

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760316

研究課題名 (和文) 抗原応答性ハイドロゲルを用いた匂いセンサの開発

研究課題名 (英文) Development of odor sensor using antigen-responsive hydrogel

研究代表者

小野寺 武 (ONODERA TAKESHI)

九州大学・システム情報科学研究院・助教

研究者番号：50336062

研究成果の概要 (和文)：

抗体と抗原の結合が架橋点となるハイドロゲルを受容膜とした新規の匂いセンサの基本原理の開発を試みた。表面プラズモン共鳴 (SPR) センサと抗原応答性ハイドロゲルを用いた匂いセンサ実現に向けて、親水性ポリマー固定化センサ表面作製方法を確立した。爆薬であるトリニトロトルエン (TNT) に対する抗体を用い、置換反応により TNT の検出が可能であることがわかった。

研究成果の概要 (英文)：

Development of a novel odor sensor was tried using a surface plasmon resonance (SPR) sensor and an antigen-responsive hydrogel. An immobilization protocol of a hydrophilic polymer on the SPR sensor surface was established. The SPR sensor with the sensor surface modified with trinitrotoluene (TNT) analogue via the hydrophilic polymer can detect TNT using an antibody against trinitrotoluene.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,440,000 |
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,010,000 | 4,650,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・計測工学

キーワード：計測工学，センサ，ハイドロゲル，ポリマー，抗原抗体反応

1. 研究開始当初の背景

税関では、爆発物や麻薬を探知する手法の一つとして、訓練された犬 (爆発物探知犬) に匂いを探知させる方法が採用されている。犬による探知は匂い源を追跡できることや高感度などの利点がある。しかしながら、結果が体調や個体差に依存し、信頼性に欠ける、また、犬の訓練に多大な時間と費用がかかるといった問題もある。犬に代わる信頼性の高く小型な新しい探知装置が望まれている⁽¹⁾。

これまでに開発されている匂いを検出するセンサは、酸化半導体式ガスセンサと統計的な分析手法を用いたものや水晶振動子に感応膜を塗布したタイプのものであるが、これらの受容レベルでの選択性は高いとはいえず、安全・安心分野に利用されるためには、感度のみならず選択性を大幅に改善する必要がある。

爆発物からは微量ながら爆薬成分が空气中に漏洩しており、爆発物探知犬は爆薬成分であるトリニトロトルエン (TNT)、ジニトロ

トルエン(DNT)等の匂いを嗅ぎ分けているといわれている。研究代表者は、表面プラズモン共鳴 (SPR) センサと抗原抗体反応を組み合わせ、代表的な爆薬である TNT を高選択かつ検出限界 50 ppt で測定するセンサ表面を開発した⁽²⁾。また、本手法の測定手順を簡略化することで、短時間に ppb レベルで測定する手法を実現した。この手法は抗原の置換反応 (より親和性の高い組み合わせに置き換わり結合する) を用いているため、抗体と抗原 (ターゲットの TNT) 溶液を混合する必要はなく、抗原を流通するだけで測定が可能である⁽³⁾。

近年、機能性高分子の開発が盛んに行われている。温度や pH などの外部環境変化に応答するような高分子である。抗原応答性ハイドロゲルもその一つである。ポリマーに固定された抗原・ポリマーに固定された抗体の結合を架橋点としている。このゲルに、抗原を滴下すると、この抗原はポリマー化抗原と置換し、ポリマー化抗体と結合する。そのため、架橋点でポリマー化抗原とポリマー化抗体の結合が解離することになり、ゲル全体としては膨張することになる⁽⁴⁾。この反応は前述した研究代表者が表面プラズモン共鳴 (SPR) センサで利用している抗原抗体反応の置換反応と同じである。また、研究代表者は TNT 測定における TNT と複合体抗原 (ターゲット類似物質とタンパク質の複合体) を効率よく置換するノウハウを有している⁽⁵⁾。以上より、TNT に応答するハイドロゲル開発の着想を得た。本研究で作製するゲルは、抗体と複合体抗原をポリマー化して、抗原抗体反応により架橋し、低分子である TNT に選択的に応答し膨潤することが特徴となる (図 1)。

SPR センサは、金表面の屈折率の変化に敏感に応答する。そこで、検出部である金表面に本研究で開発を行う抗原 (TNT) 応答性ハイドロゲルを被覆する。抗体と抗原の結合により収縮していたマトリックスが、遊離の抗原が存在することで膨潤する。それとともに密度変化、すなわち密度の高い状態から低い状態への変化を SPR センサにより測定する (図 2)。また、ハイドロゲルは水分が数~数十%を占め、内部での物質拡散・透過性に優れている⁽⁶⁾。湿潤状態を保ちつつ、気

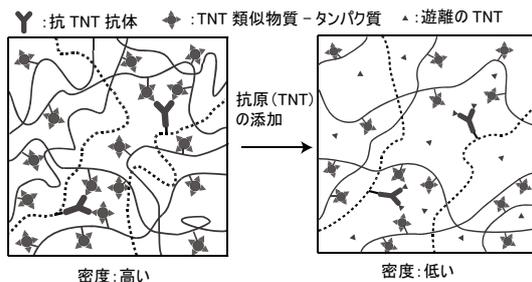


図 1 抗原 (TNT) 応答性ハイドロゲル

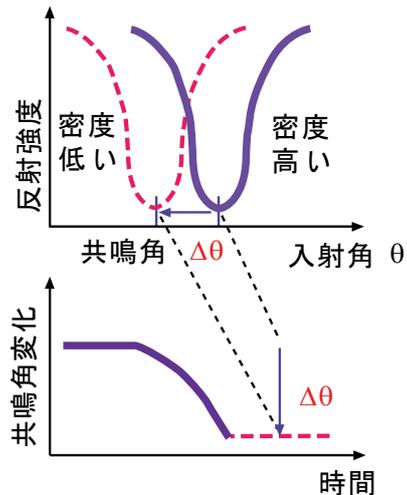


図 2 SPR センサの信号変化

相中でも測定できると考えられる。ポータブルで高感度、迅速に爆薬を気相で検出できる装置のない現在、本センサの実現は、社会の安全・安心に大きく貢献できる。

2. 研究の目的

本研究で作製する抗原 (TNT) 応答性ハイドロゲルは、抗原と抗体の組み合わせを変えることにより他の低分子化合物にも応用可能である。

爆発物探知犬や麻薬探知犬は、化学物質を嗅覚で検出しており、これらターゲットとなっている危険・有害物質は匂い物質と捉えることができる。本研究で作製する抗原 (TNT) 応答性ハイドロゲルは、生物の匂い受容機構に倣って作るものである。

本研究の目標は、水溶液中の TNT に応答し膨潤するハイドロゲルを作製すること、また、SPR センサの金表面上に抗原 (TNT) 応答性ハイドロゲルを固定化し、匂い物質 (TNT) を検出するセンサを実現することである。

3. 研究の方法

採用する複合体抗原の検討および複合体抗原の作製。ニトロ基の数やスペーサーの種類により置換のしやすさが決まるため、結合するハプテンを選択する。

SPR センサに適応するためのハイドロゲル作製の条件として、以下のことが上げられる。ハイドロゲル作製過程で、有機溶媒を使用しない、アミノ基やカルボキシル基など抗体や抗原を固定できる官能基を有する、親水性のゲルである、SPR の有効範囲の 100 nm~

300 nm 程度の膜厚を実現できる、有害性が低い、という条件をクリアするポリマーを選択する必要がある。

ポリマーの作製手順、抗原類似物質のポリマーへの固定化方法、センサ表面へのポリマー導入方法、ポリマーへの抗体固定化方法、ポリマー化した抗体とポリマー化した抗原類似物質の架橋方法、SPR センサにおける測定手順について検討する。

4. 研究成果

計画の段階では、アクリルアミドをポリマー化して、マトリックスとする予定だったが、発がん性が認められているため取り扱いのしやすい代替物質を検討した。文献調査を行い、アクリルアミドの代替材料として考えられる *N*-vinylformamide (NVF) をポリマーの出発物質に決定し、マトリックス作製の方針を確定した。

NVF に水溶性アゾ重合開始剤を加え、個体状の poly(*N*-vinylformamide) (poly(NVF)) を得た。poly(NVF) は有機溶媒に不溶であるが、水に易溶であり、得られた固体を溶解、精製し、凍結乾燥を行い、poly(NVF) を回収した。加水分解により、アミノ基を側鎖に持つ poly(vinylamine) (poly(VAm)) を得た⁽⁷⁾。フーリエ変換型赤外分光 (FT-IR) による分析を行い、一級アミンに起因する吸収を確認した。

ハイドロゲル形成には、SPR 測定装置の金表面側と抗体側をポリマー化する必要がある。金センサ表面に 16-メルカプトヘキサデカン酸により、カルボキシル基末端の自己組織化単分子膜を形成した。カルボキシル基を活性化し、poly(VAm) をアミンカップリングにより固定化した。平行して、ト

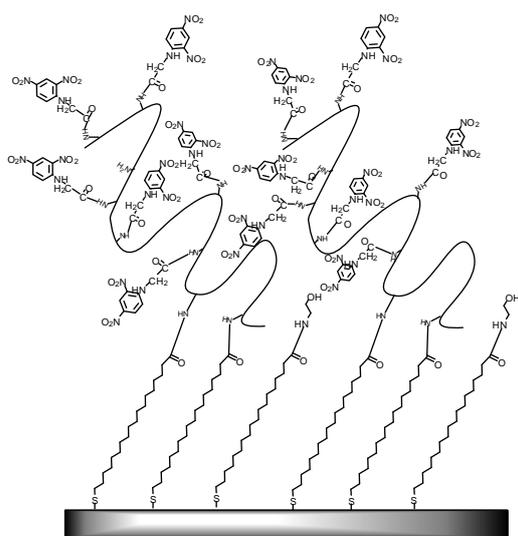


図3 Poly(VAm)固定化センサ表面

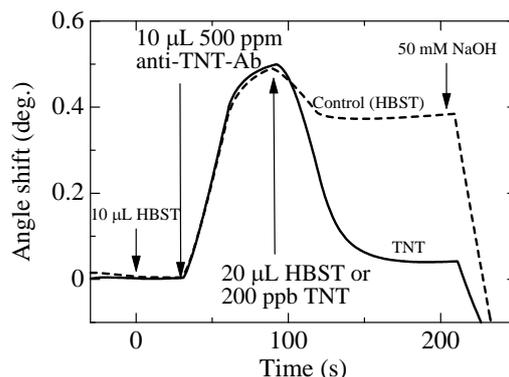


図4 SPR センサ応答

リニトロトルエン (TNT) の類似物質であるジニトロフェニルグリシン (DNP-gly) のカルボキシル基を活性化し、アミンカップリングにより Poly(VAm) を固定化した (図3)。そのセンサチップを用いて、抗 TNT 抗体の結合性を調べた。その結果を図4に示す。従来得られていた抗体結合量の 3~5 倍程度となった。また、TNT により結合した抗 TNT 抗体を置換反応により解離でき、poly(VAm) は、抗原抗体反応の反応の場として、有効に利用できることがわかった。

一方、poly(VAm) と抗体の結合は、抗体の糖鎖を用いるなど配向性を考慮した結合が必要であることがわかった。抗原応答性ハイドロゲルを用いた匂いセンサ実現に向けて、ハイドロゲル固定化センサ表面作製方法を確立することができた。

今後は、抗原応答性ハイドロゲルのセンサ表面の導入を行い、気相中の TNT の測定の実現と高感度化を行っていく予定である。

参考文献

- (1) 小野寺武, 都甲潔, 松本清, 三浦則雄: “セキュリティ用超高感度においセンサの開発”, 検査技術, Vol.12, pp.36-42 (2007)
- (2) Y. Mizuta, T. Onodera, P. Singh, K. Matsumoto, N. Miura and K. Toko: “Development of an Oligo(ethylene glycol)-based SPR Immunosensor for TNT Detection”, Biosensors and Bioelectronics, Vol.24, pp.191-197 (2008)
- (3) T. Onodera, K. Horikawa, P. Singh, N. Miura, K. Matsumoto and K. Toko: “Development of electronic dog nose based on SPR immunosensor using displacement method for detection of 2,4,6-trinitrotoluene”, International

Symposium on Olfaction and Electronic Noses (ISOEN) 2007 Book of abstracts, pp.51-52, (2007)

- (4) 浦上忠, 宮田隆志: “新規な抗原応答性高分子ヒドロゲルの調整とその物質透過制御機能”, 高分子加工, Vol. 29, pp.530-536 (2000)
- (5) 特願 2006-236294, TNT 測定方法, 及び TNT 測定装置, 発明者 小野寺武 都甲潔, 出願人 国立法人九州大学
- (6) 市川秀樹, 福森義信, “ナノハイドロゲルを利用したペプチドの特殊放出制御型マイクロカプセルの設計”, 薬学雑誌, Vol.127, pp.813-823 (2007)
- (7) K. Yamamoto, Y. Imamura, E. Nagatomo, T. Serizawa, Y. Muraoka, M. Akashi : "Synthesis and Functionalities of Poly (*N*-vinylalkylamide). XIV. Polyvinylamine Produced by Hydrolysis of Poly (*N*-vinylformamide) and Its FunctionalizationJ. Applied Polymer Science, Vol. 89, pp.1277-1283 (2003)

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

- (1) **小野寺武**, 都甲潔: “抗原応答性ヒドロゲルを用いた SPR センサによる TNT の検出”, 第 58 回応用物理学関係連合講演会 講演予稿集, 25p-CB-5, p.12-199 (2011 年 35 月 25 日神奈川工科大学で口頭発表予定だったが東日本大震災の影響で中止)

[その他]

<http://ultrabio.ed.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 武 (ONODERA TAKESHI)

九州大学・システム情報科学研究院・助教

教

研究者番号 : 50336062