

博士論文 (要約)

ナノ周期構造を用いたプリズムレス表面
プラズモン共鳴法によるコルチゾール計測
に関する研究

横山 景介

日本の高齢化率の高まりと医療費の増加は大きな問題のひとつであり、両立の施策の一つが、これまで病気になり治療に多大に費やしているコストを、予防により少しでも減らしていくという考え方である。健康診断や人間ドックは一般的な手法であるが、その診断装置は大型で高価なものが多く、また計測手法は煩雑であるため、特定の施設でしか実施することができない。

近年増加傾向にある病気の一つにうつ病がある。この病気にはまだ定量的診断方法がなく、バイオマーカーとして期待される物質（コルチゾール）の定量計測が求められている。コルチゾールは唾液中に低濃度で含まれる低分子量物質であることから、計測装置の要求機能としては、ラベルフリー計測、小型、高感度、短時間計測、センサ基板の安定的供給が考えられる。しかしながら、従来研究はラベル化計測や感度不足という課題がある。

本研究では、ナノ周期構造を用いたプリズムレス表面プラズモン共鳴法（Surface Plasmon Resonance: SPR）を考慮する。SPRは原理的にラベルフリー計測が可能であり、ナノ周期構造を持つセンサ基板は、ナノインプリント技術で安定的に供給できる。ナノ周期構造を用いて原理を単純構成にすることにより小型化が可能であり、センサ基板形状の感度に影響を及ぼす設計パラメータを工夫して高感度化を目指すことができる。また、反応容積と流速を変化させることにより時間短縮を行うことができる。

そこで、センサ基板のナノ周期構造に着目し高感度化したセンサ基板形状を開発することを、本研究の第一の目的とする。そして、その計測精度は計測装置に依存することから、高精度化した計測手法を開発することを、本研究の第二の目的とする。更に、高感度化したセンサ基板と高精度化した計測装置を用いて、うつ病のバイオマーカーと期待される低濃度かつ低分子量のコルチゾールを定量的に計測することを、本研究の第三の目的とする。

本装置では、ナノ周期構造を保有するセンサ基板を使用することで、センサ基板上に固定された光ファイバを配置し、反射光スペクトルに示現するピーク波長を観察することでSPR手法を達成する（図 1）。センサ感度は、屈折率変化に対するピーク波長の移動量及び反射光スペクトル形状を考慮した二つの感度性能指数（Figure of Merit: FOM）で評価される。屈折率変化に対するピーク波長移動量の感度を S (nm/RIU)、ピーク波長の半値幅を FWHM（Full Wavelength at Half Maximum）、高さを FH（Full Height）とすると、次式で表される。

$$FOM1 = \frac{S \text{ (nm/RIU)}}{FWHM \text{ (nm)}} \quad , \quad FOM2 = \frac{FH}{FWHM \text{ (nm)}} \times 1000$$

従来研究から、センサ基板の構造がスペクトル形状に及ぼす影響として、次の三つが報告されている。周期 d が大きくなると感度 S (nm/RIU) 及び FWHM が増大する。単位構造がホールの場合、直径が大きくなると表面プラズモン共鳴の放射減衰が大きくなり FWHM 及び FH が増大する。ホールが増加すると FH が増大し FWHM が減少する。ここから、鋭いシングルピークを示現させ、感度性能指数を向上させるためには、ホール数を増加させることが重要である。

本研究では、安全とコストの観点から可視光領域を用い、センサ基板の作製の観点から基本格子形状として三角格子形状を使用した（以下、単位構造に一つのホールを配置したセンサ基板形状を単純センサ基板と呼ぶ）。単位構造がホールの場合、感度性能指数に影響を及ぼす設計パラメータとして、単位構造の周期、センサ基板の回転対称性、ホール数、ホールの直径、ホールの深さを抽出した。

はじめに、理論及び解析から設計パラメータを考慮し高感度センサ基板形状を考案した。バルク金平板の反射光スペクトル形状及び小型検出器の性能を考慮すると、波長範囲 700 nm から 800 nm が金の反射率が高く鋭いピーク波長を示現することができる。また理論式

からピーク波長はセンサ基板の周期に依存する．ここから周期を 600 nm に決定した．単純センサ基板は一種類の回転対称性（6 回対称性）を持ちシングルピーク波長を示現するが，単位構造に 3 回対称性の構造を用いセンサ基板に二種類の回転対称性が混在すると，ダブルピーク波長を示現した．ここから，シングルピーク波長を示現するにはセンサ基板内に一種類の回転対称性を持つことが必要である．ホールの数を増加させ表面プラズモン共鳴を増強し感度性能指数を向上させるために，一定の周期かつ一種類の回転対称性を持ち，単位面積当たりのホールの数を増加させたセンサ基板形状を考案した．考案したセンサ基板形状は，単位構造を一辺の長さが周期の半分の長さである正三角形の各頂点にホールを配置したセンサ基板である．このようなセンサ基板形状にすることで，センサ基板の周期を保ち，一種類の回転対称性を持たせながら単位面積当たりのホールの数を増加させることができる．解析結果から，単純センサ基板より考案したセンサ基板形状の方が，高い感度性能指数を示した．ホールの直径は，直径の増加と共に FWHM 及び FH が増加したことから，総合的に感度性能指数の高い 150 nm に決定した．ホールの深さは，100 nm 以上では感度性能指数に及ぼす影響はほとんど無かった．これは，ナノ周期構造を認識できる深さの存在が重要であると考えられる．ここから，作製誤差要因の影響が少ない深さ 200 nm に決定した．

次に，考案したセンサ基板形状を実験から検証した．7 種類のセンサ基板を熱ナノインプリント技術及びスパッタリング法を用いて作製した．周期，回転対称性，ホールの数，ホールの深さを検証した結果，定性的に解析結果と同様の傾向を示した．考案センサ基板の感度性能指数は，単純センサ基板に比べて高い値を示した（表 1）．

センサ基板を組み込んでプリズムレス SPR 装置を開発する際に，ピーク波長のばらつきを抑えて精度よく計測することが重要である．そこで，本装置にコリメートレンズを適用し，ピーク波長のばらつきを比較検討した．光ファイバとセンサ基板の距離が 30 mm の場合，350 秒間純水を送液したときのピーク波長の経時変化は，標準偏差が従来より 14 分の 1 に減少した．

センサ基板を組み込んだ本装置のセンサ機能を評価するために，強い分子間親和力を持つアビジン-ビオチン反応を用いて，濃度と反応速度の関係を検証した．センサ基板にモノレイヤーを形成し，モノレイヤーへビオチンを固定化した．コントロール実験を行い，アビジンとビオチンが特異的に反応していることを確認後，5 種類の濃度（1 nM, 3.3 nM, 10 nM, 33 nM, 100 nM）のアビジン PBS 溶液を用いて，アビジン濃度依存性実験を行った．実験結果を反応速度の観点から考察し，反応速度がアビジン濃度に依存することがわかった．反応速度がアビジン濃度に依存することは，定性的に理論と一致し，本装置が計測装置として妥当であることを確認した（図 2）．

本装置を用いてコルチゾール濃度を定量的に計測した．まず，平衡反応到達時間を短縮するために，反応容積を減少し物質の拡散距離を制限することで約 4 分の 1 に短縮し，10 mm/s の流速を用いて未反応物質をセンサ基板上へ順次送液することで約 6 分の 1 に短縮し，両方の効果で約 23 分の 1 に短縮した．

次に，3 種類のコルチゾール濃度（0 nM, 24.3 nM, 48.6 nM）の溶液に，100 nM の抗体 PBS 溶液となるように抗体を添加した混合溶液を用いて，コルチゾール濃度を計測する手法を考案し，実験で検証した．混合溶液を用いて分子量の大きな抗体を計測することで，低濃度かつ低分子量のコルチゾール濃度を計測できた．また，混合溶液のピーク波長移動量を 100 nM の抗体 PBS 溶液のピーク波長移動量で規格化することで，センサ基板個体差の影響を小さくした．

本装置のコルチゾール計測結果を従来手法の ELISA と比較検討した（図 3）．本装置は，計測中にセンサ基板を動かす必要がなく，反応溶液や洗浄溶液を連続で送液することができる連続的なフロー方式である．一方，ELISA はピペット操作やプレートの脱着など工程が

不連続であることから、それによる計測誤差が含まれやすい。そのため、本手法は ELISA 計測結果と比較したところ、標準偏差及び変動係数が非常に小さかった。計測時間は、低濃度かつ低分子量のコルチゾールでは 3 時間から 4 時間と ELISA 計測結果と同等である。しかし、アビジンや抗体などの比較的大きな分子量の場合、10 nM の低濃度であっても 30 分以内で計測することができた。また、ナノ周期構造を用いたプリズムレス SPR 装置であるため、装置を小型化することができ、ELISA 計測装置に比べてポンプを含めた装置サイズが体積比で約 5 分の 1、装置重量が 2 分の 1 以下と小型化され取り扱いが容易である。

以上から、本装置により、低濃度・低分子量のコルチゾール-抗体反応の計測が可能であることがわかった。今後は、病気の予防・早期診断に利用することによって、日本の高齢化社会と医療費の両立に貢献できる可能性がある。

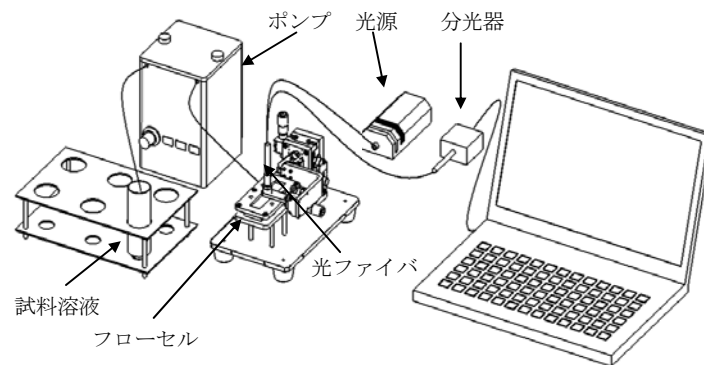
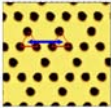
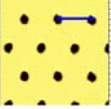


図1 装置図

表1 考案センサ基板と単純センサ基板の感度性能指数

センサ基板	FOM1	FOM2
本研究考案 センサ基板 	43.7	68.6
単純 センサ基板 	42.0	59.8

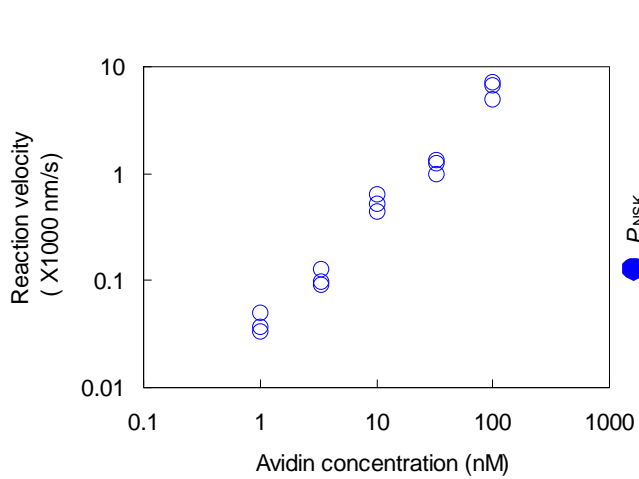


図2 反応速度のアビジン濃度依存性

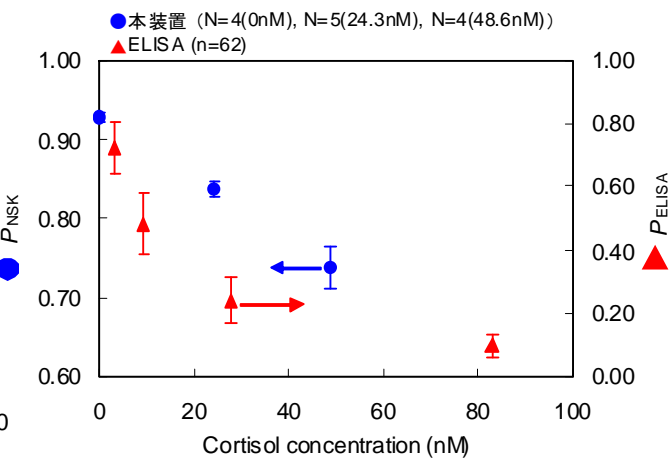


図3 本装置の結果と ELISA 結果の比較