



医療分析のための有機マテリアル

Department of Applied Chemistry Faculty of Science and Technology KEIO University

応用化学科分析化学研究室(チITTERIO研究室)

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

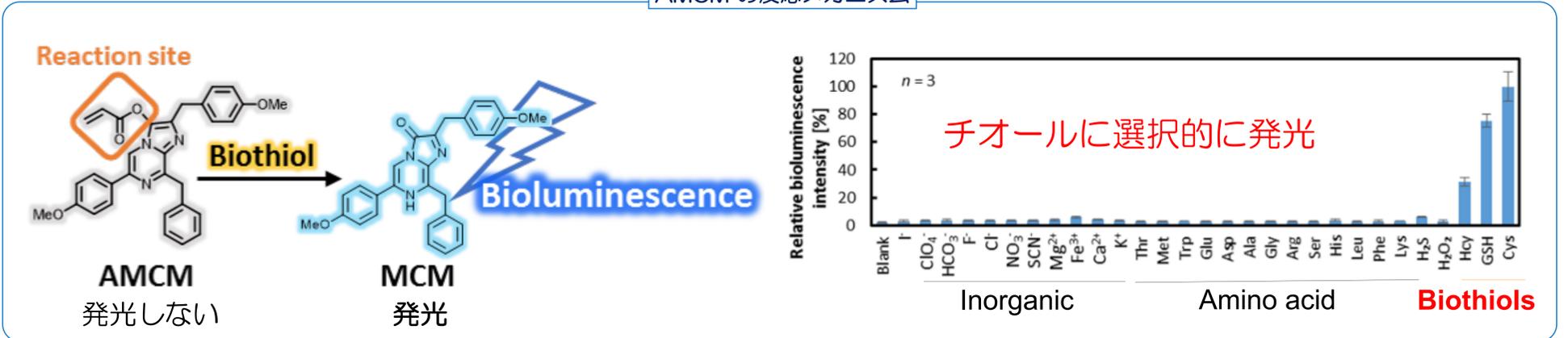
測定対象物質: **バイオチオール**

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

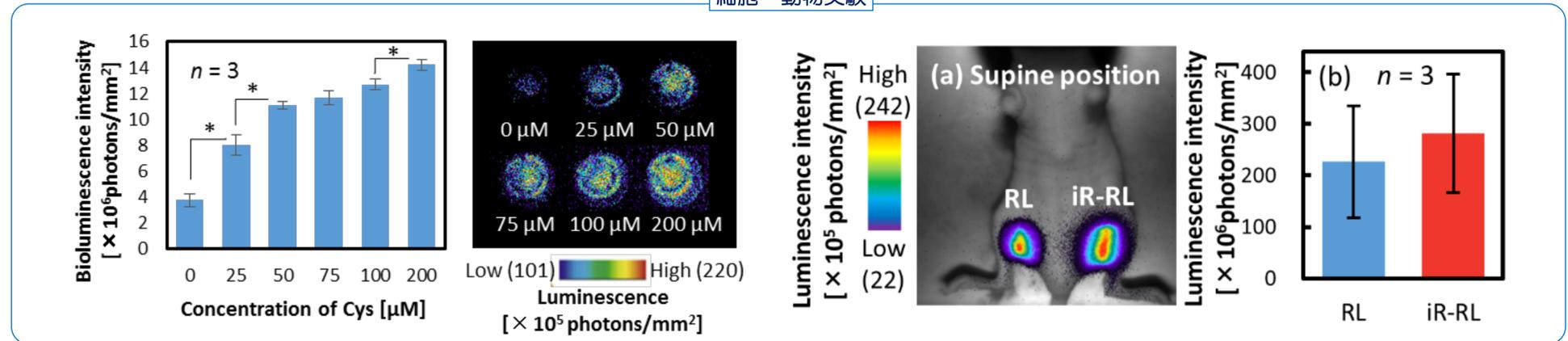
励起光不要で高感度な検出が可能な新規生物発光プローブ**AMCM**の創製

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

AMCM の反応メカニズム



細胞・動物実験



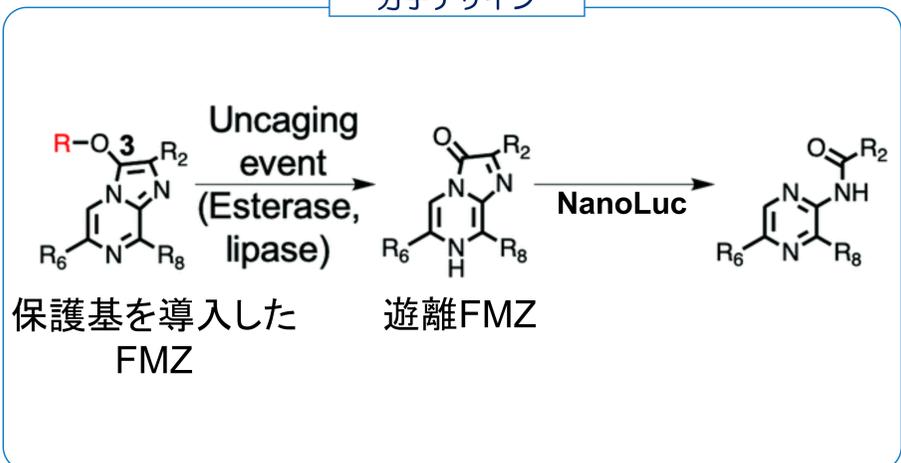
長時間の生体イメージングを志向したセレンテラジン誘導体の開発

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

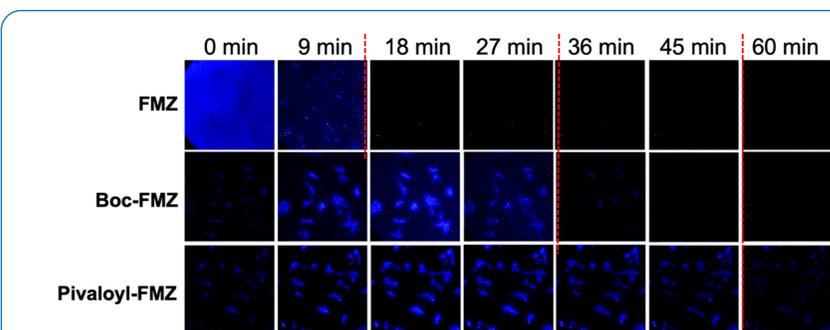
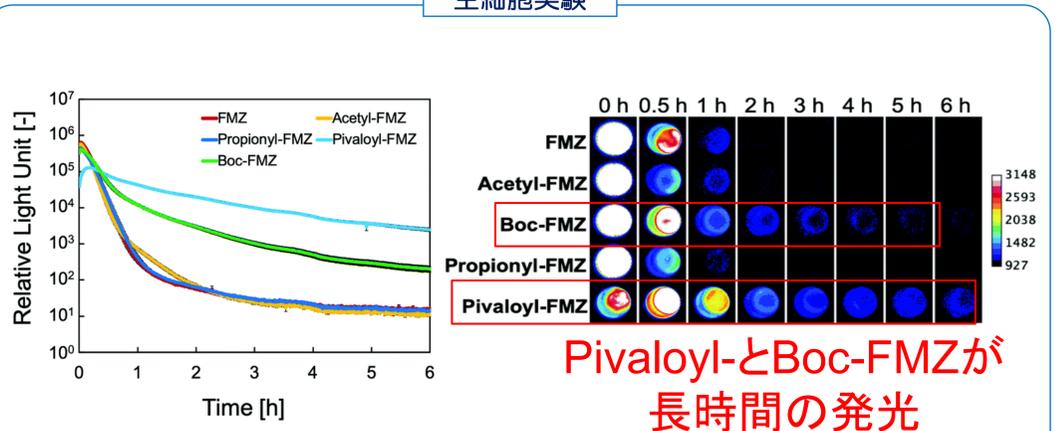
最高水準の発光輝度を示すFMZ/NanoLuc発光系はのNative FMZの不安定な性質により、短い時間でシグナルが低下する。

Native FMZに保護基を導入する事で持続的な発光を実現

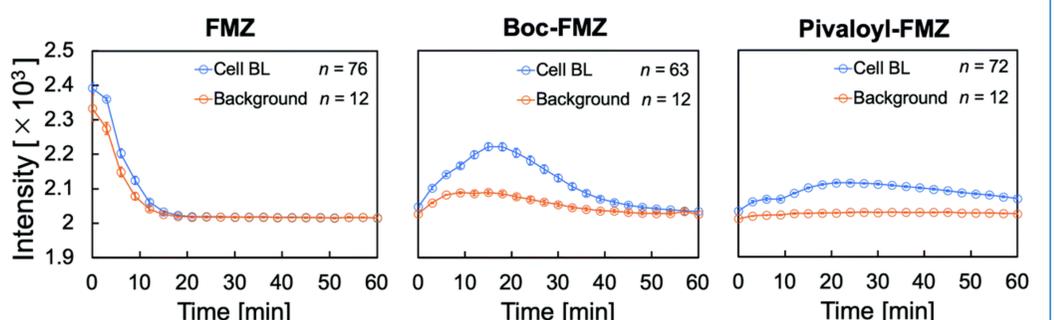
分子デザイン



生細胞実験



1細胞レベルでも長時間の発光を確認





医療分析のための有機マテリアル

Department of Applied Chemistry Faculty of Science and Technology KEIO University

応用化学科分析化学研究室(チITTERIO研究室)

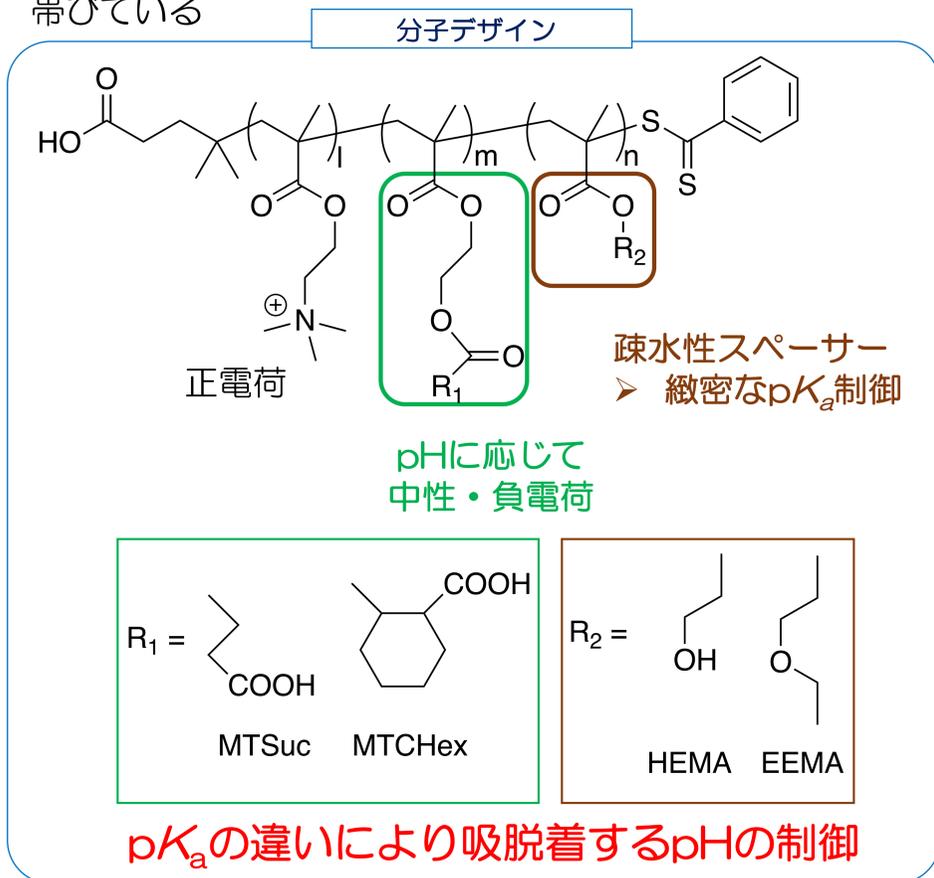
pH応答性を示す両性イオンポリマーの開発

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

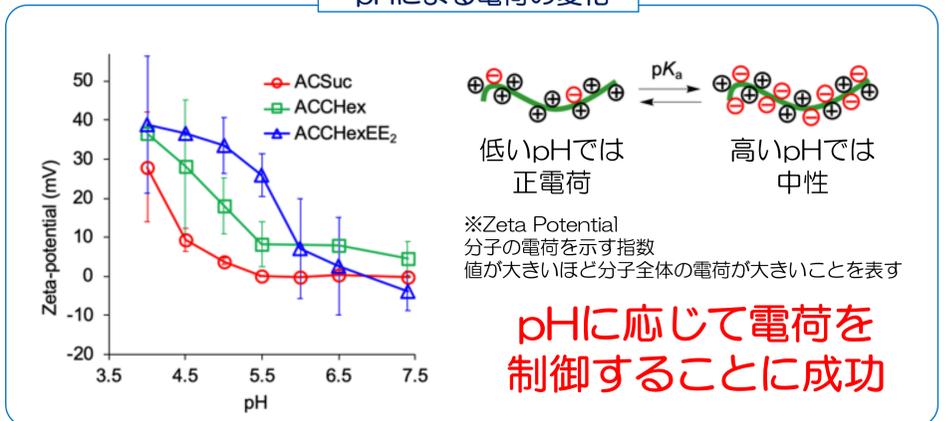
測定対象物質: 生体物質・薬

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

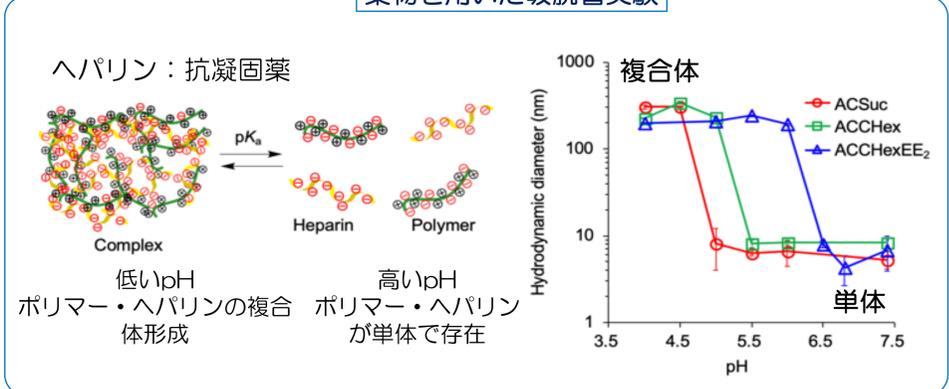
pHに応答し、生体物質への吸脱着を制御することができる両性イオンポリマーの創製



pHによる電荷の変化



薬物を用いた吸脱着実験



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

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

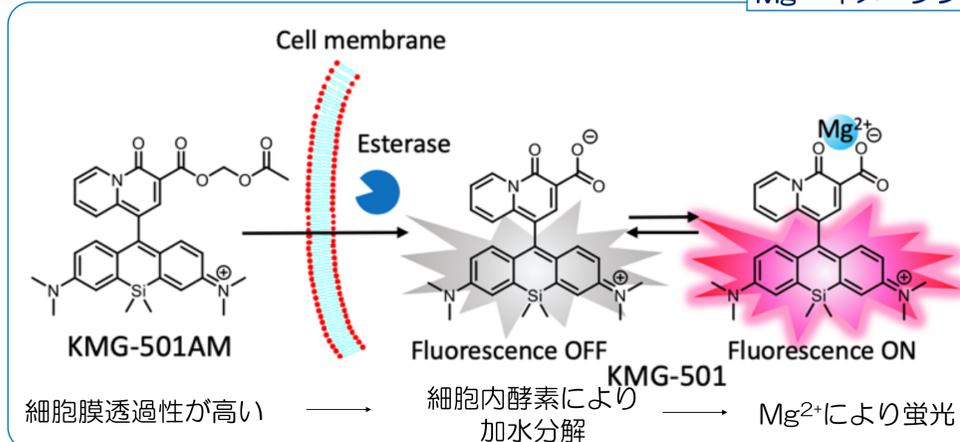
測定対象物質: 細胞内のMg²⁺

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

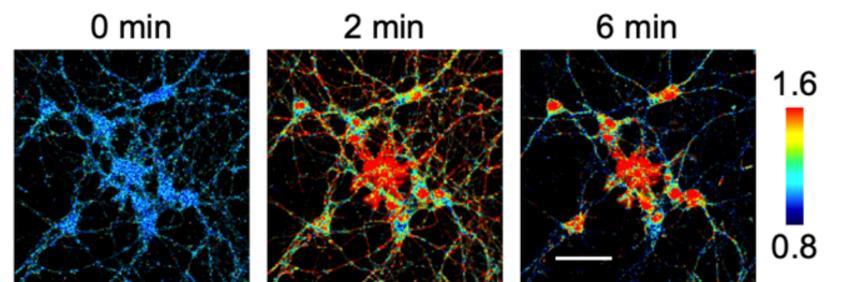
1. 他金属イオン (Ca²⁺) との選択性が低い
2. カラーバリエーションが乏しい

近赤外領域の蛍光を示すシリコンローダミン(SiR)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

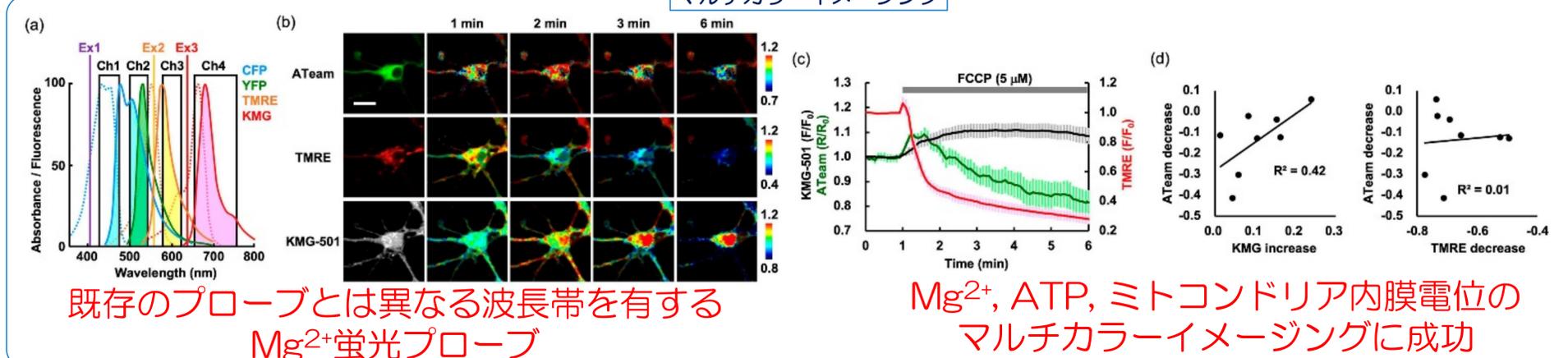


細胞実験



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





医療分析のための有機マテリアル

Department of Applied Chemistry Faculty of Science and Technology KEIO University

応用化学科分析化学研究室(チッテリオ研究室)

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

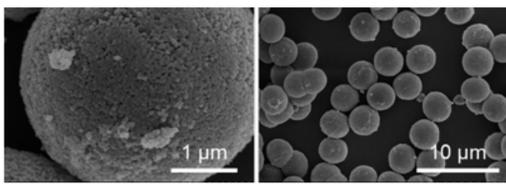
Mochida M. et al., *J. Mater. Chem. B*, 2019, 7, 4771-4777.

従来のシリカゲル系カラムは塩基性物質に弱いことが挙げられる

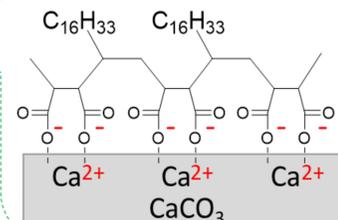
アルカリ塩であるメソポーラスCaCO₃球状粒子を用いることでアルカリ耐性を克服

マテリアルデザイン

CaCO₃メソポーラス球状粒子をポリマーで修飾



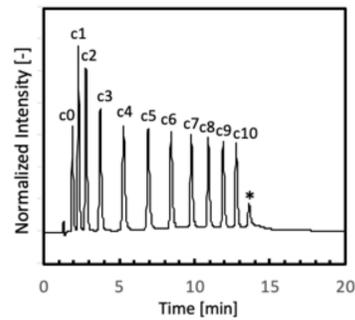
粒子表面を疎水化



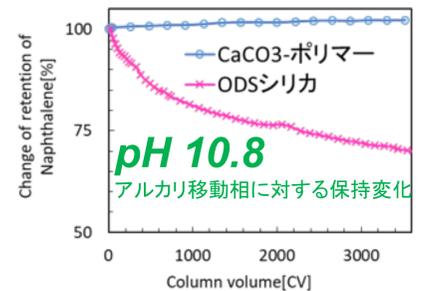
両親媒性ポリマーの静電吸着を用いることでポアを埋めない修飾と機能化を同時に実現

逆相保持およびアルカリ耐性の評価

逆相の保持挙動

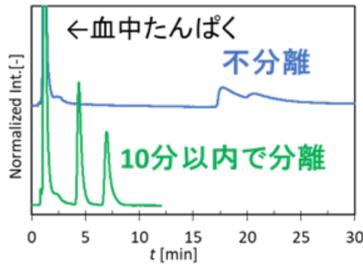


従来のカラムと比較して高アルカリ耐性



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



ODSシリカカラム (中性条件) 不分離
CaCO₃-ポリマーカラム (塩基性条件) 10分以内で分離

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

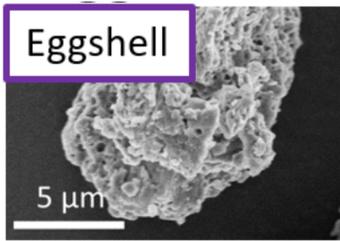
卵の殻を母体とする逆相分取カラムの開発

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

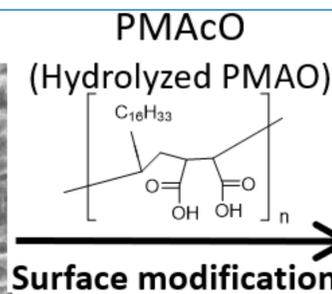
Eggshell



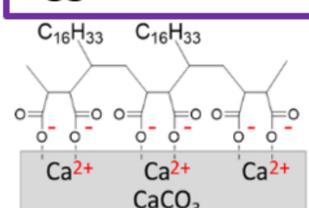
表面処理

Removal of biopolymer

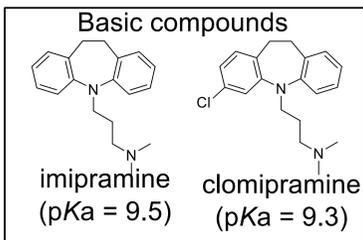
Bare Eggshell



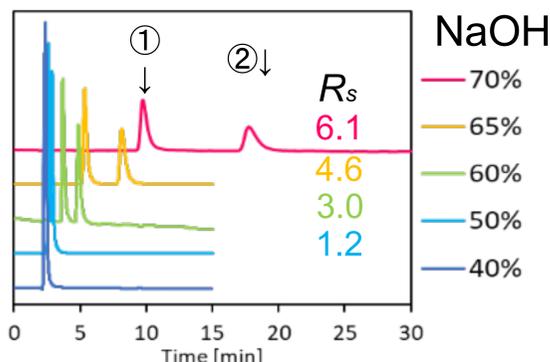
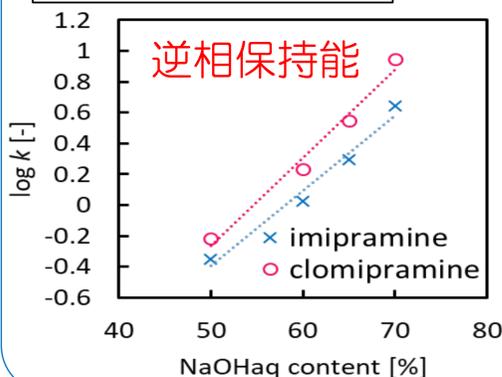
Eggshell-PMACo



逆相保持およびアルカリ耐性の評価

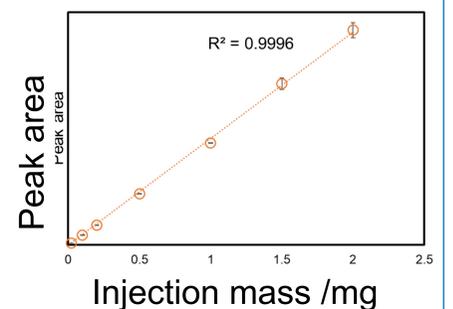
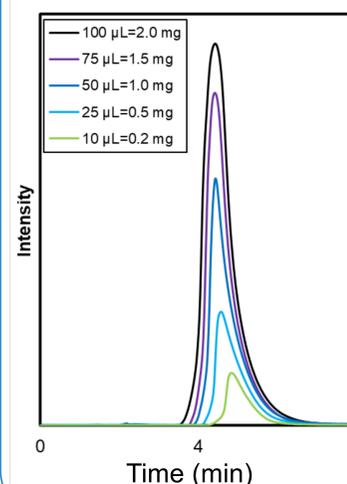


Mobile phase: Water/ACN, 3.0 mL/min Injection: 1 mg/mL, 10 μL



分取カラムへの応用

Mobile phase: Water/MeOH=50/50, 3.0 mL/min, T=25°C Sample: 20 mg/mL tert-Butylbenzene



分取カラムとして十分な保持能を獲得



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

Department of Applied Chemistry Faculty of Science and Technology KEIO University

応用化学科分析化学研究室 (チッテリオ研究室)

誰でもどこでも使える低コスト医療センサーチップの開発

コンセプト

体液による医療診断

血液

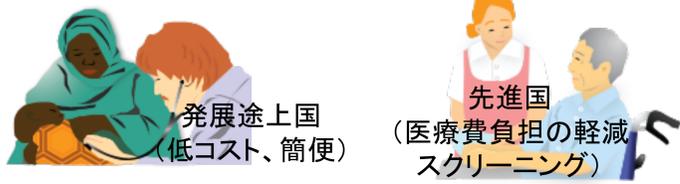
涙液

唾液

尿

- 血液: HIV, 肝疾患
- 涙液: 緑内障, ドライアイ
- 唾液: 歯周病, 全身性疾患
- 尿: 糖尿病, 腎疾患

世界で使える健康状態モニタリングデバイス



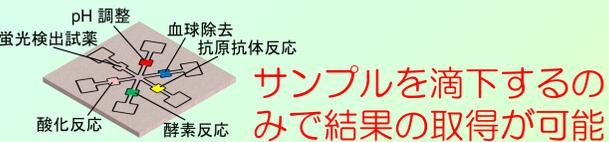
発展途上国
(低コスト、簡便)

先進国
(医療費負担の軽減
スクリーニング)

研究のポイント

マイクロ流体

- 小型化・少量のサンプルでの測定が可能
- 採取量に制限のあるサンプルの分析が可能
- 流路内でサンプルの前処理が可能



サンプルを滴下するのみで結果の取得が可能

紙基板の利用

- 目視で測定可能、低コスト、廃棄が容易
- 高度な分析機器や知識が不要 → 発展途上国での利用
- 毛細管現象でサンプルが自動的に流れる

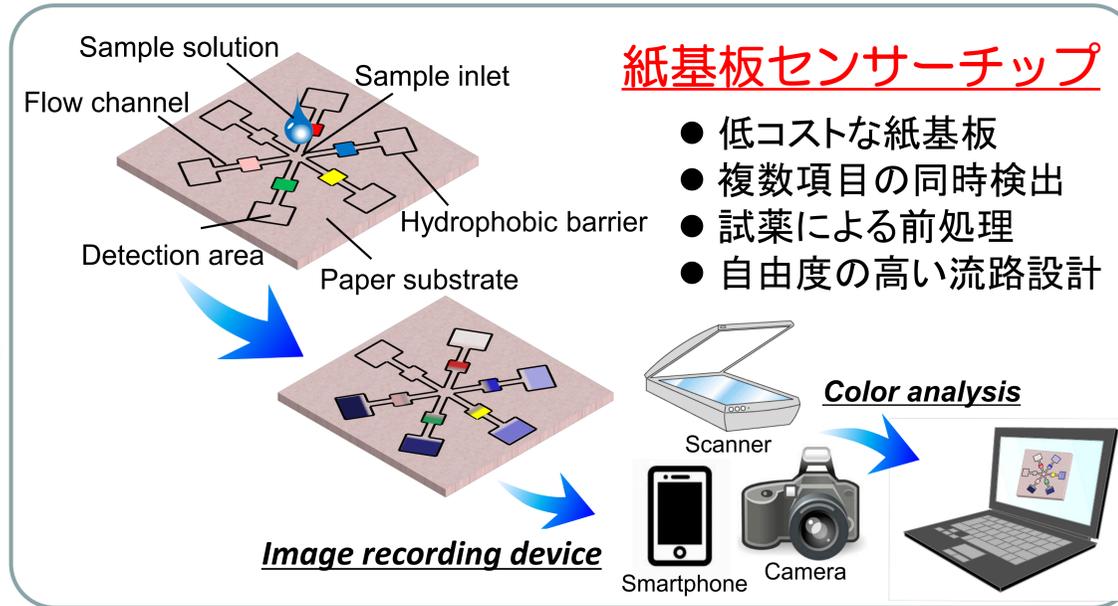


サンプル流動のための外部装置が不要

印刷技術

- 流路の作製および試薬の印刷が可能
- センシングチップをプリンターで作製可能
- 大量生産が可能
- 必要な場所に必要な量だけ印刷可能

工業化に適した技術



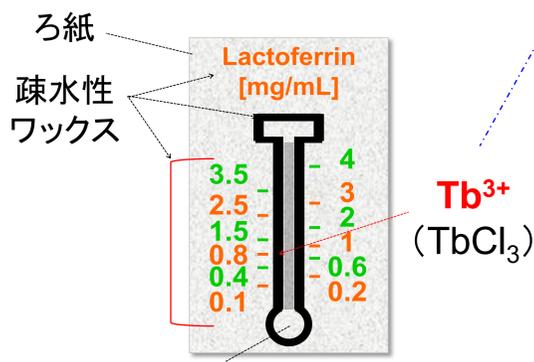
紙基板センサーチップ

- 低コストな紙基板
- 複数項目の同時検出
- 試薬による前処理
- 自由度の高い流路設計

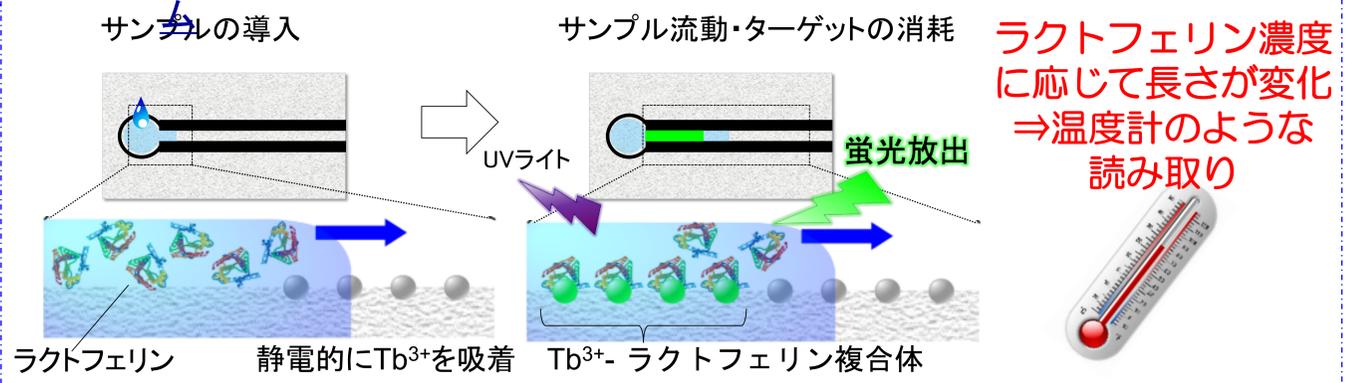
濃度に応答して長さの変化するラクトフェリンセンシングチップ

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

デバイスデザイン

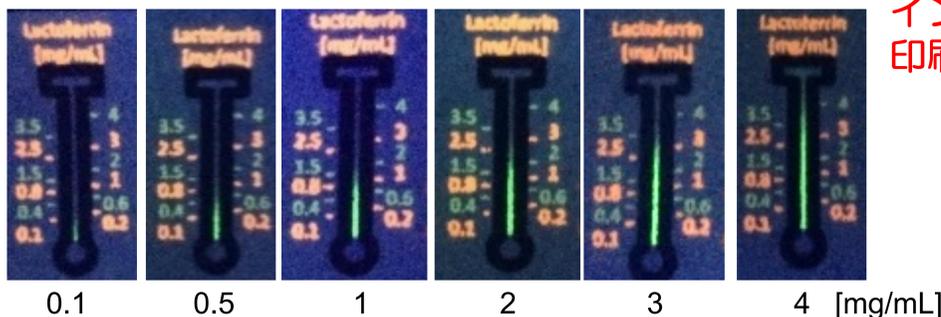


検出メカニズム



ラクトフェリン濃度に応じて長さが変化 ⇒ 温度計のような読み取り

濃度変化に対応した蛍光部分の長さ応答



インクジェットプリンターを用いて試薬をデバイス上に印刷することによって、デバイス作製の高い再現性を実現

市販キットとの比較

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	: 複数段階	⇒	1度の滴下

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



誰でもどこでも使える 低コストセンサーチップの開発

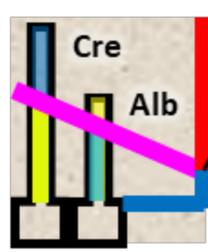
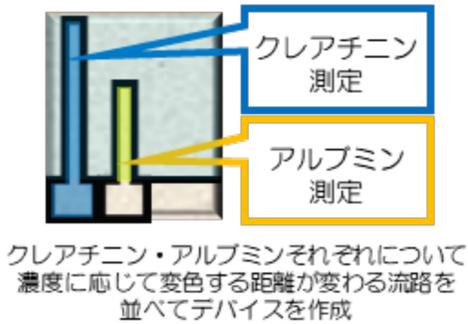
Department of Applied Chemistry Faculty of Science and Technology KEIO University

応用化学科分析化学研究室 (チツテリオ研究室)

アルブミン指数の測定のための紙基板センシングチップ

Hiraoka R. et al., ACS Sens., 2020, 5, 4, 1110-111

デバイスデザインと使用方法



正常値と異常値の境
300 mg/g Cre

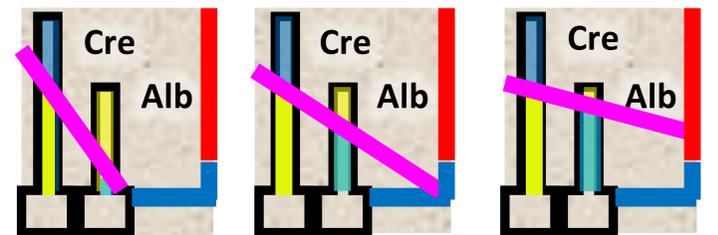
引いた直線とデバイスの枠の交点の位置から、アルブミン指数を測定

色変化の頂点を結び直線を引き

結果の視覚的・直感的な解釈が可能

結果の読み取り

アルブミン指数 [mg/g Cre]



人尿サンプルの測定

実際の写真 アルブミン指数 mg/g Cre



分析結果

Intercept of line (mm)		
Drawing-PADs	Expected value	Error (%)
8.58	8.13	+5.5
8.80	8.14	+8.1
10.5	8.21	+27.6
8.38	8.23	+1.8
9.48	8.27	+14.6
8.65	8.31	+4.0
8.76	8.51	+3.0

Intercept of line (mm)		
Drawing-PADs	Expected value	Error (%)
10.0	8.75	+14.3
9.76	8.83	+10.6
17.8	15.6	+13.9
27.1	21.7	+24.9
24.8	25.1	-1.5
10.0	8.75	+14.3

Intercept of line (mm)		
Drawing-PADs	Expected value	Error (%)
3.35	3.04	10.2
23.3	25.7	-9.4
27.4	34.8	-21.4

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

デバイスに直線を引くことで、直感的にアルブミン指数を測定できるデバイスの開発に成功した

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

Tenda K. et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2018, 130, 15595-15599
Tomimuro K. et al., ACS Sens., 2020, 5, 6, 1786-1794

紙デバイスの模式図

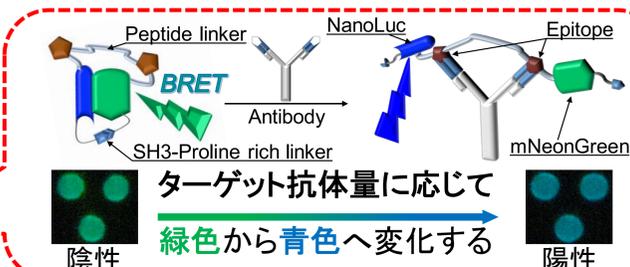
ラミネートフィルム (インレット: d = 5.5 mm)

血球除去フィルター (d = 7.9 mm)

生物発光基質を含んだ紙の層 (d = 7.9 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

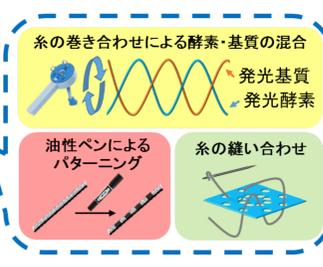
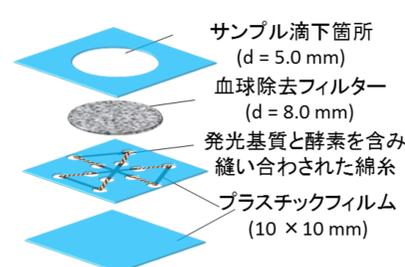


デバイスの利用方法

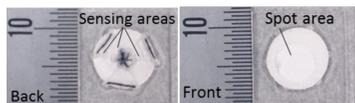


- 測定基板 : マイクロプレート ⇒ 低コストな μ PADs
- 測定サンプル : 血漿・血清 ⇒ 全血 (前処理不要)
- 測定数 : 1ターゲット ⇒ 複数ターゲット
- 測定手順 : 複数の定量操作 ⇒ 1度の滴下

糸デバイスの模式図 より少量の血液サンプルのより迅速な検出



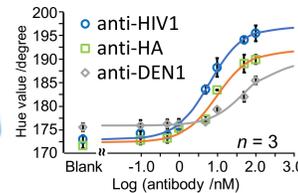
実際の写真



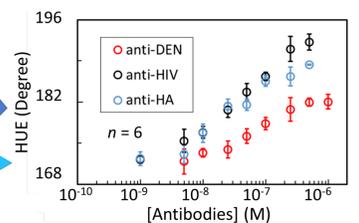
指先からの数 μ Lの血液を検出

実際の検量線

紙基板



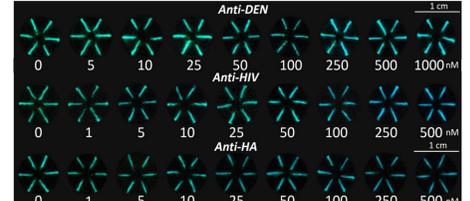
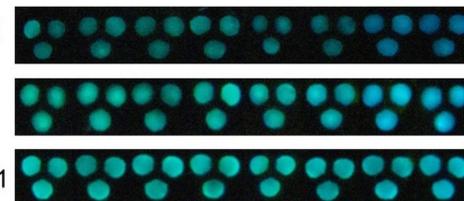
糸基板



anti-HIV1

anti-HA

anti-DEN1



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



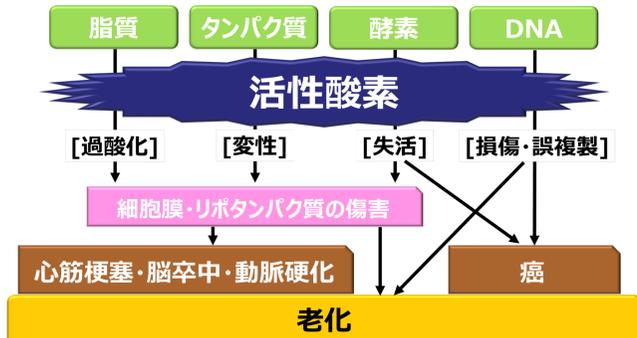
誰でもどこでも使える 低コストセンサーチップの開発

Department of Applied Chemistry Faculty of Science and Technology KEIO University

応用化学科分析化学研究室 (チッテリオ研究室)

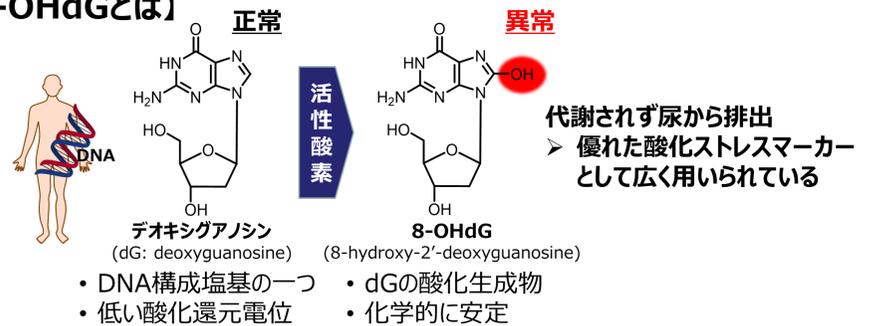
酸化ストレスと8-OHdG

酸化ストレスを日常的に把握し、病気になる前の未病状態で対策を施し予防に努めることが重要である
そのために尿中の8-OHdGを一般使用者でも簡便に測定可能な手法の開発が求められている



酸化ストレスが様々な疾病や老化亢進につながっている

【8-OHdGとは】



尿中の8-OHdG濃度から生体内の酸化ストレスを把握することができる

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

文字表示型イムノクロマト法による8-OHdG簡易検出

【イムノクロマト法】

抗原抗体反応を検出原理に用いた紙デバイスによる簡易検査手法

試料溶液の滴下 目視による結果の判定



- ✓操作が簡便
- ✓安価
- ✓迅速な測定 (~10分)
- ✓高い保存安定性 (~1年)

製品例



“Global lateral flow assay market is projected to reach USD 8.7 billion by 2023 from USD 6.0 billion in 2018 growing at a compound annual growth rate of 7.7% from 2018 to 2023” ([researchandmarkets.com](https://www.researchandmarkets.com))

	従来法	本開発法		
分析対象物質濃度とテストラインの呈色が逆の応答を示す	分析対象物質濃度	分析対象物質濃度		
	- 陰性	陰性 低 中 高		
一般ユーザの使用に向かない	- 反直感的(線の有無) - 低い検出感度 - 定量不可 (定量のために外部機器を用いる)	“使いやすさ”を重視		
【性能比較】	HPLC法	ELISA法	従来イムノクロマト法	【本開発法】
前処理	必要	不要	不要	不要
測定時間	3時間	3~4時間	5分	5-10分
専門技術	必要	必要	不要	不要
設備費用	650~850万円	100~800万円	70~90万円	不要

吸収パッド
未反応物質の除去や、反応メンブレンを通過できるサンプル量を増加させる役割を果たす。

5 mm

反応メンブレン
実際に目視によって結果を判定するエリア。標識抗体を捕捉する抗原・抗体試薬が固定化されている。

60 mm

コンジュゲートパッド
標識抗体が含有されており、サンプル溶液に再溶解し流動していく。

60 mm

サンプルパッド
サンプル溶液の受け口。バッファーや界面活性剤を含有させることによって、サンプル溶液の化学的な性質を調整する。

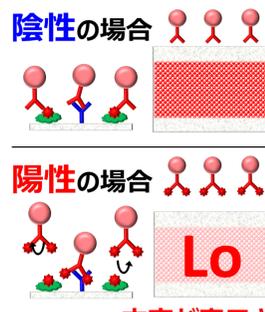
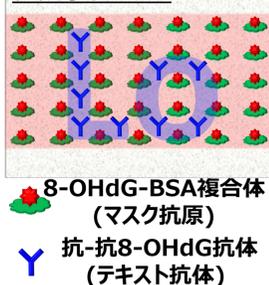
8-OHdG

コントロールゾーン
試料溶液の8-OHdG濃度によらず文字を表示する。測定が正常に行われたかを確認できる。

テストゾーン
試料溶液の8-OHdG濃度に依存して文字を表示する。

Lo
Md
Hi

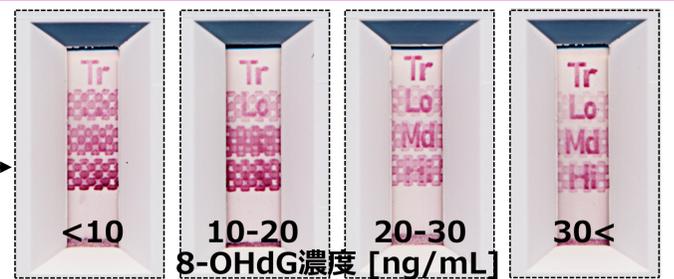
テストゾーン



【測定方法】



文字表示による直接的な結果の読み取り



研究者名

チッテリオ ダニエル・蛭田 勇樹

お問合せ先

Phone : 045-566-1568

Email: citterio@applc.keio.ac.jp / hiruta@applc.keio.ac.jp