

1. 緒言

表面プラズモン共鳴(SPR)センサは、センサ表面で起こる媒質の変化を高感度・リアルタイムに測定できる優れた化学・バイオセンサの一つであり、免疫応答・シグナル伝達・タンパク質・核酸など様々な物質間の相互作用の研究に広く利用されている¹⁾。近年では、農薬²⁾や抗生物質^{3, 4)}の測定など環境分析にも利用されている。しかし、従来の SPR センサは大型で重く、オンサイトでの使用は事実上困難である。

著者らはこれまでに、手のひらサイズの小型でポータブルな 2 チャンネル SPR センサ(160 mm×100 mm×60 mm, 770 g)を開発している^{5, 6)}。本研究では、これまでの研究をさらに発展させ、新規光学系のポータブルマルチチャンネル SPR センサを開発し、その基本特性を評価するとともに、開発したセンサをマルチムノアッセイに応用した。すなわち、光架橋反応を利用して多種類のレセプタータンパク質を SPR センサチップのマイクロチャンネル内壁に位置選択的に固定化し、多成分をノンラベル・リアルタイムかつ同時に測定できる新規分析法を開発した。

2. 原理

2-1. SPR センサの原理

SPR 現象は、金薄膜上に存在する表面プラズモンと呼ばれるプラズマ波と、光を全反射した際に生じるエバネッセント波の共鳴により、ある角度における反射光強度が減衰する現象である (Fig. 1)。このとき、共鳴角度は金表面の屈折率に依存する。したがって、金表面に抗体を修飾したセンサチップを作製し、これに試料を注入すると、試料中の抗原が表面に固定された抗体に特異的に吸着して屈折率が変化するので、この屈折率変化に伴う SPR 共鳴角度の変化、あるいは任意の角度における反射光強度の変化を測定することにより、抗原の定量が可能となる。

2-2. 光化学固定法の原理

Fig. 2 に光架橋反応を利用したマイクロチャンネル内壁への位置選択的タンパク質固定化⁷⁾の概念図を示す。本法では、一方にタンパク質との反応部位を、他方に光反応部位を有する光架橋剤を用いる。予め固定化したいタンパク質と光架橋剤とを反応させ、光反応部位を有するタンパク質を調製しておく。これをマイクロチャンネル内に導入し、外部から紫外光を照射すると、タンパク質は光照射部位においてマイクロチャンネル表面の官能基と共有結合を形成して固定化される。この操作を繰り返すことにより、多種類のレセプタータンパク質をマイクロチャンネル内の任意の位置に固定することができる。

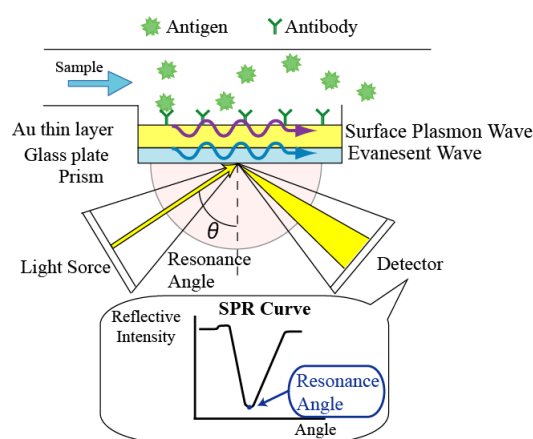


Fig. 1 SPR センサの原理

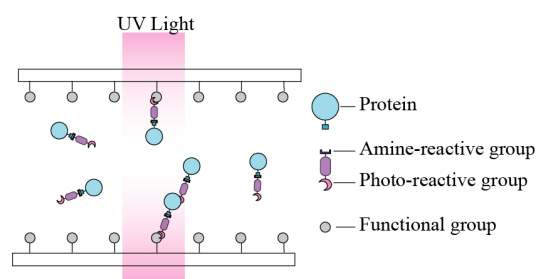


Fig. 2 光化学固定法の原理

3. 実験

3-1. マルチチャンネル SPR センサの開発

Fig. 3 に開発した SPR センサとその光学系を示す。本センサは、LED からの光をセンサチップに線焦点を結ぶように入射し、その反射光をリニア CCD で検出することにより、線焦点上のマルチポイントでの測定を可能にしている。センサの大きさは、幅 170 mm，奥行き 110 mm，高さ 150 mm，重量 1.5 kg である。

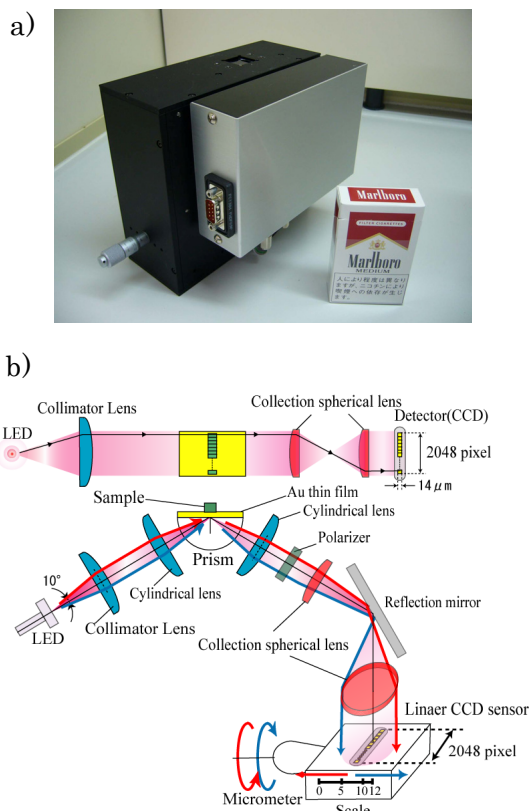


Fig. 3 開発したマルチチャンネル SPR センサ(a)とその光学系(b)

3-2. マイクロセンサチップの作製

マイクロチップの鋳型となる凸型ガラスステンプは、フォトリソグラフィ・化学エッチング法⁸⁾により作製し、マイクロチャンネルは幅 1 mm，長さ 10 mm，深さ 20 μm とした。上記テンプレートにポリジメチルシロキサン(PDMS)プレポリマーを流し込み、60°C で 1 時間加熱した後、硬化した PDMS 樹脂をテンプレートから剥離し、プラズマ照射により表面を親水化した。これを 1% 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane 溶液に 1 時間浸漬した後、金を 50 nm 蒸着したガラス基板(16 x 16 x 0.1 mm)と張り合わせ、120°C で 4 時間加熱し、両者を接合した。

3-3. 光架橋反応を利用したマイクロチャンネル内壁への位置選択的抗体固定化

光架橋剤として 4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid succinimidyl ester (ATFB-SE)を用いた。まず、10 mg/mL ATFB-SE 溶液 100 μL と 10 mg/mL 抗 IgG 抗体溶液 1 mL を混合し、1 時間攪拌した。その後、1.5 M 塩化ヒドロキシアンモニウム溶液 100 μL を加え、さらに 1 時間攪拌し、抗 IgG 抗体と ATFB-SE とのコンジュゲートを作製した。次に、この溶液を Fig. 4 に示すフローシステムを用いて、BSA でブロッキング済みのマイクロチャンネルに導入し、フォトマスクを用いて紫外光を 30 分間照射することにより、チャンネル下流部に抗 IgG 抗体を固定化した。次に、種々の濃度の IgG 溶液を注入し、免疫反応を行った。センサチップの再生には pH 2 のグリシン-HCl 溶液を使用した。全ての反応は、開発したマルチチャンネル SPR センサによりリアルタイムにモニタリングした。Fig. 5 に反応に伴うセンサ応答の概念図を示した。

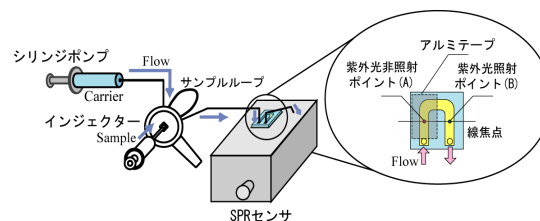


Fig. 4 フローシステム

キャリアー: 0.1 M NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4),
流量: 10 $\mu\text{L}/\text{min}$

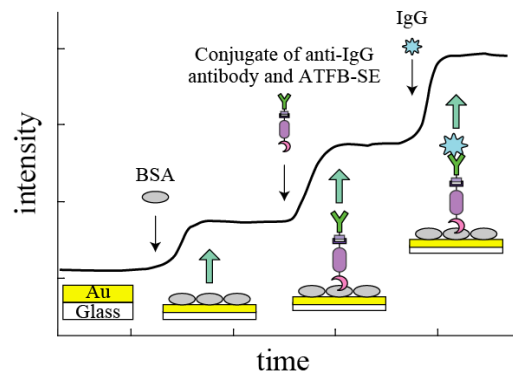


Fig. 5 抗 IgG 抗体の固定化及び IgG との反応に伴う SPR 信号の変化

4. 結果および考察

4-1. マルチチャンネル SPR センサの基本特性の評価

Fig. 6 に示すマイクロチップと 1.0~10 mM のスクロース溶液を用いて、開発した SPR センサの性能を評価した。スクロースを測定した際のセンサグラムを Fig. 7 (a)に、また、ベースラインとピークトップとの光強度差を濃度に対してプロットして得られた検量線を Fig. 7 (b)に示す。検量線はいずれの検出ポイントにおいても 1~10 mM の濃度範囲で相関係数 0.999 と良好な直線関係を示した。また、ベースラインの標準偏差をノイズ幅とし、S/N=3 として検出限界を算出した結果、本センサは屈折率感度 10^{-6} RIU を有し、市販の SPR センサと同等であることが分かった。繰返し測定(n=5)における再現性も 0.18~0.77 % と良好であった。

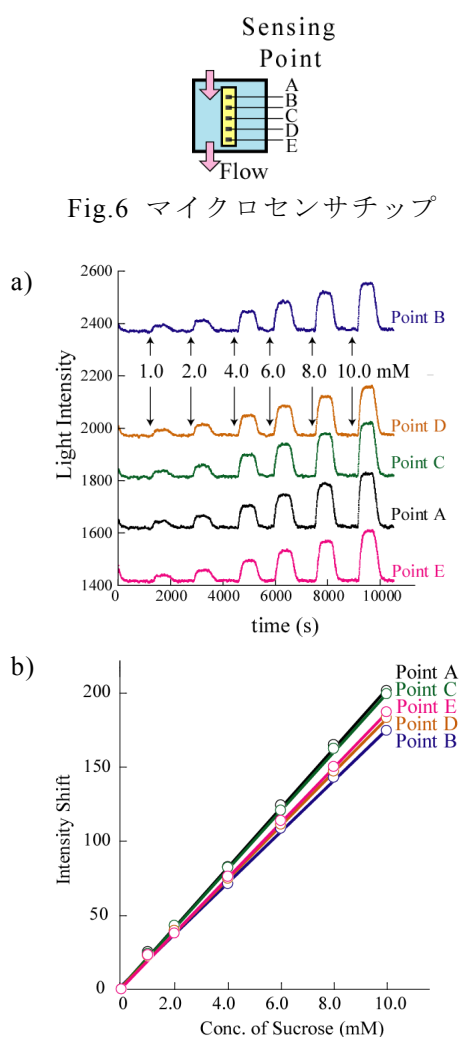


Fig.7 スクロースのセンサグラム(a)と検量線(b)

4-2. 光固定化法により作製したセンサチップによる IgG の測定

抗 IgG 抗体と ATFB-SE とのコンジュゲートをマイクロチャンネルに導入し、紫外光を照射したところ、チャンネル下流部の紫外光照射ポイントにおいては 111.2 の光強度変化が観察された。これに対して、上流の紫外光非照射ポイントにおいては、わずか 0.5 しか変化しなかった。Fig. 8 (a) に IgG を注入した際の光照射ポイントおよび非照射ポイントにおけるセンサグラムを、また、IgG の検量線を Fig. 8 (b) に示す。光照射ポイントにおいては、IgG 濃度が増加するにしたがって、光強度変化も増加した。一方、非照射ポイントにおいては、ほとんど変化しなかった。これらの結果から、本法により抗 IgG 抗体が下流の光照射ポイントのみに位置選択的に固定化されていることが確認された。

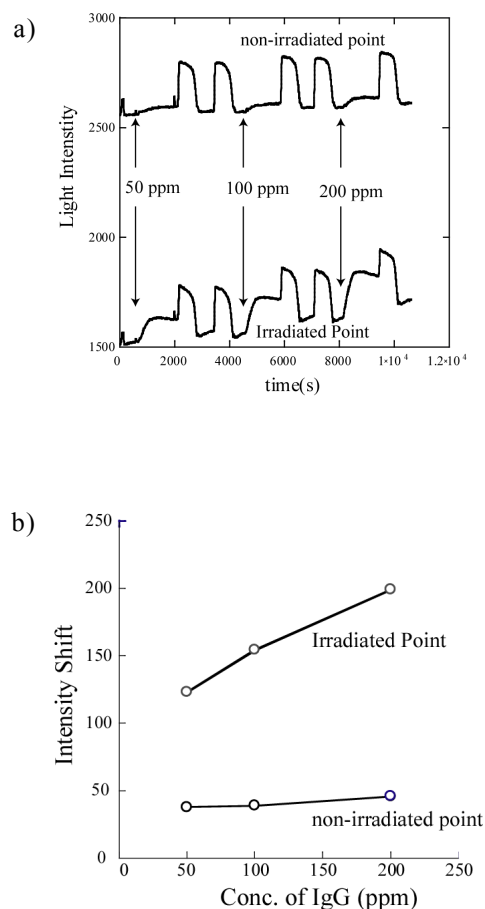


Fig. 8 IgG のセンサグラム(a)と検量線(b)

Fig. 9 (b) の検量線がラングミュアの吸着等温式に従うと仮定し、(1)式より IgG の飽和吸着量と結合定数を求めた。

$$\frac{[IgG]}{\Delta I} = \frac{[IgG]}{\Delta I_{\max}} + \frac{1}{\Delta I_{\max} K} \quad (1)$$

ここで、 ΔI は光強度変化量、 $\Delta I_{\max}$ は最大光強度変化量、 K は結合定数を表す。(1)式より $\Delta I_{\max} = 357$ と見積もられた。これは吸着量 1.22 ng/mm^2 に相当する。また、IgG と抗 IgG 抗体の結合定数は $K = 1.40 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であった。IgG と抗 IgG 抗体の結合定数は、一般に $10^6 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ と報告されている。このことから、紫外光照射は抗 IgG 抗体の活性にはほとんど影響しないことが分かった。現在、マイクロチャンネル上流部に抗 IgA 抗体を、下流部に抗 IgG 抗体を固定化し、IgA と IgG の同時測定を試みている。

5. 結論

本研究では、小型でポータブルなマルチチャンネル SPR センサを開発するとともに、光架橋反応を利用してセンサチップのマイクロチャンネル内壁に多種類のレセプタータンパク質を位置選択的に固定化し、多成分を同時に測定する方法を開発した。これにより、一台の送液ポンプとバルブで多成分の同時測定が可能となり、システム全体の小型化を図れる。本法は固定化するレセプタータンパク質の種類を変えることにより、ベッドサイドでの医療検査のみならず、オンサイトでの環境測定や食品検査などにも応用可能であり、その社会的意義は極めて大きいものと考えられる。

6. 謝辞

本研究の一部は下記の助成金により行った。記して謝意を表する。

- 1) 日本学術振興会，平成 19～20 年度科学研究費補助金(19850017)。
- 2) 独立行政法人科学技術振興機構 (JST)，平成 19 年度地域イノベーション創出総合支援事業。
- 3) (財)九州産業技術センター，平成 19 年度九州地域戦略産業イノベーション創出事業。
- 4) (財)立石科学技術振興財団，平成 19 年度研究助成。

- 5) (財)日本科学協会，平成 19 年度笹川科学研究助成。
- 6) (財)日本板硝子材料工学助成会，平成 19 年度研究助成。
- 7) (財)九州・山口地域企業育成基金，平成 19 年度研究開発助成。
- 8) (財)島津科学技術振興財団，平成 18 年度研究開発助成。
- 9) (財)加藤記念バイオサイエンス研究振興財団，平成 18 年度国際交流助成。
- 10) (財)クリタ水・環境科学振興財団，平成 18 年度研究助成。
- 11) 独立行政法人科学技術振興機構 (JST)，平成 18 年度地域イノベーション創出総合支援事業。
- 12) 日本学術振興会，平成 16～18 年度科学研究費補助金(16350047)。

7. 参考文献

- 1) D. R. Shankaran, K. V. Gobi, N. Miura, *Sens. Actuators B*, **121**, 158-177 (2007).
- 2) M. Shimomura, Y. Nomura, W. Zhang, M. Sakino, K.H. Lee, K. Ikebukuro, I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, **434**, 223-230 (2001).
- 3) E. Gustavsson, J. Degelaen, P. Bjurling, A. Sternesjo, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2791-2796 (2004).
- 4) G. Cacciatore, M. Petz, S. Rachid, R. Hakenbeck, A.A. Berwerff, *Anal. Chem. Acta*, **520**, 104-115 (2004).
- 5) A. Hemmi, T. Imato, Y. Aoki, M. Sato, N. Soh, Y. Asano, C. Akasaka, S. Ohkubo, N. Kaneki, K. Shimada, *Sens. Actuators B*, **108**, 893-898 (2005).
- 6) M. Kobayashi, M. Sato, Y. Li, N. Soh, K. Nakano, K. Toko, N. Miura, K. Matsumoto, A. Hemmi, Y. Asano, T. Imato, *Talanta*, **68**, 198-206 (2005).
- 7) H. Nakajima, S. Ishino, H. Masuda, T. Nakagama, T. Shimosaka, K. Uchiyama, *Anal. Chim. Acta*, **562** 103-109 (2006).
- 8) H. Nakajima, Y. Harada, Y. Asano, T. Nakagama, K. Uchiyama, T. Imato, N. Soh, A. Hemmi, *Talanta*, **70**, 419-425 (2006).

【著者略歴】

2003 年 3 月 日本大学大学院生産工学研究科工業化学専攻博士前期課程修了。

2006 年 3 月 東京都立大学大学院工学研究科応用化学専攻博士課程修了博士(工学)。

2006 年 4 月 九州大学大学院工学研究院応用化学部門助手。2007 年 4 月 同 助教。