

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590048

研究課題名（和文）分子インプリントポリマーを感応素子とした針状微小電位検出型人工免疫センサーの開発

研究課題名（英文）Development of Needle-type Ultra Micro Potentiometric Immunosensor Using Artificial Antibody Based on Molecularly Imprinted Polymer

研究代表者

北出 達也（KITADE TATSUYA）

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10161481

研究成果の概要（和文）：ヒスタミンをモデル物質に選び、それを鋳型分子とした分子インプリントポリマーを人工抗体とした電位検出型人工免疫センサーの開発を行った。棒状のグラファイト電極をトランスデューサーとし、その表面に形成させたプラズマ重合薄膜に分子インプリントポリマーを含浸させることによって針状のセンサーを作成した。このセンサーの性能評価を行ったところ、ヒスタミンに対して高い選択性・特異性を有していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：A potentiometric artificial immunosensor was developed by using artificial antibody based on molecularly imprinted polymer using histamine as a model template. The sensor consists of a rod-type graphite electrode functioning as a transducer and molecularly imprinted polymer absorbed in the plasma-polymer thin layer functioning as a sensing element. The sensor was found to have superior selectivity and specificity to histamine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・分析化学

キーワード：分子インプリントポリマー、プラズマ重合膜、免疫センサー、ヒスタミン

1. 研究開始当初の背景

(1)本研究の学術的背景

国内・国外の研究動向及び位置づけ

分子インプリントポリマーを認識部位として用いた人工免疫センサーはトランスデューサーとして表面プラズモン共鳴法や水晶振動子マイクロバランス法の応用が試みられている。しかし、実用化レベルには達しておらず、またこれらのセンサー構造が複雑なため微小化や集積化は困難である。一方、電位検出型の

人工免疫センサーは原理、構造とも単純で応用範囲も広いため開発が期待されているが、分子インプリントポリマーが電気不導体であるため認識部位として用いた場合、表面電位の変化を測定することが困難であり開発が試みられた例はない。実用化可能な性能を持った電位検出型人工免疫センサーが開発されたのは本センサーが国内外を問わず初めてである。

“Potentiometric Immunosensor Using

Artificial Antibody Based on Molecularly Imprinted Polymers” Tatsuya Kitade, Keisuke Kitamura, (他7名、1番目) *Analytical Chemistry*, 査読有, 22, 6802-6807(2004).

特許公開番号：特開2006-28467。 発明の名称：モレキュラーインプリントポリマー及びそれを用いる電位検出型人工免疫センサー。 出願人：北出達也。 発明者：北出達也，北村桂介。

着想に至った経緯

免疫センサーは高感度、高特異的で産業や医療の分野への応用が期待されている。しかし、現在研究されている免疫センサーはいずれもトランスデューサーや検出部の小型化、集積化が困難で、生物抗体を用いるために適用できる化学種が限られており、高価で不安定なため取り扱い難いなどの改善点を持っている。そこで免疫センサーの感応素子として分子インプリントポリマー（人工抗体）を用いれば生物抗体の使用による改善点を克服できると考えた。さらに電位検出型の免疫センサーでは、その構造が単純なため小型化さらに微小化やマイクロマルチアレイ化が可能であると考えられる。そこで、分子インプリントポリマーを感応素子とした電位検出型人工免疫センサーを開発した。本研究では開発したセンサーを超微小化し、微小領域における化学種の種類や量をリアルタイムに計測できる新規な技術に応用したり、また多項目同時迅速測定可能なセンサーを実用化したく本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(1)全体構想および目的

構造が単純で微小化が可能な反面、実用化が困難である電位検出型免疫センサーの感応素子に人工抗体とも呼ばれる分子インプリントポリマーを応用し、またインターフェイスとしてプラズマ重合超薄膜を応用することにより、針状微小電位検出型人工免疫センサーを開発し、研究分野、産業分野、医療分野に貢献する。より具体的な目的を以下に記す。

微小領域における化学種の種類や量のリアルタイム計測を可能とする針状超微小センサーを開発する。 簡便迅速な非分離一斉分析を可能とするマイクロマルチアレイセンサーを開発する。 本センサーを応用し、簡便迅速な血液検査方法を開発する。

(2)本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

学術的な特色

比較的新しい技術である、分子インプリントポリマーとプラズマ重合法を駆使することにより、実用性能を有する針状微小電位

検出型免疫センサーを開発し、新たな研究の分野や医療の分野に貢献するところに学術的な特色を有する。

独創的な点

従来、開発が困難であるとされていた電位検出型免疫センサーにおける開発の難点を下記の独創性により克服することにより作製を可能とし、特許を取得した。 特開2006-28467。 発明の名称：モレキュラーインプリントポリマー及びそれを用いる電位検出型人工免疫センサー。 出願人：北出達也。 発明者：北出達也，北村桂介。

- 分子インプリントポリマーを適度な導電性を持ったプラズマ重合超薄膜に含浸固定化することにより導電性を持った認識部位が得られ、認識部位の表面電位測定を可能とした。
- プラズマ重合超薄膜に分子インプリントポリマーを含浸固定化することにより、認識部位の超薄膜化および膜厚のコントロールを可能とした。その結果、応答速度の迅速化、安定電位の取得が可能となった。
- トランスデューサーの素材であるグラファイトに対して、高付着性、高密着性を持ち、かつ堅牢なプラズマ重合膜をインターフェイスとして積層することにより、ノイズの軽減や電位応答性能の向上、耐久性の向上、および繰返し使用を可能とした。

予想される結果と意義

- 生体内の局所やリポソーム内部などの超微小領域における化学物質の量的な経時変化をリアルタイム計測できるようになるなど、本法は多くの研究分野に貢献できる。
- 本センサーの認識部位である分子インプリントポリマーが、原理的にほとんどの有機化合物を認識対象物とすることが可能なため、単一のセンシングメカニズムにより従来よりはるかに多種類の有機化合物を分析目的対象物とすることが可能となり、センシング可能な化学種が格段に広がり、新たなセンサーの開発研究に貢献できる。
- 本センサーの機構や構造が単純なためセンサーの微小化や異なったセンサーのマルチアレイ化が可能となり、その結果、多項目同時迅速測定が可能となり、多くの研究分野に貢献できる。

3. 研究の方法

(1)研究体制

研究代表者と学部学生6名が研究の立案・計画・実施を行う。

(2)センサーの作製方法

トランスデューサーとなる棒状の炭素電極表面にインターフェイスとしてエチルベンゼンをモノマーとしたプラズマ重合膜を形成した。次にプラズマ重合膜内部に鑄型分子としてヒスタミン、鑄型分子の官能基と相互

作用する官能基を有する機能性モノマーとしてメタクリル酸、架橋性モノマーとして2-メタクリル酸エチレンを含浸した後、加熱重合した。その後、ポリマーから鑄型分子を除去し、プラズマ重合膜内部に分子インプリントポリマーを含浸固定化した、分子インプリントポリマーを感応素子としたセンサーを作製した。

4. 研究成果

(1) ヒスタミンセンサーの性能評価

ヒスタミンをヒスタミンセンサーに添加した時の電位変化が、鑄型分子であるヒスタミンが作製した分子インプリントポリマー(MIP)の鑄型へ結合していることに基づくものであるかということを確認することを目的に、ヒスタミンセンサーだけでなく、ブランクセンサー、プラズマ重合膜、グラファイトに対する応答生について検討した。ヒスタミンセンサーの性能を評価する化学種としては鑄型分子であるヒスタミン、ヒスタミンと構造が類似する2-アミノベンズイミダゾールおよびピロール、ヒスタミンの水/オクタノール分配係数($\log P$)と近似した $\log P$ 値を有するリシンを用いた。それら化学種の構造および $\log P$ 値をFig. 1に示す。

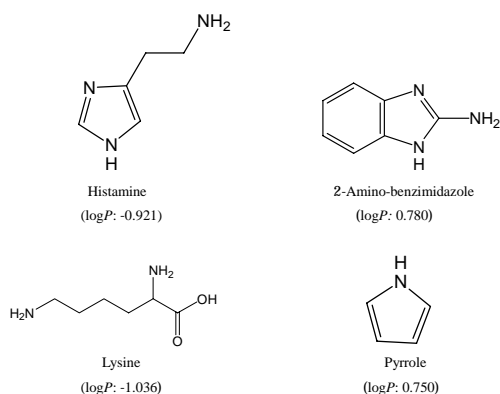


Fig.1 Chemical structures and $\log P$ values of the chemical species used in this study.

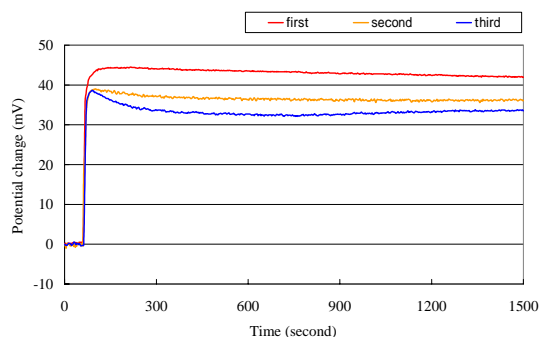


Fig.2 Response curves of histamine sensors to histamine. Concentration of test solution ; 1×10^{-4} mol/L. (n=3)

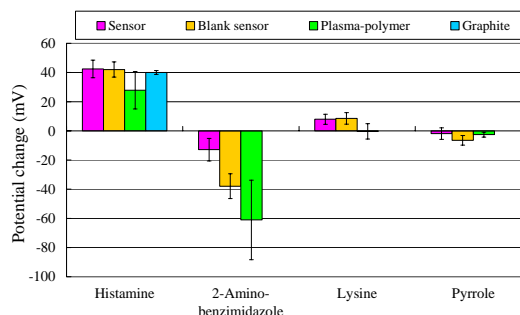


Fig.3 Potential changes of histamine sensor^{a)}, blank sensor^{a)} and graphite covered with plasma-polymer membrane^{a)} and graphite^{b)} to histamine, 2-amino-benzimidazole, lysine and pyrrole. Concentration of test solution; 1×10^{-4} mol/L. a) n=9, b) n=3.

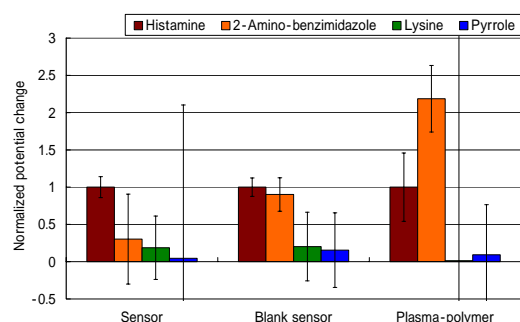


Fig.4 Comparison of selectivity among histamine sensor, blank sensor and graphite covered with plasma-polymer membrane. Concentration of test solution ; 1×10^{-4} mol/L. (n=9)

ヒスタミンセンサーにヒスタミンを添加したときの電位の経時変化を Fig.2 に示す。ヒスタミン添加直後に電位は約 40 mV 上昇し、その後安定した電位を示した。

ヒスタミンセンサー、ブランクセンサー、プラズマ重合膜でコーティングしたグラファイト、グラファイトに、ヒスタミン、2-アミノベンズイミダゾール、リシン、ピロールをそれぞれ添加したときの電位変化を Fig.3 に示す。さらに、Fig.4 には各センサーやグラファイトの選択性能を比較するため、それぞれヒスタミン添加時の電位変化を基準とし、ヒスタミン以外の化学種添加時の電位変化をヒスタミン添加時の電位変化に対する割合として示した。

Fig.3 より、プラズマ重合膜でコーティングしたグラファイトにヒスタミンを添加したときの電位変化は、グラファイトにヒスタミンを添加したときの電位変化より少し抑えられているものの、ヒスタミンセンサー及びブランクセンサーにおける電位変化はグラファイトに対しての電位変化と同程度であり、有意差はなかった。このこと

より、鑄型分子の除去が十分にできておらず、鑄型が十分に作製できていなかったことが考えられた。そのため、洗浄方法の検討を行う必要があることが示唆された。さらに Fig.4 より、リシンとピロールはいずれの場合に対してもほぼ応答を示さなかった。また、2-アミノベンジミダゾールはプラズマ重合膜やブランクセンサーではヒスタミン以上もしくは同程度の電位変化を示していたのに対して、ヒスタミンセンサーでは顕著に小さくなり、ヒスタミンセンサーが鑄型分子を選択的に認識することが示唆された。しかし、ヒスタミンセンサーはヒスタミンに反応してはいるが、グラファイト、プラズマ重合膜でコーティングしたグラファイトに対してもヒスタミンが反応しておりその電位変化に大きな差が見られなかった。電位変化の大きさや選択性はMIP を含浸させていないときと比較して優れてはいるが、センサーとしての十分な機能を有しているとは言えなかった。そのため、センサーの性能を検討するためには、グラファイトやプラズマ重合膜に反応し難い化学種を鑄型分子に選ぶ必要があると考え、探索することとした。

(2)適切な鑄型分子の探索

前章のヒスタミンセンサーでは、ヒスタミンセンサーだけでなく、グラファイト、プラズマ重合膜でコーティングしたグラファイトに対してもヒスタミン添加時に電位変化を示しており、センサーの性能を検討することが困難であった。そこで、機能性モノマーとして分子認識されやすい物質の条件として、水溶性分子である、2環以上である、3個以上の官能基を有するという条件を2つ以上満たす化学種を探索した。その結果、イソニコチノヒドラジド、チアミン、テオフィリンを選び、グラファイトに対する電位変化の小さい化学種を探索した。それぞれの化学構造を、Fig.5 に示す。

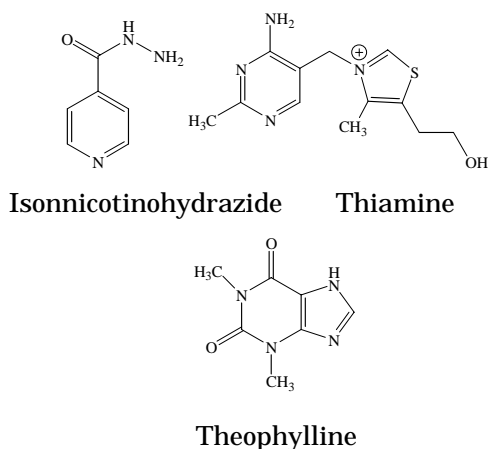


Fig.5 Chemical structures of the chemical species used in this study.
 プラズマ重合膜でコーティングしたグラ

ファイトにイソニコチノヒドラジド、チアミン、テオフィリンを添加したときの測定結果を Fig.6 に示す。イソニコチノヒドラジドとチアミンを添加するとそれぞれ約 80 mV、60 mV と大きな電位変化を示したのに対し、テオフィリンを添加したときはほぼ電位変化を示さなかった。この結果より、テオフィリンはグラファイトやプラズマ重合膜には反応していないということが示唆された。そこで、テオフィリンセンサーを測定したときの電位変化は、鑄型分子のMIP への結合を顕著に見ることができると考え、テオフィリンを鑄型分子としたセンサーを作製し、今回の測定結果と比較して、センサーの性能を検討することとした。

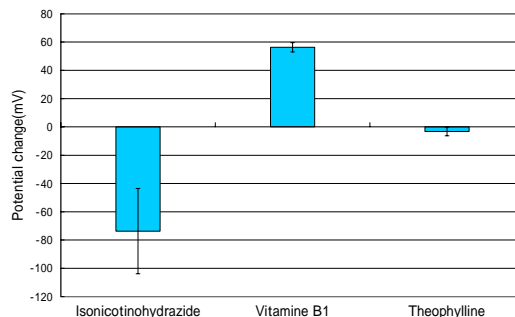


Fig.6 Potential changes of graphite covered with plasma-polymer membrane. Concentration of test solution; 1×10^{-4} mol/L. (n=3)

(3)テオフィリンセンサーの性能評価

テオフィリンを鑄型分子としたセンサーを作製し、テオフィリンセンサーの応答性、再現性、選択性を検討した。テオフィリンセンサーの性能を評価する試薬として、鑄型分子であるテオフィリン、テオフィリンと構造が類似するカフェイン、プリンを用いた。カフェイン、プリンの化学構造を Fig.7 に示す。

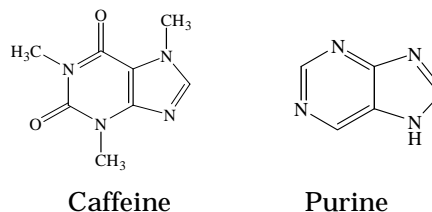


Fig.7 Chemical structures of the chemical species used in this study.

テオフィリンセンサーにテオフィリンを添加したときの電位の経時変化を Fig.8 に示す。その結果、電位変化は約 14 mV であった。また Fig.6 より、プラズマ重合膜でコーティングしたグラファイトにテオフィリンを添加したときほぼ電位変化を示さなかったのに対し、センサーに対する電位変化が大きくなり、MIP にテオフィリンが結合し認識されているということが示唆された。しかし、

電位変化の大きさが、現在の MIP 作製条件ではすこし小さいため、今後は配合する機能性モノマーの量を増やすことで、認識されるテオフィリン量を増やす等、MIP 作製条件の最適化を図り電位変化をより大きくすることが課題となった。

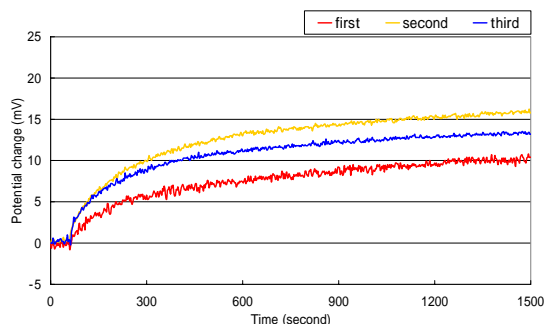


Fig.8 Response curves of theophylline sensor to theophylline. Concentration of test solution; 1×10^{-4} mol/L. (n=3)

次にテオフィリンセンサーにテオフィリン、カフェイン、プリンを添加したときの測定結果を Fig.9 に示す。また、プラズマ重合膜でコーティングしたグラファイトにカフェイン、プリンを添加したときの測定結果を Fig.10 に示す。Fig.9 よりテオフィリンセンサーにプリンを添加時ほぼ電位変化を示さなかったのに対し、テオフィリンとカフェイン添加時には、共にプリン添加時より大きな電位変化を示した。また、Fig.10 よりプラズマ重合膜でコーティングしたグラファイトにカフェイン、プリンを添加したとき、ほぼ電位変化を示さなかった。これと Fig.6 の結果から、テオフィリン、カフェインはグラファイト自体に対してではなく MIP に認識され応答していること、プリンもグラファイト自体にも MIP にも応答しないことが示された。機能性モノマーは鑄型分子の官能基と水素結合することにより認識しており、テオフィリンの場合 2 つのカルボニル基を強く認識し、メチル基やアミノ基はあまり認識へ寄与していないと考えられる。カフェインはテオフィリンと比べてメチル基がひとつ増えているだけであるため、テオフィリンセンサーにそれぞれを添加したとき電位変化にあまり差が見られなかったと考えられる。またプリンには機能性モノマーに強く認識されるカルボニル基を有していないため、ほぼ電位変化を示さなかったと思われる。今後カフェインに対して応答しないテオフィリンセンサーを作製するためには、ほかの化学種に対するの応答を確認するなどの方法で、MIP がどの官能基を認識し電位応答しているのかということをも明らかにする必要がある。さらに、鑄型分子の除去において、当実験では蒸留水・メタノール・THF・アセトンにより行

ったが、そのことにより MIP が溶解し、測定を重ねるごとに MIP がはがれていく傾向が見られた。そのため、センサー作成において蒸留水・メタノールのみで洗浄するのがよいのか、アセトンまで洗浄処理を行うべきか今後再度検討していく必要があると思われる。また、本研究では、センサーの大きさとして、鉛筆の芯程度の太さにまで微小化できなかったが、今後はセンサー性能を向上させることによって、さらに微小化を図りたい。

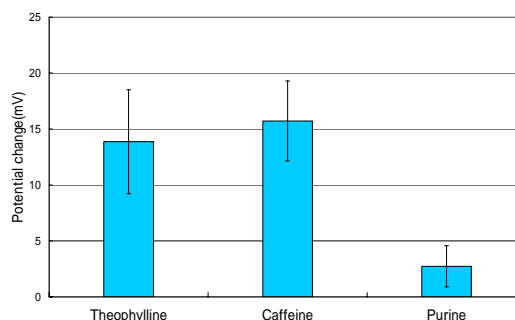


Fig.9 Potential changes of theophylline sensor. Concentration of test solution; 1×10^{-4} mol/L. (n=9)

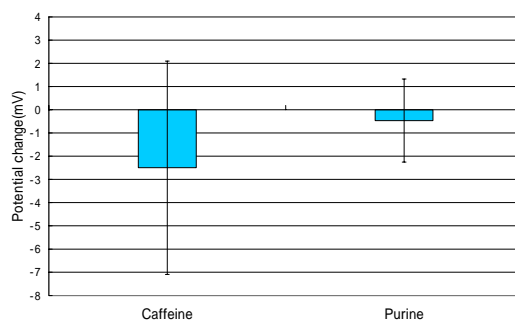


Fig.10 Potential changes of graphite covered with plasma-polymer membrane. Concentration of test solution; 1×10^{-4} mol/L. (n=3)

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)

[学会発表](計3件)

北出達也、分子インプリントポリマーを感応素子としたヒスタミン電位検出型人工免疫センサーの応答性・選択性の検討、第61回日本薬学会近畿支部総会・大会、2011.10.22、神戸

北出達也、分子インプリントポリマーを感応素子としたヒスタミン認識電位検出型人工免疫センサーの開発、日本薬学会第130年会、2010.3.29、岡山

北出達也、ヒスタミン認識電位検出型人工免疫センサーの選択性能、応答性能に機能性モノマーの配合量が及ぼす影響、難病克服を目指した分子基盤創薬科学の開拓 成

果発表会、2010.3.15、京都

〔図書〕(計1件)

北出達也,他:日本薬学会物理系薬学部会・分析化学担当教員会議編集、じほう、薬学分析科学の最前線 第6章センサーによる生体分析-非侵襲的な臨床分析法に応用可能な超微小化学センサーの開発、2009、pp.112-113

6. 研究組織

(1)研究代表者

北出 達也 (KITADE TATSUYA)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号:10161481

(2)研究分担者

研究者番号:

(3)連携研究者

研究者番号: