

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20996

研究課題名(和文) 複素SPRセンサとDNAアプタマーによる揮発性有機化合物の特異的高感度検出

研究課題名(英文) Specific and highly sensitive detection of volatile organic compounds by complex surface plasmon sensors with DNA aptamers

研究代表者

清水 大雅 (Shimizu, Hiromasa)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50345170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)： 気相中の揮発性有機化合物を特異的高感度で検出するために、複素表面プラズモン共鳴(SPR)センサの実現・感度向上と、DNAの固定化によるガス分子の選択的検出を試みた。金薄膜の膜厚を基板面内で変化させたくさび型構造をもつSPRセンサを作製し、赤色発光ダイオードからの光を入射し、反射光輝度の角度依存性の経時変化を集光レンズとカメラの組み合わせにより測定し、ガスを入力した時の時間推移を10秒おきに評価した。構築した測定系の角度分解能は0.0047度となり、0.000082の屈折率分解能を達成した。得られた一連の画像から信号を最大化する手順を確立し7ppbのサリチル酸メチルの検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水相中のたんぱく質とDNAの間に働く特異的相互作用を利用したバイオセンサについては数多くの報告例がある一方で、気体分子とDNAの間の相互作用に基づいたガスセンサについては、報告例が少ない。本研究では、DNAをSPRセンサに固定化し、気相中でガス分子を吸着する作用を見出し、ppm～ppbレベルのガスを検出できた、という点で学術的意義をもつ。また、ヒトが匂いを認識できる嗅覚閾値は1ppbから0.1ppbとされる。本研究では少なくとも7ppbのサリチル酸メチルを検出でき、嗅覚閾値まであと1桁ということまで到達し、嗅覚閾値を認識可能なセンサを視野に入れることができた、という点で社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)： We have tried the realization and improvement of the sensitivity of complex surface plasmon (SPR) sensor and selective detection of gas molecules by decoration of DNA in order to detect the volatile organic compounds in the gas phase with highly discriminative and sensitive characteristics. We have fabricated SPR sensor which composed of wedge-shaped Au thin film whose thickness is modulated inside the substrate, and evaluated the reflected light intensity every 10 seconds, by combination of a red light emitting diode, focusing lens, and camera. The obtained angle resolution was 0.0047 degrees, and we demonstrated the refractive index resolution of 0.000082. We have made a protocol that maximizes the signal based on the obtained series of the image, and successfully detected methyl salicylate of 7 ppb.

研究分野：光エレクトロニクス

キーワード：SPRセンサ 複素屈折率 揮発性有機化合物 DNA 強磁性金属

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance; SPR)センサは、水溶液中のタンパク質等の濃度を検出するセンサで、物質を特定し屈折率変化から濃度を検出する。感度を 100~1000 倍向上できれば液体より屈折率変化が小さい気体を検知できる。1 ppb の感度を持つ持ち運び可能なガスセンサが実現されれば、揮発性有機化合物や大気汚染物質検知等様々な分野に応用できる。ガス成分の選択性と感度、スループットはトレードオフの関係にある。これまでに報告されている可搬型ガス(匂い)センサの感度は数 ppm から数 ppb である。

2. 研究の目的

実用化されている SPR センサでは分子識別素子を塗布し、水溶液中の特定のたんぱく質等を選択的に検出する。分子認識素子の一つである DNA アプタマーは一本鎖の DNA からなる核酸分子で水溶液中の標的分子と結合するアプタマーが報告されている。一方、気体の分子識別の例はない。本研究では、水溶液中で DNA アプタマーが標的分子を認識するときに働くクーロン力や分子間力をガス分子識別に応用し、気相中で分子認識する DNA アプタマーを獲得し、後述する複素 SPR センサに搭載し高感度検出を実現する。全ての分析物質には光吸収があり、屈折率は複素数である。既存の SPR センサは屈折率の変化を検知しているが、光吸収の変化を検知できない。ガスを分析対象とする場合、分子量が大きいほど屈折率・吸収係数が大きくなる。特に液化したガスの光吸収は顕著である。揮発性有機化合物の多くは分子量 100~200 であり、複素屈折率(実部=屈折率と虚部=吸収係数の両方)の変化を測定・解析することで検量線を高精度化でき、感度・分析物特定精度を向上できる。これまで、強磁性金属を組み合わせた SPR センサ構造において複素屈折率分解能 Δn , $\Delta \kappa = 10^{-6}$ を解析し、くさび型 SPR センサ構造において 20 倍の感度向上を達成した(H. Shimizu, 2019)。ともに表面プラズモン波と入射光の波数(複素数)を整合でき、複素屈折率を解析可能であり、複素 SPR センサと呼んで従来の研究と区別する。本研究の目的は複素 SPR センサによる 100 倍の感度向上と、気体を識別検知する DNA アプタマーの複素 SPR センサへの固定と 100~10000 倍濃縮による揮発性有機化合物の高感度検出(1 ppb)である。

3. 研究の方法

くさび型 SPR センサの金属に強磁性金属を加えた複素 SPR センサを構成する。波長 650 nm の赤色光を光源とする。屈折率分解能 $\Delta n = 10^{-4} \sim 10^{-6}$ に対して磁化反転に伴う反射率の変化($\Delta R/R$)が最大となる金・強磁性金属の膜厚の組合せ(合計膜厚 t_1)を取得する。液化による吸収変化 $\Delta \kappa = 10^{-6}$ を考慮した組合せも取得する(t_2)。屈折率変化に対する $\Delta R/R$ の変化は従来 SPR センサの指標 反射率の変化 ΔR に比べて 100 倍大きく感度を向上できる。

【複素 SPR センサの作製とセンサ特性評価】入力光を集光し、入射角度をわずかに変化させセンサ表面に導入する。電磁石によって+/-の磁場を印加し反射光の角度依存性をカメラで撮影し、磁化反転に同調した SPR センサの出力信号($\Delta R/R$ の角度依存性)を取得する。テストガスとしてエタノール蒸気(8 % ($\Delta n = 10^{-3}$) ~ 100 ppm ($\Delta n = 10^{-6}$))を供給し、出力信号から濃度を評価し、DNA アプタマー無で 100 ppm の実現を目指す。

【DNA アプタマーによるエタノール・揮発性有機化合物の濃縮】

DNA 水溶液を SPR センサの金表面に滴下・固定する。エタノール蒸気をセンサに導入し DNA によるエタノール分子の選択的吸着と濃縮を評価する。揮発性有機化合物の一例としてサリチル酸メチル($C_8H_8O_3$ 分子量 152.15 飽和濃度 1200 ppm ($\Delta n = 10^{-4}$))を供給し濃度を評価する。様々な密度の DNA 付 SPR センサから信号を取得し、DNA 無 SPR センサと比較し濃縮能力を評価する。エタノール分子を捉えたとの報告がある DNA 配列から着手し、濃縮能力を考察して他の DNA 配列を試験する。金表面におけるサリチル酸メチルの 100~10000 倍濃縮により、濃度 1 ppb を 10 ppm ($\Delta n = 10^{-6}$)に濃縮し検出する。サリチル酸メチルの飽和濃度は 1200 ppm と低いため、DNA 近傍での液化有無を光吸収の変化 $\Delta \kappa$ の検出から試みる。

4. 研究成果

くさび型金薄膜からなるセンサチップの作製と検出感度向上

くさび型 SPR センサの金属に強磁性金属 Co を加えた複素 SPR センサを作製した(図 1(a))比較のためにくさび型構造のない複素 SPR センサを作製した(図 1(b))。磁化反転に伴う反射率の変化は前者の試料で 6.5 %、後者の試料で 8.5 %となった。試料をガラスプリズムにマウントし、赤色の p 偏光を入射し、エタノールガスの検出実験を行った。前者の試料では反射率の変化よりも反射率の磁気的変調度を用いた方がガスの検出感度が高く、1~2 %のエタノールガスの検出に成功した(図 2)。反射率の磁気的変調度が大きな後者の試料では、検出限界は前者より小さかった。これは後者の試料の性能指数が前者の試料よりも小さいためであることによる。なお、この実験では DNA を固定化せずに行った。

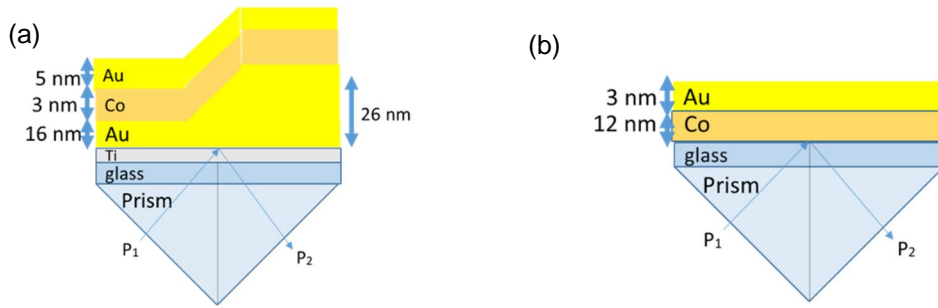


図 1. SPR センサの金属に強磁性金属 Co を加えた複素 SPR センサの模式図。(a) Au 5 nm / Co 3 nm / Au 16 nm からなるくさび型構造。(b) Au 3nm / Co 12 nm からなる参照試料。

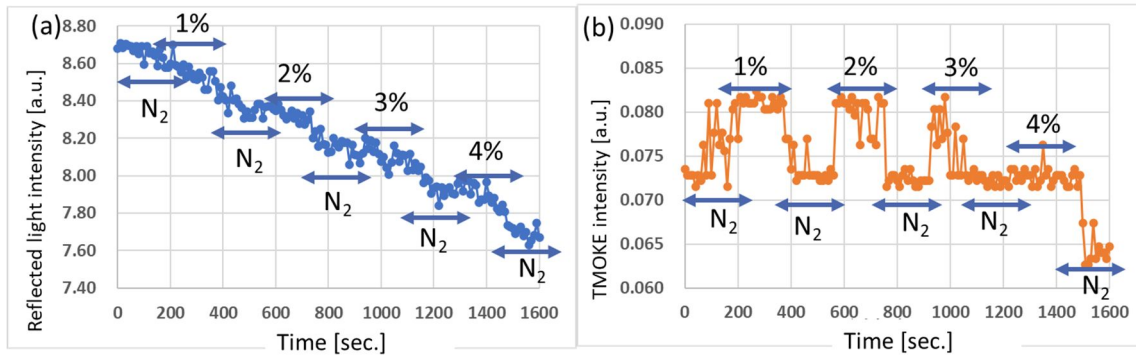


図 2. くさび型 SPR センサ(図 1 (a))によるエタノールの検出特性の評価結果。

くさび型金薄膜からなるセンサチップの作製と検出感度向上

複素 SPR センサを実現するために、強磁性金属を導入する代わりに、金薄膜をくさび型形状にしたくさび型金薄膜からなるセンサチップ(図 3)を作製し、エタノールガスの検出特性を評価した。図 4 に示す通り、DNA を固定化することなく、少なくとも濃度 0.2 %のエタノールガス(屈折率変化 2×10^{-5})を判別可能であることを明らかにした。

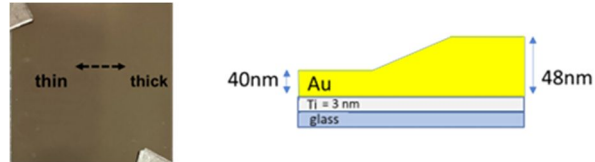


図 3. くさび型金薄膜から複素 SPR センサ。左: センサチップの写真。右: 薄膜の断面の模式図

くさび型金薄膜と集光レンズ、CMOS カメラの組合せによる複素 SPR センサの構築と DNA 修飾によるエタノール・サリチル酸メチルの検出

くさび型金薄膜からなる SPR センサチップを作製し、波長 633 nm の赤色発光ダイオードの光から光を入射し、反射光輝度の角度依存性の経時変化を集光レンズと 5 メガピクセルのカメラの組み合わせからなる測定系により評価すべくガスセンサを構築した(図 5)。集光レンズとカメラを組み合わせることで、センサを回転させることなく、反射光強度の入射角度依存性を測定することができる。構築した系の角度分解能は 1 ピクセルあたり 0.0047 度となり、 8.2×10^{-5} の屈折率分解能を達成した。様々な種類・濃度をもつガスを入力した時の反射光強度の時間推移を 10 秒おきに測定した。得られた一連の画像から信号を最大化する入射角度と金の膜厚を求める手順を確立した。反射光強度と反射率が最小となる入射角度を同時に測定可能な系を構築し、金表面の屈折率と吸収係数の変化の両方を測定可能とした。様々な種類・濃度のガスを入力した時の反射光強度の時間推移を 10 秒おきに測定した。

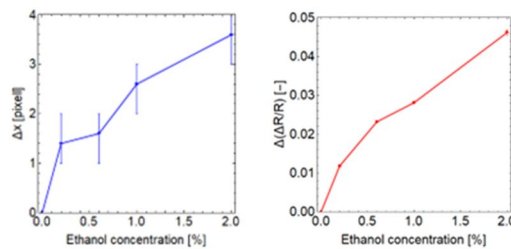


図 4. くさび型金薄膜から複素 SPR センサによるエタノールの検出特性の評価。左: 反射率が最小となる確度の変化に着目した場合。右: 反射率の変調度に着目した場合

ガスとして親水性をもつエタノールと、疎水性を示し湿布の消炎剤として用いられる匂い分子の一種であるサリチル酸メチルを用いた。微量ガス発生装置によって発生した濃度 4, 12, 27, 90 ppm のエタノールガス、濃度 7, 158 ppb のサリチル酸メチルを導入したところ、ガスの導入

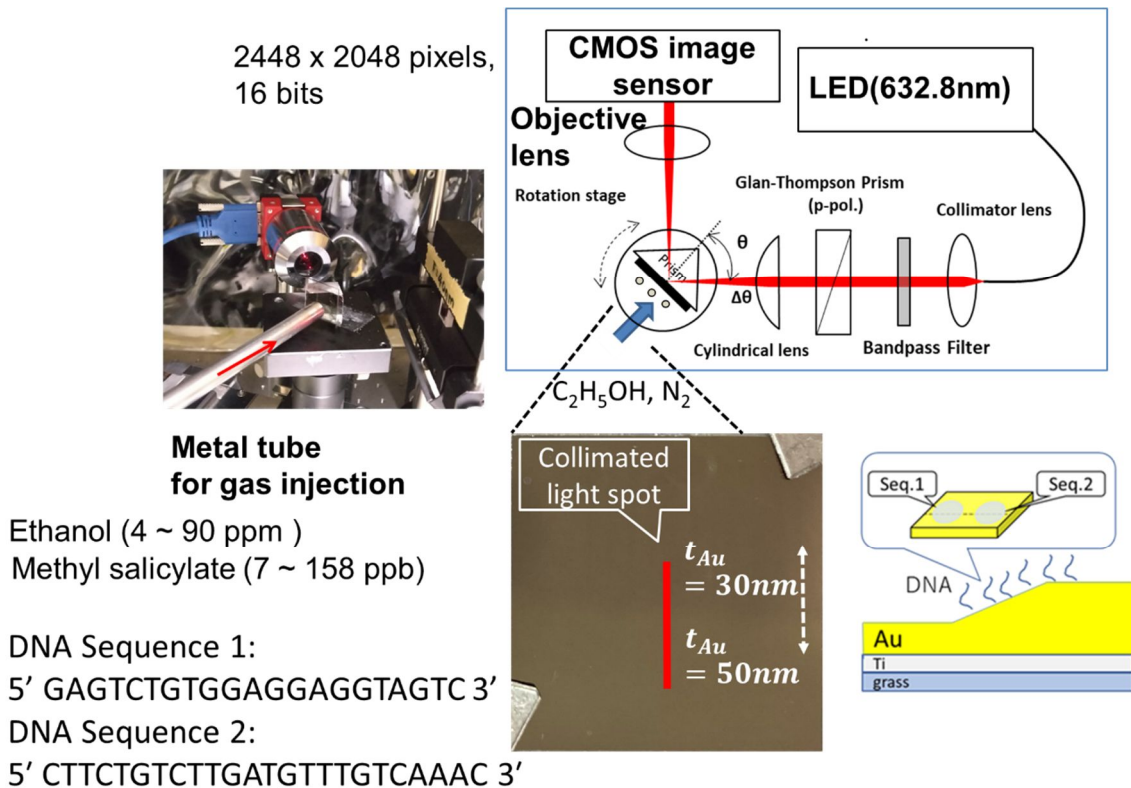


図 5. くさび型金薄膜と DNA 修飾、赤色 LED 光、集光レンズ、カメラからなる複素 SPR センサによるガス検出特性の評価の様子。

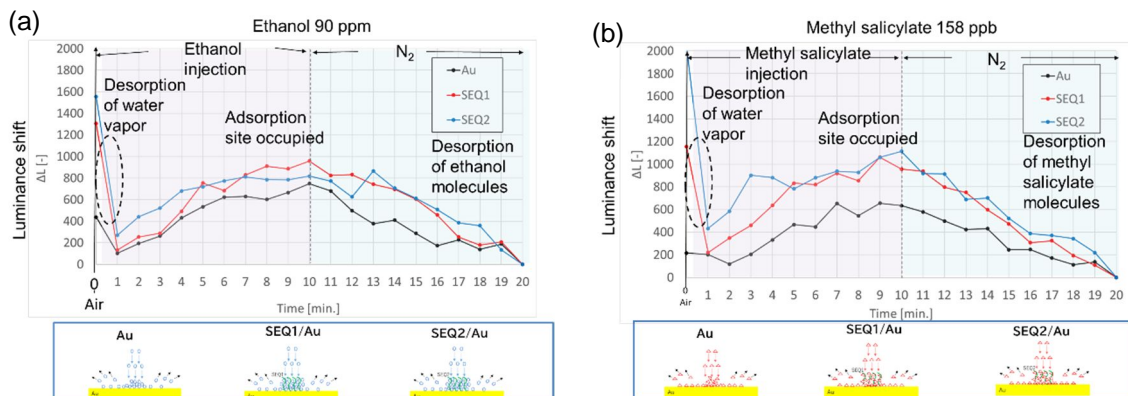


図 6. 図 5 の測定系に(a)90 ppm のエタノールガス、(b) 158 ppb のサリチル酸メチルガスを供給した時に観測された信号変化の評価結果。

初期にはもともと金属表面に吸着していた水蒸気の脱離が見られ、その後、ガス分子が吸着する様子を観測した。また、ガスを窒素に切り替えた時に、吸着したエタノールやサリチル酸メチルが脱離する様子が見られたため、上記の濃度を準リアルタイム検出することに成功した(図 6)。上記の濃度の範囲では信号変化が濃度によらずほぼ一定であったため、表面の吸着サイトは埋まっており、また、より低い濃度のガスを検出できると考えられる。

DNA 修飾による増感特性

DNA として SEQ1, SEQ2 と呼ばれる配列をもつ DNA を固定化したところ、ガス供給前に吸着していた水蒸気の量やガスの導入に伴う信号変化が大きくなった(図 6)ことから、DNA 修飾により感度を大きくすることができた。図 7 に濃度を 4, 12, 27, 90 ppm と変化したエタノール、および、濃度を 158, 7 ppb と変化したサリチル酸メチルを入力した時の信号変化を示す。少なくとも 4 ppm のエタノール、および、7 ppb のサリチル酸メチルを検出することができた。一方でエタノールとサリチル酸メチルとで信号変化の波形に大きな変化が見られなかったため、選択的検出には至らなかった。

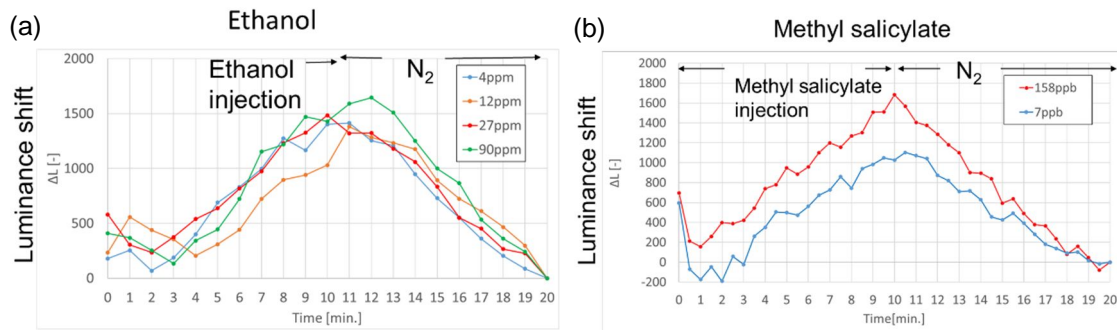


図 7. 自己組織化単分子膜 SAM と DNA を固定化した試料にエタノールとサリチル酸メチルを供給した時の信号の評価結果。

以上の研究成果は 3 件の論文誌に掲載され、国際会議にて招待講演として 2 件発表した他、国際会議において 2 件、国内学会において 9 件発表した。

今後、サリチル酸メチルを認識する DNA の固定化やグラフェン転写との組み合わせ、青紫色発光ダイオードを光源とした光学系を組み合わせることで生物の嗅覚(濃度 0.1 ~ 1 ppb) に迫る高感度検出の実現が見込まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiromasa Shimizu, Takahiro Ogura, Takumi Maeda, and Shogo Suzuki	4. 巻 3
2. 論文標題 A Wedge-Shaped Au Thin Film: Integrating Multiple Surface Plasmon Resonance Sensors in a Single Chip and Enhancing the Figure of Merit	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 724528-1, 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnano.2021.724528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shogo Suzuki, Takumi Maeda, Takahiro Ogura, Shoma Suzuki, Terunori Kaihara and Hiromasa SHIMIZU	4. 巻 58
2. 論文標題 Modulation of surface plasmon resonance by magnetization reversal in Au / Fe / Au trilayer and wedge structure for achieving higher refractive index sensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JAPANESE JOURNAL OF APPLIED PHYSICS	6. 最初と最後の頁 SBB106-1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/abea4b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rizal Conrad, Shimizu Hiromasa, Mej?a-Salazar Jorge Ricardo	4. 巻 8
2. 論文標題 Magneto-Optics Effects: New Trends and Future Prospects for Technological Developments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Magnetochemistry	6. 最初と最後の頁 94 ~ 94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/magnetochemistry8090094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hiromasa Shimizu
2. 発表標題 A Wedge-Shape Au Thin Film for Integrating Multiple Surface Plasmon Resonance Sensors in a Single Chip
3. 学会等名 International Conference on Advanced Plasmonics, Magnetism, & Magneto-Optical Technologies (ICAPMOT 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiromasa Shimizu, Shogo Suzuki, Takumi Maeda, Kohei Ito, and Kazunori Ikebukuro
2. 発表標題 50 times enhancement of the ethanol detection signal in a solid-state DNA decorated wedge-shape surface plasmon resonance sensor
3. 学会等名 BIOSENSORS 2021 - Online 31st Anniversary World Congress on Biosensors (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahiro Ogura, Takumi Maeda, Shogo Suzuki and Hiromasa Shimizu
2. 発表標題 Enhancing the Figure of Merit in Surface Plasmon Resonance Sensors with a Wedge-Shape Au Thin Film
3. 学会等名 The 26th MICROOPTICS CONFERENCE (MOC2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠原 諒平, 扇野 瞭虎, 清水 大雅
2. 発表標題 波長1300 nm帯における金薄膜における表面プラズモン共鳴の入射角と波長依存性の評価
3. 学会等名 2022年春季 第69回 応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田 恭史, 星 隼人, 伊藤 広平, 池袋 一典, 清水 大雅
2. 発表標題 シリコンスロット光導波路によるエタノールガス濃度の評価とDNA修飾による増感特性
3. 学会等名 2020年秋季 第81回応用物理学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田拓海, 伊藤広平, 池袋一典, 清水大雅
2. 発表標題 表面プラズモン共鳴センサに固定したDNAのエタノール吸着特性の推定
3. 学会等名 2020年秋季 第81回応用物理学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shogo SUZUKI, Takumi MAEADA, Shoma SUZUKI, Terunori KAIHARA, and Hiromasa SHIMIZU
2. 発表標題 Modulation of Surface Plasmon Resonance by Magnetization Reversal in Au/Fe/Au Trilayer and Wedge Structure toward Higher Refractive Index Sensitivity
3. 学会等名 The 2020 International conference on Solid State Devices and Materials (SSDM 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木翔馬, 小倉嵩寛, 前田拓海, 清水大雅
2. 発表標題 Coを用いたくさび形表面プラズモン共鳴センサの作製と反射率の磁気的変調の評価
3. 学会等名 2021年春季 第68回 応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉 嵩寛, 前田 拓海, 鈴木 翔馬, 清水 大雅
2. 発表標題 Feを用いたくさび型表面プラズモン共鳴センサの作製と反射率の磁気的変調の評価
3. 学会等名 2021年春季 第68回 応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiromasa Shimizu
2. 発表標題 Detection of Ethanol Gas and Study of Signal to Noise Ratio in a Au/Co/Au MOSPR Sensor
3. 学会等名 International Conference on Advanced Plasmonics, Magnetics, & Magneto-Optical Technologies (ICAPMOT 2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 扇野瞭虎, 清水大雅
2. 発表標題 Au/Co/Au表面プラズモン共鳴の磁気的変調度を最適化する構造の検討
3. 学会等名 2022年秋季 第83回応用物理学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口 諒, 小倉 嵩寛, 田中 淳大, 池袋 一典, 清水 大雅
2. 発表標題 表面プラズモン共鳴センサの信号の最大化とエタノールガスの試験的検出
3. 学会等名 2022年秋季 第83回応用物理学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中淳大, 小倉嵩寛, 川口諒, 清水大雅
2. 発表標題 くさび型表面プラズモン共鳴センサと PEI 塗布によるサリチル酸メチルの検出
3. 学会等名 2022年秋季 第83回応用物理学会学術講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hiromasa Shimizu	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 15
3. 書名 Physical Sensors: Optical Sensors	

〔産業財産権〕

〔その他〕

論文発表・学会発表リスト https://kenkyu-web.tuat.ac.jp/profile/ja.ebaef2bd1e89b64be82d24335419d576.html#%E7%A0%94%E7%A9%B6%E6%A5%AD%E7%B8%BE_%E8%AB%96%E6%96%87

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------