

平成21年5月27日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18550132
 研究課題名（和文） ナノレセプターを用いる bisphenol A の生体試料逐次計測用センサーの開発
 研究課題名（英文） Development of bisphenol A sensor for the successive determination of biological fluid utilizing nano chemical receptor
 研究代表者 久保 いづみ（KUBO IZUMI）
 創価大学・工学部・教授
 研究者番号：40215986

研究成果の概要：

BPA のナノレセプターである BPA-MIP を実際に電極表面に修飾し、この BPA-MIP 修飾電極を用いてリン酸緩衝液中に 5～15 μ M に調製した BPA の CV 測定を行った。BPA の酸化ピーク電流は約 580mV 付近に観察され、BPA-MIP を修飾した電極でも濃度依存的な応答を検出することが出来た。ラット血清サンプル中での 5 μ M の BPA の CV 測定を BPA-MIP 修飾電極で検討した。血清サンプルを除タンパクの操作を行う必要はあったが、血清サンプル中でも BPA の酸化ピーク電流を検出することが可能であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：センサー

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、センサーの分子認識素子として用いることを目的として、分子インプリンティング法によるナノケミカルレセプターを調製する一連の研究を行っていた。また、ナノケミカルレセプターを電極上に調製することで、認識結合した分子を電気化学的に検出するセンサーが有効であることをトリ

アジン系の除草剤を検出対象として示した。

一方 Bisphenol A に対する分子インプリンティングの研究はされていたが、これをセンサーに応用する研究は行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、その環境ホルモンとして知られ、女性ホルモンのエストロゲンと似た作用を示す、Bisphenol A (BPA) に焦点をあてた。

BPAをはじめ、環境ホルモンと呼ばれるような化学物質の検出にはガスクロマトグラフィ/質量分析や高速液体クロマトグラフィを使用し行われている。しかし、機材が高価であり、自然界でのサンプルに関しては、一度研究室に持ち帰り前処理を施す必要がある。

一方で、迅速に測定が可能なものに電気化学的な反応を利用したセンサーがある。特にバイオセンサーは、生体の持つ分子認識能力を利用しセンサーであり、生体関連の物質を測定することに対して優位性をもつ。しかし、生体分子を利用する点からコスト面でのデメリットがある。そこで、生体分子と同じように分子認識能力を持つ便利で安定な代用品として、分子鑄型法によって調製されるモレキュラーインプリントポリマー(MIP)が、この分野で期待されている。このMIPは鑄型物質に対して特異的な結合サイトを有している。

そこで本研究ではBPAが電気化学的な活性を持つことが確認されているため、MIPを電気化学測定の電極表面に直接修飾することで簡易にBPAが測定可能なBPAセンサーの構築を検討した。

3. 研究の方法

まず、BPA-MIPを修飾する電極は板状の金電極を使用し、感光性ポリイミドにより、電極面に絶縁層を作り電極面積を一定にした。

次に電極面積を一定にした電極の表面にチオール基をもつアシルメルカプタンで修飾しビニル基を電極表面に導入した。その電極上に鑄型としてBPA、機能性モノマーとして4-VPY、架橋剤のEDMAをBPA:4-VPY:EDMA, 1:3.5:12.5のモル比で、重合溶媒のトルエン中に溶解させMIPカクテルとし、窒素ページを3分間行った後、調製したカクテルをスピコーティングによって塗り広げ、紫外

線照射によって重合させBPA-MIP修飾電極を完成させた(Fig. 1)。

BPA-MIPの電極修飾の確認は原子間力顕微鏡(AFM)を使用し行った。このBPA-MIP修飾電極を用い、BPAの電気化学測定を行った。電気化学測定はリン酸緩衝液(pH 7.0、0.1M)中でAg/AgClを参照極とし、掃引範囲を0~800mVに設定しサイクリックボルタンメトリー(CV)法で測定した。さらに、アスコルビン酸存在下と除タンパク後の血清サンプル中でのBPAの検出の検討を行った。

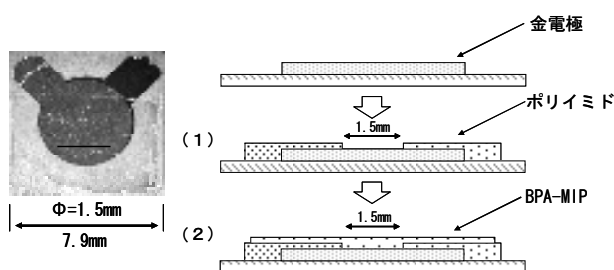


Fig. 1 作製した電極と BPA-MIP 膜の修飾イメージ、左図) 作成した金電極、右図) 電極断面の修飾イメージ、1)ポリイミド修飾、2)BPA-MIP修飾

4. 研究成果

BPA-MIPを実際に電極表面に修飾し、表面形状をAFMで確認した。結果として裸の状態の金電極の表面状態とBPA-MIP修飾後では、金電極表面の凹凸がBPA-MIP修飾により凹凸の減少が見られた。このことから、BPA-MIPの電極修飾が確認された。

このBPA-MIP修飾電極を用いて、リン酸緩衝液中に5~15 μ Mに調製したBPAのCV測定を行った。その結果をFig. 2に示した。BPAの酸化ピーク電流は約580mV付近に観察されFig. 2に示したように、BPA-MIPを修飾した電極でも濃度依存的に酸化ピーク電流を検出することが出来た。これまでにMIPを電極修飾した報告ではMIP中に支持電解質が必要であったが、本研究では支持電解質を含浸させず、CV測定が可能であったため、簡易な

MIP 修飾電極でのセンサーの可能性を見出せた。

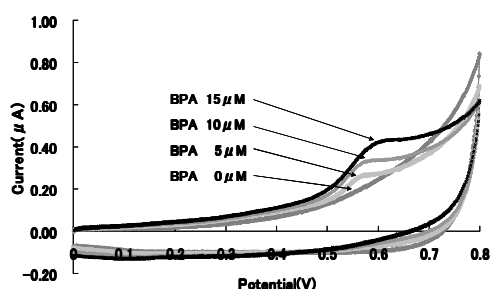


Fig. 2 BPA-MIP 修飾電極による BPA の CV

更に、BPA が食品用プラスチックトレーの原材料である点から、食品添加物として多々使用されている、アスコルビン酸(AA)存在下での BPA-MIP 修飾電極を使用した BPA の CV 測定を行った。また BPA-MIP 修飾電極の重合時間による電流値の変化を比較し、Table 1 にその結果をまとめた。このときリン酸緩衝液を測定溶媒とし、BPA は $5 \mu\text{M}$ 、AA は $50 \mu\text{M}$ に濃度を調製し CV 測定を行った。

それぞれの CV 測定において、AA は非常に酸化されやすく酸化ピーク電流値は 200mV 付近に見られ、BPA は前述したとおり 580mV 付近に確認された。

それぞれの酸化ピーク電流値を金電極と BPA-MIP 修飾電極で比較すると、BPA-MIP を電極修飾するため、AA、BPA 共に酸化電流ピーク値は減少した。しかし、重合時間 2 分、5 分共に AA の酸化ピーク電流値の減少が BPA に比べて大きくなった。これは BPA が BPA-MIP の結合サイトに取り込まれて電気化学反応をするのに対して、アスコルビン酸の反応は BPA-MIP によって阻害されたためだと考えられる。重合時間を比較すると、短い場合は電流を流しやすく、長い場合では、他の物質の反応阻害の傾向が高くなる。その為、更なる最適化が必要と考えられた。

Table 1 金電極と BPA-MIP 修飾電極での電流値比較

	BPA	AA
Au	100.0%	100.0%
MIP 2min	65.0%	55.9%
MIP 5min	45.7%	32.9%

加えて、BPA が内分泌攪乱作用を疑われているため、リン酸緩衝液で稀釈したラット血清サンプル中での $5 \mu\text{M}$ の BPA の CV 測定を BPA-MIP 修飾電極で検討した。血清サンプルを除タンパクの操作を行う必要はあったが、血清サンプル中でも BPA の酸化ピーク電流を検出することが可能であった。

本研究により、短時間の紫外線照射によって BPA-MIP 修飾電極を作製し、BPA の CV 測定を行った結果、 $5 \sim 15 \mu\text{M}$ の濃度範囲で、濃度依存性が確認することが出来た。

AA 存在下での BPA の CV 測定では、BPA-MIP により、AA の酸化反応を阻害しながら、BPA の酸化反応の検出が可能であった。また、血清サンプル中でも BPA-MIP 修飾電極で BPA の検出が可能であった。

これらのことより、BPA-MIP 修飾電極による、簡易な BPA センサーの構築が出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

①横田宣之、河東田武夫、瀧脇雄介、金松知幸、久保いづみ
 モレキュラーインプリントポリマー修飾電極による Bisphenol A センシングシステムの検討, *Chemical Sensors* 25 suppl. A, 67-69 (2009) 査読無

②N. Yokota, Y. Fuchiwaki and I. Kubo
 Fabrication of bisphenol A sensor utilizing electrode modified with molecularly imprinted polymer, *ECS Transactions*, 16(11), 551-556 (2008) 査読有

③Y. Nakane, M. M. Ito and I. Kubo
 Novel detection method of endocrine disrupting chemicals utilizing liposomes as cell membrane model, *Analytical Letters*, 41, 2923-2932

(2008) 査読有

④ I. Kubo, R. Shoji, Y. Fuchiwaki and H. Suzuki,

Atrazine Sensing Chip Based on Molecularly Imprinted Polymer Layer, *Electrochemistry*, 76, 541-544(2008)査読有

⑤ Y. Fuchiwaki, R. Shoji, H. Suzuki and I. Kubo 6-Chloro-N,N-Diethyl-1,3,5-Triazine-2,4-Diamine (Simazine) Electrochemical Sensing Chip Based on Biomimetic Recognition Utilizing a Molecularly Imprinted Polymer Layer on a Gold Chip, *Analytical Letters*, 1398-1407 (2008) 査読有

⑥ 瀧脇雄介, 竹下潤治, 佐々木直樹, 久保いづみ,

分子認識用人工レセプターを用いた水道水中シマジン計測のための測定システム,

Chemical Sensors, 24s, 67-69 (2008), 査読無

⑦ 横田宣之, 阿弓佳央梨, 中根優子, 瀧脇雄介, 久保いづみ

Bisphenol A 測定用MIP薄膜修飾センサ作製法の検討, *Chemical Sensors*, 24s, 85-87 (2008), 査読無

⑧ Y. Fuchiwaki, N. Sasaki and I. Kubo

Development of an Electrochemical Sensing System for 6-Chloro-N,N-diethyl-1,3,5-Triazine (CAT) utilizing Molecularly Imprinted Artificial Receptor, *Electrochemistry*, 75, 709-714 (2007) 査読有

(2007) 査読有

⑨ Y. Fuchiwaki, A. Shimizu and I. Kubo.

6-Chloro-N,N-diethyl-1,3,5-triazine (CAT) Sensor Based on Biomimetic Recognition Utilizing a Molecularly Imprinted Artificial Receptor, *Anal. Sci.*, 23 (1), 49-53 (2007) 査読有

⑩ I. Kubo, Y. Nakane and N. Maehara, A Carboxyalkanethiol monolayer modified electrode for blocking of ascorbic acid oxidation and its application to a biosensor, *Electrochimica Acta*, 51, 5163-5168 (2006) 査読有

⑪ 久保いづみ

ナノテクノロジーとバイオセンサ 1. 酵素センサの原理と応用, *臨床検査*, 50 (12), 1449-1458 (2006) 査読無

[学会発表] (計 18件)

① 横田宣之, 河東田武夫, 瀧脇雄介, 金松知幸, 久保いづみ,

モレキュラーインプリントポリマー修飾電極による、Bisphenol A センシングシステムの検討, 電気化学会第76回大会, 2009年3月30日, 京都

② N.YOKOTA, Y.FUCHIWAKI and I. KUBO Fabrication of bisphenol A sensor utilizing electrode modified with molecularly imprinted

polymer, *PRiME* 2008, 2008年10月16日, Honolulu (Hawaii)

③ 横田宣之, 阿弓佳央梨, 瀧脇雄介, 久保いづみ,

モレキュラーインプリントポリマー修飾電極を用いたビスフェノールAの電気化学測定, 日本分析化学会第57年会, 2008年9月10日, 福岡

④ 中根優子, 久保いづみ,

細胞膜モデルリポソームによる内分泌攪乱物質の検出, 第69回分析化学討論会, 2008年5月16日, 名古屋

⑤ I. Kubo, N. Yokota, Y. Fuchiwaki, The Establishment of bisphenol A sensing system utilizing molecularly Imprinted receptor and electrochemical determination, 7th East Asian Conference On Chemical Sensors, Dec. 4th 2007, Singapore,

⑥ 横田宣之, 横山紘幸, 瀧脇雄介, 久保いづみ

ビスフェノール A 検出用人工レセプターを用いた電気化学測定, 日本分析化学会第56年会, 2007年9月14日, 徳島

⑦ 横田宣之, 横山紘幸, 瀧脇雄介, 久保いづみ

分子認識ポリマーと電気化学測定による Bisphenol A の検出法の検討, 電気化学会第74回大会, 2007年3月30日, 千葉

⑧ 横田宣之, 瀧脇雄介, 久保いづみ

分子インプリンティングレセプターを用いた bisphenol A センサーシステムの検討, 日本化学会第87春季年回2007年3月25日 (大阪)

他10件

[図書] (計 1 件)

① 中根優子, 久保いづみ (分担執筆) テクノシステム, 「バイオセンサ・ケミカルセンサ事典(生体膜モデルを利用したバイオセンサ)」, (2007)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

なし

○取得状況 (計 件)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 いづみ (KUBO IZUMI)

創価大学・工学部・教授

研究者番号: 40214986

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

金松 知幸 (KANAMATSU TOMOYUKI)

創価大学・工学部・教授

研究者番号: 30104201