

論文の内容の要旨

論文題目 Development of Label-free Molecule Detection Method for Nanofluidics and Realization of Analytical Device Using 10^1 nm Space
(ナノ流体デバイスにおける無標識分子検出法の開発と
 10^1 nm空間を利用した極限分析デバイスの実現)

氏 名 津山 慶之

1. 緒言

近年、微小空間に化学プロセスを集積化したマイクロ・ナノ流体デバイスの研究が盛んに行われている。これまでに、マイクロ空間への化学プロセスの集積化の方法論が確立されており、それらをさらに微小なサブミクロン空間へと展開することで、超微量試料の分析や固液界面が支配的な空間における溶液の物性変化が報告されてきた。このように集積化の方法論が極限に向けて進展する中で、分子・微粒子と同等のサイズである 10^1 – 10^2 nm空間が新たな学術領域として注目され始めている。多数の分子の挙動を統計的に取り扱う従来の空間とは異なり、 10^1 – 10^2 nm空間では単一・可算個分子レベルでの物理化学・反応化学・生命化学が展開される領域である。また、分子スケールの空間を利用した単一・可算個分子レベルでの確実な化学プロセッシングや、溶液の物性変化を最大限に利用した新規分析手法の実現も期待できる。しかしながら 10^1 – 10^2 nm空間に関する学術的な知見はほとんどなく、上記のような分析デバイスも実現していない。その課題は分子検出法にある。

10^1 – 10^2 nm空間における分析には目的物質を検出・定量する方法が不可欠であるが、 μL – fL (10^{-18} – 10^{-15} L)体積中では分析において一般的な濃度である nM – μM であっても流路内に存在する分子数は可算個程度になってしまう。そのため高感度な濃度定量法、さらには分子・粒子をカウントする方法が必要であり、幅広い測定対象への応用を考えると蛍光分

子などの標識を用いない無標識光学検出法が望ましい。そのような方法として、分子・粒子の光吸収と熱緩和(光熱変換効果)を利用した光熱変換分光法が挙げられる。これまでに光干渉と光熱変換効果を利用した微分干渉熱レンズ顕微鏡(DIC-TLM)が開発され、サブミクロンスケールの流路における無標識分子検出が実現されている。しかし、ガラス基板の影響が顕著となる 10^1 – 10^2 nm流路においては、基板への熱拡散によって検出性能が低下することが報告されており、 10^1 – 10^2 nm空間における光熱変換分光法は確立されていない。

そこで本研究ではガラス基板への熱拡散により感度が低下せず、 10^1 – 10^2 nm空間に適用可能な無標識分子検出法を開発し、超微小空間を利用した極限分析デバイスを実現することを目的とする。具体的には(1) 光熱変換光回折検出法の提案と原理検証(2) 10^1 nm空間における濃度定量(3) ナノ粒子カウンティング(4) ナノ流体分析デバイスへの応用に取り組む。

2. 光熱変換光回折検出法の提案と原理検証 (第2章)

第2章ではナノ流路に適用可能な光熱変換分光法の開発を目的とした。本研究では流路サイズが波長と同等かそれ以下のときに顕著となる光回折現象に着目し、顕在化するガラス基板の影響を積極的に利用する光熱変換分光法を着想した。提案する光熱変換光回折検出法(POD: Photothermal Optical Diffraction)の原理を図1に示す。ナノ流路の幅(10^1 – 10^2 nm)は集光したレーザーのスポット径($\sim\mu\text{m}$)よりも小さいため、流路に集光照射されたプローブ光は溶液/ガラス界面を通過し、水とガラスの屈折率差(Δn)による回折光が生じる。プローブ光を重ねて励起光を集光照射すると、流路内の目的分子・粒子の励起光吸収・熱緩和(光熱変換効果)によって熱が発生する。熱拡散長($\sim\mu\text{m}$)は流路サイズよりも大きいいため、発生した熱の一部がガラス基板へと拡散し、水とガラスの温度が上昇する。水とガラスの温度変化に対する屈折率変化(dn/dT)の符号が逆であるため、発熱によって Δn が増加する。回折光強度は Δn に依存するため、流路内の目的分子・粒子による発熱を回折光強度の変化として

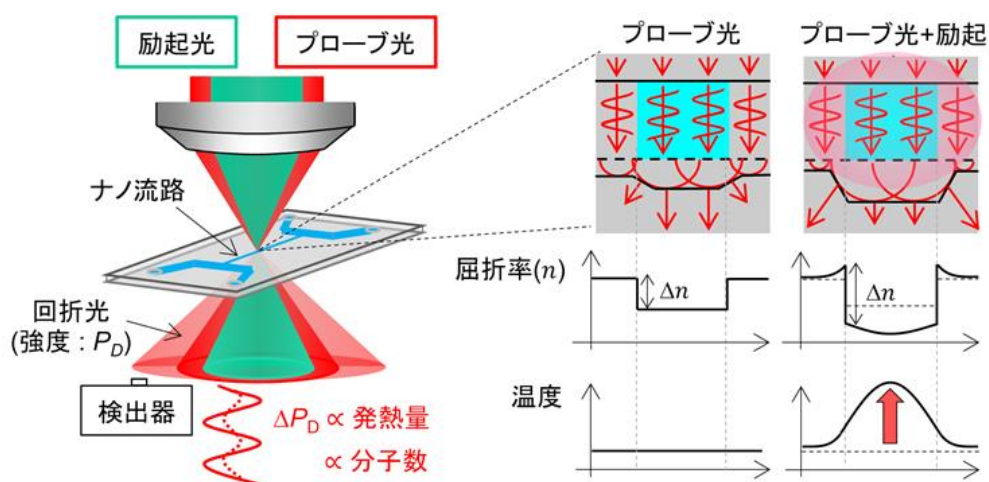


図 1. 光熱変換光回折検出法(POD)の原理

検出・定量することができる。PODは流路外へと拡散した熱が信号値に寄与する原理であるため、熱拡散が顕著な 10^1 – 10^2 nm空間に対しても高感度測定が可能である。

提案した原理に基づいて実験系を構築し、ナノ流路による光回折現象を検証した。実験結果はFresnel-Kirchhoff回折理論から導出した理論式による計算結果と一致し、流路が微小化することで回折光を透過光から高効率で分離できることが分かった。すなわち、 10^1 – 10^2 nm流路では光回折現象を利用した測定が実現可能であることが示された。

原理検証として、幅・深さ400 nmの流路に非蛍光分子であるSunset Yellow FCF水溶液を導入し、分子由来の信号の取得に成功した。さらに、検出原理を確認するための複数の実験を考案・設計し、信号が目的分子の光熱変換効果による回折光強度変化に起因していることを証明した。以上から、ナノ流路における光回折現象を利用した光熱変換分光法を初めて実現した。

3. 10^1 nm空間における濃度定量（第3章）

第3章では前章で開発したPODによって、 10^1 nm流路における高感度な濃度定量を実現することを目的とした。PODの濃度定量性を確認するため、幅・深さ400 nmの流路に対して検量線を作成した。信号値は濃度に比例して増加し、検量線の傾きと標準偏差から計算した検出限界(LOD)は2.5 μ Mであった。これは検出体積0.23 fL中の330分子(0.84 zmol)に相当し、 10^2 nm流路における高感度無標識分子検出を実現した。さらに、幅、深さ200–1200 nmの流路に対する検出性能を、従来法であるDIC-TLMと比較した。PODでは流路の微小化に対しても高感度を維持し、幅、深さ400 nm以下の流路に対しDIC-TLMと比較して2桁の性能向上を実現した。これはPODの原理では流路外へと拡散した熱が信号値に寄与するためであると考えられ、PODが 10^1 nm流路に対しても適用可能であることが示唆された。

そこで、 10^1 nm流路における無標識分子検出に取り組んだ。最初に 10^1 nm流路による光回折現象を検証し、PODの原理が 10^1 nm空間にも適用可能であることを確認した。実験条件を最適化することで、幅、深さ70 nmの流路(検出体積6.9 aL)に対して1200分子(2 zmol)のLODでの無標識分子検出・定量を実現した。さらに、有機溶媒によってPODの信号増強が可能であることを見出し、非蛍光分子であるSudan IVに対してアセトニトリルを溶媒とすることで30分子(7.8 μ M)のLODを達成した。以上によって 10^1 nm流路における高感度な無標識分子検出・定量を初めて実現した。

4. ナノ粒子カウンティング（第4章）

第4章ではPODによって光吸収に基づいたナノ粒子の検出と評価を実現することを目的とした。原理検証として直径20 nmの金ナノ粒子水溶液を幅800 nm、深さ710 nmの流路に導入し、ナノ粒子由来のパルス信号の取得に成功した。PODでは集光したレーザーのスポット径($\sim\mu$ m)がナノ流路(10^1 – 10^2 nm)よりも小さいため、流路内の全ての分子・粒子が検出領域を通過する。そのため、個々の分子・粒子をロスなく検出することで100%の検出効率を実

現できると考えた。流速や信号平均時間に対する信号値とカウント数の変化を測定することで粒子を高効率で検出できる条件を見出し、90%以上の検出効率でナノ粒子カウンティングを実現した。

さらに、PODでは個々のナノ粒子の通過位置が励起光スポットの中心部に制限されるため、信号強度が個々の粒子の吸光度に比例する。そこで、吸光度の違いによってナノ粒子の識別や評価ができると思った。直径20 nmと40 nmの金ナノ粒子混合水溶液を流路に導入し、各パルス信号の強度を測定したところ、各粒子サイズに由来するピークが見られ、パルス信号の強度が個々の粒子の吸光度に依存していることを確認した。以上によってナノ流体デバイスにおける光吸収に基づいたナノ粒子のサイズ評価を初めて実現した。

5. ナノ流体分析デバイスへの応用（第5章）

第5章では前章までを通して開発してきたPODによって、 10^1 – 10^2 nm流路を利用した極限分析デバイスを実現することを目的とした。はじめに、PODを 10^2 nm流路を利用した免疫分析(ELISA)及び分離分析(クロマトグラフィー)へと応用し、PODがナノ流体分析デバイスに適用可能であることを示した。極

限分析の実証として 10^1 nm流路における分離分析に取り組んだ(図2)。試料の体積規定サンプリング、クロマトグラフィーによる分離、PODによる無標識分子検出といった一連の化学プロセスを深さ90 nmの流路へと集積化し、 10^1 nm空間におけるfL試料の分離分析を初めて実現した。

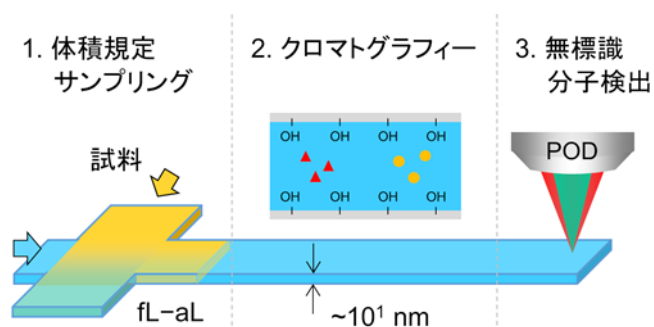


図 2. 10^1 nm 流路における分離分析の概要

6. 結言

本研究では 10^1 – 10^2 nm空間に適用可能な無標識分子検出法を開発し、超微小空間を利用した極限分析デバイスを実現した。最初に流路による光回折現象を利用した光熱変換光回折検出法(POD)を提案し、原理を検証した。次に、開発したPODによって 10^1 – 10^2 nm空間における濃度定量とカウンティングを実現した。最後に、 10^1 – 10^2 nm流路を利用した極限分析へと展開し、 10^1 nm空間におけるfL試料の分離分析を実証した。本研究成果は、超微小空間に適用可能な無標識分子検出法を新たに創成することによって、 10^1 – 10^2 nm空間へ展開するための基盤技術を確立した学術的に極めて重要な成果である。本手法を起点とすることで、孤立分子と凝縮相の境界である 10^1 – 10^2 nm空間に対する新たな学術的知見や、分子・微粒子と同等のサイズの空間を利用した様々な極限分析の実現が期待され、化学・生物学分野の発展に大きく貢献すると考えられる。