

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19550171  
 研究課題名（和文） 無機ナノ粒子・有機高分子ハイブリッド膜を用いる超高感度SPRセンサーの開発  
 研究課題名（英文） Development of a highly sensitive SPR sensor using hybrid thin film of  
 inorganic nanoparticles and organic polymer  
 研究代表者  
 松井 淳（MATSUI JUN）  
 甲南大学・理工学部・准教授  
 研究者番号：10264954

## 研究成果の概要：

金ナノ粒子と分子認識高分子のハイブリッド材料を合成し、これを表面プラズモン共鳴（SPR）センサーのセンサー素子として応用することにより、極めて高感度の低分子量脂溶性化合物用センサーを構築できた。本研究ではアトラジン（除草剤、環境ホルモン）をモデル標的分子として pM レベルの試料の検出に成功しており、本研究成果は、脂溶性化合物の高感度検出が望まれている環境分析や薬物分析における新規分析法として期待できる。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能材料、分子認識、高分子合成、表面プラズモン共鳴、バイオセンサー、金ナノ粒子、環境分析、ナノバイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

表面プラズモン共鳴（SPR）計測装置は、標的分子を標識する必要がないことから、汎用性の高いシグナルトランスデューサーとしてさまざまな生体関連物質の計測に応用されている。しかし、デバイス作製技術の進展に伴う新展開（マルチチャンネル化や小型化など）は数多く報告されている一方、分子認識素子の作製技術という点では、依然として

生体分子の固定化が中心であり、低分子量・疎水性の生体関連物質（薬物や農薬など）の計測は不得手である。これらの化合物に対して感度や選択性に優れた SPR センサーを構築するには、次のような課題を克服する必要があると考えられた。

（1）低分子化合物の検出：低分子化合物はセンサーチップに結合しても大きな誘電率変化をもたらさないため、高感度に検出す

ることが困難である

(2) 有機溶媒中での分子認識：疎水性化合物の試料調製には有機溶媒の使用が望ましい場合があるが、抗体などの生体分子では、特段の化学修飾を施さないかぎり有機溶媒中での標的分子の捕捉は難しい。

(3) 有機溶媒中での検出：有機溶媒中で疎水性標的分子を捕捉する際、結合部位内の溶媒分子が標的分子に置換されることになるが、いずれも低誘電率であるので誘電率変化は小さく、標的分子の捕捉を高感度に検知することが困難である。

## 2. 研究の目的

本研究では、有機溶媒中においても低分子量有機化合物を高感度で検出できる表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーを開発することを目的として、分子認識能を有する高分子でセンサーチップ上を被覆し、疎水性生体関連物質の選択的捕捉を行うこととした。さらに、この捕捉現象を高感度に検知するために、高分子内には予め金ナノ粒子を固定化しておくことにより、金ナノ粒子と金薄膜のカップリング効果によって増強された電磁場中において標的分子が捕捉されるため、誘電率変化を鋭敏に検知することが可能となり、有機溶媒中においても低分子量・疎水性標的分子の高感度検出が期待できると考えられた。

このようなセンサー開発は、次のような学術的新規性を有する。すなわち、金ナノ粒子を基板上に固定化することによって SPR センサーの感度が向上することを示す原理や例証についてはすでに報告があるが、特異的結合部位を金ナノ粒子と金薄膜の間に構築するための方法論については、DNA を用いる例を除いては報告がなく、選択的・高感度センシングへの展開はほとんどなされていなかった。本研究では、標的分子に合わせてテーラーメイド的に作製する分子認識高分子を、金ナノ粒子と組み合わせて用いることにより、高選択的・高感度 SPR センサーを構築するための方法論を確立するものであり、新規性に富む研究であったといえる。

## 3. 研究の方法

有機溶媒中において低分子量・疎水性生体関連物質 (医薬品や農薬など) を、高感度かつ高選択的に検出できる表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーを開発するため、以下の2点を主課題として研究に取り組んだ。

(1) 有機溶媒中において、pM レベルの検出

限界をもって、低分子量・疎水性生体関連物質 (医薬品や農薬など) を検出する SPR センサーを構築すること。

(2) 構造が類似する一連の生体関連物質の中でも、特に標的物質に対して選択性を示す SPR センサーを構築すること。

さらに、これらの課題に取り組むにあたって必要な技術的ブレークスルーとして、それぞれ、金ナノ粒子の合成と固定化、および、有機溶媒中で機能する分子認識高分子の合成に以下のように取り組んだ。

(3) 金ナノ粒子を有機溶媒中での重合反応に使用するため、ナノ粒子調製時に粒子表面をアルキル鎖などで修飾することにより可溶化した。その末端には、後に重合可能な官能基を導入することを想定し、種々の反応性基の導入について検討を行った。また、粒子径とシグナル増強効果に関する検討を行った。さらに、種々の官能基を金ナノ粒子表面に結合させるため、調製時の諸条件に加えて、精製時 (再沈殿法) の溶媒の選択についても検討を行った。また、得られたナノ粒子の有機溶媒中での分散性や重合中の凝集性などについて検討を行った。

(4) 分子認識高分子の調製法を以下のように確立した。すなわち、修飾金ナノ粒子、モノマー、架橋剤、希釈剤、標的分子 (鋳型分子)、重合開始剤等を混合し、光重合により高分子を得た (モレキュラーインプリンティング法)。モデル鋳型分子にはアトラジンを用いた。各試剤の選択、金ナノ粒子密度、希釈剤-モノマー比、架橋剤-モノマー比などについて最適化を図った。得られたハイブリッド材料は、飽和結合実験や高速液体クロマトグラフィーにより、標的分子に対する親和性や選択性の評価を行った。

(5) さらにこのハイブリッド材料で金基板表面を被覆し、表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーシステムの構築を行った。表面プラズモン共鳴測定装置にセンサーチップを装着して、低分子量・疎水性生体関連物質であるアトラジンに対して、キャリブレーションを作成し、検出限界濃度及び選択性について評価を行った。キャリアにはメタノール及びアセトニトリルなどの有機溶媒の使用を検討した。評価結果は、金ナノ粒子及び分子認識高分子の設計、ならびに金ナノ粒子-高分子複合材料の設計や固定化方法に関する条件検討へとフィードバックさせた。

(6) また、土壌・河川などの環境試料を用いて、農薬等の分析について検討を行った。

また、複数の分子認識高分子を一つの基板上に配置する方法により、センサーチップアレイを構築し、多項目検査用システムの構築する戦略についても検討した。複数高分子の配置は、基板上に光反応性触媒を吸着させ、マスクングにより特定の位置のみに高分子が調製する方法により行った。また、基板に光反応性基を導入し、光照射により特定の位置に光反応性基を導入し、特定の位置に高分子を固定化する方法についても検討した。

#### 4. 研究成果

金ナノ粒子を固定化した分子認識高分子を合成することを目的とし、以下の点について検討を行ったところ、次のような知見が得られた。

(1) 金ナノ粒子の表面修飾残基について検討を行った。高分子合成系中に金ナノ粒子を添加するためには、金ナノ粒子に有機溶媒への溶解性を付与する必要がある。そこで、ナノ粒子調製時に添加する保護剤を変えることにより種々の修飾金ナノ粒子を調製した。その結果、センサー基板を被覆する分子認識高分子の合成に適したジメチルホルムアミド等への溶解性を高めるにはメルカプトウンデカン酸等による修飾が効果的であることがわかった。さらに、高分子に共有結合を介して固定化することを想定し、アリルメルカプタン等による修飾も検討した。いずれも安定な金ナノ粒子溶液が調製可能であった。透過型電子顕微鏡による計測の結果、金ナノ粒子の粒子径(直径)は約5nmであり、単分散のナノ粒子が得られていることがわかった。また、DNAを保護基として用いることにより水溶性の金ナノ粒子についても得ることができた。

(2) 金ナノ粒子内包型分子認識高分子の合成とセンサーチップへの固定化

修飾金ナノ粒子、メタクリル酸等(モノマー)、エチレングリコールジメタクリレート(架橋剤)、ジメチルホルムアミド(希釈剤)、アトラジン(環境ホルモンであり鑄型分子として用いた)、AIBN(重合開始剤)を混合し、予めアリルメルカプタン等で修飾した金基板上で熱重合により高分子を得た。走査型電子顕微鏡により被覆高分子の膜厚を計測したところ、約300nmであることがわかった。

さらに、金ナノ粒子を固定化した分子認識高分子をセンサー素子として用い、環境ホルモン(アトラジン)の表面プラズモン共鳴法(SPR)による検出について以下のような知見を得た。

(3) メルカプトウンデカン酸で修飾した金ナノ粒子(粒子径:約5nm)を含む重合反応溶液を調製し予めアリルメルカプタンで修飾した金基板を被覆し、さらに加熱することによってセンサー素子が得られた。なお、重合反応溶液は、メタクリル酸(モノマー)、エチレングリコールジメタクリレート(架橋剤)、ジメチルホルムアミド(希釈剤)、アトラジン(鑄型分子)、AIBN(重合開始剤)を混合したものである。このセンサー素子を装着したSPRセンサー装置を用いて、アセトニトリル中でアトラジンの検出を行ったところ、約5pMまでのアトラジンが検出可能であり、極めて高感度な低分子量脂溶性化合物用センサーが構築されたことがわかった。

(4) アトラジン以外の農薬(アシュラム、クロロピリホスなど)について、同様の検出を試みたところ、いずれもアトラジンと比較してその応答値は小さく、鑄型分子として加えたアトラジンに対して選択的応答を示すことがわかった。また、アトラジンを鑄型分子として加えなかったセンサー素子についても評価を行ったところ、感度・選択性ともに大きく劣るという結果が得られ、鑄型重合法(分子インプリンティング)が有用であることが示唆された。

以上の研究成果を踏まえ、現在の基礎研究及び商業レベルでのSPRセンサーの進展(小型化など)を鑑みると、本研究成果により、医薬品分析、環境分析、食品分析などにおいて、種々のハイスループット・オンサイト分析を高感度・高選択的に行うことが可能になるものと考えられる。

#### 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4件)

(1) J. Matsui, M. Takayose, K. Akamatsu, H. Nawafune, K. Tamaki, N. Sugimoto  
Molecularly Imprinted Nanocomposites for Highly Sensitive SPR Detection of a Non-aqueous Atrazine Sample  
Analyst (査読有り) 134, 2009, 80-86.

(2) T. Tsuruoka, S. Samitsu, T. Aokata, J. Matsui, T. Murashima, K. Akamatsu, H. Nawafune  
Preparation and Characterization of Au Nanoparticle/Polymer Composite Photonic Crystals  
Trans. MRS-Japan (査読有り) 33, 2008,

717-720.

(3) T. Murashima, K. Hayata, Y. Saiki, J. Matsui, D. Miyoshi, T. Yamada, T. Miyazawa, N. Sugimoto  
Synthesis, Structure and Thermal Stability of Fully Hydrophobic Porphyrin-DNA Conjugates  
Tetrahedron Lett. (査読有り) 48, 2007, 8514-8517.

(4) J. Matsui, S. Goji, T. Murashima, D. Miyoshi, S. Komai, A. Shigeyasu, T. Kushida, T. Miyazawa, T. Yamada, K. Tamaki, N. Sugimoto  
Molecular Imprinting Under Molecular Crowding Conditions: an Aid to the Synthesis of a High-capacity Polymeric Sorbent for Triazine Herbicides  
Anal. Chem. (査読有り) 79, 2007, 1749-1757.

[学会発表] (計 6 件)

(1) 戸田勲、村嶋貴之、松井淳、縄舟秀美、赤松謙祐  
粒子分散ポリマーナノコンポジット薄膜の作製  
日本化学会第 89 春季年会 (2009 年 3 月、日本大学船橋キャンパス)

(2) 畠山智之、松井淳、玉置克之、杉本直己  
ラショナル・ランダム融合設計による ATP センサーペプチドの構築  
第 3 回 バイオ関連化学合同シンポジウム (2008 年 9 月、東京工業大学すずかけ台キャンパス)

(3) 松井淳、駒居諭、玉置克之、杉本直己  
NanoBioNow(14) 可逆的架橋により構築された分子インプリントペプチドによる ATP の認識  
日本化学会第 88 春季年会 (2008 年 3 月、立教大学池袋キャンパス)

(4) 高寄めぐみ、松井淳、赤松謙祐、縄舟秀美、玉置克之、杉本直己  
ナノコンポジット材料を用いる内分泌攪乱化学物質の SPR センシング  
第 22 回 生体機能関連化学シンポジウム (2007 年 9 月、東北大学多元物質科学研究所)

(5) 駒居諭、松井淳、玉置克之、杉本直己  
可逆的架橋反応を用いるペプチド分子内インプリンティングによる ATP レセプターの構築  
第 22 回 生体機能関連化学シンポジウム (2007

年 9 月、東北大学多元物質科学研究所)

(6) 松井淳、高寄めぐみ、赤松謙祐、縄舟秀美、玉置克之、杉本直己  
生体機能性高分子ナノコンポジットによる神経伝達物質のセンシング  
第 17 回 バイオ・高分子シンポジウム (2007 年 7 月、上智大学中央図書館棟)

[図書] (計 1 件)

竹内俊文、菱谷隆行、松井淳  
バイオセンサーの先端科学技術と応用 (第 I 編第 8 章 分子インプリント材料を分子認識素子として用いたセンサー)  
シーエムシー出版、2007、pp. 77-91.

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
松井 淳 (MATSUI JUN)  
甲南大学・理工学部・准教授  
研究者番号: 10264954

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者