

「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、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、昨年度試作したポータブル型表面プラズモン共鳴センサの改良を行った。また、ジニトロトルエン(DNT)に対するモノクローナル抗体の性能評価を行った。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した。

次年度には試作器の評価・改良を行うとともに、拭き取りサンプリングによる現場での使用方法の検討を行う。また、ガス状態の爆薬のサンプリングについても検討する。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1) に対応する)

1. 抗体の作製

ラットリンパ節法により抗 DNT モノクローナル抗体作製を試みた。本法を用いた結果、約 3 カ月という短期間で 4 株の抗 DNT 抗体産生ハイブリドーマ獲得に成功した。ここで最も DNT に対して高い結合性を示す抗体を産生した株について大量培養を行い、抗 DNT モノクローナル抗体を作製した。本抗体の爆薬関連化合物に対する結合特性を間接競合 ELISA 法によって評価した結果を表 1 に示す。ここでは比較対象として昨年度に報告したマウス由来抗 DNT モノクローナル抗体を挙げる。表 1 より、今回作製したラット由来抗 DNT モノクローナル抗体は 2,4-DNT に対して最も高い結合性を示した。更に、マウス由来抗 DNT モノクローナル抗体と比べて 2,4-DNT に対する結合性が 1 オーダー高く、かつ交

差反応性も概ね低い値を示した。このことから、本抗体はより DNT に対する結合性、特異性が高い抗体であると言える。

続いて RDX に対する抗体作製を試みた。免疫原として、(1,3,5-Trinitrohexahydropyrimidin-5-yl)methylhemiglutarate (以下 RDXa1)を BSA 及び KLH と結合させた RDXa1-BSA 及び RDXa1-KLH を免疫原として用い、ラット由来抗 RDXa1-BSA、

及び抗 RDXa1-KLH 抗体ポリクローナル抗体を作製した。両抗体を用いて間接競合 ELISA 法による RDX の測定を行った結果、両抗体ともに RDX の濃度依存的なシグナルの減少が認められたことから、RDX に対する結合性を有することが示された。

2. 間接競合法による検出

TNT の検出は、ppt レベルの感度を保ちつつ、短時間で検出を行うことを目指し、Au ナノ粒子を用いた LSPR (Localized surface plasmon resonance)による信号増幅法による最適化を試みた。

昨年度に報告した TNT 誘導体を固定化した自己組織化膜を使ったイムノ表面と、今回の Au ナノ粒子を固定したイムノ表面との特性を比較した。サンプル溶液を流通してから 2 分間の信号応答は、Au ナノ粒子を使うことにより、5 倍の増加がみられた。さらに、センサ応答の初期段階において応答速度が向上していることがわかった。これは、イムノ表面で抗原が立体的に配置されているために、抗体が抗原と、より容易に反応できたためと考えている。しかし、検出下限と検出上限には変化は見られなかった。LSPR 効果は共鳴角応答を増幅するが、抗原抗体反応自体には影響を与えないものと考えられる。

応答速度の向上により、1 分間でも TNT を検出するのに十分な共鳴角変化量が得られた。今後は、LSPR 効果による信号増幅法の最適化を行い、小型化した SPR 装置でも大型 SPR 装置と同等の感度を得られるように試みる。

また、オリゴエチレンジグリコールを有する表面を作製し、非特異吸着を抑制して誤差の少な

表 1 ラット由来抗 DNT モノクローナル抗体およびマウス由来抗 DNT モノクローナル抗体の結合特性

Compounds	rat-anti-DNT mAb		mouse-anti-DNT mAb	
	IC ₅₀ (M)	C.R (%) [†]	IC ₅₀ (M)	C.R (%)
2,4-dinitrotoluene	5.0×10^{-7}	100	5.0×10^{-6}	100
2,4,6-trinitrophenyl-glycine	1.0×10^{-6}	50	2.5×10^{-6}	202
2,4-dinitrobenzene	2.3×10^{-6}	21.7	3.0×10^{-5}	16.6
2,4,6-trinitrotoluene	2.4×10^{-6}	20.8	4.0×10^{-5}	12.5
2,6-dinitrotoluene	2.8×10^{-6}	17.9	5.8×10^{-6}	80.6
2,4-dinitrophenyl-glycine	4.2×10^{-6}	11.9	8.3×10^{-7}	596
2,4,6-trinitrophenol	8.6×10^{-6}	5.8	1.3×10^{-5}	37.8
2,4-dinitrophenol	Not detected	—	Not detected	—

CR : Cross Reactivity

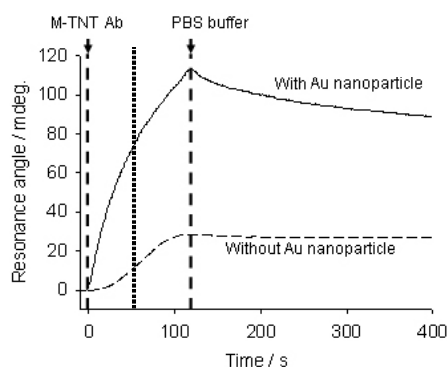


図 1 モノクローナル TNT 抗体 (10 ppm) に対する SPR 応答の比較

い測定を可能にした³⁾.

3. 鑄型分子認識膜の作製

電解質および電気化学プローブの濃度，スキャン時間などの実験条件の最適化を行った。右図は， γ -CD/TiO₂ 膜でのゲスト分子吸着に伴う，ボルタグラムの変化を示す。測定条件は，Scan range: 0 V ~ -1.2 V, Scan rate: 100 mV/sec で 2,4-DNT 濃度を 0.002 nM ~ 100 μ M と増加させながら電気化学プローブである ferricyanide 還元ピークの変化を測定した。規則正しい電流値増加が見られ，最適な電解質濃度条件下で約 2 pM(0.4 ppt)でも検出が可能であることが確認できた(図2)。 β -CD の膜の場合，1 μ M 付近から電流値の増加が飽和に達するに対し， γ -CD の膜ではその濃度範囲で規則的な増加が見られ， γ -CD/TiO₂ 膜の方が β -CD/TiO₂ 膜より 2,4-DNT 分子に対するキャパシティーが大きいことが示唆された。 β -CD または γ -CD の錯体形成について，2D ¹H-NMR および UV-vis 分光法 (Job's plot) を用いて検討を行った。

抗原-抗体法が適用できない爆薬物質の一つである DMDB に対する鑄型薄の作製を引き続き行った。また，芳香族ニトロ化合物に対する鑄型薄の作製を試み，ニトロ官能基の数，配置などによる還元ピークの変化とその定量について検討を行った。

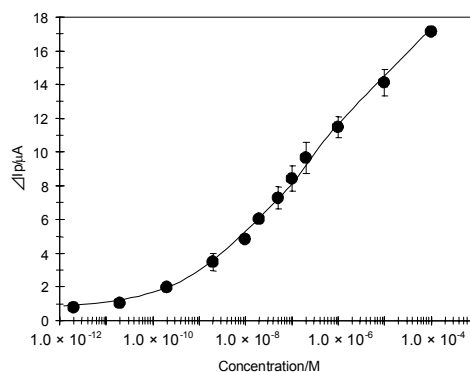


図2 γ -CD/TiO₂膜の 2,4-DNT に対するセンサ応答

4. 超高感度匂いセンサシステム 超高感度匂いセンサシステムのプロトタイプ作製

H18 年度に作製した試作装置の改良を行った。図3にその外観を示す。5 ポートの電磁弁をフローセルの後ろに配置することにより，電磁弁のコイルの発熱の影響を排除することができた。また，計測制御ソフトウェアの改良を行った。

次年度は，本試作装置により，TNT 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，さらに改良をすすめる。

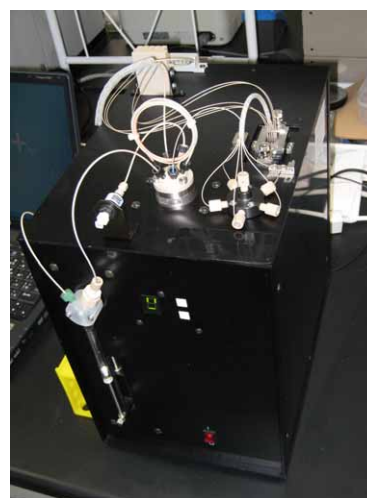


図3 プロトタイプ超高感度匂いセンサシステム

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 (九州大学大学院、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

(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、准教授)
- 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

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. P. Singh, T. Onodera, Y. Mizuta, K. Matsumoto, N. Miura and K. Toko
“Novel DNP-KLH Protein Conjugate Surface for Sensitive Detection of TNT on SPR Immunosensor”
Sensors and Materials, Vol. 19(5), 261-273, (2007)
2. M.J. Ju, D.H. Yang, N. Takahara, K. Hayashi, K. Toko, S.W. Lee, and 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., 2630-2632 (2007).
3. Y. Mizuta, T. Onodera, P. Singh, K. Matsumoto, N. Miura, K. Toko
“Development of an oligo(ethylene glycol)-based SPR immunosensor for TNT detection”
Biosensors and Bioelectronics, (in press)
4. D. R. Shankaran, N. Miura
“ Trends in interfacial design for surface plasmon resonance based immunoassays”
J. Phys. D. Appl. Phys., 40 (2007) 7187-7200.
5. 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 SPR detection of TNT”

Inter. J. Environ. Anal. Chem., 87 (2007) 771-781.

6. D. R. Shankaran, T. Kawaguchi, K. Matsumoto, K. Toko, N. Miura,
“Nano-designed SPR immunosensor for detection of explosives”
MJISAT Conference Proceedings, (2007) 1-6.
7. 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, 72 (2007) 554-560.

(2) 特許出願

平成 19 年度 国内特許出願件数：1件（CREST 研究期間累積件数：1件）