

称号及び氏名 博士(理学) 西村 勇姿

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 31 日

論 文 名 State Control of Bio-nanomaterial and Bio-microstructure by
Light-induced Fluid Effect
(光誘起流体効果による生体ナノ材料および生体マイクロ構造の状
態制御)

論文審査委員 主査 飯田 琢也
副査 溝口 幸司
副査 田中 智
副査 久保田 佳基
副査 床波 志保

**State Control of
Bio-nanomaterial and Bio-microstructure
by Light-induced Fluid Effect**

(光誘起流体効果による生体ナノ材料および
生体マイクロ構造の状態制御)

論文要旨

Yushi Nishimura

西村 勇姿

February 2018

Summary of Doctoral Thesis at Osaka Prefecture University

論文要旨

State Control of Bio-nanomaterial and Bio-microstructure by Light-induced Fluid Effect

(光誘起流体効果による生体ナノ材料および
生体マイクロ構造の状態制御)

西村 勇姿

本博士論文では、光誘起流体効果による生体ナノ材料および生体マイクロ構造の状態制御の原理開拓を目指し、様々な金属ナノ粒子集合系（金属ナノ粒子固定化ビーズ、熱応答性 dendrimer 中の金ナノ粒子、DNA 修飾金ナノ粒子）において、光誘起力と光発熱効果の相乗効果による巨視的集積現象の機構を明らかにした。また、これらの集積現象を利用したタンパク質や DNA などの迅速微量検出の新原理提案や、薬剤内包ナノカプセルの細胞への集積化に基づく高効率ドラッグデリバリーシステム（DDS）の新原理提案も行った。

本論文は全 6 章から構成されており、主な成果は 3 部構成となっている。以下に各章の概要を述べる。

第 1 章では、序論として非平衡過程を巧みに利用して多種多様な機能を発現している生体系をナノテクノロジーにより観測・制御・模倣することを目指した先行研究に触れた後、光学的なアプローチで生体系やナノ・マイクロ物質の動的過程を制御するツールとしての光ピンセットに関する研究背景を解説した。特に、ナノ領域での光マニピュレーションの例として分子の結晶化や半導体ナノ粒子の選択輸送、少数個の金属ナノ粒子の光トラップなどの先行研究についても紹介した。また、金属ナノ粒子内部の局在表面プラズモンの光学特性と協力効果に注目することで、電磁気学的な相互作用に起因する光誘起力や、光励起された電子と格子の相互作用による光発熱効果を増強できることに注目し、これらの相乗効果を利用したナノ物質の大規模光集積化の原理解明および生体ナノ物質への適用に関する本研究の着想の経緯について概説した。

第 2 章では、本博士論文を通じて用いた実験装置や原理について解説を行った。まず、本論文で中

心となる光誘起力と光発熱効果に関する原理を理論的説明も踏まえて行った。その後、レーザー集光システム、電界放出型走査型顕微鏡 (FE-SEM)、紫外可視分光光度計 (UV-vis) について原理を説明した。

第 I 部の主題である「高密度金属ナノ粒子集合系での光誘起非平衡過程とタンパク質の状態制御」に関連し、第 3 章では実験で使用した金属ナノ粒子固定化ビーズの諸元と、実験で用いたレーザー集光システムの光学配置について説明し、その後、実験結果と考察について説明した。光発熱効果のソースとして、サブミクロンオーダーのプラスチックビーズの表面に銀ナノ粒子を数万個固定化した銀ナノ粒子固定化ビーズを用いた。銀ナノ粒子固定化ビーズは LSP の協力効果の 1 つである「プラズモニック超放射」により紫外-可視-近赤外をカバーするブロードな光応答スペクトルをもつことから、光ピンセットで用いられる近赤外レーザー光も効率よく吸収し、高い光発熱効果が得られることを確認した。例えば、銀ナノ粒子固定化ビーズを分散した水中にレーザー光を照射したところ、開始からわずか数秒で沸騰現象が起こる条件があることを見出し、生じた気泡の表面に銀ナノ粒子固定化ビーズがサブ mm オーダーのマクロな領域に集積化することを解明した。特に、熱力学的理論により、入射光のパワーの関数として発生する気泡径の関係を表すことができ実験結果との良い一致も示した。また、銀ナノ粒子固定化ビーズの濃度依存性を調べたところ、高濃度であるほど光誘起バブル表面の被覆率が高まって表面エネルギーが低下するため長寿命化でき、数十分もの長時間に渡って収縮せずに安定化できることも分かった。

特に、この高い光発熱効果に注目し、低濃度のタンパク質溶液 (卵白アルブミン) を銀ナノ粒子固定化ビーズの分散液に混合してレーザー照射することで熱変性させ、pg オーダーの微量タンパク質を数秒～数分の短時間で光学的に検出できる可能性を示唆した。さらに、銀ナノ粒子固定化ビーズの分散液に実サンプルとしてのリポビテリンを主成分とする卵黄の希釈液を加えてレーザー照射を行った場合の方が、同濃度の卵白の希釈液を加えた場合よりも早く熱凝固が起こることも分かり、明瞭な差異が確認できた。本成果は迅速・高感度なフォトサーマル・バイオセンサの基礎構築に貢献するものである。

第 II 部の主題である「金ナノ粒子内包 dendrimer の細胞への光誘導集積」に関連し、第 4 章では dendrimer に内包された金ナノ粒子の諸元と、実験で用いたレーザー集光システムの光学配置について説明し、その後、実験結果と考察について説明した。高温状態で疎水性を示す有機分子を表面修飾した金ナノ粒子内包 dendrimer の特性に注目し、非共鳴レーザー照射による局所加熱により癌細胞表面への集積化に成功した。さらに、集積化後に細胞の生死判定を行ったところ、非共鳴条件下で

あるにもかかわらず、レーザー照射点近傍の癌細胞だけを選択的に死滅できることも明らかにした。この成果は非従来の光誘導型ドラッグ・デリバリー・システムの新原理開拓につながり、医薬学の発展に貢献し得るものである。

第 III 部の主題である「金属ナノ粒子の光集合過程を利用した DNA の特異的結合制御」に関連し、第 5 章では実験で使用した DNA 修飾ナノ粒子とターゲット DNA の諸元、ならびに実験で用いたレーザー集光システムの光学配置について説明し、その後、一本鎖 DNA を表面に修飾した金ナノ粒子における光集合現象の機構解明を目指した実験の結果の説明と考察を行った。金ナノ粒子に修飾した DNA (プローブ DNA) と相補的な塩基配列をもつ一本鎖 DNA をターゲットとして添加した場合、特異的結合によって二重鎖形成がおこり、DNA を介して凝集した金属ナノ粒子がマクロな集合体を形成する。通常この過程は微量の DNA の場合には数時間～数日を要する場合があるが、1 fmol 以下の微量のターゲット DNA (分光を行った測光領域では約 5 zmol) の場合でも気液界面付近に集光したレーザー光により数秒～数分程度で二重鎖形成を実現してサブmmオーダーのマイクロなネットワーク構造として光学的に観測できることを示した。さらに、金ナノ粒子内部の電子系の協力効果に起因するプラズモニック超放射による大幅な光応答スペクトルの変化を追跡することでミスマッチな塩基配列をもつ複数種類のターゲット DNA との差異も確認し、遺伝子検査の迅速・高感度化の革新につながる成果を得た。

さらに、上述のようにターゲット DNA と粒子表面のプローブ DNA の間の二重鎖形成の光加速は気液界面付近で顕著に起こることに注目し、液滴の表面状態の経時変化が及ぼす影響の解明に、熱流体力学的アプローチで取り組んだ。上述の希薄な条件下での光加速によるマクロな集合体形成の機構解明のため、高濃度条件下では相補鎖 DNA を介したプローブ粒子のネットワーク構造が得られることを確認した。この結果から、レーザー光の電磁気学的相互作用だけでなく、プローブ粒子の集合化に伴う光誘起対流の発生が重要な役割を果たすことが分かった。特に、気相側にレーザー光の焦点を設定してデフォーカスすることで広範囲のプローブ粒子とターゲット DNA の衝突確率を高め、効率良く DNA 二重鎖形成の光加速を実現するための条件を見出した。さらに、タンパク質や異種 DNA の混合条件下でも DNA 二重鎖形成の光加速が可能であることも示し、遺伝子検査などへの実用展開における重要な知見も獲得した。

最後に第 6 章では、本論文の総括を行い、得られた成果の意義や将来展望について説明し、食品検査の迅速化・高感度化や、予防医療におけるハイスループット化や低侵襲化などのバイオ関連技術の革新への貢献可能性について議論した。

論文リスト

【本博士論文を構成する査読付論文】

- “Control of Submillimeter Phase Transition by Collective Photothermal Effect”,
Yushi Nishimura, Keisuke Nishida, Yojiro Yamamoto, Syoji Ito, Shiho Tokonami, Takuya Iida,
The Journal of Physical Chemistry C **118**, 32, 18799-18804 (2014).
- “Submillimetre Network Formation by Light-induced Hybridization of Zeptomole-level DNA”,
Takuya Iida*, Yushi Nishimura*, Mamoru Tamura, Keisuke Nishida, Syoji Ito, Shiho Tokonami*,
Scientific Reports **6**, 37768 (2016).
Equally contributed 1st author

【参考論文】

- “Bubble Stabilization by Plasmonic Nanoparticles”,
Yushi Nishimura, Kazuki Ueda, Yojiro Yamamoto, Shiho Tokonami, Takuya Iida,
Research on Chemical Intermediates, Submitted (2017).
- “Enhanced Collective Optical Response of Vast Numbers of Silver Nanoparticles Assembled on a Microbead”, Shiho Tokonami, Keisuke Nishida, Yushi Nishimura, Shimpei Hidaka, Yojiro Yamamoto, Hidenobu Nakao, Takuya Iida, *Research on Chemical Intermediates* **40**, 6, 2337-2346 (2014).

学位論文審査結果の要旨

学位論文提出者氏名： 西村 勇姿

学位論文題目： State Control of Bio-nanomaterial and Bio-microstructure by Light-induced Fluid Effect
(光誘起流体効果による生体ナノ材料および生体マイクロ構造の状態制御)

本博士論文では、電磁気学的な光誘起力と熱力学的な光誘起流体効果の相乗効果によるナノ・マイクロ物質の集合化の機構解明を目指し、様々な金属ナノ粒子集合系を対象にレーザー照射下での集合現象の解析を行っている。特に、解明した機構に基づき生体ナノ・マイクロ構造の状態制御を目指した光物性物理・熱流体力学・生化学の分野横断な研究を主に3つの成果に纏めて報告している。

第Ⅰ部では金属ナノ粒子を高密度固定化したマイクロビーズ（金属ナノ粒子固定化ビーズ）の光集積を利用したタンパク質の状態制御について議論している。この系が赤外域で強い光応答を示すことに注目し、赤外レーザー照射による電磁気学的な光誘起力によるトラップ効果と光発熱効果により発生した対流と気泡を利用した集積化に成功した。また、光誘起バブルの長寿命化の機構も解明した。さらに、タンパク質溶液を銀ナノ粒子固定化ビーズの分散液に混合してレーザー照射することで熱変性して数秒～数分でpgの微量検出ができることを解明し、迅速かつ高感度なバイオ分析への応用可能性を示した。

第Ⅱ部では、熱応答性ナノカプセルに内包された金属ナノ粒子の光集積による細胞制御を目的とした。具体的には、高温環境で疎水性を示す有機分子を修飾した金ナノ粒子内包 dendrimer への赤外レーザー照射による高密度集積化の条件探索を行った。特に、癌細胞表面への集積化および選択的破壊にも成功し、医薬学に貢献し得る知見も獲得した。

第Ⅲ部では金属ナノ粒子の光集合過程を利用したDNAの特異的結合制御について議論している。一本鎖DNAを表面修飾した金ナノ粒子と一本鎖のターゲットDNAの混合液にレーザー照射することで、レーザー照射点近傍にターゲットDNAが初期に数zeptomol(数百個)しか存在しない場合でも、二重鎖形成を加速してマクロな集合体を数分程度で形成できることを解明した。特に、このような現象が気液界面付近で顕著に起こることを見出し、光誘起力と光誘起対流の相乗効果が重要な役割を果たすことも示した。また、金ナノ粒子内部の電子系の協力効果に起因する大幅な光学応答の変化を追跡して複数種のDNAの塩基配列の違いを検出できる可能性も確認した。さらに、夾雑物の混合条件下での適用可能性も示し、遺伝子検査など実用展開における重要な知見も得た。

本審査委員会は本論文を学位論文として十分な内容を有しているものとして判断した。

(主査) 飯田 琢也
溝口 幸司
田中 智
久保田 佳基
床波 志保