

「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」
平成 17 年度採択研究代表者

青山 茂

(オムロン株式会社技術本部先端デバイス研究所 主幹)

「ハイブリッド局在 S P R を用いた生体分子の環境応答性計測」

1. 研究実施の概要

本年度は初年度のため主に、詳細な設計・作製・評価を行うための研究環境整備と、新しいセンシング手法であるハイブリッド S P R の基本特性の確認、ハイブリッド S P R 構造を作製するためのプロセス検証、バイオチップとしての有用性の基本評価を行った。来年度は、今年度の研究成果をふまえて、最適な基板設計と作製を行い、本テーマが従来よりもセンシング感度が優れていることを、光学特性の評価とモデル蛋白質のセンシングで、実証する。

2. 研究実施内容

本研究テーマは、大きく分けて次の 5 つの研究項目からなる。i) ハイブリッド局在 S P R 基板の設計、ii) ハイブリッド局在 S P R 基板の作製、iii) ハイブリッド局在 S P R の評価、iv) ハイブリッド局在 S P R の高感度チップの作製、v) ハイブリッド局在 S P R を用いた生体分子相互作用の環境応答性評価。以下に各項目の本年度の研究実施内容を記述する。

i) ハイブリッド局在 S P R 基板の設計

ハイブリッド局在 S P R 基板の設計を行うには、表面プラズモン共鳴を含む近接場光学の設計手法を確立する必要がある。本年度は設計手法の調査、検討と導入を実施し、実験結果との比較を行うことで定性的、定量的な設計が可能な環境の確認・構築を行った。

① FDTD(Finite Difference Time Domain)法による設計

FDTD 法ではメッシュ化された空間において Maxwell 方程式を逐次解いていくため、三次元空間を取り扱う場合に、計

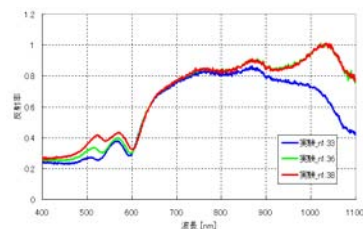


図1. 実験から求めたナノ構造からの反射スペクトル

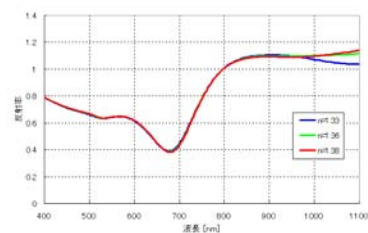


図2. 二次元FDTD法によるナノ構造からの反射スペクトル

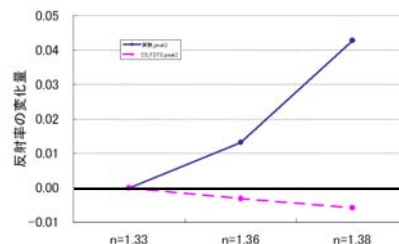


図3. 実験と二次元FDTD法の屈折率応答比較

算機メモリと計算時間が膨大になってしまう。そのため、今回は1台のPCでも計算可能な二次元シミュレーションを行った。図1に実験結果を、図2にFDTD法によるシミュレーション結果を示す。ナノ構造の構成は、試作基板の実測から求めたモデルについて計算を行った。まず図1において、520nm, 600nm, 1100nm付近で吸収が観察されているが、それぞれ520nmは伝搬型SPRの一次回折モード、1100nmは伝搬型SPRモード、600nmは局在型SPRモードであることが実験的に確認されている。図2においては、520nm, 1100nm付近の吸収は再現されているが、600nmの吸収が680nm付近へとずれていることが分かる。また、吸収量も乖離が見られる。さらに、基板表面の屈折率を変化させた場合の局在ピーク位置での反射率変化を図3に示す。この図からも明らかなように、特に局在モードにおいて実験とシミュレーションでは定量的にも定性的にも一致しない結果となった。これは、シミュレーションを二次元で行っていることが大きな理由と考えられ、二次元的な現象である伝搬型SPRは大きな影響を受けないが、三次元構造で発生する今回の局在型SPRでは、その乖離が大きなものとなってしまっていると考えられる。

②RCWA(Rigorous Coupling Wave Analysis)法による設計

RCWA法は周期構造のみに適用可能という制限があるが、構造を層状に分割する、周期構造の一周期部分のみを取り扱うという特徴から、FDTD法よりも必要とする計算機メモリと計算時間が小さい。そこで一般的なハードウェアでも三次元のシミュレーションが可能である。三次元RCWAの結果を図4に示す。まず520nm付近、1000nm付近に伝搬型SPR起因の吸収が観察されており、さらに今回の結果では、実験結果と同じ600nm付近に局在型SPR起因の吸収が確認されていることが分かる。次に、吸収ピークの屈折率応答比較を図5に示す。図3と比べると、三次元RCWA法では定性的にも定量的にも実験結果と良好な一致が確認されていることが分かる。

以上の結果から、周期構造であればRCWA法で定量的な解析が可能であることが確認された。また、周期構造以外のモデルに対しては、複数台のPCをクラスター接続したハードウェア環境を整え、特定領域において三次元FDTD法が計算可能な環境の構築も実施中である。

ii) ハイブリッド局在SPR基板の作製

ハイブリッド局在SPR基板は、ナノ構造の周期パターンを有する。よって、所望の構造を得るためには、ナノの精度での作製プロセスの確立とナノの精度での構造評価が必要になる。本年度は、プロセスの改良と評価系の改良により、垂直方向の形状サイズのバラツキ幅を $\Delta 12\text{nm} \rightarrow \Delta 6\text{nm}$ (改善率50%)にした。詳細を以下に記述する。

本研究では、ナノパターンを有する基板の作製プロセスに

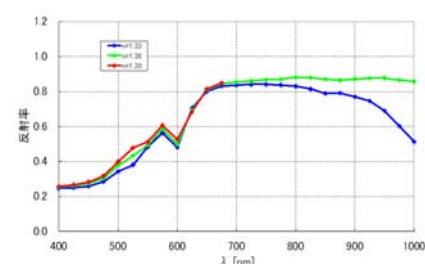


図4. RCWA法によるナノ構造からの反射スペクトル

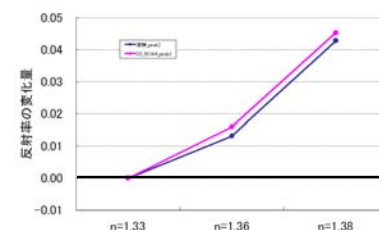


図5. 実験とRCWA法の屈折率応答比較

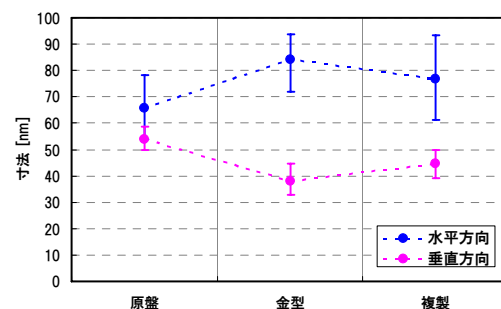


図6. 当初の基板作製各プロセス寸法精度

ついて、ハイスループットで安価に作製可能という観点から、また弊社が保有の技術であるという観点から、金型複製プロセスを用いている。当初、弊社が通常使用しているプロセスでナノ構造の作製を試みた。その結果を図6に示す。ここから明らかなように、原盤から金型作製の際、そして金型から複製品の作製の際の形状サイズが変化している。この原因として、我々は次の仮説を立てた。一つ目は、原盤から金型作製の際に、原盤を形成しているレジストのパターンが金型作製時のスパッタプロセスの熱によってレジストが変形していると推定した。二つ目は、金型から複製の際の圧力条件が不十分のため、樹脂が金型の凹部に入り込んでいないのではないかと推定した。三つ目は、ナノパターンのサイズを評価する際に、AFM（原子間力顕微鏡）を用いているが、そのカンチレバーの先端がナノの凹部の底辺に達していないのではないかと推定した。以下にそれぞれの仮説の検討結果を示す。

①レジストパターンの変形

ある特定のナノサイズの形状を有する基板をホットプレート上に乗せ、プレートの温度を変化させた後、基板を取り出し形状サイズを評価した。そこから得られた結果から、レジストが熱によって融解したため、高さ方向が減少し、幅方向が増加したと考えられる。今後は、無電解メッキによって金型を作製することによって、熱負荷の少ないプロセスを導入し、レジストの変形を抑制する。

②複製時の圧力条件

圧力条件を変化させ、その複製品の形状サイズを評価した。その結果より、圧力条件を変えても複製品のサイズへの影響がほとんどないことがわかった。しかし圧力条件が増すと、剥がれなどの欠陥が多くなることが判明した。

③カンチレバーの改良

ナノの凹部にカンチレバーの先端を入り込ませるために、TEAM NANOTEC 社が販売している角度調整可能なカンチレバーを導入して、評価を行った。その結果を図7に示す。この結果より、金型と複製品の高さ方向のサイズが一致していることから、複製について精度よく作製できていることが証明された。

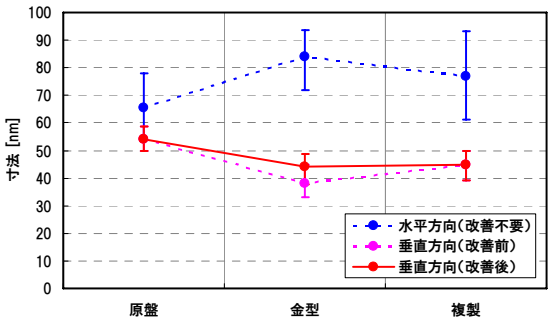
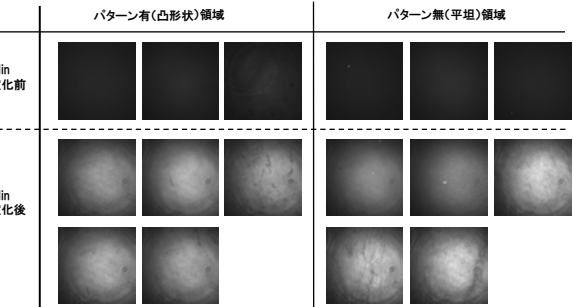


図7. カンチレバー改良後の各プロセスでの寸法精度再測定結果

iii) ハイブリッド局在SPRの評価

今年度は当初、ナノ構造による電界分布や電界強度を直接観察できる評価系の立ち上げを目標としていた。しかし、我々の仕様を満足する市販品の評価系は存在せず、予備実験や改良を行う必要性が発生した。それによって納期が6ヶ月必要となり、今年度中の立ち上げは不可能となった。しかし、評価系の仕様決めや業者選定までは行っており、来年度



蛍光強度比: ナノパターン部:周辺部 = 100:106
(測定点はともに5ポイントのAve.)

図8. ナノ構造による生体分子固定化への影響結果

発注後、即立ち上げを実施する。また、その他の設備（生体処理関連）の立ち上げや、設計（光学設計、流体設計）環境の構築を行うなど、研究環境の整備を実施した。

iv) ハイブリッド局在SPRの高感度チップの作製

生体分子間相互作用を評価するためには、基板に受容体である生体分子を固定化する必要がある。また、ハイブリッド局在SPR基板は、ナノ構造を有する基板であるため、ナノ構造に生体分子を固定化する必要がある。ここでは、ナノ構造による生体分子の固定化への影響を検証した。その影響を調査するため、ナノ周期パターンにSiO₂をスパッタした基板に、固定化膜を形成し、それに蛍光分子を修飾した生体分子を結合させ、蛍光顕微鏡を用いてその蛍光強度を直接観察した。ここで、金ではなくSiO₂をスパッタした理由は、金だとナノパターンによってプラズモンが増強され、それによって励起される蛍光強度が増加するので、付着量以上の蛍光を観察してしまい、パターンが無い基板との比較が不可能となるためである。以下に、実験の詳細を記述する。樹脂のナノパターンが有る基板と無い基板のそれぞれに、SiO₂の薄膜を形成し、さらに生体分子固定化のためのPEG(Poly Ethylene Glycol)の単分子膜をコートした後、biotinという生体分子を固定化した。そして、そのbiotinと特異的に結合するavidinに蛍光分子Cy3を修飾させた試料をそれぞれの基板に供給した。その際の各基板の蛍光強度の写真を図8に示す。ここから明らかなように、ナノ構造の有無による生体分子の結合量に差は見られなかった。従って、ナノ構造が生体分子の固定化に悪影響を及ぼすことはないことが確認できた。

v) ハイブリッド局在SPRを用いた生体分子相互作用の環境応答性評価

少量の試料をセンシング部に流すためのマイクロ流路の試作を行った。今後は、基本的な流体の基本特性をシミュレーションと実験で確認し、その後ナノ構造による影響を評価する予定である。

3. 研究実施体制

「オムロン」グループ

- ① 研究分担グループ長：青山 茂（オムロン㈱、グループ長）
- ② 研究項目：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。

「大阪大学」グループ

- ① 研究分担グループ長：和沢 鉄一（大阪大学、客員助教授）
- ② 研究項目：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。