

表面プラズモン共鳴法の計測への応用

(東京都立大学大学院工学研究科応用化学専攻) 下坂 琢哉

[はじめに] *このドキュメントは、ピー・イー・エス(株)主催によるECセミナーの抄録です。

表面プラズモン共鳴(SPR)法は、金属薄膜にp偏光の光を入射したとき、ある特定の角度(共鳴角)でその反射光強度が減少することを利用した手法である。近年、生物学分野での応用や生体の特異的応答を利用したセンサーへの応用が多数行われている。これは、SPR法が、

無色のものでも測定が可能であり、蛍光検出法でのラベル化の操作が不要である。

抗体など大きな分子に対しては感度が高い。

チオール基やジスルフィド基がある分子は金などの金属薄膜表面に強く結合するので、表面に抗体などを高密度で修飾することができる。

という特徴を持つためであるが、生物分野への応用例の多さと比較すると他の分野への例はそれほど多くは無い。これは、蛍光法では、発光波長のシフト・偏光面依存性・時間分解測定などから、対象分子やその雰囲気についての情報が得られるが、SPR法自身は、専ら量的な情報しか得られないことが一つの理由であると思われ、より広範囲への応用ということへの問題となっている。また、(より小さな分子を測るためにも)SPR法の感度を高めることも重要な課題となっている。本発表では、SPR法の長所・短所をふまえて、本研究室で行われているものも含めて応用例を紹介し、今後のSPR法の発展性について述べていくつもりである。

[マイクロチップ用SPR検出器]

近年、数cm角のガラス基板などの上にチャンネルを作成し、その中で分離・検出などを一つのチップ上で行う μ -TASが活発に研究され始めている。検出方法としては、感度・光学系の簡便性などの点から多くの場合蛍光法が用いられている。この場合蛍光ラベル化が必要であり、迅速性というマイクロチップの利点と相反している。SPR法がラベル化などを行わなくても多くの物質に感度を有する点に

注目し、マイクロチップキャピラリー電気泳動法(CE)での検出法への応用が試みられている^{1),2)}。特に糖類は、生体において胞間相互作用や生物的認識過程で重要な働きをしているが、適当なラベル化剤などが多くなくSPR法の応用が期待される。しかし、CEでは送液・分離を行うために数100V/cmの高電場がか

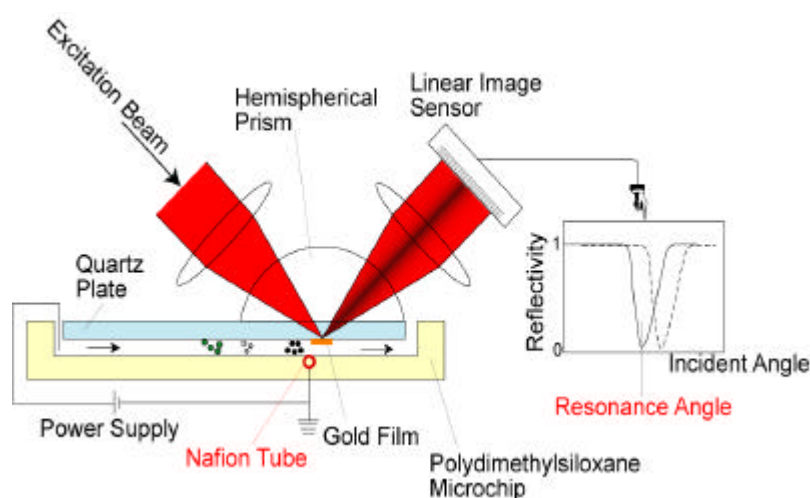


図1 SPR法を用いたマイクロチップ検出系

けられるが、その中に金薄膜があると金薄膜が損傷してしまうことがSPR法を用いる上で問題となる。そこで、当研究室では図1に示す装置系を用いSPR法をCEに応用することを試みている。白金電極とチャンネル内に埋められたイオン交換膜の一種であるナフィオンチューブを用いて電圧をかけ、ナフィオンチューブを金薄膜直前のチャンネル内に埋めた構造にする事により、金薄膜に電圧が掛からないようにした。チップは石英基板とチャンネルが掘られた

Polydimethylsiloxane(PDMS)板を張り合わせて作った。グルコース緩衝液 (pH9.53) 溶液を測定した結果を図2に示す。0秒で試料を導入し、約60秒でグルコースが検出部に到達し、検出された。この結果より、CEの高電場を用いる系においてもSPR法により検出が可能であることが示され、短時間・微量測定が可能なマイクロチップCEシステムへの応用が期待できる。

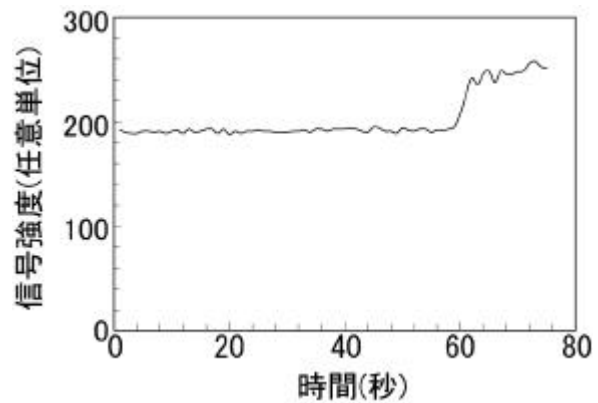


図2 グルコース溶液の検出

[SPR法による分光測定]

上述したように、SPR法では他の分光法と比べて得られる情報量が少ないという欠点がある。これは、一般的な分光法では、複素屈折率の虚部(吸光係数)を測定するのに対し、SPR法では実部(普通の屈折率)を測定するためである。

S. Boussaad³⁾らは、屈折率と吸光係数のそれぞれの波長依存性の間にクラマース・クローニヒの関係

$$\Delta e(\lambda) = -\frac{2I}{P} \int \frac{\Delta n(\lambda')}{\lambda'^2 - \lambda^2} d\lambda' \quad (1)$$

(e:消衰係数、n:屈折率の実部)

が有ることを利用し、銀薄膜表面に吸着させたチトクロムcのスペクトルを得た。図3に装置系を示す。まず、白色光を分光し、偏光子によりp偏光にした後銀薄膜界面に集光する。反射光を2分割フォトダイオードで検出し、その出力差(A-B)がちょうど0になるようにステッピングモーターで動かす。その移動量から共鳴角変化を高感度に検出している。銀薄膜上の

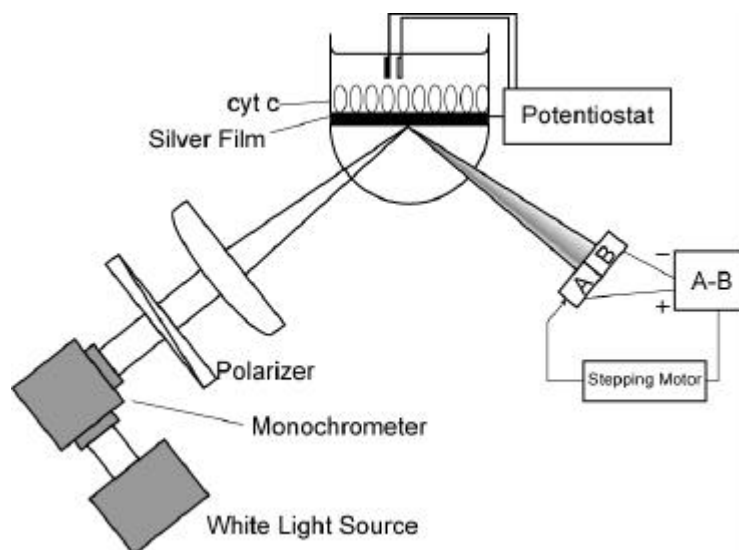


図3 高感度SPR計測系

チトクロム c は電気化学的に酸化型・還元型に変化させた。図 4 a に酸化型・還元型の吸収スペクトルを、図 4 b に還元型の共鳴角の波長依存性を示す。酸化型の場合は 500 ~ 680nm の領域では大きな吸収は無いが、還元型の場合、525nm および 550nm に吸収がある。ちょうどこの吸収極大の位置が図 4 b の変曲点となり、クラマース・クローニヒの関係から予測される結果と一致している。実際、図 4 a の吸収スペクトルから (1) 式を用いて屈折率の波長依存を求めた結果 (図 4 c) とよく一致している。

表面に吸着している分子種の吸収スペクトルを測定するのは、その吸光度が小さいため容易ではない。しかし、この多波長 SPR 法により吸収スペクトルに対応した情報が得られ、銀薄膜表面上での化学的な状態 (この場合は酸化型・還元型) の情報を得ることができた。SPR バイオセンサーは、対象物を特定するために、生物学的特異反応を利用してきたが、例えば、この手法を用いることにより、非特異的吸着反応の利用、あるいは吸着した数種類の分子種を同時に定量することが期待できる。

参考文献

- 1) S. Waseda, T. Shimosaka, K. Uchiyama, T. Hobo, Chem. Lett., 1195(1999).
- 2) T.M. Chinowsky, S.S. Yee, Electro. Lett., **35**(19), 1659(1999).
- 3) S. Boussaad, J. Pean, N. J. Tao, Anal. Chem., **72**, 222 (2000).
- 4) E. Zubritsky, Anal. Chem., 289A(2000).

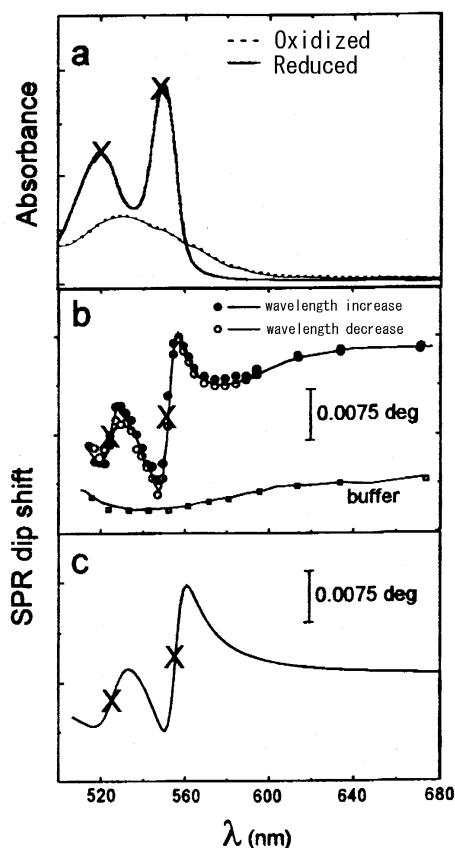


図 4 多波長 SPR 法と吸収スペクトル