

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20750061

研究課題名（和文）

プラズモン励起赤外蛍光法による高感度免疫計測のための蛍光プローブの探索

研究課題名（英文）

Search for fluorescent probe for high sensitive immunosensing by Surface Plasmon Field-enhanced Fluorescence Spectroscopy

研究代表者

滝口 裕実 (TAKIGUCHI HIROMI)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：30446736

研究成果の概要（和文）：

- 1) 可視光表面プラズモン励起蛍光システム改良によるプラズモン励起赤外蛍光測定装置の構築した。
- 2) プラズモン励起赤外蛍光測定装置による腫瘍マーカー（AFP;アルファフェトプロテイン）の迅速定量を行った。血漿試料を 15 分で測定し、可視光励起と比較して約 20 倍向上し、検出限界は 0.005 ng/mL であった。
- 3) 近赤外蛍光プローブの探索を行い、有機色素を用いる場合はセンサー表面（金薄膜表面）との間隔距離を適切にとることにより非常に高感度な測定が可能であったが、単層カーボンナノチューブを用いる場合はセンサー表面への非特異的吸着を抑制することが出来ず、分光特性評価まではいたらなかった。

研究成果の概要（英文）：

- 1) The device of near-infrared Surface Plasmon field-enhanced Fluorescence Spectroscopy (SPFS) measurement was constructed by the visible optical surface plasmon field-enhanced fluorescence measurement device improvement.
- 2) The fast quantification of the tumor marker (AFP; alpha fetoprotein) with near-infrared SPFS was done. The plasma sample would be measured in 15 minutes, it improved by about 20 times compared with the visible SPFS and the limit of detection was 0.005 ng/mL.
- 3) It searched for the near-infrared fluorescent probe. The nonspecific adsorption of single-walled carbon nanotube (SWNT) to the sensor surface could not be controlled, and it did not arrive at the spectrum evaluation of characteristics. By taking the appropriate distance of the interval with the sensor surface (surface of gold thin film), it was very high sensitivity when the organic dye was used.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,170,000	270,000	1,440,000
年度			
年度			
年度			
総計			

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：分析化学

キーワード：表面プラズモン、ナノチューブ・フラーレン、分析科学

1. 研究開始当初の背景

表面プラズモン (SPR) 法は、金などの誘電体薄膜上の 100 nm 程度の範囲の屈折率変化を非標識かつリアルタイムに計測できる手法として、材料表面でのタンパク質等の相互作用解析を行う手法として広く用いられている。また、SPR 時には金表面付近では表面プラズモンによる局所的な電場増強が生じ、入射光電場に対して数倍～数 10 倍程度の増強効果があることが知られている。一方表面プラズモン励起蛍光分光法 (SPFS) とは、増強電場を用いて金表面近傍の蛍光分子を高効率に励起させる手法であり、これまで SPFS を血中の極微量 (サブ ng/mL 程度) な腫瘍マーカーのリアルタイム計測へと応用し、およそ 10 分程度の短時間で計測、定量に成功してきた。SPR の持つリアルタイム計測と増強電場を用いる高感度計測を併せ持つこの SPFS 法は、実用的な高感度かつ短時間計測が可能な免疫計測システムのプラットフォームとして非常に有用である。これまでの SPFS 法は、金薄膜自身の 600 nm 以下での顕著な励起光の吸収による電場増強効果の相対的な減少と近赤外領域での蛍光プローブの選択肢の少なさにより、励起源として赤色の可視光 (630-650 nm 程度) を用いることがほとんどであった。しかし、フレネルの式と多層反射モデルから得られる電場増強効果の計算結果から、表面プラズモンによる電場増強効果は、長波長領域においてより顕著である (入射光電場比、633 nm: 17 倍, 730 nm: 32 倍, 950 nm: 52 倍)。近赤外領域の光源を用いた SPR 法の高感度化の研究例は存在するが、SPFS 法へと適用した例はいまだにない。近赤外領域での SPFS 計測を行うことができれば、近赤外領域でのより大きな電場増強効果より高感度かつ多波長

励起による多色計測が可能な多機能免疫計測システムの構築が期待できる。

2. 研究の目的

近赤外領域における蛍光プローブは、可視光領域のそれと比較して非常に少ない。有機色素とともに単層カーボンナノチューブ (SWNT) や赤外蛍光微粒子といったナノ構造体を近赤外蛍光プローブとして用いることを着想した。SWNT に関しては、その分光学的特性、作製法、単離法に関する研究例はあるが、実用的なバイオセンサーを指向する研究例はほとんど無い。蛍光プローブとして SWNT を用いる場合、センサー表面での分光学的性質を明らかにするとともに、これと長さ (粒径) との関係や調節法、表面処理法あるいは抗体分子の固定化法の開発が極めて重要であり、それらを解決することが本研究の主たる目的である。また、赤外蛍光プローブとしてはインドシアニングリーンを母体とする ICG-Sulfo-OSu ($\lambda_{ex}=768$ nm, $\lambda_{em}=807$ nm) などの有機色素や数 10 nm 程度の粒径の赤外蛍光ナノビーズ (概ね 800 nm 程度の励起により 850-1000 nm 程度の蛍光) も挙げられる。特異な環境である増強電場中における近赤外蛍光プローブを用いた高感度免疫計測システムの構築を最終的な目標とし、そのための新しい近赤外蛍光プローブの探索を理論、実験の両面からアプローチすることを目的とする。

3. 研究の方法

蛍光プローブ表面への抗体の固定化法や表面処理法の最適化を行うとともに、既存装置の改良による近赤外光に対応する SPFS の構築とセンサー表面における近赤外蛍光プローブの分光学的特性を明らかにすること

により、SPFS の新たな可能性を展開させる。具体的には、①近赤外 SPFS における入射角や励起光強度に対する蛍光強度の理論値との整合性と既存 SPFS との絶対感度の比較、②SWNT の長さあるいは蛍光粒子の粒径が与える蛍光消光への影響（SPFS における蛍光プローブとしての有用性の評価）、③ SWNT や赤外蛍光ナノ粒子表面への抗体分子の固定化法の最適化とその表面解析を行う。

4. 研究成果

まず、可視光領域を計測対象とした SPFS 装置を近赤外領域の計測へと改良及び測定条件の最適化を行い、抗原抗体反応の計測により評価を行うことに注力した。具体的には励起光源には発振波長が 670 nm の半導体レーザーを用い、光子計数が可能なアバランシェフォトダイオード (APD) を蛍光検出器に用いた計測システムを完成させた。さらに、金薄膜上に自己組織化単分子膜 (SAM) を介して作成した抗体固定化表面における抗原抗体反応を近赤外 SPFS 法により測定を行った。ビオチン SAM による抗体固定化と、蛍光色素に発光波長 750 nm の有機蛍光色素を用い、血中の肝がんマーカーであるアルファフェトプロテイン (AFP) の計測を行ったところ、従来の SPFS 法と比較して概ね 1/10 程度の励起光出力で励起が可能であることがわかった。また、S/N 比の向上により数倍程度検出感度が向上していることが確認できた。しかし、有機蛍光色素は強い電場における励起による蛍光退色が観察され、本法における蛍光プローブとしては最適ではないことが示唆された。従来法である可視光光源による SPFS 法と同様に血漿採取から血中 AFP (肝臓マーカー) 定量値を 15 分以内で得ることができるだけでなく、S/N 比向上に

より検出感度が約 20 倍向上(検出限界:0.005 ng/mL)した。このことは、これまでは有機赤外蛍光色素の退色及び蛍光消光によって感度ロスが生じていたが、ピチオンアビジン交互積層膜によるセンサー基板(金薄膜)表面から色素までの間隔距離の最適化により大幅にこれらを低減することができたことが大きな要因である。臨床応用および簡易型検査機器の検出原理として幅広く応用するには多種の抗原分子を計測する必要があるが、これまでの知見をもとに抗原分子の大きさ、立体配置や他分子との相互作用を考慮した上で抗体種の密度や種類を最適化したセンサー表面を設計することにより十分可能である。また、上記のような赤外蛍光色素だけでなく、単層カーボンナノチューブ (SWNT) を蛍光プローブとする近赤外 SPFS 法の検討も行った。950nm 付近において顕著な蛍光を発する SWNT を用いたが、センサー表面に強く吸着してしまい、SPFS 法においては利用することが困難となった。SWNT 表面を親水化(ヒドロキシル化等)して用いても、抗原抗体反応を阻害することが分かり、今後の研究課題として残った。

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 1 件)

- ① 河野恵子、滝口裕実、桑島修一郎、岩田博夫、小寺秀俊、和佐清孝、3次元ナノテクスチャー表面をもつサファイア単結晶基板上の表面プラズモン共鳴、表面科学、査読有、32 巻、2011、45-51

[学会発表] (計 3 件)

- ① H. Takiguchi, Y. Teramura and H. Iwata, 2008 International Conference on Solid State Devices and Materials, Speedy and

Quantitative Analysis of **alpha** fetoprotein in human plasma with Surface Plasmon Field Enhanced Fluorescence Spectroscopy, Tsukuba, Japan, 25 September, 2008

- ② 河野 恵子、滝口 裕実、宮野 公樹、桑島 修一郎、和佐 清孝、岩田 博夫、小寺 秀俊 サファイア C面ステップ基板にスパッタ蒸着した金薄膜の構造 第29回表面学術講演会 タワーホール船堀
- ③ 滝口 裕実、小竹 玉緒 表面プラズモン励起蛍光法による腫瘍マーカーの迅速定量、第20回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、金沢エクセルホテル東急・石川四高記念文化交流館

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝口 裕実 (TAKIGUCHI HIROMI)
東京大学大学院工学系研究科・助教
研究者番号：30446736

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者
該当なし