

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20710104
 研究課題名（和文） 局在プラズモン共鳴測定用チップの開発と生体分子間相互作用解析
 研究課題名（英文） Development of a localized surface plasmon resonance chip and analysis of bio-affinity
 研究代表者：
 栗田 僚二（KURITA RYOJI）
 独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・主任研究員
 研究者番号：50415676

研究成果の概要（和文）：局在プラズモン共鳴の反応場として、様々な形状のナノホールアレイをナノインプリンティング法により作製した。この構造に金薄膜を蒸着後、金膜厚やナノホールアレイの深さ、中心間距離について検討した。さらに、最適化したプラズモニックナノホール構造をポリジメチルシロキサン製のマイクロフルイディスク中に実装し、基板からの反射光の測定を行った。本センサチップを使用して、炎症マーカーの測定を行ったところ、濃度に応じたディップのシフトを確認できた。極めて簡便なセンサでありながらも、生体相互作用の一種である抗原抗体反応をリアルタイムで測定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We have fabricated various nano-structure arrays for a localized surface plasmon resonance sensor by nano-imprinting technique. Then, we have investigated relations between the nano-structure and an intensity of plasmon resonance, especially thickness of the gold film, depth of the nano-hole and periodicity. We have further integrated the nano-structure with gold film into a poly-dimethylsiloxane microfluidic device for bimolecular determination. We succeeded in measurement of TNF- α , which is known as an inflammatory marker, on our sensing device. Furthermore, we could improve the detection limit of TNF- α by enhancing the LSPR signal with gold-colloids.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学

キーワード：表面プラズモン共鳴、金ナノホール構造、バイオ分析、抗原抗体反応、ナノインプリント

1. 研究開始当初の背景

現在、研究機関や医療現場に於いて様々な生体分子が計測されている。分析機器のめざましい発展によりアミノ酸やペプチド、タンパク、核酸等の様々な生体分析装置が市販化され、基本的に測定できない分子は無くなった。一方で、これらの生体分子をより簡便かつ迅速に計測を行いたいという要求は強く、近年の Micro Total Analysis Systems 或いは Lab on a chip 技術によるハイスループット化や集積化とともに、簡便かつ迅速な生体分子計測法が期待されている。従来、大型分析機器で行われていた生体分子計測を、小型装置に組み込まれたマイクロセンシングチップを用いてオンサイト計測可能にすることで、在宅医療や治療成績の向上、莫大に膨れあがった医療費の削減など、様々な効果が期待される。研究代表者は、クレッチェマン配置型の携帯型表面プラズモン共鳴測定器用マイクロセンシングチップの研究開発を行ってきた。しかしながら、例えば家庭用ヘルスケアデバイスへとカードサイズまで表面プラズモン共鳴測定器を、感度を維持したまま小型化することは極めて難しい。これは、一般的な伝搬型表面プラズモン共鳴角度の測定手法である p 偏光の反射強度の角度依存性を測定するクレッチェマン配置では、光学部品の配置が限界に達しつつあるためである。そのため、従来のクレッチェマン配置型とは異なる新規な検出手法が望まれている。

2. 研究の目的

上述したように、今後大きく発展すると考えられる局在プラズモン共鳴法をマイクロセンシングチップへ応用していくために、本研究期間では次の2点を明らかにする。

1. 局在プラズモン共鳴による電場増強効果と、反応場の形状・大きさとの関係を明らかにし、マイクロ流路内での局在プラズモン共鳴測定に最適な構造を決定する。

2. 局在プラズモン共鳴法による生体分子間相互作用計測へ応用し、伝搬型表面プラズモン共鳴測定と比較することにより、ナノ空間での相互作用の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究の前半(平成20年度)は、上述したナノインプリンティング法によって様々な形状のナノ構造体を作製する。その後、この構造体へ白色光を入射し、その反射光を分光器に導入して分光スペクトルを得ることで、局在プラズモン共鳴強度の評価を行い、構造体の形状・大きさとの関係を明らかにする。後半(平成21年度)では、上記ナノ構造体をマイクロ流路中に形成し、フロー分析へと

応用する。この際に、ナノ構造体には予め抗体や核酸を修飾しておき、これら生体分子と相互作用を有する分子を導入することにより、分子間相互作用を測定し、従来の伝搬型表面プラズモン共鳴測定法との差異を明らかにしていく。

4. 研究成果

平成20年度は、表面プラズモン共鳴の反応場として、種々のナノ構造体をナノインプリンティング法により作製し、金を蒸着後、形状変化と電場増強の関係性を検討した。

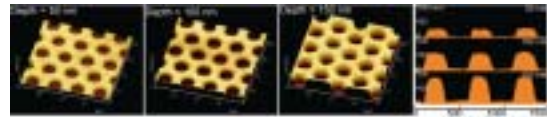


図1 作製したナノホール基板表面のAFM像

本研究では様々な形状のナノホールアレイを作製したが、はじめに直径300 nmであるホールの深さを50、100、150 nmと変化させることにより、深さ方向による吸収ピーク波長変化について検討した。図1に作製したナノホール基板のAFM像を示す。モールドの形状を精緻に転写できたことを確認した。続いて作製した基板に白色光を照射し、その反射光を測定した結果、屈折率変化に対する感度については3種類の基板とも大きな違いはなかったものの、ホールの深さが50 nmの時に最も先鋭な吸収ピーク波長を確認することができた。(図2)

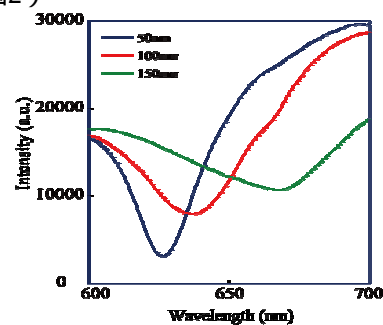


図2 種々のナノホール構造から得られた多反射スペクトル

続いて、ホールを深さを50 nmに統一し、ホールの中心間距離を400、500、600、900 nmと変化させることで、LSPRとホールの中心間距離の関係性を検討した。図3にその結果を示す。中心間距離を増大するほど、LSPR由来の吸収ピーク波長が長波長側にシフトすることを明らかにした。同時に中心間距離の増大とともに感度も増幅することが明らかとなった。両者の関係とも高い相関を有している。以上の結果より、ホールの深さ、中心間距離を最適化することで、より高感度なLSPRセンサを作成することができた。また同時に中心間距離を制御することで吸収ピーク波長を自由に決定できることから、可視光領域での簡便な生体サンプル分析への応用も可能であることが示唆された。

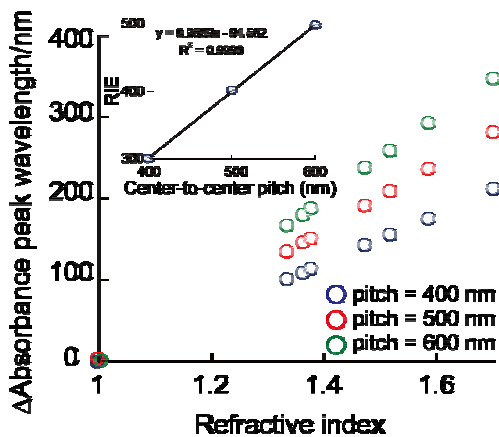


図3 中心間距離による屈折率変化と感度の関係

平成21年度は、前年度に形状を最適化したプラズモニックナノホール構造をマイクロ流体ディスク中に実装した。プラズモンセンサの基板にはペットフィルムを使用し、ナノインプリントにより構造を転写することで、安価かつフレキシブルな基板を作成した。図4に作製したチップの写真を示す。微小流路は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)をソフトリソグラフィと呼ばれる技術により加工し作成した。光透過性の高いPDMSを流路材料として利用することで、基板上側からの白色光の直接入射、基板からの反射光の測定を可能とした。

作成したプラズモンセンサチップを使用して、ウシ血清アルブミン(BSA)の金基板に対する非特異的な吸着をモニタリングした。その結果、BSA溶液を導入するに従い、反射スペクトル中に存在するプラズモン共鳴由来のディップが徐々に長波長側にシフトする現象を確認することができた。これは金ナ

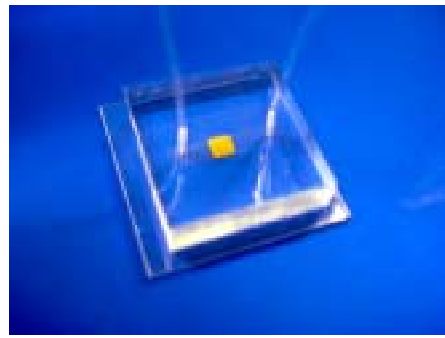


図4 作製したプラズモニックセンシングチップ

の写真

ノホール構造表面にBSAが吸着することで、表面の屈折率が大きくなったことによると考えられる。

続いて、作成したチップ上での抗原抗体反応をリアルタイムでモニタリングした。測定した結果を図5に示す。本測定では炎症マーカーの一種であるTNF- α を抗原として使用した。あらかじめ抗体を化学修飾により固定化した金ナノホール構造に種々の濃度のTNF- α を導入したところ、濃度に応じたディップのシフトを確認した。これより、我々は非常に簡便に作成されたセンサチップを用いて生体相互作用の一種である抗原抗体反応をリアルタイムで測定することに成功した。しかしながら、得られた検出限界は1 μ g/mL程度と従来のクレッチマン型SPRと比較すると2桁程度劣るものであった。そこで我々はさらなる検出限界の向上を目的として、抗原抗体反応を行った後、金コロイドを導入することでシグナルを増幅させた。その結果、検出限界は10ng/mLとなり、金コロイドを用いない時と比較し2桁程度の検出限界向上を達成した。

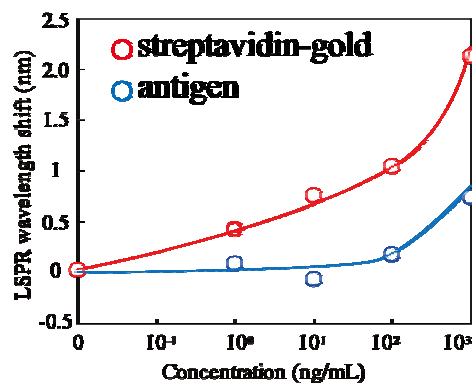


図5 チップ上で抗原抗体反応を行った際の検量線

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Kohei Nakamoto, Ryoji Kurita, Osamu Niwa, Development of on-chip localized surface plasmon resonance sensors based on gold nanohole arrays by using nanoimprinting technology, The Proceedings of μ TAS 2010, 2, 1599-1601 (2009) 査読有り

Kohei Nakamoto, Ryoji Kurita, Osamu Niwa, Fabrication of an on-chip affinity biosensor by integrating a localized surface plasmon resonance method for real-time biochemical measurement, μ TAS 2010, 2, 1752-1754 (2009) 査読有り

[学会発表](計7件)

栗田 僚二, 表面プラズモン共鳴を利用した生体分子計測用マイクロセンシングチップ, 日本分光学会 高感度表面・界面分光部会シンポジウム. 2009年12月25日、産業技術総合研究所

Kohei Nakamoto, Ryoji Kurita, Osamu Niwa, Development of on-chip localized surface plasmon resonance sensors based on gold nanohole arrays by using nanoimprinting technology, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science, 2009年11月3日、ICC Jeju, Jeju, Korea

Kohei Nakamoto, Ryoji Kurita, Osamu Niwa, Fabrication of an on-chip affinity biosensor by integrating a localized surface plasmon resonance method for real-time biochemical measurement, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science, 2009年11月3日、ICC Jeju, Jeju, Korea

中元 浩平, 栗田 僚二、丹羽修、Development of an on-chip affinity biosensor by integrating a localized surface plasmon resonance method fabricated by nanoimprint technique, 日本分析化学会第58年会 2009年9月24日、北海道大学高等教育機能開発総合センター

中元 浩平, 栗田 僚二、丹羽修、微小流路中での尿中疾病マーカー/濃度補正分子の簡易同時測定, 東京コンファレンス2009, 2009年9月4日、幕張メッセ

中元 浩平, 栗田 僚二、丹羽修、ナノホールアレーを用いた局在プラズモン共鳴センサ作製の検討, 第19回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2009年5月28日、広島大学東広島キャンパス
中元 浩平, 栗田 僚二、丹羽修、ナノインプリント法を用いた局在プラズモン共鳴(LSPR)センサの作製, 第70回分析化学討論会, 2009年5月16日、和歌山大学栄谷キャンパス

[その他]

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/brf/brf-mr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 僚二 (KURITA RYOJI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・主任研究員

研究者番号: 50415676