

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 :

氏 名 : 戦 捷

論 文 名 : 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

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

酵素標識イムノアッセイ法は抗原抗体を利用する分析法であり、選択性と感度に優れた方法であり、これまでに広く用いられている。近年、酵素標識イムノアッセイ法に代わる、酵素などによる標識が不要な表面プラズモン共鳴(SPR)センサーを用いるイムノアッセイ法が注目を集めている。この方法は、センサーチップ表面の屈折率を鋭敏に検出することができるので、極めて高感度なイムノアッセイ法であり、多方面への応用が期待されている。特に、途上国の急速の発展により生じている環境問題、食品の安全性の問題、さらには鳥インフルエンザの蔓延やエボラ出血熱ウイルスによる感染の問題などから、オンサイトで多検体試料を迅速に測定が可能な小型、高感度かつ高効率の SPR センサーの開発が環境、医療、食品など広い分野から要求されている。多検体試料測定用のマルチチャンネル SPR センサーとしては、これまでにクレチマン配置やグレーティング配置に基づいた 2 次元 CCD 素子や CMOS 素子を検出器とする SPR センサーが開発されている。しかしながら、SPR センサーに用いられている光学素子は高価であり、オンサイト測定への汎用性を考慮するとより安価なリニア CCD 素子を利用するものが有利である。一方、マルチチャンネル SPR センサーによる複数成分の同時分析には、それらの成分を認識するレセプター分子を固定化したセンサーチップが必要である。複数成分のレセプター分子を限られた面積のセンサーチップへの固定化には、DNA アレイ作製にも用いられているマイクロスポッターの利用が有効であるが、マイクロスポッターは大型かつ高価であり、作製したセンサーチップは長期に保存できないことが欠点である。従って、マルチチャンネル SPR センサーのチップをより安価で、必要な時に簡便に作製する技術の開発も重要な研究課題である。SPR センサーに基づくイムノアッセイでは、センサーチップに固定するレセプター分子の配向性や固定化密度が検出感度に大きく影響するため、微小面積のセンサーチップにレセプター分子を配向性良く、固定化量を制御できる固定法を確立することも必要である。本研究では、リニア CCD 光学素子を用いて、多検体試料を迅速に測定できる小型で高感度なマルチチャンネル SPR センサーを開発するとともに、高い空間分解能を持ち、高密度にレセプター分子を固定化する新たなセンサーチップの作製法の開発を目的とした。

第 1 章では、本研究の背景とこれまでに開発されたマルチチャンネル SPR センサーについて述べ、本研究の目的を述べた。

第 2 章では、リニア CCD 光学素子を検出器とするマルチチャンネル SPR センサーの設計とその性能評価を行った。また、本センサーに適したセンサーチップを開発するため、クロム蒸着法によって、30 個センシングストライプを持つセンサーチップを作製し、これを開発したマルチチャンネル SPR センサーのセンサーチップとして、スクロース水溶液に対する応答性を検討した。その結果、

30 個のセンシングストライプセンサーチップを用いて測定したスクロースに対する検出限界は、1.0 mM – 1.6 mM であり、これは屈折率感度に換算すると、 $3.2 \times 10^{-5} - 5.5 \times 10^{-5}$ RIU であった。10 mM スクロース溶液を検定試料として、SPR センサーの性能評価を行ったところ、標準溶液を用いて作成した検量線から得られた検定溶液の正確さは 100 % – 102 % であり、30 個のセンシングストライプにおいて正確さの差異はなく、独立に測定できることが分かった。

第 3 章では、遠心力を駆動力として複数の微小な流路に送液を行うことができるコンパクトディスク型流体基板を用いて、幅が 500 μm の 8 本のセンサーストライプチップに抗-Ig 抗体及び抗-Ig 抗体を交互に固定する方法を開発した。作製したセンサーストライプチップに対して、抗原である IgA 及び IgG の単独溶液を作用させて、SPR 応答を測定したところ、抗-Ig 抗体を固定したセンサーストライプでは IgA のみに応答し、IgG に応答しないことを認めた。一方、抗-IgG 抗体を固定したセンサーストライプでは IgG 及び IgA とも応答を示したが、これは用いた抗体自身の交差反応性によるものであることを確認し、抗 IgG 抗体も所定のセンサーストライプに固定されていることを確認した。また、さらに、作製したセンサーストライプに対して、IgA と IgG の混合溶液を作用させて、SPR センサー応答を測定したところ、抗-IgA 抗体を固定したセンサーストライプにおいて、IgA に対して 5 ppm – 100 ppm の間でセンサー応答を示し、IgG に対しては応答しないことがわかった。また、抗 IgA 抗体の IgA に対する結合定数は $3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であった。一方、交差反応性が認められた抗-IgG 抗体を固定したセンサーストライプにおいては、IgA 及び IgG に対して、それぞれに対して 5 ppm – 100 ppm の間でセンサー応答が得られ、抗 anti-IgG 抗体に対する IgA 及び IgG の結合定数はそれぞれ $1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 及び $1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であることが分かった。これらの結合定数の値を用いて、センサーチップストライプに対する IgA と IgG の混合溶液に対する実際の SPR センサ応答をシミュレーションすることができ、このセンサーチップの多成分試料に対する実用性を確認することができた。

第 4 章では、SPR センサーチップに固定化する抗体の配向性と固定化安定性を向上するため、固定化の足場となる三員性三角錐 DNA ナノ会合体を設計し、これを足場として抗 IgG 抗体を固定化した SPR センサーチップを作製し、同センサの IgG に対する応答性を検討した。その結果、DNA ナノ会合体を足場として固定化した抗 IgA 抗体の IgA に対する結合定数は、ストレプトアビジンを介して物理吸着的に固定化した抗 IgA 抗体の IgA に対する結合定数とほぼ同程度であったが、センサーチップ表面の固定化された抗 IgA 抗体への IgA の結合量は、ストレプトアビジンを介して物理吸着的に固定化された抗 IgA 抗体への結合量の約 1.7 倍高いことがわかった。そこで、IgA の結合量の差異を明らかにするため、水晶振動子(QCM)を用いて結合過程の質量変化を測定した。すなわち、500 ppb の IgA 溶液をととの反応において、DNA ナノ会合体を足場として固定化した抗-IgA 抗体に対して反応率が約 35 %あるのに対して、ストレプトアビジンを介して抗-IgA 抗体を物理吸着によって固定化した場合は反応率がわずか 8 %であった。このことは、DNA ナノ会合体を足場とすることにより、抗-IgA 抗体のセンサーチップ表面での固定化の配向性が向上していると推測できた。

第 5 章では、本論文を総括し、本研究で設計したリニア CCD 光学素子を検出器とする SPR センサーがマルチチャンネル SPR センサーとして有用であることを示した。また、遠心力で送液することができるコンパクトディスク型流体基板を用いて、限られた空間にあるストライプセンサーチップに複数の抗体を固定化する方法を確立した。さらに、三員性三角錐 DNA ナノ会合体を足場とする抗体の配向的固定化法を提案した。本研究による成果は、環境汚染物質や医療診断あるいは食品の安全性の確認など広い分野でのオンサイトでハイスループットの迅速測定に寄与できるものと期待している。