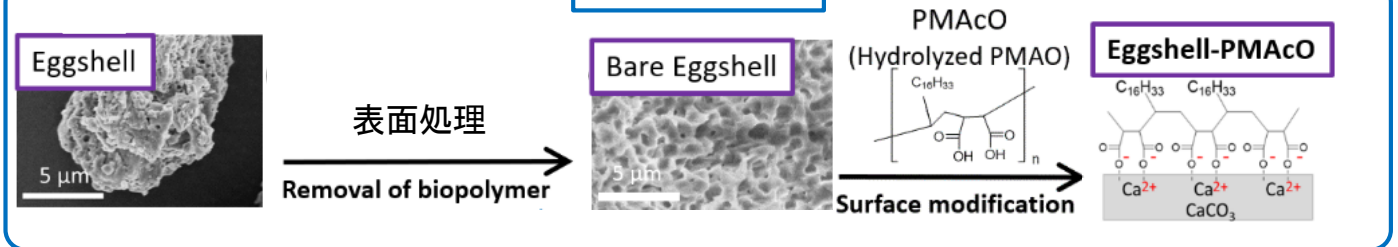
卵の殻を母体とする逆相分取カラムの開発

—卵の殻を処理した破碎状炭酸カルシウムを用いたエコフレンドリーなマテリアル—

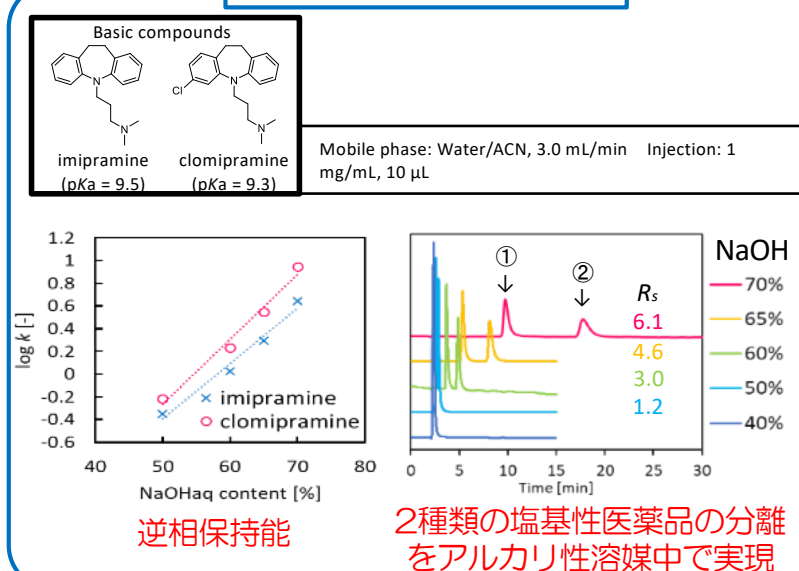
特許出願 2020

特長 アルカリ性耐性を有する炭酸カルシウムの特性を活かし、生物由来の廃棄物である卵の殻を用いた環境に優しい分取カラム

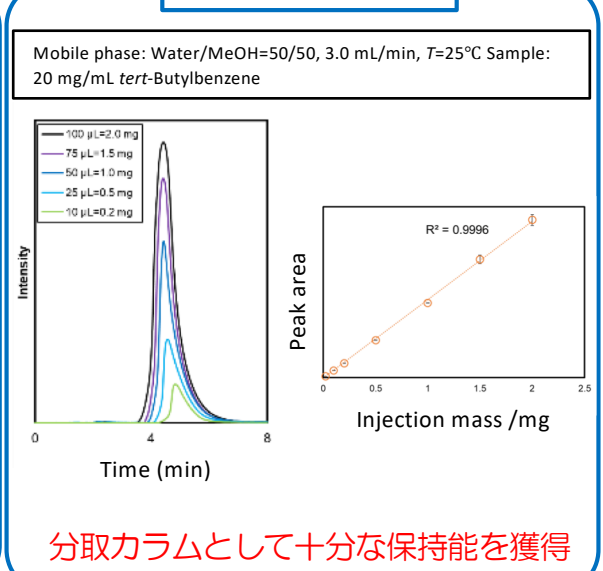
マテリアルデザイン



逆相保持およびアルカリ耐性の評価



分取カラムへの応用



結果 卵の殻を母体とする、逆相分取カラムの作製および塩基性医薬品の分離に成功

文字表示型尿中タンパク質紙基板センシングチップの開発

一文字による半定量分析が可能なセンシングチップ

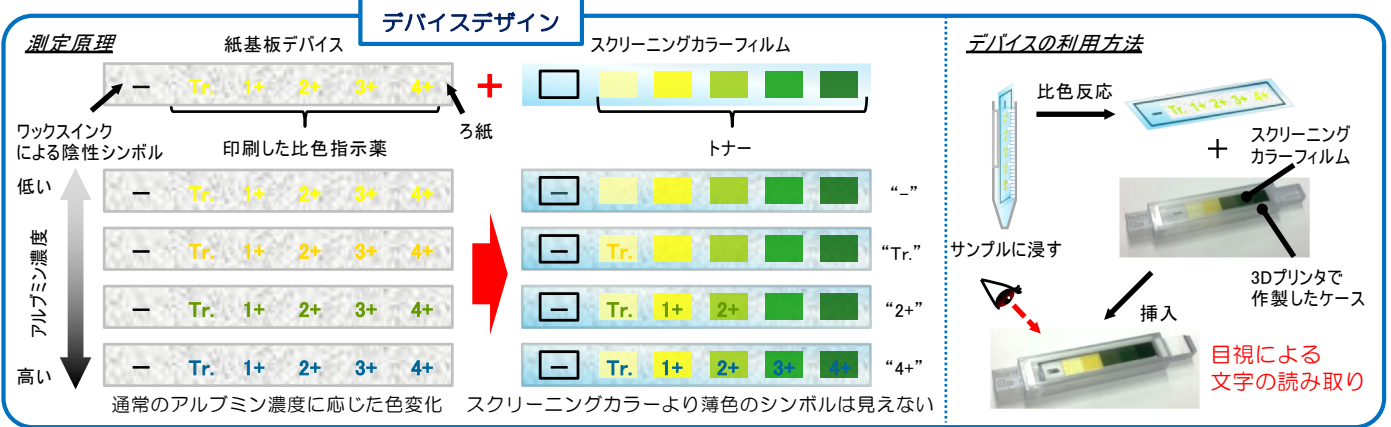
Yamada K. et al., ACS Sens., 2017, 2, 1247-1254

特長 尿中タンパク質の濃度を表示される文字によって半定量的に測定可能

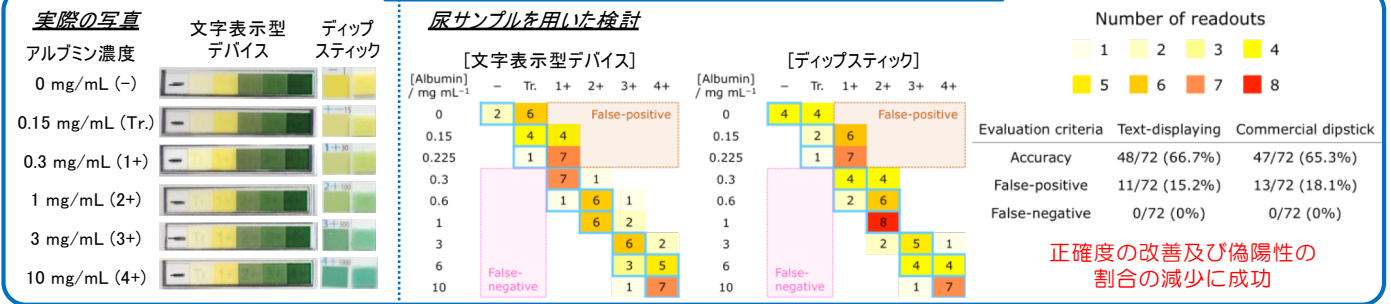
測定対象物質: アルブミン

市販の尿試験紙では表れた色調と標準色調表を比較する必要があるため、読み取り誤差があった

文字を読み取るため、読み取り誤差が少ない



市販の尿試験ディップスティックとの比較



結果 文字を見ることで読み取り誤差が少ない、尿中タンパク質を測定可能な診断チップの開発に成功

文字表示型ラテラルフローイムノアッセイによるストレスマーカー半定量分析

一文字による半定量分析が可能なセンシングチップ

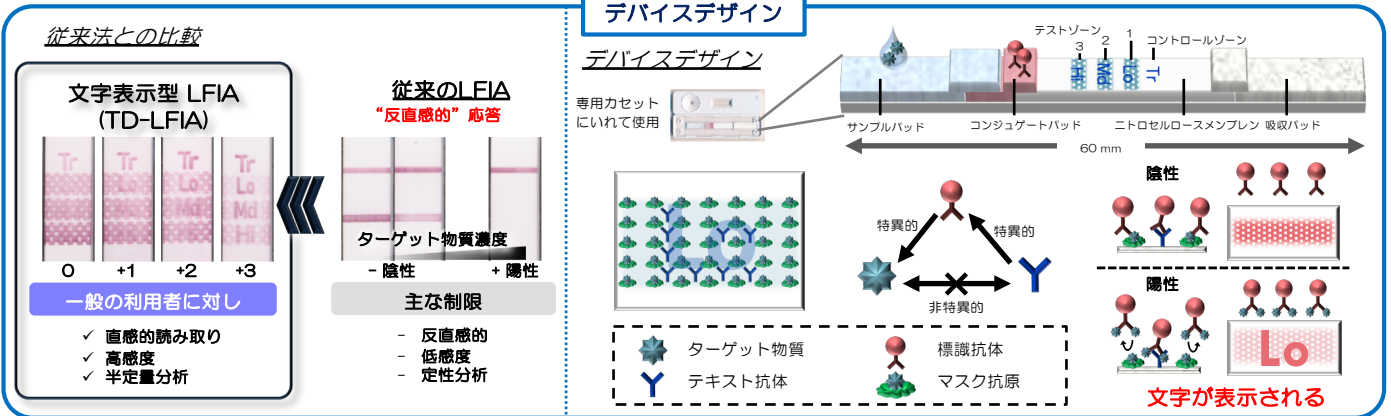
Misawa, K. et al., ACS Sens. 2020, 5, 2076-2085
特許出願2018

特長 文字を読み取ることで直感的に高感度で半定量的な

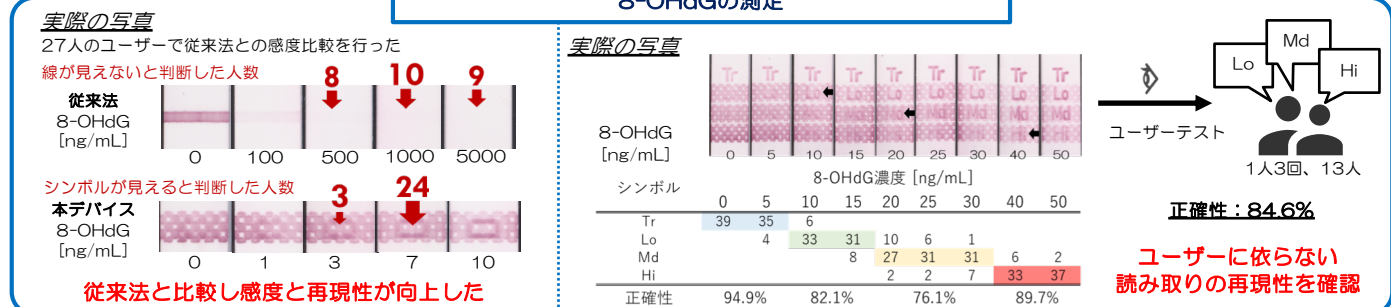
測定対象物質: 8-OHdG

- 従来競合LFIAは、"turn-off"型の応答のため反直感的。低感度
- オンオフでの検出であり定量性がない

濃度に応じて表示される文字を読み取ることで直感的・高感度に半定量分析が可能



8-OHdGの測定



結果 文字を見ることで、直感的かつ高感度に、酸化ストレスマーカーを測定可能な診断チップの開発に成功

濃度に応答して蛍光の長さが変化するラクトフェリンセンシングチップの開発

—抗体不使用かつデータ読み取り専用の機器が不要なタンパク質センシングチップ—

特長 抗体を使用せず、安価・簡便・迅速かつ選択的にヒト涙中のラクトフェリンを検出。さらに、濃度を観察される蛍光部分の長さで半定量可能。

測定対象物質：ラクトフェリン

Yamada K. et al., *Analyst*, 2014, 139, 1637-1643

眼の病気のバイオマーカー。従来のイムノアッセイに代わる扱いやすいセンサーが求められる。

特許出願 2014

デジタルカメラによるデバイスの撮影
パソコンでの色解析を必要とせず

→ 温度計のように長さ変化による検出

Yamada K. et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, 7, 24864-24875

検出原理

蛍光検出試薬 (テルビウム) : 蛍光なし
↓
ラクトフェリンと結合
↓
テルビウム-ラクトフェリン : 緑色蛍光

デバイスデザインと長さによる検出のメカニズム

可視光下 紫外光下 ラクトフェリン濃度を
読み取るための目盛り

ヒト涙液を採取

サンプルの導入口

ターゲット量に応じた長さの緑色蛍光が観察される

サンプルの導入 → サンプルの流動 → ターゲットの消耗

ラクトフェリン 静電的にTb³⁺を吸着 → Tb³⁺-ラクトフェリン複合体

濃度変化に対応する蛍光部分の長さ応答

濃度変化に応じた緑色蛍光の長さ

Length [scales] vs Lactoferrin conc. [mg mL⁻¹]

紫外光照射下
デジタルカメラで撮影

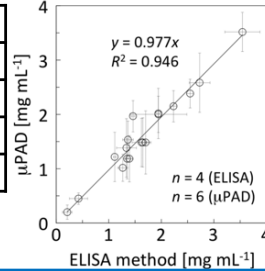
ラクトフェリン濃度に
応じた長さ変化

実サンプルへの応用

ヒトの涙液に含まれるラクトフェリン濃度を分析[スパイクテスト・ELISAとの比較]

提案法と既存法(ELISAキット)の性能比較

サンプルNo.	スパイク量 [mg/mL]	提案法 [mg/mL]	リカバリー率 [%]
1	0	1.05±0.30	—
2	1	2.07±0.31	101
3	1.5	2.45±0.27	93.3
4	2	2.87±0.24	90.7



材料費 : 150 円 ⇒ **0.5 円**
必要機器 : 分光器 ⇒ **UVハンドランプ**
分析時間 : 3-4 時間 ⇒ **10 分**
測定手順 : ウォッシングを含む複数段階
⇒ **一度のピペッティング**

市販のELISAキットとの一致
スパイクテストでの高いリカバリー率

既存法に比べ簡便であり、デバイスと
測定機器のコストを大きく低減

結果 安価で迅速、かつ長さを見るだけでヒト涙液タンパク質が測定可能な眼病診断チップの開発に成功

濃度に応答して色変化した長さが変化するカルシウムセンシングチップの開発

—チップのみで簡便にカルシウムを高選択に目視により分析—

Shibata H. et al., *Analyst*, 2019, 144, 1178-1186

特長 飲料水・水道水中のカルシウムの高選択的かつ高感度な検出をチップのみで達成。さらに、印刷技術により再現性の良いチップの生産が可能

測定対象物質 カルシウムイオン (Ca²⁺)

チップデザイン

Ca²⁺分析のための化学試薬を含んだ
インクジェット印刷可能なケミカルインク
(界面活性剤によるミセル粒子)

環境に優しい溶剤 (水) に分散するナノ材料 (粒径: 約200 nm)

チップ材料 (紙)

インクジェット印刷

Ca²⁺センシングチップ

インクジェット印刷によるチップの大量生産が可能

濃度変化に対応する色変化した部分の長さ変化

1 cm

Blank 0.05 0.1 0.5 1.0 3.0 5.0
Conc. of Ca²⁺ (mM)

Color-changed distance (mm) vs Conc. of Ca²⁺ (mM)

n = 4

色変化した「長さ」が
試料中のCa²⁺の「濃度」に対応

実サンプル中の開発した紙基板チップによるCa²⁺の定量と従来法(錯滴定法)との比較

サンプルNo.	提案法 (mM)	エラー (%)
飲料水#1	0.43±0.03	0
飲料水#2	0.25±0.03	+6
飲料水#3	0.21±0.02	+2
飲料水#4	1.96±0.13	-5
水道水#1	0.46±0.03	+10
水道水#2	0.48±0.03	+6
水道水#3	0.51±0.03	+15
水道水#4	0.39±0.01	+12

既存の分析法(錯滴定法)と
同様の分析性能を持つ

結果 アナログ温度計のように色変化した長さを測るだけで飲料水中のCa²⁺が定量可能な分析チップの開発に成功

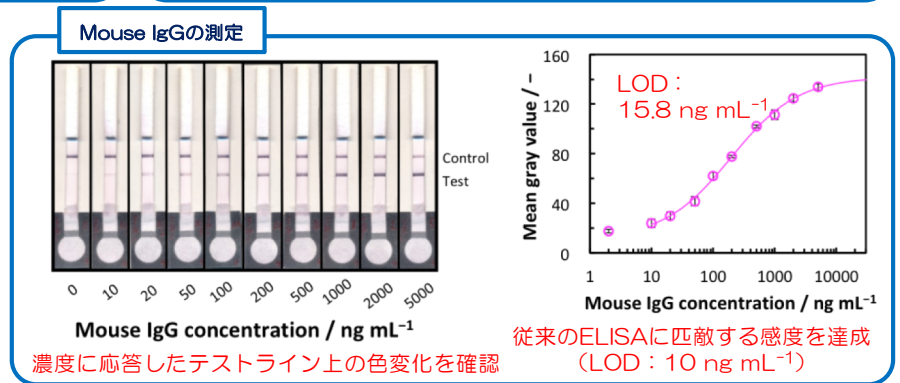
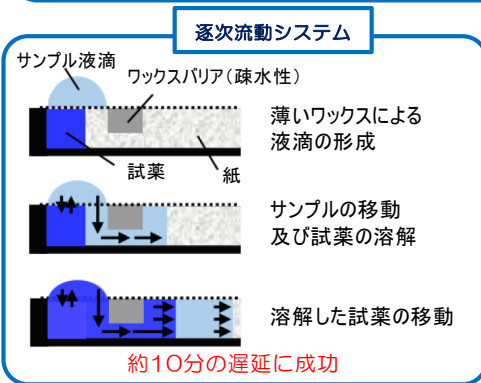
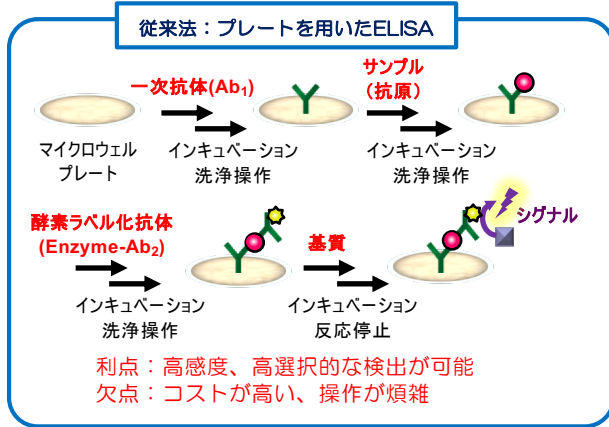
逐次流動システムを用いた抗原検出紙基板デバイスの開発

— 一滴のサンプル滴下でELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)が可能 —

特長 逐次流動システムの導入により、多段階のELISAをワンステップで行うことができる。

Ishii M. et al., Anal. Sci., 2018, 34, 51-56

測定対象物質: Mouse IgG (モデルターゲット)



結果 煩雑な操作を必要としない、ワンステップでELISAを行える紙基板デバイスの開発に成功

イオン分析のための電位差測定紙基板チップの開発

— インクジェットプリント技術を用いた紙基板の電位差測定イオン検出チップ —

Ruecha N. et al., Anal. Chem., 2017, 89, 10608-10616

特長 インクジェットプリント技術を用いることで、安価・簡便・迅速かつ選択的なイオン検出電極の作製が可能

測定対象物質: ナトリウムイオン(Na⁺)、カリウムイオン(K⁺)

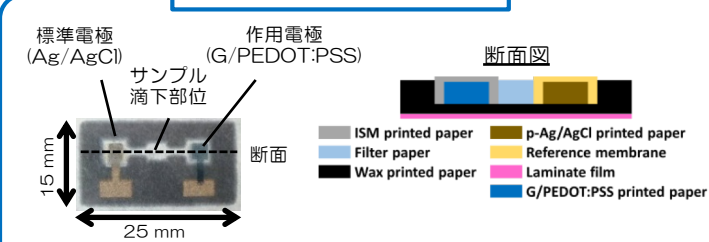
これまでの固体系電位差測定では、

- 作製方法が煩雑
- 測定前の電極調整が必要
- 標準電極の安定性が低い



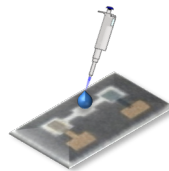
- 作製方法が簡単
- 最終利用者が行う操作はサンプル溶液の滴下のみ
- インクジェットプリント技術を用いているため再現性が向上

デバイスデザインおよび測定方法



すべての試薬をインクジェットプリンタを用いて滴下

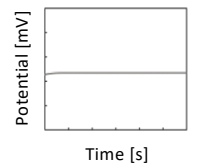
操作手順



- 1) サンプル溶液 20 μL 滴下

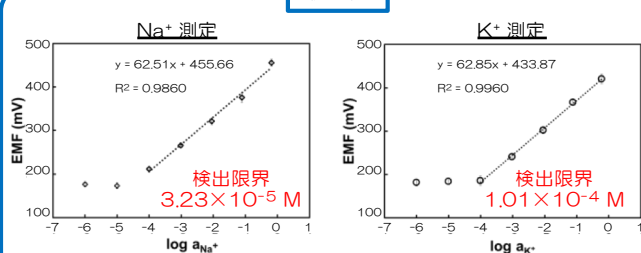
ポテンシオスタットに接続

- 2) 30秒静置
- 3) 開放電圧の測定



少量のサンプルで、簡便かつ迅速に簡単なイオン検出が可能

検量線



生体サンプル測定で求められる濃度範囲でのイオン分析が可能

実サンプルへの応用

希釈したヒトの尿に含まれるナトリウムおよびカリウムイオン濃度の測定

sample no.	concentration of Na ⁺ (mM)			concentration of K ⁺ (mM)		
	Paper-based ISE	ion meter	% error	Paper-based ISE	ion meter	% error
1	144.22 ± 7.8	100.07	4.1	54.09 ± 4.2	53.79	0.5
2	126.07 ± 5.5	121.44	3.8	47.80 ± 4.1	50.47	5.3
3	97.82 ± 6.9	100.70	2.9	41.64 ± 5.2	39.80	4.6

ヒト尿中のナトリウムおよびカリウムイオン濃度の正確な分析が可能

結果 インクジェットプリント技術を用いた使い捨て可能な紙基板電位差測定用イオン検出チップの開発に成功

生物発光型タンパク質を用いた血中抗体センシングチップの開発

— 特殊な機器を用いずに血液中の抗体濃度の測定が可能 —

特長 ピペットマンを用いることなく、定量的な抗体の同時測定が実現

Tenda K. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 130, 15595–15599

測定対象物質: anti-HIV1, anti-DEN1 (デング熱), anti-HA (インフルエンザ)

特許出願 2017

- 溶液系の測定では、
- 複数種類の試薬の定量操作
 - 高価なマイクロプレートの利用
 - 全血に対する血球除去処理が必要



- 最終利用者が行う操作は血液の滴下のみ
- 安価な紙を主な基板としたデバイス
- 血球除去フィルターが組み込まれているため全血をそのまま滴下可能

紙基板分析チップの仕組み

多層デバイスの模式図

- ラミネートフィルム (インレット: $d = 5.5 \text{ mm}$)
- 血球除去フィルター ($d = 7.9 \text{ mm}$)
- 生物発光基質を含んだ紙の層 ($d = 7.9 \text{ mm}$)
- 抗体検出のための生物発光型タンパク質を含んだ紙の層

ラミネート加工によって各層を固定する

デバイスの利用方法

指先から血液の滴下 → 反応 → 写真撮影

測定基板: マイクロプレート ⇒ 低コストな μPADs

測定サンプル: 血漿・血清 ⇒ 全血 (前処理不要)

測定数: 1ターゲット ⇒ 複数ターゲット

測定手順: 複数の定量操作 ⇒ 1度の滴下

ターゲット抗体量に応じて 緑色から青色へ変化する

陰性 (Green) → 陽性 (Blue)

実際の写真 (4 mm, 10 mm デバイスサイズ)

検出結果

検量線の作成

HIV、インフルエンザ、デング熱抗体それぞれの標準溶液を本デバイスで測定

3種類のターゲット抗体に対して、検量線の作成に成功した

全血での添加回収試験

全血に抗体を加えて測定を行ったところ、良好な回収率が得られた

Sample No.	Added [nM]			Measured value [nM]			Recovery [%]		
	anti-HIV1	anti-HA	anti-DEN1	anti-HIV1	anti-HA	anti-DEN1	anti-HIV1	anti-HA	anti-DEN1
1	0	0	0	0 ± 0	0 ± 0	4 ± 3			
2	150	0	0	144 ± 54	1 ± 1	7 ± 5	95.7		
3	100	0	0	99 ± 15	1 ± 0	13 ± 1	98.5		
4	0	150	0	0 ± 0	140 ± 49	3 ± 1		93.2	
5	0	0	150	1 ± 0	1 ± 1	159 ± 58			105.8
6	0	50	100	1 ± 0	43 ± 26	81 ± 47		85.8	80.9
7	100	0	50	95 ± 20	1 ± 1	50 ± 19	95.0		100.2
8	50	50	50	52 ± 28	58 ± 13	43 ± 13	103.2	116.3	86.5

指先から得られる血液での測定可能性を示すことが出来た

結果 在宅医療やその場診断に適した、簡便に利用可能な血中抗体濃度測定用の診断チップの開発に成功

生物発光型タンパク質を用いた血中抗体センシングのための系基板チップの開発

— 一滴の血中抗体の迅速な定量が可能でセンシングチップ —

特徴: 下処理が不要な血液サンプルの滴下と、生物発光タンパク質の発光色変化の解析によって抗体定量を行う。

測定対象物: anti-HIV1, anti-DEN1 (デング熱), anti-HA (インフルエンザ)

[1] Tenda K. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 130, 15595–15599

[2] Tomimuro K. et al., *ACS Sens.*, **2020**, 5, 6, 1786–1794

先行研究の紙基板チップ^[1]

- 30 μL の血液滴下が必要
- 20分ものインキュベーション時間が必要
- デジタルカメラを用いた発光の検出

本研究の系基板チップ^[2]

- 5 μL の血液中の検査が可能
- 5分のインキュベーションで検出可能
- スマートフォンを用いた発光の検出



指先から得られる血液の最大量: 5-10 μL 程度
小サンプルでの検出への需要

多層構造型系基板チップの原理

検出原理

陽性検体 陰性検体

血中抗体

赤血球除去フィルター

縫い合わされた綿糸

プラスチックフィルム

燃り合わされた系

フリマジン (発行基質)

LUMABS (発行酵素)

“Open” state (陽性)

“Close” state (陰性)

エネルギー移動

検出手順

5 μL の血液検体の滴下

フリップ 5分

撮影機器を用いた生物発光の検出

モデル抗体の検量線

検出下限

Anti-HIV: 4.0 nM, Anti-HA: 2.1 nM
Anti-DEN: 14.9 nM

Green to blue in response to antibody

複数抗体種同時検査

Normalized ΔHUE (-)

n = 6 (2 × 3)

LUMABS location

スマートフォンを用いた検出

3Dプリンターを用いて作成した遮光用ケース

結果 5 μL の血液検体滴下の5分後に、スマートフォンを用いた最大6種類の抗体の同時検出が可能でシステムの開発に成功

尿アルブミン/クレアチニン比目視測定のためのペーパーデバイスの開発

— 視覚的に糖尿病のバイオマーカーが測定可能 —

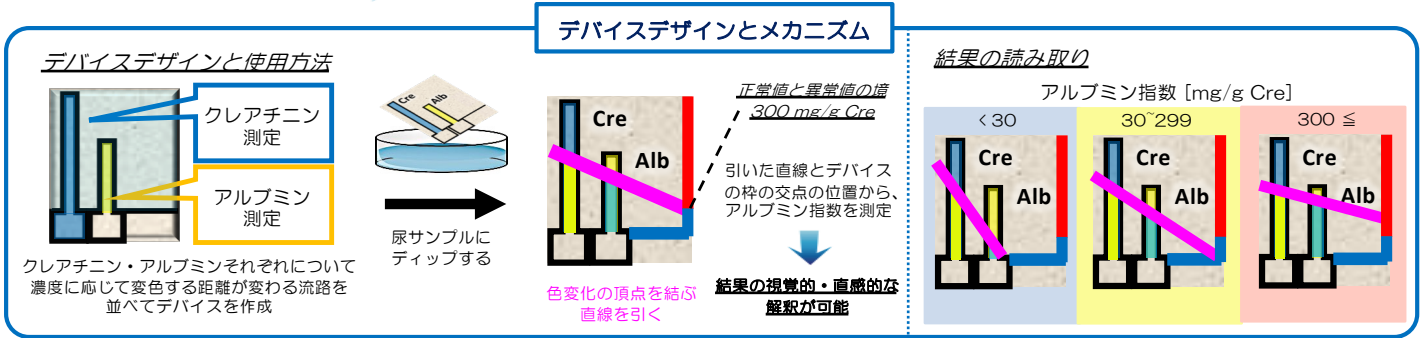
特長 直線を引くことで、視覚的に糖尿病のバイオマーカーが測定可能

Hiraoka R. et al., ACS Sens., 2020, 5, 4, 1110-1118.

測定対象物質：アルブミン、クレアチニン

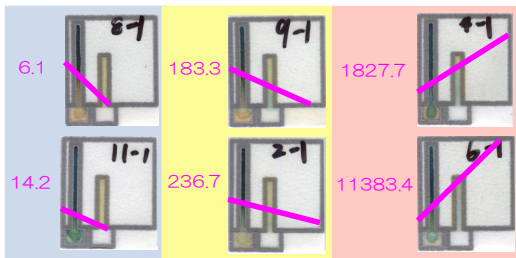
- 糖尿病性腎症の診断は、尿中のアルブミン濃度を、クレアチニン濃度で割った値(=アルブミン指数)が用いられている。
- 従来の尿試験紙では、アルブミンとクレアチニンそれぞれの濃度を色から半定量したのちに、表を用いて比を計算する必要があった。

→ デバイスに直線を引くだけで、視覚的・直感的にアルブミン指数の解釈が可能



人尿サンプルにおける測定結果

実際の写真 (アルブミン指数 mg/g Cre)



Intercept of line (mm)			Intercept of line (mm)			Intercept of line (mm)		
Drawing-PADs	Expected value	Error (%)	Drawing-PADs	Expected value	Error (%)	Drawing-PADs	Expected value	Error (%)
8.58	8.13	+5.5	10.0	8.75	+14.3	3.35	3.04	10.2
8.80	8.14	+8.1	9.76	8.83	+10.6	23.3	25.7	-9.4
10.5	8.21	+27.6	17.8	15.6	+13.9	27.4	34.8	-21.4
8.38	8.23	+1.8	27.1	21.7	+24.9			
9.48	8.27	+14.6	24.8	25.1	-1.5			
8.65	8.31	+4.0	10.0	8.75	+14.3			
8.76	8.51	+3.0						

実サンプルを用いてアルブミン指数の3段階の分類に成功

結果 患者自身による利用に適した、視覚的・直感的な糖尿病のバイオマーカー測定デバイスの開発に成功

2020年度 研究室メンバー

