



蛍光検出型バイオセンサ応用に向けたシリコン量子ドットの発光増強および抗体修飾に関する研究

柳川, 博人

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2020-03-25

(Date of Publication)

2021-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7765号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007765>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(別紙様式 3)

論文内容の要旨

氏 名 _____ 柳川 博人 _____

専 攻 _____ 電気電子工学専攻 _____

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

蛍光検出型バイオセンサ応用に向けた

シリコン量子ドットの発光増強および抗体修飾に関する研究

指導教員 _____ 藤井 稔 教授 _____

(注) 2, 000 字～4, 000 字でまとめること。

生体分子の優れた分子認識能力を積極的に利用したセンサはバイオセンサと呼ばれる。バイオセンサは、夾雑物が存在する環境下で検出対象に特異的に働きかける分子認識部と、分子認識部で発生した生物学的事象を物理信号に変換する信号変換部(トランスデューサ)から構成され、バイオセンサの新たな応用分野の開拓に向けて高感度かつ安価なトランスデューサが求められている。トランスデューサに関して、従来広く用いられてきた電気化学型に対して、高感度、連続検出、複数同時検出の可能性を有する光検出型が、近年のレーザーや光ファイバの高性能化・小型化を背景にトランスデューサの研究開発の中心となっている。抗体の極めて高い特異的結合性と光検出型トランスデューサと融合した、サンドイッチイムノアッセイ法を用いた蛍光検出型バイオセンサは検出対象を高感度に検出できる特徴を有しているおり注目されている。蛍光検出型バイオセンサは、基板上に固定化した 1 次抗体で検出対象を捕捉し、その上に蛍光標識した 2 次抗体を結合させ、外部からの照射光により蛍光体を励起しその蛍光強度から抗原である検出対象を定量する。その主な構成要素は、抗体、蛍光体、基板である。高感度化には、高い結合性を有する抗体、生体分子の自家蛍光回避のため長波長域で高い発光増強を有する基板、大きいストークスシフト・小さい蛍光劣化・長波長励起・近赤外発光の蛍光体が求められる。バイオセンサの高感度化に向けた研究開発は盛んであるものの、実用化に向けては課題が残されている。課題の 1 つは大面積プラズモニク基板である。半導体微細加工プロセスと計算機の発展を背景に高い発光増強を有する様々な金属ナノ構造が提案されているが、半導体プロセスは生産スループットが低いため高コストであり、概念実証には適するが実用化には適さない。もう 1 つの課題は蛍光体である。従来広く用いられてきた有機蛍光色素は、著しい蛍光劣化と小さいストークスシフトが高感度化の阻害要因となっている。代替として化合物半導体量子ドットの研究が盛んだが、その多くは Cd など人体及び環境への悪影響が懸念される元素を含むため、研究室での概念実証には使用できても実用化には適さない。

そこで本研究では、高感度バイオセンサの実用化に向けて、最大課題であるプラズモニク基板と蛍光体に焦点を絞り、要素技術の研究開発を行った。新規プラズモニク基板の開発では、ナノインプリントリソグラフィ(nanoimprint lithography ; NIL)で作製された 3 次元ナノ構造を有する NIL フィルム上に金属成膜することにより、高い発光増強、大面積均一性、構造再現性、生産性を有するプラズモニク基板を開発し、そのプラズモニク特性を実験及びシミュレーションにより明らかにした上で、表面増強蛍光を用いたサンドイッチイムノアッセイに適用しインフルエンザウイルスの核タンパク質を検出することでバイオセンサに応用できることを実証した。新規蛍光体は我々の研究グループで開発したホウ素(B)、リン(P)同時ドーピング Si 量子ドットのバイオセンサ応用に向けた要素技術を構築した。B,P 同時ドーピング Si 量子ドットはコア/シェル構造を有することにより、人体・環境適合性に加え、優れた近赤外発光発光、発光安定性、水溶媒分散性、表面機能化自由度を有しており、バイオセンサの高感度化に寄与することが期待される。Si 量子ドットの課題である長波長励起での小さい吸収断面積の解決に向け、NIL プラズモニク基板の金

属ナノ構造による表面プラズモンと結合させることで、長波長光子による Si 量子ドットの吸収断面積増大及び輻射遷移割合増大の同時増強を実現した。また、バイオセンサに適用するためには、Si 量子ドット表面に所望の官能基を形成し、抗体と結合させる必要がある。そこで、B,P 同時ドーブ Si 量子ドットの水溶性分散性と近赤外発光特性を保持しつつ、Si 量子ドット表面に官能基を形成する表面機能化プロセス、及び表面機能化 Si 量子ドットと抗体を共有結合させる複合体形成プロセスを開発し、複合体形成後の抗体が抗原との結合性を、複合体形成後の Si 量子ドットが近赤外発光特性を保持していることを実証した。

第 1 章では、蛍光検出型バイオセンサを説明した上で、高感度化に向け各構成要素に求められる要件を抽出した。次に、重要な構成要素であるプラズモニック基板及び蛍光体に関して、先行研究をレビューし、実用化に向けた技術課題について述べ、課題解決に向けたアプローチとして NIL プラズモニック基板、及び B,P 同時ドーブ Si 量子ドットについて説明した。その後、本研究の目的、及び本論文の構成について述べた。

第 2 章では、NIL プラズモニック基板の開発について述べた。本研究では、高感度蛍光検出型バイオセンサの実現に向け、優れた設計自由度、大面積均一性、構造再現性、生産性を有する NIL プラズモニックを開発した。従来の NIL プラズモニック基板はプラズモン共鳴がブロードであるため、高い発光増強が得られないことに加えて、シミュレーション結果とも一致しないため電場分布及びホットスポット位置の特定ができず、プラズモニック基板の特性改善には試行錯誤に頼らざるを得なかった。本研究では、Au ナノ構造における Au 表面平滑性を改善することによりシミュレーション予測と同等にシャープなプラズモン共鳴を実現したことで、電場分布、ホットスポット位置、及びプラズモニックモードを明らかにできた。さらに、開発した NIL プラズモニック基板のバイオセンサ応用可能性を、インフルエンザウイルスの核タンパク質検出により実証した。

第 3 章では、NIL プラズモニック基板による Si 量子ドットの発光増強について述べた。本研究では、優れた発光特性及び発光安定性を有する我々の研究グループで開発した B,P 同時ドーブ Si 量子ドットのバイオセンサ応用に向けて、Si 量子ドットの課題である長波長励起での小さい吸収断面積を、NIL プラズモニック基板によるプラズモンとの結合により解決した。NIL プラズモニック基板上に Layer by Layer 法で形成したポリマースペース層を用いて Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離を厳密に制御し、発光励起スペクトル、発光スペクトル、及び発光減衰ダイナミクスと、反射スペクトルを詳細に解析することで、プラズモンとの結合により Si 量子ドットの長波長光子における吸収断面積増大及び輻射遷移割合増大の同時増強を明らかにした。また、発光増強の Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離依存性を明らかにすることで、バイオセンサの高感度化に向けた蛍光体配置位置を示した。

第 4 章では、シランカップリング分子による Si 量子ドットの表面機能化について述べた。本研究では、B,P 同時ドーブ Si 量子ドットを抗体と結合させるために、シランカップリング分子を用いてアミノ基、エポキシ基に表面機能化するプロセスを開発した。シランカッ

プリング分子構造、及び Si 量子ドットとシランカップリング分子の分子数混合比を制御することにより、B,P 同時ドーブ Si 量子ドットが有する水溶性分散性及び近赤外発光特性を保持しつつ、Si 量子ドット表面をアミノ基及びエポキシ基に修飾できる表面機能化プロセスを構築した。

第 5 章では、抗体と表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成について述べた。本研究では、第 4 章で開発したプロセスで表面機能化した Si 量子ドットを用いて、抗体との複合体形成プロセスを開発した。アミノ基で機能化した Si 量子ドットと抗体のカルボキシル基をペプチド結合させ、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体が形成されていることを、電気泳動、動的散乱(Dynamic light scattering ; DLS)、及び透過型電子顕微鏡(Transmission electron microscopy ; TEM)により、詳細に解析し、表面機能化 Si 量子ドットが IgG 抗体の軽鎖及び重鎖に共有結合していることを明らかにした。さらに、複合体形成後の Si 量子ドットが近赤外発光を保持していることと、複合体形成後の IgG 抗体が抗原との特異的結合性を保持していることを明らかにし、抗体の特異的結合性と B,P 同時ドーブ Si 量子ドットの近赤外発光特性を保持しつつ、抗体-Si 量子ドットの複合体形成プロセスを構築した。

最後に、第 6 章で本研究のまとめを述べた。

氏名	柳川 博人		
論文題目	蛍光検出型バイオセンサ応用に向けたシリコン量子ドットの発光増強および抗体修飾に関する研究		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	藤井 稔
	副査	教授	喜多 隆
	副査	教授	北村 雅季
	副査		
			印
要 旨			
<p>生体分子の優れた分子認識能力を積極的に利用したセンサはバイオセンサと呼ばれる。バイオセンサは、夾雑物が存在する環境下で検出対象に特異的に働きかける分子認識部と、分子認識部で発生した生物学的現象を物理信号に変換する信号変換部(トランスデューサ)から構成され、バイオセンサの新たな応用分野の開拓に向けて高感度かつ安価なトランスデューサの実現が求められている。近年、レーザーや光ファイバの高性能化・小型化を背景に、従来広く用いられてきた電気化学型トランスデューサに対して高感度、連続検出、複数同時検出等の特徴を有する光検出型トランスデューサが研究開発の中心となっている。特に、抗体の極めて高い特異的結合性と光検出型トランスデューサを融合したサンドイッチ型ノアッセイ法を用いた蛍光検出型バイオセンサは、検出対象を高感度に検出できるため注目されている。蛍光検出型バイオセンサは、基板上に固定化した1次抗体で検出対象を捕捉し、その上に蛍光標識した2次抗体を結合させ、外部からの照射光により蛍光体を励起しその蛍光強度から抗原である検出対象を定量する。その主な構成要素は、抗体、蛍光体、基板である。蛍光検出型バイオセンサの高感度化には、高い結合性を有する抗体、長波長域で発光増強特性を有する基板、大きいストークスシフト・小さい蛍光劣化・長波長励起・近赤外発光等の性質を有する蛍光体の開発が必要である。</p> <p>本研究では、蛍光増強基板と蛍光体に焦点を絞り、蛍光検出型バイオセンサの高感度化に向けた要素技術の開発を行った。蛍光増強基板として、金属ナノ構造の表面プラズモン共鳴を利用したプラズモニック基板の開発を行った。センサの実用化を考えると、電子ビーム描画等の微細加工技術によるプラズモニック基板の製造はコスト的に現実的ではないため、ナノインプリントリソグラフィと金属成膜により構造再現性、均一性、高い発光増強特性等の特徴を有する基板の開発を行った。蛍光体に関しては、従来広く用いられてきた有機蛍光色素は、著しい蛍光劣化と小さいストークスシフトが高感度化の阻害要因となっている。その代替として化合物半導体量子ドットが検討されているが、その多くはカドミウムなど人体及び環境への悪影響が懸念される重金属元素を含むため、研究室での概念実証には使用できても実用化には適さない。本研究では、所属研究室で最近開発された、ホウ素とリンを同時ドーピングしたシリコン量子ドットを蛍光検出型バイオセンサの蛍光体として用いることを検討した。この量子ドットは、生体・環境に対する高い親和性、優れた近赤外発光特性、高い発光安定性、水溶性分散性、表面機能化自由度などの特徴を有しており、バイオセンサの高感度化の実現を可能にする新材料であると期待されている。</p> <p>本論文は、蛍光検出型バイオセンサの高性能化のための要素技術として、シミュレーションと実験によるプラズモニック基板の開発、プラズモニック基板によるシリコン量子ドットの発光増強の評価、シリコン量子ドット表面に官能基を形成する表面機能化プロセスの開発、表面機能化シリコン量子ドットと抗体を共有結合させた複合体形成プロセスの開発、に関する成果をまとめている。本論文は以下の6章から成る。</p> <p>第1章では、蛍光検出型バイオセンサの基本的な構造・原理を説明したあと、その高感度化のため</p>			

氏名	柳川 博人
<p>に各構成要素に求められる要件を抽出した。次に、重要な構成要素であるプラズモニック基板及び蛍光体に関して、先行研究をレビューし、実用化に向けた技術課題と課題解決に向けたアプローチについて詳しく説明した。</p> <p>第2章では、ナノインプリントリソグラフィと金属成膜によるプラズモニック基板の開発について詳説している。この方法によるプラズモニック基板の形成は以前から報告されているが、従来のものは表面プラズモン共鳴が非常にブロードであり、発光増強度が比較的低いことが課題であった。特に、表面ラスネスに起因する構造の複雑さから光散乱スペクトルが実験とシミュレーションでほとんど一致せず、電場分布及びホットスポット位置が不明であることが、特性改善の妨げになっていた。本研究では、金属(金)成膜時の条件を見直し、金表面の平滑性を改善することにより、シミュレーションと非常に良い一致を示すシャープな共鳴を有するプラズモニック基板の開発に成功した。シミュレーションと高い一致を示すため、電場分布が明らかになると共に、発光増強に寄与するモードの同定が可能になった。最後に、インフルエンザウイルスの核タンパク質検出により、開発したプラズモニック基板のバイオセンサ応用可能性を実証した。</p> <p>第3章では、プラズモニック基板によるシリコン量子ドットの発光増強に関する研究の結果をまとめている。シリコン量子ドットを蛍光検出型バイオセンサの蛍光体として用いる場合、シリコン量子ドットの光吸収断面積が可視光領域で小さいことが課題となる。プラズモニック基板を用いる事により、シリコン量子ドットの実効的な吸収断面積を増強できる可能性がある。そこで、プラズモニック基板上に距離を非常に精密に制御してシリコン量子ドットを配置し、発光励起スペクトル、発光スペクトル、発光寿命、反射スペクトルの距離依存性を詳細に調べた。尚、距離の制御はLayer by Layer法で形成したポリマースペース層を用いて行った。その結果、適切な配置において、シリコン量子ドットの励起プロセスと発光プロセスを同時に増強することが可能であることが明らかになった。</p> <p>第4章は、シリコン量子ドットと抗体の複合体の前段階として、シランカップリング分子によるシリコン量子ドットの表面機能化についての研究成果をまとめている。様々なシランカップリング分子を用いて、シリコン量子ドット表面をアミノ基及びエポキシ基で表面機能化するプロセスを開発した。シランカップリング分子を適切に選択することと、シリコン量子ドットとシランカップリング分子の分子数混合比を制御することにより、シリコン量子ドットの水溶性分散性及び近赤外発光特性を保持した状態で、表面をアミノ基及びエポキシ基で機能化するプロセスを構築した。</p> <p>第5章では、表面機能化シリコン量子ドットと抗体の複合体形成プロセスと複合体形成の実証について述べている。第4章で開発したアミノ基で機能化したシリコン量子ドットと、抗体のカルボキシル基をペプチド結合させ、IgG抗体-シリコン量子ドット複合体を形成した。複合体を、電気泳動、動的光散乱、透過型電子顕微鏡により詳細に解析したところ、シリコン量子ドットがIgG抗体の軽鎖及び重鎖に共有結合していることが明らかになった。さらに、複合体形成後のシリコン量子ドットが近赤外発光特性を保持していること、及び複合体形成後のIgG抗体が抗原との特異的結合性を保持していることを明らかにした。</p> <p>最後に、第6章で本研究のまとめを述べている。</p> <p>以上の様に、本研究では、サンドイッチ型ノアッセイ法を用いた蛍光検出型バイオセンサの高性能化に向けて、プラズモニック基板の開発とシリコン量子ドット蛍光体の実装に関する研究を行った。本研究により、シリコン量子ドットを蛍光体とする蛍光検出型バイオセンサの実現に必要なすべての要素技術が揃った。本論文で得られた成果は、高生体親和性・高環境親和性半導体ナノ材料であるシリコン量子ドットのバイオフォトンクス応用に関する研究を大きく前進させるものであり、価値が高い。研究成果は、国際的に評価の高い学術雑誌に掲載されるなど高い評価を得ている。提出された論文は工学研究科学学位論文評価基準を満たしており、学位申請者の柳川博人は、博士(工学)の学位を得る資格であると認める。</p>	