表面プラズモン共鳴法

表面プラズモン共鳴(Surface plasmon resonance：SPR)法は，センサーチップ上の質量の変化を，表面プラズモン共鳴により生じる反射光の消失角度の変化として検出する方法であり，物質間の結合特異性や結合親和性の解析，試料中の分析対象物質濃度の測定等に用いられる．

表面プラズモン共鳴を利用して物質間相互作用を測定する装置では，一般的に，プリズムを用いたKretschmann配置が採用されている(図1)．センサーチップの金属薄膜表面で全反射するように偏光を照射すると，反射光の一部に反射光強度が低下したSPRシグナルが観察される．SPRシグナルの生じる角度はセンサーチップ上の質量に依存して変化するため，センサーチップ上に固定した分子(リガンド)と添加した分子(アナライト)が結合又は解離することで，SPRシグナルの生じる角度が変化する(図1)．測定結果は，SPRシグナルの角度変化や，角度変化から換算されるレスポンスユニット(RU)を経時的に示したセンサーグラムとして取得される．取得された結合及び解離のセンサーグラムを理論曲線にフィッティングさせることで，リガンドとアナライトの結合速度定数(k_a)，解離速度定数(k_d)，解離定数($K_D = k_d / k_a$)を求めることができる．また，既知濃度のアナライトとレスポンスを比較することで，試料中のアナライト濃度を求めることができる．

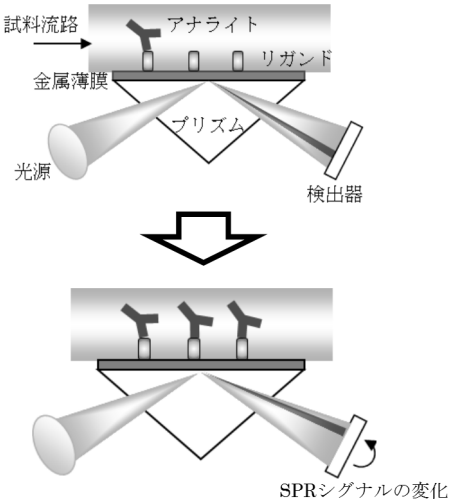

図1　SPR測定原理の概略図(Kretschmann配置)

1.　装置

一般的なSPR装置(連続フロー方式)は，光源，光学検出器，送液システム，センサーチップ挿入部，データ集積部からなる．センサーチップはカルボキシメチルデキストランを結合させたものが一般的である．固定化する分子の特性に応じて適切なものを選択する．センサーチップを装置にセットするとセンサーチップ表面に複数のフローセルが形成され，各フローセルにそれぞれリガンドを固定化することができる．

2.　測定

SPR法は，リガンドとアナライトの結合特異性の確認，結合親和性解析，又は，アナライトの濃度測定に使用される．通例，流路に測定用緩衝液を流しながら，アナライトを注入し，SPRシグナルを経時的に観察することで，センサーチップ上に固定化したリガンドとの結合のセンサーグラムを取得する．センサーグラムの形状から結合親和性を解析するカイネティクス解析では，アナライトの注入を終了した後，アナライトを含まない緩衝液を流して，解離のセンサーグラムも取得する．測定後，再生用緩衝液を流して，リガンドに結合しているアナライトを全て除去する(図2)．

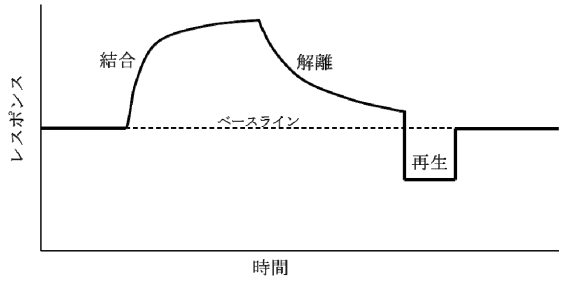

図2　SPRセンサーグラム　例示

2.1.　試料及び緩衝液

（1）　アナライト溶液

分析目的や測定を行う分子間の親和性に応じて，測定用緩衝液を用いて試料を至適な濃度に希釈し，アナライト溶液とする．試料に不溶性の夾雑物が含まれる場合，遠心分離やタンパク質低吸着のフィルターなどで不溶物を除去する．

（2）　測定用緩衝液

測定対象に応じ緩衝液を選択する．緩衝液に塩や界面活性剤を添加することでリガンドやアナライトを安定化できることがある．必要に応じ，緩衝液は使用前にフィルターろ過し，脱気する．測定時，アナライトを注入した際に対照フローセルへの非特異的な結合が見られた場合は緩衝液のpHやイオン強度等の変更により，至適化する．

（3）　再生用緩衝液

再生用緩衝液には酸性溶液，アルカリ性溶液，塩溶液，界面活性剤，非極性溶液，キレート剤などが使用される．用いることのできる緩衝液は装置の流路系の材質により異なるため，装置の化学耐性を確認する．センサーチップ表面のリガンドの性質を変化させることなく，結合した全てのアナライトを解離させる条件が理想的である．再生用緩衝液が適切であれば，再生後のベースラインがアナライト添加前のベースラインまで戻り，繰り返し測定で結合レスポンスが低下しない．再生条件が適切でない場合は，測定サイクルを重ねるごとにリガンドへの結合量が低下するため，測定の再現性に影響が生じる．リガンドとアナライトの解離が十分速い場合には緩衝液を流すことで，リガンドに結合したアナライトが解離するため，再生用緩衝液を流す必要はない．

2.2.　測定用センサーチップの準備

センサーチップへのリガンドの結合の方法には，リガンドを直接固定化する直接法と，リガンド内の特異的認識配列に結合するタンパク質やリガンドに対する抗体などを固定化し，リガンドを捕捉する捕捉法がある．リガンドの生物活性を維持した状態で固定化し，アナライトとの結合への影響を小さくすることが重要である．また，センサーチップに固定化するリガンドは純度が高いものを使用する．

リガンド固定化量は，次式を参考にして設定する．

$$\text{リガンドの固定化量}=\frac{\text{必要}R_{\max}}{\text{リガンドの結合価数}}\times\frac{\text{リガンドの分子量}}{\text{アナライトの分子量}}$$

測定に必要な$R_{\max}$(リガンドにアナライトが最大限に結合した場合のレスポンス)は使用する装置の感度に応じて定められる．結合親和性解析を行う場合は，立体障害や凝集，マストランスポートリミテーション(リガンドが過剰でアナライトの供給が追い付かず，アナライトの供給量が結合量変化の律速になっている状態)を避けるために$R_{\max}$は低く抑える．濃度測定を行う場合はマストランスポートリミテーションが生じることで，アナライト結合量の濃度依存性が上がり，検量線の直線性が上昇するため，$R_{\max}$は高くすることが望ましい．

通例，センサーチップ上にリガンドを結合していない対照フローセルを用意し，非特異的なレスポンスの検出に使用する．未処理のフローセル，リガンドを固定化する際行った化学処理と同じ処理を行ったフローセル，又はアナライトと結合性を持たないリガンド様分子を固定化したフローセルが対照フローセルとなる．捕捉法でリガンドを捕捉した場合は，捕捉用分子を固定化したフローセルを対照とする．

固定化したリガンドが安定な場合は，センサーチップを装置から外して保存することが可能である．保存には乾燥状態又は緩衝液に浸した状態で冷所に保存する方法等がとられる．

リガンドの固定化法

（1） 直接法

リガンドのアミノ基，チオール基，カルボキシル基，アルデヒド基，ヒドロキシル基や，リガンドの疎水性などを利用して，直接リガンドを固定化する．通例，センサーチップにはカルボキシル基のような固定化に利用できる基を持つ層があり，リガンドを共有結合により固定化する．直接固定化する場合にはリガンドの方向性が定まらないためにしばしば不均一な表面になる．

（2） 捕捉法

リガンドとの結合能を持つ捕捉用分子をセンサーチップに固定化し，捕捉用分子との結合によりリガンドをセンサーチップに捕捉する．捕捉用分子には，例えば，リガンドに対する抗体，リガンドに付与した特異的認識配列に対する抗体等が用いられるほか，リガンドが抗体医薬品の場合は，プロテインAやプロテインG，リガンドがビオチン化された分子である場合は，ストレプトアビジン等が使用される．捕捉法では，リガンドの方向性が均一になりやすい．捕捉用分子とリガンドは測定時に解離しないことが重要である．サイクルごとにリガンドを捕捉し直す場合は，リガンドごとに再生条件を決定する必要がないため，測定条件の決定が容易である．

2.3. 測定条件の設定

（1） ベースラインの確認

測定開始前に，ベースラインが安定していることを確認する．ベースラインが安定していない場合は，①緩衝液，高イオン強度の溶液，又は，界面活性剤を含む溶液を複数回注入する，②緩衝液を高流速で流す，③アナライトの結合と再生操作を繰り返す，等の操作で安定させる．

（2） 流速

結合親和性解析ではマストランスポートリミテーションを抑制するために速く設定し，濃度測定ではマストランスポートリミテーション条件とするために遅く設定する．

（3） 送液時間

結合や解離等の各領域の必要時間は，測定様式により異なる．特異的結合の確認では，結合領域の時間はレスポンスの変化が十分観察できる時間として設定する．カイネティクス解析を用いた結合親和性解析では，解離が遅い反応の場合，解離時間を十分にとる必要がある．平衡値解析によるアフィニティー解析では，結合が平衡に達するのに十分な時間を結合領域の時間として設定する．濃度測定では，適切な検量線が得られる測定ポイントが含まれていればよい．

（4） $R_{\max}$の確認

測定された$R_{\max}$が，リガンドとアナライトの分子量，リガンドの固定化量，リガンドの結合価数より算出された理論的$R_{\max}$を超えている場合は，結合価数が間違っている，アナライトが凝集している，非特異的結合が起こっている等の理由が考えられるため，測定又は解析条件を変更する．

（5） 測定の再現性の確認

測定条件が至適でない場合，又は，測定サイクルを重ねるごとにリガンドが失活する場合等は，測定の再現性に影響が生じることがある．また，センサーチップを保存していた場合，保存により再現性に影響が生じることもある．測定条件を設定する際には，再現性に特に留意する．必要に応じ，測定可能な回数や保存可能な期間をあらかじめ設定しておく．

2.4. 測定法

2.4.1. 結合特異性の解析

アナライトを添加し，結合レスポンスからリガンドとの結合を確認する．固定化したリガンドに別のアナライトが結合しないことを示す等，適切な対照実験により，結合が特異的であることを確認する．

2.4.2. 結合親和性解析

（1） カイネティクス解析

アナライトを注入し，結合を測定した後，アナライトを含まない溶液を流して，アナライトの解離を測定する．その後，再生操作でアナライトを全て解離し，次のアナライト溶液を測定する．再生操作を行わずに，異なる濃度のアナライトを連続して注入することで結合親和性を解析する方法もある．通例，K_D値の1／10から10倍の間で5濃度以上のアナライト濃度について測定する．

（2） 平衡値解析

結合及び解離が速く，カイネティクス解析を行うことが難しい場合や，モデルへのフィッティングが難しい場合は，平衡値解析を行う．アナライトの結合が平衡に達するまでの時間，アナライトを注入し続け，平衡に達した状態でのレスポンスを記録する．結合したアナライトを再生操作により解離して，次のアナライト溶液を測定する．K_D値は$1／2R_{\max}$を与えるアナライト濃度として算出されるため，最高濃度のアナライトで結合が飽和に近づくよう，アナライト濃度を設定する．

2.4.3. 濃度測定

マストランスポートリミテーション条件下で測定すると検量線の直線性が増し，広い範囲で測定精度を上げることができるため，リガンドをなるべく多く固定化したフローセルにアナライトを注入し，結合を測定する．その後，再生操作でアナライトを解離し，次のアナライト溶液を測定する．既知濃度のアナライトの測定結果から，検量線を作成し，アナライト濃度を計算する．アナライト濃度と拡散速度が比例することを利用し，検量線を用いずにアナライト濃度を計算する方法もある．

3. データ解析

解析を行う際にセンサーグラムの不必要な部分(捕捉用分子によるリガンドの捕捉や再生部分など)を除き，リガンドを結合したフローセルのレスポンスから対照フローセルのレスポンスを差し引く．また，センサーグラムのベースラインを0に合わせる．必要に応じ，測定用緩衝液のみを注入して得られたセンサーグラムを，アナライトを注入したセンサーグラムより差し引く．

3.1. 結合親和性解析

（1） カイネティクス解析

カイネティクス解析はリガンドとアナライトの結合様式から導かれる反応速度式を用い，測定されたセンサーグラムから近似式のパラメータ(k_a, k_d, K_D, R_{max}など)を算出する方法である．リガンドとアナライトが1：1で結合する場合，

結合領域の反応速度式は

$$dR/dt = k_a \times C \times (R_{max} - R) - k_d \times R$$

解離領域の反応速度式は，

$$dR/dt = -k_d \times R$$

で表される(C：アナライト濃度，R：レスポンス)．

マストランスポートリミテーションや溶液効果を考慮した項を含む反応速度式が用いられる場合もある．

また，結合親和性の指標となる解離定数K_Dは，次式により求められる．

$$K_D = k_d / k_a$$

結合親和性解析のための反応モデルとしては，①リガンドとアナライトが1：1で結合するモデル，②抗原に対する抗体の結合のように，リガンドとアナライトが2：1で結合するモデル，③2種のアナライトがリガンドに競合的に結合するモデル④親和性の異なる二つの結合部位をもつリガンドに1種類のアナライトが結合するモデル，⑤1：1で複合体を形成した後，コンフォメーション変化を起こすモデル等が用いられる．他の生化学実験等の結果も考慮し，理論上，適切と考えられるモデルを用いる．

カイネティクス解析を行った場合は，測定されたセンサーグラムと理論曲線の残差プロットによる評価や，χ^2 (平均平方残差で測定データと計算された理論曲線の差を示す値であり，フィッティングが良いと小さい値となる)等の統計的パラメータを指標にフィッティングが適切であるか評価する．

理論曲線とのフィッティングが不良の場合には，試薬の純度が低い，固定化の方法や固定化の密度が適切でない，アナライトの濃度が適切でない，非特異的な結合がある，リガンドの活性が落ちている，選択した反応モデルが適切でない，等の理由が考えられるため，測定条件や反応モデルの見直しを行う．また，結合・解離が速い反応で，データ解析時に，試料中の緩衝液成分によるレスポンスとして算出されるRI(refractive index)値が高くなり過ぎる場合は，RI値を0になるように固定し，フィッティングを行う．フィッティングが不良の場合に，予想されるk_a，k_dに近い値を初期値に設定することでフィッティングが良好になることがある．

（2） 平衡値解析

平衡値解析では，例えば，アナライト濃度をX軸に，各アナライト濃度において平衡に達したレスポンスをY軸にプロットし，

平衡反応式：アナライト濃度に対する平衡値

$$= \text{アナライト濃度} \times R_{max} / (\text{アナライト濃度} + K_D)$$

より回帰を行い，$1/2R_{max}$のレスポンスを示す濃度(K_D)を求める．本反応式により算出されるK_Dはリガンドとアナライトが1：1で結合すると仮定した場合の数値である．実測のレスポンスがR_{max}に収束している場合は良好な解析ができるが，R_{max}よりも低い範囲である場合は解析値の信頼性が低いため，測定濃度範囲を高濃度側に広げて再度，測定を行う．

3.2. 濃度測定

既知濃度のアナライトを注入して得られたセンサーグラムより，注入開始時のレスポンスの傾き，又は，注入後一定時間経過した時のレスポンスを求め，アナライト濃度に対してプロットする．4－パラメーターロジスティック回帰あるいは直線回帰など，適切な近似式を用いて検量線を作成する．試料をアナライトとして測定したレスポンスの傾き又はレスポンスを求め，検量線より試料濃度を算出する．

4. 各種試験への適用

4.1. 確認試験への応用例

2.4.1.に記した特異的結合の確認を利用し，試料がリガンドに結合することを確認する．システムの性能として，標準物質及び陰性対照(リガンドとの結合性が識別されるべき任意の物質)試料を測定し，結合の特異性を確認する．

4.2. 結合親和性試験への応用例

2.4.2.に記した結合親和性解析を利用して，標準物質及び試料についてK_Dを求める．結合親和性の規格値は，K_D又はK_Dの相対値(試料のK_D／標準物質のK_D)について設定することができる．

システム適合性としてシステムの性能と再現性を設定する．例えば，システムの性能は，リガンドの固定化量が設定した範囲内であること，リガンドとの結合親和性が既知である複数の親和性確認用試料のK_Dが親和性順どおりに測定できること，χ^2があらかじめ設定した数値以下であること等により確認する．システムの再現性は，繰り返し測定時のK_Dの相対標準偏差があらかじめ設定した数値以下であること等により確認する．

4.3. 結合量を指標とした比活性測定への応用例

標的分子との結合量を指標に比活性を算出する場合，2.4.3.に記した濃度測定法を利用して測定を行う．標準物質により作成した検量線をもとに，試料溶液のレスポンスから標準物質に対する相対力価を算出し，タンパク質濃度で除して比活性を求める．

システム適合性としてシステムの性能と再現性を確認する．例えば，システムの性能は，リガンド固定化量が設定した範囲内であること，検量線の相関係数又は決定係数が設定した数値以上であること等により確認する．システムの再現性は，繰り返し測定時のレスポンスの相対標準偏差が，あらかじめ設定した数値以下であること等により確認する．