

## 帽子状金属微粒子を用いたバイオセンサー

竹井 弘之・Cao Zhong

### Biosensor Based on Optical Properties of Cap-Shaped Metal Particles

Hiroyuki TAKEI and Zhong CAO

We have devised a simple method for forming surface-adsorbed metal particles. First a uniform monolayer of monodisperse dielectric spheres is adsorbed on a substrate and a metal is subsequently evaporated. The resulting metal particles covering one half of the spheres exhibit pronounced absorption in the visible spectrum. The peak absorption wavelength has been found to shift toward longer wavelengths upon binding of molecules on the surface. This principle has been exploited to devise a new optical biosensor capable of detecting molecular interactions in real-time.

**Key words:** localized surface plasmon, biosensor, molecular interaction, gold particle

#### 1. 固定化金微粒子

粒径が 100 nm 以下の金微粒子の特性は長年研究されており、局在表面プラズモンの励起により、水溶液中では波長 550 nm 近傍において顕著な吸収を示すことはよく知られている<sup>1)</sup>。可視光領域における吸収特性はさまざまな要因から影響を受け、微粒子間の相互作用、微粒子と基板との相互作用、微粒子の形状等が要因として挙げられる。共鳴現象に伴う近接場光は基礎および応用の観点から近年注目を集めており、応用および将来への発展性を考えると、基板上に固定化された金微粒子が今後さらに重要視されしていくと思われる<sup>2,3)</sup>。

表面増強ラマン分光、表面増強赤外分光等の応用においては、ガラス、シリコン等の基板上に貴金属を蒸着した際に形成されるアイランド構造が長年用いられてきたが<sup>4)</sup>、構造を制御することが困難であり、構造のごく一部のみが増強効果に貢献していると近年報告されている<sup>5)</sup>。電子ビーム描画技術を利用しての貴金属のパターニング<sup>6)</sup>、コロイドの固定化等の方法により、微粒子間の間隔、微粒子のサイズの制御が試みられている。これらのパラメーターを制御することにより、さらに効率の高い近接場光の発生が可能になると思われる。

#### 2. 帽子状金属微粒子の作製と特性

新たな試みとして、基板上に吸着された誘電体微粒子に金属を蒸着することにより、微粒子を作製する方法を紹介する。単分散の微粒子を高密度の单層として形成し、抵抗加熱により微粒子の片面のみに金属を付着させると、固相化された単分散の金属微粒子が容易に得られる<sup>7)</sup>。ポリスチレン、SiO<sub>2</sub> 等からなる単分散の微粒子はさまざまな分野ですでに用いられており、単分散の微粒子の单層を形成する方法が鍵となる。従来から、フォトニックバンドギャップ材料を作製する目的で、単分散の微粒子を層状に結晶化する方法が試みられているが、均一かつ大面積（数百 μm<sup>2</sup> 以上）の試料を再現性よく作製するには至っていない。そこで、筆者らは、微粒子の凝集プロセスを利用した。通常、ポリスチレン微粒子は斥力により分散されているが、NaCl、KCl 等の塩を加えることにより斥力を低減できる。この状態で微粒子を金等の高表面エネルギー基板に添加すると、微粒子の单層が自己組織的に形成される。微粒子は結晶状ではないが、高密度、均一、かつ大面積（数 cm<sup>2</sup> 以上）の試料が容易に得られる。固定化微粒子を乾燥し、金をさらに蒸着すると、微粒子の片面のみに金が付着し、帽子状金微粒子が得られる。

形成された試料は顕著な発色特性を有し、反射光のスペ

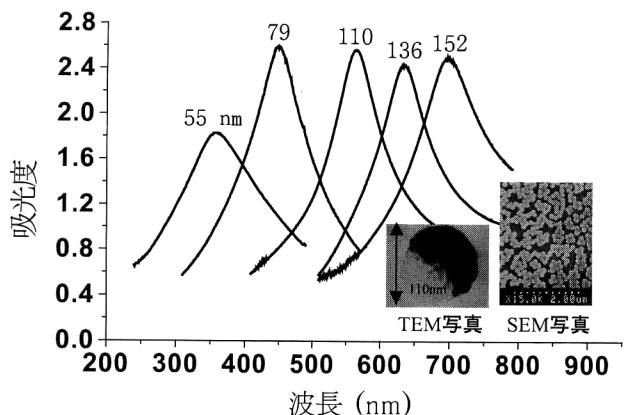


図 1 固定化金微粒子の吸収スペクトルと誘電体微粒子粒径への依存性。ピーク近傍の数値は直径 (nm) を示す。SEM 写真は固定化された微粒子、TEM 写真は基板から剥離された微粒子のひとつを示す。

クトルはシャープなピークを示す。ピークの吸光度は 2 以上であり、ピーク波長は誘電体微粒子の粒径、微粒子上に堆積した金の厚さ、微粒子の付着密度等に依存する。例として、誘電体の粒径への依存性を図 1 に示す。反射スペクトルに対して、透過スペクトルおよび基板方向からの反射スペクトルにはピークがほとんどみられないのも特徴である。

スペクトルと近接場の分布の関連については、今後の研究の課題であるが、本方法を用いることによりさまざまな構造の固定化微粒子が作製できることは明らかである。2 種類以上の単分散微粒子の混合、金以外の金属の蒸着、パターン化された微粒子等の例については文献を参照されたい<sup>8,9)</sup>。

### 3. バイオセンシングの現状

従来のバイオセンサーは、酵素反応を利用したグルコースセンサーに代表されるようにおもに診断に用いられてきているが、今後は分子レベルで生命現象を解明することにより新薬開発にも用いられるようになると思われる。薬は細胞表面の受容体タンパク質もしくは細胞内の酵素等と結合することにより薬効を発揮することから、薬と生体分子間の相互作用を定量的に評価することが重要になる。これら結合速度定数、解離速度定数、平衡結合定数に関するデータを求めるためには、分子間の結合をリアルタイムで計測する方法を利用するが近道である。今まで最も広く用いられてきた方法は、表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象に基づく SPR センサーである<sup>10,11)</sup>。高屈折率プリズム表面上に形成された金薄膜表面が抗体等の生体分子で修飾されている。抗原の結合に伴い、薄膜表面を伝播する表面プラズモンの分散関係が変化することから、抗原の結合量をリアルタイムで検出できることが特長である。

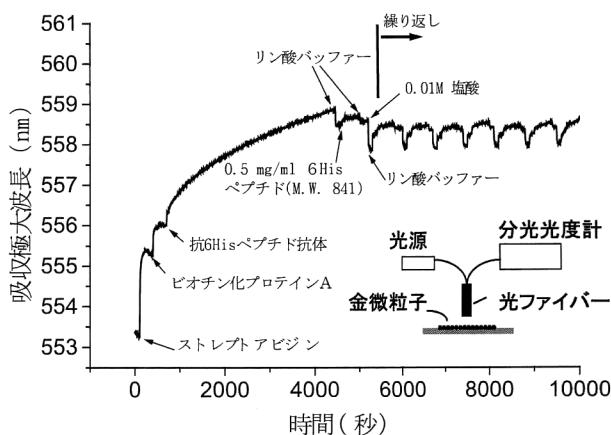


図 2 さまざまな生体分子の吸着に伴いシフトする極大吸収波長。装置は光源、金微粒子、分光光度計から構成される。

非標識で検出が可能であるすぐれた方法である。

近年においては、局在表面プラズモン共鳴現象を用いた方法が注目を集めており<sup>12,13)</sup>、そのひとつを紹介する。まだ一般的な方法ではないが、後ほど述べるようにいくつかのすぐれた点を有する。基本的には、固定化された微粒子の表面を抗体等の生体分子で修飾し、ターゲット分子の結合に伴って生じる吸収極大波長のシフト量を分光光度計でモニターするものである。光源としてはタンゲステンハロゲンランプを用い、光ファイバーを介して金微粒子に照射された光の反射光を同軸の光ファイバーで分光高度計に導く。分光器と CCD アレイ検出器が一体化された装置では、リアルタイムでのスペクトル取得が可能である。吸収極大波長はスペクトルを Pseudo-Voigt 関数で近似することにより求め、経過時間の関数として表示する。センサーとして用いられる金微粒子には、吸光度が大きく、スペクトルの半値幅がせまく、シフト量が大きいことが求められる。また、試料作製の歩留まり、ハロゲンランプとのマッチング等も考慮した結果、粒径 110 nm のポリスチレン微粒子に 20 nm 厚の金を蒸着したものを探用した。

底に金微粒子が形成された微小ウエル (容量 10  $\mu$ l) を光ファイバーで照射しながら、生体試料を添加した。金微粒子表面は官能基を有するアルカンチオールであらかじめ修飾されており、抗体等の生体分子が共有結合で固相化されている。抗原が特異的に結合するに伴い、極大吸収波長が長波長側にシフトする。6His ペプチドを抗 6His ペプチド抗体で測定した例を図 2 に示す。自己組織化膜を形成することが知られるアルカンチオールを基準とすると、波長シフトの 6 nm はほぼ 1 ng/mm<sup>2</sup> の生体分子の吸着に対応する。本装置においては約 0.02 nm の精度で測定できることから、10 pg/mm<sup>2</sup> 以下の吸着でも検出できると考える。

本論文においては、固定化金属微粒子の新規作製方法を紹介し、得られた金属（おもに金）微粒子の特性に触れた。誘電体微粒子の粒径、吸着密度、蒸着厚等を変えることにより、吸収極大波長を任意に制御できることを示した。また、本方法の特徴として、大面積かつ均一の試料が容易にできることが挙げられる。

固定化された帽子状金微粒子は、基礎的な観点から興味深いだけではなく、さまざまな応用にも用いることができる。金微粒子表面近傍の屈折率が変化するに伴い吸収極大波長がシフトする特徴を生かして、筆者らはバイオセンサーへの応用を検討してきた。従来の方法と比較して、同等の感度でありながら、温度変動に強く、高スループットスクリーニングに適した装置を試作することができた。バイオセンサーは、従来からの診断のみならずヒトゲノム情報に基づいた創薬においても重要度が増していることから、ますます広い分野で利用されると思われる。

## 文 献

- 1) U. Kreibig and M. Vollmer: *Optical Properties of Metal Clusters* (Springer, Berlin, 1995).
- 2) T. Kume, N. Nakagawa, S. Hayashi and K. Yamamoto: "Interaction between localized and propagating surface plasmons: Ag fine particles on Al surface," *Solid State Commun.*, **93** (1995) 171-175.
- 3) M. Brust, D. Bethell, C. J. Kiely and D. J. Schiffrin: "Self-assembly of gold nanoparticle thin film with nonmetallic optical and electronic properties," *Langmuir*, **14** (1998) 5425-5429.
- 4) P. F. Liao and M. B. Stern: "Surface-enhanced Raman scattering on gold and aluminum particle arrays," *Opt. Lett.*, **7** (1982) 483-485.
- 5) S. Nie and S. R. Emory: "Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering," *Science*, **275** (1997) 1102-1106.
- 6) G. A. Niklasson and H. G. Craighead: "Optical-response and fabrication of regular arrays of ultrasmall gold particles," *Thin Solid Films*, **125** (1985) 165-170.
- 7) H. Takei: "Surface-adsorbed polystyrene spheres as a template for nanosized metal particle formation: Optical properties of nanosized Au particle," *J. Vac. Sci. Technol. B*, **17** (1999) 1906-1911.
- 8) M. Himmelhaus and H. Takei: "Cap-shaped gold nanoparticles for an optical biosensor," *Sens. Actuators B*, **63** (2000) 24-30.
- 9) M. Himmelhaus and H. Takei: "Self-assembly of polystyrene nano particles into patterns of random-closed-packed monolayers via chemically induced adsorption," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4** (2002) 1-11.
- 10) S. Lofas: "Dextran modified self-assembled monolayer surface for use in biointeraction analysis with surface plasmon resonance," *Pure Appl. Chem.*, **5** (1995) 829-834.
- 11) J. Homola, S. S. Yee and G. Gauglitz: "Surface plasmon resonance sensors: Review," *Sens. Actuators B*, **54** (1999) 3-15.
- 12) T. Okamoto, I. Yamaguchi and T. Kobayashi: "Local plasmon sensor with gold colloid monolayers deposited upon glass substrates," *Opt. Lett.*, **25** (2000) 372-374.
- 13) F. Meriaudeau, T. Downey, A. Wig, A. Passian, M. Buncick and T. L. Ferrell: "Fiber optic sensor based on gold island plasmon resonance," *Sens. Actuators B*, **54** (1999) 106-117.

(2003年10月14日受理)