

「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

オムロン株式会社グループ戦略室経営戦略部・参与

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

<研究のねらい> 生命現象の詳細な解析のためには、生命現象を司る生体分子間相互作用のマイクロ領域での動的検出が不可欠である。本研究では、独自のナノ構造を金属表面に形成したセンサ基板を用いることで、金属ナノ構造内部の金属自由電子と入射光とのナノ領域での局所的な共鳴(局在型 SPR、SPR; Surface Plasmon Resonance)を発生させ、生体分子間相互作用を非標識、リアルタイム、高 S/N に検出する技術、小型センシングデバイスの研究開発を行う。

<研究概要> 平成19年度は市販装置の約 1/10 サイズのプロトモデルを構築し、局在型 SPR による小型化の実証を行った。平成 20 年度は本装置を用いて、更なる高感度化の検討とデバイスの量産技術の基礎検証を主に実施した。

<研究成果> 金属表面のナノ構造の構造パラメーターと光学的なセンシング特性についての相関検証をシミュレーションと実験により検証した結果、ピッチの微細化により、約 7 倍の高 S/N 化を確認。また、更なる高感度化のため、金コロイドを用いたサンドイッチ増感効果の検証を行った。直接法での検出限界が数十 ng/ml であったのに対し、金コロイドによる検出限界は約 6ng/ml と一桁の感度向上を達成。更に、ナノ構造基板の作製スループット向上のため、射出成形による基板作製検証を実施し、従来の作製方法に比べて 100 倍以上の高スループット化を達成した。

<今後の見通し> 今後、より実用的なデバイスの実現に向け、ナノ構造の二次元化、金コロイドの条件(サイズ、濃度等)最適化による高感度化検討や測定対象のアレイ化、流路用カバーの常温アセンブリ技術、装置サイズの更なる小型化について検討予定である。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

<研究の目的> 平成19年度は市販装置の約 1/10 サイズのプロトモデルを構築し、局在型 SPR による装置小型化の実証を行った。本装置での検出限界は数十 ng/ml(平成 19 年 3 月時点)であったが、実際の臨床等では更なる高感度化(数十 pg/ml～数 ng/ml)が求められる。そこで本年度は本プロトモデルを用いて、更なる高感度化に向けた①ナノ構造の微細化、②アッセイ法の検討を実施した。更に、デバイスの実用化にはナノ構造基板を大量、安価、安定に作製する技術が

求められる。そこで、最も汎用的な成形技術である③射出成形によるナノ基板作製について検証を行った。

<方法、結論>

① ナノ構造微細化による高感度化検証

まず、FDTD(Finite Difference Time Domain)法による光学シミュレーションを用いて、ナノ構造の構造パラメーターと光学特性の相関解明を実施したところ、ナノ溝の幅が狭く、深さが深く、ピッチが広くなるほど共鳴波長は長波長側へシフトすることが明らかとなった。また、伝搬型 SPR の感度領域が約 300nm に対し、ナノ溝構造のピッチが 300nm の場合の感度領域が 50nm、ピッチ 180nm で 25nm、ピッチ 80nm で約 10nm と、ピッチ狭いほどセンシング領域はセンサ表面へと局在化するという結果が得られた。測定対象のサイズ、プローブ層の厚さに合わせたパターンピッチを用意しておくことにより、バックグラウンドノイズの影響を最低限に抑え、ターゲットのみを検出するという従来不可能であった理想的なセンシング基板の実現が可能であることが示された。

実際にパターンのピッチと溝幅を変化させた基板を作製(深さは 50nm 固定)し、評価を行った(図1)。ここで、ピッチが微細化するに従って溝のエッジ部の鈍りや隣のパターンからの干渉といったナノ作製誤差の影響が大きくなるため、電子ビーム描画時のレジストの薄膜化等のプロセス改善を実施することで高精度なパターン作製を実現した。図1ではパターンのピッチと溝幅を変化させることで各共鳴波長が吸収された反射色が観察されており、ピッチが広く、溝幅が狭くなるほど共鳴波長は長波長側へ(パターンの反射色は赤から青へ)シフトしており、設計通りの結果が得られている。このように各ピッチに合わせて溝幅等の構造パラメーターを制御することで従来法に比べてかなり自由に共鳴波長を調整することが可能であり、光源やアプリケーション毎にチューニングが可能である。

次に、本試作基板を用いて生体分子検出の S/N 評価を行った。生体分子として BSA(Bovine Serum Albumin, Mw=66kDa)の非特異吸着の検出(Signal)とバックグラウンドノイズ(Noise, 試料を水からエタノールに置換で模擬)の信号変化量比較を行った(図2)。ピッチが 360nm の場合は S/N=0.28 であったのに対し、ピッチが 80nm では S/N=2.04 と約 7.3 倍の高感度化が確認された。

② 金コロイドサンドイッチ法による高感度化検証

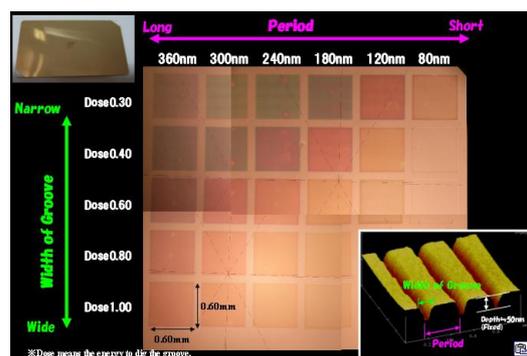


図1. ナノパターン試作基板

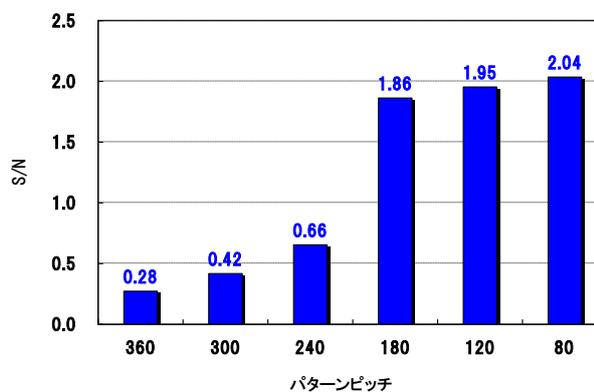


図2. パターンピッチと S/N の相関

更なる高感度化実現に向けて、金コロイドを用いたサンドイッチ増感についての検討を行った。まずリガンドとなる抗体を固定するためにプロテイン A 融合タンパク質 (ORLA18, Orla Protein Technologies 社)の単分子膜を基板上に形成し、抗 AFP 抗体 (Rabbit IgG)を固定化した。本基板上に肝臓癌の腫瘍マーカーである AFP (α -fetoprotein, Mw=70kDa)の濃度を変えてインジェクトした。次に、非特異吸着を抑えるため Fc 部分を除去した抗 AFP 抗体 (Biotin-Fab')を送液し、最後にストレプトアビジンにより修飾された金粒子 (D=10nm, British Biocell International 社)を流した。ここで、サンドイッチ抗体のフラグメント化とプロテイン A 融合タンパク質を用いた固定化方法により、非特異吸着をほぼ 0 に抑えることができています。さらに、従来の直接的な検出での検出限界が数十 ng/mlであったのに対し、本方式では検出現限界が約6ng/mlと、10倍程度の高感度化の効果が確認された。今後、金コロイドの粒径、濃度等の最適化により、更なる高感度化について引き続き検討予定である。

さらに、本実験で用いた金コロイドを利用して、センサ表面への抗原結合分布の観察を行った(図4)。特に本基板では表面にナノ溝構造を有するため、溝内部へのタンパク質の進入確率の低下が懸念されるため、SEMによりAFP1ug/ml送液後の金コロイドの結合面内分布を観察し、平坦部分と溝部分の密度比較を行った。平坦部分での金コロイド密度が13.7個/ μm^2 に対し、溝内部が13.8個/ μm^2 と溝の内側であっても、進入確率は影響が無いことが確認された。

③ ナノ構造基板の作製プロセス高スループット化

本デバイスの実用化にはナノ構造基板を大量、安価、安定に作製する技術が求められる。

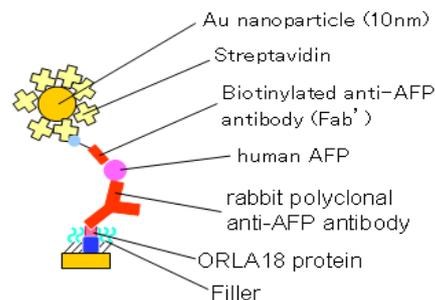


図3. 金コロイドによるサンドイッチアッセイ

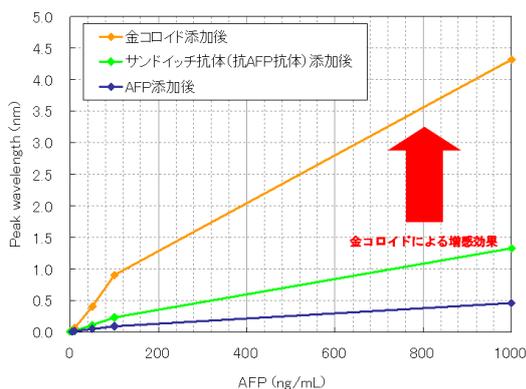


図4. 金コロイドに増感によるAFP検出

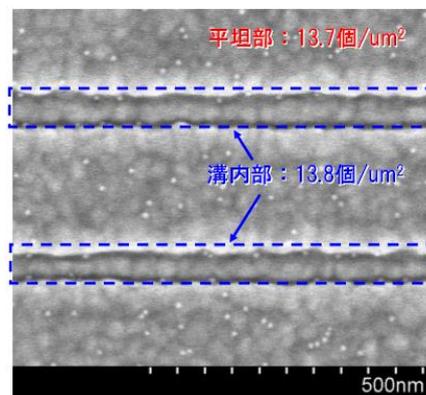


図5. 金コロイドの結合観察SEM像



図6. 射出成形テスト用試作スタンプ

これまでは、2P(Photo Polymerization)法により、基板を作製していたが、樹脂の硬化に240sec 必要であり、剥離等を含めると10min 以上が必要であり、さらにチップ毎にダイシングの後工程が必要であるといった課題があった。そこで本年度は最も汎用的な成形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。

今回、DVD 等の成形に用いられる射出成形機(日本製鋼所、J45AD-DK)を用いてナノ形状の転写性と光学特性の評価を行った。今回は DVD の金型に合わせたスタンプを作製(外形φ138.0 ± 0.1mm, 内径: φ22.0+0.01, -1mm, 板厚0.295 ± 0.005 mm)し、径方向にいくつかのパターンの向きを変えて準備した(図7)。樹脂は一般的なポリカーボネート(PC)を用いて、成形温度107℃、112℃、117℃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と言われているが、

今回の結果ではいずれも転写率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10min 程度必要であったプロセス時間が1/100 以上短縮できることが確認された。続いて、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(図8)、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。次にバイオチップとしての使用を想定し、耐薬品性に優れた環状オレフィン・コポリマー(COC)による転写を実施し、成形温度を300℃以上まで高温化することで良好な転写性が得られることが確認された。

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(オムロン株、参与)

② 研究項目

センシング基板の設計、作製、評価及び、生体分子の固定化技術、装置構築を実施する。

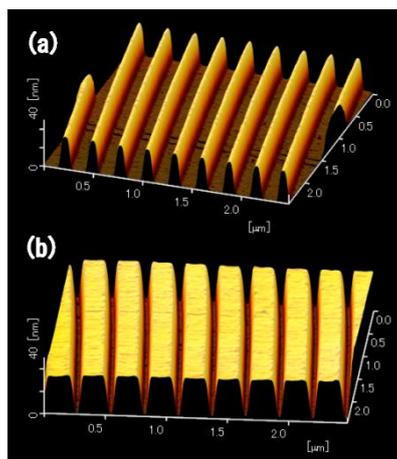


図7. (a)スタンプ, (b)成形品 AFM 像

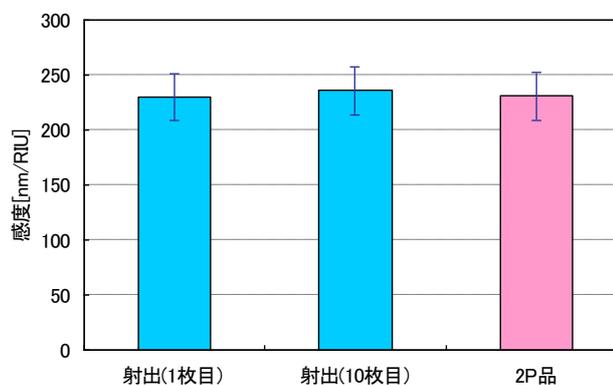


図8. 射出成型品光学特性評価結果

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表（原著論文）

1. 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)
2. 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) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：2 件）