

## 研 究 報 告 書

### 「細胞内機能を模倣したポリマー製フォトニック結晶ナノ共振器アレイの創製と 1 細胞代謝産物の非染色検出・定量への応用」

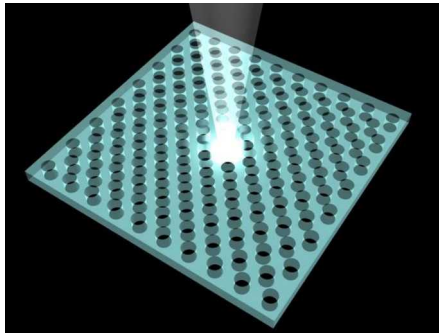
研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年3月

研 究 者: 遠藤 達郎

#### 1. 研究のねらい

本研究のねらいは、ナノ光学デバイス「フォトニック結晶(Photonic crystal: PhC)ナノ共振器アレイ」(下図)をポリマーを基材として作製し、加えて抗原抗体反応等種々の生化学反応によって誘起される屈折率変化によって観察される PhC ナノ共振器内の光閉じ込め・増幅効率変化を利用し、1 細胞レベルでの代謝産物を非染色にて検出・定量可能なツール(センサ)を開発することにある。



従来、1 細胞レベルでの代謝産物を検出・定量するには蛍光色素等の試薬を用いて染色する必要があった。この染色操作は、煩雑かつ高い技術を要するとともに、検出・定量には高額・大型な観察・検出装置が必要という課題があった。これら課題を解決するために本研究では、前述した PhC ナノ共振器を用いて、①染色が不要で、②安価・簡易な観察・検出装置を用いて、1 細胞レベルでの代謝産物を検出・定量を可能にする。

PhC は、ナノメートルサイズの誘電体が周期的に配列した構造を有する光学素子である。PhC は、この周期構造のサイズ・間隔および PhC 作製に使用する材料の物性(屈折率)を制御することで、任意の波長の光を回折・反射させることが可能である。この光回折・反射特性は、抗原抗体反応や DNA ハイブリダイゼーション等の種々の生化学反応によって誘起される周辺屈折率に対して鋭敏に変化する。加えて、PhC 内へ欠陥を導入すると、欠陥内へ特定波長の光を閉じ込め・増幅させる「ナノ共振器」機能を発現させることが可能である。これは前述した PhC の光回折・反射によって得られる光信号の増幅につながり、細胞代謝産物検出においてさらなる高感度化が実現可能と期待できる。

しかし、PhC ナノ共振器作製には、これまでシリコンやガラス等を基材としたものが報告されているが、作製が煩雑であり、大面積かつ大量に作製するには費用が高額となっていた。そこで本研究ではナノメートルサイズの構造を転写する技術であるナノインプリントリソグラフィーに着目、大量かつ安価に PhC ナノ共振器を作製するとともに、世界で初めて可視光の光を閉じ込め・増

幅可能な PhC ナノ共振器を設計・作製し細胞代謝産物検出・定量へと応用することを目指す。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

本研究では研究期間内に、①可視領域の光を高効率に閉じ込め・増幅可能な PhC ナノ共振器構造検討、②ナノインプリントリソグラフィーを用いた PhC ナノ共振器作製条件の検討、③ポリマー製 PhC ナノ共振器を用いたセンサ性能評価、④抗体固定化 PhC ナノ共振器を用いた抗原抗体反応の検出、を実施した。

- ① 可視領域の光を高効率に閉じ込め・増幅可能な PhC ナノ共振器構造検討では、これまでポリマーという屈折率の低い材料では、可視領域の光閉じ込め・増幅は困難と考えられてきた。しかし本研究では、有限差分時間領域(Finite-difference time-domain: FDTD)法を用いたシミュレーション解析によって、波長 650 nm 近傍の光を閉じ込め、増幅すること可能な PhC ナノ共振器を設計・作製することに成功した。
- ② ナノインプリントリソグラフィーを用いた PhC ナノ共振器作製条件の検討では、Cyclo Olefin Polymer (COP)をはじめ、poly(vinyl chloride)(PVC)、poly(methyl methacrylate) (PMMA)等種々のポリマーを基材とし、ナノインプリントリソグラフィーを用いて PhC ナノ共振器を作製することに成功した。加えてポリマー以外にも  $\text{TiO}_2$  や Au 等の金属を基材とした場合においても、ナノインプリントリソグラフィーを用いて PhC ナノ共振器を作製することに成功した。
- ③ ポリマー製 PhC ナノ共振器を用いたセンサ性能評価では、作製した PhC ナノ共振器を用いて周辺屈折率応答を評価した。加えて、作製した PhC ナノ共振器のセンサ性能評価のため、既存の光学顕微鏡へ搭載可能な光学系の構築を行った。作製した PhC ナノ共振器は、共振器を導入していない PhC と比べ感度を 140 倍高感度化させることに成功した。また、新たに構築した光学系は、市販のファイバー分光器を接続するだけで特性評価が可能である。これは、新たに大型かつ高額な装置を購入することなく、PhC ナノ共振器をセンサとして用いることが可能である。  
また PhC ナノ共振器は、作製時に基材中ヘイオノフォアや、リン脂質等分子認識素子を包含させると、イオンセンサや味覚センサへの応用が可能であることを明らかにし、その性能は既存のセンサと比べ 10 倍以上低濃度の測定対象物質を検出可能であることを明らかにした。
- ④ 抗体固定化 PhC ナノ共振器を用いた抗原抗体反応の検出では、PhC ナノ共振器上へ特定の抗原(測定対象物質)に対して特異的な抗体を固定化し、異なる濃度に調製した抗原溶液を滴下、抗原抗体反応によって誘起される周辺屈折率変化を回折・反射特性変化として観察した。その結果、作製した PhC ナノ共振器は、検出限界 100 fg/ml であった。

## (2) 詳細

本研究では研究期間内に、(1)可視領域の光を高効率に閉じ込め・増幅可能な PhC ナノ共振器構造検討、(2)ナノインプリントリソグラフィーを用いた PhC ナノ共振器作製条件の検討、(3)ポリマー製 PhC ナノ共振器を用いたセンサ性能評価、(4)抗体固定化 PhC ナノ共振器を用いた抗原抗体反応の検出、を実施した。各研究項目の成果詳細を以下に示す。

### (1) 可視領域の光を高効率に閉じ込め・増幅可能な PhC ナノ共振器構造検討

当該研究項目では、可視光の光を閉じ込め・増幅可能な PhC ナノ共振器構造を検討した。これまでポリマーという屈折率の低い材料では、可視領域の光閉じ込め・増幅は困難と考えられてきた。しかし本研究では、有限差分時間領域 (Finite-difference time-domain: FDTD)法を用いたシミュレーション解析によって、ポリマーを基材として用いても、波長 650 nm 近傍の光を閉じ込め、増幅すること可能な PhC ナノ共振器(図 1)を設計・作製することに成功した。

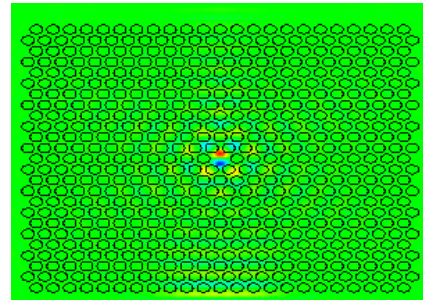


図 1 PhC ナノ共振器内の電界分布

### (2) ナノインプリントリソグラフィーを用いた PhC ナノ共振器作製条件の検討

当該研究項目では、Cyclo Olefin Polymer (COP)をはじめ、poly(vinyl chloride)(PVC)、poly(methyl methacrylate) (PMMA)等種々のポリマーを基材とし、ナノインプリントリソグラフィーを用いて PhC ナノ共振器(図 2)を作製することに成功した。加えてポリマー以外にも TiO<sub>2</sub> や Au 等の金属を基材とした場合においても、ナノインプリントリソグラフィーを用いて PhC ナノ共振器を作製することに成功した。

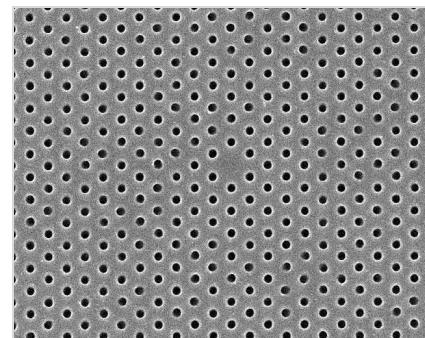


図 2 PhC ナノ共振器内の  
走査型電子顕微鏡像

本研究で作製した PhC ナノ共振器は、ナノインプリントリソグラフィーを用いて作製することから鑄型の汚染・破損がない限り同一形状の PhC ナノ共振器を作製することが可能であり、量産が容易であることを明らかにした。

### (3) ポリマー製 PhC ナノ共振器を用いたセンサ性能評価

当該研究項目では、作製した PhC ナノ共振器を用いて周辺屈折率応答を評価した。加えて、作製した PhC ナノ共振器のセンサ性能評価のため、既存の光学顕微鏡へ搭載可能な光学系の構築を行った。作製した PhC ナノ共振器は、屈折率応答評価の結果、共振器を導入していない PhC と比べ感度を 140 倍高感度化させることに成功した。また、新たに構築した光学系は、市販のファイバー分光器を接続するだけで特性評価が可能である。これは、新たに大型かつ高額な装置を購入することなく、PhC ナノ共振器をセンサとして用いることが可能であった。

また PhC ナノ共振器は、作製時に基材中ヘイオノフォアや、リン脂質等分子認識素子

を包含させると、イオンセンサや味覚センサへの応用が可能であることを明らかにした。イオンセンサへの応用については、イオノフォアとしてバリノマイシン、味覚センサへの応用にはパルミチン酸を基材中へ包含させることによって作製した。その性能は既存のセンサと比べ 10 倍以上低濃度の測定対象物質を検出可能であることを明らかにした。本成果は、細胞代謝産物の検出・定量に向けた応用だけでなく、本研究で開発した PhC ナノ共振器が食品・農業分野へ応用可能であることを示唆している。

#### (4) 抗体固定化 PhC ナノ共振器を用いた抗原抗体反応の検出

当該研究項目では、PhC ナノ共振器上へ特定の抗原(測定対象物質)に対して特異的な抗体を固定化し、異なる濃度に調製した抗原溶液を滴下、抗原抗体反応によって誘起される周辺屈折率変化を回折・反射特性変化として観察した。本研究では、アルツハイマー病のマーカー分子として応用が期待されている Amyloid  $\beta$ 、神経損傷マーカーとされている Neuron-specific enolase (NSE)をモデル抗原として抗原抗体反応の検出・定量を行った。その結果、作製した PhC ナノ共振器は、Amyloid  $\beta$ 、NSE とともに検出限界 100 fg/ml であった。この検出限界濃度は、前述した疾病の超早期診断が可能であることを示唆しており、癌や生活習慣病、神経変性疾患など各種疾病の重篤化を未然に防ぐことが期待できる性能であった。

### 3. 今後の展開

本研究で設計・作製した PhC ナノ共振器は、周辺屈折率変化に対して鋭敏に光学特性変化を示す光学センサとして動作する。これは、抗原抗体反応に限らず、DNA ハイブリダイゼーション等の生化学反応に対しても高感度に検出可能であることを示しており、今後はライフサイエンスだけでなく、医療・創薬・食品衛生・農業等の分野へ展開することで、測定対象物質を高感度かつ簡便・安価に検出・定量可能なセンサ開発が期待できる。これは、医療・創薬においては、疾病の超早期診断・予防、食品衛生においてはアレルギー・食中毒検査、農業においては、感染症の拡大防止が考えられる。

### 4. 自己評価

#### ・研究目的の達成状況

本研究では、ポリマーという屈折率の低い材料を基材として用い、世界で初めて可視光の光を閉じ込め・増幅可能な PhC ナノ共振器を設計し、実際に 140 倍高感度な光学センサとして応用可能な PhC ナノ共振器を作製することに成功した点が評価できる。加えて作製した PhC ナノ共振器が抗原抗体反応等の生化学反応を fg/ml の極超低濃度の領域で検出・定量することにも成功している。

細胞代謝産物検出・定量においては 1 細胞での検出には至らなかったものの、100 細胞以上の細胞数であれば代謝産物の検出・定量が可能であることを明らかにしている。

#### ・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究で設計した PhC ナノ共振器は、本さがけ研究に限らず、医療診断等への応用が期待できることから、東京大学医学部附属病院、トロント大学等の研究機関と連携し、応用展開を進めている。加えて、本研究によって得られた成果を基に大阪大学等とも連携し、別



用途への応用も推進している。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

本研究成果は、学会・論文・展示会発表を通じた社会発信、SciFoS (Science For Society) 活動を通じたインタビューにおいて高い評価を得ることができ、企業との連携を現在推進中である。今後はセンサのさらなる高感度化に向けた設計を行うことで、安価かつ簡便に測定対象物質の検出・定量可能なセンサやイメージングデバイスの提供が可能になると期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. S. Aki, K. Sueyohsi, H. Hisamoto, T. Endo Origin of the Optical Response of a Dye-doped Plasticized Poly (Vinyl Chloride)-based Photonic Crystal Ion Sensor, Anal. Sci., 2017 Volume 33, Pages 1247-1251.   |
| 2. S. Aki, K. Maeno, K. Sueyoshi, H. Hisamoto, T. Endo, Development of a polymer/TiO <sub>2</sub> hybrid two-dimensional photonic crystal for highly sensitive fluorescence-based ion sensing applications, Sens. Actuators B, 2018 Volume 269, Pages 257-263. |
| 3. J. Sun, K. Maeno, S. Aki, K. Sueyoshi, H. Hisamoto, T. Endo, Micromachines. 2018 Volume 8, Pages 410.   |
| 4. Photonic crystals on copolymer film for label-free detection of DNA hybridization, H. Su, X. R. Cheng, T. Endo, K. Kerman, Biosens. Bioelectron. 2018, Volume 103, Pages 158-162.   |
| 5. Core-Shell-Structured Gold Nanocone Array for Label-Free DNA Sensing, D. Kawasaki, H. Yamada, K. Maeno, K. Sueyoshi, H. Hisamoto, T. Endo, ACS Appl. Nano Mater., 2019, Volume 2, Pages 4983-4990.  |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 第 5 回ネイチャー・インダストリー・アワード特別賞
2. 第 46 回(2019 年春季)応用物理学会講演奨励賞