

Study on NanoBiosensing based on Controlling Photons/Ions in Nanospace

篠原, 修平

<https://doi.org/10.15017/1931713>

出版情報 : 九州大学, 2017, 博士 (理学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

Study on NanoBiosensing based on
Controlling Photons/Ions in Nanospace

ナノ空間における光/イオン制御に基づくナノバイオセンシングに関する研究

篠原 修平

目次

1. General Introduction	3
1-1 バイオセンサーの現状	3
1-2 本研究の意義	7
1-3 カラリメトリックバイオセンシング法	9
1-3-1 バイオセンシングの歴史的背景	9
1-3-2 従来型カラリメトリックバイオセンシング法の原理	13
1-3-3 本論文のカラリメトリックバイオセンシング法の原理	17
1-4 ナノポアデバイス	19
1-4-1 ナノポアデバイスの原理	19
1-4-2 ナノポアデバイスに関する先行研究	22
1-5 本博士論文の目的と構成	27
1-5-1 プラズモンフルカラーカラリメトリックバイオセンシングの目的	27
1-5-2 縦型 PDMS ナノポアの開発の目的	27
参考文献	28
2. プラズモンフルカラーを用いたカラリメトリックバイオセンサー	31
2-1 イントロダクション	31
2-2 実験	32
2-2-1 銀微粒子二次元シートの作製	32
2-2-2 金微粒子二次元シートの作製	32
2-2-3 ビオチン導入金微粒子（ターゲット粒子）の合成	34
2-2-4 ビオチン固定化表面の作製	34
2-2-5 紫外可視吸収スペクトル	37
2-2-6 走査型電子顕微鏡（Scanning Electron microscopy, SEM）観察	39
2-2-7 表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance, SPR）測定法	39
2-2-8 Maxwell-Garnett 理論	42
2-2-9 Finite-Difference Time-Domain（FDTD）シミュレーション	45

2-3	実験結果と考察	46
2-3-1	実験による銀微粒子シート積層数の検討	46
2-3-2	SPR 法による金微粒子の吸着の確認	48
2-3-3	金微粒子の表面被覆率の評価	48
2-3-4	金微粒子の吸着による消光スペクトルおよび呈色変化	54
2-3-5	金微粒子の表面被覆率と吸光度の相関	56
2-4	まとめ	66
	参考文献	67
3.	縦型 PDMS ナノポアの開発	68
3-1	イントロダクション	68
3-2	実験	69
3-2-1	PDMS ポアデバイスの作製	69
3-2-2	イオン電流測定	73
3-3	実験結果と考察	73
3-3-1	PDMS ポアの評価	73
3-3-2	ノイズの評価	73
3-3-3	過渡応答	77
3-3-4	ポリスチレン微粒子の測定	77
3-4	まとめ	84
	参考文献	85
4.	総括	86
4-1	プラズモンフルカラーを用いたカラリメトリックバイオセンサー	86
4-2	縦型 PDMS ナノポアの開発	87
4-3	将来展望	88
	研究業績	89
	謝辞	95

1. General Introduction

近年、病院内・家庭内での医療診断・研究・食品安全などの領域においてバイオセンサーの需要はますます高まっている。一般的にセンサーに求められる特性は、ターゲット分子に対する選択性、高い感度、応答速度、ラベルフリーであることや、化学的・物理的な安定性があげられる。これらに対して、物理・化学・生物の分野から数多くの研究がなされてきた。しかし、未だにこれらの点において理想とするバイオセンサーの開発には至っていない。本章ではバイオセンサーの全体像、現状、現在抱えている問題に関して記述し、本博士論文の目的と概要を述べる。

1-1 バイオセンサーの現状

近年、IOT (Internet of Things) 社会の実現に向け、我々の生活のあらゆる場所であらゆる情報をセンシングすることが求められており、それに伴いセンサーの開発需要は著しく伸びてきている。センサーの市場規模は、2014年度から2019年度にかけて416億1000万ドルから505億2000万ドル (1ドル=110円換算) まで成長し、今後、年間のセンサー市場成長率は 21.4% であることが予想されている¹⁾。2019年度のセンサー世界市場では、光・電磁波、熱的・時間・空間雰囲気センサーが市場の半分を占めており、化学・バイオセンサーの需要は全体の13%となっている (図1-1)。この化学・バイオセンサー技術は、臨床的、非臨床的な応用が期待されており、その範囲は、医療、生物兵器防衛、環境モニタリング、食品工業と非常に幅広く、今後さらなる市場拡大が期待されている。実際に高齢社会やヘルスケア基盤改善といった予防医学は日々進歩しており、さらに新興国の発展に伴う診療デバイスの需要拡大など、これらの分野におけるバイオセンサー市場の拡大が予想されている。また、地球の温暖化に伴う感染症の拡散、世界規模の物流の整備に伴った病気・感染症の蔓延など、今後医療以外の分野でもバイオセンサーの需要が大きくなることが予想されている¹⁾。

Markets and Marketsによると、2013年のバイオセンサー市場は113億9000万ドル

カテゴリー別構成比(2019年度/金額)

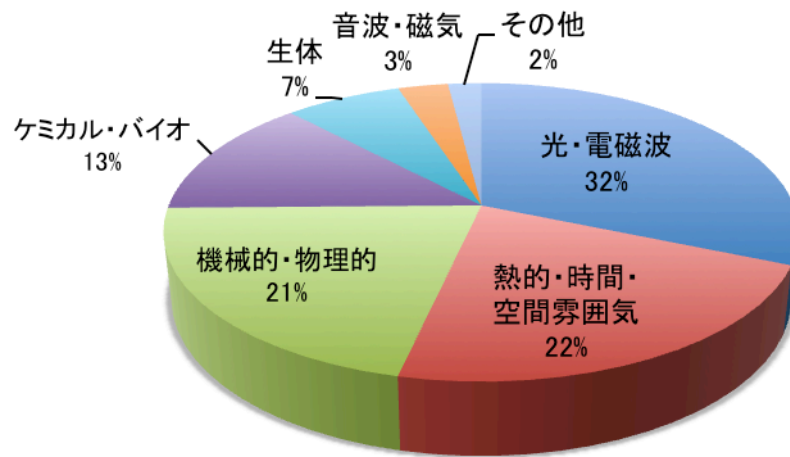


図1-1 世界市場におけるセンサーのカテゴリー別構成比¹

だったが、2014-2020年の期間に年平均10.00%で成長して、2020年には226億8000万ドルに達すると予測されている²。これらのことから、バイオセンシング技術の発展は社会的に大きな価値があると言える。

バイオセンサーの基本技術は、生体分子が持っている分子認識能力を基盤としている。具体的には、ターゲットとなる物質を認識する受容体はそのターゲットと相互作用した時に発生する物理的または化学的な変化を光や電気信号などで検出している。代表的な生体分子反応には、酵素-基質、ホルモン-レセプター、抗原-抗体などがあり、受容体をセンサーデバイスに用いることでターゲット（検体）を検出している³。

現在すでに実用化されているバイオセンシング技術としてイムノクロマト法を使用した妊娠検査薬が挙げられる⁴。この方法では、検体である尿に含まれる抗原の有無を識別している。はじめに、妊娠した際に尿に含まれる抗原のhCG（ヒト絨毛性ゴナドトロピン）が、hCG抗体を修飾した金ナノ粒子に吸着する。その後、その金ナノ粒子が判定紙上を移動し、判定紙に固定化された別の抗体と結合することで、赤紫色の判定ラインが表示される（図1-2）⁵。この金ナノ粒子を用いたイムノクロマト法は複雑な計測機器を使用せず、その簡便性から実用化に至ったと言える。こういった簡便なバイオセンサー技術は、新興国などでのインフラ整備の整っていない場所や災害被災地における応急的な感染症の検出、さらに空港検疫所における水際対策など、機器の持ち込めない環境や、その場検出が求められる場所においても有効的である⁶⁻⁹。しかしながら、イムノクロマト法では十分な量の抗原を必要とするため、尿中のhCGなど、濃度の高い検体しか検出できない。また、呈色反応であるため定量的な検出ができないなどの課題も残されている。

ここで「検出感度」に関する基本的な考え方について説明する。一般に「検出限界」（minimum limit of determination: QOD）とは、ある装置で検出できる物理量の最小値のことである¹⁰。リファレンス測定あるいは試料測定におけるデータのばらつきから求めた標準偏差 σ を用いて数学的に決まる値である。一方で、分析実験における「定量下限」（minimum limit of Quantitation: QOD）とは、信頼性を持って定量的に検出できる検出対象の最低量を指す。すなわち再現性などの信頼性も加味して決定される値である。前者は装置の固有値であるが、後者は試料の性質にも影響を受ける。装置開発の場合、多くは前者の値をもって性能を示すが、バイオセンシングなど測定法の開発の場合は、後者の値で示すの

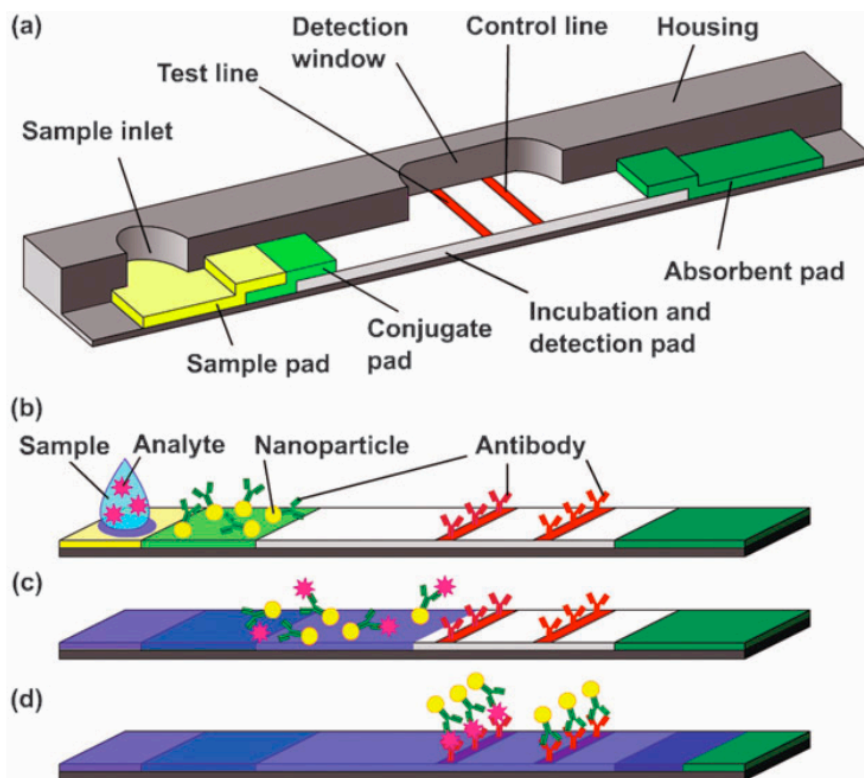


図 1-2 イムノクロマト法を使用した妊娠検査薬の原理と呈色までのステップ
 (a)妊娠検査薬の概略図(b)液体のサンプルを滴下時の様子(c)抗体を修飾した金微
 粒子と結合し流路を流れる様子(d)それぞれのラインに抗原-抗体反応により金
 粒子が固定化される様子⁵

が一般的である。そして「検出感度」とは、正しくは検出限界の濃度依存性、つまり検量線の傾きを示す値である。ある状態変化に対する信号の変化が大きい状態が「高感度」である。しかし実際の研究現場では、検出限界や定量下限の向上に対して「高感度検出」と表現する機会が多い。本論文でも慣例に従い、検出限界あるいは定量下限の向上をもって「高感度測定」としてとり扱う。

バイオセンシングの場合、測定感度は検出対象の溶液濃度の下限で示すのが一般的である。そのため、nM (nanomolar: 10^{-9} M)、pM (picomolar: 10^{-12} M)、fM (femtomolar: 10^{-15} M)、aM (attomolar: 10^{-18} M) などのモル濃度がセンサー性能を示す指標として使用される¹⁰。研究開発の現場では、低濃度検出の限界を目指して、大面積表面を使う様々な手法が開発されており、代表的なものが伝搬型表面プラズモン共鳴 (SPR) センサー、光導波路センサーなどである¹¹。これらは尿検査など、検体が多量にある場合に適した高感度検出法である。しかし検体が血液の場合は、むしろ微量分析 (液量を増やすための希釈を必要としない測定法) の開発が求められる。これに対して考案されたのが、ナノやマイクロ空間を用いた検出法で、代表的なものが、マイクロサイズの流路の中に混合、攪拌、反応、分離、抽出などの機能を集積化したマイクロ流路デバイス (micro total analysis system (μ TAS)) である¹²。これを使えば、検体である血液を希釈することなく、高濃度のまま分析ができるので、検出の濃度限界以上での検出が可能になる。もちろん両手法を組み合わせることで、より優れたバイオセンシングデバイスの開発が可能になる。

一方で、これらの既存の手法にはすでに限界が見え始めている。それは、多くの場合検出される信号の強度は検出対象の濃度に対して線形的に応答するという、さらに、その信号は分散を持つ集団の平均値であるということによる。本論文では、これら一般的なデバイスを超える新しいセンシングデバイスとして、「カラリメトリックバイオセンシング法」と「ナノポアデバイス」¹³⁻¹⁵の2つを提案する。

1-2 本研究の意義

1-1で述べたように、従来法のバイオセンサーでは、検出される信号の強度は検出対象の濃度に対して線形的に応答し、さらにその信号は、分散を持つ集団

の平均値である。これらの制約を受けない新しいセンシング法として、本論文では「カラリメトリックバイオセンシング法」と「ナノポアデバイス」の2つを提案する。以下にその意義について述べる。

カラリメトリックバイオセンシング法では、金属微粒子自己組織化膜の「メタマテリアルの性質」¹⁶を利用することで、電磁誘起透明化現象を引き出し、検出分子（今回の実験では金微粒子のタグをつけた分子）の吸着量に対して、目視による色調変化が確認できるほど非常に大きな非線形的な光吸収変化を得ようというものである。これが完成すれば、簡便で高感度かつ半定量的に利用可能な、これまではない目視検出用カラリメトリックセンサーが実現する。

一方、ナノポアデバイスでは、電気泳動等によって一分子や一粒子をナノポア構造に通過させることで、ナノポア内を流れているイオン電流が減少（ブロッキング電流）する。そのため、このブロッキング電流を計測することで、検体の検出が可能となる。さらに、イオン電流の減少量は通過物質の体積に依存するため、検出だけではなく、検体の識別も可能である。ナノポアデバイスは、一分子/一粒子を検出できるため、超高感度センサー技術として注目を集めている。一般的にその他のセンサー（吸光度測定など）では、検出対象の分子や粒子の平均的情報を計測していることになるが、ナノポアデバイスでは、一分子/一粒子計測に基づく統計的な情報が得られたため、平均化することで埋もれてしまうような情報を検出することが可能である。そのため、例えば、疾患の際に出てくる特異的なタンパク質などが体液中において僅かにしか存在しない場合でも、様々な夾雑物の中からそのタンパク質を特定し検出することが原理的に可能である。この技術によって、一分子/一粒子計測の実現が期待されている。しかしながら、ナノポアデバイスの抱える技術的課題は、検出限界を決めるブロッキング電流のS/N比の低さである。本論文では、デバイスの材質を従来の窒化シリコンから静電容量の小さい高分子材料に変えることで、この解決を試みた。

以上のように、本論文では、「金属微粒子膜を基盤としたカラリメトリックバイオセンシング」および「低静電容量材料を用いたナノポアデバイス」の2つの研究課題に取り組むが、これらは今後のバイオセンサーにおいて重要な科学技術となり得るため、これらの研究意義は大きいと言える。

1-3 カラリメトリックバイオセンシング法

1-3-1 バイオセンシングの歴史的背景

バイオセンシングの歴史を見ると、蛍光イムノアッセイ¹⁷や、酵素結合免疫吸着法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)¹⁸などの蛍光ラベルを使った方法が最も早く確立され、実用化に至っている。その後、ラベルフリーの表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 法や、水晶振動子 (Quartz Crystal Microbalance, QCM) 法¹⁹⁻²³が大きく進展した。これらの研究は、その後、量子ドットや金属微粒子などのナノ材料と組み合わせにおいて、センシングの感度や精度が大幅に向上している²⁴⁻³⁰。

金属微粒子を用いたカラリメトリックセンシングの起源は、1-1で紹介したイムノクロマト法による妊娠検査薬の開発であるが⁴、その後のブランクを経て、近年局在プラズモン共鳴に関する研究の活発化により、近年再び注目を集めている。高感度検出に関する応用例も増え、例えば De la Rica らは、ELISA に金微粒子を応用することで、前立腺がんの腫瘍マーカーである PSA や、HIV 感染の診断に用いられるカプシド抗原 p24 の検出に成功した³¹。ELISA は抗原抗体反応を用いてセンサー基板上に酵素を固定化し、酵素の還元機能を利用することで発色あるいは発光分子の呈色変化を観察する手法である。De la Rica らは、金イオン溶液を酵素によって還元することで金微粒子の凝集によるプラズモンの呈色反応を観察し、0.001 fg/ml という低濃度での検出において、目視の検出に成功している (図 1-3 および図 1-4)。また、金属微粒子の最表面を白金で被覆することで、プラズモン共鳴由来の呈色変化に加え、微粒子最表面の白金による触媒反応によって微粒子膜を大きく呈色変化させる手法が報告されている (図 1-5)³²。この手法では、金属微粒子だけを用いたイムノクロマト法にくらべ、2桁以上の検出感度であった。表 1-1 に、金属微粒子を用いた代表的なイムノクロマト法の報告例を示す³³。上記の De la Rica らの報告にあるように、fg/ml という低濃度の検体検出に成功している例が多数報告されている。定量性の観点では、インピーダンス分光などの電気計測と組み合わせることで、検体認識だけではなく、識別まで可能であることが報告されているが³⁴、呈色変化などの目視検出では、いまだ十分な成果は報告されていない。

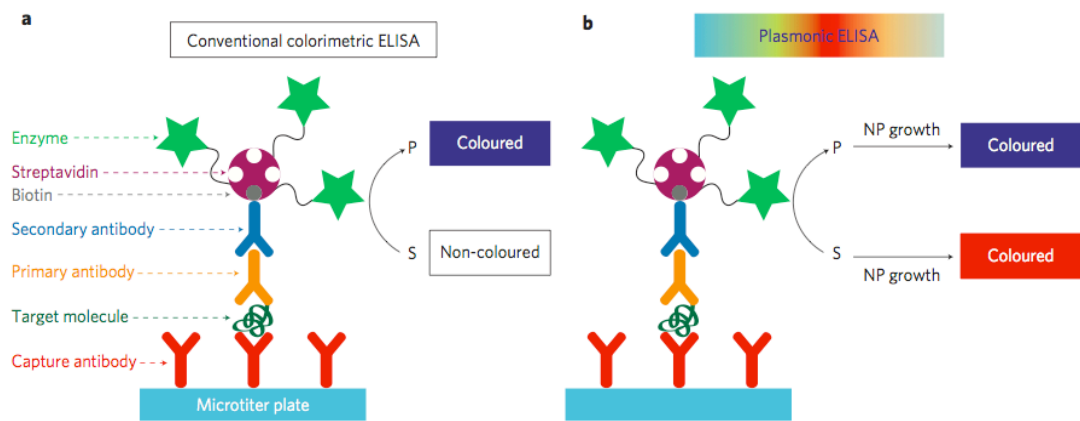


図 1-3 De la Rica らが開発したサンドイッチ型 ELISA 基板の模式図³¹

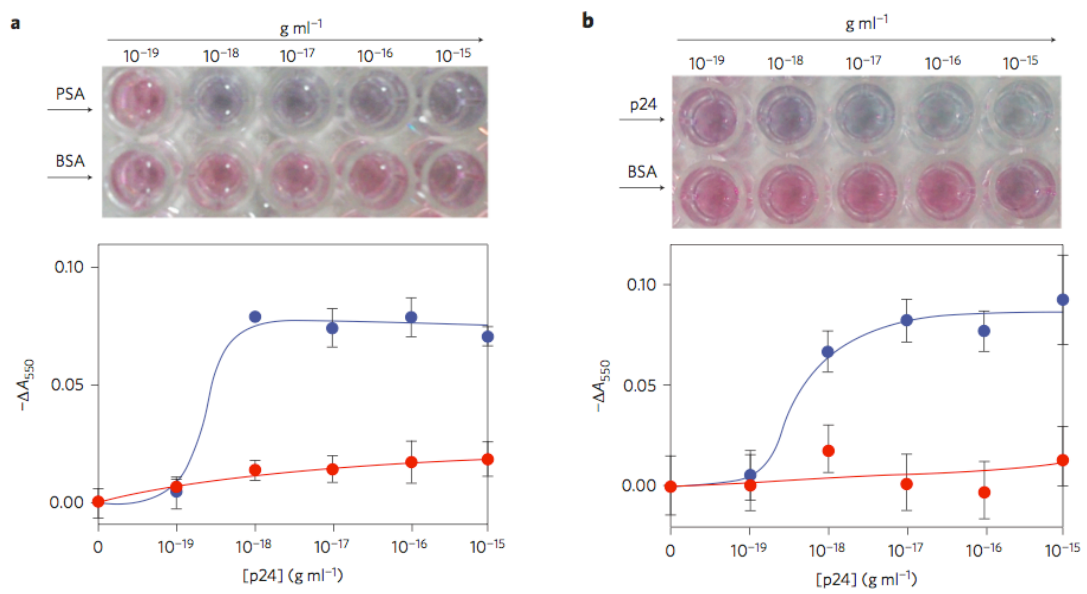


図 1-4 サンドイッチ型 ELISA 法を用いた PSA (a) およびカプシド抗原 p24 (b) の検出：検体濃度による呈色および吸光度の変化³¹

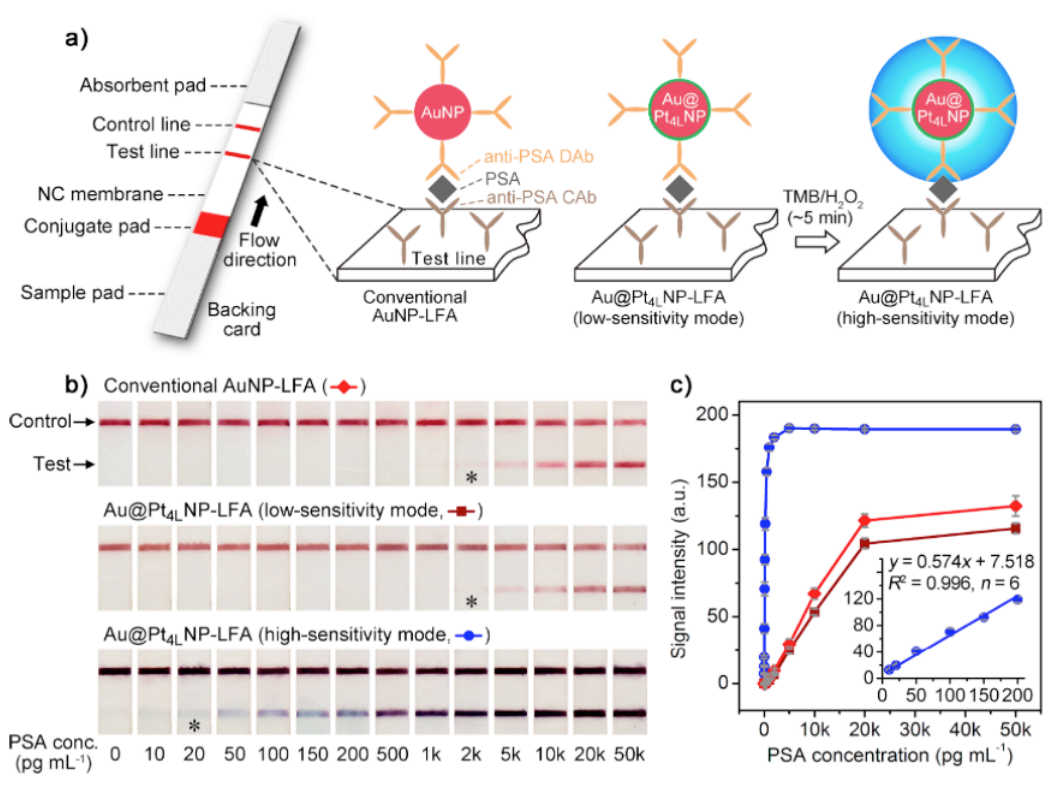


図 1-5 Xiaohu Xia らが開発した金微粒子、白金微粒子を用いたカラリメトリックバイオセンサーの模式図³²

1-3-2 従来型カラリメトリックバイオセンシング法の原理

ここでは、金属微粒子の局在プラズモン共鳴を使った従来型のカラリメトリックセンシングの原理について説明する。

金属中の自由電子が集団振動する現象をプラズモンといい、特に金属表面で発生するプラズモンは、表面プラズモン (Surface Plasmon, SP) と呼ばれている¹⁶。表面プラズモンの振動数は金属種 (金属の誘電率) によって決まり、その振動数が光などの外部電場の振動数と一致した時、表面プラズモン共鳴が起こり、光が金属に吸収される。特に、粒径が数 nm から数十 nm の金属微粒子の場合、粒子のサイズ効果により、微粒子表面の自由電子が振動運動をする。そこに、その振動数を有する光を照射することで、電子の振動と光が共鳴し、局在プラズモン共鳴が発生する。この局在プラズモン共鳴によって、光が金属微粒子に吸収され、微粒子の周辺 (粒径程度) に局在増強電場が発生する (図 1-6)。また、金属微粒子同士が隣接することで、粒子近傍の局在増強電場が粒子間でカップリングし、さらに強いプラズモン共鳴が発生する (図 1-7)。そのため、金属微粒子膜などのナノ構造集合体では、非常に強い局在増強電場が得られ、結果的に局在プラズモンの共鳴波長でのみ高い吸光係数を示すナノ薄膜が得られる (図 1-8)。局在プラズモンの共鳴波長は、金属の種類、粒子間距離、微粒子の粒径、形状、周辺の屈折率などによって決まる。カラリメトリックバイオセンシングでは、生体分子反応によってこれらの因子の変化を引き起こし、反応を色の変化 (共鳴波長の変化) として検出することができる。

たとえば、局在プラズモン共鳴を用いたカラリメトリックセンサーの研究例として、抗原-抗体反応などの生体分子反応の伴う金属微粒子近傍の屈折率変化によって、局在プラズモンの共鳴条件が変化し、呈色が変わることによるセンシング法が報告されている^{35,36}。この場合、波長シフトは小さいが、屈折率変化に対してほぼ定量的なシフトが得られる。一方で、金属微粒子の凝集によるプラズモン共鳴波長の変化 (呈色変化) によるセンシング法の場合、検出はオン-オフ型である。これら従来型のセンサーにおいても、呈色変化 (波長シフト) はさほど大きくはないものの、簡便に目視検出が可能なセンシングを実現している。

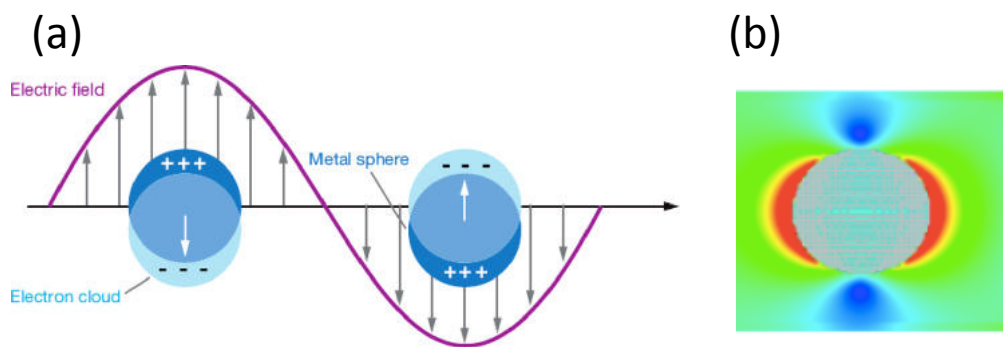


図 1-6 (a) プラズモン共鳴の概念図、(b) プラズモン共鳴時の電場強度 (FDTD 計算) ⁴⁹

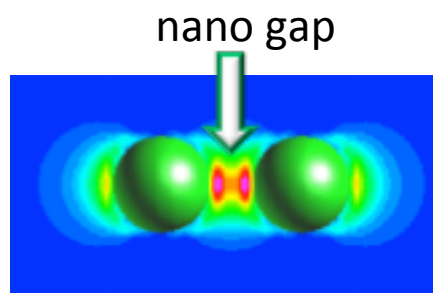


図 1-7 プラズモンカップリングの電場強度 (FDTD 計算) ⁴⁹

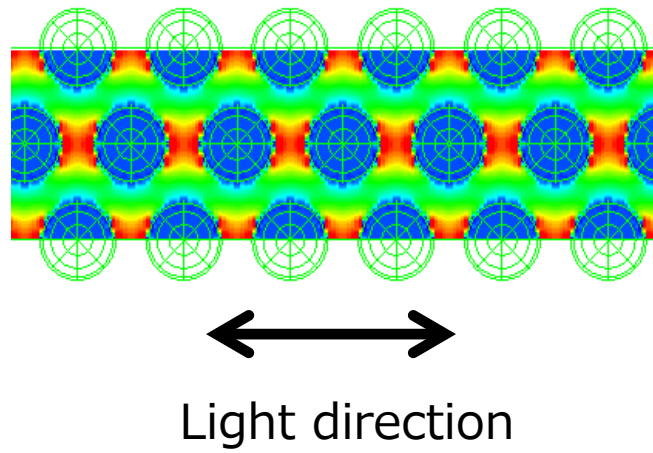


図 1-8 ナノ集合体でのプラズモンカップリングの電場強度 (FDTD 計算) ⁴⁹

1-3-3 本論文のカラリメトリックバイオセンシング法の原理

本論文では、新たな原理に基づくカラリメトリックバイオセンシング法の開発に取り組む。これらは「プラズモンフルカラー」に関する所属の研究室の先行研究に基づくものである。

近年、所属研究室では、金属微粒子膜を金属基板上に多層積層すると、層数に応じて呈色が大きく変化する現象を発見し、プラズモンフルカラーと名付けた（図 1-9）。これは金属微粒子膜の非常に高い屈折率と消衰係数（=メタマテリアルとしての性質）、並びにナノレベルで厚み制御された均一な膜構造に起因する極めて新規な光学現象である¹⁶。

これらの金属微粒子膜は、ガラスなど透明基板上に積層した場合は、積層数に応じて吸光度が上昇するだけで、共鳴波長シフトなどは現れない。しかし、金属基板上に多層積層すると、層数に応じて顕著な共鳴波長の長波長シフトと吸光度の非線形的変化を生じることがわかった。この現象について、さらに調査を加えた結果、可視域の吸収だけではなく、紫外域にも積層数に応じた大きな吸収が現れること、これらの可視域の吸収は、透明ガラス基板上で検出された本来の金属微粒子膜の共鳴吸収波長（450nm）を挟むようにして、低エネルギー側（長波長側）と高エネルギー側（短波長側）に現れることがわかった。これは、現在メタマテリアル研究分野にて大きな注目を集めている電磁誘起透明化現象に基づく現象である。おそらくこれは、金属微粒子膜にて励起された局在プラズモン共鳴由来の大きな双極子が、金属界面で自分自身の鏡像と相互作用し、四重極子を生成、これが双極子と界面にてさらに相互作用することにより発生した現象ではないかと推察している。

この電磁誘起透明化現象に基づくプラズモンフルカラー現象をカラリメトリックバイオセンシング法に応用することで、わずかな膜厚の変化（あるいはわずかな吸着物）により大きく色調を変える高感度なカラリメトリックセンシングの実現が期待される。

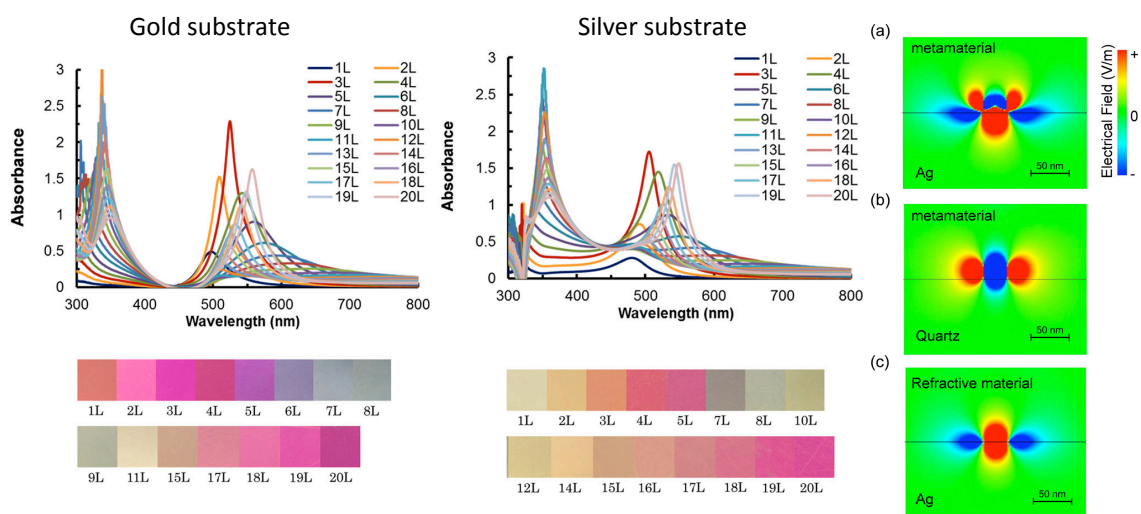


図 1-9 (左) 金基板上 (右) 銀基板上に銀微粒子膜を積層した時のスペクトル変化、FDTD シミュレーションによる (a) 銀基板上 (b) ガラス基板上にメタマテリアルを設置したとき、および (c) 銀基板上に屈折材料を設置したときの電場強度¹⁶

1-4 ナノポアデバイス

1-4-1 ナノポアデバイスの原理

ナノポアデバイスの構造は、ナノポアの上下にイオン電流計測および電気泳動用の電極が設けられ、ナノポアと電極はともに KCl などの電解質溶液で満たされている (図 1-10)。ナノポア内に検体が無ければ、ナノポアを介して電極間にイオン電流が流れ、電気泳動により検体がナノポア内に入ると、一部のイオン電流が検体によって遮断され、イオン電流が減少する (ブロッキング電流)。この減少量がナノポア内の検体の体積に比例するため、一粒子や一分子の体積がイオン電流の変化から算出され、一粒子/一分子の検出・識別に用いられている¹³⁻¹⁵。

一般的にブロッキング電流は等価回路を用いて解析される。ナノポアの等価回路を図 1-11 に示す。1975 年に Hall らによって提唱された³⁷、等価回路はナノポア内の抵抗 R_{pore} とポアと電極までの抵抗のアクセス抵抗 R_{acc} からなり、全体の抵抗はこれらの和 R_{total} として表される (式 1-3)。

$$R_{total} = R_{pore} + R_{acc} \quad (1)$$

$$R_{acc} = 2 \times \frac{\rho}{2d_{pore}} = \frac{\rho}{d_{pore}} \quad (2)$$

$$R_{pore} = \frac{4\rho L}{\pi d_{pore}^2} \quad (3)$$

ρ は電解質の抵抗率、 d_{pore} はポアの直径、 L はポアの厚みを表す。印加電圧 V_b をかけた時、イオン電流の強度 I_{ion} は、

$$I_{ion} = \frac{V_b}{R_{total}} = \frac{V_b}{R_{pore} + R_{acc}} \quad (4)$$

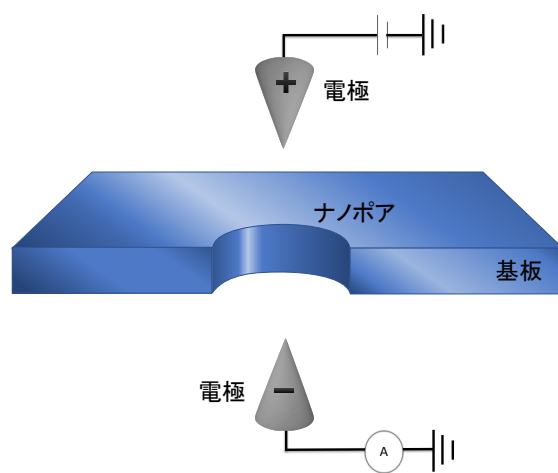


図 1-10 ナノポアデバイスの模式図

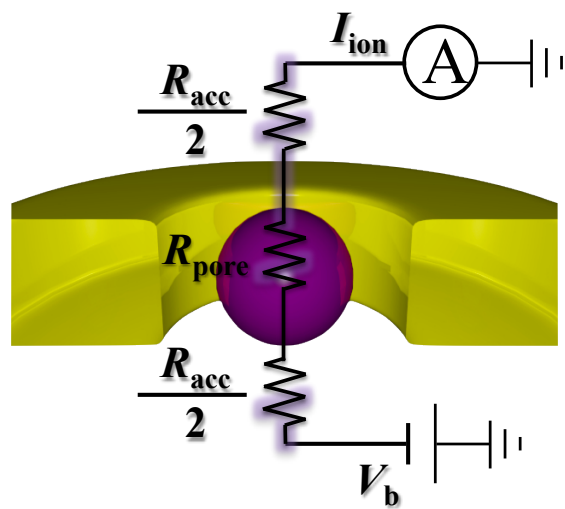


図 1-11 ナノポアデバイスの等価回路

で表される。物体が通過するとき、ポアの見かけの直径の減少に伴いポア抵抗が上昇し、イオン電流が減少する。減少したイオン電流を解析することで、通過した物体の体積を求めることができる。

一般的にナノポアデバイスは、窒化シリコン膜にナノスケールのポアが空いた構造をしている。ナノポアデバイスにおけるノイズは、主にナノポアの材質が有する静電容量に起因している。そのため、静電容量の小さい材料のみでナノポアデバイスを作製することで、イオン電流の変化の S/N 比を向上させることが原理的に可能となる。

1-4-2 ナノポアデバイスに関する先行研究

1947年にCoulterは、細孔で隔てた分散液に電圧を印加すると電気抵抗がミリ秒オーダーで変動し、粒子が移動する際に電気抵抗が増加することを発見した。この技術は1953年に特許登録され³⁸、花粉、人間の細胞、バクテリア、DNAなどの生体分子に対していくつかの報告がなされている³⁹⁻⁴²。現在ではナノ・マイクロ加工技術の向上によって、ナノメートルオーダーの小さな細孔の作製が可能となり、ナノ物質のサイズを一粒子/一分子レベルで分析が可能となり、医療における診断技術として期待が集まっている⁴³⁻⁴⁶。

近年の研究では、ポア通過物質のサイズ解析だけでなく、形状解析も報告されている。ポアの厚みを L_{pore} 、直径を D_{pore} とすると、ナノポアのアスペクト比は $L_{\text{pore}}/D_{\text{pore}}$ と定義されている。Kawaiらは、低アスペクトナノポア構造を Si_3N_4 メンブレンに作製し、微粒子をナノポアに通過させ、その際のナノポアを流れるイオン電流の変化を数学的に解析することで、液中に浮遊している微粒子の一粒子形状解析に成功している¹⁴。これは、ナノポアを薄くしたことで、通過物質の連続的な断面積の情報がイオン電流に反映されたためである。(図1-12) また同グループの研究で、ポア内部における微粒子の通過位置がシグナルに影響を及ぼすことを報告している(図1-13)¹³。そのため、通過物質のサイズや形状を定量解析するためには、軸対称のポア構造が重要であることが示唆されている。

一方、1-1で述べたように、ナノポアデバイスの研究ではノイズが大きな問題である。そのため、窒化シリコンでのナノポアデバイスの計測において、シグナルのノイズ源に関する研究も数多く報告されている。Kimらは、窒化シリコン

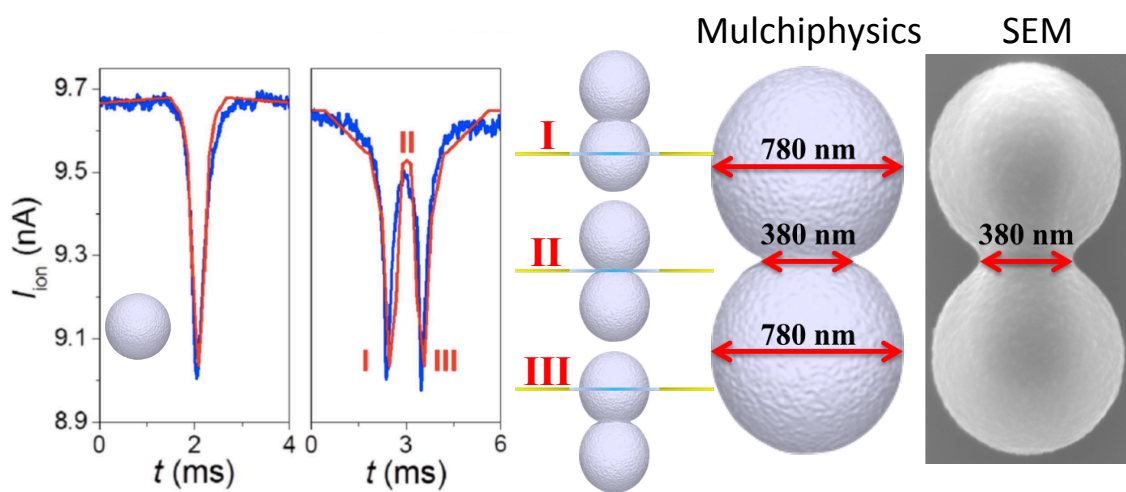


図 1-12 左：ポリスチレン微粒子が通過したときのイオン電流の実測値（青）とMulchphysicsモデルでのフィッティング（赤）。右：Mulchphysicsでを使用した微粒子モデルとSEM画像¹⁴

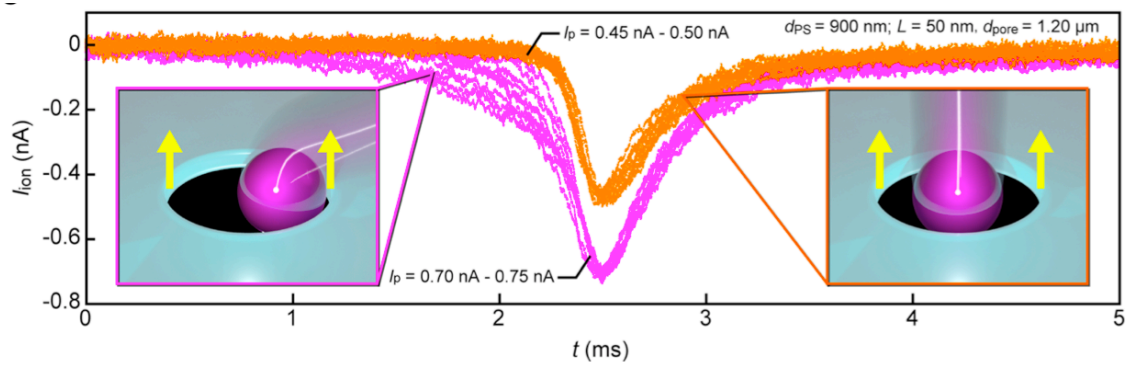


図 1-13 0.90 μm のポリスチレン微粒子が厚み50 nmポア径1.2 μm の窒化シリコンナノポアの中央（橙）と中央からずれた位置（ピンク）を通過した時のシグナル¹³

やPDMSなど静電容量の違う材料のナノポアデバイスを用いてイオン電流を計測し、パワースペクトルを解析することでノイズの周波数依存性の分析を行った。この研究によって、100-10,000 Hzの周波数のノイズに、材料の静電容量が大きく影響していることを明らかにした⁴⁷。これによって、窒化シリコンの静電容量が大きくノイズに深く関わっていることが明らかになった。そのため静電容量の低いPDMSを使ったナノポアデバイスが開発されている。Karnikらは、鋳型によってPDMSを成型しナノポアデバイスの作製に成功している。これによって、ノイズを数pAまで減少させることに成功した⁴⁸。しかしながら、これまでのPDMSナノポアデバイスは、作製プロセスの関係でマイクロ流路の一部にポアを有する横型のデバイス構造をしており、ポアの形状は四角型の非軸対称になっている(図1-14)。上述したように、ブロッキング電流を定量解析するためには、軸対称のポア構造が望ましいため、非軸対称ポア構造では定量評価が困難である。そのため、軸対称構造のPDMSナノポアが求められている。

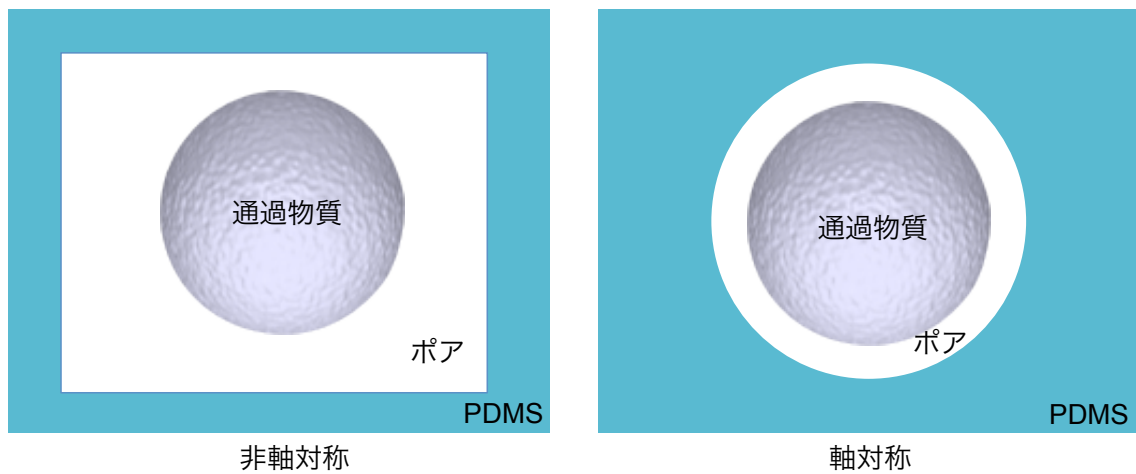


図 1-14 PDMS ナノポアデバイスのマイクロ流路のポアの形状 (左:四角型非軸対称、右:軸対称)

1-5 本博士論文の目的と構成

1-5-1 プラズモンフルカラーカラリメトリックバイオセンシングの目的

以上の研究背景を踏まえ、本研究では電磁誘起透明化現象に基づくプラズモンフルカラー現象をカラリメトリックバイオセンシング法に応用することで、高感度なカラリメトリックバイオセンシングの実現を目的とした。

具体的には、銀微粒子の3層積層膜上に20 nmの厚みのSiO₂スパッタ膜を作製し、シランカップリング処理を起点とする表面カップリング反応でストレプトアビジンを固定化し、プローブ表面を作製する。その表面に、ターゲットであるビオチン修飾金微粒子をビオチン-アビジン分子認識反応を利用して任意に吸着させ、金微粒子吸着に伴う呈色変化を目視並びに反射吸光度測定により検出する。さらに、吸着した微粒子の絶対数(表面被覆率)を、原子間力顕微鏡(AFM)観察、並びにSPR法とMaxwell-Garnett理論¹⁶とを組み合わせた定量測定法により決定し、呈色変化との関係を定量的に求める。

1-5-2 縦型PDMSナノポアの開発の目的

本研究では、静電容量の低いPDMSのみを用いた軸対称ポア構造を作製し、デバイスのノイズを下げることでS/N比を向上させることを目的とした。これまでナノポアデバイスに使用されていた窒化シリコンでは静電容量が高いことが原因でノイズが大きいことが問題とされていた。前述したようにPDMSを用いることで電流値のノイズの削減に成功しているが、ポアの形状が四角型の非軸対称になっているため通過物質の定量的な議論することが困難である。本研究では、作製プロセスを改良することで、縦型の軸対称PDMSポア構造の作製し、ノイズの削減と定量的な解析を行うことを目的とした。

参考文献

1. 富士キメラ総研 ビッグデータ、IoT 関連ソリューション分野での需要が期待されるセンサーの世界市場を調査 2015, 15080
2. バイオセンサ市場、分析と 2020 年までの予測
3. Gaudin, V. A Comprehensive Review. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *90*, 363–377.
4. Ehrenkranz, J. R. L. *Epidemiology*, 2002, **13**, s15–s18.
5. Mark, D.; Haeberle, S.; Roth, G.; Von Stetten, F.; Zengerle, R. *NATO Sci. Peace Secur. Ser. A Chem. Biol.* **2010**, 305–376.
6. Tallury, P.; Malhotra, A.; Byrne, L. M.; Santra, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 424–437.
7. Skottrup, P. D.; Nicolaisen, M.; Justesen, A. F. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 339–348.
8. Palchetti, I.; Mascini, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 455–471.
9. Ivnitski, D.; Abdel-Hamid, I.; Atanasov, P.; Wilkins, E. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 599–624.
10. Nakatsuma, A.; Kaneda, M.; Kodama, H.; Morikawa, M.; Watabe, S.; Nakaishi, K.; Yamashita, M.; Yoshimura, T.; Miura, T.; Ninomiya, M. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–9.
11. Schmitt, K.; Schirmer, B.; Hoffmann, C.; Brandenburg, A.; Meyrueis, P. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 2591–2597.
12. Reyes, D. R.; Iossifidis, D.; Auroux, P.; Manz, A. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2623–2636.
13. Tsutsui, M.; He, Y.; Yokota, K.; Arima, A.; Hongo, S.; Taniguchi, M.; Washio, T.; Kawai, T. *ACS Nano* **2016**, *10*, 803–809.
14. Ryuzaki, S.; Tsutsui, M.; He, Y.; Yokota, K.; Arima, A.; Morikawa, T.; Taniguchi, M.; Kawai, T. *Nanotechnology* **2017**, *28*, 155501.
15. Goyal, G.; Mulero, R.; Ali, J.; Darvish, A.; Kim, M. J. *Electrophoresis* **2015**, *36*, 1164–1171.
16. Okamoto, K.; Tanaka, D.; Degawa, R.; Li, X.; Wang, P.; Ryuzaki, S.; Tamada, K. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–10.
17. Alvydas J. Ozinskas, *Probe Design and Chemical Sensing*, **1994**, *4*, 449–496.
18. Buss, H.; Chan, T. P.; Sluis, K. B.; Domigan, N. M.; Winter-bourn, C. C. *Free*

- Radic. Biol. Med.* **1997**, *23*, 361–366.
19. Chen, S.; Svedendahl, M.; Duyne, R. P. Van; Käll, M. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 1826–1830.
 20. Homola, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 528–539.
 21. Nelson, B. P.; Grimsrud, T. E.; Liles, M. R.; Goodman, R. M.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1–7.
 22. Sagle, L. B.; Ruvuna, L. K.; Ruemmele, J. A.; Van Duyne, R. P. *Nanomedicine*, **2011**, *6*, 1447–1462.
 23. Keller, C. A.; Kasemo, B. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1397–1402.
 24. Xia Y.; Ye J.; Tan K.; Wang J.; Yang G. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 6241–6247.
 25. Rosi, N. L.; Mirkin, C. A.; *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1547–1562.
 26. McFarland, A. D.; Van Duyne, R. P. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1057–1062.
 27. Fornara, A.; Johansson, P.; Petersson, K.; Gustafsson, S.; Qin, J.; Olsson, E.; Ilver, D.; Krozer, A.; Muhammed, M.; Johansson, C. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3423–3428.
 28. Hu, M.; Yan, J.; He, Y.; Lu, H.; Weng, L.; Song, S.; Fan, C.; Wang, L. *ACS Nano* **2010**, *4*, 488–494.
 29. Hahn, M. A.; Tabb, J. S.; Krauss, T. D. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4861–4869.
 30. Zhang, C.; Hu, J. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1921–1927.
 31. De la Rica, R.; Stevens, M. M. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 821–824.
 32. Gao, Z.; Ye, H.; Tang, D.; Tao, J.; Habibi, S.; Minerick, A.; Tang, D.; Xia, X. *Nano Lett.* **2017**, *17*, 5572–5579.
 33. Farka, Z.; Juřík, T.; Kovář, D.; Trnková, L.; Skládal, P. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 9973–10042.
 34. Yang, T.; Wang, S.; Jin, H.; Bao, W.; Huang, S.; Wang, J. *Sensors Actuators, B Chem.* **2013**, *178*, 310–315.
 35. Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238–7248.
 36. Ghosh, S. K.; Pal, T.; *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4797–4862.
 37. Hall, J. E. *J. Gen. Physiol.* **1975**, *66*, 531–532.
 38. 特許 No. 2,656,506
 39. Kelly, J. K.; Rasch, A.; Susan, K. , 2,4 a. *Ameriacan J. Bot.* **2002**, *89*, 1021–1023.
 40. Breitman, T. R.; Selonick, S. E.; Collins, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77*, 2936–2940.

41. Hahn, M. A.; Tabb, J. S.; Krauss, T. D. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4861–4869.
42. Robertson, B. R.; Button, D. K.; *Cytometry* **1989**, *10*, 70–76.
43. Deamer, D.; Akeson, M.; Branton, D. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 518–524.
44. Goyal, G.; Mulero, R.; Ali, J.; Darvish, A.; Kim, M. J.; *Analysis. Electrophoresis* **2015**, *36*, 1164–1171.
45. Tan, S.; Wang, L.; Liu, H.; Wu, H.; Liu, Q.; *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, *11*, 1–10.
46. Larkin, J.; Henley, R. Y.; Muthukumar, M.; Rosenstein, J. K.; Wanunu, M.; *Biophys. J.* **2014**, *106*, 696–704.
47. Lee, M.; Kumar, A.; Park, K.; Cho, S.; Kim, H.; Lim, M.; Kim, Y.; Kim, K. **2014**, 1–7.
48. Sen, Y. H.; Karnik, R.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 437–446.
49. Katano, S.; Toma, K.; Toma, M.; Tamada, K.; Uehara, Y. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 14749.

2. プラズモンフルカラーを用いたカラリメ トリックバイオセンサー

本章では、アビジン-ビオチン相互作用によって金微粒子をセンサー基板上に固定化し、金微粒子の表面被覆率が 30%未満という少ない量にも関わらず、目視で観察可能な呈色反応を示すカラリメトリックバイオセンサーについて述べる。このプラズモンフルカラーバイオセンサーは、簡便かつ高感度な診断システムの開発において重要な役割を果たすことが示唆され、半定量的な測定が可能になることも示唆された。

2-1 イントロダクション

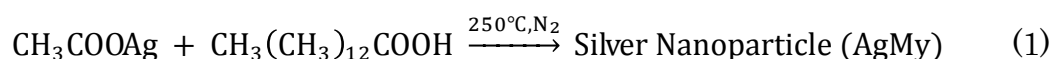
本章では、電磁誘起透明化現象に基づくプラズモンフルカラー¹をカラリメトリックバイオセンサーに応用したセンシング法について述べる。このプラズモンフルカラーは、銀微粒子膜、金微粒子膜だけではなく、金微粒子と銀微粒子のヘテロ積層構造においても確認されている²。プラズモンフルカラー現象では、層数に応じて呈色が大きく変化するため、既存のカラリメトリックバイオセンサーに比べ、高感度なセンシング法が期待できる。さらに積層構造により発現する呈色について、Finite-Difference Time-Domain (FDTD) 法による電磁気計算によって予測できる点も本法の強みである。

本研究では、金基板上に銀微粒子膜を積層しこれをプラズモニック基板とした。その上に SiO₂ スパッタ膜、シランカップリング反応を介してストレプトアビジンを固定化し、プローブ表面を作製した。ターゲットはビオチン導入金微粒子とし、ビオチン-アビジン分子認識反応によりターゲット粒子が表面に吸着した際に生じる呈色変化を目視検査と反射スペクトル測定によって評価した。また走査型電子顕微鏡観察 (SEM) と表面プラズモン共鳴分光法 (SPR) によって表面に吸着した金微粒子の被覆率を決定し、呈色変化との相関を定量評価した。

2-2 実験

2-2-1 銀微粒子二次元シートの作製

ミリスチン酸被覆銀微粒子(AgMy)は (1) 式に従い、酢酸銀とミリスチン酸を混合し、窒素雰囲気下 250 °C で酢酸銀を熱分解することで合成した³。

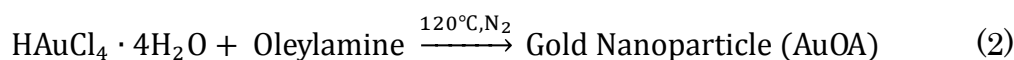


合成した銀微粒子をトルエンに分散させ、エタノールを加えて遠心分離により微粒子を沈降させ、過剰量のミリスチン酸及び粒径の小さな銀微粒子を取り除いた (温度:15°C、回転数: 6000 rpm、処理時間: 10 分)。さらにトルエンに再分散させ、高速遠心をかけることで、粒径の大きな銀微粒子と凝集した銀微粒子を取り除いた (温度:15°C、回転数: 15000 rpm、処理時間: 10 分)。この精製操作を繰り返すことで、粒径の揃った銀微粒子分散溶液を得た (図 2-1)。銀微粒子の粒径はおよそ 5 nm であった。

Langmuir-Blodgett (LB) トラフ (KSV Mini-trough 2000) を用いて、気水界面に銀微粒子のトルエン分散液を展開すると、トルエンの揮発と同時に、微粒子コア間に働くファンデルワールス力とキャッピング分子であるミリスチン酸のアルキル鎖間に働く疎水性相互作用によって銀微粒子は自己組織化し、固体結晶ドメインを形成する。この時、微粒子間距離は、ミリスチン酸分子が入れ子構造を形成することにより、一定の値 (2 nm) に保たれる⁴。展開膜を 15 mNm⁻¹ まで圧縮し、ヘキサメチルジシラザン(Hexamethyldisilazane: HMDS)により疎水処理を施した金基板上に Langmuir-Schaefer (LS) 法によって転写した。積層膜作製はこの操作を繰り返すことにより行った。

2-2-2 金微粒子二次元シートの作製

オレイン酸被覆金微粒子(AuOA)は、(2)式に従い合成した^{5,6}。



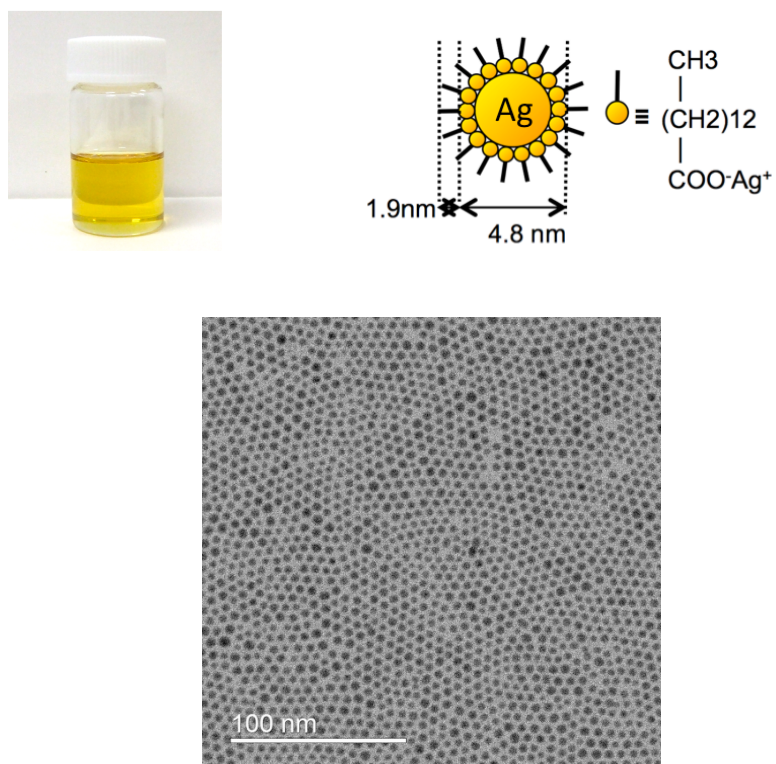
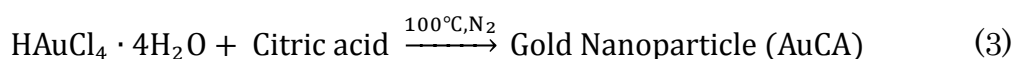


図 2-1 ミリスチン酸被覆銀微粒子のトルエン分散液及び SEM 像 ¹²

塩化金酸 1 mmol、オレイルアミン 5 ml をトルエン溶媒 50 ml に加え、窒素雰囲気下でオイルバスにより 120°C で 1 時間、90°C で 3 時間反応させた。合成した AuOA を銀微粒子と同様にトルエン/エタノール混合溶媒により精製することで、粒径の揃った金微粒子分散溶液を得た (図 2-2)。金の粒径はおよそ 10 nm であった。銀微粒子シートと同様に LB トラフを用いて二次元シートを作製した。

2-2-3 ビオチン導入金微粒子 (ターゲット粒子) の合成

分子認識反応におけるターゲットとして用いたビオチン分子を表面に導入した親水性金微粒子は、(3)式に従い、Frens 法を用いて合成した⁷。



HAuCl₄·3H₂O (Sigma, 99.9%) の 0.05wt% 水溶液 90ml を還流条件下で沸点まで加熱し、そこに 10mL のクエン酸溶液 (1.0 w%) を加え、クエン酸による還元反応により金微粒子を合成した⁸。高速遠心 (15°C, 10000 rpm, 30 min) により過剰のクエン酸を除去した。得られた金微粒子の粒径はおよそ 24 nm である (図 2-3)。合成した金微粒子に表面被覆率がおよそ 10 % になるように biotin-PEG-thiol (Code 41151-0895; LCC Engineering and Trading GmbH, Switzerland) を水溶媒中で置換反応により導入した。置換反応は室温で四時間攪拌して実施した⁷。ビオチン化金微粒子の表面の 90% はクエン酸で被覆されており、正に帯電している。本研究室の先行研究で、分散溶液の pH が高いとき、微粒子表面の電荷が打ち消され、微粒子の凝集が起こることが明らかにされている⁹。本研究では、金微粒子の凝集を防ぐために、溶液の pH を 6.5 に調整したものをを用いた。

2-2-4 ビオチン固定化表面の作製

コントロール実験用の Streptavidin 固定化金基板上は以下の手順で作製した。まず洗浄した BK7 ガラス基板上に、金を 200 nm 真空加熱蒸着した。その後、全チオール濃度が 0.25mM の biotin-PEG-thiol (Code 41151-0895; LCC Engineering

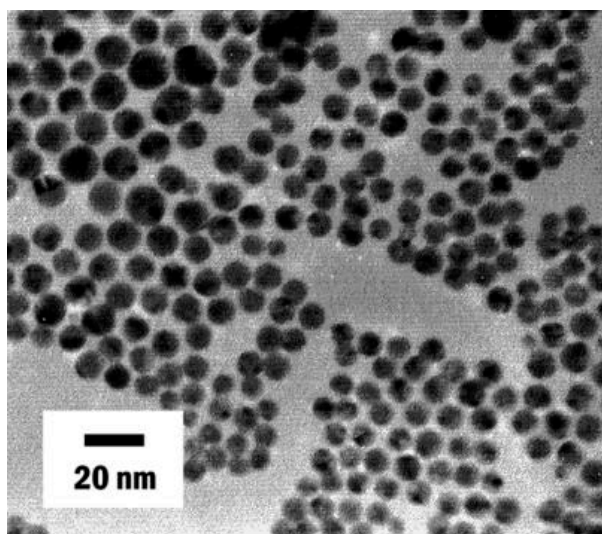
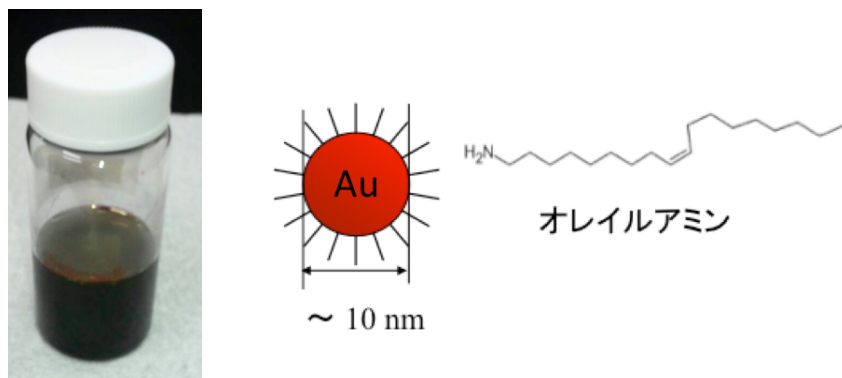


図 2-2 オレイルアミン被覆金微粒子のトルエン分散液及び SEM 像

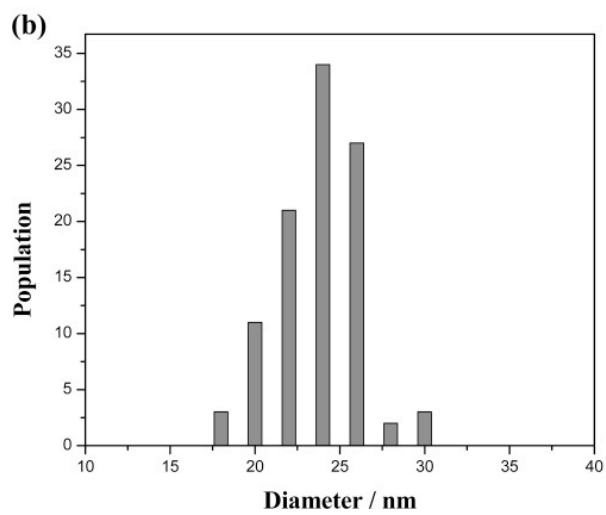
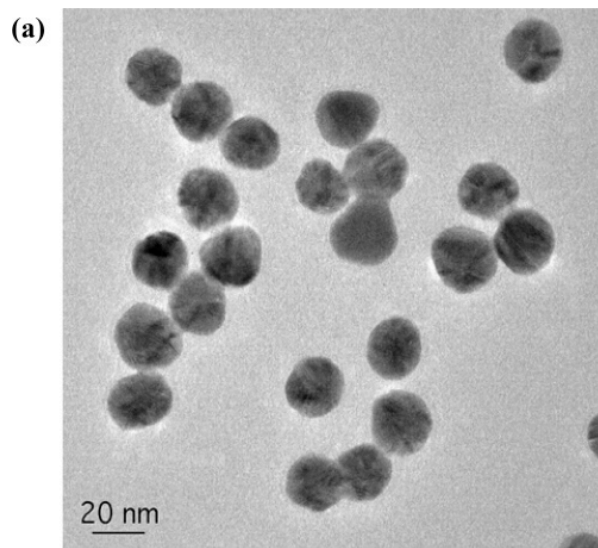


図 2-3 クエン酸還元金微粒子の SEM 像⁸

and Trading GmbH, Switzerland) および 11-mercapto-1-undecanol (97%, Sigma-Aldrich) の混合エタノール溶液 (モル濃度 1 対 9 の割合で調整) に金基板を浸した。基板は、エタノールと PBS バッファーでリンスした。こうして作製したビオチン化処理金基板を 0.5 μM の Streptavidin PBS バッファー溶液に 15 分浸漬し、表面に Streptavidin を固定化した¹⁰。SPR 測定では、LaSFN9 高屈折ガラス基板 ($n=1.85$) 上に金を 50 nm 蒸着した基板を用いた。その後の表面処理のプロセス (ビオチン化処理、Streptavidin の固定化) は前述の通りである。

バイオセンサー実験用の Streptavidin 固定化プラズモンフルカラー基板は以下の手順で作製した。BK7 ガラス基板に金を 200 nm 蒸着した基板の上に、銀微粒子シートを LS 法により三層積層した。その上にスパッタ法あるいは真空加熱蒸着によって SiO_2 膜を 20 nm 製膜した (RD002- SiO_2 , アールデック社製)。熱により銀微粒子シートが壊れるのを防ぐために、蒸着は基板を循環水で冷却しながら行った。蒸着速度は 0.1 nm/sec である。その基板を、1.0%の (3-aminopropyl) - triethoxysilane (APTES, Sigma-Aldrich) 溶液に浸漬し、120°Cで 30 分間アニールし、MilliQ 水でリンスすることで、基板表面にアミノ基を導入した¹⁰。その後、2mM の biotin-PEG-Carbonate-NHS (SUNBRIGHT BI-050TS, NOF, Tokyo) 溶液に 1 時間浸漬し、MilliQ 水でリンスし、表面にビオチン基を導入した。この基板を、0.5 μM の Streptavidin (Jackson ImmunoResearch, USA) PBS バッファー溶液に 15 分間浸漬し、ビオチン-アビジン分子認識反応により、基板表面に streptavidin を固定化した¹⁰。

ビオチン導入金微粒子のストレプトアビジン固定化表面への吸着実験は、上述のそれぞれの基板の上に、異なる溶液濃度においてビオチン導入金微粒子を吸着させて行った。吸着の概略図を図 2-4 に示す。

2-2-5 紫外可視吸収スペクトル

金属微粒子分散液の紫外可視吸収分光測定は、島津製作所社製の UV-1800 を用いて透過法により行った。純溶媒を参照セルに入れて測定した時の光量を I_0 、試料溶液を試料セルに入れて測定した時の光量を I 、モル吸光係数を ϵ 、媒質のモル濃度を c 、吸収物質の厚みを l として、Lambert-Beer の法則 (式 (4)) から吸光度を求めた。

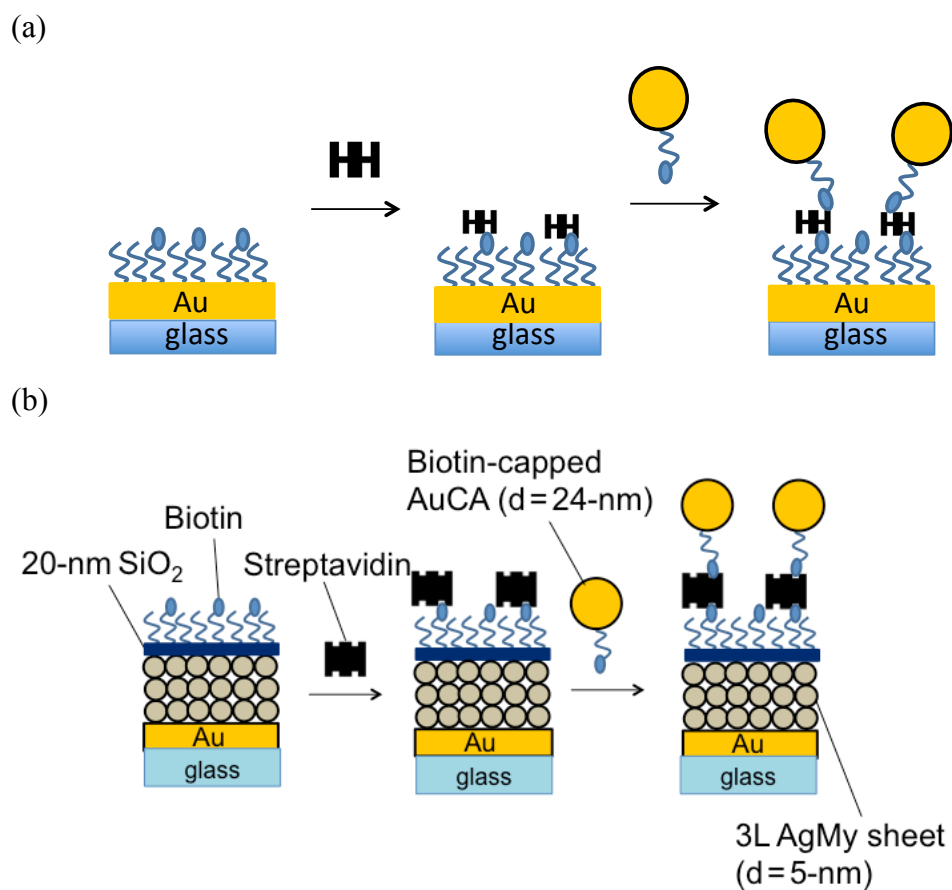


図 2-4 金基板(a)及びプラズモンフルカラー基板(b)上への
 ビオチン-アビジン分子認識反応による金微粒子の吸着

$$\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = -\varepsilon cl \quad (4)$$

金基板上に累積した金属微粒子シートの吸光度測定は、反射測定ユニットを用いて行った（入射角：5 度）。金属微粒子シートを累積する前の金基板の反射強度を I_0 、累積後の反射強度を I とし、透過測定の場合と同様に、吸光度を算出した。

2-2-6 走査型電子顕微鏡（Scanning Electron microscopy, SEM）観察

ビオチン被覆金基板上への金微粒子の吸着量は、走査型電子顕微鏡（HITACHI SE-8000）観察により評価した。加速電圧は 10～20 kV を用いた。その後、ImageJ を用いて SEM 画像から吸着した微粒子数を求め、粒径を 24 nm とし、ビオチン被覆金基板上での金微粒子による表面被覆率を求めた。

2-2-7 表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance, SPR）測定法

SPR 測定に用いた Kretschmann 配置を図 2-5 に示す。LaSFN9 基板に金を 50 nm 蒸着し、マッチングオイルによってプリズムとガラス基板を光学的に接続した。P 偏光のレーザー光（単色光）を全反射条件でプリズムに入射すると、プリズム背面にエバネッセント光がしみ出す。入射角度を調整することにより、金属界面でエバネッセント光の波数と表面プラズモンの波数を一致させると、界面で表面プラズモン共鳴が生じ、その結果、全反射条件であるにもかかわらず反射光は観測されなくなり、光は金属界面で表面プラズモン波として伝播する。表面プラズモン共鳴が生じる入射角（反射率が極小となる角度）をプラズモン共鳴角という。

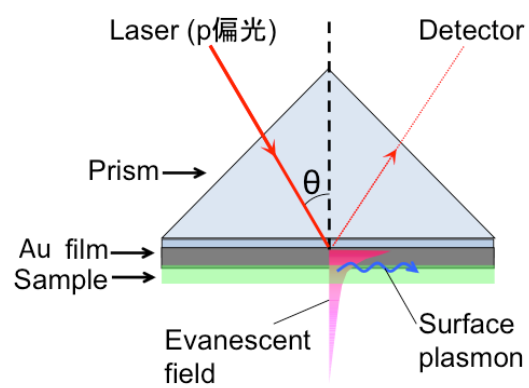


図 2-5 表面プラズモン共鳴励起のための Kretschmann 光学配置

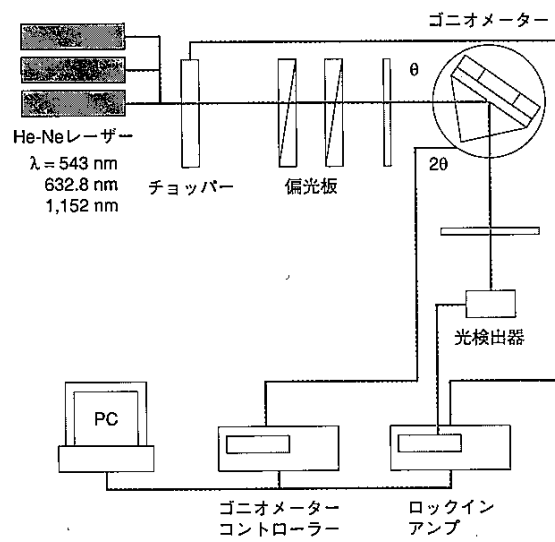


図 2-6 SPR 測定装置の模式図⁸

図 2-6 に、SPR 装置の模式図を示した。レーザー光をチョッパーで特定の周波数で断続的にカットし、チョッパーと同期したロックインアンプにより反射光をモニターすることで、蛍光灯などレーザー光以外の外部光の影響を除去している。これによって、通常照明下でも測定が可能となる。プリズム及び検出器を θ - 2θ ゴニオメーター上にそれぞれ固定化することで、レーザーの入射角をスキャンしながら連続的に反射光強度をモニターする。そしてプラズモン共鳴角を検出する測定を共鳴角測定 (Angle Scan) と呼ぶ。また、入射角を固定し、反射光強度を連続的にモニターすることで金属界面の屈折率変化をリアルタイムで測定することが可能である。この測定法を Kinetics 測定と呼ぶ。

2-2-8 Maxwell-Garnett 理論

Maxwell-Garnett 法は、微粒子を含む誘電体層を均一な媒体であると近似した場合の実効誘電関数を求める手法である (有効媒体近似) (図 2-7)。金微粒子複合層の実効誘電関数 (実部) を ϵ_{eff}' 、金属微粒子の複素誘電関数を (ϵ', ϵ'') 、媒体の複素誘電関数を $(\epsilon_m', \epsilon_m'')$ 、体積分率を f とした時、それぞれの関係は Maxwell-Garnett 理論によって (5) 式のように表される。

$$\epsilon_{eff}' = \epsilon_m' + \frac{AC+BD}{C^2+D^2} \quad (5)$$

ここで、 $A \equiv f (\epsilon' - \epsilon_m')$ 、 $B \equiv f\epsilon''$ 、 $C \equiv \epsilon_m' + \beta\epsilon' - \epsilon_m' - f\gamma (\epsilon' - \epsilon_m')$ 、 $D \equiv \beta\epsilon'' = f\gamma\epsilon'' - f\gamma (\epsilon' - \epsilon_m')$ であり、 γ は (6) 式のように表される。

$$\gamma \equiv \frac{1}{3\epsilon_m'} + \frac{K}{4\pi\epsilon_m'} \quad (6)$$

金微粒子の複素誘電関数 (ϵ', ϵ'') について、本研究では先行研究で得られた実験値 (-8.03, 3.33) ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$) を用いた^{9,11}。媒体の複素誘電関数 $(\epsilon_m', \epsilon_m'')$ は、本研究では水の値 (1.77, 0) を用いた。 K は金属微粒子間のプラズモン相

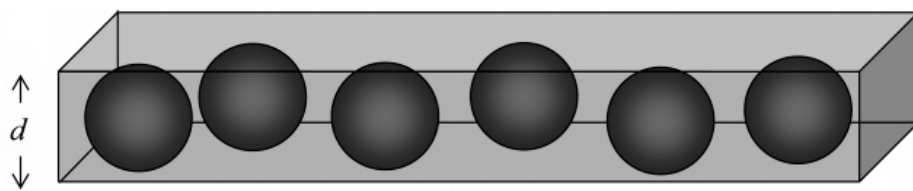


図 2-7 金属微粒子吸着層のモデル（有効媒体近似）

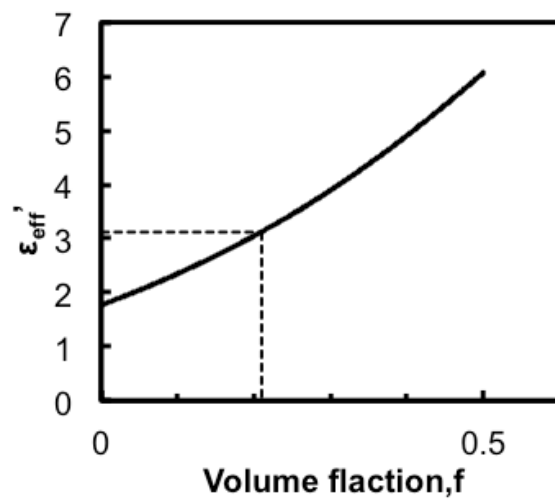


図 2-8 Maxwell-Garnett 理論での金微粒子吸着層の実効誘電率の実部と体積分率の関係

相互作用を表すパラメータで、微粒子同士が十分に離れている場合は $\mathbf{K} = \mathbf{0}$ で、 $\gamma = 1/(3\epsilon_m')$ となる。 β は微粒子の形状を表すパラメータで、真球であるとき $\beta = 1/3$ である。微粒子吸着層の膜厚を微粒子直径の24 nmとした時の、金微粒子層の実効誘電率と体積分率の関係を図 2-8 に示す。本論文では、金微粒子吸着層の実効誘電関数 (ϵ_{eff}' 、今回は実部のみを議論した) を SPR 共鳴角シフトから求め、体積分率から基板表面への微粒子の吸着数 (表面被覆率) を算出した⁹。この値を SEM 観察により求めた表面被覆率と比較し、確からしさを確認した後、呈色変化との関係について定量的に議論した。

2-2-9 Finite-Difference Time-Domain (FDTD) シミュレーション

本研究では、FDTD シミュレーションによって金微粒子被覆率と呈色変化の相関について評価した。シミュレーションには富士通の poyniting システムを用い、以下に示す原理に基づいた計算を行った。

(7)式のファラデーの法則および(8)式のアンプールの法則で示される時間の偏微分方程式を微小空間セル (Yee 格子) によって差分化すると、時間ステップ n における差分式はそれぞれ(9)および(10)式となる。

$$\Delta \times \mathbf{E} = -\mu \frac{\partial \mathbf{H}}{\partial t} \quad (7)$$

$$\Delta \times \mathbf{H} = \sigma \mathbf{E} + \epsilon \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \quad (8)$$

$$\mathbf{E}^n = \frac{1 - \frac{\sigma \Delta t}{2\epsilon}}{1 + \frac{\sigma \Delta t}{2\epsilon}} \mathbf{E}^{n-1} + \frac{\Delta t / \epsilon}{1 + \frac{\sigma \Delta t}{2\epsilon}} \nabla \times \mathbf{H}^{n-\frac{1}{2}} \quad (9)$$

$$\mathbf{H}^{n+\frac{1}{2}} = \mathbf{H}^{n-\frac{1}{2}} - \frac{\Delta t}{\mu} \nabla \times \mathbf{E}^n \quad (10)$$

ここで、 \mathbf{E} は電場、 \mathbf{H} は磁場、 ε は誘電率、 μ は透磁率、 σ は導電率を表している。(9)および(10)式の差分式から各セルの電磁界の時間変化について逐次計算を行うが、その際に解析する空間内にある座標系（直交座標系等）を設定して、各格子点上に電場と磁場それぞれの基準点を設置する。その後、時系列計算を繰り返し、ある時刻における全セルの基準点の電磁場の空間分布計算を1作業として、繰り返し計算を行っていく。

今回の計算では、入射光に差分 Gaussian モデル、振幅 1000 mV/m、入射時間 1.0 fs のパルス光を用いた。計測時間は 13.75 fs、メッシュは x 軸、y 軸、z 軸それぞれ（最大，最小，隣接格子間隔の比）= (0.2, 0.1, 2)、(0.2, 0.1, 2)、(10, 0.1, 2) とした。金属周辺の媒体（誘電体）は空气中とした。シミュレーションに用いた金属微粒子の光学パラメータを Table 2-1 に示す。

Table 2-1 FDTD シミュレーションに用いた金属微粒子の光学パラメータ

	金微粒子	銀微粒子
屈折率 (n) [8]	0.34057+2.7156i	0.0536+3.7598i
Model	Drude	Drude
瞬間比誘電率 (ε_{∞})	9.0685	5.8
波長 (λ)	570 nm	570 nm
粒径 (d)	20 nm	5 nm

(*) SPR 測定によって求めた金微粒子（粒径を 24 nm と仮定）吸着層の誘電関数の実部

2-3 実験結果と考察

2-3-1 銀微粒子シート積層数の検討

プラズモンフルカラーの先行研究では、金基板上に三層積層した銀微粒子膜においてもっとも大きな吸光度が得られた。二層及び四層では吸光度は大きく

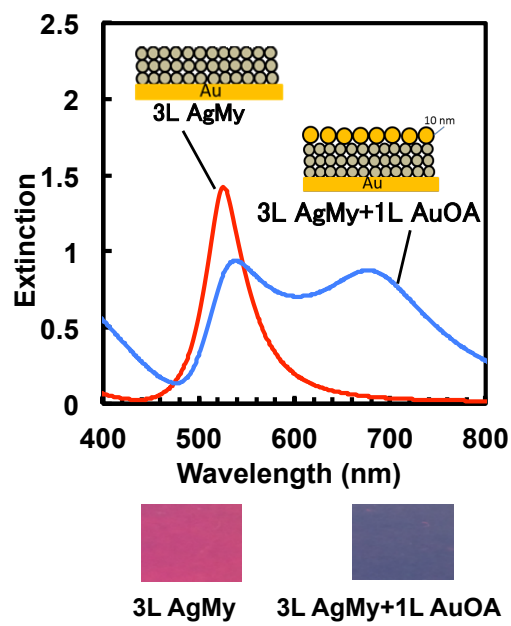


図 2-9 金基板上に銀微粒子シートを三層積層した基板 (a) とその上に金微粒子シートを 1 層積層した基板 (b) の反射消光スペクトル

減少する。これを参考に、本研究でプラズモンフルカラー基板として用いる銀微粒子積層数を、実際に三層の銀微粒子膜上に金微粒子膜を一層転写し、その際の呈色変化によって実験的に決定した（図 2-9）。

三層の銀微粒子膜上に金微粒子シートを転写することにより、金微粒子由来の吸収（ $\lambda = 680 \text{ nm}$ ）とともに、銀微粒子由来の吸収（ $\lambda = 530 \text{ nm}$ ）の大幅な減少とシフトがみられた。基板の呈色はピンクから紫に変化した。この結果から、金基板上に三層積層した銀微粒子膜を測定基板として用いた際、生体分子認識反応によって金微粒子が銀微粒子膜に吸着すると、基板が同様の呈色反応を示すことが期待された。よって本研究では金基板上に銀微粒子シートを三層積層した微粒子膜をプラズモンフルカラーバイオセンサー基板として用いることとした。

2-3-2 SPR 法による金微粒子の吸着の確認

図 2-10 は、金基板上に固定化したストレプトアビジン表面に、 1.19 mg/ml の微粒子分散液からビオチン導入金微粒子を 1 時間吸着させた際の SPR 共鳴角のシフトを示す。図 2-11 は、入射角度を 59.5° に固定して行った吸着速度測定の結果である。金微粒子注入後、反射率の上昇は約 1 時間で飽和に達した。これらの結果から、ビオチン導入金微粒子がストレプトアビジン固定化基板上に問題なく吸着されることが明らかになった。また、飽和吸着を望む場合は、今後吸着時間を 1 時間に設定することとした。

2-3-3 金微粒子の表面被覆率の評価

図 2-12 は、金基板上に固定化したストレプトアビジン表面に、濃度の異なる微粒子分散液から、ビオチン導入金微粒子を 1 時間吸着させた際の SEM 画像を示す。この画像から ImageJ ソフトウェアを用いて金微粒子の個数を数え、基板表面への金微粒子の吸着数（表面被覆率）を算出した。この結果を Table 2-2 にまとめた。微粒子分散液の濃度の上昇に伴い金微粒子の吸着量が増加しており、表面被覆率が Langmuir 型で増加した。

さらに、プラズモン共鳴角シフトからの被覆率評価も行った。図 2-14 は異な

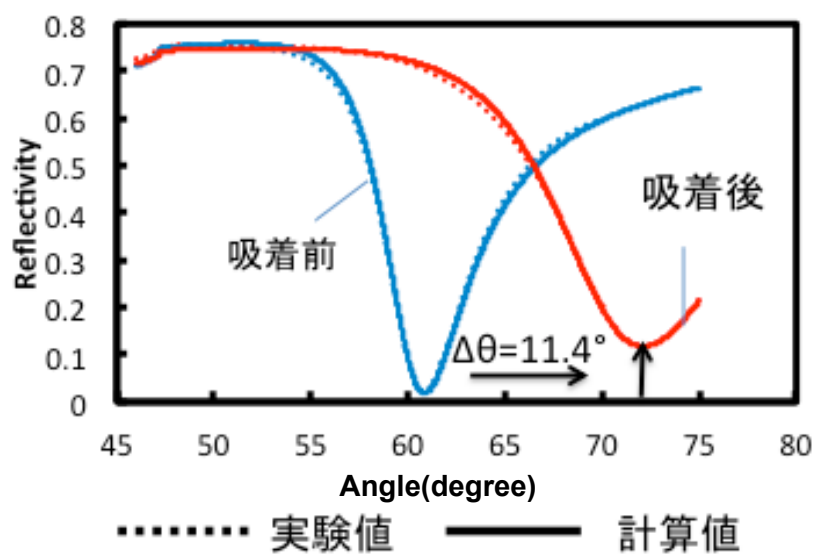


図 2-10 ストレプトアビジン固定化金基板上へのビオチン導入金微粒子吸着による共鳴角シフト（角度スキャンデータ）

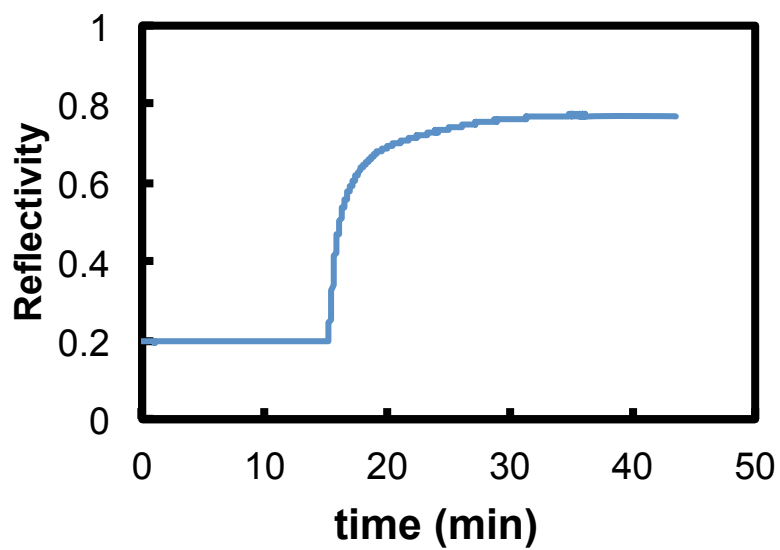


図 2-11 SPR Kinetics 測定による金微粒子の吸着速度データ

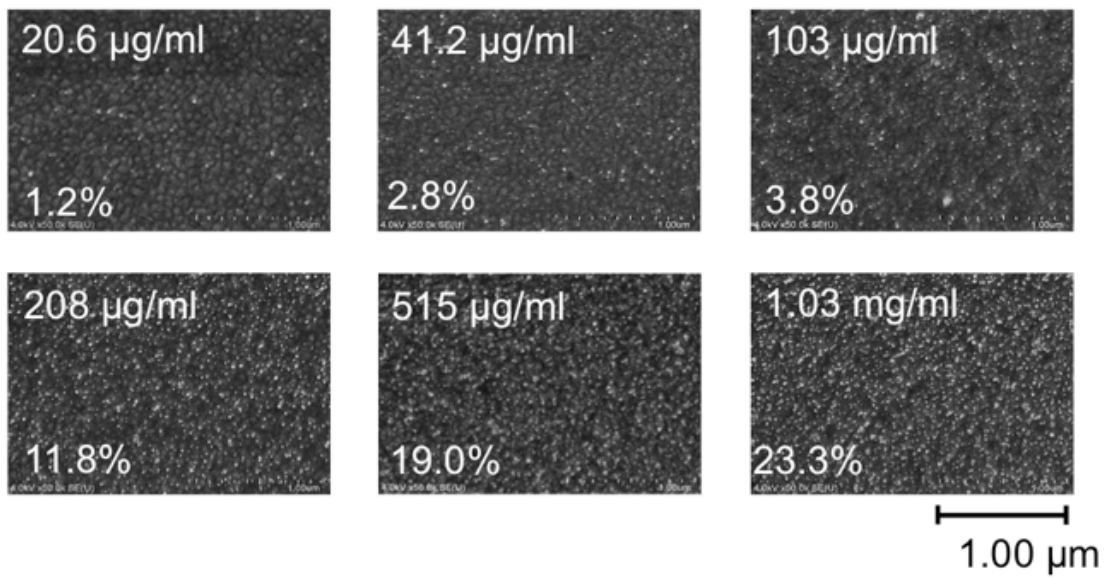


図 2-12 ストレプトアビジン固定化金基板表面に吸着したビオチン導入金微粒子の SEM 画像（左上の数字は金微粒分散液の濃度、左下の数字は Image-J を用いて算出した金微粒子による表面被覆率）

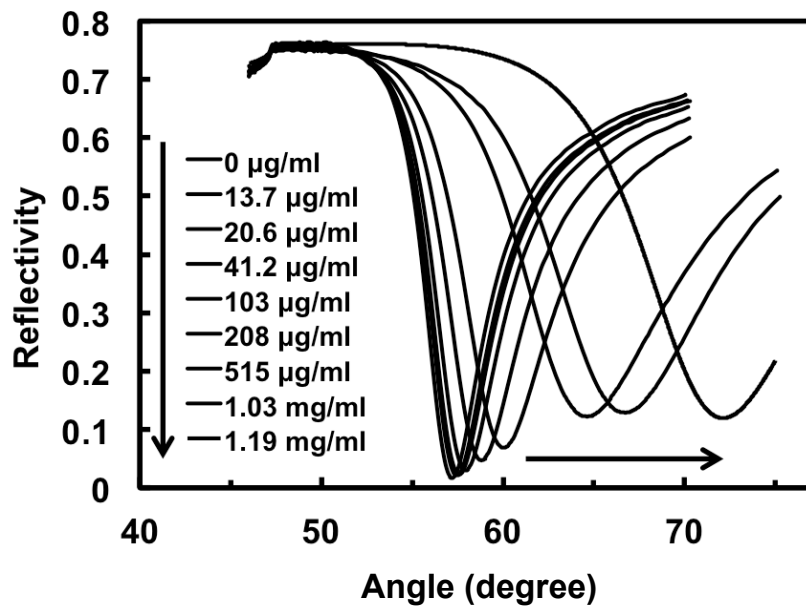


図 2-14 異なる濃度の分散液からのビオチン導入金微粒子のストレプトアビジン固定化金基板上への吸着による SPR 共鳴角シフトデータ

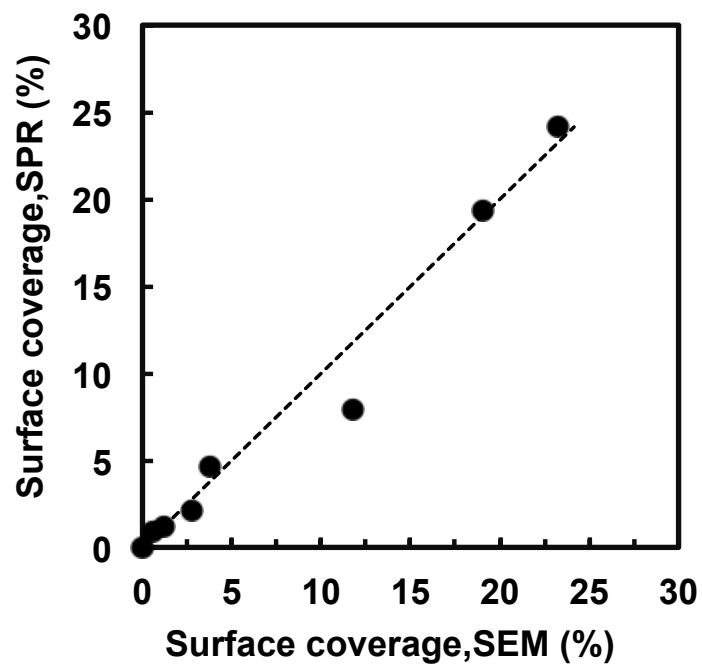


図 2-15 SEM および SPR 測定で得られた金微粒子表面被覆率の相関

る濃度の金微粒子分散液からの金微粒子吸着によるプラズモン共鳴角シフトの測定結果である。金微粒子分散液の濃度の上昇に伴って、プラズモン共鳴角のシフトが大きくなったことから、基板表面に吸着した金微粒子の数が増加したことが示唆された。この共鳴角シフトから、Winspal プログラムのフィッティングによって金微粒子吸着層の実効誘電率 ϵ'_{eff} を求め、Table 2-1 にまとめた。この値から、Maxwell-Garnett 理論に基づき金微粒子の体積分率 f を求め、その値から表面被覆率を算出した。その結果を Table 2-2 に示す。図 2-15 の相関図に示すように、SEM および SPR 測定で得られた被覆率の値が非常に近いことからそれぞれの手法により求めた金微粒子吸着の被覆率は正しく評価できていると考えられる。

Table 2-2 金微粒子吸着層の実効誘電率および表面被覆率

Concentration of biotin-capped AuCA solution	13.7 μg/ml	20.6 μg/ml	41.2 μg/ml	103 μg/ml	208 μg/ml	515 μg/ml	1.03 mg/ml	1.19 mg/ml
ϵ'_{eff} (*)	1.80	1.81	1.85	1.94	2.06	2.54	2.76	3.12
Surface coverage (SEM) /%	0.57	1.17	2.77	3.81	11.77	19.00	23.25	
Surface coverage (SPR) /%	0.90	1.20	2.10	4.65	7.95	19.35	24.15	31.5

(*) SPR 測定によって求めた金微粒子 (粒径を 24 nm と仮定) 吸着層の誘電関数の実部

2-3-4 金微粒子の吸着による消光スペクトルおよび呈色変化

ビオチン導入金微粒子分散液の濃度を 10.3 μg/ml から 1.19 mg/ml まで変化させて、ストレプトアビジン固定化金基板、およびストレプトアビジン固定化プラズモンフルカラー基板上に滴下し、一時間吸着反応させた。表面へのストレプトアビジンの固定化法が同じであることから、ここでは金基板上への金微粒子の吸着量と、プラズモンフルカラー基板上への金微粒子の吸着量は同じであると仮定した。

図 2-16 (a) に、プラズモンフルカラー基板へのビオチン導入金微粒子の吸着

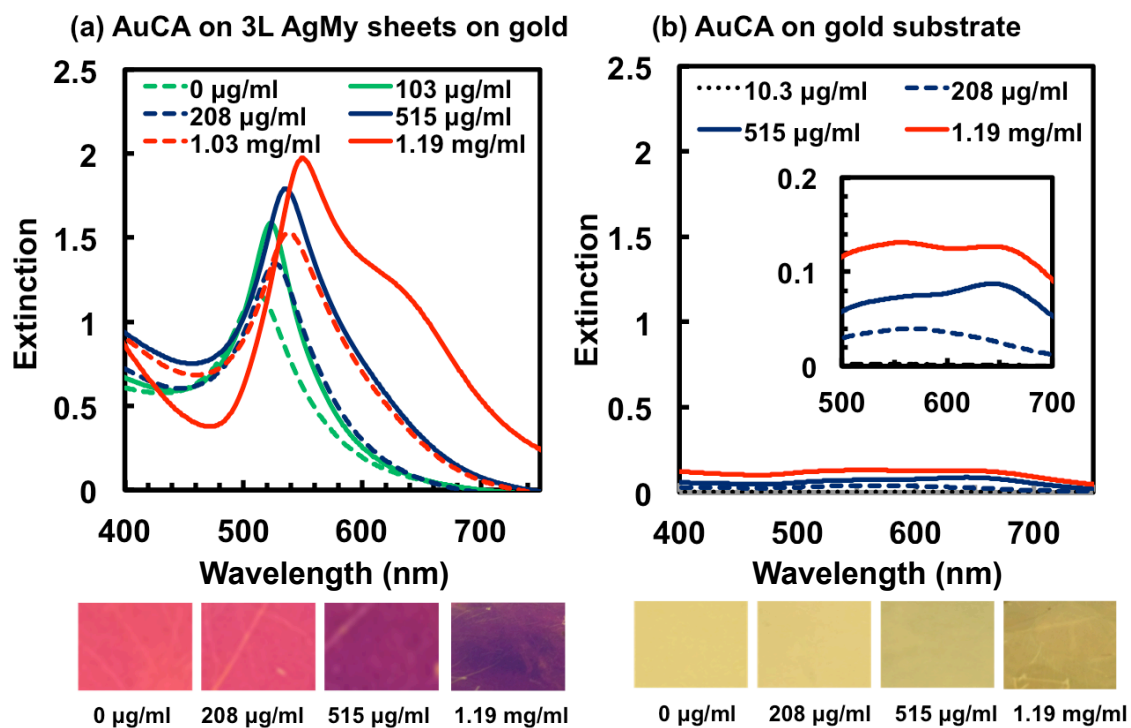


図 2-16 ストレプトアビジン固定化プラズモンフルカラー基板 (a) とストレプトアビジン固定化金基板 (b) 上へのビオチン導入金微粒子の吸着による反射消光スペクトルと呈色の変化

による、消光スペクトルと基板の呈色変化を示す。金微粒子分散液の濃度が 515 $\mu\text{g/ml}$ 以上のとき、ピンクから紫への基板の呈色変化が明確に確認された。この時、金微粒子由来の吸収 ($\lambda = 650 \text{ nm}$) はわずかにショルダー程度であったが、銀微粒子由来の吸収 ($\lambda = 550 \text{ nm}$) の長波長シフトと広く長波長域にわたる吸収のテール (吸収の上昇) が現れた。一方、図 2-16 (b) にビオチン被覆金基板上での測定 (コントロール実験) の結果を示す。高濃度分散液からの吸着において、わずかに金微粒子の局在プラズモン共鳴由来の吸収が見られたが ($\lambda = 650 \text{ nm}$)、呈色変化では、金の色がわずかに濃くなった程度で目視での検出はできなかった。以上のことから、プラズモンフルカラー基板を検出基板として用いることで、目視での確認可能な大きな呈色変化を得られることが明らかになった。

2-3-5 金微粒子の表面被覆率と吸光度との相関解析

図 2-17 は、図 2-16 (a) における銀微粒子シート由来 ($\lambda = 500 - 550 \text{ nm}$) の共鳴波長のピーク強度 (a) およびピーク位置 (b) を金微粒子の表面被覆率に対してプロットしたものである。両値とも表面被覆率に対してほぼ線形に値が増加しているが、特にピーク位置に関しては非常にきれいな線形の正の相関を示すことがわかった。

2-3-1 の銀微粒子シート三層積層基板に金微粒子シート一層を積層した場合の実験結果では (図 2-9)、金微粒子シートの積層により、銀微粒子シート由来の吸光度はむしろ減少する傾向を示した。それに対して今回の金微粒子吸着実験では、上述の通り正の相関を示した。これは積層数により吸光度が最大になる積層数が、三層と四層との間で、少なくとも直径 24 nm の金微粒子が 30% の表面被覆率で吸着した際の実効膜厚よりも厚いところにあることを示している。すなわち、微粒子の吸着がさらに進み、ある閾値を超えると、吸光度は減少すると予想される。この結果は、FDTD シミュレーションにおいても再現でき、三層の銀微粒子膜上に金微粒子膜を積層させた場合、0.5 層の場合の方が 1 層の場合よりも吸光度が大きいという結果になった (図 2-18)。これらの非線形的な吸光度の変化は、金属微粒子積層膜の電磁誘起透明化現象と連動した、膜厚による光閉じ込めの効果の変化で理論的に説明できる。

以上のような状況により、今回の実験では、金微粒子の吸着量が増えるにつれて、銀微粒子由来の局在プラズモン共鳴ピークは長波長シフトするとともに、

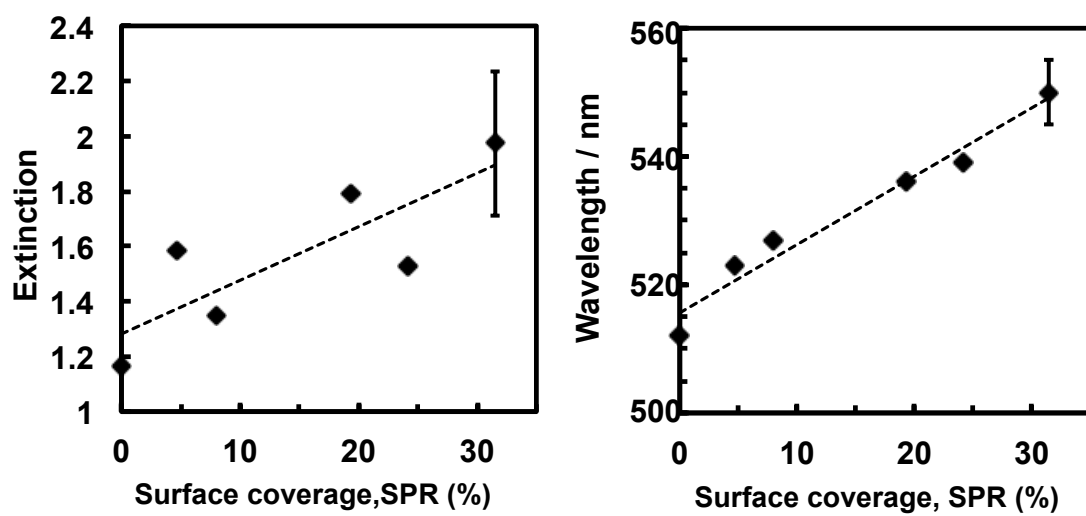


図 2-17 プラズモンフルカラー基板上へのビオチン導入金微粒子吸着により生じた銀微粒子シート由来の共鳴位置 (a) およびピーク強度 (b) と金微粒子表面被覆率との相関

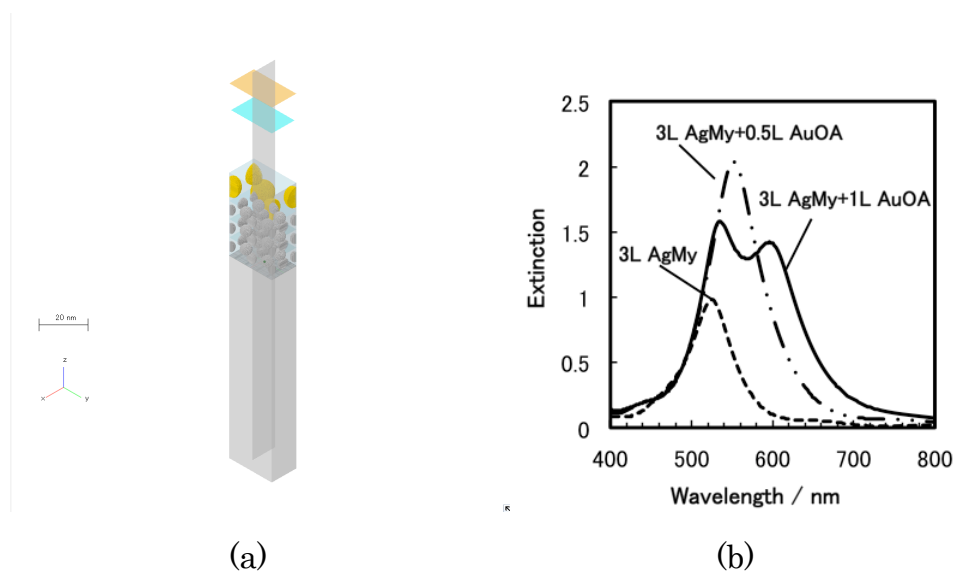


図 2-18 FDTD シミュレーションに用いたモデル (a)。金基板上銀微粒子三層積層膜、ならびにその上に 0.5 層と 1 層の金微粒子層を積層した際の消光スペクトル (FDTD シミュレーションでの計算結果)

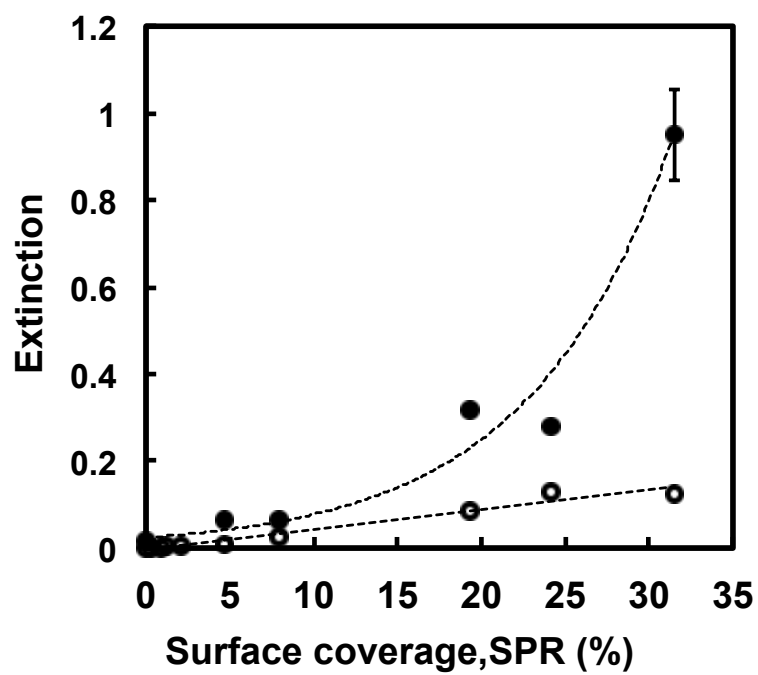


図 2-19 $\lambda=650 \text{ nm}$ での反射消光強度と表面被覆率の関係：プラズモンフルカラー基板上（黒点）と金基板上（白点）の比較

吸光度は単調増加を示した。この結果は、プラズモンフルカラーセンサーを定量測定にも応用できる可能性を示すものである。

図 2-19 は、波長 650 nm での吸光度を金微粒子の表面被覆率に対してプロットしたものである。比較のために金基板上のコントロール実験の結果を示してある。金基板上では金微粒子の表面被覆率に対して波長 650 nm の吸光度は、線形に増加しているが、この吸光度の増加は、金微粒子吸着層の実効誘電率の増加によるベースラインの上昇によるもので、金微粒子の局在プラズモンによる吸収ピークそのものは、最も高濃度からの吸着の場合であっても、0.02 程度であった。一方、プラズモンフルカラーバイオセンサー上では、金微粒子の表面被覆率に対して指数関数的な吸光度の上昇が確認された。この波長位置では、光閉じ込みによる波長 550 nm の吸収のテールに、金微粒子由来の 650 nm の吸収が重なり、吸光度の変化が最大となったと思われる（表面被覆率が 31.5% のときにおよそ 10 倍の吸光度の増加が得られた）。このように大きな波長シフトおよび吸光度の変化が 550 nm～650 nm 以上の波長域でみられたことで、プラズモンフルカラー基板では、金基板と比較して非常に大きな呈色変化（ピンクから紫）が観察されたと考えられる。

また、FDTD シミュレーションによって、吸着した金微粒子の表面被覆率と非線形な吸光度の変化について考察を行った。

図 2-20 に示す系を用いて FDTD シミュレーションを行った。金基板上に銀微粒子シート三層を積層し、SiO₂ 層及び有機物のスペーサー層 (25 nm)、その上の層に金微粒子が吸着したモデルを使用した。有効媒質近似によって、銀微粒子シート三層および吸着した金微粒子層をそれぞれ高い屈折率と消光係数を持つ均一な誘電体層（有機キャッピング分子により微粒子層は絶縁体であるため）とし、金微粒子層の膜厚を粒径の 20nm 以下の値に変えることで、金微粒子の被覆率が変わった時のスペクトル変化を計算により求めた。銀微粒子シート、金微粒子シートは、それぞれ 470 nm, 630 nm に吸収ピークを持つローレンツ型の誘電関数を設定した¹。

FDTD シミュレーション結果を図 2-21 および図 2-22 に示す。金基板上に金微粒子を吸着させた場合、膜厚の上昇（被覆率の上昇）に伴い、金微粒子由来の吸収（ $\lambda=670$ nm 付近）の単調な増大が確認された（図 2-21）。このとき、膜厚による共鳴波長の変化は見られなかった。金基板に銀微粒子シート三層、スペーサー 25 nm の上に金微粒子を吸着させた系の場合（図 2-22）、膜厚の増

大にしたがって、銀微粒子由来および金微粒子由来の両方の吸光度に非線形な上昇が確認された。銀微粒子由来の吸収は膜厚が 12 nm（被覆率換算 60 %）で最大値をとり、金微粒子由来の吸収は膜厚が 10 nm（被覆率換算 50 %）のとき最大値をとった。膜厚がさらに増えると、両方の場合において吸光度は減少した。この結果は有効媒体近似を使わずに微粒子の自己組織化構造を想定して行った FDTD シミュレーションの結果（図 2-18）と良い一致を示し、有効媒体近似による計算の信頼性を確認できた。

図 2-23 は、金微粒子の局在プラズモン共鳴波長（金基板上では 670 nm（図 2-21）、銀微粒子シート 3 層上では 630 nm（図 2-22））における吸光度を、金微粒子層の膜厚に対してプロットしたものである。このプロットは図 2-19 の実験結果の検証に相当する。図 2-19 の実験の結果では被覆率 20%（膜厚換算で 4 nm）程度から吸光度が非線形に上昇し、30%（膜厚換算で 6 nm）程度まで吸光度の上昇が見られている。シミュレーションの結果は、これをよく再現するとともに、金微粒子の吸着量がさらに増え 50%（膜厚換算で 10 nm）の被覆率を越えると、吸光度は減少に転じることを予測した。

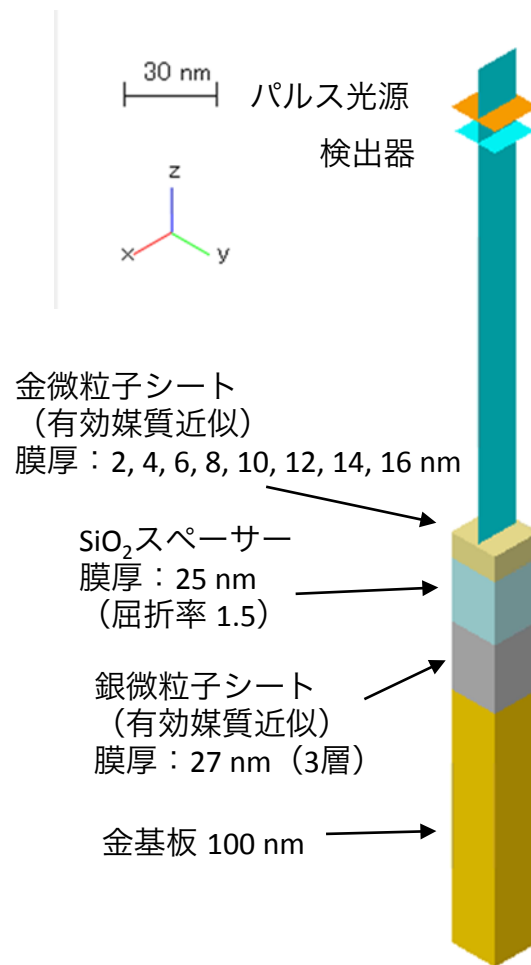


図 2-20 FDTD でのシミュレーションモデル

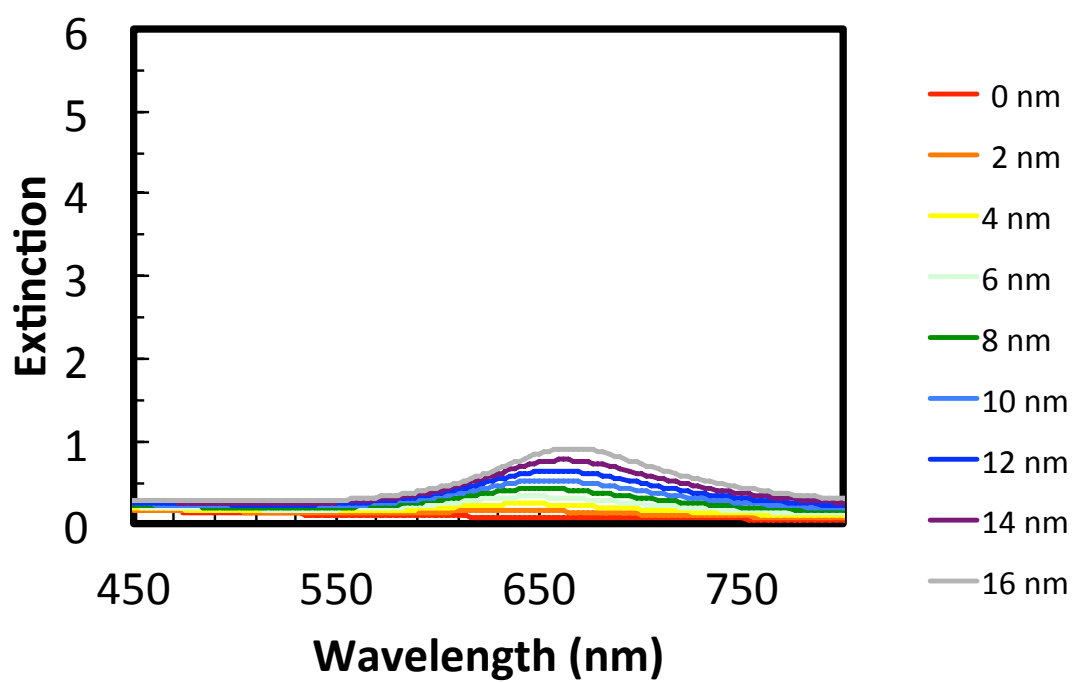


図 2-21 FDTD による、金基板上での金微粒子シートの膜厚を変化させたときの吸光度変化

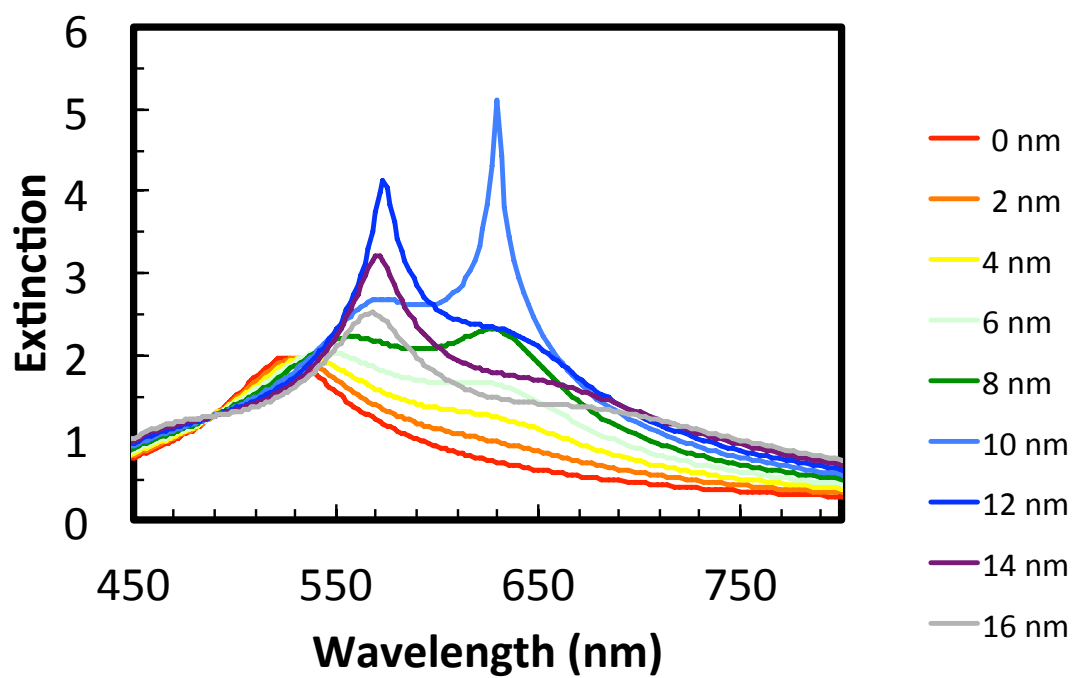


図 2-22 FDTD による、金基板に銀微粒子シート三層を積層した基板上に金微粒子シートの膜厚を変化させたときの吸光度変化

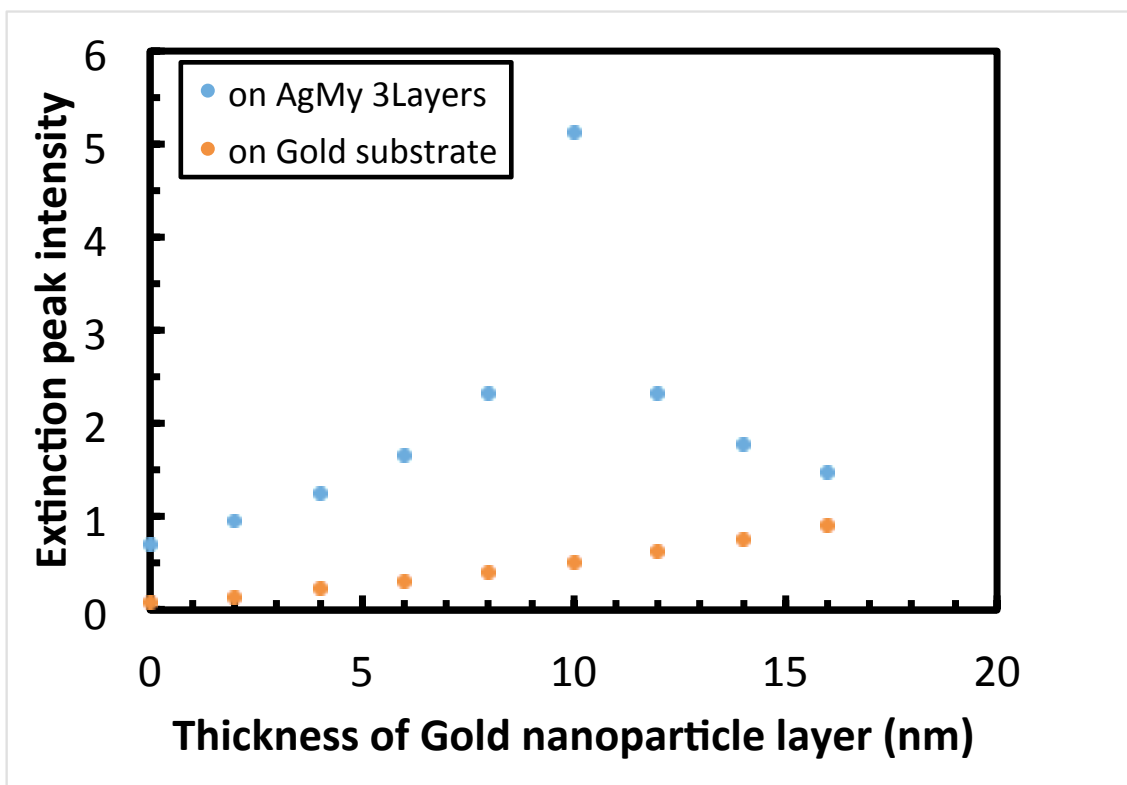


図 2-23 金基板上および金基板に銀微粒子シート三層を積層した基板上の金微粒子層の膜厚（金微粒子被覆率）に対する吸光度変化（FDTD シミュレーション結果）。吸光度はそれぞれ金微粒子の局在プラズモン共鳴波長での値である（金基板上：660 nm, 銀微粒子シート三層上：630 nm）

2-4 まとめ

本研究では、電磁誘起透明化現象を利用し、高感度かつ定量的（半定量的）な測定が可能なカラリメトリックバイオセンサーについて研究を行った。

SEM 観察および SPR 法により、ビオチン導入金基板上へ固定化した金微粒子の吸着量（表面被覆率）を定量的に求め、吸収スペクトルの変化並びに呈色変化との相関を詳細に検討した結果、表面被覆率 30 %以下と非常に低い被覆率であるにもかかわらず、プラズモンフルカラー基板上では、大きなスペクトル変化と呈色変化が見られていたことが明らかになった。コントロール実験として行った金基板上での実験では、目視で検出できるような色調変化や大きなスペクトル変化が見られなかったのとは対照的である。今回の実験条件においては、金微粒子表面被覆率と吸収ピーク位置シフトとの間には、極めて良い線形の相関が見られ、プラズモンフルカラー基板を定量（半定量的）測定に応用する可能性が示唆された。一方、650 nm 位置の吸光度では、銀微粒子積層構造由来の光閉じ込め効果の増大と金微粒子の局在プラズモン吸収の両方の効果で、金微粒子の表面被覆率が増えるにつれ、吸光度が指数関数的に増大し、被覆率が 31.5%のときには金基板のコントロール実験に比べて約 10 倍の値が得られた。

本実験は、ストレプトアビジン固定化基板をプローブ表面、ビオチン導入金微粒子をターゲット分子に見立てたバイオセンサー性能のモデル実験であったが、実際にセンシングを行う場合には、ストレプトアビジンの吸着量を、ビオチン被覆金微粒子をマーカーとして検出するサンドイッチアッセイ方式が現実的であると思われる。今回の実験を通じて、その場合に使用すべきビオチン導入金微粒子マーカーの適切な濃度（ $\sim 30\text{mg/ml}$ ）及び反応時間（1 時間）が明らかになった。

参考文献

1. Okamoto, K.; Tanaka, D.; Degawa, R.; Li, X.; Wang, P.; Ryuzaki, S.; Tamada, K. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–10.
2. Yoshida, A.; Imazu, K.; Li, X.; Okamoto, K.; Tamada, K. *Langmuir* **2012**, *28*, 17153–17158.
3. Keum, C-D.; Ishii, N.; Michioka, K.; Wulandari, P.; Tamada, K.; Furusawa, M.; Fukushima, H. *J. Nonlinear Opt. Phys. & Mater.*, **2008**, *17(2)*, 131-142.
4. Toma, M.; Toma, K.; Michioka, K.; Ikezoe, Y.; Obara, D.; Okamoto, K.; Tamada, K.; *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2011**, *13*, 7459-7466.
5. Shen, C.; Hui, C.; Yang, T.; Xiao, C.; Tian, J.; Bao, L.; Chen, S.; Ding, H.; Gao, H. *Chem. Mater.*, **2008**, *22*, 6939-6944.
6. Hiramatsu, H.; Osterloh, F. E. *Chem. Mater.*, **2004**, *13*, 2510.
7. Frens, G. *Nature*, **1973**, *105*, 20-22.
8. Li, X.; Tamada, K.; Baba, A.; Knoll, W.; Hara, M. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15755-15762.
9. Li, X.; Tamada, K.; Baba, A.; Hara, M. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9*, 408-416.
10. Tawa, K.; Cui, X.; Kintaka, K.; Nishii, J.; Morigaki, K. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2011**, *221*, 261–267.
11. Li, X.; Tamada, K.; Baba, A.; Knoll, W.; Hara, M. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15755-15762.
12. 特許 4415083 (2009.12.4) 銀微粒子製造方法、玉田他

3. 縦型 PDMS ナノポアの開発

本章では、軸対称なナノポアを静電容量の低い PDMS のみで作製し、S/N 比の高い解析が可能な縦型 PDMS ナノポアについて述べる。このデバイスを使うことでノイズは 1.86 pA という非常に低いノイズレベルを達成し、55 pA という小さいシグナルの検出に成功した。この縦型 PDMS ナノポアは、高い S/N 比での計測が可能で定量的な解析が可能な一分子/一粒子の計測システムにおいて重要な役割を果たすことが示唆された。

3-1 イントロダクション

一章で述べたように、ナノポアデバイスは、ポア通過物質に伴うイオン電流のブロック電流から、一分子/一粒子のサイズや形状などの計測を非修飾で可能にする技術であり、主に生体物質や生体分子の解析技術として注目されている¹⁻⁴。近年、一分子レベルの解析を実現させるために、イオン電流の S/N 比を改良する研究が世界中で展開されている。先行研究により、ナノポアデバイスの静電容量を下げることでノイズを減少させられることが報告されており、PDMS など低静電容量材料によるナノポアデバイスが報告されている⁵⁻⁷。しかし、これまでの PDMS ナノポアデバイスは、作製プロセスの関係でマイクロ流路の一部にポアを有する横型のデバイス構造をしており、ポアの形状は四角型の非軸対称になっている。ブロッキング電流の強度は、ポア内部における検体の通過位置にも依存するため、非軸対称ポア構造ではその依存性を定量的に議論することが困難である。そのため、軸対称構造の PDMS ナノポアが求められている。

本章では、作製プロセスを改良することで作製が可能になった、縦型の軸対称 PDMS ポアについて述べる。これまでの研究では、ゲル状の PDMS を鋳型に流し込み、それを固めることでナノポアを含む流路を成型していた。鋳型が四角型の非軸対称であるため、ポア構造も必然的に四角型であった。本研究では、銅薄膜上に厚さ 10~20 μm の PDMS を塗布し、FIB (Focus Ion Beam) を用いることでポアを作製した。そのポアが開いている PDMS 薄膜を流路がパターンニ

グされた PDMS で挟むことで、縦型かつ軸対称なナノポアを作製することに成功した。作製した縦型 PDMS ナノポアを SEM、共焦点顕微鏡によってポアの厚み、直径を評価した。また、ポリスチレン粒子をナノポアに通過させ、その際のイオン電流のブロッキング電流を計測し、これまでのナノポアデバイスでは計測が不可能であった 100 pA 以下のブロッキング電流の計測を試みた。

本デバイスは、流路も含め全て PDMS で作製している。これにより、これまで PDMS を使ったナノポアデバイスで達成できなかった定量的な検出、さらに様々な一分子/一粒子の検出が可能になることが期待される。

3-2 実験

3-2-1 PDMS ポアデバイスの作製

本研究で作製した PDMS (polydimethylsiloxane) (SYLGARD184 SILICONE ELASTMER KIT) ナノポアデバイスの写真と概略図を図 3-1 に示す。図 3-1 のように、PDMS ナノポアデバイスは全て PDMS で作製し 5 層構造をしている。PDMS ナノポアとそれを挟む中間層、その外側に溶液を導入する流路と電極を挿入する最表層を配置した。

最表層の流路は、窒化シリコン基板上に SU-8 で鋳型を作製し、その鋳型を用いて作製した。(図 3-2)。図 3-2 の窒化シリコン基板に PDMS を主剤と硬化剤を 10:1 で混合したものを流し込み、85°C で 16 時間以上加熱し硬化させた。直径 1.0 mm の生検トレパンで PDMS 上部から三ヶ所穴を開けた (二ヶ所が溶液を流し込む流路、一ヶ所が Ag/AgCl 電極の差込口)。

図 3-3 に縦型 PDMS ポアの作製方法を示す。主剤と硬化剤を 10:1 で混合した PDMS を 10 μm 厚みの銅板 (ニラコ社) 上に、7000 rpm で 60 秒間スピコートし、85°C で 16 時間以上加熱し硬化することで、厚さ 10~20 μm の PDMS 薄膜を作製した。それを 3.0 mm 径の円形に切り抜き、FIB (Focus Ion Beam) (Application; Si, ϕ ; 1.6 μm , z; 60 μm , 印加電圧: 30 kV, 電流値 I; 15 nA) を同じ場所に 10 回照射することで中心部にポアを開けた。1.67 $\times 10^2$ g/l の過硫酸アンモニウムに 3 時間浸すことで銅を溶解させ、MilliQ でリンスし PDMS のみの基板を取り出した。

PDMS ナノポアを挟み込む中間層は、窒化シリコン上に主剤と硬化剤を 10:1

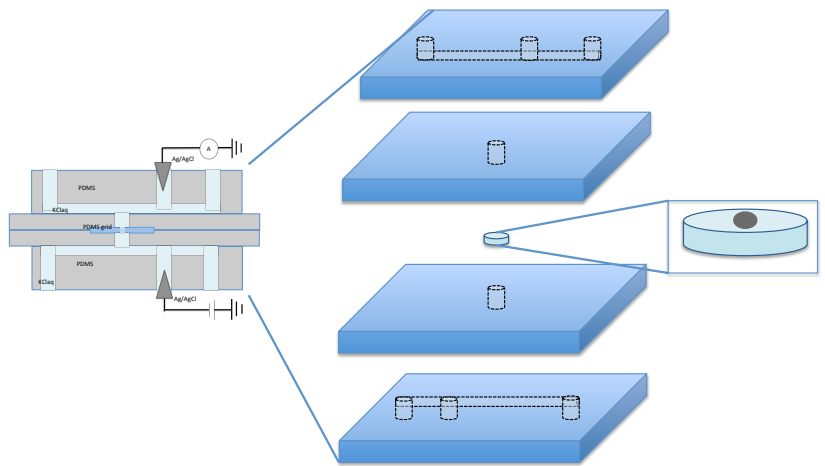
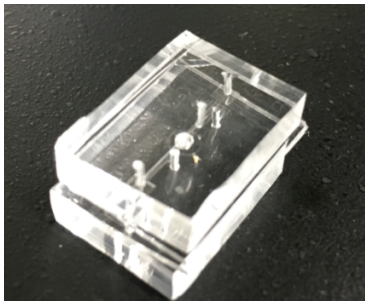


図 3-1 ナノポアデバイスの写真（左）と概略図（右）

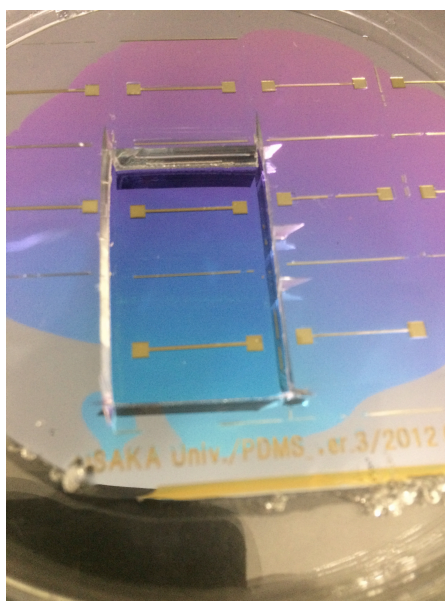


図 3-2 PDMS 流路の鋳型に用いた窒化シリコン基板

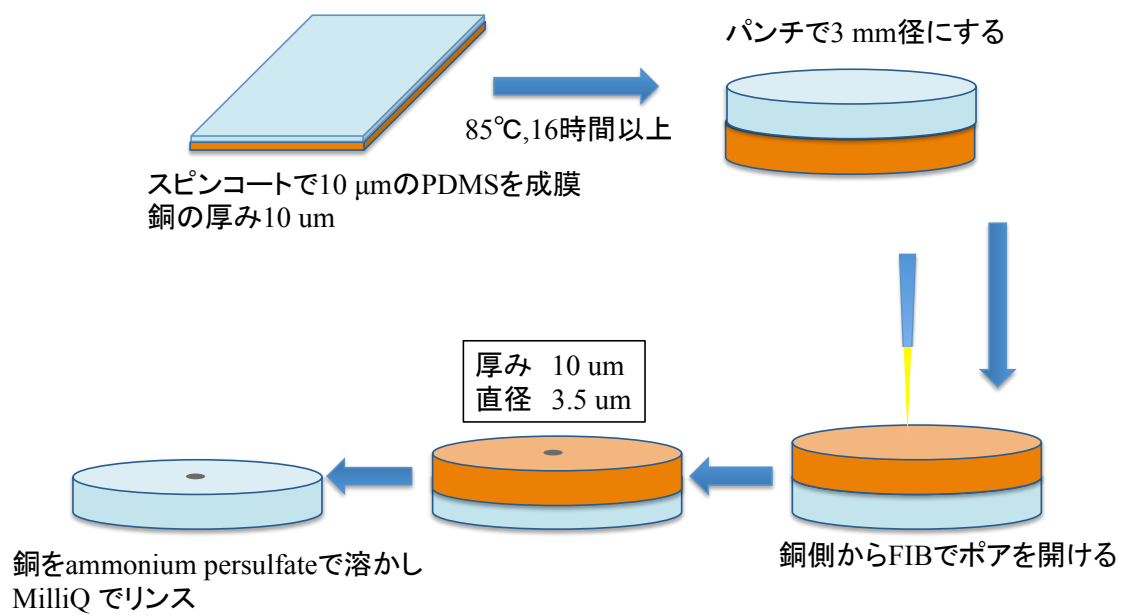


図 3-3 縦型 PDMS ナノポアデバイスの作製方法

で混合した PDMS を流し込み、厚みが約 1 mm になるように量を調整し、中心部に生検トレパンで 1.5 mm の穴を開けた。

上記の方法で作製したそれぞれの層を真空プラズマクリーナー（FEMT SCIENCE 社）によってプラズマ処理（真空度 5.0×10^{-2} Torr, Power 100W, 30 秒）をすることで表面を親水処理し、85°C で 10 時間以上加熱し接着させた。

3-2-2 イオン電流測定

PDMS に Ag/AgCl 電極を使用して 500 mV の電圧を印加し、電流値 I_{ion} をハンドメイドのアンプを用いて 1 MHz の時間分解能で計測を行った。アンプからのシグナルはデジタイザー（National Instruments NI-5922）によって収録し、RAID hard drive（National Instruments HDD-8265）にデータ転送することで、高速測定を行った。また、これらの実験は LabVIEW によって制御を行い、得られたシグナルを 1-4-1 で述べた series resistance モデルによって評価した。

3-3 実験結果と考察

3-3-1 PDMS ポアの評価

FIB によって穴を開けた銅-PDMS 基板を、PDMS 側から低真空高感度走査電子顕微鏡（SEM-3500）20.0 kV, 2500 倍で観察した（図 3-4）。SEM 画像によってポアのサイズが 3.5 μm であることを確認した。超高分解能電界放出型走査電子顕微鏡（SU8000）を用いて銅基板上に 7000 rpm で 60 秒間スピコートした銅基板に塗布した PDMS の断面を観察した。これによって PDMS ナノポアの厚みが 10 μm であることを確認した（図 3-5）。

3-3-2 ノイズの評価

図 3-6 に今回作製した縦型 PDMS ナノポアのベースライン測定の結果を示す。この測定では、電解質溶液として 1.0×10^{-2} M の KCl 溶液を使用した。RMS ノイズを評価したところ、250 kHz で 1.86 pA（RMA）であった。これまでに報告されている RMS ノイズ値は、窒化シリコンナノポアで 131.64 pA、また PDMS

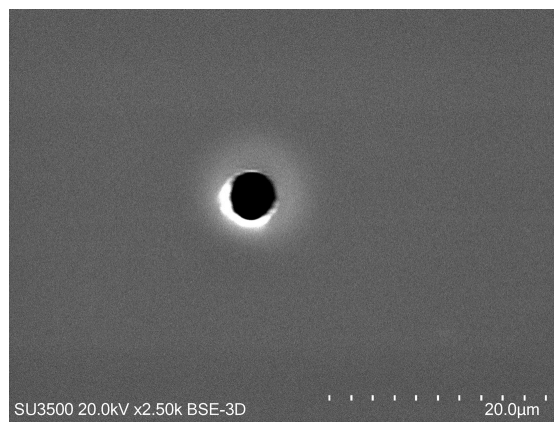


図 3-4 銅-PDMS 基板に開けたナノポアの SEM 画像 (PDMS 側)

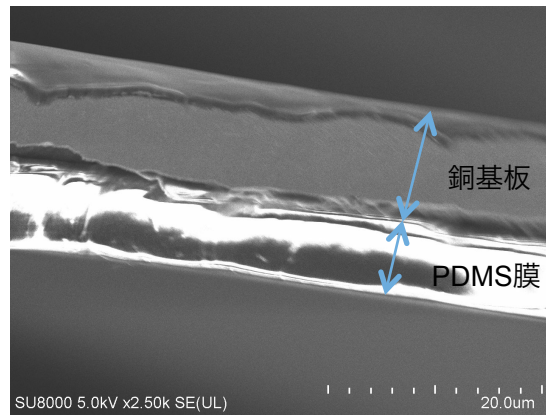


図 3-5 銅-PDMS 基板の断面 SEM 画像（上:銅基板、下 : PDMS 膜）

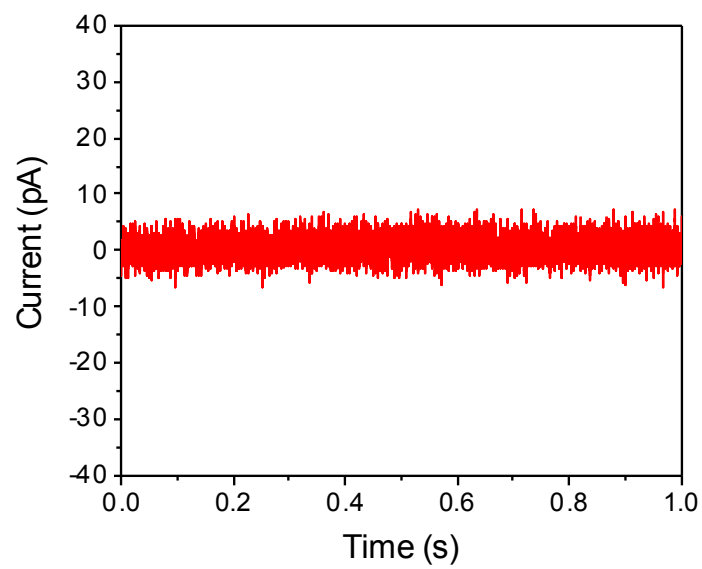


図 3-6 縦型 PDMS ナノポアデバイスのベースライン

を塗布した窒化シリコンナノポアでも 12.58 pA (RMS)⁵であり。そのため、本 PDMS ナノポアによって低ノイズ化に成功したと言える。

図 3-7 に窒化シリコン基板と PDMS ナノポアで計測したパワースペクトルを示す。電気計測のノイズは、ノイズ源によって周波数依存性があることが知られている⁴。図 3-7 に示す様に、特定の周波数に依存したシグナルは存在していない。さらに、ベース電流に周波数依存性では (図 3-8)、低周波に伴いノイズレベルが減少していることから、本 PDMS ナノポアにおけるノイズの主成分は、ホワイトノイズとピンクノイズであるといえる。よって、デバイスの静電容量低下に伴い、静電容量由来のノイズが減少したと考えられる。

3-3-3 過渡応答

図 3-9 に窒化シリコンで作製したナノポアと今回作製した縦型 PDMS ナノポアの過渡応答の測定の結果を示す。電圧印加時の電流値の立ち上がりから定常状態に安定するまでの時間の比較を行った。窒化シリコンの場合、どの印加電圧に対しても電流値が安定まで数秒かかっており、最も短いもので 1.0 V の時に約 8 秒かかっていた。一方、PDMS ナノポアの場合、電流が安定するまでの時間の印加電圧への依存性はほとんど見られず、約 250 μ s と窒化シリコンの場合と比較してもおよそ 30 倍も早く安定した。時定数 τ は式 (3) で表される。

$$\tau = R \times C \quad (3)$$

ここで R は素子全体の抵抗、C は素子全体の静電容量を示している。 τ はそれぞれ 8 秒と 250 μ 秒であり、抵抗値がそれぞれ $1.0 \times 10^9 \Omega$ 、 $1.3 \times 10^8 \Omega$ であるので、この結果から静電容量はそれぞれ、8.0 nF、1.92 pF であった。SiN に PDMS を塗布したポアの静電容量として 7.4 pF という値が報告されているため、今回の値は概ね整合性のある値であるといえる⁸。

3-3-4 ポリスチレン微粒子の測定

図 3-10 に直径 1.0 μ m のポリスチレン微粒子を直径 3.5 μ m、厚み 10 μ m の PDMS

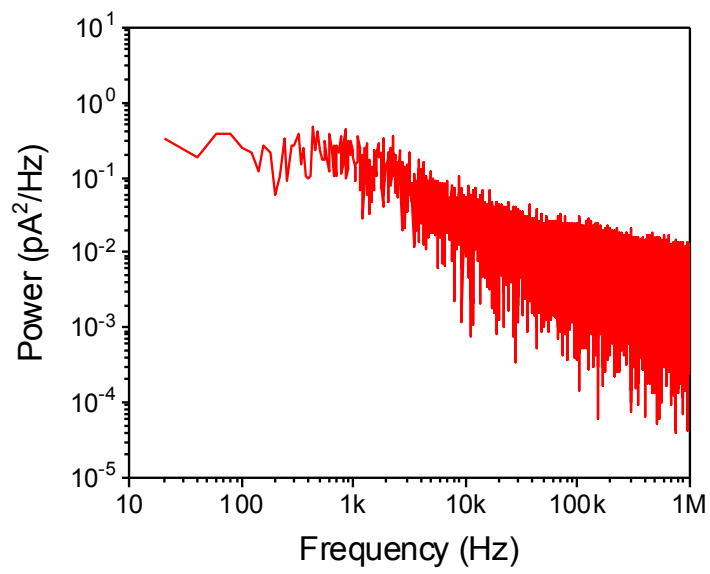


図 3-7 縦型 PDMS ナノポアデバイスのパワースペクトル

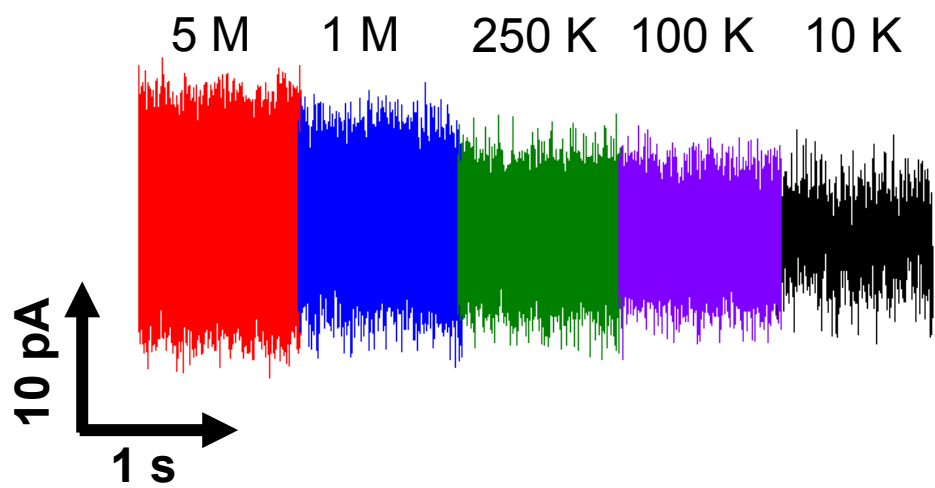


図 3-8 縦型 PDMS ナノポアデバイスでのベースラインのノイズ周波数依存性

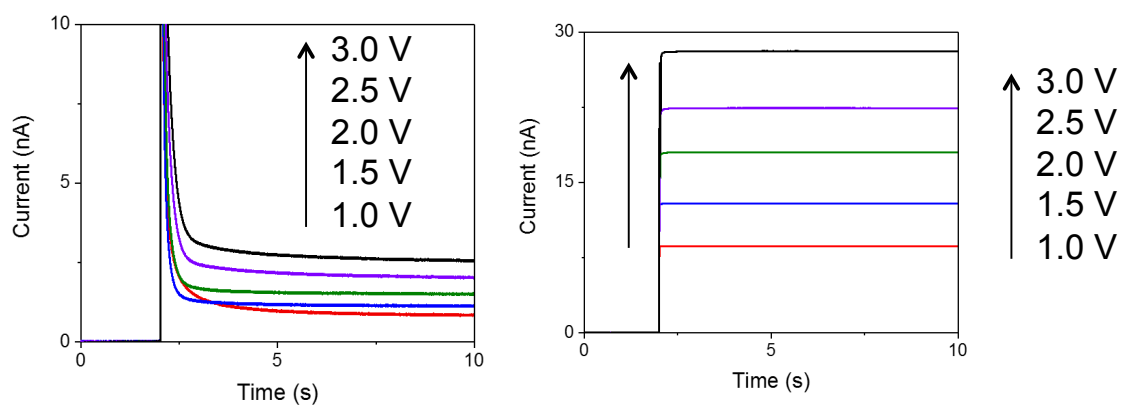


図 3-9 窒化シリコンナノポア(左)と縦型 PDMS ナノポアデバイス (右) の過渡応答

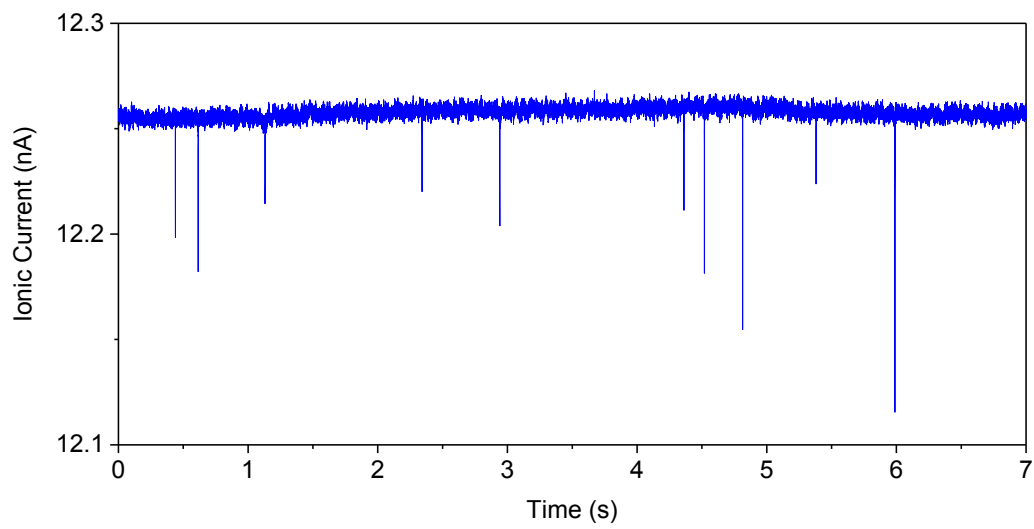


図 3-10 直径 $1.0\ \mu\text{m}$ のポリスチレン微粒子を直径 $3.5\ \mu\text{m}$ 、厚み $10\ \mu\text{m}$ の PDMS ナノポアに通過させた際のイオン強度-時間 (I_{ion-t}) のシグナル

ナノポアに通過させた際のイオン強度-時間 (I_{ion-t}) のシグナルを示す。イオン電流の結果から、ブロック電流の強度 (I_p) と幅 (t_d) の情報を得ることができた。この結果からブロック電流の統計処理を行った。図 3-11(a)にブロック電流の強度、図 3-11(b)にブロッキング電流の幅 (粒子通過時間) のヒストグラムを示す。ブロック電流の強度がナノポアを通過した物質の体積に依存していることから、 I_p ヒストグラムは通過した物体のサイズ分布を示している。この I_p ヒストグラムでは、55 pA 付近にピークの見られた。これまでの縦型ナノポアの先行研究では、100 pA 以下のブロッキング電流計測に成功した例はなく、本研究が世界で初めてである。さらに、series resistance モデルによる解析を行った。この計算では、ポア半径 1.75 μm 、ポアの厚み 10 μm 、電解質の抵抗率 30.7 $\text{m}\Omega$ 、粒子粒径 1.0 μm 、印加電圧 500 mV とした場合、イオン電流の強度は 55.2 pA であり、実験結果と良い一致を示した。このことから、本ポアデバイスによって粒子を正しく検出できていると考えられる。

また、ブロック電流強度のヒストグラムは通過した物体のサイズのみでなく、通過位置も影響することがわかっている⁹。これまでの研究によって、軸の中心を通過した場合にくらべ、軸から外れた位置を通過した際にブロッキング電流が大きくなることが知られている。図 3-11(a)の結果から、55 pA より大きいところになだらかに分布を有していることがわかる。一方、図 3-11(b)に示す t_d ヒストグラムでは 1.25 ms のところに分布が一つのみ存在している。このことから、 I_p ヒストグラムの 60 ~ 140 pA 付近の分布は、軸中心から外れた位置を通過したポリスチレン微粒子によるブロッキング電流であることが考えられる。この軸から外れた場合のイオン電流変化は(4)の式で記述できることが報告されている。

$$\Delta R = \Delta R_0 \left(1 + \frac{\varepsilon^{1.8/(d/D)}}{1.4(1-d/D)} \right) \quad (4)$$

ΔR は中心からずれた位置を通過した時の抵抗の変化、 ΔR_0 は中心を通過した時の抵抗の変化、 d は通過物の直径、 D はポアの直径、 b は中心軸からの距離である¹⁰。この式を用いて今回の実験結果を解析すると、直径 1 μm の粒子が中心軸から 830 nm ずれることで、ブロッキング電流の値が 140 pA を示すことがわかった。よって、今回の粒子計測では、粒子のポア内部における移動軸は、ポア中心から 0 ~ 830 nm 程度の範囲内であることが明らかとなった。

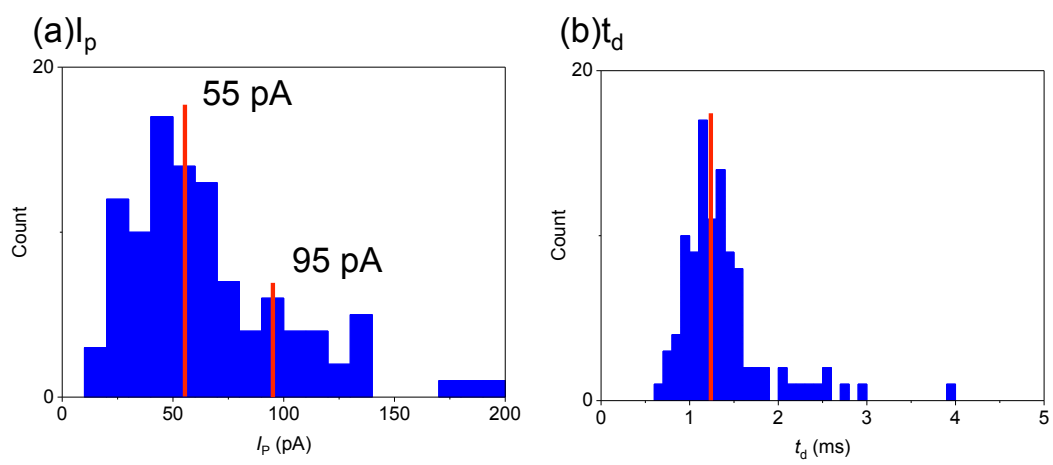


図 3-11 (a)ブロック電流の強度のヒストグラム、(b)ブロッキング電流の幅（粒子通過時間）のヒストグラム

このことから、縦型 PDMS ナノポアを使うことで物体の通過位置を定量的に議論することができ、ポア通過物質のサイズをより正確に定量評価できることが確認された。

3-4 まとめ

本研究では、低静電容量の PDMS 材料を使い縦型のナノポアデバイスを作製することで、定量的な測定が可能で S/N 比の高い縦型 PDMS ナノポアデバイスに関する研究を行った。

従来の PDMS ナノポア作製に使用されていた鋳型を使った成型法ではなく、FIB によってナノポアを作製することで縦型のナノポアデバイスの作製に成功した。イオン電流測定結果をヒストグラムによって解析すると、ブロック電流強度に二つの分布が見られた。これは、通過物質の通過位置依存性を定量的に評価できる可能性を示唆している。また、ノイズの測定においてもベース電流において、これまで報告されている窒化シリコンナノポアと比べ、約 1/70 まで減少することに成功した。また、 I_p ヒストグラムの結果から 55 pA 付近に分布中心が見られた。これまでの先行研究では、100 pA の以下のブロッキング電流計測に成功した例はなく、本研究が世界で初めてである。また、これらの結果は series resistance モデルによる計算とも良い一致を示した。

これらの結果から、縦型 PDMS ナノポアデバイスを用いることで、これまで S/N 比の観点から検出が難しかった、一分子や一粒子の計測が可能になることが示唆された。

参考文献

1. Yusko, E. C.; Bruhn, B. R.; Eggenberger, O. M.; Houghtaling, J.; Rollings, R. C.; Walsh, N. C.; Nandivada, S.; Pindrus, M.; Hall, A. R.; Sept, D.; Li, J.; Kalonia, D. S.; Mayer, M. *Nat. Nanotechnol.*, **2017**, *12*, 360–367.
2. Ellison, M. D.; Menges, S.; Nebel, L.; D’Arcangelo, G.; Kramer, A.; Drahusuk, L.; Benck, J.; Shimizu, S.; Strano, M. S. *J. Phys. Chem. C*, **2017**, *121*, 2005–2013.
3. Haque, F.; Li, J.; Wu, H.; Liang, X.; Guo, P. *Nano Today* **2013**, 56–74.
4. Ryuzaki, S.; Tsutsui, M.; He, Y.; Yokota, K.; Arima, A.; Morikawa, T.; Taniguchi, M.; Kawai, T. *Nanotechnology* **2017**, *28*, 155501.
5. Rosenstein, J. K.; Wanunu, M.; Merchant, C. a.; Drndic, M.; Shepard, K. L. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 487–492.
6. Lee, M.; Kumar, A.; Park, K.; Cho, S.; Kim, H.; Lim, M.; Kim, Y.; Kim, K. *Sci. Rep.* **2014**, 1–7.
7. Sen, Y. H.; Karnik, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 437–446.
8. Jain, T.; Guerrero, R. J. S.; Aguilar, C. a.; Karnik, R.. *Meas. Sci. Technol.* **2013**, *85*, 3871-3878
9. Tsutsui, M.; He, Y.; Yokota, K.; Arima, A.; Hongo, S.; Taniguchi, M.; Washio, T.; Kawai, T. *ACS Nano* **2016**, *10*, 803–809.
10. Qin, Z.; Zhe, J.; Wang, G. X.. *Meas. Sci. Technol.* **2011**, *22*, 1-10.

4. 総括

本論文では、バイオセンサーに求められている簡便で高感度かつ定量的な検出、さらに一分子/一粒子の検出技術の開発のために、「カラリメトリックバイオセンシング法」、および一分子/一粒子のコア技術である「ナノポアデバイス」についての報告を行なった。この章では、2,3章で述べた目標に対する「カラリメトリックバイオセンシング法」、「ナノポアデバイス」の結果の概要を説明し、これらのバイオセンサーの可能性についてまとめる。

4-1 プラズモンフルカラーを用いたカラリメトリックバイオセンサー

本研究では電磁誘起透明化現象に基づくプラズモンフルカラーをカラリメトリックバイオセンシング法に応用することで、高感度なカラリメトリックバイオセンシングの実現を目的とした。金基板上に銀微粒子シートを三層積層した微粒子膜をプラズモンフルカラーバイオセンサー基板として使用し、ビオチン-アビジン分子認識反応による微量の金微粒子の吸着を呈色変化により検出した。

まず予備検討において、金基板上銀微粒子三層積層膜の上に金微粒子を1層LS法により転写し、金微粒子の吸着時にピンクから紫への大きな呈色変化が得られることを事前確認した。基板上へのストレプトアビジンの固定化はチオールあるいはシランカップリング剤を開始剤として表面カップリング反応にて行った。ストレプトアビジン固定化金基板上にビオチン導入金微粒子を分子認識反応により吸着させたところ、金微粒子分散液の濃度によって金微粒子吸着量（表面被覆率）を30%以下で制御可能であることを、SEM観察およびSPR法により確認した。

プラズモンフルカラー基板上で、ビオチン-アビジン分子認識反応による金微粒子の吸着実験を行った結果、表面被覆率30%以下と非常に低い被覆率であるにもかかわらず、ピンクから紫への大きな呈色変化を確認した。一方、金基板上で行ったコントロール実験では、色調の変化はほとんどみられなかった。こ

のことから、プラズモンフルカラーバイオセンサーを使用することで、目視で確認可能な呈色変化を得られることが明らかになった。

金微粒子の被覆率と吸光度の相関を詳細にみると、プラズモンフルカラーバイオセンサー上に金微粒子が吸着した場合、金微粒子由来の吸収に加えて、銀微粒子積層シート由来の吸収ピークに大きな波長シフトと吸光度の変化がみられた。金微粒子表面被覆率と吸収ピーク位置シフトの間には、極めて良い線形の相関が見られ、プラズモンフルカラー基板を定量（半定量的）測定に応用する可能性が示唆された。一方、650 nm 位置の吸光度では、銀微粒子積層構造由来の光閉じ込め効果の増大と金微粒子の局在プラズモン吸収の両方の効果で、金微粒子の表面被覆率が増えるにつれ、吸光度が指数関数的に増大し、被覆率が 31.5% のときには金基板のコントロール実験に比べて約 10 倍の値が得られた。

これらの結果から、金属微粒子膜による電磁誘起透明化現象を利用することで、高感度かつ定量的な測定が可能なカラリメトリックバイオセンサーが可能であることが明らかになった。ビオチン-アビジン分子認識反応の検出はモデル実験の域を出ていないが、今回の検討により、局在プラズモンを使った従来型カラリメトリックセンサーとは全く異なる新しいデバイスの提案をすることができた。

4-2 縦型 PDMS ナノポアの開発

ナノポアデバイスは、低ノイズ化に伴い様々な一分子/一粒子検出の実現が期待されている。そのため、本研究では、ノイズ源である静電容量の小さい PDMS も用いた縦型の軸対称ポア構造を作製し、S/N 比の高い測定と定量的な解析を行うことを目的とした。

本研究では、FIB を用いた作製プロセスの改良によって、PDMS 薄膜に縦型の軸対称ポア構造の作製に成功した。これはこれまでに報告されていない新しい構造であり、これにより既存の非対称軸 PDMS ポアでは難しかった定量解析が可能となる。この縦型 PDMS ナノポアのベース電流測定では、これまで報告されている窒化シリコンナノポアと比べ、約 1/70 まで減少することに成功した。また、ブロッキング電流強度の I_p ヒストグラムの結果から 55 pA 付近に分布中心が見られた。これまでの先行研究では、100 pA 以下のブロッキング電流計測に成功した例はなく、本研究が世界で初めてである。これらの結果から、静電

容量の小さい PDMS を用いることでノイズが下がり、これまでのナノポアデバイスでは検出が難しかった、微弱なブロッキング電流の検出が可能になった。さらに、ヒストグラムのピークが 95 pA にもみられたことから、軸中心からずれた位置を通過した物体のシグナルを検出できていることが示唆され、通過位置の定量的な評価が可能になることが示唆された。

これらの結果から、縦型の軸対象 PDMS ポアを使うことで、S/N 比の高い測定と定量的な解析が可能になり、一分子/一粒子検出が可能になることが期待される。

4-3 将来展望

今回、新しい2つのセンシング法について検討を進めることで、現存のバイオセンシングデバイスにおける検出感度や得られる情報量が必ずしも技術的な限界ではなく、より新しく優れたデバイスを開発できる可能性について知ることができた。検出対象の濃度に対して線形的に大きくシフトする吸収波長は、定量性のあるカラリメトリックセンサーの開発につながることを期待されるし、検出対象の濃度に対して指数関数的に増加する信号強度は、超高感度センサーへの応用が可能である。一分子/一粒子検出技術は、検体の分子レベルでの性質の違いを検出できるということで、単に高感度であるだけでなく、多種多様で大量の情報が得られるセンサー技術として、ビッグデータ情報解析技術との組み合わせにおいて、今後大きな発展が期待できるであろう。

研究業績

授与賞

1. Seventh international conference on molecular electronics and bioelectronics
Fukuoka International congress center, Fukuoka, Japan March 17-19, 2013
March 19, 2013, D-P5,
「Fluorescence enhancement produced by Ag nanoparticle 2D sheets」
Shuhei Shinohara, Pang Pang Wang, Daisuke Tanaka, Jaehoon Lim, Kookheon Char, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada,
Poster Award
2. 2015 IMCE International Symposium jointed with the 4th International Symposium of Nano-Macro Materials, Devices, and System Research Alliance Project, Kyushu university Chikushi campus, Fukuoka, Japan
January 28, 2015, P12
「New design of colorimetric plasmon biosensor with multilayered metallic nanoparticle sheets」
Shuhei Shinohara, Daisuke Tanaka, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada
Poster Award

発表論文

1. Colorimetric plasmon sensors with multilayered metallic nanoparticle sheets
Shuhei Shinohara, Daisuke Tanaka, Koichi Okamoto and Kaoru Tamada
Physical Chemistry Chemical Physics, Royal Chemistry of Society, 2015, 17, 18606-18612
2. The role of citric acid in the stabilisation of nanoparticles and colloidal particles in the environment: Measurement of surface forces between Hafnium Oxide surfaces in the presence of citric acid

Shuhei Shinohara, Namsoon Eom, E-Jen Teh, Kaoru Tamada, Drew Parsons and Vincent S. J. Craig
In press

3. PDMS pore device with ultra low noise
Shuhei Shinohara, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada, Masateru Taniguchi and Sou Ryuzaki
To be submitted

関連する投稿論文

1. High-sensitivity surface plasmon resonance sensors utilizing high-refractive-index silver nanoparticle sheets.
Tanaka, D., Shinohara, S., Usukura, E., Wang, P., Okamoto, K., & Tamada, K.
Japanese Journal of Applied Physics, 2013, 53(1S), 01AF01.
2. Highly confined, enhanced surface fluorescence imaging with two-dimensional silver nanoparticle sheets.
Usukura, E., Shinohara, S., Okamoto, K., Lim, J., Char, K., & Tamada, K.
Applied Physics Letters, 2014, 104(12), 121906.
3. Observation of ambipolar switching in a silver nanoparticle single-electron transistor with multiple molecular floating gates
Yamamoto, M., Shinohara, S., Tamada, K., Ishii, H., & Noguchi, Y
Japanese Journal of Applied Physics, 2016, 55(3S2), 03DC02.
4. SPR study for analysis of a water-soluble glycopolymer interface and molecular recognition properties.
Terada, Y., Seto, H., Hoshino, Y., Murakami, T., Shinohara, S., Tamada, K., & Miura, Y
Polymer Journal, 2017, 49, 255–262

学会発表（国内学会）

1. 第32回表面科学学術講演会 東北大学片平キャンパス
2012年11月19日～2011年11月22日
2012年11月20日 20Da02S
「表面プラズモン共鳴による蛍光増強に関する研究」
篠原修平、王胖胖、田中大輔、JaehoonLim、KookheonChar、岡本晃一、
玉田薫
2. 第60回応用物理学会 春季学術講演会 神奈川工科大学
2013年3月27日～2011年3月30日
2013年3月28日 28p-G13-9
「銀ナノ微粒子二次元シートによる蛍光増強」
篠原修平、王胖胖、JaehoonLim、KookheonChar、岡本晃一、玉田薫
3. 第61回応用物理学会 春季学術講演会 青山学院大学
2014年3月27日～2013年3月30日
2014年3月17日 19p-E17-10
「プラズモンフルカラーを利用した高感度バイオセンサーの開発」
篠原修平、岡本晃一、玉田薫
4. 機能物性融合化学研究会 東京大学物性研究所
2015年4月2日～2015年4月3日
2015年4月2日 P18
「プラズモンフルカラーを用いたカラリメトリックバイオセンサーの開
発」
篠原修平、田中大輔、岡本晃一、玉田薫
5. 第78回応用物理学会 秋季学術講演会 福岡国際会議場
2017年9月5日～2017年9月8日
2017年9月5日 5p-A203-12

「縦型 PDMS ポアデバイスの作製と評価」
篠原修平、王胖胖、岡本晃一、谷口正輝、玉田薫、龍崎奏

学会発表（国際学会）

1. Seventh international conference on molecular electronics and bioelectronics
Fukuoka International congress center, Fukuoka, Japan March 17-19, 2013
March 19, 2013, D-P5,
「Fluorescence enhancement produced by Ag nanoparticle 2D sheets」
Shuhei Shinohara, Pang Pang Wang, Daisuke Tanaka, Jaehoon Lim, Kookheon Char, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada
2. KJF-ICOMEF 2014 International Conference on Organic Materials for Electronics and Photonics, International congress center EPOCHAL TSUKUBA, Ibaraki, Japan, September, 21-24, 2014
September 23, 2014 3PN-30
「New design of high sensitive bio-sensor by use of plasmonic full color」
Shuhei Shinohara, Daisuke Tanaka, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada
3. The 7th International Symposium on Surface Science, Shimane Prefectural Convention Center, Shimane, Japan, November 2-6, 2014
November 3, PA115
「New design of colorimetric bio-sensor by use of multilayered metallic nanoparticle sheet」
Shuhei Shinohara, Daisuke Tanaka, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada
4. 2015 IMCE International Symposium jointed with the 4th International Symposium of Nano-Macro Materials, Devices, and System Research Alliance Project, Kyushu university Chikushi campus, Fukuoka, Japan
January 28, 2015, P12
「New design of colorimetric plasmon biosensor with multilayered metallic

nanoparticle sheets」

Shuhe Shinohara, Daisuke Tanaka, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada

5. The International Conference on Materials for Advanced Technologies, ICMAT 2015 & IUMRS-ICA 2015, Singapore
July 2, 2015
「New Design of Plasmonic Full Color Biosensor by use of Multilayered Metallic Nanoparticle Sheets」
Shuhe Shinohara, Daisuke Tanaka, Sou Ryuzaki, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada

6. The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2015) Honolulu, USA, December 15-20, 2015
December 16, 2016, ANYL 257,
「Plasmonic full color sensor by use of multilayered metallic nanoparticle sheets」
Shuhe Shinohara, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada

7. The 8th Biennial Australian Colloid & Interface symposium, Opal Cove Resort • Coffs Harbour NSW, January 29 – February 2, 2017
February 2, 2017, PO13
「The effect of citric acid adsorbed for surface force on the interaction between HfO₂ surfaces fabricated by atomic layer deposition.」
Shuhe Shinohara, Namsoon Eom, E-Jen Teh, Kaoru Tamada, Drew Parsons, Vincent S. J. Craig

8. The 14th European Conference on Molecular Electronics, Dresden, Germany, August 28 – September 2, 2017
August 29, 2017, P02-090 ID 89
「New design of high sensitive plasmonic full color biosensor by utilizing of multilayered metallic nanoparticle sheets」
Shuhe Shinohara, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada

関連する学会発表

1. 8th International conference on Energy-Materials-Nanotechnology, 2014.11.23
「Highly Confined, Enhanced Surface Fluorescence Imaging with 2D Silver Nanoparticle Sheets」
Kaoru Tamada, Eiji Usukura, Shuhei Shinohara, Daisuke Tanaka, Koichi Okamoto
2. 第5回アライアンス国際シンポジウム合同資源研国際フォーラム, 2015.04.21.
「Imaging of Biointerface by use of Metal Nanoparticle Films and their Cytotoxicity test」
Shuhei Shinohara, Daisuke Tanaka, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada
3. IMCE international symposium, 2017.02.03.
「A Study of Micron-Sized Pore Structure in Ag Nanoparticle 2D Sheets」
Haruka Takekuma, Kyohei Tagomori, Shuhei Shinohara, Pang Pang Wang, Sou Ryuzaki, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada
4. 9th international conference on molecular electronics and bioelectronics, 2017.06.01.
「A Study of Micron-Sized Pore Structure in Ag Nanoparticle 2D Sheets」
Haruka Takekuma, Kyohei Tagomori, Shuhei Shinohara, PANGPANG WANG, Sou Ryuzaki, Koichi Okamoto, Kaoru Tamada

特許申請

1. 発明の名称：呈色膜、呈色膜被覆基材及び呈色膜の製造方法
国内特許出願：特願 2016-8326
出願日：平成 28 年 1 月 19 日
発明者：玉田 薫、王 胖胖、篠原 修平、宮地 計二、加藤 幹大

謝辞

本研究を進めるにあたり、熱心なご指導と多大なご助言を賜りました指導教員の玉田薫 教授、龍崎奏 助教に感謝致します。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた岡本晃一 准教授に感謝致します。

本論文を提出するにあたり、副査を引き受けてくださいました、瀧上隆智 教授、松島綾美 准教授に感謝いたします。

日々の実験において、技術的な指導とご助言を賜り、研究環境の面からも支えてくださいました分子システムデバイスリーディングプログラム助教の Pangpang Wang 先生、大分高専 田中大輔 先生、名古屋大学 白倉英治 先生に感謝致します。

研究面でのサポート、慣れない海外での生活を支えてくださいました、オーストラリア国立大学 Professor Vincent S. J. Craig、Dr. E-Jen Teh、Dr Namsoon Eom、延世大学 Professor Eunkyong Kim に感謝致します。

分子システムデバイスリーディングプログラムにおいて、プログラム教員の皆様に感謝いたします。

分子システムデバイスリーディングプログラムでの実務のサポートのみでなく、一期生の精神的なサポートをしてくださったリーディグ支援室の皆様に感謝致します。

研究生活において、秘書として研究室を支えてくださいました、上原つくみ 氏、瓜生めぐみ 氏に感謝いたします。

分子システムデバイスリーディングプログラムの一期生として、お互いに切磋琢磨しながら五年間を共に過ごした、一期生の皆様に感謝致します。

研究室の同期として、互いに切磋琢磨しながら六年間を共に過ごした立石和隆 氏に深くお礼を申し上げます。

研究室の先輩、後輩として様々な面で支えてくださいました、大岩さゆり 氏、出川亮 氏、石島歩 氏、川元駿 氏、斉藤昂 氏、寺田開生 氏、荒木祥平 氏、西田知句 氏、増田志穂美 氏、田子森恭平 氏、冷俊夫 氏、竹熊晴香 氏、大藏孝太 氏、長尾俊範 氏、松田倫太郎 氏に深くお礼申し上げます。

最後になりましたが、いつも暖かく見守っていただき、博士過程への進学のお機会を与えてくださった家族に心より感謝致します。