

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22656039

研究課題名（和文） 光学素子表面に設けたナノ構造による生化学物質の高感度・選択検出

研究課題名（英文） Sensitive and selective biochemical sensing with nan-structured surface on an optical element

研究代表者

諸貫 信行 (Moronuki Nobuyuki)

首都大学東京・システムデザイン学部・教授

研究者番号：90166463

研究成果の概要（和文）：

抗原抗体反応を利用して生化学物質の高度な検出・分析が可能となっているものの、蛍光顕微鏡や分光機器を始めとする高度な機器が必要であり、その簡便化が求められている。そこで、集光を行う光学素子表面に微粒子を自己整列させ、ここに蛍光処理タンパク質を高密度に固定化することで蛍光強度の向上を図るとともに、その光学機能を利用して集光や分光を行うことで簡素かつ6倍の蛍光輝度向上を実現し、高効率な検出の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

High sensitive matter detection is possible by applying antigen-antibody reaction, one of the biochemical sensing methods. However, fluorescence microscope and/or other analysis equipment are required and the system tends to be complicated. This study aims to simplify such system by combining fluorescent intensity improvement by nano-/microstructuring produced with self-assembly of fine particles on an optical lens and its condensation effect. It was found that the fluorescent intensity was improved up to 6 times compared to a planer substrate without fine structure. However, the improvement is limited by the scattering effect of the fine structure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学，生産工学・加工学

キーワード：微粒子，自己整列，光学素子，蛍光，検出感度，抗原抗体

## 1. 研究開始当初の背景

抗原抗体反応を利用したイムノアッセイ法では生化学物質の分子レベルでの高感度測定が可能となり、MEMS技術と組合せることでその高速化も図られている。しかし、蛍光顕微鏡を用いるなど複雑・大規模なシステムが必要となることが多く、医療現場などでの利用は必ずしも進んでいない。

申請者らは微粒子の自己整列を適用した

ナノ構造の簡易製作法を検討してきており、これまでに整列微粒子をマスクとしてピッチ 300 nm の構造による無反射面を製作やディスプレイを用いて大面積にわたる自己整列を進め、研磨工具への適用可能性などを検討してきた。

一方で、ドイツ・ブレーメン大学等では光学素子の精密機械加工について研究が進められ、光学部品の金型製作から樹脂への転写

まで一貫したプロセス確立が検討され、光学素子の製作コストを大きく下げることが期待されている。

これらの光学素子と前記ナノ構造を組合せてタンパク質を固定化し、安価なカメラと組合せたシステムで生化学物質の高感度検出が期待できる。さらに、生化学物質付着に伴う素子光学特性の変化を想定すると、蛍光を用いずに物質を特定できる可能性もある。

## 2. 研究の目的

上記背景に鑑み、本研究では光学素子表面に設けたナノ構造による生化学物質の高感度・選択的な検出システムの構築を最終目的とし、下記について研究を進める。

- (1) 光学素子表面への微小構造製作技術確立
- (2) ナノ構造へのタンパク質の固定化と生化学物質検出の検証

具体的には、まず図1に示すように微粒子を分散させた懸濁液に光学素子を浸した後、一定速度で引き上げることで微粒子の自己整列構造を製作する。整列の原理は乾燥時に微粒子間に働くメニスカス力であり、理想的には単層の最密構造を得ることができる。

微粒子構造を設けることで表面積が増すことになり、ここに抗原あるいは抗体を有するタンパク質を修飾することで周辺に到達した物質の検出が可能となる。タンパク質に蛍光処理を施しておくことで、抗原抗体反応を蛍光で検出できるようになる。

ここで、整列すべき基板を凸レンズにすることで、後の集光が可能となると考えられるものの(図2)、これまで三次元構造への微粒子整列と蛍光の集光は確認されていない。

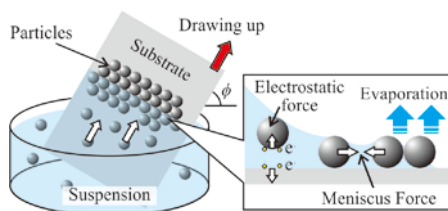


図1 微粒子の自己整列方法

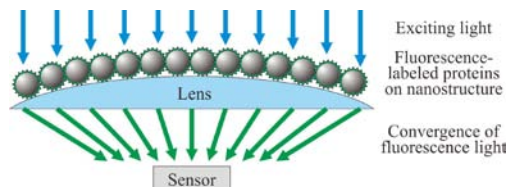


図2 凸レンズ上に整列した微粒子へのタンパク質修飾と蛍光発光の収束イメージ

## 3. 研究の方法

### (1) 微粒子整列とタンパク質修飾

シリカ微粒子を水に分散させた懸濁液に凸レンズ(直径20mm)を浸した後、ゆっくりと引き上げることで微粒子構造を製作した。次いで、ウシ血清アルブミン(BSA)で表面を修飾した。予め蛍光処理を施してあり、励起光を照射して蛍光を調べることで抗原抗体反応を利用した物質検出を模擬できるようにした。蛍光検出のための光学系を含む各条件をまとめて表1に示す。

表1 実験条件

Optics [nm]	Excitation wavelength	494
	Fluorescence light	519
Angle $\theta$	0-50 deg.	
Distance $d$	40-140 mm	
Lens	Convex (focal length 100mm), BK7	
Suspension	Particles	SiO <sub>2</sub> , $\phi$ 1 mm
	Solvent	Phosphate buffer
Protein for modification	Bovine serum albumin	

### (2) 光学機能の評価

凸レンズ上に整列したタンパク質修飾微粒子が発する蛍光の空間的な強度分布を調べるために図3に示すような装置を製作した。白色光源から発した光から励起光成分のみをフィルタリングして試料に照射し、蛍光波長だけを透過するようにした光学系の背後に光センサを設置し、強度を調べた。検出器とレンズの間の距離と角度はそれぞれ表1に示すような範囲で調整でき、蛍光の空間分布を調べることができるようになっている。

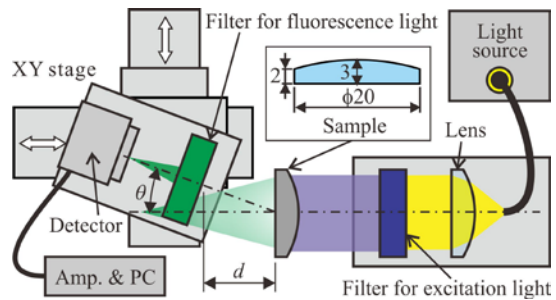


図3 蛍光の空間分布評価装置と方法

## 4. 研究成果

### (1) 整列結果の評価

図4に懸濁液からの引き上げ速度と微粒子被覆率の関係を示す。ここで、被覆率とは基板上に占める微粒子面積の割合であり、単層整列の場合、微粒子間に隙間が残ってしまうため90%が上限となり、これを上回る数値は多層整列を意味する。平面基板の場合、引き上げ速度の増加に伴って被覆率は下がる傾向にあるのに対し、三次元構造上への整列では最適とみられる引き上げ速度があることが分かった。図中にはSEM観察写真も示し

であり、被覆率が低い状況では微粒子整列がまだら模様になっていることがわかる。

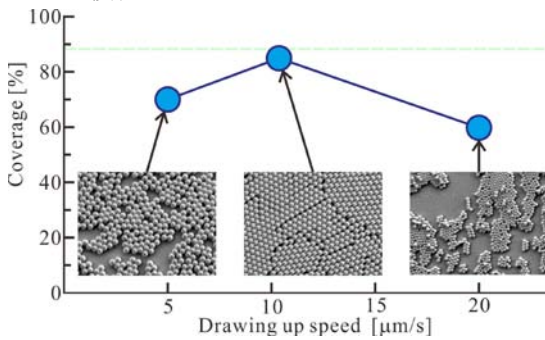


図4 引き上げ速度と被覆率の関係

(2) 光学機能評価

蛍光の輝度向上と光学的収束機能の評価するため、微粒子なしの平面基板(板ガラス)、微粒子を整列した平面基板、および凸レンズ上に微粒子を整列させた試料にそれぞれタンパク質修飾を施し、同一位置で測定した蛍光強度を比較した結果を図5に示す。

縦軸は光センサで検出した強度を示し、任意単位で相対的な比較しかできないものの、微粒子構造付与によって平面基板の4倍程度、さらに凸レンズの集光機能により6倍程度まで輝度が向上することが分かった。微粒子構造による表面積増加は、幾何学的関係から平面の4.6倍になることから、その分だけ蛍光強度が増したと考えられる。

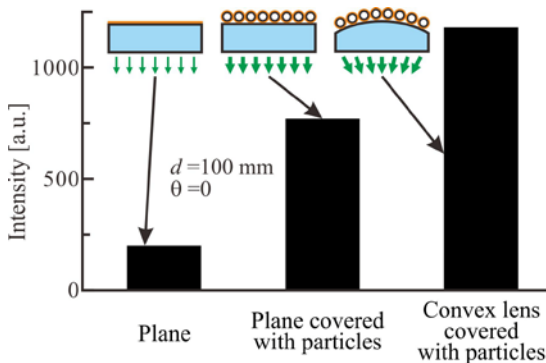


図5 微粒子構造とレンズ効果の検証結果

図6は単層整列構造の場合の蛍光の空間分布を図3の方法で測定した結果を示したものであり、レンズから距離が離れた場合にも強度が上昇し、焦点距離100mm付近で最大となることがわかる。この結果より、光学的な収束が行われたことが確認できたが、角度が大きい場合にも強い蛍光が観察されたことがわかる。

図7には、多層整列の微粒子構造を用いた場合の結果を示す。蛍光強度自体は強いものの焦点付近で強度が上がらず、距離の増加に伴って単調減少する傾向がみられた。

また、角度0度で最大強度が得られると考えられるものの、10度の位置で最大の強度が得られた。これらの結果より、多層構造では散乱してしまう蛍光成分が強く、レンズの集光機能がほとんど働かなかったと考えられる。

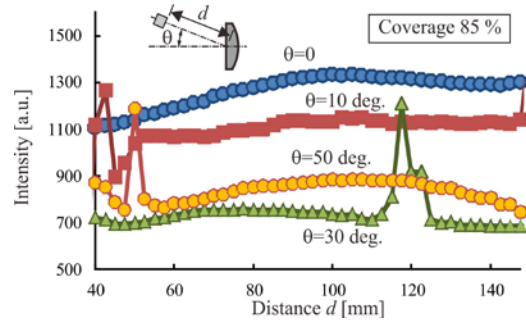


図6 蛍光強度の空間分布測定例(1)

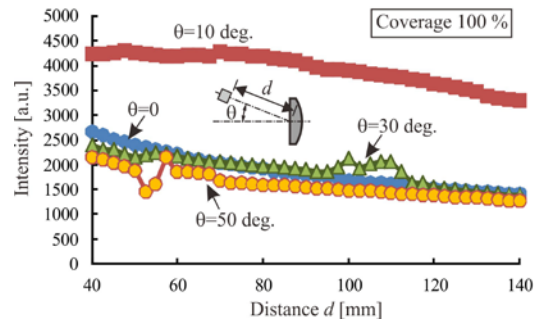


図7 蛍光強度の空間分布測定例(2)

図8には別試料の結果を示す。この例では角度は固定のまま距離を変えた実験を行った。やはり、レンズ近傍での散乱に起因する蛍光強度が強く、距離が遠ざかるにしたがって強度は下がるが、焦点近傍で強度が再び上昇する。レンズによる集光以外の複雑な現象が背景にあると考えられる。

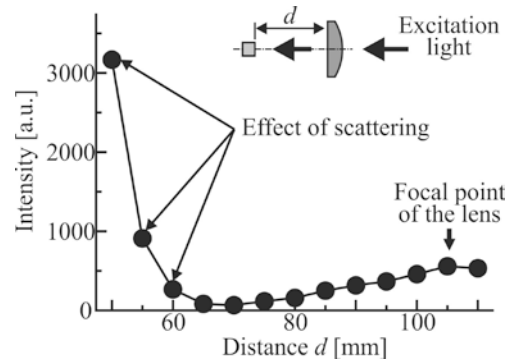


図8 蛍光強度の空間分布測定例(2)

図9はこれらの結果に対する考察を示す。SEM観察結果からわかるとおり微粒子は球形をしており、周辺に固定化されたタン

パク質が発する傾向はあらゆる方位に放射され、レンズに入射する割合は一部に限られることになる。割合は少ないものの光軸に平行な成分は光学レンズの機能を活かして焦点付近に収束したと考えられる。図6において $\theta=50$ 度程度の角度でも比較的強い強度が現れたのは、光軸からそれぞれレンズに入射した成分が焦点距離近傍ではあるものの光軸から外れた位置に結像したと考えられる。

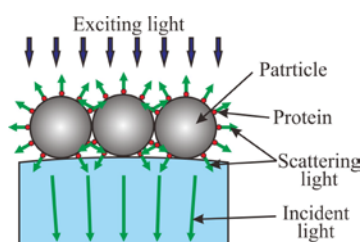


図9 微粒子から発せられる蛍光

図10には光軸に沿った蛍光成分が焦点に収束する様子とともに、散乱成分がレンズ近傍に拡散していく様子を示す。このような複数の現象が重なった結果が図6および7のようなものであると考えられる。

更なる高度化のためには、液晶パネルに用いられる輝度向上フィルムを用いて蛍光の放射方向を制限するなどの方法が考えられる。

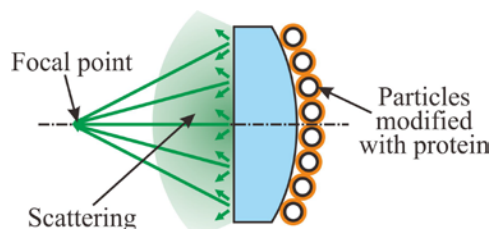


図10 微粒子から発せられる蛍光の収束

### (3) まとめ

微粒子構造による蛍光強度の増大と光学レンズによる集光機能の確認という当初の計画どおりの成果を出すことができ、平面構造の6倍程度の輝度向上を果たすことができた。しかし、微細構造に起因する散乱に対する対策をとることはできなかった。また、当初計画では表面微細構造による分光分析機能も検討する予定であったが、これについては今後の課題として残された。

### 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2件)

N. Moronuki, M. Nishio, Y. Tanaka,

Micro-/Nano-structuring based on self-assembly of particles to improve surface functionality in biomedical applications, *Procedia Engineering*, 査読有, 19, 2011, pp. 276-281

M. Nishio, N. Moronuki, and A. Kaneko, Instability Phenomenon in Dip-Coating Process for Self-Assembly of Fine Particles and Design Countermeasures, *Int. J. of Automation Technology*, 査読有, Vol.5, No.5, 2011, pp.688- 693.

[学会発表] (計9件)

西尾 学, 諸貫 信行, 田中 靖紘, 金子 新, 光学素子表面に整列させた機能性微粒子による生化学分析の高感度化 (第2報), 精密工学会春季大会, 2012.3.16, 東京.

樗 徳人, 諸貫 信行, 自己整列微粒子マスクを用いたエッチングによる微細構造の表面積評価, 日本機械学会関東支部第18期総会講演会, 2012.3.10, 東京.

Y. Tanaka, N. Keyaki, N. Moronuki and A. Kaneko, Increase in the area of structured surface and its effect on sensitivity improvement of biochemical sensing, *ASPEN2011*, 2011.9.16, Hong Kong.

M. Nishio, N. Moronuki, Y. Tanaka, A. Kaneko, Self-Assembly of functional particles on optical element for sensitivity improvement of biochemical sensor, *ASPEN2011*, 2011.9.16, Hong Kong.

田中 靖紘, 諸貫 信行, 樗 徳人, 自己整列微粒子マスクを用いた微細エッチング加工特性, 砥粒加工学会演論会, 2011.9.8, 名古屋.

Manabu Nishio, N. Moronuki, A. Kaneko, and Y. Tanaka, Self-assembly of fine particles with dip-coating of colloidal suspension - Effect of zeta potential on the process -, *Proc. The 6th International Conference on MicroManufacturing*, 2011.3.9, Tokyo.

N. Moronuki, M. Nishio, and A. Kaneko, Instability Phenomenon in Dip-coating Process for Self-assembly of Fine Particles and Countermeasures with Design, *Proc. 14th International Conference on Mechatronics Technology*, 2010.11.25, Osaka.

樺 徳人, 諸貫 信行, 田中 靖紘, 西尾 学,  
金子 新, 表面の微細構造化によるイムノア  
ッセイの高感度化, 精密工学会春季大会,  
2011.3.14, 東京.

西尾 学, 諸貫 信行, 田中 靖紘, 金子 新,  
光学素子表面に整列させた機能性微粒子に  
よる生化学分析の高感度化, 精密工学会春季  
大会, 2011.3.14, 東京.

[図書] (計1件)

諸貫 信行編著, 微細構造から考える表面機  
能, 森北出版, 2011, 199頁.

[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]

ホームページ等

<http://www.comp.tmu.ac.jp/prost/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

諸貫 信行 (Moronuki Nobuyuki)

首都大学東京・システムデザイン学部・  
教授

研究者番号: 90166463

### (2) 研究分担者

金子 新 (Kaneko Arata)

首都大学東京・システムデザイン学部・  
准教授

研究者番号: 30347273

### (2) 研究分担者

田中 靖紘 (Tanaka Yasuhiro)

首都大学東京・システムデザイン学部・  
特任助教

研究者番号: 80568113