

補助事業番号 2019M-175

補助事業名 2019年度 化学物質の継続的モニタリングを実現するマイクロ構造色DNAゲル
センサ素子の開発 補助事業

補助事業者名 慶應義塾大学 理工学部 尾上弘晃

1 研究の概要

本研究は、環境中や生体における化学物質を、安定的・持続的に計測可能な(モニタリング可能な)ゲルセンサを実現することである。マイクロ加工技術とDNAナノテクノロジーを高分子材料(ハイドロゲル)に取り入れ、ゲルの色の変化を目視などで判別することで、検出が可能な省エネルギーなセンサシステムを構築する。

2 研究の目的と背景

近年、環境保全や監視を目的とした環境中化学物質の濃度検知や、ヒトの健康維持管理のための生体物質などの検出のために、簡易で省エネルギーかつ持続的計測可能である化学センサ素子の需要が高まっている。様々な化学センサが研究される中で、特に刺激応答性ハイドロゲルとコロイド結晶を組み合わせた構造色ハイドロゲルは、ゲルの膨潤・収縮が色の変化として取得できるため、目視や簡便な光学システムにより情報を取得可能であり、環境や生体親和性が高く、かつ省エネルギーな小型デバイスへの応用として有望である。しかしながら、これらの刺激応答性ゲルの実社会で利用する際、(1)計測における化学物質の選択性の不足、そして(2)安定的・継続的な化学物質計測の困難さ、という2つの課題が解決されておらず、いまだ実用的に至っていない。

そこで本研究提案では、マイクロ加工技術とDNAナノテクノロジーを構造色ハイドロゲルに取り入れ上記の課題の解決し、省エネルギーかつ簡易なシステムにより持続的に計測可能な生化学ゲルセンサの実現を目指す。

3 研究内容

①構造色ゲルのマイクロアレイ化

ハイドロゲルセンサの応答速度を向上するために、構造色ゲルのマイクロアレイ化技術の確立に取り組んだ。ハイドロゲル内部の拡散係数は水と比較して非常に小さいため、これらの報告されている構造色ハイドロゲルセンサは外部刺激に対する応答が平衡に達するまでに数十分単位の時間を要するという問題がある。この応答時間の遅さが実用的な簡易分析デバイスの実現を目指す上でのボトルネックとなっている。そこで本研究では構造色ハイドロゲルを100 μm スケールまでスケールダウンさせ、スケール効果によって反応速度を向上させることを目的とする。加えてハイドロゲルをアレイ化して作製することにより、ゲルが反射する光量を確保し、スケールダウン前と比較して視認性を保つことができるこ

とを実験的に確認する。これにより簡易分析デバイスの応答時間を短縮することが期待できる。

純水を溶媒としてN-イソプロピルアクリルアミド (NIPAM)とN,N' メチレンビスアクリルアミド (BIS) を質量比100:1で混合したモノマー溶液を調整し、約15分間冷却した。シリカコロイド溶液 (MP-1040, 粒子径 130 nm, 40% w/w) に脱塩樹脂を10% (w/w)の分量で脱塩樹脂を加え、ボルテックスミキサーを用いて構造色の発現を確認するまで脱塩した。脱塩したコロイド溶液とモノマー溶液を体積比1:1の割合で混合し、光重合開始剤を加えたのち再び脱塩樹脂を加えて脱塩した。この溶液に窒素ガスでバブリング処理を3分間行いプレゲル溶液とした。NIPAM, シリカコロイド, 光重合開始剤の濃度はそれぞれ7%, 20%, 0.5%とした。100 μm スケールのアレイ化したハイドロゲルはアクリル板を用いて作製したモールド (深さ0.1 mm) を用い、直径 100 μm の円形パターンを持つフォトマスクを通して120秒間UV照射した。その際、カバーガラスはシランカップリングしたものをを用いた。作製したハイドロゲルはゲル化直後に純水中に入れ24時間以上静置し、十分に膨潤させた。その後、作製したハイドロゲルを顕微鏡で観察した。

作製した構造色ハイドロゲルアレイを図1に示す。顕微鏡画像から、赤い構造色を持つ直径約140 nmの円形の構造色ゲルが作製されたことが確認された。また、周囲の青い部分は作製時のUVの回折光によりゲル化したと考えられる。100 μm スケールのハイドロゲルは加熱開始後から約150秒付近で収縮率の低下と構造色の色変化が始まり、約400秒付近で収縮率が一定になった。ミリメートルスケールの大きい構造色ゲルとの反応速度の比較より、100 μm スケールで作製した構造色ハイドロゲルの反応時間がスケール効果によって短縮されたことが示唆された。現在は温度の変化が溶媒に伝わる速度が律速となり、これ以上の速度工場が実験環境の都合上難しいことより、エタノールに反応するNMUMゲルにより速度向上を検討中である。

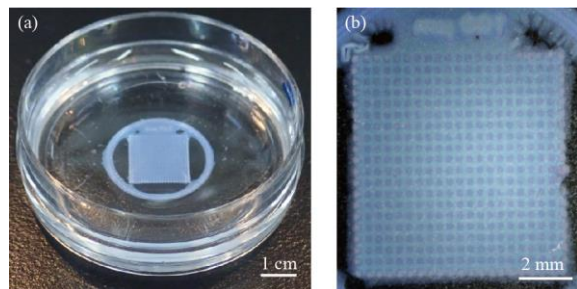


図1 作製した構造色ゲルマイクロアレイ

②ヒータ付きセンサデバイスの作製

継続的なモニタリング計測の実現のために、DNAアプタマー架橋ゲルを加熱しながら洗浄する方法を採用した。具体的にはヒータ付きマイクロ流路加熱洗浄デバイスを設計・作製した。このデバイスは、上部のPDMSマイクロ流路と、下部の金属配線基板で構成されている。流路に室温の純水を流し、配線に電流を同時に流すと、純水は電熱により徐々に加熱されて流路出口より排出される。この流路の後部に、銀イオンと反応後のDNAアプタマー架橋ゲルを配置すると、ゲルに高温状態と出口方向への水流を与えることが可能である。これにより銀イオンは熱によりゲル中のDNA

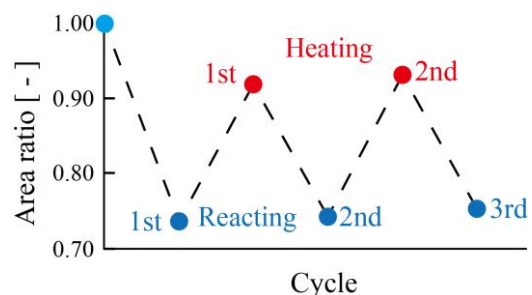


図2 酢酸銀水溶液繰り返し応答特性

アプタマーから解離され、水流によりゲルの外部へと除去されるという仕組みである。

加熱洗浄デバイスを用いて、酢酸銀水溶液応答後のDNAアプタマー架橋構造色ゲルから銀イオンを除去し、再度酢酸銀水溶液に対する応答を得られるか確認する実験を行った。まず、①ゲルを10 mMの酢酸銀水溶液に120分浸漬させた後、②ゲルを加熱洗浄デバイス内に入れ120分間デバイスを電力2.07 W、純水流量1 $\mu\text{L/s}$ で駆動させた。③その後、100 mLの純水中で120分徐冷した。この①-③の操作を複数回繰り返し、各操作を終える毎にゲルの面積を測定して収縮率を算出した（図2）。加熱洗浄・徐冷の操作後も、ゲルは膨潤し体積を回復させた。この結果から、DNAアプタマー架橋ゲルは加熱・洗浄のプロセスにより、ゲル内の銀イオンを解離され、酢酸銀水溶液応答前の状態に初期化されたと考えられる。また、2回目、3回目の酢酸銀水溶液反応後のゲルは、いずれも一回目の同様のサイズに収縮した。この結果から、加熱・徐冷を経てもDNAアプタマーは銀イオンにたいする結合能を失っていないことがわかる。これらの結果から、DNAアプタマー架橋ゲルは加熱洗浄プロセスと組み合わせることで標的物質を繰り返しセンシングすることが可能であること示された。

③化学物質モニタリング実現のためのヤヌスゲルセンサビーズ

実際に化学物質をモニタリングする際の構造色ゲルセンサ素子は、体液や環境に含まれる検出対象物質の他に、塩濃度やpHなどの環境外乱を補正するためにアレイ化する必要がある。そのため環境外乱を補正するために、2種類の化学物質にそれぞれ異なる応答を示す刺激応答性ゲルをマイクロビーズ化したヤヌス型センサビーズの検討を行った。予備検討のためDNA構造色ゲルの代わりに、取り扱いが用意なグルコースとpHに応答する両方の蛍光部位を2つの異なるコンパートメントに内包したヤヌス型蛍光マイクロビーズを作製した。これらの機能性部位は、グルコース濃度とpH値に応じて蛍光強度が変化するため、両方の強度を測定し、pH値の校正を行うことで、より正確なグルコース測定が可能となる。

このマイクロビーズは遠心マイクロ流体デバイスにより作製した。まず、グルコースセンサー用プレゲル溶液（15%アクリルアミド、0.3%メチレンビスアクリルアミド、2.5%アルギン酸ナトリウム、0.1%グルコース応答性モノマー、0.01%光開始剤）をシートキャピラリーの片側に導入し、pHセンサー用プレゲル溶液（20%アクリルアミド、0.3%メチレンビスアクリルアミド、2.5%アルギン酸ナトリウム、0.005%pH応答性モノマー、0.005%光開始剤）をもう片側に注入した。その後、 CaCl_2 水溶液を満たしたマイクロチューブにキャピラリーを挿入し、紫外線を照射しながら60秒間遠心力を印加した。ヤヌス粒子はコア-シェル構造を有し

ており、コア部は光の照射により重合し、シェル部は遠心分離中にマイクロビーズが同時に CaCl_2 溶液表面に到達した際にアルギン酸ナトリウムと Ca^{2+} イオンがイオン架橋して形成されたものである。マイクロビーズの平均直径は143.3 μm であり、その直径の分

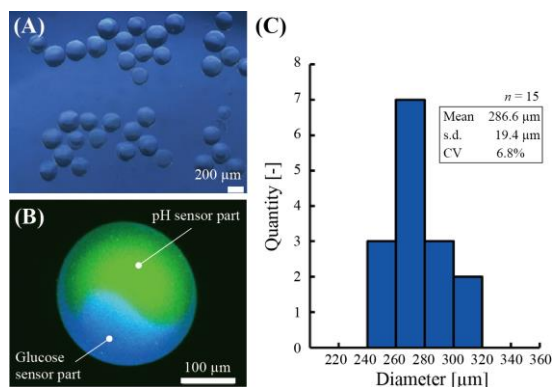


図3 作製したヤヌス型マイクロゲルセンサと粒径分布

布を（図3）に示す。グルコース応答部とpH応答部の両方の蛍光強度を測定し、pHとグルコース濃度に対するそれぞれのゲルの蛍光強度を計測し、体液と同様の成分で希釈した清涼飲料水中に入れ、蛍光強度測定実験を現在実施している。これらの測定された蛍光強度をもとに、対象溶液の環境外乱であるpH値と計測対象であるグルコース濃度を同時に計測することを目指す。

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

環境や生体の化学物質を継続的に計測することが可能になることにより、例えば水質の化学物質の変化を詳細にモニタし、公害などによる飲食料や生態系への影響の察知、などが期待できる。また農業においても、センサネットワークにより土壌の状態を管理することでより効率的な栽培が実現できる。またヒトの生体情報の取得に適用することにより、早期の生活習慣病などの予防診断が可能となる。これにより、より安全・安心の社会生活を人々に提供できる。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

研究代表者の専門である微細加工技術およびマイクロ流体技術を、ハイドロゲルの化学センサのデバイス化に応用した研究プロジェクトである。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

1. Yuta Kurashina, Mio Tsuchiya, Atsushi Sakai, Tomoki Maeda, Yun Jung Heo, Filippo Rossi, Nakwon Choi, Miho Yanagisawa, **Hiroaki Onoe**, “Simultaneous crosslinking induces macroscopically phase-separated microgel from a homogeneous mixture of multiple polymers,” *Applied Materials Today*, Vol. 22, 100937, 2021.
2. Mio Tsuchiya, Yuta Kurashina, **Hiroaki Onoe**, “Eye-recognizable and repeatable biochemical flexible sensors using low angle-dependent photonic colloidal crystal hydrogel microbeads,” *Scientific Reports*, Vol. 9, 17059, 2019.

7 補助事業に係る成果物

(1) 補助事業により作成したもの

<http://www.onoe.mech.keio.ac.jp/JKA2021.pdf>

(2) (1)以外で当事業において作成したもの

該当なし

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名： 慶應義塾大学理工学部学部(ケイオウギジユクダイガウ リコウガクブ)

住 所： 〒223-8522

神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1

担 当 者： 教授 尾上弘晃(オノエヒロアキ)

E - m a i l: onoe@mech.keio.ac.jp

U R L: <http://www.onoe.mech.keio.ac.jp/index-j.html>