

人工分子認識素子の合成とその応用

矢野 和義

①

人工分子認識素子の合成とその応用

矢野 和義

THE
STATE
OF
NEW YORK
IN SENATE
JANUARY 18, 1907

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

REPORT
OF THE
COMMISSIONERS OF THE LAND OFFICE
IN RESPONSE TO A RESOLUTION
PASSED BY THE SENATE
MAY 18, 1906
AND
BY THE ASSEMBLY
MAY 18, 1906
ALBANY: J. B. WOODWARD, STATE PRINTER
1907

目次

第1章	緒論	1
1-1	緒言	1
1-2	においの測定の意義	3
1-3	におい物質の条件	4
1-4	生体のにおい受容の様式	5
1-5	従来のおい計測法	6
1-5-1	心理・生理計測法	6
1-5-2	物理計測法	7
1-6	水晶振動子を用いたにおいセンサー	8
1-6-1	水晶振動子表面の密度変化による共振周波数の変化	8
1-6-2	水晶振動子のにおいセンサーへの応用	10
1-7	安定で高感度なにおいセンサーの作製	11
1-8	新規分子認識素子の開発とその必要性	12
1-9	生体模倣化学における分子認識	12
1-9-1	静電相互作用による認識	13
1-9-2	水素結合による認識	14
1-9-3	疎水性相互作用による認識	14
1-10	鋳型重合法	14
1-11	モレキュラーインプリンティング法	15
1-12	モレキュラーインプリンティング法による分子認識素子の合成	17
1-12-1	共有結合型モレキュラーインプリンティング	17
1-12-2	非共有結合型モレキュラーインプリンティング	18
1-13	従来のモレキュラーインプリンティング法の問題点	18
1-14	本研究の目的と意義	20

第2章	人工脂質を用いるにおいセンサー	22
2-1	緒言	22
2-2	実験方法	22
2-2-1	試薬	22
2-2-2	測定装置	23
2-2-3	スピンコート法による脂質膜の作製	24
2-2-4	標準ガスの発生法と原理	24
2-2-5	におい物質の測定法	27
2-3	結果及び考察	28
2-3-1	スピンコート法による脂質膜の作製	28
2-3-2	コレステロールの添加による脂質膜の応答性への影響	28
2-3-3	ホスファチジルゴリンのアシル鎖の長さの検討	30
2-3-4	三重結合を持つ人工脂質を用いたセンサーのにおい物質に対する 応答	35
2-3-5	α 位で分枝したアシル鎖を持つ人工脂質を用いたセンサーのにおい物質に対する応答	38
2-3-6	人の閾値とにおいセンサーの検出限界の比較	42
2-4	結言	44
第3章	高分子膜によるにおいセンサーの高感度化	46
3-1	緒言	46
3-2	実験方法	46
3-2-1	試薬	46
3-2-2	測定装置	47
3-2-3	担持膜の作製法	47
3-2-4	におい物質の測定法	48
3-3	結果及び考察	48

3-3-1	エマルションの調製及び被覆法の検討	48
3-3-2	PVBを用いた官能膜の作製及びセンサーの応答の評価	48
3-3-3	ナイロンを用いた高分子膜の作製	49
3-3-4	ナイロンを用いた担持膜のにおい応答の評価	53
3-3-5	α 位で分枝したアシル鎖を持つ人工脂質をナイロン担持膜に固定化して作製したセンサーのにおい物質に対する応答	58
3-3-6	人の嗅覚の閾値とにおいセンサーの検出限界の比較	60
3-4	結言	60
第4章	モレキュラーインプリンティング法によるテストステロン認識 高分子の合成	63
4-1	緒言	63
4-2	実験	64
4-2-1	試薬	64
4-2-2	テストステロンを鑄型としたインプリントポリマーの合成	64
4-2-3	インプリントカラムの調製	64
4-2-4	液体クロマトグラフィーによるカラムの評価	66
4-3	結果及び考察	67
4-3-1	鑄型分子と機能性モノマーとのモル比の最適化	67
4-3-2	機能性モノマーの効果	70
4-3-3	溶媒の効果	70
4-3-4	重合温度の検討	70
4-3-5	架橋剤の影響	72
4-3-6	共有結合的アプローチによるモレキュラーインプリンティング	73
4-4	結言	73
第5章	ペプチド間相互作用を模倣するモレキュラーインプリンティング	75

5-1	緒言	75
5-2	実験	76
5-2-1	試薬	76
5-2-2	新規機能性モノマー (1) の合成	76
5-2-2-1	<i>Tert</i> -butoxycarbonyl-L-valine <i>tert</i> -butylamide (3) の合成	76
5-2-2-2	L-valine <i>tert</i> -butylamide (4) の合成	79
5-2-2-3	<i>N</i> -methacyloyl-L-valine <i>tert</i> -butylamide (1) の合成	79
5-2-3	ジペプチド誘導体の合成	79
5-2-4	インプリントポリマーの合成	80
5-2-5	インプリントカラムの調製	80
5-2-6	液体クロマトグラフィーによるカラムの評価	81
5-3	結果及び考察	82
5-3-1	新規機能性モノマー (1) がインプリントポリマーの立体特異性に 及ぼす効果	82
5-3-2	鑄型分子と機能性モノマーとのモル比の最適化	84
5-3-3	溶媒の影響	84
5-3-4	インプリントポリマーのアミノ酸配列に対する選択性	86
5-4	結言	90
第6章	核酸塩基対を模倣するモレキュラーインプリンティング	91
6-1	緒言	91
6-2	実験	94
6-2-1	試薬	94
6-2-2	新規機能性モノマー (1) の合成	94
6-2-3	インプリントポリマーの合成	94
6-2-4	液体クロマトグラフィーによるカラムの評価	96

6-3	結果及び考察	96
6-3-1	新規機能性モノマー (1) の核酸塩基誘導体に対する親和性の評価	96
6-3-2	モレキュラーインプリンティングによるアロキサンの認識	97
6-3-3	鑄型分子と機能性モノマーとのモル比の最適化	102
6-3-4	¹ H-NMRによる相互作用の観察	103
6-3-5	モレキュラーインプリンティングによるバルビツール酸誘導体の認識	103
6-4	結言	107
第7章	モレキュラーインプリンティング法を用いるクロラムフェニコールの測定	108
7-1	緒言	108
7-2	実験	109
7-2-1	試薬	109
7-2-2	クロラムフェニコールを鑄型としたインプリントポリマーの合成	109
7-2-3	インプリントカラムの調製	109
7-2-4	液体クロマトグラフィーによるカラムの評価	111
7-2-5	クロラムフェニコール-メチルレッドを用いたクロラムフェニコールの計測	112
7-3	結果及び考察	112
7-3-1	機能性モノマーの種類、および鑄型分子と機能性モノマーとのモル比の検討	112
7-3-2	液体クロマトグラフィーにおける流速の選択性への影響	112
7-3-3	クロラムフェニコールの測定のための条件の検討	114
7-3-4	クロラムフェニコールの光学的測定	116
7-3-5	血清中のクロラムフェニコールの光学的測定	120
7-4	結言	120

引用文献 131

発表論文リスト 136

謝辞 137

第1章 緒論

1-1 緒言

酵素や抗体などの生体が有する優れた基質特異性、分子認識能を巧みに応用したバイオセンサーが、様々な分野で大きな注目を集めている。バイオセンサーとは、Fig. 1-1に示すように酵素や抗体、微生物などを分子認識素子とし、これを電極や光電子増倍管などのトランスデューサーと組み合わせたセンサーである。バイオセンサーは生体由来の物質を利用するため、反応性、基質選択性に優れており、また非常に簡便かつ安価に作製できることから、医療、環境計測、食品プロセスなど様々な分野に応用され、実用化されている(1-3)。

一方、バイオセンサーは分子認識素子として生体由来のものを利用しているため、長期にわたる安定性に欠ける、高温・高圧や有機溶媒中での使用に耐えられない、などの欠点を持つ。また、生体由来の素子ではセンサーとして得られる感度が十分でなく、実際のサンプルに適用できないこともある。さらに、どのような目的の分子に対しても認識や触媒反応などの機能を持つ生体由来の物質が自然に存在するわけではなく、応用範囲が事実上既に存在する生体物質に依存している。バイオセンサーに対する関心がますます高まり、測定対象が広範囲になっていく現代社会において、こうした問題は極めて深刻である。

こうした生体に由来するバイオセンサーの欠点を克服するため、生体機能を持った人工分子認識素子の創製が強く要望されている。このような素子に要求される条件として、

- (1) 生体の持つ優れた基質特異性、分子認識能と同等またはそれ以上の機能を持つこと
- (2) 生体が認識・反応できない物質と相互作用できること
- (3) 認識素子として用いるとき、生体よりも感度の高いこと
- (4) 精密な分子設計や多段階の合成過程を経ず、安価で簡便に合成できること

などがあげられる。こうした条件を満たすことのできる人工分子認識素子が創製されることによって、バイオセンサーの可能性や応用範囲が飛躍的に拡大することが期待される。

そこで本研究では、生体にかわる人工分子認識素子を合成し、これをセンサー素子とし

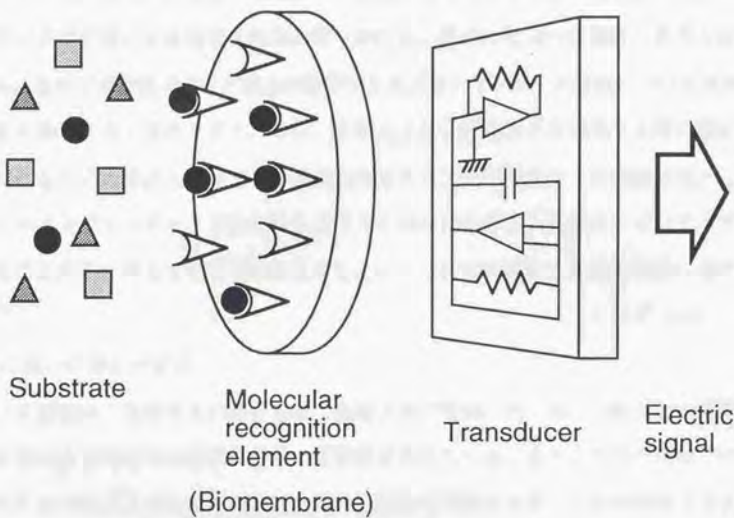


Fig. 1-1 Principle of biosensor

て利用することを目的とした。まず、比較的安定な素子である脂質を対象とし、天然には存在しない2種類の人工脂質を分子認識素子として用いることによって、高感度においセンサーを構築した。また、人工分子認識素子の合成方法としてさらに汎用性のあるモレキュラーインプリンティング法に着目し、これを用いて分子認識能を持つ様々な高分子を合成した。さらに得られた高分子をセンサーの素子として応用することを試みた。

本章ではまずにおいを計測する意義を明らかにし、従来のにおい計測法に関する知見をまとめる。さらに本研究で用いた水晶振動子によるにおいセンサーの原理について概説し、人工脂質を利用する必要性を示す。また、新規人工分子認識素子を開発する際に検討すべき分子間相互作用の様式を概説する。汎用性のある人工分子認識素子の作製方法としてモレキュラーインプリンティング法を取り上げ、この原理と応用、問題点についてこれまでの知見をまとめる。そしてこれらの知見をもとに、本研究の目的と意義を最後に述べる。

1-2 おい測定の意味

においの測定は、各種食品の品質管理、発酵工程の管理、肉、魚、果物などの鮮度の判定などいろいろな分野で広範囲な応用の可能性を有している。また、ダムや湖沼でのアオコの発生に伴う悪臭、工場排気臭や廃水臭の測定など環境モニタリングの分野でも重要な評価指標として認識されつつある。最近では一般の人々の間でもにおいに対する関心が高まっており、特に環境フレグランス、アロマセラピーなどが注目されている。

においの測定は従来、ガスクロマトグラフィーなどで行われており、最終的には人間の嗅覚によりにおいを評価していたが、これらの方法には問題点が多い。すなわち、ガスクロマトグラフィーによる分析法は試料のサンプリングが煩雑で高価な装置が必要であり、リアルタイムでの測定ができない。また、人による官能検査は、感受性の個人差や順応、疲労などにより評価が異なり、更に評価が環境や生理的、心理的な条件の影響を受けやすいので客観性に乏しく、信頼性が低い。このような背景から定性的、定量的においの計測が可能で、人の感覚を代用できるにおいセンサーの開発が求められてきた。

においを呈する化学物質の数は40万種ともいわれており、その構造は多種多様である。

人は、これらのにおい分子を鼻で受容し、においの情報を神経系で電気信号に変え脳に送り、におい認識をしている。これはにおい分子の嗅覚細胞への吸着という化学変化を、その際に生じる物理量（電気信号）の変化に変換して、情報を伝達していると考えられている。従ってこの機能を模倣することにより、人の嗅覚と同様なにおいセンサーを構築できると考えられる。しかし従来のにおいセンサーは、使用した官能膜に依存して感度が低く、測定の際のノイズが大きいなどの欠点があり実用的ではなかった。そのため人の嗅覚に匹敵する高感度なにおいセンサーの開発が強く要望されている。

1-3 におい物質の条件

嗅覚は化学物質の刺激によって引き起こされる化学感覚であるが、一般に嗅覚を刺激する物質をにおいと呼んでいる。においを感じるためには、におい分子が鼻の受容細胞に到達し、そこで相互作用を起こすことが必要である。そのため有香物質には以下のような条件が必要である(4)。

1) 分子量が300以下であること

物質を形成する分子が蒸気圧を持たなければ、空気によって鼻に届かない。分子が揮発性をもつためには、分子量に制限が出てくる。現在ではにおい分子の分子量は26-300と言われている。

2) 水及び脂質にある程度の溶解性があること

におい分子が鼻に到達してから、鼻の粘膜の水層を通過して受容器に到達し、さらに神経細胞の脂肪層に入り込むためには、ある程度の水溶性と脂質への溶解性を持つことが必要とされる。

3) 分子内に官能基や不飽和結合をもつこと

におい分子の構造をみると、カルボニル基、水酸基、エステル基のような官能基や不飽和結合を有している。このような官能基を持つことが必要であるとされている。

本研究では、高感度においセンサーを製作した後、主にアルコールを用いてその応答特性を評価し、さらに香料に用いられるような一般的な有香有機化合物を測定対象として人

の嗅覚の感度と比較した。

1-4 生体のおい受容の様式

においは嗅覚を刺激する物質と定義されるのでおいを理解するためには嗅覚のにおい受容機構を知る必要がある。におい分子の受容機構は完全には解明されていないが、現在までに多くの仮説が提唱されている。現在までに、嗅上皮表面の細胞ににおい分子が何らかの刺激を与え、この刺激が神経にパルス波として送られるという仕組みが一般的に受け入れられている。

このうちにおい受容タンパク質説(5)では受容タンパク質の存在を仮定し、受容タンパク質ににおい分子が結合すると、この変化が次の変化を誘発して細胞膜の内側でカスケード的に変化が生じ、これが細胞膜中に存在しているイオンチャンネルに作用して、細胞内外のイオンの流入を制御すると考えている。この説では、嗅覚受容タンパク質だけでなく、Gタンパク質、アデニル酸シクラーゼ、プロテインキナーゼなどの他のタンパク質や環状アデノシン-3',5'-リン酸(cAMP)などのいわゆるセカンドメッセンジャーなどの関わりによって連鎖的に起こる酵素反応過程を考慮している。しかし、受容タンパク質と思われる遺伝子はこれまでにクローニングされているが、そのタンパク質の嗅覚細胞からの精製は極めて困難であり、この仮説の証明は未だになされていない。

脂質膜受容説では、におい分子の受容に特別な受容タンパクが存在せず、におい分子が膜の脂質二重膜の空隙に吸着され、その際に生じる膜電位の変化及び脂質膜の流動性の変化が何らかの方法で神経系に伝達されるとしている(6,7)。この説は嗅覚細胞ではない神経芽細胞や、cAMP依存のイオンチャンネルが局在する嗅シリアを除去した嗅覚細胞を用いても、これらの細胞がにおい刺激に反応することから、におい受容において特別なタンパク質が存在しないと仮定した。しかし、この説では膜電位の変化による電気信号の神経への伝達経路が説明できず、この仮説もまだ証明されていない。

におい受容の機構についてはこのように依然不明な点が多いが、上記のような仮説をもとにして生体機能を模倣した認識素子を構築することができれば、人の嗅覚により近い感

度と選択性を持ったにおいセンサーが作製できると考えられる。

1-5 従来のおい計測法

香料工業における香りや、香料を用いた各種加工食品、化粧品などの香りの計測・評価については、音や光のような数値化された尺度は未だなく、客観的な表現方法も確立していない。そのため、今日においても、においや香りの評価はガスクロマトグラフィーなどの分析機器を用いてはいるものの、最終的には人間の嗅覚に頼っており、その結果の表現も一様ではない。以下に従来のおい計測法を述べる(8)。

1-5-1 心理・生理計測法

においの計測の場合、現在のところ評価の次元の数が不明で、標準のにおいも定まっていないが、このような状況の下でいくつかの計測法が用いられている。

悪臭の強さを採点する直接採点法では、強さや快・不快の程度を点数にして表す。この中には、6段階表示法や9段階快・不快表示法などがある。また希釈法では、採取された試料を無臭の空気希釈して、無臭の空気と比較し、においの区別がつかなくなるまでの希釈倍数で採取した試料の濃度を推定する。においの質の評価を行うためには、SD法が用いられている。すなわち、「きたない-きれい」、「暖かい-冷たい」などの言葉の対を多数用い、測定対象とするにおいを、たとえば5段階の尺度(非常に重い、やや重い、どちらでもない、やや軽い、非常に軽い、など)で評価する。複数の言葉の対に対する評価結果から得られるパターンで、においの特徴、違いを表現する。

T&Tオルファクトメーターは、昭和47年度文部省研究報告に記載された、嗅覚検査のための基準臭と検査方式の研究を基に開発された方法である(9-11)。ここで用いる基準物質は昭和57年5月17日に厚生省により嗅覚検査診断薬として承認された。この基準臭ができたことにより臨床的には嗅覚障害度の判定ができるようになった。わが国では、このオルファクトメトリー法が嗅覚検査に認定されたただ1つの方法である。また、この方法により求められた健康人の検知閾値、認知閾値は非常に信頼性が高く、臨床的にも用

いられている。

このほかにもにおいの保留性やにおいの時間的変化を評価して強度を判定する方法もある。

このような官能評価はにおいを感じる我々人間が測るため、ある意味では確かであるが、感受性の個人差や順応、疲労などに左右され、結果が環境や生理的、心理的な条件の影響を受けやすい。従って、客観性に乏しく、信頼性が低い。このことから官能検査の代わりに客観的な計測が行えるにおいセンサーの開発が望まれている。

1-5-2 物理計測法

においの計測を機器を用いて行うのに最もよく使われるのがガスクロマトグラフィー (GC) である。においの計測をガスクロマトグラフィーで行うと、沸点の低い揮発性化合物から順に気化してあらわれる。得られたクロマトグラムで各々のピークの同定を行う必要がある。最近では、成分の分離に優れた威力を発揮するGCとマススペクトロメトリー (MS) を組み合わせ、GCで分離した各成分をMSで分析するGC-MS法がさかんに利用されている。また、におい分子の内部振動が嗅覚細胞ににおいの興奮を引き起こすというDyson (12)やWright (13)の振動説をもとに、におい物質のレーザーラマンスペクトルを測定する方法も報告されている。さらにセラミック基板に金属酸化物を真空蒸着した金属酸化物半導体センサーも開発されている。これを用いてコーヒーやオレンジの香気成分の時間変化が測定されている。

こうした機器分析はかなり感度よくにおい物質を測定することができるが、GC-MSなど使用する機器には非常に高価なものが多く、汎用性があるとは言えない。またGCに使われる分離用カラムにはすでに多種多様な化学物質が開発されているが、脂質などの生体分子を用いたり、あるいはこれを模倣した機能性材料を合成して人の嗅覚に近い認識システムを構築している例はない。さらに用いる機器によっては、感度が低かったり、また測定の再現性や選択性に乏しくパターン分析も行えないものもある。以上のような背景から、安価で人の嗅覚システムを模倣した新規なにおいセンサーの開発が望まれている。

1-6 水晶振動子を用いたにおいセンサー

水晶振動子は、水晶板の圧電効果を利用したデバイスであり、高精度な基準信号源としてコンピューター、時計などの電子機器に広く利用されている。またこの表面を種々の官能膜（高分子膜、脂質膜）で被覆したものをセンサーとして用いることによって、いろいろな物質の計測が可能となっている。

1-6-1 水晶振動子表面の密度変化による共振周波数の変化

水晶振動子の中で代表的なものがATカット水晶振動子である。ATカット水晶振動子の構造をFig. 1-2に示す。ATカット水晶振動子は、水晶の結晶のAT面でカットした水晶板の両面に電極を形成したもので、この電極の両面に電圧を印加すると、水晶の圧電効果のため、面内方向にひずみを生じ、印加電圧を解除するとずり振動を生じる。この時の印加電圧を水晶板のずり方向の共振周波数に同期することによって、水晶振動子を共振させることができる。

ATカット水晶振動子は重量変化、粘度変化、密度変化等のごく小さな変化がその表面に起こったときに水晶振動子の周波数が変化するという性質を持つ。ATカット水晶振動子は温度による発信周波数への影響が小さいため様々なセンサーに用いられている。

Sauerbrey (14)は水晶振動子表面の振動の式をもとに、気体中での表面重量変化に関して次のような式を導いている。

$$\Delta F / F = -\Delta m / \rho d A$$

ここで、 F ：基本周波数、 ΔF ：周波数変化、 Δm ：重量変化、 ρ ：水晶の密度、 d ：振動子の厚さ、 A ：振動子の面積である。この式は、重量変化が $\rho d A$ （水晶の重量）に対して十分小さいときに成立することが実験的に確かめられている。これより水晶振動子は気体中では重量変化により周波数が変化することが分かる。液体中の表面変化については、村松

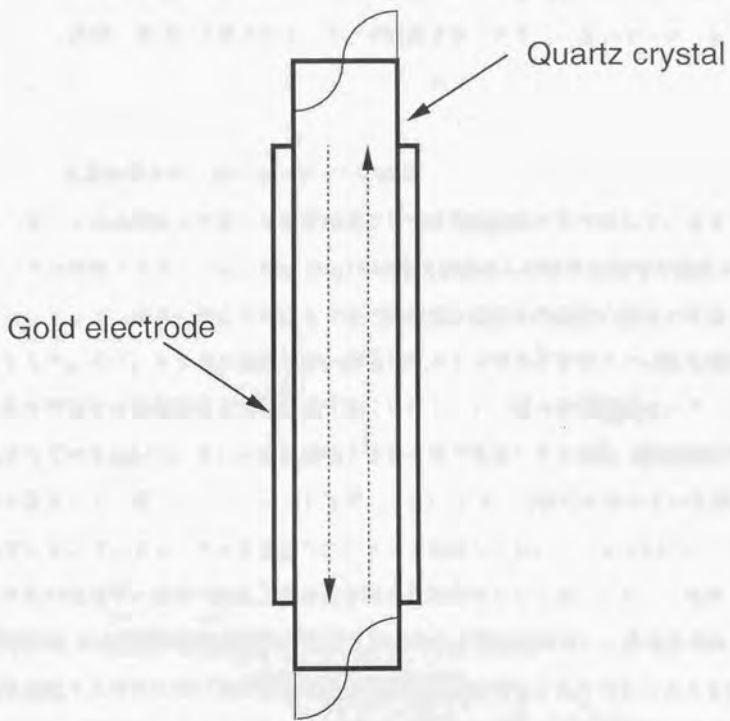


Fig. 1-2 Shear vibration model of the quartz crystal

ら(1009)が共振周波数変化と液体の粘度との関係式を導いている。

このように水晶振動子は重量変化に大きく影響され、周波数変化をすることが知られている。この原理に基づいて様々なセンサーが開発されており、おいセンサーもその一つである。

1-6-2 水晶振動子のおいセンサーへの応用

ATカット水晶振動子の微小な重量変化に対する周波数変化を利用して、さまざまなガスセンサーが報告されている。King (16, 17)は水晶振動子上にガス吸着性の薄膜を被覆することによって、湿度の測定やキシレンなどの炭化水素ガスの濃度の測定が可能であることを示した。また、シリコンやグリコールなどガスクロマトグラフィーの固定相に用いられる化学物質を水晶振動子上に固定化することによって、種々の選択性センサーチップが作製されている(18-21)。さらに水晶振動子を貴金属で被覆したり(22)、水晶振動子上にプラズマ重合により銅フタロシアニンを製膜して(23, 24)ガスの測定を行っている例も報告されている。コンピューターを駆使したパターン認識も行われている(25-27)。

これらのセンサーはすべて人工的な化合物を認識素子として用いており、栗原らの脂質膜受容説(6, 7)で重要な役割を果たす脂質とはほとんど関連性がない。多種多様なおい物質を測定するためには、人のおい受容機構を模倣したセンシングシステムを構築することが極めて重要であると思われる。こうした考えのもと、人の嗅覚組織の脂質膜に着目したバイオセンサーもいくつか報告されている。村松ら(28)やChangら(29-32)は圧電素子をフォスファチジルコリンなどのリン脂質で被覆することによって、人の嗅覚を模倣したセンサーを作製している。

リン脂質を用いたこのようなバイオセンサーによって、多様なおいの計測が可能となっている。一方、これらのセンサーは人の嗅覚よりも感度がかなり低く、人の閾値程度の微量なおいを測定することは極めて困難である。また使用できる天然の脂質の種類は限られている。さらに天然に存在する脂質を認識素子として使用すると、安定性に問題があり、一般的に繰り返し使用への耐久性が必要とされるにおい計測の分野には事実上適し

ていない。このため、センサー感度を向上させる安定な認識素子が必要とされている。

1-7 安定で高感度なにおいセンサーの作製

脂質を用いたにおいセンサーの感度は、におい物質に対する脂質の親和性に大きく左右される。従来認識素子として使われてきた脂質は、フォスファチジルコリンやフォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルイノシトールなど、細胞やオルガネラの表面に普通に存在するものばかりである。こうした脂質の物性は、コリンなどの親水基だけでなく、疎水的なアシル鎖とあわせて決定される。たとえば、脂質の分子間相互作用は疎水性側鎖の長さによって左右される(33)。従って、におい物質に対して高い親和性を持つ人工脂質を合成し、これを水晶振動子を用いたにおいセンサーに応用すれば、においの高感度センシングが行えると期待される。

岡畑らはポリスチレンをベースにした合成二分子膜を水晶振動子上に固定化してにおいセンサーを作製した(34-37)。しかしここで用いた人工脂質の側鎖はフォスファチジルコリンと同じ組成であり、しかも各側鎖はポリスチレンによって固定されているので膜としての流動性に乏しい。従ってこの人工脂質を用いるメリットには限りがある。

本研究では、におい物質測定用バイオセンサーの高感度化のためのポイントとして、以下の2つの点について考慮し実験を行うことにした。

(1) 流動性の高い官能膜を作製し、においの吸着による膜厚、粘度変化を大きくする。流動性の高い膜はその構造が乱れやすい状態にあり、におい物質が吸着することにより膜厚、および粘度が大きく変化すると考えられる。膜厚、粘度変化は密度変化に大きな影響を与え、周波数が変化する。

(2) 官能膜の表面積を上げ、におい物質の吸着量を増やす。吸着量の増加により、官能膜での重量変化が高まる。

これまでに官能膜として脂質や高分子が用いられているが、上記の(1)、(2)の観点からの官能膜の検討は行われていない。そこで本研究では、流動性に影響を及ぼすと思われる人工脂質、及びにおい分子の吸着量を増加させるための高分子膜を使ってにおいセ

ンサーの高感度化を行い、さらに人の嗅覚と本センサーの感度の比較を行うことを目的とした。

1-8 新規分子認識素子の開発とその必要性

酵素や抗体などの生体分子が有する優れた基質特異性、分子認識能を巧みに応用したバイオセンサーは、医療、環境計測、食品プロセスなど様々な分野に応用され、実用化されている(1-3)。一方、バイオセンサーは分子認識素子として生体由来のものを利用しているため、長期にわたる安定性に欠ける、高温・高圧や有機溶媒中での使用に耐えられない、などの欠点を持つ。さらに、目的の分子に対して認識や触媒反応などの機能を持つ生体由来の物質が自然に存在するとは限らない。測定対象がますます増大していく現代社会において、こうした問題は極めて深刻である。

こうしたバイオセンサーの欠点を克服するため、生体の持つ優れた機能を安定で簡単な化合物を用いて人工的に模倣・再現しようという試みが注目を集めている。人工酵素や人工レセプターの研究を中心とするいわゆる生体模倣化学(バイオミメティックケミストリー)である(38-40)。生体模倣化学ではまず、生体分子の機能を原子・電子レベルで理解する。そのうえで、アミノ酸、核酸、または非天然材料を用いて、新規生体機能素子を設計・合成する。このように合理的にデザインされた新規分子認識素子は、個々のターゲットに対して非常に特異的な選択性を有し、中には常温で優れた触媒活性を持つものも報告されている。しかしこうした手法は個々のターゲットの構造と目的分子の機能をもとにした精緻なデザインを必要とするため、普遍的な手法とはなりえない。また一般的に最終標品を得るまでに多くの合成ステップを踏むことが必要とされるため、実験者の経験と技能も要求される。

以上のような背景から、優れた機能を持つ生体に代わって、これと同様の機能を持つ安定な分子認識素子を簡便に作製する手法が強く要望されている。

1-9 生体模倣化学における分子認識

当初生体模倣化学は生体反応、なかでも特に酵素反応をモデル系として化学的に再現する学問として捉えられていた。現在では生体機能の原理を解明し、これを利用して生体と同様もしくはそれ以上の機能を持った人工系を作りだし、実用の目的に応用しようとする研究、といった広い意味に用いられるようになった。1-8で述べたように、精緻なデザインを必要とする生体模倣化学においては、新規分子認識素子を創製するための普遍的な法則は存在しないが、目的分子とこれを認識する素子との分子間相互作用は、どのような手法をとる場合でも検討されるべき最も重要な項目である。

生体系で進む反応は、対象分子（ゲスト）を厳密に認識している。このように正確に相手を識別する生体分子（ホスト）は、その分子認識力に様々な相互作用を利用している。以下に代表的な生体相互作用を列挙し、その特徴をそれぞれまとめてみる。

1-9-1 静電相互作用による認識

セリンプロテアーゼと呼ばれる一連の酵素群はその活性中心にセリン残基を持ち、その水酸基を用いてペプチド結合の加水分解を触媒している。代表的な酵素であるトリプシンは、プロトン化されたアルギニンなど正電荷をもつアミノ酸のカルボキシル側を切断し、疎水性アミノ酸には全く作用しない。これは、トリプシンの基質を認識する部分が負電荷を持っており、これによって正電荷をもつ基質を特異的に取り込むためである。このような静電相互作用は点電荷や双極子モーメントに由来し、これらに相当する単位力場は、それぞれ、

$$\text{点電荷-点電荷} \quad U = k \times Z_1 Z_2 / \epsilon r$$

$$\text{双極子-双極子} \quad U = k' \times \mu_1 \mu_2 \cos \theta_1 \cos \theta_2 / \epsilon r^3$$

で表される。Zは電荷価数、 ϵ は誘電定数、rは距離、 μ は双極子能率をあらわす。

ここで考慮すべきは、相互作用が起きる場である溶媒の極性が非常に重要であるという点である。 ϵ は誘電定数で、水の場合78、炭化水素で2である。ほとんどの溶媒はこの二者の間の値をとるが、水と炭化水素では、他の条件を全て同じとおいたときでも約40倍の

相互作用エネルギーの違いが出ることになり、静電相互作用のおこっている局所的な環境である溶媒の透電性質、つまり極性が重要な因子となる。

1-9-2 水素結合による認識

水素結合は、タンパク質や核酸などの生体高分子の高次構造形成や機能発現にとって、本質的な役割を演じている。中でも最もよく例に挙げられるのが、DNAの二本鎖を形成させている核酸塩基間の相補的水素結合で、チミンはアデニンと、シトシンはグアニンと対になって効果的な分子認識が行われることによって、DNAの構造が維持されている。

1-9-3 疎水性相互作用による認識

上記のトリプシンに対し、 α -キモトリプシンは同じセリンプロテアーゼであっても、フェニルアラニンや、チロシン、トリプトファンなど、大きな疎水性側鎖を持ったアミノ酸残基のカルボキシル側を切断し、親水性アミノ酸には全く作用しない。これは α -キモトリプシンの活性中心に疎水性の高い部分があり、この疎水性部分が基質の疎水基を認識して取り込むと、活性中心にあるセリンの水酸基が、ちょうど基質のカルボニル基を攻撃できるよう配置されるからである。この疎水性相互作用は、水になじまないゲストと疎水場をもつホストとの分子認識において、特に周囲に水が存在する場合に効果の現れる相互作用である。人工の疎水認識性ホスト化合物としては、シクロデキストリンやシクロファンのような環状化合物が研究されている。

以上のように、生体系では種々の相互作用を巧みに利用して厳密な分子認識がおこなわれている。こうした相互作用を巧みに応用すれば、人工的な生体機能分子の認識部位を効果的に構築できると考えられる。

1-10 鋳型重合法

安定な分子認識素子を簡便に作製するためには、ある程度剛直な構造を持ち、目的分子

の全体の立体構造を認識できるだけの大きさを持つ高分子であることが必須であると思われる。新たな物性や機能を持つ高分子を開発するためには、重合反応を意図的に制御できるかどうかが重要である。重合反応を制御することにより、同じモノマー組成からでも、異なった物理的性質を持つ高分子が合成できる。

生体高分子に目を向けると、その構成モノマー単位の種類や配列、さらに結合数までが厳密に制御されていることがわかる。その結果、情報の保持と伝達、分子認識能、触媒活性などの機能を発揮することができるのである。この生体高分子の生合成反応の仕組みを高分子合成に応用して、新たな機能を持つ高分子の創製が可能であると考えられる。この時、高分子の機能は、重合の際の鑄型と反応場の存在に大きく左右される。なかでも鑄型の存在に着目し、鑄型分子を系中に共存させることにより、モノマーの配向性を制御する方法を鑄型重合という。生体内における鑄型重合の代表は、核酸（DNA、RNA）を中心とした遺伝の基本機構でみられる。そこでは鑄型分子としての核酸塩基の配列に従って、モノマーが選択されて鑄型上に固定し、結合する。この鑄型の情報がモノマーの選択に生かされ、結果的に鑄型に特異的な高分子が形成される。

このように鑄型重合を行うことによって、目的分子に特異的な高分子を簡便かつ効果的に作製できると思われる。

1-1-1 モレキュラーインプリンティング法

1-9のような数々の分子間相互作用を考慮し、優れた機能を持つ生体と同様の機能を持つ安定な分子認識素子を簡便に作製する手法として、鑄型重合の一つであるモレキュラーインプリンティング法が近年大きな注目を集めている(41-44)。その原理をFig. 1-3に示す。

まず、認識対象分子を鑄型とし、この鑄型分子と、官能基を持つモノマー（機能性モノマー）とを混合して（A）、安定な複合体を形成させる（B）。ここに架橋剤を加えてそのまま一挙に重合させて高分子を合成する（C）。その後鑄型分子を高分子内から洗い流し除去することによって、鑄型分子と安定な複合体が形成できるような位置と角度を保つ

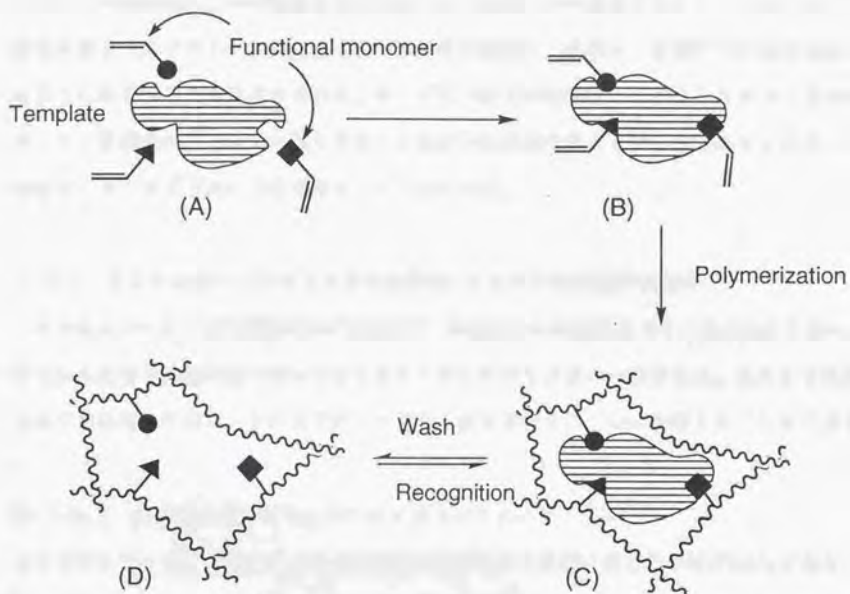


Fig. 1-3 Principle of molecular imprinting

て官能基が配置されたポリマーが生成する(D)、つまり目的分子の鑄型をとってしまうというものである。

この方法はゲストを認識する分子を精密にデザインする必要がなく、いわゆる精密な分子設計、多段階合成とは対極な立場にあるホスト高分子の合成法であるといえる。また一段階の重合反応でホストが得られるという合成の簡便さ、迅速さ、安価かつ容易な大量合成などの利点からも注目されている。そしてその最大の特徴は、どのようなゲスト分子に対しても原理的にはそれに対応したホスト高分子を合成することが可能であるという、いわばテーラーメイド的な手法であるという点にある。

1-1 2 モレキュラーインプリンティング法による分子認識素子の合成

モレキュラーインプリンティングにおいて、鑄型分子と機能性モノマーとの相互作用は、得られる高分子の特異性や結合力を左右する最も重要な要素の一つである。これまで利用されてきた相互作用は、主に可逆的共有結合と非共有結合の二つに分類することができる。

1-1 2-1 共有結合型モレキュラーインプリンティング

モレキュラーインプリンティングの実用的な可能性を最初に示したのはWulffらである。彼らは糖を鑄型分子とし、これと可逆的なボロン酸エステル結合を形成することのできる μ -ビニルフェニルボロン酸を機能性モノマーとすることによって高分子を合成した(45, 46)。得られた高分子をカラムの充填剤とし液体クロマトグラフィーを行うことによって、糖のラセミ体の分離に成功した。またSheaらはケタール結合に注目し、芳香族ケトンインプリンティングしたポリマーの分析を行なっている(47-50)。さらに、シッフ塩基(51)や炭酸エステル(52)を介した共有結合型インプリンティングの例も報告されている。

共有結合型インプリンティングの長所として、(1) 鑄型と機能性モノマーとの複合体が化学量論的であるため、ほぼ全ての機能性モノマーが鑄型分子に特異的な認識点となりえる、(2) 重合時にも安定に鑄型分子と複合体を形成しているので、得られる高分子内の認識部位に影響を受けにくい、などがある。また短所として、(1) 可逆的共有結合を行える

官能基が限定される、(2) 鋳型分子と機能性モノマーが共有結合で結ばれているため、高分子から鋳型分子を完全に除去するのが困難である、などがあげられる。

1-1 2-2 非共有結合型モレキュラーインプリンティング

Mosbachらは分子認識の推進力として水素結合やイオン結合を用い、共有結合に頼らない鋳型分子の利用を試みた。彼らは機能性モノマーとしてメタクリル酸を選び、イオンチャンネルの β -遮断薬(53)、ステロイド(54)、糖誘導体(55)、薬物(56)などに特異的な高分子を合成している。

Mosbachらのこうした研究をもとに、さまざまなインプリントポリマーが報告されている(57, 58)。さらに非共有結合型モレキュラーインプリンティングを利用して、触媒活性を持つ高分子(59-63)や、金属を特異的に配位する高分子リガンド(64-66)の合成にも成功している。また、インプリントポリマーをステンレスカラムの中で合成する*in situ*インプリンティング(67-69)の手法も開発されている。

非共有結合型インプリンティングの長所として、(1) 鋳型分子と機能性モノマーを混合し、自然な相互作用を行わせるので操作が簡便である、(2) 機能性モノマーとの結合が比較的弱いので、重合後の高分子から鋳型分子を回収しやすい、などがある。また短所として、(1) 鋳型分子と機能性モノマーとの複合体が化学平衡に依存するため、重合時の複合体形成が不安定となる、(2) 機能性モノマーを過剰量用いるため、ポリマー内に非特異的な認識部位が形成される、などがあげられる。

1-1 3 従来のモレキュラーインプリンティング法の問題点

1-1 2で述べたように、モレキュラーインプリンティングの非共有結合的アプローチと共有結合的アプローチにはそれぞれ長所、短所がある。すなわち一方の長所は他方の短所になっている。このため、モレキュラーインプリンティング法によって分子認識高分子を合成する際、認識対象分子の種類によってどちらかの手法を選択することになる。しかしながら臨床や環境、食品分野などにおいてモニタリングの対象が極めて広範に及んでい

る現状を考慮すると、非共有結合的アプローチにより普遍性があることは明かである。実際圧倒的に多数の研究が報告しているのもこの非共有結合を利用したモレキュラーインプリンティングである。

一方、非共有結合的アプローチでは、ほとんどの場合機能性モノマーとしてメタクリル酸が用いられてきた。これは鋳型分子との間に水素結合、疎水性相互作用及び双極子・双極子相互作用が働くことが期待できるという理由による。しかしながらこの単一の分子種だけでは認識できる物質にも当然限界がある。このためより選択的な認識を実現するため、メタクリル酸とビニルピリジン(70)、*p*-ビニルフェニルボロン酸とビニルピリジン(71)、*p*-ビニルフェニルボロン酸と4級アンモニウム(72)などを組み合わせたカクテルインプリンティングが研究されている。

モレキュラーインプリンティング法のこれからの展開を考えると、最も必要とされているのはその分子選択性の向上である。一方、生体物質の分子内・分子間相互作用は、イオン結合や水素結合、疎水結合などさまざまな非共有結合によって成り立っており、インプリンティングに応用されているのはこのなかのごく一部である。しかも水素結合などの非共有結合が多点で形成されることによって、非常に特異的な相互作用が成り立っている。このように生体内で実際に行われている相互作用を積極的にモレキュラーインプリンティング法に応用することによって、さらに分子認識能の高い高分子を得ることができると思われる。具体的には、生体内で実際に行われている相互作用を模倣した新規機能性モノマーを開発していくことが、モレキュラーインプリンティング法の応用範囲を広げていく上で重要であると思われる。

また従来のモレキュラーインプリンティングの研究では、重合の際の溶媒や重合方法、機能性モノマーと鋳型分子とのモル比などの諸条件を細かく検討した例は非常に少ない。個々の認識対象分子について選択的な素子を合成するためには、こうした条件を一つずつ検討することが不可欠である。

さらに本研究の目的は、生体にかわる安定な分子認識素子を創製して、超安定なバイオセンサーを構築することであり、モレキュラーインプリンティング法によって得られた分

子認識素子をこのセンサーの素子として利用することにある。モレキュラーインプリンティング法によって得られた高分子をセンサーに応用した例は極めて少ない(73,74)。さらに実サンプルの測定まで行った報告はない。

1-1 4 本研究の目的と意義

本研究は、生体にかわる人工分子認識素子を合成し、これをセンサーによる計測や液体クロマトグラフィーでの分離に応用することを目的とする。

まず、比較的安定な素子である脂質を対象とし、天然には存在しない2種類の人工脂質を分子認識素子として用いることによって、高感度においセンサーを構築することにする。

第2章では、水晶振動子を利用したにおいセンサーの官能膜として脂質の検討を行う。特に脂質のアシル鎖に着目し、天然に存在しない三重結合を持つ人工脂質と、 α 位で分枝したアシル鎖を持つ人工脂質を用いて高感度においセンサーを作製する。さらに、従来におい測定において基準臭として用いられている標準におい物質を用いて、作製したセンサーの感度を人の嗅覚と比較する。

第3章では、第2章で作製したにおいセンサーをさらに高感度化することを検討する。水晶振動子の表面を多孔性高分子で被覆することによって、センサーの官能膜の表面積を広げ、におい物質の吸着量を増加させる。さらに α 位で分枝したアシル鎖を持つ人工脂質を固定化することによってセンサーの高感度化を図る。また得られたセンサーの感度を人の嗅覚と比較する。

次に、人工分子認識素子の合成方法としてさらに汎用性のあるモレキュラーインプリンティング法に着目し、これを用いて分子認識能を持つ様々な高分子を合成した。さらに得られた高分子をセンサーの素子として応用することを試みる。

第4章では、男性ホルモン的一种であるテストステロンを認識する高分子をモレキュラーインプリンティング法によって合成する。機能性モノマーと鋳型分子とのモル比、溶媒、架橋剤などの重合条件を詳細に検討することによって、最も基質選択能の高い高分子を得る。

第5章では、ペプチド間の多点水素結合を模倣した新規機能性モノマーを合成し、モレキュラーインプリンティングに応用する。高分子内に立体選択能を持った分子認識部位を構築することによって、ジペプチド誘導体のジアステレオマーを特異的に認識させることを試みる。

第6章では、核酸塩基の相補的塩基対に見られる多点水素結合を模倣した新規機能性モノマーを合成し、モレキュラーインプリンティングに応用する。イミド構造を有する鋳型分子に対して親和性を持つ高分子を合成し、その選択性を種々の類似化合物を用いて評価する。さらにこの高分子を用いて催眠剤の一種であるバルビツール酸誘導体を選択的に認識できるか検討する。

第7章では、抗生物質の一種であるクロラムフェニコールを認識する高分子をモレキュラーインプリンティング法によって合成する。重合条件を詳細に検討することによって、最も基質選択能の高い高分子を得る。さらにこの高分子をセンサーの分子認識素子として、クロラムフェニコールセンサーを作製し、その性能を評価する。

第8章では、本研究で得られた知見をまとめる。

本研究は生体にかわる人工分子認識素子を合成し、これを計測や分離に応用するものであり、様々な用途に応用できる安定な素子を創製するための基礎研究として極めて意義深いものである。

第2章 人工脂質を用いるにおいセンサー

2-1 緒言

脂質を用いたにおいセンサーは、人の嗅覚を模倣した優れたバイオセンサーとして、これまで数種類のもが開発されている。しかし従来認識素子として使われてきた脂質は、フォスファチジルコリンやフォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルイノシトールなど、細胞やオルガネラの表面に普通に存在する天然のものがほとんどであり、安定性に問題があった。しかも人の嗅覚の閾値まで測定することができず、この感度の低さもセンサーの実用化を妨げていた。においの測定は食品の品質管理や環境保全の分野でますます重要な項目となってきていることから、こうした諸問題を解決するにおい認識素子の開発が要求されている。

脂質を用いたにおいセンサーの感度は、におい物質に対する脂質の親和性に大きく左右される。これまでにおいセンサーで検討された脂質の物性はコリンなどの親水基部分だけであり、疎水的な性質を持つアシル鎖に着目した人工脂質の研究はほとんど行われていない。アシル鎖の物性は脂質膜の流動性に極めて大きな影響を与えることが知られており、結果的に脂質膜によるにおい物質の吸着に直接影響するものと予想される。

そこで本研究では脂質のアシル鎖に着目し、種々の長さのアシル鎖や他の脂質を用いて水晶振動子上に固定化し、におい物質に対する応答への効果を評価した。さらに脂質膜の流動性におい物質の吸着量に影響を与えると思われる人工脂質を水晶振動子上に固定化し、センサーの高感度化を図った。そして、わが国で嗅覚検査法としてただ1つ認定されたT&Tオルファクトメーターの基準臭として定められている5種類のにおい分子を用いて、本センサーの検出限界と人の閾値を比較することにした。

2-2 実験方法

2-2-1 試薬

天然に存在する脂質として、SIGMA社 (St. Louis, MO, USA) 製のL- α -フォスファチジル

コリンジバレロイル (C5:0)、L- α -フォスファチジルコリンジデカノイル (C10:0)、L- α -フォスファチジルコリンジペンタデカノイル (C15:0)、L- α -フォスファチジルコリンジパルミトイル (C16:0)、L- α -フォスファチジルコリンジアラキドイル (C20:0)、コレステロールを用いた。また、人工脂質として、1,2-ジ-(オクタデク-4-イノイル)-*sn*-グリセロ-3-フォスフォコリン、1,2-ジ-(オクタデク-12-イノイル)-*sn*-グリセロ-3-フォスフォコリン、1,2-ジ-(オクタデク-14-イノイル)-*sn*-グリセロ-3-フォスフォコリン、1,2-ジ-(2'-デシルテトラデカノイル)-*sn*-グリセロ-3-フォスフォコリン、1,2-ジ-(2'-オクチルドデカノイル)-*sn*-グリセロ-3-フォスフォコリン、1,2-ジ-(2'-ヘキシルデカノイル)-*sn*-グリセロ-3-フォスフォコリンを用いた。これらはシュツットガルト大学のシュミット教授より供与された(75, 76)。

測定対象物質としては、和光純薬製のメタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*n*-ブタノール、*n*-ヘキサノール、*n*-オクタノール、トルエン、ヘキサン、シクロヘキサンを用いた。また、嗅覚検査用のおい物質として、以下の5種類のものを用い、日本薬局方に基づいて作られた無臭の流動パラフィン（小堺製薬製）を用いて、人の検知閾値の濃度に希釈した。

(a) メチルシクロペンテノロン (10-5.6 w/w)

(b) γ -ウンデカラクトン (10-5.1 w/w)

(c) イソ-吉草酸 (10-6.0 w/w)

(d) β -フェネチルアルコール (10-5.2 w/w)

(e) スカトール (10-6.1 w/w)

(a)から(c)は東京化成製、(d)、(e)は和光純薬製のものを用いた。他の試薬は分析用の純度を持つものを用いた。

2-2-2 測定装置

本研究では、共振周波数約10MHzのATカット水晶振動子（コイケ製）を用いた。水晶板は $8 \times 8 \times 0.18$ mmのものを用い、スパッタリング法によりクロム150 Å、白金1000 Åの薄膜を両面に形成し、電極とした。そして、この水晶振動子をクロロホルムで10分間超音波洗浄し、UVオゾンクリーナー（日本レーザー電子：NL-UV253）で洗浄して用いた。

本測定装置をFig. 2-1に示す。発振回路としては同時に多数の情報を得るように、8チャンネル型のものを用いた。これは8つの発振回路と周波数カウンターからなり、同時に8個までの水晶振動子の共振周波数を測定することが可能である。

本システムは窒素ポンプ、ガスパーミエーター、周波数カウンター、恒温チャンバー、水晶振動子、パーソナルコンピューター、温度計より構成される。窒素ガスを標準ガスとし、ガスパーミエーターを用いて一定温度にした。また、ガスパーミエーター中において物質を入れてにおいガスを発生させた。におい物質は導入口から標準ガスと共に恒温チャンバー内の水晶振動子に達する。システムの制御及びデータ処理はパーソナルコンピューター（EPSON：PC-286VE）で行なった。なお、この発振回路は安西メディカルから供与された。

2-2-3 スピンコート法による脂質膜の作製

スピナー（ミカサ：1H-D2）を用いて脂質薄膜を水晶振動子の表面上に形成した。脂質溶液40 mg/ml（溶媒：*n*-プロパノール）を用い、これを水晶振動子の基板の中央に 10μ l滴下し、23℃で2段階のスピナーコート（400rpm、1500rpm）を順次行うことによって薄膜を形成させた。被覆した脂質量は、スピナーコート前後の共振周波数変化により確認した。

2-2-4 標準ガスの発生法と原理

本研究では、標準ガス発生器としてガスパーミエーター(3)（ガステック社：PD-1B）を用いた。以下にこの装置の原理を述べる（Fig. 2-2）。

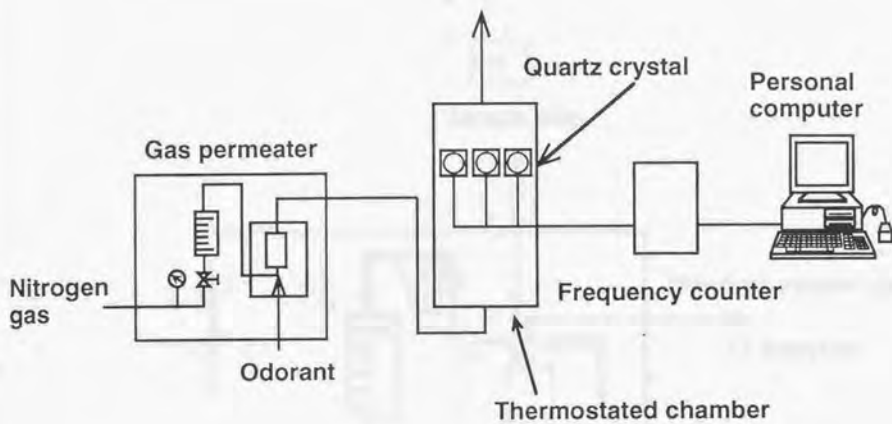


Fig. 2-1 Schematic diagram of the chemical vapor sensor

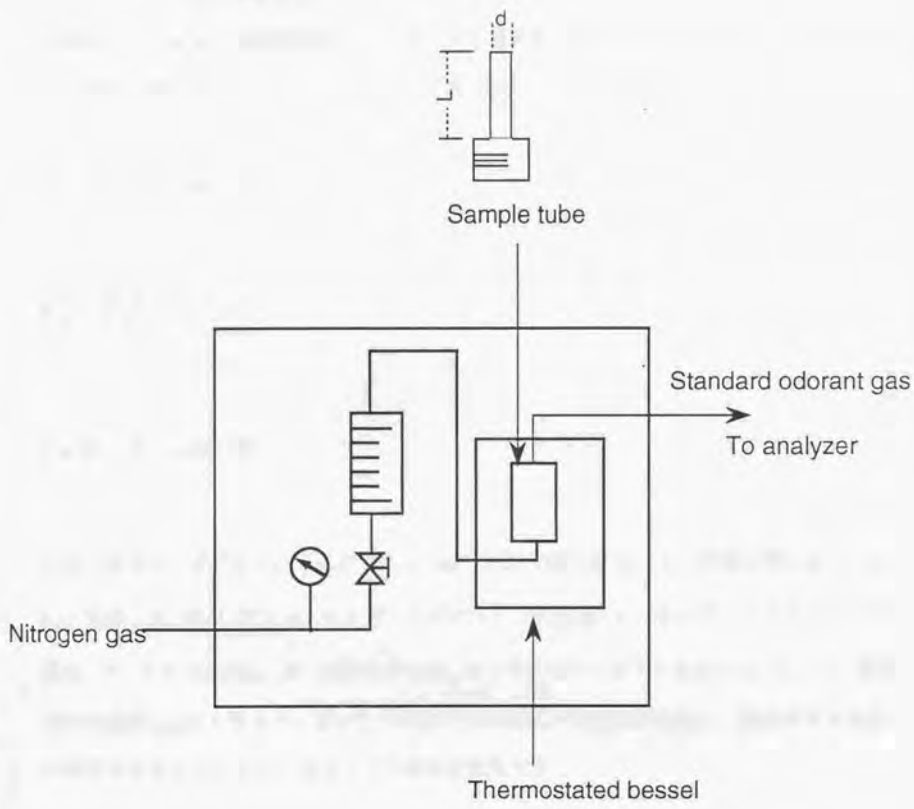


Fig. 2-2 Schematic diagram of gas permeator

サンプリングチューブ (1.5 ml) に測定物質を入れ恒温槽部に保持すると、単位時間当たり、におい分子が蒸発拡散する量は各温度で一定となる。そこにキャリアーガスを一定量送ることにより長期間安定した任意の微量濃度の標準ガスを発生させることができる。

本研究で用いたガスパーミエーターの理論式は以下の通りである。

$$D_r = K_1 \times d^2 / L = \Delta m \times 10^6 / T_i$$

$$K_2 = \frac{22.4 \times (273 + T) \times P}{M \times 273 \times 760}$$

$$C = D_r \times K_2 \times 10^3 / F$$

式中の記号は、それぞれ D_r ：拡散速度、 Δm ：試料の減少量 (g)、 T_i ：秤量時間 (min)、 K_1 、 K_2 ：定数、 T ：温度 (°C)、 d ：サンプリングチューブの直径、 L ：サンプリングチューブの長さ、 P ：圧力 (mmHg)、 M ：試料の分子量、 F ：キャリアーガスの流量 (ml/min)、 C ：標準ガスの濃度 (ppm)を表わす。従ってサンプリングチューブの直径や長さ、温度やガス流量を変化させることにより、標準ガスの濃度が調節できる。

2-2-5 におい物質の測定法

脂質で被覆した水晶振動子を30°Cに設定した容量約1Lの恒温チャンバー内に装着した。窒素ガスを流速0.2 l/minになるようにチャンバー内に送り込み、共振周波数が安定になるまで待った。その後におい物質を1.5 mLのマイクロサンプルチューブに1 ml入れ、これをガスパーミエーター中のチューブホルダーに4本同時にセットし、においガスを発生させた。においガスが恒温チャンバー中の水晶振動子に達した後 (約60分)、共振周波数変化

を測定した。共振周波数変化は、パーソナルコンピュータで記録した。

2-3 結果及び考察

2-3-1 スピンコート法による脂質膜の作製

濃度の異なるL- α -フォスファチジルコリンジデカノイル (C10:0)溶液をスピンコートにより水晶振動子に被覆した際の周波数の変化を調べた。脂質は10、20、30、40 mg/mlの *n*-プロパノール溶液を用い、それぞれ400 rpm、1500 rpmの2段階スピンコートにより水晶振動子に被覆した。スピンコートに用いた脂質溶液の濃度と脂質で被覆したことによる周波数変化との関係をFig. 2-3に示す。

この結果、脂質溶液の濃度とスピンコートによる脂質の被覆量すなわち周波数変化は比例関係にあり、40 mg/mlの溶液を用いたときに最大10 KHzの周波数変化を示すことが明らかになった。なお40 mg/ml以上の脂質溶液を用いたときには、水晶振動子の発振は観測されなかった。これは多量の脂質膜の形成によって重量変化が大きくなり、発振が妨げられたためと考えられる。溶媒として用いた *n*-プロパノールは比較的沸点が高いが、スピンコートの際脂質膜の形成と同時に直ちに蒸散したので、溶媒として問題ないことが確かめられた。

以上の結果、スピンコート法は水晶振動子上に脂質の薄膜を形成する方法として適していると判断し、以後の実験ではこの方法により脂質膜を作製することにした。

2-3-2 コレステロールの添加による脂質膜の応答性への影響

コレステロールはリン脂質のアシル鎖と相互作用することによって、細胞表面の脂質二重膜の流動性を下げることが知られている(77, 78)。これは、その固い環構造が脂肪酸側鎖の動きを妨害するからである。一方、コレステロールは脂質の親水基間の相互作用にはほとんど影響を及ぼさないことも知られている。このことから、コレステロールを混合した膜を水晶振動子上に形成することで、センサーの官能膜の流動性が変化し、水晶振動子

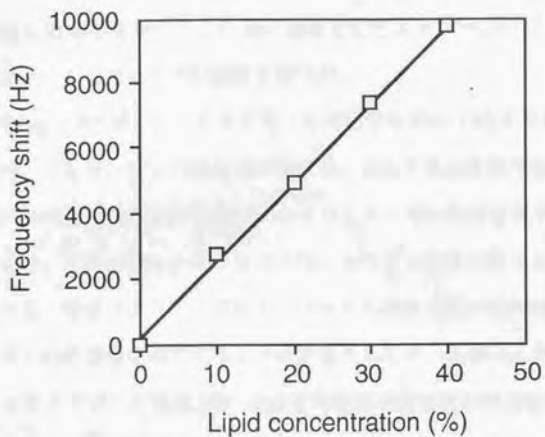


Fig. 2-3 Frequency shift caused by lipid immobilization

表面上での密度変化の効果が大きくなると考えた。さらにおい物質が吸着するために重要な脂質膜の見かけ上の面積が変化することも予想される。

そこでコレステロールとホスファチジルコリンを混合した膜をセンサーの官能膜とし、これを用いてにおいに対する応答を測定した。混合溶液は、40 mg/mlのL- α -フォスファチジルコリンジパルミトイル (C16:0)溶液100の体積に対して40 mg/mlのコレステロールを0~60の割合に調整したものをを用いた。におい物質としてエタノール、ブタノール、ヘキサノール、オクタノールを用いてその応答を調べた。

測定の結果をFig. 2-4に示す。コレステロールの重量%が0~25%まで増加すると、どのにおい物質に対してもセンサーの応答値が増大し、25%で周波数変化は最大となった。一方コレステロールの重量%が25%以上になるとセンサーの応答値は減少し、40%以上では変化しなくなった。これは明らかにコレステロールのリン脂質に対する効果によるものであると考えられる。前述のように、コレステロールには脂質膜の流動性を下げる効果があるため、センサーの応答値は減少することが予想されたが、実験により逆の結果が得られた。これは、コレステロール濃度が0~25%までは混合脂質膜の流動性は下がるものの、におい物質が吸着するために重要な脂質膜の見かけ上の面積が拡大し、さらにコレステロールの水酸基によってにおい物質をより吸着しやすくしやすくなったためと考えられる。一方、コレステロール濃度が25%以上では膜としての構造がとりにくくなり、逆ににおい分子の吸着量が減少したものと考えられる。また、細胞やオルガネラの表面上で見られるコレステロールの生理的な濃度は10~40%である(79)ことから、過剰なコレステロールの添加はセンサーの分子認識素子としての脂質膜の構造を阻害すると予想される。

以上のように、官能膜である脂質膜の流動性を変化させることでセンサーの応答をコントロールできることが示された。

2-3-3 ホスファチジルコリンのアシル鎖の長さの検討

におい物質に対する脂質の親和性は、センサーの応答値、特に感度に大きな影響を及ぼ

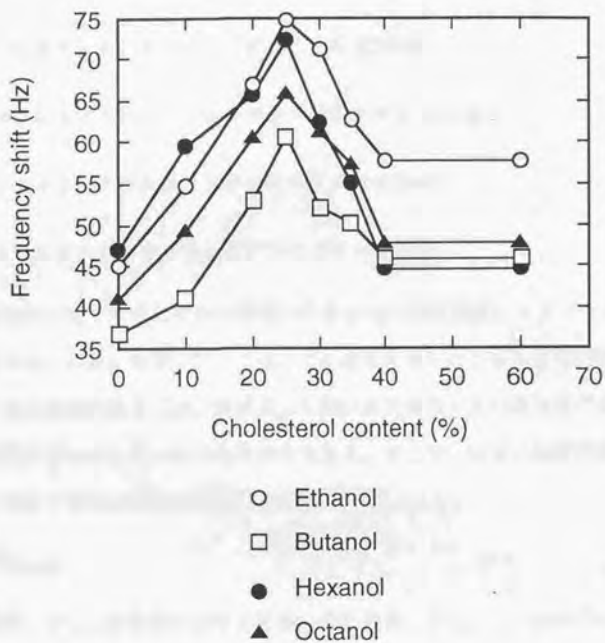


Fig. 2-4 Correlation between cholesterol content and frequency shift

すと考えられる。そこで、親和性を左右する要素として脂質のアシル鎖に着目し、この長さにおいての応答に及ぼす影響を評価した。

様々な長さのアシル鎖を持つ以下の脂質を水晶振動子上に固定化し、メタノール、エタノール、トルエン、ヘキサン、シクロヘキサンに対する応答をそれぞれ調べた。

L- α -フォスファチジルコリンジバレロイル (C5:0)

L- α -フォスファチジルコリンジデカノイル (C10:0)

L- α -フォスファチジルコリンジペンタデカノイル (C15:0)

L- α -フォスファチジルコリンジパルミトイル (C16:0)

L- α -フォスファチジルコリンジアラキドイル (C20:0)

各種の有機物に対するそれぞれの脂質の応答をFig. 2-5に示す。メタノールやエタノールなど極性の高いにおい物質に対しては、どの脂質を用いたときも比較的高い応答値が得られた。これは極性のあるにおい物質として用いたアルコールの蒸気圧が高く、においガスの濃度が高くなってしまったためと考えられる。そこで、におい物質の極性による応答値の違いを補正するために共振周波数変化率 F_r を導入した。

$$F_r = F_x / F_{x_{max}}$$

式中の記号は、 F_x ：各脂質におけるにおいの応答値、 $F_{x_{max}}$ ：各々のにおい物質に対する最大の応答値を表す。本式によって共振周波数変化率 F_r を導入することにより、においガスの濃度に関係なく脂質間の応答の違いを調べることができる。

Fig. 2-5の結果を上式に基づいてプロットし直した結果、脂質のアシル鎖の長さとの共振周波数の変化には相関があることがわかった(Fig. 2-6)。すなわち、メタノールやエタノールなど極性の高いにおい物質に対してはアシル鎖が短い脂質膜を用いた時に高い応答が得られた。逆にヘキサンやトルエンなど極性の低いにおい物質にはアシル鎖が長い脂質膜を用いた方が高い応答が得られた。これは非極性の性質を持つアシル鎖の長さにおいて物質

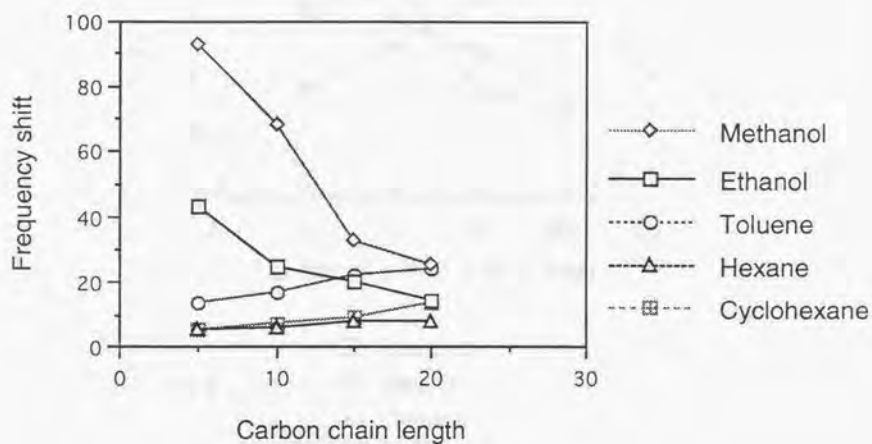
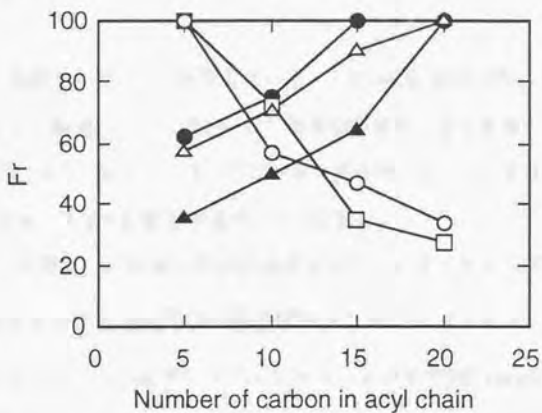


Fig. 2-5 Effect of acyl chain length on sensor response



- Methanol
- Ethanol
- △ Toluene
- Hexanol
- ▲ Cyclohexane

Fig. 2-6 Effect of acyl chain length on frequency shift

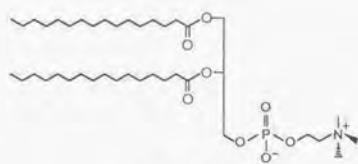
との親和性を左右することを示唆している。このように、リン脂質に対するにおいの応答は、リン脂質の親水基の種類だけでなく、そのアシル鎖の長さによっても変化することが明らかになった。以上の結果から、脂質のアシル鎖はにおいセンサーの高感度化を左右することが示唆された。

2-3-4 三重結合を持つ人工脂質を用いたセンサーのにおい物質に対する応答

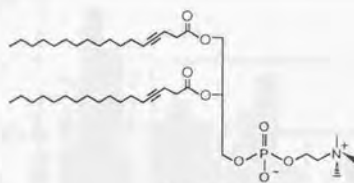
2-3-3より、脂質のアシル鎖がにおい物質の吸着に大きな影響を及ぼすことが確認できた。そこで、天然には存在しないアシル鎖を持つ種々の人工脂質を用い、それぞれがセンサーの応答値に及ぼす影響を評価することにした。

用いた人工脂質は1,2-ジ-(オクタデカ-4-イノイル)-sn-グリセロ-3-フォスフォコリン(PC-4a)、1,2-ジ-(オクタデカ-12-イノイル)-sn-グリセロ-3-フォスフォコリン(PC-12a)、1,2-ジ-(オクタデカ-14-イノイル)-sn-グリセロ-3-フォスフォコリン(PC-14a)の3つで、シュツットガルト大学のシュミット教授より供与された(75) (Fig. 2-7)。これらはアシル鎖のそれぞれ異なる部位にC-C結合間の回転運動を阻害する三重結合を有しており、北極に住む水鳥や鯨で発見された特殊な脂質の構造に基づいて合成された。もともと低温でも凍結せず、撥水性にも優れているなど特性を持っていたが、さらに実験室で合成されたこれらの人工脂質は、相転移温度や一分子あたりの面積などが、天然に見られる脂質とは異なる特徴的な値を示していた。このため、これらの人工脂質を持つ物性は脂質膜の流動性にも大きな影響を与えるものと予想される。そこで、これらの人工脂質と、対照として三重結合を持たないL- α -フォスファチジルコリンジパルミトイル (PC(C16:0))を用いることによって、アシル鎖内の三重結合のセンサー応答に及ぼす影響を検討した。

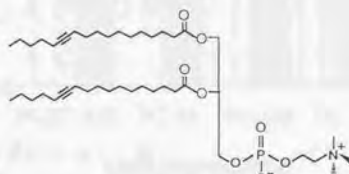
人工脂質の水晶振動子上への固定化はこれまでに示した方法と同様に行った。におい物質としてエタノール、ブタノール、ヘキサノール、オクタノールを用いてその応答を調べた。実験の結果(Fig. 2-8)、三重結合を含む人工脂質を固定化した水晶振動子は、天然に存在するPC(C16:0)よりもにおい物質に対する応答値が低いことが示された。また、三重結



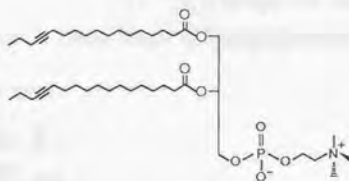
PC(C16:0)



PC-4a



PC-12a



PC-14a

Fig. 2-7 Chemical structures of phosphatidylcholine (C16:0) and unusual lipids containing triple bonds

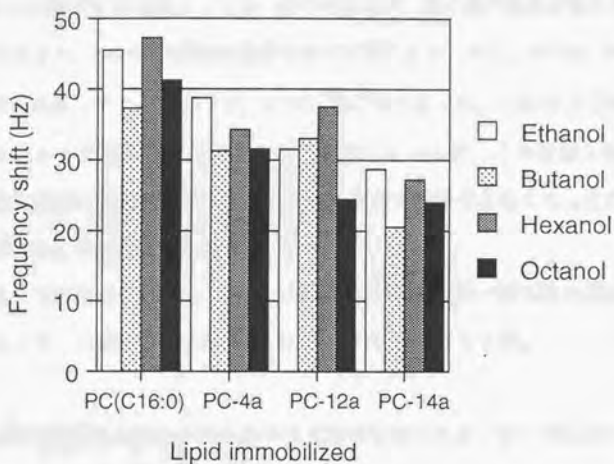


Fig. 2-8 Effect of unusual lipids containing triple bonds on sensor response

合の位置がアシル鎖の先端に近づくほど応答は低くなった。

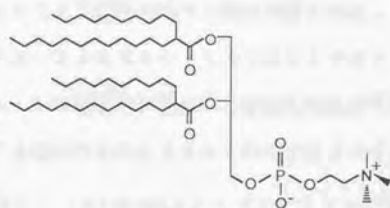
PC-4a、PC-12aおよびPC-14aは、一分子の占める面積がそれぞれ58、57、49 Åであるのに対し、ほぼ同じアシル鎖長を持つフォスファチジルコリンジステアロイル(DSPC; C18:0)は一分子あたり44 Åであることが圧力-面積曲線よりすでに明らかになっている(75)。こうした見かけ上の脂質面積の拡張が、におい物質がより吸着しやすい環境を与えると予想してこれらの人工脂質を官能膜として用いたのであるが、全く逆の結果が得られた。一方、示差熱分析によると、DSPCの相転移温度は55.7°Cであるのに対し、PC-4a、PC-12aおよびPC-14aの相転移温度はそれぞれ23.3°C、5.7°C、23.2°Cであった。これは人工脂質がより低い温度でゲル相から液晶相に転移できることを示しているが、この急激な物性の変化によって脂質膜が過剰に流動的になり、膜としての構造を維持できなくなったため、におい物質が吸着されなくなったと思われる。

以上の結果、三重結合を含む人工脂質を用いたにおいセンサーは天然の脂質よりも応答値が低く、センサーの高感度化には適さないことが明らかになった。

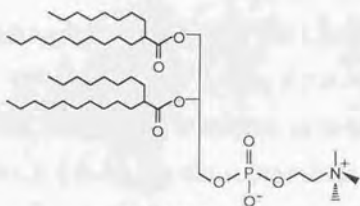
2-3-5 α 位で分枝したアシル鎖を持つ人工脂質を用いたセンサーのにおい物質に対する応答

2-3-4では、三重結合を持つ人工脂質を用いたセンサーは、本研究で用いたにおい物質に対して応答値が低く、アシル鎖の物性がセンサー応答に大きな影響を与えることが示唆された。そこで次の実験ではセンサーの高感度化を目的とし、 α 位で分枝したアシル鎖、すなわちアルキル鎖の数の多い人工脂質をにおいセンサーに用いることで、におい物質に対するセンサー応答を評価することにした。

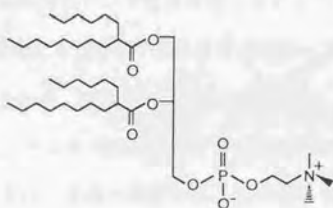
用いた人工脂質は1,2-ジ-(2'-アシルテトラデカノイル)-sn-グリセロ-3-フォスフォコリン(DX(14-10)PC)、1,2-ジ-(2'-オクタリドデカノイル)-sn-グリセロ-3-フォスフォコリン(DX(12-8)PC)、1,2-ジ-(2'-ヘキシルデカノイル)-sn-グリセロ-3-フォスフォコリン(D(10-6)PC)の3つである(76)(Fig. 2-9)。これらはアシル鎖の α 位が分枝した構造を持ち、見かけ上4本のア



D(14-10)PC



D(12-8)PC



D(10-6)PC

Fig. 2-9 Chemical structures of unusual lipids containing α -branched acyl chains

ルキル鎖を有している。こうした構造も2-3-4で述べたように、北極に住む水鳥や鯨で発見された特殊な脂質の構造に基づいている。ラングミュアプロジェクト(LB)膜作製技術によってこれらの人工脂質の圧力-表面曲線を作成したところ、1分子あたりの面積が分枝構造を持たないフォスファチジルコリンジミリストイルよりも大きいことがすでに示されている(76)。この特徴的な構造は、脂質膜の流動性に大きな影響を与え、結果的ににおい物質に対する親和性を向上させるものと予想される。そこで、これらの人工脂質と、対照として分枝していないL- α -フォスファチジルコリンジバルミトイル(PC(C16:0))を用いることによって、分枝構造がセンサー応答に及ぼす影響を検討した。

人工脂質の水晶振動子上への固定化はこれまでに示した方法と同様に行った。におい物質としてエタノール、ブタノール、ヘキサノール、オクタノールを用いてその応答を調べた。実験の結果(Fig. 2-10)、D(14-10)PC、D(12-8)PC、D(10-6)PCを固定化した水晶振動子は、PC(C16:0)を固定化したものよりも3倍から5倍の応答を示した。

D(14-10)PC、D(12-8)PCおよびD(10-6)PCは、一分子の占める面積がそれぞれ96.5、90.5、80.0 Åであるのに対し、ほぼ同じアシル鎖長を持つフォスファチジルコリンジミリストイル(DMPC; C14:0)は一分子あたり65.0 Åであることが圧力-面積曲線よりすでに明らかになっている(76)。このことから、脂質面積が見かけ上拡大し、におい物質がより吸着しやすい環境になったために、センサー応答が大きくなったものと思われる。また分枝によって適度な流動性が生じ、さらに単純に想定される脂質膜より立体的で複雑な構造をとっていることも予想される。

3つの人工脂質の各アルコールに対する応答パターンも、分枝構造を持たないPC(C16:0)の応答パターンと異なる。PC(C16:0)はアルコールの極性と応答値との間に相関が見られなかったのに対し、3つの人工脂質はどれもより疎水的なアルコールに高い親和性を示した。用いた人工脂質の中では、ヘキシル基とデカノイル基を各々2つ持つD(10-6)PCが最も高い応答を示した。これらの官能基の組み合わせは3つの人工脂質の中で最も短く、脂質の流動性をより高める効果をもたらしたと考えられる。

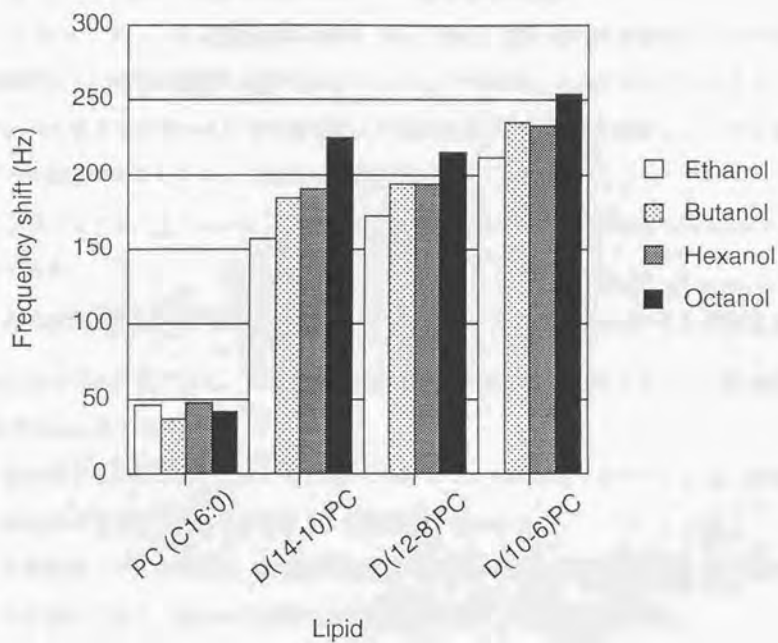


Fig. 2-10 Effect of unusual lipids containing α -branched acyl chains on sensor response

以上の結果、ヘキシル基とデカノイル基を各々2つ持つ人工脂質D(10-6)PCを用いてにおいセンサーの高感度化が可能であることが示された。

2-3-6 人の嗅覚の閾値とにおいセンサーの検出限界の比較

2-3-5 で用いた人工脂質D(14-10)PC、D(12-8)PC、D(10-6)PCを官能膜としたセンサーの感度を人の嗅覚の感度と比較することにした。すなわち、T & T オルファクトメーターで定められている5つのにおい物質を人の検知閾値と同じ濃度に調製し、これを本センサーで測定することによって感度の評価を行った。

T & T オルファクトメーターで定められている5つのにおい物質(Fig. 2-11)は以下の通りである。

Aの成分：β-フェニルエチルアルコールで、ローズP (Rose-P)の別名でよく知られている物質である。無色透明の液体で、バラ様の香気を有している。検知閾値：10^{-5.2} (w/w, 以下同様)。

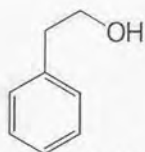
Bの成分：メチルシクロペンテノロンでシクロテンの商品名で知られている。無色粉末状で甘いカラメル様の香気を有する。検知閾値：10^{-5.6}。

Cの成分：イソ吉草酸で、無色透明な液体である。濡れた靴下のおい、ないしは汗くさいにおいであり、悪臭の代表的なものの一つである。検知閾値：10^{-6.0}。

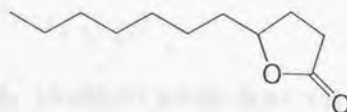
Dの成分：γ-ウンデカラクトンで無色か淡黄色の液体である。桃様香気を有する。検知閾値：10^{-5.1}。

Eの成分：スカトールで、不快な糞臭を有するが、希釈すると少し清涼感のある快香となる。元来は白色板状結晶である。天然のシベット(ジャコウネコの香腺より採取したもの)に含まれている。検知閾値：10^{-6.1}。

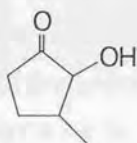
これらのおい物質を人の検知閾値と同じ濃度になるように流動パラフィンで溶解し、人工脂質D(14-10)PC、D(12-8)PC、D(10-6)PCを固定化した水晶振動子で測定した。最初にガスパーミエーターを30℃に設定して測定を行ったが、センサーの応答は観測されなかつ



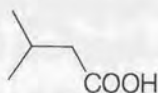
A: β -phenylethyl alcohol



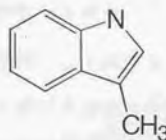
D: γ -undecalactone



B: methyl cyclopentenolone



C: isovaleric acid



E: skatole

Fig. 2-11 Chemical structures of standard odorous substances used for the olfactometer

た。そこで40℃で測定を行ったところ、応答を示すことが確認された (Fig. 2-12)。すなわち、3つの人工脂質は溶媒として用いた流動パラフィンよりも5つのにおい物質に対してより大きな応答値を示した。5つのにおい物質と3つの人工脂質との間に特徴的な認識パターンは見られなかったが、少なくとも何らかのにおいを検知できたことが明らかになった。このことから、本センサーは人とほぼ同程度のにおい検知能をもつことが示唆された。

2-4 結言

本章では、高感度においセンサーを作製するために、リン脂質のアシル鎖に着目して種々の検討を行った。まず脂質のアシル鎖長とにおい物質に対する応答との関係を調べた。その結果、脂質のアシル鎖が長いほど極性の高いにおい物質の応答が高く、逆に脂質のアシル鎖が短いほど極性の低いにおい物質の応答が高いことが示された。脂質膜にコレステロールを20%添加することで、においセンサーの感度を約2倍向上させることができた。さらにセンサーを高感度化することを目的として、三重結合を持つ人工脂質を官能膜としてにおいセンサーを作製したが、飽和アシル鎖を持つホスファチジルコリンを用いたにおいセンサーより低い応答を示した。次に α 位で分枝したアシル鎖を持つ人工脂質をセンサーの官能膜として用いることで、においセンサーの応答値が3倍以上増大した。T & T オルファクトメーターで使われる標準におい物質を測定した結果、分枝構造を持つ人工脂質を官能膜とした本においセンサーは、人の嗅覚と同程度の感度を示した。

以上のように、天然に存在しないアシル鎖を持つ人工脂質を分子認識素子として利用することによって、においセンサーの高感度化を図ることが可能になった。一方、Fig. 2-12の結果は、本センサーが溶媒などにおい以外の物質にも応答し、また選択性にも問題があることも示している。これらの問題は、さまざまな官能基を持つ人工脂質を同時に用いて、ニューラルネットワークによるパターン認識を行わせることによって解決すると思われる。

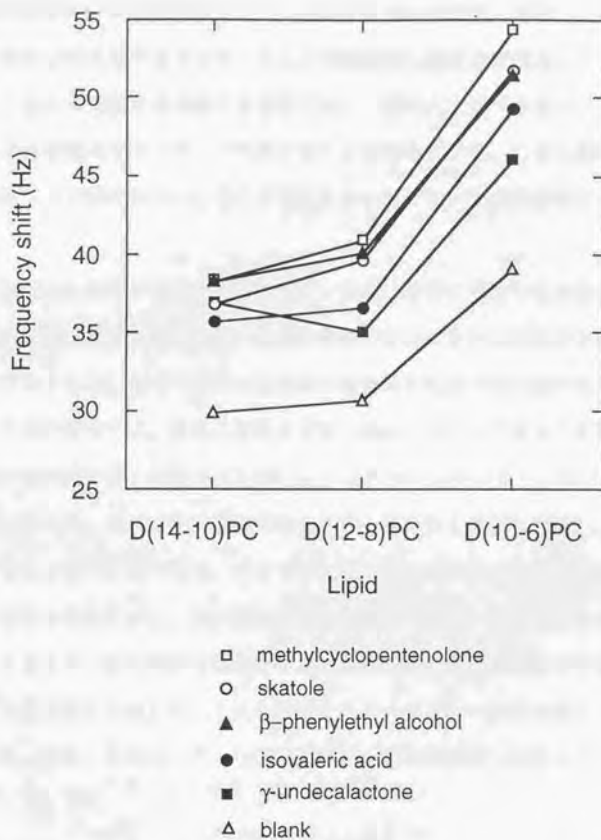


Fig. 2-12 Sensor response to standard odorants using unusual lipids containing α -branched acyl chains

第3章 高分子膜によるにおいセンサーの高感度化

3-1 緒言

前章で人と同程度のおい検知能をもつにおいセンサーの開発に成功した。このことは人間が行う官能検査を代用するセンサーとしての最低限の感度まで到達したことを意味する。においセンサーが要望される様々な分野では、一般の人と比べて高いにおい検知能を持つ調香師のような職人をセンサーで代用することを考えている。しかし現在のにおいセンサーではそこまでの感度はない。そこで更においセンサーを高感度化することを考えた。

第二章では脂質のみを用いていたためセンサー表面は非常に平滑であった。しかし、表面積の大きい官能膜を用いた方がにおい物質の吸着が容易になるためにセンサーが高感度になることが予測される。従って脂質の官能膜の作製法を検討する必要がある。

脂質の物性計測の研究では、脂質二重膜を安定に形成することが非常に重要である。そのため脂質膜の作製法が多く開発された(80, 81)。これらの方法の多くは高分子化合物を担体として用いている。中でも担持膜法は高分子化合物の多孔質膜を形成し、その上に脂質膜を形成させるという方法である。そこで多孔質状の高分子化合物を用い、官能膜を作製することで安定な応答を示し、高い応答を示すにおいセンサーが開発されると考えた。そこで、高分子膜を用い多孔質膜を形成させた。そして、その高分子膜中に脂質溶液を含浸させることで脂質膜を形成した。これらの膜をにおいセンサーの官能膜とし、においの応答を計測した。また、このセンサーの検出限界を人の検知閾値と比較した。

3-2 実験方法

3-2-1 試薬

本章では第2章と同様に、脂質としてL- α -フォスファチジルコリンジバルミトイル(C16:0)、1,2-ジ-(2'-デシルテトラデカノイル)-sn-グリセロ-3-フォスフォコリン(D(14-

10)PC)、1,2-ジ-(2'-オクチルドデカノイル)-sn-グリセロ-3-フォスフォコリン(D(12-8)PC)、1,2-ジ-(2'-ヘキシルデカノイル)-sn-グリセロ-3-フォスフォコリン(D(10-6)PC)を用いた。これらの溶媒としてクロロホルム（和光純薬製）を用いた。また、本章で用いたにおい物質は第2章で用いたアルコール及び嗅覚診断薬である。

脂質の担持膜として、ポリ塩化ビニル（重合度1100）（PVC）、ポリスチレン（PS）、ポリビニルブチラール（重合度700）（PVB）、ナイロンボール（ポリアミド）を用いた。このうち前者3つは和光純薬製、ナイロンボールはPolysciences社製のものを用いた。またそれぞれの溶媒として、和光純薬製のテトラヒドロフラン、トルエン、ジクロロメタン、ギ酸を用いた。本研究で用いた水はMILLIPORE・SO-TOCにより作製した超純水である。

3-2-2 測定装置

本研究では、共振周波数約10MHzのATカット水晶振動子を用いた。水晶板は8×8×0.18mm（コイケ）のものを用い、スパッタリング膜作製装置（SIBAURA：CFS-4ES）を用いてクロム150Å、白金1000Åの薄膜を形成し、電極とした。そして、この水晶振動子をクロロホルムで10分間超音波洗浄し、UVオゾンクリーナー（日本レーザー電子：NL-UV253）で洗浄したものをセンサーチップとして用いた。

3-2-3 担持膜の作製法

PVC、PS、PVB、ナイロンをそれぞれテトラヒドロフラン、トルエン、ジクロロメタン、ギ酸に溶かし、40mg/mlの高分子溶液となるよう調製した。スターラーで搅拌しながらこれに超純水を滴下し、ホモジナイザー（日音医理工器器械製作所：ヒスコトロン）で更に2分間搅拌し静置することでエマルジョンを形成させた。このエマルジョンを容量1mlのセルに入れ、LB膜作製装置（日本レーザー電子：LB-504S）のディッパーを用いて水晶振動子をこれに静かに浸し、60mm/minで上昇させた。水晶振動子上に高分子化合物が被覆された後、室温に放置して乾燥した。次に脂質のクロロホルム溶液を作製し、ディッパー

を用いた上記の方法と同様の方法で、水晶振動子上の高分子膜上に脂質膜を形成させた。以上の操作はすべて室温で行った。

3-2-4 におい物質の測定法

本章で用いたセンサーシステムは、第二章と同様である。ポリマーと脂質で被覆した水晶振動子を恒温チャンバーに固定した後、窒素ガスを流し、ガスパーミエーターで調製した標準ガスを0.2 l/min、30℃で連続的に流しながら共振周波数が一定になるまで待った。その後におい物質を1.5 mlのマイクロサンプルチューブにいれ、ガスパーミエーター中のチューブホルダーに一本セットし、においガスを発生させた。これが恒温チャンバー中の水晶振動子に達した後、においガスの官能膜への吸着による共振周波数変化を測定した。共振周波数は、パーソナルコンピューターで記録した。

3-3 結果と考察

3-3-1 エマルションの調製及び被覆法の検討

本研究では高分子化合物を用いることで多孔質膜を形成させることを目的としている。そこで高分子化合物のエマルションを水晶振動子に被覆し、乾燥させることにより、多孔質膜を形成することを考えた。

まずPVCとPSをそれぞれテトラヒドロフランとトルエンに溶かし、その溶液に5%の水を加えたところ固体が析出し、エマルションを形成させることができなかった。そこで、本研究ではPVB及びナイロンを用いて多孔質膜を形成させた。

以上のように調製したエマルションをスピンコート法により被覆すると、水晶振動子全体に均一な高分子膜を形成することはできなかった。加えて、水晶振動子上に被覆された高分子化合物は透明な膜となり、多孔質膜を形成しなかった。このため、本章では浸漬法を用いて脂質、及び高分子膜を形成した。

3-3-2 PVBを用いた官能膜の作製及びセンサーの応答の評価

PVBは容易に多孔質膜を形成することができ、酵素の固定化膜としてすでにバイオセンサーに応用されている(82, 83)。本章ではこれを脂質の担持膜とすることによってにおいセンサーの高感度化を図ることにした。

まず、エマルションを作製する方法の検討を行った。PVBをジクロロメタンにとかし、40 mg/mlの溶液を調製した。そしてこの溶液に超純水をPVB溶液に対して5-40% (v/v)の割合で混合し攪拌することでエマルションを形成させた。これを用いて浸漬法により水晶振動子を被覆した。エマルションの有無と高分子膜の被覆による周波数変化の結果をTable 3-1に示す。エマルションの形成はPVB溶液に対して5, 10%の体積の超純水を加えたときのみ確認された。これを用いて水晶振動子を被覆したところ、体積比10%の超純水を加えて調製したエマルションがより大きな周波数変化をもたらした。次に、このPVB膜上にL- α -フォスファチジルコリンジバルミトイル (C16:0)を浸漬法により固定化することで脂質膜を形成し、においセンサーを作製した。これを用いてエタノールを4回計測したときの応答値をFig. 3-1に示す。この結果、PVBに脂質を担持させて作製したにおいセンサーは、脂質のみを固定化したセンサー(第2章で作製)と比較して、応答値が数倍高くなったが再現性が見られなかった。これはエタノールがPVBを溶解し、多孔質状であった官能膜表面が平滑になったためであると考えられる。このことから、におい物質に溶解する高分子化合物は、においセンサーの官能膜として用いることができないことが示された。実際PVBは様々なにおい物質に溶解するため、においセンサーの官能膜としては不適切であると考えられる。

3-3-3 ナイロンを用いた高分子膜の作製

水晶振動子上に多孔質膜を作製するための4つめの高分子としてナイロンを用いた。エマルションを作製する際にナイロン溶液に様々な割合で超純水を混合した。それらの溶液を用いて水晶振動子に浸漬法によりナイロン多孔質膜を形成させた。被覆による周波数変化を測定した結果をTable 3-2に示す。これより、ナイロン溶液に加える水の量が多いほど

Tabel 3-1 Frequency shift caused by PVB membrane coating

Water ratio	Formation of emulsion	Frequency shift caused by PVB membrane coating (Hz)
5%	+	38000
10%	+	44000
20%	-	-
30%	-	-
40%	-	-

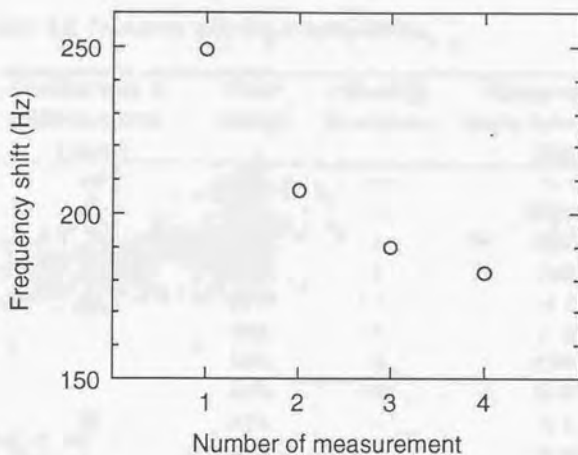


Fig. 3-1 Response of PVB-coated quartz crystal modified with phosphatidylcholine

Table 3-2 Frequency shift due to nylon coating.

Concentration of nylon solution (mg/ml)	Water content	Formation of emulsion	Frequency shift due to nylon coating (Hz) *
40	30%	-	n. t.
	40%	+	140000
	50%	+	15000
	60%	+	7000
50	30%	-	n. t.
	40%	+	n. d.
	50%	+	80000
	60%	+	5000
60	30%	-	n. t.
	40%	+	n. d.
	50%	+	n. d.
	60%	+	n. d.

* Each sample was tested at least in triplicate.
n. t., not tested; n. d., not detected.

エマルジョンを形成しやすいが、水晶振動子の共振周波数変化は逆に小さくなることがわかった。水晶振動子へのナイロンの被覆量が増えることが分かった。同様の実験を繰り返した結果、50 mg/mlのナイロン溶液に体積比50%の水を加えたときに最も安定なナイロン膜を形成することができた。以後この混合比で調製したエマルジョン溶液を用いてナイロン膜を作製することにした。なお60 mg/mlのナイロン溶液を用いたときには周波数変化が全く観測されなかったが、これは過度の重量変化が水晶振動子上で起こり発振ができなくなったためと思われる。

3-3-4 ナイロンを用いた担持膜のにおい応答の評価

3-3-3により作製したナイロン膜の上に、ナイロン膜と同様の方法でL- α -フォスファチジルコリンジパルミトイル (C16:0)を被覆したものをセンサーとして用いてエタノールに対する応答を検討した。1.5 mlのマイクロサンプルチューブ1本に1 mlのエタノールを入れ、キャリアガスの流速を0.2 l/minに設定して測定した結果をFig. 3-2に示す。これより、0-100秒までは応答は急激に増大し、それ以降応答は緩やかに増加した。また、この応答値の増加は約1時間続いた。これは官能膜の表面が多孔質状になっており、センサーの官能膜へのエタノールの吸着と脱着が平衡に達するのに時間がかかるためと考えられる。キャリアガスの流速はこのように平衡に達する時間やセンサーの感度に大きな影響を及ぼすと思われるので、次ににおいガスの流速を変化させることで周波数変化がどう変化するかを検討した。その結果 (Fig. 3-3)、流速0.4 l/minでにおいガスを流すことで最も応答値が高く、安定な応答を示した。平衡状態に達するまでの時間は約70秒であった。さらにこの流量では、同時に作製した複数のセンサー間で再現性のよい応答が得られた (Fig. 3-4)。

次に本センサーを脂質だけを固定化した従来のにおいセンサーの応答と比較した (Fig. 3-5)。ここでにおい物質としてエタノール、ブタノール、ヘキサノール、オクタノールを用いた。この結果、アルコールに対しては脂質だけを用いたセンサーより多孔質ナイロ

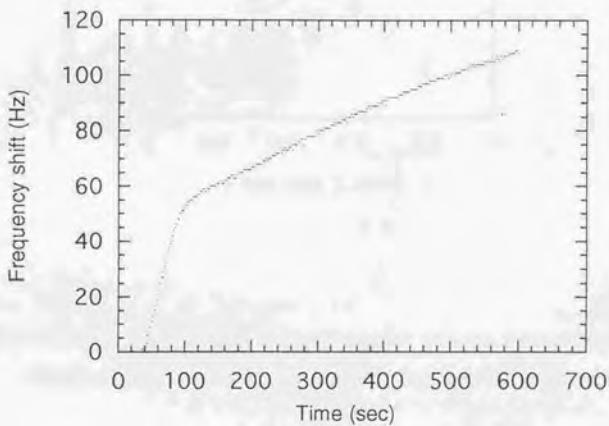


Fig. 3-2 Response curve of ethanol of quartz crystal coated by nylon-PC membrane

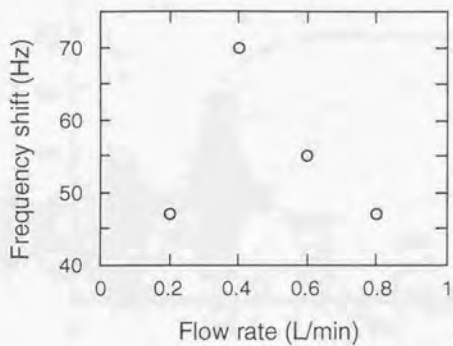


Fig. 3-3 Effect of flow rate of nitrogen carrier gas on frequency shift obtained with nylon-coated quartz crystal modified with PC(C16:0)

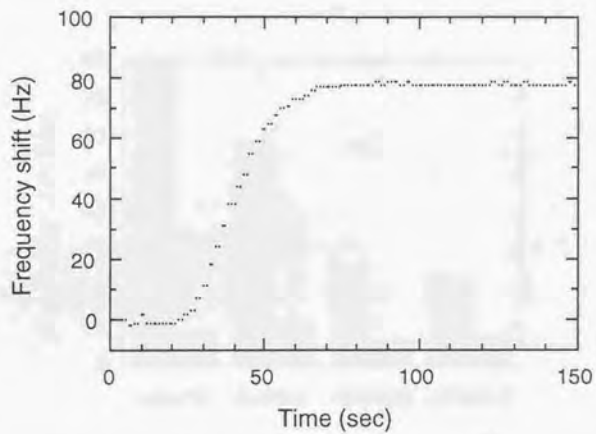


Fig. 3-4 Time course of frequency shift obtained with nylon-coated quartz crystal modified with PC(C16:0)

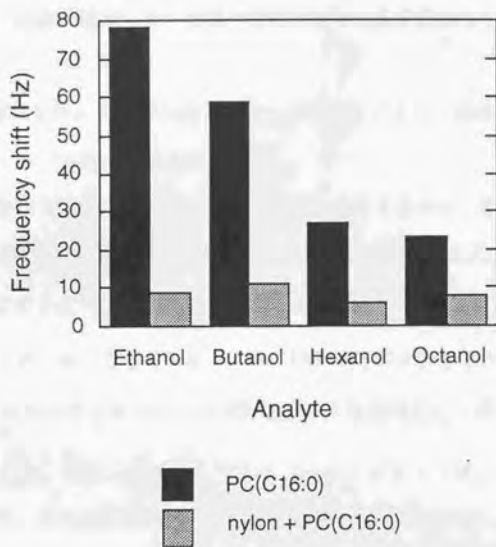


Fig. 3-5 Effect of nylon coating on frequency shift in response to alcohols

ン膜を用いたセンサーの方が3倍から8倍の高い応答値を示した。これは多孔質ナイロン膜を脂質の担持膜として用いることで、においガスの吸着量が増加したためと考えられる。またこのセンサーは、エタノールなど親水性の化合物に対してより大きな応答を示している。ここで対照として用いた官能膜は脂質だけを浸漬法により固定化しており、被覆法により応答に差異が生じたとは考えられない。ここで用いたナイロンは親水的なアミド結合を有しており、この物性がにおい物質の吸着特性をある程度左右しているものと思われる。

3-3-5 α 位で分枝したアシル鎖を持つ人工脂質をナイロン担持膜に固定化して作製したセンサーのにおい物質に対する応答

ナイロン担持膜を用いたセンサーをより高感度化するために、第2章で示した α 位で分枝したアシル鎖を持つ脂質、すなわち4本の炭化水素鎖を持つ人工脂質の利用を検討した。ナイロン膜上をそれぞれ人工脂質D(14-10)PC、D(12-8)PC、D(10-6)PCで被覆した修飾膜を形成し、においセンサーとしてアルコールに対する応答を計測した。対照としてナイロン膜にL- α -フォスファチジルコリンジバルミトイルを固定化して作製した修飾水晶振動子も同時に調製した。におい物質としてエタノール、ブタノール、ヘキサノール、オクタノールを用いて、その応答を調べた。測定の結果をFig. 3-6に示す。

これより、D(14-10)PC、D(12-8)PC、D(10-6)PCを用いたときの応答はフォスファチジルコリンジバルミトイルを用いたときの応答より大きいことが明らかになった。特にD(12-8)PCとD(10-6)PCを固定化した水晶振動子によって、フォスファチジルコリンジバルミトイルを固定化したものより約2.5倍以上の周波数変化が得られた。またこのセンサーはエタノールなど親水性のにおい物質により親和性を示しており、脂質膜のみを用いた第2章での応答パターンの結果と異なっていた。これは3-3-4の結果でも見られたように、親水性のアミド結合を持つナイロン膜を用いることで、におい分子の官能膜への吸着特性が変わったためであると考えられる。

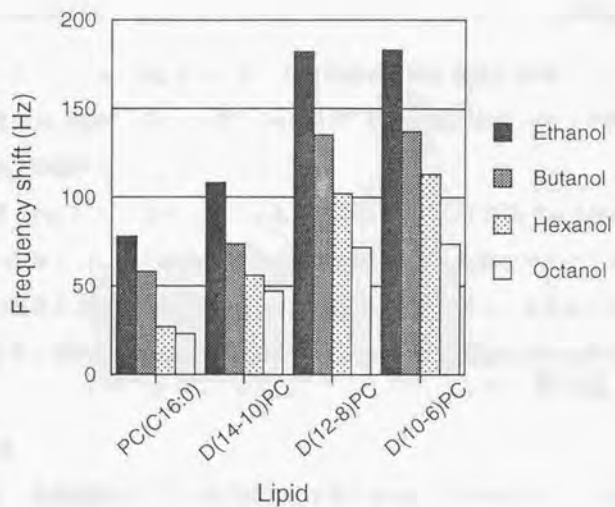


Fig. 3-6 Effect of synthetic lipids containing α -branched acyl chains on sensor response

3-3-6 人の嗅覚の閾値とにおいセンサーの検出限界の比較

ナイロン-脂質膜を用いたにおいセンサーの感度と人の嗅覚の検知閾値との比較を行うことにした。すなわち、T&Tオルファクトメーターで定められている5つのにおい物質(β-フェニルエチルアルコール、メチルシクロペンテノロン、イソ吉草酸、γ-ウンデカラクトン、スカトール、Fig. 2-11)を人の検知閾値と同じ濃度に調製し、ナイロン担持膜に人工脂質D(14-10)PC、D(12-8)PC、D(10-6)PCを固定化したセンサーで測定することによって感度の評価を行った。

この結果(Fig. 3-7)、本センサーは各におい物質に対して溶媒である流動パラフィンよりも高い応答を示し、人の検知閾値の濃度においても認識できることが示された。5つのにおい物質と3つの人工脂質との間に特徴的な認識パターンは見られなかったが、この実験により、本センサーは人とほぼ同程度のにおい検知能をもつことが示された。

3-4 結言

本章では、水晶振動子の上に多孔性高分子膜を形成して天然及び人工の脂質の担持膜とし、これにおい物質に対する応答を評価した。用いた高分子のうち、最も安定で高い応答を示したのはナイロンであった。アルコールを測定した場合、脂質だけを用いたセンサーより多孔質ナイロン膜を用いたセンサーの方が3倍から8倍の高い応答値を示した。これは多孔質ナイロン膜を脂質の担持膜として用いることで、においガスの吸着量が増加したためと考えられる。さらに α 位で分枝したアシル鎖を持つ人工脂質をナイロン担持膜に固定化して作製したセンサーは、におい物質に対して、脂質だけを用いたセンサーより2.5倍以上の応答を示した。このセンサーを用いて人の検知閾値とにおいセンサーの応答を比較した結果、人の検知閾値の濃度でもにおいセンサーは明らかに応答し、人と同程度の感度を持つことが示された。

これらの知見より、水晶振動子を多孔質ナイロン膜で被覆し、さらに適切な人工脂質を固定化したセンサーを作製することで、極めて高感度なにおいセンサーを構築できること

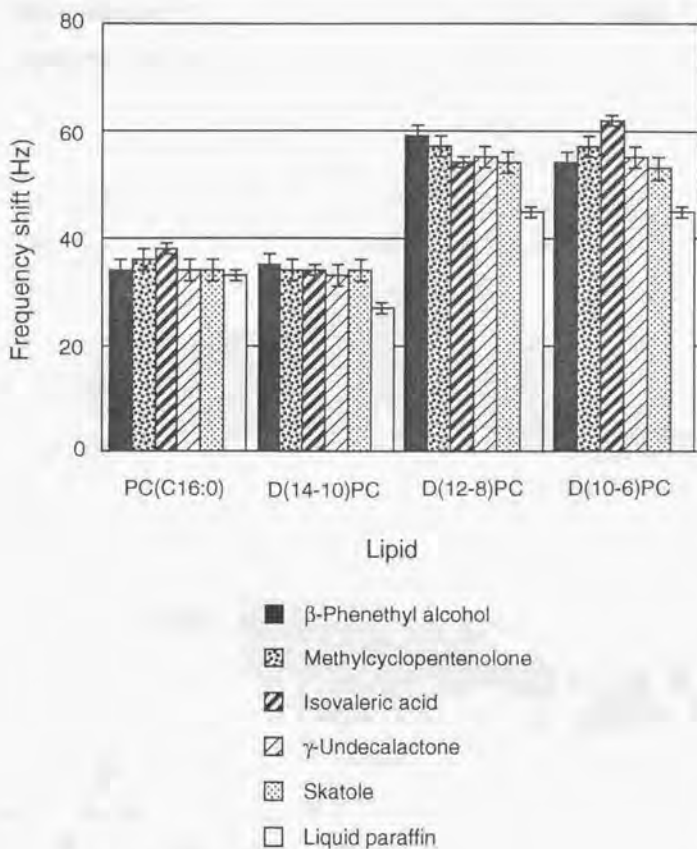


Fig. 3-7 Sensor response to standard odorants using synthetic lipids containing α -branched acyl chains.

が示された。一方、Fig. 3-7の結果は、本センサーが溶媒などにおい以外の物質にも応答し、また選択性にも問題があることも示している。これらの問題は、さまざまな官能基を持つ人工脂質を同時に用いて、ニューラルネットワークによるパターン認識を行わせることによって解決すると思われる。

4-1 緒言

モレキュラーインプリンティング法は、優れた機能を持つ生体と同様の機能を持つ安定な分子認識素子を簡便に作製する手法として近年大きな注目を集めている。この方法はゲストを認識する分子を精密にデザインする必要がなく、いわゆる精密な分子設計、多段階合成とは対極な立場にあるホスト高分子の合成法であるといえる。また一段階の重合反応でホストが得られるという合成の簡便さ、迅速さ、安価かつ容易な大量合成などの利点からも注目されている。そしてその最大の特徴は、どのようなゲスト分子に対しても原理的にはそれに対応したホスト高分子を合成することが可能であるという、いわばテーラーメイド的な手法であるという点にある。このようなモレキュラーインプリンティング法の利点を生かして、これまでに薬物や農薬、生理活性物質などに選択的な分子認識高分子が合成されている。

一方、生物学的にも臨床的にも重要であるステロイド化合物は、これまでほとんどモレキュラーインプリンティングの対象とされてこなかった(52, 64, 85)。スポーツ界においては、アナボリックステロイドが不法に使われるケースが多発しており、これを簡便かつ安価に分析する手法が要望されている。また老化のホルモン治療の点からも、男性アナボリックステロイドは大きな注目を集めている(86)。さらにステロイドは構造的に類似した極めて多くの化合物の基本骨格であり、この簡便かつ安価な分析は極めて広い範囲に受け入れられると思われる。ステロイドは剛直で立体的に極めて特徴のある構造を持ち、モレキュラーインプリンティングの対象としてはまさに最も適切なターゲットであるといえる。

モレキュラーインプリンティングにおいて、用いる機能性モノマーの種類とその量、溶媒、重合温度などの重合条件を検討することは、得られるポリマーの選択性を左右する最も重要な要素である。しかしこれまでの報告でこうした諸条件を検討した例は極めて少ない(87, 88)。そこで本研究では、ステロイド骨格を持つ男性ホルモンテストステロンを鋳型分子とし、上記のような重合の諸条件を詳細に検討してインプリンティングを行って、

最も基質選択性の高い分子認識高分子を得ることを目的とする。

4-2 実験

4-2-1 試薬

試薬は全て特級のものを用いた。液体クロマトグラフィーの溶離液は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 純度のもので使用した。重合できる試薬は、使用前に精製した(89)ものを用いた。本研究で測定サンプルとして用いた化合物の構造をFig. 4-1に示す。

4-2-2 テストステロンを鋳型としたインプリントポリマーの合成

ガラス製サンプル瓶中で、機能性モノマーであるメタクリル酸8 mmol、鋳型であるテストステロン (1) 1 mmol、架橋剤エチレングリコールジメタクリレート(EGDMA) 5 ml、重合開始剤の2,2'-azobis(2,4-dimethyl-valeronitrile) 50 mgを7.5 mlのクロロホルム中に溶かし、超音波洗浄機にて十分に脱気を行った。サンプル瓶を密閉して、40℃に設定したカラムオープンで16時間以上加熱し重合反応を行なわせた。得られた塊状のポリマーを粗粉碎し、上澄みに鋳型分子由来の吸収 (238 nm) がなくなるまで沸騰させたエタノールで洗浄した。なお対照として、鋳型分子を加えずに重合したポリマーも調製した。

4-2-3 インプリントカラムの調製

ポリマーを乾燥させた後、自動乳鉢器 (日東: ANM200WES) で完全に粉碎し、ふるいにかけて粒径が25~45 μ mのものを選別収集した。回収した粒子の中には粒径26 μ m以下の細かいポリマー粒子が若干含まれており、カラムの目詰まりやピークのテーリングを引き起こす。そこで、カラム充填には適さないこれらのポリマーを除くため、ポリマー粒子をアセトニトリル中に拡散させ、30分間放置した後、沈殿した粒子のみを分取するという沈降分離操作を5回繰り返した。残った粒子をバッカーに注ぎ、メタノールを溶媒としてステンレスカラム (100 mm \times 4.6 mm, i.d.) にスラリー充填した。このカラムを高速液体

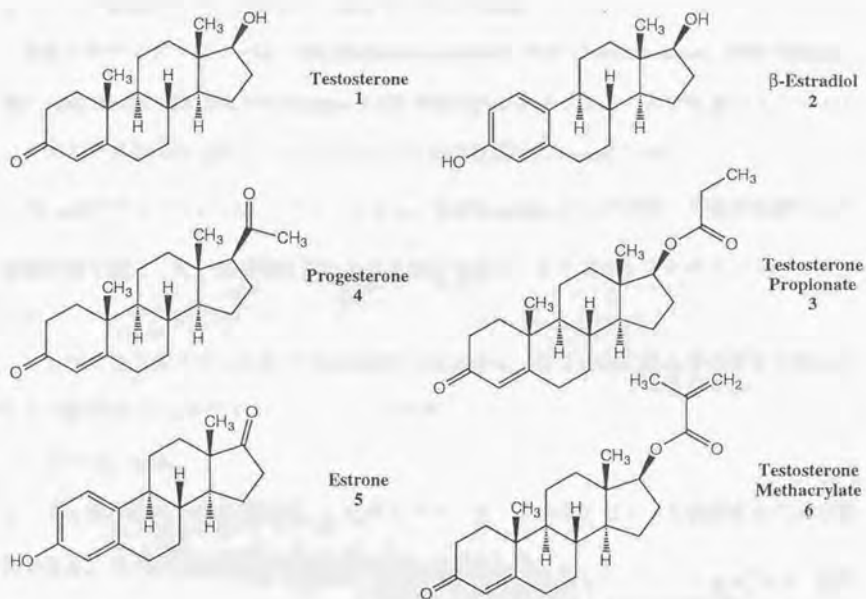


Fig. 4-1 Steroids used in these studies

クロマトグラフィー用のポンプに接続し、安定なベースラインが得られるまでメタノールで洗浄した。

4-2-4 液体クロマトグラフィーによるカラムの評価

液体クロマトグラフィーは、805 Manometric module、811C Dynamic mixer、401C Dilutor、305、306 Pumps、118 UV/VIS DetectorのGILSON HPLCシステムと、日立社製のクロマトインテグレーター (D-2500) によって行った。検出波長は225 nmとした。

0.2 mMのサンプル10 μ lをインジェクトし、流速2 ml/minとして紫外・可視検出器により保持時間を測定した。溶離液はアセトニトリルを用い、またアセトンをボイドマーカースとした。

インプリントポリマーのサンプルに対する親和性は、以下の式に従って各サンプルについての容量比 k' を算出することによって評価した。

$$k' = (t_R - t_0)/t_0$$

ここで t_R はサンプルの保持時間、 t_0 はボイドマーカであるアセトンを溶出するための時間である。また分離係数 α を以下の式によって算出した。

$$\alpha = k'_x / k'_y$$

これは一つのポリマーについて化合物 x と y の選択性を比較したものである。またインプリンティングの効果を表す指標として、インプリンティング係数 I を定義する。

$$I = k'_{imp} / k'_{non}$$

さらに選択係数 S を定義することによって、各々のステロイドがインプリンティングによってどれだけ効果的に認識されたかを評価する。

$$S = I_x / I_y$$

すべての操作は室温で行った。

4-3 結果及び考察

4-3-1 鋳型分子と機能性モノマーとのモル比の最適化

鋳型分子と機能性モノマーとの比は、インプリントポリマーの選択性と感度を左右する最も重要な要素の一つである。こうした化学量論的検討は個々のポリマーについて行われるべきであり、本研究でもテストステロンを鋳型に用いたインプリンティングの最適条件を検討することにした。

鋳型分子と機能性モノマーのモル比を1:4、1:8、1:12に変化させた3つのポリマー(P1, P2, P3)を合成した。そしてテストステロンの類似化合物である β -エストラジオール(2)、テストステロンプロビオネート(3)、プロゲステロン(4)、エストロン(5)を用いて3つのインプリントポリマーの選択性を評価した。その結果をTable 4-1に示す。

これより、鋳型分子と機能性モノマーのモル比が1:8と1:12で合成したポリマーP2とP3は、鋳型として用いたテストステロンに対して容量比がそれぞれ5.10、6.56となり、他の類自体よりも極めて強く保持することが明らかになった。インプリンティング係数Iを検討しても、P2とP3はそれぞれ4.05と4.12であり、インプリンティングの効果があらわれている。しかし選択係数Sを検討してみると、P2のテストステロン以外の化合物に対するSは3以上であるのに対し、P3のそれは2.6前後である。すなわち、テストステロンに対する「選択性」はP2のほうがP3よりも優れていることを示唆している。本研究で目的としている人工分子認識素子は、分離と同様に認識の能力も要求されているので、Sを検討した結果、この実験ではP2が最も優れたポリマーであると判断した。

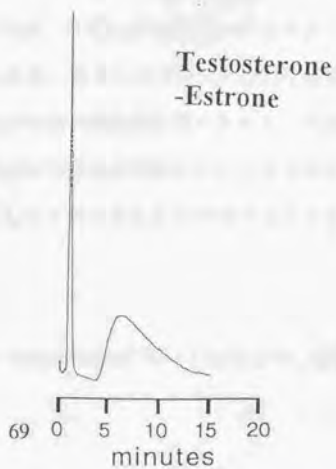
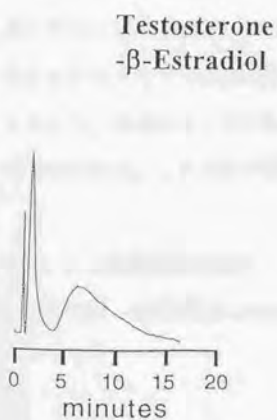
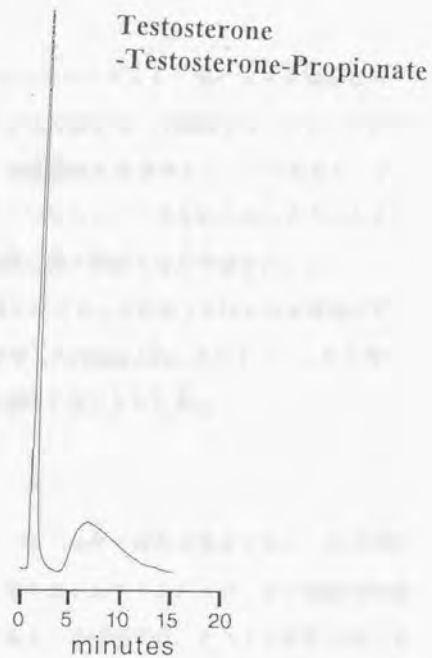
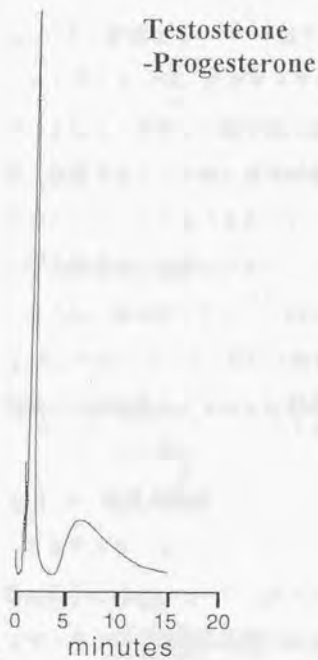
この結果を踏まえて、鋳型分子と機能性モノマーのモル比を1:8に固定して以下の実験を行うことにした。また、P2を用いて得られたクロマトグラムをFig. 4-2に示す。サンプルとして、テストステロンにそれぞれ同濃度のプロゲステロン、テストステロンプロビオネート、 β -エストラジオール、エストロンを添加したものをを用いた。この結果、P2を用いるとサンプル間の分離が極めてよく、ベースセパレーションが達成されていることが明らかになった。

Table 4-1 Performance indices for initial methacrylic acid polymers

Polymer	Template/ monomer ratio	Steroid	k _{imp}	α _{imp}	k _{non}	α _{non}	I	S ^{a)}
P1	1:4	1	1.39	1	0.795	1	1.75	1
		2	1.13	1.24	0.928	0.857	1.21	1.44
		3	0.398	3.50	0.331	2.40	1.20	1.46
		4	0.530	2.63	0.464	1.71	1.14	1.53
		5	0.464	3.00	0.398	2.00	1.17	1.50
P2	1:8	1	5.10	1	1.26	1	4.05	1
		2	1.52	3.35	1.19	1.06	1.28	3.16
		3	0.597	8.55	0.464	2.72	1.28	3.16
		4	0.795	6.42	0.597	2.11	1.33	3.04
		5	0.530	9.63	0.464	2.72	1.14	3.55
P3	1:12	1	6.56	1	1.59	1	4.12	1
		2	1.92	3.42	1.26	1.26	1.52	2.71
		3	0.729	9.00	0.464	3.43	1.57	2.63
		4	1.06	6.19	0.663	2.40	1.60	2.58
		5	0.597	11.0	0.398	4.00	1.50	2.75

a) By definition $\alpha = 1$, $S = 1$ for testosterone.

Fig. 4-2 Chromatograms obtained using P2



4-3-2 機能的モノマーの効果

4-3-1では、従来モレキュラーインプリンティングによく用いられる機能的モノマーとしてメタクリル酸を選んだ。しかしメタクリル酸を唯一の認識プローブとしたのでは、認識できる化合物に限界がある。そこで、強塩基性の機能的モノマーである2-(ジエチルアミノ)エチルメタクリレートを用いてインプリンティングを行った。テストステロンは水酸基を一つ持っており、この官能基が認識に深く関係すると予想された。

しかし、得られたポリマー(P4)は鋳型として用いたテストステロンをほとんど保持せず、 β -エストラジオールに対して最も高い親和性を示した(Table 4-2)。これより、これ以降の実験には機能的モノマーとしてメタクリル酸を使用することにした。

4-3-3 溶媒の効果

モレキュラーインプリンティング法では重合の際の溶媒の選択が重要である。重合前に鋳型分子と機能的モノマーができるだけ安定な複合体を形成することが、より選択的なポリマーを合成するのに必須であることは明かである。本研究では、テストステロンとメタクリル酸との相互作用として水素結合を期待しているが、このためには溶媒の極性が低い方が望ましい。そこで本実験系においても、溶媒の極性がインプリントポリマーの特異性に及ぼす影響を評価することにした。

4-3-1では溶媒にクロロホルムを用いたが、さらに極性の高いテトラヒドロフランを用いてインプリンティングを行った。その結果、得られたポリマー(P5)は鋳型として用いたテストステロンを最も保持したが、P2ほどの高い親和性は得られなかった(Table 4-2)。これより、機能的モノマーと鋳型分子との相互作用は水素結合を介して行われていることが示唆された。これ以降の実験には溶媒としてクロロホルムを使用することにした。

4-3-4 重合温度の検討

重合には、開始剤2,2'-azobis(2,4-dimethyl-valeronitrile)を用いているため、温度を40℃に

Table 4-2 Polymerization conditions and selected data for imprinted polymers

Polymer	Feature ^a	k'_{imp} Steroid					α_{imp} ^b Steroid				
		1	2	3	4	5	2	3	4	5	
P1	Template/ monomer ratio 1:4	1.39	1.13	0.398	0.530	0.464	1.24	3.50	2.63	3.00	
P2	Standard Polymer	5.10	1.52	0.597	0.795	0.530	3.35	8.55	6.42	9.63	
P3	Template/ monomer ratio 1:12	6.56	1.92	0.729	1.06	0.597	3.42	9.00	6.19	11.0	
P4	DAM as monomer	0.464	2.78	0.266	0.331	1.92	0.167	1.74	1.40	0.241	
P5	THF as porogen	1.99	1.06	0.530	0.729	0.331	1.87	3.75	2.73	6.01	
P6	Polymerize d at 60°C	1.52	0.862	0.331	0.464	0.266	1.77	4.60	3.28	5.73	
P7	Polymerize d at room temp using UV	2.39	1.19	0.464	0.597	0.398	2.00	5.14	4.00	6.00	
P8	PGDM as cross-linker	0.729	1.06	0.199	0.266	0.398	0.687	3.66	2.74	1.83	
P9	Covalently imprinted, hydrolyzed 6h	1.26	1.26	0.398	0.597	0.530	1.00	3.17	2.11	2.38	

a) Standard polymerization conditions are given in the experimental section. Only deviations from this procedure are listed.

b) By definition $\alpha = 1$ for testosterone

保って反応を行わせる。しかしながら、本研究では機能性モノマーと鋳型分子との相互作用は水素結合に依存しているため、原理的には高温での重合は複合体の形成を阻害し、分子認識能の高い高分子は得られない。そこで重合時の温度の影響を検討するために、60℃で重合させたポリマー(P6)と、紫外線を照射することによって室温で重合させたポリマー(P7)の選択性を評価することにした。

その結果、どちらのポリマーも鋳型として用いたテストステロンを最も保持したが、P2ほどの高い親和性は得られなかった(Table 4-2)。60℃で重合させたポリマー(P6)では、おそらく機能性モノマーと鋳型分子との複合体形成が阻害されたのではないかとと思われる。一方、紫外線によって重合させたポリマー(P7)は、P2よりもよい選択性を示すと予想されたが、結果は逆に劣っていた。これは紫外線によって重合が完全には進行しなかったためではないかとと思われる。

以上の結果、重合の程度と重合時の複合体形成との間には妥協しなければならない点があり、これは個々のインプリンティングにおいて検討されるべきであることが示唆された。

4-3-5 架橋剤の影響

これまでの実験では、モレキュラーインプリンティング法において従来架橋剤として使われてきたエチレングリコールジメタクリレートを使用してきた。しかしこの架橋剤の架橋点間距離はエチレン基を介した炭素8個分であり、より大きな鋳型分子に対してはそれに応じてさらに長い架橋点間距離を持つ架橋剤が必要であると考えられる。そこでエチレン基を持つエチレングリコールジメタクリレートの代わりに、プロピレン基を持つプロピレングリコールジメタクリレートを用いてインプリンティングを行うことにした。

しかし、得られたポリマー(P8)は分子認識能を持っていなかった(Table 4-2)。これは、プロピレングリコールジメタクリレートによってメチレン基がさらに加わることによって架橋剤としての剛直性が低下し、より柔軟に回転しやすくなったためではないかと考えられる。本実験系では加えた架橋剤は全体の80%であり、こうした架橋剤の物性の変化は生成物のポリマーの選択性に直接影響を及ぼすものと思われる。

以上の結果、重合の程度と重合時の複合体形成との間には妥協しなければならない点があり、これは個々のインプリンティングにおいて検討されるべきであることが示唆された。これより、これ以降の実験には架橋剤としてエチレングリコールジメタクリレートを使用することにした。

4-3-6 共有結合的アプローチによるモレキュラーインプリンティング

これまでの実験では機能性モノマーとしてメタクリル酸を用いており、非共有結合的アプローチによるモレキュラーインプリンティングを行っていた。しかし鑄型分子によっては適当な機能性モノマーを選択することによって共有結合的アプローチも検討できる場合がある。1-1 2で述べたように非共有結合的アプローチと共有結合的アプローチにはそれぞれ長所、短所があり、どちらを選択するかは場合によって異なる。予想と異なる結果を生むことも十分考えられる。

そこで本実験では、メタクリル酸をエステル結合によってテストステロンに付与したテストステロンメタクリレート(6)を合成した。これをそのままインプリンティングに使用することによって、共有結合によるモレキュラーインプリンティングを行った。得られたポリマーをメタノール水溶液(MeOH:H₂O, 1:1)で調製した1 M NaOHで6時間加水分解し、さらに酢酸で水和させ、最後にこのポリマーの選択性を評価した。

しかし、得られたポリマー(P9)は鑄型分子に対して高い分子認識能を持っていなかった(Table 4-2)。これは1-1 2-1で述べたように、共有結合によるモレキュラーインプリンティングを行った場合、加水分解によって鑄型分子を完全に除去しきれなかったためと思われる。

以上の結果、本実験系ではメタクリル酸による非共有結合的アプローチが最も適していることが示唆された。

4-4 結言

テストステロンをモデル鑄型分子としてモレキュラーインプリンティングを行い、重合

の際のさまざまな条件を詳細に検討した。まず、鋳型分子と機能性モノマーには最適なモル比があることを示した。またメタクリル酸以外の機能性モノマーで強塩基性の2-(ジエチルアミノ)エチルメタクリレートの効果を調べたが、逆に分子認識能を低下させることが示された。極性の高い溶媒を使っても認識能が低下し、分子認識が水素結合によって行われていることが示唆された。重合温度と架橋剤には妥協しなければならない点があることが示された。最後に共有結合的アプローチを試みたが選択性の向上には結びつかず、加水分解による鋳型分子の完全な除去が課題として残った。

これまでに一つのモレキュラーインプリンティングの系についてこれほど詳細な検討を加えた例はなく、ここで得られた知見は、今後のモレキュラーインプリンティングに極めて重要な情報を提供するものと思われる。

5-1 緒言

高い認識機能を持つホストをより簡便、安価に作製する方法としてモレキュラーインプリンティング法が注目されている。これまでにモレキュラーインプリンティング法により合成したさまざまな高分子ホストが報告されている。しかし、選択性や使用できる機能性モノマーの種類などに限界があった。これまでモレキュラーインプリンティング法で認識及び分離対象となった分子の中には、アミノ酸誘導体やペプチドを模倣した小分子などがあり、酵素やレセプターの人工模倣体をめざした研究が報告されている。しかし、ペプチドを鋳型分子とした例は少ない(90-92)。そこで本研究では新しい機能性モノマーを設計・合成し、それを用いてこれまで報告されていないペプチド類のインプリントを試みる。

アミノ酸は酸性のカルボキシル基と塩基性のアミノ基を持つ。ペプチド鎖中のアミドはこの両者が結合したものであり、プロトン供与性のNH基と、プロトン受容性のカルボニル基とを持つ。従来モレキュラーインプリンティング法によく用いられてきた機能性モノマーはメタクリル酸やビニルピリジンなどであり、前者は主に塩基性の鋳型分子に、後者は主に酸性の鋳型分子に対して用いられてきた。しかしペプチドのように酸性部分と塩基性部分が混在する鋳型分子の場合、こうした機能性モノマーを用いるのはあまり効率的ではない。一方、タンパク質中には、 α ヘリックス構造や β シート構造など、多点の水素結合による相互作用が見られ、タンパク質の構造と機能を維持するのに重要な役割を果たしている。そこでこのような相互作用を模倣した新規機能性モノマーを設計・合成しモレキュラーインプリンティングに応用すれば、ペプチド鎖に対して立体選択的なポリマーを得ることができると思われる。

土橋らは、光学活性な *N*-acetyl-L-valine *tert*-butylamide を液体クロマトグラフィーの溶離液に添加することによって、アミノ酸誘導体の光学分割が可能になったことを報告している(93, 94)。これをモレキュラーインプリンティングに応用し、*N*-acetyl-L-valine *tert*-butylamide にメタクリル酸を導入したL-バリン誘導体 (1) を新規機能性モノマーとしてイ

ンプリントポリマーを合成すれば、多点での水素結合によって立体特異性を持った分子認識素子が得られると期待される(Fig. 5-1)。

そこで本研究では、ペプチド鎖と多点で水素結合を形成すると予想されるL-バリン誘導体(1)を合成し、モレキュラーインプリンティングにおける機能性モノマーとして利用する。鋳型に用いたジペプチド誘導体とそのジアステレオマーに対するポリマーの親和性を検討することによって、この新規機能性モノマーの立体特異性に与える影響を評価する。この研究によって、ペプチド間の多点相互作用を模倣した新たなモレキュラーインプリンティングが展開できると思われる。

5-2 実験

5-2-1 試薬

アミノ酸誘導体はペプチド研究所製のものを用いた。液体クロマトグラフィーの溶離液は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)純度のものを用いた。市販のethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)は安定剤(重合阻害剤)としてヒドロキノン類が含まれている。これらを除去するため、EGDMA 500 mlにつき200 mlの1 M 食塩水で3回洗浄した。そして、無水硫酸マグネシウムで乾燥し固体をろ過したものを使用した。その他の試薬は市販のものをそれ以上精製することなく用いた。

5-2-2 新規機能性モノマー(1)の合成

新規機能性モノマー(1)は以下の手順に従って合成した(Fig. 5-2, a)。エバポレーターなど、すべての操作は40℃以下で行なった。

5-2-2-1 *Tert*-butoxycarbonyl-L-valine *tert*-butylamide (3)の合成

Tert-butoxycarbonyl-L-valine (2) 5 g (23.0 mmol)とdicyclohexylcarbodiimide (DCC) 4.8 g (23.3 mmol)を100 mlの塩化メチレン中に溶解させ0℃まで冷却した。攪拌しながら*tert*-

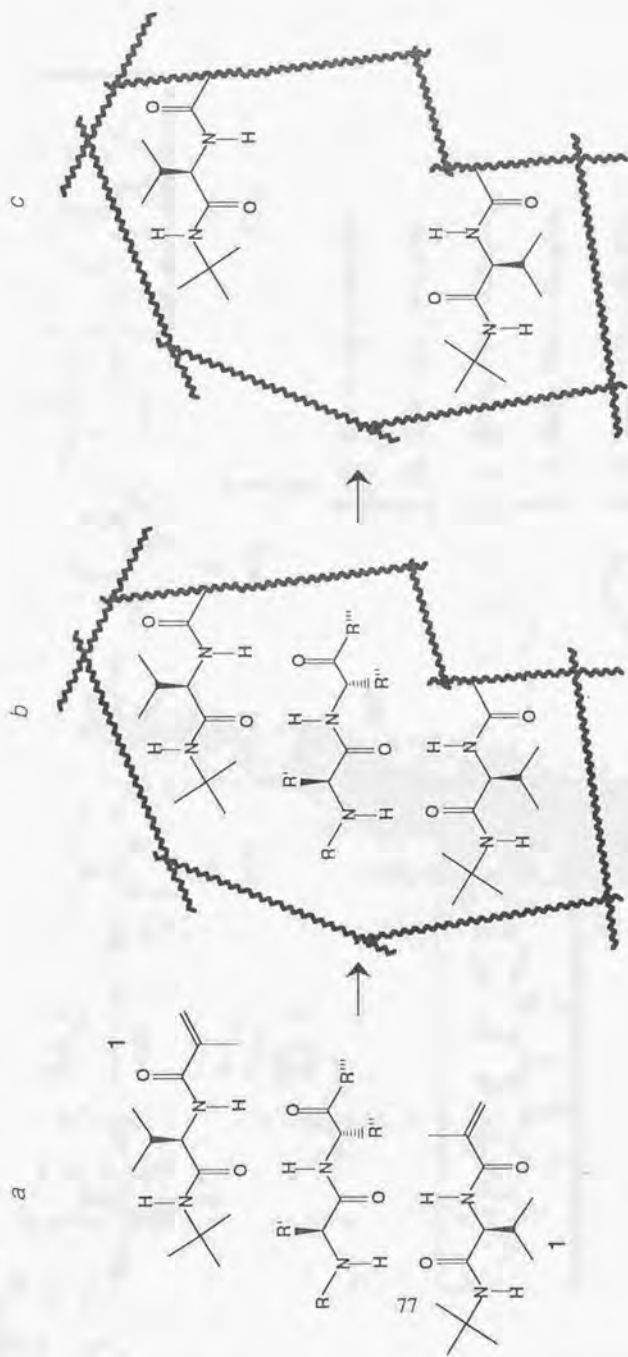


Fig. 5-1 Schematic illustration of the molecular imprinting procedure in this study

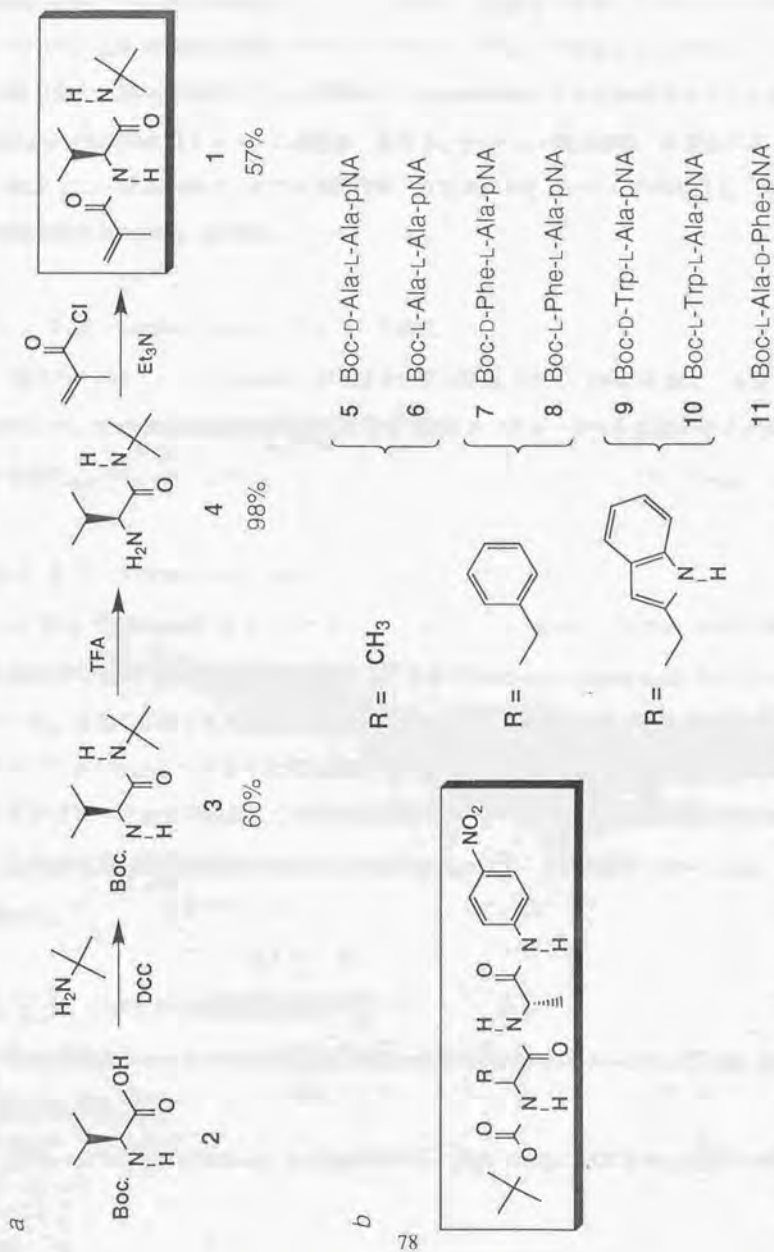


Fig. 5-2 The functional monomer and dipeptide derivatives used in this study

buthylamine 2.6 ml (23.4 mmol)をシリンジで滴下し、室温まで昇温してそのまま24時間攪拌を続けた。反応の進行は薄層クロマトグラフィー (TLC) で確認した。析出しているDCCの尿素体をろ別して塩化メチレンを留去し、50 mlの酢酸エチルに溶解させて、それぞれ100 mlの5%炭酸水素ナトリウム水溶液、蒸留水、5%クエン酸水溶液、蒸留水で各2回ずつ洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルとエーテルで再結晶を行なった。再結晶後収量3.756 g (収率60%)。

5-2-2-2 L-valine *tert*-butylamide (4) の合成

得られた 3.37 g (13.5 mmol) にトリフルオロ酢酸 (TFA) 15 mlを加え、室温で2時間攪拌した。TLCで*t*-Bocの脱離を確認してからTFAをエバポレーターと真空ポンプで留去し、4を得た。

5-2-2-3 *N*-methacryloyl-L-valine *tert*-butylamide (1) の合成

4 2.5 g (13.3 mmol) とトリエチルアミン2.0 ml (14.3 mmol) を200 mlのクロロホルムに溶解させて0°Cまで冷却した。塩化メタクリロイル 1.3 ml (13.4 mmol) をシリンジで滴下した。室温に昇温して48時間攪拌した。TLCで反応を確認してクロロホルムを留去し、エタノール150 mlとアンモニア水8 mlを加えて1時間攪拌した。これらを留去した後、酢酸エチルとエーテルで再結晶して目的の機能性モノマー (1) を得た。再結晶後収量1.938g (収率57%)。最終生成物の同定は¹H-NMR spectrometer (日本電子: JNM-A500) により行った。

5-2-3 ジペプチド誘導体の合成

Tert-butoxycarbonyl-D-alanyl-L-alanine *p*-nitroanilide (Boc-D-Ala-L-Ala-pNA) (5, Fig. 5-2, b)の合成法を示す。

Boc-L-Ala 0.46 g (24.5 mmol)、L-Ala-pNA 0.47 g (22.5 mmol)、DCC 0.48 g (23.1 mmol)、お

よびHOBt 0.60 g (44.6 mmol)を15 mlの*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 中に溶解させて、室温で24時間攪拌した。TLCで反応を確認し、析出しているDCCの尿素体をろ別して真空ポンプでDMFを留去し、50 mlの酢酸エチルに溶解させた。そしてそれぞれ100 mlの5%炭酸水素ナトリウム水溶液、蒸留水、1 N-塩酸、蒸留水で各2回ずつ洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルとエーテルで再結晶を行なって、ジペプチド誘導体 (5) を得た。再結晶後収量0.589g (収率69%)。

他の全てのジペプチド誘導体の合成はモノマーを変えて上と同様の手順で行なった。

5-2-4 インプリントポリマーの合成

ガラス製サンプル瓶中で、機能性モノマーであるL-バリン誘導体 (1) 0.25 mmol、Boc-D-Ala-L-Ala-pNA (5) 0.5 mmol、EGDMA 12.5 mmol、重合開始剤の2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) 20 mgを5 mlのクロロホルム中に溶かし、超音波洗浄機にて十分に脱気を行った。サンプル瓶を密閉して、45℃に設定したカラムオープンで24時間加熱し重合反応を行なわせた。得られた塊状のポリマーを粗粉碎し、メタノール：1N-塩酸 = 1 : 3 (v/v)の混合溶液約50 ml中に一晩静置して重合反応を停止させた。

5-2-5 インプリントカラムの調製

ポリマーを乾燥させた後、自動乳鉢器 (日東：ANM200WES) で完全に粉碎し、ふるいにかけて粒径が26~63 μ mのものを選別収集した。回収した粒子の中には粒径26 μ m以下の細かいポリマー粒子が若干含まれており、カラムの目詰まりやピークのテーリングを引き起こす。そこで、カラム充填には適さないこれらのポリマーを除くため、ポリマー粒子をアセトニトリル中に拡散させ、30分間放置した後、沈殿した粒子のみを分取するという沈降分離操作を5回繰り返した。こうして得られたポリマー粒子は、クロロホルム：メタノール = 10 : 3 (v/v)の溶液と比重がほぼ等しくなる。そこでこの溶液中にポリマー粒子を拡散させてバッカーに注ぎ、メタノールを溶媒としてステンレスカラム (100 mm \times 4.6

mm, i.d.) にスラリー充填した。このカラムを高速液体クロマトグラフィー用のポンプに接続し、安定なベースラインが得られるまでメタノールで洗浄した。

なお対照として、鑄型分子を加えずに重合したポリマーも調製した。

5-2-6 液体クロマトグラフィーによるカラムの評価

液体クロマトグラフィーは、805 Manometric module、811C Dynamic mixer、401C Dilutor、305、306 Pumps、118 UV/VIS DetectorのGILSON HPLCシステムと、日立社製のクロマトインテグレーター (D-2500) によって行った。

鑄型分子 10^{-5} molを1 mlのクロロホルムに溶解させて(10^{-8} M)、これをインジェクト用サンプルとした。鑄型分子のジアステレオマーについても同様にサンプルを調製した。これらを20 μ lインジェクトし、流速1 ml/minとして紫外・可視検出器により保持時間を測定した。またアセトンをクロロホルムに溶解させたサンプルも調製し、これをボイドマーカースとした。溶離液はクロロホルム、またはクロロホルムとヘキサンとの混合液を用いた。このときの圧力はおおよそ5-10 barであるが、5-2-5に記した沈降分離操作が不十分で微小なポリマー粒子が完全に除去できなかった場合は50 bar以上になってしまう。紫外・可視検出器では検出波長254 nmとし、サンプル中の発色基である

-ニトロフェニル基を検出した。

インプリントポリマーのサンプルに対する親和性は、アセトンをボイドマーカースとして、以下の式に従って各サンプルについての容量比 k' を算出することによって評価した。

$$k' = (t_R - t_0)/t_0$$

ここで t_R はサンプルの保持時間、 t_0 はボイドマーカースであるアセトンを溶出するための時間である。容量比とは、保持時間を補正したものであり、保持時間が大きい方が容量比も大きくなる。そして容量比が大きいほど、カラム内のポリマーのそのサンプルに対する保持力が大きいことを表す。

本研究ではジペプチド誘導体を鑄型分子として作製したインプリントポリマーがジアス

テレマーに対して選択性を有しているかを評価することを目的としている。このため、C末端側アミノ酸をL-アラニンに統一して、N末端側のBoc-アミノ酸をD-体、L-体にした一対のジアステレオマー（以下D-L体、L-L体）3組を合成した。そしてそのジアステレオマーの一つを鋳型分子としてインプリントを行い、得られたポリマーのD-L体、L-L体に対する保持力の比をみることにより、インプリントの効果を考察した。D-L体、L-L体に対する容量比の比である分離係数 α は以下の式により算出する。

$$\alpha = k'_{D-L} / k'_{L-L}$$

ここで、 k'_{D-L} 、 k'_{L-L} はそれぞれDL体、L-L体のジペプチド誘導体に対する容量比を表す。すべての操作は室温で行った。

5-3 結果及び考察

5-3-1 新規機能性モノマー1がインプリントポリマーの立体特異性に及ぼす効果

まず最初に、新規機能性モノマー1がジペプチド誘導体の立体選択性に効果があるかどうかを評価することにした。Boc-D-Ala-L-Ala-pNA (5)を鋳型としてインプリンティングを行い、得られたポリマーの5に対する容量比とそのジアステレオマーであるBoc-L-Ala-L-Ala-pNA (6)に対する容量比を比較した。その結果をTable 5-1に示す。これより、1を共重合したポリマーAは、鋳型を使わずに合成したコントロールポリマーBよりも高い立体特異性を示した ($\alpha = 1.80$)。Bの場合でもある程度の立体特異性が見られるのは、このポリマーで用いたL-バリン誘導体が光学活性であるためと考えらる。

鋳型として、より大きな側鎖を持つBoc-D-Phe-L-Ala-pNA (7)を用いてインプリンティングを行ったとき、その効果はさらに増大した。7をインプリントしたポリマーCは分離係数 $\alpha = 2.84$ を示し、ポリマーAよりもさらに立体特異性が向上した。一方コントロールポリマーBは、7に対しても、そのジアステレオマー8に対してもほとんど親和性を示さなかった。このことから、より大きな側鎖を持つペプチドを鋳型として用いると、さらに

Table 5-1 Effect of functional monomers on stereoselectivity

polymer		template	capacity factor			separation factor
functional monomer	k'_5		k'_6		α	
			k'_5	k'_6		k'_5 / k'_6
A	1	5	2.09	1.16		1.80
B	1	none	1.06	0.81		1.31
			k'_7	k'_8	k'_{11}	k'_7 / k'_8
C	1	7	2.95	1.04	0.37	2.84
B	1	none	0.54	0.43	0.30	1.26

The eluents were hexane:chloroform = 60:40. Elution was monitored at 254 nm at a flow rate of 1 mL min⁻¹. k'_n represents the capacity factor of an analyte n .

効果的なインプリンティングが行えることが示唆された。

さらに7に対して逆のアミノ酸配列を持つジペプチド誘導体Boc-L-Ala-D-Phe-pNA (11)をポリマーB、Cのサンプルとしたところ、11はどちらのカラムにもほとんど保持されず、合成したポリマーがアミノ酸配列をも認識していることが示唆された。

5-3-2 鋳型分子と機能性モノマーとのモル比の最適化

鋳型分子と機能性モノマーとの比は、インプリントポリマーの選択性と感度を左右する最も重要な要素の一つである。こうした化学量論的検討は個々のポリマーについて行われるべきであり(95)、本研究でも新規機能性モノマー1を用いたインプリンティングの最適条件を検討することにした。

鋳型分子にはBoc-D-Ala-L-Ala-pNA (5)を用い、鋳型分子と機能性モノマーのモル比を1:1から1:4に変化させた4つのポリマー(D、E、F、G)を合成した。そして鋳型分子とこのジアステレオマーであるBoc-L-Ala-L-Ala-pNA (6)に対する親和性を評価した。その結果をTable 5-2に示す。これより、鋳型分子と機能性モノマーのモル比が1:2と1:3で合成したポリマーEとFが最も高い立体特異性を示した。機能性モノマー1とジペプチド誘導体は、ペプチド結合をそれぞれ2つと3つ持っているため、Fig. 5-1で示した以外にも実際にはさまざまな相互作用を行って複合体を形成しているものと思われる。それにもかかわらず、本実験によって最も高い立体特異性を与える最適なモル比が存在することが明らかになった。

この結果を踏まえて、鋳型分子と機能性モノマーのモル比を1:2に固定して以下の実験を行うことにした。

5-3-3 溶媒の影響

モレキュラーインプリンティング法では重合の際の溶媒の選択が重要である。重合前に鋳型分子と機能性モノマーができるだけ安定な複合体を形成することが、より選択的なボ

Table 5-2 Effect of the ratio of template to functional monomer on stereoselectivity

polymer	molar ratio (template:functional monomer)	capacity factor		separation factor
		k'_5	k'_6	α
D	1:1	3.66	2.48	1.48
E	1:2	2.55	1.50	1.70
F	1:3	4.06	2.49	1.63
G	1:4	1.41	1.10	1.28

Molecularly imprinted polymers **D** to **G** were prepared using a dipeptide derivative, Boc-D-Ala-L-Ala-pNA (**5**) as a template molecule. As a solvent and an eluent of liquid chromatography, hexane:chloroform = 60:40 was used. Elution was monitored at 254 nm at a flow rate of 1 mL min⁻¹. k'_n represents the capacity factor of an analyte **n**. Capacity factor α was determined from: $\alpha = k'_5 / k'_6$.

リマーを合成するのに必須であることは明かである。本研究では、鋳型分子と機能性モノマーとの相互作用として多点水素結合を期待しているが、このためには溶媒の極性が低い方が望ましい。かつ鋳型分子や機能性モノマーが溶解できる溶媒である必要もある。最適の溶媒条件はこの相反する2つの条件の妥協点になる。そこで本実験系においても、溶媒の極性がインプリントポリマーの特異性に及ぼす影響を評価することにした。

鋳型分子のBoc-D-Ala-L-Ala-pNA (5) を様々な比のヘキサン/クロロホルム混合液に溶解し、そのまま重合することによって、インプリントポリマーE, H, Iを得た。そして鋳型分子とこのジアステレオマーであるBoc-L-Ala-L-Ala-pNA (6) に対する親和性を評価した。その結果をTable 5-3に示す。これより、ヘキサンの混合量が多くなるほど、すなわち溶媒の極性が低くなるほど立体特異性が高くなることが明らかになった。このうちヘキサン：クロロホルム=60：40で合成したポリマーIが最も高い分離係数 ($\alpha=2.57$) を示した。より極性の低いヘキサン：クロロホルム=80：20でもポリマーを合成することを試みたが、鋳型分子のBoc-D-Ala-L-Ala-pNAがこれに溶解せず、ポリマーを得ることができなかった。

以上の結果、本研究で用いた機能性モノマーと鋳型分子との相互作用は水素結合を介して行われていることが示唆された。

5-3-4 インプリントポリマーのアミノ酸配列に対する選択性

Table 5-1から5-3によって、機能性モノマー1を用いたインプリントポリマーによるジアステレオマーの光学分割が示された。これらのポリマーの特性をさらに検討するため、それぞれ異なるアミノ酸配列を有する3組のジペプチド誘導体に対する選択性を評価することにした。

用いたジペプチド誘導体は、Boc-D-Ala-L-Ala-pNA (5)、Boc-L-Ala-L-Ala-pNA (6)、Boc-D-Phe-L-Ala-pNA (7)、Boc-L-Phe-L-Ala-pNA (8)、Boc-D-Trp-L-Ala-pNA (9)、Boc-L-Trp-L-Ala-pNA (10) であり、このうち5、7、9をインプリンティングすることによってポリマーA、C、Jを合成した。また鋳型を加えずにインプリンティングを行ったコン

Table 5-3 Effect of solvent used in molecular imprinting on stereoselectivity

polymer	volume ratio in solvent (hexane:chloroform)	capacity factor		separation factor
		k'_5	k'_6	α
E	0:100	2.55	1.55	1.70
H	40:60	4.95	2.54	1.95
I	60:40	6.39	2.49	2.57

Molecularly imprinted polymers were prepared using a dipeptide derivative, Boc-D-Ala-L-Ala-pNA (5) as a template molecule. The eluents were hexane:chloroform = 60:40. Elution was monitored at 254 nm at a flow rate of 1 mL min⁻¹. k'_n represents the capacity factor of an analyte **n**. Capacity factor α was determined from: $\alpha = k'_5 / k'_6$.

トロールポリマー B もあわせて合成した。そしてそれぞれのポリマーの各ジアステレオマーに対する特異性を液体クロマトグラフィーで評価した。その結果を Table 5-4 に示す。

これより、ポリマー A と C については、それぞれ鑄型として用いたペプチド配列に対して最も高い選択性が得られた。すなわち、ポリマー A は Ala-Ala の配列に対して分離係数 $\alpha = 1.80$ 、ポリマー C は Phe-Ala の配列に対して分離係数 $\alpha = 2.84$ であった。この結果はまた、より大きな側鎖を持つペプチドを鑄型として用いると、インプリンティングの効果がより大きくなることを示唆している。ポリマー A と C について、それぞれ鑄型として用いたペプチド配列以外の配列を持つサンプルに対する親和性を評価したところ、コントロールポリマー B を用いたときとほぼ同じ低い選択性が得られた。

一方、Boc-D-Trp-L-Ala-pNA (9) を鑄型として合成したポリマー J は、鑄型とした Trp-Ala の配列 ($\alpha = 1.70$) より、Phe-Ala の配列 ($\alpha = 2.05$) に対してより高い親和性を示した。トリプトファンのアミノ酸残基は塩基性インドールである。これに対し、アラニンのアミノ酸残基はメチル基、フェニルアラニンのアミノ酸残基はフェニル基でいずれも無極性である。したがって、この実験の場合のような順相条件では、Trp-Ala は D-L 体、L-L 体ともに、Ala-Ala や Phe-Ala よりも極端によく保持される。インプリントポリマーの場合でもコントロールポリマーの場合でも保持時間でおよそ 5~6 倍大きい。 α で評価すると、評価の対照となるジアステレオマーが保持されればされるほど、 α が小さくなる。したがって、単純に Trp-Ala の場合インプリントの効果が小さいとは言いがたい。保持時間の差で見れば、Trp-Ala インプリントポリマー J の場合の Trp-Ala の D-L 体と L-L 体の差が最も大きかった。また、Boc-D-Trp-L-Ala-pNA をインプリントすると、トリプトファンのインドール基によって広い空間がポリマー内に構築されると考えられる。これが逆に、より小さな側鎖を持つ Phe-Ala 誘導体と相互作用しやすくしていることも考えられる。

以上の結果、機能性モノマー 1 を用いたこれらのインプリントポリマーはアミノ酸配列に対してある程度選択性を持つことが明らかになった。

Table 5-4 Sequence specificity of molecularly imprinted polymers

polymer		separation factor α		
	template	k'_5/k'_6	k'_7/k'_8	k'_9/k'_{10}
A	5	1.80	1.25	1.21
C	7	1.28	2.84	1.55
J	9	1.42	2.05	1.70
B	none	1.31	1.26	1.37

The eluents were hexane:chloroform = 60:40. Elution was monitored at 254 nm at a flow rate of 1 mL min⁻¹. k'_n represents the capacity factor of an analyte n.

5-4 結言

モレキュラーインプリンティング法の最大の長所は望みの鑄型分子に対して選択性のある高分子をテラーメイドに合成できる点にある。しかし現在までに使用されてきた機能性モノマーはメタクリル酸やビニルピリジンなど非常に限られていた。そこで本研究では、生体のペプチド間相互作用をモデルとし、目的分子と多点水素結合を形成する新規機能性モノマーを合成することによって、モレキュラーインプリンティングの可能性を広げることを試みた。

タンパク質の α ヘリックスや β シートに見られるペプチド間の多点水素結合を範として、ペプチドを多点水素結合により認識する新規機能性モノマーを設計・合成した。これを用いてジペプチド誘導体を鑄型としてモレキュラーインプリンティングを行った。まずこの新規機能性モノマーがインプリントポリマーの立体特異性に及ぼす効果を調べたところ、用いた鑄型に対して最も立体特異性を有していることが確認された。鑄型としてより大きな側鎖を持つペプチドを用いるとその効果はさらに向上した。また重合の際の鑄型分子と機能性モノマーとのモル比は最適化できることが示された。さらに重合の際の溶媒は極性が低いほど立体特異性を高め、鑄型の認識が水素結合を介していることを強く示唆した。

本研究によって、モレキュラーインプリンティング法でタンパク質をモデルとした認識部位を構築する基礎が示され、人工生体機能高分子の合成の可能性を開くことができた。今後のこの分野の新たな展開を導くものとして非常に意義深いと考えられる。

第6章 核酸塩基対を模倣するモレキュラーインプリンティング

6-1 緒言

高い認識機能を持つホストをより簡便、安価に作製する方法であるモレキュラーインプリンティング法によって、さまざまな高分子ホストが報告されている。しかし、選択性や使用できる機能性モノマーの種類などに限界があった。第5章ではペプチド間の多点水素結合を模倣した新規機能性モノマーを設計・合成し、これをモレキュラーインプリンティングに応用した。本章では、さらにインプリンティングのモデルを生体に求めることによって新しい機能性モノマーを設計・合成することを試みる。

生体のDNAに目を向けてみると、核酸塩基は多点での相補的塩基対(Fig. 6-1)を形成することによって二重らせんとしてのDNA構造を維持している。これを利用して、現在までに多くのアフィニティクロマトグラフィーが開発されており、塩基あるいはヌクレオシドを結合したシリカゲル固定相の開発が展開されている。またこうした核酸塩基間の水素結合を模倣することにより、Fig. 6-2のように医薬品等の光学分割が達成されている(96)。これらの医薬品はウラシルやチミンと似ており、図のリガンドは特異的に3点の水素結合を形成してこれらと会合するとされている。このことは¹H-NMRで観測するとNHプロトンが水素結合によって低磁場へシフトすることからも裏付けられている。さらにこの構造を持つ化合物を合成し、分子認識だけでなく触媒活性を持つ人工レセプターの興味深い研究も行われている(97, 98)。

以上のような知見をもとにして、核酸塩基に代表される選択性の高い分子認識性とモレキュラーインプリンティング法の持つテラーメイド的な性質とを組み合わせることにより、多点での水素結合によって特異性を持った分子認識素子が得られると期待される。

そこで本研究では、ペプチド鎖と多点で水素結合を形成すると予想される新規機能性モノマー(1)を合成し、モレキュラーインプリンティングにおける機能性モノマーとして利用する。鋳型に用いた核酸塩基誘導体とその類似化合物に対するポリマーの親和性を検討することによって、この新規機能性モノマーの選択性に与える影響を評価する。さらに

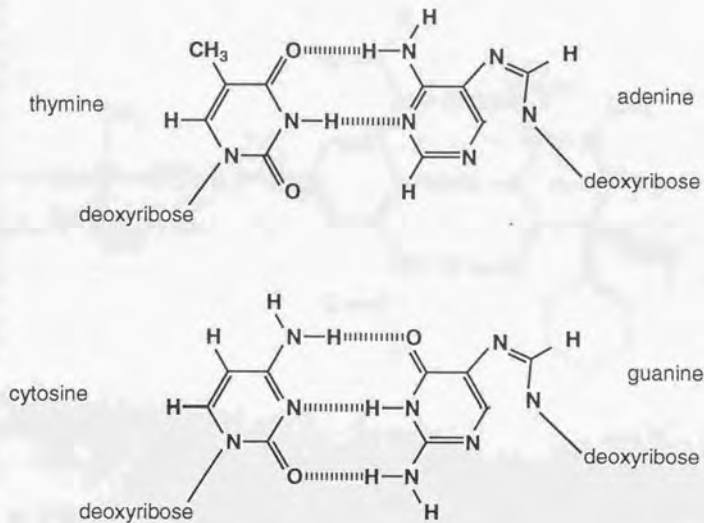


Fig. 6-1 Hydrogen bonds between nucleotide bases

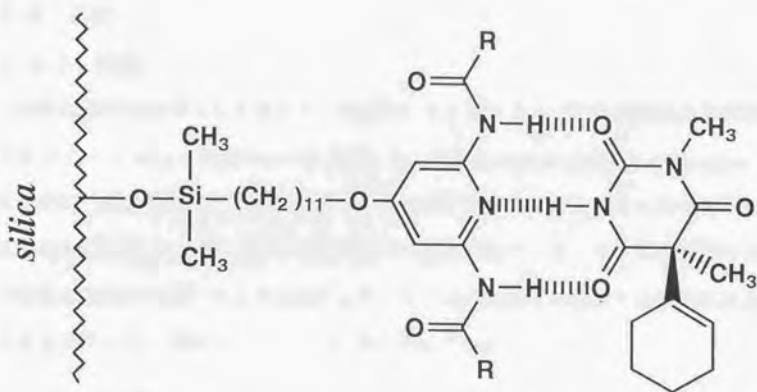


Fig. 6-2 Stationary phase mimicking hydrogen bonds between nucleotide bases

催眠作用を持つ薬物の一種であるバルビツール酸誘導体を鋳型として用いることによって、このポリマーを薬物認識に応用する。この研究によって、核酸塩基間の多点相互作用を模倣した新たなモレキュラーインプリンティングが展開できると思われる。さらには人工分子認識高分子の構築を新たに展開する上で非常に意義深いものと考えられる。

6-2 実験

6-2-1 試薬

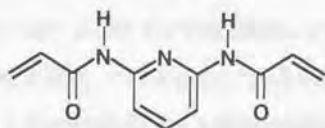
試薬は全て特級のものを用いた。液体クロマトグラフィーの溶離液は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 純度のものを使用した。市販のethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) は安定剤 (重合阻害剤) としてヒドロキノン類が含まれている。これらを除去するため、EGDMA 500 mlにつき200 mlの1M食塩水で3回洗浄した。そして、無水硫酸マグネシウムで乾燥し固体をろ過したものを使用した。その他の試薬は市販のものをそれ以上精製することなく用いた。本研究で用いた化合物の構造をFig. 6-3に示す。

6-2-2 新規機能性モノマー (1) の合成

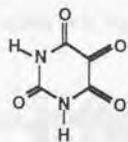
500 ml 3口フラスコに2,6-ジアミノピリジン(5.46 g, 50 mmol)とトリエチルアミン(12.1 g, 120 mmol)の混合クロロホルム溶液(150 ml)を入れ、氷冷中スターラーで攪拌させながら滴下ろうとを用いて塩化アクリロイル(10.9 g, 120 mmol)を5秒に一滴程度の速度で加えた。混合物を0℃で12時間攪拌した後500 mlナスフラスコに移し、エバポレーターで溶媒を除去しメタノール200 mlを加えた。これを二回くりかえした後、得られたメタノール溶液100 mlを滴下ろうとに入れ、攪拌させた1リットルナスフラスコ中の純水800 mlに滴下した。白濁した水溶液を放置し白色沈殿を確認してから、アスピレーターを用いて吸引ろ過にかけ、白色のろ過物を得た。収量8.23 g(収率75.8%)。

6-2-3 インプリントポリマーの合成

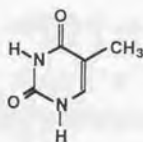
合成したアクリルアミド誘導体 (機能性モノマー (1), 1 mmol) もしくはメタクリル



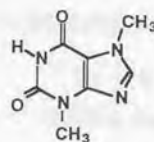
2,6-bis(acrylamido)pyridine (1)



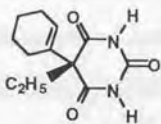
alloxan (2)



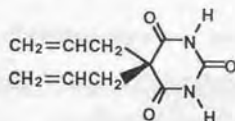
thymine (3)



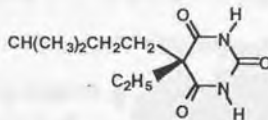
theobromine (4)



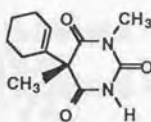
cyclobarbital (5)



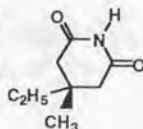
allobarbital (6)



amobarbital (7)



hexobarbital (8)



3-ethyl-3-methyl
glutarimide (9)

Fig. 6-3 Chemical structures of the functional monomer 1 and analytes used in this study.

酸（機能的モノマー、1.5 mmol）にアロキサン（鑄型分子、0.5 mmol）、EGDMA（架橋剤、20 mmol）、2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)（重合開始剤、0.9 mmol）を加え、クロロホルム（溶媒、4 ml）に溶解させて窒素置換したのち45℃、24時間加熱して重合反応を行なわせ塊状重合物を得た。これを粉碎し、ふるいにかけて粒径が26~63 μ mの粒子を採取した。アセトニトリル中で沈降させ上澄み液を除去して残った粒子を充填剤として用いた。これをメタノール及びクロロホルムで洗浄して鑄型分子を除去し、空カラム（100 mm \times 4.6 mm）にスラリー充填してカラムを調製した。このカラムを高速液体クロマトグラフィー用のポンプに接続し、安定なベースラインが得られるまでメタノールで洗浄した。

なお対照として、鑄型分子を加えずに重合したポリマーも調製した。

6-2-4 液体クロマトグラフィーによるカラムの評価

カラムの分離特性は液体クロマトグラフィーにより評価した。液体クロマトグラフィーは、805 Manometric module、811C Dynamic mixer、401C Dilutor、305、306 Pumps、118 UV/VIS DetectorのGILSON HPLCシステムと、日立社製のクロマトインテグレーター（D-2500）によって行った。クロロホルム/メタノールを溶離液としサンプルの保持時間を測定して、以下の式に従って各サンプルについての容量比 k' を算出した。

$$k' = (t_R - t_0)/t_0$$

ここで t_R はサンプルの保持時間、 t_0 はボイドマーカであるアセトンを出すための時間である。すべての操作は室温で行った。

6-3 結果及び考察

6-3-1 新規機能的モノマー（1）の核酸塩基誘導体に対する親和性の評価

合成したアクリルアミド誘導体の高分子中での分子認識特異性を確認するため、鑄型分子を加えずにアクリルアミド誘導体のみを含む高分子(polymer A)を合成し、カラムを作製

した。また比較対象とするコントロールに、従来機能的モノマーとして最もよく用いられているメタクリル酸を含む高分子(polymer B)も調製した。測定するサンプルとしては核酸塩基類(アデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル)およびプリン、ピリミジン誘導体を選んだ。測定条件としてクロロホルム/メタノール混合溶離液で流速0.5 ml/minの速さで測定を行った。その結果をTable 6-1に示す。

polymer Aを用いたカラムの場合、構造中にイミノ基をもつ化合物に対してより選択的に相互作用することが考えられるが、測定の結果も、このイミド構造をもつチミン、ウラシル、テオブロミン、アロキサン等の保持時間が他の分子に比べかなり長く保持された。これに対しメタクリル酸を用いたpolymer Bでは、シトシンの保持が高かったことを除けばほとんどの分子の保持は低かった。また官能基に対する特異性もみられなかった。これらのことから、今回新たに合成した機能的モノマーのイミノ基に対する特異性が確かめられた。これら認識特異性の違いについて考察すると、まずpolymer Bはメタクリル酸由来のカルボキシル基が高分子内でサンプルと複合体を形成するのに最も適した位置と角度で固定されていない、つまり非特異的な結合部位のままであるため今回の結果が得られたと考えられる。これはインプリンティングを効果的に行うことによって解決されると思われる。一方polymer Aは、アクリルアミド誘導体による相補的な水素結合により環状イミド構造と特異的に吸着するため、このような選択性がみられたと考えられる。つまり本来ならばインプリンティングを行うことによって得られる高分子マトリックス内の結合部位の位置的規制、結合部位の特異的固定が一部すでに実現されていることになる。これをインプリンティングに応用すればさらに優れた分子認識素子が合成できると思われる。

6-3-2 モレキュラーインプリンティングによるアロキサンの認識

モレキュラーインプリンティングにおいては、鑄型分子に少なくとも2つ以上の機能的モノマーが配位してその形を高分子マトリックス中に記憶できると、インプリンティング効果は極めて高くなる。今回新たに合成した機能的モノマーは、6-3-1のとおり単独で用いた場合にも、つまり分子の形をインプリンティングによって記憶させなくても、分子

Table 6-1 Selectivity of the polymers prepared with the monomer **1** or methacrylic acid

sample	capacity factor	
	polymer A	polymer B
adenine	0.26	0.93
guanine	0.01	0.01
cytosine	0.14	4.05
thymine	4.84	0.21
uracil	7.55	0.80
theophylline	0.01	0.03
theobromine	1.73	0.20
alloxan	2.24	1.89
6-amino-1-methyluracil	13.8	1.20

Polymers were prepared in the absence of template molecules either with the monomer **1** (polymer **A**) or methacrylic acid (polymer **B**). A chloroform/methanol (19:1, v/v) solution was used as the eluent with a flow rate of 0.5 ml/min.

選択的な性質を示す。このことから、この機能性モノマーが少なくとも2つ以上結合する部位が存在する分子を鋳型として用いれば、極めて特異的な分子認識高分子を合成できると思われる。

アロキサンはバルビツール酸誘導体と同様、見かけの上でイミド構造を二つもつ化合物である。この構造上の特徴から、機能性モノマー1とアロキサンは2:1の比で相互作用すると予想される(Fig. 6-4)。この複合体が形成されたままの状態では機能性モノマーが架橋剤とともに重合されれば、高分子マトリックス内に機能性モノマーがV字型に固定されるはずである。そこでこのアロキサンをモデル系として鋳型に用いることによってインプリンティングを行った。

本研究における機能性モノマーは主に水素結合の形成を期待して合成したものである。水素結合の形成を利用した分子認識の構築は、最近特に関心を集めているが、そのほとんどは水素結合が有効に働きうる非プロトン性(低極性)有機溶媒中で行われている。これは、プロトン性溶媒中では認識対象分子および認識部位がプロトネーションされ、意図した認識が阻害されてしまうためである。このような理由で本研究でもインプリンティングポリマーを重合するのに用いる溶媒として非プロトン性低極性溶媒であるクロロホルムを選択した。しかしながら、アロキサンはクロロホルムには微量しか溶解しない。そこでアロキサンがすべて溶解する程度にメタノールをクロロホルムに加え、クロロホルム/メタノール混合溶液を用いてインプリンティングを行った。また液体クロマトグラフィーの溶離液にもクロロホルム/メタノールを用い、流速1 ml/minでその保持時間を測定し、容量比を算出した。

その結果、アロキサン(2)を加えてインプリントしたポリマーCでは、チミン(3)に比べてアロキサンの容量比が上昇していた(Table 6-2)。チミンも幾分容量比が大きくなっていたが、テオプロミン(3)の値は逆に小さくなっていた。これより、新たに合成した機能性モノマーを用いて、インプリンティングを行うことが可能であることが示された。

次にインプリンティングポリマーを重合する時の溶媒の影響を調べるために、より極性

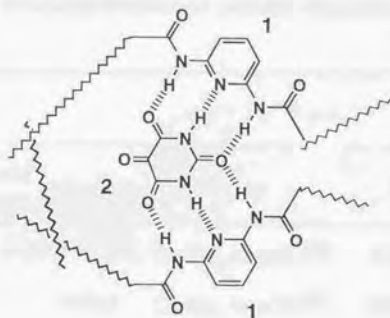


Fig. 6-4 Possible structure of the binding sites for alloxan in the molecularly imprinted polymer.

Table 6-2 Characterization of alloxan-imprinted polymer

polymer	functional monomer	template	porogen	Capacity factor		
				2	3	4
C	1	2	CHCl ₃ /MeOH ^(a)	4.88	4.42	1.33
D	1	none	CHCl ₃ /MeOH ^(a)	2.63	3.53	1.46
E	1	2	DMF	0.86	2.85	0.79
F	1	none	DMF	0.97	2.74	0.88

A chloroform/methanol (19:1, v/v) solution was used as the porogen (a) and the eluent with a flow rate of 0.5 ml/min.

の高いDMFを用いてポリマーを合成した（ポリマーE、F）。その結果、鑄型分子を加えたことによるインプリンティングの効果は見られなかった。また、試験的にメタノールのみを溶媒としたインプリンティングも行ってみたが、DMFの場合と同じように変化がみられなかった。溶媒の極性が高くなるほどサンプルが保持されなくなったことから、本研究で用いた機能性モノマーとアロキサンとの相互作用は水素結合を介して行われていることが示唆された。

6-3-3 鑄型分子と機能性モノマーとのモル比の最適化

次に鑄型分子と機能性モノマーとの重合段階における最適比について検討した。理論的には、アロキサンとこの機能性モノマーは1:2の比率で複合体を形成すると考えられる。しかしながらこの複合体は非共有結合により形成されているため、その複合体形成は化学平衡に依存しているはずである。加えた鑄型分子が完全に機能性モノマーと複合体形成するためには、ある程度過剰に機能性モノマーを加える必要があると考えられる。ところがその結果として過剰の機能性モノマーは、高分子内にランダムに存在することとなり、これがインプリントポリマーに非特異的な選択性を与えることになるという懸念が残る。また重合反応時には重合を開始させ、さらに連続的に反応を続けさせるためにある程度の熱を加えなければならない。非共有結合由来の複合体は、この重合に必要とされる高温条件下では不安定であると考えられるため、確実に高分子内に固定されると考えられる共有結合性複合体の場合と同様にはいかない。こうした点からも化学量論的な検討が必要であると考えられる。

これを確認するため、新たにインプリンティングを行った。アロキサン（鑄型分子）と機能性モノマーとのモル比を、1:1から1:4まで変えてポリマーH-Kを合成した。なお対照として、鑄型分子を加えずに重合したポリマーGも調製した。アロキサンに対しコントロールとしてチミンを用いて比較し、分離係数 α を計算した。

この結果、アロキサンのモル比が0、つまりアロキサンを加えずに重合したポリマーGや、アロキサンのモル比が1、つまりアロキサンと機能性モノマーが等量の条件で重合し

たポリマーHは、アロキサンよりもチミンの容量比が大きかったのに対し、アロキサンのモル比が1:2から1:3の場合には逆にアロキサンの容量比が大きくなっていることが分かった(Table 6-3)。このことは、機能性モノマーが2から3等量の時が、高分子内の認識部位の構築に適切であるということを示唆している。

6-3-4 $^1\text{H-NMR}$ による相互作用の観察

モレキュラーインプリンティング法により合成したポリマーの実サンプルへの応用を検討するため、鎮静・催眠作用を持つバルビツール系の薬物を鋳型分子として用いることにした。

まず、バルビツール酸誘導体の一つであるシクロバルビタールと機能性モノマーが水素結合によって複合体を形成しているかを $^1\text{H-NMR}$ スペクトルによって検証した。機能性モノマー、シクロバルビタール、そしてこれらの複合体をそれぞれ測定したものがFig. 6-5である。機能性モノマーのNHプロトン(A)は δ 7.72ppm、シクロバルビタールのNHプロトン(B)は δ 8.78ppmにそれぞれ観測された。これに対し両化合物を1:1で混合した系(C)を観測した場合にはNHピークがそれぞれ低磁場側へシフトすることが分かった。これらのことより両化合物間の水素結合の形成が示唆された。

6-3-5 モレキュラーインプリンティングによるバルビツール酸誘導体の認識

6-3-4の結果から複合体の形成が行われていると判断されたので、次にシクロバルビタール(5)のインプリンティングを行った。溶媒にはクロロホルムを用い、コントロールとして鋳型分子を加えずに同条件で重合したポリマーのカラムも作製した。比較を行うためシクロバルビタール以外にアロバルビタール(6)、アモバルビタール(7)、ヘキソバルビタール(8)、3-エチル-3-メチルグルタルイミド(9)の容量比も測定した。液体クロマトグラフィーの溶離液には、クロロホルムとメタノールをそれぞれ用いた。

その結果(Table 6-4)、メタノールを溶離液とした場合にはインプリントカラムもコントロールカラムもサンプルの保持はあまり大きくなかった。これに対し、溶離液にクロロホ

Table 6-3 Effect of the ratio of template to functional monomer on selectivity

polymer	molar ratio (template:functional monomer)	capacity factor		separation factor
		k'_2	k'_3	α
G	no template	0.74	1.11	0.67
H	1:1	0.88	1.06	0.83
I	1:2	1.83	1.66	1.10
J	1:3	1.91	1.82	1.05
K	1:4	1.49	1.53	0.97

Molecularly imprinted polymers **G** to **K** were prepared using allofan (**2**) as a template molecule. A chloroform/methanol (19:1, v/v) solution was used as the eluent with a flow rate of 0.5 mL/min. k'_n represents the capacity factor of an analyte **n**. Separation factor α was determined from: $\alpha = k'_2 / k'_3$.

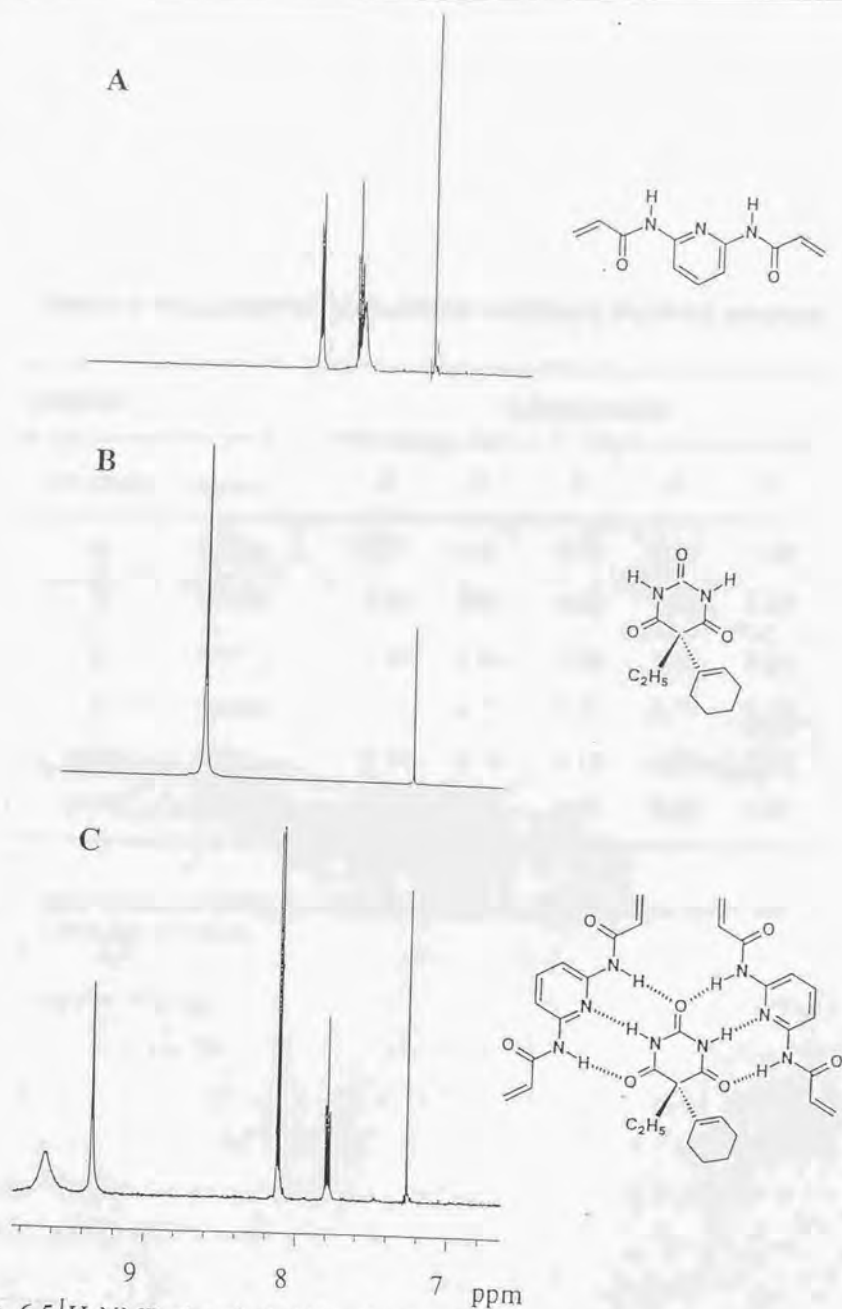


Fig. 6-5 $^1\text{H-NMR}$ chemical shifts of the protons for (A) 2,6-diaminopyridine derivative 1, (B) cyclobarbital 2 and (C) 2:1 mixtures of 1 and 3.

Table 6-4 Recognition of barbiturates in molecularly imprinted polymers

polymer		Capacity factor				
template	eluent	5	6	7	8	9
5	CHCl ₃	12.4	11.9	6.72	0.39	1.82
5	MeOH	1.38	2.04	0.46	0.33	0.47
8	CHCl ₃	2.46	4.88	1.73	1.01	0.91
8	MeOH	0.24	0.07	0.02	0.71	0.22
none	CHCl ₃	0.34	0.19	0.13	0.61	0.23
none	MeOH	0.21	0.07	0.01	0.58	0.21

Either chloroform (CHCl₃) or methanol (MeOH) was used as the the eluent with a flow rate of 1 ml/min.

ルムを用いたときは、シクロバルビタール、アモバルビタールの容量比が大きく変化した。特にシクロバルビタールについては容量比の値がコントロールカラムを用いた時の値に比べ大きな変化(7.1倍)を示し、インプリンティングの効果が表れた。ヘキソバルビタールについてはこのような変化は全く見られなかった。これはヘキソバルビタールには1位にメチル基が存在するため、水素結合の形成が阻害されているためと考えられる。3-エチル-3-メチルグルタルイミドも構造上、イミノ基がひとつしかないので、保持の大きな変化は見られなかった。またヘキソバルビタールを鋳型分子に用いた場合も、鋳型に対して大きな親和性を示さず、インプリンティングの効果は観察されなかった。

6-4 結言

本研究では、まず従来にはないタイプの新規機能性モノマーを提案した。これは核酸塩基間の相補的水素結合を模倣したアクリルアミド誘導体であり、これによって認識対象分子と多点水素結合を形成すると考えた。これを設計・合成してモレキュラーインプリンティングに利用し、核酸塩基の誘導体の選択的な認識を試みた。アロキサンを鋳型として合成したポリマーは、類似物であるチミンやテオブロミンよりもアロキサンをよりよく保持し、新規機能性モノマーを用いたインプリンティングの効果が示唆された。また重合の際の鋳型分子と機能性モノマーとのモル比は最適化できることが示された。さらに重合の際の溶媒の極性が低いほどポリマーの選択性が向上したことから、ポリマーによる鋳型の認識が水素結合によって行われていることが強く示唆された。また、この機能性モノマーを用いたポリマーを薬物の分析に応用することを試みた。その結果、バルビツール酸誘導体の一つであるシクロバルビタールを鋳型として合成したポリマーは、鋳型に対して極めて強い親和性、特異性を示し、インプリンティングの効果が最大限に発揮された。

本研究で得られた知見は、生体内の精密な分子認識の働きを模倣することで高度な分子認識が実現できるという可能性を示した。今後のこの分野の新たな展開を導くものとして非常に意義深いと考えられる。

第7章 モレキュラーインプリンティング法を用いるクロラムフェニコールの測定

7-1 緒言

第4章から第6章までは、モレキュラーインプリンティング法による新規分子認識素子の合成を行ってきた。この方法はゲストを認識する分子を精密にデザインする必要がなく、いわゆる精密な分子設計、多段階合成とは対極な立場にあるホスト高分子の合成法であるといえる。また一段階の重合反応でホストが得られるという合成の簡便さ、迅速さ、安価かつ容易な大量合成などの利点からも注目されている。そしてその最大の特徴は、どのようなゲスト分子に対しても原理的にはそれに対応したホスト高分子を合成することが可能であるという、いわばテーラーメイド的な手法であるという点にある。

このような手法を用いて任意の分子に対する認識素子が合成できれば、超安定なセンサー素子として、臨床診断や環境計測、食品プロセスなどの幅広く応用できることが期待される。しかしながら、モレキュラーインプリンティング法によって合成されたポリマーが実際にセンサー素子として利用された例は極めて少ない(73, 74)。さらに実サンプルへの応用まで報告した研究は全くない。モレキュラーインプリンティング法の究極の目的は、生体素子にかわる超安定な分子認識素子のバイオセンサーへの応用であり、これが達成されなければモレキュラーインプリンティング法の意義も半減してしまう。そこで第二部の最後に、クロラムフェニコールを鋳型分子として合成したインプリントポリマーをセンシングシステムに応用することを試みる。

クロラムフェニコールは広い抗菌スペクトルを持つ極めて有効な抗生物質であり、人体や家畜の医薬品として使用されている。クロラムフェニコールはサルモネラ感染症に対して特に効果を発揮し、また幼児期の髄膜炎や腸チフス熱(99)に対して有効な薬剤でもある。しかし同時に、骨髄の形成を阻害したり、再生不良性貧血を起こす原因にもなるなど、毒物としての脅威も併せ持つ。このことから、食用となる家畜にクロラムフェニコールを使用することは禁じられている。このため、患者の体内での薬物動態を探る上で、また食品の品質管理を行う上で、クロラムフェニコールのモニタリングは極めて重要になっている。

現在までに報告されているクロラムフェニコールの定量法は、クロマトグラフィー(100)や微生物(101)、酵素(102)、抗体(103)などを用いているが、どれも手間がかかり、経験と技術を必要とする。

そこで本研究では、クロラムフェニコールを特異的に認識する素子をモレキュラーインプリンティング法によって合成し、これをセンシングシステムに応用することを試みる。これによって超安定で普遍的な人工分子認識素子が合成され、センサー分野への応用の道が開けるものと思われる。

7-2 実験

7-2-1 試薬

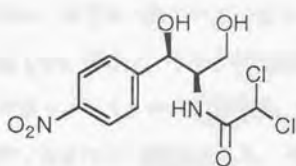
試薬は全て特級のものを用いた。液体クロマトグラフィーの溶離液は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 純度のもので使用した。市販のethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) は安定剤(重合阻害剤)としてヒドロキノン類が含まれているため、蒸留によってこれらを除去了。その他の試薬は市販のものをそれ以上精製することなく用いた。本研究で用いた化合物の構造をFig. 7-1に示す。

7-2-2 クロラムフェニコールを鑄型としたインプリントポリマーの合成

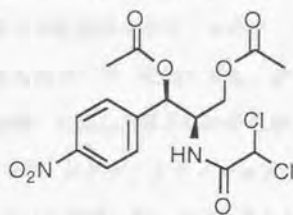
ガラス製サンプル瓶中で、機能性モノマー、鑄型であるクロラムフェニコール1 mmol、架橋剤エチレングリコールジメタクリレート(EGDMA) 5 ml、重合開始剤の2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル) 1%を5 mlのテトラヒドロフラン中に溶かし、超音波洗浄機にて十分に脱気を行った。サンプル瓶を密閉して、60℃に設定したカラムオーブンで48時間加熱し重合反応を行なわせた。得られた塊状のポリマーを粗粉碎し、熱したジメチルホルムアミドとエタノールで洗浄した。なお対照として、鑄型分子を加えずに重合したポリマーも調製した。

7-2-3 インプリントカラムの調製

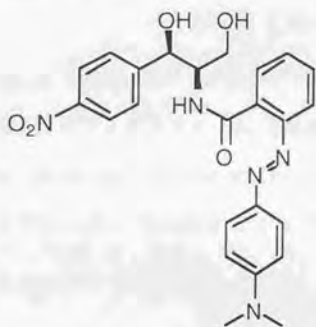
Chloramphenicol
(CAP)



Chloramphenicol diacetate
(CAP-DA)



Chloramphenicol-Methyl red
(CAP-MR)



Thiamphenicol
(TAM)

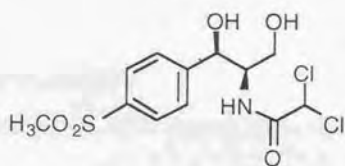


Fig. 7-1 Structures of the various substances used in this work

ポリマーを乾燥させた後、自動乳鉢器（日東：ANM200WES）で完全に粉碎し、ふるいにかけて粒径が25~63 μ mのものを選別収集した。回収した粒子の中には粒径26 μ m以下の細かいポリマー粒子が若干含まれており、カラムの目詰まりやピークのテーリングを引き起こす。そこで、カラム充填には適さないこれらのポリマーを除くため、ポリマー粒子をアセトニトリル中に拡散させ、30分間放置した後、沈殿した粒子のみを分取するという沈降分離操作を5回繰り返した。残った粒子をバツカーに注ぎ、メタノールを溶媒としてステンレスカラム（100 mm \times 4.6 mm, i.d.）にスラリー充填した。このカラムを高速液体クロマトグラフィー用のポンプに接続し、安定なベースラインが得られるまでメタノールで洗浄した。

7-2-4 液体クロマトグラフィーによるカラムの評価

液体クロマトグラフィーは、805 Manometric module、811C Dynamic mixer、401C Dilutor、305、306 Pumps、118 UV/VIS DetectorのGILSON HPLCシステムと、日立社製のクロマトインテグレーター（D-2500）によって行った。アセトニトリルに溶解させた0.1 mg/mlのサンプル10 μ lをインジェクトし、紫外・可視検出器により保持時間を測定した。溶離液はアセトニトリルを用い、またアセトンをボイドマーカースとした。

インプリントポリマーのサンプルに対する親和性は、以下の式に従って各サンプルについての容量比 k' を算出することによって評価した。

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

ここで t_R はサンプルの保持時間、 t_0 はボイドマーカースであるアセトンを溶出するための時間である。また分離係数 α を以下の式によって算出した。

$$\alpha = k'_x / k'_y$$

これは一つのポリマーについて化合物xとyの選択性を比較したものである。またインプリンティングの効果を表す指標として、インプリンティング係数Iを定義する。

$$I = k'_{imp} / k'_{non}$$

すべての操作は室温で行った。

7-2-5 クロラムフェニコール-メチルレッドを用いたクロラムフェニコールの計測

本システムの測定原理をFig. 7-2に示す。メチルレッドで標識したクロラムフェニコールをアセトニトリルに0.1-0.6 $\mu\text{g/ml}$ となるように溶かし、液体クロマトグラフィーの溶離液とした。これを用いて、ベースラインが平衡状態になるまでカラムを平衡化した。クロラムフェニコール、チアムフェニコール、クロラムフェニコールジアセテートのアセトニトリル溶液を20 μl インジェクトし、カラムから溶出したクロラムフェニコール-メチルレッドの460 nmの吸収を測定した。測定は最低3回行い、標準偏差を算出した。

7-3 結果及び考察

7-3-1 機能性モノマーの種類、および鋳型分子と機能性モノマーとのモル比の検討

まずモレキュラーインプリンティングを行うための基本的な条件として、機能性モノマーの種類、および鋳型分子と機能性モノマーとのモル比を検討することにした。機能性モノマーとしてジエチルアミノエチルメタクリレートを用いた場合、鋳型分子と機能性モノマーとのモル比を1:1、1:2、1:3とした。またメタクリル酸を使用した場合、鋳型分子と機能性モノマーとのモル比を1:2、1:8とした。これらの条件でインプリンティングを行ったところ、ジエチルアミノエチルメタクリレートを用い、鋳型分子と機能性モノマーとのモル比が1:2のときに最も高い親和性を持つポリマーが得られた。以下の実験においては、この条件でポリマーを合成することにした。

7-3-2 液体クロマトグラフィーにおける流速の選択性への影響

液体クロマトグラフィーの流速は、インプリントポリマーの評価のみならず分離カラムの特性を評価する上で極めて重要な要素である。そこで、流速がインプリントポリマーの選択性に与える影響を検討することにした。

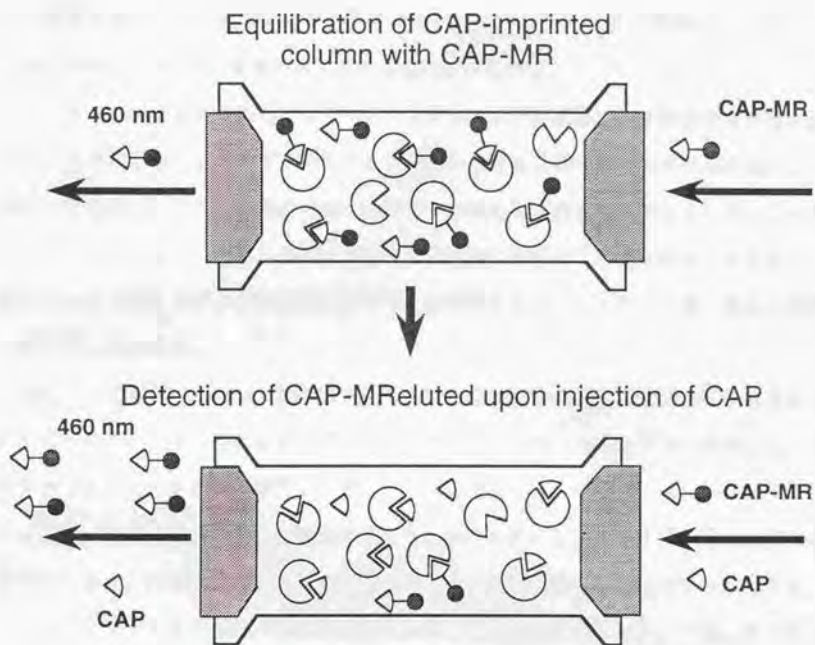


Fig. 7-2 Principle of optical detection of CAP

測定サンプルとして、鋳型に用いたクロラムフェニコール、また類似化合物として、クロラムフェニコールジアセテート、チアムフェニコール、クロラムフェニコール-メチルレッドを用いて、カラムに対する親和性を評価した。その結果をTable 7-1に示す。ここで k'_n は鋳型を加えないで重合したポリマー(nonspecific)を用いたときの容量比、 k'_s はインプリントポリマー(specific)を用いたときの容量比をあらわす。

これより、流速を上げるとインプリンティング係数 I は増加し、分離係数 α は逆に減少することが示された。インプリンティング係数の増加は非特異的な相互作用が減少していることを意味し、また分離係数の減少はポリマーの基質選択性が低下していることを意味している。これより、流速の選択はポリマーの用途に依存すると思われる。すなわち、非特異的結合を抑えたいときには速い流速を、分離能を上げたいときには遅い流速を選択すればよいと思われる。

また、ここで用いたサンプルの容量比を比較してみると、どの流速においても共通の傾向が見られる。すなわち、鋳型に用いたクロラムフェニコールは最もよく保持され、次にチアムフェニコールがよく保持される。クロラムフェニコール-メチルレッドはクロラムフェニコールのときの約半分の容量比であり、クロラムフェニコールジアセテートは全く保持されない。これらのカラムはチアムフェニコールを比較的良好に認識することから、2つのヒドロキシル基が認識に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、クロラムフェニコールジアセテートはこの2つのヒドロキシル基を持っていないため、保持されなかったのではないと思われる。クロラムフェニコール-メチルレッドは2つのヒドロキシル基を持っているが、大きなメチルレッドの側鎖によってポリマー内の認識部位へのアクセスが阻害されていると考えられる。

7-3-3 クロラムフェニコールの測定のための条件の検討

7-3-2で、クロラムフェニコール-メチルレッドはクロラムフェニコールをインプリントしたポリマーにある程度保持されることが示された。この現象を利用してクロラムフェニコールを光学的に測定する系を構築することにした。

Table 7-1 Influence of the flow rate on k' , I and α values of the various analytes as determined by HPLC analysis using a CAP imprinted- or non-imprinted polymer as the stationary phase and acetonitrile as the mobile phase.

Analyte/ Flow rate	k'_n	k'_s	I	α
2 mL/min				
CAP	1.75	17.4	9.92	1.00
CAP-DA	0.00	0.14	-	124
TAM	1.14	9.09	7.97	1.91
CAP-MR	0.83	5.32	6.40	3.26
3 mL/min				
CAP	1.54	15.4	10.0	1.00
CAP-DA	0.00	0.15	-	102
TAM	0.99	8.40	8.48	1.83
CAP-MR	0.77	4.75	6.16	3.24
4 mL/min				
CAP	1.40	14.4	10.3	1.00
CAP-DA	0.00	0.13	-	110
TAM	0.84	7.33	8.72	1.96
CAP-MR	0.70	4.51	6.44	3.19
5 mL/min				
CAP	1.15	12.0	10.4	1.0
CAP-DA	0.00	0.16	-	74.9
TAM	0.65	7.06	10.9	1.70
CAP-MR	0.49	3.94	8.04	3.04

7-2-5で示したように、クロラムフェニコール-メチルレッドをアセトニトリルに溶かし、液体クロマトグラフィーの溶離液とした。これを用いて、ベースラインが平衡状態になるまでクロラムフェニコールをインプリントしたカラムを平衡化した。これにサンプルをインジェクトし、カラムから溶出したクロラムフェニコール-メチルレッドの460 nmの吸収を測定した。このシステムの感度は溶離液に含まれるクロラムフェニコール-メチルレッドの初期濃度と流速に大きく依存するので、検量線を作成する前にまずこれらを検討することにした。その結果をFig. 7-3、7-4に示す。

溶離液中のクロラムフェニコール-メチルレッドの濃度を0.1-0.8 $\mu\text{g/ml}$ として、20 $\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコールを20 μl インジェクトしたときのピーク面積を測定した(Fig. 7-3)。その結果、0.4-0.6 $\mu\text{g/ml}$ のときが最もピーク面積が大きかった。また流速が上昇するにつれてピーク面積は減少した(Fig. 7-4)。しかし、流速が遅いとピーク幅が広くなり、正確な測定が困難になる。以上の結果を考慮して、クロラムフェニコール-メチルレッドの濃度が0.6 $\mu\text{g/ml}$ 、流速が2 ml/min のときが最適な測定条件であると判断した。

7-3-4 クロラムフェニコールの光学的測定

この光学的センシングシステムにより、7-3-3で決定された条件に従ってクロラムフェニコールの検量線を作成した。この結果、3-1000 $\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコール濃度とピーク面積は直線関係にあることが示された(Fig. 7-5)。血清中のクロラムフェニコールの許容範囲は10-20 $\mu\text{g/ml}$ で、25 $\mu\text{g/ml}$ 以上は体に害を与える恐れがあるといわれている。本センシングシステムはこの濃度を十分にカバーするものであり、実サンプルへ応用できる可能性が示された。

また、本システムによってチアムフェニコールはクロラムフェニコールの約半分ほどのシグナルを与えた。これはこの構造上の類似性によるものであり、7-3-2の結果と一致

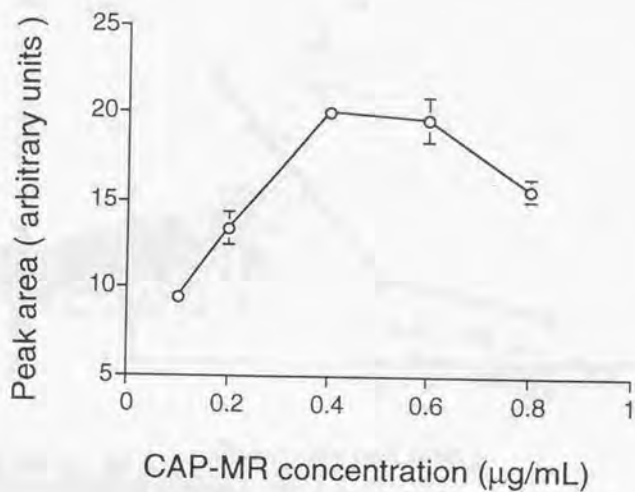


Fig. 7-3 Influence of CAP-MR concentration in the MeCN mobile phase on the area of the peak produced by injection of 20 μL of 20 $\mu\text{g/mL}$ CAP onto a 50×4.6 mm (i.d.) column containing CAP imprinted polymer. Each sample was analyzed at least three times and the error bars represent the SEM values.

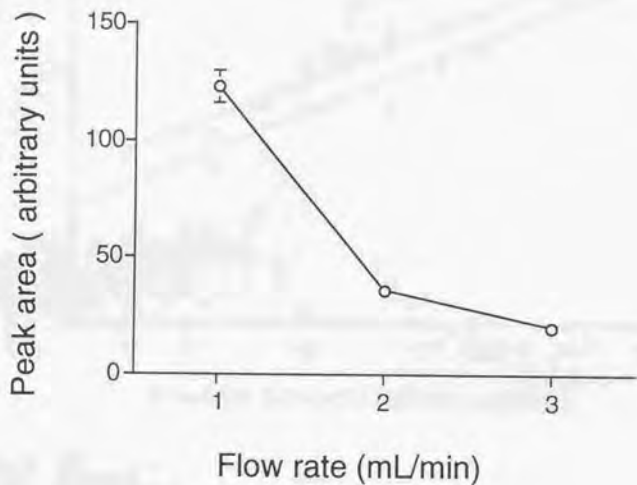


Fig. 7-4 Influence of the flow rate on the area of the peak produced by injection of 20 μ L of 20 μ g/mL CAP onto a 50 \times 4.6 mm (i.d.) column containing CAP imprinted polymer. Each sample was analyzed at least three times and the error bars represent the SEM values.

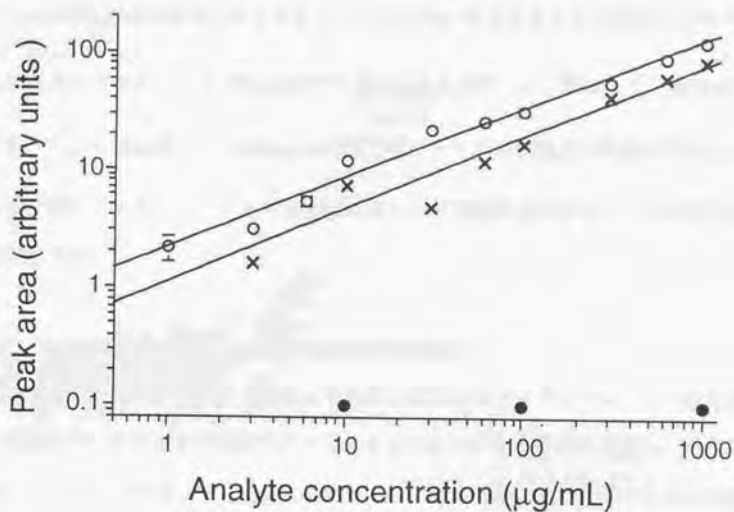


Fig. 7-5 Displacement of CAP-MR from a CAP imprinted polymer upon injection of 20 μl of CAP (○); TAM (×); or CAP-DA (●); solutions (1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The polymer was packed into a 5 cm column, the mobile phase was MeCN containing 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CAP-MR, flow rate 2 mL/min. Each sample was analyzed at least three times and the error bars represent the SEM values.

する。しかしながら食品や血清中にチアムフェニコールが混入することはなく、本システムを妨害する可能性はほとんどない。さらにクロラムフェニコールジアセテートは本システムでは0-1000 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で全く検出されなかった。またさまざまな濃度のクロラムフェニコールジアセテートを100 $\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコールと混合して、測定に与える影響を調べた。その結果、50-1000 $\mu\text{g/ml}$ の間ではピーク面積は誤差の範囲内でほとんど一定であり、クロラムフェニコールの測定にはほとんど影響を及ぼさないことが明らかになった(Fig. 7-6)。

7-3-5 血清中のクロラムフェニコールの光学的測定

この光学的センシングシステムによって血清に含まれるクロラムフェニコールを定量することを試みた。さまざまな濃度のクロラムフェニコールを牛血清に溶解し、酢酸エチルにて抽出した(104)。酢酸エチルを留去したのち、残査を300 μl のアセトニトリルに溶解して分析した。その結果をFig. 7-7に示す。

これより血清中のクロラムフェニコール濃度とピーク面積は極めて良い直線関係にあることが示された(相関係数 $r^2=0.990$)。以上の結果から、モレキュラーインプリンティング法によって合成したクロラムフェニコール認識素子は、光学的センシングシステムに適用することが可能となり、実サンプルの測定にも十分対応できることが明らかになった。

7-4 結言

クロラムフェニコールを鋳型としてモレキュラーインプリンティングを行い、極めて選択的なポリマーを得ることに成功した。諸条件を検討した後、色素のポリマーからの溶出を利用した光学的センシングシステムを構築した。この結果、3-1000 $\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコール濃度とピーク面積は直線関係にあることが検量線から示された。さらにこのセンシングシステムは血清から抽出したクロラムフェニコールも感度良く測定することが

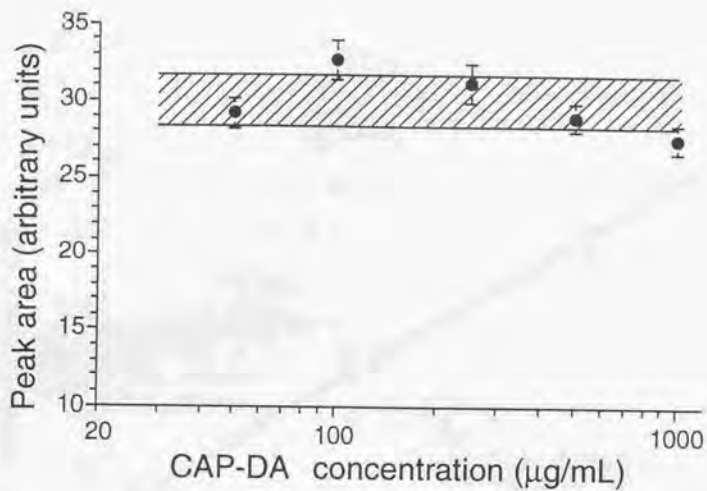


Fig. 7-6 Peak area of the CAP-MR displaced upon injection of 100 $\mu\text{g/mL}$ CAP mixed with various amounts of CAP-DA. The polymer was packed into a 5 cm column, the mobile phase was MeCN containing 0.6 $\mu\text{g/mL}$ CAP-MR, flow rate 2 mL/min. Each sample was analyzed at least three times and the error bars represent the SEM values. The crosshatched region corresponds to the range of the peak areas produced by 100 $\mu\text{g/mL}$ CAP solution.

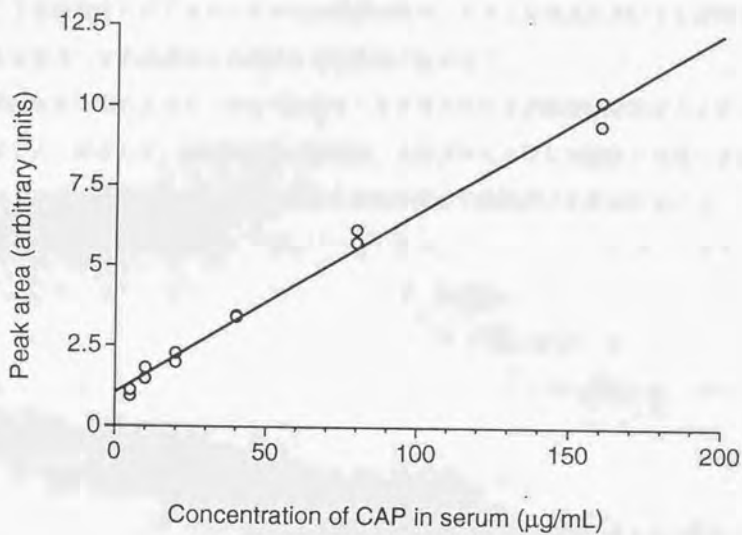


Fig. 7-7 Detection of various CAP concentrations in serum, extracted in duplicate.

可能であり、実サンプルの測定にも十分対応できることが明らかになった。

従来モレキュラーインプリンティング法によって多くの分子認識素子が合成されてきたが、センサーへの応用に成功した例は極めて少なかった。すなわち、簡便、安価、汎用性というモレキュラーインプリンティング法の大きなメリットを生かし切れないでいるのが現状であった。モレキュラーインプリンティング法の究極の目的は、生体素子にかわる超安定な分子認識素子のバイオセンサーへの応用であり、まさにこの点において本研究で目的としていた人工分子認識素子の開発とその応用に結びつく。

本章で示した結果によって、モレキュラーインプリンティング法が超安定なセンサー素子を合成する手段として、臨床診断や環境計測、食品プロセスなどの幅広く応用できることが期待される。このように本章で得られた知見は極めて意義深いと思われる。

第8章 結論

本研究では、生体にかわる安定な人工分子認識素子を合成し、これをセンサー素子として応用することを目的とした。

まず、比較的安定な素子である脂質を対象とし、天然には存在しない2種類の人工脂質を分子認識素子として用いることによって、高感度においセンサーを構築した。脂質を用いたこれまでのにおいセンサーは、脂質の親水基にのみ着目し、疎水基がセンサーの感度に与える影響は考慮されていなかった。そこで脂質膜の流動性に影響を与えらると思われるさまざまなアシル鎖を持つ脂質を用いてセンサーを構築した。特に三重結合を持つ人工脂質と α 位で分枝したアシル鎖を持つ人工脂質を用いて、高感度においセンサーの構築を試みた。またにおい物質の官能膜への吸着量を増やすために、水晶振動子を多孔性高分子膜で被覆し、さらに人工脂質を固定化することによって高感度化を図った。さらに作製したセンサーの感度を人の嗅覚と比較した。本論文の第2章では人工脂質を用いたにおいセンサーを開発し、第3章では多孔性高分子膜と人工脂質を組み合わせた安定な高感度においセンサーを開発した。

次に、人工分子認識素子の合成方法としてさらに汎用性のあるモレキュラーインプリンティング法に着目し、これを用いて分子認識能を持つ様々な高分子を合成した。従来のモレキュラーインプリンティングでは、機能性モノマーの種類、溶媒、温度など重合の際の条件を詳細に検討した例がほとんどなかった。そこでまずモレキュラーインプリンティングにこうした基礎的検討を加えることによって、より選択的な分子認識素子を得るための知見を集めた。また従来使われてきた機能性モノマーは非常に限られており、認識できる化合物の種類もおおのずと制限されていた。そこで生体が行っている特異的な分子認識を模倣して新規機能性モノマーを設計・合成し、モレキュラーインプリンティングに応用することを試みた。さらにモレキュラーインプリンティングによって合成したポリマーをセンサーの素子として利用し、実サンプルの測定を行った。本論文の第4章ではテストステロンを鋳型としてインプリンティングを行う際の諸条件を詳細に検討した。第5章では、ペ

ブチド結合間の相互作用を模倣した新規機能性モノマーを設計・合成し、これを用いてジベチド誘導体に対して立体選択性を持つポリマーを合成した。第6章では、核酸塩基間の多点での相補的水素結合を模倣した新規機能性モノマーを設計・合成し、これを用いて核酸塩基誘導体や睡眠剤に対して選択性を持つポリマーを合成した。第7章では、クロラムフェニコールに特異的なポリマーを合成し、これをセンサーの素子として利用することによって光学センシングシステムを構築した。

以下各章で得られた知見をまとめる。

第2章では、生体素子として比較的安定な脂質を水晶振動子に固定化することによってにおいセンサーを構築した。従来のおいセンサーは、脂質の親水基にのみ着目し、疎水基がセンサーの感度に与える影響は考慮されていなかった。そこで脂質膜の流動性に影響を与えらると思われるさまざまなアシル鎖を持つ脂質を水晶振動子に固定化し、得られたセンサーの感度を評価した。まず脂質のアシル鎖長とにおい物質の極性とは相関があることが示された。また脂質膜にコレステロールを20%添加することで、においセンサーの感度を約2倍向上させることが可能となった。さらにセンサーを高感度化することを目的として、三重結合を持つ人工脂質を官能膜としてにおいセンサーを作製したが、飽和アシル鎖を持つホスファチジルコリンを用いたにおいセンサーより低い応答を示した。次に α 位で分枝したアシル鎖を持つ人工脂質をセンサーの官能膜として用いることで、においセンサーの応答値が3倍以上増大した。さらにT&Tオルファクトメーターで使われる標準におい物質を測定した結果、分枝構造を持つ人工脂質を官能膜とした本においセンサーは、人の嗅覚と同程度の感度を示した。しかしセンサーの官能膜をさらに修飾することでより高感度化できる可能性も残された。

第3章では、におい物質の官能膜への吸着量を増やすために、水晶振動子の上に多孔性高分子膜を形成して天然及び人工の脂質の担持膜とし、におい物質に対する応答を評価した。用いた高分子のうち、最も安定で高い応答を示したのはナイロンであった。アルコール

ルを測定した場合、脂質だけを用いたセンサーより多孔質ナイロン膜を用いたセンサーの方が3倍から8倍の高い応答値を示した。これは多孔質ナイロン膜を脂質の担持膜として用いることで、においガスの吸着量が増加したためと考えられる。さらに α 位で分枝したアシル鎖を持つ人工脂質をナイロン担持膜に固定化して作製したセンサーは、におい物質に対して、脂質だけを用いたセンサーより2.5倍以上の応答を示した。このセンサーを用いて人の検知閾値とにおいセンサーの応答を比較した結果、人の検知閾値の濃度でもにおいセンサーは明らかに応答し、人と同程度の感度を持つことが示された。

このように天然には存在しない人工脂質を目的に応じて設計し合成することによって、極めて高感度なにおいセンサーを構築できると思われる。しかしながらバイオセンサーによって測定する必要のある化合物はにおい物質以外にも数多くあり、こうした化合物に対して特異的な分子認識素子をその都度設計・合成するのは極めて困難で経験と技術を要する。そこで次に汎用性のある人工分子認識素子を合成し応用を試みることを試みた。

第4章では、人工分子認識素子の合成方法としてさらに汎用性のあるモレキュラーインプリンティング法に着目した。これを用いてテストステロンに特異的なポリマーを合成した。従来のモレキュラーインプリンティングでは、機能性モノマーの種類、溶媒、温度など重合の際の条件を詳細に検討した例がほとんどなかった。そこでテストステロンをモデル鋳型分子として重合の際のさまざまな条件を詳細に検討した。まず、鋳型分子と機能性モノマーであるメタクリル酸のモル比は1:8が最適であることを示した。またメタクリル酸以外の機能性モノマーで強塩基性の2-(ジエチルアミノ)エチルメタクリレートの効果を調べたが、逆に分子認識能を低下させることが明らかになった。次に溶媒としてクロロホルムのかわりに極性の高いテトラヒドロフランを用いたところ、ポリマーの認識能が低下し、分子認識が水素結合によって行われていることが示唆された。重合温度は40℃、架橋剤はエチレングリコールジメタクリレートのときが良い選択性を示した。また可逆的な共有結合によって認識することを試みたが選択性の向上には結びつかなかった。

一つのモレキュラーインプリンティングの系についてこれほど詳細な検討を加えた例はなく、ここで得られた知見は、今後のモレキュラーインプリンティングに極めて重要な情報を提供するものと思われる。しかしここで用いた機能性モノマーは従来使われてきたものばかりであり、この手法では認識できる化合物の種類もおのずと制限される。このため生体の極めて特異的な相互作用を模倣した新規機能性モノマーの開発が必要であった。

第5章では、タンパク質の α ヘリックスや β シートに見られるペプチド間相互作用をモデルとし、目的分子と多点水素結合を形成する新規機能性モノマーを合成することによって、モレキュラーインプリンティングの可能性を広げることを試みた。この機能性モノマーを用いてインプリントポリマーを合成し、ジペプチド誘導体とそのジアステレオマーの認識の差を評価した。この新規機能性モノマーがインプリントポリマーの立体特異性に及ぼす効果を調べたところ、用いた鋳型に対して最も立体特異性を有していることが確認された。鋳型としてより大きな側鎖を持つペプチドを用いるとその効果はさらに向上した。鋳型分子と新規機能性モノマーのモル比は1:2または1:3が最適であることを示した。さらに重合の際の溶媒は極性が低いほど立体選択性を高め、鋳型の認識が水素結合を介していることを強く示唆した。

これによって、モレキュラーインプリンティング法でタンパク質をモデルとした認識部位を構築することが可能であることが示された。しかしまだ生体にはモレキュラーインプリンティング法で再構築していない特異的な相互作用がある。このような相互作用を模倣することによってさらに選択的な人工分子認識素子が得られるものと考えられた。

第6章では、新規機能性モノマーとして、核酸塩基間の相補的水素結合を模倣したアクリルアミド誘導体を設計・合成した。これによって認識対象分子と多点水素結合を形成すると考えた。これをモレキュラーインプリンティングに利用し、核酸塩基誘導体の選択的な認識を試みた。アロキサンを鋳型として合成したポリマーは、類似物であるチミンやデオブロミンよりもアロキサンをよりよく保持し、新規機能性モノマーを用いたインプリン

ティングの効果が示唆された。また鑄型分子と新規機能性モノマーのモル比は1:2または1:3が最適であることが示された。さらに重合の際の溶媒は極性が低いほど選択性が高くなり、鑄型の認識が水素結合を介していることが強く示唆された。また、この機能性モノマーを用いたポリマーを薬物の分析に応用することを試みた。その結果、バルビツール酸誘導体の一つであるシクロバルビタールを鑄型として合成したポリマーは、鑄型に対して極めて強い親和性、特異性を示し、インプリンティングの効果が最大限に発揮された。

これによって、生体内の精密な分子認識の働きを模倣することで高度な分子認識が実現できるという可能性が示された。しかし、以上の研究はインプリントポリマーの特性を評価しているに過ぎず、センサーへの応用は検討されていない。そこでインプリントポリマーを用いたセンシングシステムの開発が必要とされた。

第7章では、インプリントポリマーを用いたセンシングシステムの開発を行った。まず抗生物質であるクロラムフェニコールを鑄型としてモレキュラーインプリンティングを行い、極めて選択的なポリマーを得ることに成功した。クロラムフェニコール類似体を用いて検討した結果、2つのヒドロキシル基が認識に重要な役割を果たしていることが示唆された。またメチルレッドで標識されたクロラムフェニコールはこのポリマーにある程度保持された。このことを利用して、色素のポリマーからの溶出を利用した光学的センシングシステムを構築した。この結果、3-1000 $\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコール濃度とピーク面積は良い直線関係にあることが検量線から示された。さらにこのセンシングシステムは血清から抽出したクロラムフェニコールも感度良く測定することが可能であり、実サンプルの測定にも十分対応できることが明らかになった。

以上のことから、モレキュラーインプリンティング法によって生体素子にかわる超安定な人工分子認識素子が合成でき、さらにセンサーの素子として応用可能であることが示された。これによって、臨床診断や環境計測、食品プロセスなどの幅広く応用できることが期待される。

モレキュラーインプリンティング法によって合成した高分子をセンサーの素子として利用する際においては、天然の抗体を用いた免疫センサーと比較してより優れているか、また必要な感度が得られるかという点が重要になる。本研究ではこれらの点に関する検討は行っていないが、こうした特性を左右するポイントとして、(1) トランスデューサーの種類、(2) 結合部位の数、(3) 素子の調製のしやすさおよびコスト、などが挙げられる。本研究では物質の測定を紫外・可視光の吸光度を指標として行っているが、(1) の改良点として蛍光や発光、さらにラジオアイソトープを用いた測定を行えば十分高い感度が得られると思われる。近年表面プラズモン共鳴現象を利用した高感度センシングシステムが開発されており、これと組み合わせた高感度センサーの構築も十分可能である。また結合定数などの力学的特性は天然の抗体よりも劣る場合が多いが、(2) の単位重量あたりの結合部位は抗体よりも格段に多いため、感度の向上に十分寄与すると予想される。さらに、モレキュラーインプリンティング法の最大の特徴は選択的な高分子を簡便に低コストで合成できるところにあるため、(3) の点では本方法によって合成する素子が圧倒的に有利である。以上の点から、本方法の今後の可能性、応用分野は極めて広いと考えられる。

本研究ではまず、人工脂質を用いることによってにおいセンサーとしての感度を向上させることに成功した。しかし、センサーとしての選択性については、わずかに分析対象物の極性のみが識別できるなど、まだまだ不十分である。これを克服するためには、さまざまな官能基を持つ人工脂質を各種合成し、それぞれを水晶振動子上に固定化して得られる応答値をコンピューターで処理してパターン認識を行うことが考えられる。また、におい物質に対して特異性の高い分子認識素子を用いることも検討する必要がある。におい物質に対する受容体の遺伝子はすでにラットの嗅球などからクローニングされているので、今後これを用いて受容体を大量発現させ、センサーの分子認識素子として利用することが可能になると思われる。

さらにモレキュラーインプリンティング法を駆使すれば、個々のにおい物質に選択的な分子認識膜を作製することができ、極めて特異性の高いにおいセンサーを構築できると期待できる。すなわち、におい物質を適当な溶媒に溶かし、特異的な相互作用をすると予想される機能性モノマーや架橋剤等を加え、水晶振動子上で重合する。さらに種々の pH の緩衝液や有機溶媒で洗い流し、第 2 章および第 3 章で用いた計測システムに装着することによって、目的とするにおい物質に極めて特異的なセンサーが構築できると考えられる。

本研究は、人工脂質のにおいセンサーへの応用と、モレキュラーインプリンティング法による分子認識高分子の合成・センサー化への応用を行ったものであり、将来新規人工分子認識素子を開発するための基礎研究として極めて意義深いものである。

引用文献

- 1 I. Karube, *Handbook of Measurement Science*, ed. P.H. Sydenham, R. Thorn, Wiley, (1992) 3, 1721-1755.
- 2 I. Karube, K. Ikebukuro, Y. Murakami and K. Yokoyama, Enzyme Engineering XII, *Annals of the New York Academy of Sciences*, (1994) 750.
- 3 I. Karube and Y. Nomura, *Biosensors Using Immobilised Living Cells*, Chapter 16, John Wiley & Sons, (1996).
- 4 匂いの科学 高木貞敬・渋谷達明編 朝倉書店 1989年
- 5 S. Price, *Biochemistry of Taste and Olfaction*, (1981) 69-84.
- 6 N. Koyama and K. Kurihara, *Nature* (London), (1972) 236, 402.
- 7 T. Nomura and K. Kurihara, *Biochemistry*, (1987) 26, 6135.
- 8 匂いの応用工学 栗岡豊・外池光雄編 朝倉書店 1994年
- 9 塩川久子 目耳鼻 78, 1258-1270 (1975).
- 10 豊田文一 昭和47年度文部省研究報告集録(医学及び薬学1)、(1972) 231-240.
- 11 S. Takagi, *Kyukaku Shogai*, Igaku Shoin, Tokyo, (1978) p. 1.
- 12 G.M. Dyson, Raman effect and the concept of odor. *The perfumery and Essential Oil Record*, (1937) 13-19.
- 13 R.H. Wright, 菊池俊英訳: 匂いの科学、みすず書房、1969年
- 14 G. Sauerbrey, *Z. Phys.*, (1959) 155, 206.
- 15 H. Muramatsu, E. Tamiya and I. Karube, *Anal. Chem.*, (1988) 60, 5142.
- 16 W.H. King, Jr., *Anal. Chem.*, (1964) 36, 1735.
- 17 W.H. King, Jr., *Anal. Chem.*, (1969) 41, 580.
- 18 G.G. Guilbault, *Ion-Selective Electrode Rev.*, (1980) 2, 3.
- 19 A. Schmautz, *Sens. Actuators B*, (1992) 6, 38.
- 20 B.W. Saunders, D.V. Thiel and A. Mackay-Sim. *Analyst*, (1995) 120, 1013.

- 21 W.P. Carey, K.R. Beebe, B.R. Kowalski, D.L. Illman and T. Hirschfeld, *Anal. Chem.*, (1986) **58**, 149.
- 22 N. Miura, H. Minamoto, G. Sakai and N. Yamazoe, *Sens. Actuators B*, (1991) **5**, 211.
- 23 S. Kurosawa, N. Kamo, D. Matsui and Y. Kobatake, *Anal. Chem.*, (1990) **62**, 353.
- 24 S. Kurosawa and N. Kamo, *Langmuir*, (1992) **8**, 254.
- 25 B.R. Kowalski and C.F. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, (1972) **94**, 5632.
- 26 B.R. Kowalski and C.F. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, (1974) **96**, 916.
- 27 T. Moriizumi, T. Nakamoto and Y. Sakaruba, (1992) in *Sensors and Sensory Systems for an Electronic Nose*, ed. J.W. Gardner and P.N. Bartlett, *NATO ASI Series*, London, 217.
- 28 H. Muramatsu, E. Tamiya and I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, (1989) **225**, 399.
- 29 S.M. Chang, E. Tamiya and I. Karube, *Biosens. Bioelectron.*, (1991) **6**, 9.
- 30 S.M. Chang, B. Ebert, E. Tamiya and I. Karube, *Biosens. Bioelectron.*, (1991) **6**, 293.
- 31 S.M. Chang, Y. Iwasaki, M. Suzuki, E. Tamiya, I. Karube and H. Muramatsu, *Anal. Chim. Acta*, (1991) **249**, 323.
- 32 S.M. Chang, H. Muramatsu and I. Karube, *Sensors and Materials*, (1995) **7**, 13.
- 33 A. Dietrich, H. Mühwald, W. Rettig and G. Brezesinski, *Langmuir*, (1991) **7**, 539.
- 34 Y. Okahata, X. Ye, A. Shimizu and H. Ebato, *Thin Solid Films*, (1989) **180**, 51-59.
- 35 Y. Okahata, G. En-na and H. Ebato, *Anal. Chem.*, (1990) **62**, 1431-1438.
- 36 Y. Okahata, O. Shimizu and H. Ebato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (1990) **63**, 3082-3088.
- 37 Y. Okahata and H. Ebato, *Trends Anal. Chem.*, (1992) **11**, 344.
- 38 K.D.Janda, S.J.Benkovic, R.A.Lerner, *Science*, (1989) **244**, 437.
- 39 K.Johnsson, R.K.Allemand, H.Widmer, S.A.Benner, *Nature*, (1993) **365**, 530.
- 40 H.Nitta, D.Yu, M.Kudo, A.Mori, S.Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, (1992).
- 41 K.J. Shea, *Trends Polym. Sci.*, (1994) **2**, 166.
- 42 G. Wulff, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, (1995) **34**, 1812.

- 43 K. Mosbach and O. Ramström, *Bio/technol.*, (1996) **14**, 163.
- 44 T. Takeuchi and J. Matsui, *Acta Polym.*, (1996) **47**, 471.
- 45 G. Wulff and W. Vesper, *J. Chromatogr.*, (1978) **167**, 171.
- 46 G. Wulff and S. Schauhoff, *J. Org. Chem.*, (1991) **56**, 395.
- 47 K.J. Shea, T.K. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* (1986) **108**, 1091-1093.
- 48 K.J. Shea, D.Y. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.* (1989) **111**, 3442-3444.
- 49 K.J. Shea, D.Y. Sasaki, G.J. Stoddard, *Macromolecules*, (1989) **22**, 1722-1730.
- 50 K.J. Shea, D.Y. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.* (1991) **113**, 4109-4120.
- 51 G. Wulff and J. Vietmeier, *Makromol. Chem.*, (1989) **1901**, 1727.
- 52 M.J. Whicombe, M.E. Rodriguez, P. Villar and E.N. Vulfson, *J. Am. Chem. Soc.*, (1995) **117**, 7105.
- 53 L. Fischer, R. Müller, B. Ekberg and K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.*, (1991) **113**, 9358.
- 54 O. Ramström, L. Ye and K. Mosbach, *Chemistry & Biology*, (1996) **3**, 471.
- 55 A.G. Mayes, L.I. Andersson and K. Mosbach, *Anal. Biochem.*, (1994) **222**, 483.
- 56 G. Vlatakis, L.I. Andersson, R. Müller and K. Mosbach, *Nature (London)*, (1993) **361**, 645.
- 57 J. Matsui, I.A. Nicholls and T. Takeuchi, *Tetrahedron: Asymmetry*, (1996) **7**, 1357.
- 58 J. Matsui, A. Kaneko, Y. Miyoshi, K. Yokoyama, E. Tamiya and T. Takeuchi, *Anal. Lett.*, (1996) **29**, 2071.
- 59 D.K. Robinson and K. Mosbach, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1989) 969.
- 60 R. Müller, L.I. Andersson and K. Mosbach, *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, (1993) **14**, 637.
- 61 J.V. Beach and K.J. Shea, *J. Am. Chem. Soc.*, (1994) **116**, 379.
- 62 T. Matsuishi, T. Shimada and K. Morihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, (1994) **67**, 748.
- 63 J. Matsui, I.A. Nicholls, I. Karube and K. Mosbach, *J. Org. Chem.*, (1996) **61**, 5414.
- 64 S.E. Byström, A. Börje and B. Akermark, *J. Am. Chem. Soc.*, (1993) **115**, 2081.
- 65 P.K. Dhal and F.H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.*, (1991) **113**, 7417.

- 66 J. Matsui, I.A. Nicholls, T. Takeuchi, K. Mosbach and I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, (1996) **335**, 71.
- 67 J. Matsui, T. Kato T. Takeuchi, M. Suzuki, K. Yokoyama, E. Tamiya and I. Karube, *Anal. Chem.*, (1993) **65**, 2223.
- 68 B. Sellergren, *J. Chromatogr.*, (1994) **673**, 133.
- 69 J. Matsui, Y. Miyoshi, R. Matsui and T. Takeuchi, *Anal. Sci.*, (1995) **11**, 1017.
- 70 O. Ramström, L.I. Andersson and K. Mosbach, *J. Org. Chem.*, (1993) **58**, 7562.
- 71 A. Kugimiya, J. Matsui, T. Takeuchi, K. Yano, H. Muguruma, A.V. Elgersma and I. Karube, *Anal. Lett.*, (1995) **28**, 2317.
- 72 A. Kugimiya, T. Takeuchi, J. Matsui, K. Ikebukuro, K. Yano and I. Karube, *Anal. Lett.*, (1996) **29**, 1099.
- 73 D. Kriz and K. Mosbach, *Anal. Chim. Acta*, (1995) **300**, 71.
- 74 D. Kriz, O. Ramström, A. Svensson and K. Mosbach, *Anal. Chem.*, (1995) **67**, 2142.
- 75 J. Rürup, M. Mannova, G. Brezesinski and R.D. Schmid, *Chem. Phys. Lipids*, (1994) **70**, 187.
- 76 J. Rürup, F. Lauer, A. Drewes, V. Wray and R.D. Schmid, *Chem. Phys. Lipids*, (1994) **72**, 175.
- 77 R. A. Demel, *Biochimica et Biophysica Acta* (1976) **457**, 109-132.
- 78 E. Oldfield, *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* (1971) **43**, 610 .
- 79 生体膜 著 西島正弘他共訳 シュプリンガー・フェアラー東京 (株) Robert B. Gennis (1990).
- 80 E. Sada, S. Katoh and M. Terashima, *Biotechnol. Bioeng.*, (1983) **25**, 317-327.
- 81 K. Araki, R. Kon-no and M. Seno, *J. Membr. Sci.*, (1984) **17**, 89-95.
- 82 M. Gotoh, E. Tamiya and I. Karube, *Sensors and Materials*, (1988) **1**, 25-35.
- 83 M. Gotoh, E. Tamiya and I. Karube, *J. Membr. Sci.*, (1989) **41**, 291-303.

- 84 J. Frommer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1992) **31**, 1298-1328.
- 85 O. Ramström, L. Ye and K. Mosbach, *Chem Biol.*, (1996) **3**, 471.
- 86 J. M. Hoberman, C. E. Yesalis, In *Scientific American*; (1995) pp 76.
- 87 Sellergren, B. *Makromol. Chem.* (1989) **190**, 2703.
- 88 Sellergren, B.; Shea, K. J. *J Chromatogr.* (1993) **635**, 31.
- 89 K. J. Shea, E. A. Thompson, S. D. Pandey, P. S. Beauchamp, *J. Am. Chem. Soc.* (1980) **102**, 3149.
- 90 O. Ramström, I.A. Nicholls and K. Mosbach, *Tetrahedron: Asymmetry*, (1994) **5**, 649.
- 91 I.A. Nicholls, O. Ramström and K. Mosbach, *J. Chromatogr. A*, (1995) **691**, 349.
- 92 L.I. Andersson, R. Müller, G. Vlatakis and K. Mosbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995) **92**, 4788.
- 93 A. Dobashi, S. Hara, *Anal. Chem.*, (1983) **55**, 1805.
- 94 A. Dobashi, S. Hara, *Tetrahedron Lett.*, (1983) **24**, 1509.
- 95 B. Sellergren, *Makromol. Chem.*, (1989) **190**, 2703.
- 96 B. Feibush, A. Figueroa, R. Charles, K.D. Onan, P. Feibush and B.L. Karger, *J. Am. Chem. Soc.*, (1986) **108**, 3310-3318.
- 97 P. Tecilla, S.-K. Chang and A.D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.*, (1990) **112**, 9586-9590.
- 98 S.-K. Chang, D.V. Engen, E. Fan and A.D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.*, (1991) **113**, 7640.
- 99 I. Shalit, M. I. Marks, *Drugs*, (1984) **28**, 281-191.
- 100 D. J. Berry, *J. Chromatogr.* (1987) **385**, 337-341.
- 101 J. de Louvois, *J. Antimicrob. Chemother.* (1982) **9**, 253-65.
- 102 P. S. Lietman, T. J. White, W. V. Shaw, *Antimicro. Agents Chemother.* (1976) **10**, 347-353.
- 103 M. Dalbey, C. Gano, A. Izutsu, C. Collins, A. Jaklitsch, M. Hu, M. Fischer, *Clin. Chem.* (1985) **31**, 933.
- 104 S. Yamato, H. Sugihara, K. Shimada, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, (1990) **38**, 2290-2292.

発表論文リスト

"Development of a chemical vapor sensor using piezoelectric quartz crystal microbalances with coated unusual lipids", K. Yano, H. Yoshitake, U.T. Bornscheuer, R.D. Schmid, K. Ikebukuro, K. Yokoyama, Y. Masuda and I. Karube, *Analytica Chimica Acta*, (1997) **340**, 41-48.

"Development of an odorant sensor using polymer-coated quartz crystals modified with unusual lipids", K. Yano, U.T. Bornscheuer, R.D. Schmid, H. Yoshitake, H.-S. Ji, K. Ikebukuro, Y. Masuda and I. Karube, *Biosensors & Bioelectronics*, (1998) accepted.

"Testosterone receptor binding mimic constructed using molecular imprinting"
S. H. Cheong, S. McNiven, A. Rachkov, R. Levi, K. Yano and I. Karube, *Macromolecules*, (1997) **30**(5), 1317-1322.

"Stereoselective recognition of dipeptide derivatives in molecularly imprinted polymers which incorporate an L-valine derivative as a novel functional monomer", K. Yano, T. Nakagiri, T. Takeuchi, J. Matsui, K. Ikebukuro and I. Karube, *Analytica Chimica Acta*, (1998) accepted.

"Molecularly imprinted polymers which mimic multiple hydrogen bonds between nucleotide bases", K. Yano, K. Tanabe, T. Takeuchi, J. Matsui, K. Ikebukuro and I. Karube, 1997, *Analytica Chimica Acta*, (1998) accepted.

"Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers"
R. Levi, S. McNiven, S. A. Piletsky, A. Rachkov, S.-H. Cheong, K. Yano and I. Karube, *Analytical Chemistry*, (1997) **69**(11), 2017-2021.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜り、激励して下さいました東京大学先端科学技術研究センター 軽部征夫 教授に心より感謝申し上げます。

ご多忙にも関わらず本学位論文の審査を引き受けていただきました東京大学先端科学技術研究センター 二木鋭雄 教授、井街宏 教授、満洲邦彦 教授に厚くお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり多くの貴重なご教示とご援助を賜りました北陸先端科学技術大学院大学 民谷栄一 教授、広島市立大学 竹内俊文 教授、北陸先端科学技術大学院大学 横山憲二 助教授、東京大学先端科学技術研究センター 池袋一典 講師に厚くお礼申し上げます。

本研究を実施する機会を与えて下さり、貴重なご指導とご援助を賜りました東京理科大学 増田勇三 教授、シュツットガルト大学 Prof. Rolf D. Schmid に心よりお礼申し上げます。

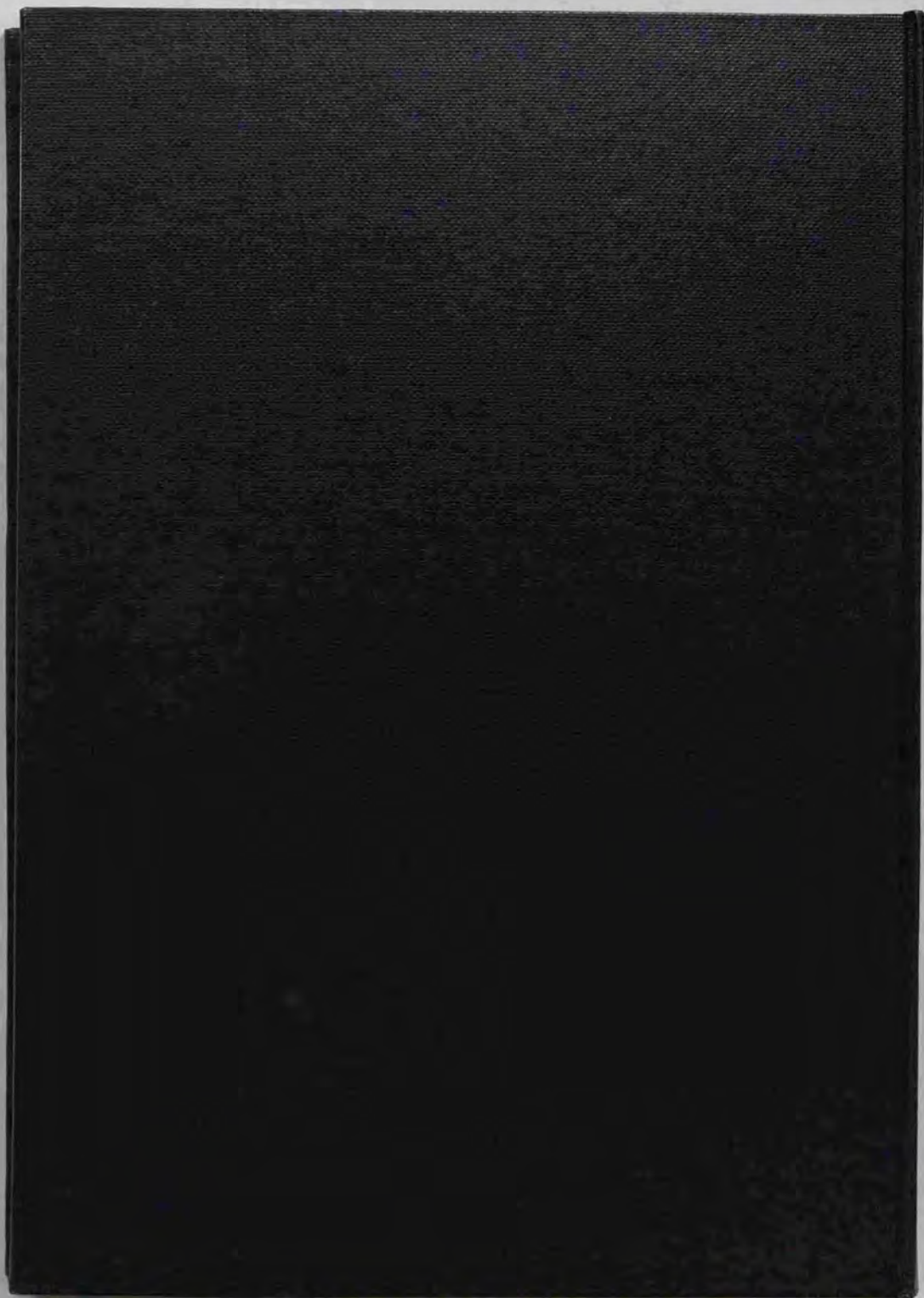
公私にわたって暖かいご指導とご援助を賜りました東京大学先端科学技術研究センター 佐々木聡 助手、同客員研究員 松川律子 博士、同客員研究員 増地矢恵子 博士、小林慶子 技官、加藤信子氏、井上由利子氏、和田知恵氏に心より感謝申し上げます。

本研究の実験及び解析にご指導とご援助を賜りました日本学術振興会外国人特別研究員 Scott J. McNiven 博士、Alexandre E. Rachkov 博士、Soo-Hwan Cheong 博士、Raphael Levi 博士、Sergey A. Piletsky 博士、シュツットガルト大学 Uwe T. Bornscheuer 博士、広島市立大学 松井淳 助手、東京大学 中桐武志氏、田邊康一郎氏、池弘錫氏、東京理科大学 吉武宏氏に心から感謝申し上げます。

常に暖かく見守って下さり、ご支援を頂きました東京大学先端科学技術研究センター 軽部研究室の皆様方に深謝致します。

いつも応援してくれた都城市の家族に感謝します。

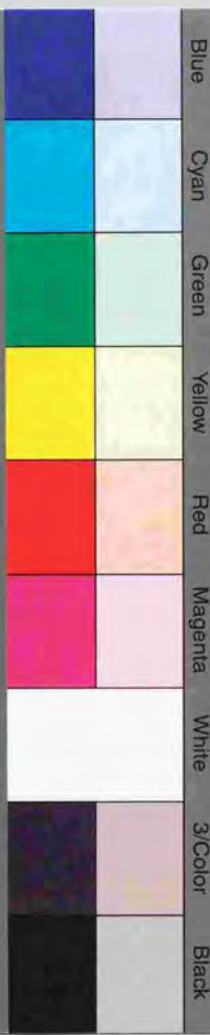
最後に、いつも心の支えになり励ましてくれた妻 清子、長女 清美に感謝します。



inches 1 2 3 4 5 6 7 8 9
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

