

プラズモンを利用した高感度多項目免疫 センサーチップの開発

関西学院大学 生命環境学部 環境応用化学
教授 田和 圭子

2023年3月2日

従来技術とその問題点

既に実用化されている多項目免疫センサーには、非標識センサーとしてビアコアに代表される表面プラズモン共鳴法 (SPR) や標識センサーとしての96穴プレートを用いた酵素免疫吸着法 (ELISA) 等があるが、

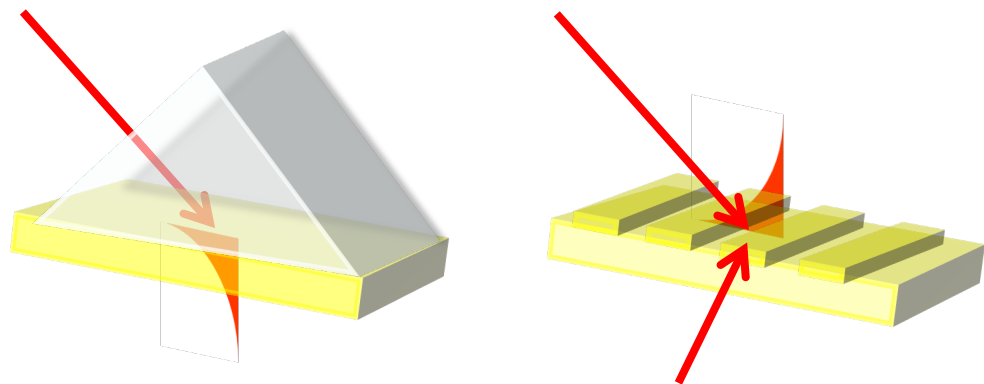
- ★微弱な信号に起因する検出感度の低さ

- ★デバイス・装置の大きさに起因する試料量等の問題があり、改善が必要である。

→ プラズモニックチップの開発と応用

プラズモニックチップの紹介

伝搬型表面プラズモン



プリズム結合型

格子結合型

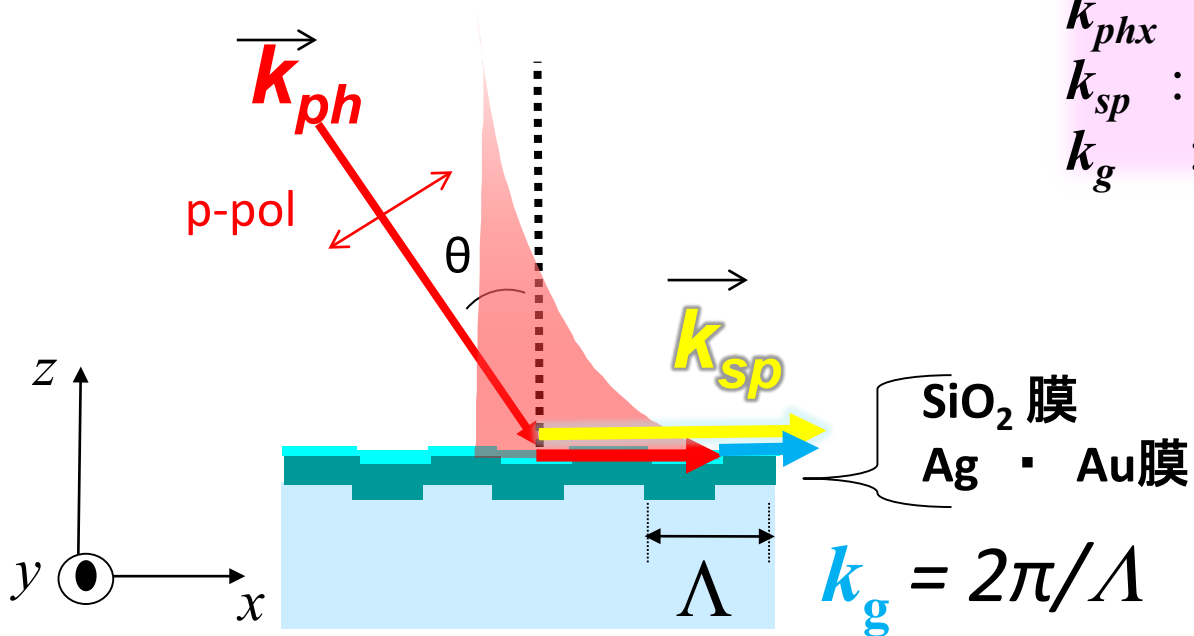
共鳴条件

$$\vec{k}_{sp} = \vec{k}_{phx} \pm m \vec{k}_g \quad (m: \text{整数})$$

$$k_0 (\epsilon_d \epsilon_m / (\epsilon_d + \epsilon_m))^{1/2} = k_0 \sin \theta \pm m k_g$$

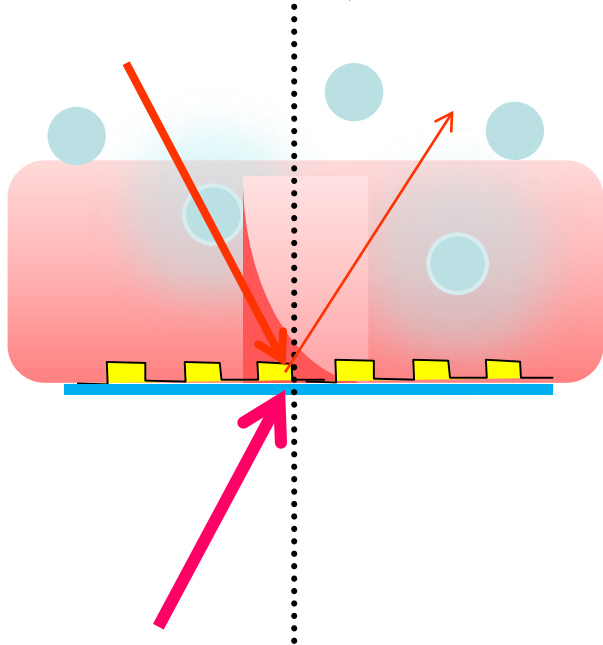
↑ 界面の誘電体の誘電率 ↑ 金属の誘電率

k_{phx} : 入射光のx成分の波数ベクトル
 k_{sp} : プラズモンの波数ベクトル
 k_g : 格子ベクトル



照射光を直接基板に入射して
 プラズモン共鳴を形成でき、
 増強電場が作れる。

格子結合型表面プラズモン励起増強蛍光法



高感度イムノセンサーへ

- ✓ 光学系の簡略化
- ✓ 入射角の制御

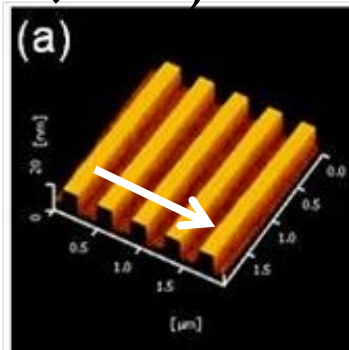
発光体が共鳴場＝増強電場領域に入ると、発光が増強される

基板に結合した粒子の高感度センシングへ

fMレベルのバイオセンシング（およそpg/mL）

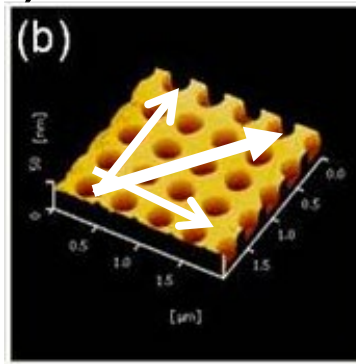
プラズモニク構造

Line & Space
(1D)



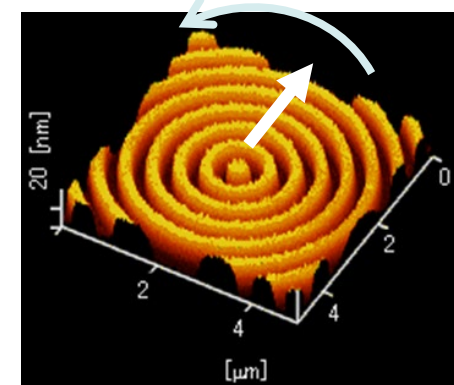
k_{g1}

Hole array
(2D)



$k_{g1} + k_{g1}'$ 'orthogonal to k_{g1}
 k_{g2} (diagonal direction)

Bull's eye



k_{g1}

基本サイズ

ピッチ 300~600 nm

深さ方向 30 nm

プラズモニクチップの紹介

サンドイッチイムノアッセイ

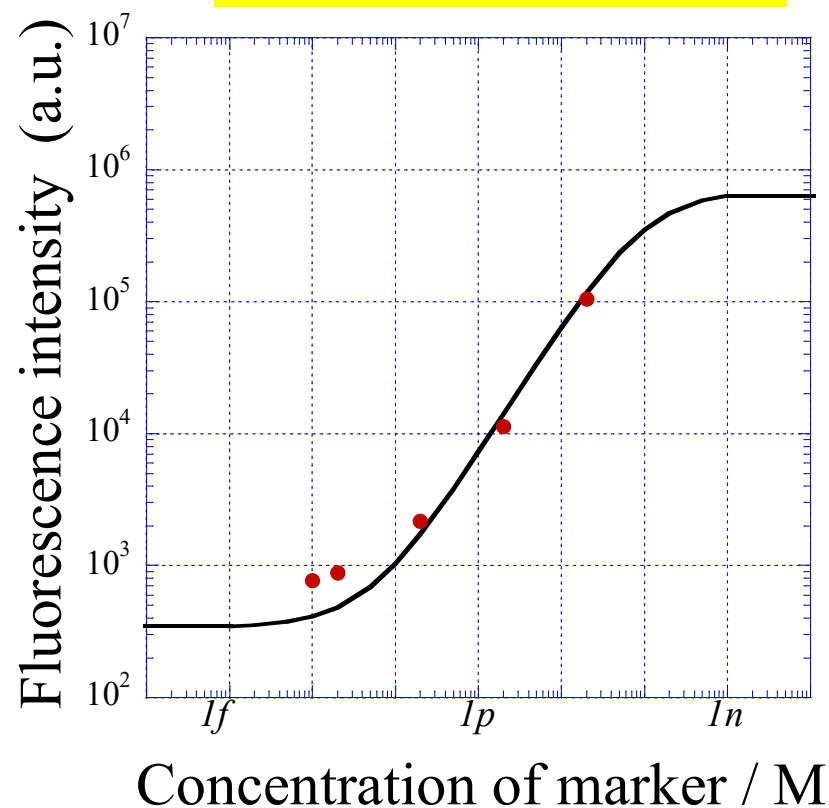
蛍光増強20～50倍

ガラス基板より
3桁以上高感度検出

蛍光標識検出抗体

捕獲抗体

抗原



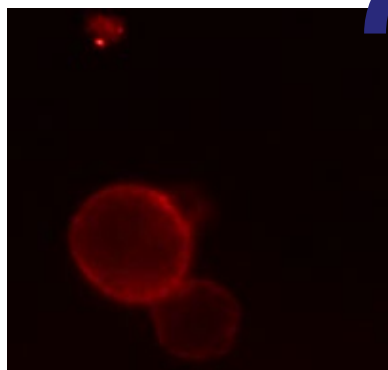
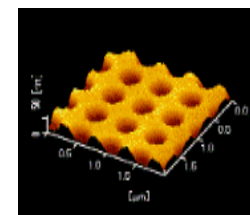
ACS Appl. Mater. Interfaces, **5** (17), 8628–8632 (2013).
Analytical Chemistry, **87** (7), 3871–3876 (2015).

乳がん細胞の蛍光顕微鏡イメージング

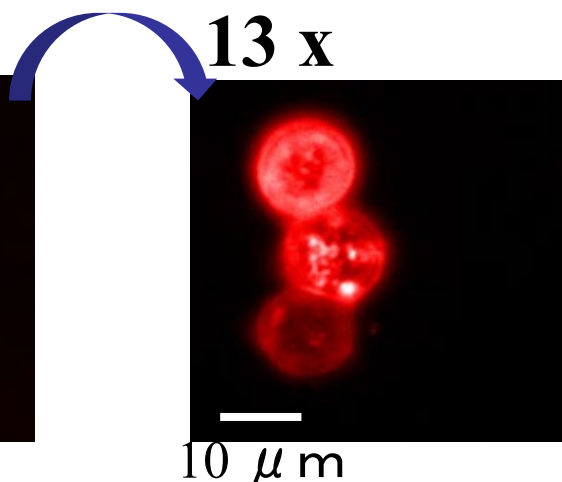
MCF-7

APC標識抗EpCAM 抗体

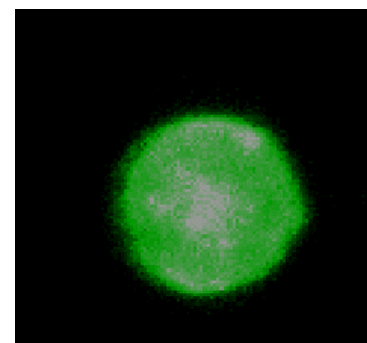
MDA-MB231



Cover slip

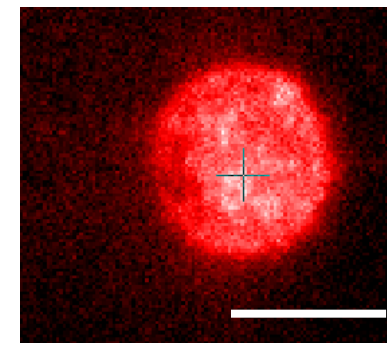


Plasmonic chip



Alexa-488 EGFR

7 x



APC EpCAM

11 x

ACS Appl. Mater. & Interfaces, **8** (44), 29893–29898 (2016).
Micromachines, **11**, 604 (2020).

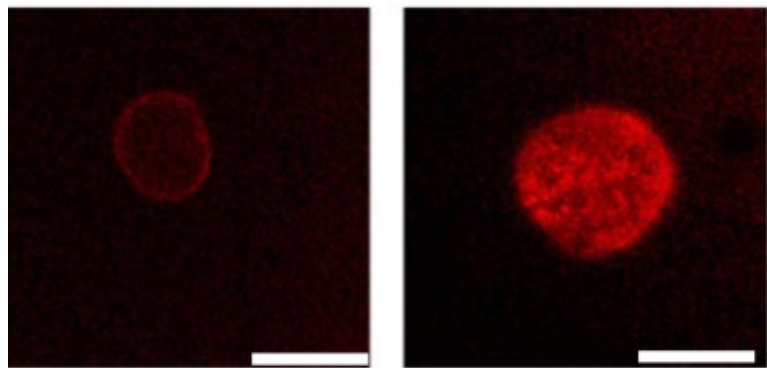
プラズモニクチップにおける増強電場

これまで

本研究

蛍光増強

乳がん細胞の増強蛍光像



左) ガラス基板上

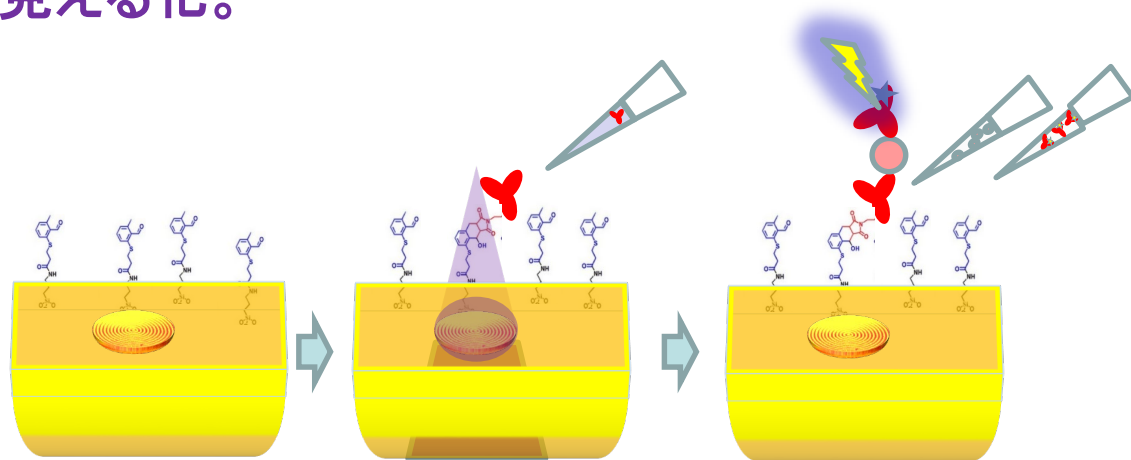
右) プラズモニクチップ上

K. Tawa, et al, ACS Appl. Mater.& Interfaces, (2016).

① 蛍光増強 × ② 光化学反応促進

→ 1分子からの
蛍光増強
: 見えないものを見える化。

→ 空間制御エリアに
捕捉分子を高密度結合
: 高感度多項目同時検出

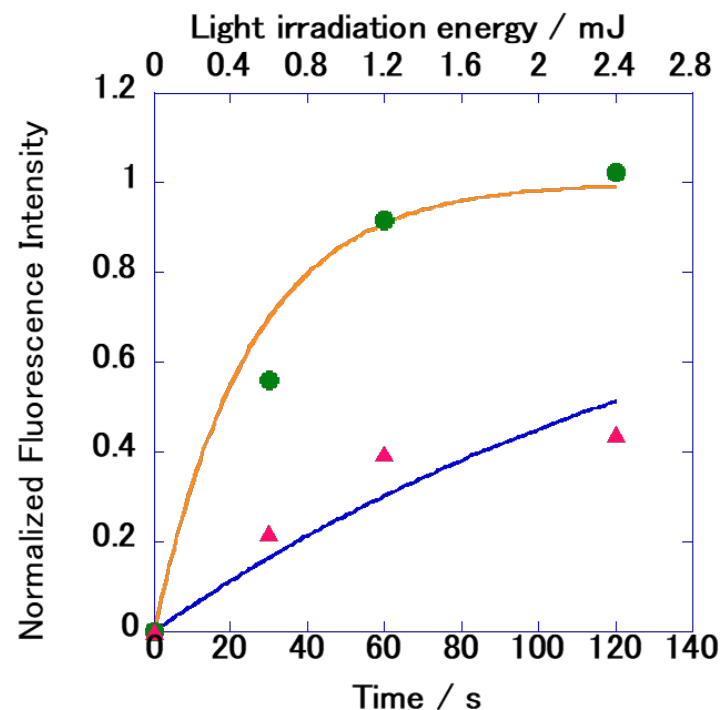
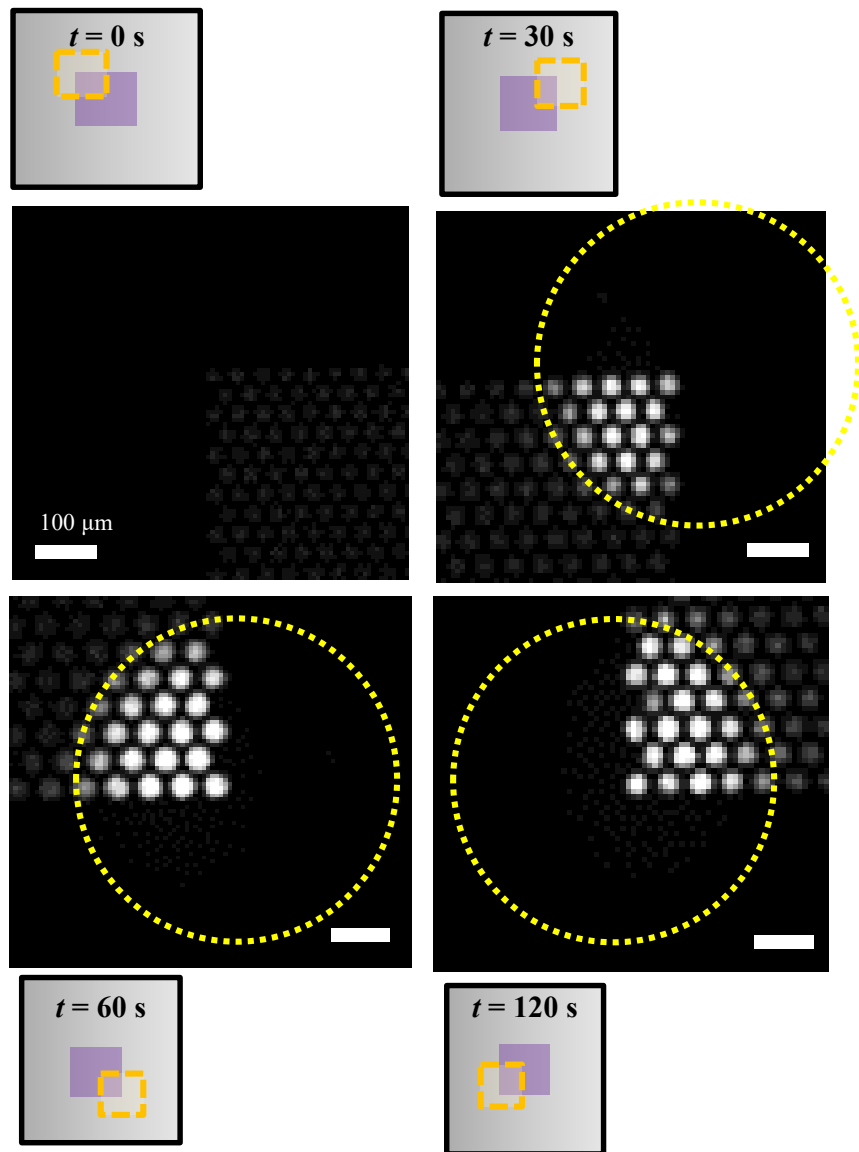


新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、検出感度及びデバイスの大きさを改良することが可能。
- 本技術により簡易操作でのマルチアレイ化ができ、多項目検査プレートとの形成が可能（従来は多項目検査用にチップにマイクロ流路やスポットティングデバイスの使用が必要）
- 本技術の適用により、検査スポットエリアを小さくでき、試料量やコスト削減が期待できる。

新技術による基礎データ

UV露光t秒間:チップに結合したCy5-maleimideの蛍光像



$k_B(s^{-1})$	$k_F(s^{-1})$
$4.0 \times 10^{-2} \pm 1.2 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^{-2} \pm 0.4 \times 10^{-2}$

k_B : 反応速度定数 (UV照射スポット内のBull's eyeパターン上)

k_F : 反応速度定数 (UV照射スポット内の平坦な金属上)

➤ プラズモニックチップ蛍光増強度 E_p
=12.8

想定される用途

- デバイスの小型化によって、多項目イムノセンサーとして病院、保健所などで多項目検査に利用。
- 医療現場での活用方法についての多様性の向上（例えば、各病室での使用など）と患者様のQOL向上が期待できる。

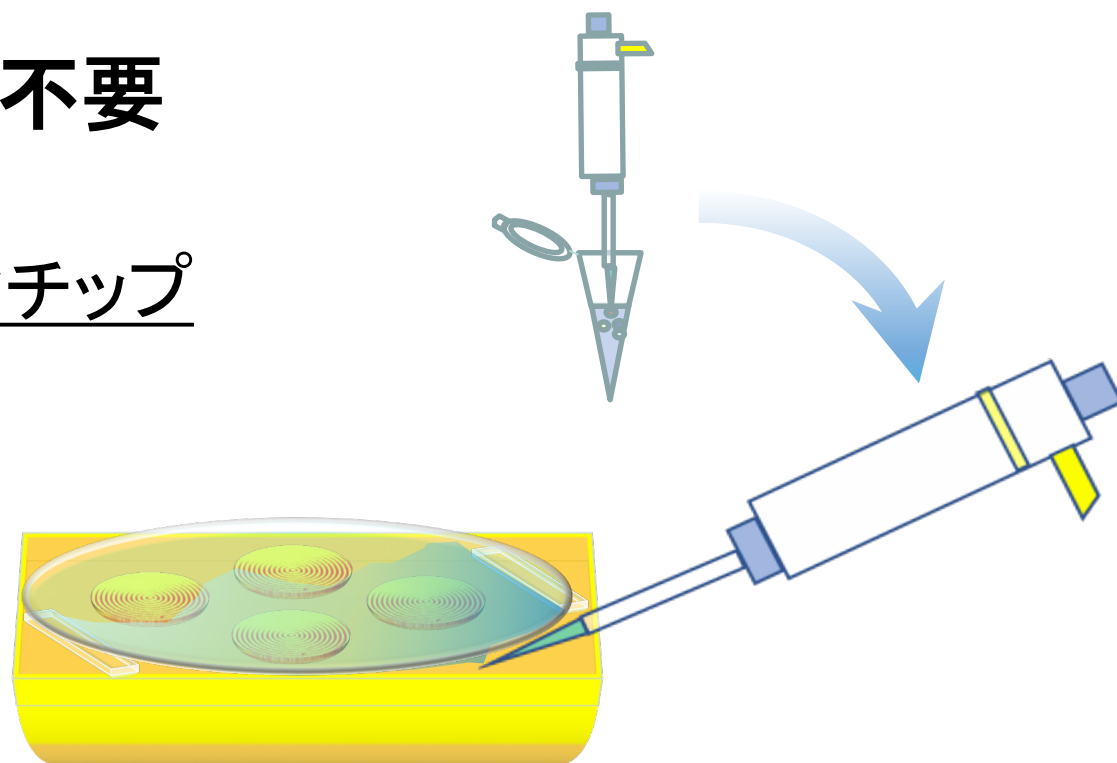
新技術の展開：**多項目同時検出免疫センサー**

★マイクロ流路不要

★ナノスポッティング装置不要



光化学反応＋プラズモニックチップ



公開番号 : WO2022/181196

PCT出願日 : 2022年1月28日

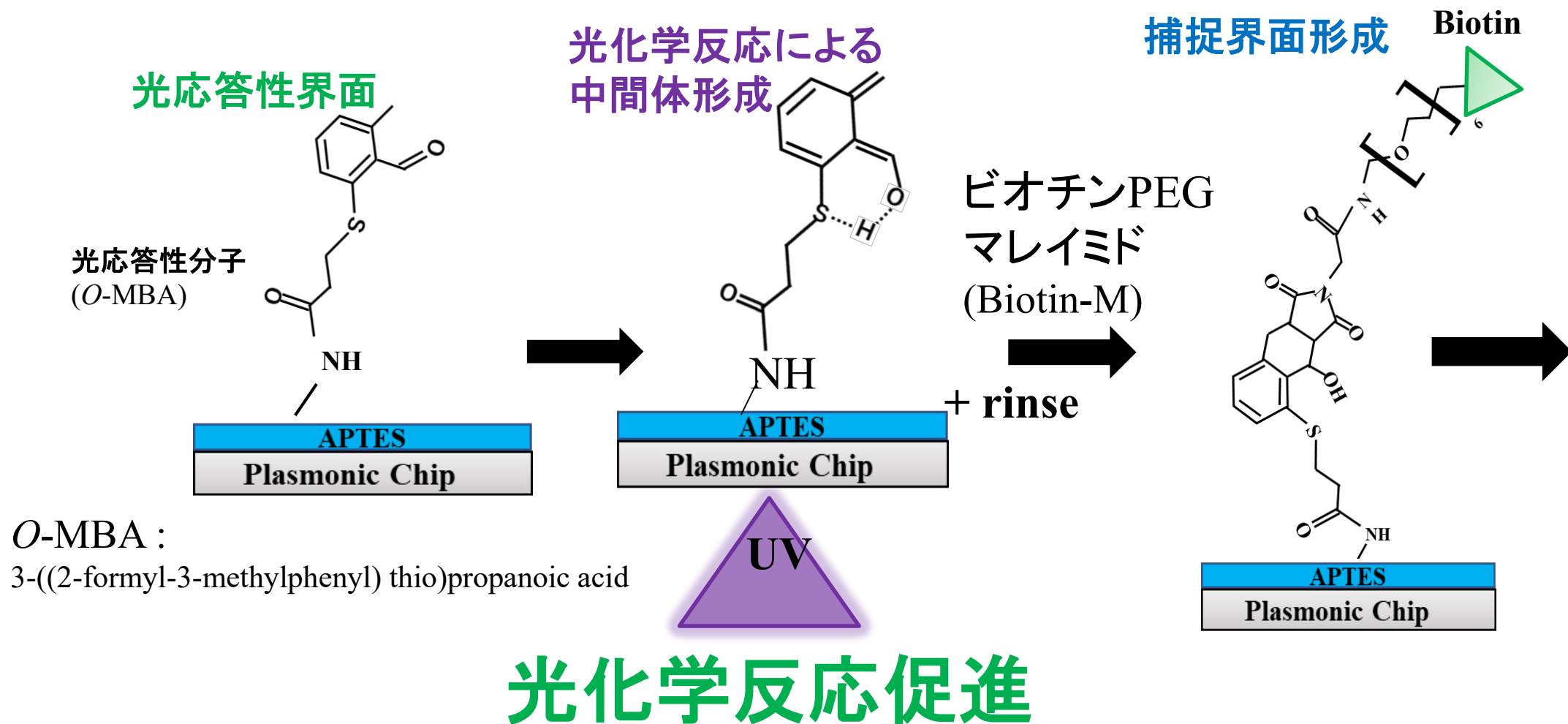
出願番号 : PCT/JP2022/003209

実用化に向けた課題

- 本技術では光反応促進2倍、蛍光信号増強12倍のトータル24倍の信号増強が得られ、これをタンパク質検出に展開・開発済み。現在、抗体を用いたセンサーへ展開中である。
- 今後、抗体を用いたセンサー感度について実験データを取得し、多項目検査に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、再現性と検出感度の向上を目指して技術を確立する必要もあり。

現在の研究データ

①捕捉界面形成

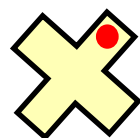


現在の研究データ

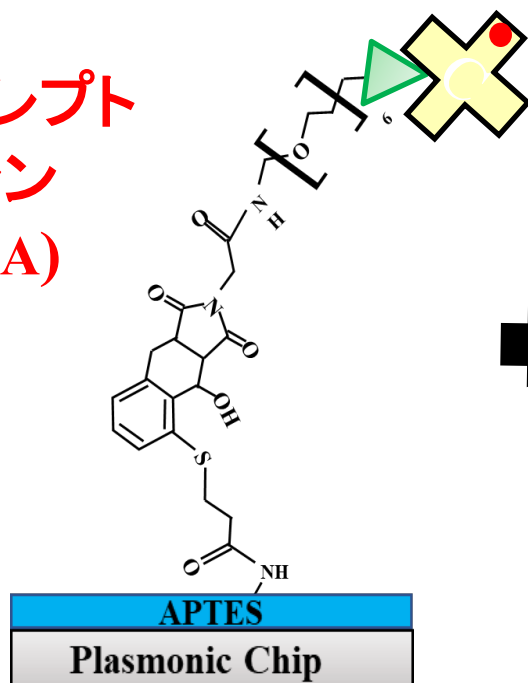
②ターゲット検出

ターゲット

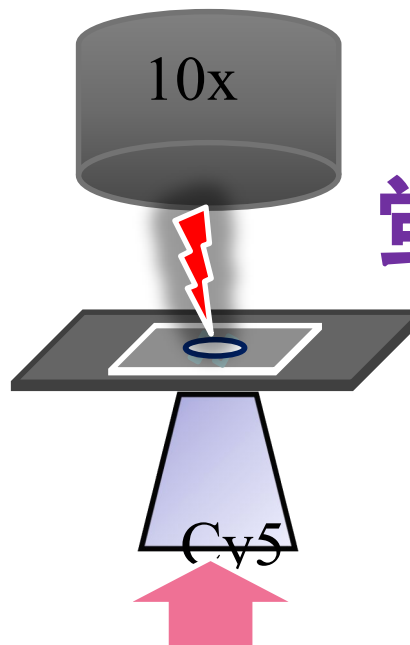
Cy5-ストレプト
アビジン
(Cy5-SA)



+ rinse



蛍光観察

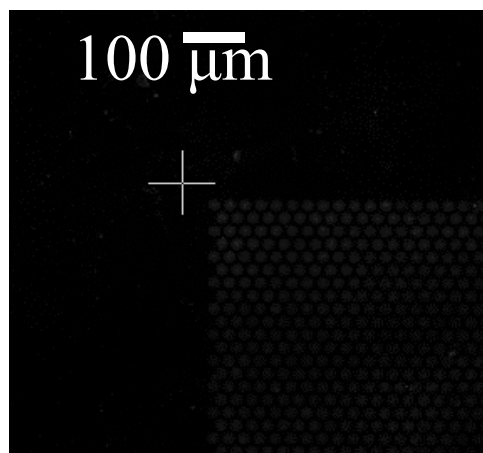


蛍光増強

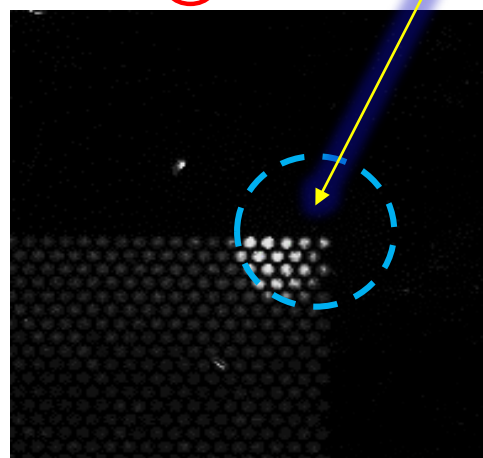
現在の研究データ 蛍光顕微鏡によるターゲット検出

UV 露光時間

① 0 s



② 30 s UV照射スポット



Cy5-SA: 10 nM

E_p : プラズモニックチップ蛍光増強度 = 13

R_p : 光化学反応促進率 = 2.3
 $\propto$ 捕捉分子密度

企業への期待

- ・ 検査における再現性を保証しうるシステム開発を目指すため、大学で作製した装置とチップをより安定したデバイスに改良できる企業との共同研究。
- ・ 半導体関連企業でナノ加工が可能で、医療分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : センシング用チップ、センシング用チップの製造方法、センシング用キット、測定方法及び測定装置
- 公開番号 : WO2022/181196
- PCT出願日 : 2022年1月28日
- 出願番号 : PCT/JP2022/003209
- 出願人 : 学校法人関西学院
- 発明者 : 田和圭子

お問い合わせ先

関西学院大学

研究推進社会連携機構(知財産学連携センター)

TEL 079-565-9052

FAX 079-565-7910

e-mail industry-academia@kwansei.ac.jp

ご清聴ありがとうございました。