

「先進的統合センシング技術」

平成 17 年度採択研究代表者

都甲 潔

(九州大学大学院システム情報科学研究院 教授)

「セキュリティ用途向け超高感度匂いセンサシステムの開発」

1. 研究実施の概要

本研究では、目的分子と選択的に結合する抗体及び鑄型分子認識膜を、表面プラズモン共鳴センサ及び電気化学センサと組み合わせ、イヌの鼻を超える ppt (parts per trillion) レベルの検出感度を有するセキュリティ用途向け超高感度匂いセンサシステムの開発を目的としている。

今年度は、ポータブル型表面プラズモン共鳴センサの試作を行った。また、トリニトロトルエン (TNT) の ppt レベルの 2 分以内検出を可能とし、TNT およびジニトロトルエン (DNT) に対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を得た。

次年度には試作器の評価を行い、改良を行う。また、ガス状態の爆薬のサンプリングについても注力していく。また、主要な爆薬である RDX に対する抗体作製についての検討を開始する。

2. 研究実施内容

1. 抗体の作製

TNT 及び DNT に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を樹立した後、これらの培養上清からモノクローナル抗体を作製し、その性質評価を行う。また、DNT に対する抗体については、より特異性の高いポリクローナル抗体の作製を試みた。

抗 TNT モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは 6 株、抗 DNT モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは 10 株を獲得した (in vivo: 4 株 in vitro: 6 株)。選抜した抗 TNT 及び抗 DNT モノクローナル抗体の各関連化合物に対する結合性を間接競合 ELISA 法により調べた。抗 TNT モノクローナル抗体は各化合物の中でも TNT に対する結合性が最も高く、高い特異性を備えていることがわかった。

抗 DNT モノクローナル抗体については DNT 以外にも結合性を持つ化合物が種々認められたことから、更なる特異性の向上を目指し、抗 DNP-KLH-400 ポリクローナル抗体を新たに作製した。本抗体および昨年度に作製した抗 DNP-KLH ポリクローナル抗体の各関連化合物に対する結合性を比較するため、IC₅₀ 値および交差反応性 (2,4-DNT と各関連化合物の IC₅₀ 値の比) を求めた。本抗体と抗 DNP-KLH 抗体を比較すると、ベンゼン環 1 位に窒素原子を持つという点で 2,4-DNT とは構造が異なる化合物に対して認識が著しく低いことから、本抗体のほうが、より

2,4-DNT に対する特異性が高いと考えられる。

2. 間接競合法による検出

表面プラズモン共鳴センサにおける間接競合法と呼ばれる感度増幅技術を用いて、犬の鼻を超える ppt レベルの感度を目指し、爆発性のある分子を効率良く、かつ高感度に測定するためのシステム化の設計を行い、短時間に多数のサンプルを測定できるように最適化を試みた。

金基板上に自己組織化法を用いて、末端にアミン基を有するアルカンチオール単分子膜を形成した。次にアミドカップリング反応により、TNPh- β -アラニンチオール単分子膜上に固定化し、これをイムノ表面として用いた。

試料溶液をイムノ表面に送液する前に、TNT 標準溶液を 5 $\mu\text{g/ml}$ モノクローナル抗 TNT 抗体(M-TNT Ab)と反応させた。未反応の M-TNT Ab はイムノ表面上に固定化された TNPh- β -アラニンと反応し、共鳴角が変化した。間接競合法では試料溶液中の TNT 濃度が増加すると、イムノ表面上の TNPh- β -アラニンと反応可能な抗体量が減少するため、測定される共鳴角の変化量は減少する。図 2 に、試料溶液中の TNT 濃度に対する阻害率 (percentage of inhibition)を示す。TNT が測定可能な阻害率を 10%から 90%とすると、その検出濃度域は 8 pg/ml (8 ppt)から 30 ng/ml (30 ppb)であった。また、TNPh-KLH コンジュゲートを PEG-NH₂ 単分子膜上に固定したイムノセンサでは、3 ppt から 70 ppb であった。この検出可能濃度域は、物理吸着法によりイムノ表面を形成した場合とほぼ等しかった。

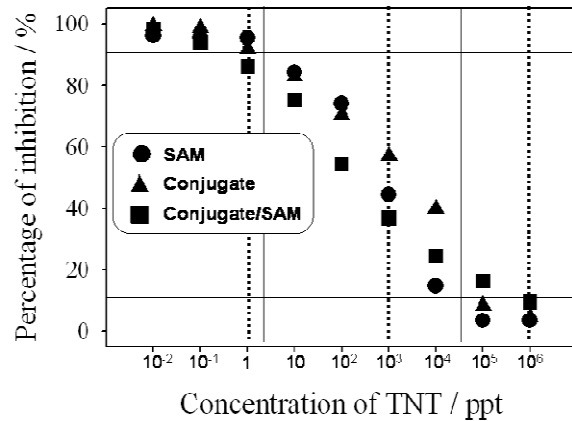


図 2 TNT 濃度に対する間接競合阻害率

TNT 測定を行った後は、ペプシン塩酸溶液を用いて表面を再生させることができた。物理吸着法を用いて作製したイムノ表面では、30 回程度の再生操作により感度が 5%程度低下したが、自己組織化法を用いた場合、100 回以上繰り返しても感度は全く変化しなかった。これは、自己組織化法で作製したイムノ表面は、ペプシン塩酸溶液によって劣化しないことを示している。物理吸着法で作製したイムノ表面では、タンパク質と金表面の間に大きなスペースが存在するために、ペプシン塩酸溶液による劣化が若干起きたと考えている。一方、最密充填された単分子膜ではそのスペースが存在しないため、安定に性能を維持したと考えられる。

3. 鋳型分子認識膜の作製

3.1 CD レセプター固定化およびニトロ化合物の電気化学検出

選択性および感度に優れた分子認識レセプターの設計法として、ホスト分子とブルーゲル法

を組み合わせる新しいレセプター設計を試みた。北九大グループの独自技術である気相表面ゾルゲル法をシクロデキストリン (CD) ホスト分子の固定化に用いることでレセプターの高密度集積化を行った。さらにフェロシアナイド(2 mM)と塩化カルシウム(1 M)混合溶液を用い、サイクリックボルタンメトリ (CV) による Fe の酸化還元反応を利用して DNT 分子の吸着挙動を追跡した。測定溶液中の DNT の濃度がそれぞれ 2 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1 μ M の濃度になるように調整した時の CV 測定 (DPV モード) 結果から、TiO₂/ γ -CD 膜の 2,4-DNT に対する結合定数が $6.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ と見積もられ、さらに検出限度は **2 nM (約 0.4 ppb)** 以下であった。100 nM のゲスト分子吸着による電流量の変化を調べたところ、2,4-DNT に最も高い変化量を示した。

3.2 分子鑄型法による DMDB センサ薄膜の作成およびその電気化学検出

抗原-抗体法が適用できない爆薬物質の一つであるジメチルジニトロブタン (DMDB) に対し、チタニア金属マトリックスを用いた鑄型膜の作製を試みた。Ti(O-*n*Bu)₄ と DMDB が 100 mM : 5 mM となるように Toluene/EtOH (1:1, v/v) 混合溶媒を用いて溶液を調整した。表面研磨したグラッシーカーボン電極上に調整した混合液をスピンドコーティングし、薄膜を作製した。作製した薄膜を 1 晩大気中で乾燥し、サイクリックボルタメトリーを用いて分析を行った。

DMDB のニトロ基の酸化還元ピーク(-1.15V)を利用して、複合膜中の DMDB の存在と、

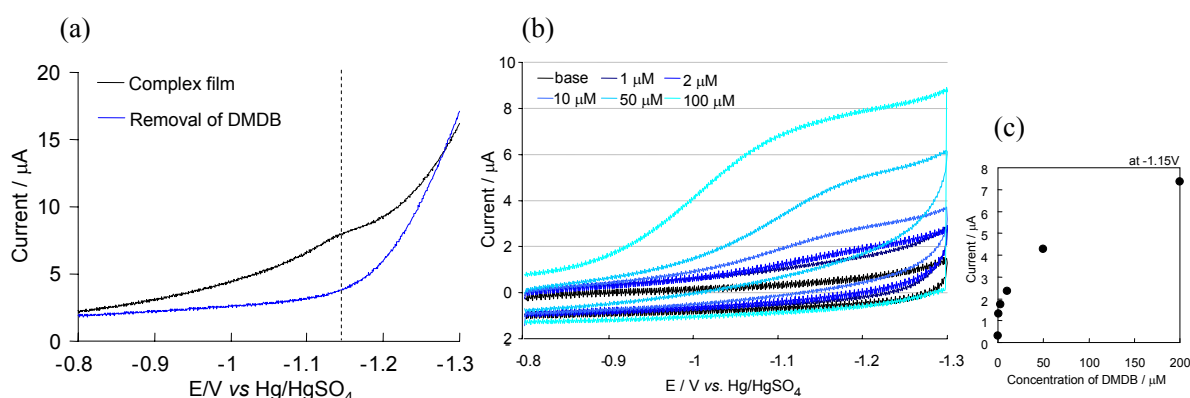


図3 (a) DMDB/TiO₂ ナノ薄膜の DMDB 除去前後の CV スペクトル、(b) TiO₂ 鑄型膜への DMDB 吸着によるピーク変化と (c) その濃度依存性 (-1.15V)

EtOH 洗浄による DMDB の除去を確認した。図3(a)。DMDB の濃度を徐々に増加させながら鑄型薄膜へのゲスト分子吸着によるニトロ基のピーク変化(-1.15V)を図3(b)に示す。また、その時のピーク変化と濃度相関を図3(c)に示した。この結果から、DMDB の濃度を増加させることで、膜中に DMDB 分子が吸着し、ピークの変化が現れることが分かった。1 μ M (0.2 ppm)の濃度からピークが検出でき、その変化量は DMDB の濃度強く関連することが分かった。

4. 超高感度匂いセンサシステムのプロトタイプ作製

爆薬探知の必要とされる現場で測定が可能な、ポータブルタイプの表面プラズモン共鳴セン

サの開発を行った。図4にその外観を示す。また、図5に上部を示す。シリンジポンプ、5ポートバルブを備えている。ノートPCで制御可能で、9.5 kg程度である。外装など規格品の組み合わせであるため、大きさ、重量とやや大きいだが、軽量化は可能である。また、検出は5チャンネル測定に対応しており、専用のセンサチップ、フローセルを作製した。

次年度は、本試作装置により、TNT および DNT の高感度検出を試みる。また、拭き取りサンプリング法と組み合わせた、検出プロトコルの検討を行うとともに、ガス状の爆薬分子のサンプリングとの組合せも検討する。

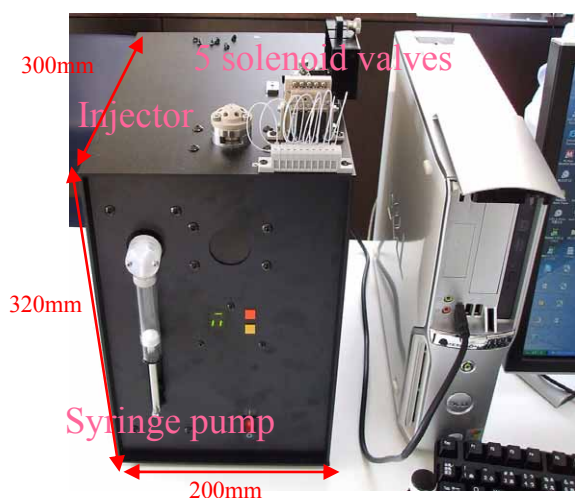


図4 試作 SPR センサシステム

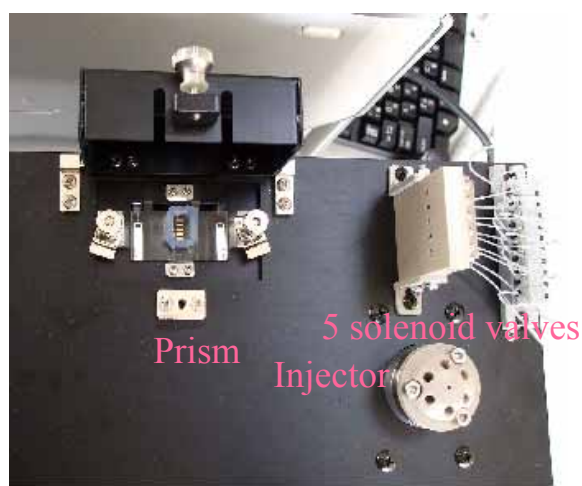


図5 試作 SPR センサシステム(上面)

3. 研究実施体制

(1)「九州大学」グループ

- ①研究分担グループ長: 都甲 潔(九州大学 教授)
- ②研究項目
 - ・セキュリティ用途向け超高感度匂いセンサの開発

(2)「北九州市立大学」グループ

- ①研究分担グループ長: 李 丞祐(北九州市立大学 助教授)
- ②研究項目
 - ・爆薬および爆薬マーカーに対する鋳型分子認識膜の作製

(3)「インセント」グループ

- ①研究分担グループ長: 池崎秀和((株)インテリジェントセンサーテクノロジー 代表取締役社長)

②研究項目

- ・超高感度匂いセンサシステムの開発設計

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- 川口俊一, D. R. Shankaran, S. J. Kim, 松本 清, 都甲 潔, 三浦則雄
“爆薬類検出用超高感度 SPR 免疫センサ”
Chem.Sens., 22,146-153 (2006)
- D. R. Shankaran, K. Matsumoto, K. Toko, N. Miura
“Development and comparison of two immunoassays for the detection of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) based on surface plasmon resonance”
Sens. Actuators B, 114,71-79 (2006)
- D. R. Shankaran, K. Matsumoto, K. Toko, N. Miura
“Performance evaluation and comparison of four SPR immunoassays for rapid and label-free detection of TNT”
Electrochemistry, 74, 141-144 (2006)
- D. R. Shankaran, T. Kawaguchi, S. J. Kim, K. Matsumoto, K. Toko, N. Miura
“Evaluation of the molecular recognition of monoclonal and polyclonal antibodies for sensitive detection of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by indirect competitive surface plasmon resonance immunoassay”
Anal. Bioanal. Chem., 386, 1313-1320 (2006)
- T. Kawaguchi, D. R. Shankaran, S. J. Kim, K. V. Gobi, K. Matsumoto, K. Toko, N. Miura
“Fabrication of a novel immunosensor using functionalized self-assembled monolayer for trace level detection of TNT by surface plasmon resonance”
Talanta, available online (2006)
- N. Takahara, D. H. Yang, M. J. Ju, K. Hayashi, K. Toko, S. W. Lee, T. Kunitake
“Anchoring of cyclodextrin units on TiO₂ thin layer for effective detection of nitro-aromatics: a novel electrochemical approach for landmine detection”
Chem. Lett. 35, 12, 1340-1341 (2006)
- N. Miura, D. R. Shankaran, T. Kawaguchi, K. Matsumoto, K. Toko
“High-performance surface plasmon resonance immunosensors for TNT detection”
Electrochemistry, 75, 13-22 (2007)
- D. R. Shankaran, T. Kawaguchi, S. J. Kim, K. Matsumoto, K. Toko, N. Miura
“Fabrication of novel molecular recognition membranes by physical adsorption and self-assembly for surface plasmon resonance detection of TNT”
Inter. J. Environ. Anal. Chem., in press (2007)

○M. J. Ju, D. H. Yang, N. Takahara, K. Hayashi, K. Toko, S. W. Lee, T. Kunitake

“Landmine detection: Improved binding of 2,4-dinitrotoluene in a γ -CD/metal oxide matrix and its sensitive detection via a cyclic surface-polarization impedance (cSPI) method”

Chem. Comm., in press