

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 年度 ～ 2009 年度
 課題番号：19550076
 研究課題名（和文） マルチチャンネル型表面プラズモン共鳴センサの開発と残留抗生物質の
 多成分同時測定
 研究課題名（英文） Development surface plasmon sensor with multi channel and
 measurement of residual antibiotics
 研究代表者
 金木 則明（KANEKI NORIAKI）
 室蘭工業大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：40125373

研究成果の概要（和文）：

従来の表面プラズモン共鳴（SPR）装置は生体分子間相互作用の評価などに極めて有効であるが、この装置は一般に大型で高価であり、オンサイトでの使用は難しい。本研究は、新規に考案したマルチビームスプリッタをプリズムセンサやマルチ受光素子などと組み合わせた新規光学系の SPR 装置を構築し、オンサイトで多成分同時に計測できる安価なポータブル多チャンネル SPR 免疫センサを開発する。本装置の実証試験として、牛乳中の残留抗生物質を計測する。

研究成果の概要（英文）：

An analytical method using surface plasmon resonance (SPR) is one of the most powerful methods for evaluating biomolecule interaction. Conventional SPR sensor, however, were not suitable for on-site analysis because of the size, weight and cost of the instruments. In this study, we attempted to develop a new portable-type SPR sensor with multi detection points for on-site analysis. The SPR sensor had the new optical system which consisted of a LD light, a multi-beam splitter, a sensor prism and a PD array. The sensor was able to detect residual antibiotics in milk.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：表面プラズモン共鳴、バイオセンサ、携帯型、残留抗生物質

1. 研究開始当初の背景

我々の身の回りには有害な生体汚染有機

化合物が満ち溢れ、食品の安全性や生への不安に脅かされている毎日である。そのため信頼できる手法により多くの化学情報を入手し、生体汚染や環境汚染を未然に防止する必要に迫られている。従来のELISA法は結果を得るのに少なくとも1時間という長時間を有し、食品への抗生物質混入を検出する際には迅速な測定が求められるが一般的なELISA法やGC-MSなどを用いた検出では、高価な測定機器と熟練したオペレーターが必要であり農畜産業の現場での測定が困難な状況である。一方、有害有機化合物を非標識で、かつリアルタイムに簡単に測定する方法として、光の共鳴を利用する表面プラズモン共鳴現象（SPR）が知られているが、残念な事にこの方法は原理的に多様性があるにも関わらず、高価な大型のラボ機器である分子間相互作用解析装置としての利用に留まっている。

有害有機化合物の生体への影響を未然に防止し、国民の健康と安全を守るという観点で、オンサイトで有害有機化合物を簡便に安価で一斉分析する計測機器が望まれる。

2. 研究の目的

従来の表面プラズモン共鳴（SPR）測定装置は生体物質・有機物質の吸着や物質間相互作用などの計測・評価に極めて有効な高性能測定装置であるが、この装置は一般的に大型でしかも高価であるため、オンサイトでの使用は難しく、またポータブルでかつ多チャンネル化した装置の開発は特に困難である。そこで、本研究開発では、これらの課題を解決すべく考案したマルチビームスプリッタをプリズムセンサやマルチ受光素子と組み合わせた新規光学系から構成されるユニークなSPR装置を構築し、オンサイトで多成分混合試料を一斉かつ同時に計測できる安価でポータブルな多チャンネル仕様のSPR免疫センサの高精度化技術確立することを目的とする。

本研究課題で提案するSPRセンサは、マルチチャンネルSPRの新規光学系である1レーザー光源、マルチプリズムセンサ、フォトダイオードアレイからなる光学系において $n \times m$ の入射光をセンサに照射することによって、SPRが一瞬におこり、 $n \times m$ 成分の同時計測が即座に実現でき、また光学系が一つでしかも可動部がなくても計測できるのでマルチチャンネルのSPRを安定にパームトップ・on siteで測定することが期待できる。本SPRセンサは構造も簡単で高額な部品を使用しないため、安価に製作可能と考えられる。

本装置の実証試験として、牛乳中の残留抗生物質を計測する。牛乳中の残留抗生物質を一斉・同時分析するための携帯型マルチチャ

ンネルSPR免疫化学センサを試作開発して、安価で簡単に残留抗生物質をオンサイトで一斉同時分析するための計測技術確立する。

3. 研究の方法

(1) マルチチャンネルSPR測定装置の試作

携帯型マルチチャンネルSPR測定装置を試作開発する。まず図1に示したように、複数のビームスプリッタを組み合わせたマルチビームスプリッタを試作する。開発する本SPR装置の光学系は以下のように構成されている。LD光を図1に示すビームスプリット・ユニットを $n \times m$ 個集積したマルチビームスプリッター（MBS）に入射する。MBSから発生した $n \times m$ 個のLD光を、予め化学反応の共鳴が起きる角度を求め、SPR共鳴角度を固定しておき、 $m \times n$ 個の測定ポイント（図2）を持つプリズム上のセンサに照射することによってSPRを発生させ、 $n \times m$ 個の反射光をこれらに対応する位置にある $n \times m$ 個の受光素子、フォトダイオードアレイで検出するものである。フォトダイオードアレイからの信号を出力する回路とパソコンに入力・表示するソフトを開発する。この光学系において、光学部品の配置、光路長などを理論・実験の両面から検討し、光強度の均一性を保つために光学系の最適化を行い、マルチチャンネルSPR測定装置の設計・試作する。

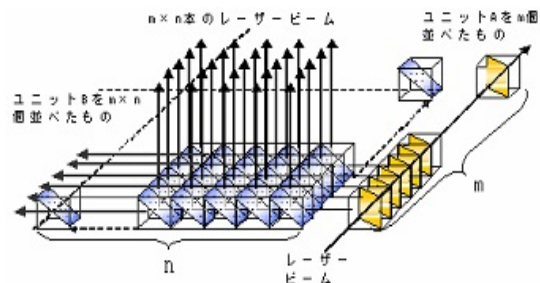


図1：マルチビームスプリッタ

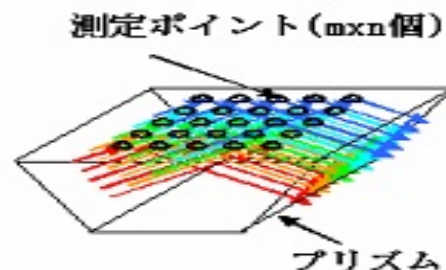


図2：マルチビームSPR光学系でのプリズム上測定ポイント

(2) 光インターフェイス膜の試作

従来の SPR 測定では、測定の都度、センサにマッチングオイルを塗らなければならず、フィールド計測には向かない。また、再現性の良好な SPR 信号を得るためのセンサセル構造をプリズムとの密着性という観点からも、マッチングオイルに代わる高分子光インターフェイス膜を試作する。ポリ塩化ビニル膜やシリコン膜などを検討する。

(3) SPR 免疫センサの試作

抗原抗体反応における化学反応の強度は金基盤上に抗体や抗原などの分子認識素子を効率よく固定化することが重要であり、アルカンチオールやシランカップリング剤を用いた固定化を検討する。試作した SPR センサを評価するために、牛乳中の残留抗生物質を対象として検討する。牛乳中の残留抗生物質は、分子量が数百~数千と小さいので、抗原抗体反応の直接法と間接法で検討し、SPR 免疫センサを試作する。

4. 研究成果

(1) マルチチャンネル SPR 測定装置の試作

① 試作 1 号機の製作

ビームスプリット・ユニットを 9 個集積したマルチビームスプリッタ MBS (9×9×3mm) 試作し、その MBS を光学系に組み込んだ 9 チャンネル SPR センサを設計試作した。試作したセンサの写真とその光学系の概念図をそれぞれ図 3 および図 4 に示す。

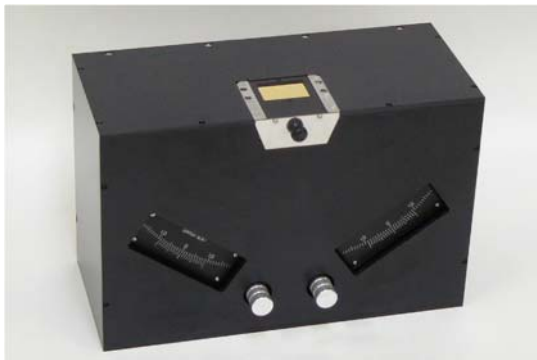


図 3 : 開発した 9 チャンネル SPR センサ

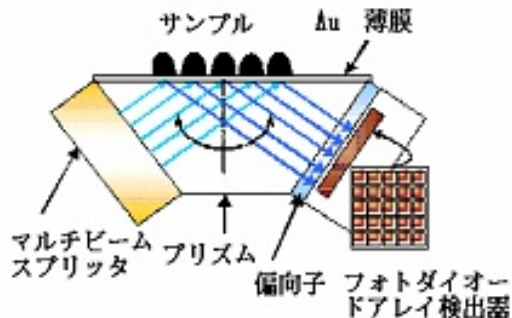


図 4 : 9 チャンネル SPR センサの光学系

本センサは、発光波長 670nm のレーザ (LD) 光を MBS に入射させて、MBS で 9 ビーム平行光線した後、プリズム上のセンサに照射させ、生じた表面プラズモン共鳴 SPR 現象に基づく 9 個の光を、プリズムの後部に配置されたフォトダイオード (PD) アレイで検出するものである。SPR 現象が起こる角度と光強度との関係を検証するために、入射角を 68.5 度±5 度の範囲を調整できる機能を組み込まれている。この調整機構は追加で組み込んだためにセンサの大きさは 260×120×170mm (幅×奥行き×高さ) で少し大きいサイズになった。

② マルチチャンネルセンサセルの試作

微小サンプルで感度良く計測するために微細加工が容易な PDMS (ポリジメチルシロキサン) を用いた薄層流路マイクロフローセルを試作した。フローセルの流路形状は 20×1.5×0.02mm で薄層である。その試作したマルチチャンネルセンサセルの写真を図 5 に示す。

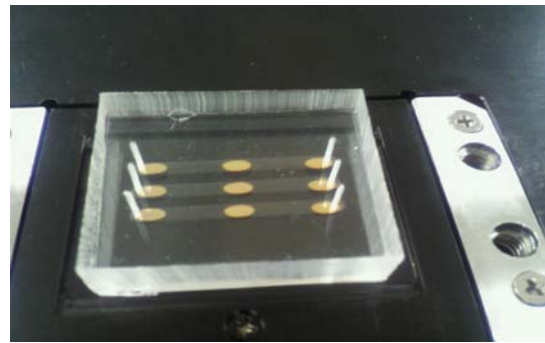


図 5 : マルチチャンネルセンサセル

③ 表面プラズモン共鳴の信号

SPR センサの表面プラズモン共鳴の信号を検証するために、図 6 に各チャンネルの水に対する SPR 曲線を示した。図から各チャンネルでの SPR 信号を同時測定可能であることが確認できる。本 SPR センサの SPR 信号は光強度から計測している。SPR の信号は、図 7 のように LD の入射に対するある特定の角度で反射光の強度が減少するので、この共鳴角をセンサ応答として測定する。共鳴が起こる i の角度に光源と検出器を固定し、共鳴角度が $i \rightarrow ii \rightarrow iii$ へと変化するにつれて、この位置での光強度が、 $a \rightarrow b \rightarrow c$ へと変化することを利用する。濃度が異なるショ糖をセンサ上に添加して全チャンネルで同時測定を行ない、図 8 は 1 例で ch1 のショ糖濃度と光強度の関係を示している。他のチャンネルでもほぼ同様な結果が得られた。

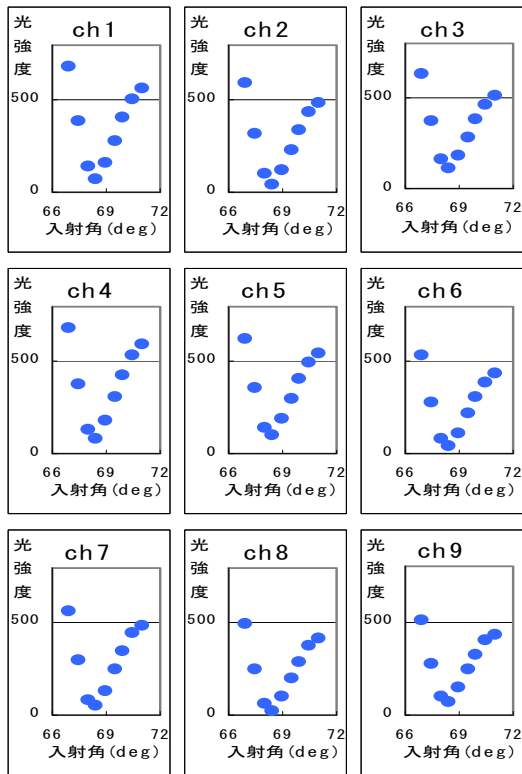


図6：SPR現象と光強度の関係

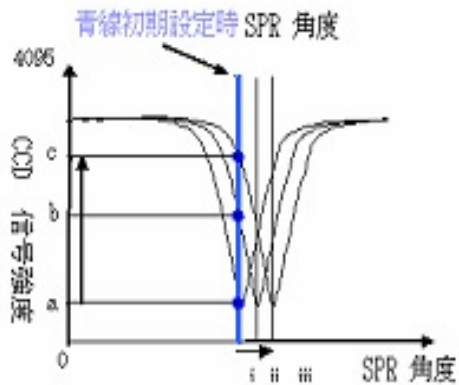


図7：光強度とSPR角度の関係

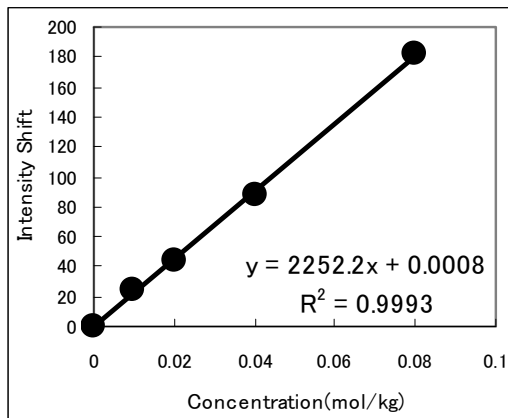


図8：シヨ糖濃度測定

④試作2号機の製作

試作1号機は光軸合わせに難しい点があり、大きさにも問題があるために、光学系に光ファイバーとマルチプリズムを組み込み、試作2号機を作製した。その写真を図9に示す。本SPRセンサも入射角を68.5度±5度の範囲を調整できる機能を組み込まれているが、大きさは220×80×100mmで小型化された。光軸合わせも簡便になり改良された。



図9：試作2号機

(2)光インターフェイス膜の試作

マッチングオイルに代わる光インターフェイス膜として使用するためには、無色透明で、粘着性が高いこと、屈折率がマッチングオイルに近く、SPR信号が等しいこと、濃度変化による角度応答が等しいことなどを考慮しなければならない。これらの条件を満たすためにシリコン膜を検討した。シリコン膜の元となるシリコン剤をテトラヒドロフランで溶解して、スピナーを用いてキャストし、スピコートすることで形成させたシリコン膜が無色透明で、マッチングオイルに屈折率が近い光インターフェイス膜を試作した。

(3)SPR免疫センサの試作

間接競合法によるペニシリン及びストレプトマイシンのSPR測定法を開発した。金センサ上にシランカップリング剤を用いて、これに各々の抗原を固定化したセンサチップを作製した。そして、図10のように一定濃度の抗体を含む抗原溶液をセンサチップに導入し、遊離の抗体がセンサチップ上の抗原と結合する際のSPR信号を検出した。開発の方法では、ペニシリンとストレプトマイシンの計測にたいしてそれぞれ10ppbの検出下限濃度を達成でき、また、センサチップの再生法を確立し、同一センサチップが多数回の繰り返し測定に使用できることが明らかになった。

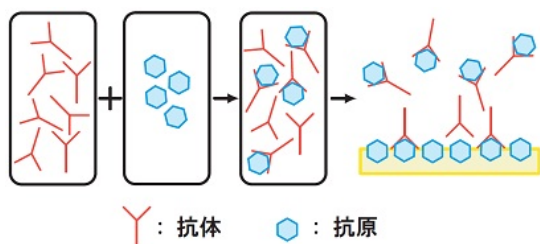


図 10 : 間接競合法を利用した測定

(4)まとめ

本研究では、新規に考案したマルチビームスプリッタをレーザー光源、プリズムセンサやマルチ受光素子などと組み合わせた新規光学系の SPR 装置を構築し、オンサイトで多成分同時に計測できる安価なポータブル 9 チャンネル SPR 免疫センサを開発した。本装置の実証試験として、牛乳中の残留抗生物質ペニシリン、ストレプトマイシンを計測した。

これにより、牛乳中の残留抗生物質を多成分同時測定する携帯型マルチチャンネル SPR センサの基盤開発技術が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① H. Nakajima, K. Furui, Y. Li, J. Ren, N. Soh, K. Nakano, A. Hemmi, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, T. Imato, Development of Portable Surface Plasmon Resonance Sensor with Multi Detection Points, *Proceedings of the μ TAS 2007*, 2, 1053-1055

[学会発表] (計 7 件)

- ① A. Hemmi, K. Furui, H. Nakajima, N. Soh, K. Nakano, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, T. Imato, Surface Plasmon Resonance Sensor with Multi Detection Points and Its Application to Simultaneous Immunoassay for IgA and IgG., The 12th International Meeting on Chemical Sensors, 2008/7/15, USA
- ② H. Nakajima, A. Hemmi, K. Furui, N. Soh, K. Nakano, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, T. Imato, On-Chip Multi-Immunoassay Using a Portable Multi-Channel Surface Plasmon Resonance Sensor and a Micro Sensor Chip Prepared by Photochemical Patterning Method, Pittsburgh Conference 2008, 2008/3/5, USA
- ③ 古井孝志, 中嶋秀, 宗伸明, 中野幸二, 辺見彰秀, 浅野泰一, 内山一美, 金木則

明, 今任稔彦, 多成分同時測定のためのポータブルマルチチャンネル表面プラズモン共鳴センサと光架橋反応を用いたセンサチップ内への位置選択的タンパク質固定化法の開発, 第 16 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2007/10/30, つくば

- ④ H. Nakajima, K. Furui, Y. Li, J. Ren, N. Soh, K. Nakano, A. Hemmi, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, T. Imato, Development of Portable Surface Plasmon Resonance Sensor with Multi Detection Points, μ TAS 2007, 2007/10/9, France
- ⑤ K. Furui, H. Nakajima, A. Hemmi, N. Soh, K. Nakano, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, T. Imato, Application of Portable Surface Plasmon Resonance Sensor with Multi Detection Points to Immunoassay Using Sensor Chip Prepared by Photochemical Immobilization Method, Tokyo Conference 2007, Asia Young Analytical Chemist Session, 2007/8/30, Tokyo
- ⑥ 古井孝志, 中嶋秀, 李岩, 任聚杰, 宗伸明, 中野幸二, 辺見彰秀, 浅野泰一, 内山一美, 金木則明, 今任稔彦, ポータブル型マルチポイント表面プラズモン共鳴センサの開発, 日本分析化学会第 68 回分析化学討論会, 2007/5/20, 宇都宮
- ⑦ A. Hemmi, K. Furui, H. Nakajima, Y. Li, J. Ren, N. Soh, K. Nakano, Y. Asano, K. Uchiyama, N. Kaneki, T. Imato, Development of Portable Surface Plasmon Resonance Sensor with Multi Detection Points, Pittsburgh Conference 2007/2/27, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金木 則明 (KANEKI NORIAKI)
室蘭工業大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号 : 40125373

(2) 研究分担者

島田 浩次 (SHIMADA KOUJI)
室蘭工業大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号 : 90178939