

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23685016

研究課題名(和文)光ピックアップ型バイオセンシング技術の創成

研究課題名(英文)Development of biosensing technologies in an optical pickup style

研究代表者

吉川 裕之(Yoshikawa, Hiroyuki)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00314378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,200,000円、(間接経費) 5,160,000円

研究成果の概要(和文)：集光レーザーを利用した独自の光ピックアップ型バイオセンシング技術の開発に取り組み、特性や有用性を評価した。集光レーザーによるアニリン系分子の酸化重合反応によって酵素反応量に応じたナノ構造体が形成され、レーザーの後方散乱光強度が変化することを示し、この原理を用いて100 pM - 1 mMの範囲でグルコースが定量検出できることを実証した。さらに、銀ナノ粒子分散液にターゲット分子を混合し、光捕捉により基板上の任意の位置に固定化した凝集体からの表面増強ラマン散乱を測定し、1 μM から10 nMの濃度範囲でアデニン分子を定量検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：An innovative biosensing technique working by simply focusing a single laser beam and detecting its reflection intensity in a manner similar to the optical pickup unit has been studied. Polyphenylenediamine nanostructures were deposited by a focused visible laser beam on a glass- o-phenylenediamine solution interface. Growth of the polymer nanostructure was monitored by a backscattered light intensity. Because the growth speed depends on light absorption by the oxidized o-PD, the backreflection oscillation curve can be used to monitor the peroxidase enzyme reaction in the solution. A reliable optical quantification of glucose can be performed in a short time. SERS based on molecular detections by using optical trapping of silver nanoparticles were also studied. Aggregates of silver nanoparticles and analyte molecules were produced by optical trapping and fixed on a glass substrate and the SERS spectra were measured by irradiating a visible laser beam on the aggregates.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：バイオセンサー 集光レーザー 酵素 光捕捉 銀ナノ粒子 酸化重合 表面増強ラマン散乱 グルコース

1. 研究開始当初の背景

極微量の血液や唾液などから複数の疾患に関係するタンパク質や遺伝子等を、迅速かつ高感度に検出できるバイオセンサーに関する研究開発が盛んである。多くの人々が自宅や職場で健康状態を定期的にチェックできれば、医療費の増加などの社会問題の解決に直接つながる。しかしバイオセンサーは高機能・高感度になるほど、生体分子間相互作用を電気や光のシグナルに変換するためのマイクロ電極や金属ナノ構造、抗体、酵素、遺伝子など基板上の構造が微細化・複雑化し、大量生産に向かなくなる。加えて、定量的な測定には高価な専用装置が必要であるため、幅広い普及が見込める技術体系ではない。

本研究では既存の技術の延長にない、新しい発想で問題を解決する。それは可視や近赤外のレーザーを集光するだけで検出できるバイオセンシング技術の創成である。センシング部には従来型のようなナノ構造や酵素の固定化等を必要とせず、検出は CD や DVD の記録再生装置として世界中に普及している光ピックアップ装置を使うことができる。

この新技術を実現するキーポイントは、生体分子やその反応を、レーザーの反射光や散乱光に変換する仕組みを開発することである。本研究では集光レーザーが誘起する光反応や光放射圧を利用した独自の仕組みを開発する。集光レーザーを用いた独自の手法により、光ピックアップ型バイオセンシング技術の創成を通じて健康社会の実現に貢献する。

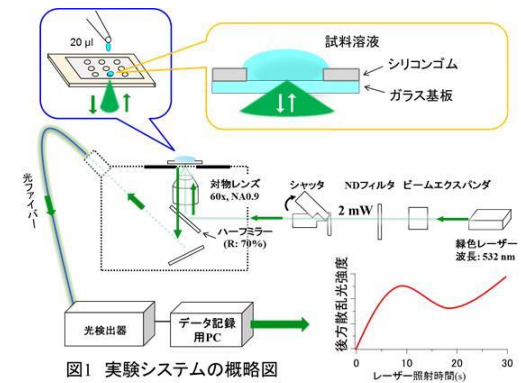
2. 研究の目的

特定の生体関連分子や生体分子間相互作用を、集光レーザーを利用して検出する独自手法の開発に取り組み、感度や精度、測定時間などバイオセンシング技術としての特性や有用性を評価する。レーザーを照射するだけで後方散乱光の強度やスペクトルから生体分子間相互作用を検出する仕組みとして、酵素反応により形状や屈折率が変化する材料や反応系を探索する。また、集光レーザーの光放射圧で銀ナノ粒子と生体分子のナノ複合体を形成させ、表面増強ラマン散乱を測定するため、活性の高い銀ナノ粒子の合成や、捕捉粒子を固定するための基板材料、レーザー強度等を検討する。それぞれのバイオセンシング技術に関係する光化学反応や光捕捉などの光誘起現象のメカニズムを解析し、最適な分子濃度、ナノ粒子の粒径、レーザー強度、波長、照射時間などを決定する。実際に小型の光ピックアップ型バイオセンシングシステムを試作する。試作システムの測定精度、感度、測定時間などを実用性の面から評価する。

3. 研究の方法

3-1. 集光レーザーによるアニリン系分子のナノ凝集体形成を利用して酸化酵素反応を検出する新しい仕組みを考案し、検出時間や感度などの評価、検出原理の解明に取り組ん

だ。可視連続発振レーザー光を光学顕微鏡を用いてサンプル中に集光し、メカニカルシャッター、電動ステージ、データ集録ボードを自作プログラムで制御することによって後方散乱光強度の時間変化をレーザー照射時間の関数として計測するシステムを構築した(図1)。



本システムを用いて、グルコースの検出を以下の方法で行った。グルコース溶液にグルコース酸化酵素を加えて1分後、オルトフェニレンジアミン分子とペルオキシダーゼ酵素を加え、ガラス基板上にその溶液を 20 uL 滴下した。基板と溶液の界面に波長 532nm のレーザーを集光し、後方散乱光強度を計測した。

3-2. 集光レーザーで局所的に銀ナノ構造体を作製し、吸着した対象分子を表面増強ラマン散乱により解析する技術開発に取り組んだ。硝酸銀溶液中に、グルコース等の還元剤を加え、波長 532 nm の可視レーザー光を集光して、集光点での銀イオンの還元反応により銀ナノ構造体を析出させた。レーザー照射エネルギーや還元剤の濃度と、得られた銀ナノ構造体のサイズや形状、プラズモン特性、ラマン散乱強度の関係について調べ、作製条件を最適化した。

また、独自の手法で合成した銀ナノ粒子と測定対象分子との混合溶液に近赤外レーザー光を集光し、光捕捉により集光スポット内部にナノ粒子集合体を作製し、基板上的の任意の位置にアプローチして固定化するシステムを構築した。1 ミクロン程度の銀ナノ粒子集合体をガラスやポリマー基板上的の任意の場所に作製し、吸着した対象分子を表面増強ラマン散乱により解析した。

4. 研究成果

4-1. 後方散乱光強度の時間変化は図2のようになり、強度が極大値を取る時間がグルコース濃度とともに早くなるのが分かる。この時間測定することにより、100 pM - 1 mM の範囲でグルコースが定量検出できることを実証した。数分の測定時間で 20 uL 以下の微量な試料溶液に対する測定が可能であり、従来法に比べ迅速・簡便な測定法であることを示し、Analytical Chemistry 誌に発表し、関連特許を出願した。また、レーザー、対物レ

レンズ等の光学部品、フォトダイオード、制御マイコンを搭載した小型の測定システムを構築した(図3)。電子顕微鏡や原子間力顕微鏡による構造観察や、散乱および吸収スペクトル解析から、レーザー集光スポット内でフェニレンジアミン分子が光化学的に酸化重合反応を起こし、集光スポットと同程度のナノ凝集体が時間とともに成長していくメカニズムを解明した。

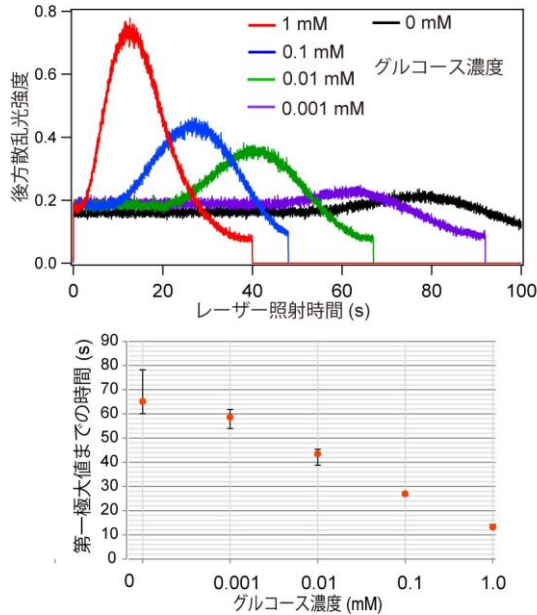


図2 レーザー強度測定に基づくグルコース検出

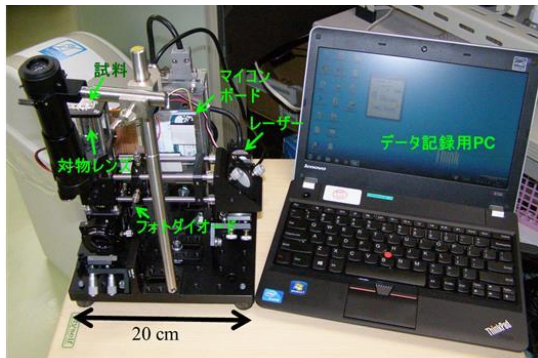


図3 試作した光ピックアップ型バイオセンシングシステム

4-2. 可視レーザーの集光により内部に銀ナノ構造体を組込んだマイクロピペットを作製し、ピペット内部に取り込んだピリジン溶液からの表面増強ラマン散乱スペクトルに成功した(図4)。単一細胞内部の分子情報を解析するためのツールとして利用できると考えられる。

光捕捉用の試料として、数 nm 程度のシーズ粒子分散液に、インジェクション装置を用いて硝酸銀溶液を極微量ずつ加えることにより、界面活性剤を用いずに、高い表面増強ラマン散乱活性を示す銀ナノ粒子を合成することに成功した(図5)。作製した銀ナノ粒子分散液にターゲット分子を混合し、レーザートラップを用いて基板上的の任意の位置

に固定化した凝集体からの表面増強ラマン散乱を測定した。表面増強ラマン散乱スペクトル中のリングブリージングモードのピーク強度を解析することにより、1 μM から 10 nM の濃度範囲でアデニン分子を定量検出することに成功した(図6)。

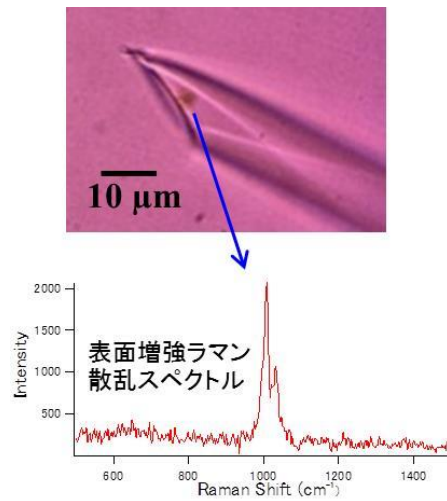


図4 ピペット内部のピリジン溶液からの表面増強ラマン散乱スペクトル

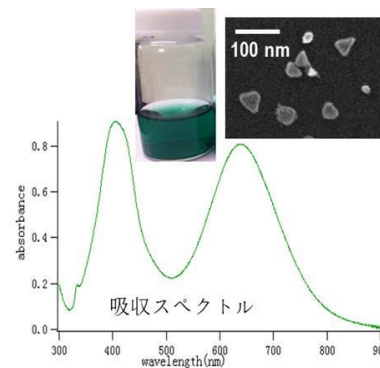


図5 作製した銀ナノ粒子の写真、電子顕微鏡像、吸収スペクトル

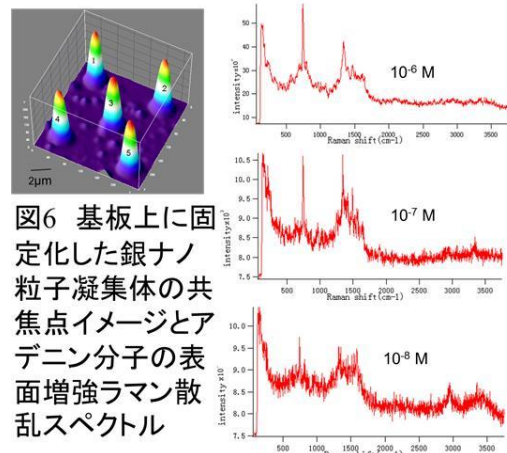


図6 基板上に固定化した銀ナノ粒子凝集体の共焦点イメージとアデニン分子の表面増強ラマン散乱スペクトル

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)

Hiroyuki Yoshikawa, Shuhei Imura, Eiichi Tamiya, "Single-Beam Optical Biosensing Based on Enzyme-Linked Laser Nanopolymerization of o-Phenylenediamine", Analytical Chemistry, Vol. 84, pp. 9811-9817 (2012), DOI:10.1021/ac301951w

[学会発表] (計 29 件)

① 吉川裕之, Bioanalysis Using Nanoplasmonic Structures, The 14th Asian Chemical Congress (招待講演), 2011 年 9 月 7 日, Queen Sirikit Convention Center, Bangkok, タイ

② 広中孝行・吉川裕之・斉藤真人・民谷栄一, レーザー誘起銀ナノ構造形成を利用した生体 SERS 測定用マイクロプローブの開発, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 2011 年 9 月 1 2 日, つくば国際会議場、茨城県

③ 山本 英貴・吉川裕之・民谷 栄一, 斜入射光学系を用いた金ナノ粒子 LSPR バイオセンサーの高感度化, 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, 2011 年 9 月 1 2 日, つくば国際会議場、茨城県

④ 広中孝行・吉川裕之・斉藤真人・民谷栄一, OPTICAL BIOSENSING BY A LASER DEPOSITION OF SILVER NANOPARTICLES, Sixth Photonics Center Symposium "Nanophotonics in Asia 2011", 2011 年 9 月 2 0 日, 志摩観光ホテルクラシック、三重県

⑤ 広中孝行・吉川裕之・斉藤真人・民谷栄一, Plasmonic Silver Nanoparticles Deposited by a Focused Laser Beam for Biosensing, 2012 Taiwan-Japan Nanophotonics and Plasmonic Metamaterials Workshop, 2012 年 1 月 1 1 日, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

⑥ 山本 英貴・吉川裕之・民谷 栄一, Incident Angle Dependence of Reflection Spectrum of Gold Nanoparticle Plasmonic Sensors, International Symposium on NanoPhotonics 2012, 2012 年 2 月 1 3 日, Friendship Hotel, Beijing, China

⑦ 広中孝行・吉川裕之・斉藤真人・民谷栄一, Laser microfabrication of Plasmonic Silver Nanoparticles for Biosensing Applications PITTCON 2012, 2012 年 3 月 1 4 日, Orange County Convention Center Orlando, FL USA

⑧ 吉川裕之・広中孝行・斉藤真人・民谷栄一,

バイオセンシングのためのレーザー誘起銀ナノ構造体形成, 第 59 回応用物理学関係連合講演会, 2012 年 3 月 1 6 日, 早稲田大学、東京都

⑨ 山本英貴, 吉川裕之, 民谷栄一, 斜入射光に対する金ナノ粒子局在プラズモンバイオセンサー基板の反射スペクトル解析, 第 59 回応用物理学関係連合講演会, 2012 年 3 月 1 6 日, 早稲田大学、東京都

⑩ 吉川裕之・内垣 健・広中 孝行・民谷 栄一, 集光レーザーと酵素反応によるポリアニリンナノ構造の形成, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 2 5 日, 慶應義塾大学日吉キャンパス、神奈川県

⑪ 吉川裕之, 集光レーザー場がつくる分子・ナノ粒子集合構造の分光解析とバイオ計測への展開, 第 8 回光科学若手研究会, 2012 年 4 月 21 日, 関西学院大学、兵庫県

⑫ 山本英貴, 吉川裕之, 民谷栄一, 全反射型 LSPR バイオセンサーの開発, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム, 2012 年 9 月 7 日, 北海道大学

⑬ 吉川裕之・井村修平・民谷栄一, 可視レーザー集光ビームによるポリフェニレンジアミンナノ構造体の形成と酵素反応検出, 2012 年光化学討論会, 2012 年 9 月 1 4 日, 東京工業大学、東京都

⑭ S. Jiang, M. Saito, H. Yoshikawa et al., Fabrication of Nano-Pillar Arrays for Plasmonic Biochip by Using Nanoimprint Technology with Porous Alumina Mold, 7th Photonics Center Symposium "Nanophotonics in Asia 2012", 2012 年 9 月 1 8 日, 金沢エクセルホテル東急、石川県

⑮ Hiroyuki Yoshikawa, Sathuluri R Rao, Eiichi Tamiya, Surface enhanced Raman scattering study using gold nanoparticles for non-invasive assay of embryonic stem cell, International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, 2012 年 1 月 2 7 日, 京都市サーチパーク、京都府

⑯ 吉川裕之・井村 修平・民谷 栄一, レーザー重合と酵素反応を利用したシングルビームバイオセンシング, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 2 5 日, 立命館大学、滋賀県

⑰ 尹航, 吉川裕之, 民谷栄一, 銀ナノ粒子の光捕捉を利用した表面増強ラマン散乱分光のバイオセンシング応用, 第 60 回応用物理学会春季学術講演会, 2012 年 3 月 2 9

日, 神奈川工科大学、神奈川県

⑱井村修平, 吉川裕之, 民谷栄一, 集光レーザービームによるナノ光重合を利用した酸化酵素反応の迅速・高感度検出, 第 60 回応用物理学会春季学術講演会, 2012 年 3 月 2 8 日, 神奈川工科大学、神奈川県

⑲吉川 裕之, 山本 英貴, 民谷 栄一, 高感度リアルタイム測定を目指した全反射型 LSPR バイオセンサーの開発, 第 60 回応用物理学会春季学術講演会, 2012 年 3 月 2 9 日, 神奈川工科大学、神奈川県

⑳ Hiroyuki YOSHIKAWA, Shuhei IMURA, Eiichi TAMIYA, Enzymatic Biosensing based on Laser Nanopolymerization of o-Phenylenediamine, International Conference on Photochemistry (ICP2013), 2013 年 7 月 22 日, ルーガアンカトリック大学、ベルギー

㉑ Hiroyuki YOSHIKAWA, Shuhei IMURA, Eiichi TAMIYA, Single-beam optical biosensing using laser nanopolymerization and enzyme reactions, SPIE2013, Optics + Photonics, 2013 年 8 月 25 日, San Diego Convention Center, USA

㉒吉川裕之・井村修平・民谷栄一, 全反射型 LSPR バイオセンサーによるイムノセンシングの特性評価, 第 74 回応用物理学会秋季学術講演会, 2013 年 9 月 17 日, 同志社大学京田辺キャンパス, 京都府

㉓吉川 裕之・井村 修平・尹 航・民谷栄一, 集光レーザー場を利用した新規ナノバイオフォトリクス計測技術の開発, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 2013 年 9 月 29 日, 名古屋大学東山キャンパス、愛知県

㉔石橋 達也・吉川 裕之・池内 智彦・民谷 栄一, 金ナノ粒子固定化基盤表面におけるマウス初代心筋細胞の分光イメージング, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 2013 年 9 月 28 日 名古屋大学東山キャンパス、愛知県

㉕井村 修平・吉川 裕之・民谷 栄一, ペルオキシダーゼ酵素反応により促進されるナノ光重合反応を利用した迅速・高感度バイオセンシング, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 2013 年 9 月 28 日, 名古屋大学東山キャンパス、愛知県

㉖尹航, 吉川裕之, 民谷栄一, 光トラップ銀ナノ粒子を用いた表面増強ラマン散乱分光による局所バイオ分析, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 2013 年 9 月 28 日, 名古屋大学東山キャンパス、愛知県

㉗石橋達也, 吉川裕之, 民谷栄一, SERS 解析用金ナノ粒子固定化基板の作製と生細胞イメージング, 第 61 回応用物理学会春季学術講演会, 2013 年 3 月 19 日, 青山学院大学相模原キャンパス、神奈川県

㉘井村修平, 吉川裕之, 民谷栄一, ペルオキシダーゼとナノ光重合を利用した抗原抗体反応のレーザー検出, 第 61 回応用物理学会春季学術講演会, 2013 年 3 月 19 日, 青山学院大学相模原キャンパス、神奈川県

㉙尹航, 吉川裕之, 民谷栄一, 光トラップによる銀ナノ粒子凝集体の作製と生体分子の SERS 解析, 第 61 回応用物理学会春季学術講演会, 2013 年 3 月 18 日, 青山学院大学相模原キャンパス、神奈川県

[図書] (計 1 件)

“Novel nanobiosensing using a focused laser beam”, Hiroyuki Yoshikawa, in “NANOBIOSENSORS AND NANOBIOANALYSES”, E. Tamiya, K. Kerman, M. C. Vestergaard, and I.-M. Hsing, ed., Springer, Berlin, in press (2014).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 被験物質の濃度測定方法および検出装置

発明者: 吉川裕之・井村修平・民谷栄一

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許権

番号: 特願 2013-218750

出願年月日: 平成 25 年 10 月 22 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 裕之 (YOSHIKAWA, Hiroyuki)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 00314378