

論文内容の要旨

論文題目 プローブ型 SPR (Surface Plasmon Resonance) センサーの開発

氏名 秋元卓央

近年、生物素子を巧みに利用したバイオセンサーの開発が盛んである。バイオセンサーとは、環境中や生体中に含まれる特定の物質を、生体物質を利用して特異的に検出する装置である。

バイオセンサーに用いられる代表的な生体物質としては、酵素や微生物、抗体が挙げられる。現在、酵素と微生物を利用したバイオセンサーは市販化され、広く一般社会で利用されている。生体物質である抗体は、酵素や微生物に比較して、タンパク質や薬物など様々な物質に対して高い特異性を持つ。したがって抗体を利用するバイオセンサーの利用価値は極めて大きい。しかし、抗体を利用するバイオセンサーはいまだ、一般的に利用されるまでに至っていない。これは、タンパク質の相互作用を機械的に検出することが困難であったことが原因である。

近年、Nylander らの報告を基礎とする表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance :SPR) センサーが市販化された。SPR センサーはタンパク質の相互作用を、タンパク質の標識を必要とせずに直接観測が可能である。このことから、SPR センサーは抗体を利用するバイオセンサーの検出器として注目を集め、現在ではタンパク質や薬物、核酸などが SPR センサーを用いて測定されている。しかし、現在の SPR センサーは高価で大型なため、その利用は一部の研究機関にとどまっている。このことから現在、小型の SPR センサーの開発が活発に行われている。

小型の SPR センサー開発に伴い、Jorgenson らによってプローブ型 SPR センサーが提案され、市販化された。プローブ型 SPR センサーは試料を *in situ* で測定可能であると期待されるため、生化学試験や環境計測において、既存の SPR センサーと比較し、更に広い範囲で応用が可能になると考えられる。しかし、これらの応用が報告された例は少ない。これは市販されたプローブ型 SPR センサーの感度が不十分であることが原因と考えられる。したがって本研究ではそれらの応用に十分対応できる高感度なプローブ型 SPR センサーの開発を目的とした。

第 1 章は緒論であり、SPR センサーの有用性と原理についての知見をまとめた。次いで、プローブ型 SPR センサーの動作原理である共鳴波長測定型 SPR センサーと、一般的な SPR センサーの動作原理である共鳴角度測定型 SPR センサーとの相違についてまとめた。

第 2 章ではプローブ型 SPR センサーの動作原理である、共鳴波長測定型 SPR センサーの基礎的な特性に対する実験と考察をおこなった。

共鳴波長測定型 SPR センサーの測定感度は、光の入射角度に依存することが簡単な理論式から予想される。このため本章ではまず、厳密な理論計算によって測定感度の入射角依存性を見積もった。この結果、小さい入射角度で高感度な測定が可能であることがわかった。

ついで、理論計算の結果を実験によって確認し、また測定感度の入射角依存性を定量的に評価することを試みた。SPR センサーは本来、試料の屈折率を測定する装置である。このため実験では、グリセリンを水に任意の濃度で希釈し、任意の屈折率を持つ液体を作製し、これらを測定対象として実験を行った。この結果、入射角 66 度において、入射角 76 度と比較した場合、試料の屈折率に対して約 7 倍の感度を得ることができた。

しかし、実験装置の光学特性から、光の入射角度は制限される。検討した結果、正確な測定を行うための入射角度の下限は 68 度であることが示された。

第 3 章では共鳴波長測定型 SPR センサーの抗原抗体反応に対する測定感度を実験的に調べた。本研究では、タンパク質相互作用を SPR センサーの測定対象としている。しかし、タンパク質の相互作用に伴う屈折率の変動は明らかになっていない。このため、抗原抗体反応に対する感度は理論計算からは推測できない。したがって、ウシ血清アルブミンをセンサー表面に固定化し、抗ウシ血清アルブミン抗体を測定対象物質として実験を行い、その測定感度を推測した。また、得られた感度の光の入射角度依存性について検討した。

実験の結果、入射角 68 度において、入射角 76 度と比較した場合、測定感度が約 3 倍という結

果を得た。また検出下限も入射角 76 度と比較した場合 1/10 倍という結果を得た。

ついで、共鳴波長測定型 SPR センサーの測定感度を共鳴角度測定型 SPR センサーの測定感度と比較することを試みた。このため、上で述べた実験と同様の実験を、共鳴角度測定型 SPR センサーを用いて行った。得られた感度を、種々の入射角度で得られた共鳴波長測定型 SPR センサーと比較し、共鳴角度測定型 SPR センサーと同等の感度を持つために必要な波長読み取り精度を算出した。この結果、入射角 68 度においては 10^2 nm オーダーの波長読み取り精度が必要であることが示された。

第 4 章では、第 2、3 章の結果を踏まえて光の入射角を 68 度と決定し、プローブ型 SPR センサーを作製した。作製したプローブ型 SPR センサーは直径 3 mm、長さ 15 mm であった。

作製したプローブ型 SPR センサーを用いて、屈折率に対する測定感度と抗原抗体反応に対する測定感度を実験によって調べた。この結果、屈折率に対する測定感度は理論計算と良く一致し、また、抗原抗体反応に対する感度は第 3 章で得られた知見と一致した。これらの結果から、作製したプローブ型 SPR センサーは、第 2、3 章の結果を良く反映していることがわかった。

ついで、作製したプローブ型 SPR センサーの試料の屈折率に対する感度を Jorgenson らの報告したプローブ型 SPR センサーと比較した。この結果、本研究で作製したプローブ型 SPR センサーの測定感度は Jorgenson らのセンサーと比較し約 7 倍の測定感度を持つことがわかった。

また、これまでに報告されたプローブ型 SPR センサーと同じものを作製し、比較実験を行った。この結果、本研究で作製したプローブ型 SPR センサーの方が SPR の強い吸収を示すことが観測された。すなわち、本研究で作製したプローブ型 SPR センサーの方が安定した SPR の信号を与えることが確認された。

以上の知見より、本研究で作製したプローブ型 SPR センサーは、現在報告されているすべてのプローブ型 SPR センサーよりも、高い測定感度を持ちまた、安定した信号を与えることがわかった。

第 5 章では、プローブ型 SPR センサーをより *in situ* 測定に適するセンサーへと改良するために、差動式のプローブ型 SPR センサーの開発を試みた。差動式プローブ型 SPR センサーは、同一のセンサープローブ上に抗体を固定化したセンサー面と固定化していないセンサー面を作製し、それぞれの測定結果を差し引くことにより抗原抗体反応のみを検出する。本研究ではセンサープローブ上に、プラズマ重合を用いて膜厚の異なる誘電体層を設けることで、差動式のプローブ

ブ型 SPR センサーの開発を実現した。

差動式プローブ型 SPR センサーの開発により、従来必要とされていた測定毎のベースラインの決定が不必要となり測定の迅速化及び簡便性が向上した。また、非特異的吸着による測定精度の低下を抑えることが可能となった。

第6章は結論であり、本研究で得られた結果をまとめた。