

自己組織化微細多孔質高分子膜のバイオセンサーへの応用

吉田 光則, 吉田 昌充, 可児 浩, 山岸 暢
大市 貴志, 藪 浩*, 下村 政嗣*

Fabrication of Biosensor with Self-Organized Porous Polymer Film

Mitsunori YOSHIDA, Masamitsu YOSHIDA, Hiroshi KANI, Toru YAMAGISHI,
Takashi OHICHI, Hiroshi YABU*, Masatugu, SHIMOMURA*

抄 録

本研究では、自己組織化による微細多孔質高分子膜の作製方法について検討し、高分子膜の応用としてバイオセンサーへの適用について検討した。この自己組織化法では水滴を鋳型とした微細多孔質膜が得られることから、その特徴を活かして表面プラズモン共鳴センサーへの応用を検討した。その結果、免疫グロブリンによる抗原抗体反応では、表面プラズモン共鳴センサーの金薄膜上に従来使われているアルカンチオール単分子層膜に比較して、ポリスチレン系の微細多孔質高分子膜を適用することで4~7倍の感度増加が認められた。

キーワード：自己組織化，微細多孔質高分子膜，バイオセンサー，表面プラズモン共鳴センサー

Abstract

In this research, it has been studied concerning the production method of the porous polymer film due to self organization and application to the biosensor. With this self-organization method from the fact that it can produce the porous polymer film, it was discussed about application to the surface plasmon resonance sensor. As a result, by antigen-antibody reaction, sensitivity increase was accepted by using the porous polymer film of polystyrene type for the surface plasmon resonance sensor.

KEY-WORDS : self-organization, microscopic porous polymer film, biosensor, surface plasmon resonance sensor

1. はじめに

自己組織化による微細多孔質高分子膜は、ポリマーを溶媒に溶解させ高湿度の条件でキャストすることで非常に容易に作製することができる。その特徴は、孔径やその配列が均一で孔径を500nmから100 μmの範囲でコントロールすることができる薄膜であることから、細孔の大きさを利用して光学フィルターや細胞分離用フィルターなどの各種フィルター膜や膜の表面の形状を活かした細胞培養基材などのバイオマテ

リアルなどの様々な分野での応用が期待されている。また、従来のレーザー加工やフォトリソグラフに比べると低コストで大量生産が可能な技術である。

本研究では、自己組織化による微細多孔質高分子膜の作製方法について、高分子の種類と溶媒の種類、高分子溶液の濃度とキャスト量、温度・湿度などについて検討し、さらに微細多孔質高分子膜の応用としてバイオセンサーのひとつである表面プラズモン共鳴センサーへの応用について検討した。

* 北海道大学 * Hokkaido University (現 東北大学)

事業名：重点領域特別研究

課題名：自己組織化による微細多孔質高分子膜の製造技術に関する研究

2. 自己組織化微細多孔質高分子膜について

下村政嗣らが開発した自己組織化微細多孔質膜は図1に示したように、高分子材料を有機溶媒に溶かした溶液を乾燥させてフィルムを作る（溶媒キャスト法）際に、高湿度の条件でキャストを行うと高分子溶液上に水滴が結露する。この微細な水滴は特定の条件下で自発的に規則的な配列をする。水滴は溶媒の蒸発により基板上に固定化され、さらにこの水滴が蒸発することにより微細な孔のあいた高分子薄膜が形成される。したがって、高分子の種類と溶媒の種類、高分子溶液の濃度とキャスト量、温度・湿度などによって種々の性状の膜が得られる。

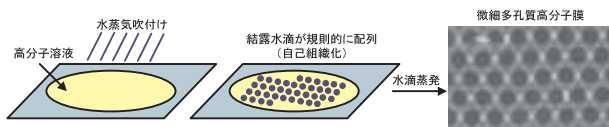


図1 自己組織化微細多孔質高分子膜の作製（概略）

3. バイオセンサーへの応用について

生体内では複雑で多様な化学反応がきわめて精密かつ正確に行われている。たとえば酵素は特定の物質を選択的に認識し特異的に化学反応を進めている。代表的な免疫システムである抗原抗体反応は、体内にウイルスなどの異物が侵入すると異物の侵入から生体を防御するために特定のタンパク質が生産される。このタンパク質は抗体と呼ばれ、異物（抗原）と特異的な化学結合することによって体内から異物を排除する仕組みが免疫システムである。

このように、あるタンパク質（抗体など）が特定の物質（抗原）を認識し、化学結合する生体物質の分子認識能力を利用したのがバイオセンサーである。

本研究では、自己組織化により作製した微細多孔質高分子膜をバイオセンサーとして表面プラズモン共鳴センサーへの応用について検討した。

3.1 表面プラズモン共鳴センサーの基本構造

表面プラズモン共鳴センサー（以下SPRセンサーと称す）は免疫反応などの生体物質の相互作用を利用し、抗原やDNAなどの特定の生体関連基質（タンパク質）を選択的に識別し信号変換するもので、診断や有機物分析をリアルタイムにセンシングするものである。センサーは特定の基質と化学結合するために生体物質が固定化された機能性膜と、その化学結合によって変化する物理量を電気信号に変換する信号変換素子から構成されている。その基本的な構造を図2に示した。センサーの金薄膜上の機能性膜には、一般的にはアルカンチオールによる単分子膜が用いられており、その末端基はカルボキシル基（-COOH）が一般的である。このカル

ボキシル基は抗原抗体反応による生体物質（たとえば抗体タンパク質など）を結合させるために化学修飾が行われる。

SPRセンサーの場合、信号変換素子は表面プラズモン共鳴現象を利用している。その原理は以下の通りである。金属薄膜が照射光を全反射するとき、エバネッセント波が生じる。また、このとき金属表面に誘電体があると表面プラズモンというエネルギー波も生じる。この両波の位相が一致したときに共鳴が起こり、反射光が減衰する現象のことを表面プラズモン共鳴という。

つまり、金薄膜上の機能性膜に基質（タンパク質）が結合し重量の変化を光の共鳴として電気信号に変化するセンサーである。

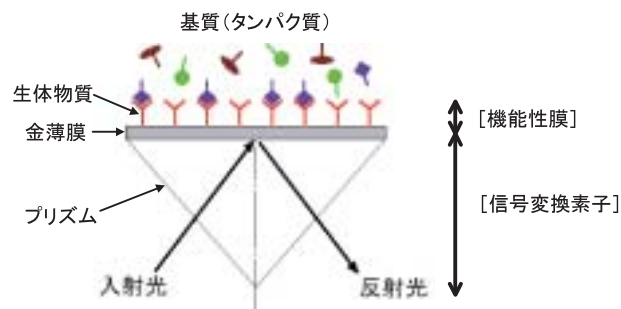


図2 SPRセンサーの構造

3.2 自己組織化による微細多孔質高分子膜の特徴

前章で述べた通り自己組織化による微細多孔質高分子膜は結露した水滴を鋳型として微細な孔のあいた高分子薄膜である。高分子薄膜の素材が両親媒性ポリマーの場合、結露した水滴の周囲にはポリマー中の親水性基が配列することが知られている。もし両親媒性ポリマー中にカルボキシル基が在るならば、水と接触していた細孔の表面は親水性のカルボキシル基が密に配列し、水滴と接触のない他の部分は疎水性のアルキル鎖が配列する相分離構造を示す。すなわち、自己組織化で作られた微細多孔質高分子膜の細孔表面はカルボキシル基が配列することで、前節で述べたアルカンチオールの単分子膜と同じ表面構造であることが推測される。

そこで、従来用いられているアルカンチオール単分子膜に換わり自己組織化による微細多孔質高分子膜をSPRセンサーの機能製膜として検討した。

4. 実験方法

4.1 自己組織化による高分子膜の作製

前述の通り自己組織化による高分子膜は種々の作製条件で孔の大きさ、深さ、膜厚などの性状が異なる。図3に高分子溶液（濃度2 mg/mlのポリスチレン/クロロホルム溶液）のキャスト量を3 ml及び5 mlの場合の供給空気の相対湿度と孔径の関係を示し、図4に供給空気の量を5 l/min及び

8 ℓ/minの場合の供給空気の相対湿度と孔径の関係を示した。また供給空気湿度を100, 80, 60, 40%RH (空気量 8 ℓ/min 及びキャスト量5ml) の場合の細孔についてレーザー顕微鏡による写真を図5に示した。孔径は供給空気の量には影響されないが、相対湿度が高くなると孔径は大きくなる。また、キャストする高分子溶液の量が多いと孔径が大きくなる。ただし、湿度が40%RHでは水分の供給が少ないために、細孔はできなかった。

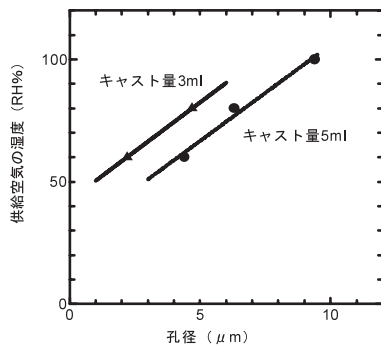


図3 キャスト量を変えた時の湿度と孔径の関係

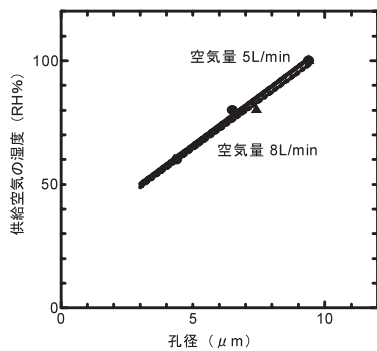


図4 空気量を変えた時の湿度と孔径の関係

4.2 微細多孔質高分子膜による機能性膜の調整

基板として16mm×16mmのカバーガラスを用い、この上に厚さが45nmの金薄膜を設け、まずpiranha溶液(硫酸:過酸化水素水=3:1の溶液)で15分間洗浄後、純水で超音波洗浄し105℃で乾燥した。そして、濃度が1.0%となる3-メルカプト-プロピル-トリメトキシシランの1%酢酸水溶液に60分間浸漬し、金薄膜をカップリング処理した。このチオール系シランカップリング剤は、加水分解されて部分的にオリゴマーとなり、分子中に金と化学結合するチオール(イオウ; S)と有機材料と化学結合する反応基を持っていることから、金表面に高分子膜を化学結合させるための表面処理剤である。

次に、自己組織化による微細多孔質高分子膜をコーティングするために、カバーガラスの金薄膜上に、濃度が0.5mg/mlとなるポリスチレン-ポリアクリル酸共重合体のクロロホルム溶液をキャストし、90%の湿度の空気を上部より5ml/分の流量で吹き付けるとクロロホルムが蒸発し水滴が鑄型となって、金薄膜上に自己組織化された微細多孔質高分子膜が形成された。(図6参照)

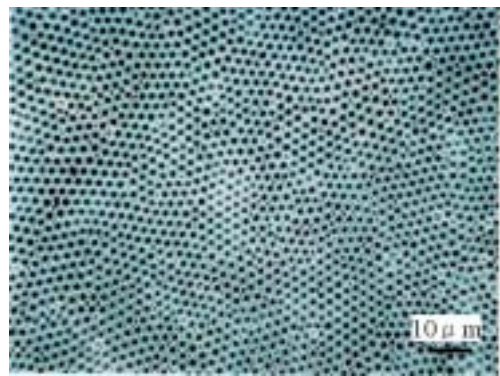


図6 自己組織化による多孔質膜の表面

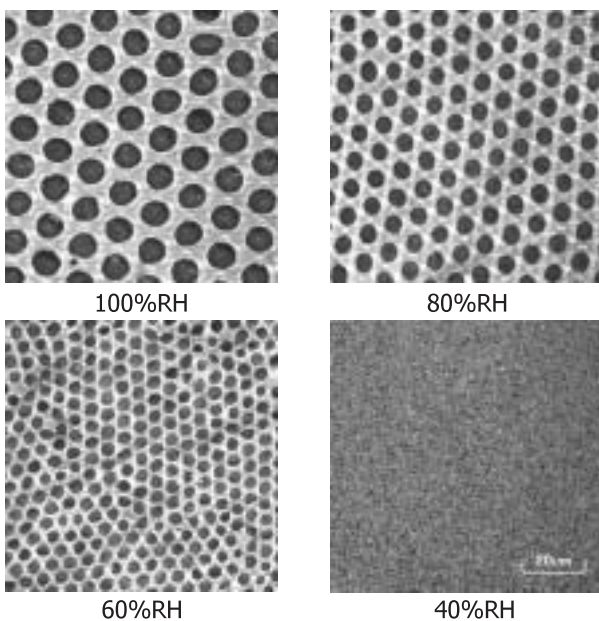


図5 供給空気の湿度を変えた時の細孔

さらに、プラズマ装置を用いてカバーガラスの金薄膜上の微細多孔質高分子膜を酸素雰囲気中で低温プラズマ酸化処理した。条件は、高周波発信器周波数; 13.56MHz, 出力; 100W, 酸素ガス流量; 50ml/分, 真空度; 1.0~1.2Torr, 処理時間; 60秒である。この処理によって高分子膜表面は酸化されカルボキシル基が増加しSPRセンサーの感度増加に有効に作用し、しかも水との濡れ性が良好になる。膜表面をフーリエ変換赤外分光分析(FT-IR)で測定すると、カルボキシル基の増大が確認された。また、処理前の水接触角は150deg.であったのに対して、プラズマ酸化処理を行うと68deg.となり、親水性が向上したことが確認された(図7参照)。

以上のように作製したカバーガラス上の金薄膜/微細多孔質高分子膜によるセンサーチップをSPR測定装置のプリズム上に固定して、専用のマウントをセットしてフロー式で以下の操作を行った。すなわち、抗原抗体反応による抗体タンパク質を結

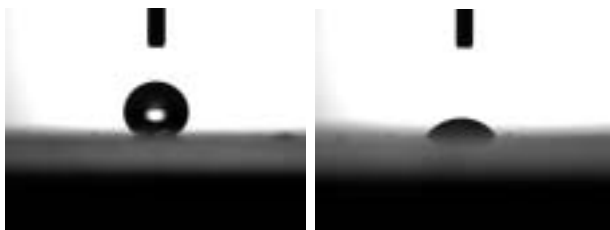


図7 プラズマ処理による水接触角の変化 (左; 処理前, 右; 処理後)

合わせるための化学修飾としてマレイミド修飾を、400mmol/lの1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide水溶液および100mmol/lのN-Hydroxysulfosuccinimide水溶液の混合液を20μl/minの流量で7分間、合計140μlをセンサー上に流すことによって処理した。

このような操作により自己組織化によって作製された微細多孔質膜にマレイミド修飾を行うことによってSPRセンサー用の機能性膜として使用できるようになった。

比較のために従来のSPRセンサーを以下の手順で調整した。厚さが45nmの金薄膜を有する16mm×16mmのカバークラスを、濃度1mmol/lとなる10-カルボキシ-1-デカンチオールのエタノール溶液に24時間浸漬し、その後エタノールで洗浄して、アルカンチオールの単分子膜を作製した。さらに多孔質高分子膜と同様にマレイミド修飾処理を行い従来法によるSPRセンサーを得た。

5. 実験結果

前述の通り作製した高分子多孔質膜及び従来使われてきたアルカンチオール単分子膜の感度を調べるために、標準物質を用いて抗原抗体反応による実験を行った。人間の細胞が作り出す抗体は5種類あるが、本研究では血液中に最も多く存在し、最も容易に抽出される免疫グロブリンG (IgG) を用いた。IgGは各種免疫不全症、感染症、腫瘍、自己免疫性疾患を含むさまざまな抗体産生系の異常をきたす疾患のモニタリングの目的で使用されている抗体である。

金薄膜上に作製した微細多孔質高分子膜およびアルカンチオール単分子膜によるセンサーチップをSPR測定装置のプリズム上に固定して、専用のマウントをセットしてフロー式で次の操作を行った。

MP BIOMEDICALS社のヒトIgG抗体の20μg/mlの濃度に調製したリン酸緩衝液を20μl/minの流量で7分間、合計140μlをセンサー上に流すことで抗体を固定化した。

SPRセンサーの感度を調べるために、MP BIOMEDICALS社の免疫グロブリンG (ヒトIgG) 抗原の1×10⁻⁸ mol/lの濃度に調整したリン酸緩衝液を流し、続いて濃度1×10⁻⁷ mol/lのリン酸緩衝液を流し、それぞれ表面プラズモン共鳴シグナルの変化を測定した。

その結果を図8、図9及び表1に示した。IgG抗原濃度が1×10⁻⁸ mol/lの場合で高分子多孔質膜が538RUであるのに対して従来法が80RU、1×10⁻⁷ mol/lの場合で高分子多孔質膜が1007RUであるのに対して従来法が247RUであった。すなわち、従来使われているアルカンチオール単分子膜と比較すると、IgG抗原濃度が1×10⁻⁸ mol/lの場合で約7倍、1×10⁻⁷ mol/lの場合で4倍、高分子多孔質膜を使用したSPRセンサーの感度が良いことがわかった。

ここで、レゾナンスユニット (RU) とは、センサーチップ表面の濃度変化にともなっておこる表面プラズモン共鳴シグナルの変化を表す単位で、角度0.1deg.は1,000RUである。

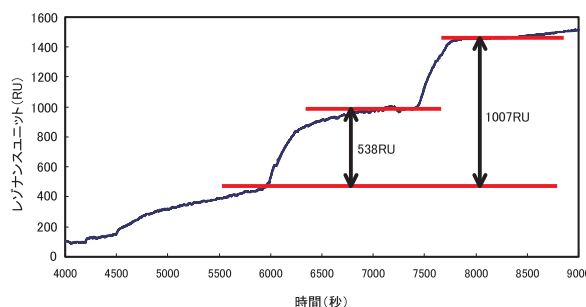


図8 多孔質膜によるSPRセンサーのIgG抗原の測定

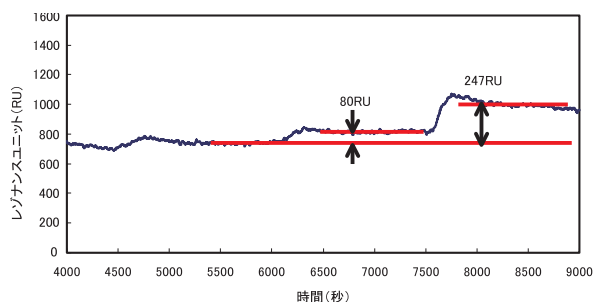


図9 アルカンチオール膜によるSPRセンサーのIgG抗原の測定

表1 SPRセンサーの感度比較

| 抗原の濃度 | 高分子膜 | 従来法 |
|--------------------------|----------|--------|
| 1×10 ⁻⁸ mol/l | 538 RU | 80 RU |
| 1×10 ⁻⁷ mol/l | 1,007 RU | 247 RU |

6. まとめ

水滴を鋳型として自己組織化により作製した微細多孔質高分子膜をバイオセンサーとして表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーへ応用した結果、以下の知見が得られた。

- (1) 自己組織化による作製条件として、供給空量の相対湿度が高くなると孔径は大きくなり、また、キャストする高分子溶液の量が多いと孔径が大きくなることがわかった。
- (2) 表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーの機能製膜に応用することを目的として微細多孔質高分子膜の表面を酸

素雰囲気低温プラズマ酸化処理することで、表面のカ
ルボキシル基が増大し、親水性が増大することが確認さ
れた。

- (3) 表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーの抗原抗体反応
では、従来のアルカンチオール単分子層膜に比較して、
4 ~ 7 倍の感度増加が認められた。

今後は、微細多孔質高分子膜の表面構造とセンサーの感度
を詳細に検討し、バイオセンサーの実用化について検討する
予定である。

謝辞

本研究では、室蘭工業大学情報工学科の島田浩治准教授お
よび㈱メンテックの日置岳彦研究員にSPRセンサーでの実
験に関して多大なる協力を賜りました。ここに心より感謝申
し上げます。

また、本研究で使用したレーザー顕微鏡は、競輪補助事業
により整備されました。記して感謝致します。

引用文献

- 1) 下村政嗣ほか、自己組織化によるナノマテリアルの創成
と応用, エヌ・ティー・エス, pp243-293 (2004)