

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：34504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2017

課題番号：15H06766

研究課題名(和文) 金属ナノホールアレイを用いた高感度小型蛍光バイオセンサの開発

研究課題名(英文) Development of highly sensitive compact fluorescence biosensor by using metal nanohole arrays

研究代表者

當麻 真奈 (Toma, Mana)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：20756697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高感度な小型蛍光バイオセンサを開発することを目的として、表面プラズモン共鳴現象によって蛍光信号の増幅が期待できる金属ナノホールアレイ構造を用いた表面プラズモン増強蛍光バイオセンサの構築を試みた。蛍光バイオセンサを構築するための要素研究として、金属ナノ構造体の作製法を開発するとともに、生体模倣接着剤であるポリドーパミンを用いた低コストで簡易なセンサの表面修飾法の有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this project, metal nano hole arrays structures are proposed for the development of highly sensitive and compact fluorescence biosensors utilizing surface plasmon enhanced fluorescence. The fabrication method of metal nanostructure array was developed, and a bio-inspired adhesive, polydopamine thin films was utilized as low-cost and simple protein linker layer of the metal sensing surfaces.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：表面プラズモン共鳴 ナノ材料 バイオセンサ コロイドリソグラフィー 蛍光

1. 研究開始当初の背景

ナノ・マイクロスケールの微細構造が配列した金属表面では、構造で散乱、回折された光と金属表面の自由電子との相互作用によって表面プラズモン共鳴が励起される。共鳴条件では、特定の波長の光に強い吸収を示し、金属表面近傍に局在化した強い電場増強がみられるため、蛍光標識を用いた高感度バイオセンサや、太陽電池の高効率化に利用できるものと期待されている。本研究で提案する先行研究で、金属ナノホールアレイ構造は、励起光を直接入射するだけでホール内部に強い電磁場を発生させることができるため、簡易な光学系で高感度な蛍光バイオセンシングが可能であると報告されている。しかしながら、センサ感度の指標である標的分子の検出限界は従来の伝搬型の表面プラズモン増強蛍光バイオセンサと比較して2桁程度大きく、感度の向上が課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、安価かつ簡便なボトムアッププロセスを用いて大面積に金属ナノホールアレイを作製し、タンパク質などの標的分子を高感度に検出できる表面プラズモン増強蛍光バイオセンサへ応用することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 金属ナノホールアレイの作製

本研究で用いる金属ナノホールアレイはコロイドリソグラフィを用いて作製する。具体的には直径数百 nm ~ 1 μm のポリスチレン粒子 (PS 粒子) をガラス基板の上にスピコートし、PS 粒子の二次元結晶膜を作製する。次に、PS 粒子を酸素プラズマ処理によって任意の粒径に収縮させた後、数十 nm ~ 数百 nm の膜厚の金属薄膜を蒸着する。最後に基板上の PS 粒子をトルエンなどで除去することによって、金属ナノホールアレイを作製する。

(2) 光学系の構築

作製した金属ナノホールアレイの光学特性を評価するための光学系では、光源にコリメートした白色光源を用いて、ロータリーステージ上に固定されたサンプルに入射し、サンプルから反射・透過してきた光を測定する。ロータリーステージを用いることにより光学特性の入射角依存性についても評価を可能にする。

(3) 蛍光バイオセンサの構築と感度評価

金属ナノホールアレイを用いて蛍光バイオセンサを構築し、検出感度の評価を行う。本実験ではモデルイムノアッセイの他に蛍光サンドイッチイムノアッセイによる分子マーカーの検出などを行う。

(4) 基板表面の化学修飾法や他の金属構造の検討

作製した蛍光バイオセンサの更なる高感度化を目指し、基板の化学修飾法や光学系の改善を図るほか、他の金属構造の作製などにも取り組む。

4. 研究成果

金属ナノホールアレイ構造を作製するため、ポリスチレン粒子二次元結晶膜作製のためのスピコート条件の最適化を行った。具体的にはスピコートの際のポリスチレン粒子の溶液濃度、溶媒種、スピンスピードなどの検証を行った。次に酸素プラズマでのポリスチレン粒子のエッチングの条件 (パワー、エッチング時間など) 出しを行った。ポリスチレン粒子のエッチングは、大気圧プラズマ装置を用いて行い、エッチングされた粒子の形状等を原子間力顕微鏡で評価した。また、作製した金属ナノ構造体の光学特性を評価するための光学系の構築を行った。

研究計画では、金属ナノホールアレイ構造を用いた蛍光バイオセンサを構築する予定であったが、ガラス基板上のポリスチレン粒子膜に大気圧プラズマエッチングを行うと、近接した粒子の凝集が確認され、予定した構造を作製することが困難であった。そこで、研究計画の一部を見直し、表面プラズモン増強蛍光バイオセンサ表面の化学修飾法の検討を行った。この研究では、蛍光イムノアッセイを行う際の抗体の固定化層にムール貝の接着機構を模倣した、ポリドーパミン薄膜を利用した。ポリドーパミン薄膜は、ドーパミン溶液を基板表面に接触させることで様々な基板材料に製膜が可能で、抗体の固定に架橋剤が不要、といった利点がある。本研究ではまず、ポリドーパミン薄膜の抗体固定化層としての特性を明らかにするために、平坦な金基板上にポリドーパミン薄膜を成膜し、プリズムカップリング法を用いて、表面プラズモン増強蛍光バイオセンサを構築した。この結果、ポリドーパミン薄膜上には、アルカンチオール自己組織化単分子膜を用いた従来法と同程度の量の抗体が結合することが明らかとなった。モデルのイムノアッセイを用いてポリドーパミン薄膜の膜厚を最適化した結果、反応時間 10 ~ 60 分で製膜したポリドーパミン薄膜が最適であることが示された。表面プラズモン増強蛍光バイオセンサとして、蛍光サンドイッチイムノアッセイを用いて炎症マーカーであるインターロイキン 6 (IL-6) の検出を行った。イムノアッセイの概要を図 1 に示す。

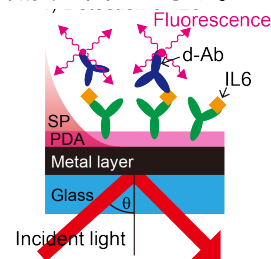


図 1 IL-6 の検出イムノアッセイの概要図

蛍光標識した検出抗体結合前後での蛍光信号の増加分と、測定したサンプル中の IL-6 の濃度から求めた検量線を図 2 に示す。検量線から、IL-6 の検出限界濃度は 100 fM となり、診断基準値 (200 fM) 以下の検出限界が

得られた。

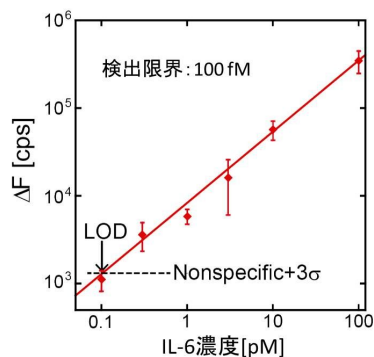


図2 IL-6の検量線

本研究では更に、ポリドーパミン薄膜を使った表面修飾法の汎用性を明らかにするために、SiO₂被覆銀プラズモニックチップへの抗体固定化層への応用も試みた。SiO₂被覆銀プラズモニックチップは、ナノインプリント法で作製した一次元の回折格子に銀およびSiO₂薄膜を成膜して作製したもので、格子結合型表面プラズモン共鳴を励起することが可能である。SiO₂被覆銀プラズモニックチップ上にポリドーパミン薄膜を成膜し、蛍光サンドイッチイムノアッセイによって、肺がんマーカーの一つである神経特異エノラーゼ(NSE)の検出を行った。バッファおよび希釈ヒト血清中でNSEを検出した結果、両者とも診断基準値を下回る検出限界が得られた。これらの研究から、ポリドーパミン薄膜は低コストかつ簡易な方法で表面プラズモン増強蛍光バイオセンサの基板表面に抗体を固定化できる手法として、有用であることが示された。

また、金属ナノホールアレイに代わる金属ナノ構造体として、金属ナノドームアレイ構造を作製し、光学特性を評価した。金属ナノドームアレイ構造は、ガラス基板上にスピコート法によってポリスチレン粒子膜を作製し、金属薄膜を成膜して作製した。異なる粒径(0.2、0.35、0.5 μm)のポリスチレン粒子を用いて粒子膜を作製し、膜厚50 nmの銀薄膜を成膜した銀ナノドームアレイ構造は、ポリスチレン微粒子の粒子径によって黄色、青色、玉虫色といった異なる色を呈した。銀ナノドームアレイ構造の反射スペクトルを図3に示す。

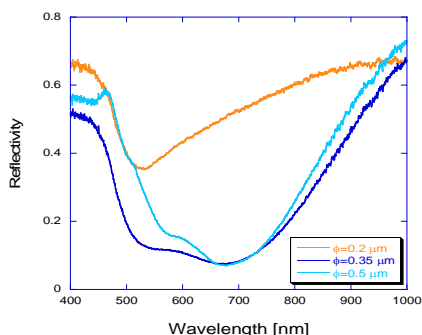


図3 銀ナノドームアレイの反射スペクトル

この呈色を利用した光学バイオセンサとして、現在比色型のバイオセンサの開発を進めている。

本研究では、生体模倣接着剤として知られるポリドーパミン薄膜を利用した表面プラズモン増強蛍光バイオセンサ表面への抗体固定法を確立した。この手法は、他のバイオセンサの表面にも応用が可能であり、簡易で低コスト、かつ汎用性の高いバイオセンサの表面修飾法として高い潜在性を有している。また、金属ナノホールアレイ構造に代わる金属ナノ構造体として、作製がより簡便な金属ナノドームアレイ構造に着目した。金属ナノドームアレイ構造では、構造作製に用いる粒子の粒径によって呈色が変わることが明らかとなった。今後の展望として、金属ナノドームアレイ構造の構造制御を更に進めていくとともに、生体分子を色の変化で高感度検出できる、比色型のプラズモニックバイオセンサの開発を進めていく予定である。

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3件)

Mana Toma, Shota Izumi, Keiko Tawa, “Rapid and Sensitive Detection of Neuron Specific Enolase with a Polydopamine Coated Plasmonic Chip Utilizing Rear-side Coupling Method”, *Analyst*, vol.143, 4, pp.858-864(2018)(査読あり)

Mana Toma, Keiko Tawa, “Thickness Dependence of Polydopamine Thin Films on the Detection Sensitivity of Surface Plasmon Enhanced Fluorescence Biosensors”, *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 57, 3S2, pp.03EK01(2017)(査読あり)

Mana Toma, Keiko Tawa, “Polydopamine Thin Films as Protein Linker Layer for Sensitive Detection of Interleukin-6 by Surface Plasmon Enhanced Fluorescence Spectroscopy”, *ACS Appl. Mater. Interfaces* vol. 8, 34, pp.22032-22038(2016)(査読あり)

[学会発表](計9件)

堂麻真奈, 田和圭子, 「ボトムアッププロセスを活用したプラズモニックバイオセンサの開発」, 電気学会光・量子デバイス研究会微細加工技術とバイオ・メディカル応用, 2018年

堂麻真奈, 田和圭子, 「金属ナノドームアレイを用いた比色型バイオセンサの開発」第65回 応用物理学会 春季学術講演会, 2018年

堂麻真奈, 泉章太, 田和圭子, 「ポリドーパミン被覆プラズモニックチップを用いた神経特異エノラーゼの高感度検出」日本化学会第98春季年会, 2018年

堂麻真奈, 田和圭子, “Fabrication of Multiple Structural Colors by Using

Plasmonic Nanodome Arrays ”第 27 回日本 MRS 年次大会、2017 年

當麻真奈、田和圭子“ Thickness Dependence of Polydopamine Thin Films on the Detection Sensitivity of Surface Plasmon Enhanced Fluorescence Biosensors ”、International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE9)、2017 年

當麻真奈、田和圭子、「ポリドーパミン薄膜の表面プラズモン増強蛍光バイオセンサへの応用」日本化学会第 97 春季年会、2017 年

當麻真奈、泉章太、田和圭子、“ Sensitive Detection of Neuron Specific Enolase by Surface Plasmon Enhanced Fluorescence Utilizing a Plasmonic Chip Functionalized by Polydopamine Thin Films ”、第 64 回 応用物理学会 春季学術講演会、2017 年

當麻真奈、田和圭子，“ Utilization of Polydopamine Thin Films as Protein Linker Layer for Detection of Interleukin-6 by Surface Plasmon-enhanced Fluorescence Spectroscopy ”、KJF International Conference on Organic Materials for Electronics and Photonics 2016、2016 年

當麻真奈、田和圭子、「ポリドーパミン薄膜の表面プラズモン増強蛍光バイオセンサのタンパク質接着層への応用」第 63 回 応用物理学会 春季学術講演会、2016 年

〔産業財産権〕

出願状況（計 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 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.kg-applchem.jp/tawa/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

當麻 真奈 (TOMA, Mana)
関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号： 20756697

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

田和 圭子 (TAWA, Keiko)
関西学院大学・理工学部・教授