

| | |
|--|---|
| 日本ードイツ 国際共同研究「オプティクス・フォトニクス 第2期」 2022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 | 大阪大学 産業科学研究所・特任教授 |
| 研究期間 | 2020年10月1日～2024年3月31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 | 大阪大学 産業科学研究所 特任教授 | 研究統括 LSPR イムノセンサーの設計 EC バイオセンサーの設計 |
| 永井 秀典 | 産業技術総合研究所 先端フォト ニクス・バイオセンシングオー プンイノベーションラボラトリ 副 ラボ長 | ナノバイオセンサーの評価 |
| Wilfred Espulgar | 産業技術総合研究所 先端フォト ニクス・バイオセンシングオー プンイノベーションラボラトリ 副 ラボ長 | ナノ金属 LSPR センサーの設計と評 価 |
| Gueriba Jessiel | 大阪大学 産業科学研究所 特任研究員 | ナノ金属 LSPR センサーの設計と評 価 |
| 合田 真紀子 | 産業技術総合研究所 先端フォト ニクス・バイオセンシングオー プンイノベーションラボラトリ 研 究補助員 | データ調査 |

| | | |
|--------|--|----------------------------|
| 齋藤 真人 | 大阪大学大学院 先導的学際研究機構 特任准教授 | LSPR イムノセンサーの製作と特性解析 |
| 大崎 脩仁 | 産業技術総合研究所 先端フォトニクス・バイオセンシングオープンイノベーションラボラトリ 協力研究員 | 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 フェロー | 研究統括 |
| 春岡 正起 | 古野電気株式会社 技術研究所 第2研究部 第2研究部長 | 研究管理、連携推進 |
| 佐藤 隆宣 | 古野電気株式会社 技術研究所 第2研究部 光応用研究室 室長 | OW バイオセンサーの開発、解析 |
| 多田 啓二 | 古野電気株式会社 技術研究所 第2研究部 光応用研究室 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 第2研究部 光応用研究室 一般社員 | OW バイオセンサーの開発、解析 |
| 河尻 武士 | 古野電気株式会社 技術研究所 第2研究部 光応用研究室 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・新事業開発統括部・主任 | 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・新事業開発統括部・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・新事業開発統括部・チーフマネージャー | SERS/EC-SERS バイオセンサーの設計、作製 |
| 松村 徹 | 田中貴金属工業株式会社・新事業開発統括部・マネージャー | SERS/EC-SERS バイオセンサーの設計、作製 |
| 権藤 麻衣子 | 田中貴金属工業株式会社・新事業開発統括部・研究員 | 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 |
| 氷室 貴大 | 呉工業高等専門学校 電気情報工学分野 特命准教授 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

2022 年度は、ドイツ側で改良・発展させた金属ナノ構造上に DNA/RNA/抗体/シグナル分子などの生体分子を固定化して高再現性、高感度、高集積化、小型化 LSPR/SERS/OW/EC-SERS バイオセンシングデバイスの作製及び評価を実施する。さらに、エクソソームや細胞についても検出・単離可能なナノ電極や計測条件を検討し、将来的に臨床試料へも応用可能な生体計測技術の開発も実施する。加えて、臨床試料について評価することで、医療診断技術の確立を目指す。

3. 日本側研究チームの実施概要

2022 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) ナノ構造 LSPR センサーの設計と評価：ドイツ側の連携先である temicon によって製造されたニッケルモールドを使用して、シクロオレフィンポリマー (COP) 上にナノインプリントリソグラフィ (NIL) と Au スパッタリングを使用して Au ナノ構造を作成し、楕円形のナノピラー/ナノホール アレイを作製することができた。ほぼ均一な楕円形（楕円率～1.73）のナノピラーとナノホールが六角形のアレイ構成で規則正しく配置されており、光の偏光角を変えると Au チップの特性スペクトルが変化することがわかった。バイオセンシングへの可能性をテストするために、アプタマーアッセイを使用して診断マーカーであるトロンビンの測定を検討した。1 μ M アプタマーの存在により観察可能なレッドシフトを示した。

(2) 誘電泳動法と抗体の分子特異性を利用したエクソソーム検出技術の開発：エクソソームの捕集効率は電極間の電場強度に依存する。そこで、先の尖ったギザギザ型アルミ電極がお互い向き合った捕集デバイスを設計・作製し、電極間電場強度の増強及びエクソソームの捕集効率について評価した。作製した捕集デバイスを利用して、印加電圧、周波数、溶液の導電率について最適化し、colo201 細胞由来エクソソーム（直径約 70 nm）の捕集に成功した。蛍光染色したエクソソームの捕集について、蛍光観察を実施したところ、エクソソームは電場強度が最も強くなるギザギザ電極の先端間（電極間）に特異的に吸着する様子が確認された。

(3) ナノプローブ sensor の開発及び in vivo イメージングへの応用：本研究では癌のマーカータンパク質である癌転移活性化因子(PAR1)に加え、PAR1（癌転移）を活性化するペプチド結合加水分解酵素(MMP1)もターゲット分子として選択し、*in vivo* イメージングについて実施した。PAR1 や MMP1 に対して特異的に結合する白金ナノプローブ（発光波長：630 nm、740 nm）を乳癌のモデルマウスへ投与後、蛍光観察によって白金ナノプローブの癌腫瘍への集積が確認された。さらに、癌組織について 3 次元計測を実施したところ、癌細胞表面から明るい蛍光が観察され、癌組織や癌細胞内における PAR1 の局在や分布について評価できた。

(4) ①OW センサー上への生体分子足場材料の修飾プロセスの確立：OW センサー上に、シランカップリング剤等の架橋剤を用いて CM デキストランを修飾することに成功したが、現在非特異吸着等の問題が顕在化しており、2023 年度に改善の取り組みを行う。②**ドイツ側との協力によるガラス基板の OW センサーの作製：**ドイツ側がナノインプリントによりグレーティングを形成したガラス基板に、EB 蒸着及びダイシングを行い、ガラス基板の OW センサーチップを完成させた。③**ガラス基板の OW センサーの評価：**屈折率標準液を用いて所望の特性が得られることを確認した。また、樹脂チップとガラスチップで組成の異なる溶液切り替え時の応答を比較した結果、ガラスチップの方が特性が良いことを確認した。

（５） EC-SERS バイオセンサー作製へ向けた電極構造の設計：ドイツ側から提供を受けたナノ構造を持つ基板(以下 NIP 基板)に金の膜厚を複数種形成し、実際に出来上がった膜構造をデータ化し、光学シミュレーションと実測を行った。肉眼で構造色を得ていた薄い物に加え、厚く形成したものにおいても隣接する柱の間にナノギャップができることが確認された。2023 年に作製する SERS センサは、金を 20,40nm という薄い領域と、250nm の厚いものとする。膜厚を最適化した EC-SERS センサを、NIP 基板上に形成し、単一物質計測用の試作品を完成させ、大阪大学にて計測を依頼する。次いで、集積型についても試作を進め、大阪大学に評価を依頼する。