

「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表面分極型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、研究開始年度であり、まず、必要な実験装置を揃え、研究実施体制を整えるとともに、試作器を作製するための方針を固めた。また、これまでの研究で得られたノウハウおよび研究資産を活かして、本プロジェクトにおける研究を開始した。トリニトロトルエン (TNT) の検出を ppt レベルで 2 分以内に可能とし、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。

次年度には試作器を作製する予定であり、また、得られたモノクローナル抗体の性能評価および SPR での測定を行う。

2. 研究実施内容

抗体の作製

<目的>

TNP-KLH 複合体及び DNP-KLH 複合体を作製し、ウサギに免疫することによって TNT 及び DNT に対して結合性の高いポリクローナル抗体を得、その性質を ELISA で確認すると共に、一部 SPR による高感度測定を試みる。

<抗体の作製方法>

トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 及びジニトロベンゼンスルホン酸 (DNBS) と高分子タンパク質 KLH を反応させ、それぞれ TNP-KLH 及び DNP-KLH 複合体を作製し、免疫原とした。それぞれの免疫原を Freund' s complete adjuvant (FCA) と混和・乳化しウサギに免疫した。初回免疫後、2 週間毎に追加免疫し、十分抗体価の上昇を確認した後と殺し全血を採取した。遠心分離、塩析、Protein G カラムによる精製後、各抗体を得た。

<間接競合 ELISA 法による抗体の評価>

得られた抗 TNP-KLH 抗体について，間接競合 ELISA 法により種々の TNT 関連化合物に対する結合性を評価した．図 1 に間接競合 ELISA 法の結果の一部を示す．A と A₀ はそれぞれ抗原が存在している時と存在していない時の吸光度を示し，同図は抗原濃度と A/A₀ × 100 の関係を示している．それぞれ本抗体はトリニトロフェノール（TNP）以外のトリニトロベンゼン化合物に対して反応性を示し，TNT に対する IC₅₀ は 2.6 × 10⁻⁸ M で高い結合性を示した．また，ジニトロトルエン化合物に対してはほとんど結合性を示さなかった．

次いで，得られた抗 DNP-KLH 抗体について，DNT 関連化合物に対する結合性を間接 ELISA 法によって評価した．測定の過程で固相化抗原の構造によって結合性に若干の相違が見られたので，2 種の固相化抗原について評価した．結果を表 1 に IC₅₀ 値として示した．固相化抗原として DNP-C8-OVA を用いた場合，2,4-DNT に対する IC₅₀ は 1.4 × 10⁻⁷ M であった．

<SPR センサ信号の増幅方法の検討>

修飾抗体を用いる SPR センサによる TNT の高感度測定は次のように行った．すなわち，SPR センサのセンサチップ表面に固定化抗原として TNP-β-alanine-OVA 複合体を固定化した．次いで，一定濃度の抗体と各濃度に希釈した遊離抗原との等量混合溶液を注入し，固定化抗原に対する抗体の結合に起因するレスポンスを測定した．続いて，ビオチン修飾抗体，ストレプトアビジン及びビオチン修飾 BSA 複合体を注入し，シグナルの増幅を行った．

ビオチン修飾抗体，ストレプトアビジン及びビオチン修飾 BSA 複合体を用いた SPR 測定の場合，固定化抗原上の抗体への結合に起因する急激なシグナル増加が確認され，測定可能範囲は約 5 × 10⁻¹²～10⁻⁸ g/ml であり，複合体を添加しないものと比べて約 2 オーダー高感度であった．

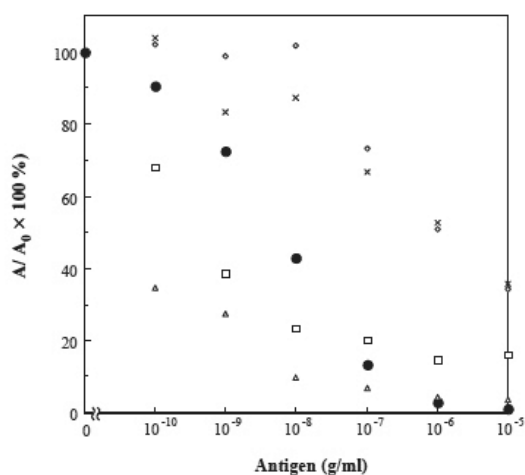


図 1 抗 TNP-KLH 抗体を用いた間接競合 ELISA 法による TNT 関連化合物の測定結果

●; TNT, □; TNA, △; TNP-aha
◆; 2,4-DNT ×; 2-ADNT

表 1 抗 DNP-KLH 抗体のニトロ化合物に対する結合性の比較

Nitroaromatic Compounds	MW.	IC ₅₀ (M)	
		Solid phase DNP-gly-OVA	Solid phase DNP-C8-OVA
2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT)	182	4.9 × 10 ⁻⁷	1.4 × 10 ⁻⁷
2,6-dinitrotoluene (2,6-DNT)	182	5.5 × 10 ⁻⁴	3.4 × 10 ⁻⁵
2-amino-4,6-dinitrotoluene (2-ADNT)	197	2.5 × 10 ⁻⁶	5.1 × 10 ⁻⁶
4-amino-2,6-dinitrotoluene (4-ADNT)	197	NI*	NI*
2,4-dinitrophenyl-glycine (DNP-gly)	241	2.9 × 10 ⁻⁸	1.5 × 10 ⁻⁸
1,3-dinitrobenzene (1,3-DNB)	168	2.7 × 10 ⁻⁶	3.0 × 10 ⁻⁶
Trinitrophenol(TNP)	227	1.3 × 10 ⁻⁶	3.1 × 10 ⁻⁶
2,4,6-trinitroaniline (TNA)	228	1.3 × 10 ⁻⁷	1.3 × 10 ⁻⁷
N-(2,4,6-trinitrophenyl)-benzylamine (TNP-ba)	312	2.9 × 10 ⁻⁵	NI*
N-(2,4,6-trinitrophenyl)-ethylamine (TNP-ae)	284	7.8 × 10 ⁻⁷	3.2 × 10 ⁻⁶
N-(2,4,6-trinitrophenyl)-glycine (TNP-gly)	286	7.0 × 10 ⁻⁷	3.5 × 10 ⁻⁶
Trinitrotoluene (TNT)	227	1.7 × 10 ⁻⁶	NI*

NI*: not inhibited

Concentration-dependent inhibition was not observed in the range of the analyte concentrations studied (1.0 × 10⁻¹⁰ - 1.0 × 10⁻⁵ g/ml).

Solid phase: DNP-C8-OVA

間接競合法による測定

抗原抗体反応を応用した間接競合法を用いて分子認識の感度を増幅させ、SPR センサで目的分子を選択的に検出する。タンパク質複合体抗原（コンジュゲート）の選定、固定化時の充填率の向上、および配向性の最適設計を行い、検出感度の向上を行った。また、送液時の流速やトータルの抗体流通時間などのパラメータを検討し、検出下限 ppt レベルの感度を保ちつつ、短時間検出を行った。

容易に交換可能なガラス基板上に金薄膜をスパッタ法により形成し、SPR センサ基板とした。この表面に物理吸着法を用いてコンジュゲートを固定化した。キャリア溶液としてはリン酸（PBS）緩衝溶液を用いた。まず、2,4,6-トリニトロフェニル-オボアルブミン（TNP-OVA）コンジュゲートを金基板上に固定化した。この時、TNP-OVA コンジュゲートが安定して表面に吸着していることを、SPR で確認した。その後、目的分子の非特異吸着を避けるために、ウシ血清アルブミン（BSA）を送液した。この時、BSA の吸着とともに共鳴角が増加する様子が観測された。BSA は大きな分子であるコンジュゲートの隙間に入り込み、金基板上の空サイトに吸着して非特異吸着を妨げる働きがある。そのため、共鳴角の変化が得られなくなるまで BSA の送液を繰り返し、表面に非特異吸着が起こる空サイトを無くした。

このようにして金基板上にコンジュゲートを固定化した後、TNT の検出を行った。はじめに、TNT と TNT 抗体を混合して 10 分間反応させた。TNT 抗体の濃度は TNT 抗体毎に最適化を行って決定した。次に、この混合溶液をセンサ基板上へ送液して、SPR で定量を行った。図 2 に TNP-OVA コンジュゲートと抗 TNP-KLH ポリクローナル抗体を組み合わせた場合の SPR 応答を示す。時間とともに抗 TNP-KLH ポリクローナル抗体が TNP-OVA コンジュゲートと結合している様子が観測された。また、混合溶液中に含まれる TNT 濃度が高いほど、共鳴角の変化量は小さかった。これは、混合溶液中で TNT と抗 TNP-KLH ポリクローナル抗体が結合し、TNP-OVA コンジュゲートへ結合できる抗 TNP-KLH ポリクローナル抗体の量が減少したためである。間接競合による応答値の減少幅は、混合溶液中の TNT 濃度に比例した。

図 3 には、TNP-OVA コンジュゲートと種々の抗体を組み合わせた時の TNT の検出範囲をまとめた。これより、検出限界はそれぞれの抗体によって異なることが分かる。特に TNT モノクローナル抗体（市販）と抗 TNP-KLH ポリクローナル抗体との組み合わせにより ppt レベルの検出が可能である。また、TNP モノクローナル抗体（市販）を使うことによって、ppb から ppm レベルの高濃度 TNT を検出することができた。したがって、同一の固定化素子を用いて混合する抗体を変えるだけで、広い濃度範囲で TNT を検出できることが分かった。さらに、TNT 測定後にペプシン-塩酸溶液を用いることで、TNT 抗体を脱離させ、素子を再活性化させることができた。このため同一のセンサ素子を 20 回以上、感度を落とすことなく使用することが可能であった。

図 2 に示したように、TNT の検出を ppt レベルの感度を保ちつつ、2 分以内で行うことができた。なお、この 2 分以内の測定は TNP モノクローナル抗体、TNT モノクローナル抗体を

用いた場合も可能であった。さらなる高感度・高速応答の達成を目指し、自己組織化単分子層（SAM）を用いた配向制御や別種のコンジュゲートの使用による最適化を図っている。

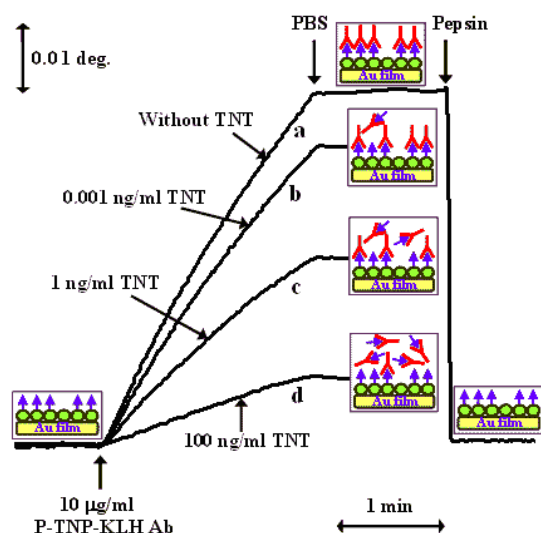


図2 TNT 共存／非共存下における TNP-KLH 抗体 (Ab) による TNP-KLH コンジュゲートとの抗体抗原反応のセンサグラム

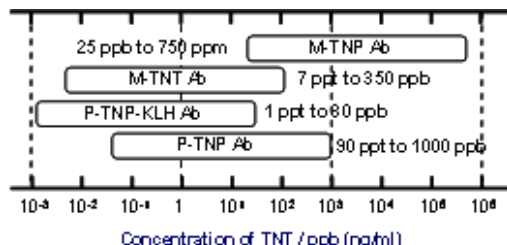


図3 TNP-OVA コンジュゲートと各抗体の組み合わせによる TNT 検出可能範囲：競合に伴う応答の阻害率 15% から 85% の範囲における直線応答領域

鑄型分子認識膜の作製

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、ホスト分子とゾ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。従来ホスト化合物の一種であるシクロデキストリン（CD）は、多くの芳香族化合物と強い分子間相互作用を示すことから様々な分野に幅広く用いられ、芳香族ニトロ化合物の爆薬物質に対してもその応用が期待できるものである。北九大のグループでは、李研究室の独自技術である気相表面ゾルーゲル法をシクロデキストリンホスト分子の固定化に用い、更にレセプター部位を高密度に作成するために有機・無機交互積層化を行った。

メルカプトエタノールを修飾した水晶振動子上に $\text{Ti}(\text{O}-n\text{Bu})_4$ と CD の交互吸着を行った際の振動数変化を図 4a に示す。この振動数変化から分かるように CD 分子は酸化チタンマトリックスを介して、薄膜中に規則的に導入できる。 γ -CD 薄膜の DNT 分子に対する結合特性をサイクリックボルタンメトリ（CV）測定により評価した。フェロシアナイド (2mM) と塩化カルシウム (1M) 混合溶液を用い、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 測定結果を図 4b に示す。図 4b は通常の LPV モードによるフェロシアナイドの酸化・還元プロットであり、図 4b の挿入図は DPV モードの結果である。以上の測定結果から認識膜の結合定数を算出すると、 TiO_2/γ -CD 膜は $6.9 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ となる。 β -CD を用いて同様な測定を行った時の結果と比較して約 3 倍以上の高い

結合力を示すことが分かった。現在、DNT の検出限度は 2 nM（約 0.4 ppb）以下を示し、膜厚や電極などの実験条件を変えることでより実用的検出が可能となった。来年度は、本技術を爆薬マーカーであるジメチルジニトロブタンに適応していく。

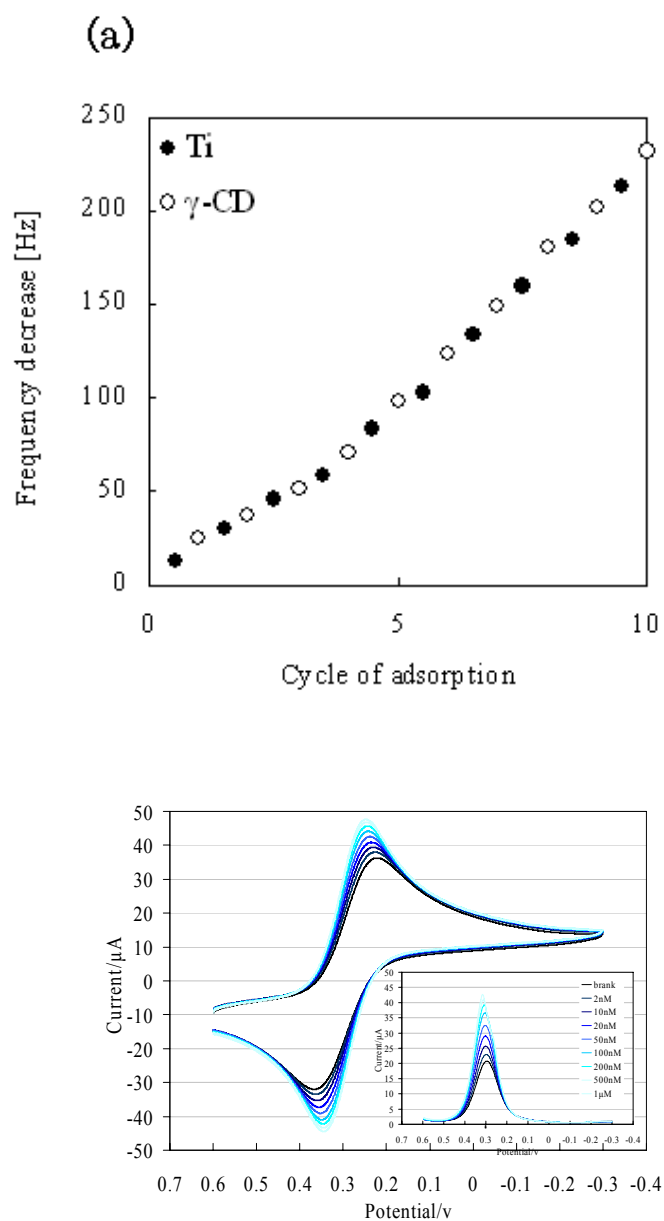


図4 QCMによるTiO₂/γ-CD交互積層膜の製膜評価(a)およびCVによるDNT結合評価(b, DNT濃度：2nM, 10nM, 20nM, 50nM, 100nM, 200nM, 500nM, 1 μM)

3. 研究実施体制

「九州大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：都甲 潔（システム情報科学研究院、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

「北九州市立大」グループ

- ① 研究分担グループ長：李 丞祐（北九州市立大学国際環境工学部、講師）
- ② 研究項目：爆薬および爆薬マーカーに対する鑄型分子認識膜の作製

「インセント」グループ

- ① 研究分担グループ長：池崎 秀和（インテリジェントセンサーテクノロジー、代表）
- ② 研究項目：超高感度匂いセンサシステムの開発設計

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- K. Matsumoto, A. Torimaru, S. Ishitobi, T. Sakai, H. Ishikawa, K. Toko, N. Miura, T. Imato, “Preparation and characterization of a polyclonal antibody from rabbit for detection of trinitrotoluene by a surface plasmon resonance biosensor,” (Talanta, 68, 305-311. 2005)
- 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,” (Sensors and 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, No. 2, 141-144. 2006)