レーザーオリジナル

変調レーザーを用いた差動型表面
プラズモン共鳴バイオセンサ

孫 曉春*・田島晴雄*・米田勝實*

(1993年3月19日 受理)

A Differential SPR Biosensor with a Modulated Laser

Xiaochun SUN*, Haruo TAJIMA* and Katsumi YONEDA*

(Received March 19, 1993)

A differential detection method and a modulated semiconductor laser have been developed for a surface plasmon resonance (SPR) biosensor. By using this method, the influence of sample backgrounds, e.g., its composition or temperature, can be cancelled and immunoreactions can accurately be measured in real time. Moreover, using the modulated laser, we can diminish the influence of noise from background light and amplify output signals to a favorable level. The sensitivity of the sensor can thus be improved. Using such an SPR biosensor system, we have been able to detect α -Fetoprotein of a few ng/ml.

Key Words: SPR biosensor, Differential detection, Modulated laser, Immunoreaction, LB film.

1. はじめに

表面プラズモン (SP: Surface Plasmon) は、金属と誘電体物質との境界にそのエネルギーを集めて伝搬する電子の疎密波である。金属の表面に光を透過または反射させることによりSPが励起される。光の振幅や位相の変化としてSPを検出し、その変化を追跡することにより表面上に起こる誘電的、幾何学的変化を調べることができる。表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象を用いたSPRバイオセンサ^{1,2)}はセンサ表面における免疫反応を光学的な屈折率の変化あるいは表面層の膜の厚さの変化として直接測定する方

法であり、標識用の試薬を用いる必要もなく、高感度で実時間測定が可能な手法であるため臨床診断などに重要な役割を果たすものと期待されている。

筆者らはこれまでSPRバイオセンサに関して様々な基礎研究を行い³⁾、将来癌の診断やエイズウイルスの検査などに用いられる実用的なバイオセンサシステムを目指し、研究開発を進めてきた。そこでセンサを実用化させるためにはまだいくつかの問題があることが分かった。その一つはセンサの出力から試料バックグラウンドの影響を除くことである。SPRバイオセンサを用いて実時間測定を行う場合、原理的に出力

*日本レーザ電子(株) (〒468 名古屋市天白区保呂町2318)

*Nippon Laser & Electronics Lab. (2381, Horo-cho, Tenpaku-ku, Nagoya 468)

の変化は免疫反応のほかに試料バックグラウンドにも依存する。特に血清のように複雑な成分が含まれ、しかも個体差のあるような試料を扱う場合この問題は重要である。もう一つ解決しなければならない問題はセンサを臨床診断に必要な感度まで持っていくことである。これらの問題の解決に向けて、我々はいろいろな試みを行った。ここで、これらの研究結果をまとめて報告する⁴⁾。

2. 測定原理

表面プラズモン共振 (SPR) を励起するため我々はATR法⁵⁾ (Attenuated Total Reflection) を用いた。ガラス/金属膜/試料の構造では (Fig. 1), 金属と試料との境界を伝搬する表面プラズモンの波数 k_{sp} の分散関係は次の式で表すことができる⁶⁾。

$$k_{sp} = (\omega/c) [\epsilon_m \epsilon_s / (\epsilon_m + \epsilon_s)]^{1/2} \quad (1)$$

ここで、 ϵ_m は金属膜の誘電率 (Au, Ag, Cu が用いられる), ϵ_s は金属膜に接する試料の誘電率である。

P偏光した光はガラス側から入射する。入射光の波数ベクトルの境界の平行成分がSPの波数と等しいとき、SPの共振が起こる。この波数整合条件、すなわちSPの共振条件は

Fig. 1 Schematic view of an SPR biosensor.
O, antigen; Y, antibody.

$$n(\omega/c) \sin \theta = (\omega/c) [\epsilon_m \epsilon_s / (\epsilon_m + \epsilon_s)]^{1/2} \quad (2)$$

で表すことができる (θ : 入射角度, n : ガラスの屈折率)。

免疫反応が起こる場合、抗体、抗原の複合体が金属膜上に形成され、試料側の誘電率 ϵ_s に変化を起こす。そのためSPRを励起させるための入射角度 θ も変化する。SPRが励起されるとき入射光のエネルギーがSPへ移り、反射光が減衰する (Fig. 2)。従って共振角度の変化を求めることにより免疫反応に関する情報が得られる。

3. 差動型センサシステムの開発

SPRバイオセンサは原理的に出力の変化が免疫反応のほか試料の成分、物性または温度などの変化にも大きく影響される (これを利用したSPR化学センサ, SPR温度センサもある⁷⁾)。免疫反応を正確に検出するために、反応をさせた一定の時間後再びバッファ溶液に戻し測定を行う方法があるが、この場合溶液の温度を精密にコントロールしなければならないし、免疫反応の時間的な変化に関する大切な情報が正確に得られない。

試料バックグラウンドの影響を打ち消し、真の免疫反応を実時間で検出するため、我々は差動型のセンサシステムを開発した。

Fig. 2 Changes in reflectance when an SP resonance occurs.

3.1 センサ素子の製作

差動型センサ素子はFig. 3に示すように構成した。ガラス基板 (BK7, $30 \times 20 \times 0.7$) 上に50 nmの金膜を蒸着した後、金膜の半分にセンシング側としてセンシング物質の抗体 (抗原) を固定し、残りの半分にレファレンス側としてセンシング物質に類似する特性を持ちながら測定したいものとは免疫反応の起こらない抗体 (抗原) を固定する。

これらの物質の固定は従来直接固定による物理吸着法と有機膜法の両方を用いてきたが、密度が高く、しかも配向の揃うことが望ましいことからLB (Langmuir Blodgett) 膜法を用いた。

LB膜法は当社製のLBバイオトラフを用いた。使用する試料に応じ下層液 (リン酸塩緩衝液PBSを用いた) 上に直接に抗体 (抗原) を展開する方法と下層液上にまず脂質膜 (たとえばアラキジン酸) を作り、そして抗体 (抗原) を注入し一定な時間で吸着させる方法で行った。このように下層液上にできた抗体 (抗原) 膜を20-25 mN/mの表面圧力までに圧縮しセンサ上に2層または多層累積した。

抗体 (抗原) を固定した後、非特異吸着を防ぐためにBSA (Bovine Serum Albumin) 溶液を用い、ブロッッキング処理を行った。

3.2 測定システムの構成と測定方法

測定システムをFig. 4に示す。センサ素子はマッチングオイルによりBK7プリズムに密着させる。半導体レーザー ($\lambda = 670$ nm) からの光は偏光子を通してP偏光とした。二つのビー

Fig. 3 Configuration of the sensor chip.

Fig. 4 Schematic description of the experimental setup used in the present study.

ムスプリッターにより入射光をモニタービーム I_0 、測定ビーム I_s' と参照ビーム I_r' に分ける。ビーム I_s' とビーム I_r' はそれぞれセンサのセンシング側とレファレンス側で反射され、 I_s 、 I_r となる。これらのビームはフォトダイオードにより検出し、電気回路そしてコンピュータを通し、 I_0 で規格化された信号として読み出す。

本測定システムは共振角度の変化量を 0.002° の感度で測定可能である。測定では、反応前後の共振曲線を取りそれにより共振角度の変化量を求める方法もあるが、その代わりに共振曲線の約半値のところに入射角度を固定し、試料の入れ換えによる反射率の時間的変化を測定する方法もある。これは直接共振角度を求める方法と比べ、実用的でしかも感度を更に高めることができる。

3.3 結果および検討

製作したセンサシステムの差動特性について

まず調べた。センシング側にBSAを固定したAu膜、レファレンス側にAu膜をそれぞれ用い、二種の試料A(蒸留水)とB(標準緩衝液PH 4.01)を交互に入れ換えた時の測定結果をFig. 5に示す。試料を入れ換えると、センシング側の出力 I_s とレファレンス側の出力 I_r が共に変化した、その差 I_{sr} は一定であった。この結果から、本センサシステムを用いることによって、試料バックグラウンドの影響を打ち消し、免疫反応に関する情報だけを実時間で取り出せることが明らかになった。

Fig. 6に免疫反応測定の結果を示す。この実験ではセンサのセンシング側にマウスIgG、レファレンス側にウサギIgGをそれぞれ固定し、抗マウスIgGの測定を行った。PBSに抗マウスIgGを加えると I_s 、 I_r が共に変化した、その変化量は異なる。一定の時間の後試料をPBSに戻すと I_r はほぼ元のレベルに戻ったことに対し、 I_s に差が生じた。このことは抗マウスIgGを加えることで、 I_r は試料バックグラウンドの変化だけによって変化した、 I_s は試料バックグラウンドの変化、さらに免疫反応によって変化したことを意味している。したがって、差動出力 I_{sr} の変化分は真の免疫反応だけに対応している。免疫反応をさせた10分後の差動出力信号より求めた抗マウスIgGの検量線をFig. 7に示す。

Fig. 5 Differential characters of the sensor system.
A, distilled water; B, standard buffer solution.

	immobilized material	sample
sensing side	mouse IgG	anti-mouse IgG
reference side	rabbit IgG	anti-mouse IgG

Fig. 6 Real time measurement of anti-mouse IgG.

Fig. 7 Output of sensors versus anti-mouse IgG concentration.

4. 変調レーザーを用いることによるセンサ感度の向上

SPRバイオセンサは屈折率の変化を検出するので呈色試薬や蛍光試薬を用いる必要がないと

いう大きな利点がある。しかし臨床検査の立場から見ると、感度にまだ足りない部分が残っている。センサの感度を向上させるため、我々はセンサ素子の製作、特にセンシング物質の固定化に工夫し、LB膜法を用いた。その一方、装置のハード部分の改善として光源に半導体変調レーザー、検出回路に位相検波器を導入する試みをした。

用いた半導体変調レーザーは波長670 nmで、中心周波数333 Hzであった。背景光やノイズなどの影響は受けなくなるため出力を十分に増幅することができた。このような変調レーザーを用いた差動型SPRバイオセンサを用い、 α -FP (α -Fetoprotein 肝癌患者の血清中で濃度が上昇する)の測定を行った。Fig. 8にセンシング側に抗 α -FP、レファレンス側に抗マウスIgGを固定した系により測定した結果を示す。ng/mlの濃度まで検出できることが分かった。これは現在の臨床診断に必要な感度に到達している。

5. まとめ

SPRバイオセンサの実用化を目指し、差動型

Fig. 8 Real time measurement of α -Fetoprotein.

検出方式および光変調法の導入を検討した。差動型検出方式により検査試料の成分、物性、温度などの影響を打ち消し、真の免疫反応を実時間で測定することができた。更に光変調法の導入によりノイズを押さえ、出力信号を十分に増幅できるためセンサの感度を向上させることができた。変調レーザーを用いた差動型SPRバイオセンサによりはじめて α -FPを数ng/mlの濃度まで検出することができた。これは臨床診断に必要な感度に到達している。

差動型検出方式を取れば原理的に試料バックグラウンドの影響を打ち消すことができるが、これはセンサのセンシング側とレファレンス側との光学特性のそろうことが前提条件である。特に低濃度の試料を測定する場合、この条件は無視できない。そのため金属膜の製作、レファレンス材料の選択など高精度に行う必要がある。

謝 辞

本研究は通産省の補助金のもとで行ったものである。研究を遂行するに当たり有益なご指導をいただいた静岡大学工学部光電機械工学科塩川祥子教授に深謝いたします。また試料の提供および免疫反応に関して多くの助言をくださった(株)医学生物学研究所の小島和夫氏および関係各位に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Liedberg B., Nylander C. and Lundstrom I.: *Sensors and Actuators* 4 (1983) 299.
- 2) Danies P. B., Deacon J.K., Eddowes M.J. and Pedley D. G.: *Sensors and Actuators* 15 (1988) 11.
- 3) 孫曉春, 松井義和, 塩川祥子, 窪田寛: 電学論 Vol.J 74-C II, 5 (1991) 443.
- 4) 孫曉春, 矢部陽一, 畑中広宣, 今勝憲, 田島晴雄, 米田勝實: 平成4年度光学名古屋講演会予稿集, (1992年10月) 23.
- 5) Mirlin D. N.: in *Surface polaritons* ed. V. M. Agranvoic and D. L. Mills (North-Holland, Amsterdam, 1982) p17.
- 6) Kolb D. M.: *ibid.*, p315.
- 7) 河田 聡, 南 茂夫: 光学 16 (1987) 438.