

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命現象の解明と応用に資する
新しい計測・分析基盤技術」
研究課題「ハイブリッド局在SPRを用いた
生体分子の環境応答性計測」

研究終了報告書

研究期間 平成17年10月～平成22年3月

研究代表者：青山 茂
(オムロン株式会社技術本部・参与)

§ 1 研究実施の概要

●研究の目的

生物は、極めて多数の生体分子間相互作用のネットワークが機能することによって形成されるシステムであり、生命現象の動的挙動を、簡便且つリアルタイムに把握するには、その事象を司る生体分子間相互作用を非標識、リアルタイムに観察する手法が求められる。本研究では、生体分子と同程度であるナノオーダーサイズの独自構造を表面プラズモン共鳴 (SPR; Surface Plasmon Resonance) センサ表面に設けることにより、金属と光の相互作用をナノスケールで自在にコントロールし、センサとして応用することで、従来困難であった高感度、小型、簡便なリアルタイムセンサを構築し、生命現象の解明に寄与することを目的とする。

●研究実施内容・経緯

現在、生体分子の動的観察の手段として、SPR センサが実用化されている。SPR センサはセンサ表面近傍の生体分子の反応を屈折率変化としてダイレクトに検出するため、蛍光等の標識を必要としないという利点を有する。しかし、そのセンシング領域は光の回折限界によって支配されるためセンサ表面から数百 nm と、分子サイズと比べて数十倍の範囲の影響を受け、ターゲット以外の溶液層の温度変化や夾雑物の影響によって感度が低下するといった課題があった。これらの課題を回避するために、従来の装置では厳密な温度コントロールや夾雑物の除去といった複雑な機構が必要となり、その結果装置が大型化、高価格化してしまう、またそれでも尚、低アフィニティの物質は検出が困難といった様々な課題があった。

一方で、それらの課題を解決する手段として、近年ナノフォトニクス分野で局在型の表面プラズモン共鳴 (LSPR; Localized Surface Plasmon Resonance) が注目を集めている。LSPR は金属ナノ構造において特定の条件で光を入射した場合に、光の回折限界以下の領域で共鳴が発生する現象であり、その共鳴電界の局在性をセンサに利用することでバックグラウンドノイズの影響を排除した高 S/N な検出デバイスが期待されている。しかし、現段階ではその発生メカニズムの解明、基本特性の確認といった基礎研究の報告がほとんどであり、センサとしての実用化には、高感度化、デバイス作製プロセスの安定化など様々な障壁が存在している状況であった。

本研究では、ナノ光学設計技術の応用により、ナノオーダーの金属構造と光波の相互作用現象を解明し、生体分子を検出するためのセンサとして効果的な構造を明らかにした。これにより、センシング領域を光の回折限界以下のナノサイズまで任意に制御することが可能となり、センサの高 S/N 化、小型、簡便な生体分子間相互作用センサシステムの構築を可能とした。さらに、生命現象解明のためには本センシングデバイスを幅広い研究者が手軽に使えるように普及可能であることが重要な鍵となる。我々は、デバイスの安定した作製を実現するセンサ構造の導出とナノ微細加工プロセスの構築を行い、生体分子固定化技術の構築を含む、本センサを用いた応用検証を実施した。

●研究成果

上記の取り組みにより、耐環境特性が従来よりも大幅 (10倍～) に向上したセンシングを実現した。この結果、従来では困難であった高感度、小型、簡便なセンシングが可能となった。以下に本研究で得られた成果を要約する。

1. センサ表面に極微細 (~100nm) なギャップ構造を狭ピッチ (300nm) で作製することにより、ギャップ内部において局在した表面プラズモン共鳴モードが発生することを発見。今回発見されたモードは、ギャップ深さ、幅の調整により、従来困難であった広範囲での感度領域や共鳴波長のチューニングが容易に可能であることが明らかとなった。
2. 上記ギャップ構造を用いることで、ナノパターンを高速で転写するナノインプリント法

- を応用したデバイス作製が可能となり、ローコスト、高品質、高 S/N (従来比 10 倍) なセンサデバイスを実現した。さらにナノ・マイクロハイブリッド構造の実現により、LSPR 用のナノ構造とサンプル送液用のマイクロ流路を同時一括に作製することに成功した。
3. 本デバイスを使用するためのセンサシステムとして、全反射等の特殊な光学系が不要といった LSPR の特徴を活かすことで、W160×D160×H144mm (3kg) と従来市販装置比約 20 分の 1 の小型プロトモデルの構築を行った。これは流路系等を含むオールインワンの SPR システムとしては現在世界最小である。さらに、簡易的な検査を行うためのシステムとして片手サイズのシステムも現在構築中である。
 4. 実際の生体分子間の相互作用検出においては、センサ表面に対する抗体等のプローブ分子の密度や配向状態を、できるだけ高い精度で制御することが非常に重要となる。本研究では、自己組織化単分子膜を用いた共有結合方式の他、ビオチン-アビジン結合や融合タンパク質を用いた方式など、異なる構造を有する生体分子の固定化技術を比較検討した。優れた結果を示した方式に関しては、プロセス条件の最適化を実施し、センサの高 S/N 化に成功した。
 5. センサの特性評価用のモデルタンパク質として、肝臓癌の腫瘍マーカーである AFP (α -fetoprotein) の検出を行い、直接法で 20ng/ml、金コロイドを用いたサンドイッチ法で 1ng/ml と非常に高感度な検出を実現した。

§ 2. 研究計画に対する成果

(1) 当初の研究構想

生命現象を司る生体分子間相互作用を簡便、高感度、リアルタイムに検出する技術を構築するため、大きく分けて下記の項目について取り組みを実施する。

i) ナノ光学技術によるデバイス設計

ナノ構造を有する場合のハイブリッド局在 SPR モードの解明を行い、高 S/N を実現する構成を決定する

ii) デバイス作製技術の構築

ナノインプリント法の応用によりハイスループット、高品質なデバイス作製技術を構築する

iii) 生体分子固定化方法の検討

プローブ分子の高密度、高配向化により非特異吸着を低減しつつ、ターゲットを高感度に捕捉する固定化技術を構築する

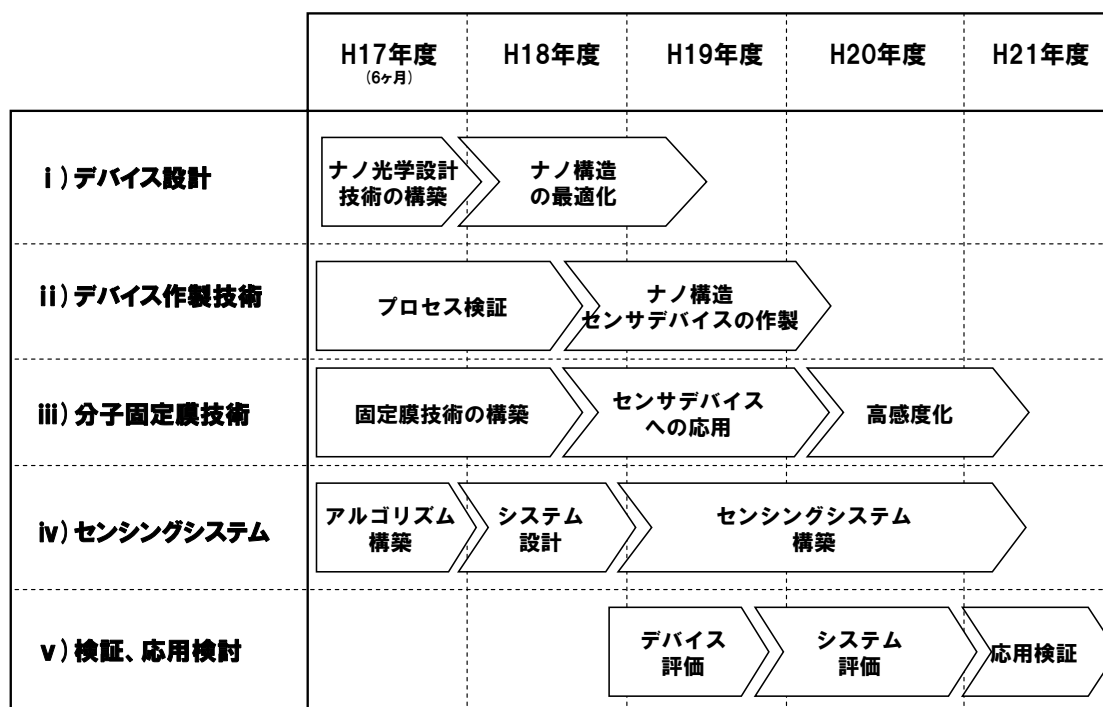
iv) センシングシステムの構築

本デバイスを測定する小型、簡便なセンサシステムの構築を行う

v) デバイス、システムの検証、応用検討

本研究で構築したデバイス、固定化膜、システムを用いて精度検証や様々な応用について検討を実施する

当初の計画は下表の通りである。



(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

・ 流路作製技術の構築（追加）

デバイスとして実用化を想定した場合にナノ構造の作製技術だけでなく、サンプルを送液するための流路等の構築が必要である。一般的な流路作製法では目標とする簡便さや再現性の達成が困難であることが判明してきたため、独自の流路作製技術の構築を追加で実施した。

・ デバイス量産プロセス検証（追加）

研究開始当初は、量産性の高いナノ構造作製技術としてナノインプリント法が一般的であったが、近年 Blu-ray の実用化等に伴い、作製スループットが高い射出成形法においてもナノ微細形状の転写が可能となってきた。本研究では最先端の射出成形法によるナノ構造作製についても追加で検討を実施した。

・ ハイブリッド LSPR モードの利用（修正）

研究の過程において発見されたギャップ型 LSPR モードは、ギャップの深さ、幅といった構造パラメータによって感度領域を任意に調整することができることが解明された。システムの小型化も考慮し、ナノ構造を最適化することで、LSPR モードによって環境特性の排除を実現した。

§ 3 研究実施体制

(1)「オムロン株式会社」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	青山茂	オムロン(株)	参与	H17. 10～H22. 3
	奥野雄太郎	オムロン(株)	技術専門職	H17. 10～H22. 3
	内田大道	オムロン(株)	主幹	H19. 4～H21. 3
	松下智彦	オムロン(株)	主査	H17. 10～H20. 3
	西川武男	オムロン(株)	主事	H17. 10～H22. 3
	山下英之	オムロン(株)		H17. 10～H21. 3
	中村恵子	オムロン(株)		H17. 10～H18. 4
	蓮井亮介	オムロン(株)		H17. 10～H22. 3
	増田梨恵	オムロン(株)		H19. 4～H21. 3
	羽根田佳子	オムロン(株)		H19. 4～H22. 3
	谷口 翠	オムロン(株)		H20. 4～H21. 3
	神山 進	オムロン(株)		H21. 4～H22. 3
	藤田悟史	WDB(株)		H18. 1～H22. 3
	梶座真由美	オムロン・パーソネル(株)		H18. 1～H22. 3

② 研究項目

(H17年度) ナノとマイクロのハイブリッド構造体によるエバネセント場と局在場の2層電場化による新しいセンシングすなわちハイブリッド局在SPRセンシングの原理解明と、それによる世界初の生体環境下での生体分子間相互作用の動的変化の解明を行う。

(H18、19年度) ナノ構造体によるエバネセント場をコントロールすることで従来に比べて高感度なバイオセンサーを実現し、それによって低分子量もしくは低アフィニティの生体分子間相互作用の検出を行う。また、センサの小型化も検討し、汎用性の高いバイオセンサーを実現する。

(H20、21年度) デバイスとしての実用化を想定し、流路系や量産性についての検討を実施し、従来困難であった高感度、小型、簡便なリアルタイムSPRセンサのプロトモデル構築を実現する。また、構築した新規デバイスを用いて、精度検証や様々な生体分子間相互作用の検出について応用検討を実施し、生命現象解明に寄与できるセンサに仕上げる。

(2)「大阪大学」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	和沢鉄一	大阪大学	客員助教授	H17. 10～H18. 3

② 研究項目

(H17年度) ナノとマイクロのハイブリッド構造体基板への生体分子固定化技術の開発を行い、さらに従来の問題点である生体分子固定化の配向制御や非特異的吸着防止の達成による高感度プロテインチップの開発を行う。

§ 4 研究実施内容及び成果

4.1 ハイブリッド局在SPRを用いた生体分子の環境応答性計測 (オムロン株式会社 青山グループ)

(1)研究実施内容及び成果

生命現象を司る生体分子間相互作用を簡便、高感度、リアルタイムに検出する技術を構築するため、前述のように大きく分けて下記の項目について取り組みを実施した。

1. ナノ光学技術によるデバイス設計
2. デバイス作製技術の構築
3. 生体分子固定化方法の検討
4. センシングシステムの構築
5. デバイス、システムの検証、応用検討

以下に各項目の実施内容、成果について記載する。

1. デバイス・ナノ光学設計技術

成果

センサ表面に独自のナノギャップ構造を設けることにより、ギャップ内部において局在した表面プラズモン共鳴モードが発生することを明らかにした。本構成を用いることで、従来SPRではセンシングエリアが数百nmであったのに対し、数十nm以下と光の回折限界以下まで局在化させることが可能であることを検証。さらにギャップ深さ、幅の調整により、従来困難であった広範囲での感度領域や共鳴波長のチューニングが容易に可能であることが確認された。

類似研究との比較

最も一般的なLSPRの発生方法としては、金属コロイドを用いたものであるが、実際にセンサ基板として用いるには、コロイドの凝集、密度制御等の課題がある。また電子ビームを用いることで安定した任意パターンを作製し、LSPRを発生させる研究も特にここ2、3年盛んに行われているが、パターン上に発生するSPRモードの理論検証等、ほとんどが基礎研究段階である。また電子ビーム法の場合、通常数～数十時間/枚の作製スループットのため、非常に高価なデバイスになってしまうといった課題があった。本研究では、独自のナノギャップ構造を提案し、実際のセンサを想定した特性(感度領域、共鳴波長、感度等)の最適化といった応用段階まで研究を進めた。さらに本構成であれば、最終的にはナノインプリント法によってナノギャップ構造を作製することにより、デバイスの量産化が可能である。

実施方法・実施内容

①設計手法の構築

ナノ領域の光学的挙動をシミュレーションするには、光の波動的性質を含んだ考察が必要である。光線追跡等の古典的・汎用的な光学設計手法では回折限界以下の領域の議論は不可能であるため、本研究では、FDTD(Finite Difference Time Domain)法をもとにした設計手法の導入を行った。FDTD法は空間をメッシュ状に細かく分割し、各メッシュの電磁場状態を周囲のメッシュと相補的に満たすようにマクスウェル方程式を解くことで求める手法である。比較的任意の形状について、動的な解析が可能であるといった長所を有するが、その反面、形状の複雑化に伴って、計算時間と計算メモリが非常に膨大(数週間～、数Gbit～)なものとなるため、広範な条件について検討が難しいといった短所がある。このため本研究ではさらに、RCWA(Rigorous Coupled Wave Analysis)法についても導入を行った。RCWA法は、一般的には回折格子等の設計に用いられており、フーリエ級数展開による近似を含むため、対象形状が周期構造に限定されるが、FDTD法に比べるとかなり短時

間で計算が可能であることから、静的な解析にはこちらを用いた。また、FDTD 法の場合、分割するメッシュの細かさによってかなり精度にばらつきが生じるのに対し、RCWA 法では実験結果と良好な一致を確認することができた。これら二つの設計手法を併用することで、より詳細且つ効率的なナノ光学設計を実現した。

②ギャップ型 LSPR の解析

従来の LSPR は、金属コロイドや電子ビーム等で作製された金属がナノサイズで隔離された構成において発生するモードが主流であった。このような隔離構造をとることで金属内部の自由電子が必然的にナノサイズ内部に閉じ込められ、共鳴が発生した際に伝搬することなく、ナノサイズのダイポールを形成し、回折限界以下の共鳴電界を発生するのである。しかし、このような隔離構造を実現するには作製プロセスが不安定な金属微粒子を用いたり、電子ビームやリフトオフなどの高価格、複雑な手法を用いる必要がある。我々は実用化可能なデバイスの実現のため、連続的な金属構造において LSPR の特性を持つ共鳴を発生させる方法について解析を行った。まずナノパターン形状としては、基板表面に凸状の樹脂パターン上に金薄膜を設けた場合と凹パターンを設けた場合に大別し、さらに光の入射方向を基板裏面側(樹脂側)からの入射と、基板正面側からの入射の2種類についてシミュレーション(偏光は X 方向の直線偏光)し、それぞれの発生する SPR のモードと感度について考察を行った。本検討の結果、凹型のパターンの金属表面に試料側から光を入射した際に、凹部内部で LSPR が発生し、強い電界の増強が確認されることが分かった。さらに、試料部分の屈折率を変えた場合の共鳴波長のシフト量からセンサとして感度を算出すると、凸-基板入射:0nm/RIU、凸-試料入射:133nm/RIU、凹-基板入射:17nm/RIU、凹-試料入射:217nm/RIU と凹型のギャップ構造において試料側から入射した場合が最も高感度にセンサとして機能することが明らかになった。従来の金属コロイドによるセンサの感度が 100nm/RIU 程度であるのと比べると 2 倍以上高感度であることが分かる。さらに、本 LSPR のモードについて、分散曲線を求めて詳細を解析した結果、通常回折格子型の SPR における1次回折モードから派生した SPR モードであり、ギャップ間を狭くしたことによって、対面するギャップ側壁間で局所的に停滞した LSPR-like なモードが発生していることが分かった。これらの結果をもとに、本研究では凹型のギャップ構造を基本構成として、さらに形状の最適化について検討を実施した。

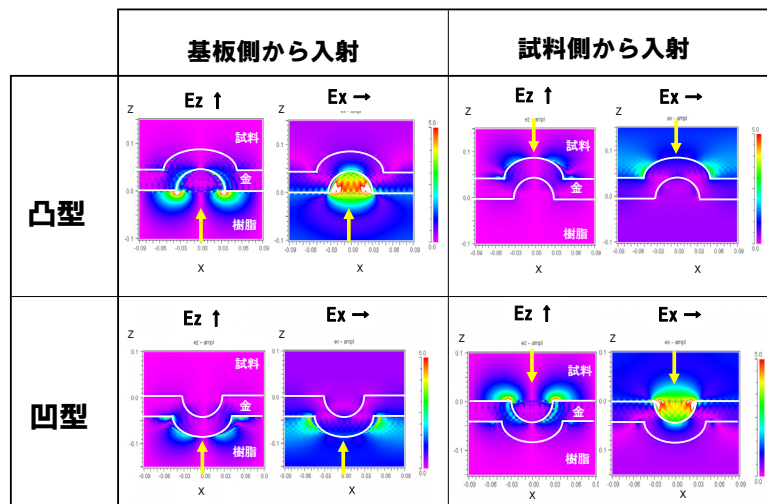


図1. 各構成における電界強度分布シミュレーション結果

③構成とセンサ特性の相関および構造最適化

本ギャップ構造について、ギャップ幅、深さ、ピッチ等の構造パラメータを変えてシミュレーションを実施し、LSPR 光学特性の検討を行った。その結果、ギャップ幅が狭い、ギャップ深さが深いほど共鳴波長は長波長側へシフトする傾向が明らかとなった。この特徴を利用して、ギャップ構造の調整を行うことにより、所望の共鳴波長にチューニングすることが可能である。例えば血液検査用のセンサとして用いる場合には、血球成分の吸収の影響を受けにくく、さらに水の吸収からはずれた 600-700nm に共鳴波長が存在するように共鳴は

長を調整したナノ構造を決定することができる。

次に、実際にギャップの深さと幅を調整することで、共鳴波長が 650nm 付近となるように設計された基板について感度領域特性の評価をシミュレーションによって行った。感度領域はセンサ表面からどの程度の距離までセンサ感度が存在しているかを示すものであり、感度領域がターゲット分子のサイズに比べて大きすぎると、ターゲット以外のバックグラウンドノイズの影響を受けやすく、ノイズが上昇することで S/N が低くなるという課題がある。また、感度領域が狭すぎると、ターゲットを捕捉するためのプローブ層の厚さのためにターゲットの反応まで感度領域が届かない結果、シグナルが低下して S/N が下がる。そのため、各センサの用途、プローブ条件等に応じて感度領域を最適化することができれば、感度を最大化することが可能である。図2にパターンをのピッチを 300nm, 180nm, 80nm 変化させた LSPR の場合と比較のため従来伝搬型 SPR について、感度領域を求めた。まず従来伝搬型 SPR の場合は、センサ表面からの距離が 300nm 付近であっても感度が残存しており、感度領域(1/e²)は 300nm 程度であることが分かる。それに対し、ピッチが 300nm, 180nm, 80nm のナノギャップ構造を表面に設けた場合の感度領域はそれぞれ 50nm, 30nm, 10nm と光の回折限界よりも大幅に小さくなっている。これらの検討結果より、このようなギャップ型の LSPR においては、

- ギャップの深さ、幅によって、共鳴波長が調整可能
- ギャップのピッチによって感度領域が調整可能

という特徴が明らかとなった。共鳴波長、感度領域のセンサの特性が独立に構造によって制御できることで、より自由度が高く、最適化が可能なセンサを実現することが可能であることが明らかとなった。

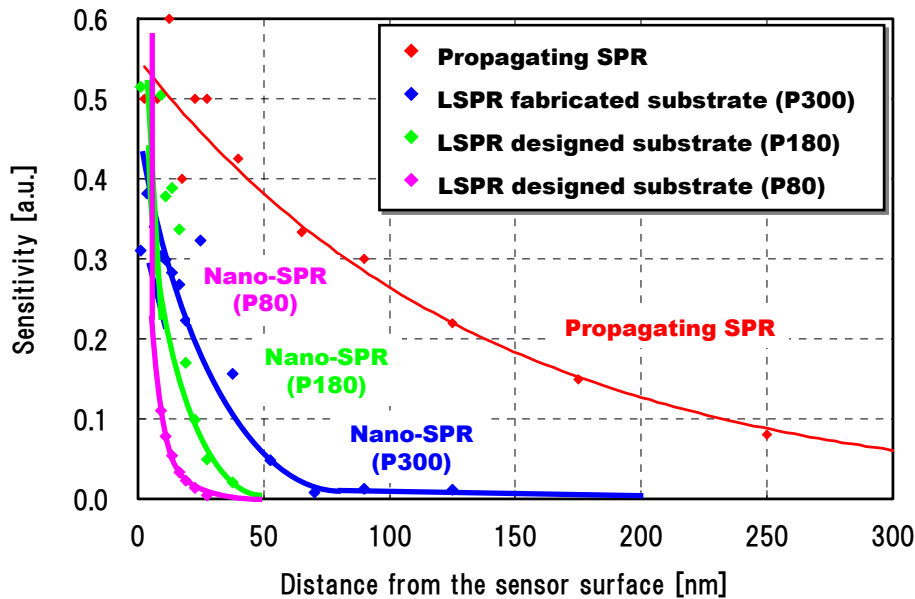


図2. 各センサ構成におけるセンサ表面からの距離と感度相関

2. デバイス作製

成果

半導体プロセスを応用したナノパターン作製とナノインプリント法を組み合わせることで、従来の LSPR センサでは困難であったデバイス作製の再現性や安定性を向上し、量産化可能なプロセスを構築した。さらに、LSPR 用のナノパターンとサンプル送液用のマイクロ流路をあらかじめ原盤上に形成することで、全ての構造を一括転写することに成功した。

類似研究との比較

ナノインプリント法は 1995 年にプリンストン大学の Chou 教授らによって提案され、10nm

以下のナノパターンの樹脂上への転写が確認されている。本研究ではこのようなナノインプリント技術を応用して基板作製を行った。また、更に作製スループットを向上するため、射出成形法によるデバイス作製も実施した。射出成形はいわゆるプラスチック成形として、身の回りの様々な製品の作製に利用されており、商品のローコスト化に大きく寄与している製法である。微細構造の転写としては、CD、DVD とナノ領域まで転写性が向上しており、近年登場した Blu-ray では最小ピット長が約 140nm までの転写を実現している。本研究では、LSPR を発生させるギャップ構造として、Blu-ray よりもさらに微細なギャップ幅 70nm のナノパターンの転写を射出成形により実現している。また、ナノサイズのパターンとマイクロサイズのパターンを同時形成することは、従来困難であったが、電子ビーム法とフォトリソグラフィ法を組み合わせることによってナノ・ハイブリッド構造の作製を実現した。

実施方法・実施内容

①基本プロセスの構築

図3に本研究におけるデバイスの基本プロセスフローを示す。まず原盤上にフォトレジストを塗布し、半導体プロセスによってナノギャップ構造を作製する。次に、原盤をもとに電鍍技術によって反転したナノ構造を有するスタンプを作製する。このとき、原盤表面にスパッタリングを直接行くと、スパッタ粒子の衝突による熱でレジストが変形するため、無電解めっきを用いる等の改良を加えることによりパターン精度を向上した。

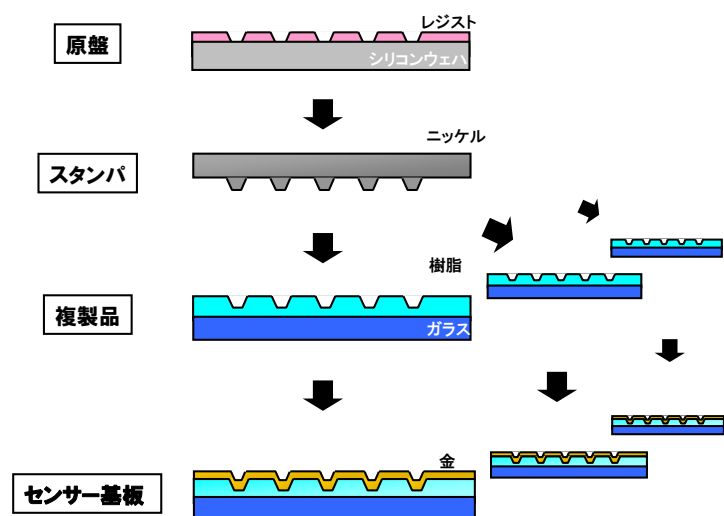


図3. デバイス作製プロセスフロー

このように作製したスタンプ

により、複製プロセスで複製品の作製を行った。まずはナノインプリント法の一つである 2P(Photo-Polymerization)法を用いた検証を行った。ガラス上に紫外線硬化型の樹脂を滴下し、その上からスタンプを押圧した状態でガラス面側から紫外線を照射(240sec)し、樹脂硬化後に剥離する。このようなプロセスによれば、一枚のスタンプから大量の複製品を得ることが可能であり、パターンも同一のマスターパターンから作製されるため、再現性が非常に高いといった特徴がある。最後に、複製品にスパッタリングによって金膜をチップ表面に形成することにより、金属のギャップ構造を作製する。金膜の厚さはシミュレーションの結果、厚い程感度が高いが、80nm 以上であればほぼ飽和するといった結果が得られており、金厚が厚いとギャップエッジ部の形状が鈍る影響もあるため、実際には 80-100nm が最適という結果が得られている。

②射出成形によるハイスループット化

従来ナノインプリント法の場合、複製後に剥離、ダイシング等のプロセスが必要であり、一つのチップ作製にトータル数分以上が必要であった。そこで更なる改善として、最も汎用的であり、ハイスループットな複製技術である射出成形を用いて、オールプラスチックのナノ基板作製について検証を行った。従来の射出成形においては、Blu-ray ディスクのピット長 140nm 以下のパターンについては転写経験が無かったため、今回 LSPR 用の数十 nm のギャップ構造転写のために、射出圧力、射出速度、温度等の条件パラメータ

を振って試作検討を実施した。

成形用樹脂はまず一般的なポリカーボネート(PC)を用いて、成形温度 107°C、112°C、117°Cで検証を行った。一般的に成形温度が高いほど転写性は良くなる半面、収縮による反りが発生しやすくなる傾向があるが、今回の結果ではいずれの条件でも転写率 93-96%と大きな差異は見られなかった。また、パターンの位置や向きによっても大きな差異は無く、良好な転写が確認された。今回の成形結果ではタクトタイムが 5sec/枚であり、従来数 min 程度必要であったプロセス時間が数十分の1以下に短縮できることが確認された。今回射出成形によって作製した基板と従来法(2P法)によって作製した基板の光学特性(バルク感度)の比較を行ったところ、両者でほぼ同等の結果が得られ、センサ基板としても問題無く使用可能であることが示された。このように、従来ナノインプリント法だけでなく、射出成形によってもセンサデバイスの作製が可能であり、アプリケーションによって、作製プロセスを選択して実施することができることが示された。

③クロスパターン、ナノ・マイクロハイブリッド構造の作製

シミュレーション結果をもとに、LSPR を発生させるナノギャップ構造を有する一次元的な溝構造を採用していた。この条件においては、溝に対して垂直な偏光成分は LSPR の発生に寄与するが、溝と平行な成分は LSPR の発生には全く寄与しないため、センサの S/N 向上のためには、あらかじめ偏光板によって垂直成分のみを取り出して利用する必要がある。しかし、実際のデバイスにおいては、流路の封止カバー内を照射光が通過した際に、カバー内の偏光性欠陥(複屈折率による偏光回転)によって偏光方向が変化し、その結果センサの S/N が低下するという課題があった。本研究では、これらの課題を解決するため、パターンを二次元化し、溝構造が直角に交差したクロスパターンを用いることで偏光依存性を解消することに成功した。本クロスパターンを用いることにより、どのような偏光成分も LSPR の発生に寄与するため、偏光板が不要となり、さらに偏光方向が回転しても問題無いという結果が得られた。図4に作製したセンサデバイスの外観写真を示す。チップの内部の赤いエリア(各 1.2mm×1.2mm)にピッチ 300nm、ギャップ幅約 70nm、深さ 40nm のナノクロスパターンを形成し、最終的に 80nm の金膜が形成されている。空気条件下では、LSPR の発生によって 530nm 付近の波長(緑)が吸収され、赤色に見える。さらに、クロスパターン部分の SEM 画像を図5に示す。面内を全体的に検査したが、大きな欠陥はなく、広いエリアに高密度(16,000,000 dots/1.2mm²)なナノパターンが非常に良好に転写されていることが確認された。さらにピッチの短いパターンについても転写検証を行った結果、ピッチ 180nm、ギャップ幅約 40nm まで転写可能であることを確認した。また、パターンサイズが小さく、二次元的なクロスパターンの方が射出成形の転写性を上げるために、樹脂温度を高くする必要があることが分かった。

実際にセンサデバイスとして使用する場合、センサ部分にサンプルを送液するためのマイクロ流路が必要となる。一般的には PDMS(Poly-dimethylsiloxane)で作製した流路をセンサチップに貼り付けて使用する方法が主流であるが、再現性良く、大量に作製することが難しい。本研究では、電子ビームによって作製したナノパターン原盤にさらにフォトリソグラフィでマイクロパターンニングすることで、幅 1mm、深さ 50 μ m の流路をナノ構造上に作製した。このように作製した原盤からスタンプを作製し、射出成形によってナノ・マイクロハイブリッド構造を一括で転写することに成功した。本プロセスにより、高品質なセンサデバイスをハイスループットに作製することが可能である。

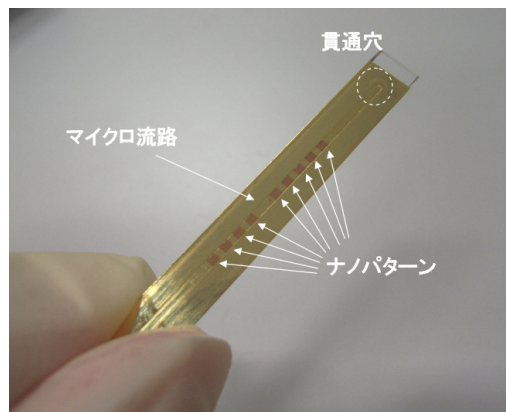


図4. 試作センサチップ外観写真

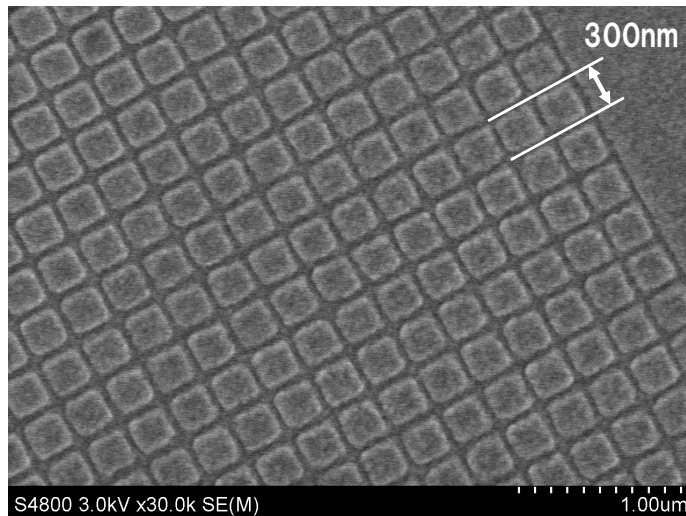


図5. 複製品ナノクロスパターン SEM 画像

3. 分子固定化技術

成果

一次抗体の密度や配向性を上昇させると同時に、血清等の非特異吸着を抑制できる表面を探索し、構造制御が容易な融合タンパク質方式と、安定性の高い PEG (polyethylene glycol) 修飾 SAM (Self-assembled Monolayer) をベースとした共有結合方式を構築した。詳細な反応条件を検討することにより、従来比 5 倍以上の S/N 向上に成功した。さらに、アレイ化を想定したスポッティングによる固定化法の検証、凍結乾燥法を用いた固定化後抗体の活性保持時間の向上についても条件検討と原理確認を実施した。

類似研究との比較

一般的な ELISA などのイムノアッセイに使用する生体分子の固定化法として、物理吸着後に BSA やスキムミルク等を用いたブロッキング処理を行うのが一般的であるが、プローブ密度の低下や非特異吸着などの影響から、バイオセンサの高感度化に十分適した方法とは言えない。その他の固定化法も 1990 年代後半から数多く提案されているが、複雑なプロセス制御の必要性や対象となる生体分子の多様性等を考慮すると、1 つの方法に収束しないのが現状である。

本研究では、LSPR の信号強度変化をリアルタイムにモニタリングすることで、固定化膜の作製プロセスが可視化できることに着目し、高感度かつ、安定的に使用できるプローブ固定化技術の構築に取り組んだ。まず、近年研究レベルで提案されつつある融合タンパク質方式を用いたセンサ表面が、実際の生体分子の高感度検出に非常に効果的であることを明らかにした。次に、共有結合による安定性の高さが期待できる PEG 修飾 SAM 方式について、カルボキシル末端 SAM の混合比率や抗体カップリング時間、pH 等のプロセス条件を最適化することで、大幅な高感度化が可能であることを明らかにした。

実施方法・実施内容

①各固定化方式の特性比較

特定のターゲット分子を高感度に検出するには、ターゲット分子を捕捉するプローブ固定化膜の形成が重要となる。特に抗体をプローブ分子として使用する場合には、配向性、密度、活性状態などが重要な要素となる。まず、我々は、図6に示すような5方式について比較検討を行い、それぞれの特徴をまとめた。最も初期に実施したのは、ビオチン末端 SAM をベースとした抗 IgG 抗体による二次抗体方式で

	物理吸着方式	COOH-SAM 共有結合方式	ORLA18 融合タンパク質方式	Biotin-SAM 二次抗体方式	デキストラン 共有結合方式
表面状態のイメージ					
リガンド固定量	2000-2500 RU	2000-2500 RU	2500-4500 RU	1000-1500 RU	12000-15000 RU
抗原シグナル 1µg/ml AFP	○ 300-400RU	△ 100-200RU	◎ 400-500RU	○ 200-300RU	◎ 400-500RU
非特異吸着 Undiluted FBS	△ 800-900RU	△ 700-800RU	◎ 100-200RU	○ 300-400RU	△ 600-800RU
表面安定性	○ 安定	○ 安定	△ 抗体解離有	○ 抗体解離有	◎ 非常に安定
表面再生	○ 可能	○ 可能	○ 可能	△ 検討必要	◎ 可能
作製プロセス	◎ 工数2	△ 工数4	△ 工数4	△ 工数4	△ 工数4
膜厚	◎ 5-10nm	◎ 5-10nm	○ 15-20nm	△ 25-50nm	× 100nm

図6. 各固定化方式の比較

あり、夾雑物に対する非特異吸着も低いレベルであったことから、一般的な物理吸着やカルボキシル末端 SAM を用いた固定化方式よりも高 S/N を示した。しかしながら、他方式と比較して、金表面からプローブ層までの距離が大きくなるという欠点があり、図2で示したような LSPR の電場増強の効果を考慮すると、センサの高感度化には不利であった。また、ビオチン-アビジン結合の耐酸性にも問題があり、結果的に表面再生が困難であった。

我々は、これらの問題を解決するために英国の Orla Protein Technologies 社が試作開発したチオール基を有するプロテイン A 融合タンパク質 ORLA18 を導入した。固定化プロセスの検討により、金表面上の ORLA18 の高密度化が可能となり、2次元表面における抗体 (IgG) 固定化量の理論的な最大値である 4000-4500RU が実現可能となった。

②非特異吸着量の評価

実際の試料にはターゲット以外の生体高分子が大量に含まれているため、固定化膜の非特異吸着防止能は、センサの検出感度に大きく影響を及ぼす。我々は、センサの実用化を考慮し、厳しい条件である無希釈の FBS (Fetal bovine serum, 総タンパク質濃度 35.6mg/ml) を各固定化膜上に添加し、非特異吸着量を比較した (図7)。その結果、物理吸着やカルボキシル末端 SAM を用いた方式では、FBS の非特異吸着量が約 700-900RU になることが分かった。また、GE Healthcare (旧 Biacore) 社から販売されているデキストラン表面の場合、FBS の非特異吸着量 (約 400-800RU) は、表面上の抗体分子の結合量と関連したため、FBS の多くは、抗体分子そのものに非特異吸着していることが推定できた。対策として、抗体の Fc 部の除去 (5を参照) を実施した。一方、前述の融合タンパク質 ORLA18 をベースにした場合は、FBS の非特異吸着量を 100-200RU にまで低減可能であることが分かり、融合タンパク質を用いた固定化方式の将来的な実用可能性が示された。

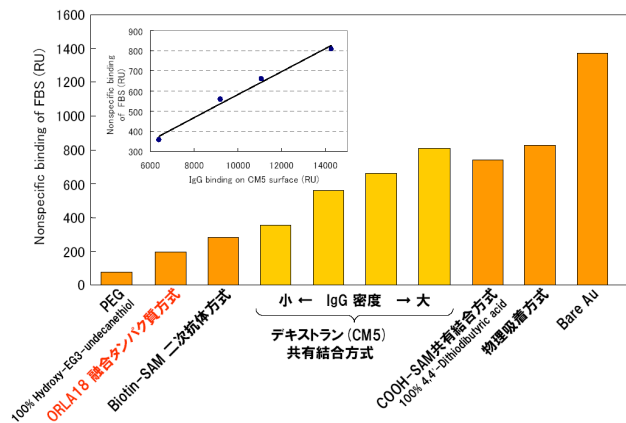


図7. 各表面における非特異吸着の検証

③PEG 修飾 SAM を用いた共有結合方式の最適化

ORLA18 方式は、高 S/N を得るための優れた固定化法と言えるが、融合されているプロテイン A の Zドメインに対する一次抗体の親和性が低い場合、長期保存やベースラインの

安定性に問題が出てくる。このため、抗体の共有結合をベースとした汎用性の高い別の固定化方式を構築する必要があった。ヒドロキシル末端とカルボキシル末端を有する各種アルカンチオールは、同仁化学研究所から高純度のものが入手可能である。我々は経験則に従い、これらのSAM 試薬を 9:1 (-OH:-COOH) の割合で混合し、スクシンイミド基を用いたアミンカップリング法により、抗体を共有結合的に固定化した。得られた固定化膜の性能は、1 μ g/ml の AFP (α -fetoprotein) と無希釈の FBS を添加後の信号強度から S/N を算出することで、相対的に評価した (図 8)。最も高い S/N を示したのは、Hydroxy-EG3-undecanethiol (Dojindo, H354)、Carboxy-EG6-undecanethiol (Dojindo, C445) の PEG 修飾されたアルカンチオールを混合した SAM 表面であり、AFP による高い信号強度を得ることができた。

これらの SAM 試薬の混合比率、NHS/EDC による活性化時間、一次抗体の表面接触時間、及びカップリング時の pH 条件を検討することで、最も高 S/N が得られる条件を決定した (図 9)。その結果、混合比率 75:25 (-OH:-COOH)、活性化時間 10 分、抗体接触時間 2 分、カップリング時の pH 5.5 において、S/N が顕著に上昇することを確認した。抗体接触時間については、従来あまり検討されない部分であり、10 分から 1 時間の反応を行うのが通常である。しかしながら、我々の検討では、抗体の固定化量を損なわない範囲で、この時間を短縮することが高 S/N の獲得に有効であることが分かった。最終的に、従来の Carboxy-EG6-undecanethiol を 100% で形成した SAM 表面に対して、5.7 倍の S/N 向上を実現することができ、汎用性の高い、安定した固定化膜技術を確立することができた。

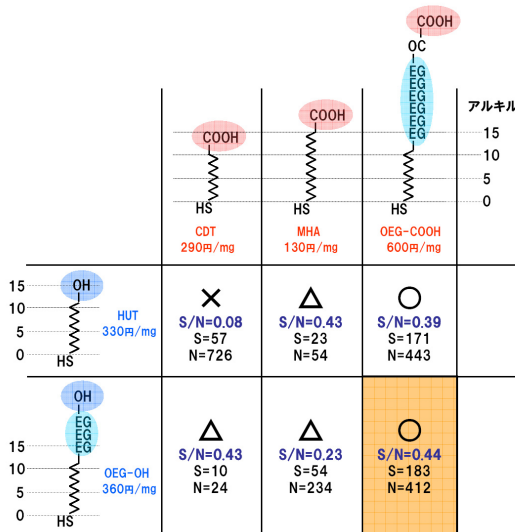


図8. SAM 作製の条件検討結果1

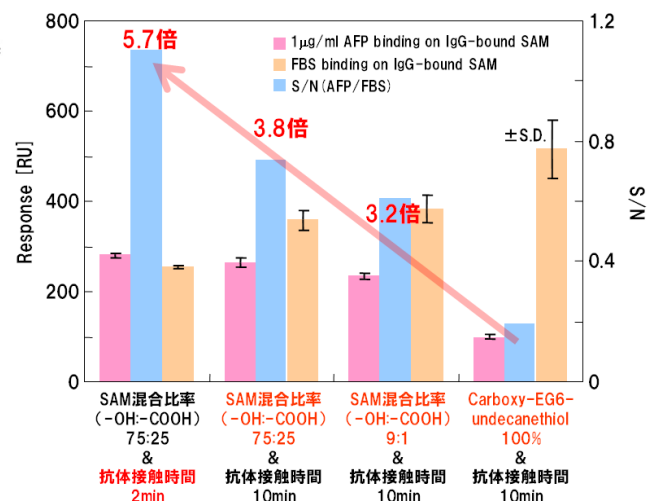


図9. SAM 作製の条件検討結果2

4. センシングシステム構築

成果

流路系等を含むオールインワンの SPR システムとしては現在世界最小レベルである、従来市販装置比約 20 分 1 (W160×D160×H144mm, 3kg) の小型プロトモデルを実現。さらに、簡易検査システムとして、手の平サイズのシステムも現在検証中である。

類似研究との比較

従来の SPR 装置は厳密な光学系や温度管理が必要であるため、装置サイズが大きく、価格も数千万円と非常に高価であった。一方で、近年小型、安価な SPR 装置もいくつかのメーカーから販売されているが、高価な装置に比べるとノイズが大きく、さらに試料の送液に必要なポンプ、流路系が含まれていないため、高精度な生化学実験でそのまま用

いるには困難であった。本研究で構築したプロトモデルでは、送液系用のポンプが内蔵（デスクトップモデル）し、マイクロ流路はチップと一体化されているため、流路取り付け機構が不要であり、さらに光学系も従来 SPR のような全反射光学系が不要のため、装置サイズを大幅に小さくすることが可能である。また、LSPR のセンシングエリア局在化の効果により、バックグラウンドノイズを低減することで、装置を小さくしても高精度なセンシングが可能となっている。

実施方法・実施内容

①デスクトップモデル(1号機、2号機)

本研究において、計 3 種類の LSPR センサプロトモデルの構築を行った。まずデスクトップモデルとして、流路系やサンプルインジェクタ等の機能を全て含むオールインワンのシステムを作製した。LSPR を発生させるための光源としては、ハロゲン光源を用い、対物レンズを用いてセンサ基板へ集光照射し、その反射光が小型分光器(USB-4000, Ocean Photonics 社)に到達するような光学系を構築した。データ処理プログラムとしては、センサ基板からの反射スペクトルをもとに、LSPR の発生する共鳴波長を多項式近似によってリアルタイムに算出するプログラムを LabVIEW によって構築している。

2007 年度に構築した 1 号機は試料送液用のポンプとしてサイズが指先程度の非常に小さな電気浸透流ポンプ(RP7SP, ナノフュージョン(株))を採用することにより、送液系のサイズを大幅に削減し、さらにフローセンサを装置内に内蔵して、実際の流量をフィードバックすることにより、 $\pm 3.9\%$ (従来シリンジポンプ精度: $\pm 5.3\%$) の高精度な流量制御を実現している。さらに、センサステージの下側には、X-Y 軸のステッピングモーターを設けており、センサ面内における反応量の分布、複数測定対象のアレイ化等への対応を可能としている。実際に本装置は外部機関に貸し出して評価頂き、長期間に渡って生化学実験用に問題なく使用できることが確認されている。

2008～2009 年度にかけて構築した 2 号機は、送液系等の機能は残したまま、より小型、軽量、簡便性を実現したものとなっている(図10)。1 号機が、本格的な生化学実験を想定しているのに対し、2 号機は特定ターゲット分子の相互作用解析やタンパク質等の試薬活性チェックなどを研究者が実験現場で簡便、迅速(～10min)に行うような使い方を想定している。従来 1 号機では 2 軸あったステッピングモーターを 1 軸に簡略化、光学系の光学部品をさらに最適配置することにより、装置サイズは W160×D160×H144mm と 1 号機の約半分、重量は 3kg と 5 分の 1 程度に小型、軽量化されている。機能としては、ユーザーがチップに滴下したサンプルを吸引ポンプによって吸引してセンサ部へと導き、そこでの相互作用を検出するといったシンプルなシステムである。

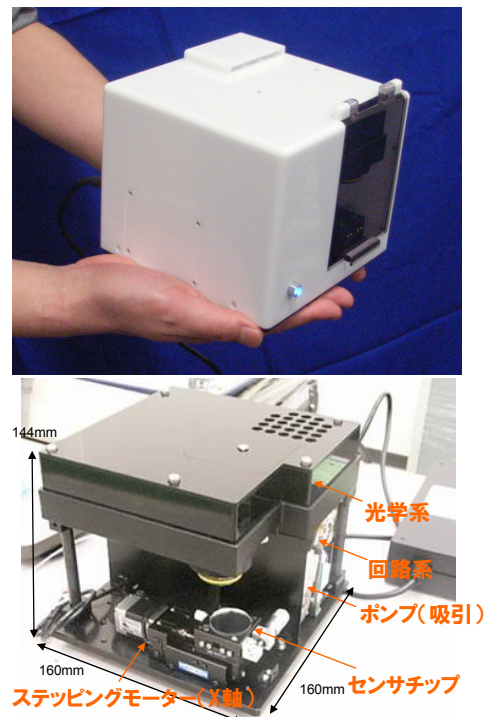


図10. 機能モデル 2 号機の外観(上)と内部構成(下)

②手の平サイズモデル(3号機)

次に、研究現場での簡便、迅速なオンサイト測定を想定し、さらに小型化を実現する手の平サイズの解析装置の構築を行った(図11)。光源は650nmの半導体レーザー、受光器にはフォトダイオードを使用し、センサチップからの反射光強度変化により、センサチップ上の反応を検出する。光源からの光は光学系を通して拡大され、センサチップ上の4点の情報を4つのフォトダイオードでそれぞれ検出する4アレイ同時測定を実現している。回路は小型化、低ノイズ化のために専用基板を構築し、Mini-USBを通してPCから供給された電源から光源、受光器の駆動およびPCへの受光データの送信を行っている。USBポートからの電源供給の場合、電圧にノイズが入りやすいため、多段のフィルタを回路内に設けることにより低ノイズ化を行っている。また、通常のA/D変換基板では10-12bitの変換が一般的であるが、14bitの変換を行うことで高感度化を可能としている。Mini-USBから取得されたデータはC++で構築された専用プログラムによってリアルタイム処理が可能となっている。このようにPCからUSBのみで駆動、処理が可能であり、簡単に持ち運びができるため、簡便かつ迅速な検査が可能になると考えられる。

本装置を用いてアビジンの検出を行った。まずセンサ表面のアレイ1, 2の2箇所にてビオチン末端を有するPEG修飾SAMを固定化し、その状態でマイクロ流路に直接ニュートラアビジン(100 μ g/ml)をインジェクトした。その結果を図12に示す。ニュートラアビジンのインジェクトを行った時点(Time=55sec付近)でアビジンの結合による信号変化が観察されている。このように、本装置を用いればタンパク質間相互作用の検出を非常に簡単な操作により、数分程度で実施することが可能であることが実証された。

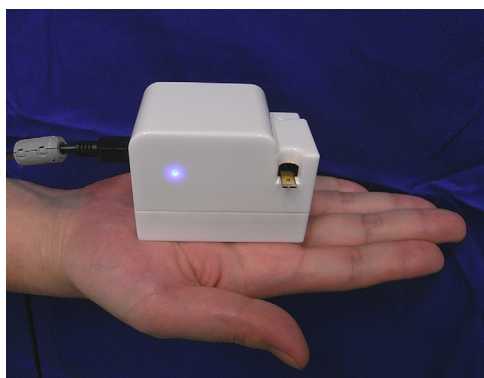


図11. 手の平サイズモデル

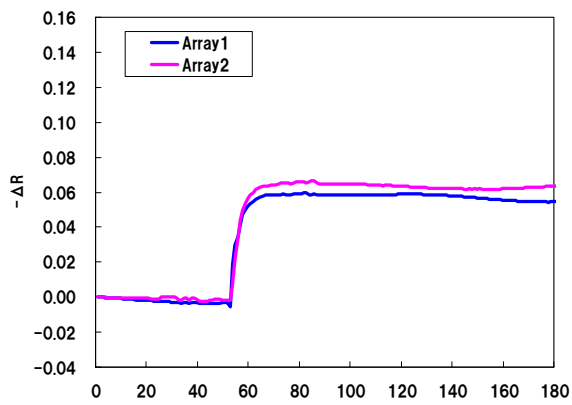


図12. 手の平サイズモデルによるアビジン検出

5. 検証、応用検討

成果

肝臓がんの腫瘍マーカーAFP(α -fetoprotein)の検出を実施。直接法で10-20ng/ml、金コロイドを用いたサンドイッチ法により、1ng/mlの高感度検出を実現した。また、ターゲットとしてタンパク質以外にDNA一塩基多型についても検出が可能であることを実証した。さらに、バックグラウンドノイズの影響が排除可能といったLSPRの特徴を利用することにより、液体クロマトグラフィにおける分離成分のインラインモニタリングへの応用についても検証を行い、新たなアプリへの展開可能性を示した。

類似研究との比較

非標識リアルタイムセンシングとしては、既存のSPRシステムでは数千万円クラスの装置と同等の精度を大幅にコンパクトなシステムにより実現する技術を構築。さらに、1ng/mlオーダーは従来のSPRでは通常困難な領域であり、固定化膜、アッセイ法の改

良、最適化により実現した。

実施方法・実施内容

①AFP の検出

我々の構築したナノギャップ構造を有する金基板上に、前述の ORLA18 融合タンパク質の層を形成し、続いて抗 AFP 抗体 (ウサギポリクローナル IgG) を結合させた。表面の再生は pH2.2 の Glycine-HCl で行い、AFP 濃度依存的な LSPR 信号を得ることができた。また、ゼロ濃度添加時の信号変化量の 3σ から、直接法における検出時の LSPR デバイスの定量限界が 10-20ng/ml であることを確認した。

次に、当デバイスが、数 ng/ml 以下の極微量の検出にも対応できるように、金コロイドを用いたサンドイッチ増感技術の開発を行った。各種メーカーから市販されている金コロイドの非特異吸着量を比較し、最終的に BBIInternational 社の $\phi=40\text{nm}$ のstreptavidin修飾金コロイドを選定した。金コロイドとAFPの連結に使用するビオチン化抗 AFP 抗体 (ウサギポリクローナル IgG) は、F(ab)'₂ 化することで、非特異吸着を5分の1に低減可能であった。図13には、直接法、サンドイッチ増感法による AFP 検出時の検量線を示す。興味深いことに、サンドイッチ増感後の LSPR 信号は、同じ検出条件での SPR 信号に比べて、2-3 倍の増幅率を示した。

さらに、添加濃度、反応時間等を検討の結果、1ng/ml の低濃度 AFP 添加時においても信号変化を得ることに成功した (図14)。今回の検討で、最後まで課題となったのは金コロイドの非特異吸着であり、流路一体型のディスプレイデバイスの必要性も明らかになった。

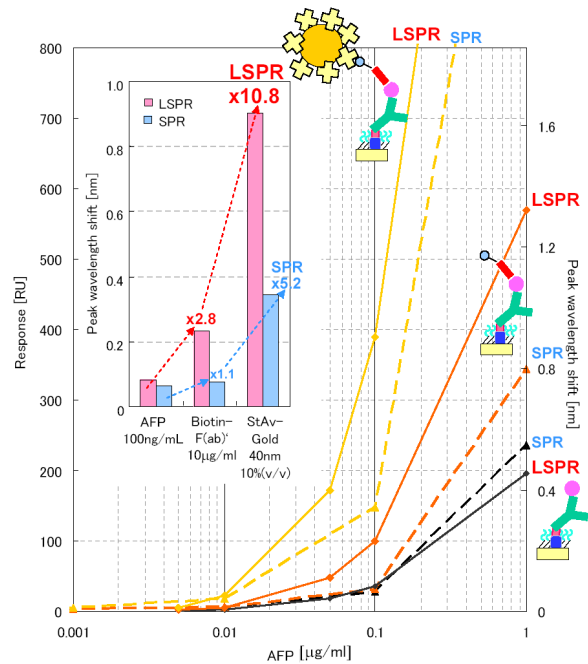


図13. LSPRによるAFP検出(増感前後)

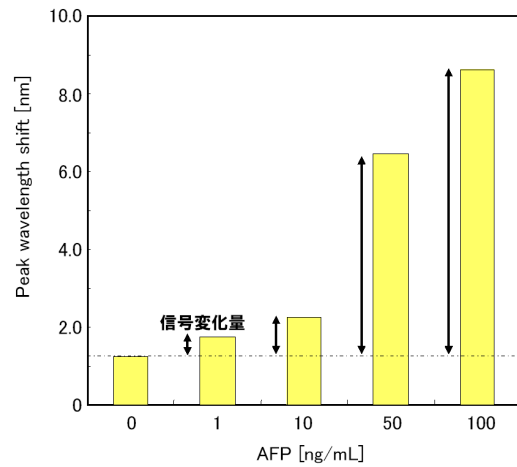


図14. 金コロイド増感後のLSPR信号

②DNA 一塩基多型の検出

近年、遺伝病や癌、生活習慣病等の罹患リスクを遺伝子情報によって予測する遺伝子診断が可能となっている。しかし、現在の DNA 検出の多くは、ゲル電気泳動法や放射性同位体標識法といった煩雑、特殊設備での検査を必要とするため、より簡便で迅速な検出手法が求められている。本研究では、構築した LSPR デバイス、システムによって DNA 一塩基多型の検出原理確認を実施し、簡便、迅速な DNA 検出が可能であることの実証を行った。

模擬サンプルとして、腫瘍壊死因子(TNF;Tumor Necrosis Factor)の一塩基多型の DNA サンプルを合成し、検出実験を行った。ターゲット DNA と一塩基ミスマッチ DNA としてそれぞれ、5'-GGT TTC GAA GTG GTG GTC TTG - 3' (21 塩基)、5'-GGT TTC GAA GCG GTG GTC TTG - 3' (21 塩基)の2種類の DNA 断片を用意し、さらにプローブ用には、センサ表面への固定化のために末端がビオチン修飾されたターゲットと相補的な 5'-biotin- ACC ACCACT TC - 3' の合成を行った。

まず金センサ表面に対して、ビオチン末端を有する PEG 修飾 SAM(ビオチン無し:有り=99:1 で混合)を形成し、その上にニュートラアビジンを結合させ、最後にプローブ DNA 断片を固定化した。このようにして形成したプローブ層の上にターゲット DNA、ミスマッチ DNA とさらにリファレンスとしてランダムな DNA 断片を送液したときの信号変化を図15に示す。ランダム配列 DNA についてはほとんど信号変化が発生せず、配列が完全に一致するターゲット DNA の場合には大きな信号変化が確認された。さらに、一塩基ミスマッチ DNA ではターゲットDNAに比べて顕著に信号変化が小さいという結果が得られた。本結果では10分程度の検査時間で非常に簡便にDNA一塩基多型の検出が可能であることが実証された。

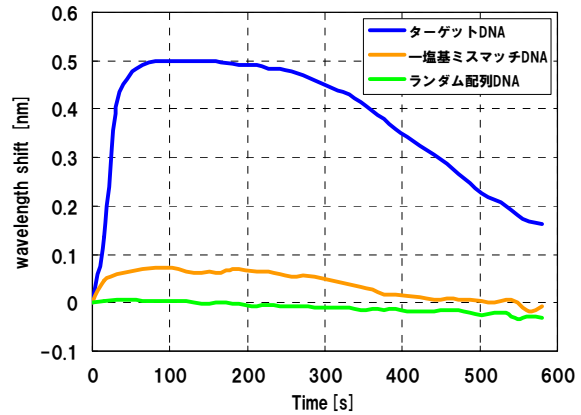
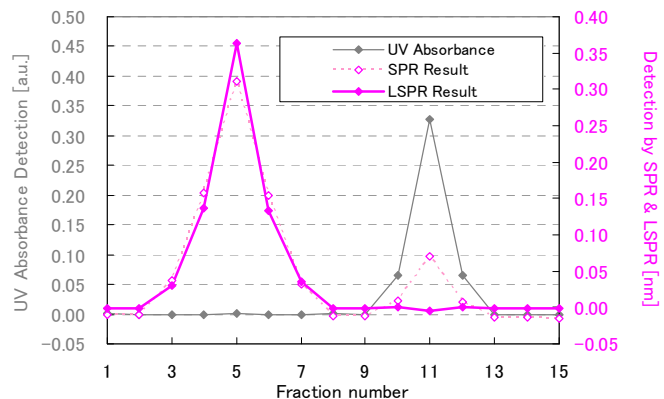


図15. DNA 一塩基多型検出結果

③液体クロマトグラフィのインラインモニタリングへの応用検証

一般的に、液体クロマトグラフィにおける分離成分の検出指標として、UV 検出器による280nmの吸光度が用いられている。しかし、この方法を用いた場合、感度が低く(通常10 μ g/ml \sim)、特異的な検出も困難であるため、分離したサンプルを電気泳動等で再度分析する必要があり、試薬のロス、手間がかかるといった課題があった。本研究では、構築したLSPRの特徴である非標識、リアルタイム、高S/Nといった特徴を活かし、分離成分のインラインモニタリングについて原理検証を行った。クロマトグラフィの分



サンプルNo.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
AFP [ug/ml]	0	0	0.1	0.5	3	0.5	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0
BSA [ug/ml]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	500	100	0	0	0

図16. 模擬サンプル分画濃度(下表)と検出結果(上)

離成分の模擬サンプルとしてターゲット成分 (AFP) と夾雑成分 (BSA; Bovine Serum Albumin) をそれぞれ最大 3 μ g/ml, 500 μ g/ml 混在した分画を作製し、検出実験を行った。

図16に各分画濃度と検出結果を示した。まず従来の UV で検出を行った場合、AFPが入った No. 3-7 のサンプルでは、濃度が低いためほとんど信号が得られず、高濃度の BSA が入った No. 10-12 のサンプルにおいて大きな信号変化が観察された。この結果からも、UV 検出器では、10 μ g/ml 以下の濃度領域における検出が困難であり、さらに AFP への特異性が無いといったことが確認される。次に、AFP 抗体を固定化した表面を用いて市販 SPR センサ (Biacore2000) による同様の検出を行った (破線グラフ)。この結果では AFP が入った No. 3-7 において濃度に応じた信号変化が観察され、SPR によって高感度な検出が可能になったことが分かる。しかし、BSA が入った No. 10-12 のサンプルにおいても多少の信号変化が発生した。これは、溶液中に浮遊する BSA 分子が SPR のセンシング領域に入った際に、バックグラウンドノイズとして信号変化を発生させる現象である。これに対して、本研究による LSPR センサを用いた場合 (実線グラフ)、AFP が入ったサンプル No. 3-7 では大きな信号変化が得られ、しかも BSA の入ったサンプルにおいてはほとんど信号変化が発生しないという結果が確認できた。これは、センシング領域が局在化していることにより、従来 SPR に比べて S/N が高くなったという効果を顕著に示すものである。このように、サンプルをリアルタイムに随時測定する必要があり、ウォッシュ等によってバックグラウンドノイズを排除することができないインライン的なアプリケーションにおいては LSPR が非常に有効な測定ツールとなることが実証された。将来的には製薬プロセスのライン上で培養物のリアルタイムモニタリング等への応用も期待される。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究による小型、簡便、高 S/N なセンシングシステムの実現、更にナノインプリント法を応用した安価なデバイス作製技術によって、様々な生体分子間の相互作用を研究現場で手軽、迅速に解析することが可能となる。さらに、このような非標識、リアルタイムなナノ分子検出技術は、研究だけでなく、医療現場や食品、環境検査といった様々な分野で必要とされており、迅速な疾患診断や食品アレルゲンの検査、環境ホルモンの検出等への応用も期待されている。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 1件、国際(欧文)誌 2件)

1. 松下智彦・西川武男・山下英之 局在 SPR バイオセンサーの研究-ハイスループットに作製可能なバイオセンサーチップの実現 OMRON TECHNICS Vol.47 No.1(通巻 155 号) 2006 年
2. Y. Ishizuka-Katsura, T. Wazawa, T. Ban, K. Morigaki and S. Aoyama Biotin-Containing Phospholipid Vesicle Layer Formed on the Self-Assembled Monolayer of a Saccharide-Terminated Alkyl Disulfide for Surface Plasmon Resonance Biosensing. Journal of Bioscience and Bioengineering 105 (5) 527-535 (2008)
3. T. Matsushita, T. Nishikawa, H. Yamashita, R. Hasui, S. Fujita and Y. Okuno Localized Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Fabricating Nano-period Structure for High Throughput by Polymer. Japanese Journal of Applied Physics 47 (9) 7420-7427 (2008)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)
特になし

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 5件、国際会議 1件)

1. Nakamura, M., Yamashita, H., Nishikawa, T., Matsushita, T., Aoyama S. (Omron Corporation) Localized surface plasmon resonance sensing with nano-imprinted substrate. Photonicnanosystem 2005, San Francisco, USA. 7 November 2005
2. 西川武男, 山下英之, 蓮井亮介, 藤田悟史, 増田梨恵, 松下智彦, 奥野雄太郎, 青山茂 (オムロン株式会社) ナノインプリンティング技術を用いた局在表面プラズモン共鳴センサーの開発 第5回プラズモニクスシンポジウム, キャンパスプラザ京都, 2007/3/6
3. 松下智彦(オムロン株式会社) ナノインプリント技術を用いた局在表面プラズモン共鳴センサーの開発と応用 マイクロ・ナノ融合加工技術研究会(平成19年度第1回例会), 京都府中小企業技術センター, 2007/9/14
4. 松下智彦(オムロン株式会社) ナノ周期構造を有する局在表面プラズモン共鳴センサを用いた抗原-抗体反応の計測および最新事例紹介 平成19年度応用物理学会関西支部シンポジウム, 島津製作所関西支社マルチホール, 2007/11/14
5. 西川武男, 蓮井亮介, 藤田悟史, 増田梨恵, 奥野雄太郎, (オムロン株式会社)、ナノインプリント技術のメディカルセンシングへの応用、電子ジャーナル主催セミナー「医療・バイオ向け電子デバイス」、総評会館(東京)、2008/9/25
6. 蓮井亮介, 西川武男, 藤田悟史, 増田梨恵, 奥野雄太郎(オムロン株式会社)、局在表面プラズモン共鳴によるバイオセンサの研究、第13回POC(ポリマー光回路)研究会、日本ペイント株式会社(大阪)、2008/10/16

② 口頭発表 (国内会議 5件、国際会議 5件)

1. Nishikawa, T., Yamashita, H., Nakamura, M., Hasui, R., Matsushita, T., Aoyama S. (Omron Corporation) Development of New Localized Surface Plasmon Resonance Sensor with Nanoimprinting Technique. Nano / Micro Engineered and Molecular System 2006, Zhuhai, China. 20 January 2006
2. Nishikawa, T., Yamashita, H., Nakamura, M., Hasui, R., Matsushita, T., Aoyama S. (Omron Corporation) Localized Surface Plasmon Resonance Sensor Fabricated by Nanoimprinting Technique. EOS Topical Meeting 2006, Engelberg, Switzerland, April 27-29 2006
3. 山下英之, 松下智彦, 西川武男, 蓮井亮介, 藤田悟史, 奥野雄太郎, 青山茂(オムロン株式会社) ナノインプリント型局在表面プラズモン共鳴センサーの開発Ⅱ 第54回応用物理学関係連合講演会, 青山学院大学相模原キャンパス, 2007/3/27-30
4. 藤田悟史, 松下智彦, 西川武男, 蓮井亮介, 山下英之, 奥野雄太郎, 青山茂(オムロン株

式会社) ナノインプリント法を用いた局在表面プラズモン共鳴センサーによる抗原抗体反応の検出 第 54 回応用物理学関係連合講演会, 青山学院大学相模原キャンパス, 2007/3/27-30

5. 松下智彦、西川武男、山下英之、蓮井亮介、藤田悟史、増田梨恵、奥野雄太郎 (オムロン株式会社) ナノインプリンティング技術を用いた局在表面プラズモン共鳴バイオセンサーの開発 第 68 回応用物理学学会学術講演会, 北海道工業大学, 2007/9/4-8
6. H. Yamashita, T. Nishikawa, T. Matsushita and Y. Okuno (Omron Corporation) Improvement of Localized Surface Plasmon Resonance Sensor Sensitivity by Using Nanoimprinting. NNT'07, Paris, France, October 11-12 2007
7. 蓮井亮介, 西川武男, 山下英之, 藤田悟史, 松下智彦, 奥野雄太郎 (オムロン株式会社)、局在表面プラズモン共鳴による腫瘍マーカーの検出、第 47 回日本生体医工学会、神戸交際会議場(兵庫)、2008/5/8
8. 藤田悟史, 西川武男, 蓮井亮介, 増田梨恵, 奥野雄太郎 (オムロン株式会社)、ナノ周期構造への固定化膜作製と局在表面プラズモン共鳴センサによる α -fetoprotein の検出、第 46 回化学センサ研究発表会、沖縄コンベンションセンター(沖縄)、2008/9/4
9. R. Hasui, T. Nishikawa, S. Fujita, H. Yamashita and Y. Okuno (OMRON Corporation) Development of Compact Sensing System by the Localized Surface Plasmon Resonance. FACSS2008, Reno, USA, 2008/9/28
10. T. Nishikawa, R. Hasui, S. Fujita, R. Masuda, H. Yamashita and Y. Okuno (OMRON Corporation) Development of Localized Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Nanoimprinting Technology. OSA Topical Meeting "Plasmonics and Metamaterials".NY, USA, 2008/10/22

③ ポスター発表 (国内会議 1件、国際会議 5件)

1. Matsushita, T., Nishikawa, T., Yamashita, H., Nakamura, M., Hasui, R., Aoyama S. (Omron Corporation) New Localized Surface Plasmon Resonance Sensor Utilizing Nanoimprinting Technology. Nano Tech2006, Boston, USA, May 7-11 2006
2. Nishikawa, T., Yamashita, H., Nakamura, M., Hasui, R., Matsushita, T., Aoyama S. (Omron Corporation) A Novel Localized Surface Plasmon Resonance Sensor Utilizing Nanoimprinting Technique. APCOT2006, Singapore, June 25-28 2006
3. 山下英之, 松下智彦, 西川武男, 蓮井亮介, 奥野雄太郎, 青山茂(オムロン株式会社) ナノインプリント型局在表面プラズモン共鳴センサーの開発 第 67 回応用物理学学会学術講演会, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス, 2006/8/29-9/1
4. T. Nishikawa, H. Yamashita, R. Hasui, Y. Ohno, S. Fujita, R. Masuda, T. Matsushita, Y. Okuno, and S. Aoyama (Omron Corporation) A Nanobiosensor Fabricated by Nanoimprinting Technology. Transducers 07, Lyon, France, June 10-14 2007
5. T. Nishikawa, H. Yamashita, T. Matsushita, R. Hasui, S. Fujita, R. Masuda, Y. Okuno, and S. Aoyama (Omron Corporation) High Sensitivity Localized Surface Plasmon Resonance Sensor

with Periodic Nanogroove Structure. SPP3, Dijon, France, June 17–22 2007

6. M. Taniguchi, S. Fujita, H. Yamashita, T. Nishikawa, T. Matsushita and Y. Okuno (OMRON Corporation) Sensitive detection of tumor marker using the localized surface plasmon resonance sensor fabricated by nanoimprint technology. Biosensors2008, Shanghai, China, 2008/5/14–16

(4)知財出願

①国内出願 (6件)

1. “生体分子固定化基板、バイオチップ及びバイオセンサ”、松下智彦・西川武男・山下英之・池田正哲・青山茂・和沢鉄一・瀬崎浩史、オムロン株式会社・国立大学法人大阪大学、2006/5/15、2006-135798
2. “表面プラズモンセンサ”、松下智彦・山下英之・西川武男・森山恵子・蓮井亮介・青山茂、オムロン株式会社、2006/3/15、2006-071832
3. “表面プラズモン共鳴センサ及び当該センサ用チップ”、西川武男・松下智彦・山下英之・蓮井亮介・藤田悟史・奥野雄太郎・青山茂、オムロン株式会社、2007/3/5、2007-054226
4. “表面プラズモン共鳴チップ”、西川武男・神山進・蓮井亮介、オムロン株式会社、2009/11/19、2009-264019
5. “表面プラズモン共鳴センシングシステム及び、表面プラズモン共鳴インライン測定方法”、藤田悟史・西川武男・大上直人、オムロン株式会社、2009/11/20、2009-264845
6. “流路チップ及び治具”、蓮井亮介・岩坂博之・西川武男・山田圭佑・神山進、オムロン株式会社、2010/3/17、2010-061254

②海外出願 (3件)

1. “生体分子固定化基板、バイオチップ及びバイオセンサ”、松下智彦・西川武男・山下英之・池田正哲・青山茂・和沢鉄一・瀬崎浩史、オムロン株式会社・国立大学法人大阪大学、2006/5/15、2006-135798、US・CN(PCT出願)
2. “表面プラズモンセンサ”、松下智彦・山下英之・西川武男・森山恵子・蓮井亮介・青山茂、オムロン株式会社、2006/3/15、2006-071832、US・EU・CN(PCT出願)
3. “表面プラズモン共鳴センサ及び当該センサ用チップ”、西川武男・松下智彦・山下英之・蓮井亮介・藤田悟史・奥野雄太郎・青山茂、オムロン株式会社、2007/3/5、2007-0542261、US・CN(PCT出願)

(5)受賞・報道等

①受賞

1. Nano50

(受賞日) 2008/11/13

(場所) National Nano Engineering Conference (Boston, USA)

(受賞講演) High Sensitive and Small-sized Biosensor Fabricated by Nanoimprinting Technology

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 日経産業新聞 2005/11/14 1面
2. 日本経済新聞 2008/5/26 13面
3. 京都新聞 2008/6/20 11面

③その他

1. セミナー 青山 茂
たんぱく質チップの開発とその応用
主催:(株)日本テクノセンター (2005/10/28 東京)
2. 第25回関西界面科学セミナー 奥野 雄太郎
ナノインプリント技術のメディカルセンシングへの応用
主催:日本化学会 コロイドおよび界面化学部会 関西支部 (2007/7/26・27 大阪)

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

特になし

②社会還元的な展開活動

展示会出展

1. 第83回日本医療機器学会大会 国際メディカルショージャパン&ビジネスエキスポ 2008、東京国際フォーラム、2008/5/29-31
2. 第7回国際バイオ EXPO、東京ビックサイト、2008/7/2-4
3. 2008 分析展、幕張メッセ国際展示場、2008/9/3-5
4. 第22回インターフェックスジャパン、東京ビックサイト、2009/7/2

§6 結び

本研究の要素技術であるナノ微細加工、ナノフォトニクス、バイオセンシングという異なる研究領域の融合については、プロジェクト開始当初予想していた以上に、近年国内外において盛んに研究が進められており、当分野に対する高い関心と期待が窺われる。これは、本研究のメインテーマである生命現象の解明といった研究分野においては勿論のこと、これからの高齢化社会における医療診断、健康管理、深刻化する新型インフルエンザ等の感染症検査、食物アレルギーの簡易検査、環境汚染物質のセンシング等、様々な分野において、ナノサイズの生体分子を簡便(非標識、リアルタイム)、高感度、小型(手の平サイズ)装置で測定したいという強いニーズが存在するためであり、その実現のためには生物や化学の技術だけでなくナノオーダーの微細加工や光によるセンシングといった技術が不可欠になるからである。

本研究は、極めて困難と認識されている極微量の生体分子センシングの実用化を目指したものである。アプリケーションによって改良の必要はあるが、非標識、リアルタイムに小型装置で高感度センシングを行うという未踏の課題に対し、独自の局在型表面プラズモン共鳴センサを構築し、実際にプロトモデルという形にまで仕上げ、原理確認、応用検証を行った点が評価に値すると考えている。特に我々の場合、企業からの CREST 参画という稀なケースであり、事務的処理等において不慣れによるとまどい等もあったが、もともと弊社が保有していた微細加工技術、光学設計技術などの強みを活かしつつ、最先端の学術領域でありながら実用化を視野に入れたスタンスでの取り組みを行った。企業においては、技術、ノウハウ、設備、人脈等さまざまな独自の資産を保有しているものの、一つのテーマを長期的に継続して研究することが、なかなか困難な状況になりつつある。このような背景下において、今回 CREST という機会を頂けたことは弊社としても、研究者としても非常に有り難い経験であったと感じており、さらに当研究成果を発展させ、実用化することによって、少しでも社会に貢献できれば幸いである。

最後になりましたが、様々な面で本研究にご協力、サポートしてくださいました、領域代表の柳田敏雄先生をはじめ、アドバイザーの先生方、またスムーズな研究実施にご尽力くださいました領域事務の方々に、深く感謝の意を表したいと思います。