

9608 臨床検査用高性能ナトリウムイオンオプトードの開発

助成研究者：鈴木 孝治(慶応義塾大学 理工学部)
共同研究者：山本 憲子(慶応義塾大学 理工学部)

要旨

臨床検査において、ナトリウムイオンはカリウムや塩化物イオンとともに、重要な測定対象イオンである。現在、この臨床検査におけるナトリウムイオン測定は主としてイオン選択性電極法により行われている。一方、最近では光検出技術の進歩により、光検出型イオンセンサー(イオン選択性オプトード)の開発が進められており、現行のイオン電極法に代わる、より高感度な測定法が近い将来に実用化されるものと期待されている。

そこで本研究では、高感度検出を目的とした新規の光導波路型ナトリウムイオン選択性オプトードを開発することを目的とした。

これまでに数多く報告されている光導波路センサーは、導波路中を伝搬する光のエヴァネッセント波の吸収を利用する化学センサーであった。しかし、これらの化学センサーは光導波路を光の伝搬のみに利用するものであり、分子やイオンの認識機能や、光情報変換機能などのセンシング機能は、導波路上に新たに構築したセンサー膜が担う形のものである。そこで我々は、光導波路自身に分子やイオンの認識機能や光情報変換機能を持たせることによって導波路自体の高機能化を図り、これをアクティブ光導波路と名付けた。このアクティブ光導波路をセンシングに利用することによって、従来型の導波路センサーと比較して、著しく高感度なイオンオプトードが開発できる。

本研究では、このアクティブ光導波路センサーの一例として、ニュートラルイオノフォア及び脂溶性アニオン性色素を包括した可塑性ポリ塩化ビニル膜(PVC)を導波路のコアとして用いたイオンセンサーを作製した。この場合、スピコーティングによって作製された可塑性PVC薄膜の屈折率を、基板の屈折率よりも高く制御することによって、イオンに応答して変色する可塑性PVC膜中に光を伝搬させることが可能となった。

このデバイスは上述した複数の機能を集積したものである。比較のため、従来型の光導波路オプトードを試作して測定したところ、アクティブ光導波路オプトードの方が著しく高感度な応答を示した。今回開発したアクティブ光導波路オプトードは、臨床検査などにおいて要求される選択性を十分に満たしている。

9608 臨床検査用高性能ナトリウムイオンオプトードの開発

助成研究者：鈴木 孝治 (慶応義塾大学 理工学部)
共同研究者：山本 憲子 (慶応義塾大学 理工学部)

1：研究の目的と概要

臨床検査において、ナトリウムイオンはカリウムや塩化物イオンとともに、最重要な測定対象イオンである。現在、この臨床検査におけるナトリウムイオン測定は主としてイオン選択性電極法により行われている。一方、最近では光検出技術の進歩により、光検出型イオンセンサー（イオン選択性オプトード）の開発が進められており、現行のイオン電極法に代わる、より高感度な測定法が近い将来に実用化されるものと期待されている。

そこで本研究では、高感度検出を目的とした新規の光導波路型ナトリウムイオン選択性オプトードを開発することを目的とした。

光導波路センサーは、HarrickのInternal Reflection Spectroscopyが出版されて以来、¹多くの研究がなされた。中でも導波路中を伝搬する光のエヴァネッセント波の吸収を利用する化学センサーは数多く報告された。²⁻¹⁵しかし、これらの化学センサーは光導波路を光の伝搬のみに利用するものであり、分子やイオンの認識機能や、光情報変換機能などのセンシング機能は、導波路上に新たに構築したセンサー膜が担う形のものである。そこで我々は、光導波路自身に分子やイオンの認識機能や光情報変換機能を持たせることによって導波路自体の高機能化を図り、これをアクティブ光導波路と名付けた。このアクティブ光導波路をセンシングに利用することによって、従来型の導波路センサーと比較して、著しく高感度なイオンオプトードが開発できる。

Fig.1に、従来から用いられている光導波路センサーの構造(A)と、本研究で用いたアクティブ光導波路センサーの構造(B)を示す。Fig.1(B)に示すような構造を利用することによって、伝搬する光の利用効率を向上させることができ、物理的なセンシングの高感度化を実現できる。

ここでは、このアクティブ光導波路センサーの一例として、ニュートラルイオンフォア及び脂溶性アニオン性色素を包括した可塑化ポリ塩化ビニル膜(PVC)を導

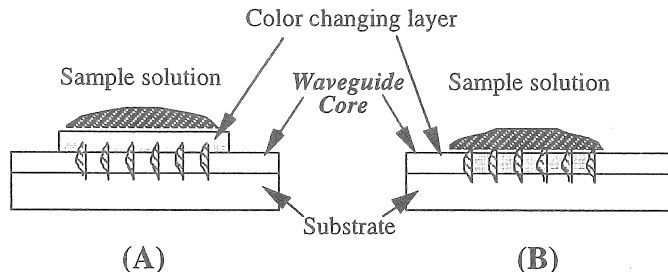


Fig. 1. Schematic illustrations of the two types of waveguide optodes (A): conventional waveguide optode; (B): active waveguide optode.

波路のコアとして用いたイオンセンサーを作製した。この場合、スピコーティングによって作製された可塑化PVC薄膜の屈折率を、基板の屈折率よりも高く制御することによって、イオンに応答して変色する可塑化PVC膜中に光を伝搬させることが可能となった。このセンサーの応答メカニズムは、油水界面でのイオン対抽出機構に基づくものであり、これについては我々が開発を進めてきた数々のオプトードの報告で、詳しく検討した。¹⁶⁻²⁰ここでは、アクティブ光導波路に包括するイオノフォアとして、我々が開発した高選択的イオノフォア分子^{21,22}を用い、臨床応用において必要とされる選択性を十分に満足する高感度アクティブ光導波路型ナトリウムイオン選択性オプトードを開発した。

2：実験

2-1：導波路の作製

Fig.2に作製した導波路及び測定系を示す。洗浄したパイレックスガラス表面の両端に、膜厚約2 μm のCorning7059ガラス層をスパッタリングによって作製した。次に、その層間の溝にアクティブ光導波路となる可塑化PVC膜を作製した。可塑化PVC膜は、膜材としてのポリ（ビニルクロリド-ビニルアセテート-ビニルアルコール（91:3:6））を30mg、膜溶媒としてのビス（2-エチルヘキシル）フタレート60mg、イオノフォア（K23E1あるいはC14-DD16C5）と脂溶性アニオン性色素（KD-A3）をそれぞれ約2から3mg混合してTHFに溶解し、スピコーティングによって作製した。これらのイオノフォアと色素は、以前に我々が開発したものである。^{17,21,22}

応答感度の比較のため、従来型の光導波路センサーも作製した。この導波路センサーは、Fig.1(A)のような構造であり、パイレックスガラスの全面に膜厚約2 μm のCorning7059ガラス層をスパッタリングによって作製し、この導波路上に上述と同様の可塑化PVC薄膜を製膜したものである（Fig.2参照）。

2-2：測定系とイオン濃度測定

Fig.2に測定システムの略図を示す。作製した光導波路をステージ上に固定し、導波路の両端にプリズムカップラーを密着させた。488nmのアルゴンイオンレーザーの光を導波路に入射し、各種イオンの水溶液を導波路上に滴下したときの光量変化量をパワーメーターを用いて計測した。ここでは、最初にイオンを含まない緩衝溶液のシグナルを検出したあとに、各種サンプルイオン溶液を滴下してシグナル変化量を算出し、検量した。

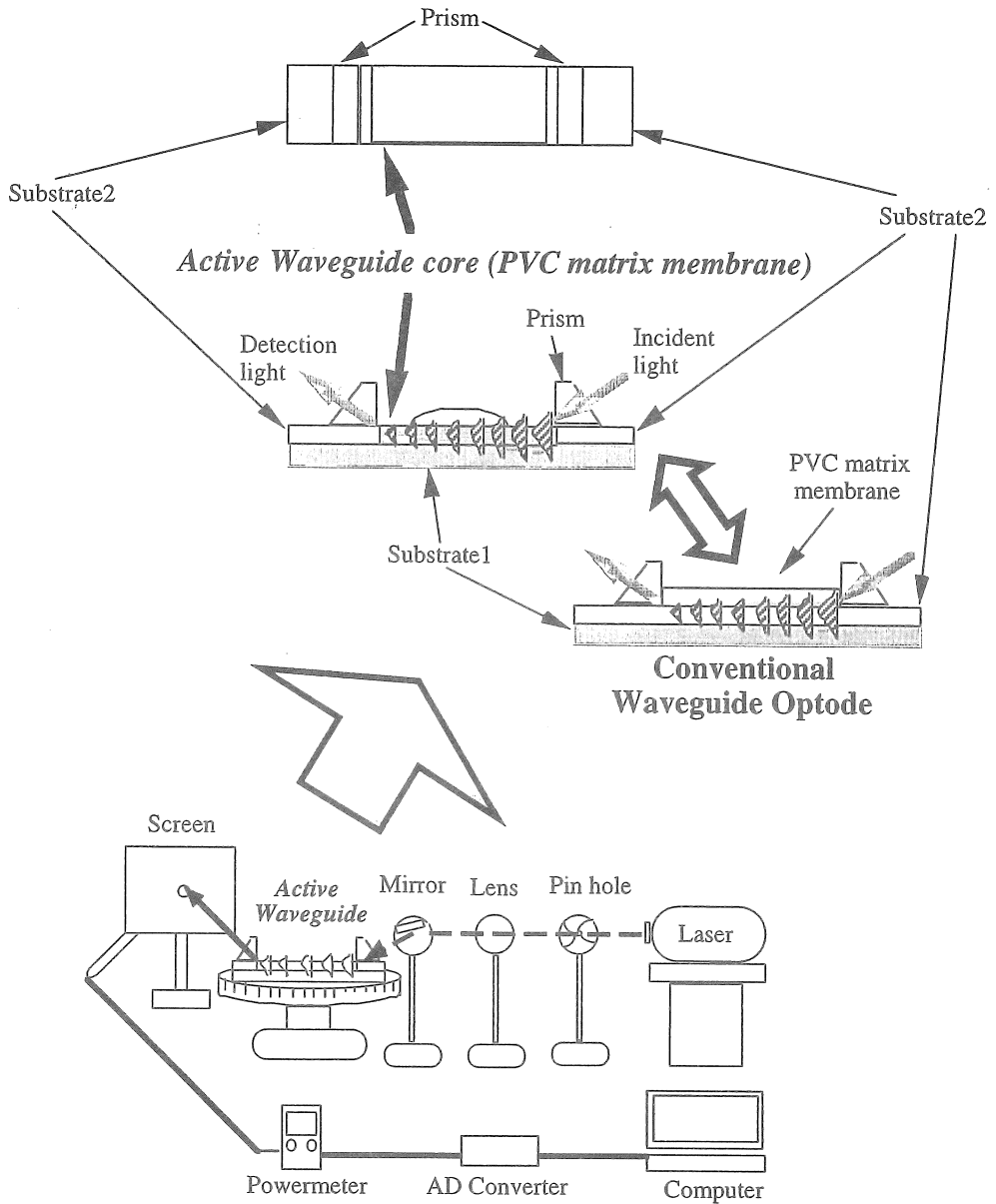


Fig. 2. Schematic representation of the waveguide optod measurement system. Materials: Substrate1: Pyrex glass, Substrate2 Corning 7059 glass, Prism: FD-11, Refractive indices: $n_{\text{prism}}=1.806$, $n_{\text{substrate2}}=1.590$, $n_{\text{PVC membrane}}=1.514$, $n_{\text{substrate1}}=1.487$, Light path length: 15mm, PVC membrane thickness: ca. $2\mu\text{m}$, Corning 7059 glass thickness: ca. $2\mu\text{m}$, Incident light wavelength: 4: 8nm.

3：結果と検討

3-1：アクティブ光導波路オプトードの設計

本研究では、光の伝搬とイオンセンシングの両方の機能を合わせ持つ新規光導波路オプトードを作製した。このオプトードを実現するために必要な条件は、“分析対象成分に応答した際に、光が伝搬する光導波路層中に伝搬光を吸収する化学種が可逆的に生成すること”である。よって、アクティブ光導波路の設計において重要な検討項目には次のようなものがある。その第一は、導波路作製において用いる材料の屈折率である。今回作製した導波路センサーの構造をFig.2に示す。Fig.2において、導波路を形成させるための光の全反射条件を満たす材料の屈折率条件は次の通りである。

$$n_{\text{prism}} > n_{\text{substrate2}} > n_{\text{waveguide}} > n_{\text{substrate1}} \geq n_{\text{sample}}$$

導波路層には、substrate 1よりも屈折率の高い材料が要求される。このため、高屈折率の可塑性PVC膜を作製するため、ビス(2-エチルヘキシル)フタレート(BEHP)を可塑剤として用いた。可塑性PVC膜は、約60重量%が可塑剤で占められており、可塑性PVC膜の屈折率は可塑剤の屈折率に大きく依存する。一般的に、芳香環を持つ有機分子の屈折率は、飽和アルキル基を持つ有機分子の屈折率よりも大きい。事実、可塑性PVC膜の典型的な可塑剤であるビス(2-エチルヘキシル)セバケート(BEHS)の屈折率は1.4510であるが、BEHPの屈折率は1.4860である。本研究ではピアレックスガラスを基板に用いており、その屈折率は1.487である。

BEHSを用いて作製した可塑性PVC膜の屈折率は、1.474であり、これは上記の全反射条件を満たさない。しかしながら、可塑剤の屈折率差からも予測できる通り、BEHPを可塑剤とする可塑性PVC膜の屈

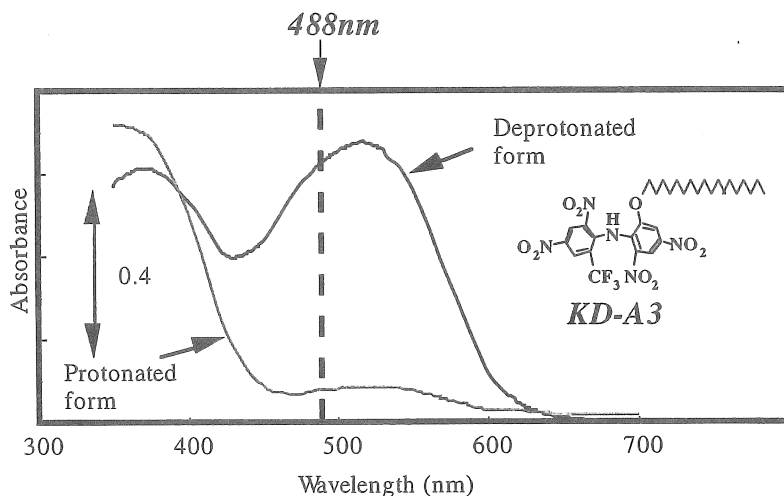


Fig. 3. Typical absorption spectra obtained with the plasticized PVC membrane containing KD-A3 in transmission mode using spectrophotometer. Membrane components and composition: 1.76 mg of K23E1, 2.09 mg of KD-A3, 59.44 mg of BEHP and 30.57 mg of PVC-PVAc-PVA. Deprotonated spectrum was obtained by using 1M calcium chloride solution (pH7).

折率は、アッペの屈折計による測定の結果、1.514であった。これは次の結果のように、上

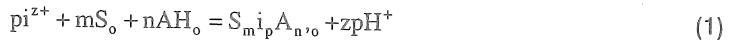
記の全反射条件を満たすものであった。

$$n_{\text{prism}} (1.806) > n_{\text{substrate2}} (1.590) > n_{\text{waveguide}} (1.514) > n_{\text{substrate1}} (1.487) \geq n_{\text{sample}} (1.333)$$

第二の重要な検討項目は、アクティブ光導波路中に包括される色素の最大吸収波長と、導波路中を伝搬する光の波長との一致である。Fig.3に、今回用いた色素であるKD-A3を含む可塑化PVC膜の吸収スペクトル変化を示す。KD-A3は、516nm付近に最大吸収波長があるため、ここでは488nmのアルゴンイオンレーザーを光源として選んだ。アクティブ光導波路センサーの応答は、主に伝搬する光の吸収に基づくため、伝搬光との波長の一致はセンサー感度に対する重要なファクターである。

3-2: センサー応答

このアクティブ光導波路センサーの応答メカニズムは、油水界面でのイオン対抽出メカニズムに基づいており、式(1)で表される。



ここで、Sはニュートラルイオノフォア、 i^{z+} はz価の電荷を持つ目的カチオン、AHは脂溶性アニオン性色素、 $S_{m,i_p}A_{n,o}$ は生成するイオン対の化学種を表す。ここでは、イオンとイオノフォアがp:m錯体を形成することを仮定している。添字のoは油相を表す。サンプル溶液がアクティブ光導波路上に滴下されると目的イオンが導波路相に抽出され、イオン対化学種が生成する。この化学種が伝搬する光を吸収する役割を果たす。

Fig.4に、カルシウムイオノフォアであるK23E1とKD-A3を用いたアクティブ光導波路センサーの典型的な応答例を示す。縦軸の吸光度は、(2)式によって計算した値を用いた。

$$A = -\log \frac{I_{\text{output(sample)}}}{I_{\text{output(buffer)}}} \quad (2)$$

$I_{\text{output(buffer)}}$ と $I_{\text{output(sample)}}$ はそれぞれ、サンプルイオンを含まない緩衝溶液を用いた場合のパワーメーターの応答と、サンプルイオン溶液を用いた場合の応答である。この測定系では、シングルビームモー

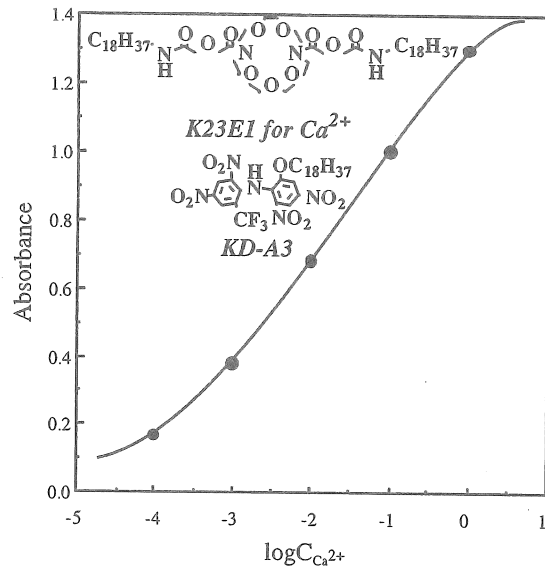


Fig. 4. Response curve obtained with the Ca^{2+} -sensitive active waveguide optode based on K23E1 and KD-A3. Membrane components and composition: 1.76 mg of K23E1, 2.09 mg of KD-A3, 59.44 mg of BEHP and 30.57 mg of PVC-PVAc-PVA.

ドでの測定を行っているため、この式を用いてバックグラウンドとの吸光度差を算出した。Fig.4に示す通り、K23E1とKD-A3に基づくカルシウムイオンオプトードは、 10^{-4} Mから1Mのカルシウムイオンに対して応答した。この測定プロセスにおいて導波路層は可逆的に黄色から赤に変色し、イオンへの応答を目視によっても確認できた。

厳密な意味でのアクティブ光導波路センサーの応答は、導波路層中に閉じこめられる光のパワーを、マクスウェルの方程式を解くことによって記述することが可能であると考えられる。定性的には、大きな閉じ込め定数を持ったアクティブ光導波路ほど高感度検出に有利である。しかしながらこの実験系においては、導波路の有効屈折率がイオンへの応答プロセスにおいて変化するために、導波路中に発生する定在波が変化してしまう。よって、光の伝搬に関する定量的な解析は困難であるが、上述のように、このセンサー応答には次の二つのメカニズムを考えることができる。一つは色素分子による光の吸収（複素屈折率の虚部）であり、もう一つは膜内でのイオン性化学種生成による導波路自身の屈折率変化（複素屈折率の実部）である。ごく最近、Freinerらによって可塑化PVCオプトード膜を使った屈折率検出型オプトードが報告された。¹⁵ 彼らはこの論文において、イオンへの応答過程における可塑化PVC膜の屈折率変化を測定しているが、これによるとその屈折率変化は0.001の桁のオーダーであることを報告している。我々が用いた系では、サンプル溶液相の屈折率は約1.33、導波路相の屈折率は約1.514であった。よって膜内でのイオン性化学種生成の屈折率変化である0.001の桁の屈折率変化は、この屈折率差（1.33と1.514）から考えて十分に小さく、無視しうる変化と考えられる。さらに、Fig.4に示した応答曲線の形はS字形のカーブであり、光吸収の法則によって導いた理論応答曲線の形に酷似していることから、この導波路センサーの応答は主に光吸収によって支配されているものと考えられる。

Fig.5にアクティブ光導波路イオンセンサーの典型的な応答プロファイルを示す。この応答時間は約10分であり、我々が以前に報告した可塑化PVC膜型フィルムセンサーの応答時間に近い値となった。この実験系ではサンプル溶液の濃度が十分が高いため、溶液相中におけるイオンの拡散は無視できると考えられる。よって、この応答時間は、膜中におけるイオン対化学種の拡散によって支配されているものと考えられる。

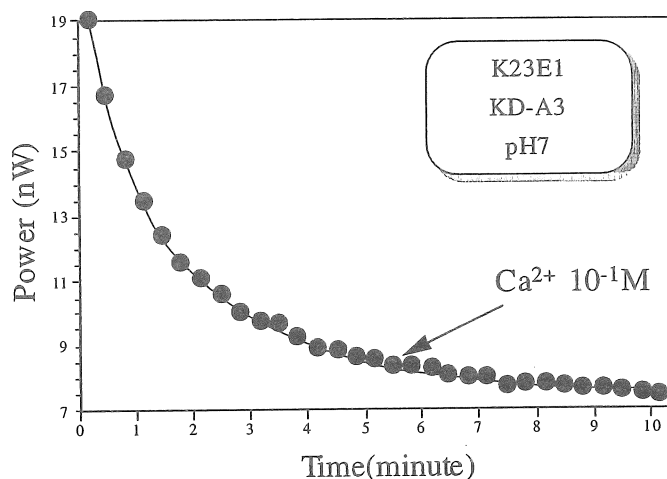


Fig. 5. Typical response profile of the Ca^{2+} -sensitive active waveguide optode based on K23E1 and KD-A3.

3-3: 従来型の光導波路オプトードとアクティブ光導波路オプトードの応答の比較

Fig.1に示したように、従来型の光導波路オプトードと、今回開発したアクティブ光導波路オプトードでは、光検出の原理が全く異なる。光吸収測定において、従来型の光導波路オプトードは膜中にしみだしたエバネッセント波の吸収を測定することであるが、アクティブ光導波路センサーにおいてはこれとは逆にエバネッセント波以外の伝搬光すべての吸収を測定することになる。Fig.6に、ナトリウムイオノフォアであるC14-DD16C5とアニオン性色素のKD-A3を用いた光導波路ナトリウムイオンオプトードの応答曲線を示す。ここでは、従来型の光導波路オプトードと比較するために、組成、膜厚、光の伝搬距離が等しい可塑化PVC膜を用いて、従来型の光導波路オプトードも作製した (Fig.1参照)。この図からもわかるように、今回作製したアクティブ光導波路オプトードの方が、著しく高感度であることがわかる。同じ膜を用いているため、従来型のオプトードにおいても、アクティブ光導波路オプトードにおいても油水界面において起こるイオン対抽出反応量はほぼ同じである。(1)式から、サンプル溶液中における目的イオン濃度が等しければ、膜内で生成するイオン対化学種の濃度も等しい。よって、この二つのオプトードの感度の差は、導波する光の利用効率の差であると考えられる。つまり、

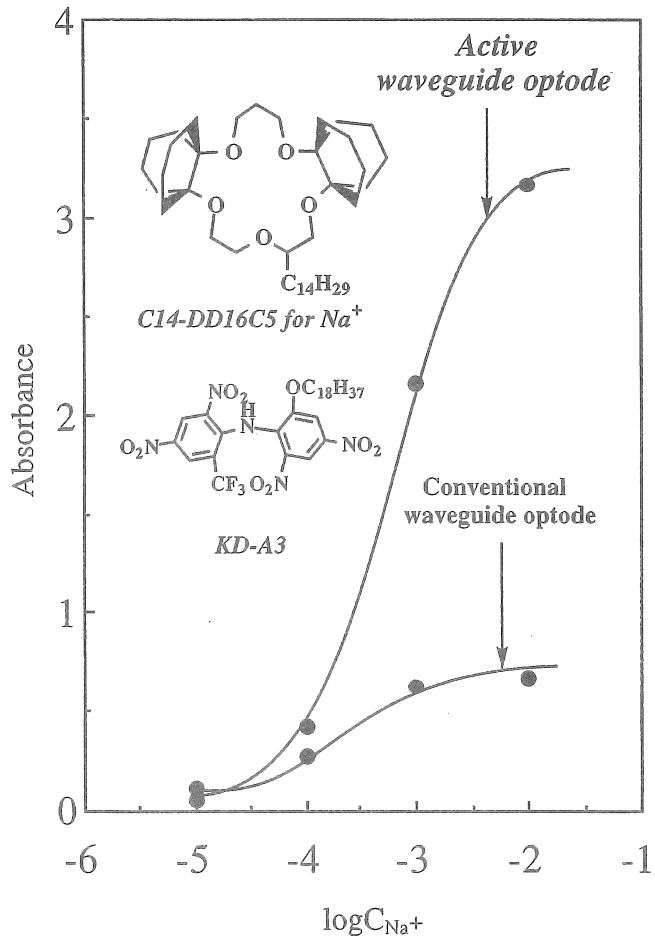


Fig. 6. Response curves obtained with the Na^+ -sensitive active waveguide optode and the conventional waveguide optode based on C14-DD16C5 and KD-A3. Membrane components and composition: 3.88 mg of C14-DD16C5, 4.24 mg of KD-A3, 87.27 mg of BEHP and 43.56 mg of PVC-PVAc-PVA

従来型の導波路オプトードにおいては導波する光のうちのエバネッセント波のみを利用して
いるのに対し、アクティブ光導波路オプトードではエバネッセント波以外の全ての光を利用
しているために、このような高感度化が実現できたものと考えられる。Fig.6において、こ
の二つのオプトードの感度の比は約4から5であるが、導波する光の電界強度の差から考えて、
導波距離を短くすることによってさらに高感度な光導波路オプトードを実現することが可能
であると考えられる。従来型の光導波路オプトードにおいても、導波路層の厚みや屈折率の
制御によって、最適化を図ることは可能であるが、構造的な優位性により、アクティブ光導
波路オプトードの方が高感度な検出が可能であると考えられる。

4 : 結論

本研究において、全く新しい光導波路オプトードのコンセプトを提案した。このデバイ
スは、複数の機能を集積したものであり、従来型の光導波路オプトードと比較して著しく高感
度な応答を示す。今回開発したアクティブ光導波路オプトードは、臨床検査などにおいて要
求される選択性及び感度を十分に満たしており、血清中ナトリウムイオンセンシングへの応
用も十分に期待できる。今後はミリメートル単位の光導波路オプトードの開発が望まれる。

参考文献

- [1] N. J. Harrick, *Internal Reflection Spectroscopy*; 2nd ed.; Harrick Scientific: New York, 1979.
- [2] S.W. Kang, K. Sasaki and H. Minamitani, *Appl. Opt.*, 32 (1993) 3544.
- [3] S. J. Choquette, L. Locascio-Brown and R. A. Durst, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 55.
- [4] D. Christensen, S. Dyer, D. Fowers and J. Herron, *Proc. SPIE*, 1886 (1993) 2.
- [5] J. Herron, K.D. Caldwell and D.A. Christensen, *Proc. SPIE*, 1885 (1993) 28.
- [6] S.S. Saavedra and W.M. Reichert, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2251.
- [7] R.M. Sutherland, C. Dahne, J.F. Place and A.S. Ringrose, *Clin. Chem.*, 30/9 (1984) 1533.
- [8] I. M. Walczak, W. F. Love, T. A. Cook and R. E. Slovacek, *Biosens. Bioelectron.*, 7 (1992) 39.
- [9] M. D. DeGrandpre, L.W. Burgess, P.L. White and D.S. Goldman, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2012.
- [10] K. Tsunoda, H. Itabashi and H. Akaiwa, *Anal. Chim. Acta*, 299, (1995) 327.
- [11] R.E. Dohner, U.E. Spichiger and W. Simon, *Chimia*, 46 (1992) 215.
- [12] U.E. Spichiger, D. Freiner, M. Lerchi, E. Bakker, R.Dohner and W. Simon, *Proc. SPIE*, 1796 (1992) 371.
- [13] L. Yang and S.S. Saavedra, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1307.

- [14] L. Yang, S.S. Saavedra and N.R. Armstrong, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1834.
- [15] D. Freiner, R.E. Kunz, D. Citterio, U.E. Spichiger and M.T. Gale, *Sens. Actuators B*, 29 (1995) 277.
- [16] K. Suzuki, K. Tohda, Y. Tanda, H. Ohzora, S. Nishihama, H. Inoue and T. Shirai, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 382.
- [17] K. Suzuki, H. Ohzora, K. Tohda, K. Miyazaki, K. Watanabe, H. Inoue and T. Shirai, *Anal. Chim. Acta*, 237 (1990) 155.
- [18] H. Hisamoto, N. Miyashita, K. Watanabe, E. Nakagawa, N. Yamamoto and K. Suzuki, *Sens. Actuators B*, 29 (1995) 378.
- [19] K. Watanabe, E. Nakagawa, H. Yamada, H. Hisamoto and K. Suzuki, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 2704.
- [20] H. Hisamoto, K. Watanabe, E. Nakagawa, D. Siswanta, Y. Shichi and K. Suzuki, *Anal. Chim. Acta*, 299 (1994) 179.
- [21] K. Suzuki, K. Watanabe, Y. Matsumoto, M. Kobayashi, S. Sato, D. Siswanta and H. Hisamoto, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 324.
- [22] K. Suzuki, K. Satoh, H. Hisamoto, D. Siswanta, K. Hayashi, N. Kasahara, K. Watanabe, N. Yamamoto, H. Sasakura, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 208.

Development of High Performance Sodium Ion Optodes for Medical Applications

Koji Suzuki and Noriko Yamamoto

(Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University,
3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama 223, Japan.)

Summary

A novel polymer waveguide-(active waveguide) type optode possessing the advantages of both selective analyte determination and optical signal propagation was developed. The noteworthy concept of this active waveguide is the integration of plural functions into the planar waveguide itself, such as molecular recognition, color change, and light propagation. In order to demonstrate this concept, the analyte sensing layer is utilized as the light propagating layer. An ion-selective optode membrane consisting of a plasticized PVC membrane containing a neutral ionophore and a color changeable lipophilic anionic dye was used as the planar active waveguide sensing layer. The principle of the response of this active waveguide is based on the measurement of the output light signal intensity in which this light is propagated through the color changeable PVC membrane phase, and its intensity is decreased by interaction with the analyte ions. In this report, calcium and sodium ion-sensitive waveguides were prepared based on our developed neutral ionophores. Comparison of the experimental responses between the novel active waveguide optode and a commonly utilized conventional waveguide optode based on evanescent wave spectrometry demonstrated that the sensitivity of the active waveguide optode is obviously greater than that of the conventional waveguide optode. This concept of an active waveguide fully demonstrates the advantageous property of a planar waveguide with respect to highly sensitive and selective optical chemical sensing. The sodium ion-selective active waveguide optodes developed here can be applied to the determination of sodium ion in the medical samples such as serum or plasma.