

【SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy:表面増強ラマン分光)】と センサーネットワーク技術の協奏による新規事業創出

生命と環境の安全・安心をめざして

ナノフォトンクス・ラボラトリー株式会社
事業概況要約書

NPL 代表取締役、IPB 取締役 Chief Science Officer 川口伸明

2007. 6. 7

21世紀は、第4次産業の時代	2
「SERS技術を応用した高感度センサー開発に関する国際フォーラム」 2006年8月25日	3
「SERS技術の最新動向に関する国際フォーラム」 2007年3月7日	4
1-1. NPLの事業目的	5
1-2. SERSとは:分子の構造や運動状態をナノ光学的に知る方法	6
1-3. SERS技術が求められる背景	7
1-4. SERS技術の産業化	8
2-1. SERSで何が分かるか:類似した分子構造の識別の実例	9
2-2. 性能比較1: Mesophotonics 社のSERS基板との比較	10
2-3. 性能比較2: Renishaw 社のSERS基板との比較	11
2-4. 性能比較3: Intel 社のSERS基板との比較	12
3-1. NPLがめざすもの:パームトップ(掌のり)サイズ 環境センサーの開発	13
3-2. SERS関連事業のイメージ	14
3-3. SERSが関連する測定・分析機器の市場	15
3-4. SERSが検出できる検体の例:多環芳香族	16
3-5. 広がる応用例:「SERSによるウイルス検知」	17
3-6. 広がる応用例:「ラマン散乱光で、生きた細胞を3次元観察」	18
4-1. ポポニン特許の現在ステータス	19
4-2. Prof. Richard Mathies (カリフォルニア大学バークリー校教授)による見解	20
5-1. プロトタイプ開発の要件	21
5-2. ポポニン基板を用いたマイクロ流体チップ(Generic LAI-SERS chip platform)	22
5-3. ロードマップ俯瞰	23
6-1. 研究協力者1: BioPOEM/BioPOETs の権威、Luke P. Lee	24
6-2. 研究協力者2:ゲノム解析法の最高峰、Prof. Richard Mathies	25
6-3. 研究協力者3: ナノテクの先駆的開拓者、Prof. James Gimzewski	26

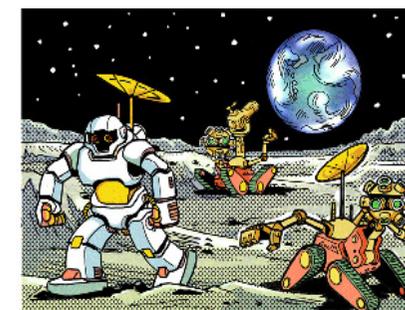
21世紀は、第4次産業の時代である。

第1次(農業)、第2次(工業)、第3次(商業)は
企業や個人などが単独で買うことができるものだった。

第4次産業とは、企業や個人単独では決して買えないもの。
それは、生命と環境の安全・安心を守る産業である。



食の安全



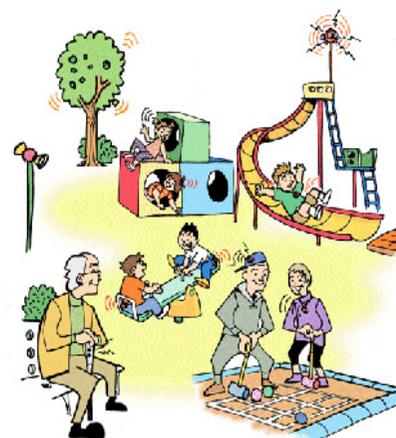
地球外生命・資源探査



環境モニタリング



医療センシング



安全安心センサーネットワーク



防災、災害・テロ対策

イラストは、首相官邸ウェブサイト「イラストで見る20のイノベーション代表例」から転載
<http://www.kantei.go.jp/jp/innovation/chukan/20daihyourei.html>



写真左 9.11テロの時に駐米大使だった柳井俊二・国土安全対策委員会委員・三菱電機(株)社外取締役も駆けつけ、対テロの国内外の動きや地雷除去への取り組みを熱心に訴えた。

主催:財団法人未来工学研究所
協賛:株式会社アイ・ピー・ビー、ナノフォトニクス・ラボラトリー株式会社
後援:経済産業省・文部科学省・国土交通省・厚生労働省・日本経済新聞社
日時:平成18年8月25日(金) 会場:パン・パシフィックホテル(横浜)

講演者

尾崎幸洋

マーティン・モスコヴィッツ

ウラジミール・ポポニン

リチャード・マティウス

瀬戸康雄

室長

福井萬壽夫

原口雅宣

関西学院大学 理工学部長

カリフォルニア大学 サンタバーバラ校 教授

ナノフォトニクス・バイオサイエンス社 CEO

カリフォルニア大学 バークリー校 教授

警察庁科学警察研究所 法科学第三部 化学第四研究

徳島大学 教授

徳島大学 助教授



超高感度センサの土台となるSERS(サーズ:表面増強ラマン分光法)と呼ばれる基礎技術は認知度が低く、これまで表舞台に出てくることはなかった。今回、フォーラム第1部では、国内外より7名の第一線の研究者を招き、SERSの歴史に始まり、原理と基礎技術の現状、今後の技術開発の方向性の報告、最後に科学警察研究所でのバイオテロ対策センシングの現状と将来展望の披露と言う贅沢な企画が初めて実現した。第2部リセプションでは、IPB技術アナリストによるSERSならびにプラズモン共鳴関連特許1000件の関連性構造分析などの定量的分析の数々が披露され、議論も熱く盛り上がった。





主催：財団法人未来工学研究所
協賛：株式会社アイ・ピー・ビー、ナノフォトニクス・ラボラトリー株式会社
後援：経済産業省・文部科学省・国土交通省・厚生労働省・日本経済新聞社
日時：平成19年3月7日(水) 会場：東海大学校友会館(霞ヶ関ビル33F)

講演者

尾崎幸洋

マーティン・モスコヴィッツ

ウラジミール・ポポニン

リチャード・マティウス

石川 満(みつる)

山田 淳(すなお)

関西学院大学 理工学部長

カリフォルニア大学 サンタバーバラ校 教授

ナノフォトニクス・バイオサイエンス社 CEO

カリフォルニア大学 バークリー校 教授

産業技術総合研究所 四国センター健康工学センター

九州大学 大学院工学研究院 教授

来賓

アラン・ルドクイスト

米国環境保護庁(EPA) 米国大使館 訪問研究員



3月7日、霞ヶ関ビル33Fにて、昨年8月に続き、第2回SERS国際フォーラムが開催され、一時は座席が足りないほどの大盛況を収めた。IPBが2004年から支援してきたポポニン博士の1分子同定の最新データに注目が集まった。アーミテージレポートを受けて緊急招集された内閣府国土安全対策委員会でもこの話題は取り上げられ、米国大使館からも本フォーラムに米国環境保護庁研究員が駆けつけたほどである。

第2部リセプションでは、IPB技術アナリストによるSERSならびにプラズモン共鳴関連特許1000件の関連性構造分析やインテル社を例にとつたのアライアンス分析などの定量的分析の数々が披露され、議論も熱く盛り上がった。

- ナノフォトンクス・ラボラトリー株式会社(NPL)の設立目的は、生命・環境の安全・安心を守る技術として、ナノ光学(Nano Photonics)およびバイオメディカル領域の知的財産を事業化することにある。
- その第一歩として、ロシア科学アカデミー出身で現在米国に住むウラジミール・ポポニン(Vladimir Poponin)博士のSERS(表面増強ラマン分光)技術を利用した高感度センサー開発を目指している。



Vladimir Poponin, Ph.D.
(ウラジミール・ポポニン博士)

【略歴】

- 1972 サンクトペテルスブルグ大学卒(量子力学専攻)
- 1973-79 Lebedev Physics Institute*1にて、Nikolai Basov教授*2に師事、高出力ガスレーザーの開発に携わる
- 1980 ロシア科学アカデミーより博士号(プラズマとレーザーの化学物理特性)
- 1983-1989 生物システムにおける微弱電磁場の発見
- 1989-1992 低周波数DNA振動の発見
- 1990-1993 Lebedev Physics Institute
シニアサイエンティスト/グループリーダー(生物分子光学)
- 1993-1996 Semenov's Institute of Chemical Physics*3 シニアサイエンティスト
- 1996-1998 Semenov's Institute of Chemical Physics 主席サイエンティスト
- 1997-現在 IFSO*4 創設代表、米国在住

*1: ロシア最高権威で最も多くのノーベル物理学者を輩出する

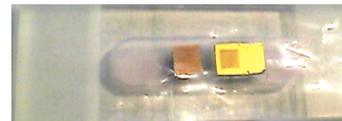
*2: レーザーの発明者でノーベル賞受賞

*3: Lebedev に次ぐロシア第2の研究所。
ノーベル化学賞を受賞したNikolay Semenovにより設立された

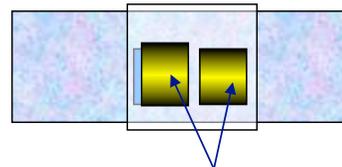
*4: International Frontier Science Organization



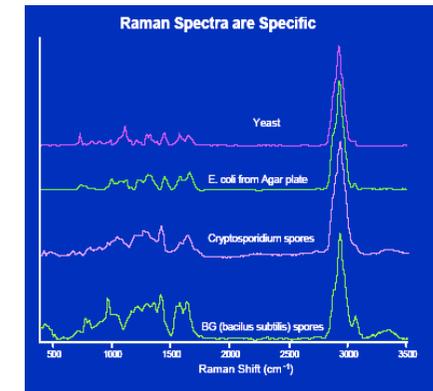
Renishaw 2000 Confocal Raman Microprobe (共焦点ラマン顕微鏡)



Glass cover slip



SERS 基板(貴金属ナノ粒子で被覆)
この上に調べたい検体を載せ、測定



分子特異的なシグナル検出により、
極微量物質を検出できる

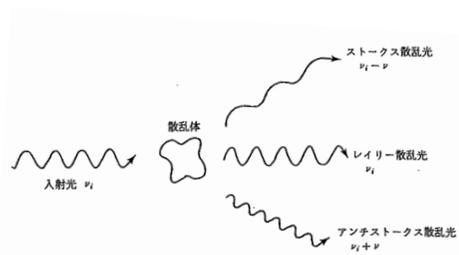
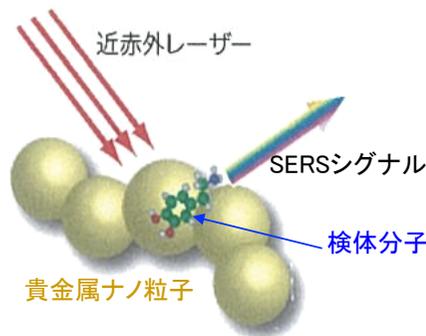


図1.3.1 レイリー散乱とラマン散乱

- SERS(Surface-Enhanced Raman Scattering 表面増強ラマン散乱)とは、金属ナノ構造体に吸着した分子からのラマン散乱光が何億倍にも増強される現象。
- その基礎となった「ラマン散乱」は、アジア人初のノーベル賞受賞者インドの物理学者 C. V. Raman博士が1928年に発見したもの。ある波長の光を分子に当てると、同じ波長の散乱光(レーリ散乱)とは別に、入射光と異なる波長の散乱が見られ、これをラマン散乱と呼ぶ。ラマン散乱光のスペクトルから分子構造など重要な情報が得られるが、その信号は不安定で、強度が微弱なために十分活用されてこなかった。
- これを解決するのがSERS技術で、金や銀など貴金属ナノ粒子で覆われたSERS基板(ガラスやシリコン性の平板で顕微鏡におけるスライドガラスに相当)上に検体を載せて測定する。基板上でナノ粒子と接触した検体のラマン散乱が著しく増強される(SERSシグナル)。
中でも、IPB・NPLが支援してきた在米ロシア人科学者Vladimir Poponin博士の技術が秀逸な増強効果を示している。ポポニン技術のコアはSERS基板の独自の製法にある。

- ダイオキシンや残留農薬などの環境汚染物質、ウイルスなどの病原体、さらには生物化学兵器(バイオテロ)など、様々な極微量の危険物質による脅威から身を守り、安全安心な生活を実現するために、日本でも生物化学的センシング技術とITの融合技術が広く求められる。

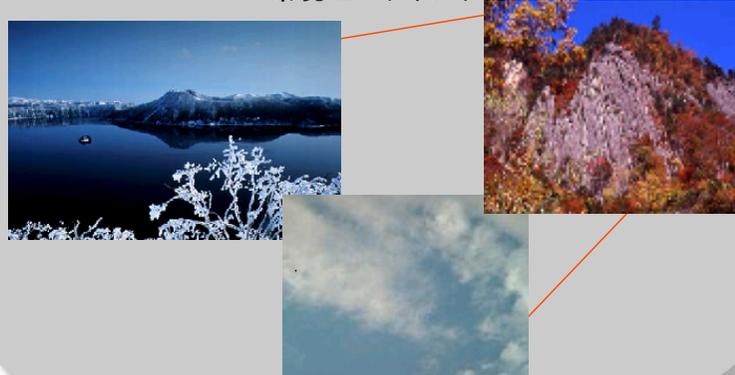
バイオテロ対策



生体分析・食品トレーサビリティ

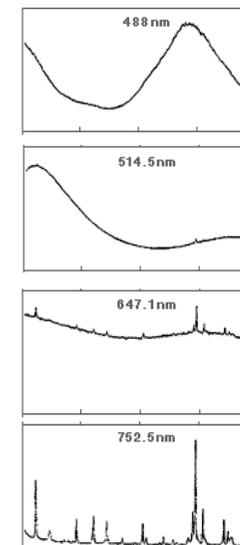


環境モニタリング



ラマンライブラリー
DB

データマイニングによる
生物化学物質の
識別・同定・構造解析



SERS技術は、ナノテク応用技術の一環としてバイオテクノロジーその他の研究成果との融合により、新産業領域創出に貢献する可能性を有する。

ラマン分光法の特徴

- ・有機分子の構造に関する情報を与える
- ・真空や強磁場を要する質量分析、核磁気共鳴に比べると装置が安価でかつ光通信技術、光記録技術の応用により小型化、量産化が可能である
- ・試料のラベリングが不要な故、簡便である上に、未結合ラベルからのノイズがない。
- ・ラマン分光法の最大の欠点であった低感度という点がSERSにより克服されつつある
- ・ナノサイズの物質の同定、定量、構造解析はナノテクの重要な技術の一つであり、ナノテクの発展とSERSの進歩は相補的關係にある。
- ・近接場法、TERS法 (Tip-Enhanced Raman Scattering) の発展により、数十ナノの高い空間分解能が得られつつある。高分解イメージングも可能。

SERS技術の期待される応用展開領域

環境・エネルギー分野

→ 広域環境モニタリング
家庭内環境モニタリング

ナノテク材料分野

→ ナノテク材料の同定、構造解析、定量分析、モニタリング

セキュリティ分野

→ テロ発生現場(一次対応者使用)の測定
空港等重要施設の監視

医療(検査)分野

→ 家庭内医療(日常検査)
院内感染対策
ウイルスモニタリングによる感染症流行の監視

バイオ産業

→ 高速DNAシーケンス測定
プロテオミクス

農業・水産分野

→ 土中残留農薬検査
農作物中の残留農薬検査
水産資源中の有害物質検査

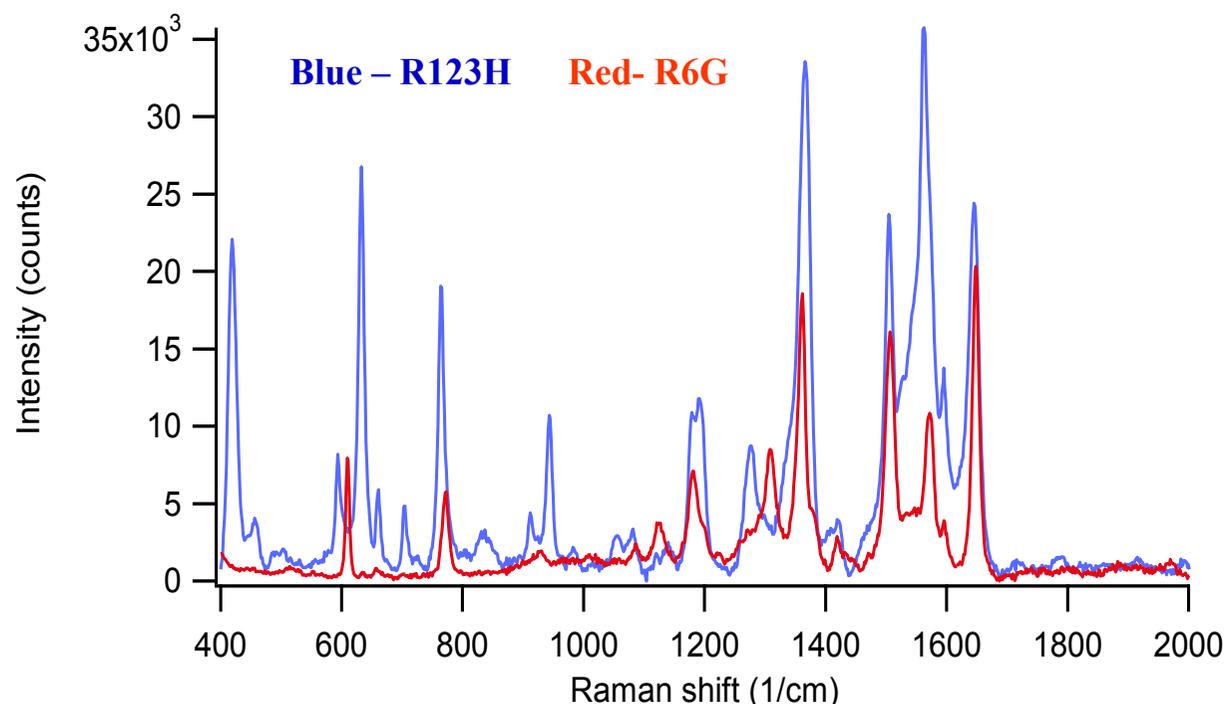
その他の分野

(太陽光発電)

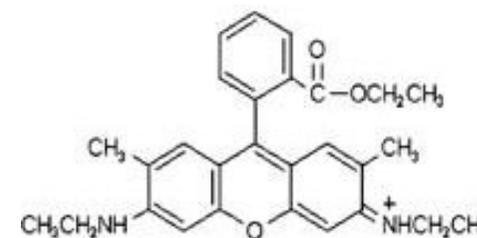
2-1. SERSで何が分かるか： 類似した分子構造の識別の実例

関係者外秘

- 環境ホルモンとしても注目される色素ローダミン類はよく似た化学構造の多くの分子種を含む。R6GとR123H、2種類のローダミン分子をポポニン基板を用いたSERSで比較した結果、両者に共通するシグナルと、一方のみに特異的なシグナルとが検出された。このことは、類似化合物の識別可能性を示すものであり、極微量の毒物や病原微生物の検出などへの応用に期待が持てる。



Rhodamine 6 G



Rhodamine 123 hydrate

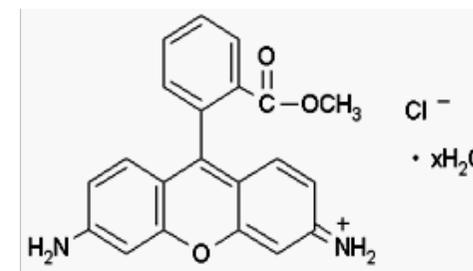
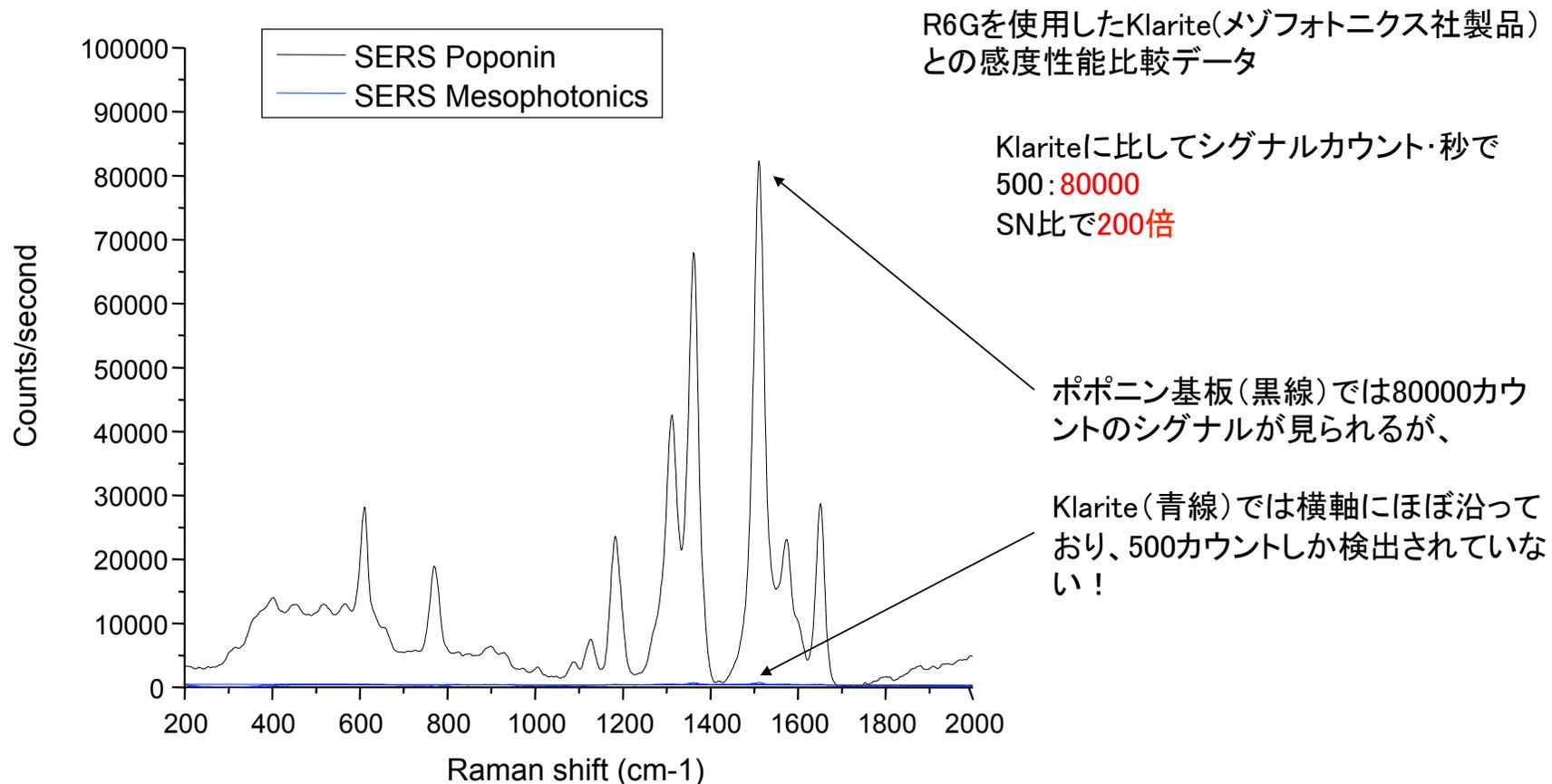


Figure 1. Rhodamine 6 G (R6G) versus Rhodamine 123 hydrate (R123H)
Sample : 1 microMole/L, in fluidic cell, Renishaw 1000
Recording conditions: 514.5 nm , 8 microWatt, 10 sec collection time, 1 accumulation
Several lines 761 1192, 1368, 1572 1645 are very close together in both R6G and R123H.
However R123H lines: 419, and 632 and 946 are distinctly different and therefore
one can discriminate between R6G and R123H using SERS spectra.

- ポポニン博士のSERS基板は、世界で最もよく使われている Mesophotonics 社製基板 (Klarite) よりも遙かに高い感度を示した。



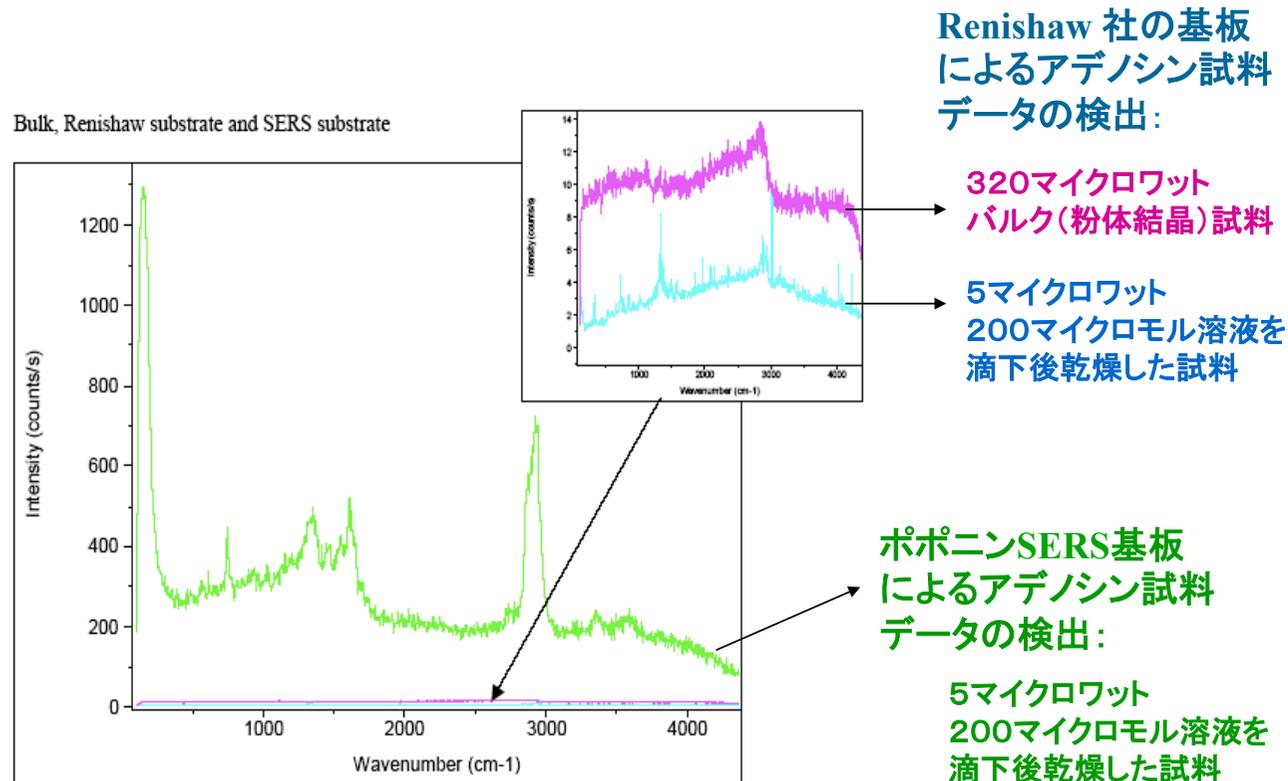
レーザー: 633 nm (DeltaNu社製コンパクトラマン分光器)

パワー: 2m Watt >メゾフォトニクス社の基板データは下段青のライン、ポポニン基板データは上段黒のライン

アキュムレーションタイム: 1秒

検体: ローダミン6G (R6G) 10⁻⁶M/L (100マイクロ・モラー)希釈溶液

- ラマン業界の老舗、Renishaw 社の基板に対し、ポポニン基板では、同じサンプル濃度、同じレーザー出力(5マイクロワット)で、遥かに強いシグナルが観測された。



レーザー: 514.5 nm

パワー: 5 Micro Watt > 緑(ポポニン基板)・青(Renishaw社基板)のライン

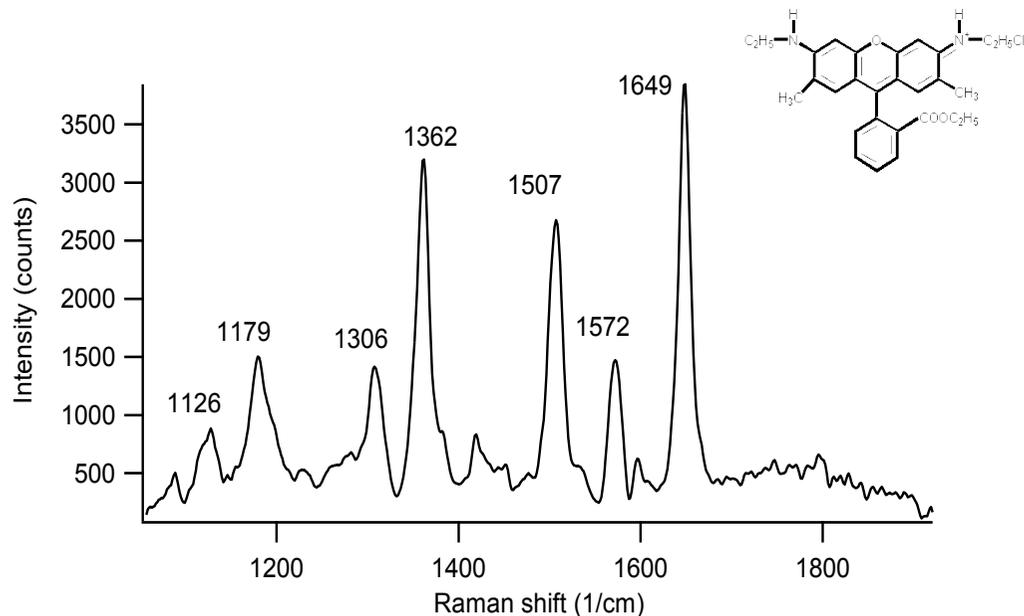
パワー: 320 Micro Watt > 赤(Renishaw社基板)のライン

インテグレーションタイム 1秒・10アキュミレーション

検体: 基板にアデノシン200マイクロモル溶液を滴下後乾燥した。

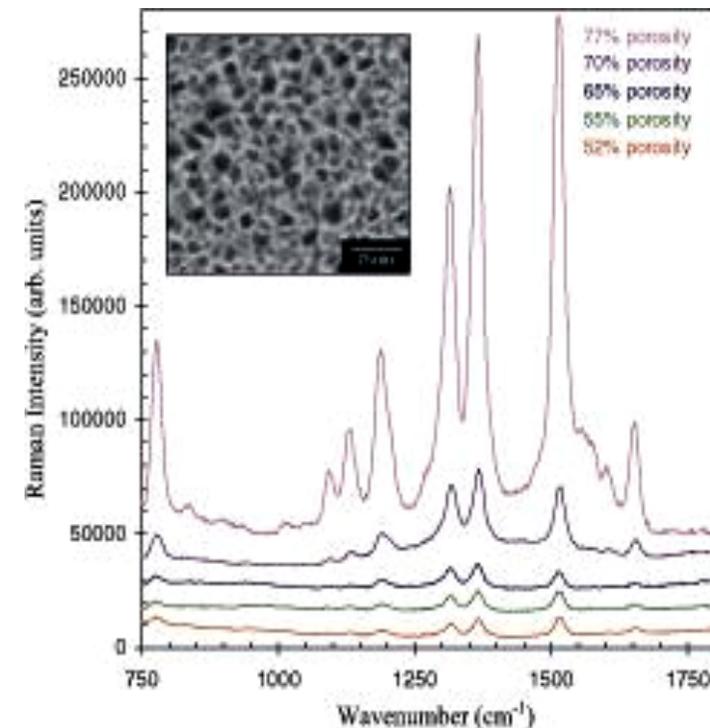
- ポポニン基板は、80マイクロワットでは、検体濃度比で Intel 社基板の114倍の検出感度を示した。レーザー出力比 7500倍と合わせると、Intel 社の100万倍程度の感度増強が見込まれる。

ポポニンSERS基板 による ローダミン6G スペクトルの検出:



Sample : R6G **1 microMole/L**, in fluidic cell 1.5 mm dip, 0.8 mm thick glass slides
Recording conditions:
80 microWatts, 514.5 nm, 0.5 second, 1 accumulation,
confocal lens objective 50x/0.5
Instrument: Renishaw 1000

Intel 社のSERS基板 による ローダミン6G スペクトルの検出:



Sample: R6G **114 microMole/L**, Laser 785 nm (NIR), **600 milliwatts** illuminating power, sampling time 0.5 second ,
Intel data (Chan, S. et al. , 2003)

3-1. NPLがめざすもの： パームトップ(掌のり)環境センサーの開発

関係者外秘



現在主流の「卓上型」ラマン分光装置



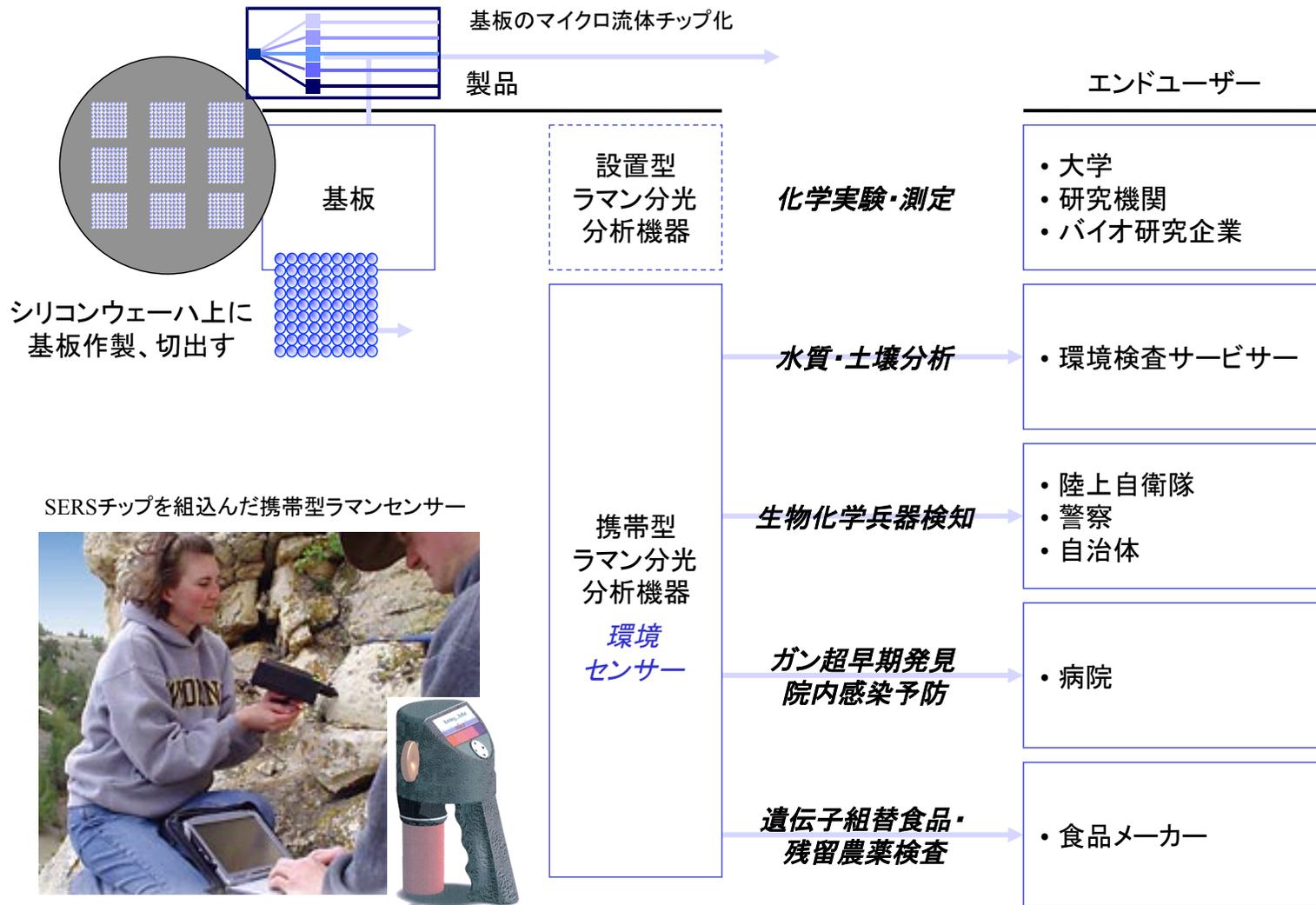
ハンドグリップ型
(完成予想図)

SERSチップとラマン分光測定器を一体化したシステム。
左のように直接、検体に触れてサンプリングし、チップ内に導入し、適当な濃度に希釈して測定を行う。
その場でPCと繋いでデータ解析することも出来るが、データのみを取得して記憶媒体に蓄積したり、データを無線インターネットでデータ処理センターに飛ばしたりも可能、

- ポポニン基板では、検体に照射するレーザーを、次世代無線通信技術に使用されるCMOSチップの待受状態¹⁾よりも低い出力(10マイクロワット以下)での高速シグナル検出を可能とした。低出力のラマン分光装置ならば、携帯(handheld)サイズ、さらには掌サイズ(palmtop)までの小型軽量化が可能。
1) インテルが取り組んでいる超広帯域通信環境(UWB)用の次世代CMOSチップの電力消費量。現在開発中のものが待受状態15マイクロワット、送受信状態150マイクロワット。
- チップ化したポポニン基板を、既に製品化²⁾されている小型ラマン分光測定器と組合せることにより、携帯型環境センサーのプロトタイプを作る。
2) 現行製品では検出対象や感度に限界があるが、超高感度のポポニン基板チップを用いることで、バイオテロや院内感染などの検出に使えるような超高感度センサーに進化させることが可能。文字通りの携帯電話サイズまで更なる小型化の可能性もある。

基板の売り方には、

- ①設置型ラマン分光分析機器における従来基板からの代替
 - ②携帯型ラマン分光分析機器(環境センサー)への搭載
- という大きく2通りあり、それぞれに異なるユーザーが存在する。



小型卓上型ラマン装置

SERSチップを組込んだ携帯型ラマンセンサー



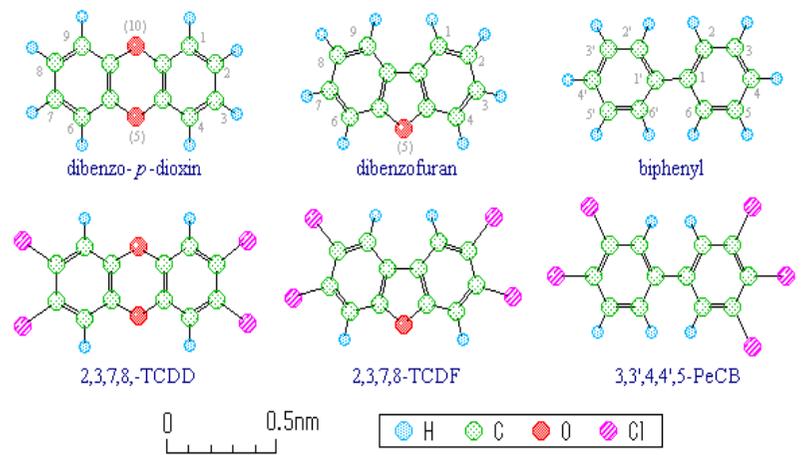
- SERSの応用が最も期待される主な市場は、SERSにより機器の精度の向上が望める測定・分析機器の市場であると思われる。特に、EU(欧州連合)では、2006年7月から特定化学物質使用規制(RoHS指令)が始まっており、電気電子機器への6種類の特定有害物質(鉛、カドニウム、6価クロム、水銀、ポリブロモビフェニル、ポリブロモジフェニルエーテル)の含有が禁止されている。
- 2007年3月1日には、中国版RoHSも始まっており、EUでは、RoHSをさらに厳格化したREACH規制(数万の化学物質が対象)が2007年6月から施行される予定である。我が国では、経済産業省が中心となって、世界各国で強化される化学物質規制に適合する制度体系が導入される予定である¹⁾。
- これらの法規制強化を追い風として、測定・分析機器の分野では、有害化学物質の使用実態把握および管理に不可欠な分析機器に対する需要が高まっている。現時点で、国内の有害化学物質測定・分析機器の市場規模は1000億円(公害用機器約200億円、その他約800億円(X線装置、質量分析装置、ガスクロマトグラフ(GC)、高速液体クロマトグラフ(HPLC)等))程度であると考えられている¹⁾。現在は、有害化学物質の測定・分析機器の主役は、蛍光X線分析装置であり、2005年以降需要が急拡大しており、例えば、エスアイアイ・ナノテクノロジー社は、有害物質分析に特化したSEA1000A(680万円)という蛍光X線分析装置を2006年度に1000台以上出荷している²⁾。また、堀場製作所も京都工場の蛍光X線分析装置の生産能力を年間1000台まで増強する予定である²⁾。
- 蛍光X線分析装置で、クロムを測定した場合、クロムの総量を分析することができるが、クロムの価数や有機構造の判定ができないという問題があり、日本電子株式会社は、この課題を解決するために、**蛍光X線分析装置とラマン分光分析装置を組み合わせた分析装置を開発し、特許を出願している³⁾**。SERSの有力な応用として、このラマン分光分析装置にSERS技術を導入し、測定精度を高めることが考えられる。
- また、米国DELTANU社が販売しているラマン分光分析装置は、英国mesophotonics社のSERS用基板(Klarite)を搭載可能であり、SERS計測もすることができる。DELTANU社は、米国Wyoming大学化学科のSERS研究者であるKeith Carron氏と共同研究を行っており、米国で9件のラマン分光に関する特許出願(SERS関連を含む)を行っている。また、DELTANU社は、ラマン分光分析装置の産業応用の他に、大学の学部教育で手軽に使用可能なラマン分光分析装置の提供も行っており、DELTANU社のウェブページには、ラマン分光分析装置の初心者向けに充実した情報が公開されている。
- 一方、米国Niton社は、小型の携帯型X線分光計「XLtシリーズ」を約500万円から約700万円程度で販売しており、2004年から現在までに100台弱出荷されている。この携帯型X線分光計の放射線の遮蔽と遮蔽方法については、特許出願もされている⁴⁾。日本では、「XLtシリーズ」は、リガク社を通して販売されている²⁾。測定・分析の対象全体としては、食品(残留農薬)、大気(トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、ホルムアルデヒド、トルエン、ベンゼン、キシレン、窒素酸化物、硫黄酸化物、浮遊粒子状物質等)、土壌(カドニウム、水銀、セレン、鉛、ヒ素、フッ素、ホウ素、シアン、六価クロム等)、電気電子機器(RoHS指令対象有害物質)、建材(アスベスト等)等が考えられる。
- 環境省が発表した環境ビジネスの市場規模予測によると、環境汚染防止のための分析、データ収集、測定、アセスメント等のサービスの提供に関する市場の規模は、2000年の2566億円から2010年には、3280億円となり、2020年には4371億円まで成長すると予想されている⁵⁾。環境ビジネス全体の市場規模は、2000年の29.9兆円から2010年には、47.2兆円となり、2020年には58.3兆円まで成長すると予想されている⁵⁾。
- 参照文献リスト
 1. 新・地球環境ビジネス 2007-2008 エコビジネスネットワーク編 産学社
 2. design news JAPAN 2007年2月号 モノづくりと有害物質規制:2ndステージ
 3. 特許文献 特開2006-184066(特願2004-376087) 出願人 日本電子株式会社 出願日 2004年12月27日
 4. 特許文献 米国特許6965118 出願人 Niton LLC 出願日 2004年5月24日
 5. 環境白書 平成16年版

3-4. SERSが検出できる検体の例: 多環芳香族

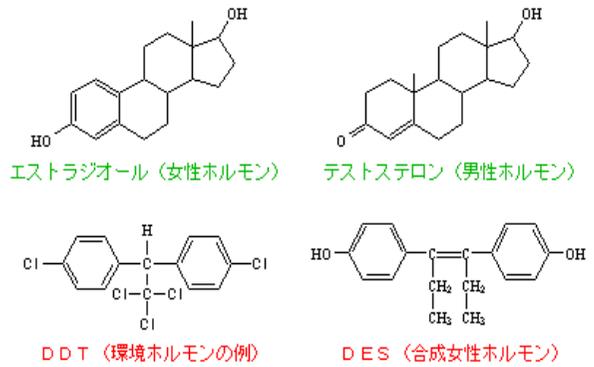
関係者外秘



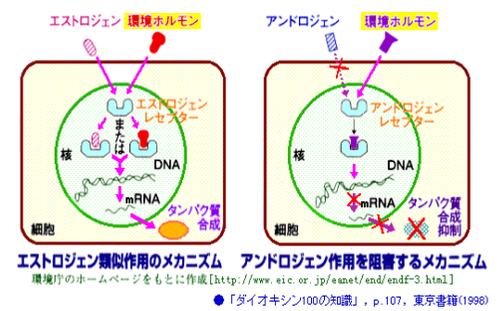
ローダミン色素などの多環芳香族化合物の中には、環境汚染物質や環境ホルモンとして知られる分子が多く含まれる。



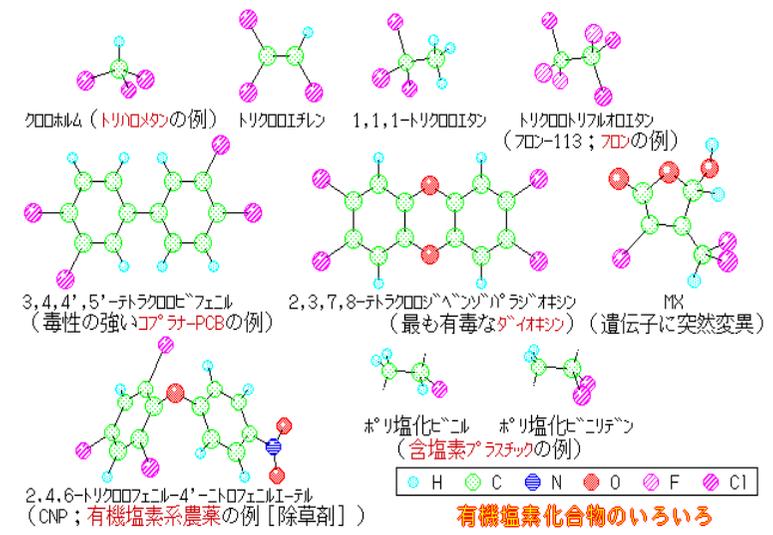
●ダイオキシン類の代表例と骨格構造



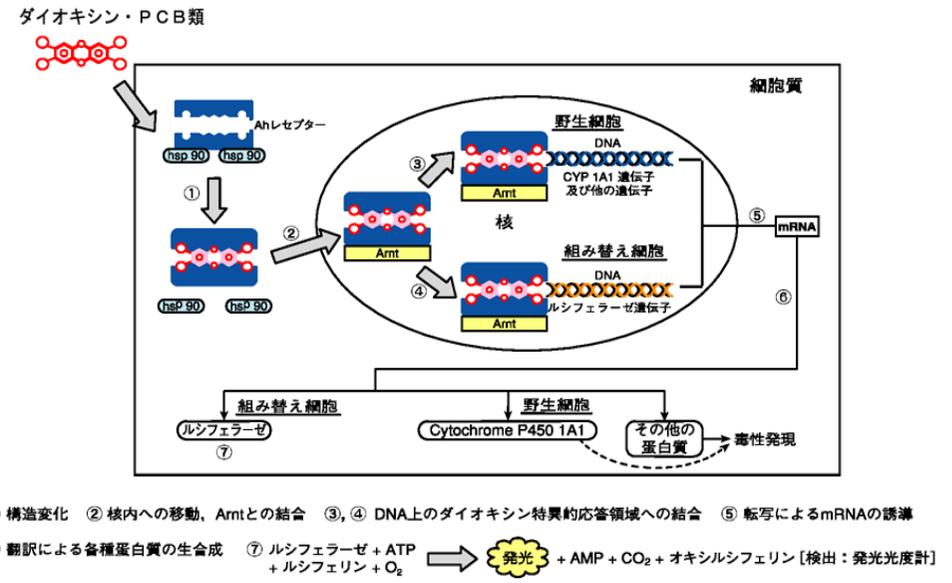
●ホルモンと環境ホルモンの構造例 (「奪われし未来」, p.112)



ダイオキシン類などが生物細胞に取り込まれると、細胞内のAhレセプター(多環芳香族化合物受容体)との結合、DNA情報の転写、蛋白合成等の細胞内反応を介して薬物代謝酵素が誘導される。



有機塩素化合物のいろいろ



2005年 analytical chemistry(分析化学会誌)に公開された論文のサマリー。
(アイオワ大と米農務省獣疾病センター研究者の連名)

Anal. Chem. **2005**, *77*, 6147–6154

Low-Level Detection of Viral Pathogens by a SERS Based Immunoassay

Jeremy D. Driskell, Karen M. Kwarta, Robert J. Libert, and Marc D. Porter

*Institute for Combinatorial Discovery, Departments of Chemistry and of Chemical and
Biological Engineering, Ames Laboratory—U.S. DOE, Iowa State University, Ames, Iowa*

John D. Neill and Julia F. Ridpath

*Virus and Prion Diseases of Livestock Unit, National Animal Disease Center,
United States Department of Agriculture, Ames, Iowa*

<要約>

ヒトおよび獣用医薬からバイオテロ防止まで、ウイルス病原体に対して高感度で、汎用的な診断試験法の開発に対するニーズは高まっている。これらの要求に対する手法として、読取法として表面増強Raman散乱(SERS)を用い、チップスケールで、サンドイッチ免疫学的方式で試料からウイルス病原体を選択抽出するためにモノクローナル抗体(mAbs)を採用した診断試験法を開発した。この手法の性能を、細胞培養培地マットから豚コカリシウイルス(FCV)の捕捉によって実証した。抗FCVmAbsを共有結合固定化層を介してで修飾したAu基材上に暴露して捕捉した表面結合FCVsと外因性Raman標識(ERL)と反応させ同定および定量を行った。ERLとして最初にRamanリポータ分子(ニトロ安息香酸誘導体;RRM)で続いてmAbs層で被覆した60nmAuナノ粒子(nP)を用いた。RRMはAuNP上にチオラート吸着層として化学吸着し、強力で特異なスペクトル識別を可能にしAuNPにmAbsの層を共有結合するように計画的に分子設計した。試料マトリックスとして細胞培養液を用いる免疫学的試験法を開発した。非特異結合を最小化し、FCV結合効率を最大化できるようにいくつかの実験パラメータ(塩濃度、ERL緩衝液および試料攪はん)の最適化後の直線性ダイナミックレンジは $1 \times 10^6 - 2.5 \times 10^8$ ウイルス/mLで、検出限界は 1×10^6 ウイルス/mLであった。方法検証手段として原子間力顕微鏡を用いて測定された捕捉FCVの数と免疫学的試験の性能は相関があった。

3-6. 広がる応用例： 「ラマン散乱光で、生きた細胞を3次元観察」

関係者外秘

大阪大発ベンチャーのナノフoton(大阪市)は、生きた細胞などをそのまま観察できるラマン散乱レーザー顕微鏡「RAMAN-11」の受注生産を開始したと、2005年9月1日に発表した。

価格は、標準仕様で1台当たり3300万円で、従来のレーザー顕微鏡が3000万円から4500万円程度であり、「相対的に安い価格設定となっている」と河田聡会長(大阪大学大学院工学研究科教授)は説明する。製薬開発などのバイオテクノロジー分野の計測で大きな効果を発揮するという。

細胞はほとんどの成分が水であるため、レーザー顕微鏡で細胞を観察する際には、従来は有機色素で染色したり、蛍光たんぱく質を入れたりして細胞を“着色”する作業が必要だった。この有機色素や蛍光たんぱく質を加えると、生きている細胞の機能に障害をもたらす可能性があり、操作無しで観察できるレーザー顕微鏡が求められていた。

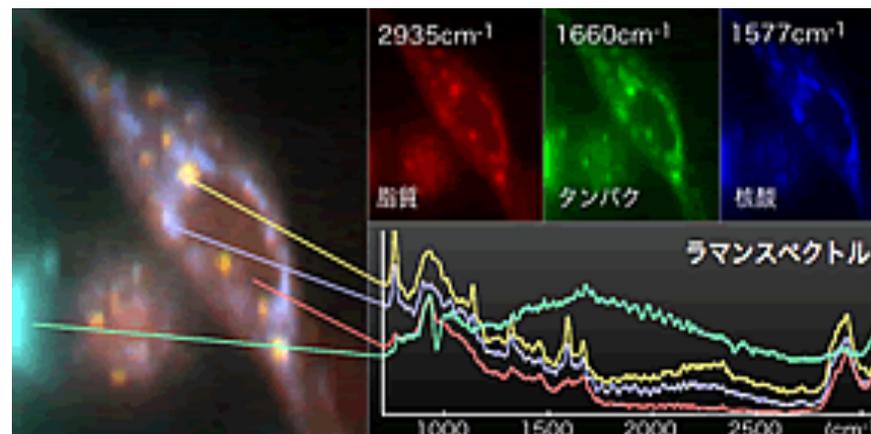
ナノフotonは、波長が一定のレーザー光を細胞に照射すると、細胞を構成する分子が入射した波長をごくわずかに一定波長分変えて散乱するラマン散乱を起こし、そのラマン散乱を検出することで、細胞に色をつけた状態で観察できることを見いだした。

ラマン散乱は、入射光に対して一定波長分をプラスした波長と、マイナスした波長を放射する。今回は、一定波長分をマイナスしたラマン散乱光を検出する。ラマン散乱光を検出すると、細胞内部の物質分布に応じた3次元カラー画像が得られるため、細胞内部を3次元的に可視化でき、構造を分析できる。細胞の機能解析や投薬に対する細胞の反応をカラー画像として調べることができる。

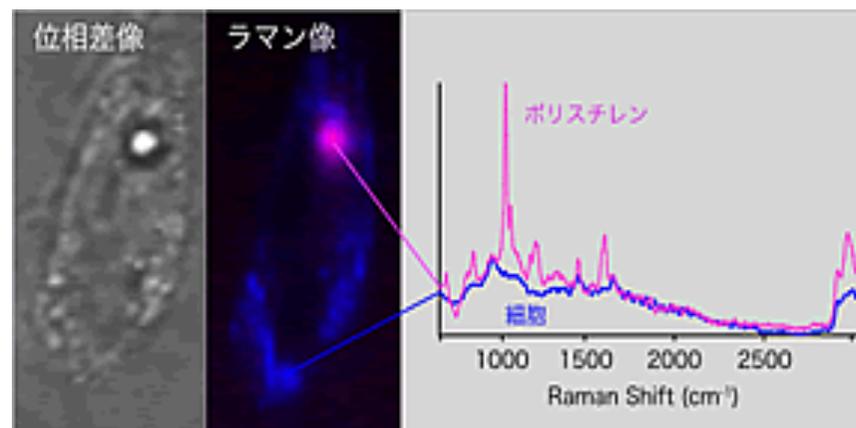
開発のポイントは、ラマン散乱光の光の強さが小さいために、入射光を遮断するフィルターと分光器(波長ごとの光の強さを測定)の実現だった。ナノフotonは、冷却した2次元CCD(電荷結合素子)にラマン散乱光を入れて画像化する「スペクトル2次元展開技術」を開発し、コア技術としている。同時に共焦点レーザー走査技術を組み合わせることで、共焦点以外の光を遮断できるため、断層画像が得られると説明する。

レーザーには半導体レーザーを採用。波長は532nmか785nmのどちらかを標準搭載する。両方搭載するオプションもある。このレーザー光を1フレーム当たり5秒で走査する。「レーザービームの走査機構もナノテクノロジーを駆使して開発した」という。

ナノフotonは、レーザー顕微鏡の骨格部分はニコン製を用い、レーザーの走査機構や分光器、2次元CCDなどを組み込んで、ラマン散乱レーザー顕微鏡「RAMAN-11」に仕上げる。納期は3カ月程度で、1年間に10台程度受注する計画。生きたままの細胞以外に、半導体デバイスやカーボン・ナノ・チューブの観察にも適しているという。カーボン・ナノ・チューブは多層の“壁”を別々に色分けできるという。



無染色のラット心筋細胞のラマン像。核酸、タンパク、脂質を示すラマンピークをRGBに割り当てて画像化。細胞内小器官や生体分子の分布を確認できる。



ポリスチレンビーズを捕食したヒト白血球の位相差像とラマン像。ラマン散乱を検出すれば、ポリスチレンと細胞とを完全に分離できる。

No	特許番号	発明の名称	出願人	出願日(優先日)	備考
1	USP#6,376,177	無標識DNAサンプルにおける塩基配列決定のための分析方法	Virtual Pro	1999.10.6	米国特許成立済み(2002.4.23付与) ただし、外国出願なし
2	US Application #60/460,702 国際公開 WO2004/090505	増強ナノ分光走査に関する方法と機器	Vladimir Poponin	2003.4.4	米国特許成立済み USP#7151598 (2006.12.19付与)
3	US Application #60/572,959 国際公開 WO2005/114298	SERSによる化学基増強検出のための重層プラズモン構造を備えた光学センサ	VP Holdings, LLC. (Vladimir Poponinの知財管理会社)	2004.5.19	各国移行中

NPLが環境センサ開発のオプション権を有するUS Application#60/572,959 (コア特許)は、基板製造方法の発明を含む基本特許に当たる。現在、各国移行中。日本への移行(2006.11.19)は確認済み。

* 移行先: 日・米・カナダ・欧州・ロシア・豪州・ニュージーランド・中・韓、インド・シンガポール・マレーシア・ベトナム・フィリピン、ブラジル・メキシコ、南アフリカ、イスラエル・オマーン・アラブ首長国連合

NPLが目指す環境センサは、殺虫剤、残留農薬、環境ホルモンなどの化学物質や、バクテリアの細胞表面のプロテオグリカン(複合糖質)、ウイルスの表面分子や、アレルゲン、その他生物体由来の抗原など、DNA以外の環境中の各種検体を検出・モニターする目的で開発されるものである。

さらに、有益な天然生理活性物質などの生体高分子の検出も対象としており、医療や創薬に関連する市場価値ある応用分野を網羅している。

また、NPLが有するオプションの権利には、コア特許を利用した様々な製品の開発、製造、販売、修理、サポートも含まれている。

1. ポポニン博士の発明における技術開発の本質と現在の状況は？

ポポニン博士は、単一分子領域への検出限界の拡張に大きな進展をもたらした。彼の最近のデータによると、基板上の活性銀サイトに吸着した単一分子から量子散乱を検出することが出来ることが明確に示されている。これは科学の大きな進歩であり、この観測結果はポポニン博士の基板およびフォーマットが単一分子を検出する能力を備えていることを証明している。単一分子の観測により、ついに共鳴および電場増強因子を量的に測定する機能が初めて提供される。ポポニン博士等にとって、基板上の分子量の測定は増強因子を測定するのに常に問題であったが、現在この問題は、量的単一分子イベントを観測することにより解決されている。

さらにこの観測はポポニン博士が発明した基板の最終的な有用性も明らかにしている。彼は効果的に基板ノイズを減らし、ラマンが蛍光よりも勝るというまでにラマン散乱増強を増加させた。

2. 特に環境センサーに注目したSERS開発の応用領域は何ですか？

環境センシングにおける応用領域はたくさんある。サブナノモルからピコモルの範囲では分子を検出する能力を必要とする状況が多く、高く評価されている。

いくつか例を挙げると、水質汚濁物、水および土壌中の農薬、化学および生物戦争物質、細菌汚染物質、ウイルス汚染物質、機内爆発物等、癌バイオマーカー、食品添加物、食品交雑物、食品中の生物活性物質および分子、家屋や建物の空気および環境モニタリングが挙げられる。

ほとんどの場合、上記の領域には、関心のある物質を検出し、また特定も行うリアルタイムの実行可能な高感度法は他にないので競争相手は皆無かそれに近い。

3. 環境センサーおよびDNA塩基配列決定法におけるこれらの技術の実現可能性は？

環境センシングにおけるこの技術の実現可能性は極めて高い。様々な種類の有機分析物はSERSのホットスポットに吸着され、感知される。超低レベルで濃度を測定する、また恒等式を測定することが可能な領域配置可能なセンサーは一般的に少ない。これらのSERSセンサーは、現在の形のままで、環境汚染物、農薬、毒素、爆発物、および化学戦争物質などを感知することが出来る。さらに表面を改良することで追加物質の感度が一層強化されると思われる。

これらの見解がお役に立てば幸いです。ポポニン博士の最近の技術における進展によってこの最高水準の技術は劇的に進歩しました。よって以前にも増して私はこの技術が、特に環境領域において有望なものとなることを確信しています。米国などにおいて他の多くのグループがこの技術を進めており、また同じ事に気が始めているので御社におきまして先へ進められることをご提案致します。

Professor Richard A. Mathies

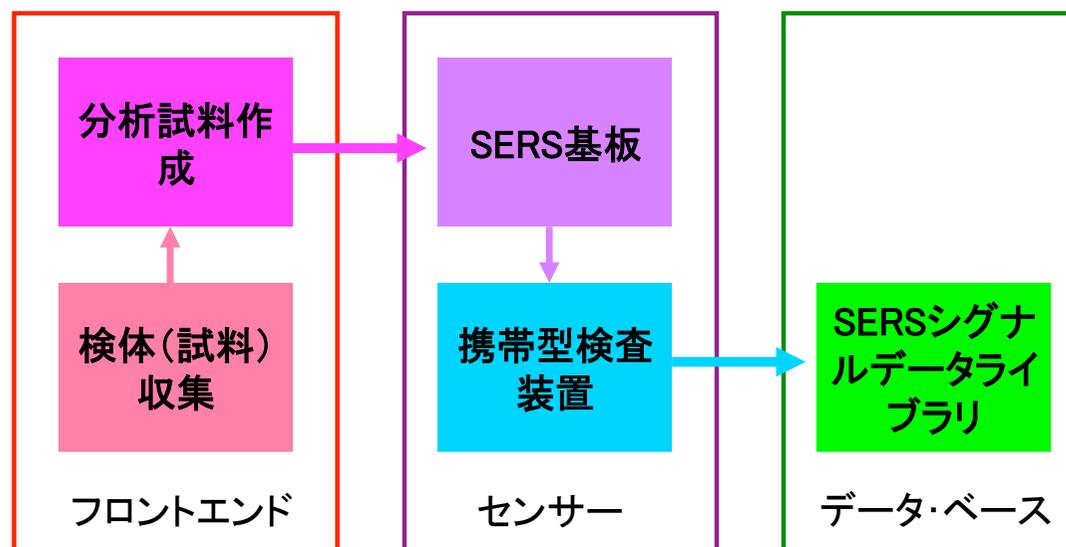
超高感度SERS環境センサーの技術要件

センサーを構成する要素は以下を含む：

前工程：バルク・検体（試料）の収集とプロセス：対象試料と背景の確定

センサー装置：検体（試料）の感度増強センサー基板・携帯型検査装置による検査

データ処理：SERSデータベースとの対比による生体・化学物質の同定



超高感度SERS環境センサーを達成するために、以下が必須。

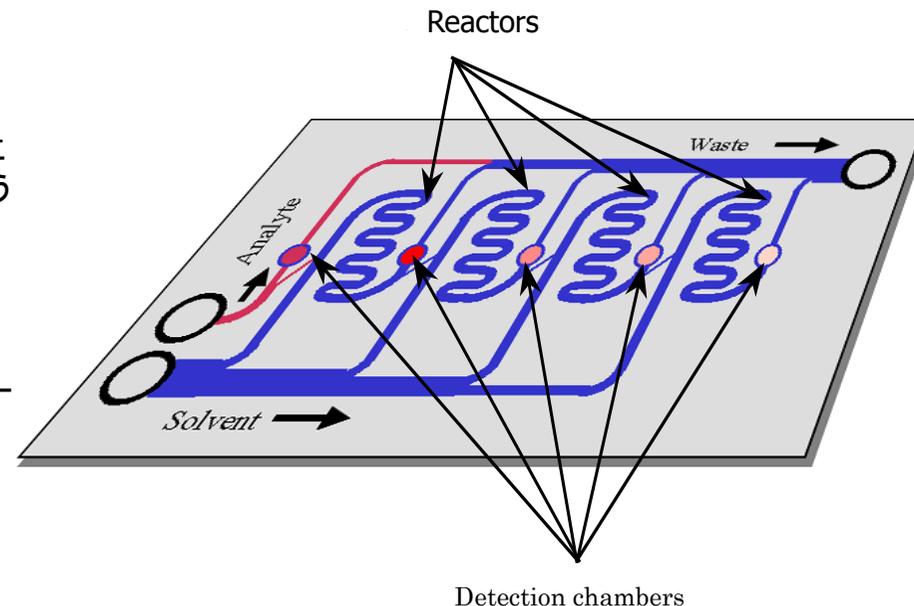
1. SERS基板の量産化
2. SERS基板のマイクロ流体チップ化
3. マイクロ流体チップと携帯型ラマン分光器の小型センサーとしての統合

ポポニン方式によるSERS基板応用による 自動希釈系列生成マイクロ流体セルユニット(SERS Chip)

環境センサーでは、この流体チップを小型ラマン分光装置に組込んで、直接環境中のサンプルを装置内に導入し、その場で分析できるようにする。

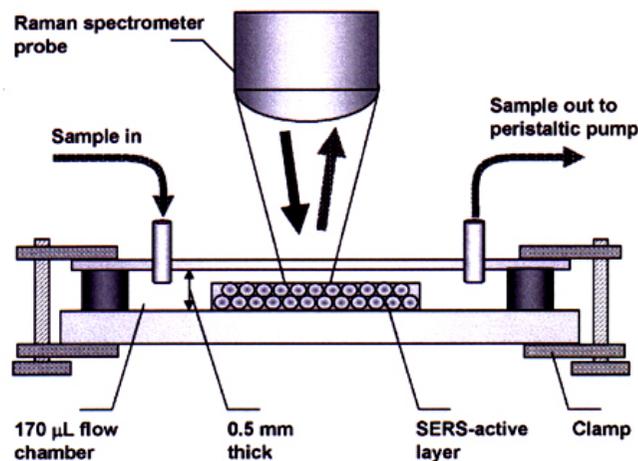
また、大学等で使われている既存のラマン分光装置には専用カートリッジを取り付けるなどして、そのまま使うことが可能。それまで使っていたRenishawやIntel、Mesophotonicsの基板よりも遥かに高感度での検出が可能となる。

さらに自動希釈系列生成によって、従来の検出プロセスに伴う線形的カリブレーション工程の排除によるデータ検出作業の迅速化を狙うセンサーシステムにおける新スタンダードとしての期待がもたれる(R.Mathies, UC Berkeley)



A dilution microfluidic chip with linear layout of detection chambers

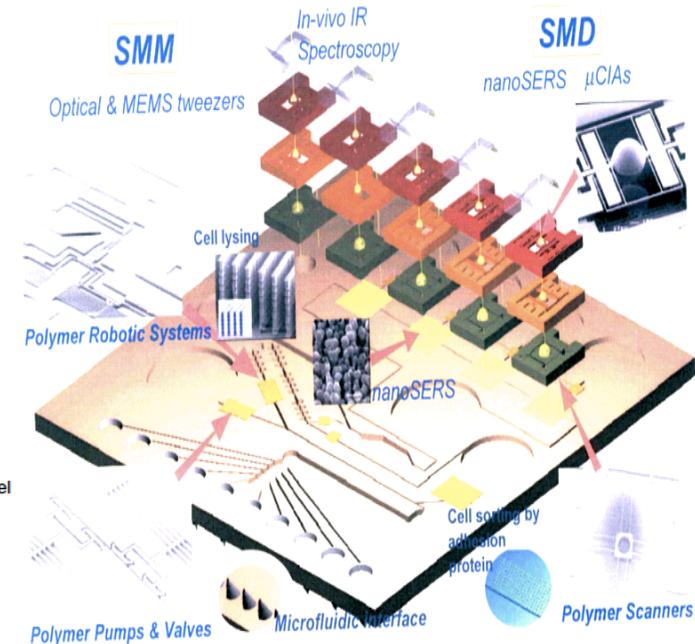
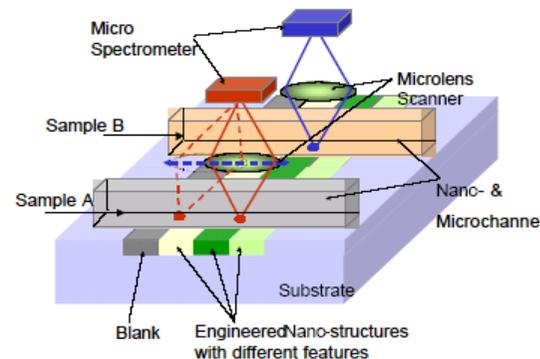
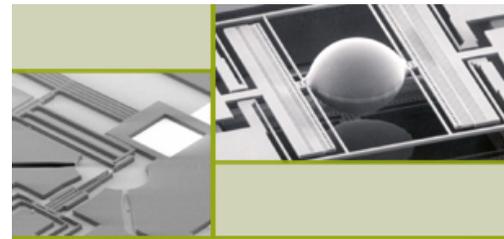
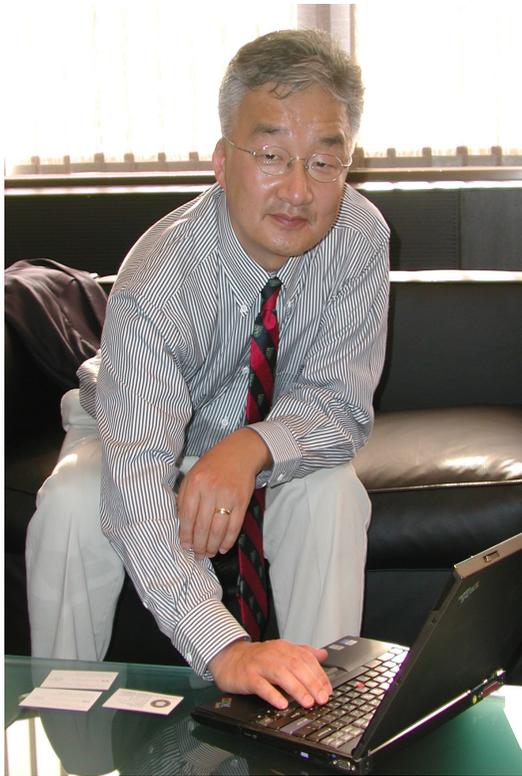
Analyte (検体) が Solvent (溶媒) と合流し、自動的に段階希釈される。たとえば、溶媒を検体の4倍速で流した場合、上図に見られる5つのDetection Chamber (SERS基板を含む) 上には、左から、原液、5倍希釈、25倍希釈、125倍希釈、625倍希釈の5段階希釈された検体が流れることになる。Chamberを10用意すれば、195万3125倍までの10段階希釈系列が自動生成される。



6-1. 研究協力者1: BioPOEM/BioPOETs の権威、Luke P. Lee

関係者外秘

- 初期の実験用基板は、BioPOEM/BioPOETs の権威、Luke P. Lee が製作。
(BioPOETs: Biomolecular Polymer OptoElectronic Technology and Science)



現在、ポポニンの実証試験用基板の製作を担当してきたのが Dr. Luke P. Lee (カリフォルニア大学バークリー校教授)である。Dr. Luke P. Leeが持つ独自技術(ポリシリコン・ナノピラー基板製造技術)は、将来、DNAや代謝産物など生体の複雑な高分子の自動解析を多元的に行う「ナノSERSアレー」(オンチップ型マイクロ・フルイディクスデバイス)開発の重要な基礎になると考えられる。既存のSERSの10万倍以上の感度増強性能を有するポポニン方式の基板製造技術に、Luke Leeの技術を組み合わせることにより、小型軽量(パームトップレベル)のSERSセンサーの開発が期待される。

- DNAナノアレイの開発には、ゲノムシーケンシングの権威、Prof. Richard Mathies も協力する。

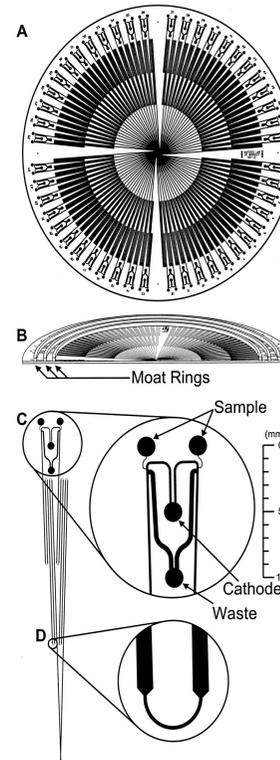


Prof. Richard Mathies

カリフォルニア大学バークレー校教授(生化学・生物物理化学)

ゲノム解析で活躍したキャピラリーアレイ電気泳動の開拓者であり、現在はその進化型であるLab-on-a-CDシーケンサー(図)の開発に力を注いでいる。

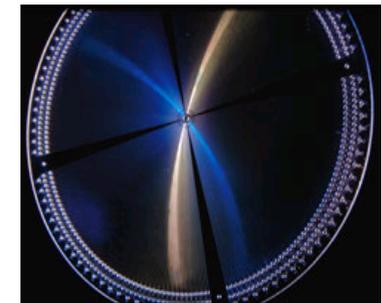
このCD型マイクロ流体チップ・シーケンサーは、直径150mmの円盤上に96本の微小流路を放射線状に配置したもの。1本当たり約430塩基のDNAを96本同時に解析することで、約4万1千塩基を24分で決定できる。ヒト1人分のDNAシーケンスに要する時間は、最新のキャピラリーアレイシーケンサーを数百台並べた解析工場を24時間操業しても3ヶ月かかると言われるが、Lab-on-a-CDシーケンサーをフル稼働すれば、5分の1以下の時間で完了する。



次世代のシーケンシング技術の開発には2つの段階が考えられます。第1段階は、操作手順が完全に統合されたマイクロ流体システム(Microfluidics)によるシーケンシング技術の開発です。100nLスケールでSangerシーケンシングを完全に統合することにより、機械装置の削除と試薬コストの大幅な軽減が可能になります。さらなるシーケンシングコストの削減には、英国のSolexa(ソレкса)社などが開発を進めている単一分子によるシーケンシングのような、Sangerに代わるパラダイムが必要となるでしょう。ポポニン博士ご提案のナノアレイ技術は、まさにこの次世代パラダイムに基づくものです。このような先進技術が開発され製品化されるまでに要する時間は、私の広範な経験から見て、有効なシーケンシングの基本的実証がなされてから5年後と予想できます。

Affymetrix社の製品に利用されている技術を今日の技術とすれば、私が明日の技術として提案しているものがLab-on-a-CDの技術であり、ポポニン博士のDNA単分子の直接読み取り技術は明後日の技術として位置づけることができます。

(by Prof. Richard Mathies)



6-3. 研究協力者3: ナノテクの先駆的開拓者、Prof. James Gimzewski

関係者外秘

- ナノレンズの開発には、ナノ電磁光学の世界的権威、Prof. James Gimzewski(ギムゼブスキ)が参加する。



私の最大の関心は、ナノレンズに向けられています。なぜならば、それによって達成される超近接場こそ、光学の新たな地平を拓くものだと考えるからです。(by Dr. James K. Gimzewski)

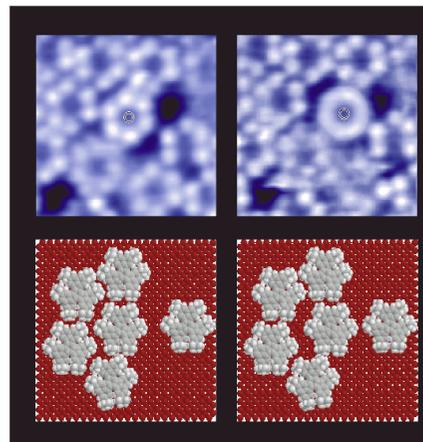
Prof. James K. Gimzewski

UCLA(カリフォルニア大学ロサンゼルス校)化学・生物化学科 教授。非弾性的なトンネル電子に起因する光電子放射(photon emission)の第一人者。英国ストラスクライド大学(University of Strathclyde)Ph.D.

1995年、STM(走査トンネル顕微鏡)において、トンネル電子がプローブチップと試料の間の局所的電磁モードによって、増強された光放射を起こすことを初めて示した。さらに、分子構造に対応した光子マッピングが可能であることを実証し、現在に至るSPM(走査プローブ顕微鏡)の発展に大きく貢献した。

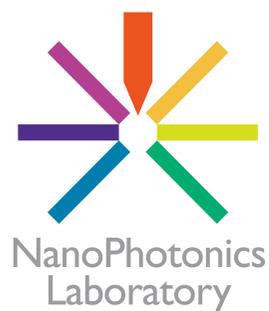
1997年、Feynman Prize for Nanotechnology (Experimental) Palo Alto.

2001年、Duddell Memorial Medal of the Physical Society of Great Britain.



前職のIBMチューリッヒ研究所時代に、Gimzewskiが共同研究者らと、1998年7月24日付のScience誌に報告した「回転と静止の2つの状態の切り替えが可能なプロペラ型分子のデザインと実際にSTMを使用して観測された分子ホイールの高速回転」はあまりにも有名。(写真左上)静止状態。中心のプロペラ型分子に明瞭な6枚の羽が見える。(写真右上)回転状態。中心分子の位置がずれている。また、羽根が回転して環状に見える。

iPB 株式会社 アイ・ピー・ビー
Intellectual Property Bank Corp.



ナノフォトンクス・ラボラトリー株式会社