

平成30年6月25日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03009

研究課題名(和文) ナノインプリント製フォトニック結晶ナノ共振器を用いたエピゲノム解析デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of nanoimprint lithography-based photonic crystal nanocavity for epigenome analysis

研究代表者

遠藤 達郎 (Endo, Tatsuro)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40432017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ナノメートルサイズの構造が周期的に配列した光学素子「フォトニック結晶」へ欠陥部位を導入することで、欠陥部位内へ特定波長の光を閉じ込め・増幅する機能を有するフォトニック結晶ナノ共振器を、ポリマーを基材として用い、ナノインプリントリソグラフィーを用いて作製し、エピゲノム解析への応用を行う、ことにある。

本研究では、可視領域の光を閉じ込め・増幅可能なフォトニック結晶ナノ共振器を設計・作製することに成功した。加えて作製したフォトニック結晶ナノ共振器は、DNAハイブリダイゼーションおよびエピゲノムの一つであるDNAメチル化を検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, design and fabrication of polymer-based photonic crystal nanocavity using nanoimprint lithography was successfully achieved. The Photonic crystal is an optical device which has a periodic dielectric nanostructure. In addition, when the single defect was introduced into photonic crystal, the specific wavelength of light will be confined in the cavity. Furthermore, the confined light wavelength and intensity will be drastically changed due to the surrounding refractive index change such as DNA hybridization. Based on these characteristics of photonic crystal nanocavity, in this study, polymer-based photonic crystal nanocavity was designed which can be confined the light in visible region. By using polymer-based photonic crystal nanocavity, DNA hybridization and DNA methylation could be detected high sensitively.

研究分野：センサー工学

キーワード：フォトニック結晶 バイオセンサー ナノインプリントリソグラフィー エピゲノム解析 DNA

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会が本格化する中、我が国の認知症患者は400万人を超えるといわれる。認知症は、介護負担が大きく、社会に対する負のインパクトも大きいことから、認知症の早期診断・予防法の開発は急務である。近年、認知症疾患の中でも最も頻度の高いアルツハイマー病は、専門医による問診(川畑信也、治療、(2012) 94, pp. 1163-1167.)や酵素免疫測定(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)法を用いたマーカー分子検出(M. Shoji *et al.*, *J. Neurobiol. Sci.*, (1998) 158, pp. 134-140.)のほか、アルツハイマー病関連遺伝子のDNAメチル化が発症・重篤化に関与し、これを検出(エピゲノム解析)することが早期診断に有効であることが報告されている(K. Lunnon *et al.*, *Nat. Neurosci.*, (2014) 17, pp. 1164-1170.)

しかしバイサルファイト法(S. C. Wang *et al.*, *PLoS One*, (2008) 3, e2698.)等、従来のメチル化DNA検出法は、以下の点で問題があった。

- (1)煩雑な操作・長い分析時間を必要とする
- (2)感度が低い(ng/mlオーダー)
- (3)大型・高額なDNAシーケンサーが必要

これは、「メチル化」というわずかな分子量・構造変化を検出する必要があるためである。これでは、アルツハイマー病等認知症の早期診断が困難となり、重篤化を招く恐れがある。上記問題を解決するために、簡便・迅速・高感度にエピゲノム解析が可能なデバイスが求められている。

一方で、ナノ光学素子「フォトニック結晶(Photonic crystal: PhC)」が注目されている。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し、周期・サイズ・アスペクト比を制御することで、任意の波長の光を回折・反射させることが可能である(A. Mekis *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, (1996) 77, pp. 3787-3790.)。そして、その反射波長および強度は、PhC周囲の屈折率に依存して鋭敏に変化することが明らかとなっている(Y. A. Ylasov *et al.*, *Nature* (2005) 438(3) pp. 65-69.)

近年ではPhCが有する光学特性を利用し、光通信高速化・大容量化や太陽電池の発電効率向上、発光ダイオード高輝度化を目指した研究が世界で盛んに進められている(J. D. Joannopoulos *et al.*, *Nature* (1997) 386 pp. 143-149., D. H. Ko *et al.*, *Nano Lett.*, (2009) 9(7) pp. 2742-2746.)

またPhCを利用し、抗原抗体反応の検出等バイオセンサーの有用性がこれまでに明らかにされている(W. Zhang *et al.*, *Sens. Actuators B: Chem.* (2008) 131(1) pp. 279-284.)

- (1)光通信応を指向した設計であるため赤外波長の光源(1550 nm)を使用している
- (2)数ミリメートルサイズのPhCを作製するのに10~20時間を要し、量産が現実的に困難

(3)バイオセンサー応用に適したPhCの設計が明らかになっていないという問題があった。

## 2. 研究の目的

前述した背景から本研究の目的は、バイサルファイト法等煩雑な操作の必要なく可視領域の光でDNAメチル化およびDNAハイブリダイゼーションに起因するわずかな分子量・構造変化を屈折率変化として高感度に直接検出可能なポリマー製「フォトニック結晶(Photonic crystal: PhC)ナノ共振器」を設計・開発し、アルツハイマー病関連遺伝子のエピゲノム解析へと応用する、ことにある。加えてポリマー製PhCナノ共振器は、ポリマー表面へナノ構造を簡便かつ迅速に転写する技術である、ナノインプリントリソグラフィ(Nanoimprint lithography: NIL)を用いて作製することとした。

また本研究では、既存の技術を凌駕する性能(簡便性・感度)でエピゲノム解析が可能なデバイスの開発を通じて、デバイスの有用性評価を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下に示す項目を実施した。

NILを用いたPhCナノ共振器の作製  
NIL装置でサイズ・形状・単位面積当たりの欠陥導入数を変化させたPhCナノ共振器を作製した。

屈折率応答性評価とエピゲノム解析用PhCナノ共振器の設計決定  
微小な屈折率変化を高感度に検出可能なPhCナノ共振器の設計を決定する。

PhCナノ共振器表面へのプローブDNA固定化とDNAメチル化の検出  
PhC表面へアルツハイマー病関連遺伝子配列を有するプローブDNAを固定化し、DNAメチル化・DNAハイブリダイゼーションによって生じる屈折率変化の検出・定量実験を行う。

上記研究項目を実施することにより、本研究では、DNAメチル化によって生じる屈折率変化を高感度に直接検出可能なPhCナノ共振器の設計、PhCナノ共振器を用いてエピゲノム解析を行い、DNAメチル化の差異、既存の検出方法との優位性、を明らかにする。

## 4. 研究成果

前述した研究項目実施によって得られた成果は以下のとおりである。

NILを用いたPhCナノ共振器の作製  
本研究項目では、有限差分時間領域法(Finite-difference time-domain method: FDTD法)を用いたシミュレーション解析を通じてポリマーを基材としたPhCナノ共振器の設計を行った。併せてシミュレーション解析によって明らかとなった最も高い光閉じ込め・増幅能を有するナノ共振器構造を、

NIL を用いて作製した。

シミュレーション解析では、ナノ共振器の欠陥導入数を変化させ、共振器内の光閉じ込め・増幅効率評価を行った結果、導入数が3の時、最も高い効率を示すことが明らかとなった。

また、欠陥導入する3とした PhC ナノ共振器を NIL にて光硬化性樹脂へ作製した結果、作製することに成功した。しかし、作製した PhC ナノ共振器のサイズが設計値よりも大きくなることが明らかとなった。これは、NIL 時の鑄型押し付け圧力が高すぎたためと考えられる。

#### 屈折率応答性評価とエピゲノム解析用 PhC ナノ共振器の設計決定

研究項目 で得られた成果を基に屈折率応答性評価を行った。前述したように PhC ナノ共振器は、周囲の屈折率変化に対して鋭敏に共振器内への光閉じ込め・増幅効率に変化する。本研究では、メチル基含有あるいは非含有ターゲット DNA があらかじめ固定化されているプローブ DNA とハイブリダイゼーションした際に生じるわずかな屈折率変化を検出・定量可能なデバイスを開発することを指向しているため、このメチル基の有無を顕著な光閉じ込め・増幅効率変化として検出可能となることが望ましい。

屈折率応答性評価は、Layer-by-Layer (LbL) 法を用いて正負異なるポリマー層を静電的に堆積させ、ポリマー層数と PhC ナノ共振器より観察される光学特性変化との相関を評価した。LbL 法を用いて屈折率応答性評価を行った結果、本研究で作製した PhC ナノ共振器は、ポリマー層 1 nm につき、1.3 nm 共振波長がレッドシフトすることが明らかとなった。このシフト量は、本研究で測定対象とする DNA の場合、塩基間の間隔が 0.34 nm から、約 3 塩基分の長さを有する DNA に対して 1.3 nm シフトすることを示唆している。この結果から、本研究で設計・作製した PhC ナノ共振器は、エピゲノム解析への応用を行うのに、十分な感度を有していることが示唆された。

#### PhC ナノ共振器表面へのプローブ DNA 固定化と DNA メチル化の検出

研究項目 で得られた成果を基に本研究項目では、作製した PhC ナノ共振器を用いてプローブ DNA 固定化および DNA メチル化の検出を試みた。

本研究では、25 塩基を有するプローブ DNA を固定化した後、異なる濃度に調製したメチル基含有あるいは非含有のターゲット DNA 溶液を滴下、ハイブリダイゼーションさせた。その後 PhC ナノ共振器より観察される光学特性変化量から、メチル化の検出を試みた。

その結果、低濃度域 (1 nM~100 nM) においては、メチル基含有・非含有とで顕著な

差は検出することはできなかったが、1  $\mu$ M 以上の濃度となると、メチル基非含有ターゲット DNA の方が変化量が大きくメチル化を検出することに成功した。

低濃度のメチル化 DNA を検出可能とするには、基材であるポリマー中へ高屈折率材料を添加することによって、PhC ナノ共振器と試料との相対的な屈折率差を大きくすること考えられる。今後は、更なる性能向上を指向した PhC ナノ共振器の設計・作製条件の改善を行い、低濃度域のメチル化 DNA の検出およびメチル化部位の断定を行うことを計画している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

- (1) Shoma Aki, Kenji Sueyoshi, Hideaki Hisamoto, Tatsuro Endo, Origin of the Optical Response of a Dye-doped Plasticized Poly(vinyl chloride)-based Photonic Crystal Ion Sensor, *Analytical Sciences*, 査読有, Vol. 33, No. 11, 2017, pp.1247 - 1251

[学会発表](計20件)

- (1) 遠藤達郎, ポリマー製フォトニック結晶への高次機能付与とセンサ応用, 2017
- (2) 安藝翔馬, 前野権一, 佐藤和郎, 村上修一, 山東悠介, 金岡祐介, 末吉健志, 久本秀明, 遠藤達郎, 脂質二重膜チャンバーを有する TiO<sub>2</sub> 製フォトニック結晶の作製と光学特性評価, 第78回応用物理学会秋季学術講演会, 2017
- (3) 前野権一, 安藝翔馬, 佐藤和郎, 村上修一, 山東悠介, 金岡祐介, 末吉健志, 久本秀明, 遠藤達郎, ポリマー製フォトニック結晶共振器, 第78回応用物理学会秋季学術講演会, 2017
- (4) 山田大空, 前野権一, 安藝翔馬, 久本秀明, 末吉健志, 遠藤達郎, 可視光での高感度センシングを指向した積層構造を有するプラズモニク結晶構造の検討と光学特性評価, 第78回応用物理学会秋季学術講演会, 2017
- (5) 安藝翔馬, 前野権一, 末吉健志, 久本秀明, 遠藤達郎, TiO<sub>2</sub>/ポリマーハイブリッド型フォトニック結晶スラブを用いた高感度蛍光イオンセンサの開発, 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2017
- (6) 遠藤達郎, 西口輝一, 山田大空, 前野権一, 安藝翔馬, 末吉健志, 久本秀明, Au/Ag 交互積層による局在表面プラズモン共鳴光学特性のチューニング, 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2017
- (7) 前野権一, 安藝翔馬, 佐藤和郎, 村上修一, 山東悠介, 金岡祐介, 末吉健志, 久

- 本秀明, 遠藤達郎, 単一細胞分析を指向したナノインプリント製フォトニック結晶ナノ共振器, 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2017
- (8) 町野泰基, 孫佳儀, 前野権一, 安藝翔馬, 佐藤和郎, 村上修一, 山東悠介, 金岡祐介, 末吉健志, 久本秀明, 遠藤達郎, 室温硬化ガラスを基材としたフォトニック結晶導波路の設計と作製, 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2017
- (9) 山田大空, 安藝翔馬, 前野権一, 久本秀明, 末吉健志, 遠藤達郎, 可視光領域における高感度バイオセンサー応用を指向したプラズモニック結晶の構造検討及び光学特性評価, 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2017
- (10) 西辻凌輔, 末吉健志, 三宅眞実, 久本秀明, 遠藤達郎, ナノインプリント製フォトニック結晶を用いる DNA 非標識検出法の検討, 第39回日本バイオマテリアル学会大会, 2017
- (11) 川崎大輝, 山田大空, 西辻凌輔, 前野権一, 安藝翔馬, 末吉健志, 久本秀明, 遠藤達郎, プラズモニックナノコーンアレイの作製と高感度遺伝子診断デバイスへの応用, 第65回応用物理学会春季学術講演会, 2018
- (12) 志水友哉, 安藝翔馬, 前野権一, 寺尾京平, 塩見太郎, 末吉健志, 久本秀明, 遠藤達郎, 2波長の共振モードによる蛍光増強を指向したハニカム格子フォトニック結晶の設計, 第65回応用物理学会春季学術講演会, 2018
- (13) 前野権一, 安藝翔馬, 寺尾京平, 塩見太郎, 末吉健志, 久本秀明, 遠藤達郎, 色素分子ドーピングポリマー製フォトニック結晶ナノ共振器の開発, 第65回応用物理学会春季学術講演会, 2018
- (14) 山田大空, 川崎大輝, 前野権一, 安藝翔馬, 末吉健志, 久本秀明, 遠藤達郎, 低濃度試料測定を指向した鎖状交差プラズモニック結晶構造, 第65回応用物理学会春季学術講演会, 2018
- (15) Tatsuro Endo, Functionalized polymer-based photonic devices for biosensing application, SPIE Defense + Commercial Sensing 2017, 2017
- (16) Shoma Aki, Kenichi Maeno, Kazuo Satoh, Shuichi Murakami, Yusuke Sando, Yusuke Kanaoka, Kenji Sueyoshi, Hideaki Hisamoto, Tatsuro Endo, Development of photonic crystal sensor with defect structure towards highly sensitive evaluation of cell membrane transport, The International Congress on Analytical Sciences 2017 (ICAS 2017), 2017
- (17) Daiki Okano, Kenji Sueyoshi, Hideaki Hisamoto, Tatsuro Endo, Enhancement of sensitivity using polymer-based photonic crystal by controlling of the surface reaction area, The International Congress on Analytical Sciences 2017 (ICAS 2017), 2017
- (18) Jiayi Sun, Kenichi Maeno, Shoma Aki, Hideaki Hisamoto, Kenji Sueyoshi, Tatsuro Endo, Fabrication of Polymer-based Photonic Crystal Waveguide with Nano-Cavities for Sensing Application, The International Congress on Analytical Sciences 2017 (ICAS 2017), 2017
- (19) Yusuke Morii, Tatsumi Mizuta, Shoma Aki, Kenji Sueyoshi, Hideaki Hisamoto, Tatsuro Endo, Fabrication of nanoimprint lithography-based photonic crystal using ZrO<sub>2</sub>-polymer composite for optical sensor application, The International Congress on Analytical Sciences 2017 (ICAS 2017), 2017
- (20) Kenichi Maeno, Shoma Aki, K. Satoh, S. Murakami, Y. Sando, Y. Kanaoka, Kenji Sueyoshi, Hideaki Hisamoto, Tatsuro Endo, IMPRINTED PHOTONIC CRYSTAL NANOCAVITY FOR  $\mu$ -SPECTROMETER, The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017), 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 達郎 ( ENDO Tatsuro )  
大阪府立大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：40432017

### (2) 研究分担者

(            )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

(            )  
研究者番号：

### (4) 研究協力者

安藝 翔馬 ( AKI Shoma )  
前野 権一 ( MAENO Kenichi )  
青野 圭剛 ( AONO Keigo )  
西口 輝一 ( NISHIGUCHI Kiichi )  
岡野 大毅 ( OKANO Daiki )  
孫 佳儀 ( SUN Jiayi )  
西辻 凌輔 ( NISHITSUJI Ryosuke )  
森井 佑輔 ( MORII Yusuke )  
山田 大空 ( YAMADA Hirotaka )  
町野 泰基 ( MACHINO Taiki )  
川崎 大輝 ( KAWASAKI Daiki )  
志水 友哉 ( SHIMIZU Tomoya )