

# ポータブル型マルチチャンネル表面プラズモン共鳴 センサーの開発及びその応用に関する研究

戦, 捷

<https://hdl.handle.net/2324/1807000>

---

出版情報 : 九州大学, 2016, 博士 (工学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

博士論文

ポータブル型マルチチャンネル表面プラズモン共鳴センサーの開発及びその応用に関する研究

九州大学大学院 工学府 化学システム工学専攻

戦 捷

## 目次

### 第1章 緒言

1.1 本論文の背景	1
1.2 表面プラズモン(SPR)センサーの原理	3
1.3 マルチチャンネル型 SPR センサーの開発の歴史と現状	11
1.4 本研究の目的	18

### 第2章 リニア CCD センサーを検出器とするマルチチャンネル型センサーシステムの開発

2.1 緒言	24
2.2 実験	25
2.2.1 試薬と材料	25
2.2.2 リニア CCD センサーを検出器とするマルチチャンネル型 SPR センサーの光学系と応答原理	25
2.2.3 SPR センサーの性能評価	29
2.2.3.1 水及びスクロース溶液に対する SPR センサーの応答性	29
2.2.3.2 SPR センサーの安定性	30
2.2.3.3 CCD センサーのピクセルの数とノイズの関係	30
2.2.3.4 30 個のセンシングストライプを持つセンサーチップの作製	30
2.2.3.5 SPR センサーの応答性に及ぼす CCD センサーの位置の影響及びスクロース溶液による検出精度の評価	33
2.3 結果と考察	34
2.3.1 水及びスクロース溶液に対する SPR センサーの応答性	34

2.3.2 SPR センサーの安定性	38
2.3.3 ピクセルの数とノイズの関係	39
2.3.4 イオンシャワーエッチング法及び Cr 蒸着法によるセンサーチップの作製とその SPR センサーへの適用性	44
2.3.5 SPR センサーの応答性に及ぼす CCD センサーの位置の影響及びスクロース溶液による検出精度の評価	50
2.4 結論	58
第3章 パターン化した抗体固定化 SPR センサーチップの開発とそれによる IgA 及び IgG のイムノアッセイ法への応用	
3.1 序論	61
3.2 実験	62
3.2.1 試薬と材料	62
3.2.2 8 チャンネルのセンサーチップの作製及びスクロース溶液によるその精度評価	63
3.2.3 パターン化した抗体固定化 SPR センサーチップの作製	64
3.2.4 IgA 及び IgG 単独溶液によるセンサーチップのパターン化の確認	69
3.2.5 IgA 及び IgG の二成分同時イムノアッセイ	70
3.3 結果と考察	70
3.3.1 8 チャンネルのセンサーチップの作製法の検討とスクロース溶液による性能評価	71
3.3.2 IgA 及び IgG 単独溶液によるセンサーチップのパターン化の確認	72
3.3.3 IgA 及び IgG の二成分同時イムノアッセイ	74

3.4 結論	82
第4章 三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を利用するボトムアップ表面修飾法による SPR センサーチップ作製法の開発	
4.1 緒言	85
4.2 実験	86
4.2.1 試薬と材料	86
4.2.2 三員性三角錐型 DNA ナノ会合体の調製	87
4.2.3 三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を利用する抗体固定化センサーチップの作製とそれによる IgA の SPR 測定	88
4.2.4 QCM によるセンサーチップ作製過程における修飾物質の結合量の評価	89
4.3 結果と考察	90
4.3.1 三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を利用して作製した抗体固定化したセンサーチップによる IgA の SPR 測定	90
4.3.2 QCM によるセンサーチップ作製過程における修飾物質の結合量の評価	93
4.4 結論	97
第5章 結言	99

## 第1章 緒言

### 1.1 本論文の背景

表面プラズモン共鳴(SPR)センサーは、表面プラズモン共鳴現象を利用するセンサーである。表面プラズモン共鳴現象は金属表面から 100 nm の領域に起こった屈折率の変化に対して高感度に応答できるため、SPR センサーは金属表面近傍における媒質の屈折率(誘電率)の変化を高感度、リアルタイムに検出することができる。したがって、SPR センサーは金属表面で起こる分子間相互作用に伴う屈折率の変化を検出するため、蛍光標識などのプロセスが不要であり、迅速でラベルフリーな測定が可能である。

これらの SPR センサーの特長から、SPR センサーは、化学物質の検出、化学物質の検出への利用が 1980 年代初めに報告されて以来<sup>1)</sup>、環境分析<sup>2)</sup>、食品安全<sup>3)</sup>及び臨床検査薬<sup>4)</sup>に幅広く利用されている。特に、SPR センサーはラベルフリーな測定が可能であるため、イムノアッセイ法で用いられる。ELISA 法と比べ、酵素の標識が不要であり、煩雑は実験手順を省くことができ<sup>5)</sup>、オンサイト測定での活躍が期待できる。更に、近年、途上国の急速の発展により生じた環境問題、食品安全問題から鳥インフルエンザの蔓延、エボラ出血熱の広い範囲での感染に至る身近な問題から、オンサイト測定可能な小型、高感度且つ高効率の SPR センサーが各環境、医療、研究など各分野から要求されている。そこで、これらの要求を応えるため、高い感度を持つマルチチャンネル SPR センサーの開発に関する研究が盛んに行われている。その中で、従来のクレチッマン配置に基づいた SPR イメージングセンサーが設計され、二次元 CCD センサーまたは CMOS センサーを検出器として、反射光を検出することによって、多サンプルの同時測定が実現された<sup>6-9)</sup>。このような配置に基づいた SPR イメージングセンサーは 120 サンプルの同時測定が実現できたという報告もある<sup>10)</sup>。また、SPR センサーの小型化を目指し、クレチッマン配置の代わりに、グレーティング配置を用いて多チャンネル SPR センサーが設計された<sup>11-14)</sup>。クレチッマン配置の SPR イメージングセンサーと同じように、二次元の CCD センサーまたは

CMOS センサーを検出器とした。これらの報告により、設計された SPR センサーの精度は  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  RIU に達した。しかしながら、二次元 CCD センサーまたは CMOS センサーは高価であり、コストの面から、安価の検出器を用いることにより、SPR センサーの値段を下げ、汎用性を拡大することができる。更に、グレーティン配置では、センサーチップの作製はクレチツマン型 SPR センサーのセンサーチップと比べ、グレーティング作製には手間がかかっており、またそのコストが高価である。従って、本研究では、安価なリニア CCD センサーを検出器とするクレチツマン配置の SPR センサーを設計し、その高性能化を目標としている。

従来、マルチチャンネル SPR センサーの測定システムに使用したセンサーチップは概ね二種類である。その一つは一枚の金薄膜をカバーガラスなどに蒸着したセンサーチップをチャンネルの持つフローセルにセットする方法である<sup>15-19)</sup>。この方法の特徴は作製プロセスが簡単であり、高価な作製装置は不要である。しかし、この方法はチャンネルと同じ数の入出口、送液チューブ、インジェクター及び送液のためのシリンジポンプが必要である。これは、測定システム全体の大型化の原因になる。もう一つの作製法にはマイクロポッターを用いて作製する方法がある。この作製法はフローセルにセットする前に、センサーチップを修飾するため、多数の送液チューブ、インジェクター、シリンジポンプが不要であり、測定システムの大型化が避けられる。しかし、マイクロポッター装置が大型で高価であり、作製したセンサーは長く保存できないのは欠点である。従って、安価でオンサイトにセンサーチップの作製法の開発が必要である。

SPR センサーでイムノアッセイを行う際、測定対象を認識して相互作用する抗体の配向性や密度はセンサーの性能に大きな影響を及ぼす。現在、主に使われている方法として、カルボキシル基を持つチオールを金基板にジスルフィド結合により結合し、カルボキシル基を抗体にあるアミンと反応させ、ペプチドを形成することによって、抗体を固定する方法である<sup>20,21)</sup>。しかし、この方法では、チオールは直接に金基板に結合し、直鎖状のコンフォメーションをとつ

て、お互いにある隙間を埋めるような配向するため、飽和吸収が基本であり、固定化量のコントロールができない。従って、本研究では、ホスホロチオエステル化プローブを用いた DNA ナノ構造体を作製し、SPR への応用することも目標の一つとした。

## 1.2 表面プラズモン共鳴(SPR)センサーの原理

### 表面プラズモン

金属は自由電子固体と呼ばれ、その中は電子が自由に走り回ることができる。しかし、電子は互いに反発しあうため、あまり密に集中することはできない。よって、電子は金属の中である固定した位置で見ると、密度が時間的に振動する波のような集団運動を起こすことで、金属全体内における偏りを解消する。このような波の事をプラズマ波と言う。プラズモンとはプラズマ波の振動数(プラズマ振動数)を量子化して考える際の用語であり、表面プラズモンとは金属の表面を走るプラズモンの事を指す。なお、金、銀、アルミニウムのプラズマ振動数はそれぞれ 2.4、3.9、15.8eV 程度であり、銀の場合は紫外光に対応する。

### エバネッセント波

表面プラズモンとは電荷密度の集団的勾配のことである。この電荷密度の勾配は電場を発生させ、振動は電波を発生させる。表面プラズモンの振動数が高ければ高いほど、電波は光の領域となる。ただし、この光は金属の表面を走るだけで、外部には伝わらない。このような光(表面波)をエバネッセント波という。

### 表面プラズモン共鳴

波は振動数( $f$ )と波数( $k$ )の間に以下のような関係を持つ。

$$v = \frac{2\pi f}{k} = \frac{\omega}{k_{light}} \quad (1)$$



この式を分散関数と言う。vは速度を、 $\omega$ は各周波数を示す。

ここで、光の分散曲線は真空中の光速が  $c=3\times 10^8$  m/s で一定であるので、Fig.1.1 のような分散曲線が得られる。また表面プラズモンの分散曲線はセンシング層の屈折率  $n_s$ 、金属の誘電率  $\epsilon_m$  を用いて以下のようにあらわされる。

$$k_0 = \frac{\omega}{c} \left[ \frac{\epsilon_m \cdot n_s^2}{\epsilon_m + n_s^2} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

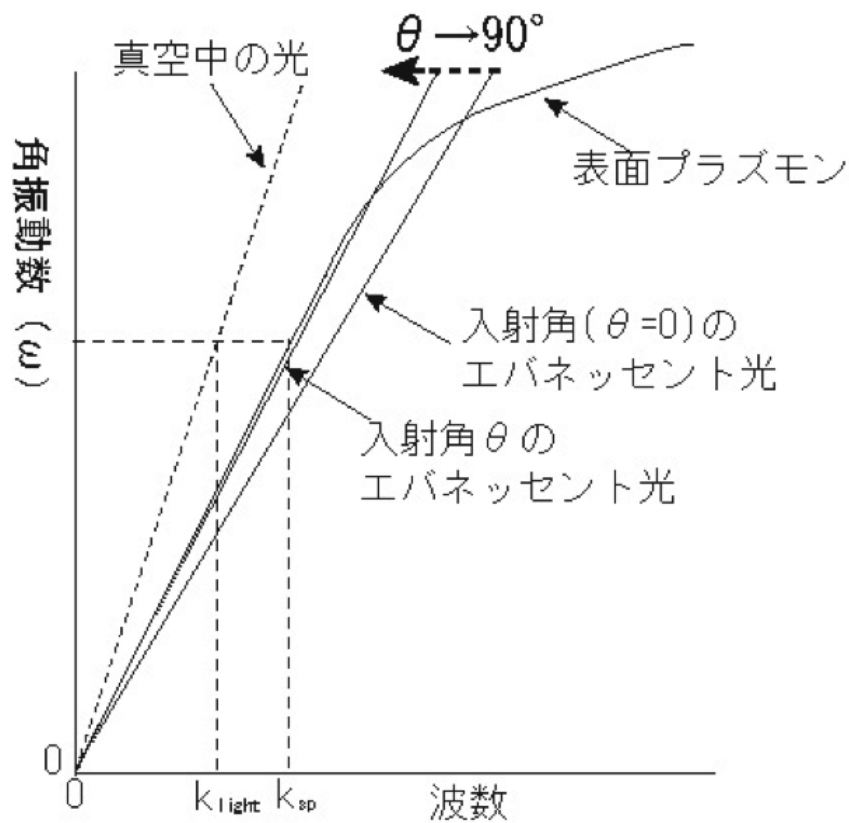


Fig. 1.1 表面プラズモンと SPR 現象に関する分散曲線。

この二つを図示すると二つの分散曲線が交わらず、実際に光波の進む速度とプラズマ波の進む速度が異なるため、プラズモン共鳴を起こすことができない。よって、単純に金属に光を当てただけでは表面プラズモン共鳴は起こらない。

光で表面プラズモン共鳴を起こすためには、光よりも遅い速度で伝播する光が必要である。この光は全反射によって発生させることができる。全反射の際、境界面で電場は不連続になることはできないため、境界面から離れるに従って

その振幅が減衰するエバネッセント波を発生させる。このエバネッセント波は境界面に沿った速度が光よりも遅く波数が大きいいため、表面プラズモンを共鳴させることができる。

式(2)に示したように、表面プラズモンの分散曲線は金属の誘電率  $\epsilon_m$  と誘電体の誘電率  $\epsilon_d$  の両方で決まる。金属として金を使用しているため誘電率は一定とみなすと、分散曲線は金属に接する物質の誘電率  $\epsilon_s = n_s^2$  によって変化する。この時  $n_s$  は金属に接する物質の屈折率を示す。

全反射条件を満たす範囲でプリズムへの入射角を変化させると、エバネッセント波の境界に沿って進む方向の波数成分  $k_{ev}(\omega)$  は入射角  $\theta$ 、プリズムの屈折率  $n_s$  を用いて以下の式のように表される。

$$k_{ev}(\omega) = n_2 k_{light}(\omega) \sin \theta \quad (3)$$

この  $k_{ev}(\omega)$  が表面プラズモンの波数  $k_{sp}(\omega)$  と一致した時、共鳴がおきる。

$$k_{ev}(\omega) = k_{sp}(\omega) \quad (4)$$

この時の角度を共鳴角といい、共鳴角  $\theta$  は式(1)~(4)より、

$$\theta = \sin^{-1} \left[ \frac{1}{n_2} \sqrt{\frac{\epsilon_m(\omega)\epsilon_s(\omega)}{\epsilon_m(\omega)+\epsilon_s(\omega)}} \right] \quad (5)$$

と表される。SPR が生じると光のエネルギーは金属内の自由電子と結合し、金属に吸収されてしまうため、全反射角であるにもかかわらず、反射光が減衰する現象が観測される。また、式(5)から、共鳴角度  $\theta$  はサンプル試料の誘電率だけに依存して変化する。つまり、金属表面における誘電率が変化する場合、共鳴角  $\theta$  も変化する。また、金属表面におけるサンプル試料の屈折率変化による PR 曲線を Fig. 1.2 に示している。

(算出プログラム：<http://unicorn.ps.uci.edu/calculations/fresnel/fcform.html>)

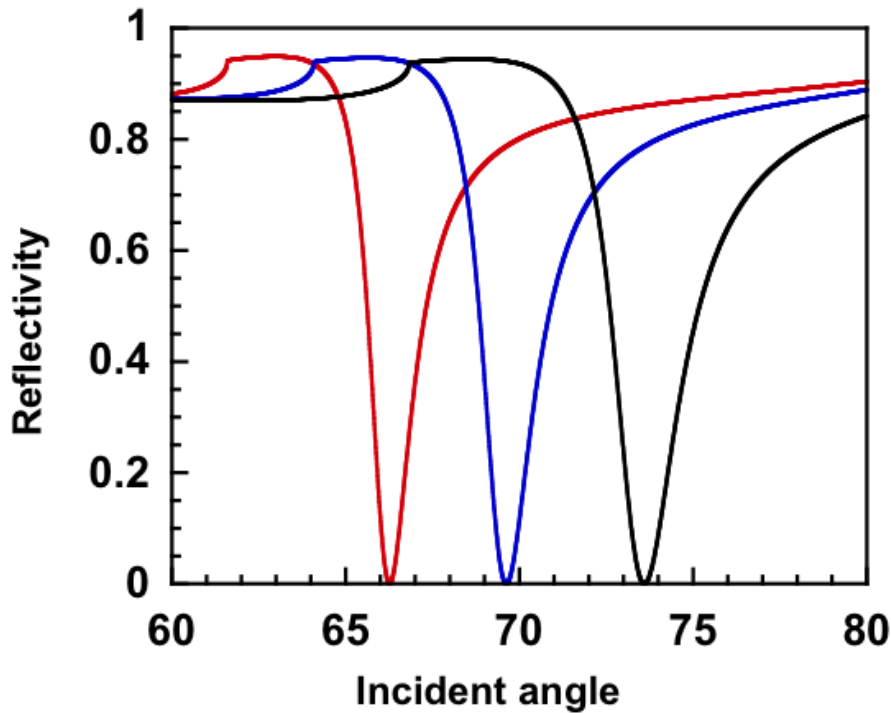


Fig. 1.2 サンプル試料の屈折率変化による SPR 曲線 (励起光波長: 770 nm, プリズム: BK7, Au 薄膜厚さ: 45 nm, サンプル試料の屈折率: 1.33(赤い線)、1.36(青い線)、1.39(黒い線))。

### 金属・偏光の影響

表面プラズモンの波数  $k_{sp}$  は被測定物質の誘電率  $\epsilon_s$  に加えて、金属の誘電率  $\epsilon_m$  の影響も受ける。よって、金属は元素の種類によって特有の誘電率を持つので、使用する金属によって、鏡面プラズモン共鳴の反射角度分布は変化する。例として、Fig. 1.3 はアルミニウムと銀の入射角に対する反射率角度分布である。図より明らかにアルミニウムより銀の方が共鳴角のピークも十分に鋭く、表面プラズモン共鳴に適している事がわかる。実際に銀は金属の中で最も適した金属であり、次いでアルミニウムとなっている。この 2 種類の金属以外に可視～近赤外領域で測定することのできる金属はない。

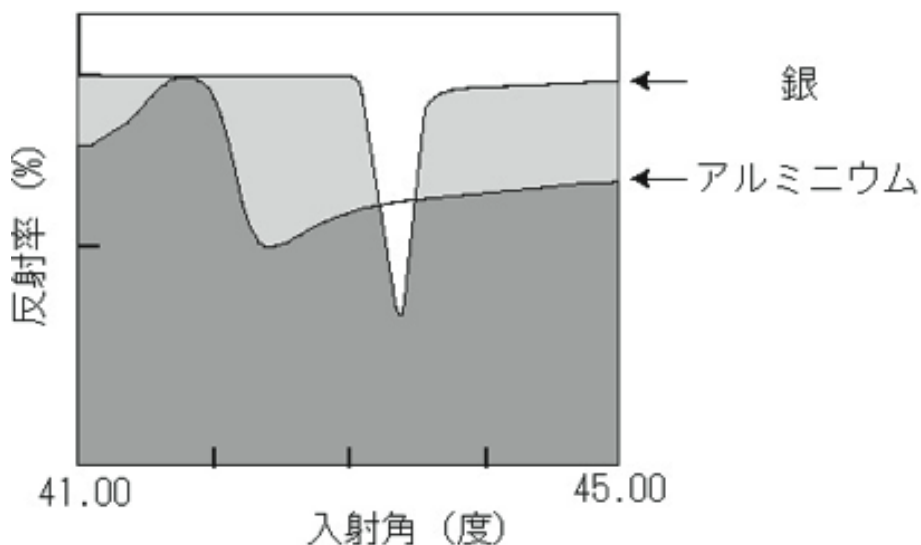


Fig.1.3 銀とアルミニウムに対する反射率角度分布。

光は水面波のような横波であり、P 偏光と S 偏光が存在する。その中で、実際に紙面内に振動する成分である P 偏光のみが表面プラズモンを共鳴させることができる。

### SPR センサーシステムの構成

SPR センサーは一つの光学系、溶液を SPR センサーチップに送る送液システム、センサーチップ上に設置された溶液保持のためのフローセル、及び得られたデータを解析するコンピューターシステムから構成されている。また、そのイメージは Fig. 1.4 に示している。更に、送液システムは SPR センサーシステム全体の大きさ、試料溶液の測定スループットに影響を及ぼしている。

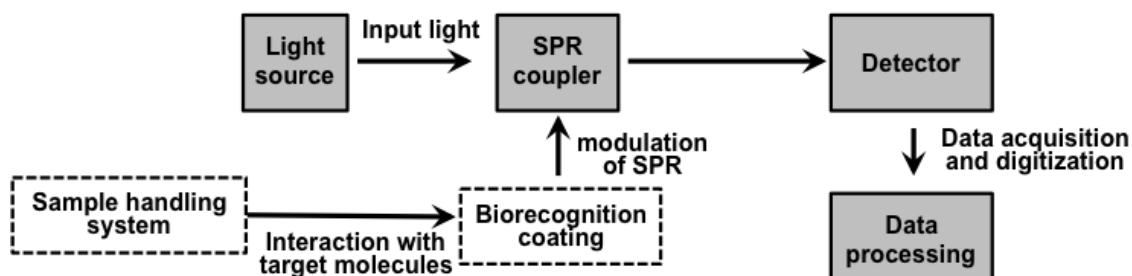


Fig. 1.4 SPR センサーシステム構成のスキーム図<sup>22)</sup>。

### SPR センサーに用いるモジュレーション方式

SPR センサーの光学系では、表面プラズモンが特定の角度で入射された光により励起され、また、励起により、反射光のある特性が変わる。この特性の変化をモジュレーションされ、SPR センサーの出力として応用されている。また、Fig. 1.5 に示しているモジュレーションの方式は現在主に使われているモジュレーション方式である。

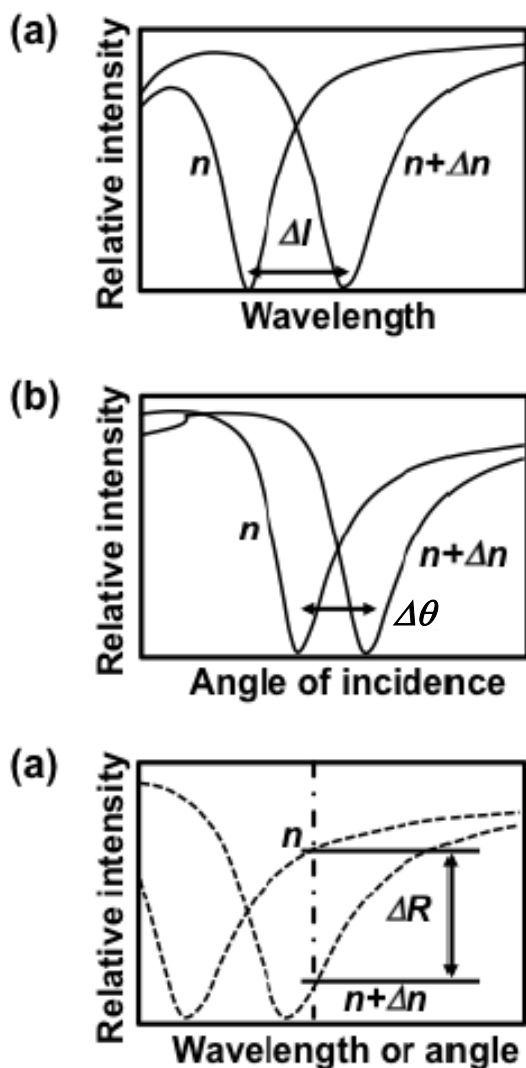


Fig. 1.5 SPR センサー測定時に使用する主なモジュレーション方式(a)波長変化 (b)角度変化(c)強度変化。

### 代表的な光学系

SPR センサーの代表的な光学系は三種類ある。プリズムとカップリングしたクレッチマン配置(Fig. 1.6(a))は現在、一番汎用されている配置であり、プリズム

を通して、金属にエバネッセントを生じるのは簡単であり、センサー構成する部品は簡単に入手できるメリットがある。さらに、クレチツマン配置はあらゆるモジュレーション方式に対応できる。

グレーティング配置(Fig. 1.6(b))はクレチツマン配置程汎用されていないが、基板となるグレーティングは転写でアクリルなどのプラスチックで作製できるため、より安価であるメリットがありあらゆるモジュレーション方式に対応できる。

ウェーブガイド配置(Fig. 1.6(c))はクレチツマン配置やグレーティング配置より新しい配置である。この配置は波長または強度二つのモジュレーション方式にしか対応できなく、さらに、コンパクトな小型の部品が必要である。

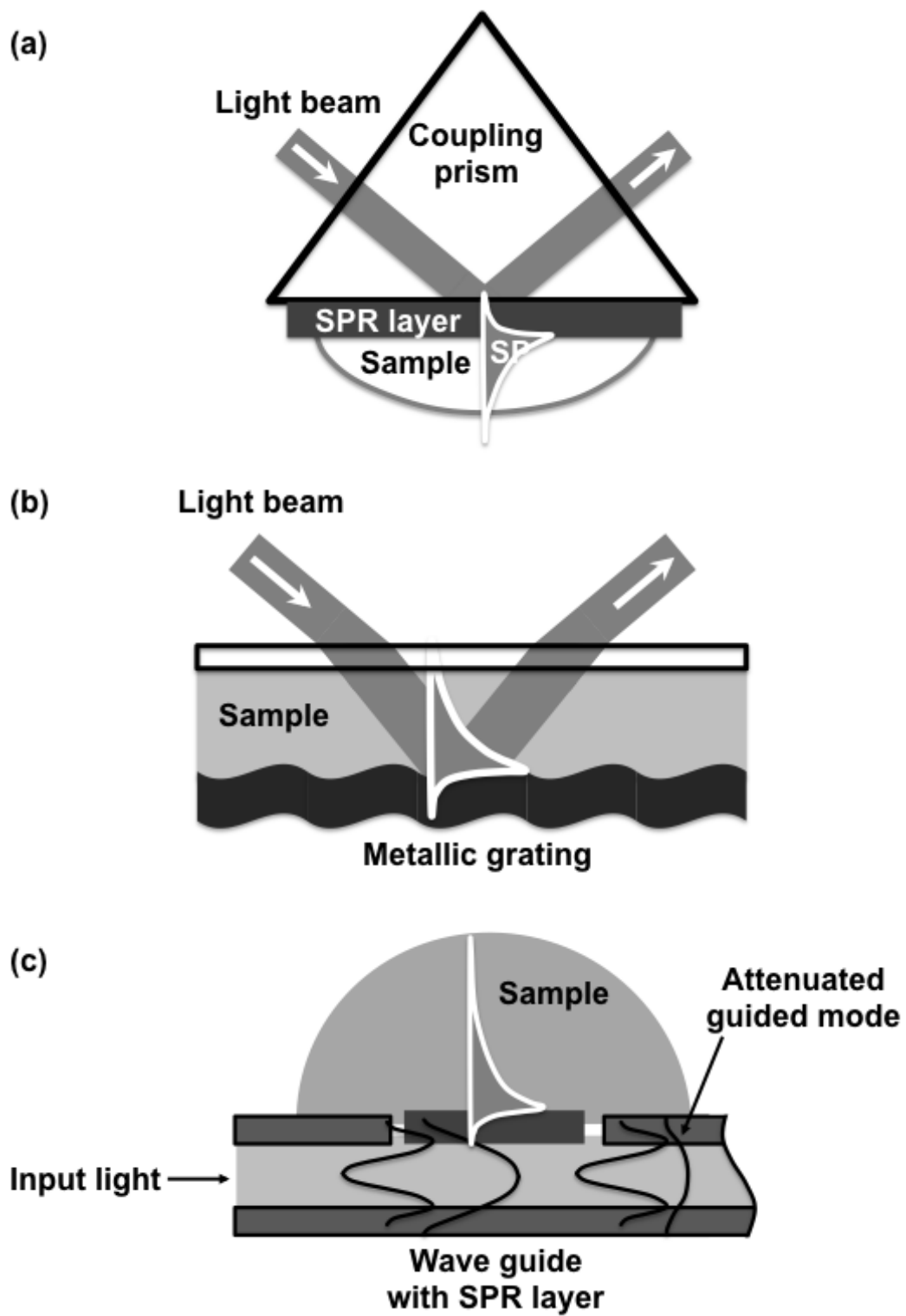


Fig. 1.6 代表的な SPR 光学系 (a)クレチツマン配置、 (b)グレーティング配置及び(c)ウェーブガイド配置。

### 1.3 マルチチャンネル型 SPR センサーの開発の歴史と現状

マルチチャンネル SPR センサーは主にクレチツマン配置またはグレーティング配置である。

#### クレチツマン配置

クレチツマン配置に基づいて設計したマルチチャンネル SPR センサーは多く報告されている。1990 年代、検出限界は  $2 \times 10^{-6}$  RIU の角度変化で測定を行うモデルが報告された<sup>23-25)</sup>。この SPR センサーは Fig. 1.7 に示すように、LED 光源 (760 nm)、ガラスプリズム、及び検出器アレイから構成されている。LED からでは光はコリメタレンズによって平行になり、さらにシリンドリカルレンズによって一直線に絞られた。線状の光はプリズムを通過し、センサーチップの背面に照射した。イメージング部分は一つのイメージングレンズ及び一つのシリンドリカルレンズから構成されており、これらのレンズにより、センサーチップ上のチャンネルから反射した光の角度スペクトルがそれぞれの検出器に到達し、検出される。この SPR センサーはその後、Biacore により検出限度が  $10^{-7}$  RIU の多チャンネル市販の SPR センサーに改善された<sup>26-28)</sup>。



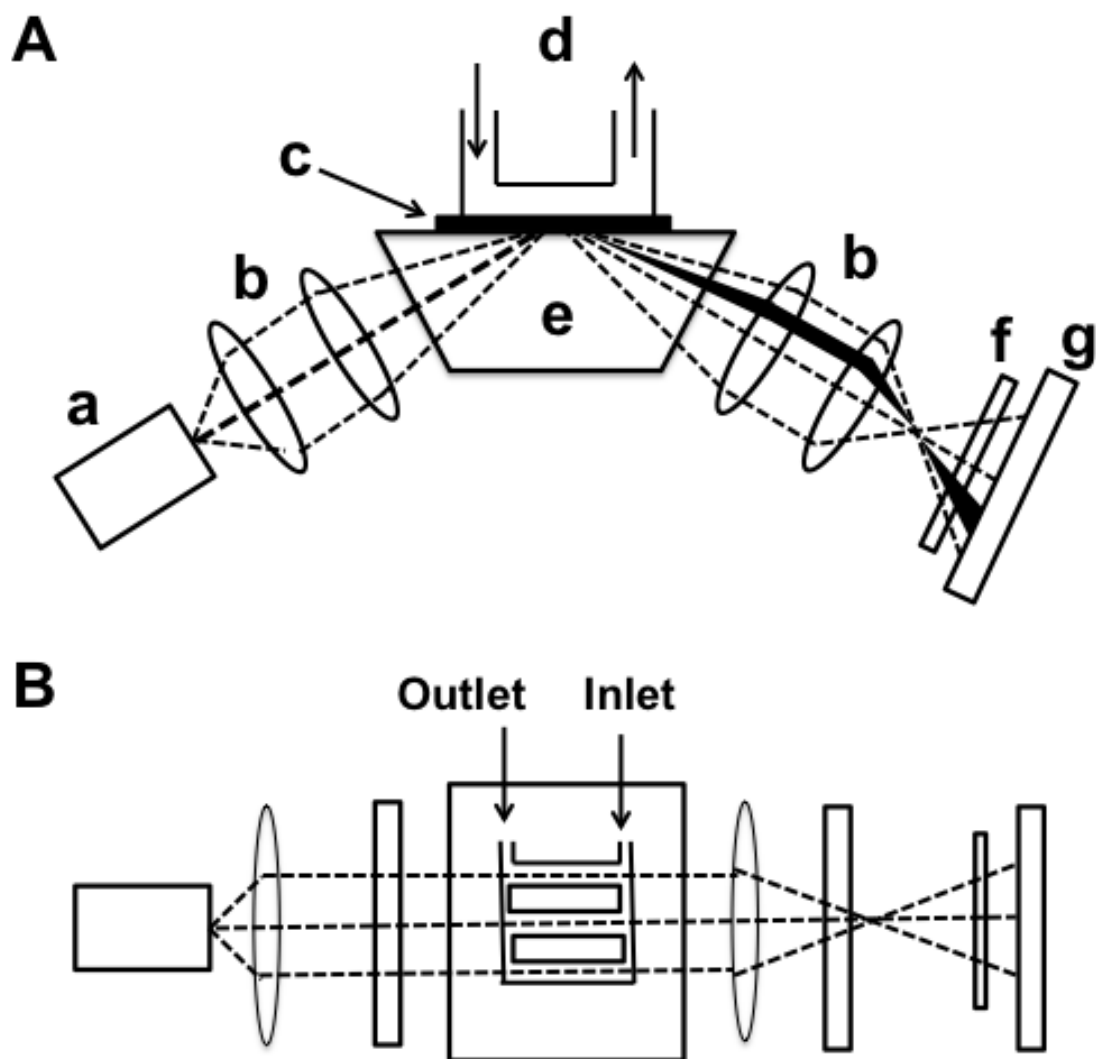


Fig. 1.7 三つの平行するチャンネルを持つ角度変化により検出を行う SPR センサー (A:側面図、B: 上面図) (a: LED、 b:レンズ、 c:センサーチップ、 d:マイクロ流路カートリッジ、 e:プリズム、 f:偏光子、 g:フォトダイオードアレイ)

一方、Homola *et al.*は波長変化の検出により測定を行う SPR センサーを開発した<sup>29-31)</sup>。Fig. 1.8 に示すように、白色光を出すハロゲンランプ、SPR センサープラットフォーム及びスペクトルメーターから構成されている。ハロゲンランプから出た白色光はマルチモード光ファイバーにより SPR プラットホームにもたらされる。また、SPR プラットホームは光束径を持つ光束を形成するインพุットコリメタレンズ、ガラスプリズム、センサーチップ、偏光子及びマルチチャンネルアウトプットコリメタレンズにより構成される。また、アウトプットコリ

メタレンズは反射光をスペクトルメーターにつながる光ファイバーと連結されている。この SPR センサーは  $1.5 \times 10^3 \text{ nm}$  の波長変化を検出でき、これはセンサー精度の  $7500 \text{ nm RIU}^{-1}$  に相当し、屈折率の  $2 \times 10^{-7} \text{ RIU}$  に相当する<sup>32)</sup>。さらに、検出部位を増やすため、波長分配多重化(WDM)アプローチが報告された<sup>33,34)</sup>。このアプローチにおいて、センサーチップの異なる部位のプラズモンから励起されたシグナルは光波のスペクトルの異なる範囲に記録される。

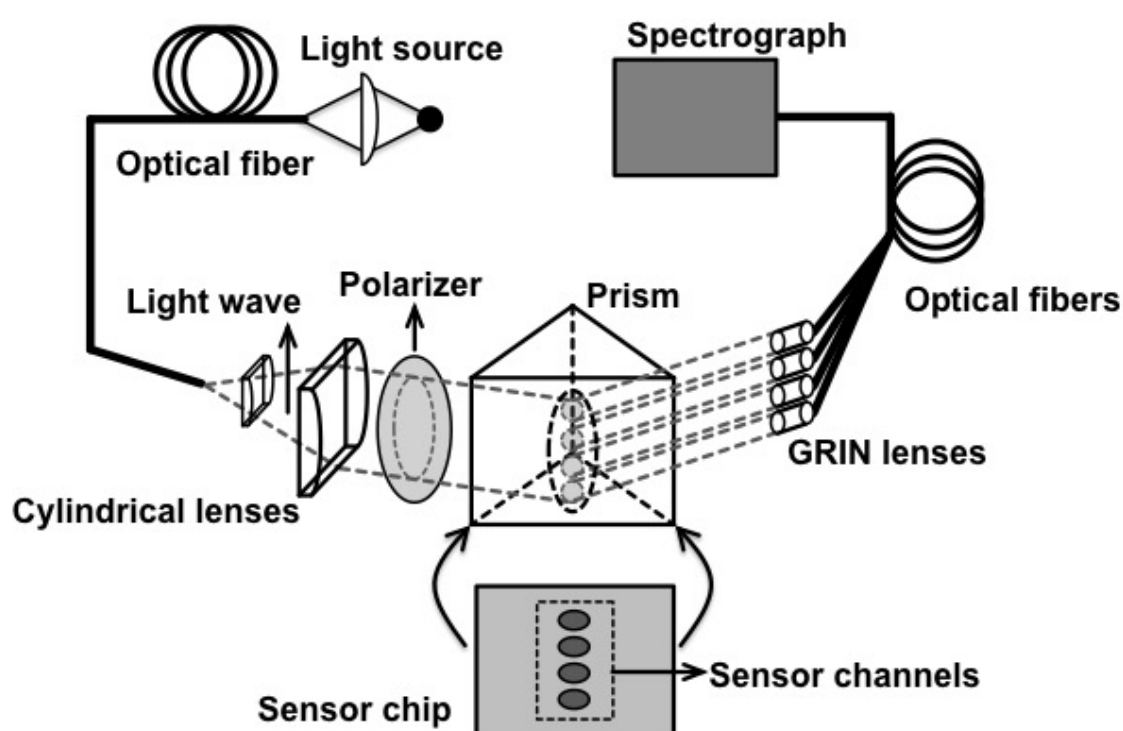
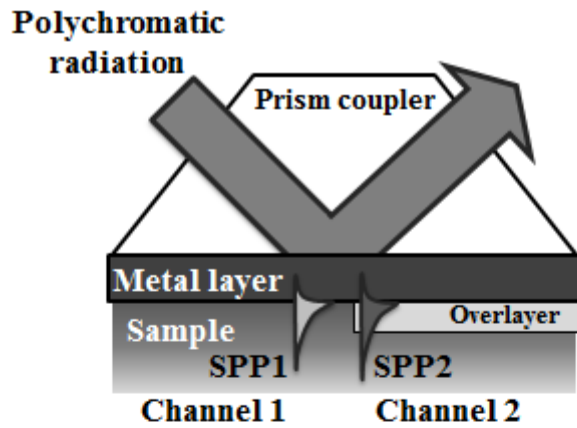


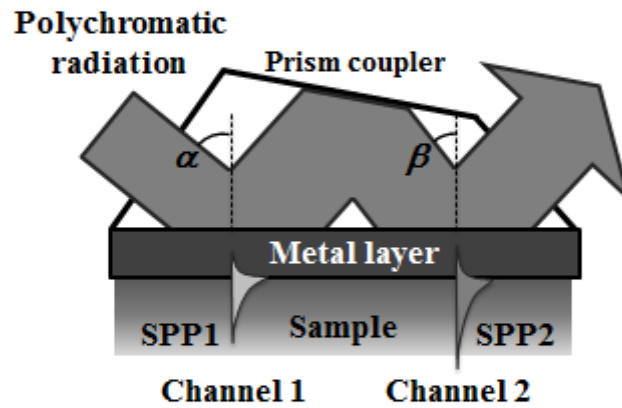
Fig. 1.8 4 チャンネルを持ち、波長変化によって測定荒れる SPR センサーの光学系。

現在、二つのタイプの WDMSPR のコンフィギュレーションが発表された。一つは Fig. 1.9(a)に示されたように、多色光の広い平行ビームを一部が絶縁体(酸化チタン)をコーティングした金薄膜から構成されたセンシング表面に入射させた。金と比較して、絶縁体薄膜における共鳴波長は長波長側にシフトする。そのため、絶縁体がコーティングされた部分と絶縁体がコーティングされていない金基板のみの部分から、二つの共鳴曲線が反射光の検出から得られる。また、も

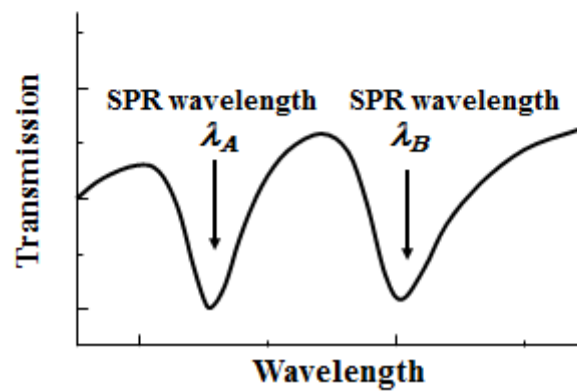
う一つのコンフィギュレーションは Fig. 1.9(b)に示しているように、一つの特  
殊のプリズムが用いられている。多色光はプリズムを通過し、センサーチップに  
照射し、また反射される。さらに、この反射光はプリズムより反射され、再び  
違う入射角度でセンサーチップの表面に入射する。入射角度の違いにより、そ  
れぞれの入射光が当たる WDM チャンネルに示している Channel1 と Channel2 は  
異なる共鳴波長を示す(Fig. 1.9(c))。このようなアプローチを用いて、8 チャン  
ネルの SPR センサーが開発された<sup>33)</sup>。二つの WDM チャンネルの屈折率感度はそ  
れぞれ  $2710 \text{ nm RIU}^{-1}$ 、 $8500 \text{ nm RIU}^{-1}$  であり、屈折率分解能の  $1.3 \times 10^{-6} \text{ RIU}$ 、 $7 \times$   
 $10^{-7} \text{ RIU}$  に相当する。



(a)



(b)



(c)

Fig. 1.9(a)多色光が一部が絶縁体(酸化チタン)をコーティングした金薄膜から構成されたセンシング表面に入射させた場合、(b)特殊なプリズムを利用し、センサーチップに二回照射場合の原理図及び(c)得られた SPR 曲線のイメージ図。

また、最初のクレッチマン配置の SPR センサーは 1980 年代に設計した反射光強度を検出するセンサーであった<sup>35)</sup>。さらに、このモジュレーションアプローチで作製した SPR センサーはその後、空間分解測定に用いられ、最初の空間分解能を持つ SPR センサーは SPR イメージングセンサーであった<sup>36,37)</sup>。SPR イメージングでは、単色の平行光はプリズムを通して、共鳴角度と近い角度でセンサーチップに照射し、エバネッセント波を励起する。反射光の強度はエバネッセントはと表面プラズモンのカップリングの強さに依存し、センサーチップ表面に起こる屈折率の変化をモニターできる。このようなアプローチは 100 個以上のセンシングエリアを持つ SPR センサーに対応できる<sup>38-40)</sup>。

さらに、近年、安価で小型の SPR センサーの研究開発は脚光を浴びている。それを実現するため、従来の 1 本の光束をセンサーチップに照射する代わりに、一本の入射光ビームを複数に分ける考え方があった。Hemmi らは Fig. 1.10 に示すような方法で一本のレーザービームを 9 本に分け 9 本の入射光を作り、クレッチマン配置に基づいて 9 個のセンシングポイントを持つ SPR センサーを設計している。この方法では、一本のレーザービームをまず、一次マルチビームスプリッターによって、3 本のレーザーに分け、さらに、二次マルチビームスプリッターによって、9 本のレーザービームに分け、入射光として使用している。

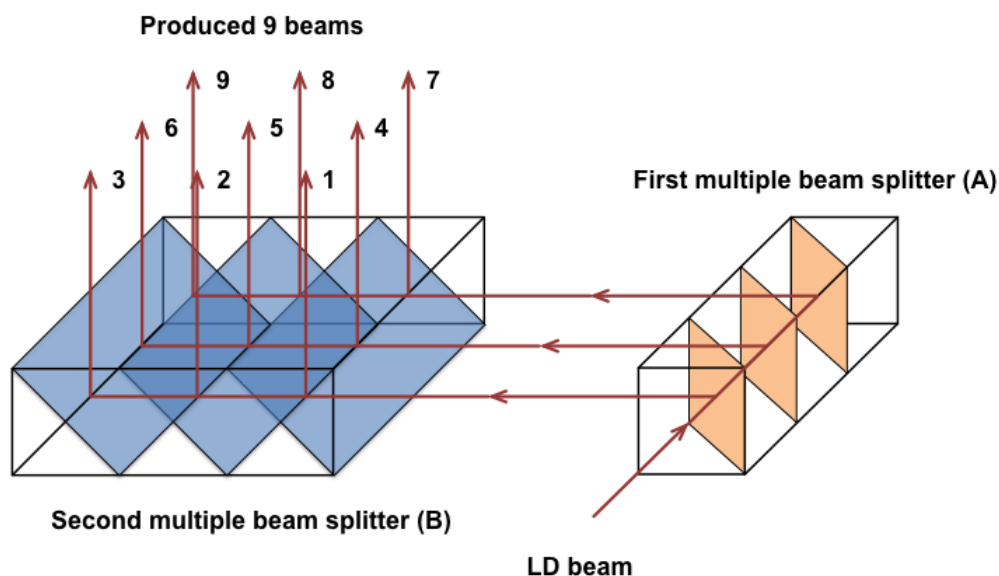


Fig. 1.10 ビームスプリッターにより 9 本の入射光を作るイメージ図。

一方、レーザー光強度が使用するスプリッターの数に増加により弱まるため、Zhang らはシリドリカルレンズアレイを使う方法を提案している<sup>42)</sup>。この光学系では、光源から出た光は凸レンズ、凹レンズ、バンドパスフィルターなどによって、P 偏光のみ隣る平行光に絞られ、さらに、シリドリカルレンズアレイによって、三本の入射光に絞られ、マルチチャンネル SPR センサーの入射光を作っている(Fig. 1.11)。

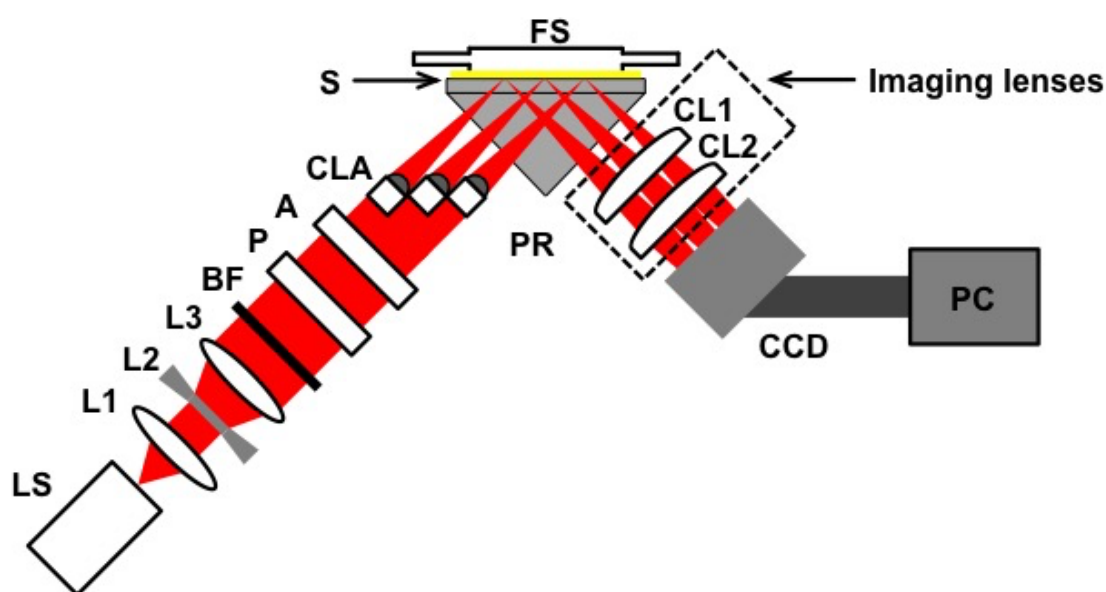


Fig. 1.11 シリドリカルレンズアレイを用いた SPR センサーの原理図。LS:光源、L1: 凸レンズ、L2:凹レンズ、L3: 凸レンズ、L4: バンドパスフィルター、P: 偏光子、A: 矩形開口、CLA:シリドリカルレンズアレイ、PR: プリズム、S: 基板、FS:フローシステム、CL1: シリドリカル凹レンズ、CL2:シリドリカル凸レンズ。

#### グレーティング配置

グレーティング配置はプリズム配置より、安価である。また、プリズムが不要なので、小型の SPR センサーの開発に有利である。Vala らは Fig. 1.12 に示すような光学系を持つ SPR センサーを開発した<sup>43)</sup>。光源から出た 760 nm の光はシリドリカルレンズにより直線状集光され、偏光子より S 偏光をカットした後、

センサーカートリッジに照射する、さらに、センサーチップから反射した光はシリンドリカルレンズなどによって、面状に絞られ、CCD センサーによって検出される。この SPR センサーでは角度変化によって、測定を行う。さらに、グレーティング配置では、多色光を使用する場合、波長変化による検出を行う方法<sup>44)</sup>あり、一方、単色光を使用し、反射光強度を測定する SPR 方法もマルチチャンネル SPR センサーに応用されている。

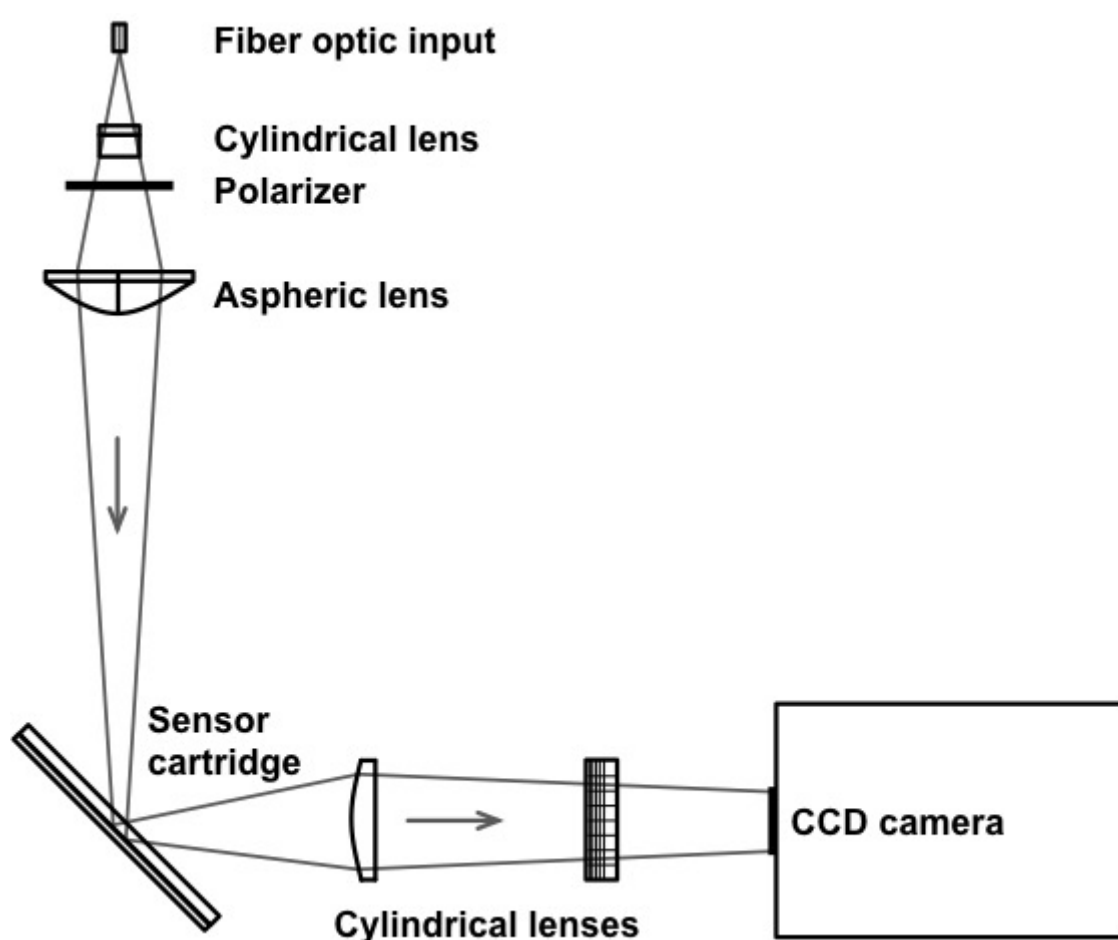


Fig. 1.12 10チャンネルを持つグレーティング型 SPR センサーの光学系。

#### 1.4 本研究の目的

従来のマルチチャンネル SPR センサーシステムはマルチ化するため、検出器として、二次元の CCD センサーもしくは二次元 CMOS センサーを用いている。しかし、これらの素子は高価であり、コストダウンという視点から、さらに安

価な光学系に関する研究が必要である。また、従来のマルチチャンネル SPR センサー測定システムでは数多くのポンプ、バルブ、インジェクターが必要であり、測定システム全体の大型化の原因となる。本研究ではリニア CCD センサーを検出部とする小型マルチチャンネル SPR センサーを設計し、安価で簡単なセンサーチップを作成することによって、測定システムの小型化を目的とする。

本論文は 5 章からなり、第 1 章では先述べたように、マルチチャンネル SPR センサーについて、背景と目的について述べた。また、本章以降は以下の通りである。

第 2 章では、リニア CCD センサーを検出器とするマルチチャンネル SPR センサーを設計し、30 個センシングストライプを持つセンサーチップをクロム蒸着法によって作製し、スクロース水溶液でその検出限界を求めた。

第 3 章では、遠心力を駆動力とし、センサーチップがセットされているディスクを回転することで抗体溶液をチャンネルに送液し、anti-IgA と anti-IgG を交互に固定する方法を提案した。

第 4 章では、三員性三角錐 DNA ナノ会合体を設計し、その SPR への応用を検討した。

第 5 章では、検討した事項に対する結論をまとめた。



## 参考文献

- 1) J. G. Gordon, and S. Ernst, *Surf. Sci.* **1980**, *101*, 499.
- 2) K. V. Gobi, C. Takaoka, and N. Mimura, *Sens. Actuators, B*, **2005**, *108*, 784.
- 3) F. Fernández, K. Hegnerová, M. Piliarik, S. F. Baeza, J. Homala, and M. P. Marco, *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, *26*, 1231.
- 4) J. Ladd, H. Liu, A.D. Taylor, V. Goodell, M. L. Disis, and S. Jiang, *Colloids Surfaces B*, **2009**, *70*, 1.
- 5) J. H. Choi, H. S. Kim, J. W. Choi, J. W. Hong, Y. K. Kim, and B. K. Oh, *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, *49*, 415.
- 6) M. Piliarik, L. Párová, and J. Homola, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 1399.
- 7) T. M. Chinowsky, S. D. Soelberg, P. Baker, N. R. Swanson, P. Kauffman, A. Mactutis, M. S. Grow, R. Atmar, S. S. Yee, and C.E. Furlong, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, *22*, 2268
- 8) C. Puttharugsa, T. WangKam, N. Huangkamhang, O. Gajanandana, O. Himananto, B. Sutapun, R. Amarit, A. Somboonkaew, and T. Srihirin, *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, *26*, 2341.
- 9) F. Bardin, A. Bellemain, G. Roger, and M. Canva, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 2100.
- 10) M. Piliarik, L. Párová, and J. Homola, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 1399.
- 11) M. Piliarik, M. Vala, I. Tichý, and J. Homola, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 3430.
- 12) M. Vala, K. Chadt, M. Piliatik, and J. Homola, *Sens. Actuators, B*, **2010**, *148*, 544.
- 13) F. Fernández, K. Hegnerová, M. Piliarik, and F.S.-Baeza, *Biosens. Bioelectron.*,

- 2010**, *26*, 1231.
- 14) J. Dostálek, and J. Homola, *Sens. Actuators, B*, **2008**, *129*, 303.
  - 15) H. Kawazumi, K. V. Gobi, K. Ogino, H. Maeda, and N. Miura, *Sens. Actuators, B*, **2005**, *108*, 791.
  - 16) S. J. Kim, K. V. Gobi, H. Iwasaka, H. Tanaka, and N. Miura, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, *23*, 701.
  - 17) M. Vala, K. Chadt, M. Piliarik, and J. Homola, *Sens. Actuators, B*, **2010**, *148*, 544.
  - 18) C. Liu, H. Shi, Z. Liu, and Y. He, *Plasmonics*, **2014**, *9*, 513.
  - 19) F. Bardin, A. Bellemain, G. Roger, and M. Canva, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 2100.
  - 20) F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, K. Niikura, and Y. Okahata, *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 2043.
  - 21) K. Lindroos, U. Liljedahl, M. Raitio and A.C. Syvänen, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29*, e69.
  - 22) O. S. Wolfbeis, and J. Homola, (2006). *Surface plasmon resonance based sensors*. Berlin.
  - 23) B. Liedberg, I. Lundstrom, and E. Stenberg, *Sens. Actuators, B*, **1993**, *11*, 63.
  - 24) S. Sjölander, and C. Urbanitzky, *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 2338.
  - 25) S. Lofam, M. Malmqvist, I. Ronnberg, E. Stenberg, B. Liedberg, and I. Lundstrom, *Sens. Actuators, B*, **1991**, *5*, 79.
  - 26) R. Karlsson, and R. Stahlberg, *Anal. Biochem.*, **1995**, *228*, 274.
  - 27) E. C. Nice, and B. Catimel, *Bioassays*, **1999**, *21*, 339.

- 28) <http://www.biacore.com>
- 29) J. Homola, P. Pfeifer, and E. Brynda, *Proc. SPIE*, **1997**, 3105, 318.
- 30) E. Brynda, J. Homola, M. Houska, P. Pfeifer, and J. Skvor, *Sens. Actuators, B*, **54**, 132.
- 31) J. Homola, J. Dostálek, S. F. Chen, A. Rasooly, S. Y. Jiang, and S. S. Yee, *Int. J. Food Microbio.* **2002**, 75, 61.
- 32) J. Homola, H. Vaisocherová, J. Dostálek, and M. Piliarik, *Method*, **2005**, 37, 26.
- 33) J. Homola, H. B. B. Lu, G. G. Nenninger, J. Dostálek, and S. S. Yee, *Sens. Actuators, B*, **2001**, 76, 403.
- 34) J. Dostálek, H. Vaisocherová, and J. Homola, *Sens. Actuators, B*, **2005**, 108, 758.
- 35) C. Nylander, B. Liedberg, and T. Lind, *Sens. Actuator*, **1982**, 3, 79.
- 36) B. Rothenhausler, and W. Knoll, *Nature*, **1988**, 332, 615.
- 37) W. Hickel, D. Kamp, and W. Knoll, *Nature*, **1989**, 332, 186.
- 38) M. Piliarik, H. Vaisocherová, and J. Homola, *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20, 2104.
- 39) E. Fu, T. M. Chinowsky, J. Toley, J. Wenstin, and P. Yager, *Rev. Sci. Instr.*, **2004**, 75, 2300.
- 40) N. Bassil, E. Maillart, M. Canva, Y. Levy, M. C. Millot, S. Pissard, W. Narwa, and M. Goosesens, *Sens. Actuators, B*, **2003**, 94, 313.
- 41) A. Hemmi, R. Mizumura, R. Kawanishi, H. Nakajima, H. Zeng, K. Uchiyama, N. Kaneki, and T. Imato, *Sensors*, **2013**, 12, 801.
- 42) P. Zhang, L. Liu, Y. He, Z. Shen, J. Guo, Y. Ji, and H. Ma, *Appl. Opt.*, **2014**, 53,

6037.

43) M. Vala, K. Chadt, M. Piliarik, and J. Homola, *Sens. Actuators, B*, **2010**, *148*, 544.

44) J. M. Jory, G. W. Bradberry, P. S. Cann, J. R. Sambles, *Meas. Sci. Tech.*, **1995**, *6*,  
1193.

## 第2章 リニア CCD センサーを検出器とするマルチチャンネル型 SPR センサーシステムの開発

### 2.1 緒言

表面プラズモン共鳴(SPR)現象を利用した計測法はセンサー表面で起こる屈折率の変化を高感度に検出できるため、最近では、臨床検査、環境分析などに幅広く使用されている<sup>1)</sup>。さらに、SPR センサーは分子間の相互作用をノンラベル、リアルタイムに計測できるため、伝染病や環境汚染物質などのモニタリングに使用されている<sup>2)-5)</sup>。しかし、従来の SPR センサーは大型で実験室での使用に限られており、検出部も一か所に限られ、一測定にいつサンプルしか測定することができなく、日常での実用が制約されている。そのため、小型でポータブルなマルチ測定が可能な表面プラズモン共鳴センサーの開発は重要である。近年、グレーティングを使った小型マルチチャンネル SPR センサーが開発された<sup>6)-9)</sup>。グレーティング式 SPR センサーはプリズムが必要でないため、センサーの小型化に有利である。しかしながら、これらのマルチチャンネル SPR センサーはいずれも高価な二次元の CCD センサーまたは CMOS センサーを用いたため、装置のコストが高くなってしまった。また、クレチツマン配置に基づいて、二次元の CCD センサーまたは CMOS センサーを検出器に用いたマルチチャンネルの SPR イメージングセンサーが多数報告されている<sup>10)-13)</sup>。しかし、検出器として、高価な二次元 CCD センサーは使用されているため、装置自身のコストダウンがこんなである。また、二次元 CCD センサーや CMOS センサーの代わりに、クレチツマン配置に基づいて、ビームスプリッターによって、入射光をいくつかに分け、マルチチャンネル SPR センサーも開発された<sup>14)-16)</sup>。

しかしながら、これらの SPR センサーはチャンネルの数は最大 9 個となり、これ以上の数のサンプルの同時測定ができない。多成分の同時検出に関して、本研究は、SPR センサーの位置の異なる感応膜からの反射光をリニア CCD の異なるピクセルに投影するマルチチャンネル SPR センサーを試作し、検出部位を増やすことを目指した。しかしながら、この SPR センサーの性能については、十分は明らかになっておらず、本研究においてマルチチャンネルのための性能を明らかにすること本章の目的とする。

## 2.2 実験

### 2.2.1 試薬と材料

スクロースはキシダ化学製のものを使用し、金基板にはエリオテック製、クロムを高純度化学研究所製を使用した。ガスケットには NTT アドバンステクノロジー製を使用し、Peek チューブが大阪ケミカル製のものを使用した。また、すべての溶液作製操作は日本ミリポア社製 Milli-Q システムによって製造したろ過済み超純水を使用した。100 mM のスクロースストック溶液を 50 mL に 1.7122g のスクロースを溶かし、作製した。その後、このストック溶液を使用して、3 mM、6 mM、8 mM、12 mM、15 mM の標準溶液を調製した。また、同じ溶液の調製法で新たな 100 mM のスクロース水溶液を調整し、10 mM のテスト溶液を調製し、本センサーに用いた。精度確認のために。

### 2.2.2 リニア CCD センサーを検出器とするマルチチャンネル型 SPR センサーの

## 光学系と応答原理

本研究に設計したクレッチマン配置 SPR センサーの光学系を Fig. 2.1 に示している。この SPR センサーは発光ダイオード(LED, 770 nm, 日立, HE7601SG)を光源として、2つのコリメータレンズ、2つのシリンドリカルレンズ、一つの半円筒プリズム(BK7)、一つの偏光子、一つの CCD センサー (Sony, ILX551B, 2048 pixels) と2つの反射鏡から構成された。また、CCD センサーのサイズは  $14\ \mu\text{m} \times 14\ \mu\text{m}$  である。

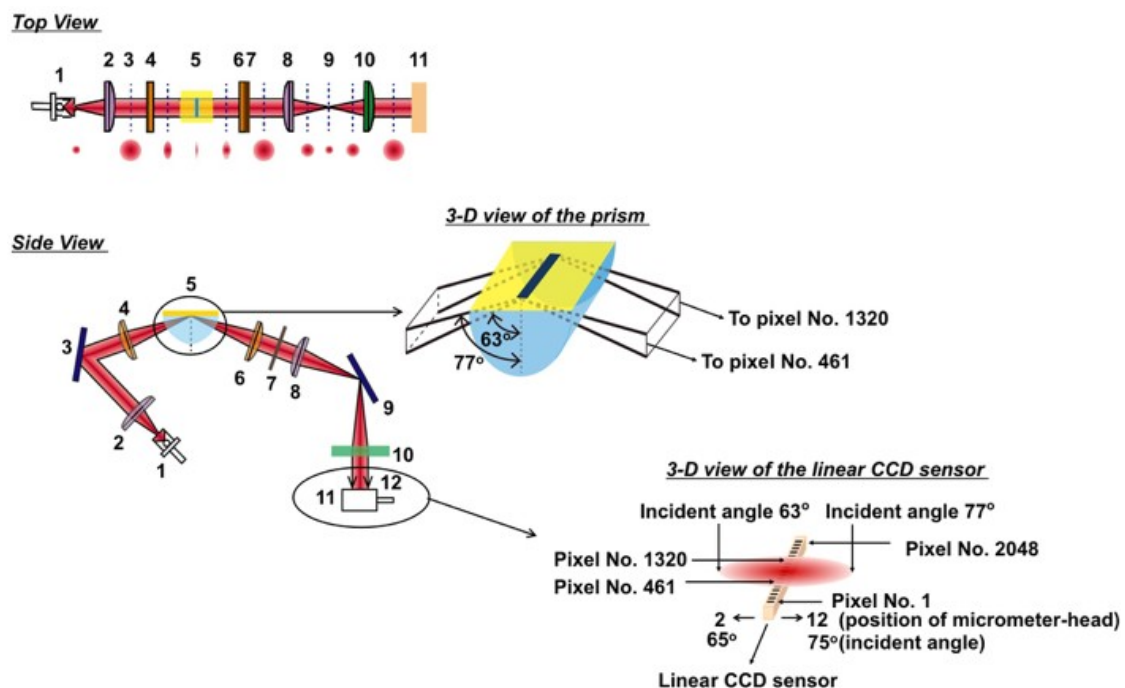


Fig. 2.1 本研究において設計したマルチチャンネル SPR センサー。 1: LED 光源、 2:コリメータレンズ、 3: 反射鏡、 4:シリンドリカルレンズ、 5:プリズムとセンサーチップ、 6:シリンドリカルレンズ、 7:偏光子、 8:コリメータレンズ、 9:反射鏡、 10:補正用円筒面レンズ、 11:リニア CCD センサー、 12:マイクロメーター。

LED (Fig. 2.1 の 1) から出た点光源は円錐型となって、コリメータレンズ (Fig. 2.1 の 2) に照射し、平行光となり、反射鏡 (Fig. 2.1 の 3)により反射され、更にシリンドリカルレンズ (Fig. 2.1 の 4) により線状に変形し、更にプリズムを通して (Fig. 2.1 の 5) 、センサーチップに照射した。センサーチップから反射した光は拡散して、反対側のシリンドリカルレンズ(Fig. 2.1 の 6)により平行光に発散された。その後、偏光子により、P 偏光だけが偏光子(Fig. 2.1 の 7)を通り、コリメータレンズ(Fig. 2.1 の 8)により集束され、反射鏡(Fig. 2.1 の 9)により反射され、補正用円筒面レンズ(Fig. 2.1 の 10)を通過し、最後に、リニア CCD センサーのピクセル 461 から 1320 (Fig. 2.1 の 11、及び立体図)の領域で検出された。また、CCD センサーの位置 (入射光角度) を連動のマイクロメーター(Fig. 2.1 の 12)で調節した。マイクロメーターの目盛は 2 から 12 まで(10 cm)であり、入射角度の  $65^{\circ}$  から  $75^{\circ}$  までに相当している。1 目盛は 10 等分にわけられているため、分解能は  $0.1^{\circ}$  であった。測定を行う際に、あるマイクロメーターをあるスケールに設定し(一定の入射角度に設定し)、反射光強度を測定した。また、各スケールにおける水に対する反射光強度を Fig. 2.2 に示している。CCD センサーの各ピクセルに投影された反射光を 12 ビットのコンバーターにより I-V 変換し(分解能 : 4096)、パソコンにあるハードディスク 5 sec ごとに保存した、パソコンのモニターには全ピクセル分の反射光強度がリアルタイムに反映される。また、本 SPR センサーのサイズは 170 mm (W) x 150 mm (D) x 110 mm (H) であり、重さは 1.5 kg であった。また、SPR センサー内部、本体及びマイクロメーターにつないでいる CCD センサーの写真を Fig. 2.3 の(a)、(b)及び(c)に示している。



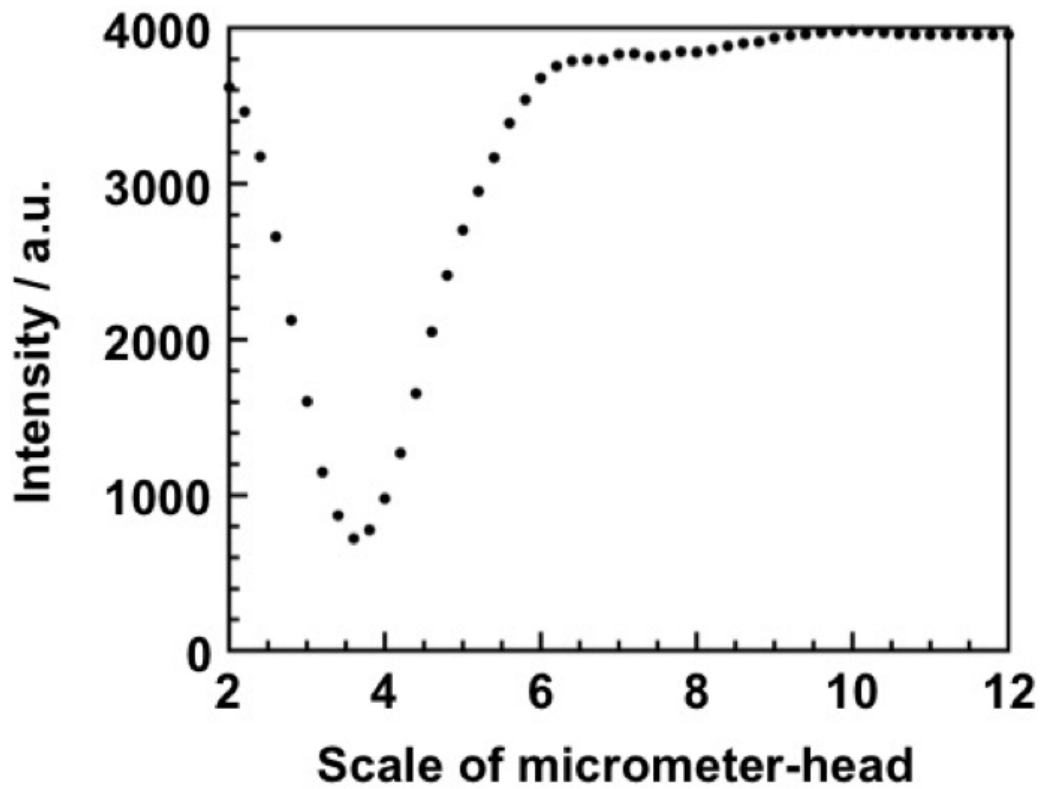


Fig. 2.2 各スケールにおける水に対する反射光強度。各スケールにおけるデータはピクセル 565 – 570 の反射光強度の平均値である。

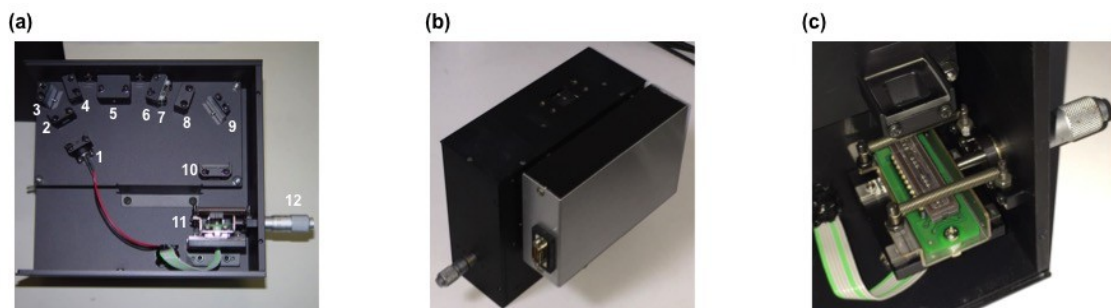


Fig. 2.3 (a) 本研究において、設計した SPR センサーの内部写真。(1: LED 光源、2: コリメータレンズ、3: 反射鏡、4: シリンドリカルレンズ、5: プリズムとセンサーチップ、6: シリンドリカルレンズ、7: 偏光子、8: コリメータレンズ、9: 反射鏡、10: 補正用円筒面レンズ、11: リニア CCD センサー、12: マイクロメーター) (b) 本 SPR センサーの本体の写真。(c) マイクロメーターにつないでいる CCD センサーの写真。

## 2.2.3 SPR センサーの性能評価

### 2.2.3.1 水及びスクロース溶液に対する SPR センサーの応答性

金基板を硫酸と過酸化水素が 1:3 の割合で混合したピラニア溶液に 90°C で 30 min 浸漬した。その後、金基板を取り出し、Milli-Q 水で 1 min 間洗浄し、更にエタノールで 30 sec 間洗浄した(今後、このソリをピラニア処理と呼ぶ)、処理した金基板をエタノール中に使用する直前までに保存した。

ピラニア処理を施した金基板をエタノールから取り出し、N<sub>2</sub> で乾燥した。SPR センサーのプリズムの上に 30  $\mu$ L のマッチングオイル(Immersion Oil Type-F, n<sub>e</sub>: 1.518, Olympus, Japan)を滴下し、金基板をセットし、サンプルのない状態で反射光強度を測定した。LED 光源に流す電流を 60 mA、80 mA、100 mA、120 mA と変化させた。また、水及びスクロース溶液に対する本 SPR センサーの応答を測定する際、金基板を N<sub>2</sub> で乾燥した後、ガスケットに貼り付け、フローセルにセットした(Fig. 2.4)。また、測定時のキャリア駅の流速は 40  $\mu$ L/min とし、LED 光源の電流値通常 120 mA とした。注入するスクロース溶液の濃度は 6 mM、12 mM 及び 15 mM であった。

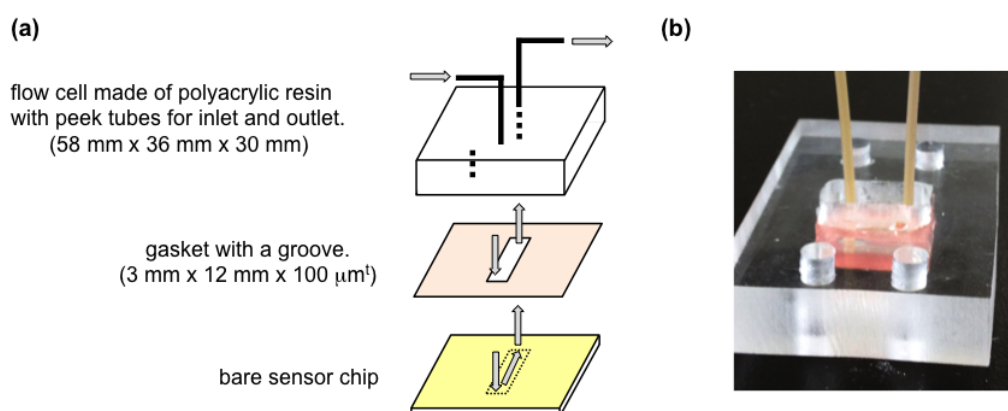


Fig. 2.4 (a)金基板、ガスケットとアクリルフローセルを組み合わせるイメージ、(b)実物の写真。

### 2.2.3.2 SPR センサーの安定性評価

ピラニア処理を施した金基板を Fig. 2.4 のようにセットし、Milli-Q 水をキャリア液として 40  $\mu\text{m}/\text{min}$  の流速で 29000 sec 流した。また、反射光強度はピクセル 750-800 で得られた反射光強度の平均値とし、その間の時間的変動を記録し、SPR センサーの安定性を評価した。

### 2.2.3.3 CCD センサーのピクセルの数とノイズの関係

ピラニア処理を施した金基板を Fig. 2.4 のようにセットし、Milli-Q 水をキャリア液として流した。流速は 40  $\mu\text{m}/\text{min}$  であった。また、試料として、8 mM と 15 mM のスクロース水溶液を用いた。また、得られた結果を 8 グループに分けた(グループ1：ピクセル 461-560；グループ 2：ピクセル 561-660；グループ 3：ピクセル 651-760；グループ 4：ピクセル 761-860；グループ 5：ピクセル 861-960；グループ 6：ピクセル 961-1060；グループ 7：ピクセル 1061-1160；グループ 8：ピクセル 1161-1260)。それぞれのグループにおいて、水及び 8mM、15 mM のスクロース溶に対して、最初のピクセルから、1 ピクセル分、4 ピクセル分、10 ピクセル分、40 ピクセル分、70 ピクセル分、100 ピクセル分の平均値と分散値を取り、SPR センサーのノイズを評価した。

### 2.2.3.4 30 個のセンシングストライプを持つセンサーチップの作製法

#### イオンシャワーエッチング法

イオンシャワーエッチング法は、Fig. 2.5 に示すように、真空下、アルゴンガスは高速電子と衝突し、電離する。生成したアルゴンイオンは印加された加速電圧により、加速され、金基板に照射し、エッチングを行う。また、アルゴンガスの流速が遅いほど、エッチング室にあるアルゴン分子の数が少なく、アルゴンイオンとの衝突が減り、より微細なパターンができる。また、今回の実験条件は、Ar の流速：1.4 SCCM、加速電圧：600 V、電流：3.5 mA、照射時間：20 min とした。また、使用したステンレス鋼マスク及び作製した 30 個のセンシングストライプを持つセンサーチップ(以下はセンサーチップと省略)の写真を Fig. 2.6 の(a)と(b)に示している。

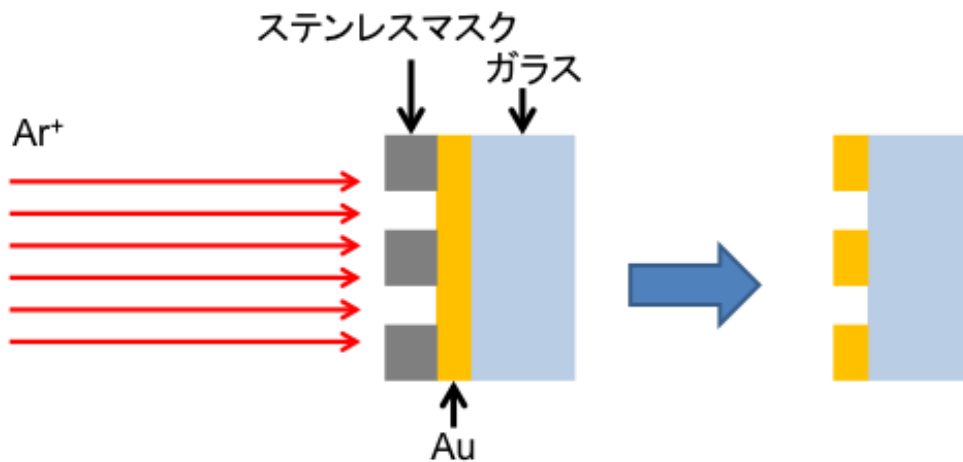


Fig. 2.5 イオンシャワーエッチングの原理図

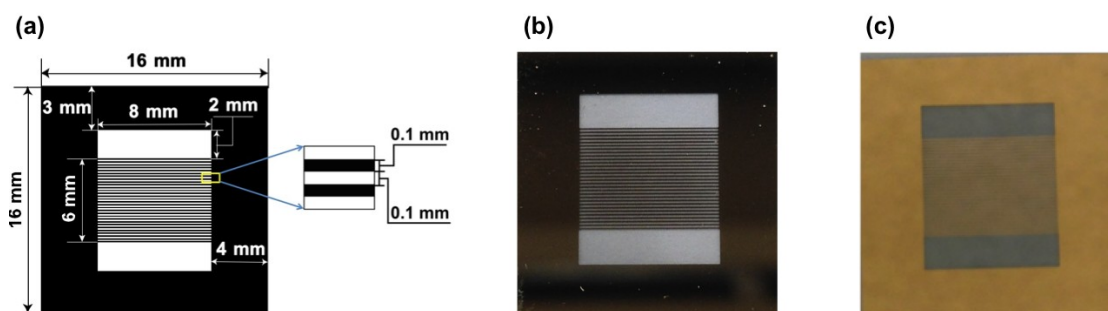


Fig. 2.6 (a)イオンシャワーエッチング及び Cr 蒸着用マスクのデザインズ、(b)イオンシャワーエッチング方によって作製したセンサーチップ、(c) Cr 蒸着方によって作製したセンサーチップ。

### Cr 蒸着法

金基板がピラニア溶液に(90°C)30 min 浸漬後、Milli-Q システムにより製造した濾過済み超純水で 2 min 流し、その後、エタノールで洗浄し窒素ガスで乾燥させた。ピラニア処理を施した金基板に 100  $\mu\text{m}$  間隔を持つマスクで覆い、蒸着装置にセットし、約 50 nm の厚みの Cr を蒸着した。また、作製した 30 ストライプを持つセンサーチップの写真を Fig. 2.6 の(c)に示している。

### 各方法で作製した金基板の水に対する応答

イオンシャワーエッチング法によって作製したセンサーチップをピラニア処理した後、Fig. 2.7(a)に示すようにセットした。また、セット後の写真は Fig. 2.7(b)に示した。またはクロム蒸着法で作製した金基板はピラニア処理せずに Fig. 2.7(a)に示すようにフローセルにセットした。その後、Milli-Q 水をフローセルに流し、その応答を観測した。

その後、ピラニア処理を施したイオンシャワーエッチング法によって作製したセンサーチップと Cr 蒸着したセンサーチップを 12 min 空気プラズマ処理を

施し、それぞれフローセルにセットし、水に対する応答を観察した。

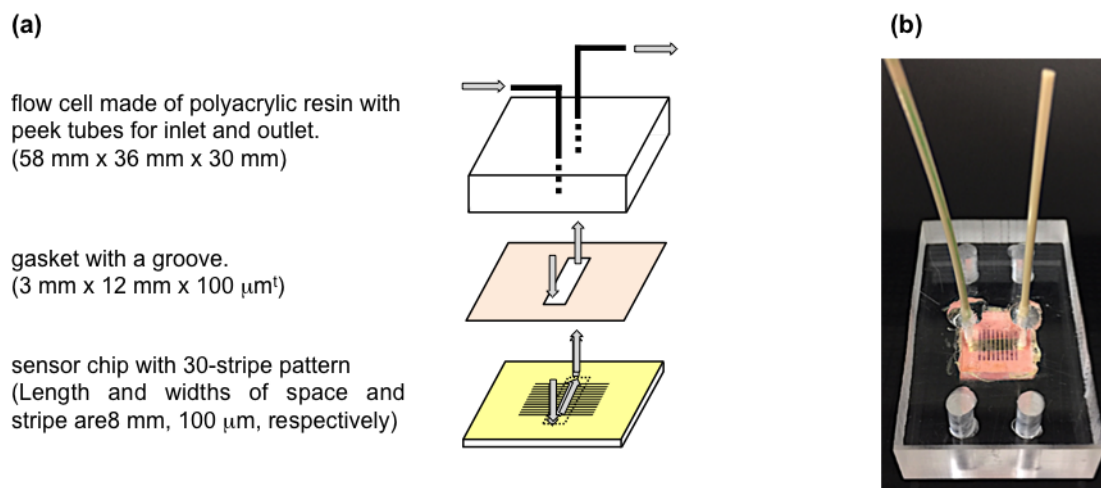


Fig. 2.7 (a)センサーチップ、ガスケットとアクリルフローセルを組み合わせるイメージズ、(b)実物の写真。

### 2.2.3.5 SPR センサーの応答性に及ぼす CCD センサーの位置の影響及びスクロース溶液による検出精度の評価

#### CCD センサー位置と SPR 応答の関係

ピラニア処理を施した金基板をフローセルにセットし、まず、CCD センサー位置と SPR 応答の関係を調べた。流速 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  でキャリア液を流しながらマイクロメーター位置を 2-12 の間で 0.2 メモリ間隔で水に対する応答について調べた。また、各スケールにおいて、3 min のデータを取り、平均値をそのスケールに於ける水の応答とした。その後、本 SPR の精度を評価するのに、CCD センサー位置の最適化を行った。3.12、3.40、4.00、4.20 の CCD センサー位置(マイクロメーターのメモリ)で 6 mM、12 mM、15 mM のスクロース水溶液をフロ

セルに流して、それぞれの位置において反射光強度測定を行った。この時のキャリア液の流速は 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  であり、注入試料のルー容量は 120  $\mu\text{L}$  であった。

### スクロース溶液による検出精度の評価

プラズマ処理を施したセンサーチップを 12 min プラズマ処理(空气中)を行い、1min 以内にフローセルにセットし、脱気した Milli-Q 水を流した。本測定において、キャリア液の流速は 40  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、注入試料ルー容量は 120  $\mu\text{L}$  であり、サンプル試料は 3 mM、6 mM、8 mM、12 mM、15 mM のスクロース水溶液であり、テスト溶液は 10 mM のスクロース水溶液である。また、一つのサンプルについては試料を 5 回の繰り返し測定を行い、テスト溶については液を 3 回の測定を行った。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 水及びスクロース溶液に対する本 SPR センサーの応答性

ピラニア処理を施した金基板を 30  $\mu\text{L}$  もマッチングオイルを滴下した後、SPR センサーにセットした。まず、LED 電流を 60 mA に設定した、反射光強度を測定し、その後、同じ基板で LED 電流を 120 mA に変え、再び反射光強度を測定した。その結果を Fig. 2.8 の(a)と(b)に示している。LED 電流を 60 mA に設定した場合、その結果は Fig. 2.8 の(a)に示しているように、両側にあるピクセルで検出された反射光強度は真ん中にあるピクセルで検出された反射光強度と比べ、低いことがわかった。これは、Fig. 2.1 の SPR センサー光学系のトップビュー

に示しているように点光源である LED から出た光は中心から外側にかけて、光の強度は弱くなっており、金基板に照射した入射光の強度がに分布があるためである。また、LED 電流を 80 mA、100 mA に設定した場合においては、LED 電流が 60 mA の場合と同じように、反射光強度はピクセルに対して凸状になっていることがわかった。さらに、LED 電流が大きくなるほど、反射光強度が強くなり、中心のピクセルで検出した反射光強度と外側にあるピクセルで検出した反射光強度の差が大きくなる。

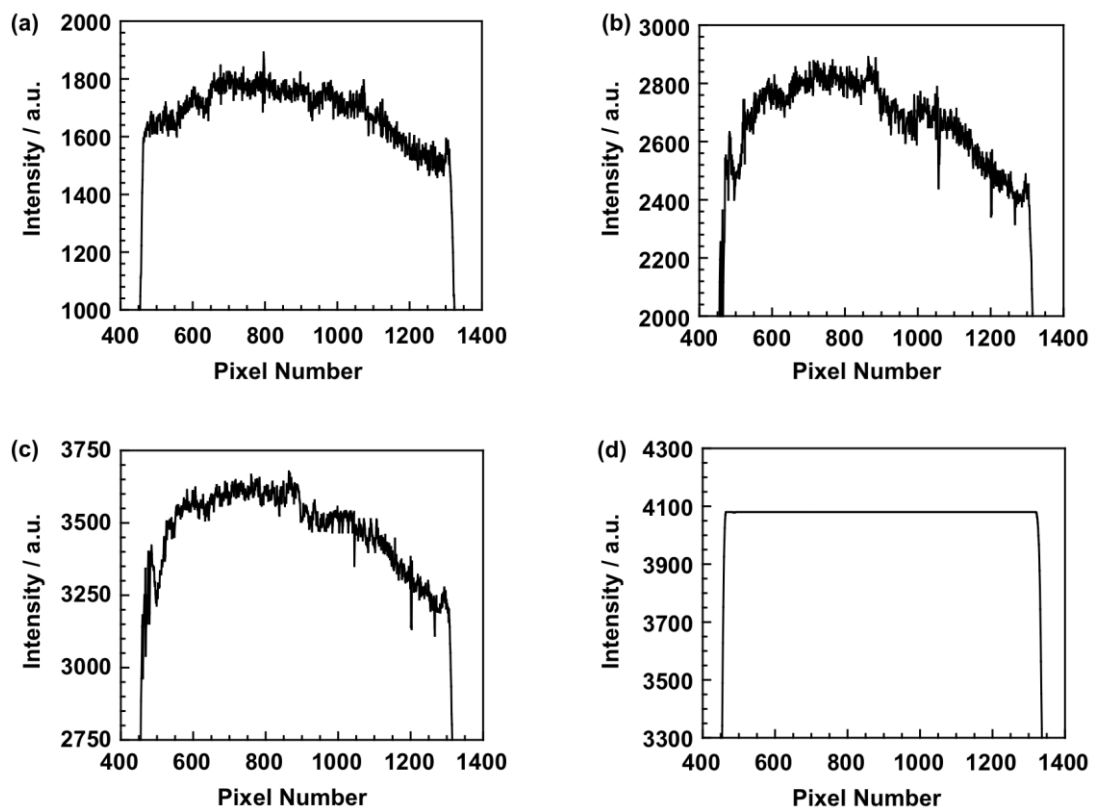


Fig. 2.8 (a) LED 電流が 60 mA での反射光分布、(b) LED 電流が 80 mA での反射光分布、(c) LED 電流が 100 mA での反射光分布、(d) LED 電流が 120 mA での反射光分布。

しかしながら、反射光強度の LED 電流を 120 mA に設定した場合、LED から出た光の強度は十分高く、全てのピクセルにおいて、ブランクの場合の反射光



強度は CCD センサーの検出限度を超え、ピクセルに対して飽和現象が得られた。さらに、スクロース溶液などの測定を行う際に、全ての測定にあたり、LED 電流が 120 mA に設定した。

水、6 mM、12 mM、15 mM のスクロース水溶液がセンサーチップを通過する際に SPR センサーの応答のスナップ写真を Fig. 2.9 の(a)に示している。この結果から、全てのサンプル試料に対する SPR センサーの応答はピクセルに対して凸状になっている。これは、ブランクの金基板で LED 電流が 60 mA に設定した場合の測定結果と一致している。すなわち、この楕円状の反射光強度の分布は点光源である LED からの光強度の分布によるものである。さらに、本 SPR センサーの測定領域を評価するのに、Fig. 2.9(a)にある 6 mM、12 mM、15 mM のスクロース水溶液がセンサーチップを通過する際に SPR センサーの応答(オレンジ色、緑、黒の点)に水がセンサーチップを通過した時の SPR センサーの応答(赤い点)を引いた。その結果、スクロース水溶液による反射光強度の変化はピクセル 461-1320 の間に観測された。すなわち、本 SPR センサーのセンシング領域は CCD センサーのピクセル 461-1320 の間であった。さらに、Fig. 2.9(b) から、各濃度のスクロース水溶液に対する応答はピクセルごとに大きなばらつきがあるが、その平均値はほとんど一定である。ピクセル 461 から 1320 まで全てのピクセルにおける反射光強度の平均値を取り、検量線を引くと、Fig. 2.10 に示すように。この結果から、反射光強度の変化とスクロース水溶液の濃度の間に良好な直線の関係があることがわかる。また、各濃度のスクロース水溶液の応答のエラーバーはピクセル 461 から 1320 まで全てのピクセルの応答から計

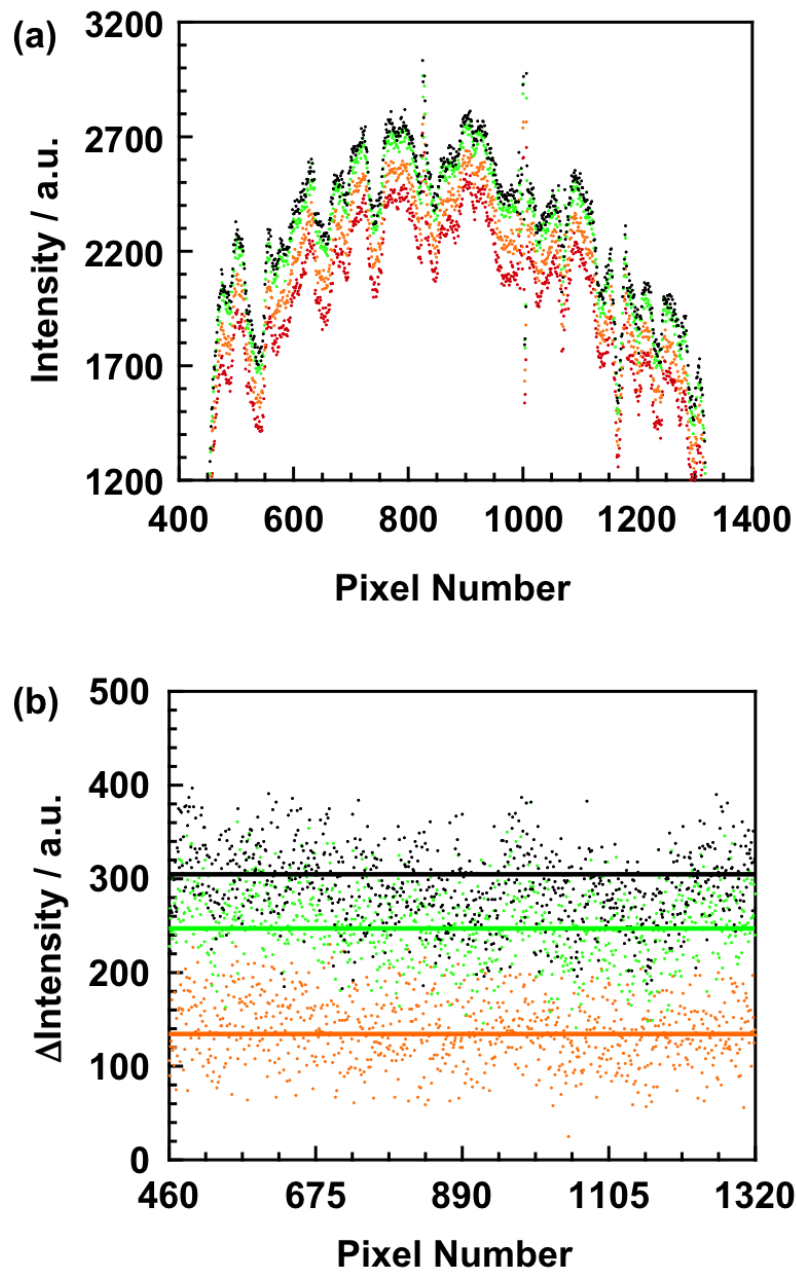


Fig. 2.9 (a) 水 (赤い点)、6 mM のスクロース水溶液 (オレンジ色の点)、12 mM のスクロース水溶液 (緑の点)、15 mM のスクロース水溶液 (黒い点) に対する SPR センサーの応答スナップ写真及び (b) 6 mM のスクロース水溶液 (オレンジ色の点)、12 mM のスクロース水溶液 (緑の点)、15 mM のスクロース水溶液 (黒い点) がセンサーチップに流した際に各ピクセルにおける反射光強度の変化。

算した反射光強度の分散値であった。この結果から、スクロース水溶液の濃度

と関係なく、ピクセル 461 から 1320 まで全てのピクセルでの反射光強度のばらつきはほとんど同程度である。

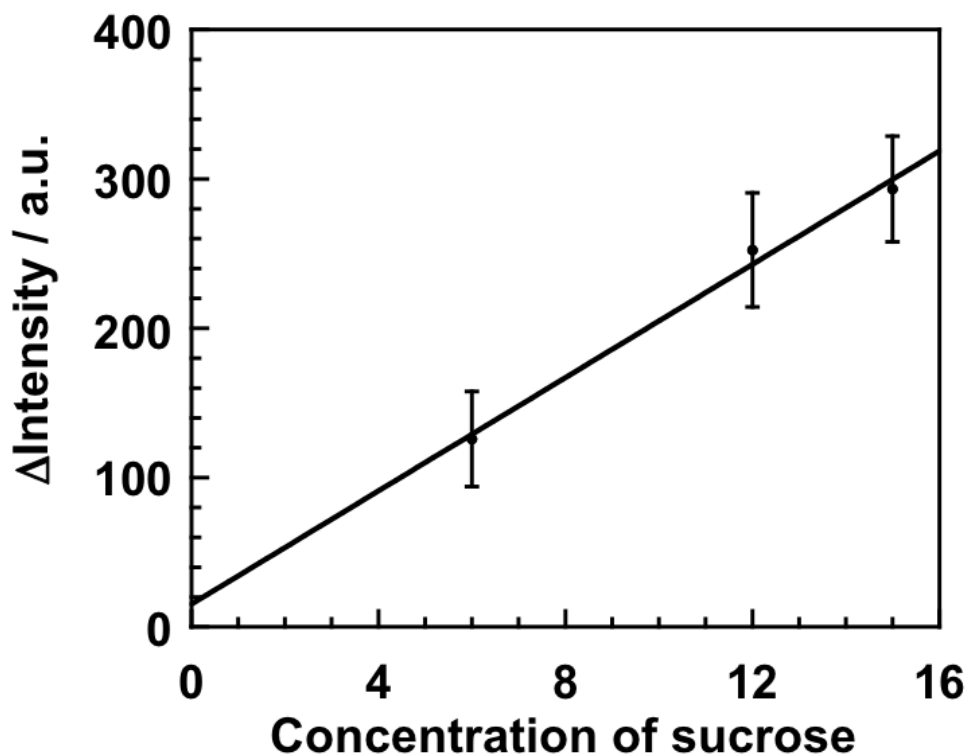


Fig. 2.10 6 mM、12 mM、15 mM のスクロース水溶液の測定結果から得られた検量線。

### 2.3.2 本 SPR センサーの安定性評価

本 SPR センサーの反射光強度を測定 CCD センサーの位置をマイクロメータースケールが 3.4 に、流速が 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  に設定し、29000 sec 間の SPR センサーの水に対する応答を観測した。この結果により、測定開始から、センサーは不安定であり、反射光強度は時間と共に増加し、測定 4000 sec から安定し始めたことがわかる(Fig. 2.11)。また、4000 sec から、反射光強度は時間と共に増加す

る傾向が示すが、これは装置のエレクトロニクスによる発熱や放熱に伴うドリフトだと考えられる。このドリフト速度は 4000 sec と 4100 sec の間の反射光強度の平均値と 28900 sec と 29000 sec の間の反射光強度の平均値の差を時間で割る方法で求めた。この結果から、本 SPR センサーのウォームアップ後のドリフト速度は 2.9 digit/h であり、極めて小さいことがわかった。

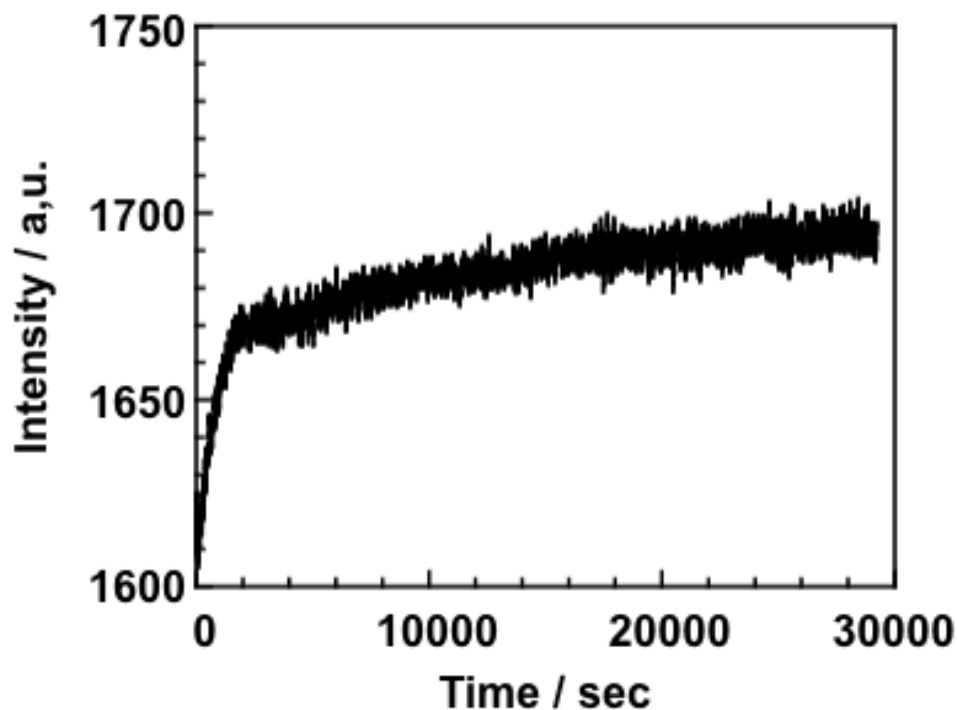


Fig. 2.11 水に対する SPR センサーの応答の時間に対する変化。

### 2.3.3 CCD センサーのピクセルの数とノイズの関係

水をセンサーチップ上に流した時の SPR センサー応答を 130 sec 間取った。実験項に述べたように、CCD センサーのセンシング領域にあるピクセル 431-1320 を 8 つのグループに分け、それぞれのグループにおける平均値に使用

するピクセルの数と標準偏差の関係を評価した。平均値を取るのに使用したピクセルの数は 1、4、10、30、70、100 個の場合において反射光強度が 130 sec 間での経時変化を Fig. 2.12 に示している(ピクセル 961 と 1060 のグループを例とする)。また、この時の反射光強度は第一回目に測定した反射光強度を  $I_{t0}$  とし、これからの 130 sec 間の各ピクセルにおけるデータから反射光強度に  $I_{t0}$  を引き、得られた結果を補正した水の反射光強度とした。補正した水の反射光強度の標準偏差は、一ピクセルしか使っていない場合では反射光強度の標準偏差は 22 であり、4 つのピクセルの平均値を取る場合では 11 digit であった。さらに、10、30、70、100 個のピクセルを使用した場合の標準偏差はそれぞれ 7.8 digit、5.0 digit、3.6 digit、3.5 digit であった。この結果から、平均値に使用したピクセルの数が多いほど、反射光強度のばらつきは小さくなることがわかった。このことは、統計論から判断して、反射光強度の変動はランダムであり、装置特有のノイズではないと考えられる。さらに、平均値に使用するピクセルの数( $n$ )と反射光強度の標準偏差値の関係を Fig. 2.13 の(a)、反射光強度の標準偏差と  $\sqrt{n}/n$  の関係を Fig. 2.13(b)に示している。この結果から、反射光強度の標準偏差と  $n$  の間に指数関係となり、 $\sqrt{n}/n$ と線形関係になることがわかった。これは Bardin ら<sup>13)</sup>の研究結果と一致した。また、8 つのグループにおいて、反射光強度と  $n$  の関係を Fig. 2.14 に示した。全てのグループにおいて、同じ結果が得られた。これらの結果から、4 ピクセル分の反射光強度の平均値を取ることにより、*ca.*  $3.2 \times 10^{-5}$  RIU の検出精度が得られ(Fig. 2.10(b)の検量線から算出した)。これ以上ピクセルの数を減らすことにより、検出精度の値が大きくなり、実用できなくなるため、本 SPR センサーは最大、4 ピクセル分の大きさで一つのサンプルが

測定できるとわかった。

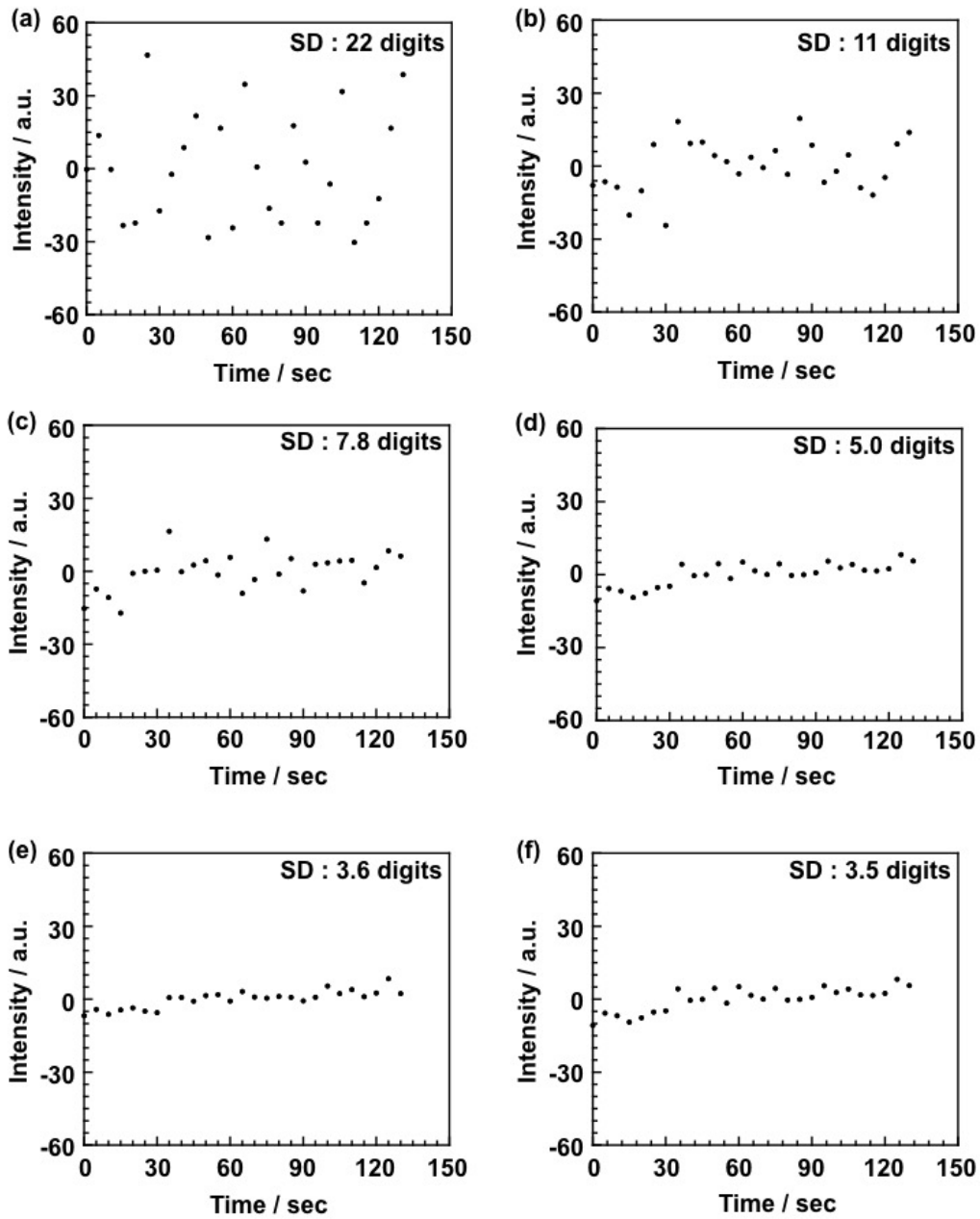


Fig. 2.12 水の時間に対する反射光強度の経時変化。(a) 1 pixel (ピクセル 961)、(b) 4 ピクセルの平均値 (ピクセル 961-965)、(c) 10 ピクセルの平均値 (ピクセル 961-971)、(d) 40 ピクセルの平均値 (ピクセル 961-1000)、(e) 7 ピクセルの平均値 (ピクセル 961-1030)、(f) 100 ピクセルの平均値 (ピクセル 961-1060)。

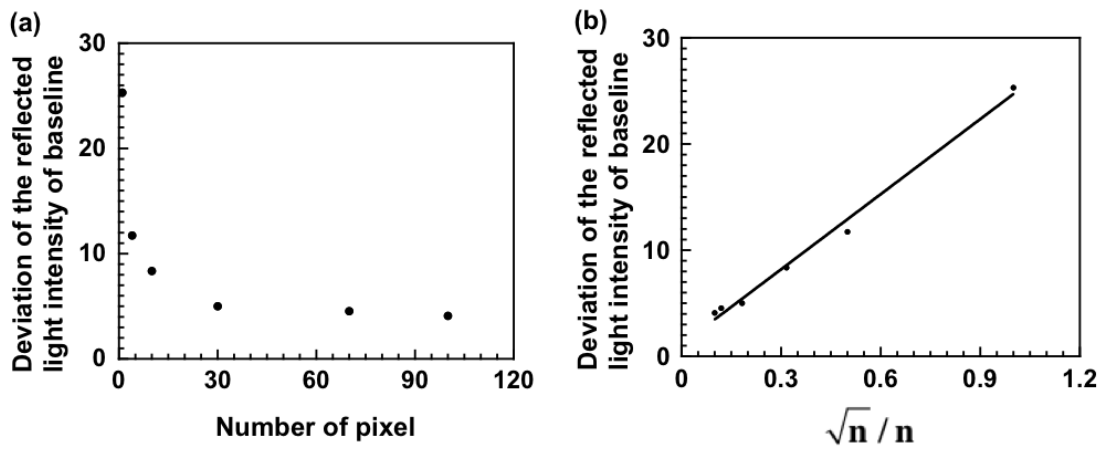


Fig. 2.13 (a)反射光強度の標準偏差と (b)  $\sqrt{n}/n$ の関係。

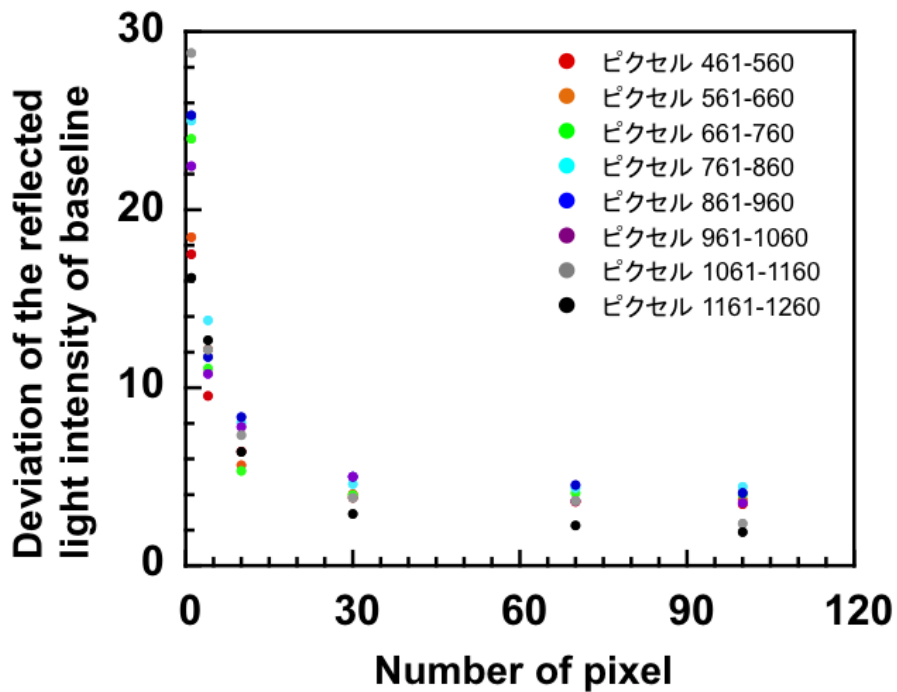


Fig. 2.14 各グループにおける反射光強度の標準偏差。

スクロース水溶液の SPR 応答(反射光強度変化)を求める際、ドリフトにより、センサーグラムは斜めとなって、単純に反射光強度の台形のセンサーグラムの

上底の平均値からベースラインの平均値を引くことができず、ベースラインを引く必要がある。その引き方は Fig. 2.15(a)に示しており、ベースラインは緑の線である。ベースラインを引いた後、SPR センサーの応答からベースラインを引き、新たなセンサーグラムが得られた。この新しいセンサーグラムの上底の平均値はスクロース水溶液による反射光強度の変化である。また、平均するのに使用したピクセルの数とスクロース水溶液に応答の関係を Fig. 2.15(b)に示している。この結果から、ピクセルの数と関係なく、スクロース水溶液に対する反射光強度の変化はほとんど変わらない。また、Fig. 2.15(b)にあるエラーバーは八つのグループでまとめた結果から得られた反射光強度の平均値標準偏差であり、この結果から、ピクセルの数が多いほど、スクロース水溶液に対する SPR センサーの応答の標準偏差が小さくなることがわかった。しかしながら、ピクセルの数が 10 ピクセルを越えると、ピクセルの数はスクロース水溶液に対する SPR センサーの応答の標準偏差に対する影響は平均するピクセルの数とほとんど関係がなくなる。



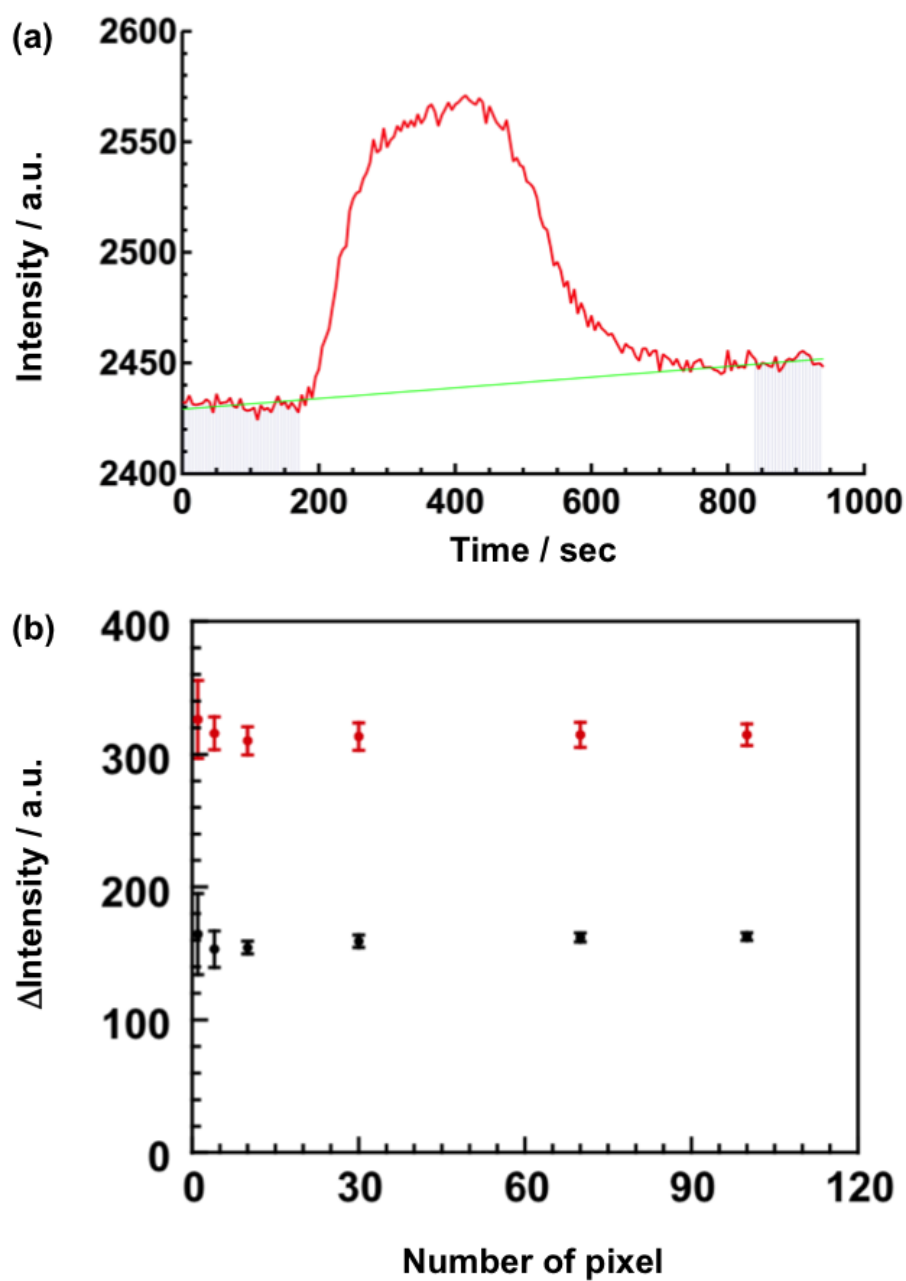


Fig. 2.15 (a) ピーク高さを求める時にベースラインの求め方、(b) 異なるピクセル数で平均した 8 mM(黒い点)及び 15 mM(赤い点)のスクロース水溶液による反射光強度の変化。

### 2.3.4 イオンシャワーエッチング法及び Cr 蒸着法によるセンサーチップの作製

とその SPR センサーへの適用性

ピラニア処理前のイオンシャワーエッチング方によって作製したセンサーチ

チップで測定した水に対する SPR 応答を Fig. 2.16(a)に示している。この応答から、水由来の反射光強度の減少が観察されたが、センシングストライプでの応答がはっきりと見てないため、そのピクセル 650 – 800 の間での拡大図が Fig. 2.16(b)に示されている。各ピクセルにおける反射光の強度によって、イオンシャワーエッチングにより、センシングストライプの作製ができたことが示されたが、各センシングストライプにて、水に対する応答が山状となっており、実際の測定に向いていないと考えられる。改善策として、イオンシャワーエッチング法で作製したセンサーチップを空气中 15 min 間プラズマ処理を施し、再び水に対する SPR 応答を測定した。その結果を Fig. 2.17(a)に示した。さらに、そのピクセル 650 – 800 の拡大図を Fig. 2.17(b)に示している。この結果から、プラズマ処理前後、イオンシャワーエッチング法によって作製したセンサーチップで測定した水に対する SPR 応答はほとんど変化がないことがわかった。これは、光はガラス-金の界面に照射した際に生じた光の散乱に由来する物だと考えられる。したがって、この現象を解決するため、界面において、光の散乱が起こらない方法を検討する必要し、クロムの蒸着によって 30 センサー個のセンシングストライプを持つチップを作製した。その水に対する SPR 応答を Fig. 2.18(a)に示しており、ピクセル 650 – 800 の拡大図を Fig. 2.18(b)に示している。この結果から、各センシングストライプにおいて、水による反射光強度の減少が観測され、Cr の蒸着により、30 個のセンシングストライプの作製ができたことがわかった。さらに、拡大図によって、界面における光の散乱による各センシングストライプでの山状の水に対する応答が観測されず、界面における光の散乱が解決された。しかしながら、このセンサーチップで測定した水の SPR 応答が大きく、マ

イクロメーターの位置にほとんど依存しないことから、Crの蒸着により、センサーチップが疎水性となり、水が十分にセンシングストライムにつけていないと考えられる。そのため、Cr蒸着を施したセンサーチップを15 min間、空气中でプラズマ処理を施し、水に対するSPR応答を測定した。その結果をFig. 2.19(a)に示し、ピクセル650–800の拡大図をFig. 2.19(b)に示している。これらの結果から、30個のセンシングストライプから、下向きの谷状の応答が観測された。また、Fig. 2.19(a)から、ピクセルに対して、反射光強度は山状に立っていることが確認され、この結果は2.3.1に述べたセンシングストライプを作っていないベアーな金基板で測定した結果と一致した。この結果から、界面での光の散乱が解決され、センサーチップの親水性が増され、各センシングストライプに水が届いたことがわかった。すなわち、プラズマ処理後のCr蒸着センサーチップが実用できると考えられ、30個のセンシングストライプを持つセンサーチップの作製ができた。12 mMに対するSPRセンサーの応答のスナップショットをFig. 2.20(a)に示している。水に対するSPRセンサーの応答と同じように、ピクセルに対して、反射光の強度は山状になっており、これは2.3.1に述べた原因と同じく、光源から出た光のムラに由来するものである。また、蒸着用のステンレス鋼製のマスクのイメージ図をFig. 2.20(b)に示しており、ストライプの幅及び二本のストライプの間の距離は両方とも100  $\mu\text{m}$ であった。また、Fig. 2.6(a)に示すように、30個のセンシングストライプが6 mmの範囲に作製され、水またはスクロース水溶液が流れた際にピクセル562-1180 (618個のピクセル)の間に検出された。この結果により、一つのピクセルはセンサーチップ上の10 $\mu\text{m}$ に相当することがわかり、また、一つのストライプの幅は100 $\mu\text{m}$ である

ため、CCD センサー上の 10 ピクセル相当すると考えられる。さらに、12 mM のスクロース水溶液がセンサーチップに流した際、ピクセル 730-740 における応答を Fig. 2.20 に示している。スクロース水溶液がセンサーチップに通過した際、SPR センサーで検出した反射光強度が Fig. 2.20(b)の赤いラインに示している。この結果から、スクロース水溶液に対して、ほぼ同じ反射光強度の変化を示したのはわずかピクセル 733-737 の 5 ピクセルであり、すなわちデザインした 10 個のピクセルのうちの 5 個のピクセルしか測定できないと考えられる。また、同じような現象はほかのセンシングストライプにも起こった。この結果から Fig. 2.6 に示したステンレス鋼製のマスクが金基板にセットし、蒸着を施した際に、クロム蒸気はマスと金基板の間に入り込み、蒸着したセンサーチップは Fig. 2.6 に示している状態になったためである。また、ほかのセンシングストライプから、一つのセンシングストライプで、5-7 個ピクセルはセンシング可能な大きさだと考えられる。

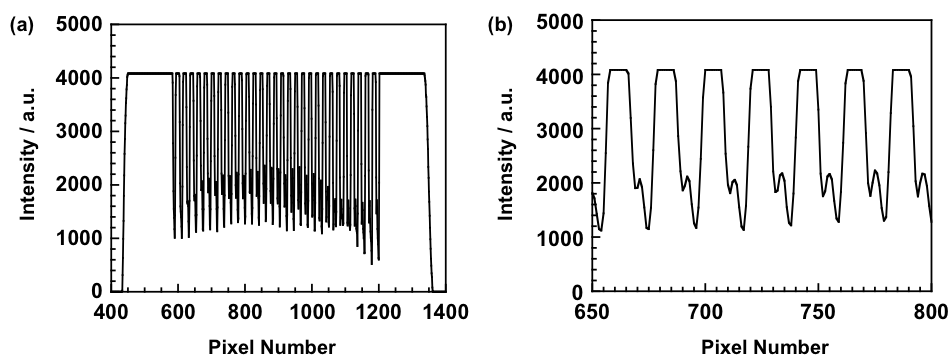


Fig. 2.16 (a) プラズマ処理前の 30 個のセンシングストライプを持つセンサーチップ (イオンシャワーエッチング)における水に対する SPR 応答及び (b)その拡大図 (ピクセル 650-800)。

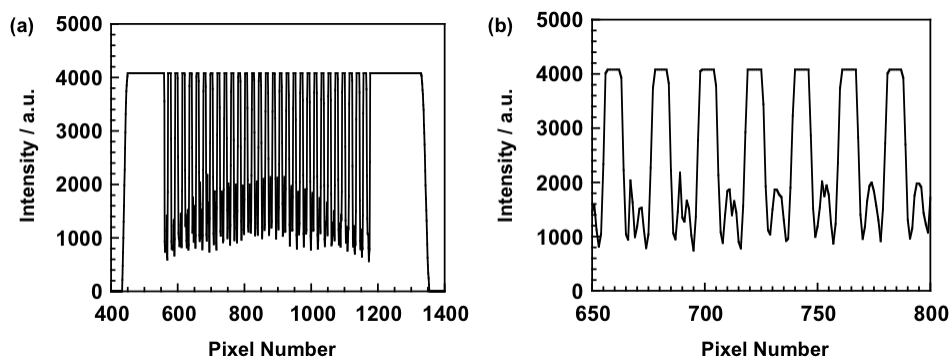


Fig. 2.17 (a) プラズマ処理後の 30 個のセンシングストライプを持つセンサーチップ (イオンシャワーエッチング)における水に対する SPR 応答及び (b)その拡大図 (ピクセル 650-800)。

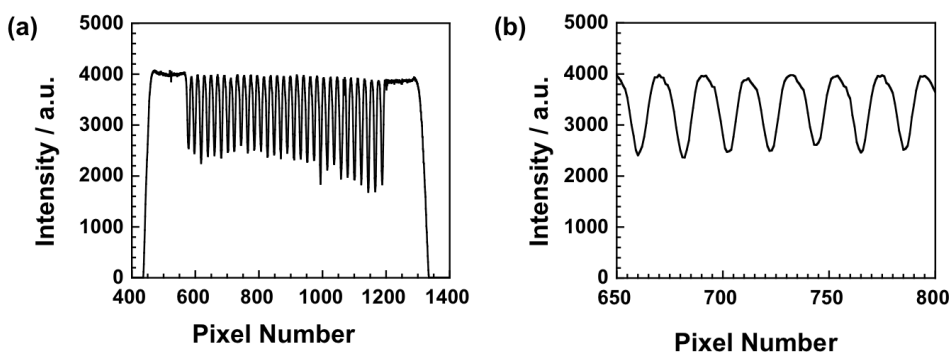


Fig. 2.18 (a) プラズマ処理前の 30 個のセンシングストライプを持つセンサーチップ (Cr 蒸着)における水に対する SPR 応答及び (b)その拡大図 (ピクセル 650-800)。

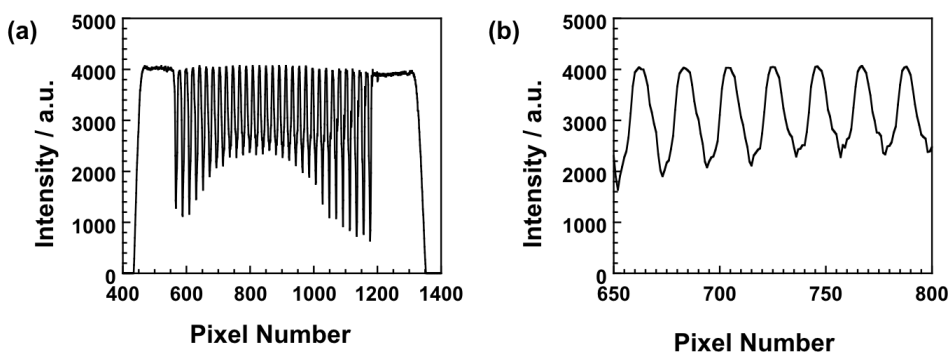


Fig. 2.19 (a) プラズマ処理後の 30 個のセンシングストライプを持つセンサーチップ (Cr 蒸着)における水に対する SPR 応答及び (b)その拡大図 (ピクセル 650-800)。

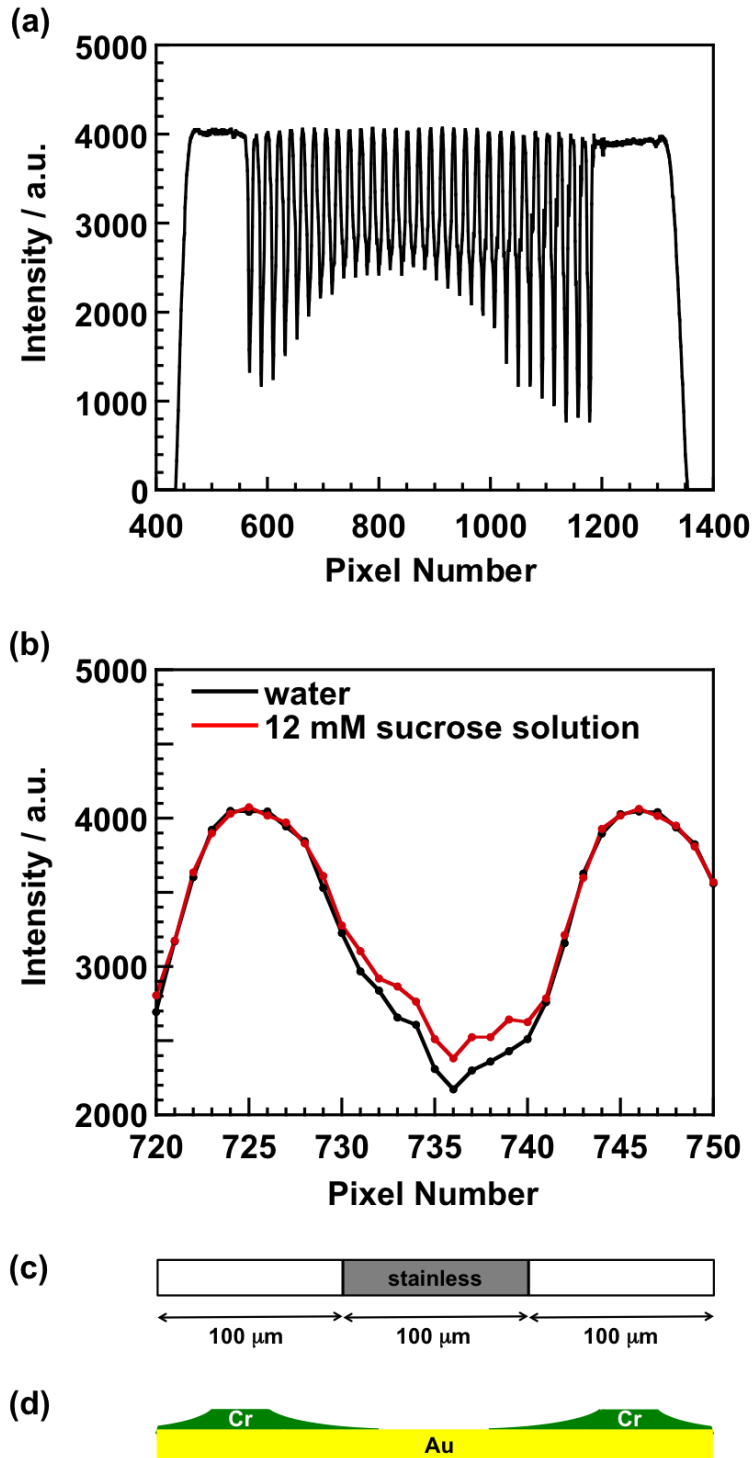


Fig. 2.20 (a) プラズマ処理後の Cr 蒸着法で作製したセンサーチップにおける 12 mM スクロース水溶液に対する SPR 応答及び (b)ピクセル 720-750 における水及び 12-mM スクロース水溶液に対する SPR 応答 (c)ステンレス鋼性蒸着用マスクのイメージ図、 (d) 蒸着後のセンサーチップのイメージ図。

### 2.3.5 SPR センサーの応答性に及ぼす CCD センサーの位置の影響及びスクロース溶液による検出精度の評価

#### CCD 位置と SPR 応答の関係

30 センシングストライプセンサーチップにおいて、水に対して、各マイクロメーター位置での SPR 応答を Fig. 2.21 に示している。マイクロメーター位置は入射光の入射角度を意味するため、スケール 3.5 付近に観測される応答は水に対する従来の SPR センサーで観測される共鳴角度を示している。この結果から、30 個のセンシングストライプセンサーチップにおいて、水の共鳴曲線が得られ、同じ位置(入射角度)で表面プラズモン共鳴が起こっていることがわかった。

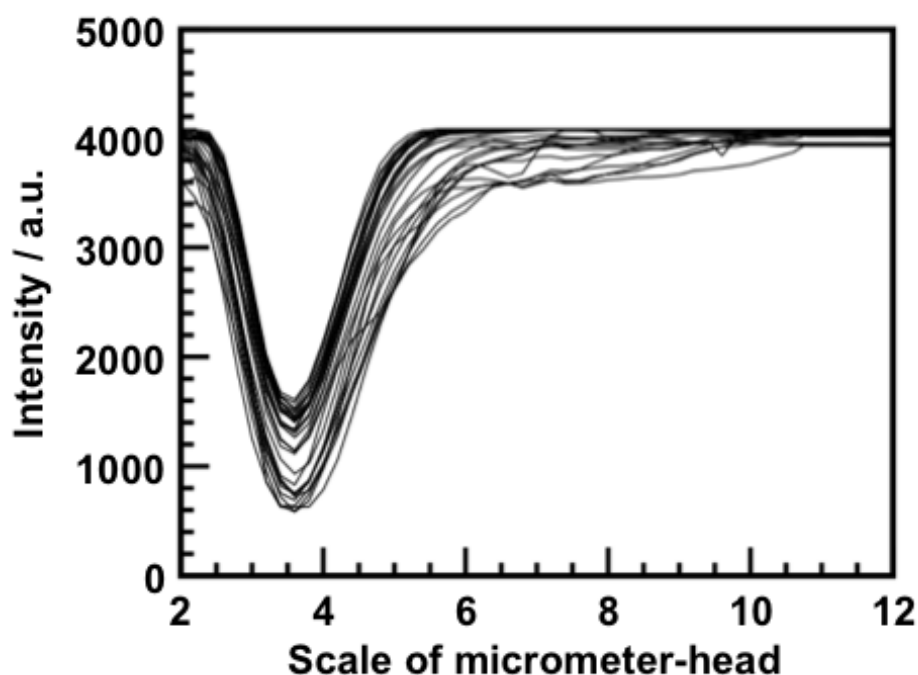


Fig. 2.21 30 個のセンシングストライプにおいて、各マイクロメーター位置における水に対する SPR 応答。

また、Fig. 2.22(a)に示すように、異なるマイクロメーター位置において、異なる濃度のスクロース水溶液に対する反射光の強度変化が異なることがわかり、本 SPR センサーの最大の応答感度を得るため、反射光強度変化が一番大きいマイクロメーター位置を確認する必要がある。センシングストライプを作っていない金基板をフローセルにセットし、水、6 mM、12 mM、15 mM のスクロース水溶液に対する反射光強度の変化をマイクロメーター位置が 3.12、3.40、4.00、4.20 でそれぞれの測定結果を Fig. 2.22(b)に示している。この結果により、共鳴角度より低い入射角度で測定する場合、溶液の屈折率の増加に従って、反射光強度は増加し、逆に、共鳴角度より高い入射角度で測定する場合、溶液の屈折率の増加に従って、反射光強度が現象することがわかった。これは、Fig. 2.22(a)に示した理論曲線から得られた結果と一致した。さらに、この測定結果から、マイクロメーター位置は 3.12 の場合において、屈折率の変化に対して、最大の反射光強度の変化が観測され、今後の実験はマイクロメーター位置が 3.12 のスケールにセットして行った。



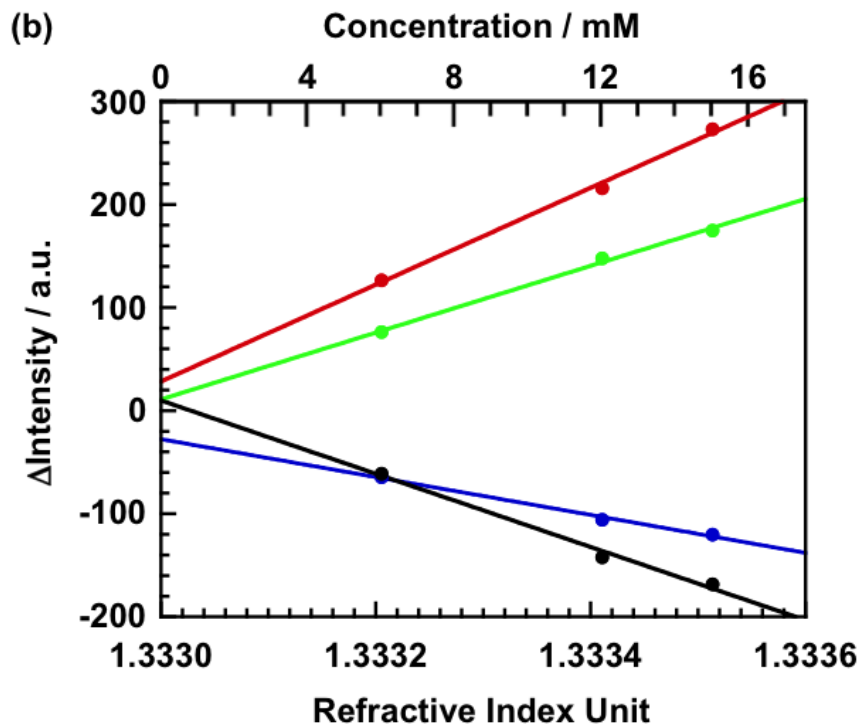
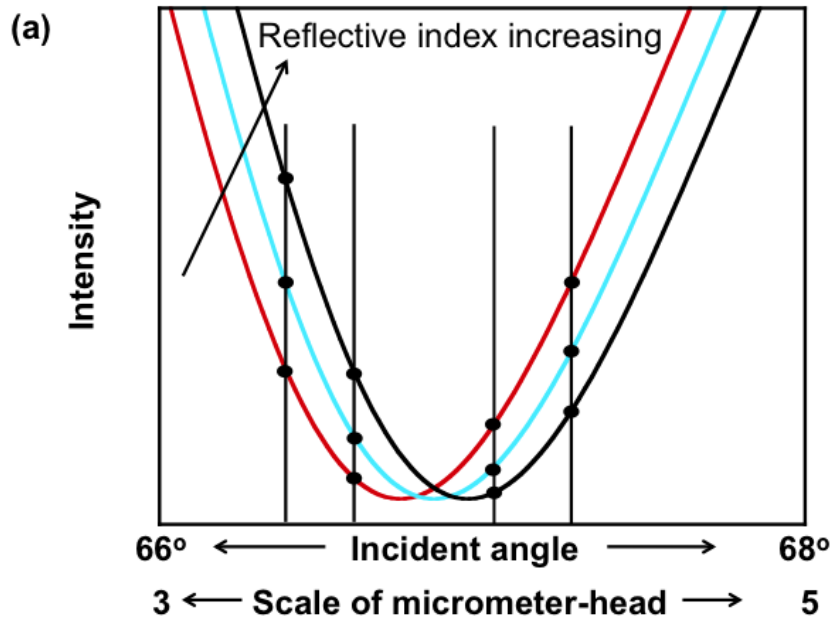


Fig. 2.22(a) マイクロメーター位置が3-5の間における異なる屈折率を持つ溶液のSPR理論曲線。(b) 水、6 mM、12 mM、及び15 mMスクロース水溶液がセンサーチップに流した際起こった反射光強度の変化。また、赤い点(線)はマイクロメーター位置が3.12、緑の点(線)はマイクロメーター位置が3.40、青い点(線)はマイクロメーター位置が4.00 (緑の点(線)はマイクロメーター位置が4.20)にある場合で測定した結果。

### スクロース溶液による 30 個のセンシングストライプでの精度評価

Cr 蒸着法によって作製したセンサーチップを用いて各濃度のスクロース水溶液に対するセンサーグラムを得た。センサーグラムを Fig. 2.23(a)に、センサーグラムから得られたピーク高さをスクロース水溶液の濃度に対してプロットして、得た検量線を Fig. 2.23(b)に示している。このセンサーグラムは各センシングストライプにあるセンシング部位の 5-6 個のピクセルにおける反射光強度の平均値を取ることによって、得られた。また、わかりやすいため、Fig. 2.24(a)と(b)に、一つのストライプから測定したセンサーグラムを及び検量線を示す。さらに、Fig. 2.24(a)に示したインセットは第一回目の 15 mM のスクロース水溶液を注入した際の SPR 応答である。この結果から、台形状の応答が観測され、これは、注入したスクロース水溶液の体積は十分大きく、流路やフローセル内での分散が小さいためである。さらに、開始 150 秒間と終盤 150 秒間のセンサー応答を平均化し、その間の時間(13000 秒)で割ることで、時間による光強度の変化を求め、これをベースラインドリフトとした。この時のドリフト速度は 23.8 digit/h であった。スクロース水溶液をセンサーチップに流した際の反射光強度の変化を反射光強度が最大となった 90 秒間の平均値から水のベースラインからとった 90 秒の平均値を引き算から得られた結果である。また、150 秒の水に対する SPR 応答から、ベースラインのノイズレベルは 7.2 digits ( $9.6 \times 10^{-6}$  RIU) であった。

スクロース水溶液の濃度と反射光強度の間にリニアな関係が得られ、各検量線の相関係数は 0.999 以上となり、良好な線形関係であった。また、5 回の繰り返し実験により、各濃度のスクロース水溶液に対する相対標準偏差 (RSDs) 0.4% - 3.4% であった。このセンシングストライプで得られたスクロース水溶

液の検量線から得られた検出限界(S/N=3)は 1.6 mM、屈折率  $5.5 \times 10^{-5}$  RIU 相当であった。さらに、他のすべてのセンシングストライプから、ほぼ同じような結果が得られた。各センシングストライプは前に述べた理由でベースラインの強度は異なった。各センシングストライプでのドリフト速度は 15.0 - 23.8 digit/h であり、検量線の相関係数は 0.998 - 0.999 であった。また、これらの検量線の傾きの RSD は 4.5 % であり、ノイズレベルは 5.0 - 9.2 digit( $1.0 - 2.0 \times 10^{-5}$  RIU) であり、検出限界は  $3.2 \times 10^{-5} - 5.5 \times 10^{-5}$  RIU であった。また、反射光強度の変化が大きい程、各センシングストライプ間に測定した結果のばらつきが大きくなった。さらに、30 チャンネルで測定したスクローステスト溶液の反射光強度変化を検量線に代入し、濃度を計算した結果、正確さは 100 % - 102 % であった。またその具体的な結果を Table 1 に示している。これらの結果から、すべてのチャンネルはお互いに影響せず、正しく測定できることが確認できた。

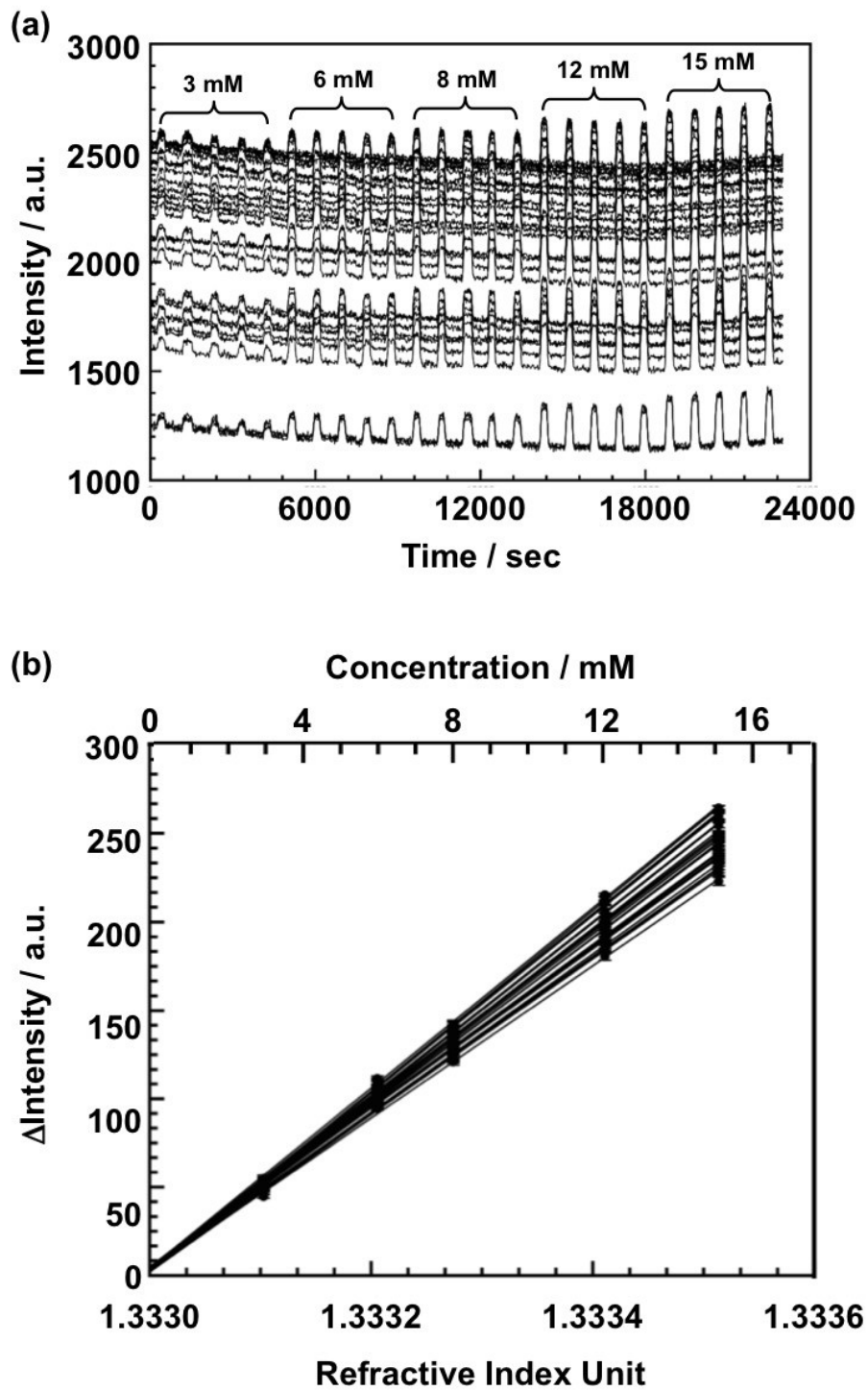


Fig. 2.23 30 個のセンシングストライプを持つセンサーチップにおいて、測定した各濃度のスクロース水溶液に対する (a) センサーグラム及び (b) 検量線。

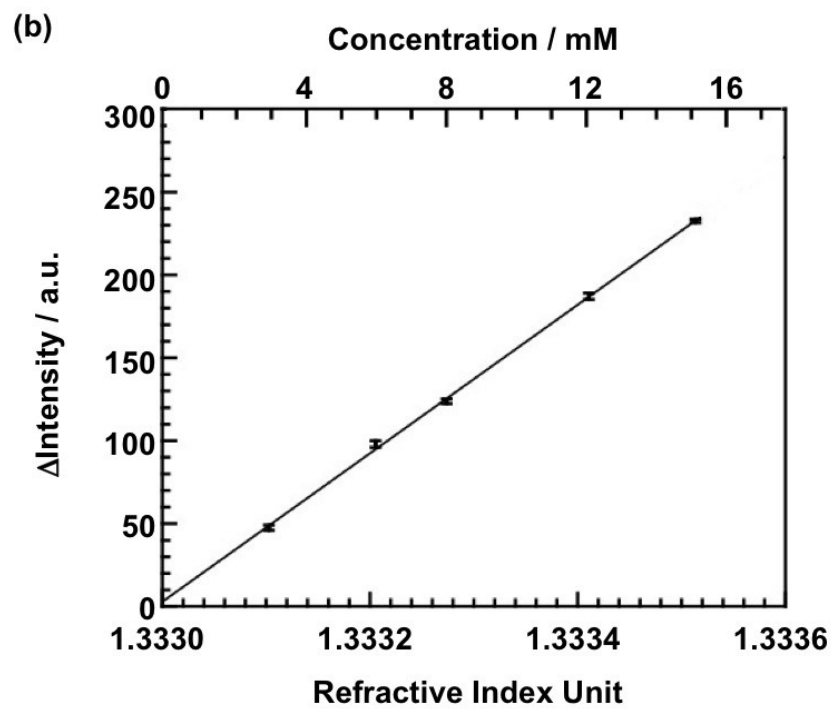
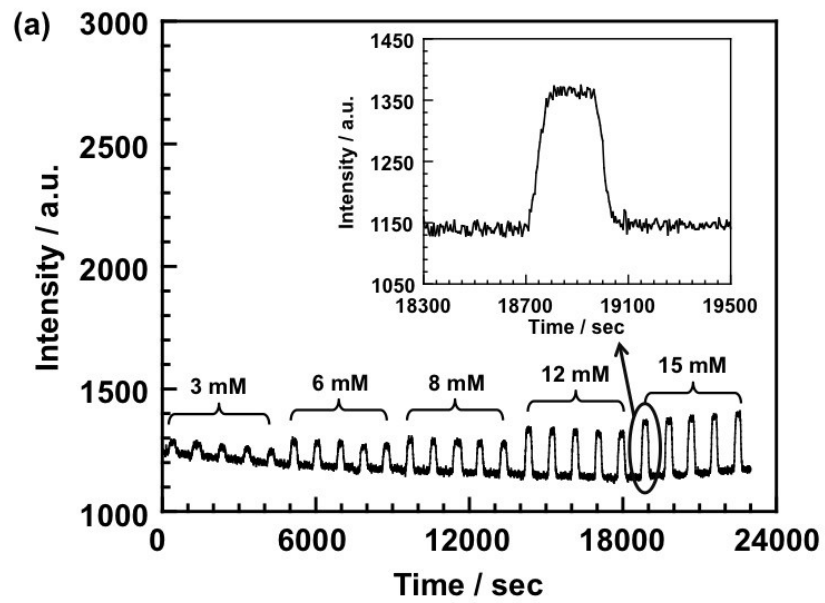


Fig. 2.24 一つのセンシングストライプにおいて、測定した各濃度のスクロース水溶液に対する (a) センサーグラム及び (b) 検量線。

Table 1 10 mM スクロース水テスト溶液の測定結果

Stripe No.	Slope of the calibration line	$\Delta$ Intensity / a.u.	Calculated concentration / mM
1	15.6	158.3 $\pm$ 2.8	10.1 $\pm$ 0.2
2	15.4	156.6 $\pm$ 3.0	10.2 $\pm$ 0.2
3	16.4	163.8 $\pm$ 1.5	10.0 $\pm$ 0.1
4	16.4	163.5 $\pm$ 2.0	10.0 $\pm$ 0.1
5	16.8	170.2 $\pm$ 1.5	10.1 $\pm$ 0.1
6	16.8	170.9 $\pm$ 0.9	10.2 $\pm$ 0.1
7	16.6	168.4 $\pm$ 1.1	10.2 $\pm$ 0.1
8	16.7	168.5 $\pm$ 1.7	10.1 $\pm$ 0.1
9	17.6	176.8 $\pm$ 1.4	10.1 $\pm$ 0.1
10	17.4	174.6 $\pm$ 3.3	10.0 $\pm$ 0.2
11	17.7	179.0 $\pm$ 1.7	10.1 $\pm$ 0.1
12	16.1	161.4 $\pm$ 1.0	10.0 $\pm$ 0.1
13	17.8	179.1 $\pm$ 1.2	10.0 $\pm$ 0.1
14	17.5	175.4 $\pm$ 2.6	10.0 $\pm$ 0.1
15	16.8	168.8 $\pm$ 2.0	10.1 $\pm$ 0.1
16	15.9	160.4 $\pm$ 2.0	10.1 $\pm$ 0.1
17	17.5	177.1 $\pm$ 0.5	10.1 $\pm$ 0
18	17.1	172.5 $\pm$ 2.7	10.1 $\pm$ 0.2
19	16.8	169.6 $\pm$ 2.2	10.1 $\pm$ 0.1
20	17.2	173.1 $\pm$ 0.6	10.1 $\pm$ 0
21	16.6	166.2 $\pm$ 2.2	10.0 $\pm$ 0.1
22	16.1	162.9 $\pm$ 1.3	10.1 $\pm$ 0.1
23	15.9	161.5 $\pm$ 0.1	10.1 $\pm$ 0
24	16.0	162.1 $\pm$ 1.1	10.1 $\pm$ 0.2
25	16.4	166.7 $\pm$ 2.9	10.2 $\pm$ 0.2
26	16.7	168.6 $\pm$ 2.1	10.1 $\pm$ 0.1
27	16.4	166.0 $\pm$ 1.3	10.1 $\pm$ 0.1
28	15.5	158.4 $\pm$ 0.8	10.2 $\pm$ 0.1
29	15.4	152.0 $\pm$ 2.4	10.1 $\pm$ 0.2
30	15.0	152.0 $\pm$ 0.3	10.1 $\pm$ 0

## 2.4 結論

本章では、リニア CCD センサーを検出器とするマルチチャンネル SPR センサーを開発した。従来のマルチチャンネル SPR センサーと比較して、安価であり、ストライプを持つセンサーチップの開発により、ハイスループットで多サンプルの同時測定が可能であることを示した。リニア CCD センサーのピクセルの数とノイズの関係について検討した結果、測定した 4 つ以上のピクセルから取得した反射光強度の平均値が測定値の変動係数は 15 以下に保つには必要である。そのため、用いるセンサーチップの幅は 40  $\mu\text{m}$  以上が必要であることがわかった。本検討により、SPR センサーに適したセンサーチップを開発した。Cr 蒸着法を用いて、最大 30 サンプルの同時測定が可能なセンサーチップを作製した。スクロース水溶液について測定した結果、30 本のセンシングストライプセンサーチップで測定した検出限界は  $3.2 \times 10^{-5} - 5.5 \times 10^{-5}$  RIU であった。10 mM のスクローステスト溶液を測定し、その反射光強度変化を各センシングストライプから得られた検量線に代入し得られた精確さは 100 % - 102 % であり、各センシングストライプはそれぞれ影響せず、独立に測定できることがわかった。

本 SPR センサーシステムは、従来のマルチチャンネル SPR と比較して、安価であり、ハイスループットで多サンプルの検出ができるという利点を有している。

## 参考文献

- 1) J. Homola, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 462.
- 2) H. Bai, R. Wang, B. Hargis, H. Lu, and Y. Li, *Sensors*, **2012**, *12*, 12506.
- 3) C. Esseghaier, A. Ng, and M. Zourob, *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, *41*, 335.
- 4) J. Luczkowiak, S. Sattin, I. Sutkevičiūtė, J. J. Reina, M. Sánchez-Navarro, M. Thépaut, L. Martínez-Prats, A. Daggetti, F. Fieschi, R. Delgado, A. Bernardi, and J. Rojo, *Bioncon. Chem.*, **2011**, *22*, 1354.
- 5) J. Dostálek, J. Příbyl, J. Homola, and P. Skládal, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, *389*, 1841.
- 6) M. Piliarik, M. Vala, I. Tichý, and J. Homola, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 3430.
- 7) M. Vala, K. Chadt, M. Piliatik, and J. Homola, *Sens. Actuators, B*, **2010**, *148*, 544.
- 8) F. Fernández, K. Hegnerová, M. Piliarik, and F. Sanchez-Baeza, *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, *26*, 1231.
- 9) J. Dostálek, and J. Homola, *Sens. Actuators, B*, **2008**, *129*, 303.
- 10) M. Piliarik, L. Párová, and J. Homola, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 1399.
- 11) T. M. Chinowsky, S. D. Soelberg, P. Baker, N. R. Swanson, P. Kauffman, A. Mactutis, M. S. Grow, R. Atmar, S. S. Yee, and C.E. Furlong, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, *22*, 2268.
- 12) C. Puttharugsa, T. WangKam, N. Huangkamhang, O. Gajanandana, O. Himananto, B. Sutapun, R. Amarit, A. Somboonkaew, and T. Sriksirin, *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, *26*, 2341.



- 13) F. Bardin, A. Bellemain, G. Roger, and M. Canva, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 2100.
- 14) A. Hemmi, R. Mizumura, R. Kawanisi, H. Nakajima, H. Zeng, K. Uchiyama, N. Kaneki, and T. Imato, *Sensors*, **2013**, *13*, 801.
- 15) E. Mauriz, A. Calle, A. Montoya, and L. M. Lechuga, *Talanta*, **2006**, *69*, 359.
- 16) I. R. Hooper, M. Rooth, and J. R. Sambles, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *25*, 411.

## 第3章 パターン化した抗体固定化 SPR センサーチップの開発とそれによる

### IgA 及び IgG のイムノアッセイ法への応用

#### 3.1 序論

従来、マルチチャンネル SPR センサーの測定システムに使用されるセンサーチップは概ね二種類ある。その一つは、一枚のベアのセンサーチップをチャンネルの持つフローセルにセットする方法である<sup>1)-4)</sup>。この方法の特徴は作製プロセスが簡単であり、高価な作製装置は不要である。しかし、この方法はチャンネルと同じ数の入出口、送液チューブ、インジェクター及びシリンジポンプが必要である。これは、測定システム全体の大型化の原因になる。もう一つの作製法はマイクロスポッターを用いて作製する方法である<sup>5)-7)</sup>。この作製法は DNA アレイなどを作製する方法であり、フローセルにセットする前に、センサーチップを測定対象のレセプター分子などを修飾することができるため、多数の送液チューブ、インジェクター、シリンジポンプが不要であり、測定システムの大型化が避けられる。しかし、マイクロスポッター装置が大型で高価であり、作製したセンサーは長く保存できないのは欠点である。従って、安価でオンサイトで使用可能なセンサーチップの作製法の開発が望まれている。

遠心力を液体の流れの駆動力とするコンパクトディスク型マイクロチップを利用する分析法が開発されている。この方法は DNA の検出<sup>8)</sup>、イムノアッセイ<sup>9)</sup>、汚染物質の検出<sup>10)</sup>などに幅広く応用されている。その一方、遠心力を駆動力として、ことが可能である(Fig. 3.1)。また、この方法は本研究の対象という SPR センサーのレセプター分子の固定法に有用と考えられる。すなわち、

マイクロスポッターを使う方法より安価あり、微小な流路にレセプター分子を送液することが可能である。ベアのセンサーチップをチャンネルを持つフローセルにセットする方法と比較して、多数の送液用チューブ、シリンジポンプ及びインジェクターが不要であり、測定システム全体の小型化に有利である。

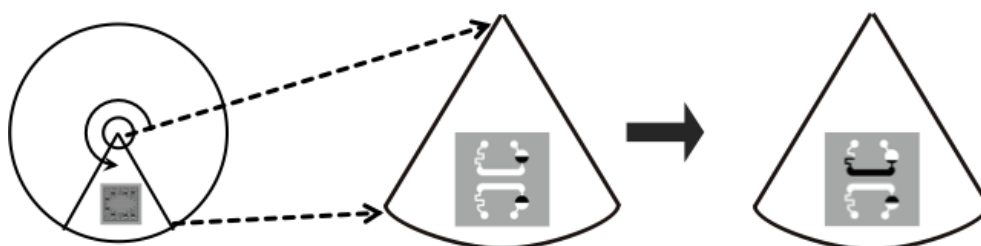


Fig. 3.1 ディスクに置かれたチャンネルがったセンサーチップのチャンネルに送液するイメージ。

## 3.2 実験

### 3.2.1 試薬と材料

スクロースはキシダ化学製のものを使用し、金基板にはエリオテック製、を使用した。ガスケットが NTT アドバンステクノロジー製のものを使用し、Peek チューブが大阪ケミカル製のものを使用した。また、すべての溶液調製の操作には、日本ミリポア社製 Milli-Q システムによって製造した超純水を使用した。100 mM のスクロースストック溶液を 50 mL に 1.7122g のスクロースを溶かし、調製した。その後、このストック溶液を使用して、3 mM、6 mM、8 mM、12 mM、15 mM の標準溶液を調製した。また、同じ溶液の調製法で新たな 100 mM のスクロース水溶液を調製し、10 mM のテスト溶液を調製し、測定を行った。

センサーチップ表面に抗体を固定化するために使用したマイクロチップ用の

ポリジメチルシロキサン(PDMS)はダウコーニング製のもので、Anti-IgA(1000 ppm)、Anti-IgG(粉末)、IgA、IgG は Bethyl Laboratories 製のもの、ブロッキング用牛血清アルブミン(BSA)を和光純薬製のものを使用した。1000 ppm の IgG ストック溶液を 3 mg の IgG 粉末を 3 mL の PBS(pH: 7.4)に溶かし調製した。また、IgA の原液および IgG のストック溶液から IgA / IgG : 5 ppm / 5 ppm, IgA / IgG : 20 ppm / 20 ppm; IgA / IgG : 40 ppm / 40 ppm; IgA / IgG: 50 ppm / 50 ppm; IgA / IgG: 100 ppm / 100 ppm の混合溶液を調製した。さらに、IgA の原液及び IgG のストック溶液から、それぞれの 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm の単独溶液を調製した。

### 3.2.2 8 チャンネルのセンサーチップの作製及びスクロース溶液によるその精度評価

#### 8 チャンネルのセンサーチップの作製

イオンシャワーエッチング法で 8 個センシングストライプを持つセンサーチップ(以下センサーチップと省略)を作製した。Ar のガスの流速 1.4 SCCM であり、加速電圧及び印加電流はそれぞれ 600 V、3.5 mA であった。また、照射時間は 20 min とし、使用したステンレス鋼マスクの寸法及び作製したセンサーチップの写真を Fig. 3.2 の(a)と(b)に示している。また、Fig. 3.2(b)に示した写真に黒く写った部分はガラスであり、金色の金薄膜部分はセンシングストライプである。

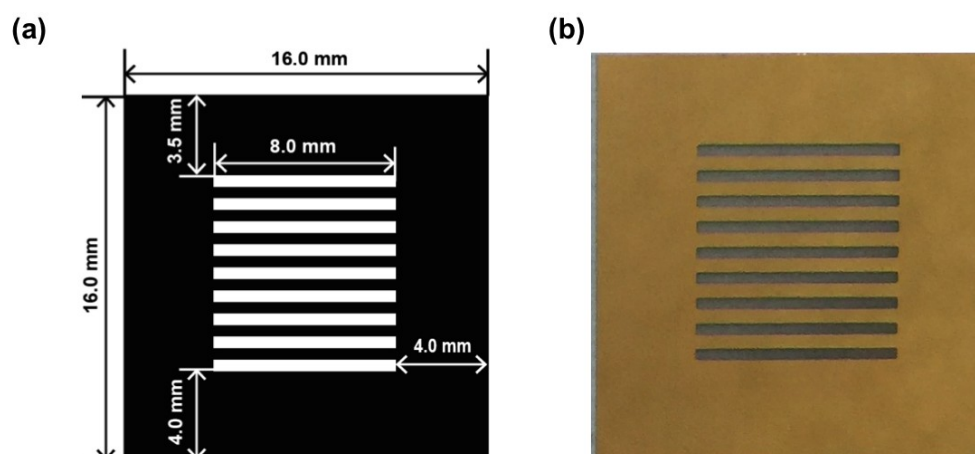


Fig. 3.2 (a) イオンシャワーエッチング用ステンレス鋼マスクのデザイン図及び (b)作製したセンサーチップの写真。

#### スクロース溶液による精度評価

プラズマ処理を施したセンサーチップを 12 min 間プラズマ処理(空气中)を行い、1min 以内にフローセルにセットし、キャリア液として脱気した Milli-Q 水を流した。本測定において、流速は  $40\mu\text{L}/\text{min}$ 、ループ用量は  $120\mu\text{L}$  であり、サンプル試料は 3 mM、6 mM、8 mM、12 mM、15 mM のスクロース水溶液であり、テスト溶液は 10 mM のスクロース水溶液を用いた。また、一つのサンプル試料を 5 回の繰り返し測定を行い、テスト溶液を 3 回の測定を行った。

#### 3.2.3 パターン化した抗体固定化 SPR センサーチップの作製

##### センサーチップへの抗体固定化に使用するマイクロチップの作製

センサーチップ表面に抗体を固定化するために使用するマイクロチップを作製した。これに先立ってテンプレートを先に作製した。また、テンプレートのデザインを Fig. 3.3 に示している。A と G の印はそれぞれ Anti-IgA と Anti-IgG

抗体溶液を入れるリザーバーを示している、このリザーバーの直径は2 mmであった。また、大気圧下で抗体溶液をリザーバーからチャンネルに送液するために孔を設けた。その直る1 mmであった。さらに、チャンネルの幅とその間の距離はそれぞれ600 $\mu$ mと400 $\mu$ mであった。テンプレートの作製法を以下の通りである。

1) あらかじめ、シリコン基板(120 mm),スピncerにセットし、中心にSU-8を6 mL気泡が入らないように慎重に滴下した。

2) スピncerで500 rpmで20秒間、さらに1200 rpmで40秒間回転させ、SU-8をシリコン基板上に均一になるように広げた。

3) レジスト層を乾燥させるため、フォトレジストを均一に塗布したシリコン基板を65 $^{\circ}$ Cに設定したホットプレート上で10分間予熱を行った後、95 $^{\circ}$ Cでさらにソフトベークを行った。その後、ホットプレートから取り出し、空气中で室温になるまで冷やした。

4) バキュームクランプに、レジスト塗布面がフィルム側になるようにシリコン基板をおき、その上からフォトマスクをかぶせ、真空ポンプを用いて密閉した。これを露光機の中にセットし、上側のUVランプを点灯させ、1.5分間露光した。

5) 露光後のガラス基板を65 $^{\circ}$ Cのホットプレートにて3分間加熱した後、さらに95 $^{\circ}$ Cのホットプレートで5分間加熱した。この熱処理を行うことにより、露光

部を硬化させる。また、この操作の目安として、露光後ベークを行うことで、硬化露光された部分が目視できるため、確認されるまでベークを続けた。

6) (5)のステップでの後、シリコン基板をホットプレートから取り出し、室温になるまで待ち、プロピレングリコールモノメチルエーテルアセテートが主成分である SU-8 ディベロッパーを用いて 12 分間現像した。現像後はイソプロパノールを用いてリンスを行う。

7) 現像後のシリコン基板は Fig. 3.3 に示したようなデザインを持つテンプレートとなり、また、SU-8 はシリコン基板から剥離しないように、さらに 15 分間 120°C でハードベークを行った。

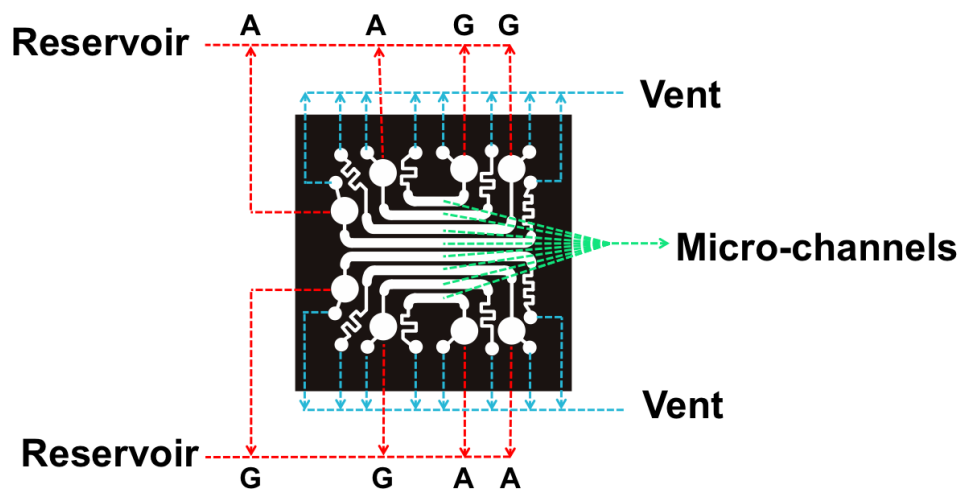


Fig. 3.3 センサーチップを修飾時に使用するマイクロチップの作製のためのテンプレートのデザイン図。

PDMS および Oligomer とその Cross-linker 重量比 10 : 1 の割合で混合し、十分混

せてから気泡がなくなるまで脱気した。また、脱気する間に、テンプレートを Fig. 3.4 に示すようにアクリル板にセットし、流し型を組み立てた。脱気した PDMS を気泡が入らないように流し型に流し、60°Cで8時間オーブンで加熱し、その後、室温になるまで自然冷却した。

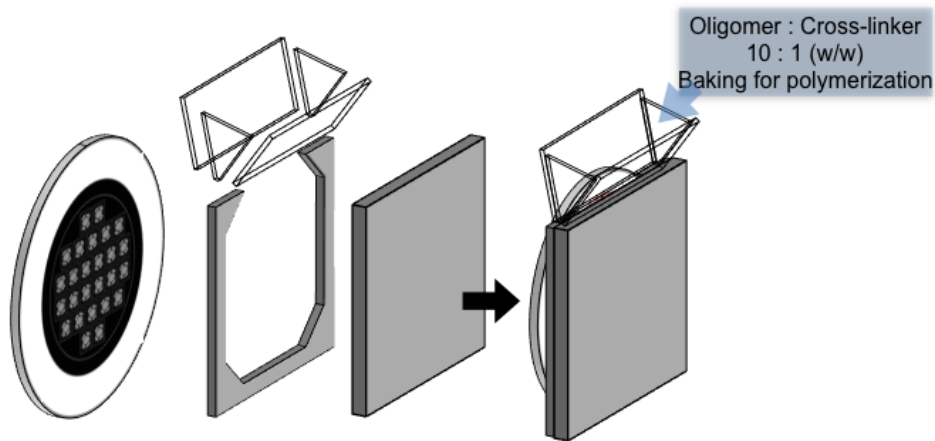


Fig. 3.4 テンプレートとアクリル板で作製した流し型のイメージ図。

### パターン化した抗体固定化 SPR センサーチップの作製

PDMS マクロチップのチャンネルがセンサーチップのセンシングストライプに合うようにセットし、優しく親指でマイクロチップを押し付け、PDMS をセンサーチップにきちんと接着させた。また、接着する部分に気泡がないことをマイクロスコープで確認した。その様子を Fig. 3.5(a)に示している。また Fig. 3.5(b)にはその断面図である。



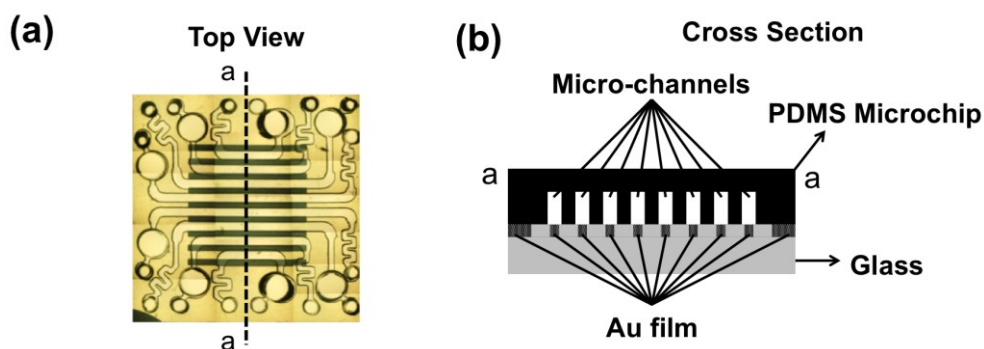


Fig. 3.5 センサーチップを修飾時に使用するマイクロチップを作製する用のテンプレートのデザイン図。

Fig. 3.3 に A と印したリザーバーに 1000 ppm の Anti-IgA / PBS(pH = 7.4)溶液を、Fig. 3.3 に G と印したリザーバーに 1000 ppm の Anti-IgG / PBS(pH = 7.4)溶液をそれぞれマイクロピペットで 3 $\mu$ L を注入した。更に、Fig. 3.6 に示したように、直径 12 cm のポリカボネートディスクにほぼ同じ大きさの無地の PDMS 板を置き、PDMS 板の中心から 4 cm の部分に 20 mm x 20mm の穴を開け、その穴にパターン化した抗体固定化 SPR センサーチップを置いた。セロハンテープでセンサーチップが飛び跳ねないように固定した。センサーチップがを置いたポリカボネートディスク回転台にセットし、約 1600 rpm で 60 s 間回転した。その後、センサーチップを 180°ひっくり返し、更に約 1600 rpm で 60 s 間回転した。その後センサーチップを 15 min 間静置し、チャンネルが縦向なるように 90°回転し、ポリカボネートディスクにセットし、また 1600 rpm で 60 s 間回転し、チャンネルにある抗体溶液を追い出した。PDMS 基板を抗体固定化用センサーチップから剥がし、ブロッキングのために 1000 ppm の BSA 溶液を垂らし、シャーレで蓋をして、15 min 間静置した後、窒素ガスで乾燥し、フローセルにセットした。そのプロセスを Fig. 3.7 に示している。

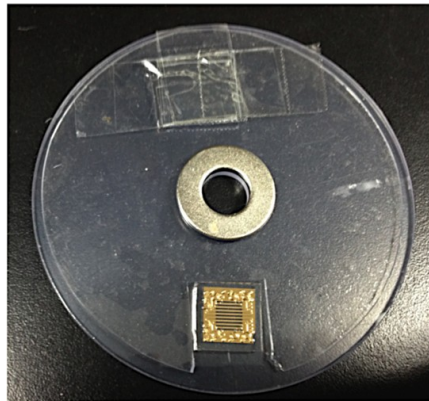


Fig.3.6 パターン化した抗体固定化 SPR センサーチップをポリカーボネートディスク上にセットした写真。

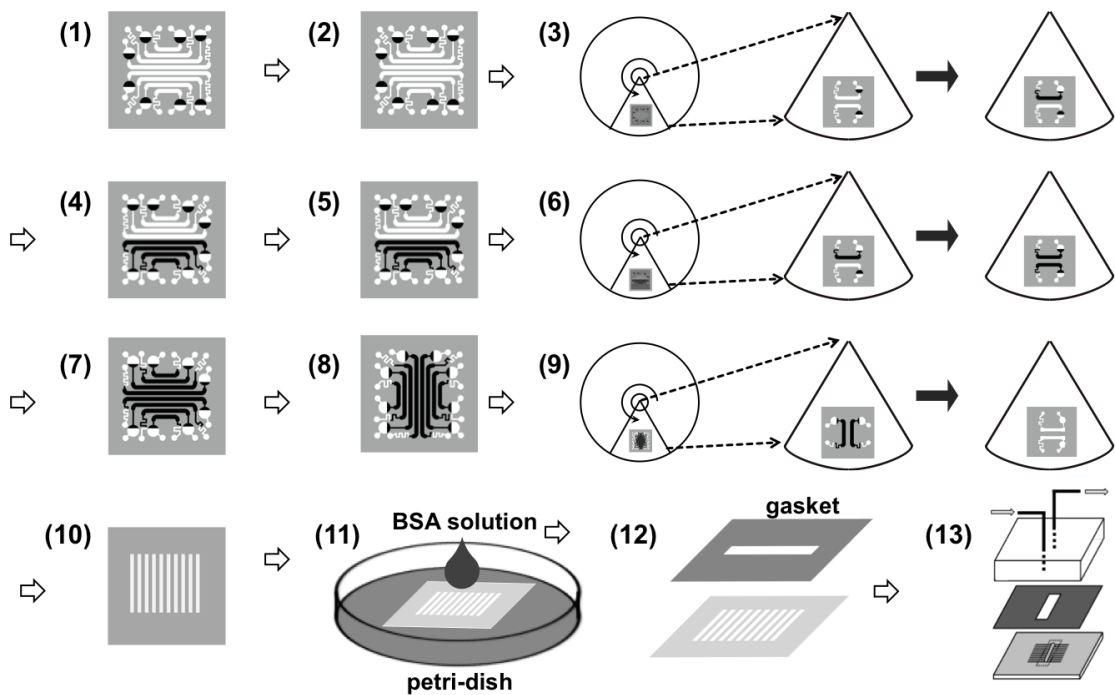


Fig. 3.7 パターン化した抗体固定化 SPR センサーチップ作製プロセス。

### 3.2.4 IgA 及び IgG 単独溶液によるセンサーチップのパターン化の確認

作製センサーチップをフローセルにセットアップした後、SPR センサーにセットし、キャリア液として、pH が 7.4 の PBS 緩衝溶液を使用した。マイクロメ

ーターのメモリを 3.65 に設定した。多層吸着した抗体を洗浄するため、キャリア液を 1 mL/min の流速で 1 min 流し、更に 20  $\mu$ L/min の流速で一時間流した後測定を行った。測定時の流速を 20  $\mu$ L/min に設定した。その後、120  $\mu$ L の 50 ppm の IgA 単独溶液及び 50 ppm の IgG 単独溶液を注入した。

### 3.2.5 IgA 及び IgG の二成分同時イムノアッセイ

フローセルに 120  $\mu$ L の IgA / IgG : 5 ppm / 5 ppm, IgA / IgG : 20 ppm / 20 ppm; IgA / IgG : 40 ppm / 40 ppm; IgA / IgG: 50 ppm / 50 ppm; IgA / IgG: 100 ppm / 100 ppm の混合溶液をそれぞれ低い濃度から注入した。また、この実験を 20  $\mu$ L/min の流速で行った。解離剤として、pH=2 のグリシン-塩酸緩衝溶液を用いた。

### 3.2.6 Anti-IgG 抗体を固定化したセンサチップでの IgA 及び IgG の測定

Anti-IgG 抗体を金基板物理吸着させ、その後、BSA でブロッキングをした。その後、IgA 測定した。また、IgG の測定も同じ方法で行った。一方、IgA 及び IgG 溶液の濃度はいずれも 5 ppm、10 ppm、20 ppm、40 ppm、50 ppm、100 ppm であり、測定に使用した緩衝溶液は PBS(pH: 7.4)緩衝溶液であり、測定条件は 3.2.4 で述べた測定条件と同じである。

新たな抗体を固定したセンサーチップ anti-IgG 抗体を流して固定化を行い、BSA でブロッキングした後、IgA 及び IgG の単独溶液をそれぞれ測定した。また、IgA 及び IgG 溶液の濃度はいずれも 5 ppm、10 ppm、20 ppm、40 ppm、50 ppm、100 ppm であり、測定に使用した緩衝溶液は PBS(pH: 7.4)緩衝溶液であり、測定条件は前で述べた測定条件と同じである。また、測定結果がセンシングストライプ 4, 6, 8 と同じピクセル位置のデータに基づいて計算された。

## 3.3 結果と考察

### 3.3.1 8 チャンネルのセンサーチップの作製法の検討とスクロース溶液による性能評価

本センサーチップにおける水に対する SPR 応答及び 15 mM スクロース水溶液に対する応答を Fig. 3.8 に示している。前章と同じく、ピクセルナンバーに対して、反射光の強度は山状になった。また、15 mM のスクロース水溶液を流したとき、反射光強度の変化が観察された。平均値に使用するセンシングストライプにあるピクセルは前章に述べたように、スクロース水溶液が流した前後、反射光強度の変化はほぼ一緒な所のピクセルを使用した。

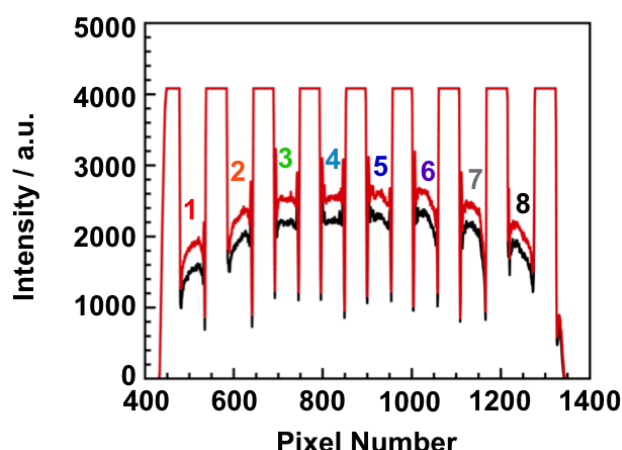


Fig. 3.8 本センサーチップにおける水に対する SPR 応答 (黒い線)及び 15 mM スクロース水溶液に対する応答(赤い線)。

各濃度のスクロース水溶液の測定により、得られたセンサーグラム及び検量線を Fig. 3.9(a)に示している。ピーク高さを前章に述べた方法でまとめた。8 個のセンシングストライプから得られた検量線を Fig. 3.9(b)に示している。各濃度を注入する際に反射光の強度変化はスクロース溶液濃度に対して、相関係数は 0.998~1.000 であり、極めて良好な線形性を示した。また、各濃度の 5 回繰り返しの測定により得た結果により、標準偏差は 0.56% - 1.36%であり、この SPR

センサーは高い再現性を持っていることが分かった。更に、 $S/N=3$  として、検出限界は  $7.54 \times 10^{-6} - 3.16 \times 10^{-5}$  RIU であり、市販の SPR センサーと匹敵できる精度を持っていることが分かった。また、Fig. 3.3 の(b)に示した水に対する SPR センサーの応答から、各チャンネルにおける反射光の強度にばらつきがあることがわかった同じ濃度のスクロース水溶液に対する反射光強度変化の RSD はほぼ 6 %であった。その結果のより、各チャンネルが各スクロース溶液濃度に対する反射光強度の変化も異なると考えられ、すべてのチャンネルにおける測定の再現性を確認する必要がある。そのため、10 mM のスクロース溶液を注入する、測定を行った。得られた反射光強度を検量線に代入し、相応するスクロース溶液濃度を計算し、99% - 102 %の正確さを得られた。この結果によって、すべてのチャンネルでは高い再現性が得られ、それぞれのセンシングストライプはお互いに影響しないことが確認でき、イムノアッセイへの応用が可能である。

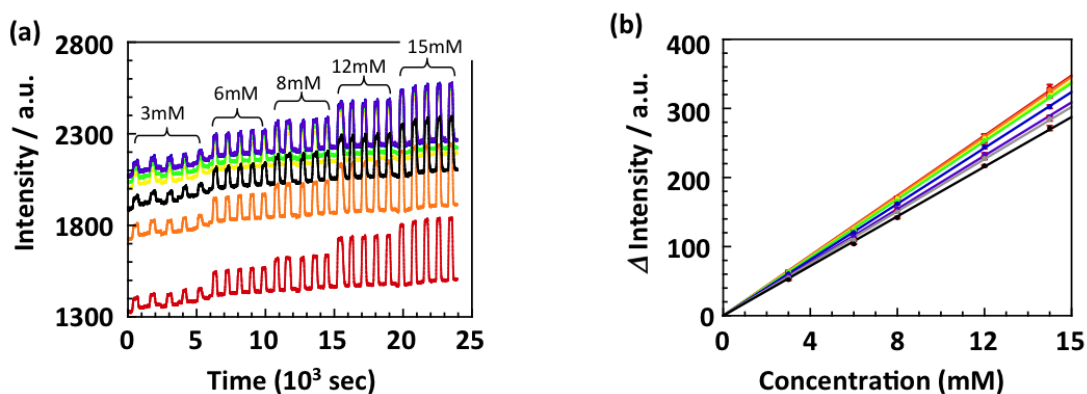


Fig. 3.9 (a) 濃度の異なるスクロース溶液に対する 8 チャンネルでのセンサグラムと (b) 検量線。

### 3.3.2 IgA 及び IgG 単独溶液によるセンサーチップのパターン化の確認

単独溶液 IgA を注入した際に各ピクセルにおける SPR 応答を Fig. 3.10(a) に

示し、単独溶液 IgG を注入した際に各ピクセルにおける SPR 応答を Fig. 3.10(b) に示している。Fig. 3.10 (a)から、すべてのストライプにおいて、IgA に対する応答が観測された。これらの結果は固定化が失敗したと示唆している。一方、IgG 単独溶液を流した際の結果(Fig. 3.10(b))から、反射光強度の変化がストライプ 2, 4, 6, 8 にしか観測されず、ストライプ 1, 3, 5, 7 における反射光強度の変化が観測されなかった。これらの結果は抗体の固定化が正しく行われたと示唆している。よって、固定化が正確に行われているかを確認するため、ストライプ 1 と 2 を選択し、IgA 及び IgG の単独溶液がそれぞれセンサチップに流している際のセンサグラムをまとめた。50 ppm の IgA 溶液がストライプ 1 に流した際のセンサグラムが Fig. 3.11 (a)に示しており、50 ppm の IgG 溶液がストライプ 2 に流した際のセンサグラムが Fig. 3.11 (b)に示している。この結果により、ストライプに 1 は IgA のみに反応性を示し、IgG に反応性を示さなかった。これは、anti-IgA が正しく標的な場所(ストライプ 1)に固定されたことを意味する。一方、ストライプ 2 において、IgA、IgG に対して、両方とも反応性を示した。これは、Fig. 3.10 にて得られた結果と一致する。これらの結果から、anti-IgA 及び anti-IgG 交代がすべて所定されている場所に固定されているが、ストライプ 2 において、anti-IgG 抗体は IgA 及び IgG に対して、両方も反応性を示したことが考えられる。のは、anti-IgG は IgA と IgG 両方とも反応し、交差反応が発生したと考えられる。したがって、IgA 及び IgG の二成分同時免疫アッセイに対して、前もって、IgA 及び IgG それぞれの単独測定が必要である。

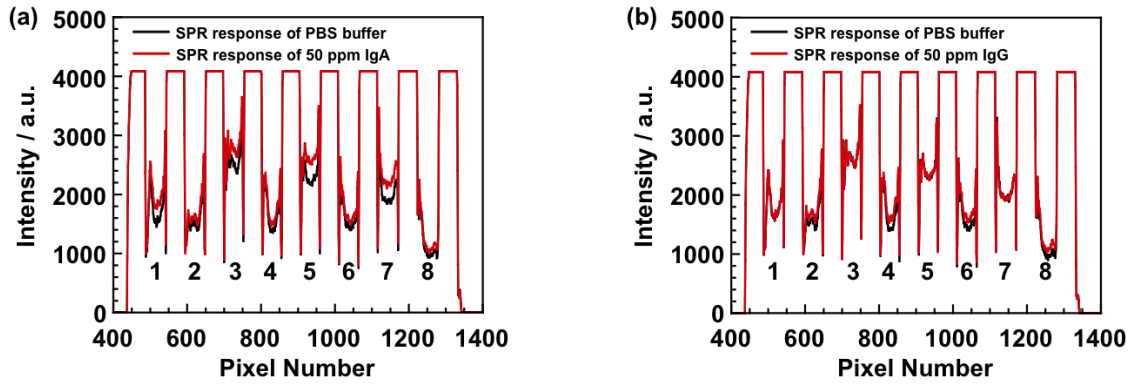


Fig. 3.10 各ピクセルにおける (a) IgA 単独溶液 50 ppm を注入する際 SPR 応答, (b) IgG 単独溶液 50 ppm を注入する際 SPR 応答。

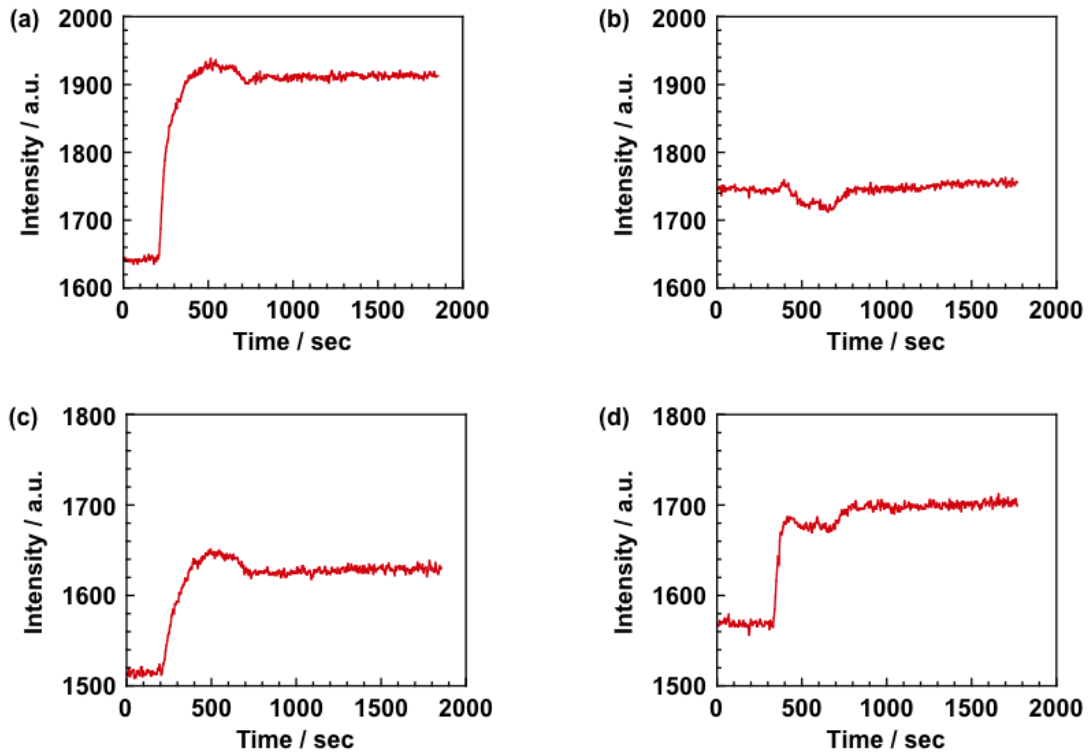


Fig. 3.11 センシングストライプ 1 における (a) IgA 単独溶液 50 ppm を注入する際のセンサグラム, (b) IgG 単独溶液 50 ppm を注入する際のセンサグラム, センシングストライプ 2 における (c) IgA 単独溶液 50 ppm を注入する際のセンサグラム, (d) IgG 単独溶液 50 ppm を注入する際のセンサグラム。

### 3.3.3 IgA 及び IgG の二成分同時イムノアッセイ

各濃度混合溶液の測定により得られた Stripe 1, 3, 5, 7 でのセンサグラムと Stripe 2, 4, 6, 8 はそれぞれ Fig.3.11(a)と(b)に示している。また、ストライプにおいて、交差反応が起こったため、こちらのデータに関して、後ほど検討する。まず、Stripe 1, 3, 5, 7 でのセンサグラムは anti-IgA と IgA の抗原-抗体反応の測定結果について検討する。

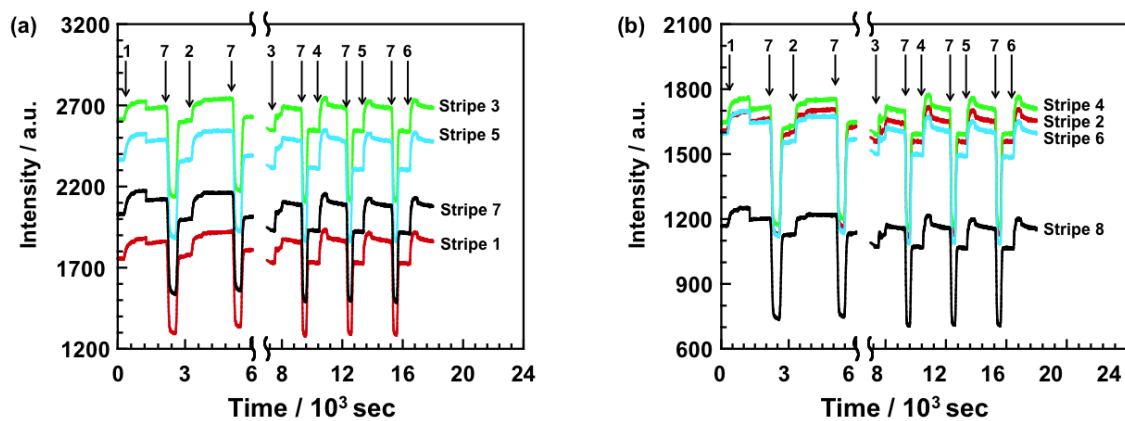


Fig. 3.12 (a) センシングストライプ 1, 3, 5, 7 から得られたセンサグラム及び (b) センシングストライプ 2, 4, 6, 8 から得られたセンサグラム (1: 5 ppm, 2: 10 ppm, 3: 20 ppm, 4: 40 ppm, 5: 50 ppm, 6: 100 ppm, 7: Gly-HCl).

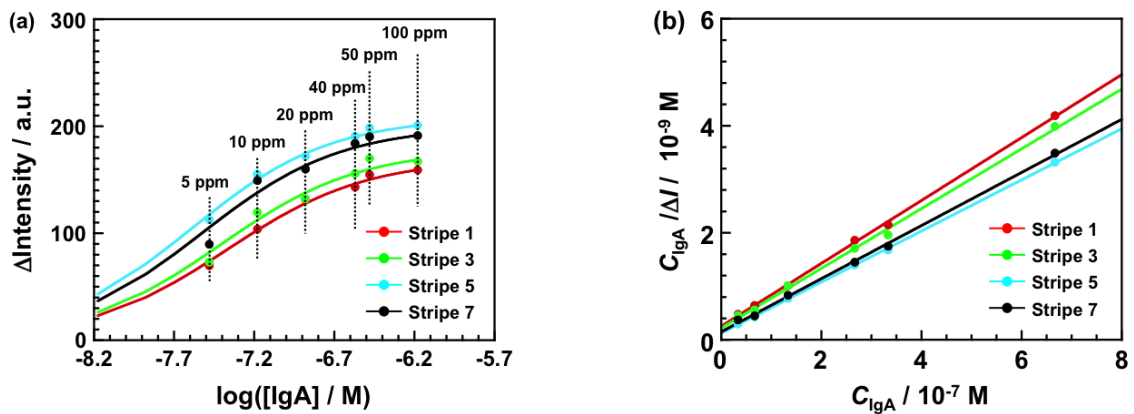


Fig. 3.13. センシングストライプ 1, 3, 5, 7 における (a) IgA の検量線と (b) ラングミュアプロット。



Fig. 3.12 (a) に示したセンサグラムから得られた IgA の検量線によって、結合定数がラングミュア吸着式により計算された。また、その計算法は以下の通りになっている。



$$K = \frac{[\underline{Ab-Ag}]}{[\underline{Ab}][Ag]} \quad (2)$$

アンダーバーはセンサーチップに吸着したものを意味する。[Ag]は抗原のモル濃度を意味し、[Ab]及び[Ab-Ag]はそれぞれセンサーチップに固定された抗体、免疫複合体の濃度を意味する。センサーチップに固定した抗体の表面濃度の物質収支から、次の式が考えられる。

$$[\underline{Ab}]^T = [\underline{Ab}] + [Ab - Ag] \quad (3)$$

$[\underline{Ab}]^T$ は抗体の全表面濃度を意味する。式(1)–(2)から、次のしきが得られる。

$$\frac{[\underline{Ab-Ag}]}{[\underline{Ab}]^T} = \frac{KC_{Ag}}{1+KC_{Ag}} \quad (4)$$

$C_{Ag} \cong [Ag]$ は溶液中の抗原最初の濃度である。

本 SPR センサーでは、表面屈折率の変化は反射光強度の変化によって検出されるため、次の式が考えられる。

$$\frac{[Ab]}{[Ab]^T} = \frac{\Delta I}{\Delta I_{max}} \quad (5)$$

$\Delta I_{max}$  はセンサーチップに固定された抗体はすべて抗原と反応する場合の反射光強度変化である。式(3)と(4)から、

$$\frac{C_{Ag}}{\Delta I} = \frac{C_{Ag}}{\Delta I_{max}} + \frac{1}{K\Delta I_{max}} \quad (6)$$

が得られる。 $\Delta I_{max}$  と  $K$  はそれぞれ  $C_{Ag}$  と  $C_{Ag}/\Delta I$  から引いた直線(ラングミュアプロット)の傾きと切片から得られる。本研究で得られた結果が式(5)によってまとめたセンシングストライプ 1, 3, 5, 7 のラングミュアプロットを Fig. 3.13(b)に示している。これらラングミュアプロットからそれぞれのセンシングストライプから得られた  $K$  と  $\Delta I_{max}$  が計算され、その結果を Table 3.1 に示している。各センシングストライプでの  $\Delta I_{max, IgA}$  の RSD は 8.97 %であった。この結果から、各センシングストライプでは、固定した抗体の量はほぼ同じだと考えられる。一方、センシングストライプ 2, 4, 6, 8 において、交差反応が起こったため、IgA 及び IgG の単独の測定結果から、IgA と IgG の同時イムノアッセイの結果を評価しなければならない。今回の研究に於いて、センシングストライプ 4, 6, 8 の結果について検討を行った。IgA 及び IgG を単独に測定する際に得られたセンサグラムを Fig. 3.14(a)と(b)に示しており、それによって得られた検量線を Fig. 3.15 (a)と(b)に示している。更に、得られた検量線によって、前述した計算法により結合定数及び  $\Delta I_{max}$  を計算した。IgA と IgG のラングミュアプロットを Fig. 3.16 (a)と(b)に示している。また、計算された結果を Table 3.1 に示している。

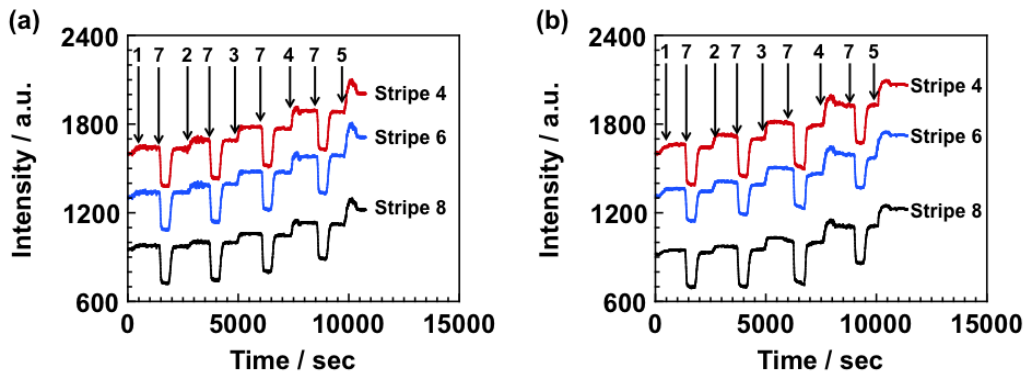


Fig. 3.14 センシングストライプ 4, 6, 8 から得られた (a) IgA のセンサグラム及び (b) IgG のセンサグラム。(1: 5 ppm, 2: 10 ppm, 3: 20 ppm, 4: 40 ppm, 5: 50 ppm, 6: 100 ppm, 7: Gly-HCl.)

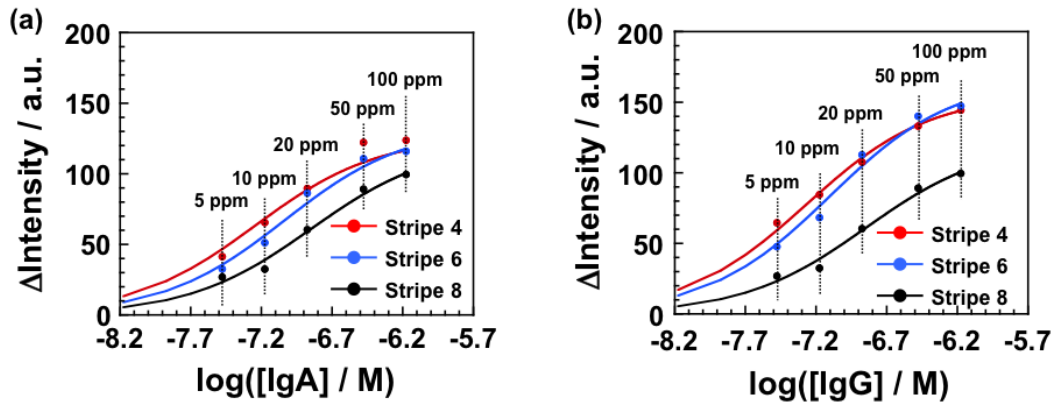


Fig. 3.15 センシングストライプ 4, 6, 8 から得られた (a) IgA の検量線及び (b) IgG の検量線。

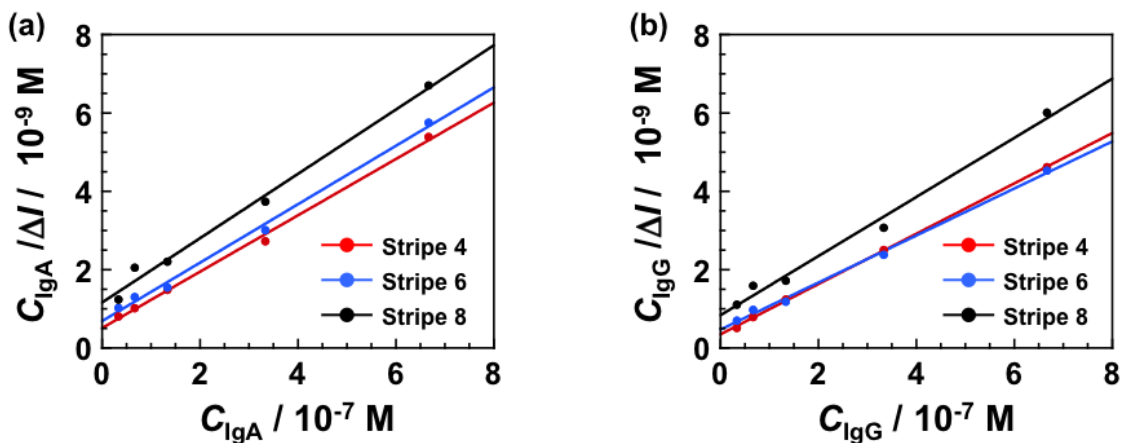


Fig. 3.16 センシングストライプ 4, 6, 8 から得られた検量線によって計算シヤ (a) IgA のラングミュアプロット及び (b) IgG のラングミュアプロット。

また、センシングストライプ 4, 6, 8 における交差反応での  $K$  及び  $\Delta I_{max}$  を以下の考え方で計算した。IgA を  $Ag_1$  とし、IgG を  $Ag_2$  とし、それぞれの反応式を次の 2 つの式だと考えられる。



この場合、2 つ抗原-抗体反応の反応係数は次の式で計算できる。

$$K_1 = \frac{[\underline{Ab-Ag_1}]}{[\underline{Ab}][Ag_1]} \quad (9)$$

$$K_2 = \frac{[\underline{Ab-Ag_2}]}{[\underline{Ab}][Ag_2]} \quad (10)$$

アンダーバーはセンサーチップに吸着したものを意味する。 $[Ag_x]$  ( $x=1,2$ ) は IgA(1) または IgG(2) のモル濃度を意味し、 $[\underline{Ab}]$  及び  $[\underline{Ab-Ag}]$  はそれぞれセンサーチップに固定された抗体、免疫複合体の濃度を意味する。センサーチップに固定した抗体の表面濃度の物質収支から、次の式が考えられる。

$$[\underline{Ab}]^T = [\underline{Ab}] + [\underline{Ab-Ag_1}] + [\underline{Ab-Ag_2}] \quad (11)$$

$[\underline{Ab}]^T$  は抗体の全表面濃度を意味する。式(9) – (11) から、次の式が得られる。

$$([\underline{\text{Ab-Ag}}_1] + [\underline{\text{Ab-Ag}}_2]) / [\underline{\text{Ab}}]^T = (K_1 \cdot C_{\text{Ag},1} + K_2 \cdot C_{\text{Ag},2}) / (1 + K_1 \cdot C_{\text{Ag},1} + K_2 \cdot C_{\text{Ag},2}) \quad (12)$$

[Ag<sub>1</sub>]と[Ag<sub>2</sub>] を IgA 及び IgG の濃度である C<sub>Ag,1</sub> と C<sub>Ag,2</sub> だと考えられる。本 SPR センサーでは、表面屈折率の変化は反射光強度の変化によって検出されるため、次の式が考えられる。

$$([\underline{\text{Ab-Ag}}_1] + [\underline{\text{Ab-Ag}}_2]) / [\underline{\text{Ab}}]^T = \Delta I / \Delta I_{\text{max}} \quad (13)$$

$\Delta I_{\text{max}}$  はセンサーチップに固定された抗体はすべて抗原と反応する場合の反射光強度変化である。式(11)と(12)から、

$$(K_1 \cdot C_{\text{Ag},1} + K_2 \cdot C_{\text{Ag},2}) / \Delta I = (1 + K_1 \cdot C_{\text{Ag},1} + K_2 \cdot C_{\text{Ag},2}) / \Delta I_{\text{max}} \quad (14)$$

本研究において、混合溶液中の IgA 及び IgG は同濃度であるため、 $C_{\text{Ag},1} = C_{\text{Ag},2} = C_{\text{Ag}}$ 、よって、次の式が得られる。

$$C_{\text{Ag}} / \Delta I = C_{\text{Ag}} / \Delta I_{\text{max}} + 1 / (\Delta I_{\text{max}} \cdot (K_1 + K_2)) \quad (15)$$

また、IgA 及び IgG をそれぞれ単独測定時得られた  $K$  を用いて、式(15)を用いて、フィッティングをし、その結果を Fig. 3.17 に示している。この結果によって、単独溶液で測定下結合定数を式(15)に代入し、フィッティングした結果

はストライプ 4, 6, 8 に測定した結果と一致した。これは、ストライプ 4, 6, 8 に  
は交差反応が起こったと確認でき、本センサチップが実用できると考えられる。

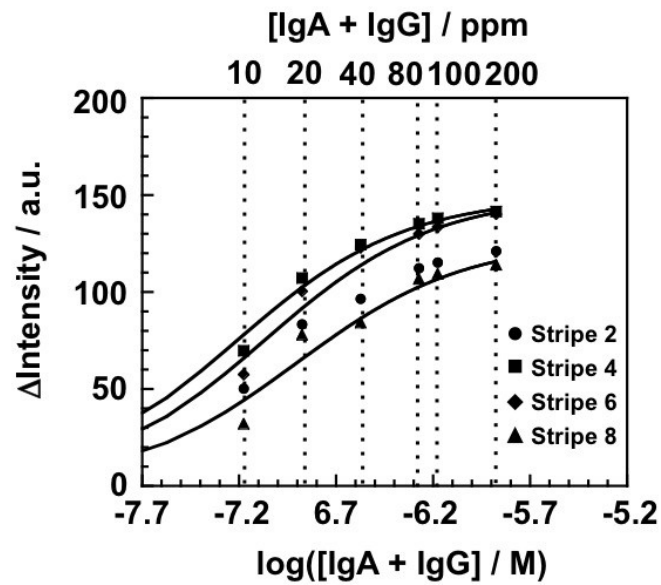


Fig. 3.17 センシングストライプ 4, 6, 8 から得られた検量線

Table 1 単独溶液を用いて測定した  $K$  と  $\Delta I_{\max}$  の値

*StripeNumber	Anti-IgA antibody*		Anti-IgG antibody**			
	$K_{\text{IgA}} / \text{M}^{-1}$	$\Delta I_{\max \text{ IgA}} / \text{a.u.}$	$K_{\text{IgA}} / \text{M}^{-1}$	$\Delta I_{\max \text{ IgA}} / \text{a.u.}$	$K_{\text{IgG}} / \text{M}^{-1}$	$\Delta I_{\max \text{ IgG}} / \text{a.u.}$
1	$1.9 \times 10^7$	172	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	$2.8 \times 10^7$	179	-	-	-	-
4	-	-	$1.4 \times 10^7$	139	$1.8 \times 10^7$	156
5	$4.6 \times 10^7$	208	-	-	-	-
6	-	-	$1.1 \times 10^7$	134	$1.3 \times 10^7$	166
7	$2.5 \times 10^7$	200	-	-	-	-
8	-	-	$0.7 \times 10^7$	122	$0.9 \times 10^7$	139
Average	$3.0 \times 10^7$	190	$1.0 \times 10^7$	132	$1.3 \times 10^7$	154

\* The anti-IgA antibody was immobilized on the sensor stripes No. 1, 3, 5, and 7.

\*\*The anti-IgG antibody was immobilized on the bare sensor chip and values were obtained from the sensor response to IgA and IgG observed at the pixels corresponding to each sensing stripes No. 4, 6, and 8.

### 3.4 結論

本章において、イオンシャワーエンチング法によって、8本のセンシングストライプを持つセンサーチップを作製した。さらに、異なるスクロースの水溶液及びテスト溶液を用いて、このセンサーチップが本研究で設計した SPR センサーでの検出限界及び正確さを確認した。また、スクロースの水溶液の測定から、このセンサーチップは本研究で設計した SPR センサーでの検出限界は  $7.54 \times 10^{-6} - 3.16 \times 10^{-5}$  RIU であり、正確さは 99 – 102 %であった。この結果から本センサーチップはイムノアッセイへの応用の可能性を確認した。さらに、遠心

力を駆動力として、anti-IgA 及び anti-IgG を交互にセンサーチップに固定した。それぞれの抗原の単独溶液より、固定化が確実に正しく行ったことが確認でき、イムノアッセイを行った。その結果で計算した $\Delta I_{max}$ から、anti-IgA を固定したセンシングストライプ 1、3、5、7において、ほぼ同じ量の anti-IgA が固定されセンシングストライプ 2、4、6、8 で交差反応が起こり、IgA と IgG の単独測定によって、測定が正しく行い、本センサチップが実用できると考えられる。最後に、結果から、各センシングストライプでの IgA-anti-IgA 及 IgG-anti-IgG の  $K$  を計算し、イムノグロブリン類の  $K$  とほぼ一致したことが確認できた。



## 参考文献

- 1) H. Kawazumi, K. V. Gobi, K. Ogino, H. Maeda, and N. Miura, *Sens. Actuators, B*, **2005**, *108*, 791.
- 2) S. J. Kim, K. V. Gobi, H. Iwasaka, H. Tanaka, and N. Miura, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, *23*, 701.
- 3) M. Vala, K. Chadt, M. Piliarik, and J. Homola, *Sens. Actuators, B*, **2010**, *148*, 544.
- 4) C. Liu, H. Shi, Z. Liu, and Y. He, *Plasmonics*, **2014**, *9*, 513.
- 5) F. Bardin, A. Bellemain, G. Roger, and M. Canva, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 2100.
- 6) J. Dostálek, J. Homola, and M. Miler, *Sens. Actuators, B*, **2005**, *107*, 154.
- 7) P. Y. Li, B. Lin, J. Gerstenmaier, and B. T. Cunningham, *Sens. Actuators, B*, **2004**, *99*, 6.
- 8) G. Jia, K.S. Ma, J. Kim, J. V. Zoval, R. Peytavi, M. G. Bergeron, and M. J. Madou, *Sens. Actuators, B*, **2006**, *114*, 173.
- 9) L. Riegger, M. Grumann, T. Nann, J. Riegler, O. Ehlert, W. Bessler, K. Mittenbuehler, G. Urban, L. Pastewka, T. Brenner, R. Zengerle, and J. Ducreé, *Sens. Actuators, A*, **2006**, *126*, 455.
- 10) S. Guo, R. Ishimatsu, K. Nakano, and T. Imato, *Talanta*, **2015**, *133*, 100.
- 11) M. Tanaka, Y. Li, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, K. Sakamoto, and T. Imato, *J. Flow Injection Anal.*, **2008**, *25*, 172.

## 第4章 三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を利用するボトムアップ表面修飾法による SPR センサーチップ作製法の開発

### 4.1 緒言

SPR センサーでイムノアッセイを行う際、測定対象を認識して相互作用する抗体の配向性や密度はセンサーの性能に大きな影響を及ぼす。現在、主に使われている方法として、カルボキシル基を持つチオールを金基板にジスルフィド結合により結合し、カルボキシル基を抗体にあるアミンと反応させ、ペプチドを形成することによって、抗体を固定する方法、ビオチン末端を持つチオールを金基板に結合し、アビジンと結合せ、さらにビオチル化した抗体がと反応させる手法がある<sup>1)-3)</sup>。しかし、この方法では、チオールは直接に金基板に結合し、直鎖状のコンフォメーションをとって、お互いにある隙間を埋めるような配向するため、飽和吸収が基本であり、固定化量のコントロールができないなどの欠点がある。また、固定化量をコントロールするのに、金基板に結合している面積が自由に制御できる分子が望ましい。一方、DNA は化学的に安定である特性を持ち、自由に塩基配列のものを合成できるため、DNA は分子認識に使用され、機能性を持つ高次構造に設計されてきた。その中 DNA origami と四面体 DNA 構造の典型的な例である<sup>4),5)</sup>。また、本研究室で、決まった三種類の s-オリゴ DNA を組み合わせ、オリゴ DNA 配列の部分が一本鎖のまま金基板と結合し、他の塩基が二重鎖を作り、三員性のナノ会合体作ることで、金基板と結合する面積をコントロールする。さらに、先ほど述べた三員性のナノ会合体に認識部位を加えると、測定対象を認識して相互作用する抗体の配向性や密度をコ

ントロールする三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を設計した<sup>6)</sup>。本研究において、本研究室で設計した三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を作って、SPR への応用を検討した。

## 4.2 実験

### 4.2.1 試薬と材料

DNA ヌクレオチドは北海道システム・サイエンス製のものを使用し、配列は Fig. 4.1 に示している。また各配列の DNA ヌクレオチドを酢酸バッファー(0.2 M pH: 4.1, 2M NaCl 含む)に溶かし、100  $\mu$ M のストック溶液を作製した。また、3 mg のストレプトアビジンを 3 mL の酢酸バッファー(0.2 M pH: 5.2)に溶かし、1000 ppm の溶液を作製した。さらに、IgA もの酢酸バッファー(0.2 M pH: 5.2)で 500 ppb、2 ppm、5 ppm、10 ppm、20 ppm、50 ppm、100 ppm になるように薄め、ビオチ標識 anti-IgA を 100 ppm に薄めた。

t1 5' - CTTCCTCCTTCCTCCTTACATTCTTAAGTCTGAAACsATsTAsCAsGCs  
GAGAAGAGCCGCCATAGTATTCTCCTTCCTCCTTCTTGTATCCAGT  
GGCTCA - 3'

t2 5' - TACTATGGCGGCTCTTCACsATsTAsCAsGCsAGATGCGAGGGTCCAATA  
CTTGGAGGAAGGAGGAAG - 3'

t3 5' - TACTATGGCGGCTCTTCACsATsTAsCAsGCsAGATGCGAGGGTCCAATA  
CTTGGAGGAAGGAGGAAG - 3'

t4 5' - biotin-TGAGCCACTGGATAC - 3'

Nsはホスホチオエードを表す

Fig. 4.1 DNA オリゴヌクレオチドの配列

#### 4.2.2 三員性三角錐型 DNA ナノ会合体の調製

Fig. 4.1 に示した配列の DNA ストック溶液をそれぞれ 1  $\mu\text{L}$  をとり、96  $\mu\text{L}$  の酢酸バッファーに溶かし、混合した。この混合溶液を 80°C で 10 分間加熱した後、0.5°C/min の速度でアニーリングを行い、構造体を作製した。また、構造体の作製のイメージ図を Fig. 4.2 に示している。このようにして、三種類の s-オリゴ DNA のうち一本にターゲット認識部位を導入するとともに、先に生成した二重鎖と Hoogsteen 水素結合を介して三重鎖<sup>7)</sup>を形成させ、三員性三角錐型の DNA ナノ会合体を得た。

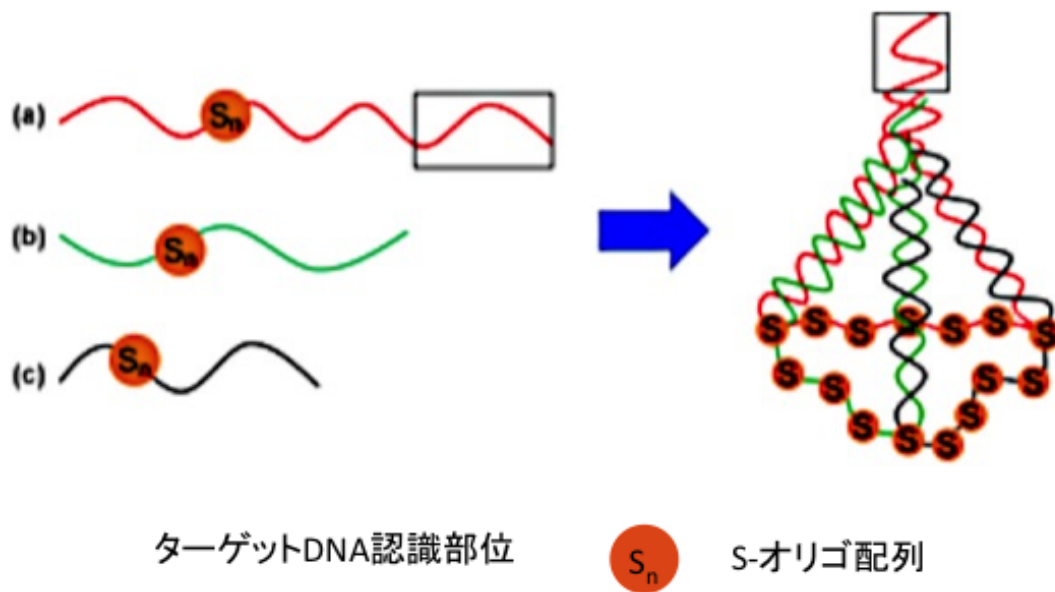


Fig. 4.2 DNA 会合体を作製するイメージ図。

#### 4.2.3 三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を利用する抗体固定化センサーチップの 作製とそれによる IgA の SPR 測定

三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を利用する抗体固定化センサーチップの作製とそれによる IgA の SPR 測定手順を Fig. 4.3 に示している。ピラニア処理を施した金基板に 30  $\mu\text{L}$  の DNA 会合体溶液を滴下し、6 時間湿潤な環境で静置し、その後、クリーンワイプで溶液を吸い出し、前章に述べたように、フローセルにセットし、SPR 測定を行った。このときのキャリアー液は酢酸バッファー(0.2 M pH: 5.2)であり、流速は 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  であった。フローセルに 100 ppm のビオチン標識 anti-IgA を注入し、金基板に到達したら、ポンプを止め、30 分間反応した。その後、ポンプを再開し、1 ppm、2 ppm、5 ppm、10 ppm の IgA 溶液を濃度が薄いほうから順に注入し、測定を行った。

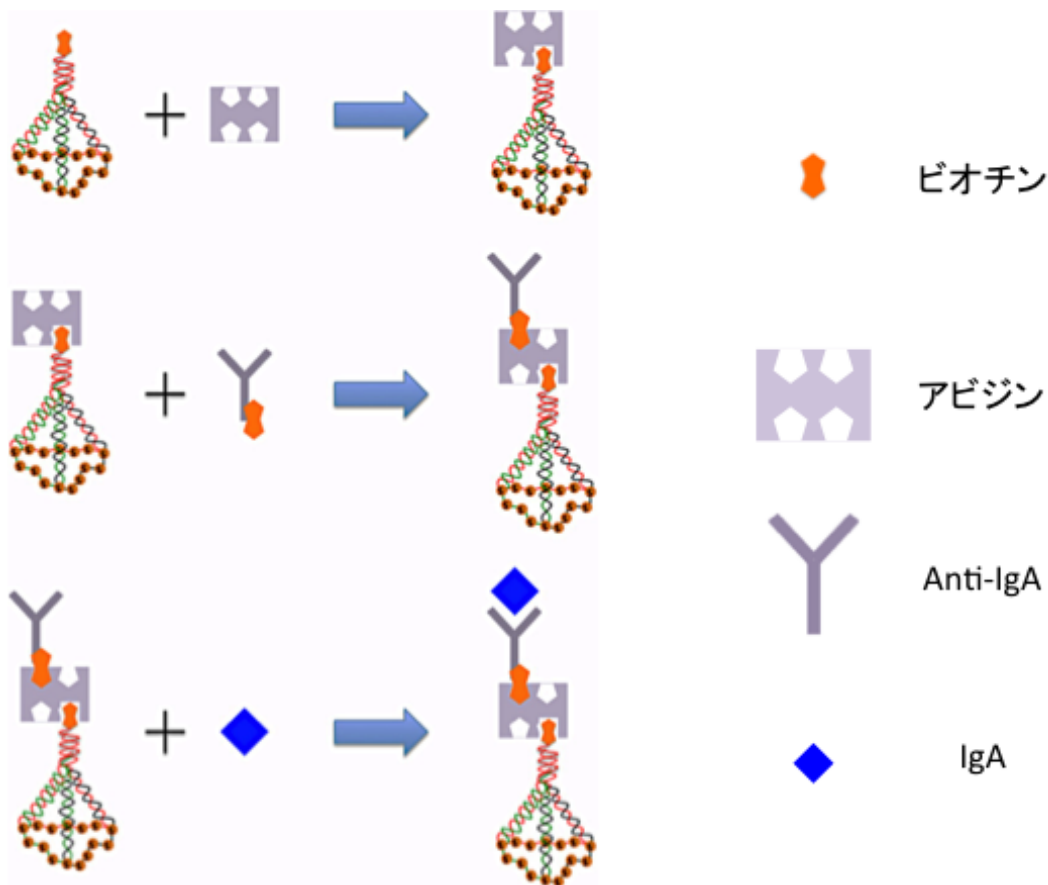


Fig. 4.3 三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を利用する抗体固定化センサーチップの作製とそれによる IgA の SPR 測定手順。

一方、比べ対象で、金基板に直接ストレプトアビジンを 1 時間物理吸着させ、その後クリーンワイプで溶液を吸い取り、DNA ナノ会合体と同じ測定条件で測定を行った。この実験で用いた IgA の濃度は 5 ppm、10 ppm、20 ppm、50 ppm、100 ppm であった。また、これらの実験において、解離剤として、pH: 2.0 のグリシン-塩酸を用い、ループ体積は 120  $\mu$ L であった。

#### 4.2.4 QCM によるセンサーチップ作製過程における修飾物質の結合量の評価

QCM 測定用金電極蒸着チップをピラニア処理し、装置にセットした。その

後、200  $\mu\text{L}$  の酢酸バッファー(0.2 M pH: 4.1, 2M NaCl 含む)をセルに注入し、ベースラインをとった。100  $\mu\text{L}$  の酢酸バッファー(0.2 M pH: 4.1, 2M NaCl 含む)を取り出し、また 100  $\mu\text{L}$  の会合体溶液を入れた。装置が安定してから、溶液を取り出し、酢酸バッファー(0.2 M pH: 5.2)でセルを 5 回洗浄した後、200  $\mu\text{L}$  をセルに注入した。装置が安定してから、100  $\mu\text{L}$  の酢酸緩衝溶液を取り出し、100 $\mu\text{L}$  のストレプトアビジン溶液を注入した。同じ手順でビオチン修飾した Anti-IgA、500 ppb の IgA 溶液を順にセルに注入した。

また、比較するため、QCM 測定用金電極蒸着チップをピラニア処理し、装置にセットしたあと、200 $\mu\text{L}$  の酢酸バッファー(0.2 M pH: 5.2)をセルに注入し、装置が安定してから、100  $\mu\text{L}$  酢酸バッファー(0.2 M pH: 5.2)を取り出し、100  $\mu\text{L}$  のストレプトアビジン溶液をセルに入れた。それから、DNA の場合と同じように測定を行った。

### 4.3 結果と考察

#### 4.3.1 三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を利用して作製した抗体固定化したセンサーチップによる IgA の SPR 測定

三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を利用して作製した抗体固定化したセンサーチップで IgA を測定し、得られたセンサーグラム及び検量線を Fig. 4.4(a)及び(b)に示している。また、検量線から、三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を利用して、基板上での吸着、解離が減り、検出結果と理論曲線は非常に近かった。さらに、この結果からまとめたラングミュアプロットから、 $\Delta I_{max}$  及び  $K$  をまとめた。結果として、 $\Delta I_{max}$  は 526 であり、 $K$  は  $3.8 \times 10^{-7} \text{M}^{-1}$  であった。この結果から、IgA のイムノアッセイを行う場合、結合定数は変わらないが、基板上に

あるリガンドの数を意味する  $\Delta I_{max}$  の値はかなり大きくなった(第 3 章に参照)。

これは、ストレプトアビジンに四つのビオチン修飾した anti-IgA と反応するサイトを有し、ストレプトアビジンを先に物理吸着量させることで、anti-IgA の配向性が向上したからだと考えられる。三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を金基板固定し、ストレプトアビジンと三員性三角錐型 DNA ナノ会合体の認識部位にあるビオチンと反応し、さらにビオチン修飾した anti-IgA を会合体に結合したストレプトアビジンと反応し、金基板を修飾することによって、anti-IgA の配向性が向上したと考えられる。されに、比較として、金基板にストレプトアビジンを物理吸着し、その上にビオチン修飾した anti-IgA を固定しイムノアッセイを行った。そのセンサーグラムは Fig. 4.6(a)に示され、検量線が Fig. 4.6(b)に示されている。さらに、検量線からまとめたラングミュアプロットを Fig. 4.7に示した。これらの結果から、ストレプトアビジンを金基板に物理吸着させる場合、 $\Delta I_{max}$  は 303 であり、 $K$  は  $3.3 \times 10^{-7} \text{M}^{-1}$  であった。 $K$  の値は DNA 会合体、anti-IgA の物理吸着の場合と比較して、ほとんど変化がなかったが、 $\Delta I_{max}$  は anti-IgA 物理吸着と会合体を金基板に修飾する場合の間にあった。この結果から、ストレプトアビジンを金基板物理吸着することにより、anti-IgA の配向性を向上させたが、DNA 会合体を使用することは配向性を向上されることにより効率的だと考えられる。



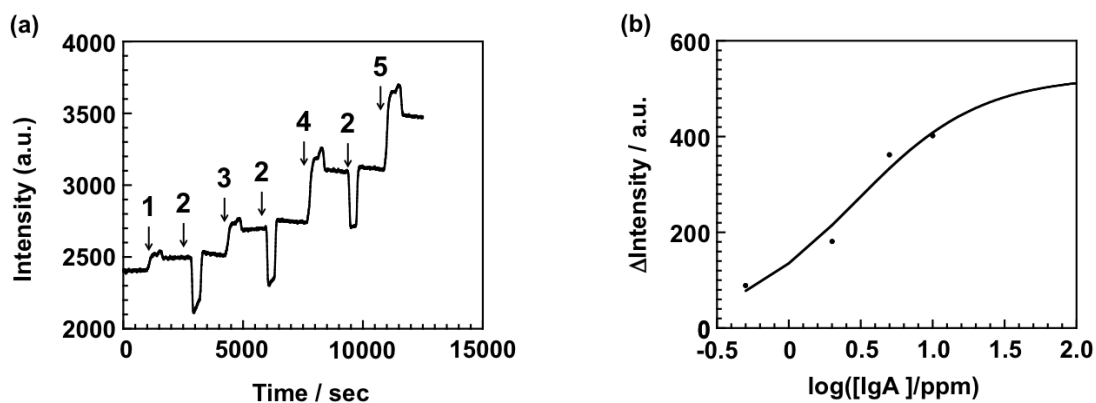


Fig. 4.4 三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を利用して作製した抗体固定化したセンサーで測定した IgA チップセンサグラム。(1: 500 ppb; 2: Gly-HCl; 3: 2 ppm; 4: 5 ppm; 5: 10 ppm)及び(b)検量線。

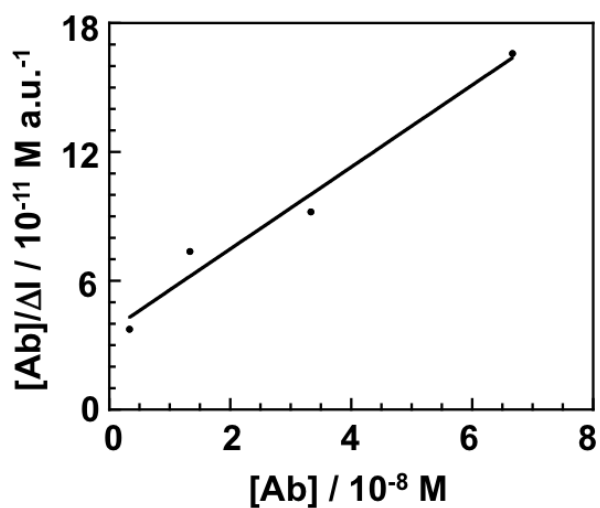


Fig. 4.5 三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を利用して作製した抗体固定化したセンサーで測定した IgA の検量線から得られたのラングミュアプロット。

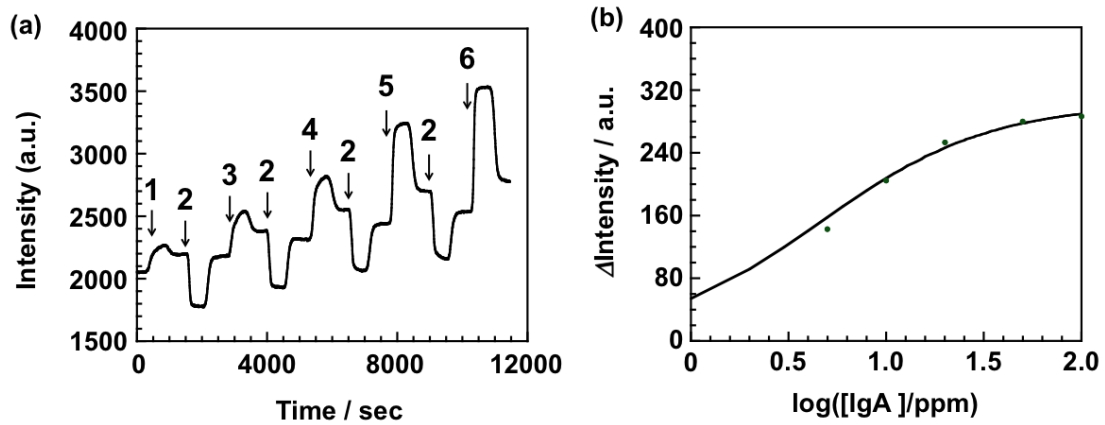


Fig. 4.6 ストレプトアビジンが金基板に物理吸着させ、ビオチン標識 anti-IgA を固定した場合の(a)センサグラム及び (b)検量線。

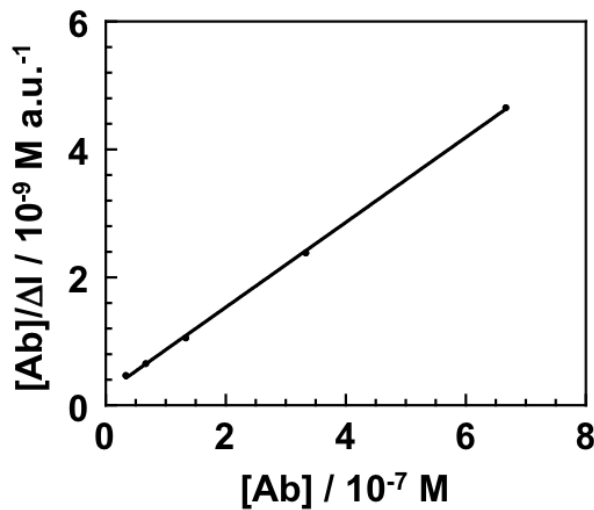


Fig. 4.7 ストレプトアビジンが金基板に物理吸着させ、ビオチン標識 anti-IgA を固定した場合のラングミュアプロット。

#### 4.3.2 QCM によるセンサーチップ作製過程における修飾物質の結合量の評価

SPR センサーで 500 ppb の IgA 溶液を測定した際、DNA 会合体を金基板に修飾した場合しか反射光強度の変化が観察されなかった。これは、三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を使用することで、anti-IgA の配向性が向上され、同じ濃度

の IgA 溶液を流したとき、ストレプトアビジンが金基板に物理吸着する場合より多くの IgA 分子が anti-IgA と反応したと推測した。確認のため、QCM によって、吸着量を評価した。三員性三角錐型 DNA ナノ会合体、ストレプトアビジン、ビオチン標識 anti-IgA、及び 500 ppb の IgA 溶液をセルに注入した際の QCM 測定結果を Fig. 4.8 (a)、(b)、(c)及び(d)に示している。これらの結果から、DNA 会合体の固定量は  $6.02 \text{ pmol/cm}^2$ 、ストレプトアビジンの固定量は  $4.65 \text{ pmol/cm}^2$ 、ビオチン標識 anti-IgA の固定量は  $9.43 \text{ pmol/cm}^2$ 、500 ppb の IgA がセルに注入する際、anti-IgA と反応後、IgA の表面濃度は  $2.14 \text{ pmol/cm}^2$  であった。

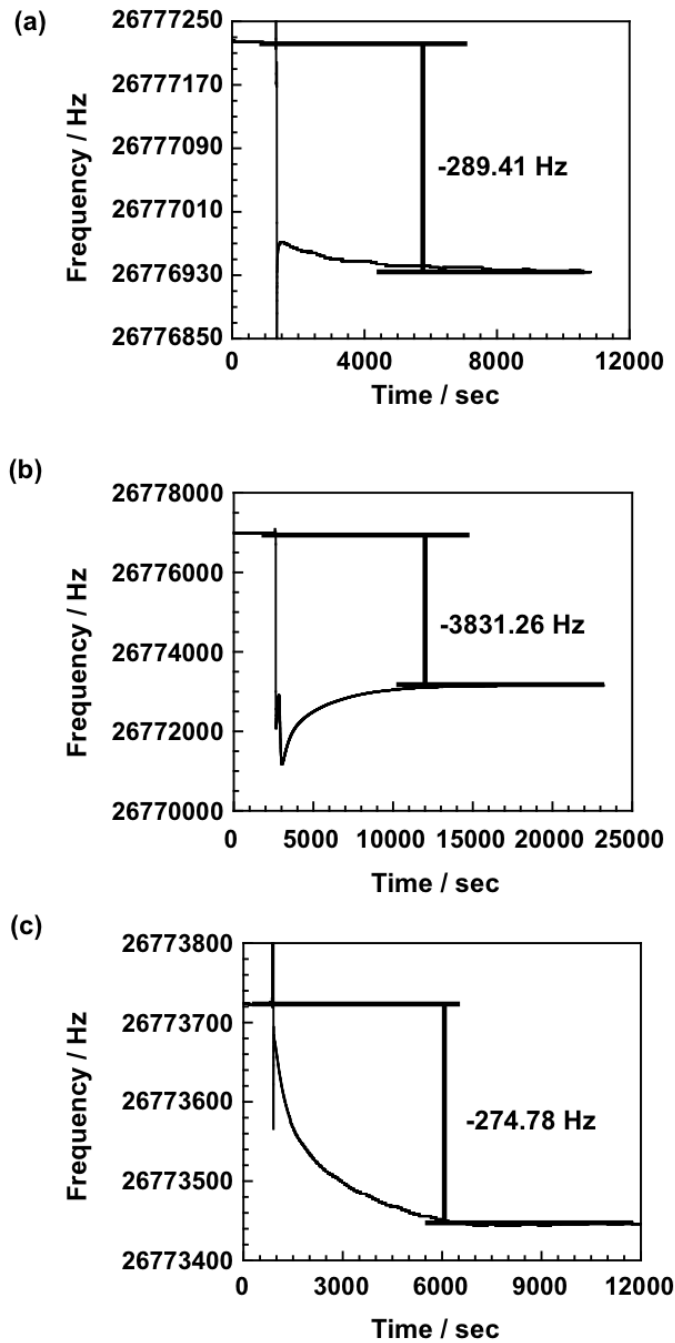


Fig. 4.8 (a)ストレプトアビジンはを注入とき(c)ビオチン標識した anti-IgA とを注入する (d) 500 ppb IgA 溶液を注入するときの QCM 測定結果。

ストレプトアビジン、ビオチン標識 anti-IgA、及び 500 ppb の IgA 溶液をセルに注入した際の QCM 測定結果を Fig. 4.8(a)、(b)及(c)に示している。ストレプト

アビジンの固定量は  $9.83\text{pmol/cm}^2$ 、ビオチン標識 anti-IgA の固定量は  $40.5\text{pmol/cm}^2$ 、500 ppb の IgA がセルに注入する際、anti-IgA と反応後、IgA の固定量は  $3.30\text{pmol/cm}^2$  であった。

これらの結果から、DNA ナノ会合体を表面に修飾した場合、ストレプトアビジンの結合率は約 70% であった、また、ストレプトアビジンとストレプトアビジンの結合率は約 200% であり、一つのストレプトアビジンに二つのビオチン修飾した anti-IgA と結合したと考えられ、これは、ストレプトアビジンの反応サイトは十分反応していたと考えられる。また、IgA と anti-IgA の結合率は 23% であった。一方、DNA 会合体を使用していない場合では、ストレプトアビジンは約 35% だった。

一方、DNA ナノ会合体を使用していない場合では、ストレプトアビジンは金基板への物理吸着量は  $9.83\text{pmol/cm}^2$  であり、DNA ナノ会合体を使用する場合の倍ぐらいあった。さらに、ビオチン標識した anti-IgA の吸着量は  $40.5\text{pmol/cm}^2$  であった。この結果から、ビオチン標識した anti-IgA は大量に金基板に物理吸着したと考えられる。さらに、500 ppb の IgA 溶液をセルに注入した際、anti-IgA との結合量は  $3.30\text{pmol/cm}^2$  であり、DNA 構造体を使用する場合と比べ、大きな値となり、つまり、ストレプトアビジンを金基板に物理吸着する場合はより多くの IgA は anti-IgA と反応した。これは、先ほど、SPR の測定結果から推測結論と矛盾した。すなわち、DNA ナノ会合体によって、IgA イムノアッセイの精度をあげたのは、ナノ会合体は anti-IgA 配向性を向上させたのみならず、DNA ナノ会合体自身も SPR 応答の増幅の原因になると考えられる。また、DNA ナノ会合体を使用していない場合の IgA と anti-IgA の反応率はわずか 8% であり、

DNA ナノ会合体の使用により配向性の向上が確認できた。

#### 4.4 結論

本章において認識部位にビオチンを修飾した三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を作製し、それを金基板に結合し、さらにストレプトアビジンを認識部位にあるビオチンサイトと反応させた。最後に、ビオチン標識 anti-IgA をストレプトアビジンに結合させ、SPR でイムノアッセイを行った。また、比較対象として、DNA ナノ会合体を使用せず、ストレプトアビジンを金基板に物理吸着させ、ストレプトアビジンの上にビオチン修飾した anti-IgA を固定し、IgA のイムノアッセイを行った。SPR の測定結果から、DNA ナノ会合体を金基板に土台にする場合はストレプトアビジンを金基板に物理吸着させる場合と比べ、結合定数  $K$  にほとんど変わらなかったのにたいして、リガントの数を意味する  $\Delta I_{max}$  はストレプトアビジン物理吸着の場合の約 1.7 倍であった。また、両方のセンサーチップでの結合量の評価を QCM で行った。DNA ナノ会合体を金基板に土台とする場合と比較して、ストレプトアビジンが物理吸着する場合の方はより多くの anti-IgA が結合した。しかし、500 ppb の IgA と反応させる際、DNA ナノ会合体を使用する場合の反応率の約 35% に対して、ストレプトアビジンが物理吸着する場合はわずか 8 % であり、DNA ナノ会合体の使用により、anti-IgA の配向性の向上が確認できた。一方、DNA ナノ会合体を使用する場合の anti-IgA と反応する IgA の量はストレプトアビジンが物理吸着する場合の量より少なかった結果から、DNA ナノ会合体により SPR 応答の増幅は配向性が向上したためだけでないことが推測した。

参考文献

- 1) F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, K. Niikura, and Y. Okahata, *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 2043.
- 2) K. Lindroos, U. Liljedahl, M. Raitio and A.-C. Syvänen, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29*, e69.
- 3) S. J. Oh, S. J. Cho, C. O. Kim, and J. W. Park, *Langmuir*, **2002**, *18*, 1764.
- 4) P. W. K. Rothmund, *Nature*, **2006**, *440*, 297.
- 5) D. Zeng, H. Zhang, D. Zhu, J. Li, L. San, Z. Wang, C. Wang, Y. Wang, L. Wang, X. Zuo, and X. Mi, *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, *71*, 434.
- 6) 九州大学大学院工学府化学システム工学専攻 吉永尚生氏 博士卒業論文
- 7) L. Betts, J. A. Josey, J. M. Veal, and S. R. Jordan, *Science*, **1995**, *270*, 1838.

## 第 5 章 結言

本論文では、リニア CCD センサーが検出器とするマルチチャンネル SPR センサーを開発し、さらに、それに応用できる 30 本のセンシングストライプを持つセンサーチップの作成法を検討した。また、イムノアッセイを行う際、簡単で安価な抗体固定法についてけんとうした。最後に、三員性三角錐 DNA ナノ会合体の SPR 測定への応用について検討した。また、SPR 測定の結果を裏付けるため、QCM 測定によって、吸着量を評価した。

第 2 章では、リニア CCD センサーを検出部位とする SPR センサーを開発した。従来のマルチチャンネル SPR センサーと比較して、安価でハイスループットで多サンプルの同時測定が可能となった。またピクセルの数とノイズの関係から、精確に測定を行うのに、四つ以上のピクセルからとった反射光の平均値が必要であるため、測定するサンプルの多いは  $40\mu\text{m}$  以上が必要である。さらに、本 SPR センサーで使用できるセンサーチップを開発し、Cr 蒸着法を用いて、最大 30 サンプルの同時測定が可能なセンサーチップを作製した。スクロース水溶液を測定した結果、各センシングストライプで測定した検出限界は  $3.2 \times 10^{-5} - 5.5 \times 10^{-5}$  RIU であった。10 mM のスクローステスト溶液を測定し、その反射光強度変化を各センシングストライプから得られた検量線に代入し得られた精確さは 100 % - 102 % であり、各センシングストライプはそれぞれ影響せず、独立に測定できることがわかった。

第 3 章では、イオンシャワーエンチング法によって、8 本のセンシングストライプを持つセンサーチップを作製した。さらに、異なるスクロースの水溶液及びテスト溶液を用いて、このセンサーチップが本研究で設計した SPR センサ



一での検出限界及び正確さを確認した。また、スクロースの水溶液の測定から、このセンサーチップは本研究で設計した SPR センサーでの検出限界は  $7.54 \times 10^{-6} - 3.16 \times 10^{-5}$  RIU であり、正確さは 99 - 102 %であった。この結果から本センサーチップは免疫アッセイへの応用の可能性を確認した。さらに、遠心力を駆動力として、anti-IgA 及び anti-IgG を交互にセンサーチップに固定した。それぞれの抗原の単独溶液より、固定化が確実に正しく行ったことが確認でき、免疫アッセイを行った。また、IgA と IgG の単独溶液の測定により得られた  $K$  と  $\Delta I_{max}$  を用いて、免疫アッセイの検量線求めた。その結果は実測値と一致した。これは、ストライプ 4, 6, 8 には交差反応が起こったと確認でき、本センサーチップが実用できると考えられる。最後に、結果から、各センシングストライプでの IgA-anti-IgA 及 IgG-anti-IgG の  $K$  を計算し、免疫グロブリン類の  $K$  とほぼ一致したことが確認できた。

第 4 章では、本章において認識部位にビオチンを修飾した三員性三角錐型 DNA ナノ会合体を作製し、それを金基板に結合し、さらにストレプトアビジンを認識部位にあるビオチンサイトと反応させた。最後に、ビオチン標識 anti-IgA をストレプトアビジンに結合させ、SPR で免疫アッセイを行った。また、比較対象として、DNA ナノ会合体を使用せず、ストレプトアビジンを金基板に物理吸着させ、ストレプトアビジンの上にビオチン修飾した anti-IgA を固定し、IgA の免疫アッセイを行った。SPR の測定結果から、DNA ナノ会合体を金基板に土台にする場合はストレプトアビジンを金基板に物理吸着させる場合と比べ、結合定数  $K$  にほとんど変わらなかったのにたいして、リガントの数を意味する  $\Delta I_{max}$  はストレプトアビジン物理吸着の場合の約 1.7 倍であった。また、両

方のセンサーチップでの結合量の評価を QCM で行った。DNA ナノ会合体を金基板に土台とする場合、と比較して、ストレプトアビジンが物理吸着する場合の方はより多くの anti-IgA が結合した。しかし、500 ppb の IgA と反応させる際、DNA ナノ会合体を使用する場合の反応率の約 35% に対して、ストレプトアビジンが物理吸着する場合はわずか 8% であり、DNA ナノ会合体の使用により、anti-IgA の配向性の向上が確認できた。一方、DNA ナノ会合体を使用する場合の anti-IgA と反応する IgA の量はストレプトアビジンが物理吸着する場合の量より少なかった結果から、DNA ナノ会合体により SPR 応答の増幅は配向性が向上したためだけでないことが推測した。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり日頃から熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました今任 稔彦教授に厚く御礼を申し上げます。また、研究内容に関して非常に有益な御助言を頂いた中野幸二准教授、石松亮一助教に深く感謝の意を表します。

特に、本研究を行うにあたり、多大なるご協力、御助言を賜りましたメビウスアドバンステクノロジーの辺見彰秀氏に深く謝意を示します。

また、Cr 蒸着に当たり、応用化学部門の田中敬二先生の御協力を頂きましたことに対し、深く御礼申し上げます。

また、イオンシャワエッチングでセンサーチップの作製にあたり、応用化学部門の安達千波矢先生の御協力を頂きましたことに対し、深く御礼申し上げます。

最後にこれまでの研究生活においてともに刺激し合い支えあいながらよりよい環境を提供していただいた、研究室の学生の皆様、関係者の方々に深謝致しまして、謝辞とさせていただきます。