

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23350118

研究課題名(和文)アトリットル空間における局所増幅電場の発現と超高感度スクリーニングチップへの応用

研究課題名(英文) Enhancement of local electric field in the atto-liter space and its application for ultra sensitive screening tips

研究代表者

福田 隆史 (Fukuda, Takashi)

独立行政法人産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・主任研究員

研究者番号：50357894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、制御されたアトリットル空間(一辺がサブ波長以下の立体空間)を高分子膜上に構築し、プラズモン共鳴場を局在化させることによって超高感度なバイオセンシングを実現することを目指し、微粒子を鋳型とする構造形成や構造複製などの要素技術の確立や夾雑物含有系における高感度センシング性能の実証などの成果を得た。また、手のひらサイズの超小型ポータブル光計測器と無線操作端末からなるプロトタイプ検査システムの作製など当初計画には無かった発展課題にも取り組み、製品化イメージを明確化できた。本研究の成果は、非標識・簡便・高感度なバイオスクリーニング検査やポイントオブケア検査の実現に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, it have aimed to fabricate a controlled atto-liter space whose dimension below a sub-wavelength and to confine a plasmon resonance field into the space in order to achieve ultrahigh-sensitive biosensing. Then, we obtained a unique structure fabrication method templating polystyrene spherical particles and an appropriate condition for structure replication via nanoimprinting process, and also proved that the local surface plasmon chip exhibits ultra-high sensitivity even for the sample containing a certain contaminant. Moreover, we have developed a prototype testing system consists of palm top optical measurement apparatus and remote operation terminal that was not included in the original plan of this project, and succeeded to clarify a practical image of the real application. The outcome of the research will lead to the realization of bio-screening testing and point-of-care testing with a feature of label-free, simple, and ultra-high sensitivity.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学、高分子・繊維材料

キーワード：バイオセンサー 局在プラズモン 電場増幅効果 スクリーニングチップ

1. 研究開始当初の背景

超高感度バイオセンシングのデバイスや原理に関する研究は近年国内外を問わず活発であり、当該研究分野の必要性・重要性は議論を待たない。局在プラズモンを検出原理とするバイオセンサーについてもプラズモニクス物理の進展も相まって、現在ではいかなる材料/プロセスを用いて所望の構造を構築し機能性を検証するか? というフェーズに至っていると考えられる。もちろんその際、デバイスコストにも強い関心が向けられている。

そのような背景の中、申請者らは、光応答性高分子材料の薄膜に水を垂らし、その状態で青色LED光を照射すると、直径300nm前後のドーム状構造を構築できること(光誘起自己構造形成現象)を世界ではじめて発見し、そのバイオセンサー機能について企業との共同研究(H20-H21年度)において検討を進めて来た。

例えば、フィブリノーゲンに対しては検出下限濃度が10pg/mLと言う超高感度(当時の公表情報の中ではトップクラスの性能)が実証されており、非標識の超高感度検出技術の確立に向け知見とスキルの蓄積が着実に進んでいる[特許出願済]。

得られたサブ波長構造(ドーム状構造)の超高感度なバイオセンシング特性は、当該構造に起因して発生する高い局所電場増幅効果(マーカーが修飾されている基板底部では30倍程度に達することがFDTDシミュレーションによって予測されている)に由来している。しかし、FDTDのシミュレーション結果を詳細に見ると、ドーム開口部では60倍以上に増強された局所場も見られる(Figure 1)。

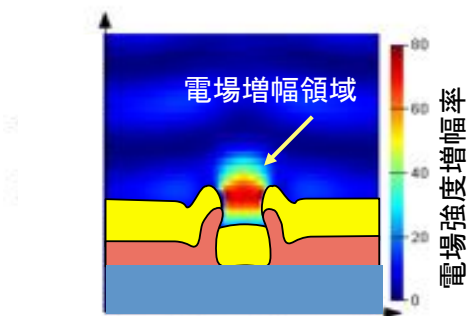


Figure 1 光誘起自己構造形成現象で得られるドーム状構造における局所電場増幅効果のFDTDシミュレーション結果

このことは、構造の更なる精密制御を施せば一層の感度向上が得られる可能性を期待させるものであると言える。

そこで、我々はさらなる構造探索と機能検証を進めることによってイムノクロマト検査キットと同程度の簡便性とELISA(酵素結合免疫吸着法)に匹敵する程度の高い検出感度を両立する局在プラズモンセンサーの開発を目指すこととした。

2. 研究の目的

本研究では、制御されたアトリットル空間(一辺がサブ波長以下の立体空間)を高分子膜中に構築し、プラズモン共鳴場を閉じ込めることで局所増幅電場を発生させ、極めて安価、かつ、非標識検出が可能な超高感度な局在プラズモンセンサーの開発を行うことを目的とした。また、作製したチップを種々の抗体でその表面を機能化し、インフルエンザウイルスや各種成人病関連タンパク質の超高感度なバイオセンシング性能を実証することを目的とした。さらに、簡便なスクリーニングチップとしての実用化を念頭にして小型システムの構築、デモンストレーションを行うことも追加的な開発課題に設定した。

3. 研究の方法

制御されたアトリットル空間の創製にはマイクロコンタクトプリンティング、及び、自己組織化・散逸過程などのソフトプロセス技術の適用を検討し、それぞれ作製したチップについて高感度なバイオセンシング性能を検証し、作製容易性・コスト・センシング性能のバランスが取れる方法を選択することとした。また、実用化に向けた基盤技術の確立という観点から、作製したサブ波長構造のレプリカ形成技術(転写材料・条件など)についても検討を進めることとした。

作製したチップのバイオセンシング性能検証に関しては、インフルエンザウイルスの検出実験を実施し、その最低検出濃度を指標とした。また、非特異吸着の抑制効果をもたらすと想定される表面修飾剤の効果について検討を行い、好適な表面修飾剤の探索を進めた。さらに、実用化に向けた検討の観点から、界面活性剤や粘度調整剤などの添加物を含むバッファを用いて、センシング応答に対する影響を検証した。

開発したチップを簡易スクリーニング用途にて実用化することを念頭に、デモンストレーションを行うためのポータブルシステムの構築にも取り組んだ。

4. 研究成果

アトリットル空間の創製手段としてマイクロコンタクトプリンティング、自己組織化・散逸過程などのソフトプロセスも検討したが、前者は構造の高アスペクト化、後者は構造サイズの微小化の点で目標仕様を達成することが難しいことが判明した。種々の方法を鋭意検討した結果、ポリスチレン微粒子を鋳型とする方法にて見通しを得たため、当該方法にて目標仕様の達成を図ることとした。作製条件の最適化に取り組んだ結果、高い面密度にて開口部に凸構造を持つサブ波長構造(外殻付孔構造)を得ることに成功し、所望のアトリットル空間の創成に成功した。

(Figure 1、2)。

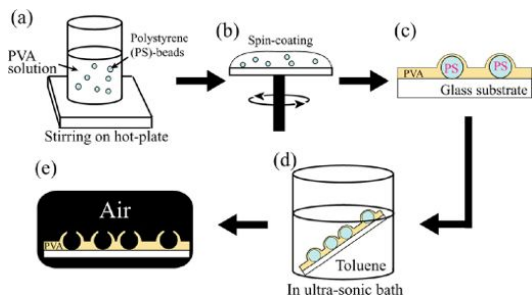


Figure 1 ポリスチレン微粒子を鋳型とする外殻付孔構造の作製手順（概念図）

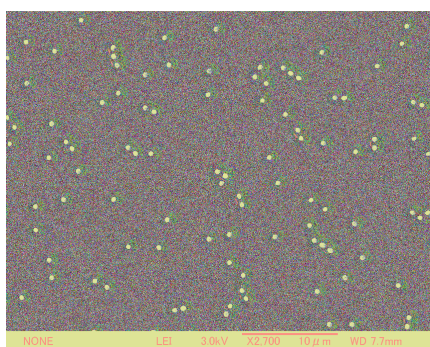


Figure 2 作製した外殻付孔構造の電子顕微鏡（SEM）観察像

さらに、当該構造が溶液中の分子や分散液中の微粒子を捕集する効果を示すことも見出した (Figure 3、4、5)。この成果は国内学会発表 2 件、国際誌論文 1 報、1 冊の書籍にて公表した。

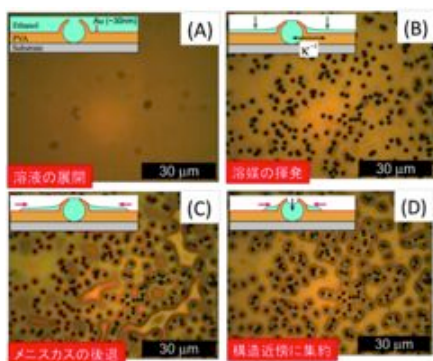


Figure 3 外殻付孔構造に溶媒が集約される過程の顕微鏡観察写真

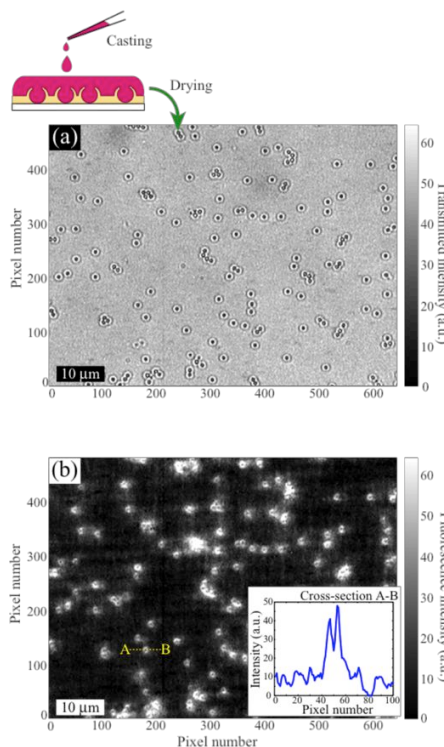


Figure 4 外殻付孔構造に溶質（蛍光分子）が濃縮された結果を確認するための蛍光顕微鏡観察像

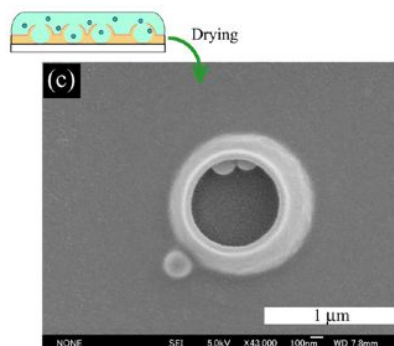


Figure 5 外殻付孔構造に微粒子が捕捉された結果（電子顕微鏡（SEM）観察像）

また、量産化を念頭に置き、サブ波長スケールの構造を複製するための転写材料、および、プロセス条件の予備的検討も行った。

ネガ型モールドはオリジナルのサブ波長構造を熱硬化性シリコン樹脂 (PDMS) にて型取りをする方法で作製した。PDMS としては硬化過程において副生成物が発生しない付加反応性材料を用いて硬化収縮を押し返るとともに、初期粘度が比較的低いものを使用し、ナノサイズの構造の転写に十分な形状追従性を有するよう材料選択を行った。

PDMS を鋳型とする構造複製では、アクリル系紫外線硬化型樹脂とエポキシ系紫外線硬化型樹脂の 2 系統 4 種の材料を用いて検討を行った。転写物の構造については原子間力

顕微鏡にて観察し、いずれも良好な転写が達成できることを確認した。また、繰り返し転写によるモールドの劣化についても検討を行い、少なくとも 10 回は良好な転写が可能であることを確認した。

しかし、チップ化に際して問題となる金 (gold) との接着性については、エポキシ系紫外線硬化型樹脂の 1 種を除き、剥離の問題が顕著であることが分かった。したがって、複製素材としてはエポキシ系紫外線硬化型樹脂が有望との結論に至った。

チップのバイオセンシング性能の検証はインフルエンザ A 型 (H1N1) のウイルス核タンパク認識抗体を物理吸着させたチップを用いて検討した。

チップの表面修飾は、以下の手順によった：1) 金 (Gold) で被覆されたチップ表面をイソプロピルアルコール、および、リン酸バッファにて洗浄。2) インフルエンザ A 型ウイルス核タンパク認識抗体にて表面修飾。3) 非特異吸着の防止を図る目的で、ウシ血清由来アルブミンを表面に追加吸着。4) リン酸バッファでチップをリンスし、乾燥。なお、抗原には不活性化されたインフルエンザ A 型ウイルス (H1N1) を用いた。

その結果、少なくとも 1.5ng/mL 程度の性能 (検出下限濃度) を有することを確認した。この感度は市販のイムノクロマト検査キットの数十倍であり、目標としていた「非標識で超高感度な局在プラズモンセンサー」として機能することを確認した。

さらに、夾雑物の有無がチップのセンシング応答に与える影響も検討した。ここで、夾雑物無しサンプルはリン酸バッファ溶液にて不活性化ウイルスを希釈したものとし、夾雑物有り相当のサンプルは市販のイムノクロマトキット付属のバッファ溶液にて希釈したものとした (当該バッファには界面活性剤や粘度調整剤他が添加されていると推定)。

その結果、夾雑物の有無に依らず定量的なセンシングが達成出来ることが確認された。

開発したチップの実用化に際しては、まず最初のターゲットを簡易スクリーニング用途に見定めることが適当であると考え、場所を問わず簡単に迅速な検査を行うための計測器を開発した (Figure 5)。これにより、実用化のシステムイメージを明確に示すことができた (2つの展示会でデモンストレーションを実施)。同成果は 2 件の解説記事、2 冊の書籍、1 件の招待講演でも成果発信した。



Figure 5 開発したポータブル超小型計測システム (上図中の左が計測器、上図中の右が制御機器：スマートフォンなどのデバイス、下図は計測器に挿入するチップ)

以上のように、当初計画した研究課題は全て順調にクリアされ、目標も全て達成することができた。実用性の高い超高感度センシングチップの創出 (製造基盤技術の確立と機能検証)、ならびに、プロトタイプシステムによるデモンストレーションに成功した事は、今後、病院でのポイントオブケアテストング・在宅診断・開発途上国での現地医療への展開に向けて大きな意味を持つと考えている。今後、さらに企業との協業を進め、実用化に向けて研究開発を推進して行きたい。

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 6 件)

Fabrication and optical properties of binary colloidal crystal monolayers consisting of micro- and nano-polystyrene spheres、江本 顕雄、内田 江美、福田 隆史、COLLOIDS AND SURFACES A-PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS、Vol. 396、pp. 189～194、2012/02

Tailored assembly of colloidal particles: alternative fabrication of photonic crystal or photonic glass、江本 顕雄、福田 隆史、APPLIED PHYSICS LETTERS、Vol. 100、pp. 131901-1～131901-4、2012/03

Dichroic reflection in specular direction of Au-coated anisotropic hemispherical structure arrays based on monolayer of subwavelength-scale polystyrene spheres、江本 顕雄、野口 尚美、福田 隆史、COLLOIDS AND SURFACES A-PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS、429、pp. 106～111、2013/04

Fabrication of submicron pores with an outer shell using modified poly(vinyl alcohol) and the molecular or particle collection effect, 江本 顕雄、野口 尚美、小林 知子、福田 隆史、LANGMUIR、Vol. 29、pp. 12601~12607、2013/09

非標識・高感度検出が可能な局在プラズモンチップとスマホ対応超小型ポータブル光計測器の開発、福田 隆史、江本 顕雄、0 plus E、Vol. 35、pp. 1215~1220、2013/10

スマートデバイスで無線操作できる超小型バイオセンシングシステムの開発、福田 隆史、江本 顕雄、瀬崎 文康、日刊工業新聞社工業材料、vol. 61、pp. 39~42、2013/11

[学会発表] (計 8件)

ポリスチレン微小球を用いた単層バイナリコロイド結晶の作製と光学的特性、江本 顕雄、内田 江美、福田 隆史、2011年秋季 第72回 応用物理学会学術講演会、山形大学、2011/08/30

材料の構造制御による高感度センシング、藤巻 真、福田 隆史、阿澄 玲子、第1回電子光技術シンポジウム、産総研臨海副都心センター、2012/02/22

水溶性ポリマーを用いたサブミクロン孔構造の作製と応用の検討、江本 顕雄、福田 隆史、第60回応用物理学会春季学術講演会、神奈川工科大学、2013/03/27

使い捨てバイオチップとスマートデバイスで操作する超小型計測装置の開発、福田 隆史、江本 顕雄、野口 尚美、阿澄 玲子、第2回電子光技術シンポジウム、産総研臨海副都心センター、2013/03/05

コロイド微粒子によるフォトニック結晶層とアモルファス層が隣接した構造の作製、江本 顕雄、福田 隆史、Optics & Photonics Japan 2012、タワーホール船堀、2012/10/23

水溶性ポリマーを用いた外殻付孔構造の作製と分子/微粒子捕集効果、江本 顕雄、福田 隆史、第74回応用物理学会秋季学術講演会、同志社大学、2013/09/17

コロイド微粒子とレプリカ作製法を利用した異方的反射二色性媒体の作製、江本 顕雄、福田 隆史、Optics & Photonics Japan 2013、奈良県新公会堂、2013/11/14

水溶性ポリマーを用いた外殻付孔構造の高密度形成に関する検討、江本 顕雄、福田 隆史、第61回応用物理学会春季学術講演会、青山学院大学相模原キャンパス学院大学相模原キャンパス、2014/03/20

[図書] (計 3件)

パーソナル・ヘルスケア -ユビキタス、ウェアラブル医療実現に向けたエレクトロニクス研究最前線-、第2編 モニタリングデバイス・システム研究の最前線、第6章ウイルス・ストレス計測、第2節 スマートデバイスでの操作が可能なポータブル計測器と局在プラズモンチップの開発、福田 隆史、江本 顕雄、瀬崎 文康、(株) エヌ・ディー・エス、2013/10/23

ヘルスケア×エレクトロニクス最前線、第2節 超小型バイオセンシングシステムのスマートデバイスによる無線操作技術の開発、福田 隆史、江本 顕雄、瀬崎 文康、(株) 情報機構、2014/06 発刊予定

Polystyrene: Synthesis, Characteristics and Applications、Ch.5 Functional Structures Fabricated from Submicron-scale Polystyrene Spherical Particles、江本 顕雄、福田 隆史、Nova Science Publishers, Inc.、2014/07 発刊予定

[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

(産総研プレス発表) スマートデバイスで操作できる超小型バイオセンシングシステム
http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2013/pr20130117/pr20130117.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 隆史 (FUKUDA, Takashi)

(独) 産業技術総合研究所・電子光技術研究部門・主任研究員

研究者番号：50357894

(2) 研究分担者

石田 尚之 (ISHIDA, Naoyuki)
岡山大学・自然科学研究科・准教授
研究者番号：80344133

(3) 研究分担者

安部 浩司 (ABE, Koji)
(独) 産業技術総合研究所・フレキシブルエ
レクトロニクス研究センター・主任研究員
研究者番号：80356378

(4) 研究分担者

牛島 洋史 (USHIJIMA, Hirobumi)
(独) 産業技術総合研究所・フレキシブルエ
レクトロニクス研究センター・チーム長
研究者番号：80356568

(5) 研究分担者

福田 伸子 (FUKUDA, Nobuko)
(独) 産業技術総合研究所・フレキシブルエ
レクトロニクス研究センター・主任研究員
研究者番号：90360635

(6) 連携研究者

江本 顕雄 (EMOTO, Akira)
(独) 産業技術総合研究所・電子光技術研究
部門・産総研特別研究員
研究者番号：80509662