

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K21924

研究課題名（和文）生体分子の機能を保持したまま基材としたナノ光学素子の作製とバイオセンサへの応用

研究課題名（英文）Fabrication of biomolecules-based nano optical devices for biosensing application

研究代表者

遠藤 達郎（Endo, Tatsuro）

大阪府立大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：40432017

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）：本研究の目的は、抗体やDNA等生体分子を基材として用い、生体分子が有する機能・分子構造を損なうことなく、ナノインプリントリソグラフィ（Nanoimprint lithography: NIL）を用いてナノ構造を転写する技術を開発することにある。加えて作製したナノ構造より観察される光学特性を利用したバイオセンサを開発することにある。

本研究では、ウシ血清アルブミンおよび抗ヒトフィブリノーゲン抗体を混合させた溶液を調製し、NILにてナノ構造を作製することに成功し、ナノ構造より観察される光学特性を用いたバイオセンサを開発することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NILは、主に熱NILまたはUVNILの二種類に大別され、良好な再現性にてナノ構造を転写可能である。しかし熱NILは、基材をガラス転移点まで加熱する必要があり、生体分子を基材として用いると変性を免れることは困難である。また生体分子は、紫外域に吸収帯を持つことからUVNILも同様である。一方で生体分子を直接加圧しナノ構造を転写しても水等を滴下すると容易に溶解し、転写した構造を維持することは困難である。

生体分子を変性させずにナノ構造を転写、その形状を維持する技術を開発する本研究は、挑戦的研究として従来のナノマイクロ加工技術において加工可能な材料の選択肢を増やすことにつながることで意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used biomolecules as a base material and fabricated nanostructures using nanoimprint lithography (NIL). In addition, fabrication of nanostructures using NIL without impairing the function of biomolecules as base materials could be achieved. Based on this fabrication techniques using NIL, the biomolecules based nanostructures exhibit the diffraction and reflection at the specific wavelength of light. Using this optical properties of nanostructures, biosensing application could be realized.

研究分野：センサ工学

キーワード：ナノインプリントリソグラフィ フォトニック結晶 生体分子 バイオセンサ

1. 研究開始当初の背景

ナノメートルサイズの構造を樹脂上へ転写する技術であるナノインプリントリソグラフィ (Nanoimprint lithography: NIL) は、鋳型を用意することで、簡便かつ安価にナノ構造を転写することが可能である。また NIL にて作製したナノ構造は、基材の物性・形状・サイズ等に依存して光を回折・反射させることが可能であり、ナノ光学素子への応用が期待されている。特に近年では、ナノメートルサイズの構造が周期的に配列したナノ光学素子である「フォトニック結晶 (Photonic crystal: PhC)」より観察される光学特性を用いてセンサへの応用が期待されている。このセンサは、PhC 周囲で誘起される周辺屈折率変化を光回折・反射特性の変化としてとらえるものである。我々は、PhC 表面で抗原抗体反応や DNA ハイブリダイゼーションによって周辺屈折率変化を誘起させ、高感度に疾病マーカー分子や特定配列を有する DNA の高感度検出・定量に成功している。

しかし、血清等生体試料中には多種の夾雑物が混在しており、夾雑物が PhC 表面へ非特異的に吸着することでノイズとなり、高感度検出・定量が困難となることが課題であった。これは、PhC 作製に基材として使用する樹脂材料表面へ疎水性相互作用・静電的相互作用によって夾雑物が吸着してしまうためである。加えて、樹脂上へ作製した PhC 表面へ抗体やプローブ DNA を固定化するためには表面処理が必要という課題があった。

この課題を解決するために本研究では「生体分子を基材として PhC を作製する。」ことを着想した。血中に存在する生体分子を基材とすることで、生体試料中の夾雑物が非特異的に吸着することを軽減させることにつながり、基材中へ抗体等を包含させることで、表面処理が不要となる事が期待できる。

一方で NIL を用いたナノ構造転写には、主に熱 NIL または UVNIL の二種類に大別され、良好な再現性にてナノ構造を転写することが可能である。

しかし熱 NIL は、基材をガラス転移点まで加熱する必要があり、生体分子を基材として用いた場合、変性を免れることは困難である。また生体分子は、紫外域に吸収帯を持つことから UVNIL も同様である。一方で生体分子を直接加圧しナノ構造を転写したとしても水等を滴下すると容易に溶解し、転写したナノ構造の形状を維持することは困難である。

そこで本研究では、生体分子の機能・分子構造を損なうことなく PhC を作製する NIL 法を開発するとともに、作製した PhC を用いてセンサとして応用可能かを明らかにすることを着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗体や DNA 等生体分子を基材として用い、生体分子が有する機能・分子構造を損なうことなく、NIL を用いて、ナノ構造を転写する技術を開発することにある。

加えて開発した技術を用いて抗体を包含させた PhC を作製、PhC 自体が分子認識・特異的結合能を有する光学バイオセンサへ応用することにある (図 1)。

本研究は、前述した課題を解決し「機能と三次元構造を有する生体分子を基材として用いても変性無くナノ構造加工が可能な技術」を提案するものである。

従来の技術では困難であった「生体分子を変性させずにナノ構造を転写、その形状を維持する」技術を開発する本研究は、挑戦的研究として従来のナノマイクロ加工技術において加工可能な材料の選択肢を増やすことにつながることで意義がある。

また、高齢化社会が本格化する中、本研究で開発するバイオセンサは、既存技術に比べ安価に作製が可能であり、迅速に診断することが可能となることが期待できる。これは将来の医療費負担額を大幅に軽減できるという成果が期待できる。加えて生体分子を基材として転写したナノ構造は、本研究で実施するバイオセンサへの応用だけでなく、バイオリアクタ、絆創膏等への応用が期待でき、医療・創薬の分野において本技術が広く利用されることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 生体分子を基材としたフォトニック結晶の作製

本研究では、光架橋、化学架橋、の二種類の作製方法にて PhC 作製を行った。PhC 作製

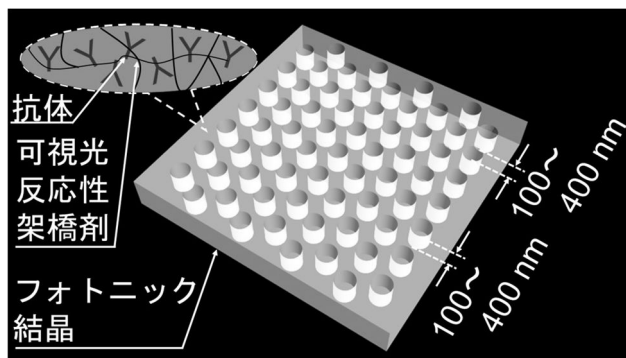


図 1 生体分子を基材とした NIL 製 PhC 概念図

には、モデル物質としてウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin: BSA) を基材として用いて PhC 作製を試みた。BSA は、試薬として大量かつ安価に購入することが可能であり、作製条件の検討に有用であると判断したためである。

光架橋による PhC の作製

PhC 作製には、BSA 水溶液 (1 mg/ml) 中へ光架橋剤として用いられている 4-Benzoylbenzoic Acid *N*-Succinimidyl Ester を添加した水溶液を滴下したスライドガラス上へ鋳型 (ピラーアレイ (直径・間隔: 230 nm)) を設置・加圧した後、波長 375nm の光 (2.57 mW/cm²) を 30 分間照射することによって BSA 同士を架橋させ、PhC を作製した (図 2)。照射後は、鋳型を機械的に離型することで PhC の作製を確認した。

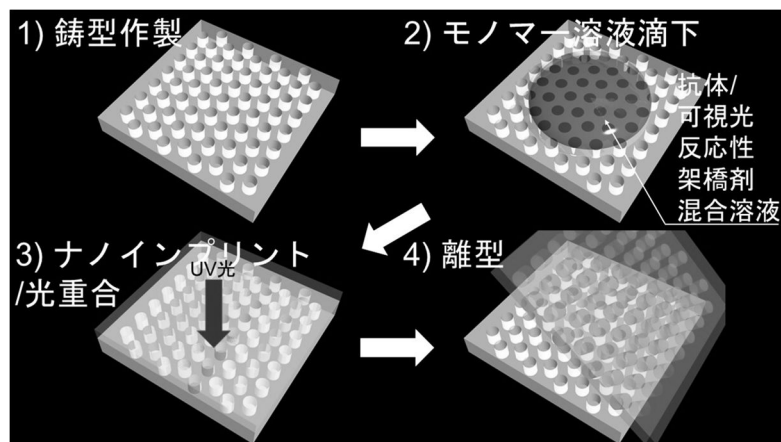


図 2 光架橋による PhC 作製手順概略図

化学架橋による PhC の作製

光架橋による PhC 作製と並行して化学架橋による PhC 作製を行った。PhC 作製には、BSA 水溶液 (1 mg/ml) を滴下したスライドガラス上へ鋳型 (ピラーアレイ (直径・間隔: 230 nm)) を設置・加圧した後、溶媒を完全に蒸発させ鋳型を機械的に離型した。離型させた PhC は、0.5% (v/v) の Gultaraldehyde (GA) 水溶液上に一昼夜設置し、揮発した GA ガスによって BSA 同士を架橋させることで、PhC を作製した。

(2) フォトニック結晶を用いたバイオセンサ応用

本研究では、当初バイオセンサへの応用を行うのに、抗体のみを基材として PhC を作製することを計画していたが、抗体の価格が高額であることから本研究では、BSA 水溶液中へ抗体を添加することで PhC を作製することとした。

バイオセンサの作製には、終濃度が 1 µg/ml となるように抗ヒトフィブリノーゲン抗体を添加した BSA 水溶液を前述した作製方法を用いて PhC を作製した。作製後は、抗体含有 PhC 表面へ異なる濃度に調製したフィブリノーゲン溶液 (1 ng/ml~1 µg/ml) を滴下、室温下にて 1 時間抗原抗体反応させた後、洗浄・乾燥させ反射スペクトル測定を行った。なお反射スペクトル測定には、ファイバ分光器を用いた。

4. 研究成果

(1) 生体分子を基材としたフォトニック結晶の作製

光架橋による PhC の作製

光架橋によって作製した PhC は、目視にて光回折による構造色を観察することが可能であり、ウシ血清アルブミン・光架橋剤濃度に依存して鋳型の形状を反映した PhC を作製することが可能であることが明らかとなった。

しかし、溶媒である水が残存しているため、水が蒸発することで収縮するとともに、光架橋剤である 4-Benzoylbenzoic Acid *N*-Succinimidyl Ester を高濃度に添加する必要がある。加えて作製した PhC 上へ緩衝液を滴下すると、架橋されなかった BSA が溶出することが確認された。

化学架橋による PhC の作製

化学架橋によって作製した PhC は、光架橋による PhC と同様に目視にて光回折による構造色を観察することが可能であった。加えてあらかじめ溶媒である水を完全に蒸発させて作製することから PhC 自体の収縮もなく、揮発した GA ガスによって長時間架橋させていることから BSA 自体の溶出も観察されなかった。また作製した PhC を緩衝液中へ 12 時間浸漬させても顕著な膨潤は観察されなかったことから、GA によって BSA が強固に架橋された PhC を作製することができた。今後の実験では、化学架橋によって作製した PhC を用いてバイオセンサ応用を行うこととした。

(2) フォトニック結晶を用いたバイオセンサ応用

抗ヒトフィブリノーゲン抗体を包含させて作製した PhC は、これまで樹脂を基材として作製していた PhC と比べ、表面処理が不要であり、容易に作成することが可能であった。加えて作製した PhC 表面へ、異なる濃度に調製した抗原溶液を滴下、反応させ光学特性評価を行った結

果、抗原濃度に依存して PhC の回折・反射ピーク強度の減少が観察された。また、添加した抗体の特異性を確認するために、1 µg/ml のヒト血清アルブミン溶液を滴下し、同様に光学特性変化を観察した結果、顕著な回折・反射ピーク強度の減少を観察することはできなかったことから包含させた抗体が特異的に抗原を認識・結合していると考えられる。これら結果から本研究では、生体分子が有する機能・分子構造を損なうことなくナノ構造を転写するとともに、センサとして応用可能であることが明らかとなった。

しかし当初は、生体分子を基材とすることにより、非特異的吸着の大幅な軽減が期待できると考えていたが、PhC とすることで、PhC 表面が疎水性となり大幅な非特異的吸着の軽減は実現することができなかった。今後は、非特異的吸着の軽減が期待できる分子も包含させた PhC を作製することで、さらなる非特異的吸着軽減を目指すことを計画している。

本研究で得られた成果は、生体分子という複雑な構造・高次の機能を有する材料を基材としてナノ構造を転写できたことから、従来のナノマイクロ加工技術において加工可能な材料の幅を広げることにつながる。加えて、タンパク質・DNA 等種々の生体分子を基材としてナノ構造を作製することで、これまで樹脂単体では実現困難であった、分子認識能を有するナノ構造を作製することができ、応用分野の拡大が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tatsuro Endo, Hirotaka Yamada, Kenji Yamada	4. 巻 11
2. 論文標題 Template Stripping Method-Based Au Nanoarray for Surface-Enhanced Raman Scattering Detection of Antiepileptic Drug	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi111100936	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林奈緒, 志水友哉, 川崎大輝, 山田大空, 久本秀明, 末吉健志, 遠藤達郎
2. 発表標題 高感度蛍光増強型バイオセンシングを志向したTiO ₂ / ハイドロゲルハイブリッドフォトニック結晶の作製
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第39回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田大空, 志水友哉, 小林奈緒, 末吉健志, 久本秀明, 遠藤達郎
2. 発表標題 モールド形状制御によるナノインプリント製プラズモニック結晶のセンサ性能制御
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田大空, 川崎大輝, 井上千種, 前野権一, 末吉健志, 久本秀明, 遠藤達郎
2. 発表標題 広域プラズモン増強電場発生を示すMetal-Insulator-Metalドットアレイの開発
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019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
研究 分 担 者	末吉 健志 (Sueyoshi Kenji) (70552660)	大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (24403)	

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
---------	---------