HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of surface plasmon resonance biosensor using self-assembled monolayer [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Suherman
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第11795号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59335
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Suherman_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士（環境科学）　　氏　名　Suherman

審査委員　主査　准教授　川口　俊一
副査　教　授　八木　一三
副査　教　授　田中　俊逸
副査　教　授　大澤　雅俊

学 位 論 文 題 名

Development of surface plasmon resonance biosensor using self-assembled monolayer
（自己組織化単分子層を用いた表面プラズモン共鳴バイオセンサの開発）

食の安全を確保することは，解決すべき重要な環境問題の課題である。特に輸入食材に含まれる違法薬物は日本でも関心が高いが，食品検査の割合は検査の手間と時間の制約のため，輸入量全体の15%前後と低く，迅速で高感度，高い信頼性のあるセンシング技術が求められている。そこで本研究では，前処理なしに直ちに実試料中に含まれる違法薬物を高感度に定量することができるバイオセンサの開発を行った。被検物質として，食肉中に含まれるベータアゴニストのクレンブテロール，サルブタモール，ラクトパミンを選択した。これらの化合物は，動物の脂肪分を減らして筋肉組織を増やす働きがあるため，赤身を増やして食肉の価値を高める目的で使われているが、同時に呼吸・循環器系に副作用が生じることが知られており，多くの先進国では使用が禁止されている。しかし，これらの化合物は分子量が300以下の小分子であるため，直接検知することは難しい。そこで，超高感度の光学センサで知られる表面プラズモン共鳴センサを信号変換として用いることを試みた。はじめに，センサ表面にベータアゴニストの抗体を固定化し，試料を含む水溶液を流通させて，表面プラズモン共鳴応答から表面の抗体と反応したベータアゴニスト量を求めて検量線を得たところ，1 ppm（1 μg mL^{-1}）が検出下限であった。そこで，センサ表面に抗原のベータアゴニストをはじめに固定化し，試料溶液とベータアゴニスト抗体を前反応させてから，センサ表面に流通させて，抗体の反応量を見積もるという間接競合阻害法での検出を試みた。その結果，10 ppt (10 pg mL^{-1})のベータアゴニストを高感度に検出できることを見出した。ここで，抗原をセンサ表面に固定化するためのバインダーにスクシンイミド末端を有するアルカンチオールの自己組織化単分子層を用いたところ，成膜液の濃度によって表面密度が大きく変化することがわかった。さらに，成膜液が低濃度であるほど，感度が向上することを見出した。この感度向上のメカニズムを解析するため，ラングミュア型吸着等温式を間接競合阻害法に適用した新しい計算式を提案し，抗体とセンサ表面との親和性が低いほど感度が向上することを見出した。

さらにこの提案を検証するために，自己組織化単分子層で使われる分子構造を変えることで，表面と抗体の親和性を変えることを試みた。この研究では，長鎖のウンデカンチオール，フレキシブルな構造を有するエチレングリコールチオール，3方向に枝分かれしたデンドリマーチオールを用いて自己組織化単分子層を構築した。その結果，抗原を表面密度 4.6×10^{-10}

$mol\ cm^{-2}$から $8.5 \times 10^{-10}\ mol\ cm^{-2}$の範囲で分散させることができた。この表面を使って，間接競合阻害法による抗原抗体反応を試験した結果，提案している計算式に基づいて，抗体と表面の親和性が低くなると感度が向上することを確認した。ここで得られた3-10 pptの検出下限は，実試料測定で求められている感度が 100 pptであるため，間接競合阻害法を用いたセンシング法は実用的に使うことができる十分な感度を有していると結論した。また，1検体あたりの検出時間は従来のELISA法や電気泳動法などを用いた場合では72時間必要であったが，本法を用いると300秒間で検出できることがわかった。

次に間接競合阻害法を用いて選択的に特定のベータアゴニストを検出する試験方法を提案し，試験を行った。間接競合阻害法では，試料溶液中の抗原-抗体の交叉性および表面に固定化された抗原の交叉性がセンサの選択性に寄与する。そのため，同時に複数種の抗体を流通させて，反応量の減少割合から選択性を評価した。また，特定の抗体と複数種の抗原を組み合わせた試験も併せて行った。その結果，特定ベータアゴニストに対する選択的検知割合は 90 %以上と非常に高く、他の類似化合物を誤検知することがないと結論した。

以上の結果から，実用的に食材に含まれる違法薬物を，迅速で高感度，高選択にセンシングすることができる技術を開発できたと結論した。

審査委員一同は，これらの成果を高く評価し，また研究者として誠実かつ熱心であり，大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ，申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。