

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750073

研究課題名(和文)高感度検出可能なフォトニック結晶構造の作製とラベルフリーバイオセンサーへの応用

研究課題名(英文)Fabrication of photonic crystal for high-sensitive label-free biosensor

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) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：高感度かつ簡便に疾病のマーカー分子を検出・定量可能なバイオセンサーは、疾病の早期診断を可能にし、個人の体調・体質に合わせた医療サービス受給に必要不可欠である。本研究は、ナノメートルサイズの周期構造を有する光学デバイス「フォトニック結晶(Photonic crystal: PhC)」の光学特性に着目し、バイオセンサー応用に適したPhC構造の最適化とそのバイオセンサー性能評価を行った。

研究成果の概要(英文)：For the future medical application, high-sensitive and simplified biosensor for detection of target molecules based on antigen-antibody reaction has been strongly desired. In this study, for development of novel high-sensitive biosensor, polymer-based photonic crystal (PhC) which has a periodic nanostructure was fabricated. For biosensor application, polymer-PhCs with different design (size, periodicity, and structure) were fabricated using electron beam lithography, and the sensing performances (sensitivity and dynamic range) using antibody-antigen reaction were investigated.

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：バイオセンサー フォトニック結晶 ナノインプリントリソグラフィー

1. 研究開始当初の背景

高感度かつ簡便に疾病のマーカー分子を検出・定量可能なバイオセンサーは、疾病の早期診断を可能にし、個人の体調・体質に合わせた医療サービス受給に必要不可欠である。しかし、現在は被験者が医療機関に赴き、専門家による血液検査や酵素免疫測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) を用いた診断が必要である。これら診断技術は、煩雑な操作、大型かつ高額な分析装置、酵素や蛍光物質のラベル化が必要である。これでは、採血による肉体的負担、分析結果が得られるまでの不安感 (精神的負担) が伴う。これら負担を軽減させるために、マーカー分子を高感度に検出・定量し、疾病の診断が可能なバイオセンサーが求められている。

一方で、ナノ光学素子「フォトニック結晶 (Photonic crystal: PhC)」が注目されている。PhC は、ナノメートルサイズの誘電体が周期的に配列した構造を有し、ブラッグ反射式に基づいて特定波長の光を反射させる光学素子である (図 1)。そして、その反射波長および強度は、PhC のサイズや周期、周囲の屈折率に依存して鋭敏に変化することが明らかとなっている (Y. A. Ylasov *et al.*, *Nature* (2005) 438(3) pp. 65-69.)

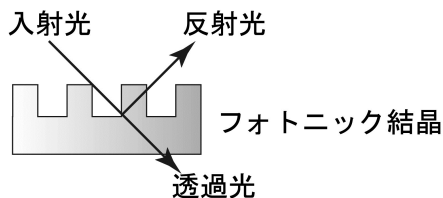


図 1 フォトニック結晶の光反射原理

近年では PhC が有する特性を利用し、光通信高速化・大容量化や太陽電池の発電効率向上、発光ダイオード高輝度化を目指した研究が世界で進められている (J. D. Joannopoulos *et al.*, *Nature* (1997) 386 pp. 143-149., D. H. Ko *et al.*, *Nano Lett.*, (2009) 9(7) pp. 2742-2746.)。また、PhC を利用したバイオセンサーの有用性がこれまでに明らかにされているが、光通信用途に設計された PhC であったため、抗原抗体反応によって生じる屈折率変化を高感度に検出するに至っていなかった (W. Zhang *et al.*, *Sens. Actuators B: Chem.* (2008) 131(1) pp. 279-284.)

我々は、これまでに PhC より観察される特定波長光の反射特性を利用し、抗原抗体反応を利用したバイオセンサーの開発を行ってきた (T. Endo *et al.*, *Sens. Actuators B: Chem.* (2010) 148(1) pp. 269-276.)。我々が開発したバイオセンサー応答は、PhC 表面へ抗体を固定化した後、抗原抗体反応によって周囲の屈折率が変化することを原理としている。この屈折率変化に伴う反射スペクトル変化を検出することで、抗原の検出・定量が可能となる

(図 2)。

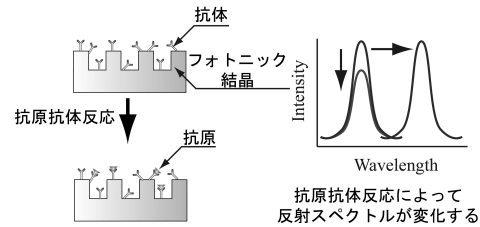


図 2 PhC を用いた

抗原抗体反応検出原理

しかし、こちらも発光ダイオード高輝度化に設計・作製された PhC を使用したため、PhC の構造が、バイオセンサー高感度化に果たす役割について明らかにできていない。

そこで、抗原抗体反応によって生じる屈折率変化に対して高感度かつ顕著に反射スペクトル変化を示す PhC の構造を明らかにすることで、さらに高感度な PhC バイオセンサーを開発することが可能と考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで明らかにされていなかった「PhC 構造と免疫センシング機能の関係」を明らかにし、従来の酵素免疫測定法よりも高感度かつ簡便に抗原抗体反応の検出が可能なラベルフリーバイオセンサーを開発することである。PhC は周囲の屈折率に依存して反射スペクトルの波長・強度が変化することが知られているが、その構造とセンシング機能の関係はまだ明らかにされていない。ここでは形状・サイズを系統的に設計した PhC を電子線描画装置を用いて作製し、観察される反射スペクトルの屈折率依存性について定量的評価を行う。そして、最も顕著な変化を示す PhC の構造を用いて、高感度・簡便・ラベルフリーで抗原を検出・定量可能なバイオセンサー開発を行うこととした。

3. 研究の方法

本研究は、以下の項目を実施した。

研究項目 1: 電子線描画装置を用いたフォトニック結晶の作製

ナノメートルサイズの周期構造を有する PhC を精度・再現性よく作製するために、電子線描画装置を用いて PhC を作製した。作製には、シリコン基板上へ電子線レジストをスピンコート法にて塗布した後、PhC 構造を描画した。なお、形状・サイズは描画条件 (描画線幅) を変化させることで、それぞれ異なるホールアレイ形状を有する PhC 構造を描画した。なお、本研究では、エッチング操作によって描画した構造が変化し、有限差分時間領域法 (Finite-difference time-domain method: FDTD 法) を用いたシミュレーション

によって得られた解析結果との差が生じることを防ぐため、描画した PhC 構造をそのまま評価に使用した。同時に、作製した PhC は、走査型電子顕微鏡および原子間力顕微鏡を用いて形状観察を行い、作製精度評価およびバイオセンサー性能評価に反映させることとした。

研究項目 2：屈折率応答性評価とバイオセンサー用フォトニック結晶の構造決定

本研究項目では、抗原抗体反応によって生じる微小な屈折率変化を検出するために適した構造を見出すための評価を行った。電子線描画装置を用いて作製した PhC を異なる屈折率を有する純溶媒(超純水、エタノール、メタノール)中へ浸漬させ、反射スペクトルの測定を行った。測定には、ファイバマルチチャンネル分光器を使用し、ファイバーから PhC へ白色光を照射し、その反射光を検出することで反射スペクトルの観察を行った。そして、大気中の反射スペクトルとの反射ピーク波長・強度変化量を測定し、最も高い単位屈折率あたりの変化量 (Refractive index unit: RIU) を示した構造を明らかにした(図 3)。

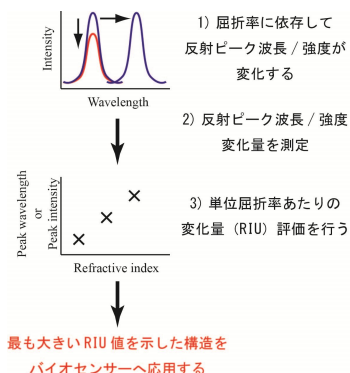


図 3 屈折率応答性評価方法

研究項目 3：フォトニック結晶表面への抗体固定化と抗原抗体反応の検出

研究項目 1,2 より得られた知見から、PhC を用いて抗原抗体反応の検出を行った。作製した PhC 表面へインスリンを特異的に認識・結合する抗体を固定化した後、異なる濃度に調製した抗原溶液を滴下し、抗原抗体反応によって生じる屈折率変化を検出した。

4. 研究成果

各研究項目より得られた成果は以下のとおりである。

研究項目 1：電子線描画装置を用いたフォトニック結晶の作製

サイズ 400 nm で作製した PhC の原子間力顕微鏡像を図 4 に示す。電子線描画装置を使用することで、目的とするサイズ・形状・周期

を有する PhC を作製することに成功した。なお、本研究では異なるサイズ(200~400 nm)

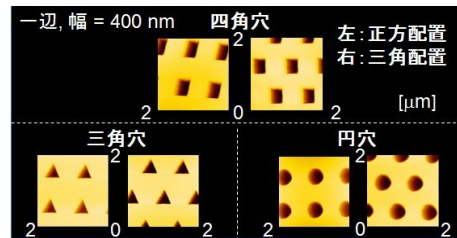


図 4 作製した PhC の
原子間力顕微鏡像

形状(四角・円・三角) 周期(正方形・三角配置)を有する PhC を作製し、屈折率応答性評価を行った。

研究項目 2：屈折率応答性評価とバイオセンサー用フォトニック結晶の構造決定

種々のサイズ・形状・周期にて作製した PhC の屈折率応答性を図 5 に示す。屈折率応答性評価を行った結果、最も高い RIU 値を示した PhC は、サイズ 400 nm、四角形状、三角配置の PhC (RIU = 480 nm) であった。この屈折率応答性は、リング共振器や表面プラズモン共鳴(Surface plasmon resonance: SPR)が有する性能よりも高いことから、本研究で作製した PhC は、既存のセンサーよりも高感度に周辺屈折率変化を検出することが可能であることを明らかにすることができた。

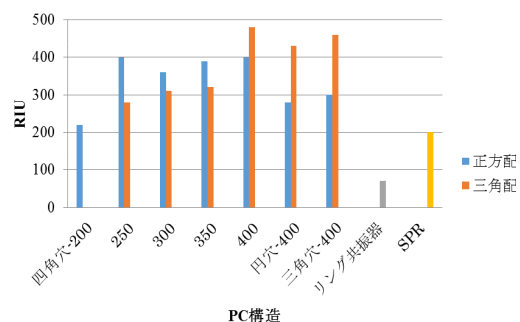


図 5 屈折率応答性評価結果

加えて、作製した PhC は、サイズに依存して反射ピーク波長がレッドシフトし、形状には依存しない事が明らかとなった。

さらに、異なる周期を有する PhC を用いて屈折率応答性評価を行った結果、三角配置の方が高い屈折率応答性を有することが明らかとなった。これは、単位面積あたりのホール占有面積が三角配置の方が大きく、異なる屈折率を有する試料溶液との接触面積が大きいためである。

本研究では、屈折率応答性評価と並行して抗原抗体反応の検出も実施することで、バイ

オセンサー応用に有効な PhC 構造を明らかにすることとした。

研究項目 3：フォトニック結晶表面への抗体固定化と抗原抗体反応の検出

PhC を用いた抗原抗体反応検出手順を図 6 に示す。バイオセンサー性能評価には、作製した PhC 表面へ抗ヒトインスリン抗体(1 $\mu\text{g/ml}$)を固定化した後、異なる濃度(0~100 $\mu\text{U/ml}$)に調製したインスリン溶液を滴下し、抗原抗体反応によって生じる屈折率変化を検出した。

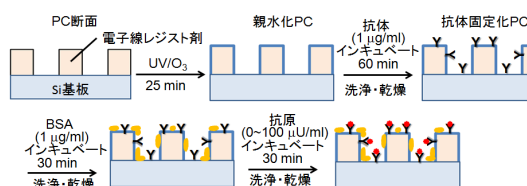


図 6 PhC を用いた
抗原抗体反応検出手順

種々のサイズ・形状を有する PhC より観察される反射ピーク強度のインスリン濃度依存性を図 7 に示す。抗体を固定化した PhC は、インスリン濃度に依存して反射ピーク強度が減少することが観察された。

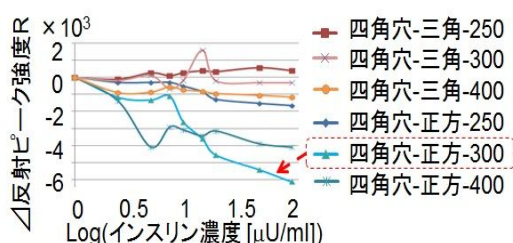


図 7 PhC ピーク強度の
インスリン濃度依存性

しかし、研究項目 2 で行った屈折率応答性評価で最も高い RIU 値を示した PhC 構造とは異なる PhC (サイズ 300 nm、四角形状、正方配置)の方が高い感度を有していることが明らかとなった。これは、純溶媒を滴下する屈折率応答性評価と異なり、PhC 表面にのみ抗体・抗原が局在しているためである。このバイオセンサー性能評価結果から、抗原抗体反応の高感度検出には、ホール内に抗原・抗体など検出対象となる物質が入ることが望ましいことが明らかとなった。

加えて、本研究で作製した PhC は、健常者の血中インスリン濃度(15 $\mu\text{U/ml}$)を検出することに成功した。

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 9 件)

1. T. Endo, C. Ueda, H. Kajita, N. Okuda, S. Tanaka, H. Hisamoto "Enhancement of fluorescence intensity of DNA intercalators using nano-imprinted 2-dimensional photonic crystal" *Microchim. Acta*, Vol. 189, 2013, pp 929-934. 査読有
2. N. Li, X. R. Cheng, A. Brahmendra, A. Prashar, T. Endo, C. Guyard, M. Terebiznik, K. Kerman "Photonic crystals on copolymer film for bacteria detection" *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 41, 2013, pp 354-358. 査読有
3. T. Endo, M. Sato, H. Kajita, N. Okuda, S. Tanaka, H. Hisamoto "Printed two-dimensional photonic crystals for single-step label-free biosensing of insulin under wet conditions" *Lab Chip*, Vol. 12, 2012, pp 1995-1999. 査読有
4. 遠藤達郎, ナノフォトニクスを駆使した高感度バイオ分析デバイスの開発, レーザー研究, Vol. 40, 2012, pp 926-930. 査読有

[学会発表](計 41 件)

遠藤達郎, 望月好宏, 末吉健志, 今井広明, 久本秀明, 「ナノインプリント製フォトニック結晶とスマートフォンを用いたノイラミニダーゼの検出」第 61 回応用物理学会春季学術講演会, 2014 年 3 月 17 日-20 日, 青山学院大学

遠藤達郎, 「プリンタブルフォトニックデバイスの作製とバイオ分析応用」レーザー学会学術講演会第 34 回年次大会, 2014 年 1 月 20 日-22 日, 北九州国際会議場

遠藤達郎, 「プリンタブルフォトニクスによるバイオセンサー開発」第 130 回微小光学研究会, 2013 年 12 月 6 日, 九州大学

遠藤達郎, 「フォトニック構造を利用したバイオセンシング」日本物理学会 2013 年秋季大会, 2013 年 9 月 25 日~28 日, 徳島大学

遠藤達郎, 梶田浩志, 和田正悟, 白石浩巳, 奥田徳路, 田中覚, 末吉健志, 久本秀明, 「ナノインプリント製フォトニック結晶を用いた非標識バイオ分析」第 74 回応用物理学会秋季学術講演会, 2013 年 9 月 16 日~20 日, 同志社大学

[図書](計 1 件)

T. Endo, "Localized surface plasmon resonance-based biosensor" in *Biochemical Sensors*, PAN STANFORD PUBLISHING, edited by Kiyoshi Toko, 2013, Part 3, Chapter 20, 377-392.

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：光学センサー及び該センサーの作製方法

発明者：遠藤達郎、安藝翔馬

権利者：遠藤達郎

種類：特許

番号：特願 2013-078232

出願年月日：2013 年 4 月 4 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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

遠藤 達郎 (ENDO, Tatsuro)

大阪府立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：4 0 4 3 2 0 1 7