

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420310

研究課題名(和文) 匂い応答性ポリマーの創成と匂いセンシング

研究課題名(英文) Development of odor-responsive polymer film and odor sensing

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、表面プラズモン共鳴(SPR)法と蛍光測定を組み合わせたSPR励起増強蛍光分光(SPFS)装置の高感度化を行った。SPFSを用いて低分子化合物であるトリニトロトルエンの間接競合法による検出を行った。また、ポリマーを用いた匂い検出膜の作製と匂い物質の検出を試みた。また、無機高分子を用いた匂い検出膜として、逆オパール膜作製条件の検討し、匂いガスに対する応答パターンを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：A measurement system for surface plasmon-field enhanced fluorescence spectroscopy (SPFS) was developed. A laser diode as a light source was employed in the optical system. A convergent light beam was irradiated from the laser diode to the interface between a prism and an Au thin film. Fluorescent dye was excited by surface plasmon resonance (SPR) and fluorescence emission measured by a photomultiplier tube. Specific antibody-antigen interaction between fluorescent labeled-anti-trinitrotoluene (TNT) monoclonal antibody and a TNT analog immobilized on the Au surface or TNT could be monitored. Additionally, a TNT analog was immobilized on a polymer-modified sensor surface. TNT was measured by a displacement method on an SPR system, and a LOD achieved over the sensor chip was 0.9 ng/mL. Furthermore, inverse opal photonic crystal (IOPC) films modified with different six alkoxysilanes were developed as odor-responsive films. Three gases could be identified using the IOPC films.

研究分野：センサ工学

キーワード：匂いセンサ ポリマー 抗原抗体反応 バイオセンサ 表面プラズモン共鳴 蛍光 フォトニック結晶

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまでに全反射型の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て、超高感度な匂いセンサの開発を行ってきている。イヌの嗅覚が頼りになる爆薬探知や人命救助などの現場で利用可能なセンサである。SPR センサ高感度に金属表面の屈折率変化を捉えることが可能であり、金属表面上の抗原抗体反応による屈折率変化をモニターすることができる。研究代表者は、これまでに 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)やトリメチレントリニトロアミン (RDX) を高選択かつ超高感度 (ppb ~ ppt の範囲) で測定可能なセンサ表面と測定手法を提案してきた。オリゴエチレングリコールやデンドリマーを用いたセンサ表面により、電気的中性かつ親水性な表面により、非特異的な吸着を抑制し高感度に爆薬の検出を可能とした。また、それらの研究の発展として表面開始原子移動ラジカル重合 (SI-ATRP) を用いて金薄膜上の有機膜の膜厚制御を行い、非特異吸着性能を有し、超高感度 (検出限界 5.7 ppt) で TNT の検出を可能とした。

一方、表面プラズモン共鳴の電場増強は、全反射に伴うエバネッセント場による電場増強より効果が高く、プリズムにコートされた金表面上の蛍光物質を励起可能であることが知られている。この手法は表面プラズモン増強蛍光分光法 (SPFS) として提案されている<sup>(1), (2)</sup>。表面プラズモンの増強電場 (数 100 nm) のみで励起されるため、溶液中の蛍光物質の蛍光を抑えることが可能であり、バックグラウンドノイズを低減できる。また、光電子増倍管を用いた測定であるため、高感度な測定が可能になる。これまでに提案されている測定装置はゴニオメーターを用いて光源の入射角度を変化させるタイプである。研究代表者のグループでは、フォーカシング全反射減衰 (ATR) 法、すなわち、コリメーターレンズを用いてくさび形の光を入射する可動部のない光学系を構築しているが、感度の向上、測定時間の短縮が必要である。また、匂い物質に応答するポリマー表面や膜が必要である。

### 2. 研究の目的

(1) フォーカシング ATR 法を用いた光学系により、SPR による増強電場を利用して蛍光励起を行い、センサ表面の蛍光測定を行い、匂い物質を検知する手法の高感度化を行う。

(2) SPR 表面における非特異吸着を抑制できるポリマー表面を構築し、匂い物質検出方法を確立する

(3) 無機高分子を用いた匂い検出膜作製方法を確立する

### 3. 研究の方法

(1) SPFS 測定系は、主に蛍光励起システム、

蛍光検出システム、フローシステムの3つから構成される。

蛍光励起システムの主な構成要素は光源、偏光板、集光レンズである。本研究ではビームエキスパンダで光を幅のある平行光に変換し、それを集光レンズで集約させることで、角度調節が不要なシステムを構築した (図 1)。蛍光を励起するエバネッセント波を発生させるため、光源には半導体レーザー (30 mW) を用いた。ビームエキスパンダによってレーザー光は平行光へと変換され、SPR を起こすため偏光板を通し p 偏光にする。この平行な p 偏光を集光レンズに通すことで多数の入射角を持つ光を一度に作成でき、それらをプリズムへ入射する。この際、入射角の中心角はセンサチップ上に水を流通することを想定してシミュレーションを行い、75°に設定した。

蛍光検出システムの構成を図 2 に示す。蛍光検出システムは対物レンズ、蛍光フィルタ、光電子増倍管 (浜松ホトニクス R6357)、コンピュータによって構成されている。SPR により励起された金チップ上の蛍光を無限補正対物レンズにより平行光へと変換する。これにより蛍光フィルタを通過させることが可能となり、蛍光色素から発せられた蛍光のみを抽出できる。蛍光は結像レンズによって集光され、光電子増倍管 (PMT) により検出される。

本研究では、測定の際にセンサチップ上にサンプルを流通させるため、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 製の流路を用い、その固定にはアクリルのフィッティングボードを用いた。

センサチップは BK7 ガラスを用い、接着

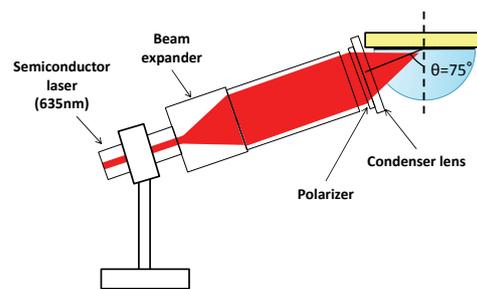


図 1 蛍光励起システム

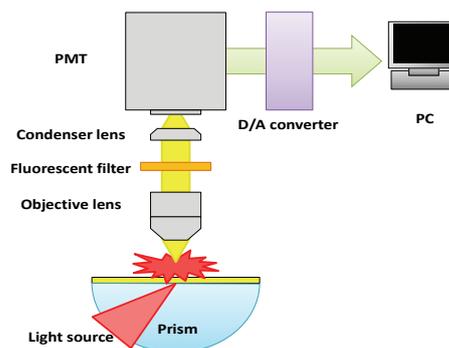


図 2 蛍光検出システム

層のチタンを介し、金が 50 nm スパッタされたものを用いた。センサチップをまえ洗浄し、金薄膜上にエチレングリコール鎖を有する自己組織化単分子膜 (SAM) を形成した。SAM のカルボキシル基を活性化し、NHS エステルに置き換えた。その後 MilliQ 水でリンスした。0.1 M エチレンジアミン (ホウ酸バッファで希釈) と 30 分反応させ、アミノカップリングにより SAM のカルボキシル基末端をアミノ基に変換した。同時に TNT 類似物質である DNP-グリシン (DNP-gly) のカルボキシル基を活性化した。その活性化した溶液をセンサチップ上に滴下し 1 時間反応させた。製作したチップ表面の構造を図 3 に示す。

まず、構築した測定系を用いて蛍光標識した抗 TNT モノクローナル抗体 (抗 TNT 抗体) のセンサチップへの結合量の濃度依存性を調べた。蛍光標識した抗体を 0, 50, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$  (ppb) に PBS で希釈した後、センサチップ上に流通した。

また、PMT の印加電圧を 500, 550, 600 V に調整し、抗体をそれぞれ流通させて蛍光強度の違いについても同時に観測した。流速は 30  $\mu\text{l/min}$  とし、サンプルを 4 分流通させたのち、再生溶液を 4 分流通させ、3 回測定を行った。

(2) 間接競合法による測定では、抗体溶液と TNT の混合溶液を試料溶液とし、高感度検出のためには、測定前に反応させる必要があった。しかし、短時間での測定が必要とされる現場では混合溶液を作製することなく測定することが望ましい。そのため、測定前の混合溶液の準備を必要とせず高感度に爆薬を検出することを目的として、置換法の検討を行った。ポリ *N*-ビニルホルムアミドに TNT 類似物質を固定化するため、加水分解によりアミノ基を付与し、そのアミノ基に TNT 類似物質を結合する。ポリマー上に付与されたアミノ基によって SPR センサ表面が電氣的に正の状態になり静電相互作用による非特異的な吸着が起こる。この場合、非特異的な吸着は SPR センサにおいて誤検知の原因となる。そこで、コハク酸をポリマーに結合することで電氣的に負のカルボキシル基を付与し、アミノ基 (+) とカルボキシル基 (-) によって SPR センサ表面を電氣的に中性とし、静電相互作用による非特異的な吸着の抑制を試

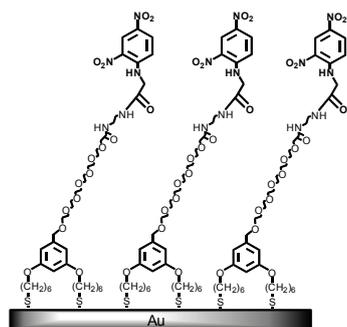


図 3 センサチップ表面

みた。

SAM を介して金チップにポリマーをアミノカップリングにより結合した。固定化する TNT 類似物質は、*m*-ニトロフェニル酢酸を用いた。

(3) 無機高分子を用いた匂い認識膜は、オルトケイ酸テトラエチルと 500 nm ポリスチレン微粒子を用い、高い空隙率の逆オパール型フォトニック結晶の作製法である co-assembly method に従い作製した<sup>(3)</sup>。この手法により、ガラス基板上に約 400 nm 周期の、鮮やかな構造色を発する逆オパール型フォトニック結晶膜を 6 個作製した (図 4)。この時点ではこれらの膜に相違は無く、同じ気体に触れさせれば同じ応答を示してしまうため、それぞれを個別に表面機能化し別々の吸着特性を与えることを試みた。表面機能化には各結晶を個別に 6 種類のアルコキシシラン中に浸漬する方法をとった。

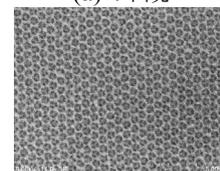
#### 4. 研究成果

(1) DNP-gly を固定化した金チップ上に、蛍光標識した抗体 500 ppb を流通させたところ、蛍光が観測された。次に、抗体濃度依存性を確認するため、PMT の印加電圧を 500 V に固定し、蛍光標識した抗体を PBS で 0, 50, 250, 500 ppb に調整し、それぞれ流通させた。その結果を図 5 に示す。抗体の濃度と蛍光応答は比例関係が得られ、抗体の検出限界は約 6 ppb となった。標準的な SPR センサである Biacore J で検出限界を求めたところ約 2 ppb であり、同程度の感度が得られた。

PMT の印加電圧は 600 V で一番大きな応答が得られた。そこで、印加電圧 600 V での TNT について、間接競合法を用いて検出を行った。間接競合法は、抗原抗体反応を用いた低分子の測定でよく用いられている測定法である。溶液中のターゲットに抗体が結合することで、チップ上のターゲット類似物質への結合が減り、応答値が減少することを利用した測定法である。本実験では、250 ppb TNT 抗体と 10 ppb TNT 溶液を用い、測定を 3 回繰り返し行った。その結果、平均応答値は 74.7 % となった。これより、間接競合法による低分子の高感度な検出が可能であることが示された。



(a) 外観



(b) 走査型電子顕微鏡画像

図 4 逆オパール型フォトニック結晶

(2) 作製したセンサ表面に抗 TNT 抗体を 2 分間流通させる. その後, ランニングバッファを 40 秒間流通させる. 40 秒後のセンサグラムを  $\Delta\theta_{pre}$  とし, TNT を 2 分間流通させ TNT の流通後のセンサグラムを  $\Delta\theta_{post}$  とする. ここで  $\tau_i = \Delta\theta_{post} / \Delta\theta_{pre}$  とする ( $i=0,1,2,\dots,7$ ; TNT 濃度 = 0, 0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100 ng/ml[ppb]). また  $(\tau_0 - \tau_i) / \tau_0$  を解離率 (Displacement Ratio) とした. 測定は各濃度で 3 回行いその平均値で検量線を作成した. また  $\tau_i$  の標準偏差の 3 倍から検出限界を求めた. 図 6 に置換法による測定例を示す. TNT 溶液流通時, TNT 濃度が高くなるにつれ, センサ応答の減少が大きくなっていることがわかる. また, TNT の検出限界は 0.9 ppb となった.

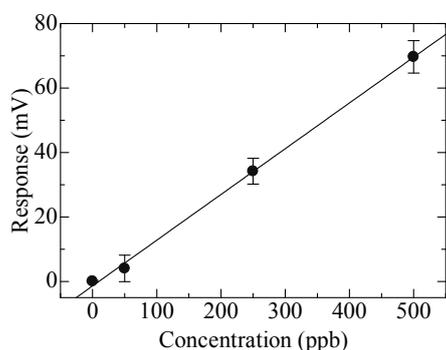


図 5 蛍光応答の抗体濃度依存性

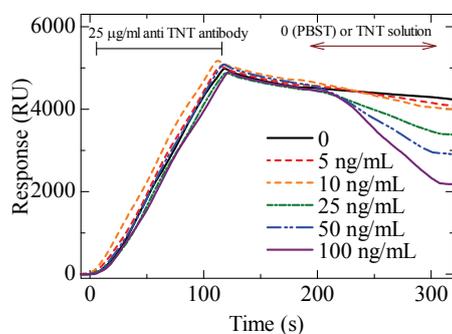


図 6 置換法による測定

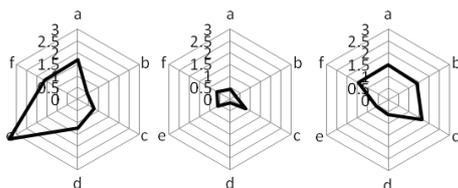


図 7 表面機能化逆オパール型フォトニック結晶アレイにより得られた気体の応答パターン (左からアセトン, エタノール, 1-プロパノール)

(3) 蒸気に触れさせる前の 6 種類の逆オパール型フォトニック結晶の反射ピーク波長を分光器で測定した. 次に, 検出対象アセトン, エタノール, 1-プロパノールの気体をフラスコ内で加熱気化し, 飽和条件下で 10 分間, 6 種類の逆オパール型フォトニック結晶を蒸気に触れさせた. その後, 分光器で蒸気に触れさせた後の 6 種類の逆オパール型フォトニック結晶の反射ピーク波長を測定し, それぞれの応答率を算出した. この時, 応答率  $\Delta\lambda$  は, 蒸気に触れさせる前と後でのフォトニック結晶の反射ピーク波長をそれぞれ  $\lambda_0$  および  $\lambda$  とすると,  $\Delta\lambda = (\lambda - \lambda_0) \cdot 100 / \lambda_0$  として算出した. そして, これら 6 つの応答率をレーダーチャート状にグラフ化した. その結果を, 図 7 に示す. 対象匂い蒸気毎に明確に異なる応答が得られた.

#### <引用文献>

- (1) J. W. Attridge, P. B. Daniels, J. K. Deacon, G. A. Robinson and G. P. Davidson, "Sensitivity enhancement of optical immunosensors by the use of a surface plasmon resonance fluoroimmunoassay", *Biosensors & Bioelectronics* 6, 201-204, 1991.
- (2) T. Liebermann and W. Knoll, "Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy" *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects*, vol. 171, pp. 115-130, 2000.
- (3) B. Hatton, B. Hatton, L. Mishchenko, S. Davis, K. H. Sandhage, J. Aizenberga, "Assembly of large-area, highly ordered, crack-free inverse opal films" *PNAS*, 107, 23, 10354-10359, 2010

#### 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 本多 俊裕, 伊藤 智, 矢田部 壘, 小野寺 武, 都甲 潔: "表面プラズモン励起増強蛍光分光法による低分子化合物の高感度検出", 電気学会研究会資料 ケミカルセンサ バイオ・マイクロシステム 合同研究会, 査読無, CHS-16-40, pp.15-18 (2016)
- ② T. Onodera, R. Ishii, R. Yatabe, K. Toko: "Development of Sensor Surfaces Using Poly(N-vinyl formamide) for Sensitive Detection of 2,4,6-Trinitrotoluene by Displacement Method on a Surface Plasmon Resonance Sensor", *Sensors and Materials*, 査読有, Vol.28, No.3, pp.209-218 (2016) doi: 10.18494/SAM.2016.1171
- ③ S. Ito, S. Tanaka, R. Yatabe, T. Onodera, K. Toko: "Sensitive Detection of 2,4,6-Trinitrotoluene by Surface Plasmon

Fluorescence Spectroscopy”, IEEE Sensors 2014 PROCEEDINGS, 査読有, pp.325-328 (2014) doi: 10.1109/ICSENS.2014.6984999

- ④ T. Onodera, K. Toko: “Towards an Electronic Dog Nose: Surface Plasmon Resonance Immunosensor for Security and Safety”, Sensors, 査読有, 14, 16586-16616 (2014) doi: 10.3390/s140916586

[学会発表] (計 16 件)

- ① 小森雄仁, 小野寺 武, 都甲 潔: “匂い物質検出のための逆オパール型フォトニック結晶アレイの開発”, 平成 29 年電気学会全国大会, 2017.3.15 (富山大学)
- ② Y. Komori, T. Onodera, K. Toko: “Development of inverse opal photonic crystal array for odor sensing”, The 15th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (ISMNTOP2016fall: in conjunction with YR Umami Forum 2016, AISCRIB 2016), 2016.12.3-4 (Maidashi Campus, Kyushu University)
- ③ 本多 俊裕, 伊藤 智, 矢田部 壘, 小野寺 武, 都甲 潔: “表面プラズモン励起増強蛍光分光法による低分子化合物の高感度検出”, 電気学会研究会資料 ケミカルセンサ バイオ・マイクロシステム合同研究会, 2016 11.30 (東京電機大学)
- ④ 小野寺 武: “匂いを測るバイオセンサシステムの開発”, 第 31 回マイクロナノ先端技術交流会「嗅覚センシングの新たな可能性について」, 2016.3.2 (東京都千代田区神田)
- ⑤ T. Onodera: “Highly sensitive Detection of Explosives Using Surface Plasmon Resonance”, 3rd International Conference on Signal Processing & Integrated Networks (SPIN2016), 2016.2.12 (Amity University, Noida, India)
- ⑥ S. Ito, R. Yatabe, T. Onodera, K. Toko: “Surface Plasmon Resonance Spectroscopy Immunosensor for Low-Molecular-Weight Substances”, Proceedings of International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications 2015 (Bio4Apps 2015), 2015.12.10 (Ito Campus, Kyushu University)
- ⑦ 小野寺 武, 石井良典, 矢田部 壘, 都甲 潔: “置換法による TNT 検出のためのポリ N-ビニルホルムアミドを用いた SPR センサ表面の開発”, 平成 27 年度電気・情報関係学会九州支部連合大会 (第 68 回連合大会), 2015.9.27 (福岡大学)
- ⑧ 小野寺 武: “表面プラズモン共鳴センサによる低分子化合物の高感度検出”, 第 7 回 生体分子相互作用解析フォーラム

ワークショップ「異なる原理に基づく相互作用解析の比較」, 2015.8.27 (東京都区芝公園)

- ⑨ H. Luo, M. Ma, R. Yatabe, T. Onodera, K. Toko: “Detection of Furfural Using Surface Plasmon Resonance Immunosensor”, 2nd World Congress of the Digital Olfaction Society, 2014.12.8-9 (Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan)
- ⑩ 小野寺武: “匂いを測る超高感度バイオセンサ”, 2014 年応用物理学会九州支部学術講演会特別共通セミナー「有機エレクトロニクスの最前線」, 2014.12.6 (大分大学工学部)
- ⑪ 井手佑人, 馬苗苗, 石井良典, 小野寺武, 都甲 潔: “表面プラズモン共鳴免疫センサを用いたラクトン類の検出”, 2014 年応用物理学会九州支部学術講演会, 2014.12.6 (大分大学工学部)
- ⑫ S. Ito, S. Tanaka, R. Yatabe, T. Onodera, K. Toko: “Sensitive Detection of 2,4,6-Trinitrotoluene by Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy”, IEEE Sensors 2014, 2014.11.3 (Valencia, Spain)
- ⑬ 小野寺武: “超高感度匂いセンサの開発”, 生化学若い研究者の会九州支部, 脳科学若手の会九州支部秋のセミナー, 2014.10.12 (九州大学馬出キャンパス)
- ⑭ 石井良典, 安浦 雅人, 矢田部 壘, 小野寺 武, 都甲 潔: “ポリ N-ビニルホルムアミドを用いた SPR センサ表面の開発と置換法による TNT 検出”, 平成 26 年度電気・情報関係学会九州支部連合大会 (第 67 回連合大会), 2014.9.19 (鹿児島大学)
- ⑮ R. Ishii, R. Yatabe, T. Onodera, K. Toko: “Development of surface plasmon resonance sensor chip using poly-vinylamine”, The 15th IUMRS-International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), 2014.8.26 (Fukuoka University, Fukuoka, Japan)
- ⑯ S. Ito, S. Tanaka, R. Yatabe, T. Onodera, K. Toko: “Development of Measurement System for Surface Plasmon Fluorescence Spectroscopy Using ATR Method with Fan-Shaped Beam”, The 15th IUMRS-International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), 2014.8.26 (Fukuoka University, Fukuoka, Japan)

[図書] (計 1 件)

- ① T. Onodera, Y. Tahara, R. Yatabe, K. Toko, “Nano-biosensors for Gustatory and Olfactory Senses”, in Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology (accepted; in press), American Scientific Publishers

[その他]

ホームページ等

<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・味覚・嗅覚センサ研究開発センター・准教授

研究者番号：50336062