



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Surface plasmon resonance immunosensor using Au nanoparticle for detection of beta agonist [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Kabiraz, Dulal Chandra
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第12866号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67702
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Dulal_Kabiraz_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士 (環境科学)

氏 名 Dulal Chandra Kabiraz

審査委員	主査	准教授	川口 俊一
	副査	教 授	BIJU Vasudevan Pillai
	副査	特任教授	田中 俊逸
	副査	教 授	高橋 昌志 (大学院農学研究院)

学 位 論 文 題 名

Surface plasmon resonance immunosensor using Au nanoparticle
for detection of beta agonist

(β アゴニストを検出するための金ナノ粒子を用いた
表面プラズモン共鳴免疫センサの開発)

安全な食糧の供給は、重要な環境課題の一つである。食文化の多様化に伴って、食肉や牛乳の需要が増えているが、地球温暖化を理由として、ウシは暑熱ストレスを感じている。その結果として、ウシの受胎率が低下し、乳牛・肉牛の生産量が低下してしまう課題が起きている。暑熱ストレスによる難産が生じると、 β アゴニストを成分とする子宮緩和剤が使用されてしまい、結果として牛乳や食肉中に β アゴニストの残渣が残ることが報告されている。しかし、食品検査の割合は検査の手間と時間の制約のために低いため、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、ウシの尿試料中に含まれる β アゴニストのうちクレンブテロールを高感度に定量することができる実用的なバイオセンサの開発を行った。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、選択性の高い免疫反応を組み合わせた。これまでの研究では、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が、応答量がわずかに10 mdegと非常に小さかったため、実用化することができなかった。そこで、抗体を金ナノ粒子で標識することで応答量を高めることを試みた。その結果、300 ppq (300 fg mL⁻¹)の高感度でありながらも応答量を3倍程度に増加させることができた。さらなる高感度化を目指して、二次抗原抗体反応を表面プラズモン共鳴センサに応用することを検討した。ここで学術的課題として、二次抗体が一次抗体の構造のうち、どのエピトープを認識しているかがわかっていなかった。そこで本研究では、エピトープの位置を同定することで、この抗原抗体反応の感度制御につながると仮定した。そこで、一次抗原抗体反応時に、表面に平行・垂直方向と異なる配向で固定化した抗原を用意し、一次抗体を反応させた。その結果、配向の異なる一次抗体の構造を作ることができた。そこへ二次抗体を反応させたところ、一次抗体を垂直方向に固定化した表面の方が高い親和性を示したことから、一次抗体は二次抗体の末端を認識していることがわかった。さらに、垂直方向に固定化した親和性の高い抗体の方が高い感度で応答を示すことを見出した。この結果は親和性が低いほど、高感度化するという結論と逆の結論になるため、高感

度化のメカニズムを検証するために、ラングミュア吸着等温式をさらに発展させて、二次抗原抗体反応を説明する新しい速度論の式を提案した。計算式に基づいて、シミュレーション曲線を作成したところ、実測値とほぼ一致した。さらに、 $\text{ppq (fg mL}^{-1}\text{)}$ レベルの高感度を得るためには、表面の親和性が液相中の抗体の親和性よりも一桁高くあるべきであることを見出した。

最後に、ウシの実尿試料測定を試みた。しかし、未処理の尿中では、抗原抗体反応が進行しないことがわかったため、前処理方法の最適化について検討を行った。その結果、実尿中には抗原抗体反応に対する阻害効果のあるタンパク質が含まれていることを見出した。さらに、その阻害タンパクは、サイズ効果で除去できない程度の小さい分子量のものであり、カルボキシ末端を有する多孔質シリカで除去できることがわかった。この知見を基にして、実尿中のクレブテロールの検出を試みたところ、約30 ppq の高感度で検出することができる結果を得ることができた。

以上の結果から、実用的にウシの尿中に含まれる β アゴニストを、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十分な資格を有するものと判定した。