



ボトムアッププロセスで構築した プラズモニックメタ表面による生体分子計測

當麻 真奈

東京工業大学 工学院 電気電子系
〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259

Biomolecular measurements using plasmonic meta-surfaces fabricated by a bottom-up process

Mana Toma

Tokyo Institute of Technology, School of Engineering,
4259 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, 226-8501, Japan

概要

本研究では、ボトムアッププロセスで作製可能なプラズモニックメタ表面を、疾病や健康状態に関わる生体分子を簡易かつ高感度に検出するバイオセンサーに応用することを目的とした。ポリスチレンナノ粒子膜に金属薄膜を蒸着した金属ナノドーム構造が、鮮やかなプラズモニック色を示すことを明らかにし、比色型のプラズモニックバイオセンサーによって、簡易な光学系で生体分子計測が可能であることを示した。

背景

金属表面の自由電子が光の電磁波によって共鳴振動を起こす表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象は、金属表面近傍の屈折率変化を高感度に計測可能な表面分光法 (SPR 分光法) として利用されている。プラズモン共鳴を起こす金属表面を特定の生体・化学物質と親和性を持つ抗体などの生体分子で機能化し、基板表面に捕捉された生体・化学物質の検出を行うのがプラズモニックバイオセンサーである。プラズモニックバイオセンサーは簡易かつ高感度に様々な生体・化学物質の検出が可能な化学センサーとして、医療診断、食品検査、環境スクリーニングなどへの応用が期待されている。^{1,2}

このように応用面でのプラズモニックバイオセンサーの重要性が高まる一方、従来の SPR 分光法ではプリズムなどの光

学素子や回転機構などを含む測定装置が使用されており、その小型化・簡略化が課題となっていた。そこで、近年注目を集めているのが、プラズモニックメタ表面と呼ばれる金属ナノ構造配列である。プラズモニックメタ表面は、プラズモニック特性を持つ波長以下の大きさの金属ナノ構造を配列したもので、金属光沢に代表されるようなバルク状態の金属の光学特性とは全く異なる性質を示す。これまでに、プラズモニックメタ表面をセンサー基板として用いることで、小型化した装置で高感度な医療診断マーカー検出の可能性が報告されている。³ 本研究では、センチメートル四方の面積に作製が可能で、かつ作製のコストが低いボトムアッププロセスを用いてプラズモニックメタ表面を作製し、バイオセンサーへ応用することを目的とした。

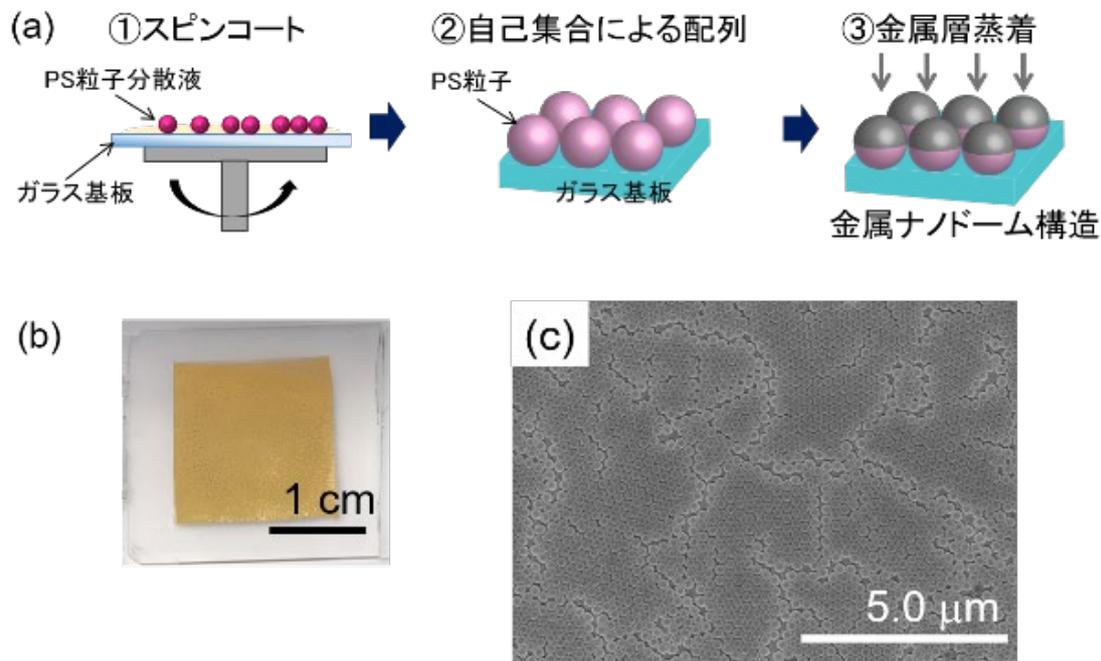


図 1 (a) 本研究で用いた金属ナノドーム構造の作製方法の概要。銀ナノドーム構造の (b) 写真と (c) 走査型電子顕微鏡像。

2. 結果

2.1 金属ナノドーム構造の作製

本研究ではボトムアッププロセスで作製可能なプラズモニックメタ表面として、ポリスチレンのナノ粒子膜上に金属薄膜を製膜した、金属ナノドーム構造を用いた。図 1 (a) に金属ナノドーム構造の作製方法を示す。まず、直径 200~500 nm の粒径のポリスチレンナノ粒子(PS 粒子)分散液をエタノール、微量の界面活性剤と混合し、洗浄したガラス基板の上にスピコート法で塗布した。溶媒の蒸発に伴う自己集合プロセスによって PS 粒子が配列し、この PS 粒子膜上に金属薄膜を 50 nm を蒸着することで、金属ナノドーム構造を作製した。金属種としては銀を使用した。直径 250 nm の PS 粒子を用いて作製した銀ナノドーム構造の写真と走査型電子顕微鏡 (SEM) 像を図 1 (b) および (c) に示す。PS 粒子膜の作製にスピ

ンコート法を用いることで、数センチメートル角の面積に、比較的均一な金属ナノドーム構造を作製することに成功した。また、SEM 観察から、金属ナノドーム構造は 2 次元の六方晶系で配列していることが分かった。また、図 1 (b) の写真からも明らかなように、銀ナノドーム構造は、いわゆる銀色ではなく金色に発色した。これは、銀ナノドーム構造のプラズモン特性によるプラズモニック色であり、微細構造によって銀本来の金属反射とは異なる光学特性を示す、プラズモニックメタ表面であると考えられる。

2. 2 金属ナノドーム構造の

プラズモニック色

図 1 (b) に示した通り、銀ナノドーム構造はプラズモニック色を示した。そこで、PS 粒子の粒径および配列状態によるプラズモニック色の調整を試みた。^{4,5}図

2に銀ナノドーム構造の作製に用いる PS 粒子の粒径を 200、250、300 nm と変化させた際の銀ナノドーム構造の反射スペクトルと反射像を示す。ここで、銀ナノドーム構造表面は水と接している。PS 粒子の粒径が大きくなるにつれて、プラズモン共鳴に起因する反射スペクトル中のディップ波長 (λ_{dip}) が長波長シフトしていくことがわかる。それに伴い、銀ナノドーム構造の発色も黄色、紫、青緑色と大きく変化する様子が観察された。

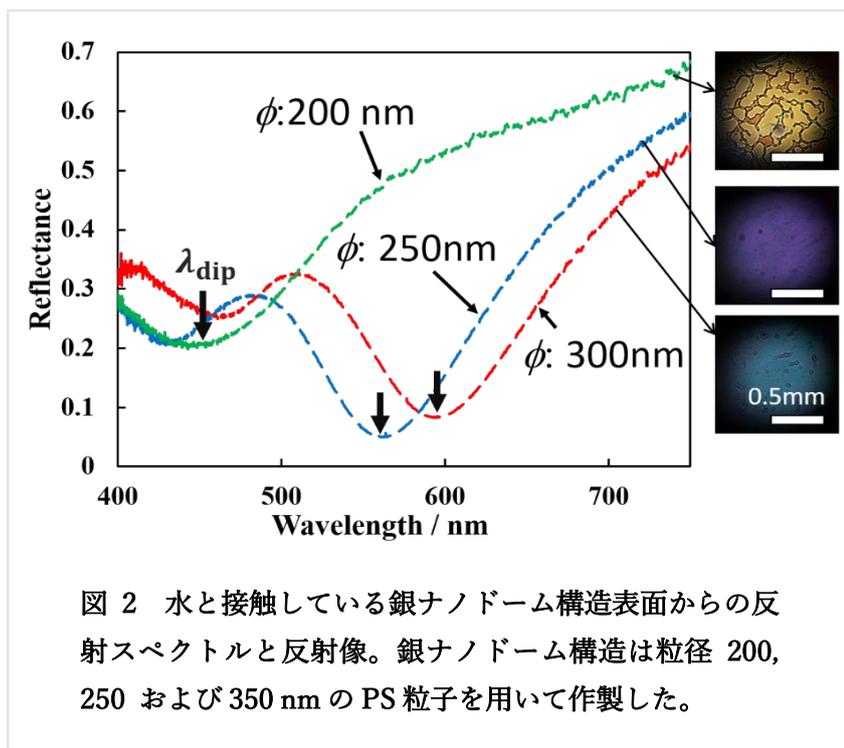


図 2 水と接触している銀ナノドーム構造表面からの反射スペクトルと反射像。銀ナノドーム構造は粒径 200、250 および 350 nm の PS 粒子を用いて作製した。

続いて、PS 粒子の配列状態によるプラズモニック色の調整の可能性についての検証を行った。PS 粒子のスピンコート溶液の濃度を変えることで、PS 粒子の表面被覆率を変化させた。図 3 に、PS 粒子膜の被覆率を、低被覆率、高い被覆率ならびに多層膜にしたときの銀ナノドーム構造の SEM 像と反射像を示す。スピンコートする PS 粒子溶液を希釈し、被覆率を低下させると、PS 粒子は 2 次元のクラスター

を形成した。それによって、銀ナノドームの反射強度が低下し、基板の表面は暗い紫色に発色した。PS 粒子溶液の濃度を調整し、被覆率が高くなると、反射率が高くなった。ここから更に PS 粒子溶液の濃度を濃くすると、PS 粒子は多層膜を形成し、所々で図 1 (c) のような四方晶の配列構造が観察された。それに伴い、銀ナノドーム構造の発色も、高被覆率の時の薄黄色から、山吹色へと変化する事が分かった。

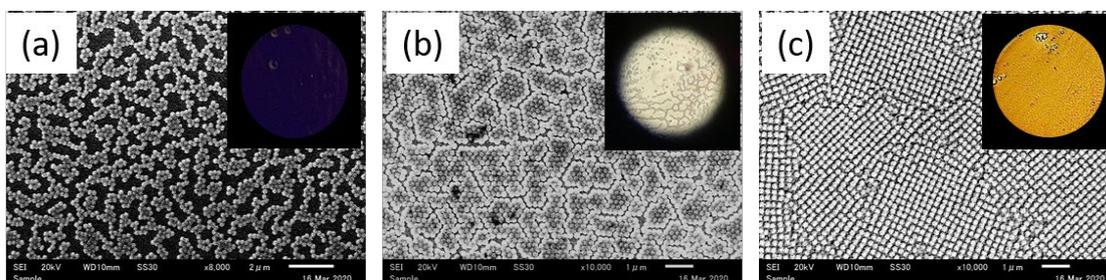


図 3 銀ナノドーム構造の SEM 像と反射像。スピンコートの条件を変えることで、PS 粒子膜の被覆状態を (a) 低被覆率、(b) 高被覆率、(c) 多層と変化した。

2. 3 比色型プラズモニック

センサーへの応用

最後にボトムアップ法で作製した銀ナノドーム構造を用いた生体分子計測法として、比色型のプラズモニックセンサーへの応用を行った。⁴ここでは、粒径 250 nm の PS 粒子で作製した銀ナノドーム構造に、酸化防止膜として金薄膜を蒸着したバイメタル構造をセンサー基板として使用した。また、検出の対象としては、モデル物質としてウサギ IgG の検出を行った。

センサー基板表面は、ポリドーパミン薄膜による化学修飾を行った後に、抗ウサギ IgG を捕捉抗体 (cIgG) として固定化し、ウシ血清アルブミン (BSA) によるブロッキングを行った。測定には、分光計測とセンサー基板表面のカラー画像取得

が同時に実施可能な光学系を使用した。モデルイムノアッセイの結果を図 4 に示す。図 4 (a) および (b) はアッセイの各段階で測定した反射スペクトルと反射画像である。センサー基板表面を PBS バッファと接触させると、反射スペクトル中の λ_{dip} が大きく長波長シフトするとともに、センサー基板の色も山吹色から紫色に変化した。捕捉抗体と BSA の結合による λ_{dip} の変化の様子は、 λ_{dip} のキネティクス計測によって観察した。図 4 (c) に示すキネティクス計測では、cIgG 溶液の注入直後に λ_{dip} が変化しており、cIgG がセンサー基板表面に結合していることが確かめられた。また、モデルの標的分子であるウサギ IgG の注入時にも、 λ_{dip} の長波長シフトが観察された。図 4 (b) に示す画像から、ウサギ IgG の結合を目

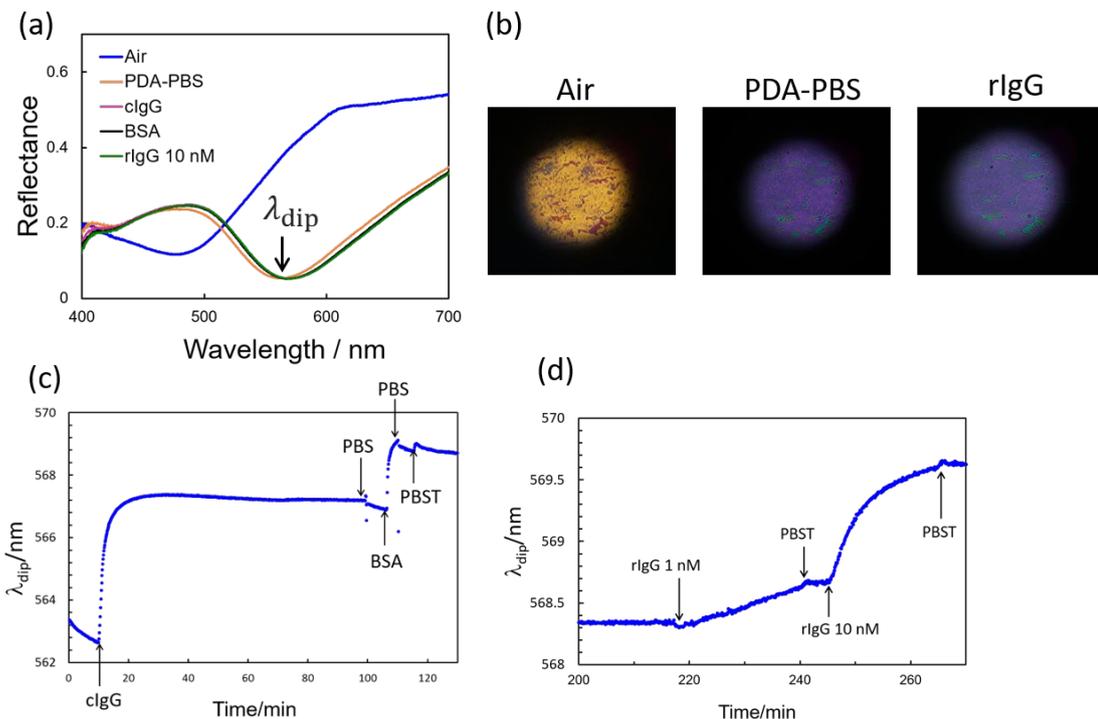


図 4 ウサギ IgG を検出するモデルイムノアッセイの各段階における (a) 反射スペクトルと (b) 反射像。センサー基板への (c) 捕捉抗体 (cIgG) と BSA の固定化、(d) ウサギ IgG 溶液注入時のキネティクス測定結果。

視で確認することは困難であるが、センサースポットの画像領域の RGB 値を平均化し、色相角度を指標とすると、色の变化からウサギ IgG を定量に検出できることが確かめられた。ウサギ IgG の濃度を変えて、校正曲線を作成し、モデルイムノアッセイの検出限界濃度を評価した結果、信号増強剤を使用しない直接検出で、サブ nM レベルのウサギ IgG を検出できることが明らかとなった。⁴

3. まとめ

本研究では、ボトムアッププロセスで作製可能なプラズモニクメタ表面を利用した生体分子計測法として、金属ナノドーム構造のプラズモニク色を用いた比色型のプラズモニクバイオセンサーを提案した。プラズモニクメタ表面からの発色をセンサー信号として用いることにより、バイオセンサーの測定系の小型化・簡略化が可能となることが期待される。

[謝辞]

本研究は、高柳健次郎財団の助成により行われました。多大なご支援を賜りましたこと、厚くお礼申し上げます。

[参考文献および発表論文]

- (1) Homola, J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (2), 462-493. DOI: 10.1021/cr068107d.
- (2) Piliarik, M.; Párová, L.; Homola, J. High-throughput SPR sensor for food safety. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (5), 1399-1404. DOI: 10.1016/j.bios.2008.08.012.
- (3) Belushkin, A.; Yesilkoy, F.; González-López, J. J.; Ruiz-Rodríguez, J. C.; Ferrer, R.; Fàbrega, A.; Altug, H. Rapid and Digital Detection of Inflammatory Biomarkers Enabled by a Novel Portable Nanoplasmonic Imager. *Small* **2020**, *16* (3), 1906108. DOI: 10.1002/smll.201906108.
- (4) Toma, M.; Itakura, Y.; Namihara, S.; Kajikawa, K. Sensitive Label-Free Immunoassay by Colorimetric Plasmonic Biosensors Using Silver Nanodome Arrays. *Adv. Eng. Mater.* **2023**, *25* (3). DOI: 10.1002/adem.202200912.
- (5) Mana Toma, Y. I., Kotaro Kajikawa. Effect of Arrangement of Ag Nanodomains on Performance of Plasmonic Sensor. *Sens. Mater.* **2021**, *33*, 201-209.