

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22750073

研究課題名（和文） ナノアレー構造体を利用する透過型表面プラズモン共鳴センサの開発

研究課題名（英文） Development of transmission-type surface plasmon resonance sensor using nano array structures

研究代表者

中嶋 秀 (NAKAJIMA HIZURU)

首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授

研究者番号：10432858

研究成果の概要（和文）：

ナノビーズを2次的に規則配列させたナノアレー構造体の作製法およびこの構造体を用いる新規の透過型表面プラズモン共鳴(SPR)センサを開発した。ナノアレー構造体はナノビーズの自己集積化を利用して作製した。本研究で開発したナノアレー構造体の作製法は、従来の電子ビームを用いる作製法に比べ、簡便であり、センサチップを大量かつ安価に作製できるという利点がある。また、開発した透過型 SPR センサは感度に問題を残しているが、クレッチマン型や反射型グレーティング方式の SPR センサに比べ、光学系が単純で、装置をより小型化できるという利点を有している。また、光学系の位置調整も簡便であるので、CD 型センサチップを用いる SPR 測定に極めて有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

A novel method to fabricate a nano array structure and a transmission-type surface plasmon resonance (SPR) sensor using the nano array structures were developed. The nano array structure was fabricated by self-assembly of nano beads. The fabrication method is superior to other method using electron beam in cost and mass production. Although the developed SPR sensor has problems with sensitivity and reproducibility, compared to other SPR sensor based on Kretschmann configuration and grating coupling, the developed SPR sensor has advantages that the optical configuration is very simple and the miniaturization of the equipment is possible. Since the positioning of the optical system is also easy, the SPR sensor developed in this study would be useful for SPR measurement on a CD-type microfluidic device.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：ナノビーズ、ナノアレー、自己集積化、表面プラズモン共鳴(SPR)、化学センサ、バイオセンサ

## 1. 研究開始当初の背景

我々人間社会を豊かで安全で住みよいものにするには、科学技術研究に携わるものの使命である。近年、人類が作り出した数々の化学物質の中には人体に有害であるものも多く、ダイオキシンをはじめとする有害化学物質による環境汚染が社会問題になっている。また、食生活に目を向けると、食の安全性を脅かす農薬や0-157などの細菌による食品の汚染、あるいは食品の銘柄や産地を偽装した事件などが次々と明らかになっている。また、医療の分野では、新型インフルエンザなどの新興感染症が世界的に流行し、人類に脅威を与えている。

河川等において汚染物質を迅速に測定できれば、環境汚染の防止対策が迅速に行える。また、食品分析を迅速に行えれば、食品(特に輸入食品)の全検査が可能となり、食の安全を確保できると考えられる。また、感染症への感染の有無を迅速に検査できるシステムがあれば、それを空港等に設置することにより感染症の日本への流入を未然に防止できる可能性がある。

しかし、これらの分析や検査において使用される市販の装置は高価であるものが多く、測定に時間を要し、またオンサイトで測定できるようなポータブルではない。このため、現場で、誰もが、簡便、迅速かつ高感度に測定できる新しい分析システムの開発が求められている。

## 2. 研究の目的

著者らはこれまでに、小型でポータブルなコンパクトディスク(CD)型SPRセンサを開発している。これはCD上に作製した多数のマイクロチャンネルに、CDの回転による遠心力を利用して試薬と試料を導入し、試料中の各成分をマイクロチャンネル内壁に固定した種々のレセプタータンパク質との相互作用により分離した後、SPR現象を利用して検出する、これまでにない全く新しいSPRセンサである。本センサは送液にポンプやバルブを全く用いないため、システム全体の小型化が可能である。SPRセンサの光学系としては、クレッチマン型配置の光学系が汎用されているが、高価なプリズムを使用するため低コスト化は困難である。そこで、このCD型SPRセンサにはプリズムを用いない反射型グレーティング方式のSPR光学系を採用した。これにより、システム全体の小型化だけでなく低コスト化も実現できた。しかし、反射型SPR光学系はCDの回転により生じる“ぶれ”の影響を受けやすく、再現性に問題を残していた。

そこで本研究では、CD型SPRセンサの再現性の向上と光学系のさらなる小型化を目的として、ナノアレー構造体を利用する透過型

SPRセンサの開発を目指した。これまでにナノホールアレーを利用する透過型SPRセンサが報告されているが、ナノホールアレーの作製には通常電子ビームを用いるため低コスト化は困難である。そこで本研究では、ナノビーズを用いて安価に規則配列ナノ構造体を作製する方法を検討するとともに、これを用いた透過型SPRセンサを試作し、その性能を評価した。

## 3. 研究の方法

### (1) 規則配列2次元ナノビーズ構造体の作製

2次元ナノビーズ構造体は、溶媒の蒸発により生じるキャピラリーフォースによる自己集積化を利用して作製した。Fig.1に構造体の作製法を示す。まず、直径300nmのポリスチレン(PS)ナノ粒子を水と2-プロパノールの混合溶液に懸濁させ、これを半硬化状のPDMS基板上に滴下し、温度を25°C~50°C、湿度を6.4~97.3%に保った環境下で1日乾燥させることにより3次元ナノビーズ構造体を作製した。次に、作製した3次元構造体を水とエタノールの混合溶液に浸し、30分間超音波洗浄することによりPDMSに埋め込まれている最下層のビーズ以外の構造体を除去し、2次元ナノビーズ構造体を作製した。

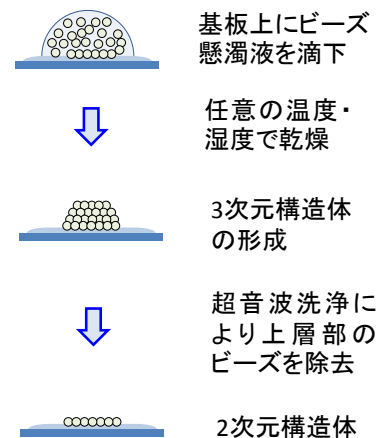


Fig.1 規則配列ナノビーズ構造体の作製方法

### (2) 透過型SPRセンサの開発

3-1で作製した2次元ナノビーズ構造体上に、真空蒸着法により金薄膜(50nm)を形成し、透過型SPRセンサ用センサチップを作製した。このセンサチップを試料溶液に浸した後、白色光をセンサチップに垂直に照射し、その透過光をマルチチャンネルCCD分光器で検出した。開発した透過型SPRセンサの光学系をFig.2に示す。

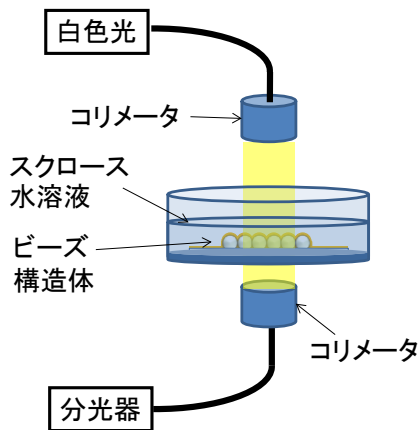


Fig.2 透過型 SPR センサの光学系

#### 4. 研究成果

##### (1) 規則配列 2次元ナノビーズ構造体の作製条件の検討

温度を 25℃一定とし、6.4~97.3%の湿度環境下で作製した 3次元ナノビーズ構造体を Fig.3 に示す。湿度 6.4~75.3%で乾燥させたとき、構造体はドーナツ状になり、ビーズの配列も不規則であった。これは乾燥湿度が低いとビーズ懸濁液の乾燥が早くなり、キャピラリーフォースによるビーズの集積化よりも早く溶媒が蒸発してしまうためと考えられる。これに対して、湿度 97.3%で乾燥させた場合、ビーズが規則的に配列した半球状の 3次元構造体を得られた。

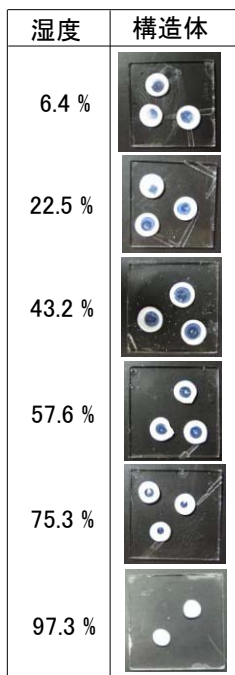


Fig.3 異なる湿度環境下で作製した 3次元ナノビーズ構造体の写真(温度：25℃一定)

そこで、湿度を 97.3%一定とし、温度を変化させたときの 2次元構造体の配列を比較した。25~50℃の温度環境下で作製した 2次元ナノビーズ構造体の SEM 像を Fig.4 に示す。Fig.4 の SEM 像から明らかなように、40℃で乾燥させた構造体が最も広範囲に規則的に配列しており、Fig.5 に示すその拡大図から、ナノビーズは単層で PDMS 層に半分埋め込まれた形で配列していることが確認できた。25℃や 50℃で配列が不十分だったのは、25℃ではビーズが配列するだけの十分な対流が起こらず、また、50℃では溶媒の蒸発が早くビーズが配列するための十分な時間がないためと推測される。

以上の結果から、SPR 測定に用いる 2次元ナノビーズ構造体は温度 40℃、湿度 97.3%の環境で作製することとした。

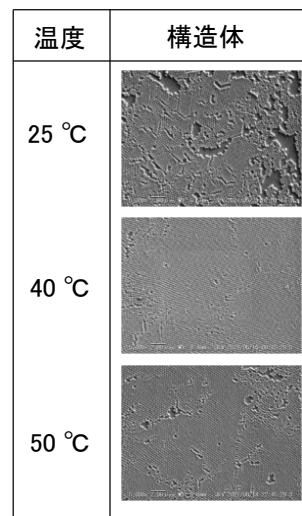


Fig.4 異なる温度環境下で作製した 2次元ナノビーズ構造体の SEM 像(湿度：97.3%一定)

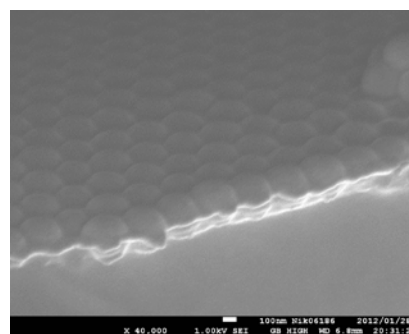


Fig.5 温度 40℃、湿度 97.3%の環境下で作製した 2次元ナノビーズ構造体の SEM 像

##### (2) 透過型 SPR センサの性能評価

水およびスクロース水溶液を用いて、作製したセンサチップを用いる透過型 SPR センサの性能を評価した。すなわち、センサチップ

を試料溶液に浸した後、白色光をセンサチップに対して垂直に照射し、その透過光を分光器で検出した。なお、透過光強度は、センサチップ上のビーズ構造体の存在する領域の透過光強度 (IB) を構造体が存在しない領域の透過光強度 (IG) で除することにより規格化した。得られた透過光強度と波長の関係を Fig. 6 に示す。水を試料としたとき、ビーズ構造体は赤色を呈し、640 nm 付近に吸収を示す曲線が得られた。さらに、スクロース水溶液を試料としたとき、この曲線はスクロース濃度の増加に従って長波長側にシフトした。このことから、640 nm 付近の吸収はビーズ構造体上で生じた SPR 現象によるものと考えられる。また、共鳴波長の変化量をスクロース濃度に対してプロットした検量線は、Fig. 7 に示すように良好な直線関係を示した。さらに、センサチップのビーズ構造体上に IgA 抗体を固定化し、BSA によるブロッキングを行った後 IgA を反応させると、IgA と IgA 抗体の複合体形成に基づく SPR 曲線の長波長側へのシフトが観察された。以上の結果から、規則配列 2 次元ナノビーズ構造体を用いる透過型 SPR センサにより免疫測定が可能なことが確認された。

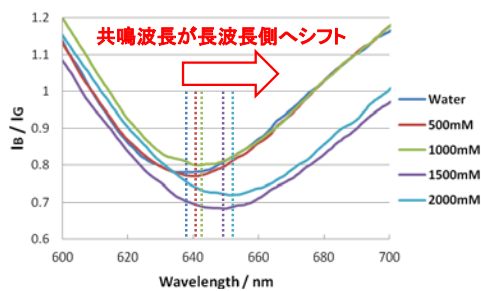


Fig.6 スクロース水溶液に対する透過光強度と波長の関係

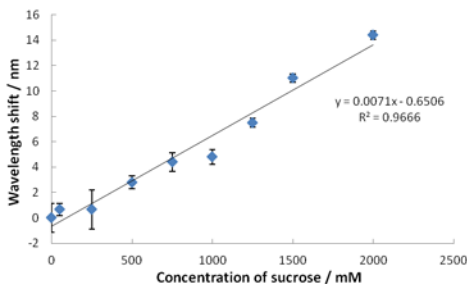


Fig.7 スクロースに対する検量線

### (3) 結論

本研究では、ナノビーズを用いて簡便にナノアレー構造体を作製する方法を開発するとともに、これを用いる新規透過型 SPR センサを開発した。透過型 SPR センサは、光学系

の位置調整が容易なので、CD 型マイクロチップを用いる SPR 測定に有用である。CD 型 SPR センサは装置全体の小型化が可能なので、これが実用化されれば、河川等における環境計測やベッドサイドでの医療検査が可能となり、地球環境保全や人類の健康福祉に大いに貢献するものと考えられる。

### 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 17 件)

1. 森岡和太, 中嶋 秀, 辺見彰秀, 曾 湖烈, 内山一美, コンパクトディスク型マイクロチップを用いる LED 誘起蛍光分析システムの開発と酵素免疫測定法への応用, *分析化学*, **62**, 65-71, 2013, ([https://www.jstage.jst.go.jp/article/bunsekikagaku/62/2/62\\_65/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bunsekikagaku/62/2/62_65/_pdf)), 査読有.
2. Akihide Hemmi, Ryosuke Mizumura, Ryuta Kawanishi, Hizuru Nakajima, Hulie Zeng, Katsumi Uchiyama, Noriaki Kaneki, Toshihiko Imato, Development of a novel two dimensional surface plasmon resonance sensor using multiplied beam splitting optics, *Sensors*, **13**, 801-812, 2013, (DOI: 10.3390/s130100801), 査読有.
3. Hulie Zeng, Yoriko Inoue, Kosuke Moritani, Moeka Nishiwaki, Hizuru Nakajima, Katsumi Uchiyama, Controllable construction of ordered three-dimensional microbeads structure and its application in enzyme-linked immunosorbent microarray, *Sensors and Actuators B*, **168**, 446-452, 2012, (DOI: 10.1016/j.snb.2012.04.007), 査読有.
4. Akihide Hemmi, Takashi Usui, Akihiro Moto, Tatsuya Tobita, Nobuaki Soh, Koji Nakano, Hulie Zeng, Katsumi Uchiyama, Toshihiko Imato, Hizuru Nakajima, A surface plasmon resonance sensor on a compact disk-type microfluidic device, *Journal of Separation Science*, **34**, 2913-2919, 2011, (DOI: 10.1002/jssc.201100446), 査読有.

[学会発表] (計 66 件)

1. Ryosuke Mizumura, Hizuru Nakajima, Akihide Hemmi, Hulie Zeng, Katsumi Uchiyama, Development of 2D surface plasmon resonance sensor using multi beam splitter, *RSC Tokyo International Conference 2012*, Makuhari Messe, Chiba, (2012.09.06).

2. Takashi Usui, Akihide Hemmi, Hui Zeng, Katsumi Uchiyama, Hizuru Nakajima, Fabrication of Nano Array Structure for Transmission Type Surface Plasmon Resonance Sensor, *PITTCON 2012*, 790-17P, Orlando, FL, USA, (2012.03.12).
3. Akihide Hemmi, Ryuta Kawanishi, Noriaki Kaneki, Toshihiko Imato, Katsumi Uchiyama, Hizuru Nakajima, Development of 2D Surface Plasmon Resonance Sensor Using Multi Beam Splitter, *242nd American Chemical Society National Meeting*, Denver, CO, USA, (2011.09.01).
4. Akihide Hemmi, Tatsuya Tobita, Takashi Usui, Akihiro Moto, Nobuaki Soh, Koji Nakano, Toshihiko Imato, Katsumi Uchiyama, Hizuru Nakajima, A surface plasmon resonance sensor on a compact disk-like microfluidic device, *Pittcon 2011*, Atlanta, GA, USA, (2011.03.14).

[図書] (計1件)

1. 中嶋秀, 他 56 名, 分析化学用語辞典, 全 461 ページ, 日本分析化学会分析化学用語辞典編集委員会編, オーム社, 2011, (ISBN 978-4-274-21091-4).

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: コンパクトディスク型マイクロチップ, その製造方法および分析システムならびに分析方法

発明者: 中嶋秀, 臼井崇, 内山一美, 辺見彰秀

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-189555

出願年月日: 2012 年 08 月 30 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0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.comp.tmu.ac.jp/uchiyama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 秀 (NAKAJIMA HIZURU)

首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授

研究者番号: 10432858

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし