

氏 名	三木 一司
所属機関	独立行政法人 物質・材料研究機構
研究題目	ラマン散乱断面積を意識したコアシェル粒子二次元配列の開発とウイルス検出センサーへの応用

1. 研究の目的

本提案ではナノテクノロジー分野に留まっていた近接場光技術を実用的な医療用センサー技術へと発展させました。申請者は、金属ナノ粒子を2次元配列化することで、近接場光を金属ナノ粒子周辺のみの局在から4cm²程度の基板表面を覆う光へと発展させました。この大面積近接場光源は従来の点光源近接場光源に比べてデバイス化に有利です。更に、近接場光＝電磁場と看做すと、表面ラマン増強効果(SERS)基板として利用可能で、バイオセンサーに使える新材料システムです。

本助成研究の成果としては、SERSに最適構造の金銀コアシェルナノ粒子の実現を目指しました。生物学領域で良く使われている色素分子をラマン励起できる波長調整と、高いラマン散乱断面積を両立しました。得られたナノ粒子を用いてウイルス検出用センサーを高性能化しました。更に、20nm以上の金ナノ粒子を2次元配列化する手法を簡便化することにも成功し、この手法は1.5インチの基板程度の面積にも配列化でき、現在報告されている配列化手法として最も先進的な手法になっています。

全体研究構想では、SERS型ウイルス検出用センサーの開発を目指しました。全体構想は、科学技術振興機構 東アジア・サイエンス&イノベーション・エリア構想「東南アジアで深刻な病原体を検出する為のプラズモニックバイオセンサー」(タイ、ベトナムと)と連携し、実証テストとしてH1N1型インフルエンザAの検出技術の実現に成功しています。この実証では、金銀コアシェルナノ粒子の2次元配列を利用しています。感染した尿膜液を生物製剤とした実証実験では検出感度は6 TCID₅₀/mL⁻¹と高い値が出せました。1 TCID₅₀は、検体溶液を半分に分けた際に、一方では検体があるがもう一方には検体が無い濃度を示します。

2. 研究の内容(手法、経過、評価など)

2.1 金銀コアシェルナノ粒子配列の実現

本研究の基盤技術は、我々が2010年に報告したハイブリッド法(*Applied Physics Letters* **97** (2010) 221101)です。この手法は電気泳動法、溶媒蒸発法、自己組織化法の3手法を組み合わせた金属ナノ粒子の2次元配列化法です。報告時には金薄膜を固定基板として金ナノ粒子の配列作製で例示しました。この手法を、光学的に透明な基板(ITO基板)に、配列化する金属ナノ粒子の粒径を10~100nmの範囲に拡張し、光学的に魅力がある技術へと進化させました(成果論文1)。更に、金配列作製時に用いる金コロイド分散液が、金粒子粒径が20nmを超えても、沈殿し難い技術を開発しました(成果論文3)。具体的には、金微粒子上に二種類のアルカンチオールを用いて、約7:3のモル比のドデカンチオールとオクタデカンチオールの混合自己組織化単分子膜を形成することにより、安定なコロイド分散溶液が実現できました。この分散溶液を用いて、50nmの金微粒子配列が80%以上の被覆率で形成できました。

目標実現の為、金属粒子をAu@Agコアシェル粒子に拡大しました(成果論文2)。Au@Agコアシェルは図1(TEM+EDX像)に示すように、金ナノ粒子がコア、銀をシェル層にした構造です。この構造では、形状と粒径が制御しやすい金ナノ粒子が出発材料に使

40Au@AgNP (0.4)



図1 試作したAu@Agコアシェル粒子のEDX像(Ag), EDX像(Au), TEM像.

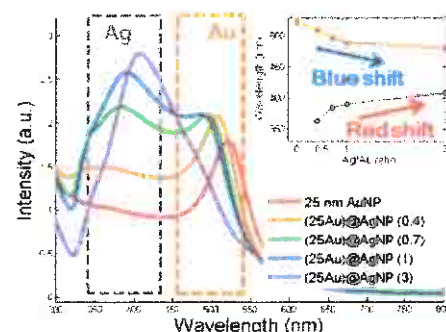


図2 Au@Agコアシェル粒子のコロイド状態での吸収スペクトル。シェル層の銀の量が増加するに伴い、銀由来のピークがレッドシフト、金由来のピークがブルーシフトするのが分かる。

2. 研究の内容 (続き) (書ききれない場合には、同一形態のページを追加しても結構です)

えること、外側の層の銀は可視光域での吸収が殆ど無い為、高輝度の近接場光源になること、の二つ特徴があります。金と銀の組み合わせにより、配列化によるレッドシフトと、銀付加によるブルーシフトを調整して、シフト量を相殺する事も可能で、コアシェル粒子の粒径と局在表面プラズモンの共鳴波長をある程度独立に制御できます。図2は金由来と銀由来の共鳴波長の変化を、配列化前のコロイド分散液の状態です。配列化すると図3の様に共鳴波長は一つのピークになります。図4にITO基板上に形成した Au@Ag コアシェル粒子配列の SEM 像を示します。(40Au)@Ag(1)は、粒径 40 nm の金ナノ粒子をコアにして、銀:金のモル比

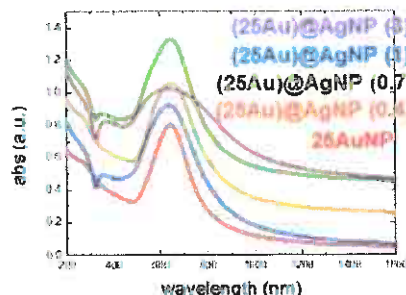


図3 試作した ITO 基板上の Au@Ag コアシェル粒子配列の吸収スペクトル。

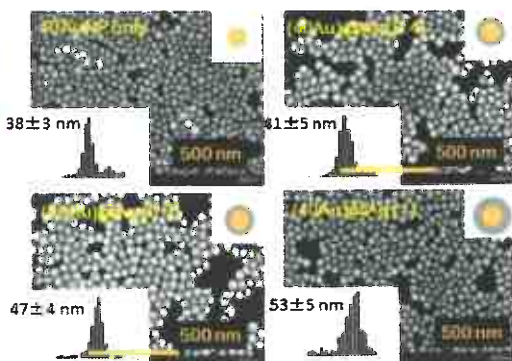


図4 試作した ITO 基板上の Au@Ag コアシェル粒子配列の SEM 像。

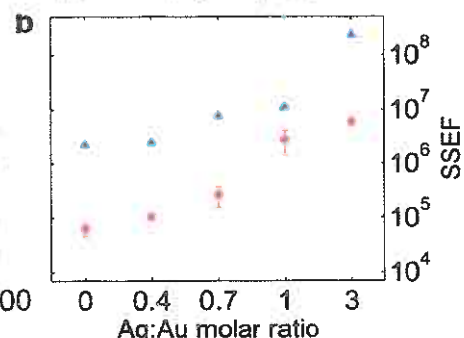
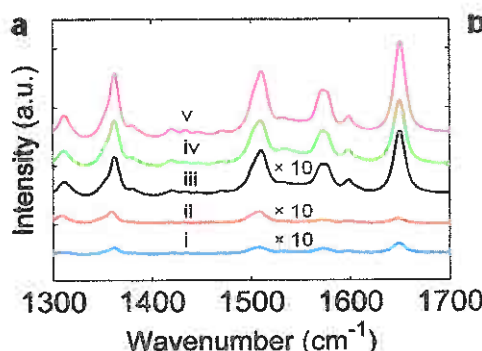


図5 40Au@Ag コアシェルを使ったローダミン 6G の SERS スペクトルと SERS 増強因子。コアは 40nm の Au 粒子で、シェルの Ag 層とのモル比をパラメータとしている。

に相当する銀をシェル層として堆積させた事を意味します。図4から、モル比1までは粒子形状は球状で、粒径分布も 10%以内に収まっている事が分かります。SERS の増強因子はローダミン 6G を Au@Ag 配列上に吸着させ、配列無しの基板のみの SERS 信号を比較対象として求めました。ここでは SERS 増強効果が高かった 40nm の結果についてのみ示します。Ag : Au のモル比を変数にして、Au@Ag 配列上のローダミン 6G からの SERS スペクトルと SERS 増強因子を図5に示します。SERS 信号は Ag : Au のモル比が大きくなると (i から v へ) 大きくなることが分かります。SERS 増強因子は Ag:Au のモル比が3で約 10^7 と大きな値になります。これ以上のモル比ではコアシェル粒子の形状がかなり歪になりました。従って、40nm の Au 粒子をコア粒子として、Au:Ag=1:3 モル比を持つコアシェル粒子配列をバイオセンサーに応用することにしました。

2.1 金属ナノ粒子の配列化の簡便化

金銀コアシェルナノ粒子の実現には、我々の研究グループが以前開発したハイブリッド法 (文献1) を用いました。この手法は電気泳動法、溶媒蒸発法、自己組織化法の三つの手法を組み合わせた手法で、溶媒蒸発にほぼ一晩使います。電極等取り付けをグローブバッグ中で行う手間や処理時間が長い問題点があります。又、コロイド分散液の使用量が配列に必要な量に比較して無駄が多いのも問題点でした。これらの問題点を解決できる手法を見出すことができました (成果論文6)。コロイド分散液の調製後、分散液に基板を浸漬させて超音波を印可し、基板をヘキサン溶液に浸漬させてもう一度超音波を印可する二段ステップの簡便な手法です。基板面積や材質に制約が無い利点もあります。1.5 インチの石英基板上に 30nm 粒径の金粒子を配列化した試料の光顕像を図6に示します。

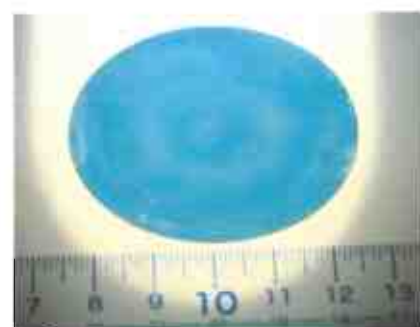


図6 1.5 インチ石英基板上に TPTMS 処理をし、30nm 粒径の金ナノ粒子を新たな手法で 2 次元配列化した光顕像。

3. 研究の結論、今後の課題

3.1 ウイルス検出センサーの作製の成功に大きく貢献（成果論文4，5）

本研究で作製した金銀コアシェルナノ粒子配列はウイルス検出センサーへ発展することができました。全体構想は、科学技術振興機構 東アジア・サイエンス&イノベーション・エリア構想「東南アジアで深刻な病原体を

検出する為のプラズモニクバイオセンサー」（タイ、ベトナムと）と連携し、実証テストとして H1N1 型インフルエンザ A の検出技術の実現に成功しました。試作した SERS 検出型イミュノセンサー（バイオセンサー）（図7）では、SERS 基板上にインフルエンザ A 核蛋白質（抗原）を固定し、抗原上に SERS プローブを配置しました。利用方法は、開発した処方箋に従って SERS 基板を表面処理し、抗原溶液を滴下・固定化します。続いて SERS プローブ溶液を滴下し、抗原と結合していない余分な SERS プローブを洗浄除去後、ラマン分光測定により検出信号を得ます。SERS プローブは抗原認識部位、ラマン信号源（TBBT 分子）、増強散乱体（25nm 金微粒子）から構成され、TBBT のラマン散乱効率を金微粒子のプラズモン効果により増強します。更に SERS 基板とのプラズモン結合効果によりラマン散乱強度を増強します。SERS 基板は本研究の成果です。TBBT 分子の C-S 及び C-C（リング）の伸縮振動に由来するラマンピークは生体物質のラマンピークと干渉せず、かつ強いラマン信号を発する為選択しました。

SERS 検出型イミュノセンサーのインフルエンザ A の検出実証はタイ NANOTEC 研究所で実施しました。SERS 検出型イミュノセンサーの SERS 信号強度のインフルエンザ A 核蛋白質濃度依存性を調べて検出限界を調べました。挿入図に示す様に、 1065cm^{-1} (C-S 振動) と 1565cm^{-1} (C-C (ring)) の2つのラマンピークは低濃度領域で濃度に比例し高濃度領域では飽和します。 1565cm^{-1} の強度を検出信号とした場合、 $0.15\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下の比例領域では、開発したセンサー（SERS 基板上：■）の感度がリファレンス（金薄膜上：▲）より4倍感度が高くなっています。この感度改善で検出限界 LOD はリファレンスの 48ng/mL から 8ng/mL に改善します。この試行結果は蛍光検出型イミュノセンサーより低い値を示しています。次に SERS 検出型イミュノセンサーの蛋白質選択性を調べ、インフルエンザ A 核蛋白質のみが強い SERS 信号を示す明瞭な蛋白質選択性が得られました。又、インフルエンザ A H1N1 に感染した尿膜腔液（濃度 $5.6 \times 10^3 \text{ TCID}_{50}\text{mL}^{-1}$ ）を薄めていき、SERS 信号の感度曲線を得て検出限界を調べました。この測定は生物製剤中でどの程度の検出感度を持つかを調べる為のもので、検出限界は $6 \text{ TCID}_{50}\text{mL}^{-1}$ と低い値が得られました。 $1 \text{ TCID}_{50}\text{mL}^{-1}$ は、検体溶液を半分に分けた際に、一方では検体があるがもう一方には検体が無い濃度を示します。

3.2 研究の結論、今後の課題

ラマン散乱断面積が大きく、バイオセンサーで良く使われる波長 633nm で利用できる Au@Ag コアシェル粒子二次元配列の開発に成功し、高感度のインフルエンザ A ウイルス検出センサーが実現できました。次の課題は、原理的に実証されたセンサーの最適化になります。将来的にはセンサーよりも持ち運び可能なラマン装置の開発が重要になります。



図7 研究開発したセンサーの概念図と SERS プローブの内部構

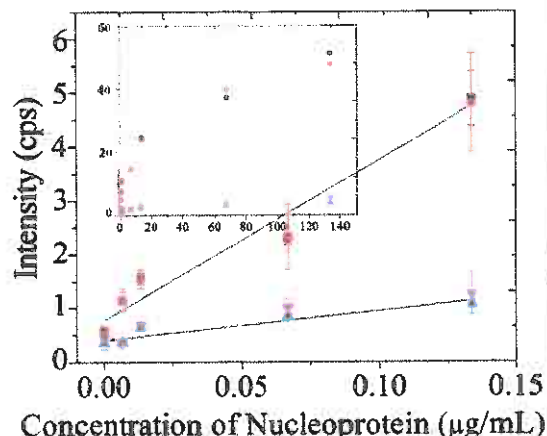


図8 インフルエンザ A 核蛋白質検出感度曲線（SERS 信号強度の核蛋白質濃度依存性）。赤と紫は SERS 基板と金薄膜（リファレンス）の場合。

4. 成果の価値(とくに判りやすく書いて下さい)

4. 1. 社会的価値

本研究では基礎的な研究からバイオセンサー試作、インフルエンザ A 検出まで一貫できたことの意義は大きい。一貫した研究から判断して、表面増強ラマン効果 (SERS) を使ったセンサーは、バイオセンサーよりもケミカルセンサーで先行して使われる可能性が高い。バイオセンサーの性能評価でローダミン 6G など薬品を使っており、汎用 SERS 基板の供給さえあれば高感度なケミカルセンサーが実現できることを示しているからである。更に、原理的には高感度なバイオセンサーが実現できることを示した。本研究を踏み台にした最適化研究と、インフルエンザ A 以外の実証研究が必要である。将来的には、簡易センサー開発用の免疫センサーキットが販売されているように、SERS 基板に、親水化+抗体固定化の為の処方箋と処理薬一切が付属したキットが販売されることが想定されます。

4. 2. 学術的価値

表面増強ラマン効果は原理的には高感度な手法として良く知られ、トップデータとしては、分子一個の検出も可能であることは既の実証されている。但し、測定用の基板の調製が難しく、用いた同一基板内でも場所によって得られる信号強度が桁違いになる事が良く知られている。本研究の汎用 SERS 基板は、我々が構築した技術で供給できる。

新たに開発した、超音波を利用した金属粒子配列方法は簡便であり、特に 10nm 以上 100nm 以下の粒径の金属粒子を配列化する方法としては優れている。この論文の査読結果は、全査読者が一致した意見で、原理的な点の研究は不十分だが成果のインパクトが強いため速報すべきであると。我々が開発した手法が使われて、再現性のある強い信号が誰でも得るようになれば、表面増強ラマン分光の発展に大きく寄与できます。表面増強ラマンを使った応用研究への参入者も増えると期待できます。

4. 3. 成果論文(本研究で得られた論文等を年代順に書いて下さい。未発表のものは公表予定を書いて下さい)

1. 'Enhancement of self-assembly of large-sized (> 10 nm) gold nanoparticles locally on an ITO substrate', *Applied Physics Express* **7** (2014) 065001 (4 pages), Takao Ochiai, Katsuhiro Isozaki, Satoko Nishiyama, and Kazushi Miki.
2. 'Square-centimeter-scale 2D-arrays of Au@Ag core-shell nanoparticles towards practical SERS substrates with enhancement factor of 10^7 ', *Chemical Physics Letters* **605-606** (2014) 115-120, Francesca Pincella, Yeji Song, Takao Ochiai, Katsuhiro Isozaki, Kenji Sakamoto, and Kazushi Miki.
3. 'Assembly of Mid-Nanometer-Sized Gold Particles Capped with Mixed Alkanethiolate SAMs into High-Coverage Colloidal Films', *Langmuir* **31** (2015) 13494-13500, Ung Thi Dieu Thuy, Kenji Sakamoto, Satoko Nishiyama, Sayaka Yanagida, Nguyen Quang Liem, and Kazushi Miki.
4. 'Extrinsic surface-enhanced Raman scattering detection of influenza A virus enhanced by twodimensional gold@silver core-shell nanoparticle Arrays', *RSC Adv.* **6** (2016) 97791-97799. Kullavadee Karn-orachai, Kenji Sakamoto, Rawiwan Laocharoensuk, Suwussa Bamrungsap, Sirirung Songsivilai, Tararaj Dharakul and Kazushi Miki.
5. 'SERS-based immunoassay on 2D-arrays of Au@Ag core-shell nanoparticles: influence of the sizes of the SERS probe and sandwich immunocomplex on the sensitivity', *RSC Adv.* **7** (2017) 14099-14106. Kullavadee Karn-orachai, Kenji Sakamoto, Rawiwan Laocharoensuk, Suwussa Bamrungsap, Tararaj Dharakul and Kazushi Miki.
6. 'Formation of Uniform and High-Coverage Monolayer Colloidal Films of Midnanometer-Sized Gold Particles over the Entire Surfaces of 1.5-in. Substrates', *Langmuir* **33** (2017) 9954-9960, Sayaka Yanagida, Satoko Nishiyama, Kenji Sakamoto, Hiroshi Fudouzi, and Kazushi Miki.