

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24226003

研究課題名(和文) ナノスロットレーザの極限的な光局在を利用する超高感度バイオマーカーセンサ

研究課題名(英文) Ultra-sensitive bio-marker sensor based on ultimate light localization in nanoslot laser

研究代表者

馬場 俊彦 (BABA, TOSHIHIKO)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：50202271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 129,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではGaInAsPフォトニック結晶ナノレーザの医療用バイオマーカーセンシングへの応用を研究した。まず本ナノレーザが示す、従来に比べて桁違いに高い感度が、光局在による屈折率効果ではなく、バイオ分子の表面電荷の効果に由来することを見出した。また原子層堆積法により保護膜と結合剤を真空一貫で形成し、センシングの安定化をはかった。さらにナノレーザの大規模集積、測定の自動化を実現し、統計処理を可能にした。その結果、ストレプトアビジン(試験的なタンパク質)、前立腺特異抗原(前立腺癌マーカー)、コラプシン反応媒介タンパク質(アルツハイマー病マーカー)を従来技術より2桁も低濃度から検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In research project, we applied our GaInAsP semiconductor photonic crystal nanolasers to sensing biomarkers for medical use. First, we found that an ultrahigh sensitivity of this nanolaser is not arising from the refractive index effect due to light localization but from electrical charge of biomolecules. Secondly we optimized the chemical protection and formation of silane coupling agent in vacuum by employing atomic layer deposition and stabilized the sensing characteristics. Thirdly we established large-scale array technology of nanolaser and developed the automatic measurement system, which enabled the statistical analysis of detection signals. Consequently, we achieved the sensing of streptoavidin (a test protein), prostate-specific antigen (a biomarker for prostatic cancer), and collapsin response mediator protein (a candidate biomarker for Alzheimer disease) from more than two orders lower concentrations than those detectable by conventional technology.

研究分野：ナノスロットレーザ

キーワード：フォトニック結晶 ナノレーザ ナノスロット バイオマーカー バイオセンシング

## 1. 研究開始当初の背景

代表者はフォトニックナノ構造光デバイスを長年研究し、特に GaInAsP 半導体フォトニック結晶ナノレーザの世界初の室温連続発振を 2007 年に報告した。このナノレーザは共振器が露出しているため、何か媒質が接するとレーザモードが変化し、発振波長がシフトする。逆にこのシフトを捉えれば、媒質をセンシングできる。代表者はこのナノレーザをタンパク質溶液に浸漬し、タンパク質の吸着を検出するバイオセンシング動作を 2009 年に初めて報告した。ただし当初は、同様の光共鳴を用いるフォトニックセンサのものと大差ない平凡な感度しか得られなかった。その後、代表者は同レーザに幅 50 nm 以下の極細ナノスロットを導入し、レーザモードを局在化することを提案、実証した。これは感度向上と熱的安定化をもたらし、波長シフトがより詳細に分析できるようになった。その結果、極低濃度タンパク質検出が実現し、他のフォトニックセンサと比べて 4 桁以上の高感度が示されたため、その起源の探求が重要な研究テーマとして浮上した。

一方、医療分野では、癌、アルツハイマー病など進行性重大疾病の早期発見、早期治療に向け、血中バイオマーカータンパク質検査の発展が強く望まれている。現在のタンパク質センシングには一般に発色標識が用いられるが、標識を付けるプロセスは煩雑・高コストであり、また標識自体がタンパク質を変質させる懸念もある。そのため、扱いが簡易で低コスト（使い捨て可能）な無標識センサが待望されている。また分離・濃縮などを行わずに、より微量の検査を可能にする高感度センサが望まれている。しかしこれまで研究されてきた無標識センサは一長一短であり、医療応用に至っていない。一方、本ナノレーザセンサは全ての条件を満たす可能性があった。

## 2. 研究の目的

ナノフォトニクス物理、表面化学、医療応用の融合分野の中で、これまでのフォトニック結晶ナノレーザバイオセンサに関する成果を深化、発展させ、実用に近づけるため、以下の二つを目的とした。第一に上記の超高感度の原理を解明し、デバイスを高性能化すること、第二に不純物試料におけるバイオマーカー検出に高選択性を与える表面処理を確立し、最終的にはヒト由来の血液に対して従来の検出限界を超えるバイオマーカー検出を実証することである。具体的には以下の 3 つに取り組んだ。

### (1) 超高感度の原理の探究と高性能化

本研究のナノスロットは他の類似構造よりも狭く、理論計算される光局在が強力なので、これによる光勾配力がタンパク質を集め、高感度をもたらす可能性があった。

また各種の表面修飾にセンシング結果が敏感であったため、それによる静電的な効果も候補となった。これらを解明すると共に、さらにナノスロットによるラマン増強なども検討し、マルチセンサとしての可能性を多角的に探究した。

### (2) 表面化学の探究

本ナノレーザは、様々なバイオ分子やイオンを含む体液のような溶液に対して腐食される可能性があり、これはセンサ信号のノイズとなるため、第一にこれを抑制する保護膜の形成を検討した。また抗原抗体反応を用いた選択的なセンシングのために表面修飾を最適化し、超高感度を安定して発現させることを第二の目標とした。さらに溶液中に分散するタンパク質を操作する機構も検討した。

### (3) バイオマーカーセンサの開発

ナノレーザアレイを構築し、統計処理等が行える自動測定環境、ならびに小型の可搬型測定システムの構築を目指した。そして、癌マーカーやアルツハイマー病マーカーを具体的な目標とし、抗原抗体反応などの特異結合を利用した高選択的なセンシングに取り組んだ。これらを通じて無標識センサとしての実用可能性を示すことを目指した。さらに(1)、(2)の探求成果を反映させた新しいセンシングへの展開を検討した。

## 3. 研究の方法

上記の三つの研究の中で、特に(2)における原子層堆積装置の導入に多くの予算を措置し、これによる保護膜形成を行ったことが、様々な形で研究を進展させた。まずセンシングノイズが大幅に減少し、発振波長の挙動がより明確に把握できるようになった。また様々なイオンを含む溶液におけるセンシングが可能になり、発振強度の pH 依存性が見いだされた。これを契機に、発振特性が GaInAsP 半導体の帯電に深く関わることが判明した。そこで、高感度赤外カメラを導入し、発光・発振特性を詳細に評価すると共に、原理実証と応用展開を兼ねた細胞イメージングも実施した。最終的には(1)の高感度波長シフトもイオンや帯電に由来することが判明した。

また、同じ原子層堆積装置に有機物（抗体修飾の結合剤となる自己組織化単分子膜 SAMS）の形成機構を追加し、表面修飾を安定化させた。さらに測定の自動化、可搬型測定系の構築を行った。これらにより、(3)のバイオマーカーセンシングが一挙に進んだ。まず選択的なセンシングのテスト試料として、特異吸着を示す代表的な組み合わせであるストレプトアビジン（SA）タンパク質とビオチンのセンシングを試した。さらに現在の健康診断でも前立腺癌のバイオマーカーとして利用されている前立腺特

異抗原 (PSA) を選び、実用的な高感度センシングの実証を進めた。これらについては、ヒト血液試料を模擬した不純物を大量に含む試料に対するセンシングも試した。さらに横浜市立大学医学研究科の五島良郎教授の協力のもと、アルツハイマー病のバイオマーカーとして期待されるコラプシン反応媒介タンパク質 2 (CRMP2) をヒト血液試料から採集し、その高感度センシングにも取り組んだ。

#### 4. 研究成果

本ナノレーザセンサは、純水中の動作において短波長側への波長ドリフトが見られ、さらにタンパク質や塩イオン、電解質などが含まれると、表面エッチングにより波長ドリフトが加速するという問題があった。そこで原子層堆積を用いて、極薄の酸化膜を保護膜として形成した。原子層堆積はナノメートル級の膜厚制御、複雑な形状への完全な被覆という特長が本研究の目的に適する。様々な酸化膜の特性を調査した結果、水中でほぼ電気的中性を示す  $ZrO_2$  が、化学耐性とセンシング特性の両面で優れることがわかった。これを契機に、ナノレーザを様々な溶液中で動作させたところ、酸性の pH では発振強度が増加し、アルカリの pH では減少することがわかった。一般に固体材料には固有の等電点 pI があり、それより大きな (小さな) pH では負 (正) に帯電する。本 GaInAsP 半導体では、純水中で負に帯電する。発光寿命測定の結果と強度の結果を総合し、より強く負に帯電すると表面再結合が増加し、これが発振強度に反映することがわかった。これは、表面に吸着した帯電物質を発振強度のみからセンシングできることを意味する。実際、負に帯電する DNA のハイブリダイゼーションを発振強度のみから観測することに成功した。これは蛍光標識等もスペクトル分析も用いない初めてのフォトニックバイオセンサとなり、これを Applied Physics Letters 誌に発表した論文は米国物理学会からプレスリリースされ、世界の 50 件を超える機関で報道されて、あらゆるメディアによる学術論文の引用指数を表す Altmetrics においてトップ 1% 論文にランキングされた。また、この効果はレーザ発振に限らず、単なるフォトルミネセンス (PL) においても発現することが確認されたため、表面に形成した異なる帯電物質、具体的には表面に培養した細胞が PL を通じて無標識イメージングできることを実証した。2016 年米国光学会 Optics Express 誌に論文を発表したほか、応用物理学会ポスター賞を受賞し、スウェーデンで開催された国際会議 Biosensors では採択率 5% の口頭発表に選ばれた。

さらに、このような帯電の効果は超高感度波長シフトの起源にもなることが明らかになった。その根拠になったのが、ナノレ

ーザをプラズマに曝露すると発振波長がいったん大きく短波長化し、純水中で官能基が中性化していくにつれて徐々に波長が戻る様子が観測された。この実験では付着する分子がないにも関わらず、明瞭な波長シフトが観測されたことから、表面電荷が波長シフトに関与することが明らかである。また、後述する抗原抗体反応の観測では、高濃度の抗体修飾よりも低濃度の抗原による抗原抗体反応の方が大きな波長シフトを生むことなどが観測された。これは抗原抗体反応による帯電の変化が、抗体の屈折率効果よりもはるかに大きな波長シフトを生むことを示唆している。これを説明するために、様々な電気光学効果を調査したところ、ナノレーザの製作に用いている GaInAsP 量子井戸ウエハの光閉じ込め層にキャリアが捕獲され、それによるキャリア効果が半導体の屈折率の優位な変化を生じさせて、波長をシフトさせる効果が有力となった。このようなキャリア捕獲は、光閉じ込め層からの PL 強度が帯電状態に大きく変化することにより裏付けられた。つまり、ナノレーザセンサの超高感度は、付着するバイオ分子の屈折率ではなく、その帯電によってもたらされていると結論付けた。一方、当初、想定された光勾配力とラマン散乱の増強効果については、ナノスロット幅が 10 nm 以下になると顕著になるものの、実際に製作される幅 30 nm 以上では大きな効果が生まないことがわかった。

また、バイオマーカーセンサの開発に向けて、周辺技術を整備した。具体的には、原子層堆積装置に SAMS を導入した。これにより、保護膜形成から抗体等の結合剤までを真空一貫で形成できるようになった。保護膜や結合剤はそれぞれ時間経過に対して表面状態が敏感であり、この真空一貫プロセスは表面修飾の安定化に貢献した。また、センシングの統計処理を可能にするため、ナノレーザの大規模アレイ集積を行った。1089 個の集積では歩留まり 100% の発振を実現し、最大 11664 個までの集積を実現した。レーザにおいてこのような大規模集積は前例がなく、これを報告した Applied Physics Letters の論文は Nature Photonics 誌にて報道された。またこれらのナノレーザアレイの測定を自動化したほか、可搬型測定システムも構築し、画像認識によってアレイの位置を自動識別しながら測定を行うことも可能にした。これらを利用することで、一つの測定対象に対しても数 10 個単位のナノレーザに対する同時測定と統計評価を可能にした。

具体的なバイオマーカー検出を行う前に、まずは SA とビオチンという極めて親和定数が高い (結合力が強い) 組み合わせの特異結合を選択検出した。ここでは 100zM 以下という超低濃度に対して感度が現れたほか、血中の不純物を模擬した牛血清アルブ

ミン(BSA)が10兆倍高濃度でも,ストロプトアビジンが選択的に検出された.これは親和定数の高さを考慮しても,極めて選択度の高い結果である.そこで次に,抗原抗体反応によるPSAの検出を試した.ここでは市販の酵素結合免疫反応法(ELISA)キットにより100 fMまで試料の濃度を正確に検定し,それ以下の濃度も希釈して検出限界濃度を調べた.SAとビオチンの組み合わせに比べると親和定数が6桁低いが,それでも1 fM以下の濃度を検出し,100億倍のBSAを含む試料においても選択的なPSA検出を確認した.これはELISAが検出できる限界濃度より100倍も低濃度の検出となる.そこでさらに,CRMP2の抗原抗体反応を検出した.ここではマウス由来,およびヒト血液由来の不純物試料において,いずれも10 pMのCRMP2の検出に成功した.CRMPは抗体の性能が低く,ELISAではnMレベルしか検出できない.すなわちここでも100倍の低濃度からの検出に成功した.以上の成果はOptics Express誌とMRS Communications誌に計3編の論文(雑誌論文, を含む)として発表した.

以上の成果から,本フォトニック結晶ナノレーザバイオセンサの原理を解明し,表面修飾の安定化,医療応用可能なバイオマーカーに対する超高感度センシングの実証に成功し,当初の研究目的を達成した.

#### 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3件)

S. Hachuda, T. Watanabe, D. Takahashi and T. Baba, “Sensitive and selective detection of prostate-specific antigen using a photonic crystal nanolaser”, 査読有, Optics Express, vol. 24, no. 12, 2016, pp. 12886-12892, DOI:10.1364/OE.24.012886

T. Baba, “Biosensing using photonic crystal nanolasers”, MRS Communications, 査読有, vol. 5, no. 4, 2015, pp. 555-564, DOI: 10.1557/mrc.2015.73

K. Watanabe, Y. Kishi, S. Hachuda, T. Watanabe, M. Sakemoto, Y. Nishijima and T. Baba, “Simultaneous detection of refractive index and surface charges in nanolaser biosensors”, Applied Physics Letters, 査読有, vol. 106, no. 2, 2015, pp. 021106, DOI: 10.1063/1.4904481

##### [学会発表](計5件)

T. Baba, “Photonic crystal nanolasers and its application to bio-sensing” (招待講演), International Conference on Indium Phosphide and Related Materials, 2016年6月28日, 「富山国際会議場」(富山市)  
T. Baba, “Bio-sensing applications of

photonic crystal nanolasers” (キーノート講演), OSA Advanced Optoelectronics and Micro-/nano-Electronics, 2015年10月30日, 「杭州」(中国).

T. Baba, “Photonic crystal nanolasers for bio/medical applications” (招待講演), International Nano-Optoelectronics Workshop (iNOW), 2015年8月6日, 「東京大学」(東京都).

T. Baba, K. Watanabe and Y. Kishi, “Photonic crystal nanolaser bio-sensors for detecting environmental index and surface charges” (招待講演), IEEE International Conference on Transparent Optical Networks, 2015年7月6日, 「ブダペスト」(ハンガリー).

T. Baba, “Photonic crystal nanolasers for sensing applications” (Invited), OSA Laser Science, 2013年10月7日, 「オーランド」(米国).

##### [産業財産権]

##### ○出願状況(計1件)

名称: センサー装置、生体分子視覚化装置およびセンシング方法

発明者: 馬場俊彦, 渡邊敬介, 岸洋次, 酒本真衣(横浜国立大学)

権利者: 横浜国立大学

種類: 特願

番号: 特願 2014-228009 号

出願年月日: 平成26年11月10日

国内外の別: 国内

##### ○取得状況(計1件)

名称: 半導体レーザ

発明者: 馬場俊彦, 渡邊秀輝, 横山圭佑(横浜国立大学)

権利者: 横浜国立大学

種類: 特許

番号: 特許第5152721号

出願年月日: 平成20年3月24日

取得年月日: 平成24年12月14日

国内外の別: 国内

##### [その他]

ホームページ等

<http://www.baba-lab.ynu.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

馬場 俊彦 (BABA, Toshihiko)

横浜国立大学・工学研究院・教授

研究者番号: 50202271

##### (2)研究分担者

西島 喜明 (NISHIJIMA, Yoshiaki)

横浜国立大学・工学研究院・准教授

研究者番号： 6 0 5 8 1 4 5 2

(3)連携研究者

(4)研究協力者

五嶋良郎 (GOSHIMA, yoshio)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号： 0 0 1 5 3 7 5 0

遠藤達郎 (ENDO, tatsuro)  
大阪府立大学・工学研究科・准教授  
研究者番号： 4 0 4 3 2 0 1 7