

博士論文

定量的病理診断へ向けたテラヘルツ波ケミカル  
顕微鏡の開発

2026年3月

DING XUE

岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科



## 概要

本論文は、著者が令和5年4月に岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科ヘルスシステム統合科学専攻博士後期課程に入学し、令和8年3月の修了に向けて取り組んできた研究成果をまとめたものである。

近年、がんをはじめとする重大疾患は世界的に主要な死亡原因の一つであり、その早期発見および個別化医療の実現は医療分野における重要な課題となっている。特に日本においては、がんゲノム医療の推進により、患者個々の分子情報に基づいた精密診断および治療戦略の構築が進められている。一方で、従来の病理診断手法、とりわけホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded : FFPE) 標本を用いた解析は、前処理工程の煩雑さ、解析時間の長さ、および侵襲性といった課題を内包しており、迅速かつ低侵襲な診断技術の確立が求められている。

これらの背景のもと、血液や体液中に含まれる細胞や生体分子を対象とする液体生検は、患者負担を低減可能な次世代診断手法として注目されている。しかしながら、その実用化には、高感度性、定量性、再現性を同時に満たす工学的計測技術の確立が不可欠である。

本研究では、電磁波の一種であるテラヘルツ波に着目し、テラヘルツ波ケミカル顕微鏡 (Terahertz Chemical Microscopy : TCM) を基盤とした生体試料検出手法の開発を行った。TCMは、半導体デバイス工学、薄膜材料工学、電圧制御回路技術および信号処理技術を統合した工学システムであり、試料表面に生じる電位変化を電気的信号として非接触・ラベルフリーで検出可能である点に特徴を有する。本研究では、液体中に存在するがん細胞の検出に加え、ウイルス性疾患と関連するタンパク質分子の検出にも適用範囲を拡張し、TCMが多様な医療診断対象に対して実用的な計測手法となり得ることを示した。

第1章では、がん診断および個別化医療の社会的背景を踏まえ、従来診断技術の課題と工学的計測技術に求められる要件を整理するとともに、本研究の目的および論文構成を明確にした。

2章では、テラヘルツ波の物理的特性、発生原理および検出原理について体系的に整理し、生体試料検出におけるテラヘルツ波利用の技術的妥当性を示した。

第3章では、TCMの装置構成および動作原理について詳細に述べ、特にテラヘルツ波発生素子および半導体表面における電位変化検出機構を工学的観点から明らかにした。

第4章では、抗原抗体反応やアビジン-ビオチン反応などの生体分子間相互作用の基礎を整理するとともに、既存の生体分子検出技術と比較することで、TCMの特徴および優位性を示した。

第5章では、がんゲノム医療を見据えた応用として、液体中に存在するがん細胞を対象とした検出実験を行い、TCMによる表面電位変化計測が、液体生検における新たな工学的診断手法として有効であることを示した。特に混合細胞中で特定の細胞と検出できることをはじめ実証した。

第6章では、がん関連応用に加え、神経疾患および感染症診断への応用可能性を検討し、

$\alpha$ -シヌクレインおよび SARS-CoV-2 N タンパク質を対象とした検出実験を通じて、TCM が細胞検出のみならず、ウイルス関連タンパク質を含む生体分子検出にも適用可能であることをはじめて実証した。

第 7 章では、TCM の検出性能向上を目的として、外部電圧制御による内部電場調整の理論的検討および電圧印加条件下におけるテラヘルツ波振幅応答解析を行った。さらに、電圧掃引による感度最適化および複数センシングプレート間のばらつき低減効果について統計的に検証し、感度、定量性および測定安定性の向上を工学的観点から明らかにした。

第 8 章では、本研究全体を総括し、TCM が従来の FFPE 標本を用いた病理診断を補完、あるいは将来的に代替し得る工学的診断基盤として、医療分野において実用的価値を有することを示した。

以上より、本研究は、テラヘルツ波ケミカル顕微鏡を基盤とした工学的計測技術が、がんをはじめとする疾患診断および感染症関連分子検出において、低侵襲・迅速・非破壊な医療検査手法として有効であることを示すものであり、将来的な次世代医療診断技術の発展に寄与することが期待される。

# 目次

第1章 序論.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 本論文の目的.....	2
1.3 本論文の構成.....	3
第2章 テラヘルツ波の基礎理論.....	5
2.1 テラヘルツ波の基礎理論.....	5
2.2 テラヘルツ波の発生原理.....	6
2.3 テラヘルツ波の検出原理.....	10
2.4 まとめ.....	12
第3章 TCMの装置および原理.....	15
3.1 TCMの概要.....	15
3.2 TCMの装置構成.....	16
3.3 テラヘルツ波発生素子.....	19
3.4 まとめ.....	21
第4章 生体分子間相互作用の基礎.....	23
4.1 生体分子.....	23
4.2 生体分子間相互作用.....	24
4.2.1 抗原抗体反応.....	24
4.2.2 アビジン-ビオチン反応.....	25
4.3 生体分子間相互作用の検出既存技術.....	26
4.3.1 酵素免疫測定法 (ELISA).....	26
4.3.2 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法.....	28
4.4 まとめ.....	30
第5章 がんゲノム医療に向けた液中細胞検出.....	31
5.1 がんゲノム医療と液体生検の背景.....	31
5.2 TCMを用いたがん細胞の検出実験.....	32
5.2.1 TCMによるがん細胞検出の基本原理.....	32
5.2.2 センシングプレートの化学修飾.....	34
5.2.3 細胞培養および試料調製.....	35
5.3 結果および考察.....	36
5.3.1 測定対象となるがん細胞および抗体の特性.....	36
5.3.2 化学修飾センシングプレート上におけるがん細胞検出プロセス.....	37
5.3.3 表面固定状態の検証：AFM および染色法による評価.....	39

5.3.4	がん細胞濃度とテラヘルツ波振幅強度の関係	41
5.3.5	特異性評価：異なる細胞種に対する応答比較	43
5.3.6	混合細胞試料におけるがん細胞比率依存性評価	45
5.3.7	本章結果のまとめと今後の課題	47
5.4	まとめ	48
第6章	分子生体関連物質への応用	51
6.1	医療応用の背景（神経疾患・感染症診断の重要性）	51
6.2	神経疾患関連タンパク質の検出例： $\alpha$ -シヌクレイン	52
6.2.1	$\alpha$ -シヌクレインの医学的背景と検出意義	52
6.2.2	TCMによる $\alpha$ -シヌクレインの濃度依存性評価	53
6.3	感染症関連タンパク質を用いた検出原理の詳細検証：SARS-CoV-2 N タンパク質	54
6.3.1	SARS-CoV-2 N タンパク質の医学的背景と検出意義	54
6.3.2	アプタマーを用いた検出系の構築	55
6.3.3	AFMによる表面固定状態の検証	56
6.3.4	アプタマー固定条件の最適化	57
6.3.5	SARS-CoV-2 N タンパク質濃度依存性評価	59
6.3.6	試料量依存性の評価と微量検出の可能性	61
6.4	まとめ	63
第7章	電圧制御によるTCM高性能化	65
7.1	性能ばらつきの顕在化と課題設定	65
7.2	外部電圧制御による内部電場調整の理論的背景	66
7.3	外部電圧印加条件下による表面電位応答解析	68
7.3.1	外部電圧印加下におけるテラヘルツ波振幅応答の基礎特性	68
7.3.2	異なる生体分子に対する電圧応答差の検証	70
7.3.3	外部電圧制御下における細胞検出感度の空間分布評価	71
7.3.4	単一センシングプレートにおける電圧掃引による感度最適化解析	73
7.3.5	複数センシングプレートに対する電圧調整効果の統計的検証	75
7.3.7	総合考察	77
7.4	まとめ	78
第8章	総括	81
	謝辞	83
	参考文献	84
	研究業績	97

## 第1章 序論

本章では、本研究の背景、目的、および本論文全体の構成について述べる。まず、がんゲノム医療をはじめとする次世代医療分野において、生体分子および細胞を高感度かつ非標識で検出する技術が求められている社会的・学術的背景を整理する。次に、既存の検出技術が抱える課題を踏まえ、本研究においてテラヘルツ波ケミカル顕微鏡（TCM）を用いた新たな検出手法を提案する目的を明確化する。最後に、本論文の全体構成を示し、各章が担う役割と相互関係について概説する。

### 1.1 研究背景

近年、がんは世界的に主要な死亡原因の一つであり、日本においても高齢化の進行とともに罹患率および死亡率はいずれも高水準で推移している。がんは遺伝子変異の蓄積により発症・進行する疾患であり、その分子学的背景は患者ごとに大きく異なる。このため、従来の画一的治療では十分な治療効果が得られない症例も多く、患者個々の分子情報に基づく精密診断および個別化治療の実現が強く求められている<sup>1-8</sup>。

こうした背景のもと、日本では国を挙げた医療戦略としてがんゲノム医療が推進されている。がんゲノム医療は、がん細胞に存在する遺伝子変異を網羅的に解析し、その情報を基に最適な治療薬や治療方針を選択する医療であり、2019年以降はがん遺伝子パネル検査の一部が保険診療として導入されている。この取り組みにより、がん診療は経験則に基づく治療から、分子情報に基づく科学的医療へと大きく転換しつつある<sup>9,10</sup>。

一方で、がんゲノム医療の基盤となる臨床検体解析においては、現在もホルマリン固定パラフィン包埋（Formalin-Fixed Paraffin-Embedded：FFPE）標本を用いた病理診断が主流である。しかしながら、FFPE標本を用いる手法には、試料採取における侵襲性、前処理工程の煩雑さ、解析に要する時間の長さ、および分子情報の劣化といった課題が存在する<sup>11-19</sup>。これらの制約は、迅速な診断や治療方針決定を阻害する要因となり、がんゲノム医療の実臨床へのさらなる展開において大きなボトルネックとなっている。

このような背景から、近年では血液や体液中に含まれるがん細胞や生体分子を対象とする液体生検（Liquid Biopsy）が研究開発段階を中心に検討されている。液体生検は、低侵襲で繰り返し検査が可能である点に加え、迅速性や患者負担の軽減といった利点を有しており、個別化医療との親和性が高い診断手法である<sup>20-22</sup>。しかしながら、液中に存在するがん細胞や関連分子は極めて微量であり、その高感度かつ定量的な検出には、従来の医学的検査技術のみでは限界がある。

この課題に対し、工学的計測技術の導入は不可欠である。これまでに、酵素免疫測定法（ELISA）<sup>23-26</sup>、電気化学センサ<sup>27-30</sup>、マイクロ流体デバイス<sup>31-34</sup>、質量分析（MS）<sup>35,36</sup>、ならびに表面プラズモン共鳴（SPR）<sup>37-39</sup>や蛍光標識法<sup>40-42</sup>を基盤としたバイオセンシング技術など、さまざまな工学的アプローチが提案されてきた。例えば、ELISAは高感度、高特

異性だが、前処理や測定時間が長くなる。MS は分子を高精度で識別できるが、装置が高価で操作にも技術が必要である。蛍光標識法はリアルタイムの観察ができるが、標識による分子の変化や光退色、非特異的な結合の問題がある。SPR は非標識で分子間相互作用を観察できるが、低分子の検出には感度の限界がある。蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いた光学計測法は、高い空間分解能を有する一方で、蛍光標識や染色処理が不可欠であり、試料前処理の煩雑化や生体試料への影響が問題となる。また、フォトリチングやバックグラウンドノイズの影響により、定量性や長時間観察に制約が生じる。電気化学センサは、小型化や高感度化が可能であるものの、電極表面の劣化や汚染による再現性低下、測定対象分子の選択性確保といった課題を抱えている。さらに、マイクロ流体デバイスを用いた検出手法は、少量試料での高効率解析を可能とする反面、デバイス構造の複雑性や流路閉塞、前処理工程の多段化が医療現場への導入を難しくしている。これらの既存手法に共通する課題として、①標識や試料加工を前提とする点、②測定系の複雑化に伴う再現性・信頼性の問題、③リアルタイム性および非侵襲性の両立が困難である点が挙げられる。そのため、医療現場において迅速かつ簡便に運用可能な新たな計測原理の確立が求められている。

このような背景のもと、本研究では本研究室で開発したテラヘルツ波ケミカル顕微鏡 (TCM) を用いた新たな計測アプローチを提案する。TCM は、生体分子の結合や細胞存在に伴う表面電位変化をテラヘルツ波振幅の変化として検出できる点で特徴的である。この性質により、従来の光学顕微鏡では困難であった分子結合に起因する電気的狀態変化や、ラベルフリー条件下での反応分布をテラヘルツ波信号として二次元的に可視化することが可能となる。この信号を基に空間分布情報を評価することにより、液中細胞や生体分子の濃度だけでなく、反応の均一性や局所的挙動といった付加的情報も把握可能となる。さらに、前処理がほぼ不要で測定時間が短く、評価技術に依存しないため、従来法と比較して迅速かつ簡便な測定が可能であり、医療現場での実用化にも適している。

したがって、医学的ニーズを出発点とし、工学的視点から新たな検出原理および計測システムを構築することは、次世代診断技術の確立において極めて重要である。本研究は、このような医工連携の立場から、非接触・ラベルフリーかつ高感度な計測を可能とするテラヘルツ波ケミカル顕微鏡を基盤とした新しい工学的診断基盤の構築を目的としている。

## 1.2 本論文の目的

本論文の目的は、がんゲノム医療の進展に伴い高度化・多様化する医療ニーズに対し、工学的計測技術の立場から、非接触・ラベルフリーかつ高感度な生体試料検出手法を確立することである。特に、従来の病理診断において主流であるホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本に依存しない、新たな診断基盤の構築を目指す。本研究では、血液や体液中に存在する細胞および生体分子を対象とする液体生検に着目し、その計測課題を工学的に再定義する。すなわち、侵襲性の低減・迅速性・前処理の簡略化・再現性および定量性の確保という医学的要求条件を満たすために、従来の光学的・化学的手法とは異なる検出原理の

導入を試みる。

そのための計測基盤として、本論文では TCM を採用する。TCM は、半導体デバイス工学、薄膜材料工学、電圧制御回路技術および信号処理技術を統合した工学システムであり、試料表面に生じる電位変化をテラヘルツ波放射強度として検出・可視化できる点に特徴を有する。本研究では、この特性を活かし、生体反応を非接触かつラベルフリーで捉える新しい検出手法の確立を目指す。具体的には、第一に、TCM の基本原理および装置構成を整理し、表面電位変化とテラヘルツ波放射特性との関係を工学的に明確化する。第二に、がんゲノム医療を見据え、液中に存在するがん細胞の検出を対象として、TCM による感度、定量性および再現性の評価を行い、液体生検への適用可能性を検討する。さらに、本研究ではがん関連応用にとどまらず、感染症や神経疾患と関連するタンパク質を対象とした検出実験を実施し、TCM が細胞検出のみならず、タンパク質レベルの生体分子検出にも応用可能であることを示す。これにより、TCM を基盤とした計測手法が、疾患種別に依存しない汎用的な医療診断技術として展開可能であることを明らかにする。以上より、本論文は、医学的課題を出発点とし、工学的視点から新たな検出原理および計測システムを構築することにより、次世代の低侵襲・迅速診断技術の実現に資する工学的基盤を提示することを目的とする。

### 1.3 本論文の構成

本論文は、全 8 章で構成されており、各章の内容は以下のとおりである。

第 1 章では、本研究の背景および目的について述べた。がんをはじめとする重大疾患が社会および医療に与える影響を整理するとともに、日本におけるがんゲノム医療の推進を踏まえ、従来の病理診断手法が有する課題を明確化した。その上で、液体生検に代表される低侵襲診断技術の重要性を示し、医学的ニーズに対して工学的計測技術が果たす役割を整理した。

第 2 章では、テラヘルツ波の基礎理論について述べる。電磁波としてのテラヘルツ波の特性、発生原理および検出原理を体系的に整理し、本研究で用いるテラヘルツ計測の物理的基盤を明確にする。

第 3 章では、TCM の装置構成および動作原理について詳述する。特に、半導体基板上に形成されたセンシングプレートにおける表面電位変化とテラヘルツ波放射強度との関係に着目し、TCM による電位検出の工学的原理を明らかにする。

第 4 章では、生体分子間相互作用の基礎について述べる。抗原抗体反応およびアビジン-ビオチン反応を例に取り、生体分子結合に伴う表面状態変化の特徴を整理する。また、既存の生体分子検出技術を概観し、TCM を用いたラベルフリー検出の位置付けを明確にする。

第 5 章では、がんゲノム医療への応用を目的として、TCM を用いた液中がん細胞検出について検討する。液体生検の背景を整理した上で、液中がん細胞濃度とテラヘルツ波信号との関係を実験的に評価し、本手法の有効性および課題について考察する。

第6章では、TCMの医療応用の拡張として、神経疾患および感染症診断を想定した生体分子検出について検討する。具体的には、 $\alpha$ -シヌクレインおよびSARS-CoV-2 Nタンパク質を対象とした検出実験を行い、TCMが細胞検出に加えて、タンパク質レベルの生体分子検出にも適用可能であることを示す。

第7章では、TCMの性能最適化および高感度化を目的として、外部電圧制御による内部電場調整の理論的検討および電圧印加条件下におけるテラヘルツ波振幅応答解析を行う。さらに、電圧掃引による感度最適化および複数センシングプレート間のばらつき低減効果について統計的に検証し、感度、定量性および測定安定性の向上について工学的観点から考察する。

第8章では、本研究全体を総括し、得られた成果を整理するとともに、TCMを基盤とした工学的計測手法の医療診断分野における将来展望について述べる。

## 第2章 テラヘルツ波の基礎理論

本章では、本研究の基盤となるテラヘルツ波の基礎理論および物理的特性について整理する。まず、テラヘルツ波が有する周波数帯域、物質透過性、分光・イメージングへの適性といった基本的特徴を概説する。次に、半導体デバイスおよび電磁波工学の観点から、テラヘルツ波の発生原理および検出原理について説明する。これらの基礎的事項を通じて、後続章で扱う TCM における生体試料検出の物理的背景を明確にする。

### 2.1 テラヘルツ波の基礎理論

テラヘルツ波 (Terahertz wave) は、図 2.1 に示すように電磁波スペクトルにおいてマイクロ波と赤外線の間位置する周波数帯域の電磁波であり、おおよそ 0.1~10 THz (波長 3 mm~30  $\mu$ m) を指す。この周波数帯域は、長らく電子工学と光学のいずれの技術領域においても十分な発生・検出手段が確立されておらず、テラヘルツギャップ (Terahertz gap) として知られてきた<sup>43,44</sup>。テラヘルツ波そのものの存在は比較的古くから知られており、19世紀末には赤外線と電波の連続性が理論的に示されていた。しかし、実用的な研究対象として本格的に注目されるようになったのは 1980 年代後半から 1990 年代にかけてである<sup>45-47</sup>。この時期、超短パルスレーザー技術の発展により、フェムト秒レーザーを用いた光伝導アンテナ (Photoconductive Antenna : PCA) や電気光学サンプリング法が確立され、時間領域においてテラヘルツ波を直接発生・検出する技術が実現した。これを契機として、THz-TDS が確立され、テラヘルツ波研究は急速に発展した。2000 年代に入ると、半導体デバイス工学、非線形光学、薄膜材料技術の進展と相まって、テラヘルツ波の高効率発生・高感度検出が可能となり、材料評価、非破壊検査、セキュリティ分野への応用が広がった。さらに 2010 年代以降は、生体分子や医療診断への応用研究が本格化し、非侵襲・非破壊かつラベルフリーな計測手法として、テラヘルツ波が医工学分野において注目されるようになった<sup>48-51</sup>。

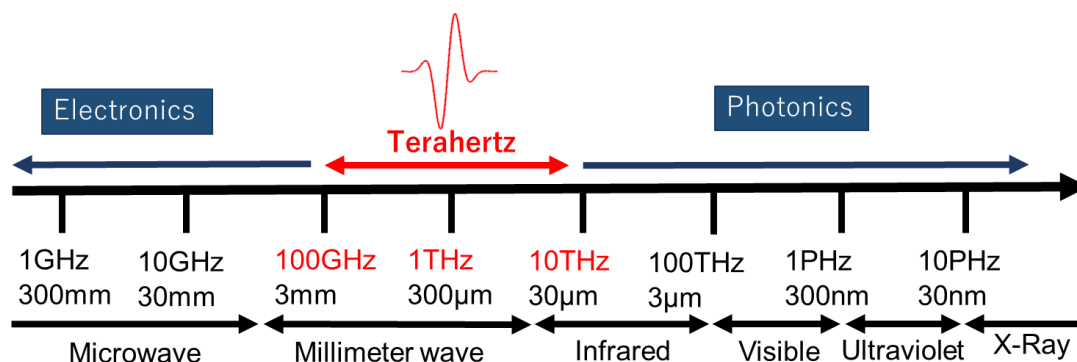


図 2.1 周波数による電磁波の分類

生体試料を対象とした計測・診断技術においては、検出感度と同時に、生体への影響を最小限に抑える安全性が極めて重要である。電磁波を利用した生体検出手法は、その周波数帯

に応じて生体への作用機構および安全性が大きく異なる。可視光や紫外線領域では、光子エネルギーが数 eV 程度に達し、電子遷移や化学結合の切断を引き起こす可能性がある。特に紫外線や X 線は電離放射線に分類され、DNA 損傷や細胞死を誘発するリスクがあるため、生体試料に対しては照射条件に厳しい制限が必要となる。一方、マイクロ波帯では光子エネルギー自体は低いものの、分子回転や誘電損失による加熱効果が支配的となり、局所的な温度上昇が生体機能に影響を及ぼす可能性がある。そのため、高感度検出を目的として強度を増加させた場合、熱的ダメージが問題となる。これに対し、テラヘルツ波の光子エネルギーはおおよそ数 meV 程度と極めて低く、分子の共有結合や電子状態を直接励起することはない。このため、テラヘルツ波は非電離放射であり、生体組織や細胞、タンパク質に対して化学的損傷を与えにくいという本質的な安全性を有している<sup>52-56</sup>。

また、テラヘルツ波の波長は細胞サイズや分子集合体スケールと同程度であり、生体試料や界面構造との相互作用において特徴的な情報を含む。特に、テラヘルツ帯では分子間振動、水素結合ネットワーク、低エネルギー励起モードなどが関与し、物質の誘電応答や導電特性の変化が顕著に現れる。このため、テラヘルツ波は物質の化学的・物理的状态変化に対して高い感度を有している。生体試料においては、水が強いテラヘルツ吸収を示すことが知られている一方で、界面に形成される表面電位の変化は、テラヘルツ波の放射強度変化として間接的に検出可能である。この特性は、溶液中における生体分子反応や細胞接着、抗原抗体反応などの検出に応用可能であり、本研究で用いる TCM の基本原理とも密接に関係している。近年では、レーザ走査技術と組み合わせることで、テラヘルツ波を用いた二次元および三次元イメージングが可能となっている。特に、局所的な電場変化やキャリアダイナミクスに起因するテラヘルツ放射を検出する手法では、溶液中に存在する細胞やタンパク質などの生体分子を、空間分布情報として可視化できる点に大きな特長がある。これにより、単なる点計測に留まらず、生体反応の不均一性や局所的变化を画像として捉えることが可能となるこのように、テラヘルツ波は、非接触、非破壊、ラベルフリーという条件を満たしつつ、生体試料の電氣的・物理的状态変化を高感度に反映する電磁波である。特に、半導体デバイス上で発生する微弱な電位変化や界面反応をテラヘルツ放射として読み出す手法は、従来の光学顕微鏡や電気化学センサとは異なる情報を提供する。本研究において用いる TCM は、これらのテラヘルツ波の基礎物理特性を工学的に統合・応用した計測技術であり、次節以降で述べるテラヘルツ波の発生原理および検出原理の理解において、本節の内容は重要な基盤となる。

## 2.2 テラヘルツ波の発生原理

テラヘルツ波の発生方法としては、大きく分けて PCA を用いる方法、非線形光学結晶 (ZnTe, GaAs など) に基づく光整流法、および半導体表面からの光励起放射法が挙げられる<sup>57,58</sup>。PCA は高い時間分解能を有する一方で、電極構造を必要とし、液体環境下での応用には制約が生じる。また、非線形光学結晶を用いた方法は光学系が複雑になりやすいとい

う課題がある。これに対し、半導体表面にフェムト秒レーザー光を照射し、内部電場に起因する超高速キャリアダイナミクスを利用してテラヘルツ波を発生させる手法は、構造が簡便であり、高強度かつ安定したテラヘルツ放射が得られるという特長を有する。本研究では、この半導体表面励起型テラヘルツ波発生法を採用し、TCMへの応用を目的としている。

本研究では半導体素子を用いる方法でテラヘルツ波を発生させているため、その発生原理について述べる。図 2.2 は本研究で用いた半導体素子のエネルギーバンド図の模式図であり、(a) は p 型半導体、(b) は n 型半導体の構造を示している。半導体素子の材料である Si の結晶は共有結合によって形成されているが、半導体内部と表面では構造が異なる。半導体内部では共有結合が規則的に並んでいる一方で、半導体表面では共有結合に関連する Si の価電子が余っている。また、半導体表面は空気にさらされているため、ガスや気体などの分子の吸着が起こる。これらことが要因となり、半導体表面では表面準位が形成される。この表面準位とフェルミ準位は異なるため、電子が捕捉されやすい状態となる。これにより、半導体内部の電子の移動が起こり、平衡状態になる。したがって、半導体表面では図 2.2 に示すように p 型では下向き、n 型では上向きにエネルギーバンドの曲がりが生じる<sup>59,60</sup>。また、半導体内部の電子の移動により、半導体表面では見かけ上電荷のない空乏層が形成され、電界が生じる。この電界を空乏層電界という。

ここからは、空乏層電界  $E_d$  を導く。はじめに、空乏層内部におけるポアソン方程式は次式で表される。

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = -\frac{\rho}{\epsilon_0\epsilon_d} \quad (2.1)$$

ここで、 $\phi$ ：空乏層の電位、 $x$ ：半導体表面からの距離、 $\rho$ ：電荷密度、 $\epsilon_0$ ：真空の誘電率、 $\epsilon_d$ ：半導体の比誘電率である。

また、空乏層内部の電荷密度  $\rho$  は次式で表される。

$$\rho = eN \quad (2.2)$$

ここで、 $e$ ：電気素量、 $N$ ：単位面積当たりの表面電荷である。

(2.2) 式を (2.1) 式に代入し、(2.1) 式を  $x$  について積分し、 $x = W$  における空乏層電

界  $E_d = -\frac{d\phi}{dx} = 0$  の条件から、次式となる。

$$E_d = \frac{eN}{\epsilon_0\epsilon_d}(W - x) \quad (2.3)$$

ここで、 $W$ ：空乏層幅である。

半導体表面での空乏層電界  $E_d$  は  $x = 0$  の場合であり、その条件を (2.3) 式に代入すると、次式で表される。

$$E_d = \frac{eN}{\epsilon_0\epsilon_d}W \quad (2.4)$$

ここで、(2.3) 式についてさらに  $x$  について積分し、 $x = W$  における空乏層の電位  $\phi = 0$

の条件から、次式で表される。

$$\phi = \frac{eN}{2\varepsilon_0\varepsilon_d}(W-x)^2 \quad (2.5)$$

(2.5) 式について  $W$  について解き、 $x=0$  における  $\phi = \phi_s$  とすると、次式で表される。

$$W = \sqrt{\frac{2\varepsilon_0\varepsilon_d}{eN}}\phi_s \quad (2.6)$$

ここで、 $\phi_s$  : 空乏層の表面電位である。

(2.6) 式を (2.4) 式に代入すると、半導体表面における空乏層電界  $E_d$  は次式と表すことができる。

$$E_d = \sqrt{\frac{2eN}{\varepsilon_0\varepsilon_d}}\phi_s \quad (2.7)$$

ここで、半導体素子に対してそのバンドギャップを超えるエネルギーをもつフェムト秒レーザーパルス照射すると、半導体内部の価電子帯にあるキャリアが伝導帯に励起される。そして、励起されたキャリアは半導体表面にある空乏層電界によって加速され、半導体内部に瞬時電流が生じる。このとき、瞬時電流の時間微分に比例した電磁波が発生する。ここで、フェムト秒レーザーパルスによってキャリアを励起させると、瞬時電流の立ち上がりはフェムト秒レーザーのパルス幅に依存するため、ピコ秒からフェムト秒オーダーとなる。そのため、瞬時電流の時間微分に比例して発生する電磁波は 2.1 節で述べたテラヘルツ波帯域の電磁波を発生させることができる。ここで、半導体表面から発生するテラヘルツ波の電界強度  $E_{\text{THz}}(t)$  は次式で表される。

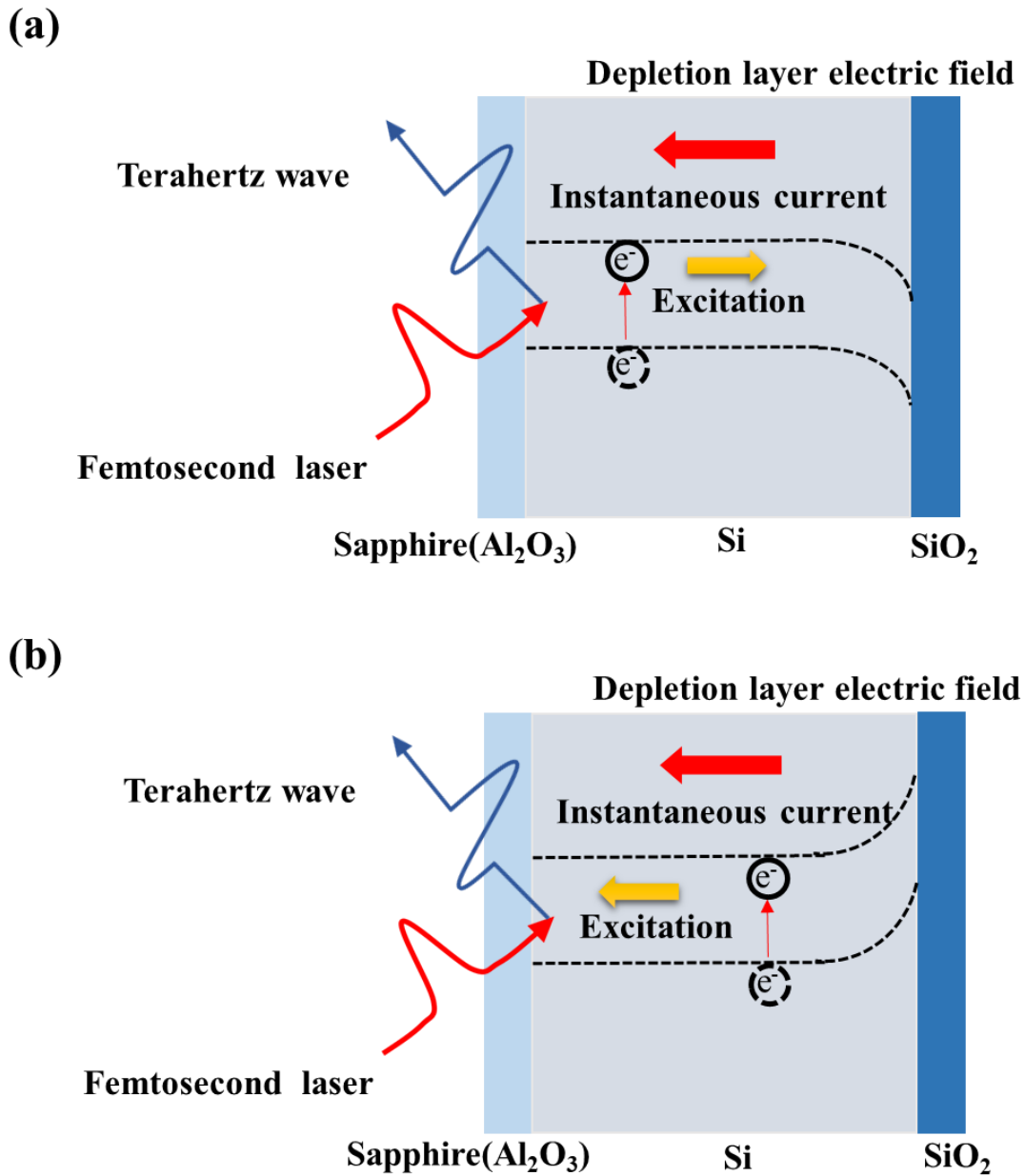


図 2.2 半導体表面からのテラヘルツ波の発生原理 (a) p型半導体 (b) n型半導体

$$E_{\text{THz}}(t) \propto \frac{\partial J(t)}{\partial t} \propto e \frac{\partial n(t)}{\partial t} v(t) + en(t) \frac{\partial v(t)}{\partial t} \quad (2.8)$$

ここで、 $J(t)$ ：半導体内部の瞬時電流、 $n(t)$ ：キャリア密度、 $v(t)$ ：キャリア移動速度である。(2.8) 式の第一項、第二項はそれぞれ、キャリア密度の時間微分に比例、キャリア移動速度の時間微分、すなわちキャリア加速度に比例することを表している。上記に述べたようにキャリアは空乏層電界によって加速されるため、第二項は空乏層電界に比例すると捉えることができる。そのため、半導体表面から放射されるテラヘルツ波の電解強度  $E_{\text{THz}}(t)$ は

空乏層電界  $E_d$  に比例し、次式で表すことができる。

$$E_{\text{THz}}(t) \propto E_d = \sqrt{\frac{2eN}{\epsilon_0 \epsilon_d}} \phi_s \quad (2.9)$$

### 2.3 テラヘルツ波の検出原理

テラヘルツ波の検出方法としては、PCA を用いる方法や、電気光学 (Electro-Optic: EO) 結晶を用いた方法などが広く知られている。EO サンプルング法は、結晶のポッケルス効果を利用して非接触かつ広帯域な検出が可能である一方、光学系が複雑であり、調整の難易度が高いという課題がある。これに対し、PCA を用いた検出法は、比較的簡便な光学構成で高感度かつ位相情報を保持したコヒーレント検出が可能であることから、THz-TDS において広く用いられている。本研究においても、計測系の安定性および TCM への実装適性を考慮し、PCA を用いたテラヘルツ波検出法を採用した<sup>61,62</sup>。

本研究では、ボウタイ型の PCA を検出素子として用いている。図 2.3 に、ボウタイ型 PCA を用いたテラヘルツ波検出原理の模式図を示す。PCA は、大きく分けてシリコンレンズおよび半導体基板から構成されている。シリコンレンズには、高抵抗シリコンが用いられており、これはテラヘルツ波に対する吸収損失を低減し、効率的にテラヘルツ波を半導体基板へ集光するためである。また、シリコンはテラヘルツ帯において屈折率が高く、レンズとして優れた集光特性を有する。半導体基板には、半絶縁性ガリウムヒ素 (Semi-Insulating GaAs: SI-GaAs) 基板上に低温成長ガリウムヒ素 (Low-Temperature grown GaAs: LT-GaAs) 層を形成した構造を用いている。LT-GaAs は、低温成長により多数の欠陥準位を含むため、キャリア寿命が極めて短く、超高速応答が求められるテラヘルツ波検出に適した材料である。LT-GaAs 表面には平行伝送線路が形成され、その中央部には数  $\mu\text{m}$  程度の微小ギャップを有するボウタイ型アンテナ構造が作製されている。ボウタイ型アンテナは、ギャップ近傍に強い電界集中を生じさせることができるため、高感度なテラヘルツ波検出が可能であり、広帯域応答にも優れている。

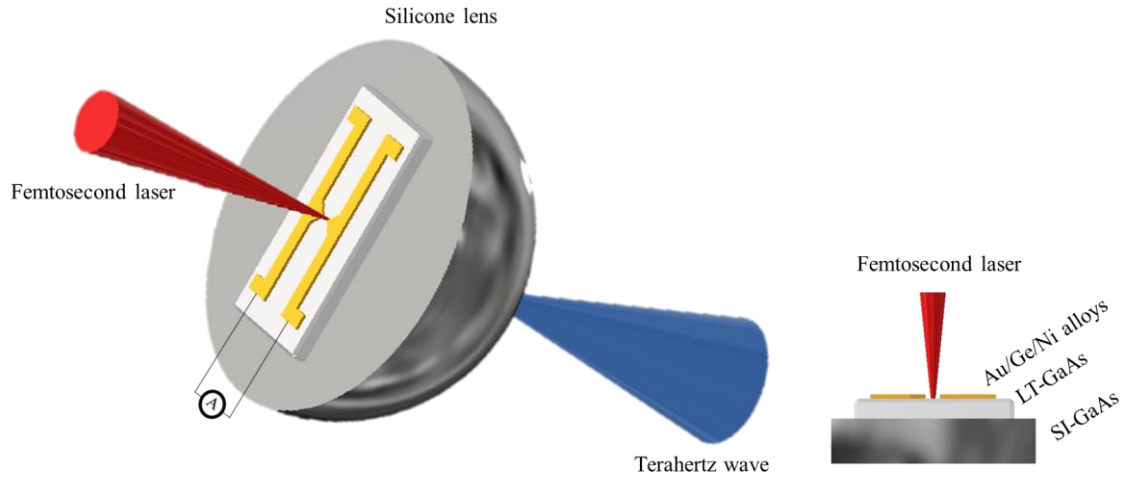


図 2.3 ボウタイ型 PCA を用いたテラヘルツ波の検出原理

テラヘルツ波の検出においては、まず半導体内部のキャリアを価電子帯から伝導帯へ励起する必要がある。そのため、本研究では半導体のバンドギャップを超えるエネルギーを有するフェムト秒レーザーパルスを探光として用い、LT-GaAs 側からアンテナの微小ギャップ部に集光照射している。一方、テラヘルツ波はシリコンレンズを介して集光され、探光の照射とは反対側である SI-GaAs 側から半導体基板へ入射する。この配置により、探光によって励起された光生成キャリアは、入射したテラヘルツ波の時間的に変化する電界によって瞬時に加速され、半導体内部に過渡的な電流が誘起される。このとき発生する瞬時電流は nA オーダーと非常に微弱であるため、通常の電流計による直接測定は困難である。そこで、本研究では高感度な電流増幅器を用いて信号を増幅し、ロックイン検出を併用することで高い信号対雑音比 (SNR) を確保している。増幅された瞬時電流は、照射されたテラヘルツ波の振動電界と、探光によって生成されるキャリア数の時間応答との畳み込みによって決定される。この瞬時電流密度を  $J(\Delta\tau)$  とすると、次式で表される。

$$J(\Delta\tau) = e\mu \int_{-\infty}^{\infty} E_{THz}(t')N(t' - \Delta\tau)dt' \quad (2.10)$$

ここで、 $\Delta\tau$  : テラヘルツ波に対するフェムト秒レーザーパルスの時間遅延、 $e$  : 電気素量、 $\mu$  : キャリア移動度、 $E_{THz}(t)$  : 照射したテラヘルツ波の電界強度、 $N(t)$  : 価電子帯に励起されたキャリア数の時間変化である。そして、 $N(t)$  は探光のパルス形状  $G(t)$  とキャリアの時間応答  $D(t)$  の畳み込みによって決まる。LT-GaAs のキャリア寿命が探光のパルス幅に対してはるかに短い場合、LT-GaAs 内部ではキャリアの増減が極めて短い時間で起こるため、このときの  $N(t)$  はデルタ関数として扱うことができる。この場合の

(2.10) 式は次式となる.

$$J(\Delta\tau) = e\mu E_{\text{THz}}(t') \quad (2.11)$$

したがって、瞬時電流はテラヘルツ波の振動電界に比例するため、瞬時電流を測定することで、テラヘルツ波の電界強度を取得することができる。

一方、LT-GaAs のキャリア寿命がプローブ光のパルス幅に対して長い場合、LT-GaAs 内部ではキャリアの増減がゆるやかに起こるため、このときの  $N(t)$  はステップ関数として扱うことになる。この場合の (2.10) 式は次式となる。

$$J(\Delta\tau) = e\mu \int_{-\infty}^{\infty} E_{\text{THz}}(t') dt' \quad (2.12)$$

したがって、瞬時電流はテラヘルツ波の振動電界を積分した値に比例する。この場合の PCA は積分器として機能し、時間応答は  $N(t)$  の立ち上がり応答時間、すなわち、プローブ光のパルス幅に依存する。そのため、広帯域のテラヘルツ波は検出するためには半導体のキャリア寿命に対してプローブ光のパルス幅をはるかに短くする必要がある。

## 2.4 まとめ

本章では、本研究の基盤となるテラヘルツ波工学の基礎理論について、特にテラヘルツ波の物理的特性、発生原理、および検出原理に焦点を当てて体系的に整理した。これにより、後続章で扱うテラヘルツ波ケミカル顕微鏡 (TCM) におけるセンシング機構を理解するための理論的基盤を明確にした。

2.1 節では、テラヘルツ波が周波数 0.1~10THz、波長約 3 mm~3  $\mu$ m の範囲に位置する電磁波であることを示し、電波と光波の中間的性質を有する点を整理した。テラヘルツ波は、電波に由来する高い物質透過性と、光波に由来する高い指向性・集光性を併せ持つため、非接触・非破壊計測に適している。また、光子エネルギーが最大でも約 0.4 eV 程度と低く、X 線などの高エネルギー電磁波と比較して生体への影響が小さいことから、医療・バイオ分野における安全性の高い計測手段として注目されていることを示した。さらに、分子間相互作用や低エネルギー励起に感受性を持つ周波数帯である点から、生体関連物質の検出や状態評価への応用可能性についても整理した。

2.2 節では、テラヘルツ波の発生原理について述べ、特に本研究で採用している半導体表面からのテラヘルツ波放射機構に着目して詳細に説明した。半導体表面形成される空乏層電界の発生機構を整理し、これがテラヘルツ波放射の本質的要因であることを示した。さらに、フェムト秒レーザー照射によって生成された光キャリアが、空乏層電界によって加速され、時間的に急峻な瞬時電流を形成することでテラヘルツ波が放射されることを示した。このとき放射されるテラヘルツ波電界は、瞬時電流の時間微分に比例することを数式的に示し、半導体内部電場および表面電位がテラヘルツ波強度を支配する重要な因子であることを理論的に明らかにした。また、空乏層電界の変化がテラヘルツ波放射特性に直接反映されることを示し、後続章で扱う「表面電位変化の検出」という TCM の基本概念へとつながる

る物理的背景を整理した。

2.3 節では、テラヘルツ波の検出原理として、PCA を用いた検出手法について述べた。本研究で用いたボウタイ型 PCA 素子を例に、フェムト秒プローブ光によって生成されたキャリアが、入射するテラヘルツ波の電界によって加速され、半導体内部に瞬時電流が生じる過程を説明した。この瞬時電流は、キャリア寿命およびプローブ光パルス幅に依存し、テラヘルツ波電界強度に比例、あるいはその時間積分に比例することを説明した。これにより、広帯域かつ高時間分解能なテラヘルツ波検出を実現するためには、超短パルス光源および高速応答を有する半導体材料の選択が重要であることを明確にした。また、PCA を用いた検出手法では、時間波形情報および振幅情報のいずれも検出可能であるが、本研究では、テラヘルツイメージングに基づいて測定点を選択し、振幅情報に着目した検出を行った。

以上より、本章では、テラヘルツ波の発生および検出に関する基礎理論を体系的に整理し、テラヘルツ波が半導体内部電場および表面電位変化に対して高い感受性を有することを理論的に明確にした。本章で得られた知見は、次章で詳述する TCM の装置構成および動作原理を理解する上で不可欠な基盤であり、TCM を用いた生体分子および細胞検出における物理的妥当性を裏付けるものである。これらの理論的整理を踏まえ、次章では、実際の測定系として構築した TCM の装置構成およびセンシングプレートの設計思想について詳述する。



### 第3章 TCMの装置および原理

本章では、本研究で用いた TCM について、その基本概念、装置構成および検出原理を述べる。まず、TCM の測定原理およびシステム全体の概要を示す。次に、本研究で構築した測定装置の構成要素について説明し、特にテラヘルツ波発生素子センシングプレートの構造と役割を明らかにする。さらに、生体試料との相互作用により生じる表面電位変化が、どのようにテラヘルツ波応答として検出されるかを説明し、TCM の動作原理を体系的に整理する。

#### 3.1 TCM の概要

TCM は、テラヘルツ波を利用して、半導体基板上に配置された化学物質や生体物質の情報を、非接触かつラベルフリーで高感度・高分解能に取得することが可能な革新的な計測システムである。TCM は、従来のテラヘルツ分光法の枠組みを超え、物質そのものによるテラヘルツ波の透過・反射特性を直接測定するのではなく、センシングプレート表面で生じる電気的状態変化をテラヘルツ波信号として読み出す点に大きな特長を有している。本研究で用いられる TCM では、 $\text{SiO}_2/\text{Si}/\text{Sapphire}$  からなる三層薄膜構造をテラヘルツ波発生素子兼センシングプレートとして用いている。センシングプレート最表面の  $\text{SiO}_2$  層は化学修飾されており、試料溶液中の生体分子や化学分子が特異的に結合または反応する場として機能する。これらの分子間相互作用により  $\text{SiO}_2$  表面の電荷分布および表面電位(ケミカルポテンシャル)が変化し、その影響が Si 層内部に形成された空乏層電界の強度変調として反映される。この状態でセンシングプレートにフェムト秒レーザーを照射すると、空乏層電界下で励起されたキャリアが加速され、その時間微分に比例したテラヘルツ波が放射される。放射されるテラヘルツ波の振幅および時間波形は、空乏層電界、すなわちセンシングプレート表面の電位状態に強く依存するため、試料溶液中で進行する化学反応や生体分子間相互作用を、高感度かつリアルタイムに反映した信号として取得することができる。このように、TCM は表面電位変化に起因する空乏層電界の変調を介して、電気的情報をテラヘルツ波の放射強度として変換・検出する点に、本質的な特長がある。

テラヘルツ検出システムとしての TCM の大きな優位性は、水によるテラヘルツ波の強い吸収という従来手法の制約を回避できる点にある。一般的なテラヘルツ分光法では、測定対象にテラヘルツ波を直接照射し、透過・反射特性を評価するため、水溶液中での測定は著しく困難であった。一方 TCM では、テラヘルツ波が試料溶液そのものを伝搬する必要がなく、センシングプレート内部で発生したテラヘルツ波を検出するため、水溶液環境下においても安定した測定が可能である。この特性は、生体分子を生理的条件下で評価する上で極めて重要な利点である。さらに、フェムト秒レーザーの照射位置を高精度に制御することで、センシングプレート表面を二次元的にスキャンし、複数の測定点から得られたテラヘルツ波信号を空間的に再構成することが可能である。これにより、センシングプレート上にアレイ状に固定された複数サンプルを同時に評価し、反応の進行や分布を可視化したテラヘル

ツイメージングとして取得することができる。この点において、TCM は単なる点計測にとどまらず、高度な空間情報を有する計測システムとして機能する。生体物質検出法として見た場合、TCM は従来の ELISA、表面プラズモン共鳴 (SPR)、蛍光標識法などと比較しても多くの利点を有する。TCM では、測定信号が分子量や分子構造そのものではなく、センシングプレート表面の化学的ポテンシャル変化に基づいているため、測定対象の分子サイズや種類に依存しにくいという特長がある。また、蛍光色素や酵素標識を必要としないラベルフリー測定であることから、試料前処理が簡便であり、分子の立体構造や活性を損なうことなく反応過程を観測できる。これらの特長により、TCM は抗原-抗体反応、タンパク質-リガンド相互作用、核酸-低分子相互作用など、多様な生体分子間相互作用の検出に適している<sup>63-72</sup>。さらに、多検体同時測定、リアルタイム応答、高感度検出を同時に実現できる点において、従来法では両立が困難であった性能を兼ね備えている。将来的には、ハイスループットスクリーニング、創薬研究、疾患診断、食品検査、環境モニタリングなど、幅広い分野への応用が期待される。

### 3.2 TCM の装置構成

本研究において使用した TCM は、フェムト秒レーザーを光源とし、センシングプレートを用いたテラヘルツ波発生部と、PCA による検出部から構成される時間領域テラヘルツ計測システムである。本装置の全体構成および外観を図 3.2 に示す。TCM におけるレーザー光源としては、TOPTICA Photonics 社製 FemtoFiber ultra 780 ファイバーレーザーを用いた。本レーザーの中心波長は 780 nm、パルス幅は 100 fs、繰り返し周波数は 80MHz、平均出力は約 780 mW であり、半導体表面における超高速キャリア励起に十分な時間分解能と出力安定性を有している。フェムト秒レーザーはビームスプリッターによってポンプ光およびプローブ光に分岐される。ポンプ光は、複数のミラーを介して光路を調整した後、機械式チョップ (SCD-500) により 2 kHz の強度変調が付与される。変調されたポンプ光は集光レンズによってセンシングプレートのサファイア基板側に集光照射され、フェムト秒レーザー照射による超高速キャリア励起を介して、半導体薄膜構造内部においてテラヘルツ波が発生する。本手法における空間分解能は、放射されるテラヘルツ波の波長によって制限されるものではなく、センシングプレート表面におけるフェムト秒レーザーの照射スポットサイズによって決定される。中心波長 780 nm のレーザー光を用いることにより、理論的にはマイクロメートルオーダーの高い空間分解能が達成可能であり、表面電位変化に起因する空乏層電界の変調を、放射されるテラヘルツ波振幅の変化として高感度に検出することができる。

センシングプレートから放射されたテラヘルツ波は、軸外し放物面鏡によって効率よく反射・集光され、検出器であるボウタイ型 PCA へと導かれる。PCA は、プローブ光の照射によって半導体内部にキャリアを生成し、入射するテラヘルツ波の振動電界によってこれらのキャリアが加速されることで瞬時電流を発生する。この瞬時電流は数ナノアンペアオ

ーダーと極めて微小であるため、Femto 社製の超低雑音電流アンプ (DLPCA-200) を用いて高感度に増幅される。DLPCA-200 はトランスインピダンスゲインを  $10^3 \sim 10^{11}$  V/A の範囲で可変設定可能であり、本研究では信号レベルに応じた適切なゲインを選択することで、微小電流を高精度に電圧信号へ変換している。また、等価入力雑音電流は最小で約  $4.3 \text{ fA}/\sqrt{\text{Hz}}$  と極めて低く、ナノアンペア/ピコアンペア領域の微弱信号検出に適している。増幅後の信号は、チョッパの参照信号を用いてロックインアンプ (LI5640) による同期検波が行われ、雑音成分を抑制した高い信号対雑音比 (SNR) で電気信号として取得される。その後、取得した信号は PC に送信され、データの記録および解析が行われる。一方、プローブ光はビーム分岐後、ミラーを介して時間遅延ステージを通過し、可動ミラーによって光路長が精密に調整される。その後、集光レンズを用いて PCA の微小ギャップ部に照射される。これにより、テラヘルツ波の到達タイミングとプローブ光の時間遅延を高精度に制御することが可能となる。本研究では、時間遅延ステージをテラヘルツ波の最大ピーク強度が得られる位置に固定することで、時間分解測定に加えて、リアルタイムでのテラヘルツ波強度変化の計測を実現している。さらに、センシングプレートは X-Y ステージ上に水平に設置されており、このステージは LabVIEW によって制御した。ステージを精密に走査することにより、センシングプレート上におけるポンプ光の照射位置を二次元的に制御し、局所的なテラヘルツ波強度分布を計測することが可能である。これにより、センシングプレート表面で生じる化学反応や生体分子間相互作用の空間分布を、可視化されたイメージングデータとして取得できる。この走査型計測方式は、多数のサンプルを同一センシングプレート上に配置した場合でも同時計測を可能とし、各サンプルの反応強度や結合特性の違いを定量的に評価する手法として有効である。そのため、本研究で構築した TCM システムは、高感度検出のみならず、ハイスループット解析および生体分子イメージングへの応用も可能な柔軟性を有している。

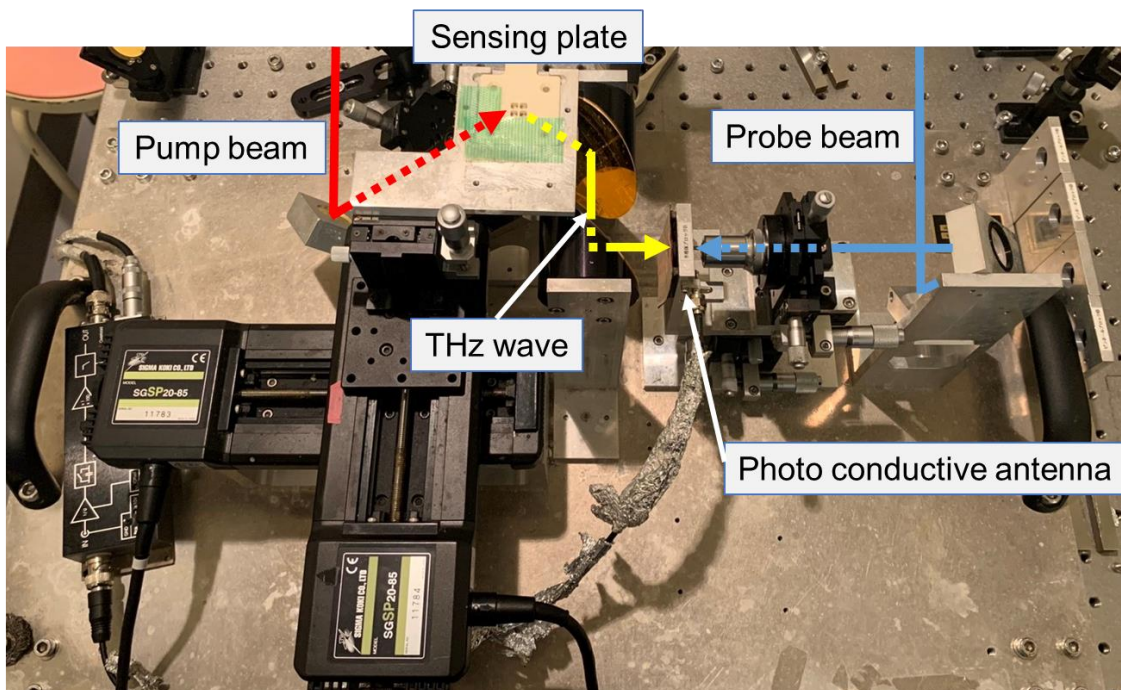
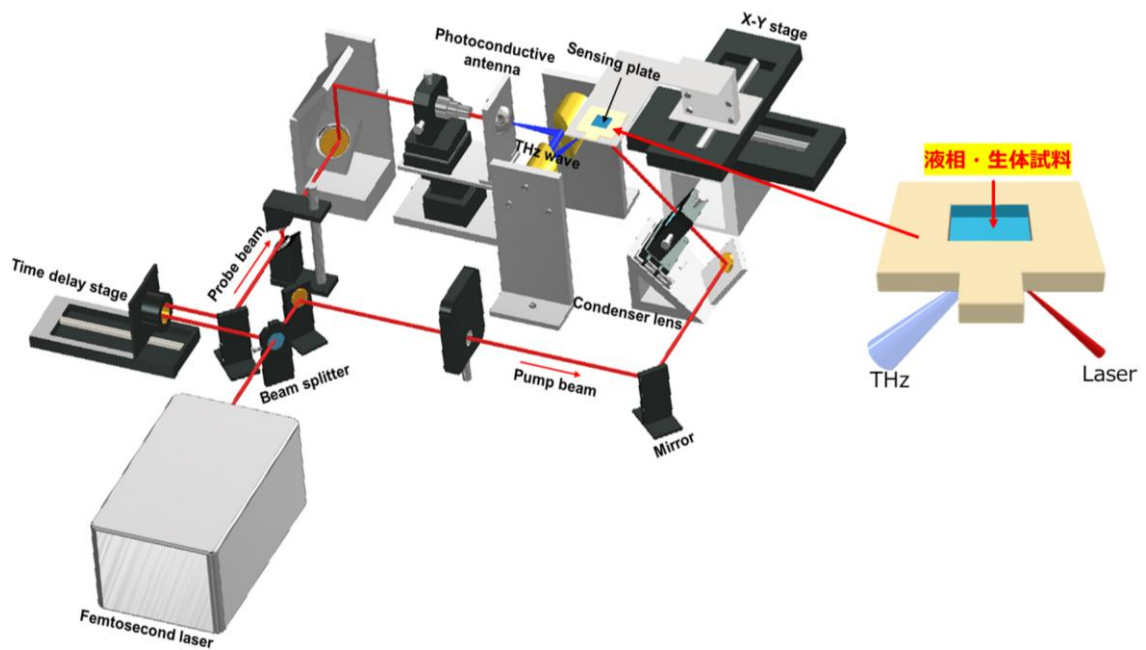


図 3.2 テラヘルツ波ケミカル顕微鏡 (TCM) の装置構成および外観図。ファイバーレーザーから出射したレーザー光は、ビームスプリッターによってポンプビームとプローブビームに分岐される。ポンプビームは、ミラーおよび機械式チョップを通過した後、センシングプレートに集光照射され、半導体薄膜構造内部においてテラヘルツ波を発生させる。一方、プローブビームは光遅延ラインを経由してテラヘルツ波検出器へと導かれ、遅延時間を制御しながら検出器に照射される。これにより、センシングプレート表面から放射されたテラヘルツ波の電界強度が時間分解的に測定される。

### 3.3 テラヘルツ波発生素子

本研究において使用したセンシングプレートは、TCM を構成する中核的な要素であり、フェムト秒レーザー照射によってテラヘルツ波を発生させる機能を有する半導体基板である。TCM における検出原理は、センシングプレート表面で生じる電位変化をテラヘルツ波強度として読み出す点に本質的な特徴があり、その検出感度および信号安定性は、使用する半導体材料および層構造に大きく依存する。本節では、本研究で採用したセンシングプレートの基本構造、材料選択の背景、ならびにその工学的利点について述べる。

TCM では、フェムト秒レーザー照射によって半導体基板表面近傍で生じる光励起キャリアダイナミクスを介し、表面電位の変化をテラヘルツ波強度として間接的に読み出すことが基本原理となる。そのため、センシングプレートに用いる材料には、①表面電位変化に対する高い感度、②生体分子固定化に適した表面化学特性、③水溶液環境下における化学的・物理的安定性、④テラヘルツ波発生の再現性および長時間測定における信号安定性が同時に求められる。これまでに、GaAs や InP に代表される III-V 族半導体、ならびに ZnO や GaN などの酸化物・窒化物半導体においても、表面電場やキャリア移動に起因したテラヘルツ波応答が報告されている。これらの材料は高いキャリア移動度を有し、強いテラヘルツ波放射が得られる点で優れている一方で、表面酸化層の不安定性や水溶液中での劣化、さらには測定再現性の確保が課題となる場合が多い。特に、生体試料を対象とした繰り返し測定や長時間測定においては、表面状態の微小な変動が測定結果に直接影響を及ぼす可能性がある。これに対し、Si は自然酸化によって形成される安定な SiO<sub>2</sub> 層を有し、化学的に安定した表面状態を維持できるという特長を持つ。この SiO<sub>2</sub> 表面は、シランカップリング反応などを用いた表面修飾が容易であり、抗体、タンパク質、核酸などの生体分子を高い再現性で固定化することが可能である。さらに、Si/SiO<sub>2</sub> 界面における表面電位変化は、フェムト秒レーザー照射時の光生キャリアの生成・加速挙動に直接影響を与え、その結果としてテラヘルツ波強度に高感度に反映される。このため、分子量や分子構造に依存しない、普遍的な生体分子検出が実現される。また、Si は半導体産業において長年にわたり用いられてきた材料であり、薄膜形成、膜厚制御、界面品質管理などのプロセス技術が高度に確立されている。その結果、センシングプレートとして用いた場合でも、基板間での物性ばらつきが小さく、テラヘルツ波応答の再現性に優れている。さらに、Si 基板は大面積化や微細加工との親和性が高く、単一基板上に複数の測定領域や生体分子固定領域をアレイ状に形成することが可能である。TCM では、これを X-Y ステージ走査と組み合わせることで、多検体を同一条件下で同時に測定するハイスループット解析への展開が可能となる。以上の特長は、TCM を単なる物理計測装置にとどめることなく、再現性、拡張性、および実用性を兼ね備えた生体分子検出プラットフォームとして発展させる上で重要な要素である。本研究では、これらの要件を満たすセンシングプレートとして、SiO<sub>2</sub>/Si/サファイアからなる三層構造半導体基板を採用しており、その詳細な構造および各層の役割については次節において述べる。

本研究において使用したセンシングプレートは、TCMにおける中核的な構成要素であり、フェムト秒レーザー照射によってテラヘルツ波を発生させる機能を有する半導体基板である。センシングプレートの構造模式図および実物写真を図 3.3 (a), (b) に示す。センシングプレートの外形寸法は 10 mm × 10 mm の正方形であり、シリコン酸化膜 (SiO<sub>2</sub>)、シリコン (Si)、およびサファイア (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 基板からなる三層構造を有している。各層の厚みは、表面の SiO<sub>2</sub> 層が自然酸化によって形成される数ナノメートル、Si 層が約 500 nm、最下層の Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 基板が約 500 μm である。このうち Si 層は、フェムト秒レーザー照射によって価電子帯から伝導帯へとキャリアが励起され、空乏層電界により加速されたキャリアの超高速ダイナミクスを介してテラヘルツ波を放射する主要な機能層である。一方、最表面の SiO<sub>2</sub> 層は、主として自然酸化によって形成されており、Si/SiO<sub>2</sub> 界面の安定化に寄与するとともに、後述する表面化学修飾のための反応基板としての役割を果たす。基板最下層に用いられている Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> は、高い機械的強度を有するだけでなく、近赤外域における高い光透過性を示す材料である。この特性により、センシングプレート背面側から照射されるフェムト秒レーザー光の透過損失が低減されるとともに、生成されたテラヘルツ波の取り出し効率が向上し、高感度な波形取得が可能となる。さらに、サファイアは熱伝導性にも優れているため、レーザー照射に伴う局所的な温度上昇の影響を受けにくい特性を有する。この特性により、長時間測定や繰り返し測定において、測定条件の安定化に寄与する可能性がある。溶液中に存在する生体分子や化学物質の測定を実現するため、本研究では専用の測定用基板を用い、センシングプレートを接着剤によって所定の位置に固定する構造を採用している。測定用基板の外観およびセンシングプレートの固定構造を図 3.3 (c) に示す。この構造により、センシングプレート上部に測定用溶液を保持するためのウェルが形成され、液体環境下での安定した測定が可能となる。形成されるウェルのサイズおよび配置数は、実験目的に応じて柔軟に設計可能である。これにより、保持するサンプル溶液量を適切に制御できるだけでなく、複数のウェルを同一センシングプレート上に配置することで、多検体の同時測定や濃度依存性の比較測定が可能となる。さらに、試料体積を微量化することにより、背景信号のばらつきを低減し、測定条件間の差異を最小限に抑えた高精度な比較評価が実現される。このようなウェル構造の可変性は、少量サンプルを用いた迅速かつ高感度な測定を可能とし、TCM を用いた生体分子検出における実験自由度および再現性の向上に大きく寄与している。

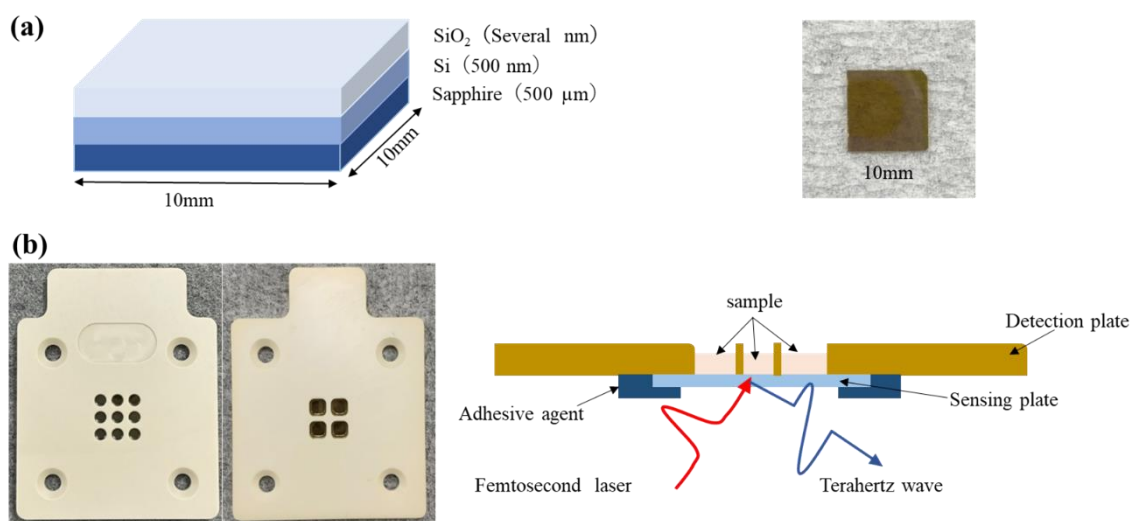


図 3.4(a) センシングプレートの構造図と実物写真。  
 (b) 測定用基板の外観と断面図。

### 3.4 まとめ

本章では、本研究で用いた TCM の装置構成および動作原理について詳細に述べた。第 2 章で整理したテラヘルツ波の発生・検出理論を基盤として、TCM がどのように化学反応や生体分子相互作用を高感度に検出するかを、装置レベルおよび物理メカニズムの観点から体系的に整理した。

3.1 節では、TCM の基本概念について説明した。TCM は、半導体基板表面に形成されたセンシングプレート上で生じる化学反応や分子吸着に伴う表面電位変化を、テラヘルツ波放射強度の変化として非接触かつリアルタイムに検出する計測手法である。特に、液中環境下においても測定が可能であり、従来の光学的・電気化学的手法では困難であった無標識検出やその場計測を実現できる点が、本手法の大きな特徴であることを整理した。また、TCM は電極を直接試料に接触させる必要がなく、試料への影響を最小限に抑えた測定が可能であることから、生体試料を対象としたセンシング技術として高い適用性を有することを示した。

3.2 節では、TCM 装置の全体構成について述べた。本研究で構築した測定系は、フェムト秒レーザー光源、テラヘルツ波発生部、テラヘルツ波検出部、および光学系・電気計測系から構成されている。レーザー光をポンプ光およびプローブ光に分岐し、ポンプ光をセンシングプレートに照射することでテラヘルツ波を発生させ、プローブ光と PCA を用いて検出する構成とした。さらに、光学遅延機構を導入することで、テラヘルツ波の時間波形および振幅情報を高い時間分解能で取得可能であることを示した。これらの装置構成により、TCM はテラヘルツ時間領域計測と化学センシング機能を統合したシステムとして動作すること

を明確にした。

3.3 節では、テラヘルツ波発生素子であるセンシングプレートの構造および材料特性について詳述した。本研究で用いたセンシングプレートは、サファイア基板上に形成されたシリコン薄膜および酸化シリコン層から構成されており、その表面には自然酸化膜および化学修飾層が形成される。これにより、半導体表面近傍に安定した空乏層電界が形成され、外部刺激に対して高い感受性を示すことを説明した。また、液中試料がセンシングプレート表面に接触した際、分子吸着や生体分子間相互作用によって表面電位が変化し、それが空乏層電界を介してテラヘルツ波放射強度の変調として反映されることを示した。これにより、TCM が「生体分子間相互作用を可視化する顕微計測技術」であることを明確に位置づけた。

以上より、本章では、TCM の装置構成および動作原理を詳細に整理し、テラヘルツ波放射がセンシングプレート表面の電気的狀態に強く依存することを明らかにした。本章で示した理論および装置的検討は、後続章で展開する生体分子間相互作用の検出、ならびに細胞およびタンパク質を対象とした応用研究の物理的妥当性を支える重要な基盤である。特に、TCM が液中環境下においても非接触・高感度な計測を可能とする点は、本研究の大きな特徴であり、従来技術との差別化要因である。これらの検討を踏まえ、次章では、TCM を用いた生体分子検出の基礎となる生体分子間相互作用の物理化学的背景について整理し、抗原抗体反応やアビジン-ビオチン反応といった代表的な相互作用機構を概説する。

## 第4章 生体分子間相互作用の基礎

本章では、生体分子および生体分子間相互作用の基礎について整理する。まず、水溶液環境下における生体分子の特性と、分子認識や特異的結合が果たす役割について概説する。次に、抗原抗体反応およびアビジン-ビオチン反応を代表例として、生体分子間相互作用の一般的な様式を説明する。さらに、これらの相互作用を検出するために従来用いられてきた代表的な検出技術について概観し、各手法が有する利点と原理的制約を整理する。これにより、非標識かつ高感度な新規検出手法の必要性を明確にし、TCM を用いた生体分子検出への導入とする。

### 4.1 生体分子

生体分子とは、タンパク質、核酸 (DNA および RNA)、糖質、脂質など、生命活動を維持するために不可欠な有機化合物の総称である。これらの分子は、細胞や組織を構成する基本要素であると同時に、生体内における情報伝達、代謝制御、エネルギー変換など、多岐にわたる機能を担っている<sup>73,74</sup>。例えば、タンパク質は酵素反応の触媒や構造支持体として機能し、核酸は遺伝情報の保存および発現制御を司る。一方、糖質や脂質は、細胞膜構造の形成やエネルギー貯蔵、シグナル分子としての役割を果たすなど、生体機能の基盤を構成している。これらの生体分子は、水溶液環境下において立体構造を形成し、その構造に由来する高い特異性と親和性を示す点に大きな特徴がある。すなわち、分子表面に分布する電荷、官能基、疎水性領域などが相互に補完的に作用することで、特定の分子同士が選択的に結合する。このような分子認識に基づく相互作用は、酵素と基質、抗原と抗体、受容体とリガンドといった形で生体内に広く存在しており、生命現象の高度な制御を可能にしている。生体機能の多くは、単一分子の性質だけでなく、このような分子間相互作用の集合として成立していると言える。また、生体分子間相互作用は、多くの場合、非共有結合性相互作用 (静電相互作用、水素結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力など) によって支配されており、外部環境の変化に対して敏感に応答する。そのため、溶液条件や表面状態のわずかな変化であっても、相互作用の強度や結合状態が変化し得る。これは、生体分子が高度に制御された反応系である一方で、計測・検出の観点からは、高感度かつ非侵襲的な手法が求められる理由でもある。

このような特性を有する生体分子は、バイオセンシングや医用診断技術において重要な検出対象とされてきた。特に、固体表面上に生体分子を固定化し、溶液中のターゲット分子との相互作用を検出する手法は、分子認識能を直接的に利用できる点で有効である。しかし、生体分子間相互作用は本質的に微弱なエネルギー変化として現れるため、その検出には高い感度と再現性が求められる。したがって、生体分子の構造的特性および相互作用の本質を理解することは、新規バイオ検出手法を検討する上で不可欠な基盤となる。

## 4.2 生体分子間相互作用

生体分子間相互作用とは、生体分子同士が相互に認識し、特定の結合状態を形成する過程を指す。生命現象の多くは、単一分子の機能によって成立するのではなく、複数の生体分子が相互作用することで初めて発現する。そのため、生体分子間相互作用は、細胞内外における情報伝達、代謝制御、免疫応答、遺伝子発現制御など、あらゆる生命活動の根幹をなす要素である。一般に、生体分子間相互作用は共有結合を伴わない可逆的な結合として生じる場合が多く、その主な駆動力は静電相互作用、水素結合、疎水性相互作用、およびファンデルワールス力である。これらの相互作用はそれぞれのエネルギーが比較的弱い一方で、多数が同時に作用することで高い特異性と選択性を実現している。このような多点結合的性質により、生体分子は特定の分子を高精度に識別しつつ、環境変化に応じて結合・解離を制御することが可能となっている。生体分子間相互作用の成立には、分子の立体構造が極めて重要な役割を果たす。タンパク質や核酸は、溶液中で三次元構造を形成し、その表面に分布する電荷状態や官能基配置が、相手分子との相補的な結合を可能にする。いわゆる「鍵と鍵穴モデル」や「誘導適合モデル」に代表されるように、結合過程では分子構造の微細な変化が伴う場合も多く、これにより相互作用の強度や選択性が精密に制御されている。

また、生体分子間相互作用は、分子量や化学組成そのものよりも、分子表面の物理化学的状态に強く依存する点が特徴である。結合の形成に伴い、分子表面の電荷分布や双極子モーメント、さらには界面における局所的な電位状態が変化することが知られている。これらの変化は、生体分子間相互作用を「物理量」として捉える上で重要な指標となり得る。このような観点から、生体分子間相互作用は、単なる化学反応としてだけでなく、界面現象や電気的特性の変化として理解することができる。特に、固体表面上に生体分子を固定化した場合、分子結合に伴う電荷再分布や表面電位変化は、基板内部の電場状態やキャリア挙動に影響を及ぼす可能性がある。この性質は、生体分子間相互作用を非標識かつ間接的に検出するための重要な物理的基盤となる。

したがって、生体分子間相互作用の検出においては、分子量や発光特性といった分子固有の性質に依存するのではなく、結合に伴って生じる界面電位や電気的応答を高感度に捉える手法が有効であると考えられる。この考え方は、後述する既存の生体分子検出技術の限界を理解する上でも重要であり、新たな検出原理に基づく手法を検討するための理論的背景となる。

### 4.2.1 抗原抗体反応

抗原抗体反応<sup>75-77</sup>とは、抗原 (antigen) と抗体 (antibody) との間に生じる、高度に特異的かつ可逆的な生体分子間相互作用であり、免疫応答の基盤となる重要な反応である。抗原は、ウイルス、細菌、タンパク質、糖鎖など、生体にとって異物として認識される分子や構造を指し、その表面には抗体と結合可能な特定の部位であるエピトープ (epitope) が存在する。一方、抗体は免疫グロブリンに分類されるタンパク質であり、抗原を特異的に認識す

る能力を有する。図 4.2.1 に示すように、抗体は 2 本の重鎖（H 鎖）および 2 本の軽鎖（L 鎖）から構成される Y 字型構造を有しており、その N 末端側の可変領域に形成されるパラトープ（paratope）が、抗原上のエピトープを特異的に認識・結合する。パラトープは、重鎖および軽鎖の可変領域に含まれる補完性決定領域（Complementarity-Determining Regions: CDR）によって形成され、抗原の立体構造や電荷分布に対して高い相補性を示す。

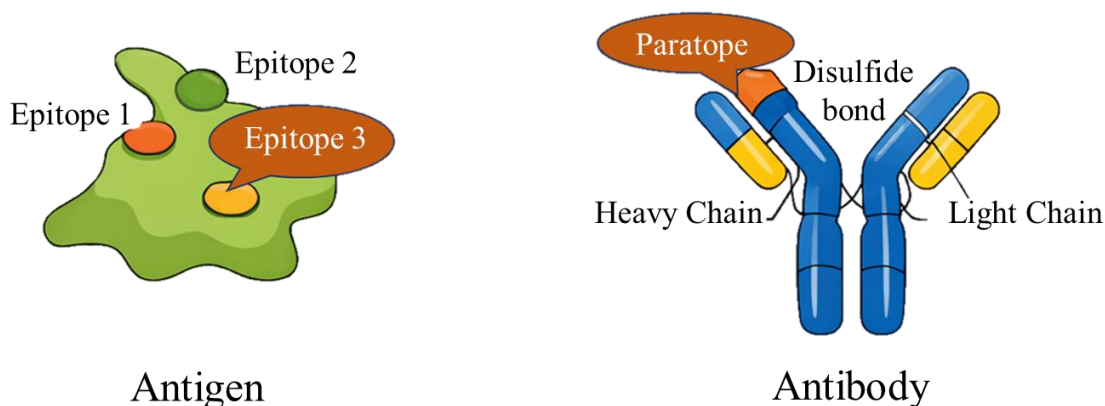


図 4.2.1 抗原および抗体構造の模式図

抗原抗体結合は共有結合ではなく、水素結合、静電相互作用、疎水相互作用、ファンデルワールス力などの非共有結合性相互作用の総和によって成立している。そのため、結合は可逆的でありながらも、非常に高い親和性と選択性を示す。この特異性は、抗体がどのエピトープに対して産生されたかによって決定され、同一抗原であっても異なるエピトープに対する抗体は異なる結合挙動を示す。このような抗原抗体反応の高い分子認識能は、生体分子検出や診断技術において極めて重要であり、センサ表面に固定化された抗体と標的分子との結合を検出することで、高選択的なバイオセンシングが可能となる。そのため、抗原抗体反応は、生体分子間相互作用を利用した検出技術の代表的モデルとして広く用いられている。

#### 4.2.2 アビジン-ビオチン反応

アビジン-ビオチン反応とは、卵白由来タンパク質であるアビジン（avidin）と、ビタミン B 群に属する低分子化合物であるビオチン（biotin）との間に生じる、極めて強固かつ特異的な分子間相互作用を指す。図 4.2 に示すように、アビジンは四量体構造を有し、1 分子あたり最大 4 分子のビオチンと結合可能な結合ポケットを備えている。

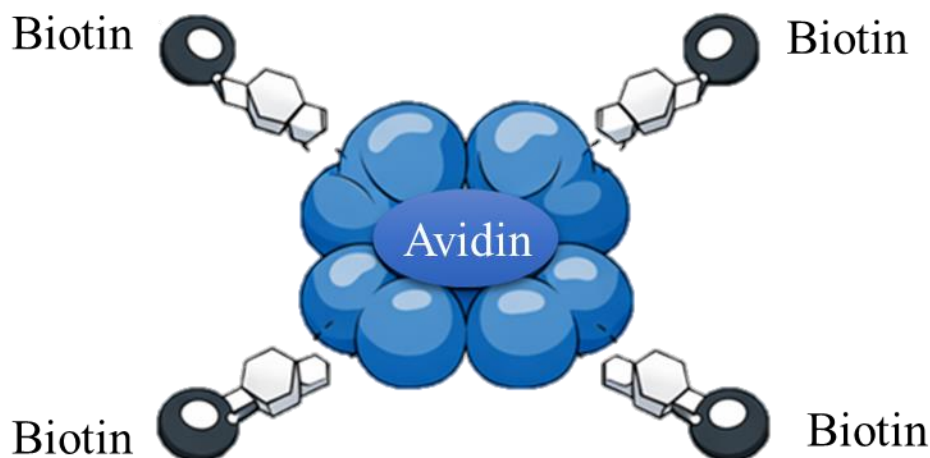


図 4.2.2 アビジン-ビオチン結合の模式図

この反応の最大の特長は、その結合親和性の高さにあり、アビジン-ビオチン間の解離定数はおよそ  $10^{-15}$  M 程度と報告されており、これは非共有結合性相互作用の中で最も強い部類に属する。結合は主に水素結合および疎水相互作用によって安定化されており、一度形成されると通常の洗浄操作では解離しにくい。また、ビオチンは分子量約 244 Da の非常に小さな分子であるため、抗体やタンパク質に標識として導入しても、それら本来の立体構造や分子認識能をほとんど損なわないという利点を有する。この特性により、アビジン-ビオチン反応は、生体分子の固定化や高密度配置を必要とするバイオセンサ設計において広く利用されている。さらに、アビジンが多価結合能を有することから、表面上においてビオチン化分子を高密度かつ安定に配置することが可能であり、生体分子間相互作用を効率的に誘起できる。この点は、微小な表面電位変化や電荷再分布を検出原理とするセンシング手法において、信号強度および再現性の向上に寄与する重要な要素となる<sup>78</sup>。

以上の理由から、アビジン-ビオチン反応は、抗原抗体反応と並ぶ代表的な生体分子間相互作用モデルとして、生体分子検出技術や表面機能化プロセスにおいて広く用いられている。

#### 4.3 生体分子間相互作用の検出既存技術

生体分子間相互作用を高感度かつ高選択的に検出するため、これまでにさまざまな分析・検出技術が開発され、生命科学、医療診断、創薬研究などの分野で広く利用されてきた。本節では、代表的な既存技術として、酵素免疫測定法 (ELISA) と表面プラズモン共鳴 (SPR) 法について概説し、それぞれの特徴と限界について整理する。

##### 4.3.1 酵素免疫測定法 (ELISA)

酵素免疫吸着測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay : ELISA 法) とは、測定対

象となる抗原または抗体を固相上に固定化し、酵素標識を用いた発色反応により、抗原あるいは抗体量を定量的に評価する生体分子検出手法である。抗原-抗体間の高い特異的結合を利用することから、生体分子間相互作用を検出する代表的な方法として、基礎研究から臨床検査に至るまで幅広く用いられている。ELISA 法では、測定対象の抗原または抗体をマイクロプレート上に固定化し、酵素で標識した抗体あるいは抗原を反応させることで測定を行う。反応形式としては、標識抗体を直接反応させる直接法、一次抗体と二次抗体を用いる間接法のほか、サンドウィッチ法および競合法などが知られている。本研究では、プレート上に抗体を固定化し、測定対象を抗原とする肺がん細胞の検出を行ったため、以下ではサンドウィッチ法および競合法について述べる。

図 4.3.1 (a)に、サンドウィッチ法による抗原検出原理および測定結果の例を示す。サンドウィッチ法では、測定対象抗原に対して特異的に結合する捕捉抗体をマイクロプレート表面に十分量固定化する。次に、試料中の抗原を添加し、固定化抗体との特異的結合を形成させる。その後、洗浄操作により未結合の抗原を除去する。続いて、酵素で標識された検出抗体を反応させ、抗体-抗原-抗体からなるサンドウィッチ構造を形成する。最終的に基質溶液を添加すると、酵素反応により発色が生じ、その吸光度を測定することで抗原量を定量的に評価することができる。抗原量が少ない場合には発色強度は弱く、抗原量が多い場合には発色強度は強くなる。したがって、図 4.3.1 (a)に示すように、吸光度が高いほど測定対象抗原量が多いことを意味する。

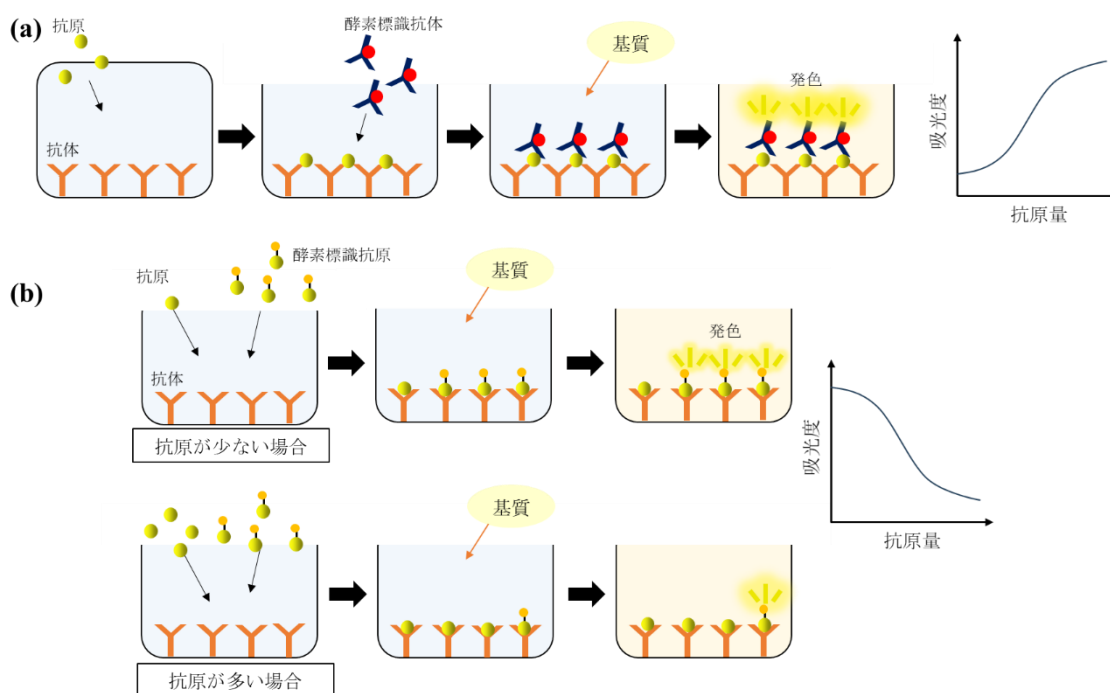


図 4.3.1 (a) サンドウィッチ法を用いた抗原の測定  
(b) 競合法を用いた抗原の測定

図 4.3.1 (b) に、競合法による抗原検出原理および測定結果の例を示す。競合法では、サンドウィッチ法と同様に、測定対象抗原に特異的に結合する抗体をプレート上に固定化する。その後、あらかじめ濃度が既知の酵素標識抗原と、測定対象の抗原を同時に添加し、固定化抗体との結合反応を競合的に進行させる。反応後、洗浄操作によって未結合の抗原を除去し、基質を加えて酵素反応による発色を生じさせる。競合法では、測定対象抗原量が多い場合、抗体との結合部位が測定対象抗原によって占有されるため、酵素標識抗原の結合量は減少し、結果として発色は弱くなる。一方、測定対象抗原量が少ない場合には、酵素標識抗原が多く抗体と結合するため、発色は強くなる。したがって、図 4.3.1 (b) に示すように、吸光度が低いほど測定対象抗原量が多く、高いほど抗原量が少ないという逆相関の関係が得られる。

ELISA 法の利点として、高い感度および特異性を有する点に加え、多検体を同時に測定できる高いスループット性が挙げられる。一方で、サンドウィッチ法および競合法のいずれにおいても酵素標識が必要であり、抗原-抗体反応に加えて発色反応を伴うため、測定工程が複雑化し、測定時間およびコストが増大するという課題がある。

#### 4.3.2 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法

表面プラズモン共鳴法 (Surface Plasmon Resonance : SPR 法) とは、金属薄膜と誘電体からなる二媒質界面において励起される表面プラズモンを、エバネッセント波との共鳴現象として検出することにより、生体分子間相互作用を非標識で解析する光学的検出手法である。主に抗原-抗体反応や受容体-リガンド結合など、界面近傍で生じる屈折率変化を高感度に検出できる点が特徴である。図 4.3.2 に、SPR 法による生体分子検出原理の模式図を示す。SPR センサでは、一般に高屈折率プリズム上に金 (Au) 薄膜を形成したセンサチップが用いられる。金薄膜表面にはマイクロ流路が設けられ、流路内に抗体溶液を導入することで、金薄膜表面に抗体が固定化される。その後、測定対象となる抗原を含む溶液を流し、固定化抗体との特異的結合反応を生じさせる。測定時には、プリズム側から金薄膜に対して、全反射条件を満たす臨界角より大きい入射角でレーザー光を照射する。このとき、金薄膜界面にはエバネッセント波が発生し、界面近傍に存在する自由電子の集団振動である表面プラズモンと共鳴条件を満たすと、入射光エネルギーの一部が表面プラズモンの励起に消費される。その結果、反射光強度が急激に減衰する現象が観測される。この反射光強度が最小となる入射角は共鳴角と呼ばれ、金薄膜表面近傍の屈折率に依存して変化する。抗原-抗体反応が進行すると、金薄膜表面に結合した生体分子層の質量および密度が変化し、局所的な屈折率が変化するため、共鳴角も変化する。したがって、抗原反応前後における共鳴角のシフト量を測定することで、抗原量や結合挙動を定量的に評価することが可能である。

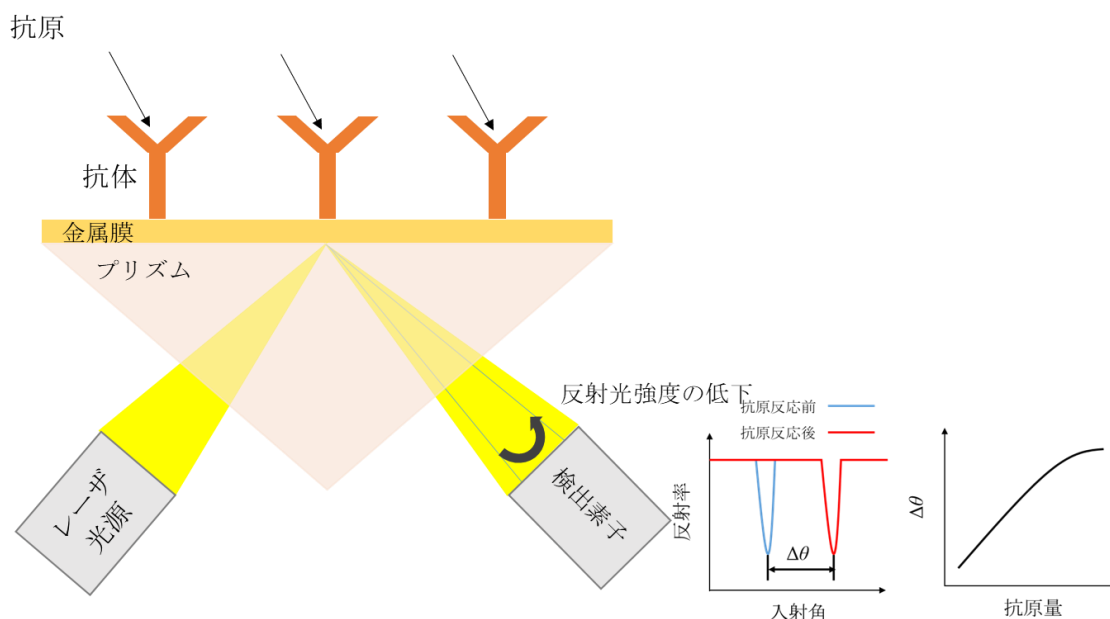


図 4.3.2 SPR 法を用いた抗原の検出原理

SPR 法の利点として、ELISA 法のような酵素標識や蛍光標識を必要とせず、生体分子間相互作用をリアルタイムかつ非標識で観測できる点が挙げられる。また、結合および解離過程を連続的に追跡できるため、反応速度定数の解析にも適している。一方で、SPR 信号は金薄膜表面に吸着した分子の質量および屈折率変化に依存するため、分子量の小さい抗原や低濃度試料に対しては感度が低下するという課題がある。さらに、プリズム、レーザー光源、高精度角度制御機構などから構成される精密な光学系を必要とするため、装置構成が複雑であり、測定系の小型化や現場適用が困難である点も指摘されている。

これまでに、生体分子間相互作用の検出手法として、ELISA や SPR 法が広く用いられてきた。ELISA 法は高い感度および定量性を有する標準的な手法である一方で、酵素や蛍光分子などの標識操作を必要とし、測定工程が煩雑になるという課題がある。また、測定結果は主として試料全体の平均的な応答に基づくため、空間的な分布情報を得ることは困難である。SPR 法は非標識でのリアルタイム検出が可能であり、分子間相互作用を動的に観測できる点に優位性を有する。しかしながら、検出領域は比較的広く、局所的な分子結合や反応分布を高い空間分解能で可視化することには制限がある。

これに対して、TCM は、非標識・非接触での検出が可能であり、測定工程が簡便であるという特長を有する。さらに、フェムト秒レーザーを用いた局所励起により、マイクロメートルオーダーの空間分解能で生体分子間相互作用を二次元的に可視化できる点が、他の既存技術にはない大きな利点である。以上の特長から、本研究では、生体分子間相互作用の検出手法としてテラヘルツ波ケミカル顕微鏡を用いた計測に着目し、生体分子検出への応用を検討する。

#### 4.4 まとめ

本章では、TCM を用いた生体分子検出の基礎として、生体分子の種類および生体分子間相互作用の物理化学的特性について整理するとともに、従来用いられてきた代表的な検出技術について概説した。特に、本研究で対象とする抗原抗体反応およびアビジン-ビオチン反応を中心に、その結合特異性および検出原理を体系的にまとめた。

4.1 節では、タンパク質をはじめとする生体分子の基本構造および機能について概説した。生体分子は一次構造から高次構造に至る階層的な構造を有しており、その立体構造が機能発現および分子認識に強く関与している。特に、タンパク質表面に存在する電荷分布や親水性・疎水性領域は、他の生体分子との相互作用を決定づける重要な要因であることを示した。このような分子表面の電氣的・化学的特性は、TCM における表面電位変化の起源と密接に関係しており、本研究における検出メカニズムの理解に不可欠である。

4.2 節では、生体分子間相互作用の代表例として、抗原抗体反応およびアビジン-ビオチン反応について詳細に述べた。抗原抗体反応は、高い特異性と親和性を有する分子認識機構であり、医療診断やバイオセンシング分野において広く利用されている。一方、アビジン-ビオチン反応は、極めて強固な結合力を有し、固定化技術や標識技術の基盤として重要な役割を果たしている。本章では、これらの相互作用が単なる結合現象にとどまらず、分子結合に伴う表面電荷状態や局所電位分布の変化を引き起こす点に着目し、TCM による検出原理との関連性を明確にした。

4.3 節では、生体分子間相互作用を検出する既存技術として、酵素免疫測定法 (ELISA) および表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を取り上げ、それぞれの原理、利点および課題について整理した。ELISA は高感度かつ定量性に優れる一方で、標識操作や多段階の前処理が必要であり、リアルタイム性に制約がある。SPR 法は無標識かつリアルタイム測定が可能であるが、装置構成の複雑さや測定条件の制約が存在することを示した。これら既存技術との比較を通じて、TCM が無標識・非接触・液中測定という特長を併せ持つ新しいセンシング手法であることを位置づけた。

以上より、本章では、生体分子間相互作用の基礎的理解と、それを検出するための従来技術の限界を明確にした。これにより、生体分子の結合や吸着に伴う表面電位変化を直接的に捉える TCM の有効性および独自性が、理論的観点から裏付けられた。本章で整理した知見は、次章で展開するがん細胞検出実験において、なぜ特異的な分子認識がテラヘルツ波振幅変化として観測されるのかを理解するための重要な基盤となる。次章では、これらの基礎理論を踏まえ、がんゲノム医療を見据えた液中細胞検出への TCM の応用について述べ、実際の生体試料を対象とした検出性能および特異性を実験的に検証する。

## 第5章 がんゲノム医療に向けた液中細胞検出

本章では、TCM を用いたがん細胞検出について検討し、本手法ががんゲノム医療における液体生検技術として有する可能性を示す。まず、がんゲノム医療および液体生検の背景を整理し、血中循環腫瘍細胞などの検出が持つ臨床的意義を明確にする。次に、TCM によるがん細胞検出の基本原則、センシングプレート上の化学修飾手法、および試料調製方法について概説する。さらに、がん細胞濃度とテラヘルツ波振幅応答の関係、特異性評価、混合細胞試料における検出特性、および AFM 等による表面固定状態の検証結果を示し、TCM が液中細胞検出プラットフォームとして成立することを実験的に明らかにする。

### 5.1 がんゲノム医療と液体生検の背景

近年、がんの発症および進展が遺伝子変異や分子レベルの異常と密接に関連していることが明らかとなり、個々の患者のゲノム情報に基づいて最適な治療方針を選択する「がんゲノム医療」が国際的に注目されている。がんゲノム医療の概念は、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencing : NGS) 技術の発展を背景として 2010 年代以降に本格化し、腫瘍の遺伝子変異プロファイルに基づく精密医療 (Precision Medicine) の中核を成す医療戦略として位置づけられている。日本においても、がんゲノム医療は国家的医療政策の一環として推進されてきた。2015 年には「がんゲノム医療実現推進に向けた体制整備」が提唱され、2018 年にはがん遺伝子パネル検査が保険適用となった。これに伴い、全国にがんゲノム医療中核拠点病院・連携病院が整備され、診断から治療方針決定までを包括的に支援する体制が構築されている。これらの政策的支援は、がんを単一の疾患として捉えるのではなく、分子レベルで層別化された疾患群として理解し、患者一人ひとりに適した医療を提供することを目的としている。

がんゲノム医療では、腫瘍組織に存在する遺伝子変異や分子特性を高精度に把握することが不可欠であり、診断精度の向上や治療効果の最大化、さらには副作用の低減が期待されている。一方で、がんは時間とともに遺伝子変異を蓄積し、治療過程においても分子特性が変化する動的な疾患であるため、単一時点で取得された組織情報のみでは十分とは言えないという課題が指摘されている。このような腫瘍の時間的・空間的多様性を考慮した継続的モニタリング手法の確立は、がんゲノム医療の高度化において重要な課題である。従来のがん診断では、手術や生検によって腫瘍組織を直接採取し、病理学的あるいは分子生物学的解析を行う組織生検が主流であった。図 5.1 に、一般的ながん遺伝子パネル検査における組織検査の実験 (臨床) フローを示す。図に示すように、本手法では腫瘍組織の採取後、病理診断による検体評価、核酸抽出、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析、および専門家による結果解釈といった複数の工程を経て診断が行われる。しかし、組織生検は侵襲性が高く、患者への身体的・精神的負担が大きいだけでなく、繰り返し実施することが困難である。また、採取部位に依存するため、腫瘍全体や転移巣を十分に反映できない場合も少なくない。

このような背景から、低侵襲かつ反復可能ながん診断・モニタリング手法として、血液などの体液を用いる「液体生検 (Liquid Biopsy)」が近年急速に発展している。

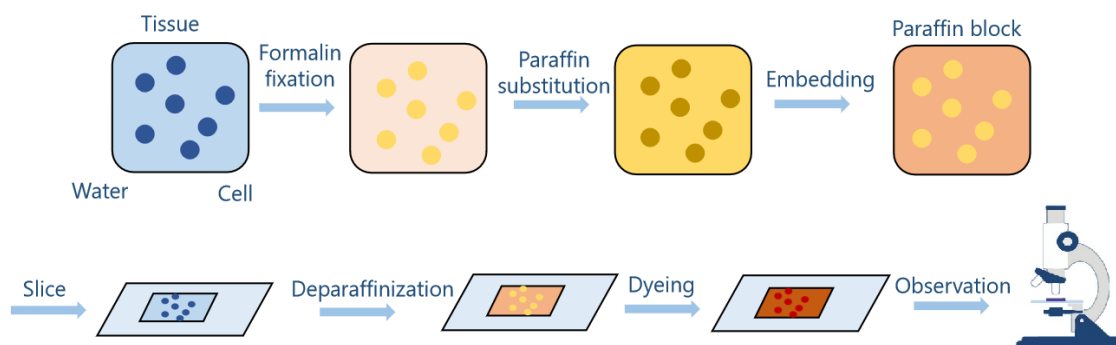


図 5.1 一般的ながん遺伝子パネル検査における組織検査

液体生検では、血液中に存在する循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cells : CTCs)、腫瘍由来 DNA (circulating tumor DNA : ctDNA)、エクソソームなどを解析対象とし、腫瘍の分子情報を間接的に取得する。特に CTCs は、原発巣や転移巣から血中に放出された生き残ったがん細胞であり、がんの転移機構や治療抵抗性の理解において重要な情報を有すると考えられている。しかしながら、CTCs は血液 1 mL あたり数個以下という極めて低濃度で存在することが多く、高感度かつ高選択的な検出技術が求められている。医学的観点からは、液中がん細胞を高感度に検出・定量することにより、がんの早期診断、治療効果のリアルタイム評価、再発や転移の予測といった臨床的価値が期待される。これらは患者の予後改善のみならず、過剰治療の回避や医療資源の最適化にも寄与し、社会全体の医療効率向上および生命福祉の向上につながる重要な要素である。一方、工学的観点からは、複雑な前処理や標識操作を必要とせず、微量試料を迅速かつ再現性良く測定可能な新規センシング技術の開発が重要な課題となっている。特に、溶液中に存在する生体試料を非接触・非標識で評価可能な計測手法は、従来技術の制約を補完し、臨床現場への実装可能性を高める上で有力なアプローチと位置づけられる。

このように、がんゲノム医療の進展と液体生検の高度化は、医学的要求と工学的技術開発が密接に結びついた学際的課題であり、高感度かつ汎用性の高い液中がん細胞検出技術の確立が強く求められている。本研究は、このような社会的・医療的要請を背景として、工学的視点から新たな液中細胞検出手法を提案し、がんゲノム医療および将来的な個別化医療への貢献を目指すものである。

## 5.2 TCM を用いたがん細胞の検出実験

### 5.2.1 TCM によるがん細胞検出の基本原則

前章までに述べたように、TCM は半導体センシングプレート表面の電位変化をテラヘル

ツ波放射強度として高感度に検出可能である。本研究では、この計測原理を生体分子間相互作用の検出に応用し、がん細胞の非標識かつ選択的検出を行う。図 5.2.1 (a) (b) は、それぞれがん細胞反応前および反応後におけるセンシングプレートのエネルギーバンド構造と、その表面状態を模式的に示したものである。本手法では、3.1.1 節で述べた抗原抗体反応の特異性に基づき、測定対象となるがん細胞表面抗原を認識する抗体を、あらかじめセンシングプレート表面に固定化する。ここで固定化された抗体は、がん細胞表面に発現する特定の膜タンパク質（抗原）を選択的に認識する役割を担っている。

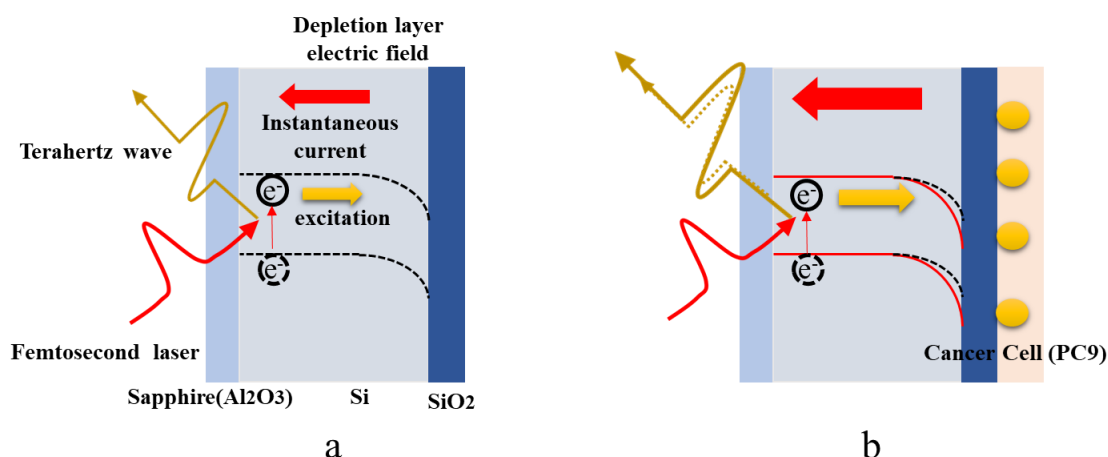


図 5.2.1 TCM を用いたがん細胞の検出原理 (a) 反応前 (b) 反応後

がん細胞との反応前においては、抗体固定化後の状態を初期状態とし、TCM を用いてテラヘルツ波振幅強度を測定する。次に、抗体を固定化したセンシングプレート上にごん細胞を導入すると、抗原抗体反応を介して細胞が表面に特異的に結合する。すなわち、本手法におけるがん細胞検出の本質は、がん細胞そのものではなく、細胞表面に発現する分子（抗原）と抗体との特異的結合反応を検出している点にある。がん細胞は細胞膜表面に由来する電荷や双極子構造を有しており、抗原抗体反応を通じて細胞がセンシングプレート表面近傍に固定化されることで、表面電位が変化する。その結果、半導体内部に形成される空乏層の電界分布が変調される。2.2 節で述べたように、TCM において観測されるテラヘルツ波は、光励起キャリアが空乏層電界によって加速されることで発生し、その振幅は空乏層電界の強さに比例する。したがって、がん細胞の結合に起因する表面電位および空乏層電界の変化は、テラヘルツ波振幅強度の変化として反映される。

以上より、がん細胞反応前後におけるテラヘルツ波振幅強度を比較することで、がん細胞の存在を非標識かつ電気的に検出することが可能となる。本検出原理は、蛍光標識や酵素反応を必要とせず、抗原抗体反応に基づく界面電荷変化を直接読み出す点に特徴がある。さらに、固定化する抗体を変更することで、がん細胞に限らず、特定のタンパク質や生体分子を

標的とした検出へと拡張可能であり、がん診断や分子標的医療への応用が期待される。

### 5.2.2 センシングプレートの化学修飾

TCM を用いたがん細胞検出においては、抗原抗体反応をセンシングプレート表面上で安定かつ再現性良く進行させることが不可欠である。そのため、本研究では、 $\text{SiO}_2$  表面を基盤とした段階的な化学修飾を行い、生体分子を高密度かつ安定に固定化可能な界面を構築した。図 5.2.2 に、センシングプレート表面における化学修飾プロセスの概念図を示す。本手法では、無機材料である  $\text{SiO}_2$  表面に有機官能基を導入し、さらに生体分子を共有結合的に固定化することで、生体分子認識に適したハイブリッド界面を形成している。

まず、センシングプレート表面に付着した油分や有機汚染物を除去し、清浄な表面状態を得るため、アセトン (99.5%, Sigma-Aldrich Japan G.K (シグマアルドリッチジャパン合同会社), 東京都目黒区) およびエタノール (99.5%, 林純薬工業株式会社, 大阪府大阪市) による超音波洗浄をそれぞれ 2 分間行った。これにより、表面の脱脂および殺菌・消毒を同時に実施した。その後、センシングプレートを測定用基板に接着剤で固定し、安定した測定環境を構築した。

次に、Milli-Q 水で 200 mM に希釈した NaOH (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪府中央区) を各ウェルに添加し、シェーカー上で振盪することで、 $\text{SiO}_2$  表面をアルカリ処理した。この処理により、 $\text{SiO}_2$  表面にヒドロキシ基 ( $-\text{OH}$ ) が生成され、後続のシランカップリング反応に適した活性表面が形成される。

ヒドロキシ基を導入した表面に対して、(3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) (99%, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA) を反応させることで、 $\text{SiO}_2$  表面にアミノ基 ( $-\text{NH}_2$ ) を導入した。APTES はシランカップリング剤として広く用いられており、無機表面と有機分子を化学的に接続する役割を担う。

導入したアミノ基を生体分子固定化に適した反応状態とするため、ホモ二官能性架橋剤である BS3 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 2 mg (0.002 g) を反応させた。BS3 は NHS エステル基を有し、アミノ基と共有結合することで、表面官能基を活性化する。

最後に、アビジン (Vector Laboratories, Inc., Newark, CA, USA) を反応させることで、センシングプレート表面にアビジンを共有結合的に固定化した。アビジンはビオチンに対して極めて高い親和性を有することから、後続のビオチン標識抗体や生体分子を高密度かつ安定に固定化するための基盤として機能する。

このアビジン固定化戦略により、抗体や生体分子の種類を変更するだけで、さまざまな標的分子に対応可能な汎用的センシングプレートを構築できる点が、本手法の大きな利点である。

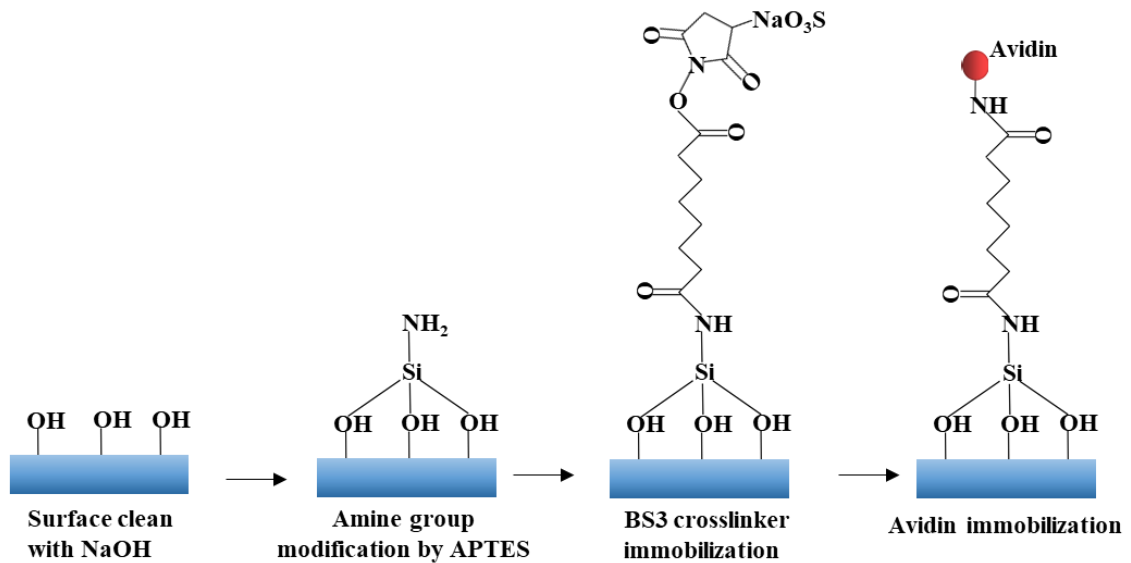


図 5.2.2 センシングプレート表面における化学修飾プロセスの模式図  
(SiO<sub>2</sub> 表面の洗浄, ヒドロキシ化, APTES 修飾, 架橋反応, アビジン固定化)

### 5.2.3 細胞培養および試料調製

がん細胞培養を行う主な目的は、TCM を用いた検出実験において、生理学的に健全で再現性の高い細胞試料を安定的に供給することにある。本研究では、モデルがん細胞として肺腺がん培養細胞を用い、センシングプレート上に固定化された抗体との特異的相互作用に基づく検出特性を評価した。本研究で使用した肺腺がん培養細胞は細胞バンクより入手し、解凍後、RPMI-1640 培地を用いて培養を行った。培養は、温度 37 °C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% に制御された CO<sub>2</sub> 培養箱内で行い、細胞が生理条件下で安定的に増殖する環境を維持した (図 5.2.3(a))。培養方法としては、細胞表面状態を均一に保ちやすく、形態観察が容易である静置培養法を採用した。

TCM 測定に用いる細胞試料については、測定直前に細胞数および生存率の確認を行った。細胞数は自動セルカウンターを用いて定量評価し、測定に用いる細胞懸濁液の濃度を一定範囲内に調整した。この操作により、TCM 測定における信号変化が細胞数のばらつきに起因しないよう配慮した。さらに、細胞の生存率はトリパンブルー染色法により評価した。細胞懸濁液と 0.4% トリパンブルー染色液を混和し、染色後の細胞を自動セルカウンターにより解析した結果、測定に用いた細胞はいずれも 98% 以上の高い生存率を示した (図 5.2.3(b))。この結果から、本研究において使用した細胞は、死細胞や膜損傷細胞の影響が極めて少なく、TCM により観測される信号変化が、細胞死ではなく、抗原抗体反応に起因する界面電位変化を反映していることが示唆される。

(a)



(b)

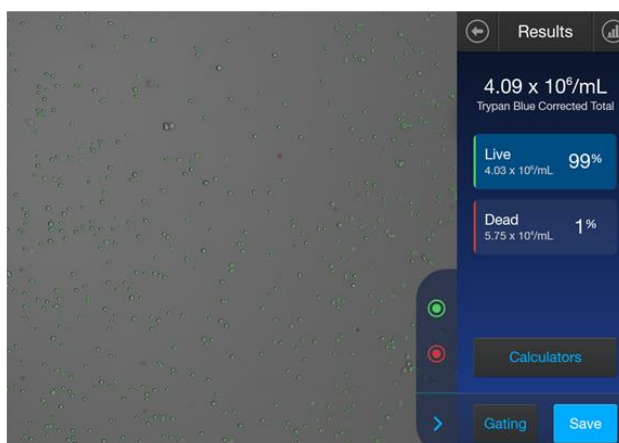


図 5.2.3 (a) (a) CO<sub>2</sub> 培養箱 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)

(b) 自動セルカウンターによる細胞数測定結果

以上のように、本研究では、培養環境、細胞数、および生存率を厳密に管理・確認した上で細胞試料を調製しており、TCM を用いたがん細胞検出実験の信頼性および再現性を担保している。

### 5.3 結果および考察

#### 5.3.1 測定対象となるがん細胞および抗体の特性

本研究におけるがん細胞検出実験では、検出対象として肺腺がん由来培養細胞株 PC9 を用い、その細胞表面に発現する上皮系マーカーを認識する抗体として Cytokeratin (AE1/AE3) 抗体を選択した。本節では、これら抗原・抗体の選択理由および、本研究全体

における位置づけについて述べる。

がん細胞検出技術の開発において重要となるのは、特定の臓器がんに限定した検出にとどまらず、がん細胞一般に共通する生物学的特徴を捉えた汎用的な検出原理を確立することである。本研究で用いる TCM は、細胞表面に由来する電荷変化や界面電位変化を検出する手法であり、特定の遺伝子変異や分子構造そのものを直接同定するものではない。そのため、本研究の主眼は「肺がん細胞の診断」そのものではなく、抗原抗体反応を介してがん細胞がセンシングプレート表面に固定された際に生じる物理量変化を、TCM によってどのように高感度に検出できるかを実証することに置かれている。この観点から、本研究ではモデルケースとして肺腺がん細胞を採用している。肺腺がんは臨床的にも罹患率が高く、また液体生検や循環腫瘍細胞 (CTC) 検出の対象としても注目されている代表的ながん種である。中でも PC9 細胞は、肺腺がん由来のヒト培養細胞株として広く利用されており、増殖特性が安定で再現性の高い実験が可能であることから、本研究における検出原理実証用モデル細胞として適している。

一方、検出に用いる抗体として選択した Cytokeratin (AE1/AE3) は、上皮細胞由来の中間径フィラメントであるサイトケラチン群を広範囲に認識する抗体カクテルである。Cytokeratin は多くの上皮系がん細胞に共通して高発現しており、臨床病理学的にもがん細胞同定の標準マーカーとして用いられている。特に、血液中に存在する循環腫瘍細胞の同定においては、Cytokeratin 陽性・白血球マーカー陰性という判定基準が一般的に採用されている。このような背景から、本研究で Cytokeratin (AE1/AE3) 抗体を用いることにより、TCM による検出対象を「肺腺がん細胞」という個別の疾患モデルに限定しつつも、検出原理そのものは「上皮系がん細胞一般」に拡張可能であることを示すことができる。すなわち、本節で示す結果は、肺腺がんに特化した検出にとどまらず、将来的な多様ながん種への応用可能性を内包している。

さらに、本研究では抗原抗体反応を利用してがん細胞をセンシングプレート表面に固定化し、その反応前後におけるテラヘルツ波振幅強度の変化を比較することで検出を行っている。この手法は、蛍光標識や酵素反応を必要としない非標識検出であり、抗体と細胞の結合に伴って生じる界面電荷変化を直接的に物理量として捉える点に特徴がある。したがって、抗原・抗体の組み合わせを変更することで、異なるがん細胞や生体分子へと容易に展開可能なプラットフォーム技術であると位置づけられる。以上より、本節では肺腺がん培養細胞 PC9 および Cytokeratin (AE1/AE3) 抗体を用いたモデル実験系を通じて、TCM によるがん細胞検出の有効性を検証する。本章で得られる知見は、後続の特異性評価、混合試料に対する検出実験、さらには第 7 章で述べるセンシングプレートおよび測定系の高感度化・再現性向上手法の妥当性を評価するための基盤となる。

### 5.3.2 化学修飾センシングプレート上におけるがん細胞検出プロセス

本節では、5.2.1 節で述べた TCM によるがん細胞検出原理に基づき、本研究で用いた修

飾センシングプレート上における抗原抗体反応の具体的な実験プロセスと、測定対象となる物理量について述べる。本節で示す反応および測定手順は、本章以降に示すすべての細胞検出実験に共通する標準プロトコルである。図 5.3.2 (a) に、本研究で使用した測定用基板の構造および外観を示す。本図では、測定用基板の正面および裏面の両面構造を示している。裏面側には、センシングプレートが測定用基板に固定されており、機械的安定性および測定時の液漏れ防止の観点から、センシングプレートと測定用基板は粘着剤（接着剤）を用いて接着・固定している。一方、正面側には溶液を導入するためのウェル構造が形成されており、各ウェル内において抗原抗体反応および細胞反応を行う構成となっている。まず、5.2.2 節で述べた化学修飾手順に従い、センシングプレート表面にアビジンを固定化する。その後、図 5.3.2(b) ようにビオチン標識された Cytokeratin 抗体 (biotin Cytokeratin, AE1/AE3, Protein A or G purified, Novus, USA) を pH 7.4 の PBS で 86  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈した溶液を、各ウェルに導入する。これをシェーカー (Corning LSE Orbital Shaker) により 45 rpm で 30 分間反応させることで、アビジン-ビオチン間の高親和性結合を介して抗体をセンシングプレート表面に安定に固定化する。抗体固定化後、肺腺がん培養細胞反応前の初期状態として、TCM によるテラヘルツ波振幅強度の測定を行う。測定は、測定範囲 8 mm  $\times$  8 mm, 測定間隔 0.5 mm の条件で二次元イメージングとして取得し、これを反応前の基準データとする。この測定により、抗体固定化のみが行われた状態におけるセンシングプレート表面電位分布に対応したテラヘルツ波強度分布が得られる。

次に、肺腺がん培養細胞 (PC9) を培養液で 0 cell/mL,  $10^3$  cell/mL,  $10^4$  cell/mL,  $10^5$  cell/mL に希釈した溶液を、各ウェルに導入する。ここで、0 cell/mL の条件は培養液のみを導入したリファレンス試料として用いる。これらの試料をシェーカーで 45 rpm, 15 分間振盪することにより、抗体と肺腺がん培養細胞との抗原抗体反応を促進し、細胞をセンシングプレート表面に特異的に結合させる。反応後、各ウェル内の溶液を除去し、pH 7.4 の PBS を用いて 10 回洗浄を行うことで、非特異的に吸着した未結合細胞を除去する。洗浄後、反応前と同一条件（測定範囲 8 mm  $\times$  8 mm, 測定間隔 0.5 mm）にて、肺腺がん培養細胞反応後のテラヘルツ波振幅強度を測定し、二次元イメージングを取得する。TCM において測定される物理量は、センシングプレート表面近傍の電位変化に起因する空乏層電界の変調を反映したテラヘルツ波振幅強度である。がん細胞が抗原抗体反応によりセンシングプレート表面に結合すると、細胞膜表面に由来する電荷分布が界面電位を変化させ、その結果として空乏層電界が変調される。この電界変化はテラヘルツ波放射強度の変化として検出されるため、反応前後におけるテラヘルツ波振幅強度の差分を評価することで、がん細胞の存在および濃度依存的な応答を定量的に評価することが可能となる。

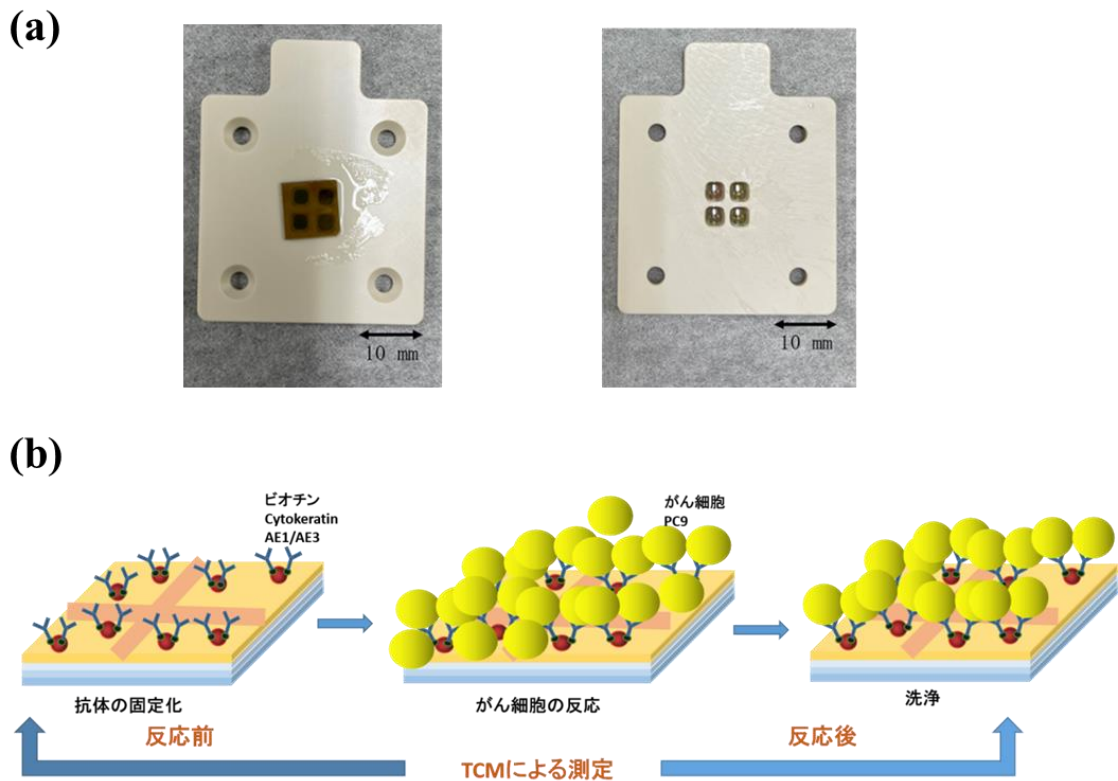


図 5.3.2 (a) 実験で使用した測定用基板 (b) 実験手順の概略図

なお、本研究で使用した測定用基板は、多ウェル構造を有しており、形成されるウェルのサイズおよび配置数は、測定対象や実験条件に応じて柔軟に調整可能な設計となっている。これにより、抗原抗体の種類や濃度のみならず、各試料の体積および同時測定する試料数を実験目的に応じて変更することが可能である。このような多ウェル構成を採用することで、異なる試料条件を同一センシングプレート上で同時に評価することが可能となり、濃度依存性の比較や対照試料との並列測定など、生物実験において重要な実験設計を効率的に実施できる。さらに、同一基板上で複数条件を測定することにより、測定環境やセンシングプレート特性に起因するばらつきを低減でき、試料間の差異をより明確に評価することが可能となる。

本章以降に示す各実験では、5.3.2 節で述べた反応および測定プロトコルを基本とし、抗原抗体の種類、濃度条件、試料体積、ならびにウェルのサイズおよび配置数を実験目的に応じて適宜変更して測定を行った。これにより、多様な実験条件下におけるがん細胞および生体分子検出特性を、統一した物理量に基づいて系統的に評価している。

### 5.3.3 表面固定状態の検証：AFM および染色法による評価

本節では、センシングプレート表面における抗体および細胞の固定状態を確認するため、原子間力顕微鏡 (AFM) 観察および染色法による評価を行った。TCM による検出結果の信

頼性を担保するためには、抗体がセンシングプレート表面に適切に固定化されていること、ならびに抗体-細胞反応後に細胞が表面上に保持されていることを実験的に確認する必要がある。

抗体固定前後におけるセンシングプレート表面の形態変化を評価するため、AFM 観察を行った。図 5.3.3 (a) に、抗体固定前 (左) および抗体固定後 (右) の AFM 像を示す。抗体固定前の表面は比較的平滑であるのに対し、抗体固定後には表面粗さの増加や微細な構造変化が確認され、抗体分子がセンシングプレート表面に固定化されたことを示唆している。この結果より、前節までで用いた抗体固定プロセスが有効に機能していることが確認された。

次に、抗体-細胞反応後における細胞の表面保持状態を確認するため、染色法による評価を行った。細胞反応後、センシングプレート表面をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、非特異的に吸着した成分を除去した。その後、医療機関の病理技師との協力のもと、標準的な細胞染色操作を施した。図 5.3.3 (b) に、測定用基板に固定されたセンシングプレートの外観写真と、その中の一つのウェルを拡大した染色後の観察像を示す。図中の黒枠で示したウェルに対応する領域において、紫色に染色された領域が確認され、抗体-細胞反応後に細胞がセンシングプレート表面上に保持されていることが視覚的に確認された。本研究では、染色試薬の詳細な組成や染色機構の解析を目的としておらず、染色結果はあくまで細胞の存在確認を目的とした補助的評価として用いている。

以上の AFM 観察および染色結果より、本研究で用いた抗体固定および細胞反応プロセスにおいて、抗体ならびに細胞がセンシングプレート表面に適切に固定・保持されていることが確認された。これらの結果は、前節までに示した TCM による検出結果を物理的・形態学的観点から裏付けるものである。

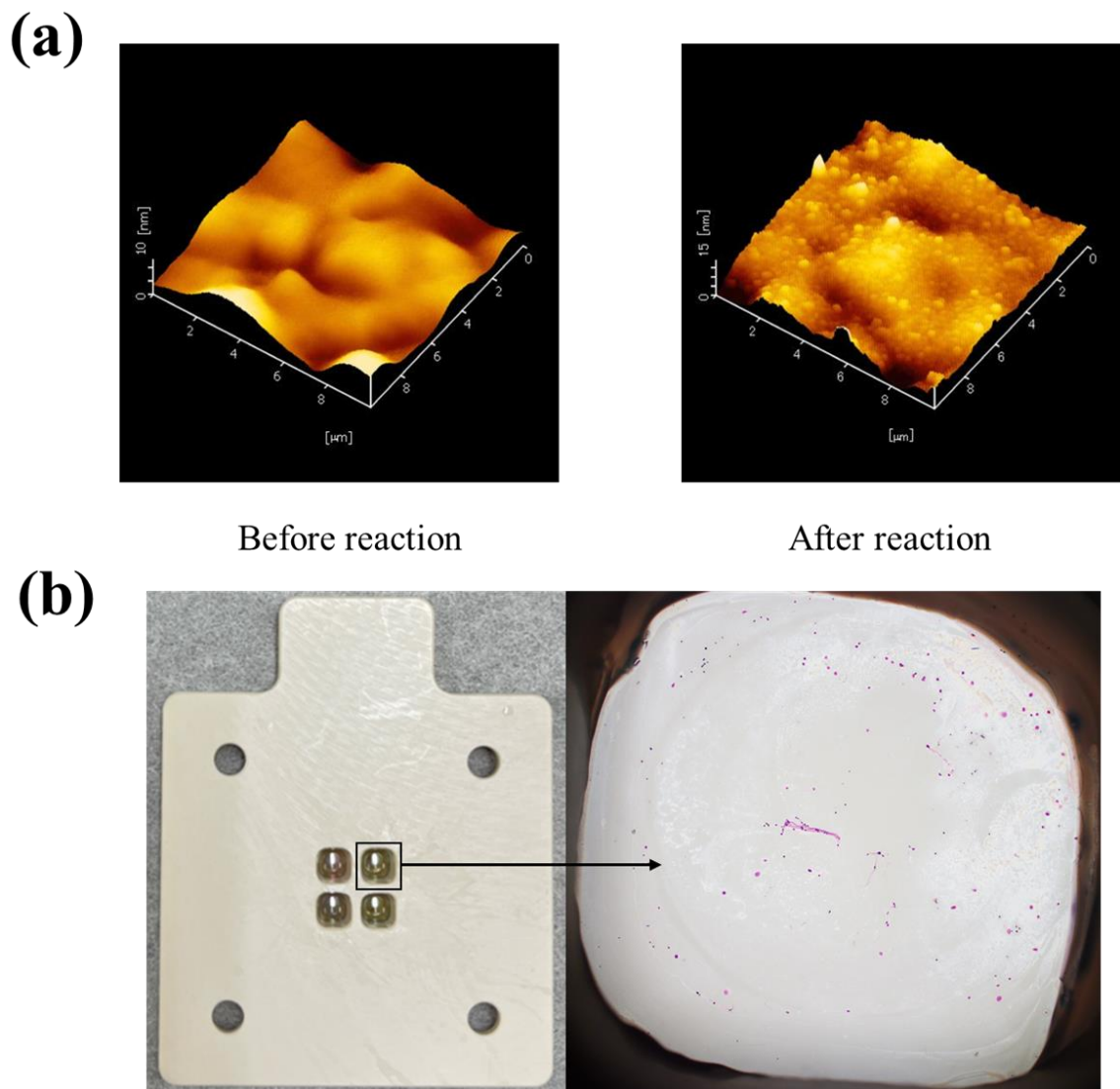


図 5.3.3 (a) 抗体固定前 (左) および抗体固定後 (右) のセンシングプレート表面を原子間力顕微鏡 (AFM) により観察した結果を示す。抗体固定前には比較的平滑な表面が観察されるのに対し、抗体固定後には表面粗さの増加および微細構造の変化が確認され、抗体分子がセンシングプレート表面に固定化されたことを示唆している。

(b) 測定用基板に固定されたセンシングプレートの外観写真と、黒枠で示したウェル領域に対応する染色後の拡大観察像を示す。抗体-細胞反応後に PBS 洗浄を行った後、細胞染色を施した結果、紫色に染色された領域が確認され、細胞がセンシングプレート表面上に保持されていることが視覚的に確認された。

#### 5.3.4 がん細胞濃度とテラヘルツ波振幅強度の関係

図 5.3.4 (a) に、抗体固定化後の肺腺がん培養細胞反応前および反応後におけるテラヘル

ツ波強度のイメージング結果を示す。同一図内において、反応前および反応後の結果を対比して示しており、測定範囲内の色調の違いは、テラヘルツ波振幅強度の空間分布の差異を表している。反応前後のイメージングを比較することで、各ウェルにおいてテラヘルツ波強度が変化していることが確認できる。次に、反応前後のイメージングデータから、各ウェルごとにテラヘルツ波振幅強度の平均値を算出した。平均値の算出には、各ウェル中央部に設定した黒線で囲まれた  $1.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$  の正方形領域を用いた。本研究では、反応前後における平均値の差分を、がん細胞結合に起因するテラヘルツ波振幅強度変化量として定義している。この解析手法は、本節以降に示すすべての定量評価実験において共通に適用している。図 5.3.4 (a) を詳細に比較すると、がん細胞を含まないリファレンス試料 ( $0 \text{ cell/mL}$ ) においても、わずかなテラヘルツ波振幅強度変化が観測されている。この変化は、溶液導入や洗浄操作に伴う環境変動、あるいは基板全体への影響に起因すると考えられる。そこで、各ウェルにおけるテラヘルツ波振幅強度変化量から、リファレンスウェルの平均変化量を差し引くことでオフセット補正を行い、がん細胞結合に由来する成分のみを抽出した。

図 5.3.4 (b) に、肺腺がん培養細胞濃度とテラヘルツ波振幅強度変化量の関係を示す。横軸は肺腺がん培養細胞の濃度 ( $\text{cell/mL}$ )、縦軸はオフセット補正後のテラヘルツ波振幅強度変化量である。測定の再現性を確認するため、同一条件下で 4 回の独立した測定を行った。図中のエラーバーは、4 回の測定から算出した標準偏差を示している。図 5.3.4 (b) より、がん細胞濃度の増加に伴い、テラヘルツ波振幅強度が単調に増加する傾向が確認できる。この結果は、がん細胞濃度が高くなるにつれて、センシングプレート表面に固定化された抗体と結合するがん細胞数が増加し、表面電位変化が増大したことを反映していると考えられる。

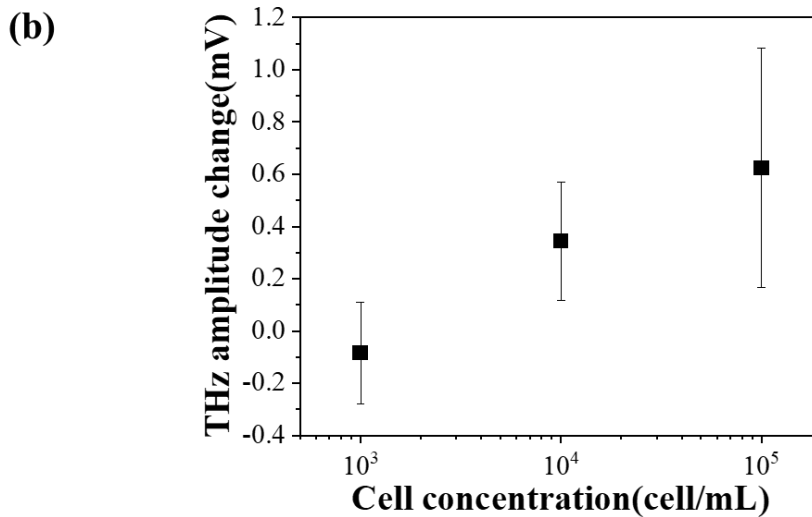
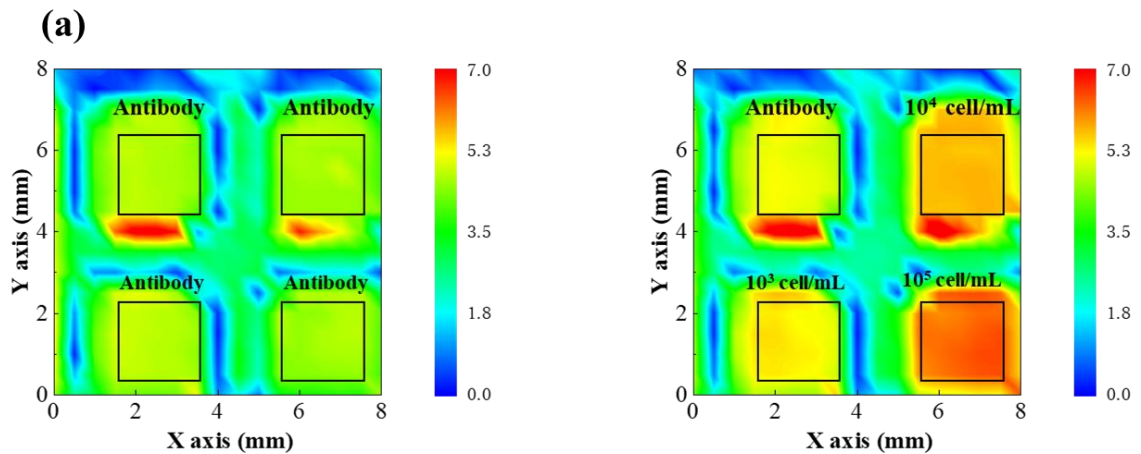


図 5.3.4 (a) テラヘルツ波強度のイメージング結果  
 (b) 肺腺がん培養細胞濃度とテラヘルツ波強度の関係

以上の結果から、TCM を用いることで、アビジン-ビオチン結合を介した抗体固定化系において、がん細胞濃度に依存したテラヘルツ波振幅強度変化を再現性良く検出できることが示された。本節で確立した解析手法および定量指標は、後続の特異性評価実験や混合細胞系試料の解析、さらに第 7 章で述べるシステム最適化後の性能評価においても共通の評価基盤として用いる。

### 5.3.5 特異性評価：異なる細胞種に対する応答比較

本節では、本研究で構築した TCM を用いたがん細胞検出系の特異性を検証するため、標的細胞と非標的細胞に対する応答の比較評価を行った。測定手順およびデータ解析方法は、前節 (5.3.3, 5.3.4) で述べた方法と同一であり、本節では抗原種のみを変数として評価を行っている。

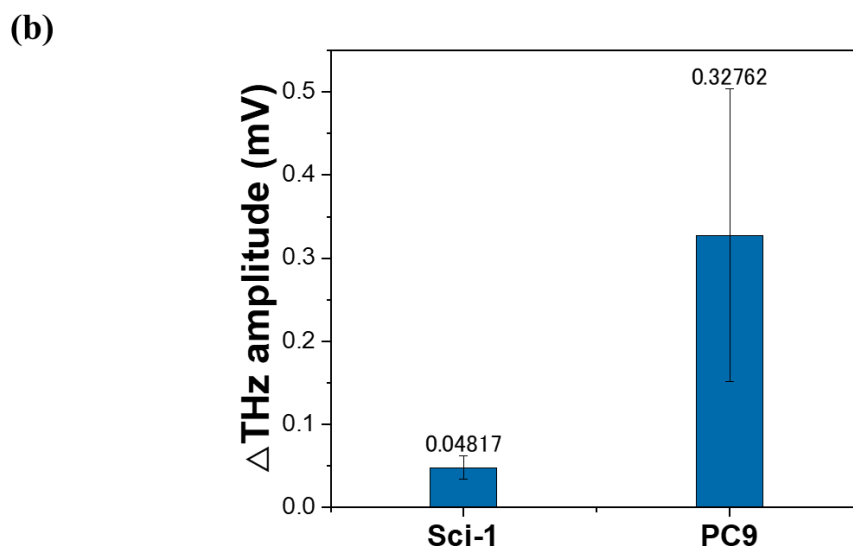
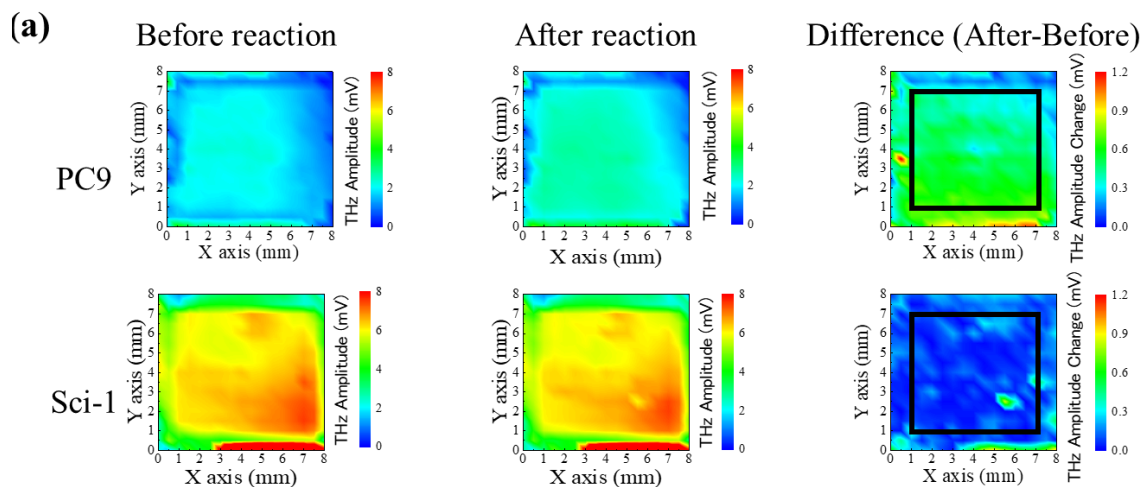


図 5.3.5 (a) biotin 化 Cytokeratin 抗体 (AE1/AE3) を固定化したセンシングプレート上において、肺腺がん培養細胞 (PC9) およびリンパ腫細胞 (Sci-1) を反応させた際の、反応前、反応後、および反応前後の差分として得られたテラヘルツ波振幅強度分布を示している。上段は PC9、下段は Sci-1 に対応する結果である。色の違いはテラヘルツ波振幅強度の相対的な変化を示している。

(b) 図 5.3.5 (a)に示した黒枠で囲まれた領域内において、PC9 および Sci-1 それぞれについて 3 回の独立測定から算出したテラヘルツ波振幅強度変化の平均値を示したものである。PC9 に対しては明瞭な振幅増加が観測される一方、Sci-1 に対する応答は小さく、本検出系が抗体-抗原反応の特異性を反映していることが示唆される。

使用した抗体は、前節までと同様に biotin 化 Cytokeratin 抗体 (AE1/AE3, Protein A or G purified, Novus, USA) であり、抗体濃度およびセンシングプレートへの固定化条件はすべて統一した。抗原としては、標的細胞である肺腺がん培養細胞 (PC9) と、対照群と

してリンパ腫由来培養細胞 (Sci-1) を用いた。両細胞ともに濃度は  $1.0 \times 10^5$  cells/mL に揃えて測定を行った。Cytokeratin は上皮系細胞に特異的に発現する中間径フィラメントタンパク質群であり、上皮系がん細胞の同定マーカーとして広く用いられている。一方、Sci-1 はリンパ系由来の細胞株として分類されており、細胞系データベースおよび免疫表現型解析において、Cytokeratin を発現しない非上皮系細胞として報告されている。このため、本研究では Sci-1 を Cytokeratin 抗体に対する陰性対照細胞として選択し、抗体-抗原反応の特異性評価に用いた。

図 5.3.5 (a) に、PC9 および Sci-1 それぞれについて、反応前、反応後、および反応前後の差分として得られたテラヘルツ波振幅強度分布を示す。PC9 においては、反応後にテラヘルツ波振幅強度の明瞭な増加が観測されたのに対し、Sci-1 においては反応前後での変化が相対的に小さいことが確認できる。さらに、図 5.3.5 (b) には、黒枠で囲まれた領域内におけるテラヘルツ波振幅強度変化について、PC9 および Sci-1 それぞれ 3 回の独立測定から算出した平均値を示す。計算の結果、Sci-1 細胞における反応前後のテラヘルツ波振幅変化は  $0.04817$  mV であったのに対し、PC9 細胞では  $0.32762$  mV と、約一桁大きな変化が得られた。その結果、PC9 に対する応答は Sci-1 に比べて一貫して大きく、本測定系が Cytokeratin 抗体と標的細胞との特異的相互作用に基づく信号を検出している可能性が示唆された。

以上の結果より、本研究で構築した TCM を用いた検出系は、上皮系がん細胞に特異的な抗原抗体反応に対して選択的な応答を示すことが確認された。本特異性評価の結果は、後続章における生体分子検出実験および検出系の応用展開において、本手法の有効性を支持する基盤的知見である。

### 5.3.6 混合細胞試料におけるがん細胞比率依存性評価

実際の生体試料中では、標的となるがん細胞は単独で存在するのではなく、多数の非標的細胞と混在している場合がほとんどである。そのため、がん細胞検出手法の実用性を評価する上では、混合細胞試料中におけるがん細胞比率に対する応答特性を明らかにすることが重要である。本節では、TCM を用いた検出系が、混合細胞試料中におけるがん細胞比率の違いを反映可能かどうかを検証した。使用した抗体は前節までと同様に、biotin 化 Cytokeratin 抗体 (AE1/AE3) であり、抗体濃度および固定化条件はすべて統一した。抗原としては、肺腺がん培養細胞 (PC9) およびリンパ腫細胞 (Sci-1) を用い、両者を混合した細胞懸濁液を測定試料とした。混合比は、

$$\text{PC9:Sci-1} = 2.0 \times 10^4 \text{ cells/mL} : 8.0 \times 10^4 \text{ cells/mL}$$

$$\text{PC9:Sci-1} = 8.0 \times 10^4 \text{ cells/mL} : 2.0 \times 10^4 \text{ cells/mL}$$

の 2 条件とし、総細胞濃度はいずれも  $1.0 \times 10^5$  cells/mL に統一した。細胞反応条件および測定手順は、5.3.3 節および 5.3.4 節で述べた方法と同一である。

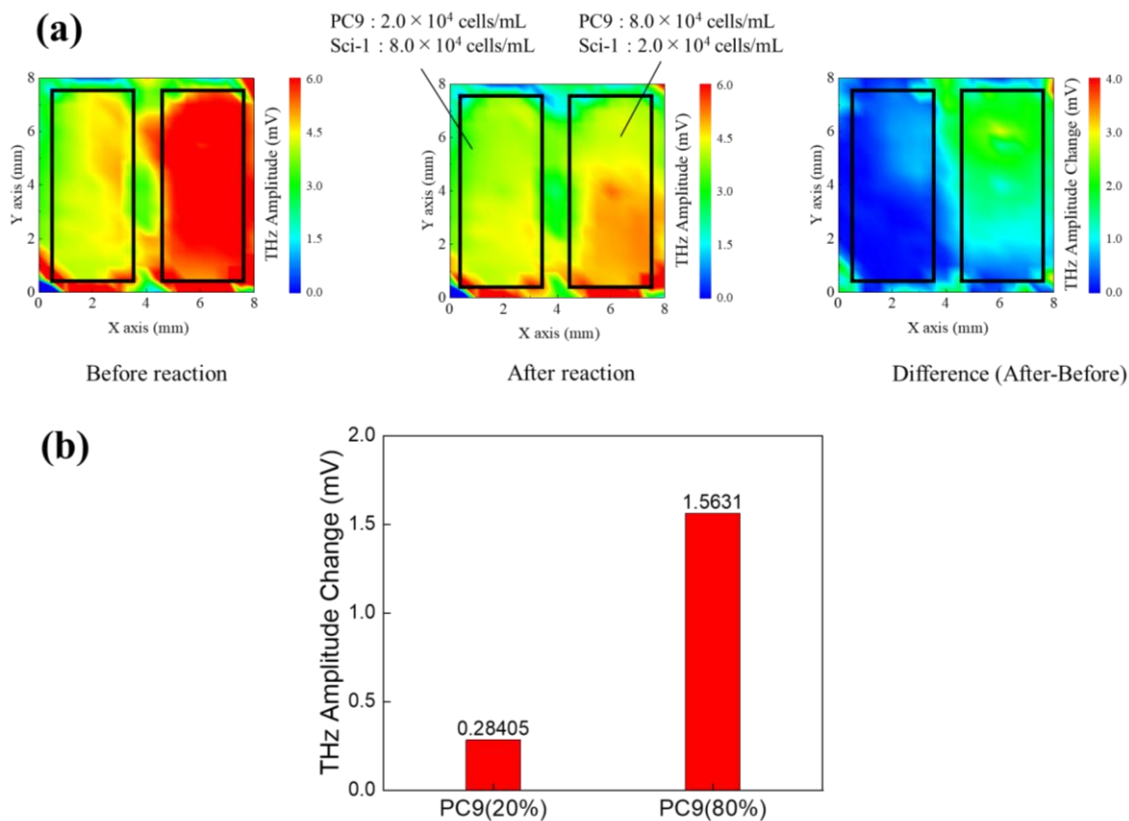


図 5.3.6 (a) 混合細胞試料に対するテラヘルツ波応答の空間分布。左側は PC9:Sci-1 =  $2.0 \times 10^4$  cells/mL :  $8.0 \times 10^4$  cells/mL, 右側は  $8.0 \times 10^4$  cells/mL :  $2.0 \times 10^4$  cells/mL の混合試料について、それぞれ反応前, 反応後, および両者の差分として得られたテラヘルツ波強度分布を示す。差分画像は、抗体-細胞反応に伴うテラヘルツ波応答変化を可視化したものである。

(b) 図 5.3.6 (a) に示した差分画像中の黒枠で囲まれた領域において算出したテラヘルツ波強度変化の平均値。各混合比条件に対して、反応に起因する信号変化の代表値を示している。

図 5.3.6 (a) は、各混合条件における反応前, 反応後, および反応前後の差分として得られたテラヘルツ波振幅強度分布を示している。がん細胞 (PC9) の割合が高い条件では、差分イメージにおいて相対的に大きなテラヘルツ波振幅変化が観測される一方、PC9 の割合が低い条件では振幅変化が小さくなる傾向が確認された。さらに、図 5.3.6 (b) には、差分イメージ中の黒枠で囲まれた領域内におけるテラヘルツ波振幅強度変化の平均値を示す。PC9 の比率が高い混合条件において、より大きな振幅変化が得られており、計算の結果、PC9 比率が 20% の条件では反応前後のテラヘルツ波振幅変化は 0.28405 mV, 一方 80%

の条件では 1.5631 mV であった。これらの結果から、PC9 比率が 80% の条件では、20% の条件と比較して、テラヘルツ波振幅変化がおよそ 5.5 倍に増加していることが確認された。本検出系が混合細胞試料中におけるがん細胞比率の違いを反映して応答している可能性が示唆される。

本節で示した結果は、混合細胞試料中においても TCM による検出原理が成立することを示す概念実証的な結果である。本研究では、混合細胞比率に対する厳密な定量性や統計的再現性の評価を目的とはしておらず、検出感度の詳細な検証については、単一細胞系における濃度依存性評価を通じて第 7 章で議論する。

### 5.3.7 本章結果のまとめと今後の課題

本節では、5.3 節で得られた一連の実験結果を個別に総括するのではなく、TCM を生体分子検出プラットフォームとして位置づける観点から統合的に考察する。

本研究では、アビジン-ビオチン結合を介した抗体固定化センシングプレートを用い、肺腺がん培養細胞 (PC9) をモデル試料として、液中に存在するがん細胞の非標識検出を試みた。その結果、細胞濃度の増加に伴いテラヘルツ波振幅強度が単調に増加することが確認され、TCM が抗体-抗原結合に起因する表面電位変化を、テラヘルツ波放射強度の変化として検出可能であることが実験的に示された。さらに、リンパ腫細胞 (Sci-1) を陰性対照とした特異性評価および混合細胞試料を用いた比率依存性評価により、本手法が単なる細胞存在の検出にとどまらず、標的分子発現の有無や比率の違いを反映した応答を示すことが明らかとなった。これらの結果は、TCM が抗体分子を介した分子認識に基づく検出系として機能していることを裏付けている。また、AFM 観察および染色法による表面固定状態の検証から、抗体および細胞がセンシングプレート表面に安定して固定されていることが確認され、観測されたテラヘルツ波強度変化が、測定系の不安定性ではなく、実際の分子・細胞反応に起因するものであることが支持された。

以上の結果より、本章では、TCM が

1. 抗体-抗原反応を介した生体分子認識が可能であること
  2. 液中試料に対して非標識かつ選択的な検出が可能であること
  3. 同一基板上で多条件を同時評価できる測定プラットフォームであること
- を示すことができた。

一方で、本章で扱った検出対象は主として細胞レベルであり、より分子量の小さいタンパク質に対する感度や応答特性については、さらなる検討が必要である。また、測定感度や再現性の向上に向けては、センシングプレートの構造設計や印加電圧条件など、測定系そのものの最適化が重要となる。

これらの課題を踏まえ、次章 (第 6 章) では、TCM を用いたタンパク質検出への応用可能性を検討し、本章で確立した検出概念を分子レベルへ拡張する。さらに第 7 章では、TCM システム自体の性能最適化および高感度化手法を検討し、本検出プラットフォームの汎用

性と実用性の向上を目指す

#### 5.4 まとめ

本章では、がんゲノム医療の実現に向けた基盤技術として、液体生検におけるがん細胞検出の重要性に着目し、テラヘルツ波ケミカル顕微鏡 (TCM) を用いた液中がん細胞検出の可能性について、基礎原理から実験的検証までを体系的に検討した。

5.1 節では、がんゲノム医療および液体生検の背景について整理し、従来の組織生検が抱える侵襲性や時系列解析の困難さといった課題を明らかにした。その上で、血液などの体液中に存在する循環腫瘍細胞 (CTC) を対象とした高感度・低侵襲な検出技術の必要性を示し、本研究における TCM の位置づけを明確にした。

5.2 節では、TCM によるがん細胞検出の基本原理を示すと同時に、センシングプレートの化学修飾手法、細胞培養条件および試料調製プロセスについて詳細に述べた。特に、抗体を用いた表面修飾により、がん細胞を選択的に固定化する検出系を構築した点は、本研究の検出特異性を担保する重要な要素である。また、液中環境下においても安定した測定が可能であることを示し、TCM が実際の生体試料分析に適用可能であることを実験設計の段階で示した。

5.3 節では、得られた測定結果に基づき、TCM によるがん細胞検出特性を多角的に評価した。まず、がん細胞濃度とテラヘルツ波振幅変化との間に明確な相関関係が成立することを示し、TCM が定性的検出にとどまらず、定量的評価が可能な手法であることを明らかにした。さらに、異なる細胞種を用いた比較実験により、本検出系が抗原抗体反応に基づく高い特異性を有することを確認した。混合細胞試料を用いた評価では、がん細胞比率の変化に応じてテラヘルツ波振幅が連続的に変化することが示され、複雑な細胞環境下においてもがん細胞由来の信号を抽出可能であることが示唆された。これは、実際の臨床試料に近い条件下での検出可能性を示す重要な結果である。さらに、AFM 観察および染色法を用いた表面固定状態の検証により、センシングプレート上にがん細胞が選択的かつ安定的に固定化されていることを直接的に確認した。これにより、観測されたテラヘルツ波振幅変化が、単なる溶液成分の変動ではなく、表面上に固定化されたがん細胞に起因するものであることが実験的に裏付けられた。以上の結果から、本章では、TCM が無標識・非接触という特長を維持したまま、液中がん細胞を高感度かつ特異的に検出可能であることを実証した。本研究で示した検出原理および実験結果は、がんゲノム医療における新たなセンシング手法としての TCM の有効性を示すものであり、将来的な臨床応用に向けた基盤的成果であると位置づけられる。

一方で、本章の結果から、センシングプレート間の感度ばらつきや測定条件による応答差といった課題も明らかとなった。これらの課題は、TCM を実用的な定量計測技術へと発展させる上で避けて通れない問題であり、次章および第 7 章で述べる性能最適化および高感

度化手法の検討へと直結する。次章では、がん細胞検出にとどまらず、神経疾患関連タンパク質や感染症関連タンパク質を対象とした応用探索を行い、TCM の検出対象の汎用性および拡張性について検証する。



## 第6章 分子生体関連物質への応用

本章では、第5章で確立したがん細胞検出手法を基盤として、TCMの応用可能性を他の疾患領域へと拡張する。まず、神経変性疾患および感染症診断における生体分子検出の重要性を整理する。次に、神経疾患関連タンパク質である $\alpha$ -シヌクレインを対象として、TCMによる濃度依存性評価を行い、がん以外の疾患分野への適用可能性を示す。さらに、SARS-CoV-2 Nタンパク質を対象として、アプタマー固定条件の最適化、表面固定状態の検証、濃度依存性および試料量依存性の評価を通じて、TCMによる非標識・微量検出の有効性を詳細に検討する。本章の検討により、TCMが分子種や疾患領域に依存せず柔軟に応用可能な検出プラットフォームであることを示す。

### 6.1 医療応用の背景（神経疾患・感染症診断の重要性）

近年、医療分野においては、疾患の早期診断および進行状態の把握を目的とした高感度かつ低侵襲な検出技術の重要性が急速に高まっている。とりわけ、中枢神経疾患や感染症といった分野では、病態の進行に伴う分子レベルの変化を迅速に捉えることが、治療方針の決定や予後評価に直結するため、従来法に代わる新たな計測プラットフォームの確立が強く求められている。

神経変性疾患に代表されるアルツハイマー病やパーキンソン病では、発症前あるいは極めて初期段階においてすでに特定のタンパク質が異常蓄積または構造変化を起こすことが知られている。しかしながら、これらの疾患は臨床症状が顕在化した時点では病態が進行している場合が多く、早期段階での分子検出が診断・介入の鍵となる。一方、感染症診断においても、病原体由来タンパク質を迅速かつ高感度に検出する技術は、パンデミック時の感染拡大抑制や医療現場での即時判断において極めて重要である。

現在広く用いられている免疫測定法や核酸増幅法は、高い感度と特異性を有する一方で、蛍光・酵素標識、複雑な前処理、あるいは試薬反応時間を必要とする場合が多い。また、測定系が対象分子ごとに最適化されており、異なる疾患分子を同一原理・同一プラットフォームで評価することが困難である点も課題として挙げられる。

こうした背景のもと、本研究で用いているTCMは、半導体センシングプレート表面における電位変化をテラヘルツ波放射強度として検出するという物理原理に基づき、標識を必要としない生体分子検出を可能とする手法である。TCMは、抗体やアプタマーといった分子認識素子を組み合わせることで、検出対象を柔軟に切り替えることができ、疾患種別に依存しない汎用的な計測プラットフォームとしての展開が期待される。

第5章では、このTCMプラットフォームを用いたがん細胞検出を通じて、生体由来試料に対する基本的な検出原理および信号応答特性を検証した。本章では、その知見を踏まえ、細胞よりも分子サイズの小さい疾患関連タンパク質を対象とした応用探索として、神経疾患関連タンパク質および感染症関連タンパク質の検出を試みる。これにより、TCMががん

細胞検出にとどまらず、多様な医療分野に適用可能な生体分子検出基盤であることを示すことを目的とする。

## 6.2 神経疾患関連タンパク質の検出例： $\alpha$ -シヌクレイン

### 6.2.1 $\alpha$ -シヌクレインの医学的背景と検出意義

$\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -synuclein) は、主に中枢神経系の神経終末に豊富に発現する低分子量タンパク質であり、シナプス小胞の動態制御や神経伝達機能に関与すると考えられている<sup>79,80</sup>。一方で、本タンパク質は構造的に可塑性が高く、環境条件や分子間相互作用に応じて異常凝集を起こしやすい特性を有することが知られている。 $\alpha$ -シヌクレインの異常凝集は、パーキンソン病をはじめとするレビー小体型認知症、多系統萎縮症などのシヌクレインopathyと総称される神経変性疾患群の主要な病理学的特徴である。これらの疾患では、 $\alpha$ -シヌクレインが神経細胞内で線維状構造を形成し、レビー小体やグリア細胞封入体として蓄積することが確認されている。とくに、疾患の発症および進行においては、単量体よりもオリゴマーや線維前駆体といった中間凝集体が強い神経毒性を示す可能性が指摘されており、 $\alpha$ -シヌクレインの存在量および状態変化を捉えることが重要な研究課題となっている<sup>81,82</sup>。

臨床的観点からは、 $\alpha$ -シヌクレインは脳脊髄液 (CSF) や血液、唾液などの体液中にも微量ながら存在することが報告されており、低侵襲なバイオマーカー候補として注目されている<sup>83,84</sup>。しかしながら、体液中に存在する  $\alpha$ -シヌクレインは濃度が極めて低く、かつ他のタンパク質が高濃度に共存する複雑な環境下にあるため、高感度かつ高特異的な検出が求められる。現在、 $\alpha$ -シヌクレインの検出には ELISA や質量分析法、免疫沈降法などが用いられているが、これらの手法は標識反応や前処理工程を必要とする場合が多く、迅速性や測定系の簡便性に課題を残している。また、測定条件が手法ごとに大きく異なるため、他疾患関連タンパク質との横断的比較が困難である点も指摘されている。

このような背景から、 $\alpha$ -シヌクレインを対象とした検出においては、標識を必要とせず、分子間相互作用に起因する物理量変化を直接検出できる新規計測手法の導入が期待されている。本研究で用いる TCM は、センシングプレート表面における分子結合に伴う電位変化をテラヘルツ波振幅強度として検出可能であり、がん細胞検出で実証した原理をタンパク質検出へと展開する上で適した特性を有する。

以上のことから、 $\alpha$ -シヌクレインは、医学的意義が高いだけでなく、TCM を用いた生体分子検出プラットフォームの応用可能性を検証する対象分子としても極めて適している。本章では、この  $\alpha$ -シヌクレインをモデル分子として取り上げ、TCM による非標識タンパク質検出の可能性について検討する。

### 6.2.2 TCM による $\alpha$ -シヌクレインの濃度依存性評価

本節では、 $\alpha$ -シヌクレインをモデル分子として、TCM を用いた非標識タンパク質検出の定量的可能性について検討した。測定原理および実験系の基本構成は、第 5 章におけるがん細胞検出実験と共通であり、センシングプレート表面における分子間相互作用に起因する電位変化を、テラヘルツ波振幅強度の変化として検出するものである。反応条件、洗浄手順、および測定プロトコルの詳細については、第 5 章に準拠するため、本節では省略する。

センシングプレート表面には、ビオチン修飾抗  $\alpha$ -シヌクレイン抗体 (Biotin Anti-Alpha-synuclein antibody [MJFR1]) を固定化し、測定対象としてリコンビナントヒト  $\alpha$ -シヌクレインタンパク質を用いた。本研究では、体液中で想定される低濃度領域を想定し、 $\alpha$ -シヌクレインの濃度を 0.1, 1, および 10 ng/mL の 3 条件に設定した。図 6.2.2 に、各濃度条件におけるテラヘルツ波振幅強度の変化を示す。図より、 $\alpha$ -シヌクレイン濃度の増加に伴い、テラヘルツ波振幅強度が単調に変化する傾向が確認された。特に、0.1 ng/mL という極低濃度条件においても、バックグラウンド信号との差異が明確に観測されており、本手法が高感度なタンパク質検出能力を有することが示唆される。

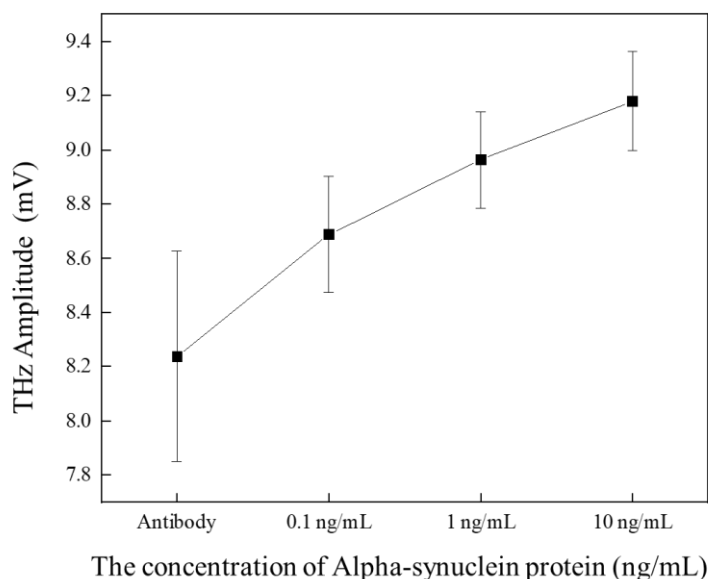


図 6.2.2 ビオチン修飾抗  $\alpha$ -シヌクレイン抗体を固定化したセンシングプレート上において、 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質を用いた測定結果を示す。 $\alpha$ -シヌクレイン濃度を 0 (Antibody), 0.1, 1, および 10 ng/mL とした際のテラヘルツ波振幅強度の変化をプロットしたものであり、濃度の増加に伴いテラヘルツ波振幅が単調に変化する傾向が確認された。

また、測定結果は濃度の増加に対してほぼ線形な応答を示しており、TCM による  $\alpha$ -シ

ヌクレイン検出が単なる有無判定にとどまらず、半定量的評価に適用可能であることが示された。この傾向は、第 5 章で示したがん細胞濃度とテラヘルツ波振幅強度との関係と整合しており、TCM における検出原理が、細胞レベルから分子レベルに至るまで共通して成立していることを裏付ける結果である。一方で、高濃度側においては振幅変化量の増加が緩やかになる傾向も観測されており、抗体固定量や表面結合サイトの飽和といった要因が影響している可能性が考えられる。この点については、抗体密度の最適化や外部電圧制御を組み合わせた感度調整手法（第 7 章）と併せて検討することで、さらなる定量性向上が期待される。以上の結果から、TCM は  $\alpha$ -シヌクレインのような低分子量タンパク質に対しても、高感度かつ非標識での検出が可能であり、濃度依存性を有する定量的計測手法として有効であることが示された。本結果は、TCM を生体分子検出プラットフォームとして神経疾患関連バイオマーカー解析へ展開する上での基礎的知見を提供するものである。

### 6.3 感染症関連タンパク質を用いた検出原理の詳細検証：SARS-CoV-2 N タンパク質

#### 6.3.1 SARS-CoV-2 N タンパク質の医学的背景と検出意義

SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) は、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の原因ウイルスであり、世界的なパンデミックを引き起こした。COVID-19 は呼吸器症状にとどまらず、全身性炎症反応や神経系、循環器系への影響も報告されており、感染状況の迅速かつ正確な把握は、公衆衛生および臨床医療の両面において極めて重要である<sup>85-88</sup>。

SARS-CoV-2 はエンベロープを有する一本鎖 RNA ウイルスであり、その構造タンパク質としてスパイク (S) タンパク質、エンベロープ (E) タンパク質、膜 (M) タンパク質、およびヌクレオカプシド (N) タンパク質を有する。これらの中でも N タンパク質は、ウイルス RNA と結合してヌクレオカプシド構造を形成し、ウイルス複製および粒子形成において重要な役割を果たしている。医学的観点から、N タンパク質はウイルス粒子中に比較的高コピー数で存在し、感染初期段階から体液中に検出されやすいことが報告されている。この特性により、N タンパク質は PCR による遺伝子検査のみならず、抗原検査における主要な検出標的として広く利用されている。また、S タンパク質と比較して変異の影響を受けにくい点も、安定した診断マーカーとしての利点である。現在、SARS-CoV-2 の検出には RT-PCR 法や抗原迅速検査が広く用いられている。RT-PCR 法は高感度かつ高特異性を有する一方で、前処理や温度制御を含む複雑な操作を必要とし、測定時間や設備要件の面で制約がある。また、抗原迅速検査は簡便性に優れるものの、検出感度や定量性の面で課題が指摘されている。とくに、低濃度試料や微量サンプルに対する信頼性の高い定量評価は、依然として技術的な課題として残されている<sup>89-92</sup>。

SARS-CoV-2 N タンパク質の検出においては、高い特異性と再現性を有する分子認識素子の選択が重要である。本研究では、抗体に代わる分子認識素子として、SARS-CoV-2 N タ

ンパク質に特異的に結合する biotin 標識アプタマーを用いて検出系を構築した。

アプタマーは、Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) 法により *in vitro* で選択される一本鎖 DNA あるいは RNA 分子であり、抗体と同様に高い親和性および特異性をもって標的分子と結合することが知られている。近年では、その分子設計の自由度、化学的安定性、非免疫原性、化学合成による高い再現性および低コスト性といった特長から、基礎研究のみならず、診断・創薬・治療分野において広く利用されている<sup>93-95</sup>。

特にウイルスタンパク質検出への応用においては、アプタマーは抗体と比較して分子サイズが小さいという特徴を有しており、固体表面上に固定化した際に、標的タンパク質がセンサ表面近傍に配置されやすいと考えられる。TCM では、半導体表面近傍に形成される電場分布や界面電荷状態の変化がテラヘルツ波放射特性に影響を及ぼすため、分子認識層の厚さや構造は検出感度に影響を与える一因となる可能性がある。この観点から、アプタマーの小分子性は、TCM を用いた界面応答検出において有利に働く可能性が示唆される。

一方で、本研究においては、アプタマーと抗体の検出性能を直接比較することを目的としたものではない。本章では、テラヘルツケミカル顕微鏡を用いたウイルスタンパク質の非標識検出が実現可能であることを実証することを主眼とし、分子認識素子として、固定化条件の再現性およびセンサ実装性に優れたアプタマーを採用した。

本節で構築したアプタマー固定化検出系を用い、後続の実験では、アプタマー濃度条件の最適化、AFM による表面固定状態の評価、ならびに SARS-CoV-2 N タンパク質濃度に依存したテラヘルツ波強度変化の測定を行い、TCM を用いた微量ウイルスタンパク質検出の可能性について検討した。

以上より、SARS-CoV-2 N タンパク質は、感染症診断における医学的重要性が高いだけでなく、TCM を基盤とした生体分子検出プラットフォームの汎用性および微量検出能力を検証するモデル分子として極めて有用である。本章では、N タンパク質を対象とした検出実験を通じて、TCM の感染症診断応用に向けた可能性について検討する。

### 6.3.2 アプタマーを用いた検出系の構築

SARS-CoV-2 N タンパク質の検出においては、高い特異性と再現性を有する分子認識素子の選択が重要である。本研究では、抗体に代わる分子認識素子として、SARS-CoV-2 N タンパク質に特異的に結合する biotin 標識アプタマーを用いて検出系を構築した。

アプタマーは、Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) 法により *in vitro* で選択される一本鎖 DNA あるいは RNA 分子であり、抗体と同様に高い親和性および特異性をもって標的分子と結合することが知られている。近年では、その分子設計の自由度、化学的安定性、非免疫原性、化学合成による高い再現性および低コスト性といった特長から、基礎研究のみならず、診断・創薬・治療分野において広く利用されている。特にウイルスタンパク質検出への応用においては、アプタマーは抗体と比較して分子サイ

ズが小さいという特徴を有しており、固体表面上に固定化した際に、標的タンパク質がセンサ表面近傍に配置されやすいと考えられる。TCM では、半導体表面近傍に形成される電場分布や界面電荷状態の変化がテラヘルツ波放射特性に影響を及ぼすため、分子認識層の厚さや構造は検出感度に影響を与える一因となる可能性がある。この観点から、アプタマーの小分子性は、TCM を用いた界面応答検出において有利に働く可能性が示唆される。一方で、本研究においては、アプタマーと抗体の検出性能を直接比較することを目的としたものではない。本章では、TCM を用いたウイルスタンパク質の非標識検出が実現可能であることを実証することを主眼とし、分子認識素子として、固定化条件の再現性およびセンサ実装性に優れたアプタマーを採用した。

本節で構築したアプタマー固定化検出系を用い、後続の実験では、アプタマー濃度条件の最適化、AFM による表面固定状態の評価、ならびに SARS-CoV-2 N タンパク質濃度に依存したテラヘルツ波強度変化の測定を行い、TCM を用いた微量ウイルスタンパク質検出の可能性について検討した。

### 6.3.3 AFM による表面固定状態の検証

アプタマーを用いた SARS-CoV-2 N タンパク質検出系において、センシングプレート表面へのアプタマー固定状態を確認することは、検出信号の再現性および信頼性を担保する上で重要である。そこで本研究では、AFM を用いて、アプタマー固定前後のセンシングプレート表面形状を比較評価した。

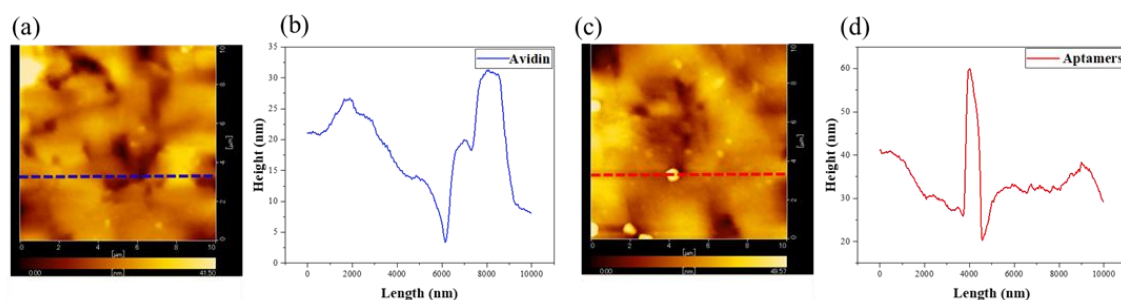


図 6.3.3 AFM によるセンシングプレート表面状態および高さプロファイルの評価結果。

(a), (b) はアビジン固定化後の表面像および対応する高さプロファイルを示し、算術平均粗さ ( $S_a$ ) は約 4.79 nm である。(c), (d) はアビジン-ビオチン反応を介してビオチン化アプタマー (Anti-SARS-CoV-2 N-protein aptamers) を固定化した後の表面像および高さプロファイルを示しており、 $S_a$  は約 5.86 nm である。アプタマー固定化後に表面粗さの増加が確認される。

図 6.3.3 に示す AFM 観察結果および高さプロファイルから、アビジン固定後の表面粗

さ (Sa) は約 4.79 nm であるのに対し、アビジン-ビオチン反応を介してビオチン化アプタマーを固定化した後には、Sa が約 5.86 nm へと増加することが確認された。この表面粗さの増加は、分子層の形成に伴う表面形状変化を反映したものと考えられる。

以上の結果から、本研究で採用したアビジン-ビオチン結合を利用した固定化手法により、SARS-CoV-2 N タンパク質検出に必要なアプタマーが安定にセンシングプレート表面へ固定されていることが AFM 観察により確認された。この表面固定状態の検証は、前節で示したアプタマー固定濃度最適化実験および後続のタンパク質検出実験におけるテラヘルツ波応答の妥当性を支持する基盤的結果である。

#### 6.3.4 アプタマー固定条件の最適化

SARS-CoV-2 N タンパク質検出における感度および測定再現性を確保するためには、センシングプレート表面へのアプタマー固定条件の最適化が重要である。本節では、第 5 章で確立した測定手順およびデータ解析方法に基づき、アプタマー固定濃度がテラヘルツ波応答に与える影響について検討した。

本実験では、biotin 標識アプタマー (Anti-SARS-CoV-2 N-protein aptamers, biotinylated, 原液濃度 1.58 mg/mL) を用い、アビジン-ビオチン結合を介してセンシングプレート表面に固定化した。抗原には、組換え SARS-CoV-2 N タンパク質 (recombinant SARS-CoV-2 N protein, Funakoshi Ltd., Bunkyo-ku, Tokyo) を用いた。センシングプレートは四つのウェルを有する測定用基板に固定し、前処理後、アプタマー固定濃度を 5, 50, および 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の三条件に設定して固定化を行った。アプタマー固定後、N タンパク質導入前の状態を反応前データとして、TCM によりテラヘルツ波振幅分布の測定を行った。その後、各ウェルに N タンパク質溶液 (100 ng/mL) を導入し、所定時間反応させた後、再度 TCM 測定を行い、反応後のテラヘルツ波振幅分布を取得した。本実験では、再現性を確認するため、異なる三枚のセンシングプレートを用いて同一条件で測定を行った。

図 6.3.4(a) に、各アプタマー固定濃度条件におけるテラヘルツ波振幅分布の一例を示す。図中には、反応前、反応後、およびそれらの差分イメージを示しており、色の違いはテラヘルツ波振幅の変化を表している。いずれの条件においても、N タンパク質反応に伴うテラヘルツ波振幅の変化が確認された。定量評価として、第 5 章と同様に、各ウェル内の黒枠で示した  $2\text{ mm}^2$  の領域におけるテラヘルツ波振幅の平均値を算出し、反応前後の差分を求めた。図 6.3.4 (b) に、三枚のセンシングプレートにおけるアプタマー固定濃度とテラヘルツ波振幅変化の関係を示す。横軸はアプタマー濃度、縦軸は N タンパク質反応によるテラヘルツ波振幅変化を示している。

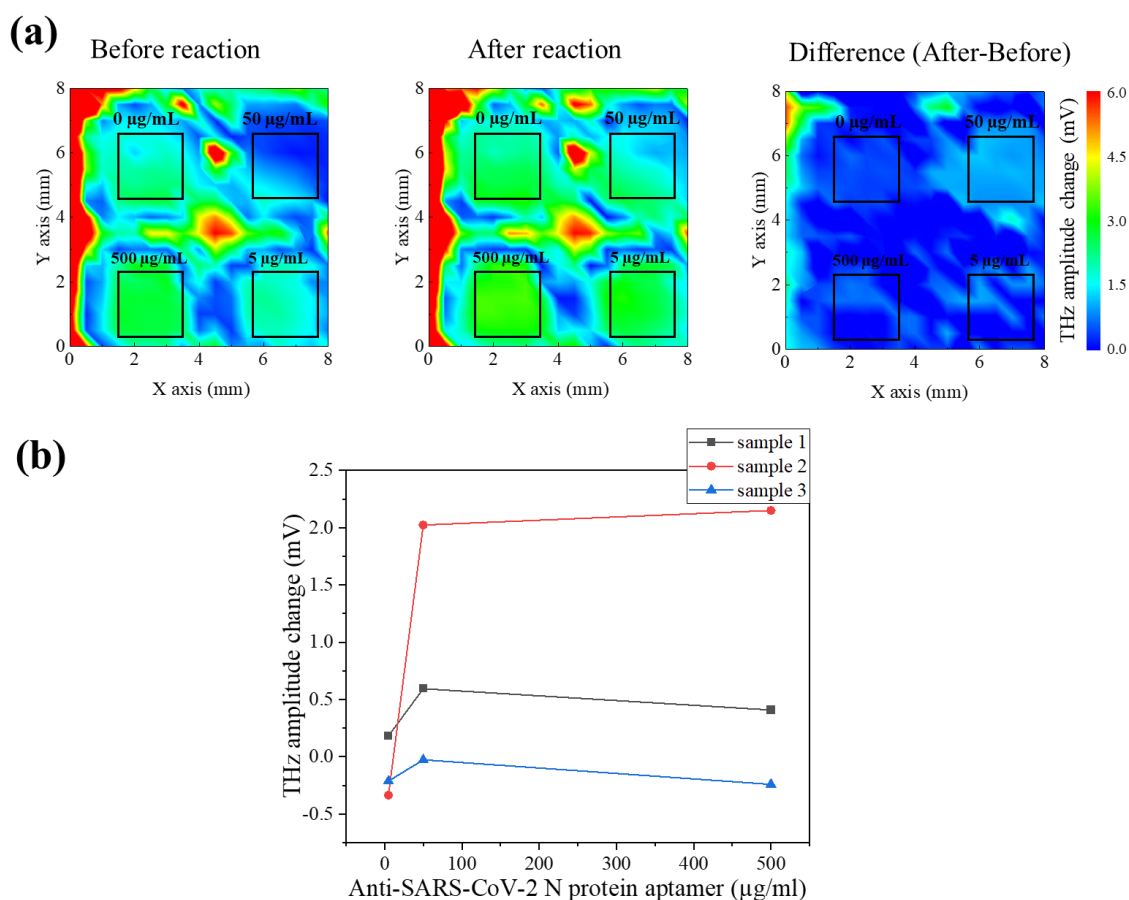


図 6.3.4 (a) アプタマー固定濃度を 5, 50, および 500  $\mu\text{g/mL}$  としたセンシングプレートにおいて, SARS-CoV-2 N タンパク質 (100  $\text{ng/mL}$ ) 反応前, 反応後, およびそれらの差分として取得したテラヘルツ波振幅分布を示す。色の違いはテラヘルツ波振幅の大小を表しており, N タンパク質反応に伴う振幅変化が各ウェル内で確認される。

(b) 図 6.3.4(a) に示したテラヘルツ波振幅分布に基づき, 各ウェル内の黒枠で示した  $2\text{ mm}^2$  の領域におけるテラヘルツ波振幅の平均値を算出し, 反応前後の差分として求めた結果を示す。横軸はアプタマー固定濃度, 縦軸は SARS-CoV-2 N タンパク質反応によるテラヘルツ波振幅変化を示している。各プロットは異なる三枚のセンシングプレートで得られた測定結果を示す。

同一アプタマー濃度条件においても, センシングプレート間でテラヘルツ波振幅変化にばらつきが見られたが, これは各センシングプレートの表面状態や感度の個体差に起因するものと考えられる。一方, 全体的な傾向として, 5  $\mu\text{g/mL}$  条件では 50  $\mu\text{g/mL}$  および 500  $\mu\text{g/mL}$  条件と比較して振幅変化が小さく, 100  $\text{ng/mL}$  の N タンパク質が十分に反応していない可能性が示唆された。これに対し, 50  $\mu\text{g/mL}$  と 500  $\mu\text{g/mL}$  の条件間では, テラヘルツ波振幅変化に顕著な差は認められず, 両条件においてほぼ同程度の N タンパク質反応

量が得られていると考えられる。以上の結果から、50 µg/mL のアプタマー固定条件において、十分な検出感度を維持しつつ、高濃度条件に比べて過剰なアプタマー使用を避けた効率的な検出系構築が可能であることが示された。

本研究では、これらの結果を踏まえ、以降の SARS-CoV-2 N タンパク質検出実験において、アプタマー固定濃度として 50 µg/mL を採用した。

### 6.3.5 SARS-CoV-2 N タンパク質濃度依存性評価

前節までの検討により、SARS-CoV-2 N タンパク質 100 ng/mL に対して、ビオチン化アプタマーの固定濃度として 50 µg/mL が最適であることを確認した。本節では、この条件を固定した上で、TCM を用いた N タンパク質検出における濃度依存性評価を行った。

TCM 測定では、センシングプレートごとに感度や表面特性に起因する応答のばらつきが生じる可能性がある。そこで本実験では、単一のセンシングプレートを四分割した多領域構成を用い、同一センシングプレート上で複数濃度条件を同時に測定することで、基板間ばらつきの影響を低減した。各ウェルにおいて同一の反応条件を適用し、テラヘルツ波振幅変化と N タンパク質濃度との関係性を評価した。N タンパク質濃度は、0 ng/mL (参照値)、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL とし、測定範囲は 8.0 × 8.0 mm とした。図 6.3.5 (a) に、各濃度条件における反応後のテラヘルツ波振幅分布を示す。分布図より、N タンパク質濃度の増加に伴い、テラヘルツ波振幅が段階的に変化していることが確認できる。次に、各ウェル内に設定した黒枠 (2.0 × 2.0 mm) の領域について、反応後のテラヘルツ波振幅の平均値を算出した。得られた平均値から、参照値 (0 ng/mL) の平均振幅を差分することで、N タンパク質反応に起因する実質的なテラヘルツ波振幅変化を求めた。これらの測定は、同一条件下で 4 回繰り返して実施した。図 6.3.5 (b) に、N タンパク質濃度とテラヘルツ波振幅変化の関係性を示す。横軸は N タンパク質濃度、縦軸はテラヘルツ波振幅変化を示しており、エラーバーは 4 回の測定から得られた標準偏差を表している。その結果、N タンパク質濃度の増加に伴い、テラヘルツ波振幅変化が単調に増加する傾向が確認された。さらに、両者の関係性は高い線形性を示し、決定係数は  $R^2 = 0.9503$  であった。

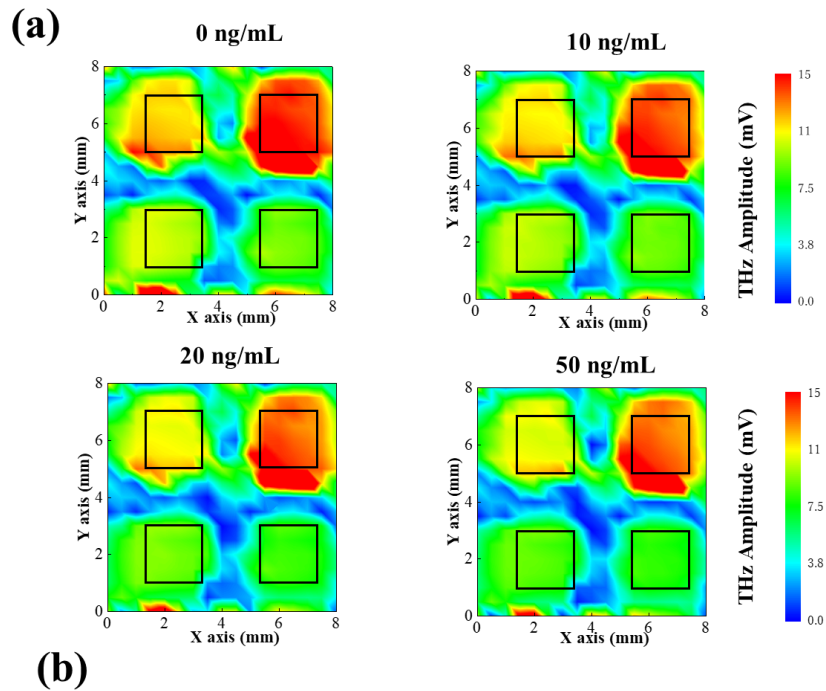


図 6.3.5 (a) SARS-CoV-2 N タンパク質濃度依存性評価における、反応後のテラヘルツ波振幅分布イメージング結果を示す。各ウェルにおける N タンパク質濃度は、0 ng/mL(参照値)、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL であり、測定範囲は  $8.0 \times 8.0$  mm とした。分布図中の色の違いはテラヘルツ波振幅の相対的な変化を表しており、N タンパク質濃度の増加に伴い、テラヘルツ波振幅が段階的に変化していることが確認できる。

(b) SARS-CoV-2 N タンパク質濃度とテラヘルツ波振幅変化の関係を示す。各ウェル内に設定した黒枠 ( $2.0 \times 2.0$  mm) の領域におけるテラヘルツ波振幅の平均値を算出し、参照値 (0 ng/mL) との差分から振幅変化量を求めた。横軸は N タンパク質濃度、縦軸はテラヘルツ波振幅変化を示している。エラーバーは、同一条件下で 4 回行った測定から得られた標準偏差を表す。N タンパク質濃度の増加に伴い、テラヘルツ波振幅変化が増大し、両者の間に高い線形相関が確認された。

以上の結果より、TCM とアプタマー固定化センシングプレートを組み合わせることで、SARS-CoV-2 N タンパク質の濃度に依存した定量的検出が可能であることが示された。このことは、TCM がウイルスタンパク質の高感度かつ定量的検出に適用可能な計測プラットフォームであることを示唆している。

### 6.3.6 試料量依存性の評価と微量検出の可能性

前節までの検討により、SARS-CoV-2 N タンパク質濃度とテラヘルツ波振幅変化との定量的関係を確認した。本節では、TCM を用いたタンパク質検出における実用性向上を目的として、測定に用いる試料量を低減した条件下での応答特性を評価し、微量検出の可能性について検討した。

本実験では、9 ウェルを有するセンシングプレートを用い、各ウェルに最適条件として決定したアプタマー濃度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anti-SARS-CoV-2 N-protein aptamers, biotinylated) を固定化した。試料量は 0.5, 1, および 2  $\mu\text{L}$  の 3 条件とし、各条件につき 3 ウェルずつ配置した。アプタマー固定後、TCM により反応前のテラヘルツ波振幅分布を取得した。その後、各ウェルに同一体積の SARS-CoV-2 N タンパク質溶液を導入し、濃度 1, 10, および 100  $\text{ng}/\text{mL}$  の条件で反応を行った。反応後、再度 TCM 測定を行い、テラヘルツ波振幅分布を取得した。図 6.3.6(a) に、試料量を変化させた条件下で取得したテラヘルツ波振幅分布の代表例を示す。N タンパク質反応前後において、試料量の違いにかかわらずテラヘルツ波振幅の変化が確認され、濃度の増加に伴い振幅変化が増大する傾向が認められた。定量評価のため、各ウェル内に設定した 1  $\text{mm}^2$  の領域におけるテラヘルツ波振幅の平均値を算出し、反応前後の差分を求めた。

図 6.3.6(b) には、N タンパク質濃度および試料量の違いによるテラヘルツ波振幅変化を示す。いずれの試料量においても、振幅変化は主として N タンパク質濃度に依存しており、試料量による顕著な差は認められなかった。さらに、試料量 0.5, 1, および 2  $\mu\text{L}$  のすべてのデータを統合し、テラヘルツ波振幅変化と N タンパク質濃度との関係について線形回帰解析を行った。その結果、高い線形性が得られ、決定係数は  $R^2 = 0.9881$  であった。この結果は、本測定条件下において、試料量を低減した場合でも N タンパク質濃度を安定して評価可能であることを示している。

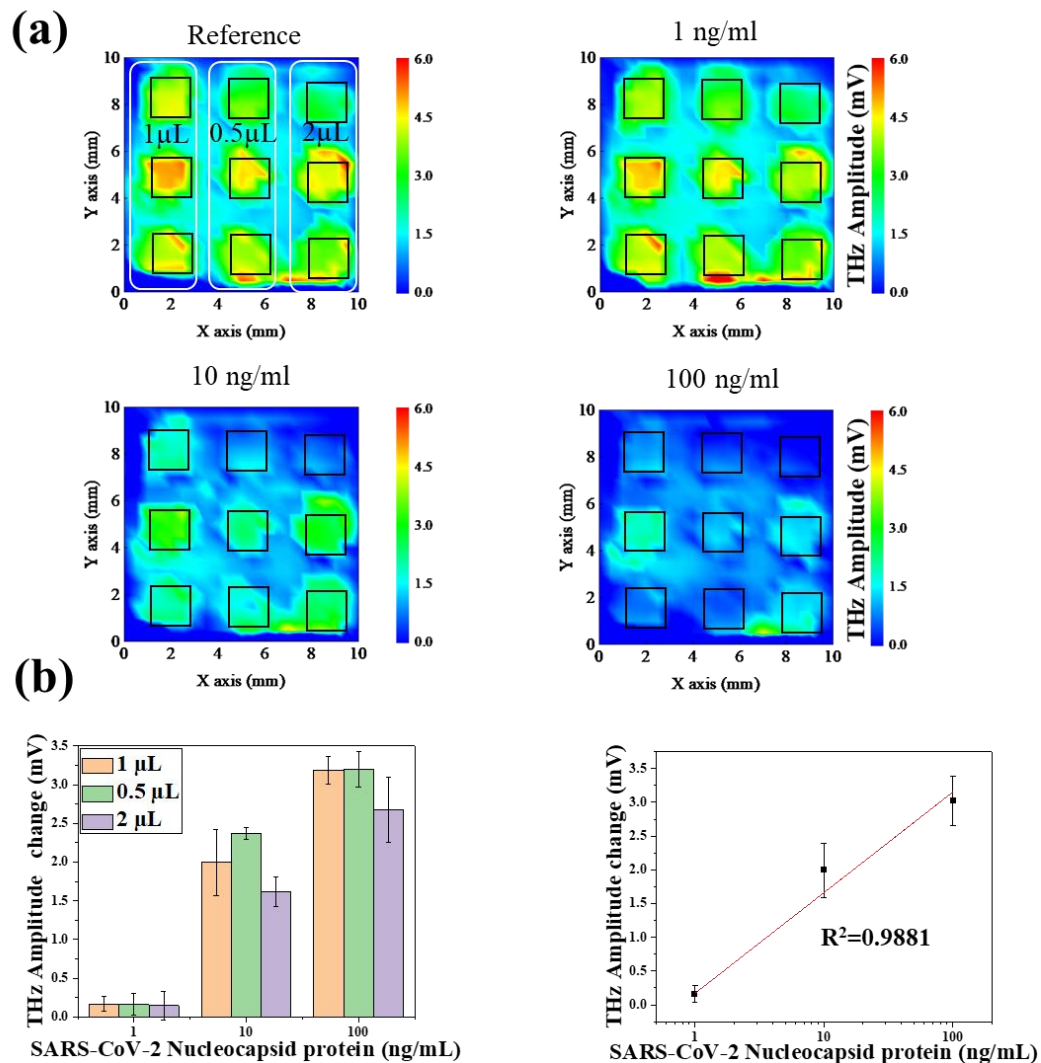


図 6.3.6 (a) 試料量を変化させた条件下における SARS-CoV-2 N タンパク質検出時のテラヘルツ波振幅分布。アプタマー (50  $\mu$ g/mL) 固定後に取得した反応前のテラヘルツ波振幅分布と、N タンパク質 (1, 10, 100 ng/mL) 反応後に取得したテラヘルツ波振幅分布を示す。試料量は 0.5, 1, および 2  $\mu$ L とし、各条件下で反応前後の分布変化を比較した。N タンパク質濃度の増加に伴い、試料量に依存せずテラヘルツ波振幅が増大する傾向が確認される。(b) 試料量および SARS-CoV-2 N タンパク質濃度に対するテラヘルツ波振幅変化の定量評価。図 6.3.6 (a) に示した各ウェル内の 1 mm<sup>2</sup> の領域におけるテラヘルツ波振幅の平均値を算出し、反応前後の差分として振幅変化を求めた結果を示す。棒グラフは試料量 0.5, 1, および 2  $\mu$ L の条件を比較したものであり、いずれの試料量においてもテラヘルツ波振幅変化は主として N タンパク質濃度に依存していることがわかる。併せて、全データを用いた線形回帰結果を示しており、テラヘルツ波振幅変化と N タンパク質濃度との間に高い線形性 ( $R^2 = 0.9881$ ) が得られた。

本実験において、最小試料量 0.5  $\mu$ L、濃度 1 ng/mL の条件で検出が可能であり、検出

された N タンパク質量は 0.5 pg に相当する。以上より、TCM を用いた本検出手法は、試料量に依存しない定量応答を示し、微量タンパク質検出への応用可能性を有することが示唆された。

## 6.4 まとめ

本章では、前章までに確立した TCM による生体試料検出原理を基盤として、がん細胞検出にとどまらない応用可能性の検証を目的とし、神経疾患および感染症という異なる疾患領域に関連する生体分子を対象とした検出実験を行った。これにより、TCM が特定の分子種や疾患に依存しない汎用的な生体分子検出プラットフォームとして機能し得るかを多角的に評価した。

6.1 節では、神経変性疾患および感染症診断における早期検出技術の重要性について整理し、これらの分野に共通する課題として、試料量の制約、前処理の煩雑さ、および標識操作に伴う測定時間の増大を挙げた。その上で、無標識・非接触で測定可能な TCM が、これらの課題解決に資する新規計測手法であることを位置づけた。

6.2 節では、神経疾患関連タンパク質として  $\alpha$ -シヌクレインを対象に取り上げ、TCM を用いた濃度依存性評価を実施した。その結果、溶液中の  $\alpha$ -シヌクレイン濃度の増加に伴い、テラヘルツ波振幅が系統的に変化することが確認され、TCM が神経疾患関連タンパク質の検出にも適用可能であることが示された。これは、細胞サイズの対象ではなく、分子レベルの生体試料に対しても TCM が感度を有することを示す重要な結果であり、本手法の適用範囲を拡張する成果である。

6.3 節では、感染症関連タンパク質として SARS-CoV-2 N タンパク質を対象に、検出原理および測定系の詳細な検証を行った。アプタマーを用いた検出系の構築により、抗体とは異なる分子認識機構を TCM に導入し、固定条件の最適化および AFM による表面固定状態の確認を通じて、センシングプレート上での分子固定の再現性と安定性を評価した。さらに、SARS-CoV-2 N タンパク質の濃度依存性評価においては、濃度増加に応じたテラヘルツ波応答の変化が確認され、TCM が感染症関連タンパク質の検出においても有効であることが示された。また、試料量依存性の検討により、微量試料条件下においても測定が成立することが示唆され、臨床現場で求められる少量試料診断への適用可能性が示された。

以上の検討から、本章では、TCM ががん細胞検出に限定されることなく、神経疾患および感染症といった異なる疾患分野においても柔軟に適用可能であることを実験的に示した。特に、抗体およびアプタマーという異なる分子認識要素を用いた検出系の構築を通じて、TCM が多様な分子設計と組み合わせ可能な拡張性を有することが明らかとなった。一方で、本章の結果から、測定感度や応答の再現性がセンシングプレートの状態や測定条件に依存する可能性も示唆された。これらの課題は、TCM を汎用的かつ定量的な生体分子計測プラットフォームとして確立するために克服すべき重要な問題であり、次章で述べる性能最適

化および高感度化手法の検討へと直接的につながる。次章では、外部電圧制御による内部電場調整に着目し、TCM 応答のばらつき低減および感度向上を目的としたシステム最適化手法について体系的に検討する。

## 第7章 電圧制御による TCM 高性能化

本章では、前章までの検出実験を通じて顕在化した、TCM における検出感度および再現性のばらつきに着目し、その要因分析と性能最適化手法について検討する。まず、センシングプレート間の応答差が生じる背景を整理し、内部電場状態の違いがテラヘルツ波応答に与える影響に着目する。次に、外部電圧を印加した条件下での表面電位応答解析を通じて、検出感度の制御性および最適化条件を明らかにする。さらに、複数センシングプレートを用いた統計的検証を行い、TCM を高感度かつ再現性の高い計測プラットフォームへと発展させるための基盤的知見を示す。

### 7.1 性能ばらつきの顕在化と課題設定

先行研究において、我々は TCM を用いた肺腺がん細胞の検出に成功しており、発生するテラヘルツ波振幅が細胞濃度の対数に比例することを報告してきた。しかしながら、同一の測定条件および同一試料を用いた場合であっても、異なるセンシングプレートを使用した際には、検出感度に差が生じることが確認されている。

図 7.1(a)に示すように、本研究では製造ロットの異なる 4 枚のセンシングプレートを用い、同一の肺腺がん細胞試料に対する検出実験を行った。その結果、いずれのセンシングプレートにおいてもがん細胞の検出自体は可能であったものの、得られたテラヘルツ波振幅の変化量には明確な差が認められた。これらの差異を定量的に評価するため、図 7.1(b)に示すように、各センシングプレートにおけるテラヘルツ波振幅と細胞濃度の関係を線形近似し、その傾きを検出感度の指標として比較した。その結果、感度指標にはセンシングプレート間で顕著なばらつきが存在することが明らかとなった。このばらつきは、測定系や試料条件の違いによるものではなく、主としてセンシングプレート自体の物理的・電気的特性差に起因すると考えられる。

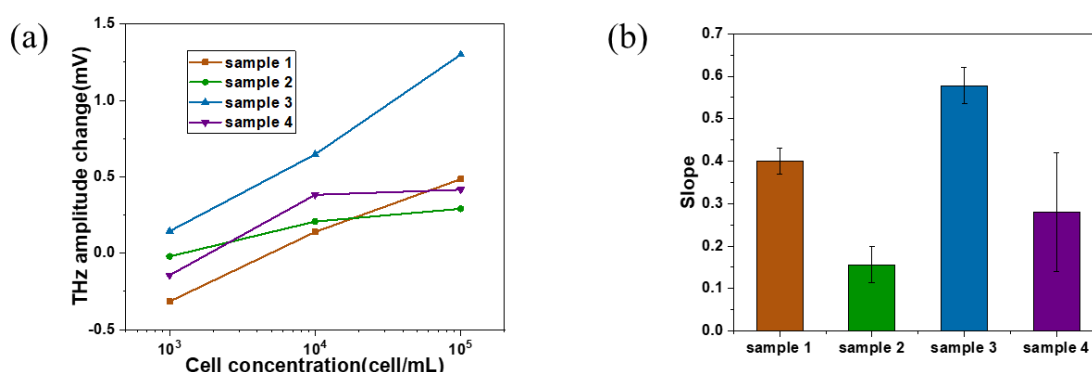


図 7.1 (a)は同一条件下において、異なる 4 枚のセンシングプレートを用いて肺腺がん細胞を測定した際のテラヘルツ波振幅応答を示す。(b) は各センシングプレートにおけるテラヘルツ波振幅と細胞濃度の関係を線形近似し、その傾きを検出感度の指標として比較した結果を示す。感度指標にはセンシングプレート間で顕著なばらつきが存在し、製造プロセスに起因する内部特性差が検出感度に影響を与えている可能性が示唆される。

特に、本研究で用いた  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  構造を有するセンシングプレートにおいては、製造過程に由来する不純物分布、界面状態密度、あるいは表面状態の違いが、初期表面電位や能帯湾曲状態に影響を及ぼすことが知られている。これらの要因により、各センシングプレート内部に形成される空乏層の電場分布が異なり、結果としてテラヘルツ波発生効率および振幅応答に差が生じると推察される。

以上の結果から、TCM における検出感度のばらつきは、生体分子反応だけではなく、センシングプレート内部電場の初期状態の違いに強く依存している可能もあると考えられる。したがって、TCM の高感度化および高再現性化を実現するためには、各センシングプレートにおける内部電場の動作点を能動的に制御し、テラヘルツ波振幅が表面電位変化に対して高感度に応答する条件を確立することが重要な課題である。

## 7.2 外部電圧制御による内部電場調整の理論的背景

図 7.2(a-b)に示すように、がん細胞やタンパク質などの生体試料がセンシングプレート表面と相互作用すると、試料に由来する電荷や分極により表面電位が変化する。この表面電位の変化は、 $\text{SiO}_2/\text{Si}$  界面近傍に形成される空乏層の幅および内部電場分布に影響を与え、結果としてセンシングプレートから放射されるテラヘルツ波の振幅変化として観測される。したがって、反応前後におけるテラヘルツ波振幅の変化量を評価することで、試料の存在や濃度に関する定量的情報を取得することが可能である。一方で、本研究で用いたセンシングプレートでは、空乏層の厚さがシリコン薄膜の膜厚以下に制限される場合があり、表面電位の変化に対する応答が飽和する可能性がある。このような条件下では、生体分子反応による表面電位変化が十分に内部電場へ反映されず、テラヘルツ波振幅の変化量が限定される。その結果、検出感度や定量性が低下する要因となる。さらに、実験に用いた複数のセンシングプレート間では、初期状態における表面電位や能帯湾曲の程度が必ずしも一致していないことが確認されている。これらの差異は、シリコン薄膜中の不純物分布や界面固定電荷密度のばらつきに起因し、空乏層幅および内部電場強度の応答特性に不均一性をもたらす。その結果、図 7.2(d)に示すように、同一濃度のがん細胞あるいはタンパク質を用いた場合であっても、センシングプレートごとに検出されるテラヘルツ波振幅が異なるという再現性の問題が生じる。

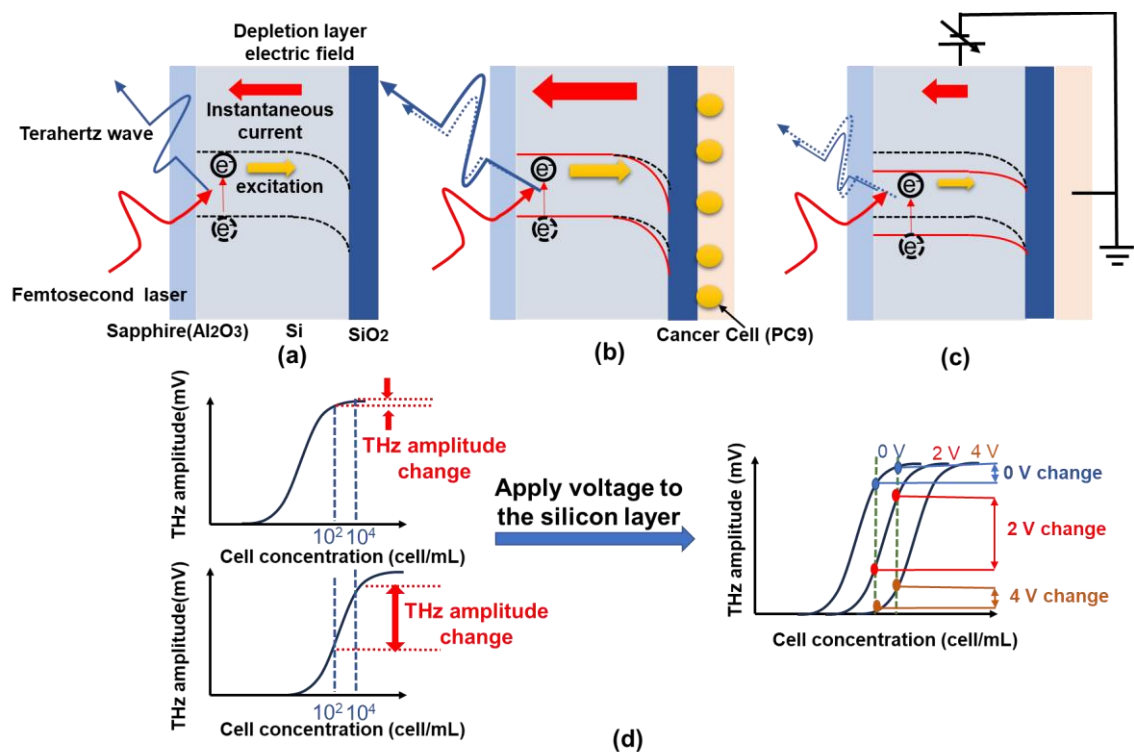


図 7.2 (a)はフェムト秒レーザーをセンシングプレート上のシリコン層に照射すると、光励起によりキャリアが生成され、空乏層内に瞬間的な電流が誘起される。この過渡電流に起因してテラヘルツ波が放射される様子を模式的に示している。(b)はセンシングプレート表面に固定化された肺腺癌細胞が空乏層内のバンド構造を局部的に歪ませることで、内部電場分布が変化し、その結果として放射されるテラヘルツ波の振幅が変調される原理を示している。(c)はシリコン層に外部から可変電圧を印加することにより、電圧チューニング型センシングプレートを構成し、フェルミ準位の位置を制御する概念図である。これにより、空乏層内の内部電場強度を能動的に調整することが可能となる。(c)はシリコン層に外部から可変電圧を印加することにより、電圧チューニング型センシングプレートを構成し、フェルミ準位の位置を制御する概念図である。これにより、空乏層内の内部電場強度を能動的に調整することが可能となる。

これらの課題を解決するため、本研究ではセンシングプレートのシリコン層に外部電圧を印加し、内部電場を能動的に制御する手法に着目した。図 7.2(c)に示すように、シリコン層に外部電圧を印加することでフェルミ準位が変化し、それに伴って SiO<sub>2</sub>/Si 界面近傍の能帯湾曲が調整される。この能帯構造の変化は空乏層幅および内部電場強度に直接影響し、テラヘルツ波放射に寄与するキャリア加速領域を制御することを可能にする。特に重要な点として、外部電圧の印加は内部電場の空間分布形状を大きく変化させるのではなく、主としてその強度を連続的かつ一様に調整する役割を果たす。これにより、テラヘルツ波振幅が表面電位変化に対して高感度に応答する動作領域を意図的に設定することが可能となる。

この効果は、図 7.2(d)に示したテラヘルツ波振幅と試料濃度の関係を、電圧制御によって実質的に横軸方向へ平行移動させる操作として理解できる。すなわち、センシングプレートごとに異なる初期表面電位を補償し、検出感度の動作点を最適化することで、センシングプレート間のばらつきを低減しつつ、TCM システム全体の感度および再現性を向上させることが可能となる。

以上より、外部電圧制御による内部電場調整は、生体分子反応に起因する局所的な表面電位変化を効率よくテラヘルツ波振幅へ変換するための有効な手段であり、TCM における高感度化および定量性能向上のための重要な理論的基盤である。

### 7.3 外部電圧印加条件下による表面電位応答解析

#### 7.3.1 外部電圧印加下におけるテラヘルツ波振幅応答の基礎特性

前節 (7.1) で示したように、TCM における検出感度のばらつきは、センシングプレート内部に形成される空乏層電場の初期状態の違いに起因する可能性が高い。本研究ではこの仮説を検証するとともに、外部電圧印加によって内部電場を能動的に制御する手法の有効性を評価するため、まずテラヘルツ波振幅の電圧応答に関する基礎特性を検討した。

図 7.3.1(a) に、本研究で用いたセンシングプレートへの電圧印加方法の模式図を示す。電圧印加に際しては、試料溶液側を白金線により接地し、センシングプレート裏面の Si 薄膜層に銀ペーストを用いて電極を形成した。その後、ファンクションジェネレータを用いて Si 層に対して外部電圧を印加する構成とした。この配置により、試料側の電位を基準としつつ、Si 層内部の電位分布および空乏層電場を連続的に調整することが可能となる。

このような電圧印加構成に基づき、抗体固定化および表面修飾を施した後のセンシングプレートに対して Si 層へ外部電圧を印加し、発生するテラヘルツ波振幅との関係性を評価した結果を図 7.3.1(b) に示す。いずれのセンシングプレートにおいても、テラヘルツ波振幅は印加電圧の増加に伴って増大する傾向を示し、およそ 0-5 V の電圧範囲において有効な応答が確認された。この挙動は、外部電圧の印加によって Si 層のフェルミ準位が変化し、それに伴って能帯湾曲および空乏層電場が調整されることで、フェムト秒レーザー励起によるキャリア加速が促進され、瞬時電流が増大する結果、テラヘルツ波放射強度が増強されるためであると考えられる。すなわち、外部電圧はテラヘルツ波発生効率を制御する有効な物理パラメータとして機能している。一方で、同一条件下で測定を行ったにもかかわらず、4 枚のセンシングプレート間において、テラヘルツ波振幅の絶対値および有効な電圧応答範囲には明確な差が認められた。この差異は、表面への不純物原子・分子の吸着、界面状態密度の違い、あるいは半導体内部における原子周期性の乱れなど、製造プロセスに由来する不可制御要因によって、各センシングプレートの初期電場状態が異なることに起因すると考えられる。

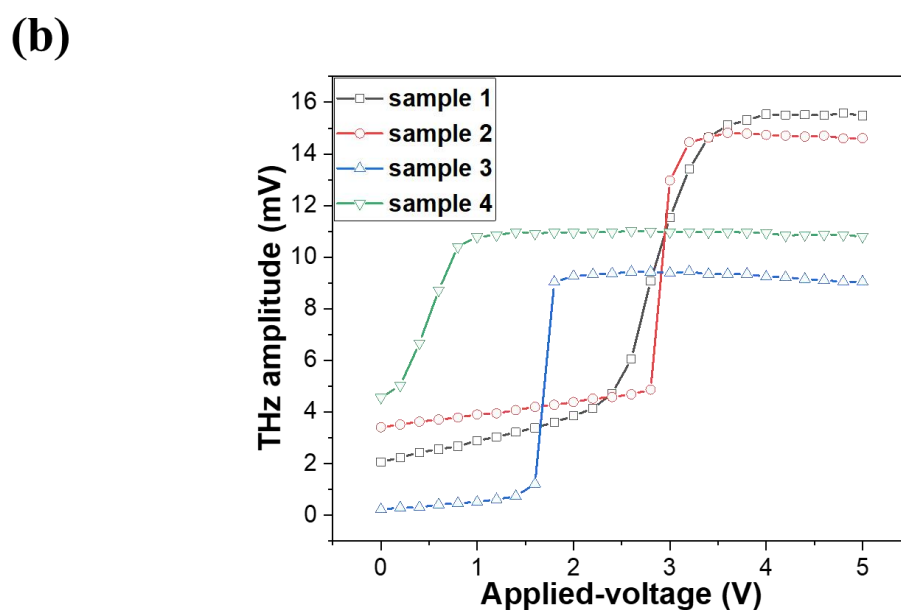
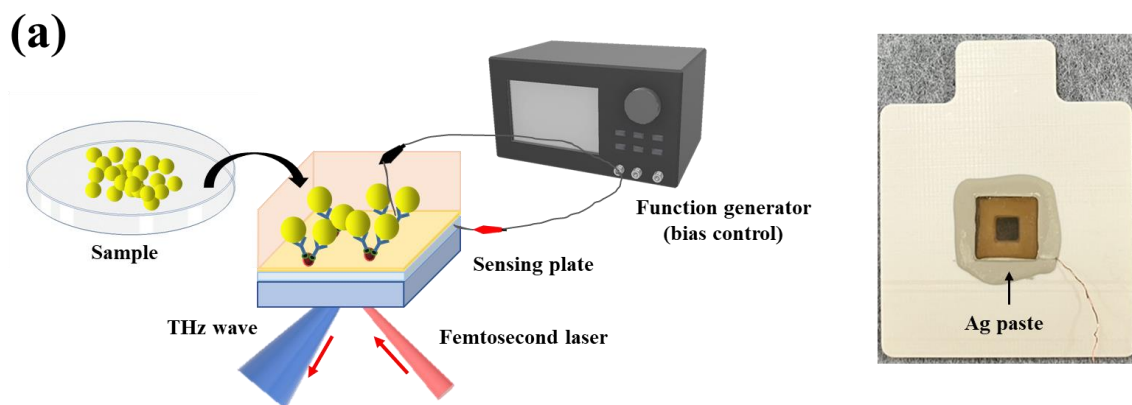


図 7.3.1 (a) センシングプレートへの外部電圧印加方法の模式図。試料溶液側を白金線により接地し、センシングプレート裏面の Si 薄膜層に銀ペーストを用いて電極を形成した。ファンクションジェネレータにより Si 層へ外部電圧を印加することで、試料側電位を基準とした Si 層内部の電位分布および空乏層電場を制御可能な構成となっている。

(b) 抗体固定化および表面修飾後のセンシングプレートに外部電圧を印加した際のテラヘルツ波振幅応答を示す。テラヘルツ波振幅は印加電圧の増加に伴い増大するが、同一条件下においてもセンシングプレートごとに振幅応答および有効電圧範囲に差が確認される。

以上の結果より、外部電圧はテラヘルツ波振幅を一様に増幅する単純な操作ではなく、各センシングプレートに固有の内部電場状態に応じて、テラヘルツ応答特性を異なる形で変調する制御パラメータであることが示唆される。したがって、外部電圧制御は、センシングプレートごとに異なる動作点を補正し、表面電位変化に対する応答感度を最適化するため

の有効な手法であり、次節以降で示す段階電圧制御および感度最適化解析の基盤となる重要な結果である。

### 7.3.2 異なる生体分子に対する電圧応答差の検証

本節では、センシングプレート表面に固定される物質の違いが、外部電圧に対するテラヘルツ波振幅応答に与える影響について検討した。ここでは、avidin 固定状態および抗体(AE-1/AE-3) 固定状態を対象とし、段階的に電圧を印加した際のテラヘルツ波振幅変化を比較評価した結果を示す。

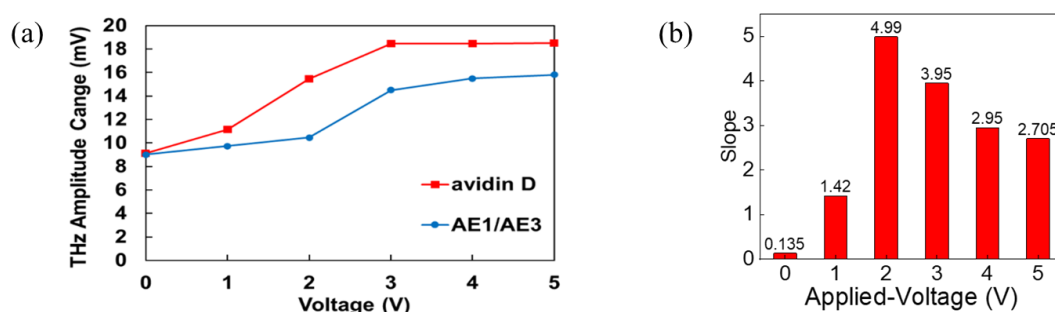


図 7.3.2 (a) センシングプレート表面における抗体結合前 (avidin 固定状態) および抗体結合後における、印加電圧に対するテラヘルツ波振幅の応答曲線。抗体結合後には、振幅の立ち上がりが緩やかになり、飽和電圧が高電圧側へとシフトするとともに、全体の振幅が低下する傾向が確認された。(b)感度と印加電圧との関係。抗体反応前後のテラヘルツ波振幅差を感度とした。感度は特定の電圧条件において最大値を示し、外部電圧による内部電場制御が、抗体反応に起因する表面電位変化を高感度に検出可能であることを示している。

図 7.3.2(a)は、抗体結合前 (avidin 固定状態) および抗体結合後におけるテラヘルツ波振幅の電圧応答を示したものである。いずれの状態においても、印加電圧の増加に伴いテラヘルツ波振幅は増大し、高電圧側で飽和する挙動を示した。一方で、抗体結合後の応答曲線は、抗体結合前と比較して立ち上がりが緩やかであり、飽和に達する電圧も高電圧側へとシフトしていることが確認された。また、全体として抗体結合後のテラヘルツ波振幅は低下する傾向を示した。これらの結果は、センシングプレート表面に固定された物質が、表面電位およびそれに伴う内部電場分布に影響を与え、結果としてテラヘルツ波発生過程における電圧応答特性を変化させることを示唆している。特に、抗体分子の固定により、表面電荷分布や有効誘電環境が変化し、空乏層の電場応答が修飾された結果、テラヘルツ波振幅の電圧依存性が変化したものと考えられる。図 7.3.2(b)は、抗体反応前後におけるテラヘルツ波振幅差を感度として定義し、印加電圧との関係を示したものである。その結果、印加電圧 0V では感度は小さい値に留まる一方、特定の電圧条件 (本実験では約 2V) において感度が最大

となることが明らかとなった。このことは、外部電圧によって内部電場の動作点を調整することで、表面反応に起因する微小な電位変化を、より高感度にテラヘルツ波振幅へ変換できることを意味している。

以上より、テラヘルツ波振幅の電圧応答特性は、センシングプレート表面の固定状態に依存して変化することが明確となった。すなわち、段階電圧印加は、単なる信号増幅手法ではなく、測定対象や表面固定条件に応じて最適な感度動作点を探索・設定するための有効な制御手段である。本結果は、電圧制御型 TCM が、抗体反応をはじめとする生体分子検出において、高感度かつ再現性の高い計測を実現するための基盤技術となり得ることを示している。

### 7.3.3 外部電圧制御下における細胞検出感度の空間分布評価

前節までの単点測定の結果から、外部電圧を印加することで、テラヘルツ波振幅の応答特性および検出感度が大きく変化することが示された。しかし、単点測定では、感度向上がセンシングプレート全体に一様に生じているのか、あるいは局所的な効果にとどまるのかを評価することは困難である。特に、TCM を用いた細胞検出では、将来的なイメージング応用や局所反応解析を見据えると、検出感度の空間的な分布特性を明らかにすることが重要となる。そこで本節では、外部電圧制御が細胞検出感度の空間分布に与える影響を評価することを目的とした。

本研究では、抗原抗体反応を介した肺腺がん培養細胞 PC9 の検出を対象とし、細胞濃度を  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  cell/mL と段階的に変化させた際のテラヘルツ波応答を測定した。まず、印加電圧を 0 V から +2 V まで変化させた場合の単点測定結果を基に、電圧条件と検出感度の関係を整理した。その結果をまとめたものが 図 7.3.3(a) である。図 7.3.3(a) に示されるように、いずれの細胞濃度条件においても、印加電圧の増加に伴ってテラヘルツ波強度変化が増大し、検出感度が向上する傾向が確認された。これは、外部電圧によってセンシングプレート内部の電場分布が変化し、表面電位変化に対するテラヘルツ波発生効率が増強されたためと考えられる。特に、本実験条件下では、+2 V 付近で感度が顕著に増大し、細胞濃度差に対する応答が最も明瞭に得られた。

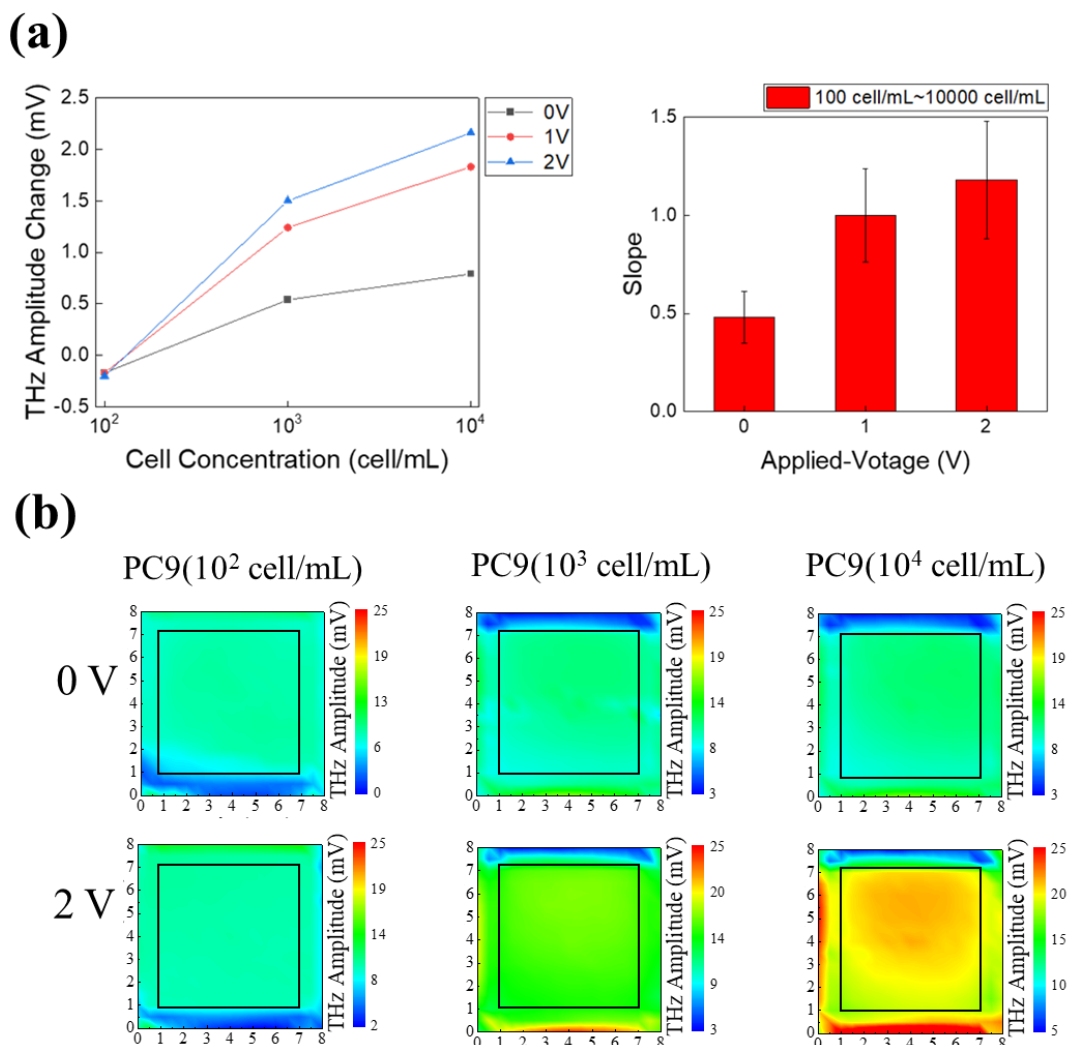


図 7.3.3 (a) 外部電圧制御下における肺腺がん細胞 (PC9) 検出の単点測定結果。センシングプレート上に抗体を固定化した後、PC9 細胞濃度を  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  cell/mL と変化させ、各濃度条件において印加電圧を 0 V から +2 V まで変化させた際のテラヘルツ波振幅変化を示す。いずれの細胞濃度においても、印加電圧の増加に伴いテラヘルツ波振幅が増大し、細胞濃度差に対する応答が強調される傾向が確認された。特に +2 V 付近において、濃度依存性が最も明瞭となり、外部電圧制御による検出感度向上が示唆される。

(b) 外部電圧印加の有無による肺腺がん細胞検出の空間分布評価結果。PC9 細胞濃度が  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  cell/mL の場合を示す。上はバイアス電圧を印加しない条件 (0 V)、下は +2 V を印加した条件で取得したテラヘルツ波イメージング結果である。0 V 条件では細胞濃度の違いによる信号コントラストは限定的であるのに対し、+2 V 印加時にはテラヘルツ波強度の空間分布に明確な差が現れ、細胞濃度に応じた信号変化が視覚的に判別可能となっている。これらの結果は、外部電圧制御がセンシングプレート全体にわたり有効に作用し、細胞検出の空間分解能および感度を同時に向上させることを示している。

次に、単点測定で得られた電圧依存性が、センシング領域全体においても同様に反映されているかを検証するため、X-Y 走査による空間分布測定を行った。バイアス電圧を印加しない条件 (0 V) および +2 V を印加した条件で取得したイメージング結果を 図 7.3.3(b) に示す。図 7.3.3(b) において、上はそれぞれ PC9 濃度が  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  cell/mL の場合の結果を示している。0 V 条件下では、細胞濃度の増加に伴うテラヘルツ波強度の変化は確認できるものの、そのコントラストは限定的であり、空間的な識別性は十分とは言えない。一方、+2 V を印加した条件では、細胞濃度の増加に伴う信号強度の変化が明確となり、空間分布としても濃度差を視覚的に判別可能な応答が得られた。これは、外部電圧による内部電場制御が、センシングプレート全体にわたって有効に作用していることを示唆している。さらに定量評価として、接着剤等の影響を除外するため、黒線で囲まれたセンシング領域内のテラヘルツ波強度平均値を算出した。その結果、PC9 濃度が  $10^2$  cell/mL と  $10^4$  cell/mL の間におけるテラヘルツ波振幅強度変化量は、0 V 条件では約 2.16 mV であったのに対し、+2 V 条件では約 10.04 mV となり、検出感度が約 5 倍向上することが確認された。

以上の結果より、外部電圧制御は、単点測定における検出感度の向上にとどまらず、空間分布測定においても細胞濃度差を明瞭化する効果を有することが示された。本節で示した +2 V は、本研究条件下において空間分布評価に適した代表的な電圧条件であり、外部電圧制御が TCM における細胞検出およびイメージング応用の基盤技術として有効であることを示す結果である。

#### 7.3.4 単一センシングプレートにおける電圧掃引による感度最適化解析

前節までの結果から、外部電圧の印加によりセンシングプレートの検出感度が大きく変化することが示された。しかし、これらの実験では限られた電圧条件下での比較に留まっており、感度が最大となる最適電圧条件の存在については十分に検証されていなかった。そこで本節では、単一のセンシングプレートを用い、広い電圧範囲にわたって連続的に電圧を掃引することで、検出感度の電圧依存性を詳細に評価した。

本実験では、細胞濃度を一定に保った状態で、印加電圧を  $-2.5$  V から  $+2.5$  V まで  $0.1$  V 刻みで変化させ、それぞれの電圧条件におけるテラヘルツ波振幅変化をリアルタイムで測定した。電圧は一定時間間隔ごとに段階的に変更され、各電圧においてテラヘルツ波振幅が安定した値を示した時点のデータを用いた。これらの結果を整理したものを 図 7.3.4(a) に示す。図 7.3.4(a) より、印加電圧の増加に伴いテラヘルツ波振幅は全体として増大する傾向を示すことが確認できる。一方で、振幅の増加率は電圧に対して一様ではなく、特定の電圧領域において顕著な変化が生じていることが分かる。特に、本研究で用いたセンシングプレートにおいては、およそ  $0.3$ – $0.7$  V の範囲でテラヘルツ波振幅の変化が最も顕著となり、この電圧領域において感度が高くなることが示唆された。

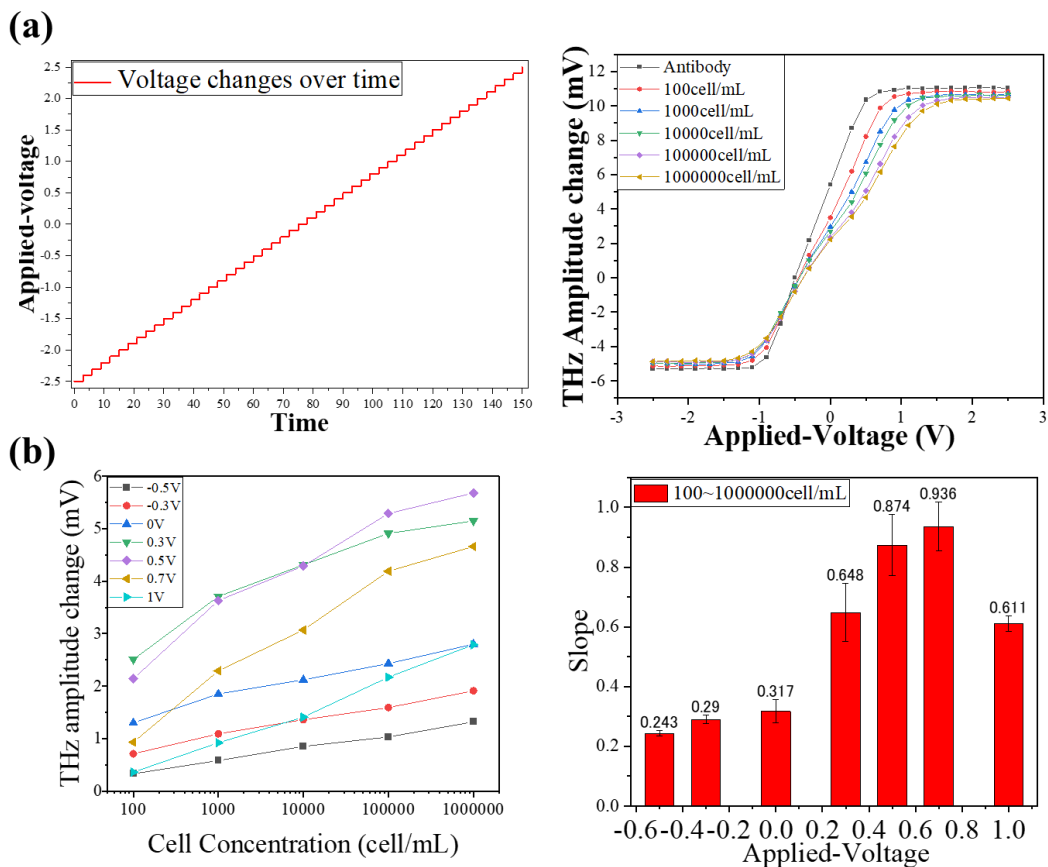


図 7.3.4(a) 単一センシングプレートにおいて、細胞濃度を一定に保った条件下で、印加電圧を  $-2.5\text{ V}$  から  $+2.5\text{ V}$  まで  $0.1\text{ V}$  刻みで掃引した際のテラヘルツ波振幅変化を示す。横軸は印加電圧、縦軸はテラヘルツ波振幅変化を表す。印加電圧の増加に伴いテラヘルツ波振幅は全体として増大する傾向を示すが、電圧に対する応答は一律ではなく、特定の電圧領域において顕著な変化が確認される。

(b) 印加電圧条件ごとの細胞濃度依存性および検出感度の評価結果。左図は、各印加電圧における細胞濃度とテラヘルツ波振幅変化の関係を示す。右図は、左図に基づいて算出した検出感度を印加電圧の関数として示したものである。検出感度は印加電圧に依存して変化し、特定の電圧領域において最大値を示すことが確認された。

次に、異なる細胞濃度条件におけるテラヘルツ波振幅応答を、各電圧条件ごとに整理した結果を図 7.3.4(b)に示す。図 7.3.4(b)左図は、各印加電圧における細胞濃度とテラヘルツ波振幅の関係を示しており、いずれの電圧条件においても、細胞濃度の増加に伴ってテラヘルツ波振幅が増大する傾向が確認された。一方で、その傾き、すなわち検出感度は印加電圧によって大きく異なることが明らかとなった。図 7.3.4(b)右図は、各電圧条件における検出感度をまとめたものであり、感度が電圧に依存して非単調に変化する様子が示されている。こ

の結果から、検出感度は単に電圧を高くすれば向上するわけではなく、センシングプレート内部の電場状態が表面電位変化に対して最も高感度に応答する特定の動作点が存在することが示された。

以上の結果は、外部電圧印加がテラヘルツ波振幅の単純な増幅手段ではなく、センシングプレート内部の空乏層電場および能帯湾曲状態を調整することで、検出感度そのものを最適化可能な制御パラメータであることを示している。また、本節で得られた結果は、最適電圧条件がセンシングプレート固有である可能性を示唆しており、次節における複数センシングプレートを用いた統計的検証へと議論を展開する基盤となる。

### 7.3.5 複数センシングプレートに対する電圧調整効果の統計的検証

7.3.4 節では、単一のセンシングプレートを対象として、Si 層に印加する外部電圧を掃引することにより、テラヘルツ波振幅応答および細胞検出感度が大きく変調されることを示した。しかしながら、TCM を用いた実際のバイオセンシング応用を想定した場合、センシングプレートは必ずしも均一な電気特性を有するとは限らず、センシングプレート間の個体差が検出感度および定量性に影響を及ぼす可能性がある。この点を踏まえ、本節では、複数のセンシングプレートを用いた統計的検証を行い、外部電圧印加による感度制御が、個体差を有するセンシングプレート群全体に対してどの程度有効であるかを体系的に評価した。本研究では、初期テラヘルツ応答特性および電圧応答範囲の異なる 6 枚のセンシングプレートを用い、化学修飾された肺腺がん細胞を検出対象として測定を行った。図 7.3.5(a)~(f) は、それぞれ異なるセンシングプレートに対応しており、各センシングプレートについて同一の解析手順を適用した結果を示している。

各サブ図の左側（例：図 7.3.5(a1)~(f1)）は、異なる細胞濃度条件下において、Si 層へ印加した電圧に対するテラヘルツ波振幅の変化を示している。横軸は印加電圧、縦軸は細胞反応後に得られたテラヘルツ波振幅であり、細胞濃度ごとにプロットされている。いずれのセンシングプレートにおいても、テラヘルツ波振幅は印加電圧の増加に伴って増大する傾向を示すが、振幅増加が顕著となる電圧範囲はプレートごとに異なることが確認できる。特に、図中の黒枠で示した電圧領域は、各センシングプレートにおいてテラヘルツ波振幅の増加勾配が最も大きくなる領域であり、外部電圧によって内部空乏層電場が効果的に制御されている状態を反映していると考えられる。この黒枠領域は、必ずしもすべてのプレートで同一の電圧値を示しておらず、各センシングプレートが固有の最適電圧帯を有していることを示唆している。一方、各サブ図の右側（図 7.3.5(a2)~(f2)）では、左側で抽出された電圧条件に基づき、細胞濃度の対数とテラヘルツ波振幅変化量との関係を整理し、線形近似によって検出感度を算出した結果を示している。ここでは、無電圧条件（0 V）における感度と、黒枠で示した電圧領域内で得られた感度とを比較している。図 7.3.5(a), (b), および (e) に対応するセンシングプレートでは、無電圧条件においても細胞濃度対数とテラヘルツ波振幅変化量との間に比較的良好な線形関係が確認され、それぞれ  $R^2 = 0.8646, 0.821,$

0.9483 を示した。一方で、図 7.3.5(c), (d), および (f) に対応するセンシングプレートでは、無電圧条件下では線形性が著しく低下し、 $R^2$  はそれぞれ 0.7135, 0.09816, 0.3638 にとどまった。

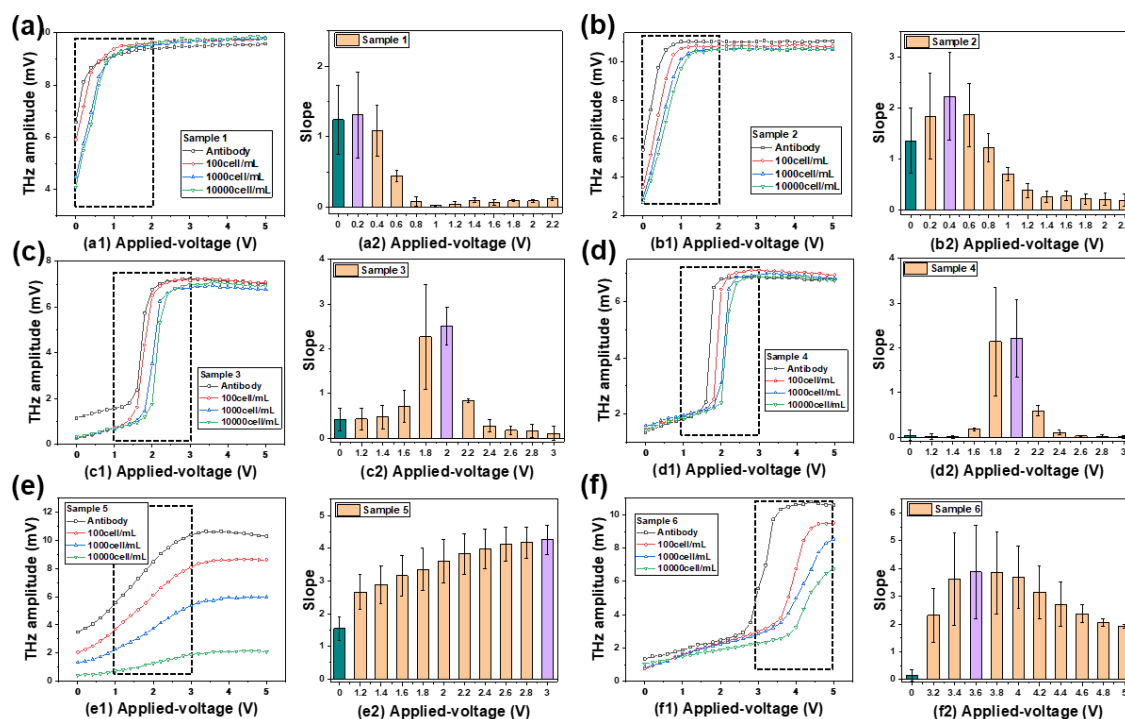


図 7.3.5 (a1–f1)は TCM システムにより測定された、センシングプレート Si 層への印加電圧に対するテラヘルツ波振幅の変化を示す。各サブ図は異なるセンシングプレートに対応しており、色分けされた曲線は、センシングプレート上に固定化された肺腺がん細胞 (PC9) の各濃度条件を表している。いずれのセンシングプレートにおいても、特定の電圧範囲においてテラヘルツ波振幅が顕著に増大する領域が確認され、黒枠で示した領域は振幅変化が最も顕著な電圧範囲を示している。(a2–f2)は(a1–f1)において黒枠で示した電圧範囲内の各電圧条件に対して、テラヘルツ波振幅変化量を細胞濃度に対してプロットした結果を示す。各電圧条件における検出感度は、細胞濃度の対数とテラヘルツ波振幅変化量との線形フィッティングの傾きとして算出した。棒グラフにおいて、緑色のバーは無印加電圧 (0 V) 条件下で得られた検出感度を示し、紫色のバーは各センシングプレートにおいて最も高い検出感度が得られた印加電圧条件を示している。

しかしながら、これらすべてのセンシングプレートにおいて、黒枠で示した電圧領域を選択して検出感度を算出した場合、細胞濃度対数とテラヘルツ波振幅変化との間に明瞭な線形関係が回復し、検出感度は無電圧条件と比較して一貫して向上した。この結果は、外部電圧印加が、線形検出が成立しにくいセンシングプレートに対しても有効に作用することを明

確に示している。以上の結果を総合すると、外部電圧は単にテラヘルツ信号を増幅する役割を果たすだけでなく、各センシングプレートが有する初期電場状態の違いを補正し、感度の高い動作点へと能動的に誘導する制御パラメータとして機能していると解釈できる。すなわち、外部電圧制御により、センシングプレート間の感度ばらつきを低減しつつ、細胞濃度に対する定量的かつ再現性の高い検出が可能となる。

このように、本節で示した複数センシングプレートに対する統計的検証は、TCM における外部電圧制御が装置個体差を内包した実環境下においても有効であることを裏付ける重要な結果であり、TCM 技術を実用的な細胞・バイオマーカー検出プラットフォームへと発展させる上で、本質的な意義を有する。

### 7.3.7 総合考察

本節では、7.3.1 から 7.3.6 に至る一連の実験結果を総合的に整理し、外部電圧制御型テラヘルツ波ケミカル顕微鏡 (TCM) が有する物理的意義および検出手法としての有効性について包括的に考察する。

まず、7.3.1 および 7.3.2 において示したように、センシングプレートの Si 層に外部電圧を印加することで、テラヘルツ波振幅は単調に変化し、特定の電圧範囲において顕著な応答増強が観測された。これは、外部電圧によって Si 層内部のフェルミ準位が変化し、界面近傍に形成される能帯湾曲および空乏層電場が能動的に制御された結果であると解釈できる。重要なのは、この電圧印加が単なる信号増幅ではなく、「表面電位変化に対する感度そのもの」を制御するパラメータとして機能している点である。すなわち、TCM における検出特性は、生体分子反応の有無だけでなく、センシングプレート内部電場の動作点に強く依存しており、外部電圧はその動作点を調整するための有効な制御手段であることが示された。

7.3.3 では、単点測定に加えて X-Y スキャンによる空間分布評価を行い、外部電圧印加がイメージング性能に与える影響を検討した。その結果、バイアス電圧を印加しない条件では細胞濃度差に起因するコントラストが不明瞭であったのに対し、適切な電圧 (例: 2 V) を印加することで、濃度依存的なテラヘルツ波振幅変化が空間的にも明瞭に可視化されることが確認された。この結果は、外部電圧制御型 TCM が単点検出に留まらず、高感度イメージング手法としても有効であることを示しており、将来的な組織試料や不均一試料への応用可能性を強く示唆するものである。

続く 7.3.4 では、単一のセンシングプレートに対して広範囲な電圧掃引を行い、検出感度の電圧依存性を詳細に解析した。その結果、テラヘルツ波振幅自体は電圧増加に伴い増大する一方で、検出感度は必ずしも高電圧側で最大となるわけではなく、特定の電圧範囲 (例: 0.3–0.7 V) において最大化されることが明らかとなった。これは、内部電場が過度に強くなると、表面電位変化に対する相対的な応答勾配が低下する可能性を示唆しており、TCM における検出感度は「振幅の絶対値」ではなく、「電圧応答曲線の勾配」によって支配され

ることを示す重要な知見である。

7.3.5 では、製造ロットの異なる複数のセンシングプレートを用いた統計的検証を行った。その結果、無印加電圧条件では細胞濃度とテラヘルツ波振幅変化との線形性が成立しないセンシングプレートが存在する一方で、適切な電圧を印加することで、すべてのセンシングプレートにおいて検出感度が顕著に向上することが示された。特筆すべき点は、各センシングプレートにおいて「感度が最大化される電圧範囲」が異なることである。これは、製造過程に由来する不純物分布や界面状態密度の違いにより、各センシングプレートの初期内部電場状態が異なるためと考えられる。すなわち、センシングプレート間の感度ばらつきは不可避であるものの、外部電圧制御によって各センシングプレート固有の最適動作点へ補正できることが、本研究により実験的に示された。

さらに 7.3.6 では、これまでとは逆の観点から、テラヘルツ波振幅を一定に保つようフィードバック電圧を調整する測定手法を pH 検出に適用した。その結果、テラヘルツ波振幅自体は pH に対して非線形かつ飽和的な応答を示す一方で、フィードバック電圧と pH の間には高い線形関係が得られることが確認された。この結果は、TCM における検出指標として「振幅変化」だけでなく、「補償に必要な電圧量」を用いる新たな定量測定モードが有効であることを示している。すなわち、外部電圧制御は感度最適化のみならず、検出原理そのものを拡張する可能性を有している。

以上の結果を総合すると、本研究で提案した外部電圧制御型 TCM は、

1. センシングプレート内部電場を能動的に制御可能であること
2. 検出感度を電圧によって最適化できること
3. センシングプレート間ばらつきを補正し、再現性を大幅に向上できること
4. さらに、フィードバック制御を導入することで、新たな定量測定モードへ拡張可能であること

を同時に実現する計測手法であると結論づけられる。

この「電圧を用いた感度および動作点チューニング」という概念は、TCM を単なる材料依存型センサから、内部状態を能動的に制御可能な高機能計測プラットフォームへと発展させるものであり、次章で述べる結論および将来展望に直結する重要な基盤成果である。

## 7.4 まとめ

本章では、テラヘルツ波ケミカル顕微鏡 (TCM) における検出感度および再現性の限界要因に着目し、性能ばらつきの顕在化からその克服に至る一連の最適化手法を体系的に検討した。特に、センシングプレート内部電場を外部電圧によって能動的に制御するという新たなアプローチを導入し、TCM を高感度かつ再現性の高い計測プラットフォームへと発展させるための基盤を確立した。

まず 7.1 では、従来の TCM において、センシングプレート間および測定条件間で検出感度に顕著なばらつきが存在することを明確化し、これが実用化に向けた本質的課題であ

ることを示した。これにより、「感度向上」だけでなく、「感度の制御性および再現性」が重要な評価軸であることを本章の課題として設定した。

続く 7.2 では、外部電圧印加による Si 層内部電場制御の理論的背景を整理し、フェルミ準位の変化、能帯湾曲、および界面近傍の電場状態がテラヘルツ波放射特性に与える影響を示した。この理論的整理により、外部電圧が単なる信号調整手段ではなく、TCM の動作点そのものを規定する制御パラメータであることが明確となった。

7.3 では、この理論的背景に基づき、グラデーション電圧（段階電圧）を用いた実験的検証を通じて、外部電圧制御型 TCM の有効性を多角的に評価した。7.3.1 および 7.3.2 では、外部電圧印加下におけるテラヘルツ波振幅の基礎応答特性と、生体分子種に依存した電圧応答差を明らかにし、TCM が表面電位変化に対して高い感受性を有することを示した。さらに 7.3.3 では、外部電圧制御が単点測定にとどまらず、細胞濃度分布の空間的可視化を可能にすることを示し、高感度イメージング手法としての拡張性を明らかにした。7.3.4 では、単一センシングプレートに対する電圧掃引実験を通じて、検出感度が特定の電圧範囲で最大化されることを示し、「振幅の大きさ」ではなく「電圧応答曲線の勾配」が感度を支配するという重要な知見を得た。7.3.5 では、複数のセンシングプレートを用いた統計的検証により、無印加電圧条件では感度の線形性が保証されない場合がある一方で、各センシングプレートに適した電圧を印加することで、すべてのセンシングプレートにおいて検出感度が大幅に向上することを示した。これは、製造ばらつきに起因する初期内部電場状態の違いを、外部電圧によって補正可能であることを実験的に示した初めての結果である。以上を総合すると、本章で確立した外部電圧制御の枠組みは、TCM における

- (1) 検出感度の最適化,
  - (2) センシングプレート間ばらつきの補正,
  - (3) 高感度イメージングへの拡張,
- を同時に実現する包括的手法であると結論づけられる。

本章の成果は、TCM を受動的な材料依存型計測技術から、動作点を能動的に設計・制御可能な計測プラットフォームへと進化させるものであり、次章で述べる結論および将来展望の中核を成す基盤成果である。



## 第 8 章 総括

本論文では、TCM を基盤とした非接触・非標識生体計測技術に着目し、その基礎物理から装置構成、生体分子および細胞検出への応用、さらに性能最適化および高感度化手法に至るまでを一貫した枠組みの中で体系的に検討した。本研究の目的は、TCM を単なる物性評価装置としてではなく、医療診断分野において実用性を有する定量的バイオセンシングプラットフォームとして確立することであった。

第 1 章では、がんをはじめとする重大疾患の早期診断に対する社会的・医学的要請を整理し、従来の病理診断や標識依存型検出技術が有する侵襲性、時間的制約、および前処理負担といった課題を明確化した。その上で、液体生検に代表される低侵襲診断技術の重要性を示し、生体分子反応に伴う電気的変化を非接触で読み出す工学的計測手法として、TCM に着目した研究の位置づけを明確にした。

第 2 章および第 3 章では、本研究の物理的・工学的基盤として、テラヘルツ波の発生および検出原理、ならびに TCM の装置構成と動作原理について整理した。特に、半導体表面に形成される空乏層電場とフェムト秒レーザー励起キャリアによる瞬時電流がテラヘルツ波放射を生じる機構を理論的に明確化し、センシングプレート表面電位変化がテラヘルツ波振幅として読み出されることを示した。これにより、TCM が溶液環境下においても表面電位変化に高感度で応答する計測手法であることを物理的に裏付けた。

第 4 章では、生体分子および生体分子間相互作用の基礎について整理し、抗原抗体反応およびアビジン-ビオチン反応を代表例として、分子認識に伴う表面状態変化の特徴を明確にした。また、ELISA 法や SPR 法といった既存の生体分子検出技術を概観し、高感度である一方で標識依存性や装置構成の複雑さといった制約が存在することを示した。これにより、非標識かつ電気的応答に基づく TCM の位置づけを明確にし、後続章における応用研究の理論的背景を整えた。

第 5 章では、がんゲノム医療への応用を目的として、TCM を用いた液中がん細胞検出について検討した。肺腺がん細胞 (PC9) をモデルとして、細胞濃度とテラヘルツ波振幅強度との間に明確な相関が得られることを示し、TCM が抗体-抗原反応に起因する表面電位変化を検出可能であることを実証した。さらに、異なる細胞種を用いた特異性評価および混合細胞試料における比率依存性評価を通じて、本手法が標的分子の存在量および割合を反映した応答を示すことを明らかにした。これらの結果により、TCM が液体生検を想定した細胞検出プラットフォームとして成立し得ることを示した。

第 6 章では、TCM の医療応用の汎用性を検証するため、神経疾患および感染症を対象とした生体分子検出への応用探索を行った。 $\alpha$ -シヌクレインおよび SARS-CoV-2 N タンパク質を対象とした検出実験により、TCM が細胞レベルのみならず、タンパク質レベルの生体分子を液中で非標識検出可能であることを示した。特に、アダマーを用いた認識系の導入により、抗体に依存しない柔軟な検出系構築が可能であることを示し、TCM の応用範囲を大きく拡張した。

第 7 章では、TCM の検出性能向上および実用化に向けた最も重要な課題である感度および再現性のばらつきに着目し、外部電圧制御による性能最適化手法を提案した。グラデーション電圧を用いた系統的解析により、検出感度が電圧条件によって大きく変化し、特定の電圧範囲において最大化されることを明らかにした。さらに、複数のセンシングプレートに対する統計的検証から、外部電圧制御によってセンシングプレート間ばらつきを補正可能であることを示した。

以上の成果を総合すると、本論文の学術的・技術的貢献は以下の三点に集約される。

第一に、TCM における表面電位検出機構を生体分子反応へと拡張し、細胞およびタンパク質を対象とした非標識・非接触検出が可能であることを実証した点である。

第二に、外部電圧制御を導入することで、従来受動的であった TCM の動作点を能動的に設計・最適化可能であることを示し、感度および再現性の両立という課題に対する解決指針を提示した点である。

今後の展望としては、センシングプレート材料および界面設計のさらなる高度化、多項目同時検出を可能とするアレイ化、ならびにマイクロ流体デバイスとの統合による自動化・高スループット化が挙げられる。

本論文で示した一連の研究成果は、テラヘルツ波工学とバイオセンシングを融合した新たな計測概念を提示するものであり、TCM を基盤とした工学的診断技術の発展に寄与するものと考えられる。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々から多大なるご指導、ご支援を賜りました。この場をお借りして、心より感謝申し上げます。

まず初めに、本研究のご指導を賜りました岡山大学教授、紀和利彦先生に、心より深く御礼申し上げます。研究の方向性の確立から論文執筆に至るまで、常に丁寧かつ的確なご助言を賜り、本研究を遂行する上で大きな支えとなりました。先生のご指導のもとで研究に取り組めたことは、私にとって大変貴重な経験であり、深く感謝申し上げます。

また、日々の研究活動において親身にご指導くださいました同大学准教授、王璣先生にも、心より感謝申し上げます。研究に行き詰まった際にも的確なご助言と温かい励ましをいただき、多くの困難な局面を乗り越えることができました。

副指導教員としてご助言を賜りました、医用情報ネットワーク学研究室教授、横平徳美先生、ならびに機械工学コース認知神経科学研究室教授、楊家家先生にも、深く感謝申し上げます。先生方の幅広いご専門に基づくご指摘とご助言は、本研究の理解を深め、研究の視野を広げる上で大変有益でした。

さらに、本研究の中間審査において貴重なご意見を賜りました理化学研究所の大谷知行様にも、心より御礼申し上げます。いただいたご指摘を通じて、研究内容を改めて見つめ直し、より深く考察する機会を得ることができました。

また、実験手法の検討や実験試薬の選定などにおいて、多くの有益なご助言とご支援をいただきました井上博文先生にも、心より感謝申し上げます。先生のご経験に基づくご助言は、本研究の円滑な遂行に大きく寄与しました。

研究室の先輩である葭田勇一様、岩附康平様には、実験手法や測定システムの調整をはじめ、博士課程入学当初の研究生活や大学生活に至るまで、多方面にわたりご支援いただきました。お二人のご助力なくして、本研究の基盤を築くことはできなかつたと感じております。ここに深く感謝申し上げます。

また、研究室の後輩である辻紗也佳様、村上真菜様、近江佑斗様、南真衣様には、実験の実施、実験系の検討、ならびにデータ処理や解析に至るまで、多大なご協力をいただきました。共に議論を重ねながら研究を進められたことは、本研究を完成させる上で大きな力となりました。

最後に、博士課程を通じて、研究活動のみならず精神的な面でも支えてくださった研究室の皆様、友人、そして家族に深く感謝申し上げます。皆様の支えがなければ、本研究を無事に完成させることはできませんでした。

本研究を通じて得られた多くの学びと貴重な経験に心より感謝するとともに、今後はこれらの経験を活かし、社会に貢献できる研究者として一層精進してまいります。

## 参考文献

1. Santucci C, Carioli G, Bertuccio P, et al. Progress in cancer mortality, incidence, and survival: a global overview. *European Journal of Cancer Prevention* [homepage on the Internet] 2020 [cited 2025 June 10];29(5):367–381. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/CEJ.0000000000000594>
2. Blandin Knight S, Crosbie PA, Balata H, Chudziak J, Hussell T, Dive C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biol* [homepage on the Internet] 2017 [cited 2025 June 10];7(9):170070. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsob.170070>
3. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics [Homepage on the Internet]. In: Ahmad A, Gadgeel S, editors. *Lung Cancer and Personalized Medicine*. Cham: Springer International Publishing, 2016 [cited 2025 June 10]; p. 1–19. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24223-1\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-24223-1_1)
4. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* [homepage on the Internet] 2016 [cited 2025 June 10];11(1):39–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086415000179>
5. Walters S, Maringe C, Coleman MP, et al. Lung cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK: a population-based study, 2004–2007. *Thorax* [homepage on the Internet] 2013 [cited 2025 June 10];68(6):551–564. Available from: <https://thorax.bmj.com/lookup/doi/10.1136/thoraxjnl-2012-202297>
6. Nesbitt JC, Putnam JB, Walsh GL, Roth JA, Mountain CF. Survival in early-stage non-small cell lung cancer. *The Annals of Thoracic Surgery* [homepage on the Internet] 1995 [cited 2025 June 10];60(2):466–472. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000349759500169L>
7. Cappello F, Angerilli V, Munari G, et al. FFPE-Based NGS Approaches into Clinical Practice: The Limits of Glory from a Pathologist Viewpoint. *JPM* [homepage on the Internet] 2022 [cited 2025 June 10];12(5):750. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4426/12/5/750>

8. Angerilli V, Galuppini F, Pagni F, Fusco N, Malapelle U, Fassan M. The Role of the Pathologist in the Next-Generation Era of Tumor Molecular Characterization. *Diagnostics* [homepage on the Internet] 2021 [cited 2025 June 10];11(2):339. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4418/11/2/339>
9. Mano H. Cancer genomic medicine in Japan. *Proc Jpn Acad, Ser B* [homepage on the Internet] 2020 [cited 2025 Dec 30];96(7):316–321. Available from: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab/96/7/96\\_PJA9607B-06/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/pjab/96/7/96_PJA9607B-06/_article)
10. The International Cancer Genome Consortium. International network of cancer genome projects. *Nature* [homepage on the Internet] 2010 [cited 2025 Dec 30];464(7291):993–998. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature08987>
11. Gaffney E, Riegman P, Grizzle W, Watson P. Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research. *Biotechnic & Histochemistry* [homepage on the Internet] 2018 [cited 2025 June 10];93(5):373–386. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10520295.2018.1446101>
12. Corless CL, Spellman PT. Tackling Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tumor Tissue with Next-Generation Sequencing. *Cancer Discovery* [homepage on the Internet] 2012 [cited 2025 June 10];2(1):23–24. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/2/1/23/2908/Tackling-Formalin-Fixed-Paraffin-Embedded-Tumor>
13. Kou T, Kanai M, Matsumoto S, Okuno Y, Muto M. The possibility of clinical sequencing in the management of cancer. *Jpn J Clin Oncol* [homepage on the Internet] 2016 [cited 2025 Dec 30];46(5):399–406. Available from: <https://academic.oup.com/jjco/article-lookup/doi/10.1093/jjco/hyw018>
14. Bolognesi C, Forcato C, Buson G, et al. Digital Sorting of Pure Cell Populations Enables Unambiguous Genetic Analysis of Heterogeneous Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tumors by Next Generation Sequencing. *Sci Rep* [homepage on the Internet] 2016 [cited 2025 June 10];6(1):20944. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep20944>
15. Kerick M, Isau M, Timmermann B, et al. Targeted high throughput sequencing in clinical cancer Settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues,

- input amount and tumor heterogeneity. *BMC Med Genomics* [homepage on the Internet] 2011 [cited 2025 June 10];4(1):68. Available from: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-8794-4-68>
16. Yoshida Y, Ding X, Iwatsuki K, et al. Detection of Lung Cancer Cells in Solutions Using a Terahertz Chemical Microscope. *Sensors* [homepage on the Internet] 2021 [cited 2025 June 10];21(22):7631. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8220/21/22/7631>
  17. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *The American Journal of Pathology* [homepage on the Internet] 2002 [cited 2025 Dec 30];161(6):1961–1971. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010644720>
  18. Do H, Dobrovic A. Sequence Artifacts in DNA from Formalin-Fixed Tissues: Causes and Strategies for Minimization. *Clinical Chemistry* [homepage on the Internet] 2015 [cited 2025 Dec 30];61(1):64–71. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/61/1/64/5611545>
  19. Diaz LA, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *JCO* [homepage on the Internet] 2014 [cited 2025 Dec 30];32(6):579–586. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2012.45.2011>
  20. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discovery* [homepage on the Internet] 2016 [cited 2025 Dec 30];6(5):479–491. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerdiscovery/article/6/5/479/5481/Clinical-Applications-of-Circulating-Tumor-Cells>
  21. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* [homepage on the Internet] 2017 [cited 2025 Dec 30];17(4):223–238. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc.2017.7>
  22. Bardelli A, Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell* [homepage on the Internet] 2017 [cited 2025 Dec 30];31(2):172–179. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610817300028>
  23. Lofgren JA, Dhandapani S, Pennucci JJ, et al. Comparing ELISA and Surface Plasmon

- Resonance for Assessing Clinical Immunogenicity of Panitumumab. *The Journal of Immunology* [homepage on the Internet] 2007 [cited 2025 Dec 30];178(11):7467–7472. Available from: <https://academic.oup.com/jimmunol/article/178/11/7467/8023050>
24. Ambrosi A, Airò F, Merkoçi A. Enhanced Gold Nanoparticle Based ELISA for a Breast Cancer Biomarker. *Anal Chem* [homepage on the Internet] 2010;82(3):1151–1156. Available from: <https://doi.org/10.1021/ac902492c>
  25. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* [homepage on the Internet] 1978 [cited 2025 Dec 30];31(6):507–520. Available from: <https://jcp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jcp.31.6.507>
  26. Lewis JG, Elder PA. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma cortisol. *Journal of Steroid Biochemistry* [homepage on the Internet] 1985 [cited 2025 Dec 30];22(5):673–676. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022473185902225>
  27. Wang J. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics* [homepage on the Internet] 2006 [cited 2025 Dec 30];21(10):1887–1892. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566305003441>
  28. Grieshaber D, MacKenzie R, Vörös J, Reimhult E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* [homepage on the Internet] 2008 [cited 2025 Dec 30];8(3):1400–1458. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8220/8/3/1400>
  29. Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR. Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev* [homepage on the Internet] 2010 [cited 2025 Dec 30];39(5):1747. Available from: <https://xlink.rsc.org/?DOI=b714449k>
  30. Turner APF. Biosensors: sense and sensibility. *Chem Soc Rev* [homepage on the Internet] 2013 [cited 2025 Dec 30];42(8):3184. Available from: <https://xlink.rsc.org/?DOI=c3cs35528d>
  31. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature* [homepage on the Internet] 2006 [cited 2025 Dec 30];442(7101):368–373. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature05058>

32. Sackmann EK, Fulton AL, Beebe DJ. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* [homepage on the Internet] 2014 [cited 2025 Dec 30];507(7491):181–189. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature13118>
33. Dittrich PS, Manz A. Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* [homepage on the Internet] 2006 [cited 2025 Dec 30];5(3):210–218. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrd1985>
34. Chin CD, Linder V, Sia SK. Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities. *Lab Chip* [homepage on the Internet] 2007 [cited 2025 Dec 30];7(1):41–57. Available from: <https://xlink.rsc.org/?DOI=B611455E>
35. McLafferty FW. A Century of Progress in Molecular Mass Spectrometry. *Annual Rev Anal Chem* [homepage on the Internet] 2011 [cited 2025 Dec 30];4(1):1–22. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-anchem-061010-114018>
36. McLafferty FW. Tandem Mass Spectrometry. *Science* [homepage on the Internet] 1981 [cited 2025 Dec 30];214(4518):280–287. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.7280693>
37. Piliarik M, Homola J. Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits? *Opt Express* [homepage on the Internet] 2009 [cited 2025 Dec 30];17(19):16505. Available from: <https://opg.optica.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-17-19-16505>
38. Singh P. SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges. *Sensors and Actuators B: Chemical* [homepage on the Internet] 2016 [cited 2025 Dec 30];229:110–130. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400516301186>
39. Homola J, Piliarik M. Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensors [Homepage on the Internet]. In: Homola J, editor. *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006 [cited 2025 Dec 30]; p. 45–67. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/5346\\_014](http://link.springer.com/10.1007/5346_014)
40. Gonçalves MST. Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes. *Chem Rev* [homepage on the Internet] 2009;109(1):190–212. Available from: <https://doi.org/10.1021/cr0783840>

41. Dean KM, Palmer AE. Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging. *Nat Chem Biol* [homepage on the Internet] 2014 [cited 2025 Dec 30];10(7):512–523. Available from: <https://www.nature.com/articles/nchembio.1556>
42. Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* [homepage on the Internet] 2000 [cited 2025 Dec 30];18(2):233–234. Available from: [https://www.nature.com/articles/nbt0200\\_233](https://www.nature.com/articles/nbt0200_233)
43. Sirtori C. Bridge for the terahertz gap. *Nature* [homepage on the Internet] 2002 [cited 2025 Dec 30];417(6885):132–133. Available from: <https://www.nature.com/articles/417132b>
44. Tonouchi M. Cutting-edge terahertz technology. *Nature photonics* 2007;1(2):97–105.
45. Hu BB, Nuss MC. Imaging with terahertz waves. *Optics letters* 1995;20(16):1716–1718.
46. Auston DH, Cheung KP, Smith PR. Picosecond photoconducting Hertzian dipoles. *Applied physics letters* 1984;45(3):284–286.
47. Grischkowsky D, Keiding S, Van Exter M, Fattinger C. Far-infrared time-domain spectroscopy with terahertz beams of dielectrics and semiconductors. *Journal of the Optical Society of America B* 1990;7(10):2006–2015.
48. Smolyanskaya OA, Chernomyrdin NV, Konovko AA, et al. Terahertz biophotonics as a tool for studies of dielectric and spectral properties of biological tissues and liquids. *Progress in Quantum Electronics* [homepage on the Internet] 2018 [cited 2025 Dec 30];62:1–77. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079672718300454>
49. Li K, Chen X, Zhang R, Pickwell-MacPherson E. Classification for Glucose and Lactose Terahertz Spectrums Based on SVM and DNN Methods. *IEEE Trans THz Sci Technol* [homepage on the Internet] 2020 [cited 2025 Dec 30];10(6):617–623. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/9154601/>
50. Kleine-Ostmann T, Nagatsuma T. A Review on Terahertz Communications Research. *J Infrared Milli Terahz Waves* [homepage on the Internet] 2011 [cited 2025 Dec 30];32(2):143–171. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10762-010-9758-1>

51. Son J-H, Oh SJ, Cheon H. Potential clinical applications of terahertz radiation. *Journal of Applied Physics* [homepage on the Internet] 2019 [cited 2025 Dec 30];125(19):190901. Available from: <https://pubs.aip.org/jap/article/125/19/190901/155981/Potential-clinical-applications-of-terahertz>
52. Gezimati M, Singh G. Advances in terahertz technology for cancer detection applications. *Opt Quant Electron* [homepage on the Internet] 2023 [cited 2025 Dec 30];55(2):151. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s11082-022-04340-0>
53. Walther M, Fischer BM, Ortner A, Bitzer A, Thoman A, Helm H. Chemical sensing and imaging with pulsed terahertz radiation. *Anal Bioanal Chem* [homepage on the Internet] 2010 [cited 2025 Dec 30];397(3):1009–1017. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-3672-1>
54. Woolard DL, Brown R, Pepper M, Kemp M. Terahertz Frequency Sensing and Imaging: A Time of Reckoning Future Applications? *Proc IEEE* [homepage on the Internet] 2005 [cited 2025 Dec 30];93(10):1722–1743. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/1512493/>
55. Hillger P, Grzyb J, Jain R, Pfeiffer UR. Terahertz Imaging and Sensing Applications With Silicon-Based Technologies. *IEEE Trans THz Sci Technol* [homepage on the Internet] 2019 [cited 2025 Dec 30];9(1):1–19. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/document/8576551/>
56. Saeedkia D. *Handbook of terahertz technology for imaging, sensing and communications*. Elsevier, 2013;
57. Auston DH, Cheung KP, Smith PR. Picosecond photoconducting Hertzian dipoles. *Applied physics letters* 1984;45(3):284–286.
58. Bonvalet A, Joffre M, Martin J, Migus A. Generation of ultrabroadband femtosecond pulses in the mid-infrared by optical rectification of 15 fs light pulses at 100 MHz repetition rate. *Applied Physics Letters* 1995;67(20):2907–2909.
59. Spicer W, Liliental-Weber Z, Weber E, et al. The advanced unified defect model for Schottky barrier formation. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics Processing and Phenomena* 1988;6(4):1245–1251.

60. Spicer W, Chye P, Skeath P, Su CY, Lindau I. New and unified model for Schottky barrier and III–V insulator interface states formation. *Journal of Vacuum Science and Technology* 1979;16(5):1422–1433.
61. Lepeshov S, Gorodetsky A, Krasnok A, Rafailov E, Belov P. Enhancement of terahertz photoconductive antenna operation by optical nanoantennas. *Laser & Photonics Reviews* [homepage on the Internet] 2017 [cited 2025 Dec 30];11(1):1600199. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lpor.201600199>
62. Khiabani N, Huang Y, Shen Y-C, Boyes Stephen J. Theoretical Modeling of a Photoconductive Antenna in a Terahertz Pulsed System. *IEEE Trans Antennas Propagat* [homepage on the Internet] 2013 [cited 2025 Dec 30];61(4):1538–1546. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/6409989/>
63. Yamashita M, Tonouchi M, Hangyo M. Visualization of supercurrent distribution by THz radiation mapping. *Physica B: Condensed Matter* [homepage on the Internet] 2000 [cited 2025 June 10];284–288:2067–2068. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921452699028951>
64. Kiwa T, Tonouchi M, Yamashita M, Kawase K. Laser terahertz-emission microscope for inspecting electrical faults in integrated circuits. *Opt Lett* [homepage on the Internet] 2003 [cited 2025 June 10];28(21):2058. Available from: <https://opg.optica.org/abstract.cfm?URI=ol-28-21-2058>
65. Kiwa T, Oka S, Kondo J, et al. A Terahertz Chemical Microscope to Visualize Chemical Concentrations in Microfluidic Chips. *JJAP* [homepage on the Internet] 2007 [cited 2025 June 10];46(11L):L1052. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1143/JJAP.46.L1052>
66. Kiwa T, Kondo Y, Minami Y, Kawayama I, Tonouchi M, Tsukada K. Terahertz chemical microscope for label-free detection of protein complex. *Applied Physics Letters* [homepage on the Internet] 2010 [cited 2025 June 10];96(21):211114. Available from: <https://pubs.aip.org/apl/article/96/21/211114/338718/Terahertz-chemical-microscope-for-label-free>
67. Kiwa T, Kamiya T, Morimoto T, et al. Imaging of Chemical Reactions Using a Terahertz Chemical Microscope. *Photonics* [homepage on the Internet] 2019 [cited 2025 June 10];6(1):10. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-6732/6/1/10>

68. Kiwa T, Kondo J, Oka S, et al. Chemical sensing plate with a laser-terahertz monitoring system. *Appl Opt* [homepage on the Internet] 2008 [cited 2025 June 10];47(18):3324. Available from: <https://opg.optica.org/abstract.cfm?URI=ao-47-18-3324>
69. Liu C, Wang J, Negishi R, Inuzuka T, Kiwa T. Label-Free Measurement of CD63 Positive Extracellular Vesicles Using Terahertz Chemical Microscopy. *ACS Sens* [homepage on the Internet] 2024 [cited 2025 June 10];9(6):3244–3252. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssensors.4c00590>
70. Wang J, Morita K, Ando M, et al. Terahertz aptasensor for dopamine neurochemical detection. *Appl Phys Express* [homepage on the Internet] 2023 [cited 2025 June 10];16(5):052002. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.35848/1882-0786/acd102>
71. Ding X, Murakami M, Wang J, Inoue H, Kiwa T. Microdetection of Nucleocapsid Proteins via Terahertz Chemical Microscope Using Aptamers. *Sensors* [homepage on the Internet] 2024 [cited 2025 June 10];24(22):7382. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8220/24/22/7382>
72. Morita K, Mitsuda Y, Yoshida S, Kiwa T, Wang J. Mapping Surface Potential in DNA Aptamer–Neurochemical and Membrane–Ion Interactions on the SOS Substrate Using Terahertz Microscopy. *Biosensors* [homepage on the Internet] 2025 [cited 2025 June 10];15(1):46. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6374/15/1/46>
73. Chandana BS, Syed SA, Khanum SJ, et al. Structures and functions of biomolecules [Homepage on the Internet]. In: *Biochemical and Molecular Pharmacology in Drug Discovery*. Elsevier, 2024 [cited 2025 Dec 30]; p. 3–19. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780443160134000014>
74. Yadav M, Yadav HS, editors. *Biochemistry: Fundamentals and Bioenergetics* [Homepage on the Internet]. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2021 [cited 2025 Dec 30]; Available from: <https://www.eurekaselect.com/197467/volume/1>
75. DeLisi C. *Antigen antibody interactions*. Springer Science & Business Media, 2013;
76. Noor S, Fatima A, Fatima I, Javed A. Antigen-Antibody Interaction in Cell Signaling. In: *Cell Signaling*. CRC Press, 2025; p. 92–125.
77. Brownlee J. Antigen-antibody interaction [Homepage on the Internet]. Swinburne,

- 2024 [cited 2025 Dec 30]; Available from: [https://swinburne.figshare.com/articles/report/Antigen-antibody\\_interaction/26263970](https://swinburne.figshare.com/articles/report/Antigen-antibody_interaction/26263970)
78. Wilchek M, Bayer EA. The avidin-biotin complex in immunology. *Immunology today* 1984;5(2):39–43.
  79. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC.  $\alpha$ -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro. *Science* [homepage on the Internet] 2010 [cited 2025 Dec 30];329(5999):1663–1667. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1195227>
  80. Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The Function of  $\alpha$ -Synuclein. *Neuron* [homepage on the Internet] 2013 [cited 2025 Dec 30];79(6):1044–1066. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627313008027>
  81. Winner B, Jappelli R, Maji SK, et al. In vivo demonstration that  $\alpha$ -synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci USA* [homepage on the Internet] 2011 [cited 2025 Dec 30];108(10):4194–4199. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1100976108>
  82. Kalia LV, Lang AE. Parkinson’s disease. *The Lancet* [homepage on the Internet] 2015 [cited 2025 Dec 30];386(9996):896–912. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614613933>
  83. Yamaguchi Y, Pearce G, Ryan CA. The cell surface leucine-rich repeat receptor for *At* Pep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci USA* [homepage on the Internet] 2006 [cited 2025 Dec 30];103(26):10104–10109. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0603729103>
  84. Ding C, Ganesvaran G, Alty JE, et al. Study of levodopa response in Parkinson’s disease: Observations on rates of motor progression. *Movement Disorders* [homepage on the Internet] 2016 [cited 2025 Dec 30];31(4):589–592. Available from: <https://movementdisorders.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mds.26497>
  85. Wu Y-C, Chen C-S, Chan Y-J. The outbreak of COVID-19: An overview. *Journal of the Chinese Medical Association* [homepage on the Internet] 2020 [cited 2025 Dec 30];83(3):217–220. Available from:

<https://journals.lww.com/10.1097/JCMA.0000000000000270>

86. Lee EC, Wada NI, Grabowski MK, Gurley ES, Lessler J. The engines of SARS-CoV-2 spread. *Science* [homepage on the Internet] 2020 [cited 2025 Dec 30];370(6515):406–407. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abd8755>
87. Woo PCY, Lau SKP, Chu C, et al. Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *J Virol* [homepage on the Internet] 2005 [cited 2025 Dec 30];79(2):884–895. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.79.2.884-895.2005>
88. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Gorbalenya AE, Baker SC, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* [homepage on the Internet] 2020 [cited 2025 Dec 30];5(4):536–544. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z>
89. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* [homepage on the Internet] 2020 [cited 2025 Dec 30];25(3). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
90. Porte L, Legarraga P, Vollrath V, et al. Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *International Journal of Infectious Diseases* [homepage on the Internet] 2020 [cited 2025 Dec 30];99:328–333. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971220304057>
91. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* [homepage on the Internet] 2020 [cited 2025 Dec 30];581(7809):465–469. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x>
92. Krüttgen A, Cornelissen CG, Dreher M, Hornef MW, Imöhl M, Kleines M. Comparison of the SARS-CoV-2 Rapid antigen test to the real star Sars-CoV-2 RT PCR kit. *Journal of Virological Methods* [homepage on the Internet] 2021 [cited 2025 Dec 30];288:114024. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093420302767>

93. Zeng W, Liu G, Ma H, et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [homepage on the Internet] 2020 [cited 2025 Dec 30];527(3):618–623. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X20308767>
94. Narayanan K, Chen C-J, Maeda J, Makino S. Nucleocapsid-Independent Specific Viral RNA Packaging via Viral Envelope Protein and Viral RNA Signal. *J Virol* [homepage on the Internet] 2003 [cited 2025 Dec 30];77(5):2922–2927. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.77.5.2922-2927.2003>
95. Gao T, Gao Y, Liu X, et al. Identification and functional analysis of the SARS-COV-2 nucleocapsid protein. *BMC Microbiol* [homepage on the Internet] 2021 [cited 2025 Dec 30];21(1):58. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-021-02107-3>



## 研究業績

### 査読付論文

#### 第一筆者

1. **Xue Ding**, Mana Murakami, Jin Wang, Hirofumi Inoue, Toshihiko Kiwa, Microdetection of Nucleocapsid Proteins via Terahertz Chemical Microscope Using Aptamers, *Sensors*, 24, 22, 7382, 2024.
2. **Xue Ding**, Yuto Ohmi, Jin Wang, Hirofumi Inoue, Toshihiko Kiwa, Highly sensitive detection of cancer cells using a voltage-tuned terahertz chemical microscope, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 51, 100972, 2026.

#### 第一筆者以外

1. Yuichi Yoshida, **Xue Ding**, Kohei Iwatsuki, Katsuya Taniizumi, Hirofumi Inoue, Jin Wang, Kenji Sakai, Toshihiko Kiwa, Detection of lung cancer cells in solutions using a terahertz chemical microscope, *Sensors* 21 (22), 7631. 2021.
2. Gang Wang, Zhaokai Li, Wei Ni, Heng Ye, Yang Liu, Linjian Chen, Lin Wang, Changjiang Liu, Jingyu Chen, Xuchao Wang, **Xue Ding**, Longshan Zhao, Xiaofeng Ge, Yan Wang, Yuanchao Ye, Toshihiko Kiwa, Linghe Zang, Jin Wang, Cuilian Dai, Binbin Liu; Theranostics, A small molecule esculetin accelerates postprandial lipid clearance involving activation of C/EBP $\beta$  and CD36 mediated phagocytosis by adipose tissue macrophages. *Theranostics*, 15(12), 5910-5930, 2025. (Impact Factor: 13.3, Top 3.6%)

## 国際学会口頭発表

### 代表

1. **Xue Ding**, Mana Murakami, Jin Wang, Hirofumi Inoue, Toshihiko Kiwa, Sensitivity-Controlled Measurement of Cancer Cells Using Terahertz Chemical Microscopy, Opto-X-Nano2024, Okayama, Japan, Nov 27, 2024 招待講演
2. **Xue Ding**, Mana Murakami, Jin Wang, Hirofumi Inoue, Toshihiko Kiwa, Voltage-Controlled Terahertz Chemical Microscope for High-Sensitive Measurement of Biological Materials, 2024 Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim (CLEO-PR), Incheon, Korea, 4-9, Aug. 2024, WelG-2
3. **Xue Ding**, Sayaka Tsuji, Mana Murakami, Jin Wang, Hirofumi Inoue, Toshihiko Kiwa, Detection Of Nucleocapsid Proteins Of COVID-19 Using A Terahertz Chemical Microscope, 48th International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves (IRMMW-THz), 17-22, Sep., 2023, Montreal, Canada, Tu-PM1-5-2.
- 4.

### その他連名

1. Toshihiko Kiwa, **Xue Ding**, Mana Murakami, Changjiang Liu, Hirofumi Inoue, Jing Wang,

- Toward Terahertz pathology: Detection of cancer cells by a terahertz chemical microscope, the 6th International Symposium on Microwave/THz Science and Applications. (MTSA2024), Copenhagen, Denmark, 4-7 June, 2024, TU-3.2. **招待講演**
2. YUCHEN MA, Changjiang Liu, **Xue Ding**, Jin Wang, Toshihiko Kiwa, Kinetics analysis of anti-CD9 antibody and H1299 EV using terahertz chemical microscope, JSPS-Optica Joint Symposia 2024, Nigata, Japan, 2024, 18p-B2-15
  3. **Xue Ding**, Sayaka Tsuji, Mana Murakami, Jin Wang, Hirofumi Inoue Inoue, Toshihiko Kiwa, Detection Of Nucleocapsid Proteins Of COVID-19 Using A Terahertz Chemical Microscope, 48th International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves (IRMMW-THz), 17-22, Sep., 2023, Montreal, Canada, Tu-PM1-5-2.

### 国際学会ポスター発表

#### 代表

1. **Xue Ding**, Mana Murakami, Jin Wang, Hirofumi Inoue, Toshihiko Kiwa, Detection of Biological Materials by A Versatile Terahertz Chemical Microscope, Opto-X-Nano2024, 2024.26–30, Okayama, Japan, P-15
2. **Xue Ding**, Mana Murakami, Jin Wang, Hirofumi Inoue, Toshihiko Kiwa, Detection of Lung Cancer Cells by A Voltage-controlled Terahertz Chemical Microscopy, The 6th International Symposium on Microwave/THz Science and Applications. (MTSA2024), Copenhagen, Denmark, 4-7 June, 2024, PO-1

#### その他連名

1. Mana Murakami, **Xue Ding**, Sayaka Tsuji, Jin Wang, Hirofumi Inoue, and Toshihiko Kiwa, Detection of SARS-CoV-2 in A Solution with A Small Volume Using Terahertz Chemical Microscope, The 6th International Symposium on Microwave/THz Science and Applications. (MTSA2024), Copenhagen, Denmark, 4-7 June, 2024, PO-2
2. Changjiang Liu, **Xue Ding**, Jin Wang, Negishi Ryo, nuzuka Tatsutoshi, Toshihiko Kiwa,, Detection of exosome-antibody reactions using terahertz chemical microscopy, 10th Optical Terahertz Science and Technology (OTST2024), 2024.4.8-12, Marburg, Germany, TuC.6
3. Changjiang Liu, **Xue Ding**, Jin Wang, Toshihiko Kiwa, Plasma cleaning of a biosensor surface evaluated by a terahertz chemical microscopy, The 12th Asia-Pacific Laser Symposium (APLS 2023), 4-7 Sep. 2023, Hakodate, Japan, PEW1-09

### 国内学会口頭発表

#### 代表

1. **丁雪**、村上 真菜、近江 佑斗、王 璿、井上 博文、紀和 利彦, 生体物質の高感度測定のための電圧印加型テラヘルツ波ケミカル顕微鏡の開発, レーザー学会学術講演会第

45 回年次大会, 広島市, 2025.1.21-23, I04-22a-III-03

2. **Xue Ding**, Sayaka Tsuji, Mana Murakami, Jin Wang, Hirofumi Inoue, Toshihiko Kiwa, Microdetection of Nucleocapsid Proteins by Terahertz Chemical Microscopy, 2024 年第 7 1 回応用物理学会春季学術講演会, 東京都, 2024.3.22-25, 25p-11E-7
3. **丁雪**, テラヘルツ波ケミカル顕微鏡による COVID-19 N-タンパク質の検出, レーザー学会 関西支部、中国・四国支部連合 若手学術交流研究会, 箕面市, 2023.12.18-19
4. **丁雪**, 辻紗也佳, 葭田勇一, 岩附康平, 井上博文, 王璉, 堺健司, 紀和利彦, テラヘルツ波ケミカル顕微鏡を用いた液体中肺癌細胞検出技術の開発, 第 69 回応用物理学会春季学術講演会, 26p-E101-8, 2022.3.22-26, 相模原市

#### その他連名

1. 村上 真菜、**丁雪**、辻 紗也佳、王 璉、井上 博文、紀和 利彦, 肺腺がん細胞高感度検出のための電圧印加型テラヘルツ波ケミカル顕微鏡の開発, 2024 年第 7 1 回応用物理学会春季学術講演会, 東京都, 2024.3.22-25, 25p-11E-8
2. 村上真菜, 辻沙也加, **丁雪**, 王璉, 井上博文, 紀和利彦, 空乏層電圧変調による TCM の高感度化, 2023 年度応用物理・物理系学会中四国支部合同学術講演会, 2023.7.29, Dp-3, 松江市
3. 辻 紗也佳、**丁雪**、村上 真菜、井上 博文、堺 健司、王 璉、紀和 利彦, テラヘルツ波ケミカル顕微鏡を用いたアプタマーによる SARS-CoV-2 検出技術の開発, 2023 年第 70 回応用物理学会春季講演会, 17p-A202-6, 2023.3.15-18, 東京都
4. 紀和 利彦, **丁雪**, 辻 紗也佳, 村上 真菜, 井上 博文, 王 璉, テラヘルツ波ケミカル顕微鏡による生体関連物質検出, 第 74 回コロイドおよび界面化学討論会, 2023.9.12-15, 長野市, 3A02. **招待講演**
5. 紀和 利彦, **丁雪**, 辻 紗也佳, 王 璉, 堺 健司, 井上 博文, テラヘルツ病理学の創生へ向けた取り組み, 第 3 回広帯域極限電磁波生命理工連携研究会「イメージングとその周辺技術の生命医科学への応用」, 2022.9.6, Online **招待講演**
6. 紀和 利彦, 葭田 勇一, **丁雪**, 辻 紗也佳, 谷泉 克弥, 王 璉, 堺 健司, 井上 博文, テラヘルツ波ケミカル顕微鏡の応用, 日本化学会 第 102 春季年会, 特別企画「赤外線の利用—近赤外からテラヘルツまで—」, 2022.3.23-26, Online **招待講演**

#### 国内ポスター発表

##### その他連名

1. 村上 真菜、**丁雪**、近江 佑斗、王 璉、井上 博文、紀和 利彦, テラヘルツ波ケミカル顕微鏡を用いた肺腺がん細胞検出における抗体の特異性評価, レーザー学会学術講演会 第 45 回年次大会, 広島市, 2025.1.21-23, P01-21p-P-20

## 学会賞・研究上の表彰

### 全国規模以上

1. **Ding XUE**, Opto-X-Nano2024, The best presentation award, 2024.11.28

### その他

1. **DING XUE**, Detection of nucleocapsid proteins of COVID-19 using a terahertz chemical microscope, 2023 年度岡山大学科学技術イノベーション創出フェローシップ 2023 年度岡山大学科学技術イノベーション創出フェローシップ研究成果報告会,優秀発表賞, 2023.9.28
2. ヘルスシステム統合科学研究科令和6年度研究科長賞, 2025.3.25

## 獲得資金

### 学内

1. 2023年度岡山大学科学技術イノベーション創出フェローシップ (OUフェローシップ)