

研究課題別評価

1. 研究課題名: 局在表面プラズモン増強を使った光倍高調波によるバイオチップの高密度化

2. 研究者氏名: 梶川浩太郎

研究員: 三井圭太(平成 15 年4月~平成 16 年 12 月)

研究員: 坪井一真(平成 16 年4月~平成 18 年 3 月)

3. 研究のねらい

局在表面プラズモン共鳴(LSP)で増強された光倍高調波(SH)光を用いてバイオ、化学、食品関連分野で活用できる非標識な(蛍光などの標識分子を用いない)マルチチャンネルセンシングプラットフォームの作成とその解析装置の開発をめざす。このセンシングでは、LSPが持つ周囲媒質の誘電率に共鳴条件が敏感であること、共鳴時には周囲に増強された電場が生じることを利用したものである。研究では非標識という特徴を活かしてタンパクのセンシングを中心に検討を行った。非線形光学過程を用いるため単純な反射や吸収を利用した場合と比べて高い感度が得られる。また、このLSP-SHセンサは、既存の非標識バイオセンサの一種である(伝播型)表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサに比べて高い空間分解能を有するところに特徴がある。センサのドットサイズを小さくし、既存のマルチチャンネルSPRバイオセンサに比べて単位面積あたりのセンシングドット数が 10^2 倍のLSP-SHセンシングチップを作成とそれを検出する顕微光学分光装置の開発を目標とした。

研究では、以下に示す個々項目について研究を行い、最終的にそれらを統合した。

- (1) 高い効率でLSPを励起し、かつ、SH活性なナノ構造の創製
- (2) LSPチップの作成と目的のリガンド分子を塗布する装置の開発
- (3) 高い分解能と感度を有するSH顕微分光装置の開発
- (4) LSPによる電場解析と非線形光学効果への拡張
- (5) LSP-SH用の新しいバイオセンシング手法の提案

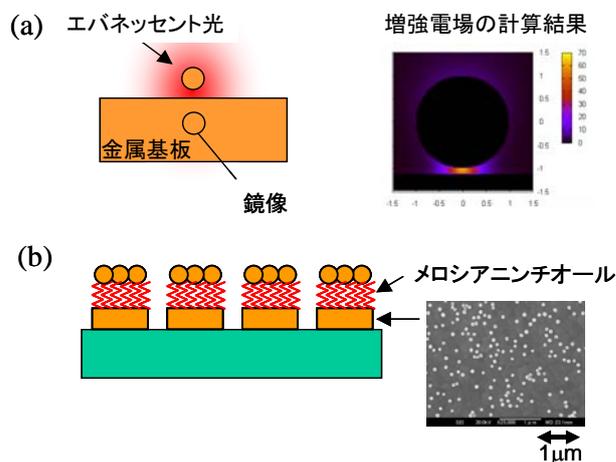


図1SIGN システムと増強電場の計算結果(a)、チップの模式図およびSEM写真(b)。

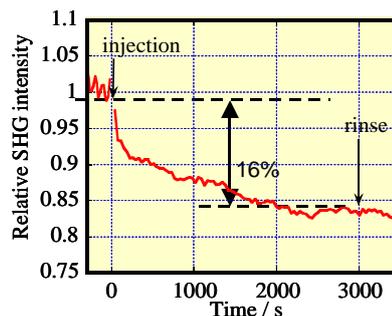


図 2 LSP-SH 光によるアビジンの結合過程の検出

4. 研究成果

4-1 LSP-SH活性なナノ構造の創製

まず、光学的に均一な系でLSPによる高い増強電場が得られる構造を探索した。様々な系を検討した結果、作成方法の容易さや再現性、よく規定された構造が作成できる点で、図1(a)に示すような金薄膜の表面上に1~2nm 程度の高さに固定化した金ナノ微粒子(SIGN)が、今回の目的に最も適している

いう結論を得た。以下、この系をSIGNシステムと呼ぶ。SIGNシステムのナノギャップを支持する材料には直径 80~100nm の球状金ナノ微粒子をメロシアンチオール自己組織化単分子膜(SAM)が最適であると結論し、それを利用して金表面に固定化したSIGNシステムを用いることにした。この系では、金表面に対するSH光強度の増強度が非常に大きく、最大で58000倍と実測された。これを用いて、アビジンタンパクのLSP-SHセンシングを行った結果を図2に示す。分子の結合とともにSH光強度が減少し、結合終了とともに一定となる。この他、DNAなどの分子についても同様のセンシングができることを確認した。

4-2 LSPチップの作成

SIGNシステムをマイクロドット状にパターンングしてセンシングアレイを作成する方法を検討した。まず、メロシアンSAMをUVフォトリソグラフィーによりドット状にパターンングし、そこへ金ナノ微粒子を固定化する方法(チップA)、不活性なSAMをUVフォトリソグラフィーによりネガティブなドット状に除去し、そこへメロシアンSAMを堆積してから金ナノ微粒子を固定する方法(チップB)、パターンングした金薄膜上にメロシアンSAMと金ナノ微粒子を固定する方法(チップC)などを検討した。その結果、本研究ではチップCを採用することにした(図1(b))。理由は、チップAではタンパクに対して活性な金表面が露出する点で好ましくなく、これを改善したチップBではアレイヤーで精度良くスポットを行うのが難しいためである。チップCのドットヘリガンド分子をスポットすることができるアレイヤーを考案して作製した。市販のピンタイプのアレイヤーは表面にダメージを与える可能性があるためである。この装置ではマイクロキャピラリの先端にシリコンゴム(PDMS)を塗布して、微動機構を用いてコントロールする。

4-3 SH顕微分光装置の開発とバイオセンシング

最終的にはドットサイズが 20 μ m のLSP-SHバイオセンシングチップを目指すため、分解能 5 μ m のSH顕微鏡を目指した。走査型ではなく冷却 CCD を用いて画像として読み込むことによりスループットをあげることにした。冷却CCDには、電子冷却で-75 $^{\circ}$ Cまで到達し、バックイルミネーションタイプでSH光波長 400nm でも十分な感度を持つCCDを選んだ。レーザーにはブロードバンド TiSa レーザーを用いて波長を 720-900nm の範囲で可変として測定を行った。波長を変えることにより様々な共鳴条件でセンシングを行うことができるようになる。その結果、分解能 5 μ m でSH光信号 0.01cps(各画素における)の信号を読み取ることができるSH顕微分光装置を作製した。これは、現在報告されているSH顕微鏡の中で最も良い感度である。

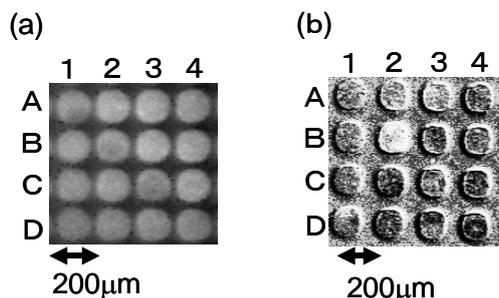


図3 LSP-SHバイオセンシングチップによるアビジンの検出結果。(a) 非特異結合を利用してA1、B2、C3のドットの金微粒子上に直接アビジンを結合させた場合。(b) 特異結合の場合。リガンドをB2ドットの金微粒子上に塗布しアビジンを結合させ、アビジン結合前後のSH光強度の差をイメージしたもの。

この装置を用いてLSP-SHバイオセンシングチップを観察した。まず、確認のため金ナノ微粒子表面への非特異結合を使って3つのLSPドットアレイ(A1、B2、C3)にアビジンを吸着した。これをSH顕微測定したものが図3(a)である。A1、B2、C3のドットにおいて周囲のドットに比べてSH光強度が31%低下しており、この手法が高感度であることがわかる。次にリガンドであるビオチンへのアビジンの結合を検出した結果を図3(b)に示す。これはアビジンの結合前後の差をイメージングしたものであり、リガンドであるビオチンが結合したドットB2がはっきりとわかる。これ以外のドットにもアビジンは非特異結合を起こしSH光の変化が生じているが、特異結合では表面からの距離が1分子層分(数 nm)だけ離れているためSH光強度の低下が小さい。ドットB2が明るくイメージングされているのはそのためである。DNAのハイブリダイゼーションの追跡でも同様の結果が得られている。このようにLSP-SHバイオセンシングでは、分子の結合状態や表面からの距離などの詳細な情報を知ることができる。これを利用したさらに高感度・多機能測定を行うためのバイオセンシング手法については4-5に述べた。

4-4 電場解析と非線形光学効果への拡張

SIGNにおけるSH光の起源を知ることが基礎的な興味だけでなく高感度なバイオセンシングをめざす上でも重要な知見となる。最近よく用いられているFDTD法は金ナノ構造で十分な精度を得られる保証が無いこと、非線形光学への展開が難しいこと、等の理由によりラプラス方程式を直接解く方法を選んで電磁場の解析を行った。その結果、反射スペクトルやSH光強度は実験と良い一致がみられ、この方法が妥当であることがわかった。SH光の起源に関する詳細な検討を行った結果、SIGNをサポートする材料としてAUTのような非線形感受率が小さい材料を用いた場合にはナノギャップ中からのSH光強度は打ち消し合い微粒子の上半分からのSH光強度が支配的であること、メロシアンチオールのような非線形感受率を持つ材料を用いた場合にはそこからSH光強度の寄与が支配的であること等がわかった。これらの知見はSH光に対するSIGNの応答だけでなくSIGNをSERSや蛍光測定などへ応用した場合にも重要な知見となる。

4-5 LSP-SH用の新しいバイオセンシング手法の提案

SIGNシステムの光学応答は、単に分子間の相互作用に基づく結合や吸着をモニターできるだけでなく、様々な情報を与えてくれることがわかった。たとえば、SIGNの共鳴条件は表面からの距離に依存するため、SIGNシステムの反射スペクトルやSHスペクトルを測定することにより、分子の表面への結合構造、吸着構造に関する知見を得ることができる。今回測定したアビジンは、反射スペクトルから見積もられたサイズが2nmでありX線回折などの手段で得られたのものより小さいので、吸着による構造変化が起こっていることが示唆される。また、分子をSIGNのサポート層に用いることによりSH光のみでなくSERS等の振動分光にも適用できるため、分子の検出や吸着構造の研究に有力な方法である。単純なアフィニティーバイオセンシングと異なり様々な情報を得ることができるので、将来的に発展すると思われる。

5. 自己評価

本研究の目的はLSPにより増強されたSHGを使ってバイオセンシングを行う手法を開発し、それをアレイ化することによりマルチチャンネルセンサーシステムを作成することである。ポスドク研究員の2名と研究者の専門分野は互いに相補的であり、足りない部分を補いあって研究を進めることができた。タンパク分子の物理が専門の研究員はリガンド分子の固定化等の部分を担当して生体由来分子の扱いに不慣れな我々に作製条件の最適化行ってくれた。また、もう一人の研究員はシステムの構築およびセンサープラットフォームの開発を担当した。これら2名の研究員と研究室所属の学生の力を借りて作製したSH顕微分光システムおよびその観察技術は世界最高水準であると考えている。

最初にLSP-SHを使ってアフィニティーバイオセンシングを増感し分解能を上げるためにSH光を用いるというアイデアを実証した。ここでは、単に測定を行うだけでなくSH光の起源や共鳴状態との関連を実験と理論の両方から検討した。結果として、メロシアンSAMを用い80~100nm径の金ナノ微粒子

を金基板上に固定化した系(SIGN)が最適であるという結論を得ることができた。次に、SIGNを材料に用いたバイオチップの作成方法の検討を行った。半年にわたって作成条件の検討を重ねたが、目標達成のためにはチップCが最適であるという結論に達し、 $\phi 120\mu\text{m}$ のドットを使って2種類の検出方法でLSP-SHセンシングの動作を実証した。既存のマルチチャンネルバイオセンサよりもセンシングドットの密度が1桁半高いものが作成できたことになる。しかし、当初目標は2桁高いものを作成することであったので、この点はわずかに目標には届かなかった。原因は、我々が作製したアレイヤーの精度が思ったほどよくなかったため、再現性良く数 $10\mu\text{m}$ のドットにサンプルを打てなかったことにある。既にチップは、 $20\mu\text{m}$ 角の SIGN ドットが作られており、そこからの SH 光イメージが得られている。チップとシステムの性能は充分なので、この部分を解決して動作が確認できるよう研究を進める。

また、この方法の最大の問題点はコストが高いということである。光源にTiSaレーザーを用い、ディテクタには冷却CCDを用いるためである。これを解決するため、最近小型で低コストな Nd:YAG を用いてチップの観察を行った。その結果SH光強度測定感度は落ちるものの工夫次第で利用が可能であることがわかった。SIGNシステムを使ったバイオセンシングは、単純なアフィニティーの測定だけでなく、結合構造、吸着構造の知見を得ることができるということを提案した。SERSやCARS、IR-SFG(赤外和周波数発生)、蛍光増強への展開も可能であり、多機能なバイオセンサ、バイオセンシングチップへと展開していくと考えられる。よって、ハイエンドなセンシング手法として継続して研究すべきであると考えます。

以上をまとめると、本研究はドットサイズにおいては当初目標にわずかに届かなかったが、LSP-SHによるバイオセンシングを最初の実証し、それをシステム化したという点において、成果を上げたものと考えている。さらにこれを進めて、多機能化へむけた新しいセンシング手法の開発を行っていきたい。

6. 研究総括の見解

倍高調波信号周波数が局在表面プラズモンに共鳴する時には、その信号光強度は増大する。この原理を用いて、金属微粒子上に付着したタンパク質を高感度で感知するシステムの構築を目ざした。

倍高調波発生を最も増強する系を探索し、直径 $80\sim 100\text{nm}$ の球状金ナノ微粒子をメロシアンチオール自己組織化単分子膜上に並べ、それを金薄膜上に分布させる系を選んだ。このバイオセンシングチップにアビジンを塗布した時には、倍高調波発生強度に有意の変化を観測している。更に分解能 $5\mu\text{m}$ の倍高調波顕微鏡を目指して、冷却 CCD を用いて画像として読み込む努力を払っている。

光源にチタンサファイアレーザーを用い、ディテクターには冷却 CCD を用いるため、コスト高になる問題点と、「どの様なタンパク質をどの程度識別できるのか」との問題の解決に向け努力が払われている。これらの難問を解決して、実用に耐える製品に結実することを願っている。

7. 論文等

論文(20件(原著論文12件、解説論文8件))

1. Keita Mitsui, Yoichiro Handa and Kotaro Kajikawa, "Optical fiber affinity biosensor based on localized surface plasmon resonance", Appl. Phys. Lett. 85 (2004) 4231-4233.
2. Ryo Naraoka, Haruki Okawa, Kazuhiko Hashimoto and Kotaro Kajikawa, "Surface Plasmon Resonance Enhanced Second-Harmonic Generation in Kretschmann Configuration", Opt. Commun. 248 (2005) 249-256.
3. Ryo Naraoka and Kotaro Kajikawa, "Phase detection of Surface Plasmon Resonance Using Rotating Analyzer Method", Sens. Actuators B (Chemical) 107 (2005) 952-956.
4. Kazuma Tsuboi and Kotaro Kajikawa, "Second harmonic generation enhanced by local surface plasmon resonance", Proceedings of SPIE Vol. 5928 (2005) 59280P.
5. 梶川浩太郎「金ナノ微粒子中の局在表面プラズモンを用いた光ファイババイオセンサー」レーザー研究 33(9) (2005) 603-608. 他15件

特許(3件)

1. 梶川浩太郎「局在化表面プラズモンセンサ、センシング装置およびセンシング手法」
出願人:財団法人理工学振興会 特許願 2004-309844. 2004年10月25日
2. 梶川浩太郎「表面プラズモン増強走査型ポツケルス顕微鏡表面プラズモン共鳴を用いた誘電体薄膜の分極検出装置及び検出方法」出願人:国立大学法人 東京工業大学
特許願 2005-029856 2005年2月4日
3. 梶川浩太郎、三井圭太「微量試料ホルダ、微量試料用センサーセット及び微量試料の検出方法」
出願人:独立行政法人科学技術振興機構 特許願 2005-091684 2005年3月28日

受賞(1件)

1. 平成16年度丸文学術奨励賞「ナノ領域に局在した表面プラズモン共鳴増強非線形光学効果とバイオセンシングデバイスに関する研究」

招待講演 (7件)

1. Sinya Abe, Kazuma Tsuboi, Kotaro Kajikawa, "Localized Surface Plasmon Resonance Enhanced Second-Harmonic Generation", Second International Nanophotonic Symposium Handai (INPS 2004) Plasmonics from fundamentals to applications, July 27, 2004, Osaka University.
2. Kotaro Kajikawa, Keita Mitsui, "Optical fiber biosensor based on localized surface plasmon resonance in gold nanoparticles", Optics East —SPIE Conference 5593—, Philadelphia, USA, October 28, 2004.
3. Kotaro Kajikawa, "Nano-Liter Biosensing Using Localized Surface Plasmon Resonance", Third Symposium on Nanophotonics Science and Technology, Taroko, Taiwan, 14 September, 2005.
4. 梶川浩太郎、「局在化プラズモンバイオセンシング」 ナノ学会創立大会(神戸大学)
平成15年5月31日 神戸大学
5. 梶川浩太郎「表面プラズモン共鳴を利用した有機超薄膜の評価とバイオセンシング」
第10回分子システムシンポジウム(文部科学省 21世紀 COE「分子情報科学の機能イノベーション」)九州大学 2004年1月6日 他2件

一般発表(招待講演以外)

国際会議21件、国内会議32件