

称号及び氏名 博士（工学） 西辻 凌輔

学位授与の日付 2024年3月31日

論文名 「ポリマー製ナノフォトニクス基板に基づく  
簡易センシングシステム構築と高機能化」

論文審査委員 主査 久本 秀明

副査 松岡 雅也

副査 椎木 弘

副査 中島 智晴

## 論文要旨

近年の医療分野では、医療従事者の減少、患者の生活の質向上や即時・その場測定等、医療ニーズの多様化から、疾病の早期診断・その場診断、モニタリング可能な簡易測定デバイス・システムが求められている。また、現在主に行われている医療診断手法として知られる酵素免疫測定法（ELISA: Enzyme-linked immuno-sorbent assay）やポリメラーゼ連鎖反応（PCR: Polymerase chain reaction）等の生化学的分析手法は、蛍光色素等の標識やDNAの抽出・精製等の前処理が必要であるため、測定操作の煩雑さ、専門的技術の必要性、また大型・高価な装置である点が課題であった。そのため、安価、小型、簡易な操作性を兼ね備えた医療診断デバイス・システムも求められている。小型、簡易なデバイスとしてイムノクロマトグラフィが知られているが、これは一般に定性分析向けであり、測定感度の低さに加え、DNAメチル化やタンパク質翻訳後修飾等の複雑な生体反応測定は困難である。これらの課題解決のため、フォトニック結晶（PhC: Photonic crystal）や、局在表面プラズモン共鳴（LSPR: Localized surface plasmon resonance）・表面増強ラマン散乱（SERS: Surface enhanced Raman scattering）を誘起する金属ナノ構造体等のナノフォトニクス基板、水晶振動子（QCM: Quartz crystal microbalance）を利用した、センサの小型化による可搬性の付与や測定の簡易化が研究されている。ナノフォトニクス基板をセンサ応用したナノフォトニクスセンサでは、光と物質の直接的相互作用で測定対象を検出するため、非標識検出による測定時間短縮や測定操作簡易化が実現できる。QCMセンサは、電極表面への物質の吸脱着を共振周波数変化として検出する。したがって、電極表面への抗体やプローブDNA等のリガンドの固定化で非標識検出に適用でき、簡易なセンサを開発できる。しかし、ナノフォトニクス基板はSi等の半導体材料を電子線描画やイオンエッチングなどで作製する必要がありスループット性と高額な装置による高コストな作製プロセスが課題であった。また、ナノフォトニクス基板・QCMともに高感度・高精度測定のための高額な材料、装置の必要性も課題であり、安価な材料・装置と高精度な測定の両立が困難であった。そこで本研究では、ナノインプリントリソグラフィ（NIL: Nanoimprint lithography）技術で作製された安価なポリマー製ナノフォトニクス基板を活用したセンシングデバイスと、簡易・安価な測定系の構築を実施した。またナノフォトニクス基板とQCMの組み合わせで異なる情報を同時取得できるデバイスの開発や、機械学習による多変量データ解析での複雑な信号処理から、センシングシステムの高機能化を実現した。

第1章は緒言であり、本研究に関連する先行研究を参照し、本研究の背景と目的を述べた。

第2章では、ポリマー製ナノフォトニクス基板に基づくDNAハイブリダイゼーション非標識

検出デバイス開発のための、基板表面へのプローブ DNA 固定化方法の検討について述べた。特定配列の DNA 検出は感染症や遺伝性疾患の診断に応用されており、その他にも薬効や副作用の個人差の特定へも応用できる。現在、広く知られている遺伝子診断方法には、PCR 法、DNA マイクロアレイ、アガロースゲル電気泳動があり、これらの手法は高感度・高選択的である一方、測定には蛍光色素標識や高価な検出器が必要である。そのため、近年、電気化学測定や表面プラズモン共鳴測定を利用した非標識 DNA 検出が研究されている。これらの検出方法は蛍光標識を必要としないため、測定操作を簡略化できる利点がある一方、高額な装置、金や銀などの高価な材料が必要である。そこで本研究では、安価かつ簡易な作製方法の NIL で作製されたポリマー製 PhC と簡易な光学系を使用し、DNA の検出を実施した。ここでは、ポリマー性 PhC 表面へのプローブ DNA の固定化方法として静電吸着と共有結合の 2 種を検討し、共有結合による固定化の方が静電吸着の場合と比較して約 1/100 の濃度までハイブリダイゼーションに基づく DNA の検出ができ、高いセンサ性能を持つことを明らかにした。

第 3 章では、ポリマー製ナノフォトニクス基板のセンサ応用の一例として、第 2 章で用いたポリマー製 PhC 表面へ酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) を液相析出させた  $\text{TiO}_2$  製 PhC と LAL (Limulus amoebocyte lysate) 試薬を用いたエンドトキシン検出への応用について述べた。エンドトキシンは、グラム陰性菌の細胞壁の構成要素の 1 つであるリポ多糖であり、血液や脳脊髄液にエンドトキシンが混入した場合、発熱や敗血症性ショック等の複数の症状を引き起こす可能性がある。さらに、エンドトキシンは熱に安定であり、通常の滅菌条件下では不活性化しないため、完全な除去が困難である。現在のエンドトキシン検出方法としては LAL 試薬を用いたゲル化法が知られているが、この手法はエンドトキシンと LAL 試薬の反応による十分なゲルの形成が必要である。エンドトキシン濃度が低い場合、ゲル形成が十分に進行しないため、感度が低くなる。またより高感度な測定方法として比色法が挙げられるが、発色合成基質や吸光光度計を用いる必要があり、測定に専門的な知識、技術が必要になる。そこで、簡易かつ高感度な検出系開発のために、第 2 章で用いたポリマー製 PhC と簡易な光学系でのエンドトキシン検出を着想した。予備検討の結果、ポリマー製 PhC のみでは高感度なエンドトキシン検出が困難であったため、本研究ではポリマー製 PhC 上に液相析出法で  $\text{TiO}_2$  を析出させ、測定感度向上を図った。本検出系では、エンドトキシンと LAL 試薬間のゲル化反応に伴う PhC 表面の屈折率変化を光学特性変化として検出した。その結果、反応時間 60 min で直線範囲 0.001 – 1 EU/mL と検出限界 (LOD: Limit of detection) 0.0002 EU/mL を達成し、特に LOD では市販試薬の LOD 0.015 EU/mL と比較して約 2 桁低くなることを明らかにした。

第 4 章では、ポリマー製ナノフォトニクス基板に基づくセンシングデバイスの高機能化を目指し、バイオ分野での非標識検出法に応用されている QCM と LSPR 測定基板を活用した、重量変化・誘電率 (屈折率) 変化の同時取得デバイス開発について述べた。QCM では導電性電極の間に挟まれた水晶の圧電特性を利用して付着物質の重量変化を検出しており、LSPR 測定基板は金属表面の自由電子の集団振動を利用するため、付着物質 (および媒質) の屈折率変化に関連する情報を検出している。この二つの測定は生体分子の結合時に異なる情報が得られるため、これらの測定原理を組み合わせることができれば、表面で起こる生体分子の反応をより詳細に分析できる。しかしこれらの測定は異なるデバイスで行われるため、測定結果にはデバイス間誤差が含まれることが多く、正確な評価が困難である。そこで本研究では、NIL で QCM 電極表面に塗布した光硬化性樹脂にポリマー製ナノフォトニクス基板をモールドとして構造を転写後、金蒸着で金ナノ構造を作製し、測定物質の吸着量と光学特性変化情報を同時取得できるデバイスを作製した。作製デバイスの性能評価のため、モデル物質としてシリカナノ粒子を用い、QCM 電極表面へ吸着した際の吸着量と光学特性変化を同時測定した。その結果、シリカナノ粒子濃度と吸着量 (重量) ・光学特性 (周辺屈折率) の  $R^2$  値がどちらも 0.99 以上であったことから、シリカナノ粒子濃度に応じた吸着量 (重量) と光学特性 (周辺屈折率) 変化を同時測定できることを明らかにした。本研究で開発したデバイスは複数情報を取得できるため、より複雑な生体反応解析の実現が期待できる。またこのデバイスは吸着量や LSPR の測定だけでなく、QCM による粘弾性の測定、金ナノ

構造による SERS の測定等、その他の応用へも展開できる。

第 5 章では、ナノフォトニクス基板に基づくセンシングシステムの高機能化の一例として、ナノフォトニクス基板上での SERS 測定と機械学習解析を組み合わせた測定法の開発を行った。SERS は金属ナノ構造表面に吸着した分子のラマン散乱強度が増幅される現象であり、金属コートされたナノフォトニクス基板に基づく SERS センサは、LSPR とラマン散乱のカップリングで一般に高感度となる。また SERS スペクトルには、分子内の振動情報だけでなく、分子間相互作用の情報も含まれているため、多くの化学的情報を得られる。しかし、SERS は通常のラマンでは観測できない小さな分子振動のシグナルも増強するため、一般にスペクトル形状が複雑であり、解析が困難である。そこで機械学習を用いた多変量解析との併用を着想した。本研究では基礎的知見を得るために、官能基が 1 つ異なるチオフェノール類似構造分子（4-Methylbenzenethiol、4-Hydroxybenzenethiol など）混合サンプルを金蒸着ナノフォトニクス基板表面に結合させ、その混合比率予測を試みた。異なる比率でチオフェノール類を混合したサンプルから、作製したナノフォトニクス基板を用いてそれぞれの比率での SERS スペクトルを測定した。測定した SERS スペクトルを機械学習にて多変量解析し、2 種の分子の混合比率を比率ごとに分類したところ 99.4% の精度での予測を達成した。以上から機械学習での多変量解析が SERS スペクトルからの分子混合比率情報抽出に有用であることを明らかにした。今後、ナノフォトニクス基板に基づく SERS と機械学習を組み合わせた手法で、類似構造分子の微量検出や官能基変化の検出等への応用が期待できる。

第 6 章では、本研究で得られた結果を総括した。本研究では、NIL で作製されたポリマー製ナノフォトニクス基板に着目し、そのバイオセンサ応用と高機能化のための指針を示した。今後、これらの技術を併用し、1 デバイスでの複数情報取得と機械学習解析によって、簡易測定での DNA メチル化、タンパク質の翻訳後修飾等の複雑な生体反応を検出、解析できると考えている。本研究は、簡易性と高機能性を兼ね備えたセンサ開発の基盤となり、医療診断だけでなく、薬学検査や環境分析等、他分野への貢献も期待できる。

## 審査結果の要旨

本研究では、ナノインプリントリソグラフィ(NIL: Nanoimprint lithography)技術で作製された安価なポリマー製ナノフォトニクス基板を活用した多様なセンシングデバイス開発と、簡易・安価な測定系の構築・多変量解析の導入を実施し、以下の成果を得ている。

ポリマー製ナノフォトニクス基板に基づくDNAハイブリダイゼーション非標識検出デバイス開発のための、基板表面へのプローブDNA固定化法の検討では、静電吸着と共有結合を検討し、共有結合による固定化の方が静電吸着の場合と比較して約1/100の濃度のDNAを検出でき、高いセンサ性能を持つことを明らかにした。

センサ応用の一例として検討したエンドトキシンの検出ではポリマー製フォトニック結晶(PhC: Photonic crystal)表面へ酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)を液相析出させたTiO<sub>2</sub>製PhCを作製した。エンドトキシン検出法として、LAL(Limulus amoebocyte lysate)試薬とエンドトキシンの反応に基づくゲル化法が知られているが、検出下限に課題があった。ここではTiO<sub>2</sub>製PhC上でのエンドトキシンとLAL試薬間のゲル化反応に伴うPhC表面の屈折率変化を光学特性変化として検出した。その結果、反応時間60minで直線範囲0.001 – 1 EU/mLと検出限界(LOD: Limit of detection)0.0002 EU/mLを達成し、特にLODでは市販試薬のLOD 0.015 EU/mLと比較して約2桁低くなることを明らかにした。

ポリマー製ナノフォトニクス基板に基づく複数情報同時取得センシングデバイスの開発ではバイオ分野での非標識検出法に应用されている水晶振動子マイクロバランス(Quartz crystal microbalance: QCM)の電極表面に金属ナノ構造を作製し、QCMに基づく重量変化と局在表面プラズモン共鳴に基づく誘電率(屈折率)変化の同時取得デバイスを開発した。作製デバイスの性能評価のため、モデル物質としてシリカナノ粒子を用い、QCM電極表面へ吸着した際の吸着量と光学特性変化を同時測定した。その結果、シリカナノ粒子濃度と吸着量(重量)・光学特性(周辺屈折率)のR<sup>2</sup>値がどちらも0.99以上であったことから、シリカナノ粒子濃度に応じた吸着量(重量)と光学特性(周辺屈折率)変化を同時測定できることを明らかにした。

ナノフォトニクス基板に基づくセンシングシステムの高機能化の一例として、ナノフォトニクス基板上でのSERS測定と機械学習解析を組み合わせた測定法の開発を行った。SERSは高感度に分子レベルの化学的情報を得られるが一般にスペクトル形状が複雑であり、解析が困難である。そこで機械学習を用いた多変量解析との併用を着想した。ここでは基礎的知見を得るために、官能基が1つ異なるチオフェノール類似構造分子混合サンプルを金蒸着ナノフォトニクス基板表面に結合させ、その混合比率予測を試みた。2種の分子の混合比率を比率ごとに分類したところ99.4%の精度での予測を達成した。以上から機械学習での多変量解析がSERSスペクトルからの分子混合比率情報抽出に有用であることを明らかにした。

以上の諸成果は、NILで作製されたポリマー製ナノフォトニクス基板に着目し、そのバイオセンサ応用と高機能化のための指針を示したものである。今後、これらの技術を併用し、1デバイスでの複数情報取得と機械学習解析によって、簡易測定でのDNAメチル化、タンパク質の翻訳後修飾等の複雑な生体反応を検出、解析できると期待されるものであり、本分野の学術的・産業的な発展に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。学位論文審査委員会は、本論文の審査および最終試験の結果から、博士(工学)の学位を授与することを適当と認める。