

青山 茂

(オムロン(株)グループ戦略室経営戦略部 参事)

## 「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」

### 1. 研究実施の概要

本年度は、ポリマー材料を用いてナノインプリントによって作製された独自のナノ周期構造を配列した局在SPR(表面プラズモン共鳴)センサによってモデル蛋白質であるBSAの検出に成功した。しかし、センサとしての感度はまだまだ改善の余地があり、センサのサイズもまだ大きなものとなっている。次のステップとして、来年度は、①センサの高感度化と腫瘍マーカーを含む様々なプロテインの検出と、②センササイズの小型化(来年度は、卓上サイズの概念設計完了を目指す)を目標として研究開発を行う。

### 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) 基板の設計、ii) 基板の作製、iii) 基板の評価、iv) チップの作製、v) 生体分子相互作用検出。以下に各項目の本年度の研究実施内容を記述する。

#### i) 基板の設計

本年度は、前年度に構築した設計環境を用いて、ナノ構造の周期、形状、大きさ(幅、深さ、傾き)等のパラメータとセンサ特性の相関関係を RCWA(Rigorous Coupled Wave Analysis)法によるシミュレーションにより解析し、現時点での最適な構造を設計した。詳細を下記に記述する。構造設計を行う上で、パラメータは数多く存在する。例えば、ナノ構造の形状、サイズ、材料、周期構造のピッチ、入射光の方向などがあげられる。我々は、シミュレーションによりナノ構造の最適設計を行った。その結果、ナノ構造の形状は凹型がよく、入射光は試料側から入射させるのがよいという結果を得た。また同様に、金属厚さ、凹部の溝幅、凹部の溝の壁の傾斜角についても最適設計を行い、それぞれ80nm以上、10-60nm、垂直(90°に近ければ近いほうがよい)という結果を得た。また、凹部の溝深さとナノ構造のピッチについてもシミュレーションした。この2つのパラメータはトレード・オフの関係にある。検証の結果、共鳴波長が可視光で特に検出器の感度が良い 650-700nm になる条件で、ピッチは大きく、深さは浅い方がより良いことがわかった。

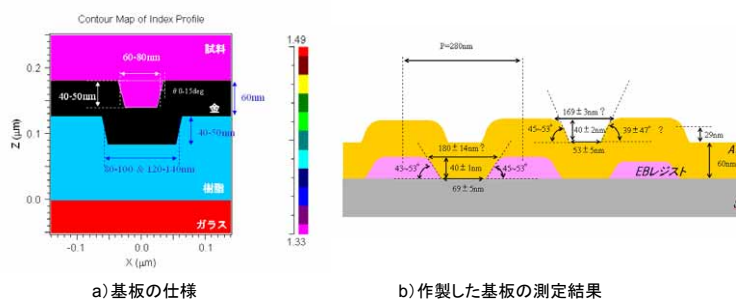


図1. 作製した基板の仕様と実際に測定した結果

次に、シミュレーションと実測が一致しているかどうかを検証した。試作した基板は、上記最適値を決める前に作製したため、その時点で最適と思われた構造で試作を実施した。そのときの仕様と、実際に作製した基板の実測値を図1に示す。また、シミュレーションと実測の波長と反射強度の関係を図2に示す。ここで、シミュレーションと実測値に誤差が生じているのは、凹部の傾斜角が仕様 75-90° に対して、実際に作製した基板の凹部の傾斜角が 39-53° となっていることによる影響である。

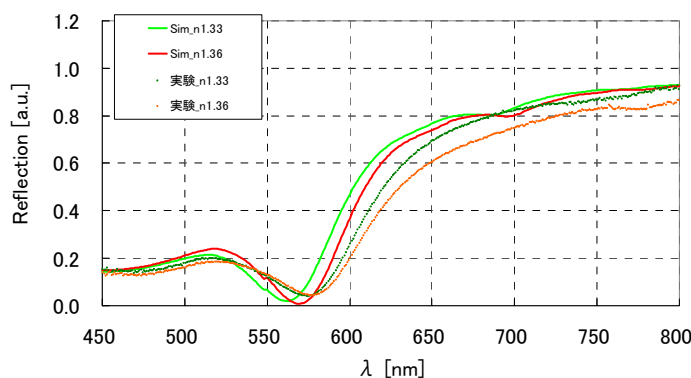


図2. 設計した基板のシミュレーションと作製した基板との波長-反射強度の関係

来年度は、設計において、パラメータとして三次元ナノ構造の配置についても検討を加えることで、高感度化を実現する。

### ii) 基板の作製

弊社では、ナノ構造を安価に、高品質に作製するために弊社保有の金型複製方式を応用している。H18年度は、原盤から金型を作製するプロセスの改善を行った。具体的には、無電解メッキ工程を弊社プロセスに導入することで、原盤から金型を作製したときの寸法のバラツキを図3に示すように $\Delta 10\text{nm}$  から $\Delta 1\text{nm}$  以下に抑えることができた。

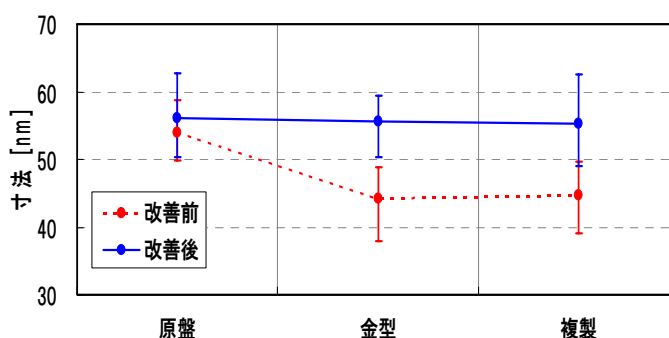


図3. 無電解メッキ工程による寸法精度の改善結果

また、作製した基板の形状評価を実施したところ、パターンの幅と深さ寸法はほぼ設計値通りであったが、パターンの傾斜角において設計仕様 75° 以上に対して、作製した基板では 39-53° であり、センサ感度の低下の要因のひとつとなっている。パターンの傾斜角が急峻なほどセンサ特性も高感度であることがシミュレーションでも確認されている。したがって、来年度はさらなるプロセスの高精度化を実施する。特に、原盤作製プロセスでエッチング条件の最適化を行うことで、ナノ構造の傾斜角の設計仕様を達成する。

### iii) 評価系の構築

センシング感度を評価するには、その評価系による誤差(ノイズ)がないことが理想である。ノイズが大きいと微小な生体分子の信号がノイズに埋もれてしまい検出することができない。評価系には本来、様々な因子のノイズが存在する。例えば、光源の温度変化による発光スペクトルの揺らぎ、各光学部品の位置ずれ、受光器の電子ノイズ、試料を流す流路内の気泡

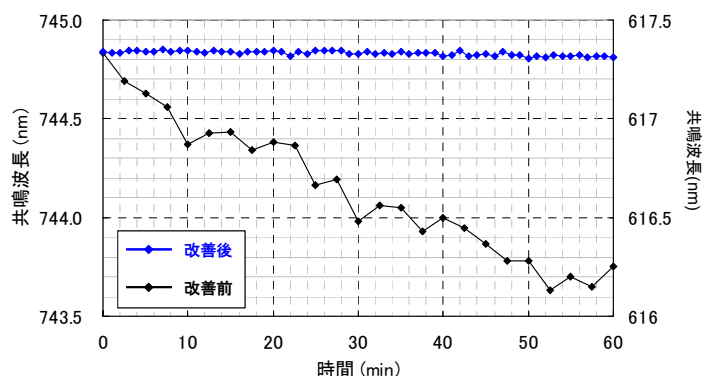


図4. 改善前と改善後の評価系の共鳴波長の揺らぎ

やゴミなどである。我々は、これらのノイズ要因を改善することで、図4に示すように、1時間当たりの共鳴波長の揺らぎ(maximum-minimum 値)を $\Delta\lambda = 1.1\text{nm/h}$  から $\Delta\lambda = \pm 0.1\text{nm/h}$  以下に低減した。すなわち、従来よりも約10倍の分解能を達成した。

また、本年度は、ナノ構造による電界分布や電界強度を直接観察することができる光子走査型トンネル顕微鏡の導入を行った。来年度は、この装置の立ち上げを行い、実際に作製した基板のナノオーダーレベルの電界分布や電界強度の直接観察を実現し、設計理論に反映させる。

#### iv) チップの作製

本年度は、生体分子間相互作用を評価するための生体分子固定化膜の研究開発を行った。そこで、次の2つの有効な固定化膜作製方法を確立した。一つは昨年度から検討しているビオチンを修飾した PEG (ポリエチレングリコール) を基板に固定化する手法で、他方は英国の Orla 社が開発している固定化用融合蛋白質 ORLA18 を使った固定化方法である。これらの手法を用いて、弊社独自でナノ構造基板への固定化プロセスを開発し、ナノ構造基板への固定化に成功した。また、この2つの手法の比較を図5に示す。これからわかるように、両方一長一短である。今後は、さらなる改善を満ちし、すべての項目を満足できるような固定化方法を確立する。

	ビオチン修飾 PEG	ORLA18
受容体配向性	○	○
受容体密度	△	○
非特異吸着	○	△
プロセス簡便性	△	△
ナノ構造への固定化	△	○
検出感度	○	○
安定性	△	△

図5. 2つの固定化膜(ビオチン修飾PEG, ORLA18)の比較

#### v) 生体分子相互作用検出

本年度は、上述で作製した基板を用いて、BSAの検出に成功した。その結果を図6に示す。詳細には、固定化膜 ORLA18 表面上で、抗体 (Anti-BSA, 0.03mg/mL ) と抗原 (BSA, 0.1mg/mL) を順に反応させた。その際の波長シフトは、それぞれ 1.36nm、0.47nm であり、結合分子比 1.0:0.8 の特異的な抗原抗体反応と判断できる(図6a)。続いて、pH 2.2 の酸性条件により表面を再生した後、再度抗体 (Anti-BSA, 0.03mg/mL) を結合させ、非抗原 (Fibrinogen, 0.1mg/mL) による非特異吸着量を評価した。その結果、波長シフト0.11nmが確認できた(図6b)。抗原と非抗原による S/N は 4.3 であり、これは従来の SPR 装置から得られる結果と同等であった。ここで、流速は 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、Running buffer は 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, 25 $^{\circ}\text{C}$ である。来年度は、癌腫瘍マーカーなど様々な生体分子の相互作用の検出を試みる。

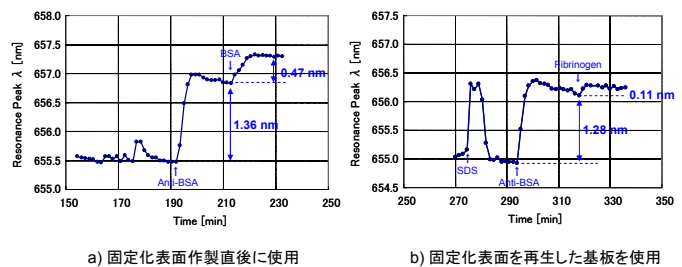


図6. 独自基板によるBSAの検出

また、来年度はセンシング装置とセンサチップの小型化について取り組む。センサチップの小型化については、特に局在SPRによるセンシング部に加え、試料を流すマイクロ流路が一体化されたチップの試作を行う。センシング装置の小型化については、測定検出部、光源、送液システムの小型化を実施し、卓上サイズのセンシング装置を検討する。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「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㈱ 参事)

#### ②研究項目

・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ー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を実現する。

### 4. 研究成果の発表等

#### (1)特許出願

平成 18年度特許出願:2 件(CREST 研究期間累積件数:2 件)