

氏名	Karn-orachai Kullavadee		
学位の種類	博士(工学)		
学位記番号	博甲第8055号		
学位授与年月日	平成29年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	数理物質科学研究科		
学位論文題目	Surface-enhanced Raman Scattering Based Immunosensors (表面増強ラマン散乱検出型イムノセンサー)		
主査	筑波大学教授(連係大学院)	工学博士	三木一司
副査	筑波大学教授	工学博士	伊藤雅英
副査	筑波大学准教授(連係大学院)	博士(工学)	荻原充宏
副査	物質・材料研究機構グループリーダー	博士(工学)	宮崎英樹

## 論文の要旨

本論文では、バイオセンサーの主要な種類の一つであるイムノセンサーの読取手法に表面増強ラマン散乱分光を適用した研究を実施して、新検出方式のイムノセンサーの作製成功とインフルエンザAの検出実証に成功している。

バイオセンサーは国民の健康を守る上で重要な装置であり、罹患している病状を診断し必要な医療措置を決める為に使われる。バイオセンサーは特定の生物的検体を高速に正確に安価に測定できるものが望ましいが、全ての感染症や疾病に理想的なものが開発されてはいない。例えば、インフルエンザA検出用バイオセンサーは更なる高感度化が必要である。インフルエンザA検出用に現在使われているのはペーパクロマトグラフィ方式で比較的高感度であるが感染後1日経過しないと検出ができない。インフルエンザ治療薬は万能薬と言われているタミフルが現存するが感染後2日以内に服用しないと効果が無い。つまり、治療まで考えればインフルエンザA検出用バイオセンサーの更なる高感度化が必要である。本論文では、イムノセンサーの高感度化を研究し、特に以下の2点で成果をあげている。

### (1) 表面増強ラマン散乱分光読み取り方式のイムノセンサーの作製とインフルエンザA検出実証

イムノセンサーはバイオセンサーの主流の一つで、基板上に蛋白質を吸着し特定の蛋白質の濃度を測定するものである。このセンサーは、標的検体を認識する受容体と、受容体が検体を認識した変化の際に信号を発する信号変換器の二つからなる。受容体は抗原抗体反応を使う場合には抗体になる。信

号変換器は電氣的なものから光學的なものまで多種多様であり長所短所があるが、本論文では特に検出感度に拘り、光學的な手法である表面増強ラマン散乱分光を選択している。表面増強ラマン散乱分光は分子一個の認識が可能と共に分子の識別も可能な手法であり複雑な生体内の分子認識には最適なものの一つである。

本論文ではイムノセンサーの様式としては最も簡便な直接イムノアッセイ方式を採用している。この方式では標的抗原(検体)を基板に吸着させ、その後抗原を受容体として基板上に滴下し、抗原抗体反応で検体を認識した抗原の濃度を調べる。抗原濃度を測定する方式として表面増強ラマン散乱分光を採用し、その方式として間接型を採用した。直接型が基板の固定された抗原からも表面増強ラマン散乱分光信号を測定するのに対して、間接型では抗体からのラマン散乱分光信号では無く、専用の表面増強ラマン散乱分光信号源を(抗原抗体反応により)抗原に固定してこの信号源からのラマン信号を測定する。

間接型の表面増強ラマン散乱分光読み取り方式のイムノセンサーは既に報告があるが、本論文では、更に検出感度を上げる観点から、プラズモンカップリング効果により表面増強ラマン散乱分光信号強度を増加させる試みを行っている。この増強の工夫が本論文の独自性である。具体的な構造は、ラマン散乱分光信号源として金ナノ粒子にラマン信号源のTBBT(4, 4'-thiobisbenzenethiol)分子、分子認識用の抗体と、保護用のPEG(Thiolated PEG carboxylate (MW =3,400 Da) 及び Thiolated PEG (MW = 5,000 Da))分子で修飾した分子システム(以下SERSプローブと呼ぶ)、プラズモンカップリング用の基板として金コア粒子銀シェル層の2次元配列(以下SERS基板と呼ぶ)を用いている。SERS基板は疎水性の為、親水性に変える事と、カルボン基を末端とする分子での導入が必要である。その後、カルボン基にカルボジイミド架橋を行い蛋白質の固定が可能とする。この一連の表面修飾制御では、可視光域の吸収スペクトルを測定しプラズモンの共鳴周波数がほぼ変化しないことを確認している。

試作した表面増強ラマン散乱分光読み取り方式イムノセンサーの感度は、プラズモンカップリング効果の利用により約4倍改善すること、検出限度、LODは8ng/mlと、SERS基板を用いずに金薄膜基板を用いた場合の59ng/mlに比べ7.4倍の改善になることを明らかにしている。インフルエンザAの抗体を用いた場合にはインフルエンザの核蛋白質検出は他の蛋白質に比べて2桁以上の選択比を持ち、又再現性は4.6%の値と素晴らしいセンサー性能を示すことを明らかにしている。

試作センサーの生物学的試料測定テストも行っている。インフルエンザ感染の孵化鶏卵漿尿液を用いたもので、この液はワクチンを製造する際に用いられるものである。得られた結果はml当たり6個のウイルスまで測定できることを示し、この値は従来報告されている最良値、11個よりも約2倍改善されており、現存するインフルエンザA検出用のバイオセンサーとしては最高の感度であることを明らかにしている。

なおインフルエンザAの検出実験は全てタイ王国の科学技術開発庁(NSTDA)傘下のNANOTEC研究所で実施している。

(2) 表面増強ラマン散乱分光読み取り方式イムノセンサーの重要パラメータ: SERSプローブの大きさと、SERSプローブ-SERS基板間の距離

間接型の表面増強ラマン散乱分光読み取り方式イムノセンサーの感度を決定する二つの重要なパラメータについて検討を行っている。センサーの感度は表面増強ラマン散乱分光の信号強度と、信号及びバックグラウンドノイズの揺らぎに依存する。揺らぎについては詳細な検討は行っていないが、本論文では

信号強度について詳しい検討を行っている。信号強度は散乱断面積によって決まり、励起レーザ波長にも依存し、又 SERS プローブと SERS 基板の間のプラズモンカップリングを使っている為、SERS 基板のプラズモン共鳴波長にも依存する。用いているレーザ波長は 633nm で、SERS 基板のプラズモン共鳴波長もレーザ波長に合わせてある。そこで、残りの変数は、SERS プローブに使われている金ナノ粒子のサイズ（以下 SERS プローブ径と称す）と SERS プローブと SERS 基板との距離になる。前者は散乱断面積に直接関係し後者はプラズモンカップリングの大きさを決める。

SERS プローブ径を 26-110nm の間で変えて、人の血液中の主要抗体の一つ h-IgG を使ったイムノセンサーを作製し、h-IgG の抗原に対するイムノセンサーの測定強度を調べている。解析の為に、SERS プローブの密度を走査電子顕微鏡観察により求めている。その結果、プローブ一個当たりの信号強度はプローブ径が大きくなるに従い単調に増加し、プローブ密度は逆に単調減少して、両者の積が 53nm のプローブ径で最大となる事を明らかにしている。試作したセンサーでは、表面増強ラマン散乱分光の原理以外に、イムノセンサーの検出プロセスも重要である事を示している。

SERS プローブと SERS 基板の距離は、抗原—抗体—抗原の反応結合体（以下免疫複合体と称す）により決まる。但し、結合は抗原や抗体の種類によって認識部位が異なるので、厳密には距離を特定する事は難しい。そこで、大きさが異なる二つのケースについて信号強度の大きさを定性的に比べている。一つは h-IgG で直線的に並ぶと仮定すると 36nm の長さになる。もう一つは前立腺特異抗原 PSA で、同じ仮定をすると 28nm の長さになる。比較はプラズモンカップリングが SERS 基板の有無による信号強度比である SERS 増強度で行っている。H-IgG が 2.6 倍、PSA が 6.4 倍と反応結合体の大きさが小さいほど SERS 増強度が大きくなる事を明らかにしている。抗体は幾つかの断片に分解する事が可能で、断片だけでも抗原を認識する機能を持つ。従って、この結果は今後センサー感度を上げる指針を与える結果を示している。

## 審 査 の 要 旨

〔批評〕

本論文では、バイオセンサーの主要な種類の一つであるイムノセンサーに表面増強ラマン散乱分光の読取方式を研究し、新検出方式のイムノセンサーを実際に試作しインフルエンザAの検出実証まで成功している。表面増強ラマン散乱分光読み取り方式のイムノセンサーは既に報告があるが、本論文では、検体固定基板に金薄膜基板の代わりにSERS基板（金属ナノ粒子配列）を用いる事で、約4倍に読み取り信号を増強することに成功している。この事は狙い通りにプラズモンカップリング効果による表面増強ラマン散乱信号を増強する事に成功した事を示している。試作センサーはインフルエンザAの核蛋白質のみを選択的に検出し、他の蛋白質を検出しない選択性を持ち、4.6%のばらつきで良い信号検出の再現性を兼ね備えている。生体材料を用いた場合の感度として、ml当り6個のウイルスを検出する感度がある事を実証している。この感度はインフルエンザA検出用イムノセンサーとしては世界一のものである。イムノセンサーの強度を改善したアイデア、センサーのデザイン、必要な合成全てを確立し、センサーを実際に試作して、現実の感染症に適用できることを実証するまで研究を完結した事は評価できる。

以上の点で本論文は高い価値を持つと評価する。

〔最終試験結果〕

平成29年2月14日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。