

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18973

研究課題名（和文）非同期ピコ秒超音波法を用いた高感度・リアルタイムバイオセンサの確立

研究課題名（英文）Development of highly sensitive real-time monitoring biosensors using asynchronous optical sampling picosecond ultrasonics

研究代表者

長久保 白（Nagakubo, Akira）

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：70751113

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）：本研究では非同期ピコ秒超音波法とナノ自立薄膜を組み合わせることにより、GHz-THz帯の超音波を用いた高感度・無標識・リアルタイムバイオセンサを開発した。熱・音響モデルを構築し、振動子の最適化とレーザ加熱による温度上昇の影響を定量的に見積もり振動子の最適化を行った。作製した振動子を用い、抗原抗体反応のモデルとしてプロテインAと免疫グロブリンGの吸着反応を非同期ピコ秒超音波法を用いてモニタリングした。10、100 ng/mlの濃度の免疫グロブリンG溶液をフローまたは滴下しながら共振周波数の変化をモニタリングし、吸着前後で最大約1% (=10,000 ppm)の検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオセンサの発展はまだ探求が続いている。本研究ではその重要な一角を占める質量検出型バイオセンサの可能性について研究した。ナノ振動子を用いることで感度はさらに向上する可能性が高く、さらに非同期ピコ秒超音波法を組み合わせることによりリアルタイムで10-100 GHz帯の共振スペクトルを数秒ごとにモニタリングし続けることができる本手法は非常に重要である。またレーザ光を数ミクロンまで集光した計測法であるためハイスループット化も可能であり、そのためには今後ますますの計測時間の短縮化、SN比の向上、振動子の高周波化など、発展の余地が尽きない。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a highly sensitive, label-free, real-time biosensor using GHz-THz ultrasound by combining an asynchronous picosecond ultrasound method with a nanoscale free-standing thin film. Thermal and acoustic models were constructed to optimize the oscillator and to quantitatively estimate the effect of temperature rise due to laser heating. The oscillator was used to monitor the adsorption reaction of protein A and immunoglobulin G using asynchronous picosecond ultrasound as a model of antigen-antibody reaction, monitoring the change in resonance frequency during the flow or drop of immunoglobulin G solutions at concentrations of 10 and 100 ng/ml, and observing a decrease in resonance frequency of about 1% (=10,000 ppm) at most was successfully detected.

研究分野：音響物理学

キーワード：ピコ秒超音波法 非同期計測 バイオセンサ リアルタイムモニタリング 超音波

1. 研究開始当初の背景

医学の発展に伴い人類の寿命は延びていき、健康寿命といういかにいつまで健康であり続けられるかという概念が重要視されるようになってきた。そのためには膨大な数の健康な人を対象とした病気の早期発見・診断が非常に重要な技術の1つである。また昨今の COVID-19 の蔓延に代表されるように、新たな病気に対して有効なワクチン・新薬の迅速な開発も人類にとって非常に重要なテーマである。これらのために欠かせないのがハイスループットかつ高感度で検査時間が短いバイオセンサの開発である。

バイオセンサとは生体組織が有する高い分子識別能力を利用したセンサであり、病気の発症や炎症に伴う特定のタンパク質の検出に用いられている。バイオセンサではタンパク質の吸着に伴う物理的・化学的な変化を光学的、電気的、機械的な量に変換し、タンパク質濃度を定量化する。その代表例として広く使用されているのが **ELISA** と呼ばれる酵素免疫吸着測定法 (**Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay**) である。この手法では抗原または抗体といった標的物質の検出反応の後、その検査物質と特異的に結合する酵素を蛍光物質で標識化して更に反応させてから蛍光量を評価する。これによって高感度で低濃度のタンパク質まで簡便に検出することができる^[1]が、蛍光物質で標識化する必要があり洗浄やインキュベーションといった手順と検査時間が必要となる。また標的物質の吸着過程をリアルタイムで観測することができないため吸着・反応速度、つまり親和性を評価することができず、新薬の開発においてネックとなる。そこでリアルタイムに吸着反応をモニタリングすることができる代表的な手法が表面プラズモン共鳴法 (**Surface Plasmon Resonance**)^[2]である。溶液中において金属薄膜表面にタンパク質が吸着すると金属/タンパク質/溶液の屈折率がわずかに変化する。この変化を界面における電磁波の共鳴モード、つまりプラズモン共鳴の共鳴条件の変化から検出するのが **SPR** センサである。この手法では無標識で吸着反応をリアルタイム観察することができるが、一般的な感度は高くない。また非常に高価な専用の装置が必要であり、反応場の表面数 100 nm の領域における反応しかとらえることができないためダイナミクスレンジの限界や適応対象の制約がある。そのため無標識・リアルタイムで高感度かつ汎用性が高いバイオセンサの開発は現代でも必要とされている。

2. 研究の目的

そこで我々が着目したのが独自に開発を続けてきた質量検出型のバイオセンサである。これは QCM と呼ばれる水晶振動子マイクロバランス法 (Quartz Crystal Microbalance) に代表されるように、振動子表面における分子の吸着反応によって振動子の質量の増加・共振周波数の低下から標的物質を検出するセンサである。このセンサは無標識で幅広い標的物質の吸着反応をリアルタイム観察することができるが、感度が低いことが大きな問題であった。この感度を向上させるために我々は薄型水晶を無線・無電極で共振させる手法¹⁵⁾を開発してきた。さらに感度を向上させるために我々は厚さ 10-100 nm オーダの薄膜を振動子として用い、フェムト秒パルスレーザで共振させる手法¹⁶⁾も開発した。しかしこのフェムト秒パルスレーザを用いた手法では 1 回の共振周波数の計測に 1-10 分ほど時間がかかるため、リアルタイム観測を実現するためには計測時間を短縮化することが必要だった。そこで今回、我々は非同期ピコ秒超音波法とナノ微細加工技術を組み合わせることにより、GHz-THz 帯の超音波を用いた高感度・無標識・リアルタイムバイオセンサを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

まず最初に振動子の最適化を目指し、熱・音響解析とそれに応じた試料作製を行った。レーザ光を用いて自立多層膜の共振を励起する場合、励起後の共振モードの応力分布とポンプ光の強度分布が一致している方がより効率的に励起することができる。また検出に関してもひずみ分布に応じた屈折率変化がプローブ光の反射強度を決定する。そこで膜厚方向を z 、正規化したひずみ分布を $\varepsilon(z)$ 、ポンプ光とプローブ光の電場分布をそれぞれ $E_{pu}(z)$ 、 $E_{pr}(z)$ とし、効率関数 Ψ を次式で定義した。

$$\Psi = \int \varepsilon(z) |E_{pu}(z)|^2 dz \int \varepsilon(z) |E_{pr}(z)|^2 dz$$

この計算結果をもとに、厚さ 100 nm の自立 SiN 上に Au を 25、40、55、80 nm 成膜した試料を作製し、その共振をピコ秒超音波法によって計測し、振動子を評価した。

そのようにして作製した振動子を用いて免疫グロブリン G (IgG) の検出実験を行った。まず、ピラニア溶液を用いて基板を洗浄する。硫酸と過酸化水素水を体積比 3:1 で混合しピラニア溶液を作製し、膜表面に付着した有機残渣を除去後、超純水を用いて基板を十分に洗浄する。続けて大気で 1 分間プラズマ洗浄したのち自己組織化単分子膜 (Self-assembled monolayer: SAM) の形成を行う。10-カルボキシ-1-デカンチオールを無水エタノールで溶解させ濃度 10 mM の溶液を作製し、振動子をその溶液に 4 °C で 12 時間浸漬させることで厚さ数 nm 程度の SAM を Au 表面に形成させる。無水エタノールおよび超純水で 3 回ずつ十分に洗い流し、超純水に溶解させた 100 mM の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドと N-ヒドロキシスクシンイミド混合溶液中に室温で 1 時間浸漬することで SAM 末端を活性化させる。その後超純水、リン酸緩衝溶液 (Phosphate buffered saline: PBS) でそれぞれ 3 回ずつ十分に洗い流し、PBS に溶解させた 200 μ g/ml のプロテイン A 溶液に室温で 2 時間浸漬させる。PBS で 3 回十分に洗い流したのち、未反応の SAM 末端のブロッキングのために PBS に溶解させた 10 mg/ml の牛血清アルブミン (Bovine serum albumin : BSA) に室温で 1 時間浸漬させる。同様に PBS で 3 回洗浄後、所望の濃度の IgG 溶液、バッファ、グリシン-塩酸緩衝溶液 (Glycine-HCl buffer solution: GHB, pH 2.2) を浸漬またはフローすることで計測を行う。

4. 研究成果

多層膜共振周波数の 1 次モードと 2 次モードの効率関数 Ψ を計算した結果を図 1 に示す。両面成膜した振動子ではタンパク質固定下面の Au は 10 nm と固定し、レーザ照射面の Au の膜厚に対する励起関数の変化を求めた。Au を片面に成膜する振動子の場合では、SiN 100 nm の場合は Au を 55 nm、SiN 200 nm の場合は Au を 87 nm 成膜することで励起検出効率を最大にできることがわかった。両面成膜の振動子では、SiN 100 nm、200 nm の振動子のいずれもレーザ照射面には Au を 10 nm 成膜することで励起検出効率を最大にできることがわかった。

この計算に基づき、いくつかの膜厚で作製した振動子の共振波形を図 2 に示す。図 2 に示すように、80 nm の Au を成膜した場合でも、SiN の厚さが 200 nm の振動子の方が信号対雑音比が高く、Q 値も高い。また厚さ 100 nm の SiN 自立膜上に Au の厚さを変更して作製した振動子では Au の厚さが 55 nm の時が最も信号対雑音比も Q 値も高く、理論と整合性のとれた結果となり理想的な振動子を作製することに成功した。

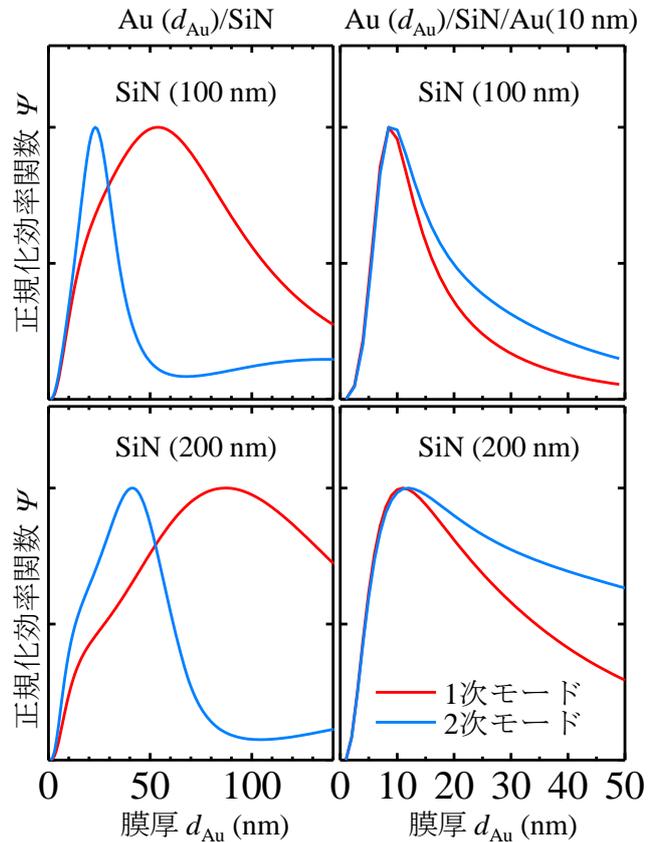


図 1 SiN 自立膜上に Au を成膜した場合の励起・検出効率関数の Au 膜厚依存性

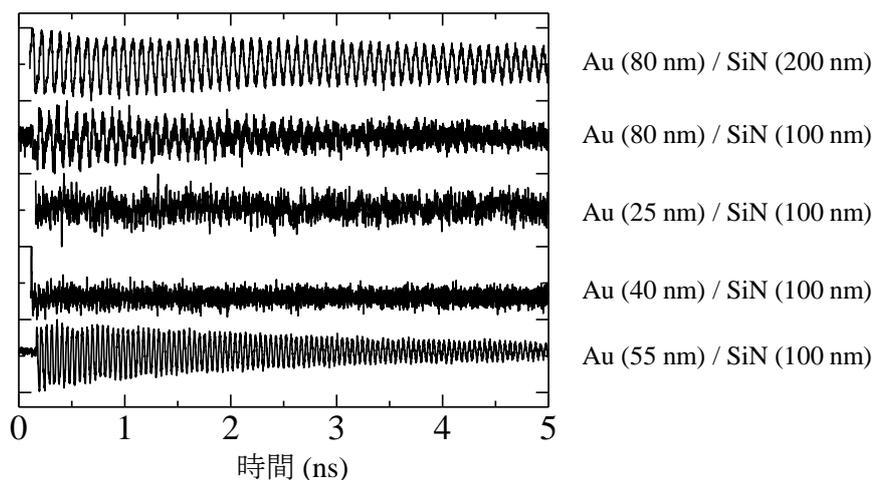


図 2 膜厚が異なる振動子の共振波形

また熱の影響も輸送行列理論を用いて計算した。レーザ光を照射した際の Au 表面における温度上昇と Au 底面での温度上昇の時間応答を見積もった結果を図 3 に示す。このモデルに従うと励起直後は表面で瞬間的な温度上昇が発生するが、熱伝導の過程で Au 裏面に熱が伝わるころには約 3 度程度の温度上昇となる。従って室温で実験を行う本バイオセンサの場合ではこの程度

の温度上昇は問題にならないと考えられる。

最後にこの振動子を用いて IgG の検出実験を行った。濃度 100 ng/ml の IgG を滴下した際の周波数、振幅、Q 値の変化を図 4 左に示す。このように本計測システムを用いることによって 20 GHz 帯の共振周波数を連続モニタリングすることに成功した。また IgG 滴下後から共振周波数、振幅、Q 値いずれも低下する様子がわかる。これは IgG 吸着に伴い質量が増加した様子を反映している。

IgG の濃度を変えて滴下前後の共振周波数の変化量をまとめたグラフを図 4 右に示す。従来の同期計測では共振信号を約 2 ns 間しか取得することができないため正確に共振周波数を決定することができない。一方、保険球で確立した非同期計測法を用いると 12.5 ns 間の信号を取得することができるため、共振周波数の決定精度が上がり、周波数変化を正確に評価することができる。共振周波数の変化率は IgG の濃度上昇とともに大きくなる傾向をとらえることに成功した。また 100 ng/ml の IgG 溶液を滴下した場合でも、プロテイン A を固定化していない振動子では共振周波数が低下しなかった。このことから IgG とプロテイン A の特異結合を評価することに成功したといえる。

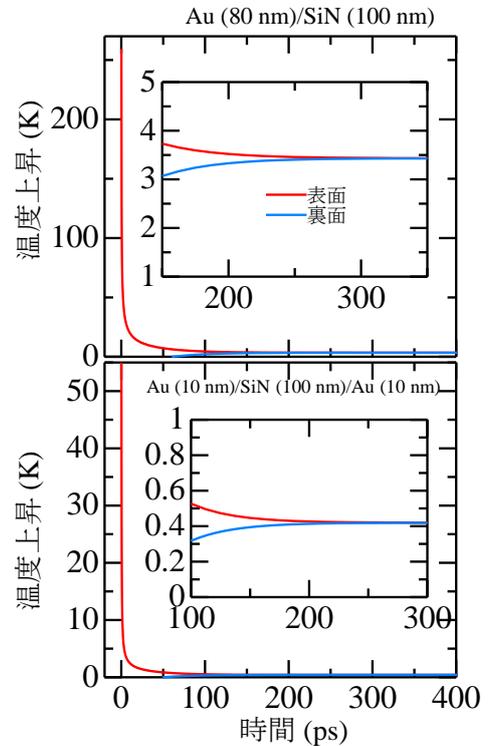


図 3 パルスレーザー照射後の温度変化

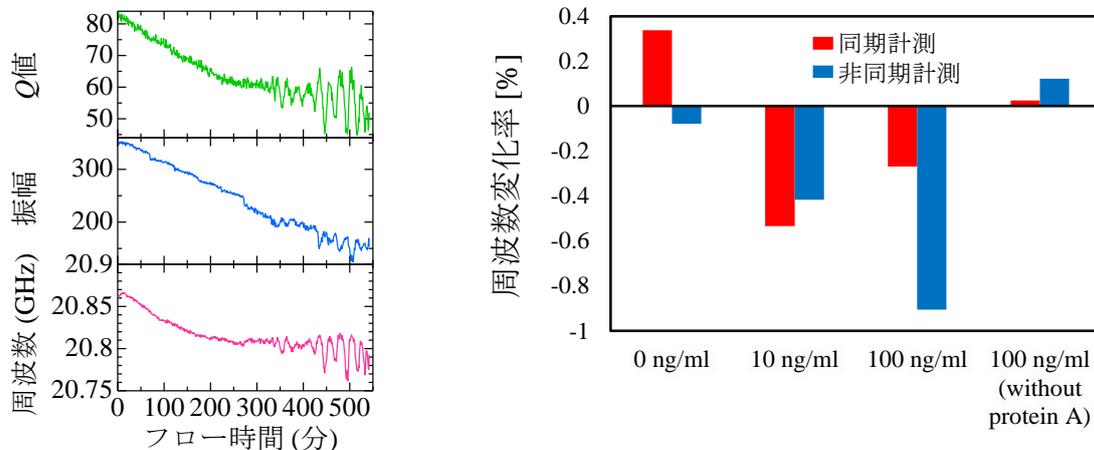


図 4 (左)IgG100 ng/ml 溶液滴下後の共振特性の変化。(右)異なる濃度の IgG 滴下前後の共振周波数変化パルスレーザー照射後の温度変化

<参考文献>

- [1] X. Wu, M. K. K. Oo, K. Reddy, Q. Chen, Y. Sun, and X. Fan, *Sci. Rep.* **5**, 3779 (2014).
- [2] L. C. Su, R. C. Chen, Y. C. Li, Y. F. Chang, Y. J. Lee, C. C. Lee, and C. Chou, *Anal. Chem.* **82**, 3714 (2010).
- [3] H. Ogi, K. Motohisa, K. Hatanaka, T. Ohmori, M. Hirao, and M. Nishiyama, *Biosens. Bioelectron.* **22**, 3238 (2007).
- [4] K. Noi, A. Iwata, F. Kato, and H. Ogi, *Anal. Chem.* **91**, 9398 (2019).
- [5] L. Zhou, F. Kato, M. Iijima, T. Nonaka, S. Kuroda, and H. Ogi, *Anal. Chem.* **95**, 5507 (2023).
- [6] H. Ogi, T. Kawamoto, N. Nakamura, M. Hirao, and M. Nishiyama, *Biosens. Bioelectron.* **26**, 1273 (2010).
- [7] H. Ogi, T. Kawamoto, Y. Nakamichi, and M. Hirao, *Jpn. J. Appl. Phys.* **51**, 07GA08 (2012).
- [8] H. Ogi, S. Iwagami, A. Nagakubo, T. Taniguchi, and T. Ono, *Sensor Actuat. B: Chem.* **278**, 15 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuan Wenlou, Nagakubo Akira, Wright Oliver B., Ogi Hirotosugu	4. 巻 62
2. 論文標題 High sensitivity biosensing scheme based on a GHz phononic crystal waveguide	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SJ1012 ~ SJ1012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/acb2d6	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 Yuan Wenlou, Nagakubo Akira, Wright Oliver B., Ogi Hirotosugu	4. 巻 63
2. 論文標題 GHz surface-wave phononic crystal biosensor using a Fano resonance at the bandgap edge	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 017006 ~ 017006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ad193a	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 Kohei Sugaya, Akira Nagakubo, and Hirotosugu Ogi	4. 巻 1
2. 論文標題 Development of a real-time GHz resonant biosensor using asynchronous picosecond ultrasonics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of The 44th Symposium on Ultrasonic Electronics	6. 最初と最後の頁 1P2-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 A. Nagakubo, A. Tange, and H. Ogi
2. 発表標題 GHz phonon biosensor using free-standing SiN nanofilm with real-time monitoring by asynchronous optical sampling picosecond ultrasonics
3. 学会等名 The 2022 IEEE International Ultrasonics Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohei Sugaya, Akira Nagakubo, and Hirotsugu Ogi
2. 発表標題 Development of a real-time GHz resonant biosensor using asynchronous picosecond ultrasonics
3. 学会等名 The 44th Symposium on Ultrasonic Electronics (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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