

## ノート

## 表面プラズモン共鳴 (SPR) センサによる生体分子の簡易検出技術の開発

中村 広隆\*<sup>1)</sup> 秋元 卓央\*<sup>2)</sup>

## Development of a simple detection method for bio-molecular interactions using an SPR sensor

Hirotaka Nakamura\*<sup>1)</sup>, Takuo Akimoto\*<sup>2)</sup>

キーワード: SPR センサ, 生体分子

Keywords: SPR sensor, Bio-molecular

## 1. はじめに

SPR センサ<sup>(1)(2)</sup>は, 生体分子の相互作用の解析装置として, 現在, 大学や各種研究機関等で広く利用されている。しかし, 現在大学等で普及している一般的な SPR センサは高感度であるが, 大型で高価な装置となっている。そこで, 本研究では, 小型, 低価格で簡易に生体分子の検出が可能であり, また小さな病院や家庭においても利用できる簡易型 SPR センサの開発を目指している。測定対象を  $\gamma$ -GTP とし, プローブ型 SPR センサ (略称: SPR センサ) の製作と測定感度の評価及び検出能力の評価を行った。

血液中の  $\gamma$ -GTP は, 肝臓の解毒作用に関係している酵素として, 肝機能の指標に利用されている。この酵素の簡易測定を可能にすることで, 肝機能の簡易検査装置としての利用が期待できる。

## 2. 実験内容及び結果

**2.1 プローブ型 SPR センサの製作** 製作したプローブ型 SPR センサの構成を図 1 に示す。SPR センサは, 主に光源 (LD:670nm), ビームスプリッタ (BS), センサープローブ, 光検出器 (PD), 偏光板, データ取得装置 (PC) で構成されている。図 2 にセンサープローブを示す。センサープローブは, 長さ 50mm, 直径 1.5mm のサイズであり, 先端には金薄膜が成膜されている。

**2.2 プローブ型 SPR センサの測定原理** プローブ型 SPR センサ装置は, 図 1 に示すように, 光源から出射された光 (LD:670nm) は, ビームスプリッタを透過し, センサープローブに入射され, センシング面で反射し, 再びビームスプリッタに入射し, ここで分岐された光が光検出器に入射する構成となっている。センサープローブへ入射する光の偏光状態の調整は, センサープローブとビームスプリッ

タの間に偏光板を設置し調整を行った。本 SPR センサの測定原理としては, センシング面に屈折率の異なる測定試料 (屈折率:n1 及び屈折率:n2) を各々滴下すると, 光の吸収スペクトルが変化 (シフト) するため, 光検出器 (PD) の出力は, 反射光強度  $I_1$  から  $I_2$  に変化する。この出力値の差  $I_2-I_1$  と, 予め測定したセンサ出力と屈折率の関係から, 測定試料の屈折率 (または濃度) を測定することができる。

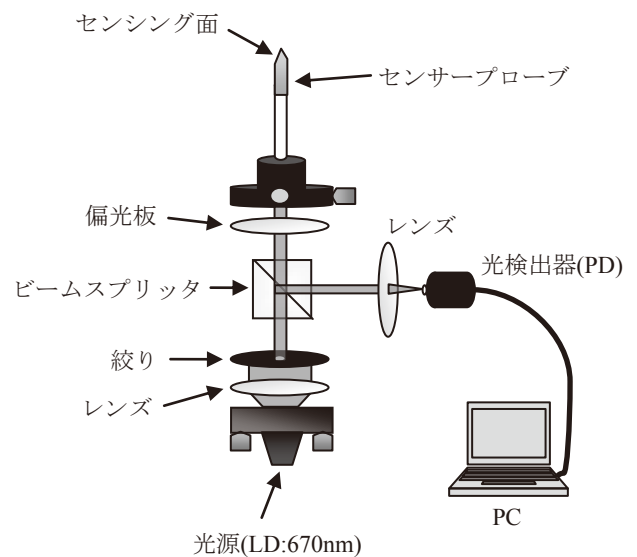
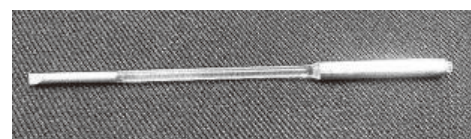


図 1. プローブ型 SPR センサの概略図



長さ 50mm、直径 1.5mm

図 2. センサープローブの外観

事業名 平成 21 年度, 22 年度, 23 年度 共同研究

\*<sup>1)</sup> 光音技術グループ\*<sup>2)</sup> 東京工科大学

**2.3 プローブ型 SPR センサの測定感度の評価** 製作したプローブ型 SPR センサの測定感度の評価として、測定試料の屈折率を変化させたときのセンサ出力の測定を行った。測定方法としては、屈折率が異なるグリセリン溶液；1.25% (n:1.3347), 2.5% (n:1.3363), 5.0% (n:1.3404) を作成し、純水 (n:1.3330) 及び各グリセリン溶液を SPR センサのセンシング面に滴下し、その時の SPR センサの反射強度変化を測定した。この結果 (図3) から、屈折率変化に対する測定感度として、純水とグリセリン溶液 1.25%の屈折率変化  $1.7 \times 10^{-3}$  まで測定が可能であることを確認した。

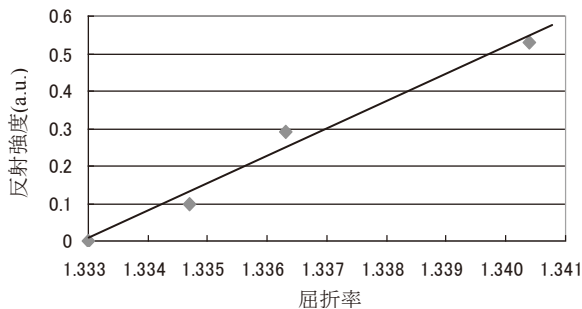


図3. プローブ型 SPR センサの感度評価

**2.4  $\gamma$ -GTP の測定 (水溶液中)**  $\gamma$ -GTP の測定方法としては、測定を始める前に抗  $\gamma$ -GTP 抗体を固定化した金表面 (センサープローブ) を BSA (Bovine serum albumin : タンパク質) に 2 時間浸しブロッキングを行った。その後、リン酸バッファーには 10 分間浸し、その後任意の濃度に希釈した  $\gamma$ -GTP 水溶液に 20 分間浸した。次に、リン酸バッファーに 10 分間浸し測定を行った。測定が終了したセンサープローブは 0.01 mol/l 塩酸で洗浄し、結合した  $\gamma$ -GTP を剥離した。この操作を繰り返す (7 回を限度)、任意に設定した各濃度の  $\gamma$ -GTP を測定した。この時、測定した  $\gamma$ -GTP が、抗  $\gamma$ -GTP 抗体と特異的に結合していることを確認するために、同じ測定条件で 50  $\mu$ g/ml の CRP (C-反応性タンパク) の測定を行った。

測定結果の一例を図4に示す。図4は  $\gamma$ -GTP の濃度が 500 U/L (38.5  $\mu$ g/ml) の結果である。この測定結果からセンサープローブを  $\gamma$ -GTP に浸すことにより、固定化した抗体と  $\gamma$ -GTP が結合し、約 0.23V の変化が得られたことがわかる。図5は 50  $\mu$ g/ml の CRP を測定した結果である。CRP の場合は、測定値に大きな変化はみられないことから、CRP と抗  $\gamma$ -GTP 抗体との優位な結合はないと判断できる。したがって、図4で得られた測定結果は、 $\gamma$ -GTP が特異的に結合している結果であることを示している。

図6は、 $\gamma$ -GTP の検量線である。この結果から、本 SPR センサは、50 U/L (3.8  $\mu$ g/ml 相当) の  $\gamma$ -GTP の検出が可能であることが確認できる。健康な成人の血中の  $\gamma$ -GTP 濃度は約 50 U/L (3.8  $\mu$ g/ml) 未満であると報告されている。したがって、現在の SPR センサの検出感度においては、健康な成人の  $\gamma$ -GTP 量の最大値に相当する値 (約 50 U/L) まで測定が可能であると考えられる。しかし、プローブ型 SPR センサ

を用いて家庭で簡単に正確に肝臓の健康診断を行うためには、10U/L (0.77  $\mu$ g/ml) まで測定できることが望まれる。このため本 SPR センサは、1桁程度の高感度化を図る必要がある。

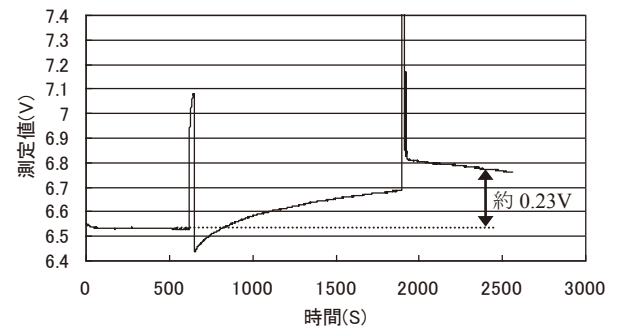


図4. 500 U/L (38.5  $\mu$ g/ml) の  $\gamma$ -GTP の測定結果

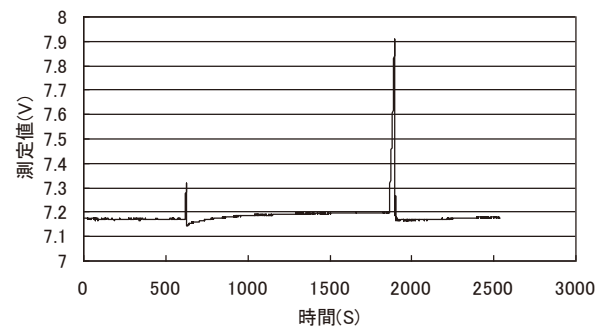


図5. 50  $\mu$ g/ml の CRP の測定結果

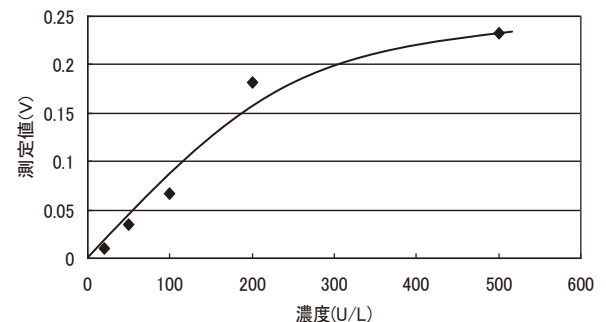


図6. 各濃度の  $\gamma$ -GTP の測定結果 (検量線)

### 3. まとめ

プローブ型 SPR センサの製作と感度評価、 $\gamma$ -GTP の測定による SPR センサの検出能力評価を行った。その結果、SPR センサの感度評価では、 $1.7 \times 10^{-3}$  の屈折率変化、 $\gamma$ -GTP の測定では、50 U/L (約 3.8  $\mu$ g/ml 相当) の  $\gamma$ -GTP の測定が可能であることを確認した。今後は、SPR センサの高感度化を図り、検出感度の向上を目指す。

(平成 24 年 5 月 31 日受付, 平成 24 年 8 月 30 日再受付)

### 文 献

- (1) 福井 萬壽夫, 大津 元一: 「光ナノテクノロジーの基礎」, オーム社 (2003)
- (2) V. M. Shalaev, S. Kawata, : “Nanophotonics with Surface Plasmons”, Elsevier (2007).