

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

本研究は、目的分子と選択的に結合する抗体および鑄型分子認識膜を、それぞれ表面プラズモン共鳴 (SPR) センサおよ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を開発することを目的としている。

今年度は、昨年度改良したポータブル型 SPR センサの更なる改良および評価を行った。この試作器の SPR 現象の検出器としての感度は、市販の卓上型 SPR 装置と同等レベルであることがわかった。ジニトロトルエン (DNT) について、独自に作製した抗体を用いて市販の卓上型 SPR 装置による測定をし、検出下限 30 ppt を達成した。また抗体については、爆薬である RDX に対するモノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞を確立した。ELSIA 法による測定を行い、検出下限 480 ppt を得た。

次年度には1次試作器の評価・改良を終え、拭き取り法による実証 (模擬) 試験を行う。また、2次試作器の作製を行う。ガス状態の爆薬のサンプリングについても検討する。SPR 測定における高感度検出方法の検討は継続して行う。

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

RDX の抗体については、19 年度に行った初期評価の結果を踏まえ、本格的な抗 RDX 抗体の作製を開始した。まず、高親和性抗体の獲得のため、ウサギ由来ポリクローナル抗体の作製を試みた。免疫原としては RDXa1-KLH を用い、これをウサギに免疫した。免疫期間中、血清抗体価の十分な上昇を確認した後に全採血を行い、得られた血清を精製し、ウサギ由来抗 RDXa1-KLH ポリクローナル抗体を得た。これを用いて間接競合 ELISA 法による RDX の測定を行った。19 年度に作製したラット由来抗 RDXa1-KLH ポリクローナル抗体と比較して、新たに作製したウサギ由来抗 RDXa1-KLH ポリクローナル抗体は RDX に対してより高い親和性を示し、かつ ppb レベルでの RDX 検出が可能であった。

また, RDX に対するモノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞を確立した. ELISA 法による測定では, 検出下限が 480 ppt となった. 本モノクローナル抗体の交差反応性を検討したところ, RDXa1 及び RDXa2 (RDX アナログ) には高い親和性を示すものの, 他の爆薬関連物質には殆ど全く親和性を示さなかった. このことから, 本モノクローナル抗体は極めて特異性が高いと判断された.

2. 間接競合法による検出

DNT の測定

昨年度作製したウサギ由来抗 DNP-KLH-400 抗体を用いた SPR センサによる測定系の構築を試みた. ここでは DNT 類似化合物を, 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介して金基板へ導入した. 測定は $20 \mu\text{g/ml}$ のウサギ由来抗 DNP-KLH-400 ポリクローナル抗体と 2,4-DNT の混合溶液を市販の卓上型 SPR 装置にインジェクションすることで行った. 結果より, 2,4-DNT の濃度依存的なシグナルの減少が確認され, その検出下限は 20 ppt であった⁶⁾. この感度は, TNT についてこれまで捉えられた感度と同等であり, TNT, DNT 共に ppt レベルの感度を達成できたことになる.

3. 鋳型分子認識膜の作製

爆薬マーカーであるジメチルジニトロブタン (DMDB) に対し, チタニアマトリックスを用いた鋳型薄膜の作製を試みた. $\text{Ti}(\text{O}-i\text{Bu})_4$ 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用いて薄膜を作製し, サイクリックボルタメトリーを用いて分析を行った. その結果, 1 ppm 以下の DMDB を検出することが可能であった. この時の検出時間は 1 分以内であった.

爆薬マーカー検知のための, ポータブルな電気化学測定装置の試作を行った. 来年度は本試作装置による気相中の DMDB の検出を試みる.

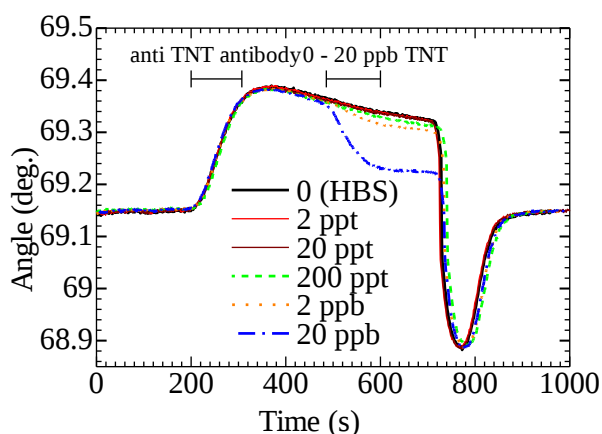


図1 試作 SPR 装置における置換法での TNT の測定

4. 超高感度匂いセンサシステムのプロトタイプの作製

シヨ糖溶液を用いて、共鳴角度変化を既存の卓上形 SPR 装置および本試作装置により、測定を行った。その結果、シヨ糖濃度に対する角度変化は、既存の卓上 SPR 装置と同レベルであることがわかった。また、試作 SPR 装置で置換法により TNT を測定した(図1)。その結果、市販卓上型 SPR 装置と同等の応答が得られることがわかった。

5. サンプルング・濃縮技術の確立

吸着剤(濃縮管)を用いず、約 2.5 ppm の TNT ガスを、1 分間の冷却凝集により約 220 ppt の溶液にすることが可能であった。1 分程度の短時間で溶液化できるものの、濃縮の効率としては悪く、現場で想定される ppt~ppb レベルのガスに適用することは難しい。そこで、捕集管を用いた実験系の再検討を行うため、新規の実験系の構築を行った。

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. T. Kawaguchi, D. R. Shankaran, S.J. Kim, K. Matsumoto, K. Toko, N. Miura, “Surface plasmon resonance immunosensor using Au nanoparticle for detection of TNT”, Sens. Actuators B, 133 467-472 (2008)
2. 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, Vol.24, pp.191-197 (2008)
3. K. Nagatomo, K. Matsumoto, S. Ishitobi, M. Koga, K. Toko, N. Miura, “Preparation of anti-dinitrotoluene polyclonal antibody and effect of the hapten spacer length in coating antigen on immunoassay sensitivity”, J. Fac. Agr., Kyushu Univ., Vol.54, pp.165-171 (2009)
4. K. Nagatomo, K. Matsumoto, K. Toko, N. Miura, “Preparation of anti-2,4-dinitrotoluene monoclonal antibody by using rat medial iliac lymph node cells and its characterization using solid phase enzyme-linked immunosorbent assay”, J. Fac. Agr., Kyushu Univ., Vol.54,

pp.173-178 (2009)

5. P. Singh, T. Onodera, Y. Mizuta, K. Matsumoto, N. Miura, K. Toko, “Dendrimer modified biochip for detection of 2,4,6 trinitrotoluene on SPR immunosensor: fabrication and advantages”, *Sensors & Actuators B*, Vol.137, pp.403-409 (2009)
6. K. Nagatomo, T. Kawaguchi, N. Miura, K. Toko, K. Matsumoto, “Development of a sensitive surface plasmon resonance immunosensor for detection of 2,4-dinitrotoluene with a novel oligo (ethylene glycol)-based sensor surface”, *Talanta* (2009) in press

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)