

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23686062

研究課題名(和文) 抗原応答性ハイドロゲルに基づく匂いセンサの高感度化とその応用

研究課題名(英文) Development of odor sensor based on antigen-responsive hydrogel and its applications

研究代表者

小野寺 武 (Onodera, Takeshi)

九州大学・味覚・嗅覚センサ研究開発センター・准教授

研究者番号：50336062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,400,000円、(間接経費) 5,220,000円

研究成果の概要(和文)：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、親水性ポリマーを固定化したSPRセンサ表面の作製方法を確立した。爆薬であるトリニトロトルエン(TNT)やRDX、催涙剤の成分であるカプサイシノイドの検出を行った。TNTに対しては、表面開始原子移動ラジカル重合によりポリマー層を構築したセンサ表面を用いて、間接競合法により、検出限界5.7 pptとなった。置換法では、0.4 ppbが得られた。RDXとカプサイシンについては、オリゴエチレングリコールを有する自己組織化単分子膜を用いたセンサ表面で、それぞれ40 ppt, 150 ppbが得られた。

研究成果の概要(英文)：To realize odor sensor based on antigen-responsive hydrogel, sensor surfaces modified with hydrophilic polymer were developed for surface plasmon resonance (SPR) sensor. Explosives such as trinitrotoluene, RDX, component of lachrymator, capsaicinoids, were measured using the sensor surfaces. The limit of detection (LOD) for TNT was 5.7 ppt (pg/mL) by indirect competitive method on the polymer surface formed with surface initiated-atom transfer radical polymerization. LOD of 0.4 ppb (ng/mL) for TNT was achieved by displacement method. LOD for RDX and capsaicinoids were 40 ppt and 150 ppb, respectively, using the sensor surfaces modified with self-assembled monolayer containing oligo(ethyleneglycol) by indirect competitive method.

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：センシングデバイス バイオセンサ ハイドロゲル 抗原抗体反応 匂いセンサ 表面開始原子移動ラジカル重合 表面プラズモン共鳴

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまでに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トリニトロトルエン (TNT) を高選択かつ短時間に ppb レベルで測定可能な手法を提案した。この手法は抗原の置換法 (より親和性の高い組み合わせに置き換わり結合する) を用いるため、短時間で測定が可能である。

一方、近年、温度や pH などの外部環境変化に応答するようなポリマーの開発が盛んに行われている。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とポリマーに固定された抗体の結合が架橋点となるゲルである。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る。その結果、ゲル全体としては膨潤することになる。この反応は研究代表者が SPR センサの測定で利用した置換法と同様の原理であり、匂い物質に応答するハイドロゲル開発の着想を得るに至った。

2. 研究の目的

本研究では、抗原応答性ハイドロゲルを用いたセンサ表面を実現するため、ポリマー作製手法およびそれらを用いたセンサ表面の作製方法について、検討を行い、爆薬や催涙剤成分の検出を行う。

(1) 抗原類似物質を 3 次元的に配置したポリマー表面を作製し、水溶液中の TNT の高感度検出を行う。

(2) SPR センサによる 1, 3, 5-trinitroperhydro-1, 3, 5-triazine (RDX, C₃H₆N₆O₆, 分子量 222.12) の高感度検出方法の確立を行う。RDX は、最も一般的な爆発物である TNT と比べ、爆発の威力が大きい。軍用爆弾として多用されるプラスチック爆弾、コンポジション C-4 も、RDX が主成分であり、TNT と合わせて検出できることが望まれている。

(3) テロに使われる化学剤の一つに催涙剤が挙げられる。この催涙剤の成分にはカプサイシン等のカプサイシノイドが使われることがある。また、市販の催涙スプレーの主成分でも用いられる。そこで、SPR と抗原抗体を用いて、カプサイシンを現場において検出するためのセンサ表面と測定方法を確立する。

(4) 表面開始原子移動ラジカル重合 (SI-ATRP) を用いて、抗体の 3 次元的な結合サイトを構築すると共に、結合サイトの密度の最適化を行い、TNT の間接競合法による超高感度検出を行う。

(5) SI-ATRP を用いて、抗体の 3 次元的な結合サイトを構築すると共に、結合サイトの密度の最適化を行い、TNT の置換法による高感度検出を行う。

3. 研究の方法

(1) 抗体結合サイトとなる抗原類似物質を 3 次元的に配置するため、ラジカル重合によるビニル系ポリマーを用いたセンサ表面の作製を試みた。まず *N* ビニルホルムアミド (NVF) よりラジカル重合でポリ *N* ビニルホルムアミド (poly-NVF) を得た後、これを加水分解することで側鎖にアミノ基を持つポリビニルアミン (poly-VAm) を得た。この poly-VAm をセンサ表面に自己組織化単分子膜 (SAM) を介して固定した。poly-VAm 上に TNT 類似物質 (DNP-glycine) を固定してセンサ表面を作製した。この表面に対して抗 TNT 抗体の結合量および非特異吸着量を評価した。また、TNT の検出を間接競合法により行った。

(2) RDX の類似物質を固定化したセンサチップを作製し、中性の水溶液中でマイナスに帯電するウシ血清アルブミン (BSA) とプラスに帯電するリゾチームを用いて、非特異吸着性の評価を行った。非特異吸着予防に優れていたオリゴエチレングリコールを有する SAM に、RDX の類似物質 (図 1 (c)) を固定化したセンサチップを用いて、間接競合法により測定を行った。通常、間接競合法では、溶液を流通する前に、抗体とターゲット物質を混合し、一定時間おいた後 (インキュベーション)、流通するが、その必要性の有無を検討した。

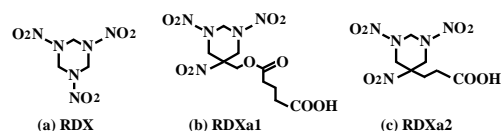


図 1 RDX とその類似物質 (雑誌論文③)

(3) カプサイシンと同じくバニロイド構造を有するホモバニリン酸をロコガイヘモシアン (CCH) と結合し、それを免疫原として得られたポリクローナル抗体を用いて、カプサイシノイドの検出を試みた。3 種類のカプサイシン類似物質を図 2 に示す。チップには SAM を形成させ、これらの類似物質をそれぞれ固定化したセンサチップを用意した、間接競合法によりカプサイシノイドの検出を試みた。また、測定におけるインキュベーション時間の検討も行った。

(4) SI-ATRP を用いて、センサチップ表面における抗体結合サイトの三次元配置を試みた。MES (mono-2-(methacryloyloxy) ethylsuccinate) と DEAEM (diethylaminoethylmethacrylate) の混合モノマーを用いて表面を作製した。

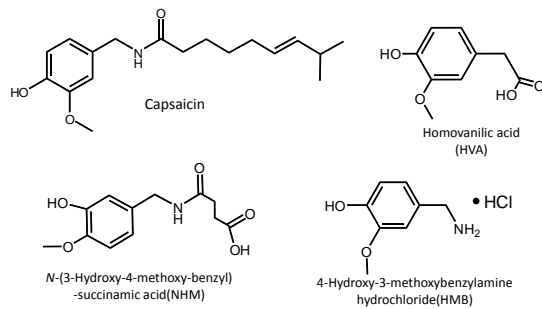


図2 カプサイシンとその類似物質 (雑誌論文②)

Poly-MES-co-DEAEM 表面では負の電荷を持つMESと正の電荷を持つDEAEMを混合し、混合比により非特異吸着を制御することを試みた。また、SI-ATRPの開始点となるSAM試薬とそうでないSAM試薬を混合してSAMを形成することにより、ポリマーの密度を変化させて、抗体と表面との親和性の制御を試みた。

(5) SI-ATRPにより、MESとHEMA(2-hydroxyethylmethacrylate)の混合モノマーを用いてpoly-MES-co-HEMA表面を作製し、センサ表面の特性を検討した。この表面では負の電荷を持つMESに対して電氣的に中性かつ親水性のHEMAを混合することで非特異吸着の抑制を試みた。次にTNT類似物質はMESのカルボキシル基に結合されるが、MESとHEMAの混合比を変えることで表面に固定されるTNT類似物質の量を制御し、センサ表面と抗体の親和性の最適化を試みた。また置換法によりTNTの検出を行った。

4. 研究成果

(1) Poly-VAmをセンサ表面に固定しpoly-VAm上にTNT類似物質を固定してセンサ表面を作製した。この表面に対してTNT抗体の結合量を評価したところ、高い結合量が得られたが、同時に非特異吸着も高いことが分かった。そこで、poly-VAmの加水分解率を制御しpoly-NVF-co-VAmとすることでポリマーの帯電を抑えた(図3)。加水分解率28%のポリマー(poly-NVF-co-VAm)を用いて作

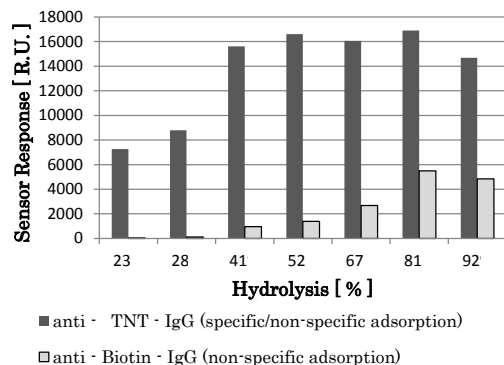


図3 加水分解率と特異的な結合/非特異吸着量の関係 (雑誌論文⑤)

製したセンサ表面は、非特異吸着を抑制できることがわかった。このセンサ表面を用いて、TNTの検出を間接競合法で行い、検出限界は28 pptとなった。

(2) RDX類似物質とタンパク質のコンジュゲートを作製し、これをラットに免疫した後、ハイブリドーマ細胞を作製することで抗RDXラットモノクローナル抗体が得られた。次にオリゴエチレングリコールを有するSAMを用いてRDX類似物質をセンサ表面に固定するところで、BSAおよびリゾチームの吸着が少ない、すなわち、非特異吸着が起こり難いSPRセンサ表面を作製した。このセンサ表面を用いて間接競合法の実験条件を最適化し、抗体濃度40 ppb、流入量60 μl、インキュベーション時間0分で40 pptの検出限界を実現した(図4)。インキュベーション時間15分の場合も、0分と同様の傾向であり、インキュベーションがなくても測定できることがわかった。

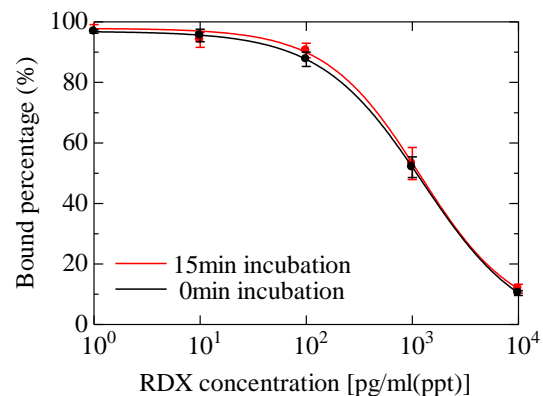


図4 間接競合法によるRDXに対する応答特性 (雑誌論文③)

(3) ウサギ由来のホモバニリン酸-CCHに対するポリクローナル抗体と4-ヒドロキシ-3-メトキシベンジルアミン塩酸塩(HMB)を固定化したチップとの組み合わせで間接競合法によりカプサイシノイドの検出に成功した。インキュベーション時間を変化させて結合率を調べたところ、インキュベーションなしの条件でも測定が可能であった。したがって、流通時間5分間でのカプサイシン検出が可能となった。また、間接競合法により、150 ppbの検出限界となった。

(4) MESとDEAEMの混合比24:16が非特異吸着抑制とセンサ表面作製効率の面から最適と判断された。SI-ATRPの開始点となるSAMの混合比が大きいほど解離速度定数が大きくなることがわかった。また、これらの表面を用いて間接競合法によりTNTの検出を行ったところ、検出限界は5.7 pptとなった(図5)。

(5) Poly-MES-co-HEMA表面では、MESに対し

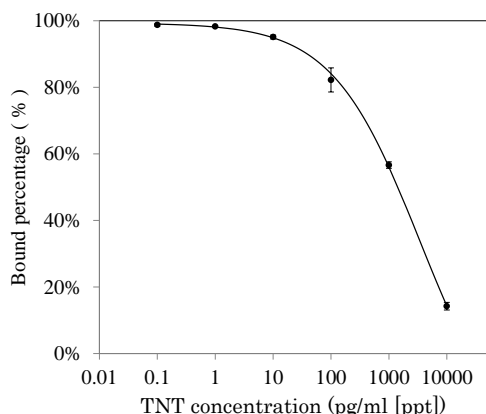


図5 間接競合法による TNT に対する
応答特性 (雑誌論文④)

て10倍以上のHEMAを混合することで非特異吸着を抑制することがわかった。HEMAの混合比が大きくなるほど解離速度定数も大きくなり、TNTの検出限界も低くなる傾向が得られた。最も低い検出限界は0.4 ppbとなった。

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 5 件)

- ① R. Yatabe, T. Onodera, K. Toko: Fabrication of surface plasmon resonance sensor surface with control of the nonspecific adsorption and affinity for the detection of 2,4,6-trinitrotoluene using an antifouling copolymer, *frontiers in BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY*, Volume 2, Article 10, pp.1-7 (2014) 査読有り.
doi: 10.3389/fbioe.2014.00010
- ② S. Nakamura, R. Yatabe, T. Onodera, K. Toko: "Sensitive Detection of Capsaicinoids Using a Surface Plasmon Resonance Sensor with Anti-Homovanillic Acid Polyclonal Antibodies", *Biosensors*, Vol.3, No.4, pp.374-384 (2013) 査読有り.
doi:10.3390/bios3040374
- ③ Y. Tanaka, R. Yatabe, K. Nagatomo, T. Onodera, Kiyoshi Matsumoto and Kiyoshi Toko: "Preparation and Characteristics of Rat Anti-1,3,5-Trinitroperhydro-1,3,5-Triazine (RDX) Monoclonal Antibody and Detection of RDX Using Surface Plasmon Resonance Immunosensor", *IEEE Sensors Journal*, Vol.13, No.11, pp.4452-4458 (2013) 査読有り.
doi:10.1109/JSEN.2013.2269697
- ④ R. Yatabe, T. Onodera, Kiyoshi Toko:

Fabrication of an SPR Sensor Surface with Antifouling Properties Using Surface Initiated Atom Transfer Polymerization for Highly Sensitive Detection of 2,4,6-Trinitrotoluene, *Sensors*, 13, 9294-9304 (2013) 査読有り.

doi:10.3390/s130709294

- ⑤ R. Yatabe, T. Onodera, K. Toko: "Highly Sensitive Detection of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) Using Poly(vinylamine-co-N-vinylformamide) Based Surface Plasmon Resonance (SPR) Immunosensor", *Sensors and Materials*, Vol.25, No.1, pp.45-56 (2013) 査読有り.

<http://myukk.org/SM0902.html>

[学会発表] (計 17 件)

- ① 石井良典, 矢田部 壘, 小野寺 武, 都甲 潔: "ポリビニルアミンを用いた SPR センサ表面の開発", 平成 26 年電気学会全国大会 (3/18-3/20), 3-089, 第3分冊, p.215 (2014年3月19日口頭発表. 愛媛大学)
- ② 伊藤 智, 田中秀平, 矢田部 壘, 小野寺 武, 都甲 潔: "表面プラズモン増強蛍光分光測定装置に用いるセンサ表面の開発", 平成 26 年電気学会全国大会 (3/18-3/20), 3-087, 第3分冊, p.215 (2014年3月19日口頭発表. 愛媛大学)
- ③ 矢田部 壘, 小野寺 武, 都甲 潔: "SI-ATRP を用いた SPR センサチップにおける非特異吸着の抑制", 2013 年 (平成 25 年度) 応用物理学会九州支部学術講演会講演予稿集, Vol.39, 30Cp-9, p.81 (2013年11月30日口頭発表 長崎大学)
- ④ P. Singh, T. Onodera, R.P. Singh, S. Kumar, K.K. Rajak, V.P. Singh: "Development of novel surface matrices for detection of peste des petits ruminant (PPR) virus over surface plasmon resonance biosensor", P260, 3rd International Conference on Bio-Sensing Technology, 12-15 May 2013 (2013年5月13日ポスター発表, Meliá Sitges, スペイン)
- ⑤ 矢田部 壘, 小野寺 武, 都甲 潔: "表面開始原子移動ラジカル重合を用いた SPR 免疫センサによる TNT の高感度検出", 第 60 回応用物理学会春季学術講演会 講演予稿集, 29aG17-1, p.12-185, (2013年3月29日口頭発表 神奈川工科大学)
- ⑥ P. Singh, R. P. Singh, K. K. Rajak, T. Onodera, V. P. Singh, S. Kumar: "Development of SPR biosensors for viral pathogens", National Symposium on Frontier of Biophysics, Biotechnology and Bioinformatics

- (37th Annual Meeting of Indian Biophysical Society (IBS), Jan 13-16, 2013), PP-120, p.178 (2013年1月15日ポスター発表, University of Mumbai, インド)
- ⑦ T. Onodera, P. Singh, R. Yatabe, K. Umino, K. Toko: "Development of Surface Plasmon Resonance Biosensor for Antibiotic", Proceedings of the 2013 International Symposium on Information Science and Electrical Engineering, p.44 (2013年1月11日口頭発表およびポスター発表, 九州大学)
- ⑧ R. Yatabe, T. Onodera, K. Toko: "Fabrication of the SPR sensor chip by Surface Initiated-Atom Transfer Radical Polymerization", Proceedings of the 2013 International Symposium on Information Science and Electrical Engineering", p.49 (2013年1月11日ポスター発表, 九州大学)
- ⑨ 矢田部 壘, 小野寺 武, 都甲 潔: "表面開始原子移動ラジカル重合を用いたSPRセンサチップの作製", 2012年(平成24年度)応用物理学会九州支部学術講演会講演予稿集, Vol. 38, 2Ea-6, p.165 (2012年12月2日口頭発表 佐賀大学)
- ⑩ 中村真悟, 矢田部 壘, 田中祐輔, 小野寺 武, 都甲 潔: "表面プラズモン共鳴 (SPR) 免疫センサを用いたカプサイシンの高感度検出", 2012年(平成24年度)応用物理学会九州支部学術講演会講演予稿集, Vol. 38, 2Ea-12, p.171 (2012年12月2日口頭発表 佐賀大学)
- ⑪ P. Singh, R. P. Singh, S. Kumar, T. Onodera, V. P. Singh and K. K. Rajak: "Development of SPR-optical Biosensors for Detection of PPR Virus-", Recent Topics in Plant, Medical and Animal Virology, pp.135-136, VIROCON-2012 (XXI National Conference on Immunobiology and Management of Viral Diseases in 21st Century), 8-10, November, 2012, (2012年11月9日口頭発表, Mukteswar, インド)
- ⑫ T. Onodera: "Development of portable surface plasmon resonance (SPR) biosensor system for security and safety", Recent Topics in Plant, Medical and Animal Virology, p.137, VIROCON-2012 (XXI National Conference on Immunobiology and Management of Viral Diseases in 21st Century), 8-10, November, 2012 (2012年11月9日口頭発表, Mukteswar, インド)
- ⑬ 田中祐輔, 矢田部 壘, 中村真悟, 小野寺 武, 都甲 潔: "RDX 高感度検出のための表面プラズモン共鳴免疫センサ", 平成24年度 電気関係学会九州支部連合大会 (第65回連合大会) 講演論文集, 07-1A-05, (2012年9月24日口頭発表 長崎大学)
- ⑭ P. Singh, T. Onodera and K. Toko: "Surface Plasmon Resonance Biosensor Surfaces for Detection of Viral Pathogens", Proceedings of International Conference on Innovation in Electronics and Communication Engineering (ICIECE-2012), pp.8-13 (2012年7月20日口頭発表, GURU NANAK INSTITUTE OF TECHNOLOGY, Hyderabad, インド)
- ⑮ 矢田部 壘, 小野寺 武, 都甲 潔: "ポリビニルアミンを用いたSPR免疫センサによるTNT高感度検出", 電気学会研究会資料 センサ・マイクロマシン部門総合研究会(ケミカルセンサ研究会2012.6.11-12), CHS-12-14, pp.69-74 (2012年6月12日口頭発表, 京都大学)
- ⑯ T. Onodera, R. Yatabe, Y. Tanaka, S. Nakamura and K. Toko: "Sensitive Detection of Low-Molecular-Weight Substances Using SPR Immunosensor", Proceedings of China-Japan Joint Symposium on Sensing Technology Apr.22-25, 2012, p.1 (2012年4月23日口頭発表, Southeast University, 中国)
- ⑰ 矢田部 壘, 小野寺 武, 都甲 潔: "ポリビニルアミンを用いたSPRセンサチップの開発", 第59回応用物理学関係連合講演会 講演予稿集, 16p-F8-16, p.12-198 (2012年3月16日口頭発表 早稲田大学)

[図書] (計3件)

- ① T. Onodera: "Electronic Dog Nose Using Surface Plasmon Resonance Method", Biochemical Sensors: Mimicking Olfactory and Gustatory Senses (Editor: K. Toko), Chapter 15, pp.351-375, Pan Stanford Publishing, Singapore (2013.9)
- ② K. Toko, T. Onodera and Y. Tahara: "Nano-Biosensors for Mimicking Gustatory and Olfactory Senses", in Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences (Editors: Debasis Bagchi, Manashi Bagchi, Hiroyoshi Moriyama and Fereidoon Shahidi), Chapter 15, pp.270-291, Wiley-Blackwell, Oxford, (2013.2)
- ③ 都甲 潔, 小野寺 武, 南戸秀仁, 高野則之: "イチバンやさしい理工系『「センサ」のキホン』", ソフトバンククリエイティブ (2012.5)

[その他]

ホームページ等

<http://www.rdctos.kyushu-u.ac.jp>

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

第 16 回 (2012 年) 応用物理学会九州支部発表奨励賞 受賞. 矢田部 壘 “表面開始原子移動ラジカル重合を用いた SPR センサチップの作製” (共著: 小野寺 武, 都甲 潔)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 武 (ONODERA, Takeshi)

九州大学・味覚・嗅覚センサ研究開発センター・准教授

研究者番号: 50336062