

疎水性化合物の高感度分析を可能とする

ポリジアセチレンリポソーム型イクオリン発光デバイスの開発

2016年度

山本 涼子

本論文の基礎となる報文を以下に示す。

Ryoko Yamamoto, Shigehiko Takegami, Atsuko Konishi, Hikari Horikawa, Sayumi Yonezawa, and Tatsuya

Kitade: Polydiacetylene liposomal aequorin bioluminescent device for detection of hydrophobic compounds.

*Anal. Chem.*, **88**, 5704–5709 (2016). [第 1 章および第 2 章]

# 目次

略語一覧.....	1
要旨.....	2
序論.....	5
第1章 PLABD の構築および物質検出メカニズムの妥当性に関する検討	
1. 緒言.....	9
2. 実験材料および実験方法.....	11
2.1 実験材料.....	11
2.1.1 試薬.....	11
2.2 実験方法.....	11
2.2.1 DALS の調製.....	11
2.2.2 PLABD の調製.....	11
2.2.3 粒子径および粒度分布の測定.....	12
2.2.4 ζ電位の測定.....	12
2.2.5 DALS および PLABD における発光測定.....	12
2.2.6 LCN 添加時における発光測定.....	12
3. 実験結果および考察.....	13
3.1 PLABD の調製のための UV 照射時間.....	13
3.2 DALS および PLABD の粒子径と粒度分布.....	15
3.3 DALS および PLABD のζ電位.....	18
3.4 AQ の発光制御.....	19
3.5 PLABD の LCN に対する応答.....	22
4. 小括.....	24
第2章 疎水性アミン化合物に対する PLABD の signal generator としての有用性の検討	
1. 緒言.....	25
2. 実験材料および実験方法.....	27
2.1 実験材料.....	27
2.1.1 試薬.....	27
2.2 実験方法.....	27
2.2.1 DALS (pH 11.0) の調製.....	27
2.2.2 DALS (pH 9.0) の調製.....	27
2.2.3 PLABD (pH 11.0) および PLABD (pH 9.0) の調製.....	27
2.2.4 PDALS (pH 11.0) の調製.....	27

2.2.5	PDALS (pH 9.0) の調製.....	27
2.2.6	PDALS (pH 11.0) 懸濁液および PDALS (pH 9.0) 懸濁液の色相観察.....	28
2.2.7	可視吸収スペクトルの測定.....	28
2.2.8	二次微分スペクトルの計算.....	28
2.2.9	分析対象物添加時における発光測定.....	28
2.2.10	BIR の計算.....	29
3.	実験結果および考察.....	30
3.1	PDALS の応答性.....	30
3.2	PLABD の応答性.....	36
3.3	PLABD と分析対象物の相互作用.....	40
4.	小括.....	43
	総括.....	44
	謝辞.....	46
	引用文献.....	47

## 本論文で使用した略語一覧

AQ	:	Aequorin
BIR	:	Bioluminescent intensity ratio
CI	:	Calcium ionophore
DALS	:	Diacetylene liposome
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid
LB	:	Langmuir–Blodgett
LCN	:	Lidocaine
$\log D$	:	Logarithm of distribution coefficient
$\log P$	:	Logarithm of octanol/water partition coefficient
MLV	:	Multilamellar vesicle
PCA	:	Procainamide
PCDA	:	10,12–Pentacosadiynoic acid
PCN	:	Procaine
PDA	:	Polydiacetylene
PDALS	:	Polydiacetylene liposome
$pK_a$	:	Logarithm of acid dissociation constant
PLABD	:	Polydiacetylene liposomal aequorin bioluminescent device
TDM	:	Therapeutic drug monitoring

## 課程博士学位論文 内容の要旨

薬学専攻・博士課程

氏名 (英字名) 山本涼子 (Yamamoto Ryoko)

学位論文題目 疎水性化合物の高感度分析を可能とするポリジアセチレンリポソーム型イクオリン発光デバイスの開発

疾病の原因究明や予防、あるいは最適な治療を実施するにあたって、血中や尿中の薬物やバイオマーカーの挙動をモニタリングすることは極めて重要である。しかし、これらを高感度に検出するための分析法として用いられる ELISA 法や LC/MS/MS などの分析法には、前処理や機器の操作が煩雑である、機器の導入および維持に高額の設備投資を必要とするなどの問題点がある。従って、臨床現場における分析対象物のより簡便で迅速、低コストで高感度な分析法の開発が強く望まれている。

このような背景のもと著者は、物質検出のための素子を用いた高感度分析法の確立を目指し、物質との相互作用により信号を生じる signal generator の開発に着手すべく、ポリジアセチレン (PDA) に着目した。PDA は分子中にジアセチレン構造を有するモノマーから UV 照射を経て得られるポリマーであり、共役エンイン構造を有するため可視光を吸収するが、外部刺激によってコンホメーション変化を生じ、その色相が変化することが知られている。特に、PDA 膜を有するリポソームと生体分子や化学物質などとの相互作用を用いた比色分析法は操作が簡便で、視覚的にも結果を容易に判別可能であるので、幅広いターゲット分子の分析法の開発に利用されてきた。しかし一方で、色相変化を用いた分析法には、感度が低いという問題点がある。そこで本研究では、PDA のコンホメーション変化を活用した、新規な物質検出メカニズムに基づいた signal generator を開発することを目的とした。すなわち、signal generator として、PDA 膜を有するリポソームと発光タンパク質であるイクオリン (AQ) による生物発光を組み合わせたポリジアセチレンリポソーム型イクオリン発光デバイス (PLABD) を考案し、疎水性アミン化合物を分析対象物として、PLABD の物質検出メカニズムの妥当性および signal generator としての有用性について検討を行った。

### 第1章 PLABD の構築および物質検出メカニズムの妥当性に関する検討

著者が提唱した、PLABD の物質検出メカニズムの仮説を以下に詳述する。AQ をリポソームの内水相、Ca<sup>2+</sup>イオンキャリアーとしてカルシウムイオノフォア (CI) をジアセチレン脂質膜中にそれぞれ封入したジアセチレンリポソーム (DALS) を作製する。この DALS に 254 nm 付近の UV を照射し、ジアセチレン脂質同士が架橋し PDA 膜となった PLABD を得る。PLABD では隣接するジアセチレン脂質が重合しているため PDA 膜中に存在する CI の運動性が抑制されており、この PLABD 懸濁液に Ca<sup>2+</sup>イオンを加えても、PLABD 内水相に存在する AQ の発光は観測されない。次いで、Ca<sup>2+</sup>イオン存在下での PLABD 懸濁液に分析対象物を添加すると、PLABD と分析対象物との相互作用により、PLABD 膜のコンホメーション変化が生じる。その結果、CI の運動性が回復し、外水相に存在する Ca<sup>2+</sup>イオンが CI を介して PLABD 内水相へと拡散し、PLABD 内水相の

AQの発光が観測される。したがって、PLABDを用いた分析法はこの時に生じるAQの発光強度より、分析対象物の定量を行う方法である。

本章では、上記で提唱した物質検出メカニズムの妥当性の検討を目的に、ジアセチレン構造を有する脂質 10,12-pentacosadiynoic acid を用いて逆相蒸発法により DALS を作製し、この DALS に UV を 10 分間照射して PLABD を調製し、DALS および PLABD に  $\text{Ca}^{2+}$  イオン、また PLABD に分析対象物としてリドカイン (LCN) を添加した時の AQ の発光挙動を追跡した。

まず、CI の運動性を検討するために、DALS 懸濁液と PLABD 懸濁液にそれぞれ  $\text{CaCl}_2$  水溶液を添加した時の発光強度を測定した。その結果、PLABD 懸濁液では DALS 懸濁液よりも発光強度は低値となった。DALS と PLABD はいずれも内外の両水相に AQ が存在しているので、この結果は、外部から  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを添加した際に DALS では内外の両水相の AQ が発光する一方、PLABD では外水相の AQ のみが発光し、内水相の AQ は発光しないためであると考えられた。したがって、PLABD では CI の運動性が抑制されていることが示された。

次いで、PLABD の物質応答性を検討するため、あらかじめ一定量の  $\text{CaCl}_2$  水溶液と混合した PLABD 懸濁液に LCN 水溶液を添加すると内水相に存在する AQ の発光が観測され、LCN 濃度の増加に応じて発光強度の増大が見られた。一方、LCN を含まない超純水を添加した場合には AQ の発光はほとんど観測されなかった。以上のことから、PLABD の物質検出メカニズムの妥当性が示され、目的とする PLABD を構築することができた。

## 第2章 疎水性アミン化合物に対する PLABD の signal generator としての有用性の検討

PLABD の signal generator としての有用性を検討するために、LCN および構造の類似したプロカイン (PCN)、プロカインアミド (PCA) の3種の薬物を分析対象物として、PLABD の応答性と感度について、従来の比色分析法との比較を行った。AQ と CI を含有しない PDA リポソーム (PDALS) を PLABD と同様に調製し、各薬物を添加した後の色相を視覚的に確認した。最も広い濃度範囲で色相変化が見られた LCN について、吸収スペクトルを用いた比色分析法では、0.25–6.25 mM の濃度範囲で、直線で近似した場合の相関係数は  $r=0.89$  であった。一方、あらかじめ一定量の  $\text{CaCl}_2$  水溶液と混合した PLABD 懸濁液に各薬物の水溶液を添加した際には、薬物濃度の増加に応じて AQ の発光強度の増大が見られ、LCN の 10 nM–10 mM、PCN の 10 nM–100  $\mu\text{M}$ 、PCA の 100 nM–100  $\mu\text{M}$  の濃度範囲において、直線で近似した場合の相関係数はそれぞれ  $r=0.89$ 、 $r=0.66$ 、 $r=0.74$  であった。以上の結果より、PLABD を用いた分析法は、PDALS を用いた比色分析法と比較して大幅にダイナミックレンジが広く、感度もより高いことが明らかとなり、PLABD の signal generator としての有用性が示された。

上記の PLABD の実験において、LCN と他の薬物との間では応答性に差が見られたため、この要因について考察を行った。前述の PLABD の実験は pH11.0 条件下で行ったものであり、3種の薬物はほとんどが分子型として存在している。また、LCN、PCN、PCA の  $\log P$  値はそれぞれ 2.26、0.88、1.92 であり、LCN は他の薬物よりも疎水性の高い化合物であるため、各薬物と PLABD 膜との疎水性相互作用の大きさが応答性の違いに関与していると考えた。そこでこの考察を実証するため、LCN の  $\text{pK}_a$  値が 7.9 であることを利用して、分子型の存在比率がより小さい pH9.0 条件下

で同様の実験を行った。その結果、pH9.0 条件下では LCN の 100 nM–10 mM の濃度範囲で、直線で近似した場合の相関係数は  $r=0.77$  であった。pH11.0 条件下と pH9.0 条件下の両実験結果を比較すると、分子型の存在比率がより大きい pH11.0 条件下で、より高感度に LCN を検出することができた。この結果より、PLABD の物質応答性には、PLABD 膜と分析対象物との疎水性相互作用が大きな役割を果たすことが示された。

以上、本研究で PLABD の物質検出メカニズムの妥当性および signal generator としての有用性を明らかにすることにより、物質検出のための新たな素子となる PLABD を構築することができた。PLABD は、PDA の色相変化を利用した従来の比色分析法では困難な高感度分析を可能とし、また PLABD を用いた分析法は測定が簡便かつ迅速である。今後は、抗原抗体反応など分析対象物に特異的な反応を PLABD 膜表面で捉え、それに応答する PLABD の構築により、臨床現場で求められる薬物やバイオマーカーの PLABD を用いた新規高感度分析法の開発へと、更なる展開が期待できる。

## 序論

疾病の原因究明や予防、あるいは最適な治療を実施するにあたって、患者個人ごとに対し血中や尿中の薬物やバイオマーカーの挙動をモニタリングすることは極めて重要である。たとえば、治療薬物モニタリング (TDM) により体内の薬物濃度を測定することで、患者に合わせた治療や副作用対策の個別化が可能である。また、各種の腫瘍マーカーの検出は癌の動態の評価に多く用いられ、今日の癌治療において欠かせないものとなっている。このような、生体試料中に極微量に存在する薬物やバイオマーカーなどを検出するため、臨床現場において分析対象物を高感度に検出する分析法が必要とされている。この条件を満たす分析法として、現状では抗原抗体反応と紫外可視分光法を組み合わせた酵素免疫測定法や、蛍光分析法と組み合わせた蛍光偏光免疫測定法、また、HPLC と MS/MS を組み合わせた LC/MS/MS が利用されている。しかし、これらの分析法は前処理や機器の操作が煩雑で専門知識および技術を必要とし、さらに、機器自身が非常に高価で導入および維持に高額の設定投資を必要とする。またこれらの要因に加えて、外部機関に分析を依頼した場合、分析結果が得られるまでに相応の時間を要するなどの問題点がある。したがって、臨床現場における分析対象物のより簡便で迅速、低コストで高感度な分析法の開発が強く望まれている。

このような背景のもと、著者は臨床現場での要求を満たす高感度で簡便かつ迅速な分析法を確立するための基盤を構築することを目的として、分析対象物との相互作用により信号を生じる新たな signal generator の開発に着手すべく、 $\pi$  共役系高分子であるポリジアセチレン (PDA) に着目した。分子中にジアセチレン構造を有するモノマーは 254 nm 付近の UV を照射することにより、隣接する分子間で重合が進行し、共役エンイン構造を有する PDA を形成する (Figure 1)。

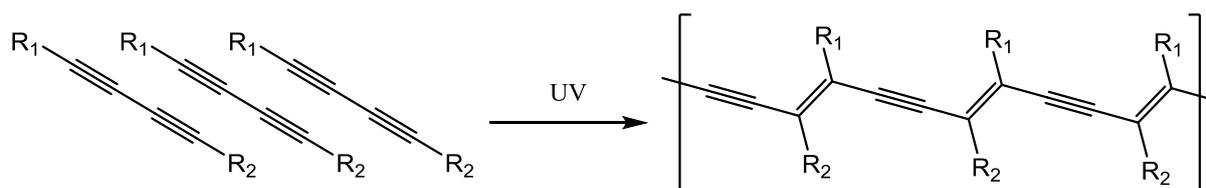


Figure 1. Photopolymerization of diacetylene monomers.

ジアセチレン構造を有するモノマーの内、ジアセチレン構造を有する両親媒性の脂質から調製された単分子膜、多分子膜、エマルションやリポソームなどの自己集合体は 254 nm 付近の UV 照射により、それぞれ PDA 膜<sup>1-4)</sup>、PDA エマルション<sup>5-8)</sup>や PDA リポソーム (PDALS)<sup>9,10)</sup>を形成する。多くの場合において、これらの共役エンイン構造が 600 から 650 nm 付近の可視光を吸収

するために青色を呈することが知られている。さらに、これらの PDA は熱<sup>2, 4, 11-14)</sup>、pH<sup>15)</sup>、圧力<sup>1, 16)</sup>などの外部刺激によりコンホメーション変化を生じる結果、500 から 550 nm 付近の短波長側における吸光度が増加し、青色から赤色へと色相が変化するという特性を有する。このコンホメーション変化の詳細なメカニズムは解明されていないが、PDA における秩序的な分子の配列が、外部刺激によって平面構造から非平面構造へと変化する (Figure 2) ために生じると考えられている<sup>9, 17)</sup>。実際に、色相が赤色へと変化した PDA では側鎖の配列が変化していることが報告されている<sup>15, 18)</sup>。

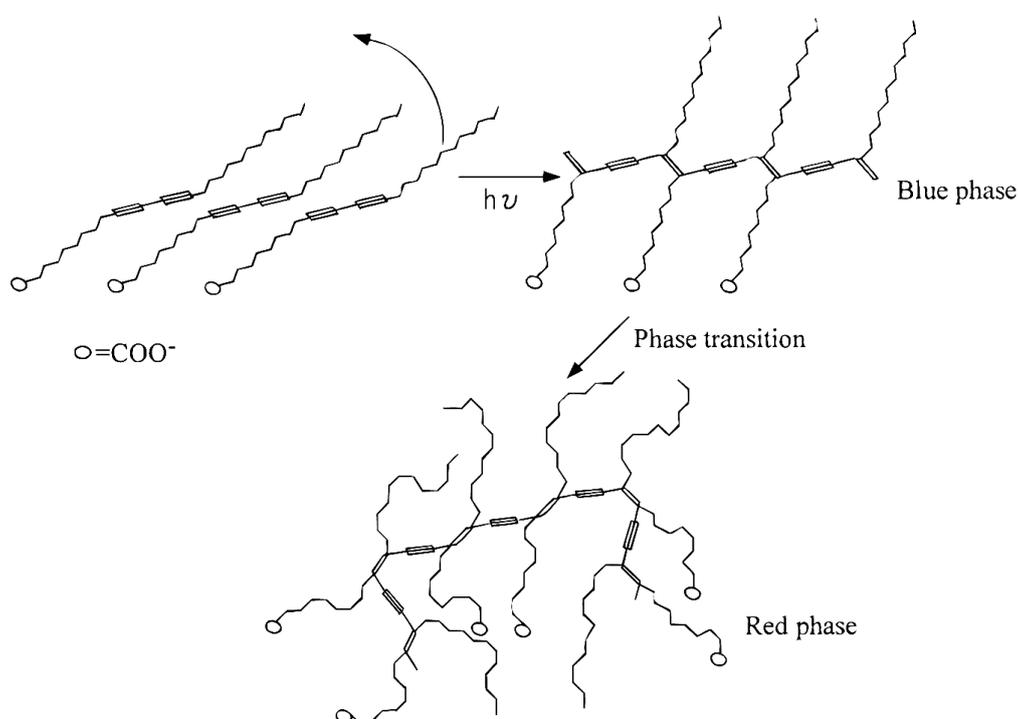


Figure 2. Schematic representations of the photopolymerization of diacetylene monomers and the conversion from the blue phase to the red phase.

Reprinted with permission from *Langmuir*, **12**, 3938–3944 (1996). Copyright (1996) American Chemical Society.

色相の変化という PDA の特性を利用した初めてのバイオセンシングシステムとして、Charych らはインフルエンザウイルスの検出のための、シアル酸を修飾したジアセチレン脂質から構成さ

れる PDA の Langmuir–Blodgett (LB) 膜を構築した<sup>19)</sup>。インフルエンザウイルスと LB 膜表面のシアル酸との相互作用が生じると PDA のコンホメーション変化が引き起こされ、その結果 PDA 膜の色相が青色から赤色へと変化するという検出メカニズムである。その後、シアル酸を修飾したジアセチレン脂質から構成された PDALS を用いて、インフルエンザウイルスの比色分析を行った結果についても報告されている<sup>20)</sup>。PDA の色相の変化という特性を利用した比色分析法は操作が簡便で、色相の変化が数十秒から数分間で生じるため迅速であり、なおかつ視覚的にも結果を容易に確認できるという利点がある。このため、PDA の LB 膜や PDALS はコレラ毒素<sup>21)</sup>、ストレプトリジン O<sup>22)</sup>、核酸<sup>23, 24)</sup>、抗原<sup>25)</sup>や酵素<sup>26–28)</sup>などの高分子の物質<sup>29–33)</sup>から、有機リン系神経ガス<sup>34)</sup>、抗生物質<sup>35)</sup>やシクロデキストリン<sup>36, 37)</sup>などの低分子の物質<sup>38–42)</sup>まで、幅広いターゲット分子の分析法における素子として研究されてきた。

しかし、これらの研究で用いられてきた PDA の色相の変化を利用した分析法は、分析対象物の高感度な分析に用いるには感度が低いという問題点がある。例えば、種々の薬物を分析対象物とした PDALS を用いた比色分析の研究において、向精神薬ノルトリプチリンおよび抗不整脈薬リドカイン (LCN) は、それぞれ約 1  $\mu\text{M}$ 、および 100  $\mu\text{M}$  以下の濃度では、PDALS の色相に変化が生じなかったことが報告されている<sup>40)</sup>。なお、ノルトリプチリンの至適血中濃度は 50–150  $\text{ng/mL}$ <sup>43)</sup> (167–500  $\text{nM}$ )、また LCN の有効血中濃度は 2–5  $\mu\text{g/mL}$ <sup>44)</sup> (8.5–21.3  $\mu\text{M}$ ) であるため、PDALS を用いた比色分析法では、臨床現場において要求される定量範囲を満たさないことが明らかである。

そこで本研究では、高感度で簡便かつ迅速な分析法を確立するための基盤の構築として、PDA の特性であるコンホメーション変化を活用した新規な物質検出メカニズムに基づく signal generator を開発することを目的とした。すなわち、高感度分析における signal generator として、PDALS と発光タンパク質であるイクオリン<sup>45, 46)</sup> (AQ) による生物発光を組み合わせた、ポリジアセチレンリポソーム型イクオリン発光デバイス (PLABD) を考案した。

第 1 章では、PDALS 膜におけるコンホメーション変化を活用した新規な物質検出メカニズムを提唱し、その仮説に基づいた signal generator である PLABD の構築を行い、提唱した PLABD の物質検出メカニズムの妥当性について検討を行った。まず、提唱した signal generator として適切な PLABD の構築、およびその基本的な物理的パラメータを得るために、逆相蒸発法<sup>47)</sup>を用いてジアセチレンリポソーム (DALS) を調製し、DALS から PLABD を調製するための最適な UV 照射時間の検討を行った結果と、DALS および PLABD の粒子径と電位をそれぞれ測定した結果について述べた。次に、重合による AQ の発光制御について仮説を立て、DALS と PLABD にそれぞれ  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを添加した際の AQ の発光測定を行い、両者における AQ の発光強度の違いを検証した結果について述べた。最後に、LCN を分析対象物として、 $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下の PLABD に LCN または超純水を添加した際の AQ の発光測定を行い、PLABD の LCN に対する応答を検討した結果について述べた。

第2章では、高感度分析における PLABD の signal generator としての有用性の検討、および分析対象物が PLABD 膜におけるコンホメーション変化を引き起こす要因について仮説を立て検証を行った。すなわち、3種のモデル薬物である LCN および構造の類似したプロカイン (PCN)、プロカインアミド (PCA) を分析対象物として、従来の比色分析法における PDALS と、PLABD の各薬物に対する応答について検討し、最も広い濃度範囲で変化の見られた LCN について、PDALS と PLABD の感度を比較した結果について述べた。3種のモデル薬物の構造式を Figure 3 に示す。さらに、異なる pH 条件での PLABD の LCN に対する応答性および感度を比較し、PLABD 膜におけるコンホメーション変化を引き起こす、PLABD と分析対象物との相互作用に関する仮説を立て、検証を行った結果について述べた。

以下、各章に分けて詳述する。

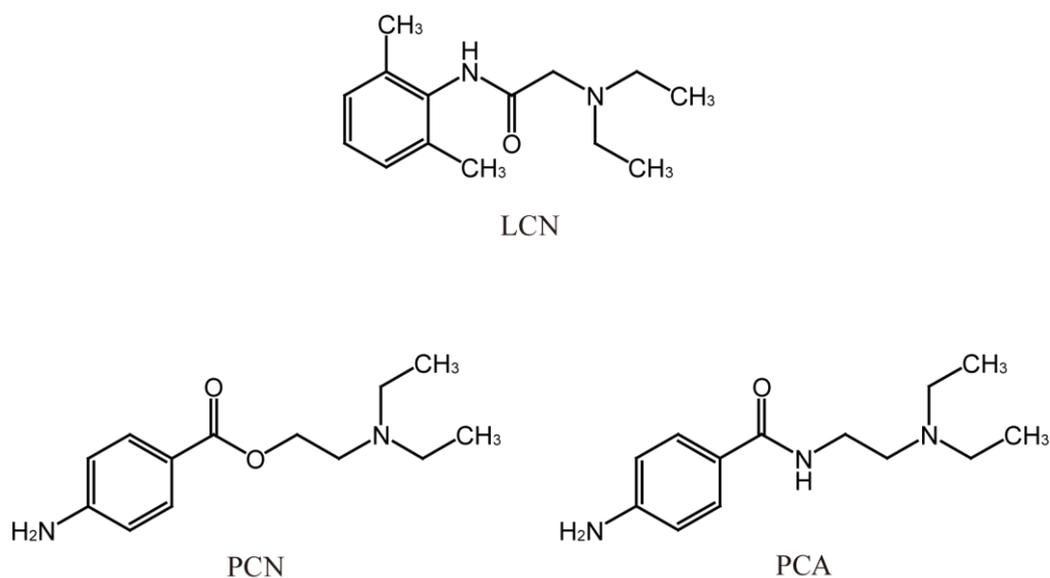


Figure 3. Chemical structure of model analytes, such as LCN, PCN, and PCA, used in this study.

# 第1章 PLABD の構築および物質検出メカニズムの妥当性に関する検討

## 1. 緒言

化学発光または生物発光に基づく検出法は、高感度で、ダイナミックレンジが広く、反応に対する応答が速いなどの特徴を有する。特に生物発光は化学発光と比較して発光量子収率が高いため、発光効率が低い。本研究で発光物質として用いた AQ は、1962 年にオワンクラゲ *Aequorea aequorea* より発見・抽出された、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンと特異的に結合し瞬間発光 ( $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$ ) するタンパク質である<sup>45, 46</sup>。AQ は発光基質であるセレンテラジンと、タンパク質部分であるアポタンパク質および分子状酸素が複合体を形成した状態で存在している<sup>48-50</sup>。AQ への  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの結合によってアポタンパク質がオキシゲナーゼとして活性化され、セレンテラジンの酸化を触媒して青色光が生み出される。 $\text{Ca}^{2+}$  イオンに対する感受性の高さから、AQ は微量  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの検出、定量や細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの動的変化のイメージプローブとして用いられてきた。さらに、他のホタルルシフェリンやウミホタルルシフェリンなどの発光タンパク質と異なり、AQ の発光はルシフェラーゼや ATP を必要とせず、その発光メカニズムは微量の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンとの結合のみであるので、極めて単純である。一方、AQ の発光を計測する発光測定器は、光源および分光器を必要とせず測定器自身がコンパクトで安価であるため、臨床現場において導入しやすい。これらの利点から、本研究における PLABD の発光物質として AQ を用いることとした。

著者が提唱した、PLABD の物質検出メカニズムの仮説を以下に詳述する (Figure 4)。

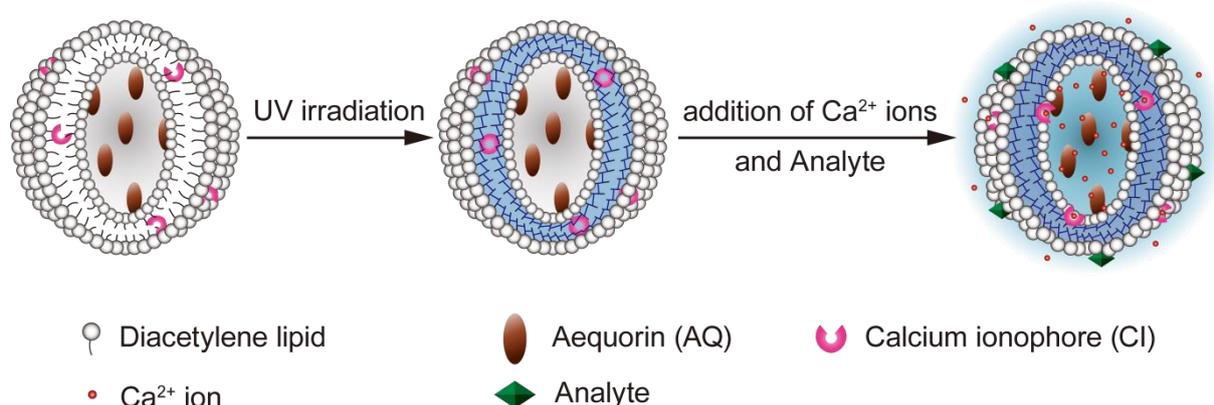


Figure 4. Detection mechanism of PLABD for analytes.

This figure was cited from Figure 1 in *Anal. Chem.*, **88**, 5704–5709 (2016).

まず、AQ を内水相に、また  $\text{Ca}^{2+}$  イオンのキャリアーとしてカルシウムイオノフォア (CI) をジアセチレン脂質膜中にそれぞれ封入した DALS を、逆相蒸発法<sup>47)</sup>を用いて調製する。この DALS に 254 nm 付近の UV を照射し、ジアセチレン脂質同士が重合した PLABD を得る。PLABD では隣接するジアセチレン脂質が重合しているため PLABD 膜中に存在する CI の運動が抑制されており、この PLABD 懸濁液に  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを加えても、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンの内水相への拡散が妨げられているため、PLABD 内水相に存在する AQ の発光は観測されない。次いで、 $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下の PLABD 懸濁液に分析対象物を添加すると、PLABD と分析対象物との相互作用により、PLABD 膜におけるコンホメーション変化が生じる。その結果、PLABD 膜中の CI の運動が回復し、外水相に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが CI を介して PLABD 内水相へと濃度勾配に従って拡散し、PLABD 内水相の AQ と結合して発光が観測される。したがって、PLABD を用いた分析法はこの時に生じる AQ の発光強度より、分析対象物の定量を行う方法である。

本章では、上述した仮説を実証するため、signal generator である PLABD の構築、および PLABD の物質検出メカニズムの妥当性について検討を行った。まず、ジアセチレン構造を有する脂質として、PDALS を用いた比色分析法の研究において多く使用されている 10,12-pentacosadiynoic acid (PCDA) を用いて逆相蒸発法<sup>47)</sup>により DALS を調製し、DALS から PLABD を調製するための適切な UV 照射時間について検討を行った。PCDA の構造式を Figure 5 に示す。次に、DALS と PLABD の基礎的な物理的パラメータを得るために粒子径、粒度分布、および電位をそれぞれ測定した。さらに、重合による CI の運動の抑制、すなわち PLABD における AQ の発光制御について立てた仮説を検証するため、DALS と PLABD にそれぞれ  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを添加した際の発光測定を行った。最後に、疎水性アミン化合物である LCN を分析対象物として、PLABD の LCN に対する応答について検討を行った。

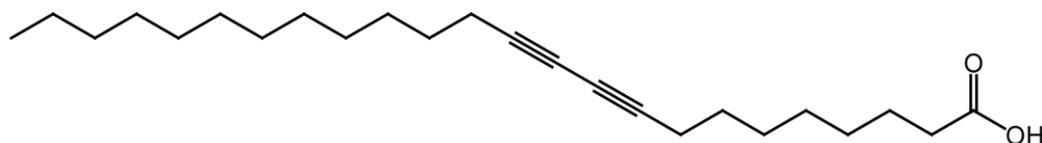


Figure 5. Chemical structure of diacetylene monomer, PCDA, used in this study.

## 2. 実験材料および実験方法

### 2.1 実験材料

#### 2.1.1 試薬

PCDA は東京化成社製、CI は Sigma-Aldrich 社製の calcimycin、AQ 水溶液は JNC 社製を使用した。LCN は和光純薬工業株式会社製のリドカイン塩酸塩一水和物を使用した。

その他の試薬は全て特級を用いた。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 DALS の調製

DALS の調製にあたり、従来の比色分析法における素子として研究されてきた多くの PDALS と同じく、DALS 懸濁液の総脂質濃度、すなわち PCDA の終濃度は 1 mM とした。また、calcimycin は細胞膜の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの透過性に関する研究において 1–10  $\mu\text{M}$  程度の終濃度で用いられており<sup>51–53)</sup>、本研究においては PCDA の重合を妨げず、かつ  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを十分に透過させる濃度として、PCDA の 1/600 となる 1.67  $\mu\text{M}$  とした。AQ は DALS の調製における有機溶媒との混合や超音波処理によって失活・変性しても、十分な発光を示すように 40  $\mu\text{g}$  添加することとした。

50 mL ナス型フラスコ中で 4.5 mg の PCDA および 5 mM calcimycin–ジメチルスルホキシド溶液 4.0  $\mu\text{L}$  を適量のクロロホルム溶液に溶解した後、窒素気流下で有機溶媒を除去し脂質の薄膜を得た。脂質の薄膜をジエチルエーテル溶液 6.0 mL に溶解した後、5%スクロース–10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) 1.8 mL を添加し、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の AQ 水溶液 200  $\mu\text{L}$  を下層の水相に加えた。混合溶液を超音波洗浄器 (SONOREX DIGITEC DT-255H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Germany) 中で 30 秒間混和した後、ロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒を減圧留去した。再度、5%スクロース–10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) 10 mL を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した後に 2 分間洗浄器中で混和することで懸濁液とした。懸濁液を再度ロータリーエバポレーターで 30 分間以上減圧し、懸濁液中に残存する有機溶媒を完全に除去することにより、DALS 懸濁液を調製した。

#### 2.2.2 PLABD の調製

石英セルに DALS 懸濁液を加え、マグネチックスターラーで攪拌しながら UV 照射を 5、10、または 15 分間行い、PLABD 懸濁液を調製した。照射光の波長は 254 nm 付近、出力は 0.43  $\text{mW}/\text{cm}^2$  であった。

#### 2.2.3 粒子径および粒度分布の測定

DALS および PLABD の粒子径および粒度分布はサブミクロン粒子径アナライザー (Nicomp 380, Particle Sizing Systems, USA) を用いて、動的光散乱法により求めた。一定量の DALS 懸濁液または PLABD 懸濁液を 5%スクロース–10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) でそれぞれ 2 倍に希釈し、その希釈液の一部を Disposable Culture Tube (Kimble Glass 社) に移して、5 mW He–

Ne レーザーの 632.8 nm における散乱強度から粒子径を計算した。測定条件は 23°C の水での物性値を採用し、散乱光角度：90°、粘度：0.933 cpoise、屈折率：1.333、測定時間：10 分間とした。

#### 2.2.4 ζ 電位の測定

DALS および PLABD の ζ 電位はゼータ電位測定装置 (ZEECOM ZC-3000, マイクロテック・ニチオン社製) を用いて、電気泳動法により求めた。一定量の DALS 懸濁液または PLABD 懸濁液を 5% スクロース-10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) でそれぞれ 1000 倍に希釈し、その希釈液の一部を水系標準測定セル (マイクロテック・ニチオン社製) に移し、405 nm のレーザー光を照射して ζ 電位を測定した。

#### 2.2.5 DALS および PLABD における発光測定

DALS および PLABD の AQ の発光測定は、ルミノメーター (Lumat LB9507, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Germany) を用いて行った。測定用チューブに DALS 懸濁液、または UV 照射を 10 分間行った PLABD 懸濁液を 150 μL 加え、次いで 5% スクロース-10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) 150 μL を加え、混合後に測定部に設置した。インジェクション部から 20 μM 塩化カルシウム水溶液を 100 μL 添加すると同時に 15 秒間の発光測定を行った。

#### 2.2.6 LCN 添加時における発光測定

Ca<sup>2+</sup>イオン存在下の PLABD 懸濁液に LCN 水溶液を添加した時の AQ の発光測定は、ルミノメーター (Lumat LB9507, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Germany) を用いて以下のように行った。測定用チューブに PLABD 懸濁液を 150 μL 加え、次いで 5% スクロース-10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) 120 μL と 200 μM 塩化カルシウム水溶液 30 μL を添加し、混合後に測定部に設置した。塩化カルシウム水溶液を添加してから 1 分後に、インジェクション部から 1 M、100 mM、10 mM の LCN 水溶液 100 μL を添加すると同時に 15 秒間の発光測定を行った。

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 PLABD 調製のための UV 照射時間

PDA は、分子中にジアセチレン構造を有するモノマーの自己集合体に 254 nm 付近の UV 照射を行い、隣接するモノマー同士のジアセチレン部位が重合して得られる  $\pi$  共役系高分子である。ジアセチレンモノマーの構造、ジアセチレンモノマー集合体の形状、pH や溶媒などの環境の違いによって PDA を形成するための UV 照射時間は異なる。これまでに報告されている PDALS に関する研究において、ジアセチレンモノマーで構成されるリポソームから PDALS を調製するために要した UV 照射時間は、多くの場合数十秒間から数十分間である<sup>21-40</sup>。このため本研究においても、DALS から PLABD を調製するにあたり、適切な UV 照射時間について検討を行った。DALS 懸濁液に UV 照射を 5 分、10 分、15 分行った時の PLABD 懸濁液をそれぞれマイクロウェルプレート上のウェルに加え、色相を視覚的に確認した (Figure 6)。

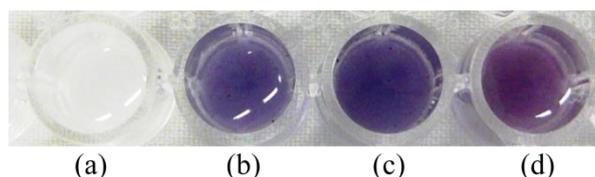


Figure 6. Color changes of (a) DALS and (b) PLABDs with different irradiation periods of (b) 5, (c) 10, and (d) 15 min.

This figure was cited from Figure 3 in *Anal. Chem.*, **88**, 5704–5709 (2016).

DALS 懸濁液は、DALS を構成する PCDA がモノマーの状態であるので、可視領域における吸収はほとんど見られず白色であった (Figure 6a) が、UV を 5 分間または 10 分間照射して調製した PLABD 懸濁液はそれぞれ青色と濃青色を呈した (Figure 6b, c)。このことから、UV 照射により隣接する PCDA 分子のジアセチレン部位同士が重合し、共役エンイン構造を形成した、すなわち PLABD が構築されたことが示された。さらに、UV 照射時間が 5 分間の PLABD 懸濁液より 10 分間の PLABD 懸濁液の色相の方がより青色が濃いことから、より重合が進んでいることが示唆された。一方、UV を 15 分間照射して得られた PLABD 懸濁液は紫色を呈した (Figure 6d)。これは、PLABD 膜におけるコンホメーション変化が生じた結果、短波長側の吸光度が増加したためであると推測された。UV の照射を続けることによって、PDALS 懸濁液の色相が青色から赤色へ変化する例はいくつか報告されている<sup>20, 21, 54, 55</sup>が、詳細なメカニズムについては明らかになって

いない。PLABD を物質検出のための signal generator として用いる本分析法は、PLABD と分析対象物との相互作用によって生じる PLABD 膜における微細なコンホメーション変化を利用するものである。そのため、分析対象物の添加前に視覚的に確認できる程度のコンホメーション変化が生じた PLABD は本分析法に適さないと考えた。以上の結果より、以後の実験においては濃青色を示した、UV を 10 分間照射して調製した PLABD を用いることとした。

### 3.2 DALIS および PLABD の粒子径と粒度分布

DALIS および PLABD の粒子径を Table 1 に示す。

Table 1. The particle size and size distribution of DALIS and PLABD

	Particle size $\pm$ Size distribution ( $\mu\text{m}$ )	
	peak 1	peak 2
DALIS	$0.71 \pm 0.10$	$12.90 \pm 1.86$
PLABD	$0.66 \pm 0.10$	$12.73 \pm 2.71$

The values represent the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

This table was cited from Table 1 in *Anal. Chem.*, **88**, 5704–5709 (2016).

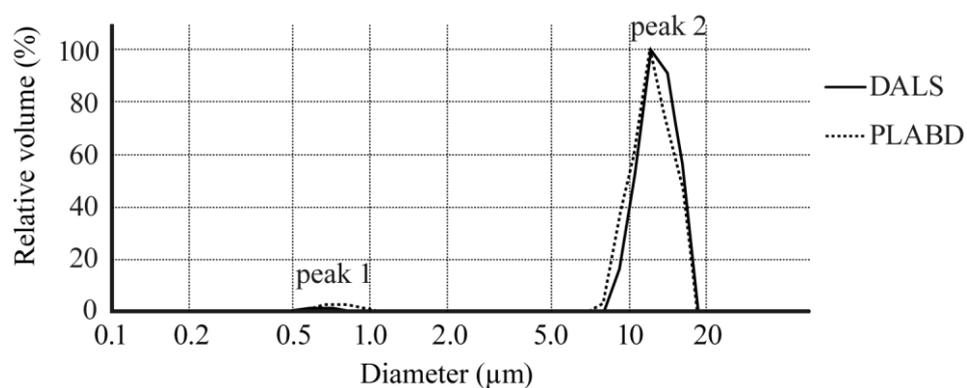


Figure 7. Particle size distributions of DALIS and PLABD determined by the DLS method. Both DALIS and PLABD showed bimodal distributions with volume-weighted distribution ratios of 2:98.

This figure was cited from Figure S–1 in *Anal. Chem.*, **88**, 5704–5709 (2016).

DALS および PLABD の両方において、粒子径約 0.7  $\mu\text{m}$  および約 12.8  $\mu\text{m}$  の異なる 2 種の粒子が存在することが確認された。UV 照射後の PLABD は DALS と比較して明確な粒子径および粒度分布の変化は見られなかった。このことから、UV 照射による重合は粒子径および粒度分布に影響を与えないことが示された。また、DALS および PLABD の粒子径、DALS の調製時の超音波の出力、さらに DALS 懸濁液が白濁していることが視覚的に確認できたことから、DALS および PLABD は多重膜リポソーム (MLV) であると考えられる。

粒度分布を調べたところ、粒子径約 0.7  $\mu\text{m}$  の粒子と約 12.8  $\mu\text{m}$  の粒子の体積比は 2 : 98 であった (Figure 7)。PDALS を用いた従来の比色分析法の多くが PDALS 膜表面での分析対象物との相互作用を利用しているのと同様に、PLABD を用いた物質検出メカニズムにおいても、分析対象物との相互作用は MLV である PLABD の最外層の膜の表面で生じると考えられる。さらに、PLABD の物質検出メカニズムにおける AQ の発光には、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンのキャリアーである、PLABD 膜中の CI が大きく影響すると考えられる。このため、分析対象物と相互作用する最外層の膜の表面積と AQ の発光に相関があると仮定し、粒子径の異なる 2 種の粒子の最外層の膜の総表面積比を算出し、それぞれの粒子の AQ の発光への寄与について理論的な検証を行った。

Figure 7 に示す peak 1 の粒子の半径、総体積および粒子数をそれぞれ  $r_1$ 、 $V_1^{\text{total}}$  および  $n_1$  とし、peak 2 の粒子の半径、総体積および粒子数をそれぞれ  $r_2$ 、 $V_2^{\text{total}}$  および  $n_2$  とすると、それぞれの粒子の総体積比は (1) 式で表される。

$$V_1^{\text{total}} : V_2^{\text{total}} = \frac{4}{3}\pi r_1^3 \cdot n_1 : \frac{4}{3}\pi r_2^3 \cdot n_2 \quad (1)$$

(1) 式から、2 種の粒子の粒子数比は (2) 式として表される。

$$\begin{aligned} \frac{V_1^{\text{total}}}{V_2^{\text{total}}} &= \frac{r_1^3 \cdot n_1}{r_2^3 \cdot n_2} \\ \frac{n_1}{n_2} &= \frac{V_1^{\text{total}} \cdot r_2^3}{V_2^{\text{total}} \cdot r_1^3} \end{aligned} \quad (2)$$

一方、peak 1 の粒子の最外層の膜の総表面積を  $S_1^{\text{total}}$ 、peak 2 の粒子の最外層の膜の総表面積を  $S_2^{\text{total}}$  とすると、それぞれの粒子の総表面積比は (3) 式で表される。

$$\begin{aligned} S_1^{\text{total}} : S_2^{\text{total}} &= 4\pi r_1^2 \cdot n_1 : 4\pi r_2^2 \cdot n_2 \\ \frac{S_1^{\text{total}}}{S_2^{\text{total}}} &= \frac{r_1^2 \cdot n_1}{r_2^2 \cdot n_2} \end{aligned} \quad (3)$$

(2)(3) 式から、次の (4) 式を得ることができる。

$$\frac{S_1^{\text{total}}}{S_2^{\text{total}}} = \frac{r_1^2 \cdot V_1^{\text{total}} \cdot r_2^3}{r_2^2 \cdot V_2^{\text{total}} \cdot r_1^3} = \frac{r_2 \cdot V_1^{\text{total}}}{r_1 \cdot V_2^{\text{total}}} \quad (4)$$

Table 1 より、DALIS の peak 1 の粒子径は 0.71  $\mu\text{m}$ 、peak 2 の粒子径は 12.90  $\mu\text{m}$ 、また PLABD の peak 1 の粒子径は 0.66  $\mu\text{m}$ 、peak 2 の粒子径は 12.73  $\mu\text{m}$  であることから、DALIS では  $r_1=0.36 \mu\text{m}$ 、 $r_2=6.45 \mu\text{m}$ 、PLABD では  $r_1=0.330 \mu\text{m}$ 、 $r_2=6.365 \mu\text{m}$  である。これらの数値および  $V_1^{\text{total}}=2$ 、 $V_2^{\text{total}}=98$  を (4) 式に代入することにより、DALIS および PLABD の粒子径の異なる 2 種の粒子の最外層の膜の総表面積比を算出した。その結果、DALIS と PLABD でそれぞれ  $S_1 : S_2=27 : 73$  と  $S_1 : S_2=28 : 72$  となった。以上より、PLABD の最外層の膜の表面積と AQ の発光に相関があると仮定すると、PLABD における AQ の発光に対して、粒子径約 0.7  $\mu\text{m}$  の粒子は約 3 割、粒子径約 12.8  $\mu\text{m}$  の粒子は約 7 割の寄与をしていることが示された。

### 3.3 DALIS および PLABD の $\zeta$ 電位

DALIS および PLABD の $\zeta$  電位を Table 2 に示す。

Table 2. The  $\zeta$  potential values of DALIS and PLABD

	$\zeta$ potential (mV)
DALIS	$-27.6 \pm 8.2$
PLABD	$-23.3 \pm 6.7$

The values represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

This table was cited from Table 1 in *Anal. Chem.*, **88**, 5704–5709 (2016).

DALIS の $\zeta$  電位は $-27.6 \pm 8.2$  mV、PLABD の $\zeta$  電位は $-23.3 \pm 6.7$  mV であった。これは Figure 5 に示すように、DALIS および PLABD を構成する脂質である PCDA の親水基末端であるカルボキシ基の負電荷により、膜表面が負に帯電しているためと推測された。また、UV 照射後の PLABD は DALIS と比較して明確な $\zeta$  電位の変化は見られなかった。このことから、UV 照射による重合は $\zeta$  電位に影響を与えないことが示された。

### 3.4 AQの発光制御

逆相蒸発法により調製されたリポソームは、膜水和法や超音波処理法などの他のリポソーム調製方法と比較して目的物の保持効率が低い<sup>47)</sup>ものの、内水相に封入されなかった目的物は外水相に存在する。本研究で調製した DALS および PLABD においても、AQ は内水相のみならず外水相にも存在すると考えられる。外水相に存在する AQ は、PLABD を用いた物質検出メカニズムには不要であるため、本来であればゲルろ過クロマトグラフィーや透析を用いて、PLABD の外水相に存在する AQ を取り除く必要がある。しかし、本研究においては AQ の失活・変性を防ぐためにこれらのタンパクを除去するための操作を行っておらず、DALS と PLABD のいずれも、内水相と外水相の両方に AQ が存在する。DALS では、膜を構成する脂質である PCDA が重合していないため膜中の CI はその運動が抑制されておらず、DALS に外部から  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを添加した場合、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンは濃度勾配に従い、CI を介して DALS の外水相から内水相へと拡散する。その結果、DALS では内水相と外水相に存在する全ての AQ が発光すると考えられる (Figure 8a)。一方、PLABD においては、隣接する PCDA 同士が重合しているため CI の運動が抑制され、外部から添加した  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの、CI を介した内水相への拡散が妨げられる。したがって PLABD では外水相に存在する AQ のみが  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと反応して発光すると考えられる (Figure 8b)。

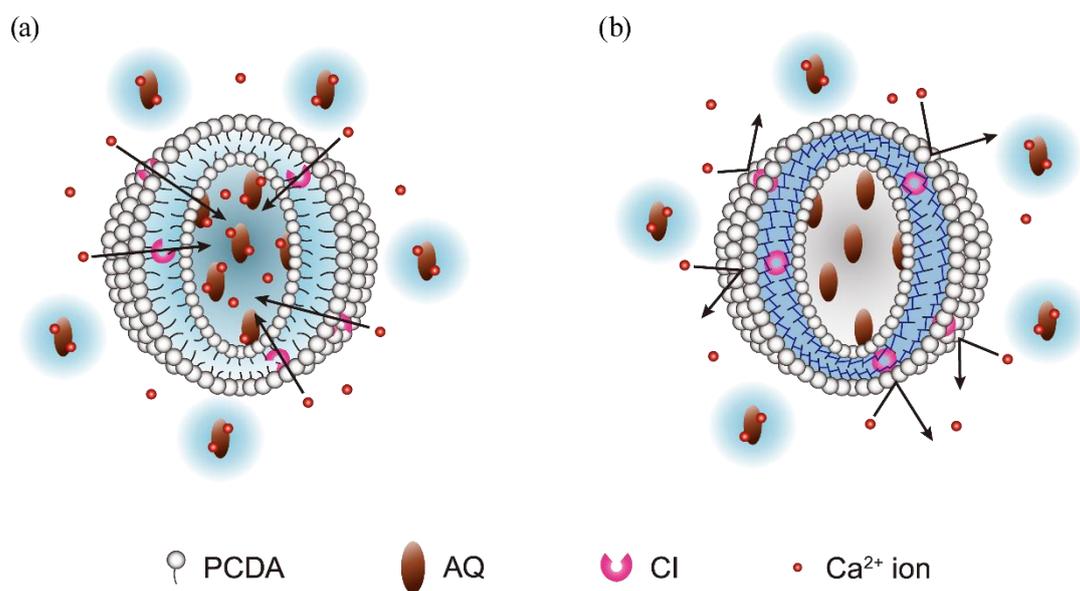


Figure 8. Bioluminescence of AQ in (a) DALS and (b) PLABD after the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  ions.

この CI の運動性の仮説について検証するため、一定量の DALS 懸濁液と PLABD 懸濁液にそれぞれ塩化カルシウム水溶液を添加した際の AQ の発光測定を行った。得られた AQ のカイネティックカーブを Figure 9 に示す。

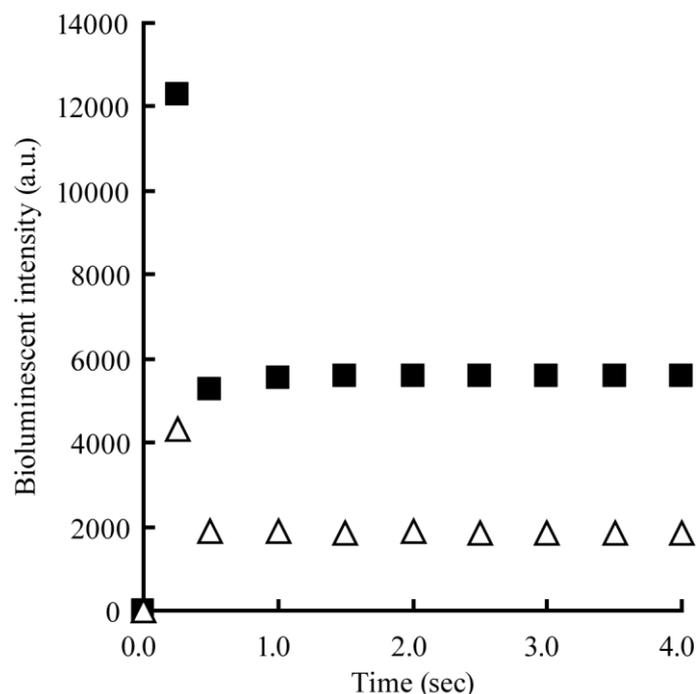


Figure 9. Changes in the bioluminescent signal of AQ with time for (■) DALS and (△) PLABD suspensions after the addition of 20  $\mu\text{M}$  aqueous solution of  $\text{CaCl}_2$ .

This figure was cited from Figure 5 in *Anal. Chem.*, **88**, 5704–5709 (2016).

DALS 懸濁液と PLABD 懸濁液のいずれにおいても、塩化カルシウム水溶液の添加直後に AQ の発光が観測され、すぐに消光した。これは AQ が  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと反応した際に見られるカイネティックカーブと同様のものであり、DALS 懸濁液および PLABD 懸濁液中に AQ が存在することが示された。また、AQ の発光強度は、PLABD 懸濁液の方が DALS 懸濁液よりも低値となり、先述した仮説を支持する結果となった。すなわち、この発光強度の違いは、DALS における内外の両水相に存在する AQ の発光と、PLABD における外水相のみに存在する AQ の発光との差であると考えられる。以上より、DALS と PLABD の内水相に AQ が封入されていること、また、PLABD では重合によって膜中の CI の運動が抑制されていることが示された。

一方、DALS 懸濁液と PLABD 懸濁液のいずれにおいても、塩化カルシウム水溶液の添加直後の瞬間発光の後、持続的な発光が観測された。AQ への  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの結合個数は 3 個であり、発光に必要な  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの個数は最低 2 個であることが示唆されている<sup>56,57</sup>。このことから、この持続的な発光について、瞬間的な発光の後に余剰の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが AQ の空いている結合部位に結合することにより、AQ の持続的な発光が生じているという仮説を立てた。この仮説を検証するため、超純水または 1 mM EDTA 水溶液を用いて一定濃度の AQ 水溶液を作製し、それぞれに塩化カルシウム水溶液を添加した際の AQ の発光測定を行った。得られた AQ のカイネティックカーブを Figure 10 に示す。

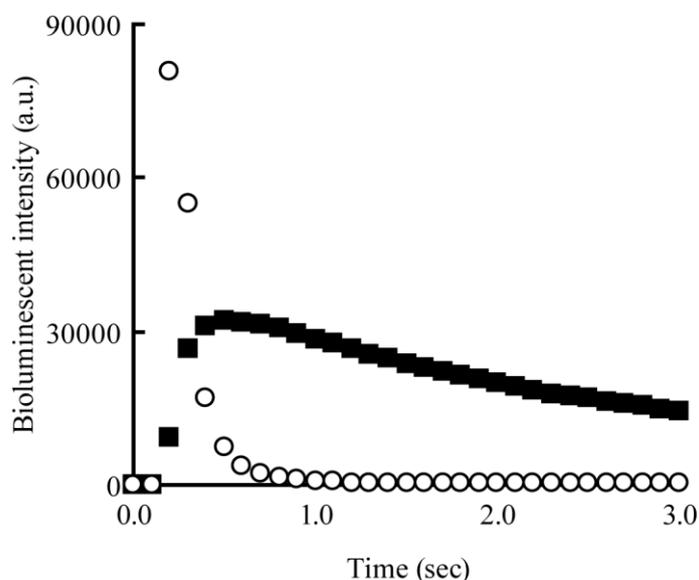


Figure 10. Changes in the bioluminescent signal of AQ with time for (■) AQ diluted with ultrapure water and (○) AQ diluted with 1 mM EDTA aqueous solution after the addition of aqueous solution of  $\text{CaCl}_2$ .

超純水で希釈した AQ 水溶液では発光が緩やかに減衰したのに対し、1 mM EDTA 水溶液で希釈した AQ 水溶液では最初に瞬間発光が生じた後、速やかに消光した。このことから、添加直後に AQ と結合しなかった余剰の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンをキレート剤である EDTA で補足することにより、AQ の持続的な発光を妨げることが可能であることが示された。また、調製から 24 時間後に塩化カルシウム水溶液を添加した際、超純水で希釈した AQ 水溶液ではほとんど発光が見られなかったのに対し、1 mM EDTA 水溶液で希釈した AQ 水溶液では調製直後と比較してほぼ同じ発光強度を示した (data not shown)。以上の結果より、Figure 9 で観測された AQ の持続的な発光は、水溶液中に存在する余剰の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが AQ と結合することにより生じることが示唆された。

### 3.5 PLABD の LCN に対する応答

PLABD の物質検出メカニズムにおける仮説では、 $\text{Ca}^{2+}$ イオン存在下において PLABD と分析対象物との相互作用により、重合によって抑制されていた CI の運動が回復し、外水相に存在する余剰の  $\text{Ca}^{2+}$ イオンが CI を介して内水相へと拡散し、結果 AQ の発光が生じることを想定している。ここでは、その物質検出メカニズムの仮説を実証するために、モデル薬物として LCN を用いて、PLABD の LCN に対する応答について検討を行った。第 1 章 3.4 AQ の発光制御 で述べたように、PLABD は内外の両水相に AQ が存在する。外水相に存在する AQ は PLABD の物質検出に不要であるため、あらかじめ PLABD 懸濁液を塩化カルシウム水溶液と混合することで外水相に存在する AQ の影響を除去した。 $\text{Ca}^{2+}$ イオン存在下で外水相に存在する AQ が消光し終えた PLABD 懸濁液に種々の濃度の LCN 水溶液、または比較として超純水をそれぞれ添加した時の AQ の発光測定を行った。得られた AQ のカイネティックカーブを Figure 11 に示す。

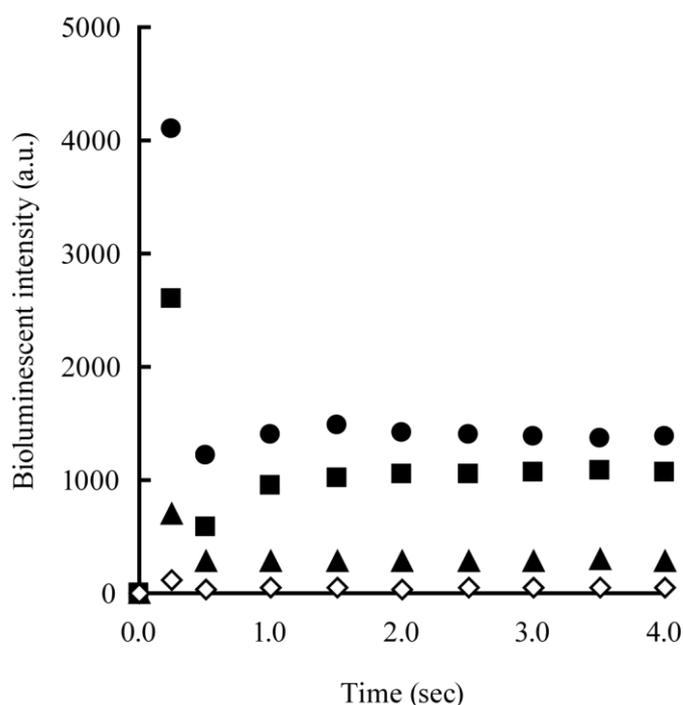


Figure 11. Changes in the bioluminescent signal of AQ in PLABD suspensions at various times after the addition of LCN aqueous solutions of different concentrations: (●) 1 M, (■) 100 mM, and (▲) 10 mM and (◇) ultrapure water.

Ca<sup>2+</sup>イオン存在下の PLABD 懸濁液に 1 M、100 mM、または 10 mM の LCN 水溶液をそれぞれ添加すると AQ の発光が観測され、かつ LCN 濃度の増加に応じて AQ の発光強度が増大する傾向が見られた。一方、超純水を添加した場合には、AQ の発光はほとんど観測されなかった。また、測定後の PLABD 懸濁液の色相は、10 mM の LCN 水溶液を添加した場合は青色から紫色に、100 mM 以上の LCN 水溶液を添加した場合には赤色に変化しており (Figure 12)、PLABD と LCN との相互作用によって、視覚的に確認できる程度のコンホメーション変化が生じていることが認められた。一方、超純水を添加した後の PLABD 懸濁液の色相に変化は見られなかった。これらの AQ の発光強度と色相の変化から、PLABD 膜におけるより大きなコンホメーション変化が生じると、AQ の発光強度がより高値となることが示唆された。

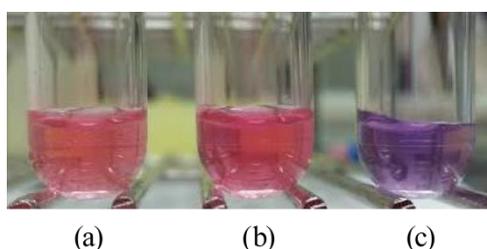


Figure 12. The PLABD suspensions after the addition of (a) 1 M, (b) 100 mM and (c) 10 mM LCN aqueous solutions.

以上のことから、PLABD と LCN の相互作用により、PLABD 膜におけるコンホメーション変化が引き起こされて CI の運動が回復したこと、またその結果として外水相の Ca<sup>2+</sup>イオンが CI を介して PLABD の内水相へと拡散することで内水相の AQ が発光したことが示された。すなわち、PLABD は LCN に対して応答することが明らかになり、本章で提唱した PLABD の物質検出メカニズムの妥当性が実証された。

## 4. 小括

本章では、PDALS 膜におけるコンホメーション変化と AQ による生物発光を活用した新規な物質検出メカニズムに基づく signal generator としての PLABD を提唱し、PLABD の構築、および PLABD の物質検出メカニズムの妥当性について検討を行った。

逆相蒸発法<sup>47)</sup>を用いて調製した DALS に、約 254 nm の UV を照射して調製した PLABD は、その懸濁液が青色を呈したことから、PLABD 膜を構成する PCDA が隣接する分子同士で重合していることが示された。加えて、いずれも内外の両水相に AQ の存在する DALS と PLABD に  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを添加した場合には、AQ の発光強度は PLABD の方が DALS よりも低値となった。このことから、PLABD では重合によって膜中の CI の運動が抑制され、AQ の発光が制御されていることが示された。

さらに、 $\text{Ca}^{2+}$ イオン存在下で外水相に存在する AQ が発光し終えた PLABD に、LCN 水溶液を添加した時は AQ の発光が観測され、一方で超純水を添加した時には AQ の発光はほとんど観測されなかった。この時、LCN 水溶液添加後の PLABD 懸濁液は、LCN 濃度の増加に伴い色相が青色から赤色側へと変化したのに対し、超純水添加後の PLABD 懸濁液では色相の変化が見られなかった。以上の結果から、PLABD と LCN との相互作用によって PLABD 膜におけるコンホメーション変化が生じたこと、その結果 CI の運動が回復し、外水相の  $\text{Ca}^{2+}$ イオンが CI を介して PLABD の内水相へと拡散し、内水相の AQ の発光が生じたことが示された。

以上より、AQ の発光を重合によって制御可能である PLABD が構築できた。また、PLABD が LCN に対してコンホメーション変化および AQ の発光を生じたことから、PLABD の物質検出メカニズムの妥当性が示された。

## 第2章 疎水性アミン化合物に対する PLABD の signal generator としての有用性の検討

### 1. 緒言

第1章において、PDALS 膜におけるコンホメーション変化と AQ による生物発光を活用した、新規な物質検出メカニズムに基づいた signal generator である PLABD を構築した。PLABD では重合によって AQ の発光が制御されていること、また PLABD の LCN に対する応答が見られたことから、PLABD の物質検出メカニズムの妥当性を明らかにした。

PDALS を用いた従来の比色分析法の研究において、高分子の分析対象物と PDALS 膜表面の修飾基との特異的な結合<sup>29, 31)</sup>や、親水性の分析対象物と PDALS 膜との静電的相互作用<sup>58-60)</sup>などによって生じる PDALS 膜におけるコンホメーション変化を利用した例が、これまでに数多く報告されている。一方で、分析対象物の PDALS 膜の疎水性領域への浸透によってコンホメーション変化が生じ得ることも示されている<sup>40, 61)</sup>が、報告例は少ない。また、分析対象物の分子サイズの影響について、低分子の化合物は高分子の化合物と比較して PDALS 膜におけるコンホメーション変化を引き起こしにくい可能性が示唆されている<sup>62)</sup>。実際に、分子量約 150 から 400 の種々の薬物を分析対象物とした、PDALS を用いた比色分析の研究においては、高感度に検出可能である薬物でも数  $\mu\text{M}$  以上の濃度存在下でなければ色相の変化が見られなかった<sup>40)</sup>。TDM の実施されている薬物のうち、LCN では 100  $\mu\text{M}$  以上の濃度存在下で色相の変化を生じ、LCN 濃度と色相の変化との間に相関性が見られた。また、PCA では 1 mM 以上の濃度存在下でも色相の変化を生じず、PCA 濃度と色相の変化との間に相関性は見られなかった。LCN の有効血中濃度は 2-5  $\mu\text{g/mL}$ <sup>44)</sup> (8.5-21.3  $\mu\text{M}$ ) であり、また PCN は血中濃度 9  $\mu\text{g/mL}$ <sup>44)</sup> (38.2  $\mu\text{M}$ ) 以上が中毒域であるため、PDALS を用いた従来の比色分析法では、臨床現場において要求される分析対象物の定量範囲を満たさないことが明らかである。

本章では、PDALS を用いた従来の比色分析法では高感度に検出することが困難であると考えられる、低分子の疎水性化合物を分析対象物として、高感度分析における PLABD の signal generator としての有用性の検討を行った。すなわち、分析対象物として3種類のモデル薬物、LCN および LCN と構造の類似した PCN、PCA を用いて、PLABD の各薬物に対する応答性および感度を、従来の比色分析法における PDALS と比較した。PDALS の各薬物に対する応答性および感度を検討するため、PDALS に各薬物を種々の終濃度となるよう添加した後の色相を視覚的に確認した。最も広い濃度範囲で色相の変化が見られた薬物について添加後の PDALS 懸濁液の吸収スペクトルを測定し、二次微分処理を行って得られた二次微分値と薬物濃度との相関性を求めた。一方、PLABD の各薬物に対する応答性および感度を検討するため、 $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下の PLABD に種々の濃度の各薬物の水溶液を添加した際の AQ の発光測定を行った。得られた発光強度から、後述する bioluminescent intensity ratio (BIR) を算出し、BIR と各薬物濃度との相関性を求めた。さらに、

PLABD の分析対象物に対する応答性の違いについて、疎水性相互作用が影響するという仮説を立て、薬物の分子型存在比率の異なる pH 条件下での先述の PDALS および PLABD の実験を行って結果を比較し、仮説の検証を行った。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 実験材料

#### 2.1.1 試薬

PCDA、CI、AQ 水溶液、および LCN は第 1 章と同じものを使用した。PCN は東京化成株式会社製のプロカイン塩酸塩、PCA は半井化学薬品株式会社製のプロカインアミド塩酸塩を使用した。その他の試薬は全て特級を用いた。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 DALS (pH 11.0) の調製

第 1 章 2.2.1 DALS の調製 と同様に逆相蒸発法<sup>47)</sup>にて DALS (pH 11.0) を調製した。

#### 2.2.2 DALS (pH 9.0) の調製

5%スクロース-10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 9.0) を用いて、第 1 章 2.2.1 DALS の調製 と同様に逆相蒸発法<sup>47)</sup>にて DALS (pH 9.0) 懸濁液を調製した。

#### 2.2.3 PLABD (pH 11.0) および PLABD (pH 9.0) の調製

第 1 章 2.2.2 PLABD の調製 と同様の方法で、DALS (pH 11.0) 懸濁液または DALS (pH 9.0) 懸濁液にそれぞれ UV 照射を 10 分間行い、PLABD (pH 11.0) 懸濁液または PLABD (pH 9.0) 懸濁液を調製した。照射光の波長は 254 nm 付近、出力は 0.43 mW/cm<sup>2</sup>であった。

#### 2.2.4 PDALS (pH 11.0) の調製

第 1 章 2.2.1 DALS の調製 および第 1 章 2.2.2 PLABD の調製 と同様に以下の方法で、PDALS (pH 11.0) 懸濁液を調製した。

50 mL ナス型フラスコ中で 4.5 mg の PCDA を適量のクロロホルム溶液に溶解した後、窒素気流下で有機溶媒を除去し脂質の薄膜を得た。脂質の薄膜をジエチルエーテル溶液 6.0 mL に溶解した後、5%スクロース-10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) 2.0 mL を加えた。混合溶液を超音波洗浄器 (SONOREX DIGITEC DT-255H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Germany) 中で 30 秒間混和した後、ロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒を減圧留去した。再度、5%スクロース-10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) 10 mL を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した後に 2 分間洗浄器中で混和することで懸濁液とした。懸濁液を再度ロータリーエバポレーターで 30 分間以上減圧し、懸濁液中に残像する有機溶媒を完全に除去した。得られた懸濁液を石英セルに加え、マグネチックスターラーで攪拌しながら UV 照射を 10 分間行い、PDALS (pH 11.0) 懸濁液を調製した。照射光の波長は 254 nm 付近、出力は 0.43 mW/cm<sup>2</sup>であった。

#### 2.2.5 PDALS (pH 9.0) の調製

5%スクロース-10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 9.0) を用いて、第 2 章 2.2.4 PDALS (pH

11.0) の調製 と同様の方法で PDALS (pH 9.0) 懸濁液を調製した。

### 2.2.6 PDALS (pH 11.0) 懸濁液および PDALS (pH 9.0) 懸濁液の色相観察

透明の 96 穴マイクロウェルプレート上に PDALS (pH 11.0) 懸濁液または PDALS (pH 9.0) 懸濁液 150  $\mu\text{L}$  を加え、次いでそれぞれのウェルに終濃度が 0 から 25 mM となるように、PDALS (pH 11.0) 懸濁液に LCN、PCN、PCA 水溶液および 5% スクロース–10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) を添加した。PDALS (pH 9.0) 懸濁液には LCN 水溶液および 5% スクロース–10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 9.0) を添加した。それぞれ、添加から 1 分後の各ウェル内の懸濁液の色相を視覚的に確認した。

### 2.2.7 可視吸収スペクトルの測定

2 mL メスフラスコに PCDA 濃度が 0.25 mM となるように PDALS (pH 11.0) 懸濁液を加え、次いで終濃度が 0 から 25 mM となるように LCN 水溶液を添加した。LCN 水溶液の添加から 1 分後に 5% スクロース–10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) を標線まで加え全量 2 mL とし、Sample 側試料とした。5% スクロース–10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) を Reference 側試料とした。

可視吸収スペクトルの測定は、分光光度計 U-3310 (日立ハイテクサイエンス社製) を用いた。測定条件は Slit 幅 : 2.0 nm、Scan Speed : 60 nm/min、波長間隔 : 0.1 nm、波長走査範囲 : 500–700 nm とした。なお、測定セルは光路長 1.0 cm、光路幅 0.5 cm のマイクロブラック石英セルを使用した。

### 2.2.8 二次微分スペクトルの計算

二次微分スペクトルは、得られた吸収スペクトルから、Savitzky—Golay 法<sup>63)</sup>に基づく計算プログラム<sup>64)</sup>を用いて求めた。微分条件は 3 次多項式近似、データ点数を 17 点、微分波長間隔 ( $\Delta\lambda$ ) は 1.0 nm とした<sup>65)</sup>。

### 2.2.9 分析対象物添加時における発光測定

第 1 章 2.2.6 LCN 添加時における発光測定 と同様の方法で、 $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下の PLABD (pH 11.0) 懸濁液または PLABD (pH 9.0) 懸濁液に LCN、PCN、または PCA 水溶液をそれぞれ添加した時の AQ の発光測定を、ルミノメーター (Lumat LB9507, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Germany) を用いて以下のように行った。測定用チューブに PLABD (pH 11.0) 懸濁液または PLABD (pH 9.0) 懸濁液を 150  $\mu\text{L}$  加え、次いで 5% スクロース–10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) または 5% スクロース–10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 9.0) 120  $\mu\text{L}$  と 200  $\mu\text{M}$  塩化カルシウム水溶液を 30  $\mu\text{L}$  添加し、混合後に測定部に設置した。塩化カルシウム水溶液を添加してから 1 分後に、インジェクション部から PLABD (pH 11.0) 懸濁液に種々の濃度の LCN、PCN、または PCA 水溶液 100  $\mu\text{L}$  を添加すると同時に 15 秒間の発光測定を行った。PLABD (pH 9.0) 懸濁液には種々の濃度の LCN 水溶液 100  $\mu\text{L}$  を添加すると同時に 15 秒間の発光測定を行った。

### 2.2.10 BIR の計算

PLABD の AQ の封入量は一定ではなく、PLABD ごとに AQ の発光強度が異なるため、PLABD の AQ の発光強度と薬物濃度との相関性を求めるにあたり、以下の式を用いて AQ の発光強度から PLABD ごとに BIR を算出した。なお、発光強度は全て RLU 値を用いた。

$$\text{BIR} = \frac{\text{bioluminescent intensity at an appropriate analyte concentration}}{\text{mean bioluminescent intensity at analyte concentration of } 100 \mu\text{M}}$$

上記の式より BIR を算出することで、PLABD ごとの AQ の発光強度の標準化を行った。

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1 PDALS の応答性

PDALS を用いた従来の比色分析のメカニズムを Figure 13 に示す。

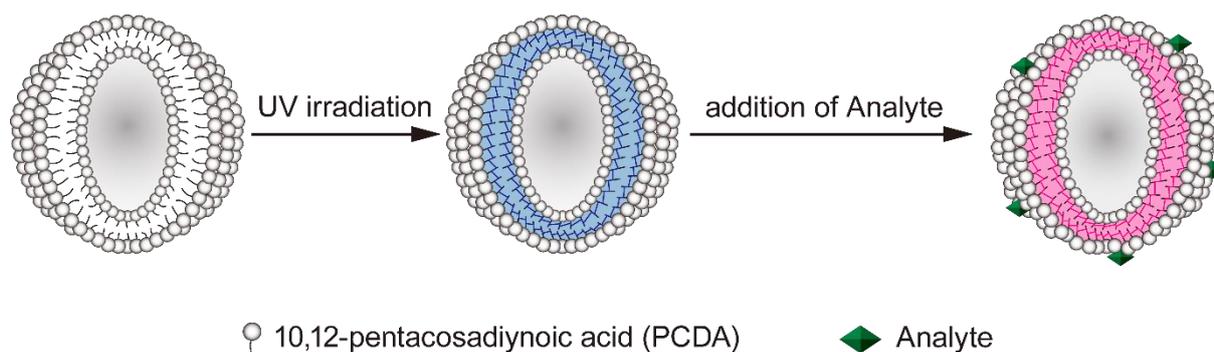


Figure 13. Detection mechanism of PDALS for analytes.

まず、ジアセチレン脂質を用いて調製したリポソームに 254 nm 付近の UV を照射し、ジアセチレン脂質同士が重合した PDALS を得る。PDALS では隣接するジアセチレン脂質が重合しており、その懸濁液は青色を呈する。次いで、青色の PDALS 懸濁液に分析対象物を添加すると、PDALS と分析対象物との相互作用により、PDALS 膜におけるコンホメーション変化が生じる。その結果、PDALS 懸濁液の色相は赤色側へと変化する。この時、PDALS の吸収スペクトルは Figure 14 に示すように、長波長側の吸光度が減少し、短波長側の吸光度が増大する<sup>66)</sup>。PDALS を用いた比色分析法は、この時の吸光度の変化から、分析対象物の定量を行う方法である。

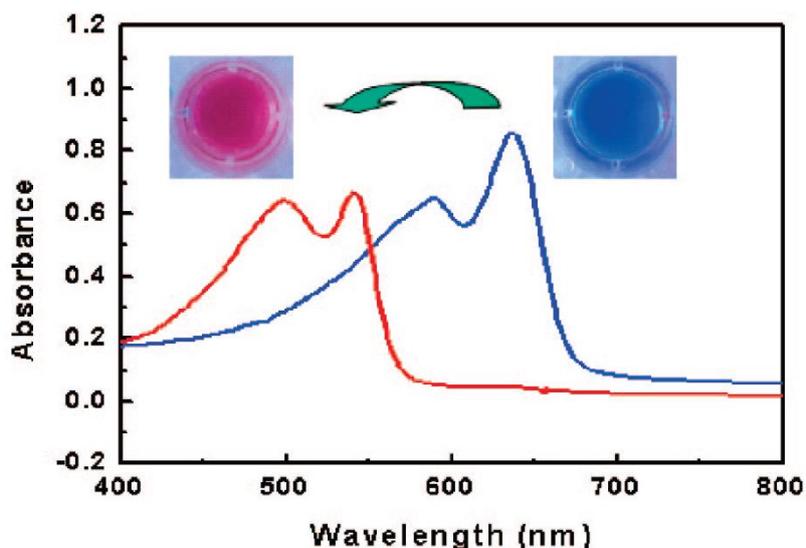


Figure 14. Absorption spectra and color change of a PDA solution that take place in response to analyte.

Reprinted with permission from *Acc. Chem. Res.*, **41**, 805–816 (2008). Copyright (2008) American Chemical Society.

本章で PLABD の signal generator としての有用性を検討するにあたり、比較として、PDALS の LCN、PCN、および PCA に対する応答性および感度を、PDALS 懸濁液の色相の変化から求めた。まず、PDALS の LCN、PCN および PCA に対する応答を視覚的に確認するため、マイクロウェルプレート上加えた一定量の PDALS (pH 11.0) 懸濁液に LCN、PCN、PCA 水溶液、および 5% スクロース-10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 11.0) を、終濃度が 0 から 25 mM となるようにそれぞれ添加した。添加から 1 分後の PDALS (pH 11.0) 懸濁液の色相を Figure 15 に示す。

Figure 15a より、薬物非存在下の PDALS (pH 11.0) 懸濁液の色相は青色であった。一方で LCN 水溶液を添加した場合、いずれの LCN 濃度存在下においても PDALS (pH 11.0) 懸濁液の色相は青色から赤色側への変化が認められ、LCN 濃度の増加に伴い PDALS (pH 11.0) 懸濁液の色相がより赤色側へと変化した。PCN では 2.5–25 mM の濃度存在下で赤色側へと変化した。PCA では 25 mM 存在下でのみ紫色へと変化したことが認められた。種々の薬物を分析対象物とした、PDALS を用いた比色分析の研究<sup>40)</sup>において、数百  $\mu\text{M}$  の LCN 濃度存在下で PDALS の色相の変化が見られたこと、また、PCN および PCA は数 mM の濃度存在下でもほとんど色相の変化が見られなかったことが報告されており、これらは上述の結果と一致する。以上の結果より、PDALS と各薬物との相互作用により PDALS 膜におけるコンホメーション変化が生じること、および PDALS は各薬物に対し応答性が異なることが明らかになった。

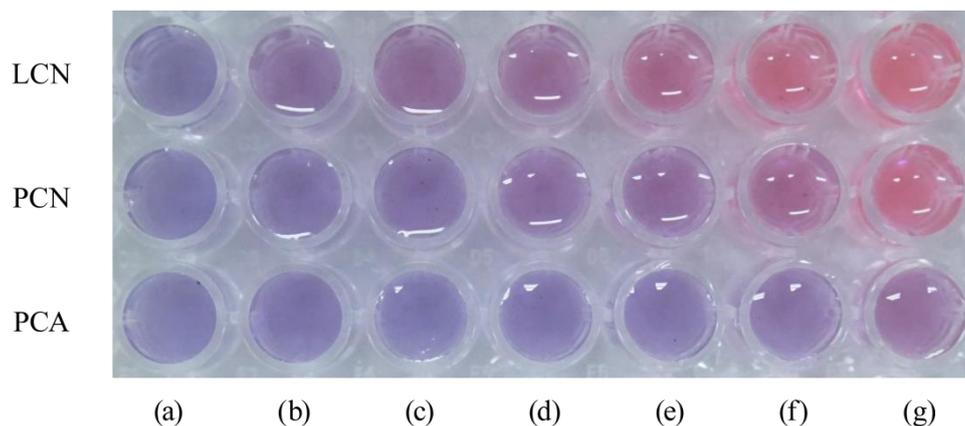


Figure 15. Color changes of PDALS suspensions in the presence of varying LCN, PCN, and PCA concentration: (a) 0, (b) 0.025, (c) 0.25, (d) 2.5, (e) 6.25, (f) 12.5, and (g) 25 mM.

The figure for LCN was cited from Figure 4 (a) in *Anal. Chem.*, **88**, 5704–5709 (2016).

次に、3種のモデル薬物のうち、最も広い濃度範囲で色相の変化が見られた LCN について、より正確な定量範囲を調べるために、種々の濃度の LCN 水溶液を添加した後の PDALS (pH 11.0) 懸濁液の可視吸収スペクトルを測定した結果を Figure 16 に示す。なお、PCN および PCA については、LCN よりも色相の変化が観測された濃度の下限が高かったため、PDALS の PCN および PCA に対する応答性は、LCN に対する応答性よりも低いと判断した。

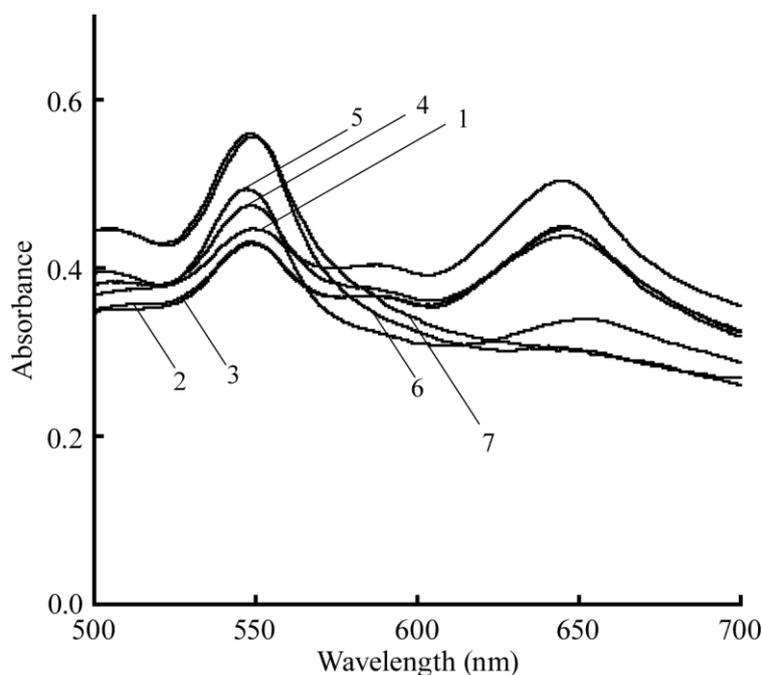


Figure 16. Absorption spectra and of PDALS suspensions in the presence of varying LCN concentrations: (1) 0, (2) 0.025, (3) 0.25, (4) 2.5, (5) 6.25, (6) 12.5, and (7) 25 mM.

This figure was cited from Figure 4 (b) in *Anal. Chem.*, **88**, 5704–5709 (2016).

Figure 16 において、PDALS 懸濁液中に存在する LCN 濃度の増加に伴い 645 nm における吸光度が減少し、550 nm における吸光度が増大する傾向が見られた。これは、PADLS を用いた従来の比色分析法の研究において報告されている、PDALS の吸光度および極大吸収波長の変化と同様の結果である。しかし、LCN 濃度の増加に応じた 550 nm における吸光度の増大が見られず (Figure 16 (1), (2) および (3))、Figure 15 に示した視覚的な色相の変化と一致しなかった。この原因として、PDALS の光散乱に起因する強いバックグラウンドシグナルの影響により、測定ごとのベースラインが一定しないためであると考えられる。したがって、LCN との相互作用による PDALS の色相の変化が LCN 濃度と相関するかどうかは不明である。そこで、バックグラウンドシグナルの影響を除去するため、微分スペクトルを算出することとした<sup>67)</sup>。紫外・可視吸収スペクトルを波長で微分して得られる微分スペクトルは、試料溶液中の不溶成分による濁りや、妨害物質による幅広い吸収などの、バックグラウンドシグナルの影響を消去する特性を有する。Kitamura らは、分光光度計のコンピューターのメモリーから RS-232C インターフェースを介してパソコンに吸収スペクトルを取り込み、Savitzky-Golay 法に基づいて作成した BASIC 言語によるプログラムを用いて二次微分スペクトルを得ている<sup>63-65)</sup>。同様のプログラムを用いて、Figure 16 に示す吸収スペクトルに二次微分処理を行った。

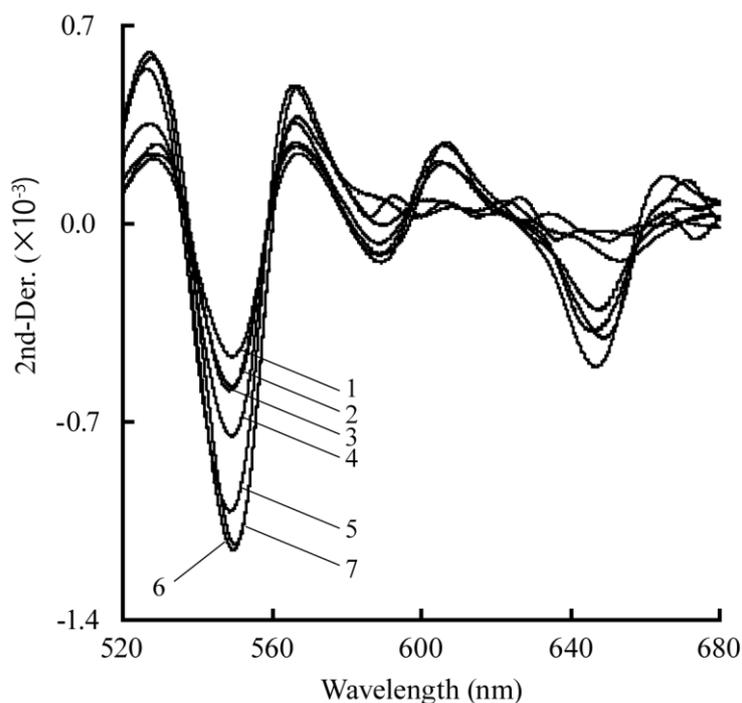


Figure 17. Second-derivative spectra of PDALS suspensions in the presence of varying LCN concentrations: (1) 0, (2) 0.025, (3) 0.25, (4) 2.5, (5) 6.25, (6) 12.5, and (7) 25 mM.

Figure 17は、Figure 16の吸収スペクトルから計算された二次微分スペクトルである。得られた二次微分スペクトルには、538 nm付近と560 nm付近のゼロ点において等微分強度点が確認された。このゼロ点における等微分強度点の存在から、PDALSに起因する強いバックグラウンドシグナルの影響が二次微分処理によって十分に除去され、かつPDALSのみの単成分の吸収スペクトル変化を反映していることが示された。

LCN濃度の変化に伴い大きく吸光度が変化した550 nmで、それぞれの二次微分スペクトルから二次微分値を読み取り、得られた二次微分値の絶対値をLCN濃度に対してプロットした相関図をFigure 18に示す。

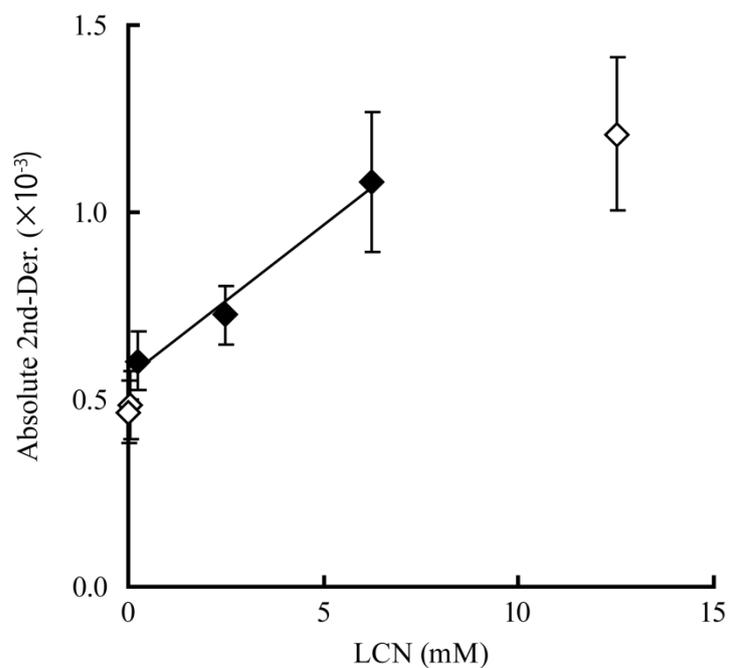


Figure 18. Calibration curve of LCN with PDALS at 550 nm. Error bars indicate the standard deviations of three replicate experiments.

LCN 濃度 0.25–6.25 mM の範囲において、直線で近似した場合の相関係数を、最小二乗法を用いて求めると  $r=0.89$  となった。以上の結果より、PDALS を用いた比色分析法では、LCN は 0.25–6.25 mM の範囲で定量的に検出が可能であること、および、PCN または PCA はそれぞれ 2.5 mM または 25 mM 以上の濃度存在下で検出が可能であることが示された。

### 3.2 PLABD の応答性

第1章 3.5 PLABD の LCN に対する応答 より、PLABD は高濃度の LCN に対して応答することが示された。そこで、PLABD の LCN に対する応答性および感度を求めるため、 $\text{Ca}^{2+}$ イオン存在下の PLABD (pH 11.0) 懸濁液に 1 nM から 10 mM までの種々の濃度の LCN 水溶液をそれぞれ添加した時の AQ の発光測定を行った。得られた AQ のカイネティックカーブを Figure 19 に示す。

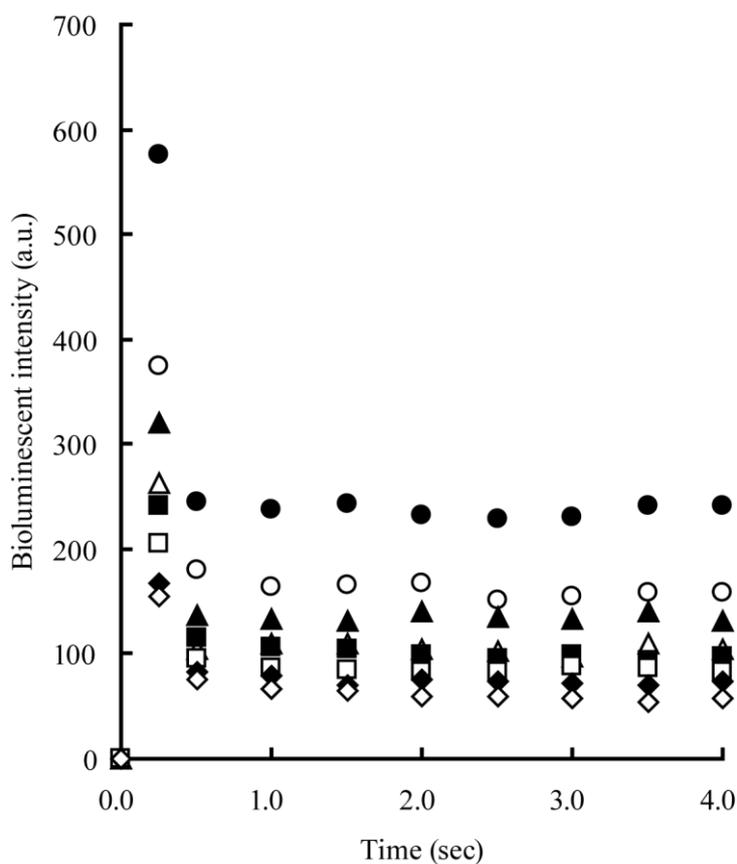


Figure 19. Changes in the bioluminescent signal of AQ in PLABD suspensions at various times after the addition of LCN aqueous solutions of different concentrations: (●) 10 mM, (○) 1 mM, (▲) 100 μM, (△) 10 μM, (■) 1 μM, (□) 100 nM, (◆) 10 nM, and (◇) 1 nM. This figure was cited from Figure 6 in *Anal. Chem.*, **88**, 5704–5709 (2016).

第1章 3.5 PLABDのLCNに対する応答の結果と同様に、LCN水溶液添加直後にAQの発光が観測され、また添加するLCN濃度の増加に応じて、その発光強度が増大した。加えて、100  $\mu\text{M}$ 以下の濃度のLCN水溶液を添加した後のPLABD (pH 11.0) 懸濁液の色相の変化は視覚的に確認されなかった。視覚的に確認できる程度のコンホメーション変化が生じない微量のLCNしか存在しないにも関わらず、PLABDのAQの発光が観測されたことから、PLABDは視覚的に確認できない微細なコンホメーション変化しか生じない低濃度のLCNに鋭敏に応答することが示された。さらに、PCN水溶液またはPCA水溶液を添加した場合にも、LCNと同様にAQの発光が観測され、添加する薬物濃度の増加に応じて、その発光強度が増大した (Figure 20a および Figure 20b)。

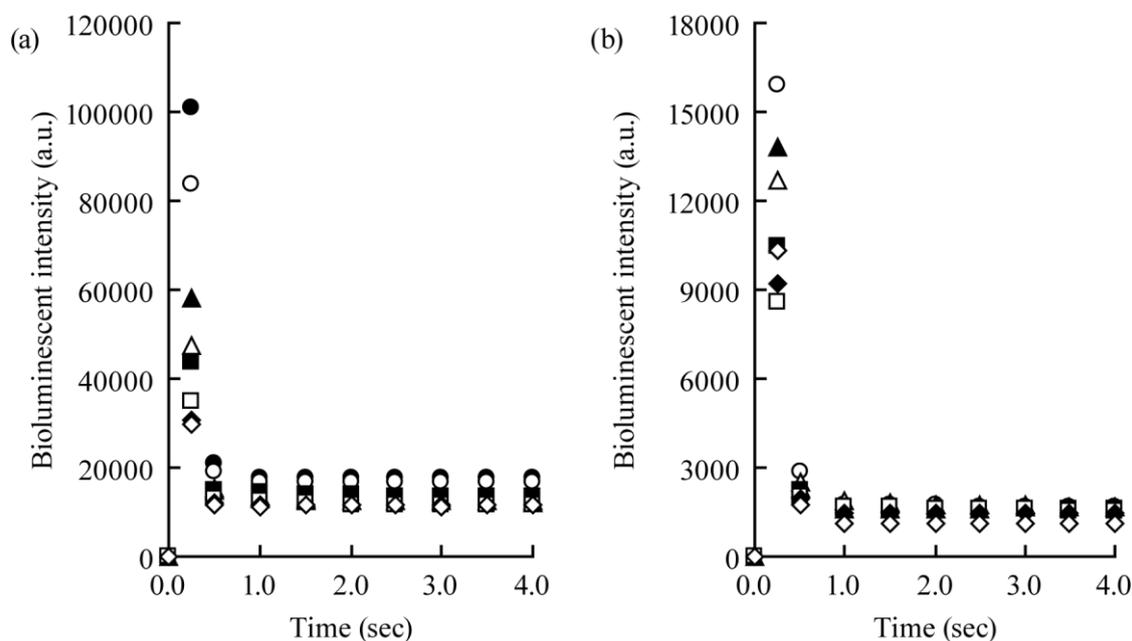


Figure 20. Changes in the bioluminescent signal of AQ in PLABD suspensions at various times after the addition of (a) PCN aqueous solutions and (b) PCA aqueous solutions of different concentrations: (●) 10 mM, (○) 1mM, (▲) 100  $\mu\text{M}$ , (△) 10  $\mu\text{M}$ , (■) 1  $\mu\text{M}$ , (□) 100 nM, (◆) 10 nM, and (◇) 1 nM.

PLABDのAQの封入量は一定ではなく、調製したPLABDごとにAQの発光強度は大きく異なる。PLABDのAQの発光強度と薬物濃度との相関性を求めるにあたり、PLABDごとのAQの発光強度の標準化を行う必要がある。このため、第2章 2.2.10 BIRの計算で示した式を用いて、PLABDに種々の濃度の各薬物を添加した際に測定したAQの各発光強度を、同一のPLABDに

100  $\mu\text{M}$  の各薬物を添加した際の平均発光強度で除した値を BIR とした。得られた発光強度の値を用いて BIR を算出し、各薬物の濃度の対数値に対して BIR をプロットした相関図を Figure 21 に示す。

LCN 濃度 10 nM–10 mM の範囲において、直線で近似した場合の相関係数を、最小二乗法を用いて求めると  $r=0.89$  となった。AQ の発光強度と LCN 濃度との間に相関性が見られたことから、PLABD を用いて微量の LCN を定量的に検出可能であることが示唆された。同様に、PCN は 10 nM–100  $\mu\text{M}$ 、PCA は 100 nM–100  $\mu\text{M}$  の範囲において、直線で近似した場合の相関係数はそれぞれ  $r=0.66$ 、 $r=0.74$  となった。以上の結果より、PLABD の物質検出メカニズムに基づいた本分析法は、分析対象物を定量的かつ高感度に検出可能であることが示された。

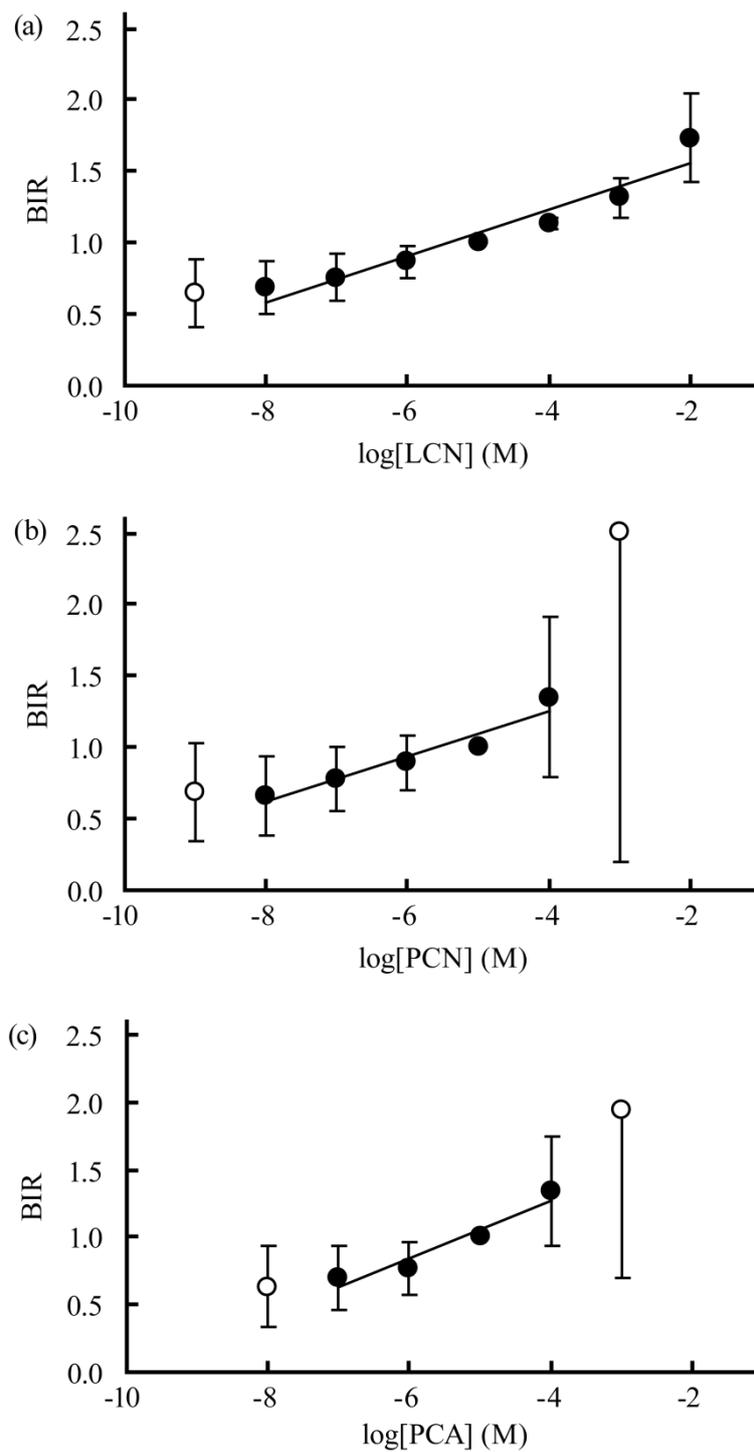


Figure 21. The calibration curves of (a) LCN, (b) PCN and (c) PCA with PLABD. Error bars indicate the standard deviations of three replicate experiments.

This figure was cited from Figure 7 in *Anal. Chem.*, **88**, 5704–5709 (2016).

### 3.3 PLABD と分析対象物の相互作用

本章において得られた PDALS および PLABD の 3 種のモデル薬物に対する応答性に関する実験結果より、いずれにおいても LCN と他の薬物との間では応答性に差が見られたため、この要因について以下のように考察を行った。

PDALS と分析対象物との相互作用により引き起こされるコンホメーション変化は、分析対象物の膜表面への結合や、あるいは膜への浸透によって生じると考えられている。第 1 章 3.2 DALS および PLABD の粒子径と粒度分布の結果より、PLABD の膜表面は負の電荷を帯びているため、プロトン化した分析対象物が PLABD 膜との静電的相互作用により結合し得ると考えられる。しかし、3 種のモデル薬物 LCN、PCN、および PCA の  $pK_a$  はそれぞれ 7.9、8.9、および 9.2<sup>68,69)</sup> であり、第 2 章 3.1 PDALS の応答性 および 3.2 PLABD の応答性 における実験は、全て pH 11.0 で行ったものである。Henderson-Hasselbalch の式より算出した pH 11.0 における LCN、PCN、PCA の分子形比率はそれぞれ約 100%、99%、および 98% であり、pH 11.0 で行った実験においては 3 種のモデル薬物のほとんどが分子形として存在しており、イオン型の比率はごく僅かである。このため、PLABD 膜表面とイオン型薬物との静電的相互作用によってコンホメーション変化が生じることは困難であると考えられる。一方、化合物の疎水性を表す *n*-オクタノール/水分分配係数 ( $\log P$ ) は LCN で 2.26、PCN で 0.88、PCA で 1.92 であり<sup>70)</sup>、LCN は他の薬物と比較して疎水性が高い。なお、各薬物の水相中での解離を考慮した分配係数  $\log D$  は以下の式で求められる。

$$\log D = \log P - \log(1 + 10^{pK_a - pH})$$

pH 11.0 における  $\log D$  は LCN で 2.26、PCN で 0.88、PCA で 1.91 であり、ほぼ  $\log P$  と同じ値である。以上の各薬物の物性値の比較から、本研究における PLABD と薬物の相互作用により引き起こされるコンホメーション変化は、PLABD 膜の疎水性領域への分子型薬物の浸透によって生じる、すなわち PLABD の物質応答性には、PLABD 膜と分析対象物との疎水性相互作用が影響するという仮説を立てた。

この仮説を検証するため、LCN の  $pK_a$  値が 7.9 であることから、LCN の分子型の存在比率が約 93% である pH 9.0 において、PDALS および PLABD のそれぞれについて、第 2 章 3.1 PDALS の応答性 および 3.2 PLABD の応答性 と同様の実験を行った。なお、PLABD を構成する PCDA はモノカルボン酸であり (Figure 5)、 $pK_a$  値が 4.7<sup>71)</sup> であることから、pH 11.0 と pH 9.0 のいずれにおいても PCDA のイオン型比率は約 100% である。したがって、PCDA の分子型比率、あるいはイオン型比率の寄与は、この仮説の検証に大きな影響を与えないと考えた。

まず、マイクロウェルプレート上に加えた一定量の PDALS (pH 9.0) 懸濁液に、終濃度が 0 から 25 mM となるようにそれぞれ LCN 水溶液および 5% スクロース-10 mM 硫酸アンモニウム水溶液 (pH 9.0) を添加した後の色相を Figure 22 に示す。

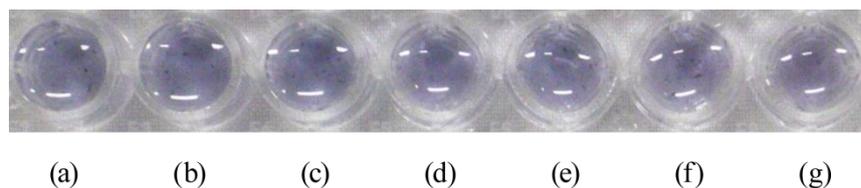


Figure 22. Color change of PDALS suspensions at pH 9.0 in the presence of varying LCN concentration: (a) 0, (b) 0.025, (c) 0.25, (d) 2.5, (e) 6.25, (f) 12.5, and (g) 25 mM.

This figure was cited from Figure S–2 in *Anal. Chem.*, **88**, 5704–5709 (2016).

いずれの LCN 濃度においても PDALS (pH 9.0) 懸濁液の色相の変化は見られなかった。つまり、pH 9.0 では PDALS と薬物との相互作用によって、色相の変化が視覚的に確認できる程度の PDALS 膜におけるコンホメーション変化が生じないことが明らかになった。

一方、Ca<sup>2+</sup>イオン存在下の PLABD (pH 9.0) 懸濁液に種々の濃度の LCN 水溶液をそれぞれ添加した時の AQ の発光測定を行った。得られた AQ のカイネティックカーブを Figure 23 に示す。pH 11.0 での結果と同様に、添加する薬物濃度の増加に応じて、AQ の発光強度が増大した。

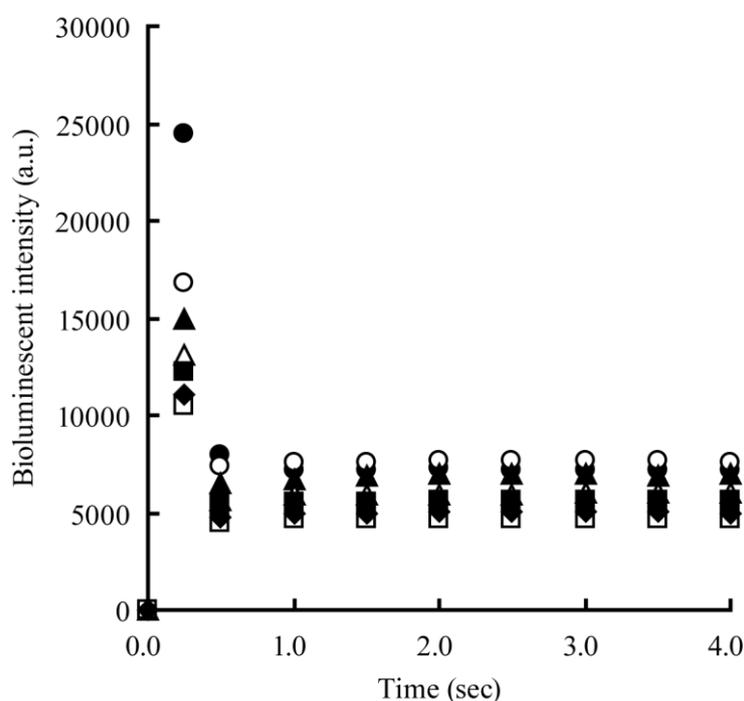


Figure 23. Changes in the bioluminescent signal of AQ in PLABD suspensions at pH 9.0 at various times after the addition of LCN aqueous solutions of different concentrations: (●) 10 mM, (○) 1mM, (▲) 100 μM, (△) 10 μM, (■) 1 μM, (□) 100 nM, (◆) 10 nM.

得られた AQ の発光強度の値を用いて BIR を算出し、LCN の濃度の対数値に対して BIR をプロットした相関図を Figure 24 に示す。

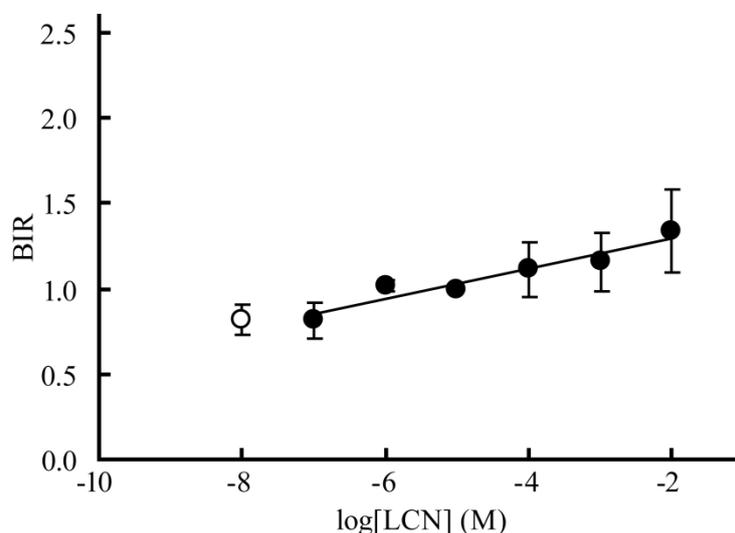


Figure 24. Calibration curve of LCN with PLABD at pH 9.0. Error bars indicate the standard deviations of three replicate experiments.

This figure was cited from Figure S-3 in *Anal. Chem.*, **88**, 5704-5709 (2016).

LCN 濃度 100 nM–10 mM の範囲において、直線で近似した場合の相関係数を、最小二乗法を用いて求めると  $r=0.77$  となった。pH 11.0 と pH 9.0 の実験結果を比較すると、分子型の LCN の存在比率がより大きい pH 11.0 の方が、定量下限がより低濃度でダイナミックレンジもより広いことから、より高感度に LCN を検出可能であることが明らかになった。これは、LCN 存在下の PDALS 懸濁液の色相が、pH 9.0 では青色のままで変化が見られなかった (Figure 22) のに対して、pH 11.0 では赤色側へと変化が見られた (Figure 15) という、視覚的な色相の変化の結果とも相関する。一方、LCN の  $\log D$  は pH 11.0 で 2.26、pH 9.0 で 2.23 であり、その差は非常に小さいにも関わらず、pH 11.0 の方がより高感度に LCN を検出することが可能である。これは、pH 9.0 と比較して pH 11.0 では LCN の分子型比率が約 7% 多いためであると考えられる。

以上の結果より、分子形薬物の PLABD 膜の疎水性領域への浸透によりコンホメーション変化が生じる、すなわち PLABD の物質応答性には、PLABD 膜と分析対象物との疎水性相互作用が影響していることが示唆された。

## 4. 小括

本章では、分析対象物として3種のモデル薬物 LCN、PCN、および PCA を用いて、PLABD の各薬物に対する応答性および感度を、従来の比色分析法における PDALS と比較し、高感度分析における PLABD の signal generator としての有用性について検討を行った。

従来の比色分析法における PDALS 懸濁液に各薬物を添加した後の色相を視覚的に確認すると、LCN では 0.025–25 mM 濃度存在下の広い範囲で PDALS 懸濁液の色相が青色から赤色へと変化したのに対し、PCN では 2.5 mM 以上、PCA では 25 mM の濃度存在下でのみ色相の変化が見られた。最も広い濃度範囲で色相の変化が見られた LCN について、LCN 添加後の PDALS 懸濁液の吸収スペクトルを測定し、二次微分処理を行って得られた値と LCN 濃度との間に 0.25–6.25 mM の範囲で  $r = 0.89$  の相関性が得られた。

一方、PLABD の AQ の発光強度より各薬物への応答性を検討した結果、BIR と LCN 濃度との間に 10 nM–10 mM の範囲で  $r = 0.89$  の相関性が得られた。また PCN は 10 nM–100  $\mu$ M、PCA は 100 nM–100  $\mu$ M の範囲において、それぞれ  $r = 0.66$ 、 $r = 0.74$  の相関性が得られた。PDALS と PLABD の結果の比較より、PLABD を用いた分析法は大幅にダイナミックレンジが広く、感度もより高いことが明らかになった。このことから、高感度分析における PLABD の signal generator としての有用性が示された。

さらに、PLABD の各薬物に対する応答性の違いについて、各薬物の  $pK_a$  および  $\log P$  より、疎水性相互作用が影響しているという仮説を立て、LCN の分子型存在比率の異なる pH 条件下での PDALS および PLABD の実験を行って検証した。その結果、LCN の分子型存在比率のより高い pH 条件下で、より高感度に LCN を検出可能であることが明らかになった。すなわち、PLABD の物質応答性に、PLABD 膜と分析対象物との疎水性相互作用が影響することが示唆された。

## 総括

血液や尿などの生体試料中に極微量に存在する薬物やバイオマーカーなどを検出するための高感度な分析法は、個別化した医療の進む臨床現場において必要不可欠となっている。しかし現状の分析法は前処理や機器の操作が煩雑で、さらに、機器の導入および維持に高額の設備投資を必要とする。したがって、臨床現場における分析対象物のより簡便で迅速、低コストで高感度な分析法の開発が強く望まれている。

本論文では、このような背景のもと、臨床現場で求められる高感度で簡便かつ迅速な分析法を確立するための基盤の構築として、分析対象物との相互作用により信号を生じる **signal generator** の開発を目的とし、 $\pi$ 共役系高分子である PDA のコンホメーション変化という特性に着目した。すなわち、新規な物質検出メカニズムに基づく **signal generator** として、外部刺激に対してコンホメーション変化を生じる PDALS と、発光効率が高く単純なメカニズムで発光する AQ による生物発光を組み合わせた、PLABD を考案した。

第1章では、PDALS 膜におけるコンホメーション変化と発光タンパク質である AQ による生物発光を活用した新規な物質検出メカニズムを提唱し、その仮説に基づいた **signal generator** である PLABD の構築を行い、提唱した PLABD の物質検出メカニズムの妥当性について検討を行った。DALC および PLABD の  $\text{Ca}^{2+}$  イオン添加時の AQ の発光測定の結果から、重合によって CI の運動が抑制されること、すなわち PLABD では AQ の発光が制御されていることを示した。さらに、分析対象物である LCN の添加によって PLABD 膜におけるコンホメーション変化が生じたこと、加えて、 $\text{Ca}^{2+}$  イオン存在下で LCN 添加時に PLABD の AQ の発光が観測され、LCN に対する応答が見られたことから、PLABD の物質検出メカニズムの妥当性を示すことができた。

第2章では、3種のモデル薬物に対する PLABD の応答性および感度を、PDALS を用いた従来の比色分析法と比較し、PLABD の **signal generator** としての有用性の検討、および分析対象物が PLABD 膜におけるコンホメーション変化を引き起こす要因について仮説を立て検証を行った。その結果、PLABD を用いた分析法は、PDALS を用いた比色分析法よりも感度とダイナミックレンジの両方において優れていることを明らかにし、高感度分析における PLABD の **signal generator** としての有用性を示すことができた。また、PLABD の分析対象物に対する応答の違いについて、LCN の分子型比率が異なる pH 条件下で行った実験結果を比較した。その結果、LCN の分子型比率がより大きい pH 条件下で、より高感度に LCN を検出可能であることを明らかにし、PLABD の物質応答性に PLABD 膜と分析対象物との疎水性相互作用が影響することを示すことができた。

以上より、PLABD は、PDALS の色相の変化を利用した従来の比色分析法では困難な高感度分析を可能にする signal generator であり、PLABD を用いた本分析法は、分析対象物を PLABD に添加するだけであるため操作が簡便で、また測定時間も数秒と迅速であるという利点を有する。今後は、抗原抗体反応などの分析対象物に特異的な反応を膜表面で捉え、それに応答する PLABD を構築することにより、臨床現場で求められる薬物やバイオマーカーの PLABD を用いた新規高感度分析法の開発へと、更なる展開が期待できる。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究を遂行するに際して終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました京都薬科大学 薬品分析学分野 北出達也 教授 に衷心より深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたりその都度有益な御助言ならびに御指導を賜りました京都薬科大学 薬品分析学分野 武上茂彦 准教授 ならびに同大学 同分野 小西敦子 助手 に厚く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、有益な御助言と御校閲を賜りました京都薬科大学 代謝分析学分野 安井裕之 教授 ならびに同大学 薬品物理化学分野 斎藤博幸 教授 に深く感謝いたします。

本研究の遂行に御協力いただきました京都薬科大学 薬品分析学分野 学生諸氏 ならびに同大学 同分野 教育補助 の皆様に深く感謝いたします。

最後に、京都薬科大学ならびに同大学大学院への進学の機会を与え、温かく見守り支え続けてくださった両親ならびに兄に心から感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Tomioka, Y.; Tanaka, N.; Imazeki, S., Surface–pressure–induced reversible color change of a polydiacetylene monolayer at a gas–water interface., *J. Chem. Phys.*, **91**, 5694–5700 (1989).
- 2) Mino, N.; Tamura, H.; Ogawa, K., Analysis of color transitions and changes on Langmuir–Blodgett films of a polydiacetylene derivative., *Langmuir*, **7**, 2336–2341 (1991).
- 3) Batchelder, D. N.; Evans, S. D.; Freeman, T. L.; Häussling, L.; Ringsdorf, H.; Wolf, H., Self–assembled monolayers containing polydiacetylenes., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1050–1053 (1994).
- 4) Lio, A.; Reichert, A.; Ahn, D. J.; Nagy, J. O.; Salmeron, M.; Charych, D. H., Molecular imaging of thermochromic carbohydrate–modified polydiacetylene thin film., *Langmuir*, **13**, 6524–6532 (1997).
- 5) Wu, S.; Niu, L.; Shen, J.; Zhang, Q.; Bubeck, C., Aggregation–induced reversible thermochromism of novel azo chromophore–functionalized polydiacetylene cylindrical micelles., *Macromolecules*, **42**, 362–367 (2009).
- 6) Morin, E.; Nothisen, M.; Wagner, A.; Remy, J. S., Cationic polydiacetylene micells for gene delivery., *Bioconjugate Chem.*, **22**, 1916–1923 (2011).
- 7) Gravel, E.; Ogier, J.; Arnauld, T.; Mackiewicz, N.; Ducongé, F.; Doris, E., Drug delivery and imaging with polydiacetylene micells., *Chem. Eur. J.*, **18**, 400–408 (2012).
- 8) Neuberger, P.; Perino, A.; Morin–Picardat, E.; Anton, N.; Darwich, Z.; Weltin, D.; Mely, Y.; Klymchenko, A. S.; Remy, J. S.; Wagner, A., Photopolymerized micells of diacetylene amphiphile: physical characterization and cell delivery properties., *Chem. Commun.*, **51**, 11595–11598 (2015).
- 9) Okada, S.; Peng, S.; Spevak, W.; Charych, D., Color and chromism of polydiacetylene vesicles., *Acc. Chem. Res.*, **31**, 229–239 (1998).
- 10) Cheng, Q.; Yamamoto, M.; Stevens, R. C., Amino acid terminated polydiacetylene lipid microstructures: morphology and chromatic transition., *Langmuir*, **16**, 5333–5342 (2000).
- 11) Singh, A.; Thompson, R. B.; Schnur, J. M., Reversible thermochromism in photopolymerized phosphatidylcholine vesicles., *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2785–2787 (1986).
- 12) Beckham, H. W.; Rubner, M. F., On the origin of thermochromism in cross–polymerized diacetylene–functionalized polyamides., *Macromolecules*, **26**, 5198–5201 (1993).
- 13) Kim, J. M.; Lee, J. S.; Choi, H.; Sohn, D.; Ahn, D. J., Rational design and in–situ FTIR analyses of colorimetrically reversible polydiacetylene supramolecules., *Macromolecules*, **38**, 9366–9376 (2005).
- 14) Lee, S.; Lee, J.; Lee, M.; Cho, Y. K.; Beak, J.; Kim, J.; Park, S.; Kim, M. H.; Chang, R.; Yoon, J., Construction and molecular understanding of an unprecedented, reversibly thermochromic bis–polydiacetylene., *Adv. Funct. Mater.*, **24**, 3699–3705 (2014).
- 15) Kew, S. J.; Hall, E. A. H., pH response of carboxy–terminated colorimetric polydiacetylene vesicles., *Anal. Chem.*, **78**, 2231–2238 (2006).
- 16) Carpick R. W.; Sasaki D. Y.; Burns A. R., First observation of mechanochromism at the nanometer scale., *Langmuir*, **16**, 1270–1278 (2000).

- 17) Leclerc, M., Optical and electrochemical transducers based on functionalized conjugated polymers., *Adv. Mater.*, **11**, 1491–1498 (1999).
- 18) Saito, A.; Urai, Y.; Itoh, K., Infrared and resonance Raman spectroscopic study on the photo-polymerization process of the Langmuir–Blodgett films of a diacetylene monocarboxylic acid, 10, 12-pentacosadiynoic acid., *Langmuir*, **12**, 3938–3944 (1996).
- 19) Charysh, D. H.; Nagy, J. O.; Spevak, W.; Bednarski, M. D., Direct colorimetric detection of a receptor–ligand interaction by a polymerized bilayer assembly., *Science (Washington, DC, U. S.)*, **261**, 585–588 (1993).
- 20) Reichert, A.; Nagy, J. O.; Spevak, W.; Charych, D., Polydiacetylene liposomes functionalized with sialic acid bind and colorimetrically detect influenza virus., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 829–830 (1995).
- 21) Pan, J. J.; Charych, D., Molecular recognition and colorimetric detection of cholera toxin by poly(diacetylene) liposomes incorporating G<sub>m1</sub> ganglioside., *Langmuir*, **13**, 1365–1367 (1997).
- 22) Ma, G.; Cheng, Q., Vesicular polydiacetylene sensor for colorimetric signaling of bacterial pore-forming toxin., *Langmuir*, **21**, 6123–6126 (2005).
- 23) Wang, C.; Ma, Z., Colorimetric detection of oligonucleotides using a polydiacetylene vesicle sensor., *Anal. Bioanal. Chem.*, **382**, 1708–1710 (2005).
- 24) Jung, Y. K.; Kim, T. W.; Kim, J.; Kim, J. M.; Park, H. G., Universal colorimetric detection of nucleic acids based on polydiacetylene (PDA) liposomes., *Adv. Funct. Mater.*, **18**, 701–708 (2008).
- 25) Kolusheva, S.; Kafri, R.; Katz, M.; Jelinek, R., Rapid colorimetric detection of antibody–epitope recognition at a biomimetic membrane interface., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 417–422 (2001).
- 26) Jelinek, R.; Okada, S.; Norvez, S.; Charych, D., Interfacial catalysis by phospholipases at conjugated lipid vesicles: colorimetric detection and NMR spectroscopy., *Chem. Biol.*, **5**, 619–629 (1998).
- 27) Kolusheva, S.; Zadnani, R.; Schrader, T.; Jelinek, R., Color fingerprinting of proteins by calixarenes embedded in lipid/polydiacetylene vesicles., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 13592–12598 (2006).
- 28) Xue, W.; Zhang, D.; Zhang, G.; Zhu, D., Colorimetric detection of glucose and an assay for acetylcholinesterase with amine-terminated polydiacetylene vesicles., *Chin. Sci. Bull.*, **56**, 1877–1883 (2011).
- 29) Gill, I.; Ballesteros, A., Immunoglobulin–polydiacetylene sol–gel nanocomposites as solid–state chromatic biosensors., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **42**, 3264–3267 (2003).
- 30) Lee, S. W.; Kang, C. D.; Yang, D. H.; Lee, J. S.; Kim, J. M.; Ahn, D. J.; Sim, S. J., The development of a generic bioanalytical matrix using polydiacetylenes., *Adv. Funct. Mater.*, **17**, 2038–2044 (2007).
- 31) Jung, Y. K.; Kim, T. W.; Jung, C.; Cho, D. Y.; Park, H. G., A polydiacetylene microchip based on a biotin–streptavidin interaction for the diagnosis of pathogen infections., *Small*, **4**, 1778–1784 (2008).
- 32) Lim, M. C.; Shin, Y. J.; Jeon, T. J.; Kim, H. Y.; Kim, Y. R., Microbead-assisted PDA sensor for the detection of genetically modified organisms., *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 777–785 (2011).

- 33) Jung, S. H.; Jang, H.; Lim, M. C.; Kim, J. H.; Shin, K. S.; Kim, S. M.; Kim, H. Y.; Kim, Y. R.; Jeon, T. J., Chromatic biosensor for detection of phosphinothricin acetyltransferase by use of polydiacetylene vesicles encapsulated within automatically generated immunohydrogel beads., *Anal. Chem.*, **87**, 2072–2078 (2015).
- 34) Lee, J.; Seo, S.; Kim, J., Colorimetric detection of warfare gases by polydiacetylenes toward equipment-free detection., *Adv. Funct. Mater.*, **22**, 1632–1638 (2012).
- 35) Zhou, D.; Wang, F.; Wang, H.; Kambam, S.; Chen, X., Colorimetric and fluorometric detection of neomycin based on conjugated polydiacetylene supramolecules., *Macromol. Rapid Commun.*, **34**, 944–948 (2013).
- 36) Kim, J. M.; Lee, J. S.; Lee, J. S.; Woo, S. Y.; Ahn, D. J., Unique effects of cyclodextrins on the formation and colorimetric transition of polydiacetylene vesicles., *Macromol. Chem. Phys.*, **206**, 2299–2306 (2005).
- 37) Brockgreitens, J.; Ahmed, S.; Abbas, A., Kinetic analysis of  $\alpha$ -cyclodextrin interactions using polydiacetylene liposomes., *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*, **81**, 423–427 (2015).
- 38) Kolusheva, S.; Molt, O.; Herm, M.; Schrader, T.; Jelinek, R., Selective detection of catecholamines by synthetic receptors embedded in chromatic polydiacetylene vesicles., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10000–10001 (2005).
- 39) Lee, J.; Jeong Jeong, E.; Kim, J., Selective and sensitive detection of melamine by intra/inter liposomal interaction of polydiacetylene liposomes., *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)*, **47**, 358–360 (2011).
- 40) Katz, M.; Ben-Shlush, I.; Kolusheva, S.; Jelinek, R., Rapid colorimetric screening of drug interaction and penetration through lipid barriers., *Pharmaceutical Research*, **23**, 580–588 (2006).
- 41) Chen, X.; Kang, S.; Kim, M. J.; Kim, J.; Kim, Y. S.; Kim, H.; Chi, B.; Kim, S. J.; Lee, J. Y.; Yoon, J., Thin film formation of imidazolium-based conjugated polydiacetylenes and their application for sensing anionic surfactants., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 1422–1425 (2010).
- 42) Xu, Q.; Lee, S.; Cho, Y.; Kim, M. H.; Bouffard, J.; Yoon, J., Polydiacetylene-based colorimetric and fluorescent chemosensor for the detection of carbon dioxide., *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 17751–17754 (2013).
- 43) 融 道男 (2008) 向精神薬マニュアル, 187.
- 44) 伊賀立二 (2005) 研修医・医学生のためのくすりマニュアル-安全な薬物治療のために-, 133.
- 45) Shimomura, O.; Jhonson, F. H.; Saiga, Y., Extraction, purification, and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*., *J. cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223–240 (1962).
- 46) Shimomura, O.; Jhonson, F. H., Calcium binding, quantum yield, and emitting molecule in aequorin bioluminescence., *Nature*, **227**, 1356–1357 (1970).
- 47) Szoka, F. Jr.; Papahadjopoulos, D., Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 4194–4198 (1978).

- 48) Shimomura, O.; Johnson, F. H., Regeneration of the photoprotein aequorin., *Nature*, **256**, 236–238 (1975).
- 49) Shimomura, O.; Johnson, F. H., Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 2611–2615 (1978).
- 50) Musicki, B.; Kishi, Y.; Shimomura, O., Structure of the functional part of the photoprotein aequorin., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **21**, 1566–1568 (1986).
- 51) Nakajima–Shimada, J.; Iida, H.; Tsuji, F. I.; Anraku, Y., Monitoring of intracellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae* with an apoaequorin cDNA expression system., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 6878–6882 (1991).
- 52) Petronilli, V.; Penzo, D.; Scorrano, L.; Bernardi, P.; Lisa, F. D., The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome *c* and cell death., *J. Biol. Chem.*, **276**, 12030–12034 (2001).
- 53) Suzuki, J.; Umeda, M.; Sims, P. J.; Nagata, S., Calcium–dependent phospholipid scrambling by TMEM16F., *Nature*, **468**, 834–838 (2010).
- 54) Kuriyama, K.; Kikuchi, H.; Kajiyama, T., Solid–state polymerization behaviors of crystalline diacetylene monolayers on hydrophilic surfaces., *Langmuir*, **12**, 2283–2288 (1996).
- 55) Yuan, W.; Jiang, G.; Song, Y.; Jiang, L., Micropatterning of polydiacetylene based on a photoinduced chromatic transition and mechanism study., *J. Appl. Polym. Sci.*, **103**, 942–946 (2007).
- 56) Shimomura, O., Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 359–363 (1995).
- 57) Shimomura, O.; Inouye, S., Titration of recombinant aequorin with calcium chloride., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 77–81 (1996).
- 58) Jonas, U.; Shah, K.; Norvez, S.; Charysh, D. H., Reversible color switching and unusual solution polymerization of hydrazide–modified diacetylene lipids., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4580–4588 (1999).
- 59) Su, Y.; Li, J.; Jiang, L., Effect of amphiphilic molecules upon chromatic transitions of polydiacetylene vesicles in aqueous solutions., *Colloids Surf., B*, **39**, 113–118 (2004).
- 60) Lee, S.; Lee, K. M.; Lee, M.; Yoon, J., Polydiacetylenes bearing boronic acid groups as colorimetric and fluorescence sensors for cationic surfactants., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **5**, 4521–4526 (2013).
- 61) Shin, M. J.; Kim, Y. J.; Kim, J. D., Chromatic response of polydiacetylene vesicle induced by the permeation of methotrexate., *Soft Matter*, **11**, 5037–5043 (2015).
- 62) Seo, S.; Lee, J.; Choi, E. J.; Kim, E. J.; Song, J. Y.; Kim, J., Polydiacetylene liposome microarray toward influenza A virus detection: effect of target size on turn–on signaling., *Macromol. Rapid Commun.*, **34**, 743–748 (2013).
- 63) Savitzky, A.; Golay, M. J. E., Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures., *Anal. Chem.*, **36**, 1627–1639 (1964).
- 64) Kitamura, K.; Hozumi, K., Effect of the degree of polynomials in the Savitzky–Golay method for calculation of second–derivative spectra., *Anal. Chem. Acta.*, **172**, 111–118 (1985).

- 65) Kitamura, K.; Imayoshi, N.; Goto, T.; Mano, T.; Nakai, Y., Second-derivative spectrophotometric determination of partition coefficients of chlorpromazine and promazine between lecithin bilayer vesicles and water., *Anal. Chem. Acta.*, **304**, 101–106 (1995).
- 66) Ahn, D. J.; Kim, J. M., Fluorogenic polydiacetylene supramolecules: immobilization, micropatterning and application to label-free chemosensors., *Acc. Chem. Res.*, **41**, 805–816 (2008).
- 67) 武上茂彦 (2006) 分光学的手法によるフェノチアジン系薬物とリン脂質リポソームとの相互作用の解明
- 68) Uolpe, P.; Palade, P.; Costello, B.; Mitchell, R. D.; Fleischer, S., Spontaneous calcium release from sarcoplasmic reticulum. Effect of local anesthetics., *J. Biol. Chem.*, **258**, 12434–12442 (1983).
- 69) Saenger-van de Griend, C. E.; Ek, A. G.; Widahl-Naesman, M. E.; Andersson, E. K. M., Method development for the enantiomeric purity determination of low concentrations of adrenaline in local anaesthetic solutions by capillary electrophoresis., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 77–83 (2006).
- 70) Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D., *Exploring QSAR*, Vol.2; American Chemical Society: Washington, DC, USA (1995).
- 71) Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02