

【公開版】

平成28年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「射出成形の超微細構造プリズムレス SPF バイオセンサーチップ及び
装置の開発」

研究開発成果等報告書

平成29年5月

担当局 近畿経済産業局
補助事業者 一般財団法人 大阪科学技術センター

目 次

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	・・・ 2
1-2 研究体制	・・・ 7
1-3 成果概要	・・・ 9
1-4 当該研究開発の連絡窓口	・・・ 11

第2章 本論

2-1 研究開発実施内容	
【1】光の波長以下の超微細構造の射出成形用金型ピンの作成	・・・ 12
【2】超微細構造の射出成形による精密転写	・・・ 15
【3】超微細構造透明樹脂への金属膜の成膜	・・・ 15
【4】バイオセンサー感度の評価、フィードバック	・・・ 17
【5】POCT 装置用チップとしてのマイクロ流路設計	・・・ 19
【6】流路一体成形	・・・ 22
【7】評価用検査装置による基礎評価データの構築	・・・ 23
【8】販路開拓と POCT 装置の開発	・・・ 24

第3章 全体総括

3-1 研究開発成果	・・・ 25
3-2 研究開発後の課題・事業化展開	・・・ 25

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

(1) 研究開発の背景

健康で安心して暮らす健康長寿社会の実現のため、病気にならない予防医療技術、病気になったとしても、疾患が軽微なうちに治療を行い完治までの時間や苦痛を軽減するための早期発見技術が求められている。近年の目覚ましい医療の進歩から、種々の疾患に起因する物質が特定されてきており、これらの物質をより高感度で検出することができれば、より早く、軽微もしくは未病の状態でも早期発見することができる。ここに透明樹脂に超微細加工を行うことによって実現する革新的、低コスト・高感度 SPF バイオセンサーチップの研究開発について説明する。

< 従来の技術 >

現在実用化されている代表的な検出センサーとして、表面プラズモン共鳴法（SPR 法）と酵素結合免疫吸着法（ELISA 法）が挙げられる。

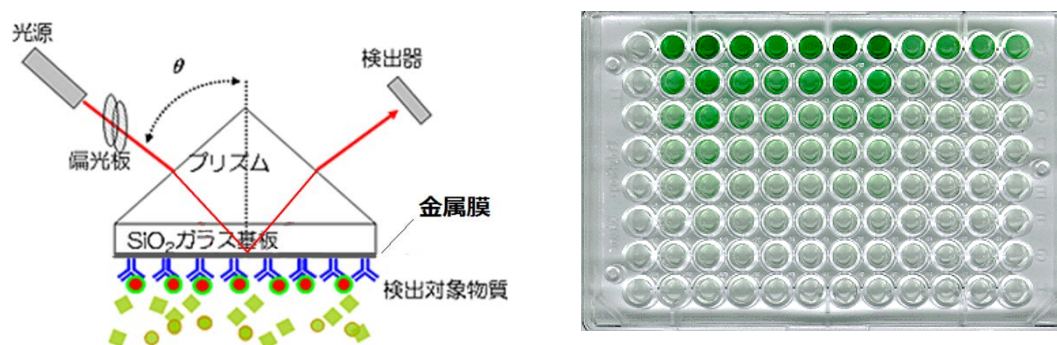


図 1. (左) SPR 法のチップ模式図 (右) ELISA 法プレートの写真

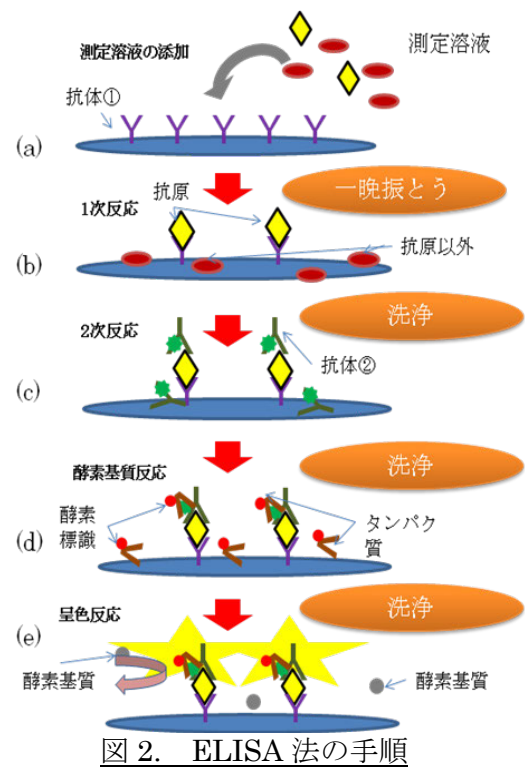
◇ 従来の技術 1 ～SPR 法～

SPR 法は、Surface Plasmon Resonance の略で、金属内の自由電子に電磁波である光が特定の条件で入射した時に発生する集団振動（表面プラズモン）を利用したものである。操作は簡単で迅速ではあるが、上図 1(左)に示すようなプリズムを使用し、感度不足と装置・チップの価格に問題がある。

◇ 従来の技術 2 ～ELISA 法～

また一方の ELISA 法は、特異性の高い抗原抗体反応を利用し、検出目的の微量物質（抗原）に酵素で標識した抗体を吸着させ、その発光や発色の検量線から特定物質の濃度を測定する方法である。

上図 1(右)は ELISA で使用するウェルプレート例で、このように多数の反応ポケット（ウェル）の中で図 2 のような複雑な手順を踏んで試料を反応させて検出する。患者から採取する血液などを多く必要とし、患者の負担が大きく、反応時間が長く結果が出るまでに時間を要する。



以下に SPR 法と ELISA 法の課題を表 1 にまとめた。

表 1. SPR 法および ELISA 法の課題

SPR 法の課題	ELISA 法の課題
・微量を検出するには感度不足 ・装置の小型化が困難 ・装置の低コスト化が困難 ・チップが高価で薄型化が困難	・検査反応時間が長い ・操作が煩雑 ・試料に 100 μL 程度必要→患者の負担

(2) 研究目的及び目標

従来技術に対し、ジュラロン工業株式会社（以下ジュラロン工業）と国立研究開発法人産業技術総合研究所関西センター（以下産総研）および関西学院大学（以下関学）（平成 27 年 4 月～）は、波長以下の超微細加工をチップの表面に施すことによって、小型で高感度、安価で操作性が良く、迅速性に優れた蛍光増強法による SPF バイオセンサーチップの研究開発を行っている。

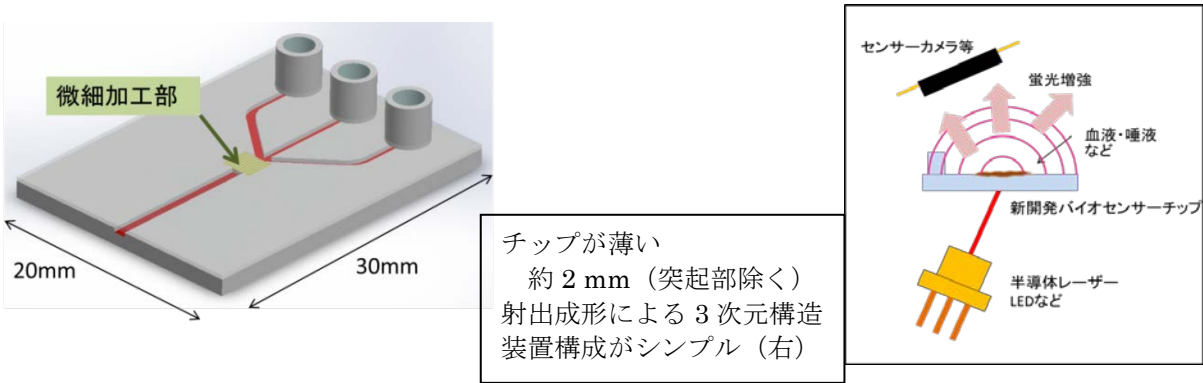


図 3. (左)新開発の SPF バイオセンサーチップと (右) 装置構造

【公開版】

新開発の SPF バイオセンサーチップと従来方式との比較イメージを以下図 4 に示す。

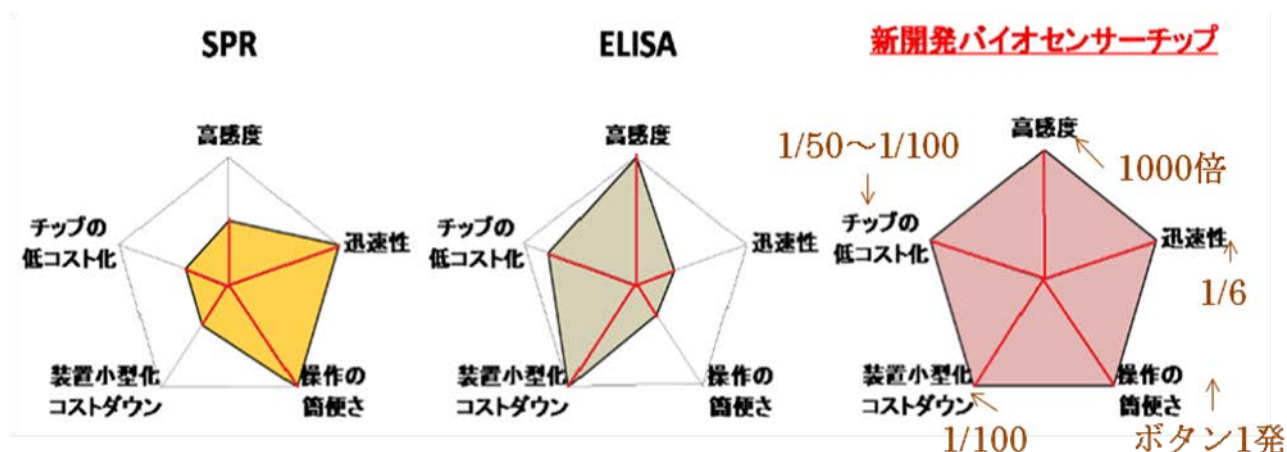


図 4. 従来方式と新開発バイオセンサーチップの比較

本事業の SPF バイオセンサーチップには、微細加工を施すことで蛍光強度は通常のガラス板上で測定した蛍光強度と比較して 100 倍以上の強度がある。SPF 測定の原理を以下の図 5 で説明する。

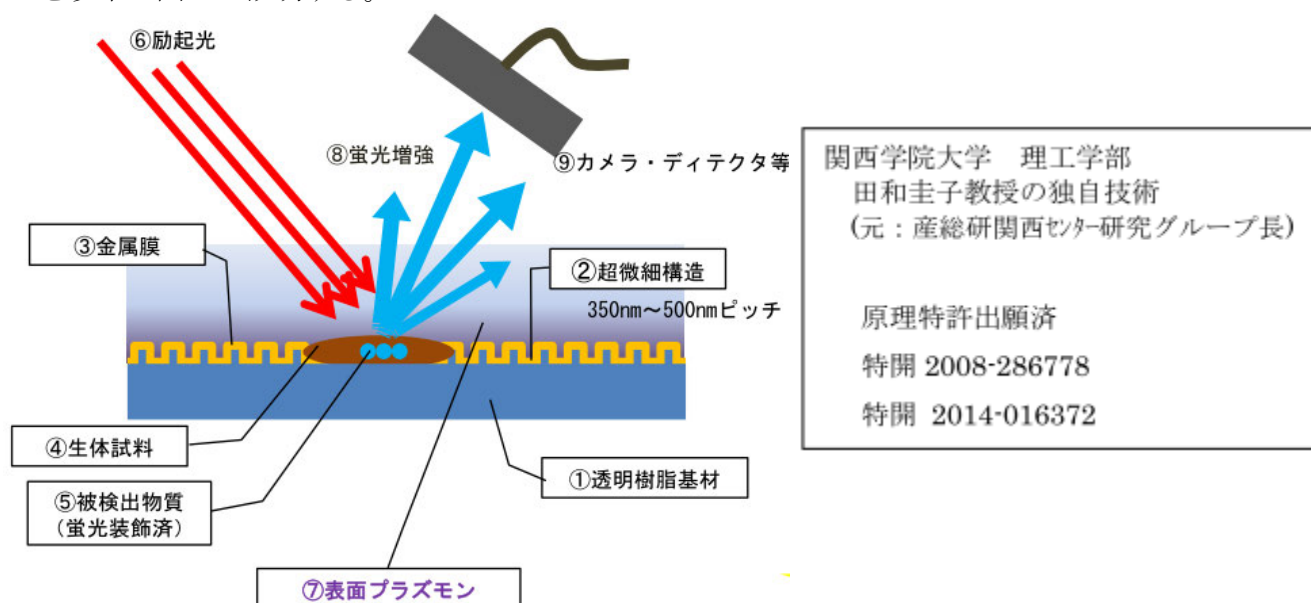


図 5. 新開発 SPF バイオセンサーチップの微細構造

透明樹脂基材①に光の波長以下のピッチ、深さをナノレベルの精度でコントロールした超微細構造②を施し、その表面に表面プラズモンを発生させるための金属薄膜③を施す。この①②③で構成されているものを、表面プラズモニックセンサーチップと呼んでいるものである。

次にこのセンサーチップの微細構造上に生体試料④をのせる。この生体試料の中には特定したい被検出物質⑤がその物質に特異反応で結合させ蛍光標識された状態で含まれているものとする。

そこへ励起光⑥を一定の角度で入射させると、②の超微細構造と③の金属膜との相

【公開版】

相互作用で表面プラズモン⑦が発生する。この表面プラズモン⑦が⑤の蛍光標識された被検出物質の蛍光励起光となり蛍光を発生させ、更に発生した蛍光が⑦の表面プラズモンと再カップリングすることで、著しい蛍光増強⑧が発生する。これを⑨のカメラや光センサーディテクタなどで検出し、被検出物質の有無・濃度を検出する。

増強した蛍光強度は、通常ガラス板上で測定した蛍光強度と比較して 100 倍以上の強度がある。この特性を利用した検出方法を蛍光増強法（SPF 法）と言う。この特性を利用し低濃度の被検出物質を高感度で検出するのである。

小型でありながら高感度で少量の生体試料で検査できることから患者の負担を抑え、しかも安価で使い捨てを前提とした迅速で操作性に優れた POCT 用バイオセンサーチップの量産化開発を行う。

※新開発 SPF バイオセンサーチップは、微細加工部のみのチップでの評価と流路を施すことが可能な大きさのチップでの評価、2 つに分けて行うため、以後チップの表記を下記で記す。

超微細構造部のみの評価用チップ：微細構造チップ

マイクロ流路の大きさを持ったチップ：マイクロ流路用チップ

<本研究開発のこれまでの取り組み>

2013 年 7 月より、射出成形による微細構造チップの 1 次試作に取り組み、これまで以下のような成果を上げ、今後の課題を確認した。

◎電子線描画による金型ピンの作成

ジュラロン工業はこれまで金型精密加工を、5 軸の精密切削加工装置による機械加工で行ってきた。本事業で取り組む線幅 175 nm～250 nm（ピッチ 350 nm～500 nm）は機械加工では成し得ないため、半導体パターン作成技術である電子線描画（EB 描画）を金型加工に応用した。

射出成形金型は下図 6 の右のような構造とし、超微細構造部分は、研究開発の進捗に応じて交換もしくは取り外して修正が可能な金型ピン構造とした。

1 次試作は、文部科学省が実施した平成 25 年度ナノテクノロジープラットフォーム「研究設備の試行的利用課題募集」を利用し、取り組んだ成果である。

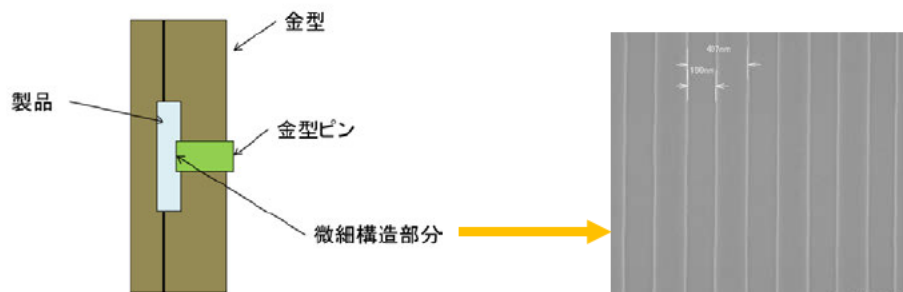


図 6. 微細構造部分が取り外し可能な金型

【公開版】

新開発バイオセンサーチップの量産化開発に向けて解決すべき課題を以下の実地内容【1】～【8】の通りに定めた。

【1】光の波長以下の超微細構造の射出成形用金型ピンの作成の目標値

Si 基板の EB 描画とエッチングによる微細加工部の寸法精度、平面度は以下の規格を満足すること。

項目	規格
格子ピッチ	約 400 nm ± 10%
格子深さ	約 20 nm～30 nm の狙い値 ± 5 nm
表面平面度（光学面評価）	傾き成分を除去して 10 mλrms 以下

※エッジのダレ不可 / 表面平面度は、関学のナノインプリント製チップを基準とした。

※チップのカケ、ヒビ、割れ無きこと

【2】超微細構造の射出成形による精密転写成形品の精度目標

上記、高精度金型ピンを転写した成形品の精度も、金型の目標精度に準じる。

項目	規格
格子ピッチ	約 400 nm ± 10%
格子深さ	約 20 nm～30 nm の狙い値 ± 5 nm
表面平面度（光学面評価）	傾き成分を除去して 10 mλrms 以下

※エッジのダレ無きこと。微細構造部にカケ、ヒビ、割れ無きこと。

【3】超微細構造透明樹脂への金属膜の成膜の目標

成形した微細構造チップに成膜する 4 層の初期スペックは以下の通りである。

	材質	膜厚
1 層目	接着層	(厳秘) ※
2 層目	Ag	100 nm 以上の設定値±10%
3 層目	接着層	(厳秘) ※
4 層目	SiO ₂	20 nm～40 nm

スパッタリング後の表面粗さ Ra の目標値は 4 nm 以下とする。

※接着層の材質および膜厚は厳秘のため明記しない。

【4】バイオセンサー感度の目標

実験の指標として、ビオチン-スト렙トアビジン反応(Cy5 付き)の検出蛍光強度が、ガラス板を用いた反応と比較して 100 倍以上であることを目標とする。

この目標は、量産を見越した成形バラツキ、成膜バラツキを含めた製品規格である。これを達成した上で、IL-6、HER2 の検出感度を測定する。

【5】POCT 装置用チップとしての流路作成を行う

POCT (Point of Care Testing) 市場で必要とされるバイオマーカーを選択し、それに応じた生体試料と試薬の供給→反応方法を 1 チップ上で行う POCT 装置用チップの流路設計を行う。

【6】流路一体成形

実施内容【5】で設計した流路一体型チップを超小型卓上射出成形機での一体成形で24時間自動生産システムの構築を行い、内製成膜装置による成膜、出荷検査までの一貫生産を実現する。目標製造単価を100円とする（バイオマーカーのコストは除く）。

【7】評価用検査装置による基礎評価データの構築

高感度であることを利用して、装置構造を簡素化するための基礎データを以下の項目で評価する。

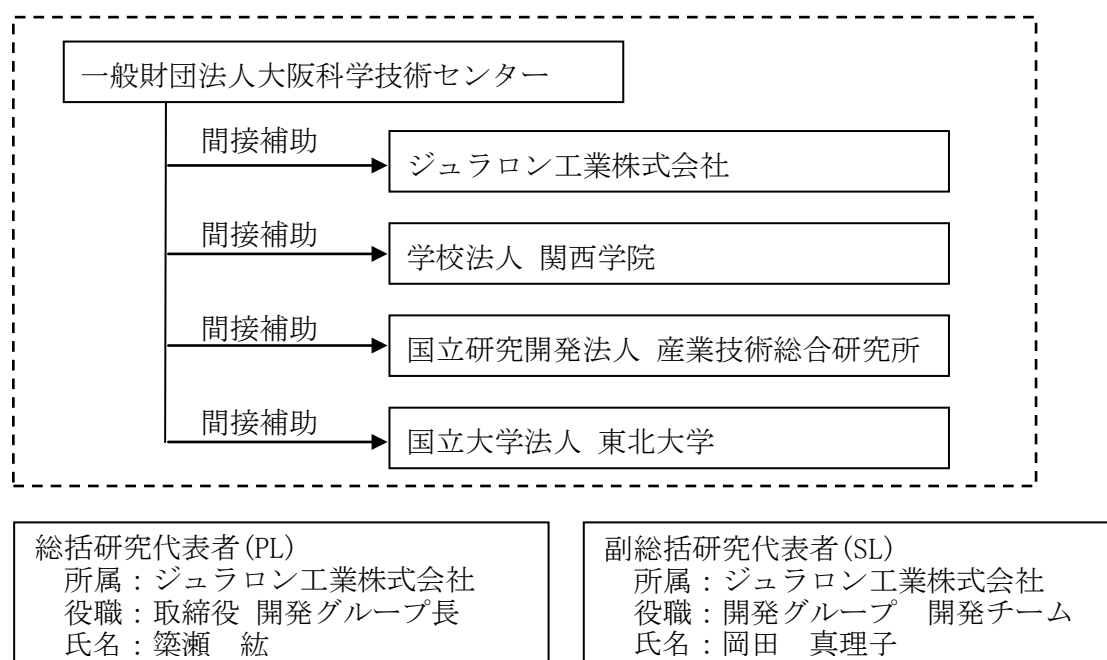
①励起光のコヒーレンス性、②励起光強度、③励起光の入射角度、④蛍光検出ディテクタの仕様

【8】販路開拓とPOCT装置の開発

実施内容【7】で構築した基礎データの評価結果を元に学会・学術論文での発表を実施する。医療系コンサルタント会社を介して装置会社、製薬会社に訴求。POCT装置の開発原案を平成29年2月迄に決定する。

1-2 研究体制

（研究組織）



（事業管理機関）

・補助事業者【一般財団法人大阪科学技術センター】

氏 名	所属・役職
小島 一哉	常務理事 技術振興部長
森山 昌己	技術振興部 副部長

【公開版】

川口 満	技術振興部 副部長
谷口 裕一	技術振興部 調査役

(研究者)

・間接補助事業者【ジュラロン工業株式会社】

氏 名	所属・役職
築瀬 紘	取締役 開発グループ長
岡田 真理子	開発グループ 開発チーム
荒木 秀	開発グループ 開発チーム
伊田 陵司	技術グループ 第1技術チーム

・間接補助事業者【学校法人 関西学院】

氏 名	所属・役職
田和 圭子	理工学部・大学院理工学研究科 教授

・間接補助事業者【国立研究開発法人 産業技術総合研究所】

氏 名	所属・役職
細川 千絵	バイオメディカル研究部門 主任研究員

・間接補助事業者【国立大学法人 東北大学】

氏 名	所属・役職
梅津 光央	大学院工学研究科 教授

(アドバイザー)

氏 名	所属・役職
松嶋 朝明	国立大学法人 京都大学 学際融合教育研究推進センター ナノテクノロジーハブ拠点 工学博士
中本 安成	国立大学法人 福井大学 医学部医学科付属病院 教授
岩野 正之	国立大学法人 福井大学 医学部腎臓内科 教授
加藤 正雄	株式会社ディ・アル・ケイ・ネット 代表取締役

1-3 成果概要

【1】光の波長以下の超微細構造の射出成形用金型ピンの作成

【1-1】超微細構造バイオセンサーチップの物理構造仕様の設計

電磁場解析ツール Rsoft を導入することにより、RWCA 法および FDTD 法の両方から超微細構造による表面プラズモン共鳴を理論解析することが可能となった。

実施内容【4】での実測結果をフィードバックして再解析すると、製造バラツキの範囲内であれば SPR 共鳴角等の特性に関しては特に大きな変動はないことが示された。

【1-2】EB 描画による、超微細構造部金型加工

京都大学ナノハブ拠点の装置を用いて、目的の寸法を持ったナノ格子入子ピンを作成することができた。Si 基板の EB 描画とエッチングによる微細加工部の寸法精度、平面度は以下の規格を満足することであったが、実際の目標値に対する実測値も下記に記した。

〈課題に対する具体的な技術目標値〉

項目	規格
格子ピッチ	約 400 nm $\pm$ 10%
格子深さ	約 20 nm～30 nm $\pm$ 5 nm
表面平面度（光学面評価）	傾き成分を除去して 10 mλrms 以下

〈Si 基板の微細構造部の実測値〉

項目	実測値
格子ピッチ	402 nm $\pm$ 2 nm
格子深さ	28 nm $\pm$ 2 nm
表面平面度（光学面評価）	必要なし（当初の目標値を見直した）

以上により技術目標値を達成し、金型ピンが完成した。

※表面平面度に関しては、当初の目標数値 10 mλrms 以下と定めていたが、目標未達であっても、SPF 強度が目標のガラス板対比 100 倍超を達成できた。これより、当初の目標値を見直した。

【2】超微細構造の射出成形による精密転写

ジュラロン工業保有の 3t 超小型卓上射出成形機によって超精密転写成形を実現する為の成形条件を種々実験した実測値の結果を下記に記した。

〈課題に対する具体的な技術目標値〉

項目	規格
格子ピッチ	約 400 nm $\pm$ 10%
格子深さ	約 20 nm～30 nm $\pm$ 5 nm
表面平面度（光学面評価）	傾き成分を除去して 10 mλrms 以下

〈成形品の微細構造部の実測値〉

項目	実測値
格子ピッチ	387 nm ± 3 nm
格子深さ	24 nm ± 1 nm
表面平面度（光学面評価）	必要なし（当初の目標値を見直した）

以上により、技術目標値を達成した。

【3】超微細構造透明樹脂への金属膜の成膜

ジュラロン工業の研究用スパッタリング装置はロードロック室を搭載しており、高精度な膜厚制御が可能であった。

スパッタ膜のスペックの達成度を調べると、AFM の膜厚測定から、Ag 膜厚 120 nm 狙いで 119.9 nm の精度良い成膜を仕上げることに成功した。また Ra（表面粗さ）は 1 ～2 nm 程度の良好なスパッタ面が得られることも確認できた。

AFM で 4 層の膜厚が目標値どおりに完成したこと、並びに実施項目【4】でガラス板比 100 倍超の蛍光増強が確認できたことから、技術目標値を達成した。

【4】バイオセンサー感度の評価、フィードバック

【4-1】ビオチン-ストレプトアビジン反応での蛍光強度増強評価

試作した微細構造チップで代表的な抗原抗体反応のモデル化合物であるビオチン-ストレプトアビジン反応 (Cy5 付き) での蛍光強度増強度合を関学が保有する評価装置を利用して、関学と共同で評価した。SPF 強度に関して、当初目標であるガラス板対比 100 倍超の蛍光増強が確認できた。

【4-2】疾患起因物質検出感度の評価

ガラス比 100 倍超の感度が確認できた微細構造チップを用いて関学が保有する SPF 評価装置を利用し、IL-6 の抗原が高感度に測定できるかの評価を行ったところ、関学のナノインプリント製微細構造チップと同程度の感度を出すことが確認出来た。さらに、迅速・高感度化が出来ないかについて東北大と共に現在も研究開発を行っている。

【5】POC 装置用チップとしてのマイクロ流路設計

POCT (Point of Care Testing) 市場で必要とされるバイオマーカーを選択し、それに応じた生体試料と試薬の供給→反応方法を 1 チップ上で行う POCT 装置用チップの流路設計を行う事に対し、流路・液送条件検討用マイクロ流路用チップを立案した。試作時には流路を切削加工で行い、流路内容が決定し量産する際には、流路と微細構造を組み込んだ射出成形品を提供する予定である。

実際に流路を切削加工し、評価したところ課題は 3 点が挙がった。

1. 逆流
2. 検出部
3. マイクロ流路用チップの蓋

引き続き、上記 3 点の課題解決に対し、現在も取り組んでいる。

【6】流路一体成形

微細構造チップの約 10 倍の大きさのあるプラスチック基板(マイクロ流路用チップ)でも射出成形でナノの微細構造の形状が出せるか、成形条件を検討したところ、ナノ形状の AFM 観察でも凹凸の微細構造を観察することができ、SPR 共鳴角も確認できた。

※流路はミクロン単位の幅と深さであるため、ナノ形状構造の成形条件さえ決定していれば、成形可能である。

【7】評価用検査装置による基礎評価データの構築

高感度の装置構造を簡素化するための基礎データを以下の項目を評価した。

- ①励起光のコヒーレンス性：実験中に確認した収差は今後の装置開発に影響を与えることを見越し、今後対策を検討する必要がある。
- ②励起光強度：適正な強度を見つけることが出来た。
- ③励起光の入射角度：SPR 共鳴角のことであり、ジュラロン工業のプロトタイプの装置でも測定することが出来た。
- ④蛍光検出ディテクタの仕様：小型化しやすい検出装置を発見した。

また、サポイン期間内で作製したプロトタイプでビオチン-ストレプトアビジン反応(Cy5 付き)での蛍光強度増強評価を行った結果、濃度 1 nM まで測定できた。今後さらなる感度の向上を目指し、現在も取り組んでいる。

【8】販路開拓と POCT 装置の開発

実施内容【7】による基礎データから、POCT 装置の小型化に向けて必要になりそうな新たな方式を考案している。これに関し、法定期間内での設計仕上げに向けて開発を行っていく予定である(プロトタイプの開発)。また販路開拓(川下展開)の調査も行っており、医療ニーズへ貢献するために、適した製品開発を行っていく。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

(事業管理機関)

〒550-0004 大阪市西区靱本町1丁目8番4号

一般財団法人 大阪科学技術センター

技術振興部 TEL: 06-6443-5322 Fax: 06-6443-5319

川口 満 Email: m.kawaguchi@ostec.or.jp

(法認定中小企業)

〒576-0053 大阪府交野市郡津2丁目51-8

ジュラロン工業株式会社

開発グループ TEL: 072-891-5515 Fax: 072-891-3815

築瀬 紘 Email: yanase@juraron.co.jp

第2章 本論

2-1 研究開発実施内容

サポイン事業の実施内容の流れを以下図 7 に示す。

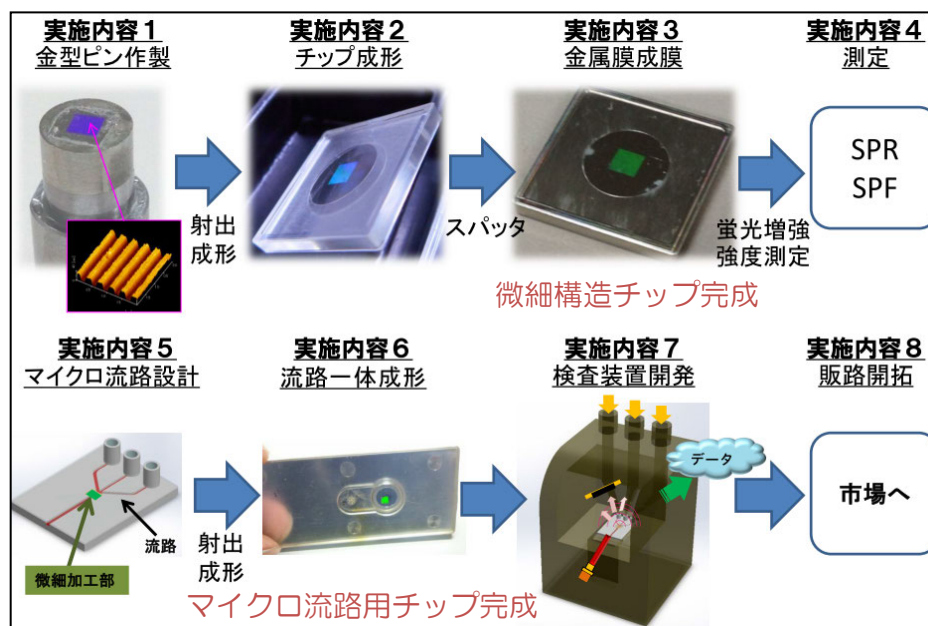


図 7. 実施内容の全体像

以下、実施内容【1】～【8】の具体的な内容を記す。

【1】光の波長以下の超微細構造の射出成形用金型ピンの作成

【1-1】超微細構造バイオセンサーチップの物理構造仕様の設計

超微細構造のピッチ、溝と凸部のデューティー比、溝深さ、金属薄膜の仕様を電磁界解析ソフト Rsoft で設計し、微細加工上課題となる精度公差を含めた物理構造仕様を平成 26 年度には決定できた。

さらに平成 28 年度では、チップの SPR 測定結果・AFM 測定結果・実施内容【4】の実験結果から測定形状を解析モデルにフィードバックし、超微細構造のピッチ、溝と凸部のデューティー比、格子深さ等による影響を電磁界解析ソフト Rsoft により検証を行った解析結果を下図に示す。

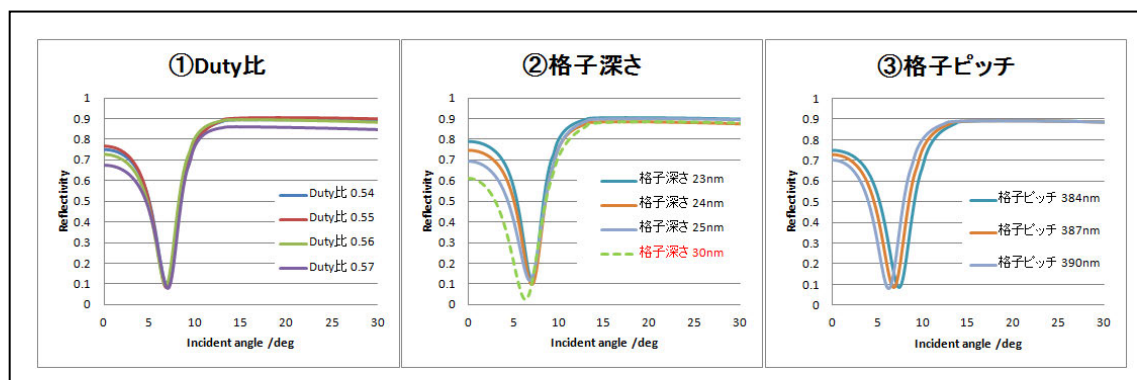


図 8. 成形品の形状バラツキによる SPR 共鳴角変化シミュレーション結果

測定結果をフィードバックした解析モデルを用いることで、成形品バラツキに対する評

価と、改良の方向性についてのより良いデータを得ることができた。

【1－2】EB 描画による、超微細構造部金型加工

射出成形用金型の微細構造部分は、実際に Si の EB 加工・エッチングによる高精度微細加工を、京都大学ナノハブ拠点の助言を得ながら、加工条件データを積み重ね、目標精度を達成させた。

京大ナノハブ拠点にある大面積超高精度電子線描画装置を用いて、ドーズ量(1 ドット辺りの面積に対するビーム電流値とドーズ時間の積)の条件を確認した。描画では、ドーズ量を制御することで、数十 nm～数 nm で任意の微細構造やパターンの描画自体に関与している。ドーズ量を $120 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 、 $130 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 、 $140 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 、 $150 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 、の 4 パターンに変化させ、SEM 観察を行った結果が写真 1 である。

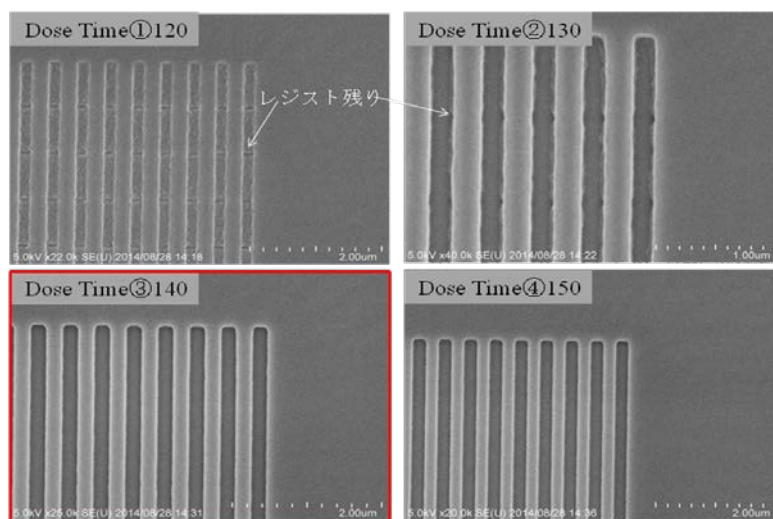


写真 1. EB 描画による微細加工の写真 (走査型電子顕微鏡 (SEM))

写真 1 の結果から、ドーズ量を $120 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 、 $130 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ にした場合、レジスト残りが出た。ドーズ量を $150 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ にした場合、若干であるが描画しすぎていた。そのため、今回用いたドーズ量は $140 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ と決定した。

さらに深堀ドライエッチング装置で深さ出しを行った。エッチング時間を 21 sec、31 sec、41 sec、51 sec の 4 パターンに変化させ、SEM 観察を行った結果が写真 2 である。

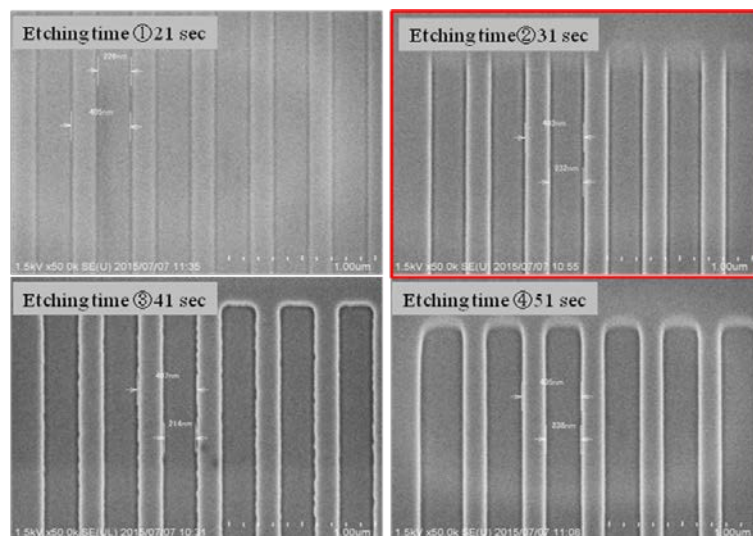


写真 2. エッチング時間の確認 (SEM 観察)

エッチング時間 4 パターンで作製した微細構造を測定した寸法が表 2 である。

表 2. 各々のエッチング時間に対する格子ピッチ、格子幅、格子深さの寸法

エッチング時間		①	②	③	④
格子ピッチ	/nm	405	403	407	405
格子幅	/nm	226	232	214	238
格子深さ	/nm	10.8	26.2	38.3	54.1

表 2 の結果から 20～30 nm の深さに近いエッチング時間は 31 sec であったため、その条件を用いて Si 基板に微細構造を作製した。完成後の金型入れ子ピンは写真 3 であり、Si 基板の微細構造形状を AFM で確認した結果が図 9 である。



写真 3. 金型入れ子ピン

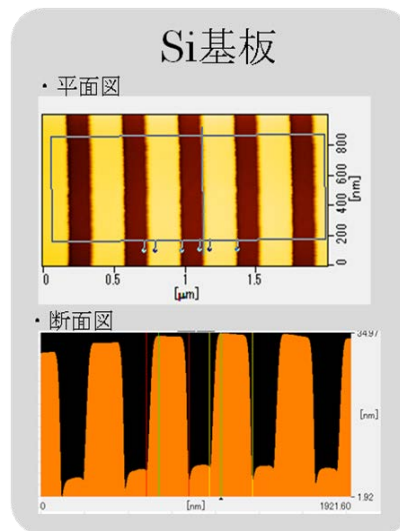


図 9. Si 基板の AFM 画像

AFM 測定により確認した寸法を、以下の表 3 に示した。

表 3. 各々の格子ピッチ、格子幅、格子深さの寸法

項目		規格（目標寸法）	Si 基板
格子ピッチ	/nm	400 ± 40	393 ± 3
格子幅	/nm	（無し）	218 ± 10
格子深さ	/nm	20～30 ±5	26 ± 1

【2】超微細構造の射出成形による精密転写

実施内容【1】で作成した微細構造金型ピンを金型に組み込み、ジュラロン工業所有の超小型卓上射出成形機（型締め力 3 t：右写真）および実施内容【1－3】の金型ピンを用いて成形条件の検討を行ったところ、良好な転写性が得られた。写真 5 に完成した成形品、微細構造チップを、図 10 に成形品の AFM 画像を載せた。



写真 4. 高さ 18 cm 超小型成形機

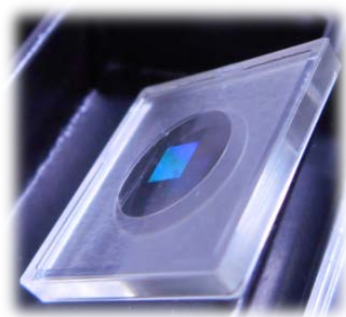


写真 5. 成形品(微細構造チップ)

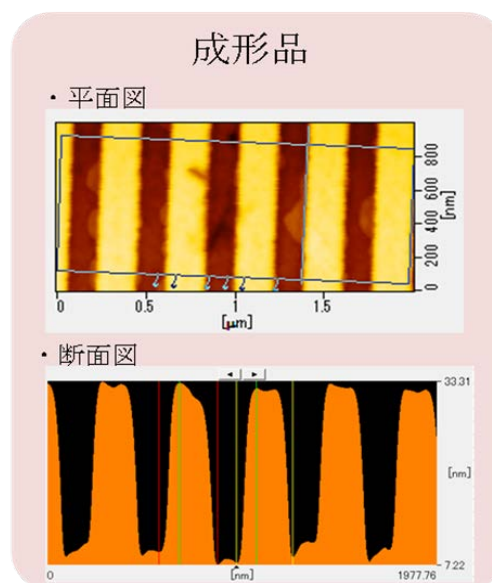


図 10. 成形品の AFM 画像

また、成形品の寸法を規格値との比較を表 4 に示す。

表 4. 各々の格子ピッチ、格子幅、格子深さの寸法

項目	規格（目標寸法）	成形品
格子ピッチ /nm	400 ± 40	387 ± 3
格子幅 /nm	（無し）	215 ± 2
格子深さ /nm	20～30 ±5	24 ± 1

表 4 より精度良く転写されていたことが分かり、後に述べる実施内容【4－1】でのガラス比 100 倍が出る形状であることも確認出来た。

【3】超微細構造透明樹脂への金属膜の成膜

射出成形した微細構造付透明樹脂に、金属膜をスパッタリングで成膜する。ジュラロン工業に導入したスパッタリング装置による成膜試験を行い、良好な膜厚制御精度および良好な（平滑な）表面よりなる金属膜を得ることができたことを下記に示す。

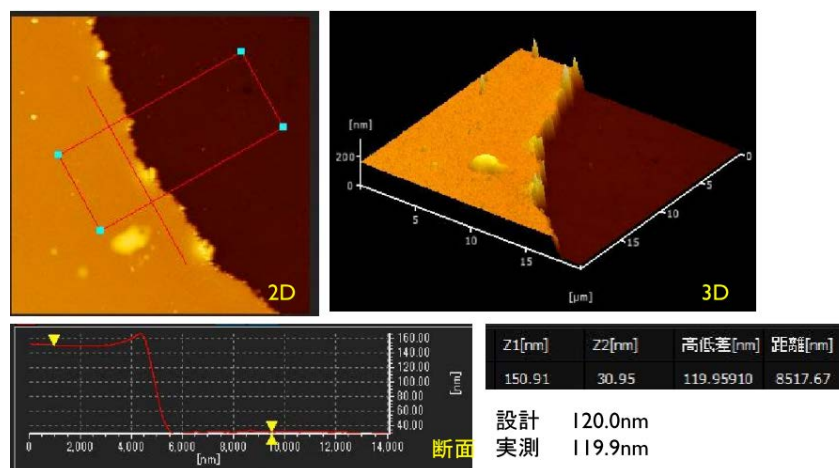


図 11. AFM による膜厚測定結果

図 11 より、Ag 膜厚 120 nm 狙いで 119.9 nm の成膜で仕上げる事ができ、図 12 より、スパッタ面は Ra1~2 nm 程度の良好な表面精度が得られることが確認できた。

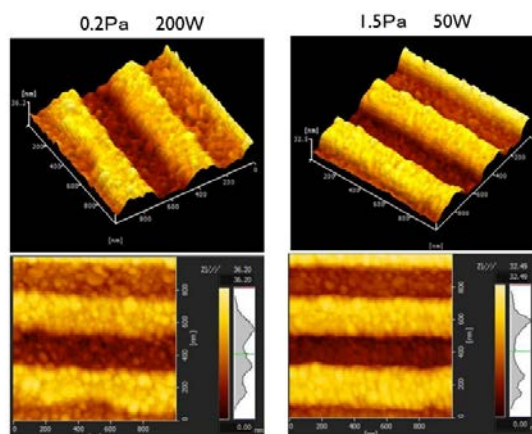


図 12. AFM によるスパッタ面の表面精度 (Ag)

微細構造チップに金属スパッタ成膜をした後の写真と微細構造部の AFM 画像を示す。

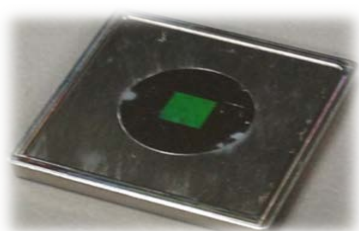


写真 6. (左)スパッタ済み超微細構造チップ

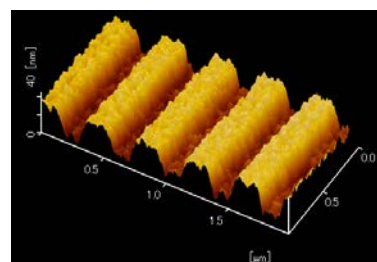


図 13. スパッタ後の成形品の AFM 画像

微細構造部を AFM で確認したところ、凹凸形状がきれいに残っていることも確認ができた。

【4】 バイオセンサー感度の評価、フィードバック

【4-1】 ビオチン-ストレプトアビジン反応での蛍光強度増強評価

ビオチン-ストレプトアビジン反応(Cy5 付き)での蛍光強度増強評価を関学保有の SPF 評価装置を利用して、関学と共同で評価した。

まずは、作成した微細構造チップにて、SPR 強度の測定を行った。SPR は、励起光の入射角度の変化に対して反射率の落ち込みが図 14(左)のように急峻であるほど SPF バイオセンサーチップとして良好な条件で作成されている。

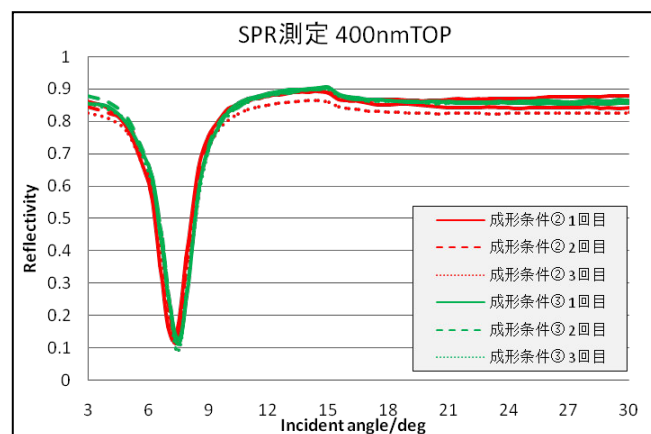
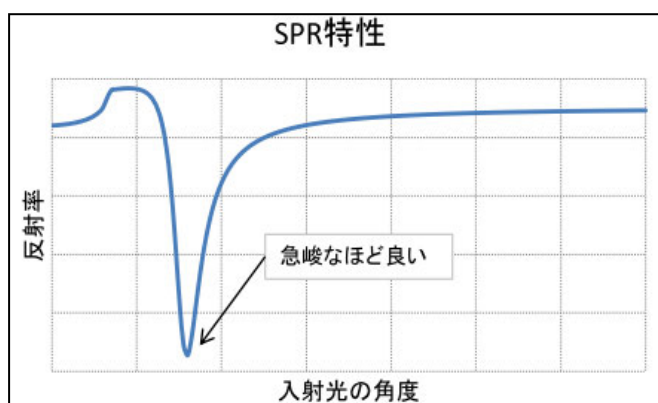


図 14. (左) SPR 特性と (右) 実際の SPR 測定

SPF バイオセンサーチップは、励起光の表面プラズモン共鳴により増強した蛍光が微細構造と再カップリングすることによって発生するプラズモン共鳴で 2 重に蛍光増強されることを利用したバイオセンサーチップである。いかに急峻で強度の高い表面プラズモン共鳴を発生させるかが、バイオセンサーチップの高感度化を左右する。確認したところ、図 14(右)のように急峻な反射率の落ち込みを確認することが出来た。

SPF バイオセンサーの励起光の入射方法は以下の図の方式で行った。

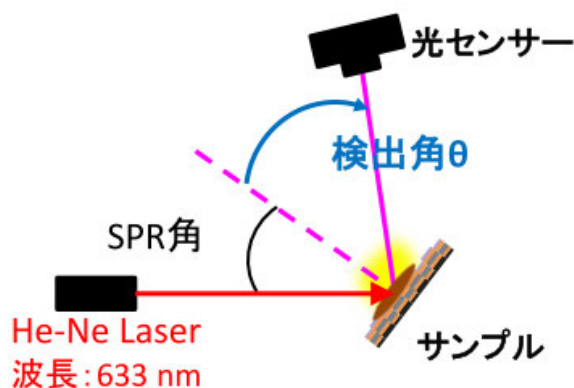


図 15. 蛍光増強法 (SPF 法) による検出方式

SPF 特性では蛍光のピーク強度が高いほど性能が優れていることを示しており、図 16(右)が実際の結果である。

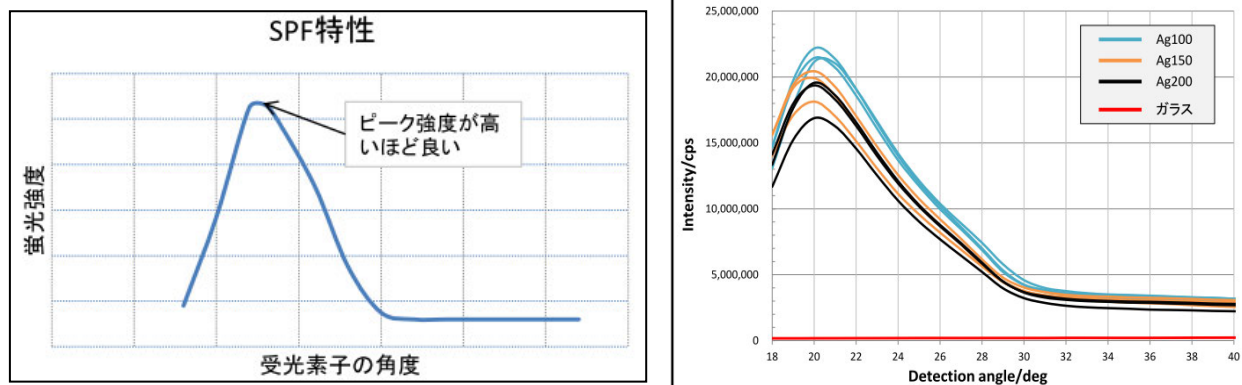


図 16. (左) SPF 特性と (右) 実際の SPF 蛍光強度の測定

図 16 の結果からガラス比との蛍光強度を確認したところ、100 倍以上出ていることが平成 27 年の 9 月時に確認できた。

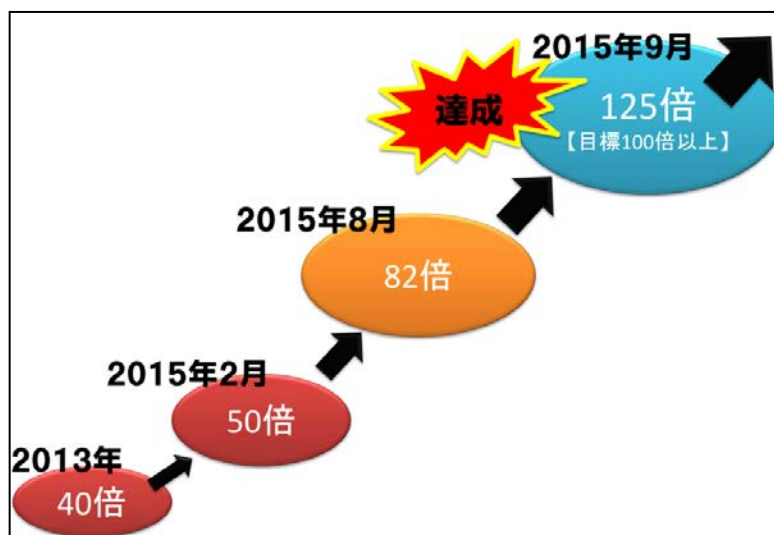


図 17. ガラス比達成状況

これ以降も継続して、ジュラロン工業の微細構造チップがガラス比 100 倍以上であることの確認が取れた。

【4-2】疾患起因物質検出感度の評価

ガラス比 100 倍以上の感度が確認できた微細構造チップを用いて関学保有の評価装置を利用し、IL-6 の抗原が高感度に測定できるかのチップの評価を行った。

実施内容【4-1】のビオチン-スト렙トアビジン反応(Cy5 付き)での手順と IL-6 評価の手順の違いを以下図 18 に示した。

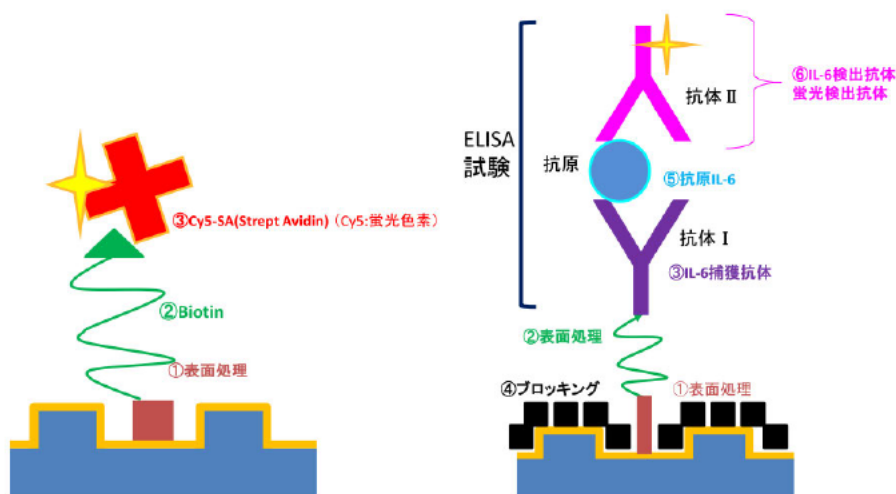


図 18. 評価作業手順 (左)ビオチン-ストレプトアビジンと(右)IL-6

図 18 のようにモデル化合物ビオチン-ストレプトアビジンは①から③の手順で行うのに対し、IL-6 は①～⑥までの操作と倍以上の操作であることが分かる。

IL-6 の③から⑥の部分は実際の ELISA 測定と同じ操作であり、⑤抗原 IL-6 の濃度を低濃度にしていくことで高感度に測定できる微細構造チップが出来ているかの確認を行った。IL-6 の評価を行った結果を図 19(左)に示した。

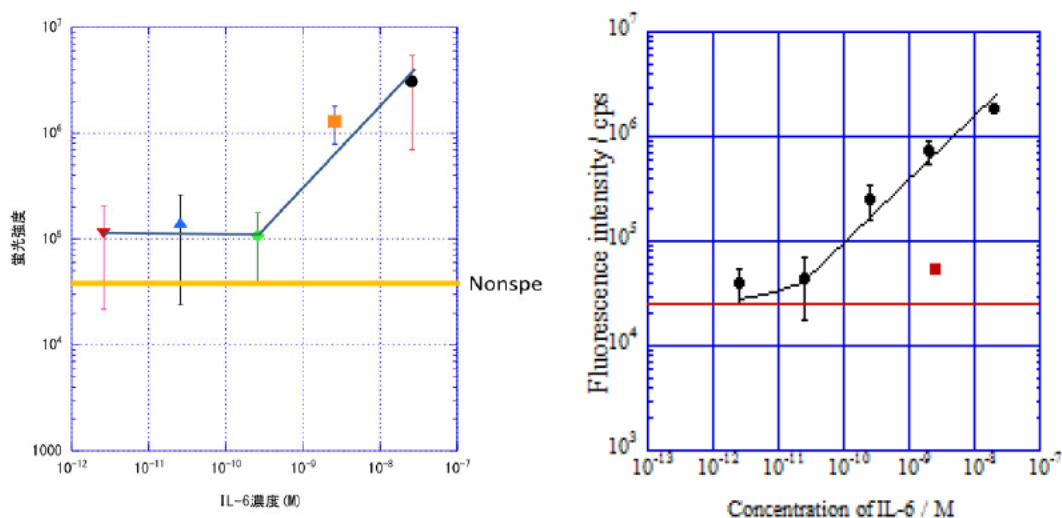


図 19. IL-6 感度比較 (左)ジュラロン工業の微細構造チップと(右)関学の微細構造チップ

※関学チップのデータは Journal of Molecular and Engineering Materials 投稿中

図 19 の結果より、関学のナノインプリント製微細構造チップの IL-6 評価(図 19(右))と比較し、ほぼ同感度のデータが出ていることが分かった。また、東北大学と共に、さらなる高感度・迅速・簡便化を目指して現在研究開発中である。

【5】POCT 装置用チップとしてのマイクロ流路設計

実施内容【4-2】の IL-6 の操作の単純化のため、マイクロ流路の作製を行った。IL-6 のバイオマーカーの評価作業手順を参考に、具体的な流路付きチップの立案、設計と試作を試みた。

【公開版】

バイオマーカーの粘性および流路幅等の形状寸法を決定するために流路設計用小型 NC 加工機を購入した。実際に流路評価用マイクロ流路用チップに様々な流路パターンを加工し、どの形状が最適かを試作・評価しながら、試薬を検出部へ届け、流路付きチップ上での検出蛍光強度の測定が行えるよう取り組んだ。実際にマイクロ流路用チップを射出成形で成形し、小型 NC 加工機で加工したものが写真 7 である。

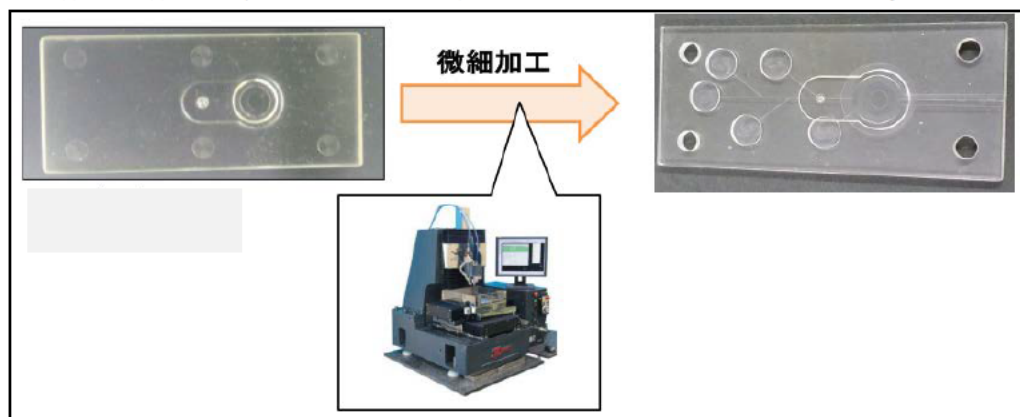


写真 7. マイクロ流路用チップの微細加工

最終的には、高評価の流路が決定し、マイクロ流路用チップの量産が決まれば、流路を金型に加工し、流路を含んだ成形品として量産を行う予定である。また、流速・圧力・濃度検討は必要なため、写真 8 のような外部からチューブで接続し、シリンジポンプで液送試験をすることを試みた。



写真 8. バイオセンサーチップ用液送システム 接続時の様子

実際に流路を加工し、液を流してみたところ、以下の問題点 3 つが出てきた。1 つ目が「逆流」である（写真 9）。

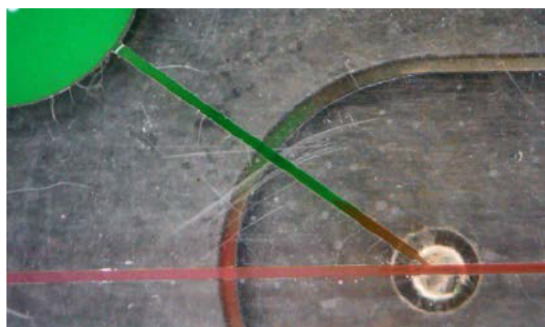


写真 9. 問題点①逆流

本来は、赤の液は左から右に向かうのが、左上の方へ流れているのが分かる。

2つ目が「検出部に液が流れない」ことである（写真 10）。

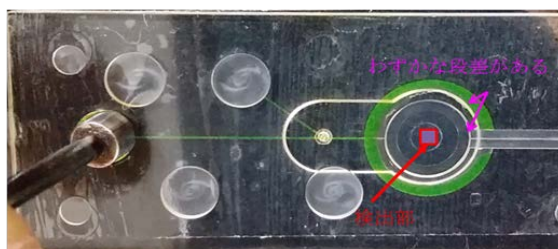


写真 10. 問題点②検出部

写真により、検出部を避け、周りに液が流れているのが分かった。

また、流路用チップと流路の蓋となるシートを大気圧プラズマ処理で貼り付けるため、条件決めた。



写真 11. プラズマ処理条件

条件 1 の場合は剥がれたが、条件 2 では半分しか剥がれなかった。処理条件を詰める必要があることが分かった。

【6】流路一体成形

プラズモニックチップの約 10 倍の大きさのあるプラスチック基板、マイクロ流路用チップでもナノの微細構造の形状が出せるか、成形条件を検討し、チップのナノ形状の AFM 観察および SPR 特性による評価・確認を行った。

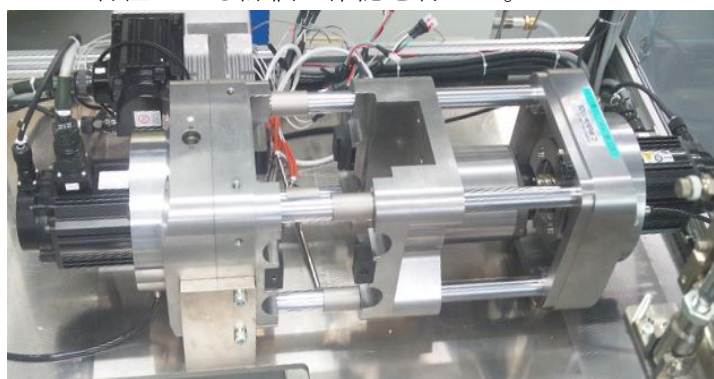


写真 12. 10 t 小型射出成形機

【公開版】

上記写真 12 の 10 t 小型射出成形機でチップの成形を行ったところ、成形条件を検討していく上でバリとショートの問題を解決することが必要だと分かった。

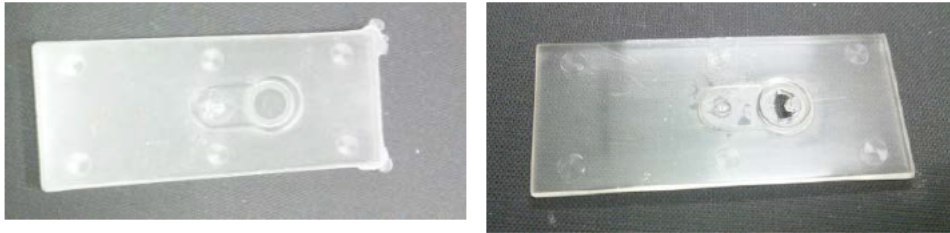


写真 13. (左) バリと(右)ショート

成形条件を検討後、完成したマイクロ流路用チップが以下、写真 14(左)である。比較で微細構造チップの写真写真 14(右)に示した。

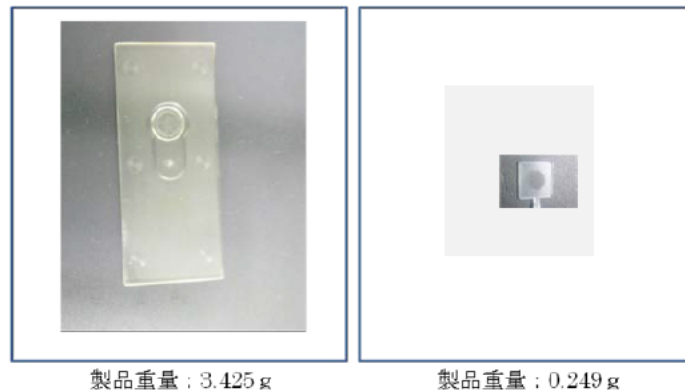


写真 14. (左)マイクロ流路用チップと(右)微細構造チップ

マイクロ流路用チップで一番重要なことが、ナノの微細構造が転写されているかどうかということである。AFM でナノ形状を確認した結果を図 20 に示した。

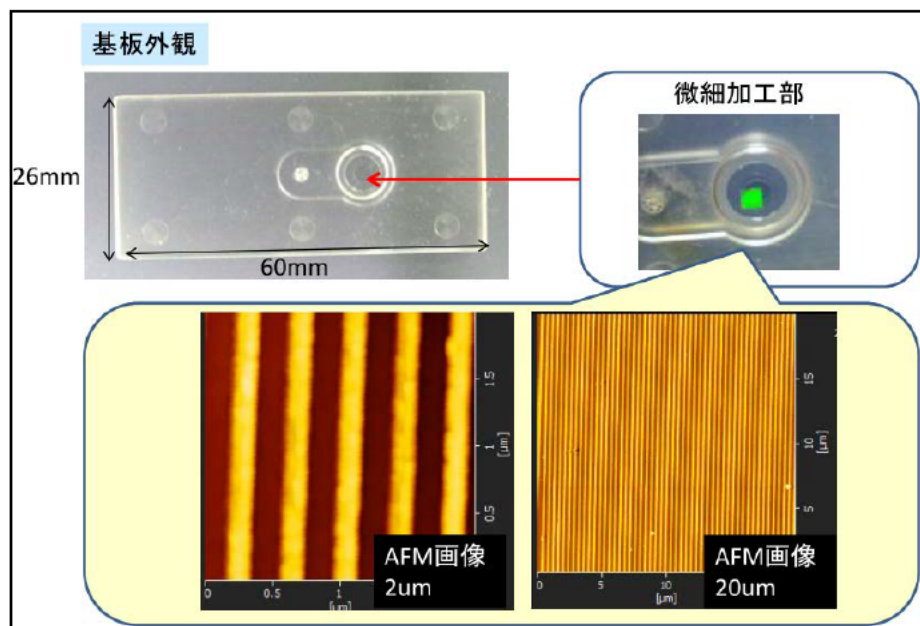


図 20. 微細構造部の AFM 画像

AFM 画像より、 $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ および $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ の両方の範囲で凹凸の超微細構造が出来ていることを確認できた。また、光学特性を確認するために、SPR 測定を行った。

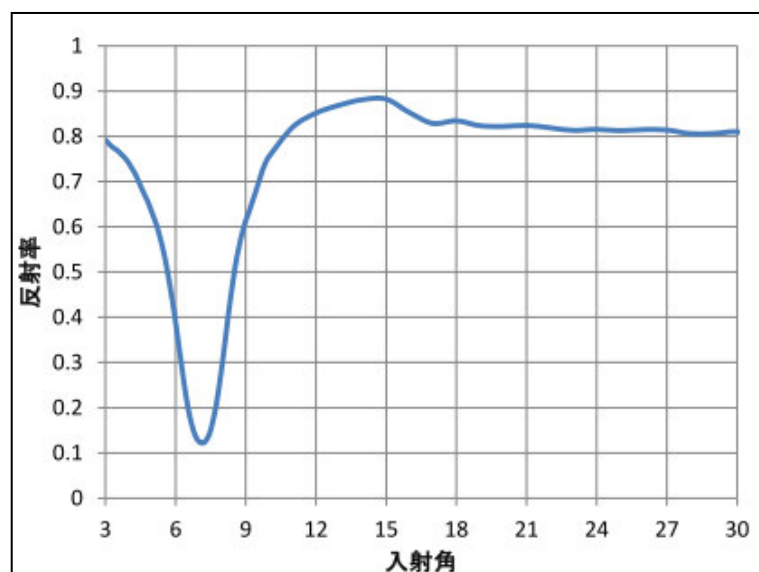


図 21. SPR 測定による光学特性確認

図 21 の結果より、SPR 測定による反射率の落ち込みも確認ができた。
この結果、流路評価用のマイクロ流路用チップは完成した。

【7】評価用検査装置による基礎評価データの構築

POCT 装置に必要と思われる装置部品の確認のために関学の装置を参考にし、プロトタイプ的设计を行い、作製に着手した。

そのプロトタイプ装置を用いて、SPR 共鳴角を確認したところ、図 22 のように確認することが出来た。

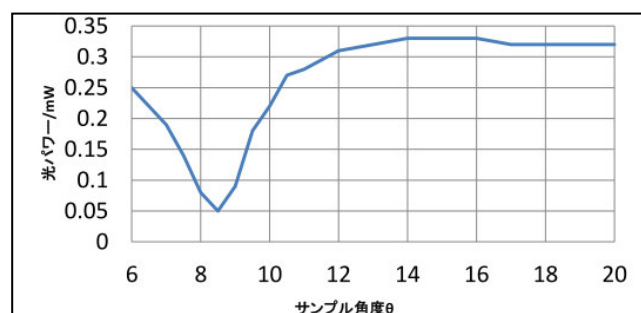


図 22. SPR 共鳴角確認

※本来はレーザー100%に対し反射率を見る必要があるが、今回は未確認である。

この SPR 共鳴角度を用いて、実施内容【4-1】で行ったビオチン-ストレプトアビジン反応(Cy5 付き)での蛍光強度増強評価を行った結果が図 23 である。図 23 に記載している 100 nM、10 nM、1 nM、100 pM、10 pM はストレプトアビジン (Cy5 付き)の濃度である。また、図 23(左)で 10 nM より低濃度でのスペクトルが確認出来ないため、100 nM を除いたグラフを図 25(右)に示した。

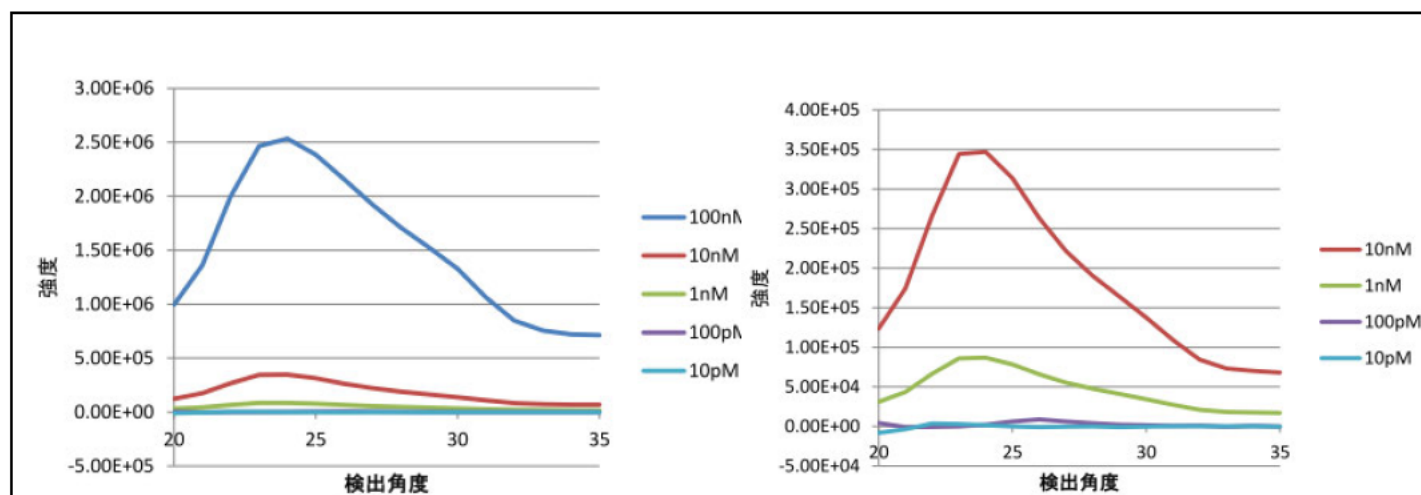


図 23. SPF による蛍光強度確認 (左)濃度：100 nM～10 pM と(右)濃度：10 nM～10 pM

図 23 の結果より、ストレプトアビジン (Cy5 付き)の濃度 1 nM までは測定することが出来た。感度向上に向けてこれからも取り組んでいく。

【8】販路開拓と POCT 装置の開発

実施内容【7】で構築した基礎データの評価結果の下、POCT 装置の小型化への開発内容を決定した。また販路開拓（川下展開）として、医療ニーズの調査を現在も行っている。

また実際の POCT 装置の小型化の目安として、写真 15 ぐらいの大きさを目安としている。縦 20.7 cm×横 18.6 cm×高さ 8.0cm の大きさの箱である。この箱内に全ての部品が収まるほどの小型装置を目指す。



写真 15. 白葛箱（しらかずらのはこ）

※奈良の正倉院の貴重な宝物の一つ

第3章 全体総括

3-1 研究開発成果

本事業は透明樹脂に超微細加工を行うことによって実現する革新的、低コスト・高感度SPFバイオセンサーチップおよび検査機の研究開発を行うものである。

本事業の要である超精密射出成形用金型の製作方法は京都大学ナノハブ拠点の装置を使用することで、目的の寸法を持ったナノ格子入子ピンを作成することができ、その入子ピンを用いて格子ピッチ $400\text{ nm} \pm 10\%$ の精密転写射出成形法を確立した。

また、本事業の特長である高感度検査を実現する為、回折格子形状の設計通りの製作および形状確認（原子間力顕微鏡(AFM)によるナノ形状の測定等）に注力し、微細構造チップを用いてSPF測定を行って表面プラズモン増強効果を確認した。その結果、モデル反応であるビオチン-ストレプトアビジン反応(Cy5付き)で、数値目標であったガラス板対比100倍超の蛍光増強強度を達成した。

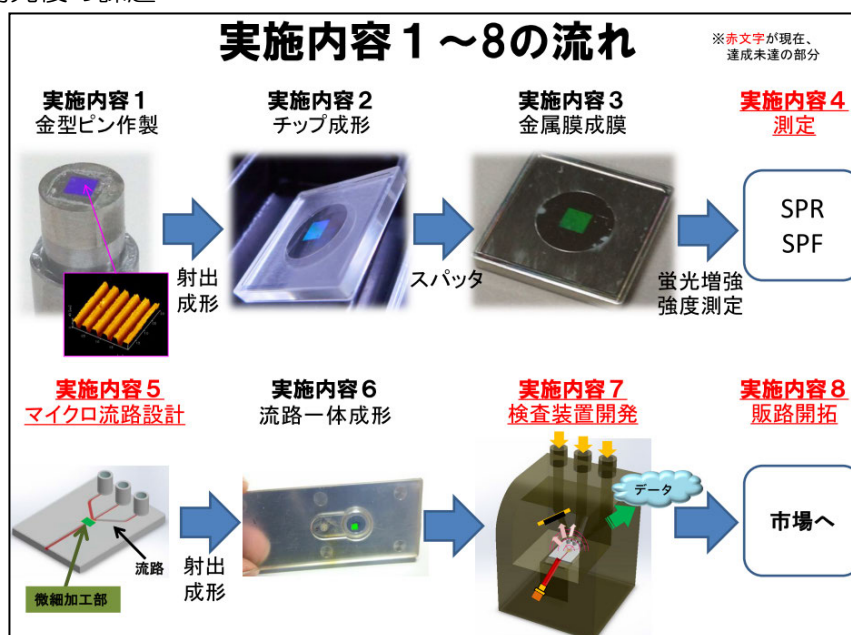
さらにガラス板対比100倍超の蛍光増強強度が出た微細構造チップを用いて、実際の抗原抗体反応IL-6を使用して感度を確認したところ、関学のナノインプリント製微細構造チップと同等の感度を得ることが出来たため、新開発バイオセンサーチップの微細構造部は完成した。

次にマイクロ流路用チップに関して、微細加工チップよりも体積が大きい、微細構造部が出来ていることを確認することが出来た。チップ内容に関しては、ELISA試薬をより簡単に検出部に届けるための設計立案はできた。

検査装置に関して、設計はでき、期間外ではあるが、プロトタイプ装置開発の着手を行ない、ガラス板対比100倍超の蛍光増強強度が出た微細構造チップを用いて、ビオチン-ストレプトアビジン反応(Cy5付き)でどれくらいの感度が出るか確認したところ、濃度1 nMまでは測定することが出来た。

3-2 研究開発後の課題・事業化展開

(1) 研究開発後の課題



上記図の実施内容【1】～【8】での課題を赤字で示した。

課題に関して、以下の表にまとめた。

研究開発実施内容	課題
【４】 バイオセンサー感度の評価、フィードバック	本事業成形サンプルにてビオチン・ストレプトアビジン反応でガラス板対比 100 倍超感度を達成し、さらには IL-6 での高感度測定も可能にしたが、さらなる迅速・高感度化部分が未だ未達のため、東北大と共に今後も研究開発を行っていく。
【５】 POCT 装置用チップとしてのマイクロ流路設計	マイクロ流路の設計各種・試作方法を立案、決定した。実際に流路を切削加工し評価したところ課題は 3 点が挙げられた。 1. 逆流 2. 検出部 3. マイクロ流路用チップの蓋 引き続き、上記 3 点の課題解決に対し、今後も取り組んでいく。
【７】 評価用検査装置による基礎評価データの構築	評価用検査装置の基本設計を完了し、プロトタイプ機の製作に着手したが、ビオチン・ストレプトアビジン反応(Cy5 付き)で濃度 1 nM 以上の感度が出るよう今後も改良・取り組んでいく。
【８】 販路開拓と POCT 装置の開発	POCT 装置の小型化に向けて必要になりそうな新たな方式を考案している。これに関し、法定期間内での設計仕上げに向けて開発を行っていく予定である(プロトタイプの開発)。 また販路開拓(川下展開)の調査も行っており、医療ニーズへ貢献するために、適した製品開発を行っていく。

(2) 事業化展開

近年、少子高齢化等の社会変化および健康長寿社会の実現のための医療技術等の進展に伴い、医療費の増大が顕著でありこの対応策が強く求められている。一方、医学の進歩により疾病に起因するバイオマーカーの発見がなされ、診断や治療への応用が可能となっており、各種検査設備での疾病の診断検査に利用されている。

早期かつ正確な病疾診断の為にその必要性はますます増大している。

しかしこのような検査はその試薬が高価でありかつ検査手順が煩雑、あるいは大型の装置が必要な為専門の検査所にサンプルを集めて専門の検査員が行わなければならない等の困難があり、検査コストが高く、日数が掛かるという問題点がある。このような検査を街中の診療所あるいは薬局、家庭等で迅速、安価、確実にこなすニーズは高いと予想される。実際、労働厚労省は 2015 年にも従来、医師の処方箋が必要であった排卵日検査薬、尿路結石や大腸がんを調べる検査薬を処方なしで個人が買えるように規制緩和する意向である(日本経済新聞、2014. 6. 1 付)。このような動きが今後も進展することが予想され、医療用検査薬の市場の拡大が見込まれる。

ジュラロン工業(株)は、光学部品の生産で培った超精密成形技術およびプラスチックの射出成形による量産技術をこれらの医療分野に活用すれば上記社会的ニーズに応じることができる考えた。

(1)で述べた課題を解決した後、事業化に向けて現在 2 点の医療ニーズを発見している。その 2 つの医療ニーズへ貢献するために国立大学医学部の教授と共に開発を行っていく。