

日本ードイツ 国際共同研究「オプティクス・フォトンクス 第2期」 令和2（2020）年度 年次報告書	
研究課題名（和文）	プラズモニック金属ナノ構造を用いた高感度・高機能性 SERS/OW/LSPR バイオセンサーの開発
研究課題名（英文）	Novel plasmonic materials based on nanogap features for ultrasensitive and reproducible SERS/OW/LSPR biosensing for biomedical applications
日本側研究代表者氏名	民谷 栄一
所属・役職	産業技術総合研究所 先端フォトンクス・バイオセンシング オープンイノベーションラボラトリー ラボ長
研究期間	2020年10月1日～2023年9月30日

1. 日本側の研究実施体制

氏名	所属機関・部局・役職	役割
民谷栄一	産業技術総合研究所 先端フォトンクス・バイオセンシングオープンイノベーションラボラトリー ラボ長	研究統括 LSPR イムノセンサーの設計
寺田侑平	産業技術総合研究所 先端フォトンクス・バイオセンシングオープンイノベーションラボラトリー 特別研究員	LSPR イムノセンサーの作成と評価
羅 希	産業技術総合研究所 先端フォトンクス・バイオセンシングオープンイノベーションラボラトリー 特別研究員	ナノ金属 LSPR センサーの設計と評価
齋藤真人	大阪大学大学院 工学研究科 物理学系専攻 応用物理学コース 助教	LSPR イムノセンサーの製作と特性解析
大崎脩仁	大阪大学大学院 工学研究科 物理学系専攻 応用物理学コース 博士学生	ナノイムノセンサーの評価

西森 靖	古野電気株式会社 技術研究所 取締役 技術研究所長	研究統括
春岡正起	古野電気株式会社 技術研究所 研究部 光電波センサ研究室 室長	研究管理、連携推進
多田啓二	古野電気株式会社 技術研究所 研究部 光電波センサ研究室 主任	OW バイオセンサーの開発、解析
梶 祥一郎	古野電気株式会社 技術研究所 研究部 光電波センサ研究室 一般社員	OW バイオセンサーの開発、解析
栗田昌昭	田中貴金属工業株式会社・新事 業カンパニー・担当研究員	SERS/EC-SERS バイオセンサーの設 計、作製
麻田敬雄	田中貴金属工業株式会社・新事 業カンパニー・部長	SERS/EC-SERS バイオセンサーの設 計、作製
窪田 秀一	田中貴金属工業株式会社・新事 業カンパニー・チーフマネー ジャー	SERS/EC-SERS バイオセンサーの設 計、作製
田中慎一	呉工業高等専門学校・自然科学 系分野・准教授 呉医療センター・中国がんセン ター 院外研究員（兼任）	生体分子修飾技術の開発及び生体計 測技術の構築
黒木太司	呉工業高等専門学校 電気情報 工学分野 教授 呉医療センター・中国がんセン ター 院外研究員（兼任）	生体計測の最適化及びデータ解析
江口正徳	呉工業高等専門学校 電気情報 工学分野 准教授 呉医療センター・中国がんセン ター 院外研究員（兼任）	生体計測の最適化及びデータ解析

2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

本年度は既存の手法で作製したセンサー基板上に、生理活性を維持した生体分子固定化法について確立するだけでなく、LSPR/OW/SERS/EC-SERS イムノ/バイオセンサーの作製及びそれらのセンサー特性を評価し、計測条件について最適化する。加えて、FDTD 法を用いた電場増強の計算や LabVIEW を用いた導波光学及び電磁波光学に基づくシミュレーションも行い、高感度な LSPR/OW/SERS/EC-SERS バイオセンサー構造の設計も実施する。

1. 日本側研究チームの実施概要

本年度は当初の計画通り研究を進め以下のような成果が得られた。

①**LSPR バイオセンサーの作製・評価**：局在表面プラズモン共鳴（LSPR）は標的分子の結合による局所的な屈折率の変化を吸収率スペクトルピークのレッドシフトとして検出することができる。LSPR を誘起する貴金属ナノ構造には金ナノ粒子や金ナノピラーなどがある。

ここでは、複数のアルミナポーラスモールドから金ナノピラー基盤を作製し、それぞれの屈折率応答の評価及び、金で覆われたナノピラー表面での抗原-抗体相互作用の検出について検討した。金のナノピラーで囲まれたマイクロウェルを持つ基板を作製し、細胞の捕捉と LSPR による細胞分泌の in situ イメージング測定を行った。その結果、細胞の捕捉率は 86% であることが確認され、また、マイクロウェル周辺の金表面には LSPR の吸収ピークが観測され、ナノ-マイクロ集積構造の作製に成功したことが示された。さらに、金表面に抗 IL-6 抗体を固定化したところ、細胞の周囲で吸光ピークがシフトする様子を観察することに成功した。これらの結果から、ナノ・マイクロ集積基板を用いることで、LSPR により細胞のサイトカイン分泌を検出することが示された。

②OW バイオセンサー及び光学系の設計：LabVIEW に実装したプログラムの妥当性を、市販のビーム伝搬法を用いたシミュレーションソフトとの比較により検証した。(図左) 2 つのシミュレーション結果が良く一致し、最適な伝搬層厚さが存在することが示された。また予定には無かったが、LabVIEW に FDTD を実装し、グレーティング構造によるビームの出射効率を評価し、グレーティングの周期を少し変えるだけで出射効率が大きく変わることが示された。以上を踏まえて OW センサーの設計を行った。LabVIEW を用いたビーム光学に基づくシミュレーションにより、解像点数が最大となるような OW センサ及びレンズ等光学部品の相対距離を計算した。市販の光学部品を選定し、前記最適な相対距離と光学部品の干渉を考慮し、光学系の設計を CAD を用いて行った。

③バイオセンサー作製へ向けたナノ電極構造の設計：(1) 加工工程の検討 ドイツで作製するナノインプリントでナノ構造を施した樹脂シートに 30nm 前後の金薄膜を形成するとフォトニック結晶が得られる。金をさらに厚く形成するとナノ構造が厚膜に埋もれて光活性を消失し一般的な電気配線となる。そこで、ドイツ側で用意したナノ構造をもつ基板を調達し、反応場エリアに厚さ 30nm 程度の厚さの金薄膜をドット状に形成し反応場とし、次いで 200nm 以上の厚い金膜で配線を形成することにした。(2) 電極の設計 2 インチ角の石英基板の中央に、60 個の金反応場を配置し、外側に引き出すリード線、基板外に信号を取り出す電極を構成する図面を作成し、使用上の不都合を検討した。(図中央)

④金属ナノ構造への生体分子固定化法の検討：本年度は金属表面に生理活性を維持した生体分子 (DNA/RNA/抗体/シグナル分子など) の固定化技術の開発について実施した。特に、高輝度でかつ生体適合性が高い金属 (金及び白金) ナノ粒子を用いて抗体分子の標識手法の開発について実施し、癌細胞のマーカータンパク質の特異的染色や蛍光顕微鏡観察によってその生理活性について評価した。さらに、本研究では、Protein A をアダプタータンパク質として利用した分子修飾法についても検討した。Protein A は抗体の抗原認識部位とは無関係な Fc 領域と選択的に 4 箇所では結合できるため、直接金属表面に固定してもその活性は維持される。金属ナノ粒子で標識した抗体分子を癌細胞 (MDA-MB-231) へ投与し、蛍光顕微鏡観察を実施した。その結果、細胞表面から金属ナノ粒子からの明るい蛍光が観察され、細胞表面のマーカータンパク質の特異的検出に成功しただけでなく、本修飾法を用いることによって金属ナノ構造表面へ生体分子の生理活性を維持した生体分子修飾は可能であることを確認できた。(図右)

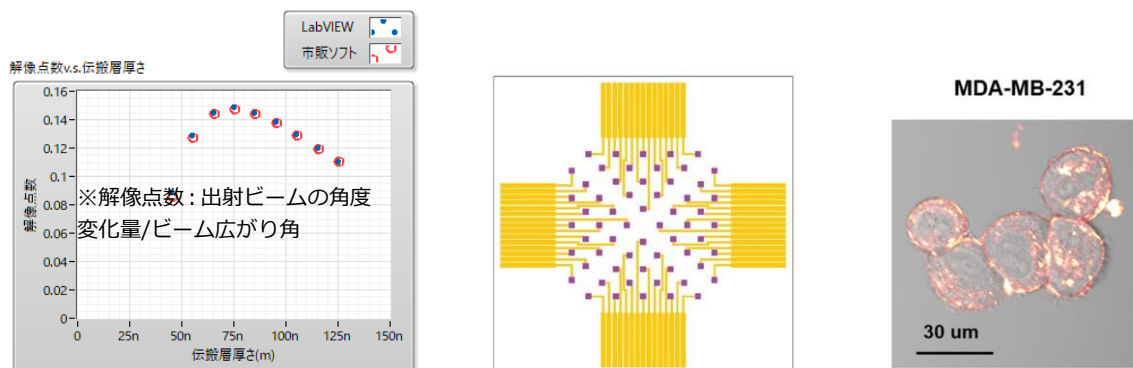


図 （左） LabVIEW に実装したプログラムと市販のシミュレーションソフトの比較、（中央）設計した金属ナノ電極構造、（右）白金ナノ粒子（発光波長：630 nm）で標識した乳癌細胞（MDA-MB-231）の蛍光画像