

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21144

研究課題名（和文）グラファイトナノ薄膜振動子を用いた多チャンネル超高感度振動子バイオセンサーの開発

研究課題名（英文）Development of multichannel Ultrasensitive oscillator biosensor using graphite nano-thin film oscillators

研究代表者

荻 博次（Ogi, Hirotsugu）

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：90252626

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：振動子センサーは代表的な無標識バイオセンサーであり、計測時間が短く、創薬プロセスに必要とされる生体分子間の親和性評価を可能とする。振動子センサーの感度は、振動子材料の密度が小さく、かつ、振動子が薄いほど飛躍的に向上することから、多層グラフェンナノ薄膜は、想定し得る材料中でもっとも有望なセンサー材料である。本研究では、極めて品質の高い多層グラフェンナノ薄膜を用いた多チャンネル自立膜振動子の開発に成功し、共鳴周波数が40GHzを超える超高周波領域でのバイオアッセイに成功した。その結果、検出感度が従来のバイオセンサーのそれを大きく上回るセンサーを完成させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

安心・安全な社会の構築において、高感度かつハイスループットのセンサーシステムの確立は重要な課題である。本研究において開発するバイオセンサーシステムは、原理的には極めて高い感度のバイオアッセイを可能とし、早期診断や創薬プロセスにおいて多大に貢献する可能性を有する。

研究成果の概要（英文）：The oscillator biosensor is a typical label-free biosensor that allows a short measurement time and the evaluation of binding affinity between biomolecules, which is necessary for the drug discovery process. The sensitivity of such a sensor dramatically increases with the decrease in the mass density of the oscillator material and the decrease in the oscillator thickness, making the multilayer graphene nanofilm the most promising sensor material among all possible materials. In this study, we succeeded in developing a multichannel freestanding membrane oscillator based on extremely high-quality multilayer graphene nanofilms, and bioassays in the ultrahigh-frequency region with resonance frequencies exceeding 40 GHz were successfully performed. As a result, we succeeded in developing a sensor system whose detection sensitivity greatly exceeds that of conventional biosensors.

研究分野：超音波工学

キーワード：バイオセンサー 振動子 多層グラフェン ピコ秒超音波

1. 研究開始当初の背景

共振している振動体に、物質が吸着すると、振動体の質量が増加するため、共振周波数が低下する。この原理を利用し、共振周波数の変化から吸着物質を定量するセンサーが振動子センサーである。振動子センサーは無標識バイオセンサーとして代表的なセンサーである。計測時間が比較的短く、創薬プロセスに必要とされる生体分子間の親和性を正確に評価することが可能である。振動子センサーは質量検出型のセンサーであるため、その感度は、振動子材料の密度が小さく、かつ、振動子が薄いほど飛躍的に向上する。ことから、多層グラフェンナノ薄膜は、想定し得る材料中でもっとも有望なセンサー材料である。しかし、これまで、多層グラフェンナノ薄膜をセンサーに用いた例は無い。本研究では世界で初めてこれを実現した。

2. 研究の目的

本課題ではグラファイトナノ薄膜を用いた多チャンネル超高感度振動子バイオセンサーの開発を目的とする。振動子センサーは代表的な無標識バイオセンサーであり、計測時間が短く、創薬プロセスに必要とされる生体分子間の親和性評価を可能とする。標的をレセプタを介して振動子に吸着させ、その際の質量増加を振動子の共振周波数変化から検出する。つまり質量検出型センサーであり高感度化には振動子の軽量化が絶対条件である。理論的には振動子センサーの感度は、

$$(\text{感度}) \propto \frac{1}{(\text{振動子の密度})(\text{振動子の厚さ})^2}$$

により与えられる。つまり、密度が低くかつ薄い振動子を用いることにより飛躍的に感度が向上する。グラファイトは面内剛性が高いため(ヤング率>1000 GPa)、100 nm以下の自立薄膜化が可能であり、かつ密度が小さい(2260 kg/m³)ため著しい感度向上が可能となる。加えて以下のような極めて重要な利点を有する。申請者は、振動子センサーの感度が、薄型化により飛躍的に向上することから、薄膜振動子を用いたバイオセンサーを提案してきた [1, 2]。しかし、薄膜振動子の力学共振は、フェムト秒オーダーの極短パルス光照射により瞬間的な熱膨張・収縮を起こして励起するが、レーザー照射により振動子上に固定化した蛋白質が加熱され失活するという問題が生じた。熱伝導率の高い金属や窒化シリコンの場合、膜厚を増加しなければ蛋白質が失活して機能しない。ところが、グラファイトは面外(c軸)方向の熱伝導率が非常に低く(~0.3 W/mK)対して面内熱伝導率が非常に高い(~1000 W/mK)ため、熱は面内方向に拡散し表面の蛋白質の過度の加熱を防ぐことができる。以上のように、低密度・高強度・低面外熱伝導率という特徴を備えたグラファイトは、振動子センサーとして現存する材料中で最適であり、例えばこれを用いて100 nm厚さの振動子を開発すると、その検出感度は従来の水晶を用いた振動子センサーを大幅に超えることになり、超高感度化が可能となる。

3. 研究の方法

ポリイミド樹脂を引っ張り応力下において高温焼成にて作製された高品質の多層グラフェン [3]を用いた。シリコン基板に多数の微小貫通孔を明け、厚さ50 nmの多層グラフェンを転写した。これにより多数の多層グラフェンを自立膜状態とすることができる。このチップを自作のセンサーフォルダにセッティングし、上面よりピペッティングにより蛋白質の固定化および検体

の注入を行い、下面よりパルス光を照射し、多層グラフェンの音響応答を計測した。

本研究では、レセプターとグラフェン表面を結合するリンカーとしてピレンブタン酸スクシンイミジルエステル (1-Pyrenbutanoic Acid Succinimidy Ester: PASE) を用いた。グラフェン表面にリンカーを固定化する際、共有結合又は非共有結合を利用した修飾を行う。共有結合を用いた修飾の場合、グラフェン内に欠陥が生じてしまう恐れがあるが、PASE を用いた非共有結合による修飾は、グラフェン内に欠陥を導入することなくリンカーを固定化することができる。PASE はピレン ($C_{16}H_{10}$) というベンゼン環4つを平面に並べた構造を持っており、グラフェンの6員環との π -相互作用により、グラフェンの c 面と結合する。スクシンイミド基とたんぱく質に修飾したアミノ基が結合することで、PASE を介してレセプターをグラフェン表面に固定化することができる。

本研究では、顕微ピコ秒超音波法を開発し、多層グラフェンの力学共振を計測した。ピコ秒超音波法とは、フェムト秒パルスレーザを用いたポンプ・プローブ法の一つであり[4, 5]、ナノ物質中においてサブ THz オーダの超音波の励起・検出を可能にする光計測手法である。極短パルス光を薄膜材料に照射すると、試料中に様々は周波数を有するフォノンが励起される。これらのフォノンの内、薄膜界面を境界とする特定の周波数のフォノンは共鳴し、薄膜内に定在波が生じる。このときの共振周波数 f と音速 v 、膜厚 d 、振動モードの次数 n の関係は、両端自由端反射の場合、以下の式で表すことができる。

$$f = v \cdot n / (2d)$$

共振状態にある薄膜にプローブ光を照射すると、その反射率も同じ周波数で振動し振動波形を取得することができる。

4. 研究成果

本研究において開発した光学系の概略図を図1に示す。2台のチタン・サファイアパルスレー

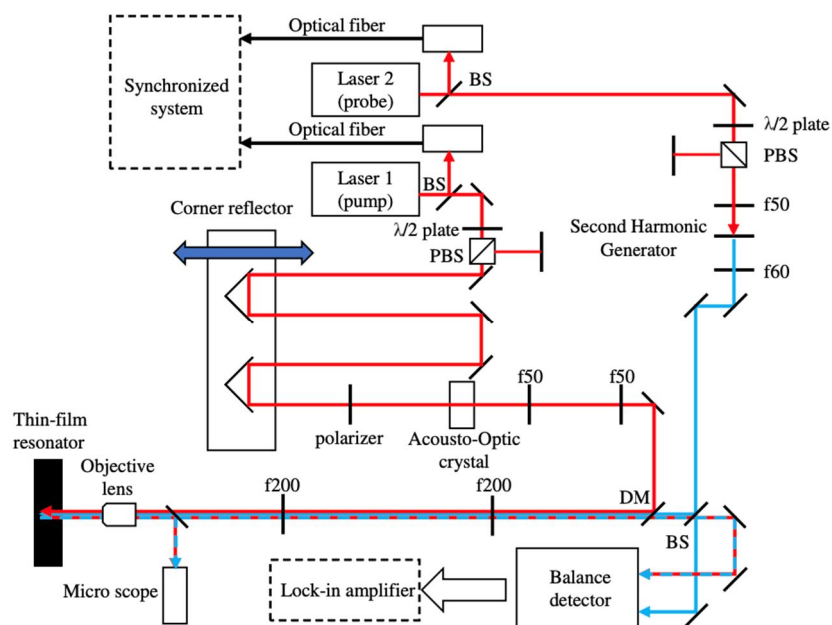


図1 顕微ピコ秒超音波法の光学系

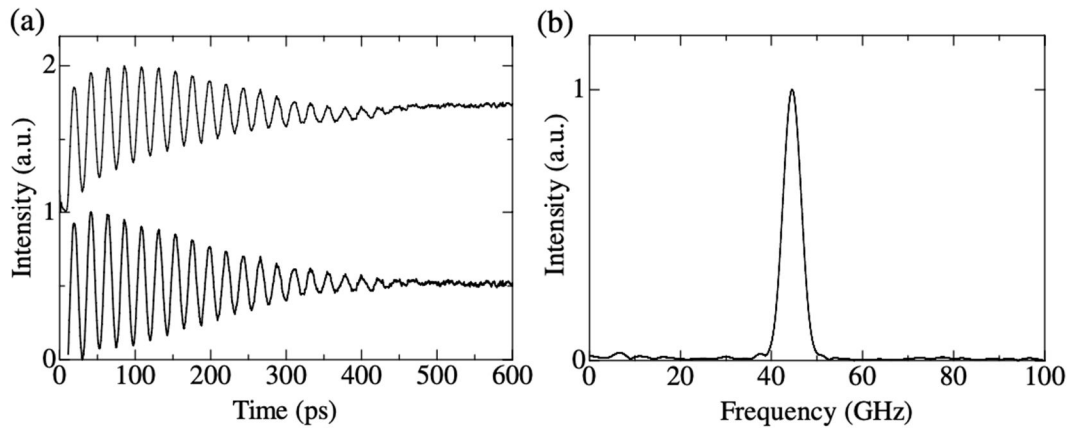


図2 多層グラフェンのフォノン共振の計測例。(a)測定した振動波形(上)と、バックグラウンドを除去した振動波形(下)。(b)高速フーリエ変換スペクトル。

ザを光源とし、一方から発振したレーザをポンプ光 (Laser1)、他方から発振したレーザをプローブ光(Laser2)として使用した。どちらのレーザもパルス発生周期 80 MHz、中心波長 800 nm、パルス幅は約 150 fs である。まず 2 つの光源が発するパルスの周期を同期するために、両レーザの一部をビームスプリッタによって分離し、フォトディテクタを用いて電気信号に変換し取り込んだ。これらをもとに同期システムを用いて、Laser2 のキャビティ長をピエゾステージによって制御することで 2 台のレーザのパルスを同期した。ポンプ光については、 $\lambda/2$ 板により偏光方向を調整後、偏光ビームスプリッタによって p 偏光を透過させることでパワーを調整した。コーナリフレクタを用いて光路長を μm オーダで調整することで、ポンプ光とプローブ光が試料に到達する時間差を 55.3 fs の時間分解能で制御した。コーナリフレクタを通過後のポンプ光にはロックイン計測を行うため音響光学素子により 100 kHz の変調を施した。その後、波長 800 nm の光を反射するダイクロイックミラーにより反射させ、倍率 100 倍の対物レンズに入射した。プローブ光については第二次高調波発生源 (SHG) を用いてその中心波長を 400 nm に変換した。プローブ光の一部を参照光としてバランスディテクタに取り込み、残り一方を対物レンズを介して試料に照射し、試料表面で反射したプローブ光を検出光としてバランスディテクタへ取り込んだ。これをロックインアンプに入力することで、ポンプ光に与えた強度変調と同じ周波数成分のみを取り出し、ポンプ光がもたらした反射率変化を観測した。

また、光路外のライトを点灯し、アテネータを用いて光の強度を調整し、対物レンズ前のアテネータの表面からの反射光をマイクロ스코プに取り込むことで試料表面を顕微鏡観察して計測位置を調整した。

図2は、計測した多層グラフェンの共振振動の例である。周波数が 45 GHz という超高周波の共振計測が実現されていることがわかる。

多層グラフェン表面に、PASE リンカーが高密度で固定化されていることを確認するために、プロテイン A を表面に装飾した金ナノ粒子を用いて、これを PASE 固定化後のチップ表面に添加し、その後、よく洗浄してから原子間力顕微鏡 (AFM) にて表面を観察した。PASE の活性化末端は、プロテイン A のアミノ基と結合する。金粒子の直径は 20 nm であるため、AFM で金粒子を確認することで、リンカーが多層グラフェン上に固定されていることを間接的に評価することができる。結果、チップ表面に十分高い面密度において金粒子を確認することができ、本

研究で用いた固定化プロトコルの有効性が確認された。

本研究では、まず、センサーとしての能力を評価するために、IgG を標的たんぱく質として検出を試みた。IgG と特異的に結合するプロテイン A を PASE 末端に固定化し、その後、PASE の未反応末端と IgG との非特異結合を防ぐために、牛血清アルブミン (BSA) を添加し、ブロッキングした。そして、IgG 溶液の濃度を 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ng/mL と変化させて実験を行った。IgG 滴下前後に得られた波形から、共振周波数と Q 値を求め、これら 2 つの値から IgG 滴下による変化率を算出した。結果、共振周波数については、1 ng/mL 以上の濃度に対して有意な低下が観測され、Q 値については、0.1 ng/mL 以上の濃度に対して、有意な低下をしめした。このことから、検出限界が 0.1 ng/mL 以下であることが示唆された。これは、他の無標識バイオセンサーの検出限界と比較しても 1 桁程度低い値であり、高感度化されていることがわかる。

次に、医療現場においては頻繁に使用されているバイオマーカーである C 反応性プロテイン (CRP) の検出実験を行った。IgG 検出実験のときと同様に、PASE 末端に抗 CRP 抗体を固定化し、BSA によって未反応部位をブロッキングし、様々な濃度の CRP 溶液をインジェクションした。結果、検出限界が 1 ng/mL 以下であることが判明し、これについても、他の無標識バイオセンサー感度を大きく上回ることがわかった。

以上より、本研究にて提案した多層グラフェン振動しバイオセンサーが、非常に有望な無標識バイオセンサーとなり得ることが明らかとなった。

<引用文献>

1. H. Ogi, K. Matsumoto, Y. Fujita, T. Kawamoto, N. Nakamura, and M. Hirao, Appl. Phys. Express 3, 017001 (2009).
2. H. Ogi, T. Kawamoto, N. Nakamura, M. Hirao, and M. Nishiyama, Biosen. Bioelectron. 26, 1273 (2010).
3. M. Murakami, A. Tatami and M. Tachibana, Carbon 145, 23 (2019).
4. C. Thomsen, J. Strait, Z. Vardeny, H. J. Maris and J. Tauc, Phys. Rev. Lett. 53, 989 (1984).
5. C. Thomsen, H. T. Grahn, H. J. Maris and J. Tauc, Phys. Rev. B 34, 4129 (1986).
6. H. Ogi, M. Fujii, N. Nakamura, T. Yasui and M. Hirao, Phys. Rev. Lett. 98, 195503 (2007).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 萩 博次
2. 発表標題 最新MEMS水晶振動子バイオセンサー
3. 学会等名 大阪大学ナノ理工学人材育成産学コンソーシアム 令和2年度 第2回ナノ理工学情報交流会「これからのコロナテック」（2020年12月18日 大阪大学豊中キャンパス 文理融合型研究棟）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 萩 博次
2. 発表標題 最先端MEMS振動子バイオセンサー技術
3. 学会等名 一般社団法人電子情報技術産業協会 シーンオリエンテッド先端実装技術分科会発表会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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