

氏名(本籍)	なかもと こうへい (香川県)		
学位の種類	博士(工学)		
学位記番号	博甲第6027号		
学位授与年月日	平成24年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	数理物質科学研究科		
学位論文題目	Study of Micro/Nano Structured Sensing Device for Biosensor Application (生体サンプル中の疾病マーカー測定を目指したマイクロ・ナノバイオセンシングデバイスの研究開発)		
主査	筑波大学連携大学院教授	工学博士	丹羽 修
副査	筑波大学教授	博士(工学)	鈴木博章
副査	筑波大学教授	工学博士	長崎幸夫
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	辻村清也

論文の内容の要旨

本論文は、6章から構成されており、第1章を緒言とし、第2章から第5章を実験項、第6章を総括としている。近年、疾患に関連する生体サンプル中の様々なバイオマーカーを簡便に測定する必要性が高まっており、 μ TASやLab on a Chipと呼ばれる微小分析システムの研究が盛んに行われている。リアルタイム、非標識での測定が可能な表面プラズモン共鳴 (SPR) 法は簡便、迅速なポイントオブケアデバイスの測定原理として応用できる可能性がある一方で、屈折率変化を測定する検出原理上、小分子に対する感度が低いという問題点があり、生体サンプル中の小分子のバイオマーカーの測定には不向きであった。同時に、現在主に用いられているクレッチマン配置では、プリズムが必要である上に光学配置が複雑という問題があり、さらなる簡便化が求められる。そこで本研究は生体サンプル中に存在する多様な種類の疾病マーカーを、より簡便な金属ナノ構造を利用した光学配置を採用した SPR センサを構築することを目的とした。

第1章では、医療などの分野で集積化されたマイクロデバイスが求められる背景をまとめ、これを可能とする微細加工の技術背景とともに、検出原理として用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) 法に関して整理した。この背景および既往の研究をふまえ、本研究の目的を示した。さらに、本研究における特徴および論文の構成を示した。

第2章では、尿中に存在する疾病マーカー (トランスフェリン) とその濃度補正マーカー (クレアチニン) を同時に測定可能なマイクロセンシングチップの作製を行った。検出原理にはリアルタイム、標識無での測定が可能な SPR 法を用いた。通常 SPR 法は小分子に対する感度が低いという問題点が存在するが、本研究では、センシング表面に可逆な酸化還元特性を示すオスmium錯体ポリマーを修飾し、シグナルを増幅させることによりこの問題を解決した。尿中に含まれる妨害物質の除去を検討した後、ヒト尿サンプル中のトランスフェリン濃度を測定したところ、クレアチニン濃度を補正することでサンプル間のばらつきを低減できることを確認した。

第3章では、ナノインプリント法により作製した金のナノホール構造を用いた SPR センサデバイス開発

を行った。金ナノホールアレイを用いる場合、そのサイズや周期性が測定感度に大きく影響することが知られている。まず、金の膜厚、ホールの深さ、周期性をそれぞれ変化させ、バイオセンサ应用到に最適な表面の構築を検討した。また比較のため、有限差分時間領域法 (Finite Difference Time Domain Method: FDTD 法) を用いて金ナノ構造表面の電場分布と得られる反射スペクトルを計算し、実験結果との比較を行った。その結果、ホールの深さ、周期がそれぞれ 50nm、150nm の時に最も高感度な基板が得られることを明らかにした。さらに、基板上にキャプチャー抗体を固定化することで、疾病マーカーの一種である TNF- α の定量を行い、2次抗体に金ナノ粒子を標識して増幅することにより 21ng/mL の検出限界を達成した。

第4章では、第3章にて構造を最適化した金ナノホールアレイ上にオスmium錯体ポリマーを修飾し、その特性を電気化学測定と反射スペクトル取得を同時に行うことで、オスmium錯体の酸化還元と SPR ディップの関係性を検討した。その結果、オスmium錯体が酸化されることにより、反射スペクトル中の SPR ディップ波長が膜厚により 3-10nm 程度変化することを確認した。この波長シフトの変化速度から基質の定量が可能であり、複数検討した膜厚からディップシフト量と半値幅を考慮し最適なものを選択したのち、過酸化水素の測定検討を行った。その結果、検出下限が 10 μ M、直線域が 10-250 μ M であることを確認し、金ナノホール構造を用いた SPR デバイスでも小分子の計測が可能であることを示した。

第5章では、これまで行っていた金の積層法を蒸着法からスパッタ法に変更することにより、ポリマーナノホール構造上に独立した金のピラー構造を作製する手法を検討した。通常 20nm を下回るような金属ナノギャップ構造を作製するためにはエッチングプロセスが必要となるが、本手法ではそのようなエッチングプロセスを必要とせず、スパッタリングによる金のまわりこみの作用と、ホール壁面のマスク機能を組み合わせることにより、ボトムアップ的に金のナノピラー構造を作製した。中心部にピラー構造を有する場合、得られた反射スペクトルに二種類の SPR ディップが得られた。これは蒸着法によって作製された金ナノホール構造からは確認されなかった現象であり、ナノピラーと周囲のホール構造の近接効果により得られたものと考えられる。

第6章では各実験項で得られた結果に関して総括を行い、作製したマイクロ/ナノ構造を用いたセンサの今後の可能性について提案している。

審査の結果の要旨

現在、バイオセンシング応用を見据えた、小型の光学デバイスの研究開発が盛んに行われており、本論文では、主に金ナノホール構造を用いたリアルタイム、非標識での測定が可能な表面プラズモン共鳴 (SPR) デバイス構築を目的とした研究を行っている。著者は初めに、尿中に存在する疾病マーカーを、補正分子であるクレアチニン濃度も同時に測定できるマイクロセンシングチップを構築した。クレアチニンは通常 SPR 法での測定が感度の問題から難しいが、著者は金薄膜表面にオスmiumポリマーを修飾することでシグナルの増幅に成功し、両物質の SPR 法による迅速な測定を達成した。続いて著者は、これまで主に用いられてきたクレッチマン配置と呼ばれるプリズムを用いた形式の SPR デバイスをより小型、簡便化されたバイオセンサを構築するために、金ナノホール構造を用いた SPR デバイスの作製に取り組んだ。まず、このような金属ナノ構造を用いる際、その形状やサイズ、周期性が感度に大きな影響を与えることが知られていることから、著者は金ナノホール構造の形状を実験、計算の両面から検討することにより、可視光中でバイオセンシングに最適な金ナノホールアレイを構築した。最適化された構造は、ナノ構造を大面積に一括転写することができる光ナノインプリント法を用いてプラスチック基板に転写され、抗原抗体反応を用いたタンパク質検出に応用された。この結果、ナノホール構造を用いた測定においても従来のクレッチマン配置と同程度の検出限界を、より小型化されたデバイス構造で達成し、バイオセンシング素子としての可能性を示した。

低分子の検出においても2章で行った酵素反応に伴うオスミウム錯体高分子の酸化還元状態変化を SPR 法で、検出する方法が、金ナノホールアレイ上でも可能な事を実証した。

さらに著者は、より電場の増強が期待される金属ナノギャップ構造の構築にも取り組み、金属の積層方法と、下地のポリマーナノホール構造の深さをコントロールするのみで、アスペクト比4以上の金ナノピラーを周囲のホール構造と独立して作製する手法を確立した。本論文を通し、著者は新たな金ナノ構造の作製、検討を通じ表面プラズモン共鳴法を用いた新たなポイントオブケアデバイスの検出原理として利用可能であることを示し、本研究の目的を達成している。

平成24年2月13日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。