

メタ表面蛍光バイオセンサシステムの最近の進展と展望

物質・材料研究機構 電子・光機能材料研究センター
岩長祐伸

1. はじめに

メタ表面は人工的なナノ構造を表面に設計，作製することで自由度の高い光制御技術を実現する光学・フォトンクスにおける一分野に成長を遂げた。2011年に異常屈折と称する現象の報告¹⁾を端緒に多くの研究者がメタ表面研究に参画し，現在世界中で精力的な研究開発が行われている。なかでも，平坦なレンズとして機能するメタレンズ^{2,3)}については海外で複数のスタートアップが起業し，商用化に向けた動きが顕在化している。メタレンズは光波の光線光学的な制御という点において工学的な工夫を数値シミュレーションによる設計に実装しやすく，得られた設計をトップダウン型の極微細加工により実行することで実現されている。

メタ表面の応用という点ではバイオセンサ応用も1つのトピックであり，表面プラズモン共鳴(SPR)法による反射スペクトルの共鳴シフトをメタ表面上で行うタイプのセンシング⁴⁾や特定のメタ表面上で著しく顕在化する蛍光増強効果⁵⁻⁷⁾を利用した蛍光センシング^{8,9)}が報告されており，具体的な検出実績を積み上げながら，実用化に向けた階段を上っている。

一口にバイオセンサと言っても，実に多岐にわたる対象を検出するため，様々な検出機構を有するデバイスがバイオセンサと呼ばれている。例えば，血液中の血糖(グルコース)を測るデバイスから，短鎖の核酸であるメッセンジャーRNAを測るデバイスまで実に多岐にわたる。また，環境計測において生物由来の分子を水などから検出するデバイスもバイオセンサと呼ばれることがある。当然ながら，それぞれのデバイスの動作原理，機構は大きく異なり，バイオセンサと広義に一括りにすることは単語の受け取り側の認識が一樣でないことから誤解を招きやすい。そこで，本稿では生体内に内在する抗原や抗体といった疾患やその予防に関与する生体タンパク質分子とDNAまたはRNAである核酸分子を検出対象とするバイオセンサについて述べる。これらの分子は分子量10000を超える大きな分子であり，抗体については典型的な免疫グロブリンG(IgG)分子は分子量約15万である。こうした大きな分子自体が最適な生化学条件下で特定の生体反応に関与する機能，役割を担っている。

本稿で対象とするバイオセンサの検出方式は実用化されているなかで大きく分類すると2つある。分析対象液中の分子質量を測る方式と標的に特異的な標識ラベルを用いて検出する方式である。前者としてはクロマトグラフィーや質量分析法，反射スペクトルの表面プラズモン共鳴(SPR)測定法などがある。後者は分子の化学的特性を活用する方法で，酵素反応による着色や蛍光分子からの蛍光を測定する。最近の測定法の改良により高感度な質量分析法も一部の先端的高額装置で可能になっているが，大まかに言うと，前者は比較的高濃度の対象分子を検出することに適した方法であり，後者は低濃度の対象分子を検出する方法である。蛍光検出は高感度化しやすい方法であり¹⁰⁾，特異的に対象分子にラベリングできる特性を重視して，高感度なバイオセンシングとして広く認知，普及している方法である。

なお，ラマン散乱測定もバイオセンサの動作原理の1つとされることがあるが，ラマン散乱は分子振動信号を測定するため低分子検出に適した方法であり，本稿のバイオセンサで対象とする大きな生

体分子には不向きである。水などに含まれる比較的低分子を対象とする環境測定においてラマン散乱測定は用途を見出すことが考えられる。

メタ表面蛍光バイオセンサの最近の進展についてこれから述べるが、第2節ではメタ表面において蛍光を高輝度化できる原理について述べる。第3節ではバイオセンサとしての検出の実例として疾患マーカーである抗原検出とセルフリーDNA検出について述べ、第4節ではまとめて代えて今後の展望について述べる。

2. メタ表面における蛍光高輝度化の原理

メタ表面のなかで誘電体（半導体を含む）のみからなるものを全誘電体メタ表面と呼ぶ。この節では全誘電体メタ表面のなかで世界最高レベルの発光増強効果を示したメタ表面⁷⁾について述べる。図1(A)は測定した全誘電体メタ表面の反射スペクトルであり、図1(B)はその走査型電子顕微鏡像（斜め30度から撮像）を示す。周期300 nmで直径約220 nmのシリコンナノ円柱が正方格子状に周期的に並んでいる。測定に対応する数値シミュレーションによる反射スペクトルを図1(C)に示す⁸⁾。測定と数値計算の結果を比較すると、全体として良い一致を示しており、700 nm付近の大きな反射ピークや600 nm以下での反射ピークが2つの結果でともに確認できる。

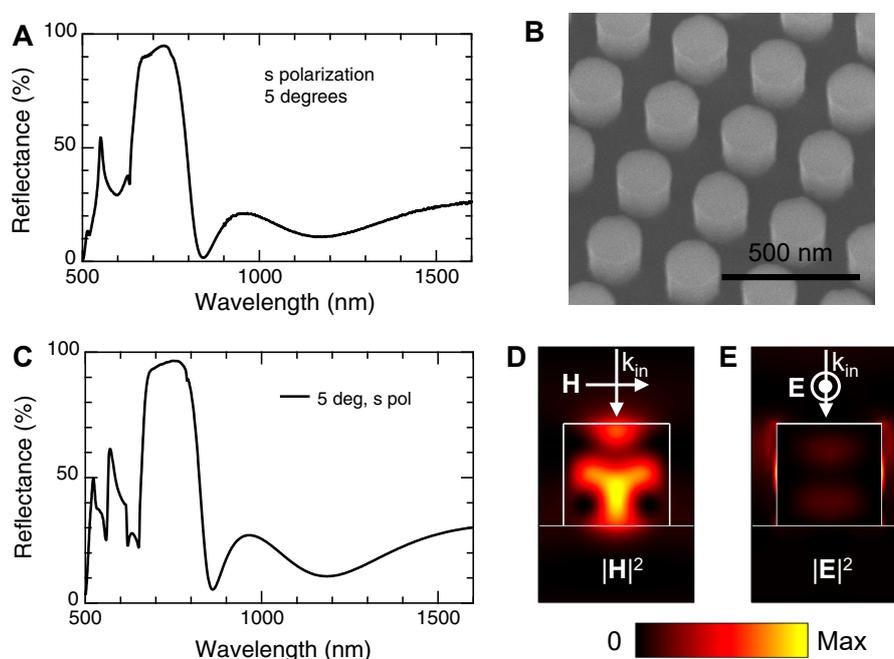


図1. 全誘電体メタ表面の光学特性と共鳴電磁場。(A) 測定による反射率スペクトル（入射角度5度，s偏光）。(B) メタ表面の走査型電子顕微鏡像（斜め30度からの撮影）。(C) 数値シミュレーションによる反射率スペクトル（測定結果(A)と同条件）。(D) 共鳴磁場強度分布。(E) 共鳴電場強度分布。文献8から引用

発光増強に関与するメタ表面の光共鳴モードは560 nm付近のモードであることから、図1(C)で波長559.3 nmの反射ディップにおける共鳴電磁場を可視化してみよう。図1(D, E)に共鳴磁場、電場強度分布を数値計算によって可視化している。入射光強度を1と設定したときに、共鳴磁場、電場強度の最大値はそれぞれ46.3, 39.3であり、明確な共鳴増強がある⁸⁾。特徴的な性質として、磁場分布がシリコンナノ円柱の内部に強く局在し、相対的に電場分布はナノ円柱最表面で最も大きな値を取る。シリコンナノ円柱の最表面に発光物質が存在する場合には、この強い電場分布を介して発光遷移が起こり、その効率化が期待できる。実際、蛍光分子を直接メタ表面上に分散させて、蛍光強度増強を実験的に調べた結果、最大で1000倍強の増強効果が得られることが明らかになっている⁷⁾。

顕著な蛍光強度増強効果を得るためには、「蛍光分子の励起効率×内部量子効率×発光効率（パーセル因子）」を最大化する必要がある。図1は発光効率を高めるためのメタ表面の共鳴状態について示している。励起効率についてもメタ表面による効率化があり、さらに内部量子効率での損失を抑制できていることが1000倍を超える蛍光増強効果につながっている。上の3因子のいずれかに注目して最適化を試みる研究がしばしば見受けられるが、3因子の積で効果が生じるため、方針として十分ではない。

メタ表面基板としての特性実証は上述のように進めてきたが、バイオセンサ化するためには特定の標的分子を特異的にメタ表面上に固定する必要がある。その工程を図2に示している。図2はDNA検出の模式図である。シリコンナノ円柱の周期列からなるメタ表面上にマイクロ流路を通じて捕捉分子（シスストレプトアビジン）を流し、固定されなかった浮遊分子はリンスで洗い流す（ステップ1）。ビオチンと蛍光分子を備えたDNAプローブと交配反応した標的DNAの二重鎖をマイクロ流路に長し、ビオチン・アビジン間の強力な結合反応を介してメタ表面上に標的物を捕捉する。浮遊物をリンスで洗い流した後、蛍光測定を行い、標的検出を行う（ステップ2）。

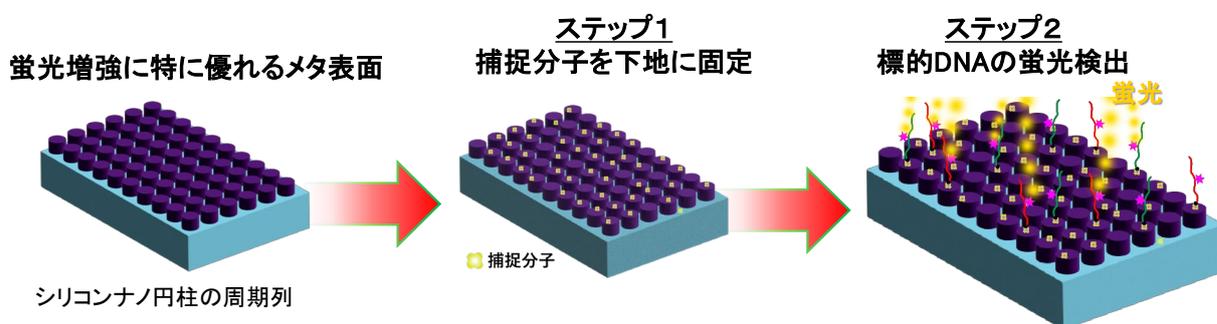


図2. メタ表面上における蛍光バイオセンシングの模式図。一部画像は許諾を得て文献9から引用

3. メタ表面センサシステムによる検出実績

この節ではメタ表面センサを中心的要素として、送液、蛍光画像取得・解析を自動化したセンサシステムによる生体分子の検出実績について述べる。

まず、タンパク質分子である抗原検出について述べる。図3は抗原として癌マーカーの1つであるCEA検出結果を示す¹¹⁾。図3(A)はリン酸生理食塩水（バッファー）中（左）と血清中（右）にあるCEA捕捉構造体の模式図を示す。CEAを抗CEA抗体でサンドウィッチ状に挟み込んだ構造体を形成している。バッファー中では夾雑分子は少なく、タンパク質分子の凝集を防ぐウシ血清アルブミンが混雑してある。一方、血清（血液から赤血球をのぞいた液体）中にはアルブミンやIgGなどの多様なタンパク質分子や脂質分子が混在しており、これらの夾雑分子が血清中に含まれる大部分の生体分子を占めている（濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ 以上）。検出対象となるCEAは微量に混じっている（濃度 ng/mL オーダー）という状況にあることを模式的に示している。

バッファー中でのCEA検出結果を図3(B)に示している。横軸はCEA濃度であり、濃度域が広いため対数表示で示す。挿入図に濃度ゼロ付近の線形表示を示す。測定値をエラーバー付きの丸で示し、検出曲線を点線で示している。この検出曲線はHill方程式を使って、測定値をフィッティングしたものである。Hill方程式は結合・解離の化学反応による生成物量を与える方程式として知られている¹²⁾。検出下限は濃度ゼロの蛍光信号値から 3σ (σ : 標準偏差) 離れた濃度として求める。図3(B)に横線として 3σ の位置を示しており、検出曲線との交点が検出下限値 2 pg/mL を与える。CEAの医療診断基準値が 5 ng/mL であることから十分な検出性能であると言える。この研究のなかで通常の検査法であるエライザ法の市販キットを複数種使って比較したところ、CEA検出範囲は $1\text{--}50 \text{ ng/mL}$ であった。検出下限で比較すると、メタ表面バイオセンサは500倍高精度であった。

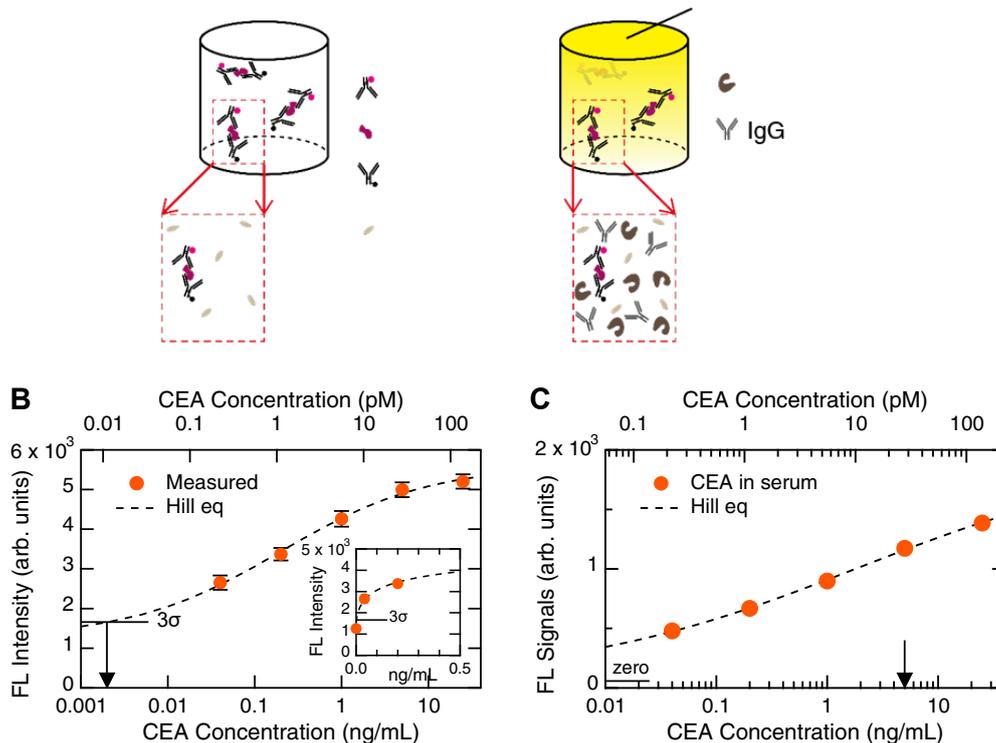


図 3. 抗原，癌マーカーCEA 検出。(A) バッファー中 (左) と血清中 (右) の CEA と抗体によるサンドウィッチ複合体。(B) バッファー中の CEA 検出結果。矢印が検出下限値 2 pg/mL を示す。(C) 血清中の CEA 検出結果。矢印は医療診断値 5 ng/mL を示す。文献 11 から引用

血清中での CEA 検出は自動化センサシステムよりさらに蛍光測定バックグラウンドが低い、正立型共焦点蛍光顕微鏡を用いて評価を行った。その結果を図 3 (C) に示している。バッファー中と同じ CEA 濃度範囲で検出できていることが分かる。このように、メタ表面センサが実検体を模した血清中に分散する CEA 検出に有用であることを明らかにした。共焦点配置で測定したことにより、測定系に起因するバックグラウンドが大きく低減し、検出下限がさらに低濃度になることが分かった。つまり、メタ表面センサ自体の検出性能は図 3 (B) で見積もった検出下限値よりもさらに低濃度の値に達する。なお、血清サンプルの自動化センサシステムによる測定も図 3 (B) と同様に行うことができ、メタ表面バイオセンサの夾雑分子耐性は測定系に依らず担保されている。

CEA 以外の抗原および抗体検出として、癌マーカー-PSA¹¹⁾、新型コロナウイルスのスパイクタンパク質とその抗体¹³⁾、早期癌マーカーの p53 抗体⁸⁾、IgG⁸⁾がある。多様な対象に対応できる汎用性は蛍光検出という汎用性の高い検出原理に由来している。

さらに、尿中のタンパク質であるヒト血清アルブミン (HSA) の検出に最近成功した¹⁴⁾。HSA は健康水準の維持を示すマーカーの 1 つであり、その値が下がると、加齢に伴う衰弱の兆候を示す。尿には様々な夾雑物 (イオンやタンパク質分子) が多く含まれているが、10 ng/mL オーダーの低濃度 HSA であっても検出できることを示した。この検出例もメタ表面バイオセンサの夾雑物耐性を示す。

つぎに核酸検出の実例についても述べる。図 4 (A) は運動誘発性セルフリーDNA の概念と次世代シーケンサーによる解析によって同定された標的配列を示している (右側の太線)⁹⁾。この場合、標的と設定したセルフリーDNA は 239 塩基対からなる短鎖の DNA 断片であり、運動によって血中濃度が上昇する¹⁵⁾。セルフリーDNA は体内変化に即応性があることや多様な疾患との相関もあると考えられているが、血中濃度が基本的に低く、特に高感度な検出系が必要とされている対象である。

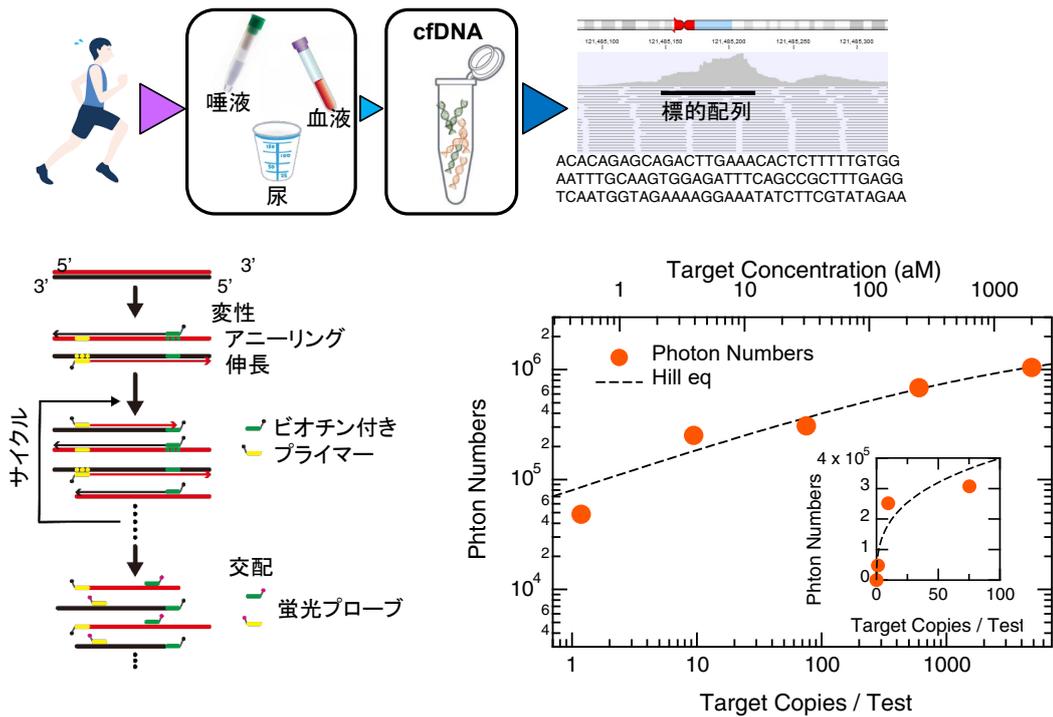


図 4. セルフリーDNA 検出。(A) 運動誘発性セルフリーDNA と次世代シーケンサーによる配列同定。(B) 短サイクル増幅過程の模式図。(C) メタ表面バイオセンサによる蛍光検出結果。横軸：標的セルフリーDNA の個数を対数表示。挿入図では横軸線形表示。文献 9 から許諾を得て引用

図 4 (B) では標的セルフリーDNA に対する短サイクルの増幅過程と蛍光プローブの交配反応を示している。標的から生成された増幅反応物を選択的にメタ表面バイオセンサ上で蛍光検出する方式を採った。検出結果を図 4 (C) に示している。横軸が標的 DNA の個数を表しており、対数表示である。挿入図では線形表示で 0 個までの範囲を含めて表示している。0 個と 1 個の検出信号は 99.9% の統計的信頼度で区別された。このときの蛍光検出には正立型共焦点蛍光顕微鏡を用いた。簡便な測定法として、自動化センサシステムによる蛍光像の解析からは 99.7% 以上の統計的信頼度で標的 1 個と 0 個を区別でき、分子の 1 個と 0 個を区別する究極的な検出系の構築に成功した⁹⁾。核酸検出に関して、筆者が知る限り、この精度での成功例は報告された前例がない。

このほかの核酸検出例として、新型コロナウイルスの相補 DNA 検出を行った¹⁶⁾。その検出下限は 5.86 aM であり、通常検査として行われる定量 PCR (Polymerase Chain Reaction) 法の 30~60 倍高感度であることを明らかにした。この精度は PCR 法の最上位手法とされるデジタル PCR 法に匹敵する。メタ表面センサシステムによる簡明な測定法でデジタル PCR 法と遜色ないことは、メタ表面センサシステムが核酸検出のゴールドスタンダードとなりうる潜在能力を示している。

4. 今後の展望 ———— まとめに代えて

メタ表面バイオセンサシステムの最近の進展を中心に述べてきた。タンパク質から核酸まで多様な対象を検出できることが理解いただけたら幸いである。詳細を割愛した部分もあり、興味のある方には参考文献を参照願いたい。結果をごく簡潔に抽出すると、従来の検査法であるタンパク質用のエライザ法と比べて約 2 桁高精度であり、核酸検出に関しては DNA を 1 個と 0 個を測り分ける究極的な性能に到達したことを示した。これらの結果は、汎用的、かつ、より高精度な検査が可能なプラットフォームが社会に提供可能な段階に近づいていることを示唆している。こうした手法は単に従来の検査法の置き換えにとどまることなく、従来サービスとして提供できてこなかった検査精度を可能にすることで、早期発見・早期診断といった先進的な医療や健康状態を維持する予防医学のための基盤技

術としての役割を果たすことができる。数十年前から理想として語られてきた医療の未来、ひいては将来の健康社会を実現することを念頭に置いて、研究開発を進めたいと考えている。

謝辞

本稿で述べてきた研究成果は科学研究費補助金・基盤研究(A) (課題番号 17H01066), 著者所属機関 (NIMS) におけるセンサ・アクチュエータ研究プロジェクト, 重点研究プロジェクト「バイオマテリアル」および SIP 第3期「マテリアル事業化イノベーション・育成エコシステムの構築」による支援を受けて行われた。

参考文献

- 1) N. Yu, P. Genevet, M. A. Kats, F. Aieta, J.-P. Tetienne, F. Capasso, and Z. Gaburro, “Light Propagation with Phase Discontinuities: Generalized Laws of Reflection and Refraction,” *Science* **334**, 333–337 (2011).
- 2) M. Khorasaninejad, W. T. Chen, R. C. Devlin, J. Oh, A. Y. Zhu, and F. Capasso, “Metalenses at visible wavelengths: Diffraction-limited focusing and subwavelength resolution imaging,” *Science* **352**, 1190–1194 (2016).
- 3) A. She, S. Zhang, S. Shian, D. R. Clarke, and F. Capasso, “Large area metalenses: design, characterization, and mass manufacturing,” *Opt. Express* **26**, 1572–1585 (2018).
- 4) A. Tittl, A. Leitis, M. Liu, F. Yesilkoy, D.-Y. Choi, D. N. Neshev, Y. S. Kivshar, and H. Altug, “Imaging-based molecular barcoding with pixelated dielectric metasurfaces,” *Science* **360**, 1105–1109 (2018).
- 5) B. Choi, M. Iwanaga, H. T. Miyazaki, Y. Sugimoto, A. Ohtake, and K. Sakoda, “Overcoming metal-induced fluorescence quenching on plasmo-photonic metasurfaces coated by a self-assembled monolayer,” *Chem. Commun.* **51**, 11470–11473 (2015).
- 6) M. Iwanaga, B. Choi, Y. Sugimoto, and H. T. Miyazaki, “The artificial control of enhanced optical processes in fluorescent molecules on high-emittance metasurfaces,” *Nanoscale* **8**, 11099–11107 (2016).
- 7) M. Iwanaga, “All-Dielectric Metasurfaces with High-Fluorescence-Enhancing Capability,” *Appl. Sci.* **8**, 1328 (2018).
- 8) M. Iwanaga, “All-Dielectric Metasurface Fluorescence Biosensors for High-Sensitivity Antibody/Antigen Detection,” *ACS Nano* **14**, 17458–17467 (2020).
- 9) M. Iwanaga, T. Hironaka, N. Ikeda, T. Sugawara, and K. Takekoshi, “Metasurface Biosensors Enabling Single-Molecule Sensing of Cell-Free DNA,” *Nano Lett.* **23**, 5755–5761 (2023).
- 10) D. A. Giljohann and C. A. Mirkin, “Drivers of biodiagnostic development,” *Nature* **462**, 461–464 (2009).
- 11) M. Iwanaga, “Robust Detection of Cancer Markers in Human Serums Using All-Dielectric Metasurface Biosensors,” *Biosensors* **13**, 377 (2023).
- 12) R. Gesztelyi, J. Zsuga, A. Kemeny-Beke, B. Varga, B. Juhasz, and A. Tosaki, “The Hill equation and the origin of quantitative pharmacology,” *Arch. Hist. Exact Sci.* **66**, 427–438 (2012).
- 13) M. Iwanaga and W. Tangkawsakul, “Two-Way Detection of COVID-19 Spike Proteins and Antibody Using All-Dielectric Metasurface Fluorescence Sensors,” *Biosensors* **12**, 981 (2022).
- 14) Q. Fu, M. Iwanaga, and Y. Tang, “Metasurface Platform Incorporating Aggregation Induced Emission Based Biosensor for Enhanced Human Serum Albumin Detection,” *Adv. Opt. Mater.* (2024), doi:10.1002/adom.202400868.

- 15) T. Sugasawa, S. Fujita, T. Kuji, N. Ishibashi, K. Tamai, Y. Kawakami, and K. Takekoshi, “Dynamics of Specific cfDNA Fragments in the Plasma of Full Marathon Participants,” *Genes* **12**, 676 (2021).
- 16) M. Iwanaga, “Rapid Detection of Attomolar SARS-CoV-2 Nucleic Acids in All-Dielectric Metasurface Biosensors,” *Biosensors* **12**, 987 (2022).
-

執筆者の
顔写真
(20×25mm)

岩長祐伸 Masanobu Iwanaga

国立研究開発法人物質・材料研究機構 電子・光機能材料研究センター グループリーダー
〒305-0044 茨城県つくば市並木1-1