

平成22年6月1日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700377
 研究課題名（和文） 貴金属ナノ粒子—刺激応答性高分子複合材料を用いた簡易診断用バイオセンサーの研究
 研究課題名（英文） Noble metal nanoparticle-stimuli responsive polymer composite-based biosensor for medical diagnostics
 研究代表者
 遠藤 達郎（ENDO TATSURO）
 東京工業大学・大学院総合理工学研究科・助教
 研究者番号：40432017

研究成果の概要（和文）：

近年の高齢化社会に向けた在宅医療サービスの向上および生活習慣病予防、予後、健康維持・管理を実現するため、簡便かつ短時間に生体情報の取得が可能な簡易診断用バイオセンサーが求められている。そこで本研究では金や銀など貴金属ナノ粒子より発現される光学特性である局在表面プラズモン共鳴（Localized surface plasmon resonance: LSPR）とイオン強度や温度等外部環境の変化に対して膨潤・収縮特性を示す刺激応答性高分子との複合材料の基礎特性について評価を行い、簡易診断用バイオセンサーの構築を行った。

研究成果の概要（英文）：

For realization of more-simplified biosensor for home medical care application, novel concept of biosensor should be developed. In this study, for development of novel biosensor for future medical diagnostics, noble metal nanoparticle-stimuli-responsive hydrogel composite was focused. Noble metal nanoparticles such as gold and silver can be observed localized surface plasmon resonance (LSPR). LSPR is nonlinear optical characteristics which can be observed specific color with naked eye. Using LSPR characteristics for development of biosensor, determination of target molecules can be performed using simple optical experimental setup. For fabrication of LSPR-based biosensor using noble metal nanoparticles-stimuli-responsive hydrogel composite, in this study, evaluation of basic characteristics such as optical characteristics and stability were carried out. As a result, noble metal nanoparticles-stimuli-responsive hydrogel composite have a high usability for development of biosensor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：在宅医療、貴金属ナノ粒子、バイオセンサー、刺激応答性高分子

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に向けた在宅医療サービスの向上および生活習慣病予防、予後、健康維持・管理、そして在宅医療において糖尿病や癌、肝炎、インフルエンザ、ヒト免疫不全症候群(HIV)等の様々な病態の把握・疾病予防技術の開発は健康研究において重要な研究課題である。そこで、簡便かつ短時間に生体情報の取得が可能なバイオセンサーは大きく健康維持増進に寄与することが可能であると考えられる。しかし、現在の主たる診断技術・装置ならびにバイオセンサーは疾病の指標となるマーカー分子を検出・定量するために専門の分析機関に分析依頼をする必要があり、結果が得られるまでに長い分析期間と高額な分析費用を要する。これは被験者にとって結果が得られるまでの精神的不安および費用面での金銭的な不安をおおることとなる。これら不安を払しょくすることが可能なバイオセンサーの開発は急務である

一方で、簡便かつ短時間にマーカー分子の検出・定量を行うために簡易診断用バイオセンサーが世界的に研究され、製品化もされているが感度・定量性に乏しく、検出可能なマーカー分子に限界があるのが現状である。よって従来の簡易診断用バイオセンサーとは異なり、多岐にわたるマーカー分子を高感度かつ簡便に検出・定量可能な簡易診断用バイオセンサーが求められている。

2. 研究の目的

簡便かつ安価、短時間に疾病マーカー分子を検出・定量可能なバイオセンサーは将来の医療分野のみならず、食品衛生検査や、環境計測等幅広い分野への応用が可能である。そこで、本研究では金や銀などの貴金属ナノ粒子より発現される光学特性である局在表面プラズモン共鳴 (Localized surface plasmon resonance: LSPR) より観察される色彩とイオン強度や温度等外部環境の変化に対して特異的に膨潤・収縮特性を示す刺激応答性高分子とを複合させた複合材料に着目し、この複合材料を用いた簡易診断用バイオセンサーの構築を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

LSPR は単一の貴金属ナノ粒子より励起可能であり、その光学特性は周囲の屈折率に応じて異なる。そして、LSPR の特筆すべき点の一つとして、可視領域中においてバルク貴金属とは異なる特異的な吸収帯 (色彩) が観察されることである。この色彩を利用したバイオセンサーを構築することで、目視にて測

定対象物質を検出・定量可能となる。

しかし、貴金属ナノ粒子は分散媒中で容易に凝集してしまう。これでは、測定対象物質の検出・定量を困難なものとし、汎用性・可搬性に優れない。そこで、貴金属ナノ粒子をイオン強度や温度等外部環境の変化に対して膨潤・収縮特性を示す刺激応答性高分子中へ包含させた複合材料を創製し、バイオセンサー構築に用いることとした (図 1)。

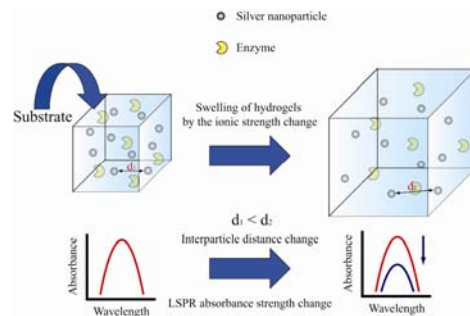


図 1 貴金属ナノ粒子-刺激応答性高分子複合材料を用いたバイオセンサー検出原理

本研究ではバイオセンサー構築に以下の項目について検討を行った。

- (1) 貴金属ナノ粒子の特性評価
- (2) 貴金属ナノ粒子-刺激応答性高分子複合材料の調製と特性評価
- (3) 複合材料への生体認識素子固定化とバイオセンサーへの応用

4. 研究成果

(1) 貴金属ナノ粒子の特性評価

本研究では、バイオセンサー構築に使用する貴金属ナノ粒子に保護層として PVP(Poly Vinyl Pyrrolidone)を被覆した粒径 20 nm の銀ナノ粒子を用いた。PVP 保護銀ナノ粒子は波長 408 nm に LSPR による吸収ピークが観察される。また PVP にて被覆することで高い分散性、安定性を維持することが可能となる (図 2)。

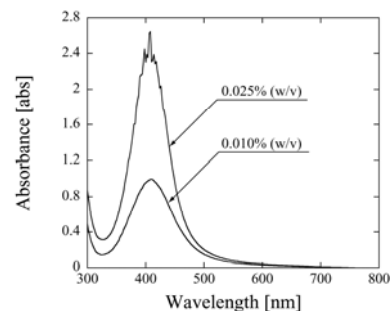


図 2 PVP 保護銀ナノ粒子の LSPR 光学特性

なお、本研究で使用した PVP 保護銀ナノ粒子は、室温化において高い安定性を有するが、DNA など生体分子と複合化させることで、さらに高い温度安定性を有することが観察された。また、PVP 保護銀ナノ粒子は過酸化水素に対して顕著な LSPR 光学特性変化を示すことが観察され、活性酸素種の定量にも有用であることが示された (図 3)。

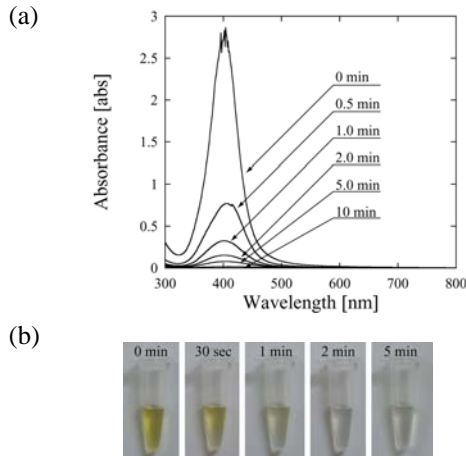


図 3 PVP 保護銀ナノ粒子の過酸化水素に対する(a)LSPR 光学特性変化と(b)色彩変化

(2) 貴金属ナノ粒子-刺激応答性高分子複合材料の調製と特性評価

PVP 保護銀ナノ粒子を刺激応答性高分子中へ包含させるため、本研究では刺激応答性高分子として外部のイオン強度変化に対して膨潤・収縮挙動を示す Polyacrylamide (PAA) を使用することとした。PVP 保護銀ナノ粒子を包含させた PAA は簡便かつ安価に調製することが可能であり、調製する際に PAA 濃度および PVP 保護銀ナノ粒子濃度を調整することで任意の LSPR 光学特性を得ることが可能である (図 4)。

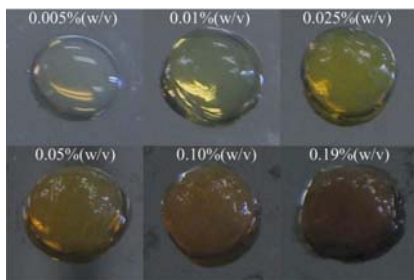


図 4 異なる濃度に調製した銀ナノ粒子-刺激応答性高分子複合材料の外観写真

(3) 複合材料への生体認識素子固定化とバイオセンサーへの応用

調製した銀ナノ粒子-刺激応答性複合材料を用いてバイオセンサーへの応用を行った。バイオセンサーへの応用に本研究ではモデ

ル実験として血糖値の指標となるグルコースを検出・定量可能なバイオセンサーを作製した (図 5)。

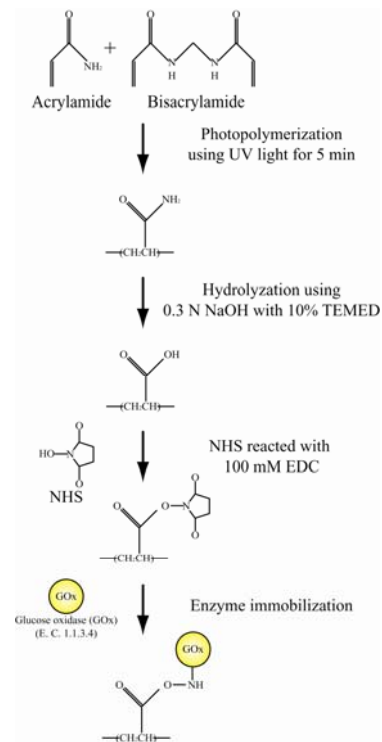


図 5 バイオセンサー作製手順

本研究で作製したバイオセンサーはグルコースに対して特異的に認識するグルコース酸化酵素(Glucose oxidase: GOx)を生体認識素子として用いることとし、銀ナノ粒子-刺激応答性高分子複合材料中へ固定化することでバイオセンサーとした。なお、作製したバイオセンサーは分光光度計を用いて特性評価を行うこととした (図 6)。

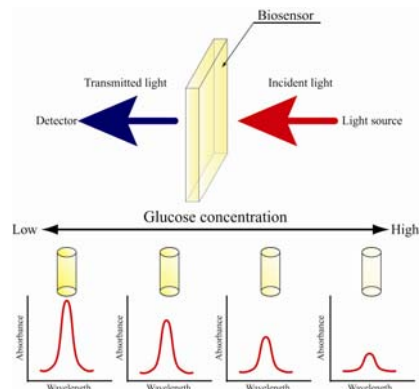


図 6 バイオセンサーの特性評価概略図

銀ナノ粒子-刺激応答性高分子複合材料を用いたバイオセンサーは、認識素子として GOx を固定化したことで、試料中のグルコー

スのみを特異的に認識し、高い選択性を有することが観察された (図 7)。また、グルコース溶液をバイオセンサーへ滴下することで、顕著な LSPR 吸収強度の減少が観察された (図 8)。これは、酵素反応によって過酸化水素が生成され、銀ナノ粒子を酸化させたためと考察される。

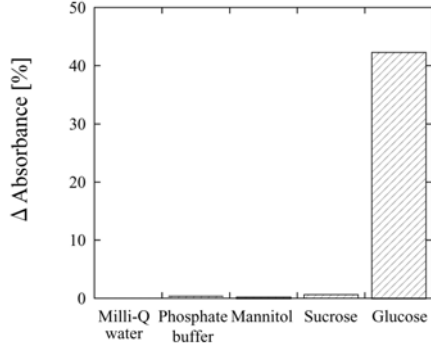


図 7 作製したバイオセンサーの選択性

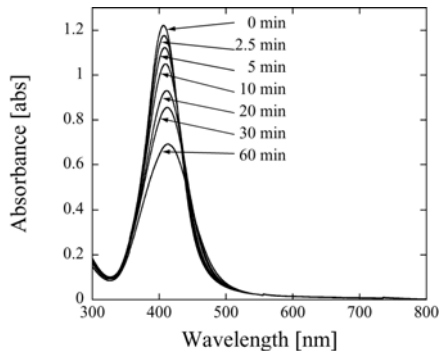


図 8 1 mM グルコース溶液に対する LSPR 光学特性変化

そして、作製したバイオセンサーは中性領域で高い酵素活性を示すことが観察されたとともに (図 9)、異なる濃度のグルコース溶液に対する LSPR 光学特性変化の観察を行った結果、グルコース濃度に依存した LSPR 光学特性変化を観察することができ (図 10)、検出限界は 1 pM であった (図 11)。この検出限界は血中や涙液中のグルコース濃度よりもはるかに低濃度のグルコースを検出可能であることが示唆された。

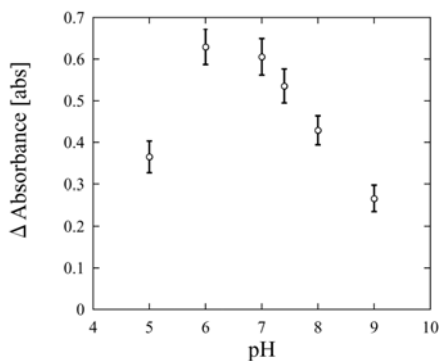


図 9 バイオセンサーの pH 依存性

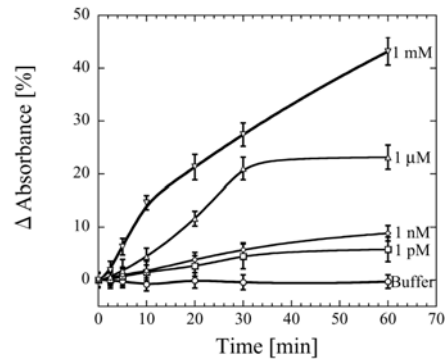


図 10 異なるグルコース濃度に対する LSPR 光学特性の経時変化

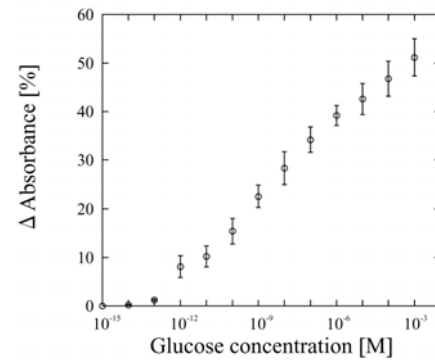


図 11 バイオセンサーの検量特性

本研究にて作製したバイオセンサーは、PVP 保護銀ナノ粒子より観察される色彩を利用し、測定対象物質の検出・定量を実現するものである。この色彩は、測定対象物質の濃度に応じて変化することが目視でも観察可能であり、特定の測定系を必要とせずに検出・定量が可能であることが示唆された。

以上の結果から、本研究によって得られた成果は将来の在宅医療において簡便に個人の健康状態の維持・管理を可能にする技術として応用可能であると考えられる。

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 3 件)

① T. Endo, Y. Yanagida, T. Hatsuzawa "Enhancement of thermal properties of polyvinylpyrrolidone (PVP)-coated silver nanoparticles by using plasmid DNA and their localized surface plasmon resonance (LSPR) characteristics" NanoBiotechnology, Vol. 4(1-4), 2009, pp 36-42. 査読有

② T. Endo, Y. Yanagida, T. Hatsuzawa, "Quantitative determination of hydrogen peroxide using polymer coated Ag nanoparticles" Measurement, Vol. 41(9), 2008, pp 1045-1053. 査読有

③T. Endo, R. Ikeda, Y. Yanagida, T. Hatsuzawa
“Stimuli-responsive hydrogel-silver nanoparticles
composite for development of localized surface
plasmon resonance based optical biosensor”
Analytica Chimica Acta, Vol. 611(2), 2008, pp
205-211. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

①T. Endo, Y. Yanagida, T. Hatsuzawa
“Development of localized surface plasmon
resonance based reactive oxygen species ROS
detection method using silver nanoparticles”
International Topical Meeting on Information
Photonics 2008, 2008年11月19日, 淡路夢舞
台国際会議場

②T. Endo, Y. Yanagida, T. Hatsuzawa,
“Enhancement of thermal properties of
polymer-coated noble metal nanoparticles using
plasmid DNA” Pacific Rim Meeting on
Electrochemical and Solid-State Science
(PRiME 2008), 2008年10月14日, 米国 ハ
ワイ

③遠藤達郎、柳田保子、初澤毅、高分子保護
銀ナノ粒子の熱耐性を利用した DNA 定量法
の開発、第2回化学センサー・バイオセ
ンサーおよび計測技術合同ワークショ
ップ、2008年9月3日、幕張メッセ 国際
会議場

④T. Endo, Y. Yanagida, T. Hatsuzawa,
“Stimuli-responsive hydrogel assisted silver
nanoparticles for development of localized
surface plasmon resonance based optical enzyme
biosensor” Biosensors 2008, 2008年5月14
日, 中国 上海

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 達郎 (ENDO TATSURO)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・
助教

研究者番号：40432017

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし