

アップルとグーグルを合体



技術解説

谷口正輝*

Combining Apple and Google

Key Words : Nanopore, AI, Virus, Infections diseases, diagnostic

はじめに

アップルに代表されるスマートフォンは、アプリをダウンロードするだけで、地図にもゲームにもなる。アップルは、基本のOSと、アプリが動くポータブルでデザイン性の高いハードウェアを提供する。新規ビジネス参入者は、新たなアプリ開発に専念することができる。このビジネスモデルが、デジタルオープンプラットフォームである。アプリの数が増えたと、ユーザー数も爆発的に増加する。今や、スマホは、世界のインフラとなっている。

グーグルは、AIを搭載した検索アプリを提供する代表格である。スマホに搭載されたアプリが世界中で使われるたびに、大量データが生成される。蓄積される情報量に応じて、AIが学習し、検索機能が向上する。情報の解析や学習による新たな情報創出ビジネスが、データマネージメントモデルである。スマホアプリは、まさにこのモデルである。

デジタルオープンプラットフォームとデータマネージメントは、どちらが欠けても巨大なビジネスは成立しない。データを生み出すハードウェアが川上なら、データマネージメントは川下である。川を流れる水の量が、データ量である。川上から川下までの全てを握ることで、巨大ビジネスを創出できる。キーは、デジタルオープンプラットフォームの汎用性の広さと、解決できる社会課題の多様性である。

この発想で開発してきたのが、AI ナノポアである。

AI ナノポアは、デジタルオープンプラットフォームとデータマネージメントを両立した開発プラットフォームである。わずかなハードウェアの変更と、アプリを変えるだけで、様々な検査法を開発することができる。AI ナノポアは理化学機器として販売されており、幾つかの検査法の開発が進められている。研究開発の道のりに合わせて、技術解説を進めていく。

ナノポアの開発

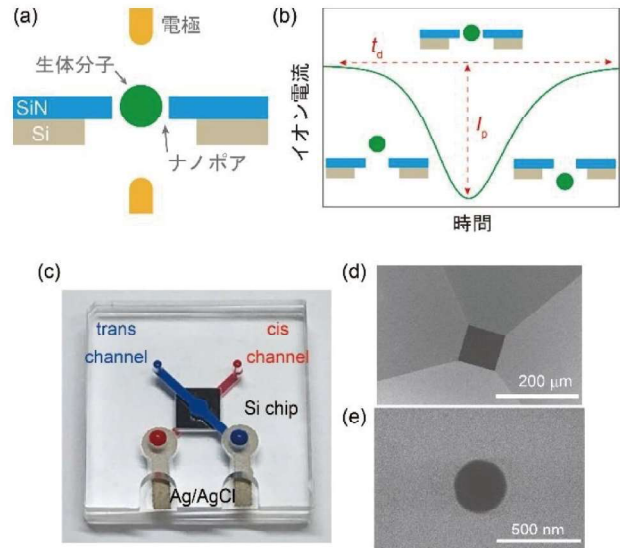


図1 ナノポアの構造と原理。(a) ナノポアの構造と(b) ナノポアの原理。 I_p と t_d は、それぞれ、最大電流値と電流持続時間。(c) ナノポアモジュールの光学写真。(d) ナノポアのSiN薄膜の走査電子顕微鏡(SEM)像。(e) ナノポアのSEM像。c-eは、文献1から許可を得て転載。

ナノポアは、シリコン基板上の厚み50nmの窒化シリコン膜に作製される直径数nmから数 μm の貫通孔である(図1)¹⁾。ナノポアは、電解質で満たされ、上下に1対の電極が設置される。電圧を加えると、



* Masateru TANIGUCHI

1972年7月生まれ
京都大学大学院 工学研究科 分子工学
専攻博士後期課程修了(2001年)
現在、大阪大学 産業科学研究所
教授 博士(工学)
専門/1分子科学
TEL : 06-6879-8445
FAX : 06-6875-2440
E-mail : taniguti@sanken.osaka-u.ac.jp

正電圧と負電圧の方向に、それぞれ、アニオンとカチオンが移動する。このイオンの動きが、電極間にイオン電流を生み出す。ナノポア内に物質が入ると、イオンの流れが減少し、イオン電流が減少する。大きな体積の物質は、大きなイオン電流の減少を示す。これが、ナノポアのデバイス原理である (図 1b)。

ナノポアは、当初、直径数 nm の貫通孔を持つタンパク質が用いられていた。現在、タンパク質ナノポアは、塩基配列を調べる DNA シークエンサーとして実用化されている²⁾。タンパク質の機械的・熱的な耐久性と安定性を向上させるため、半導体加工技術を用いたナノポアの開発が、世界中で始まった。収束イオンビームや透過電子顕微鏡を用いて、直径数 nm のナノポアの熾烈な開発競争となった。再現性と歩留まりの低いこれらの方法を用いて作製されるナノポアの量産化は、極めて困難である。2007年、電子線リソグラフィを主軸とする微細加工技術で、直径 50 nm 以上のナノポアの開発を開始した³⁾。

シリコン基板上の薄膜に貫通孔を作製するだけの簡単な構造であるが、デバイス作製から技術開発の壁に当たった。ナノポアは、厚み 50 nm の窒化シリコン中空薄膜上に作製される。要求される薄膜特性は、割れない機械的安定性と電気的絶縁性である。柔らかい薄膜はスパッタ法で作製されるアモルファスで実現できるが、絶縁性が低かった。高い絶縁性を持つ結晶膜にすると、固すぎて割れてしまった。程よいアモルファスを作製する方法の試行錯誤を約 1 年続け、低圧化学気相堆積法 (LPCVD) にたどり着いた。

次のハードルは、窒化シリコン中空薄膜に直径 50 nm 以上のナノポアを作製する方法であった。電子線リソグラフィで穴のパターンを描画する。その後、エッチングで窒化シリコンに貫通孔を作製する。リソグラフィとエッチングの両プロセスに耐える薄膜特性の最適化と微細加工プロセスの最適化を繰り返し、現在の量産プロセスを確立した。

作製したナノポアの評価は、電子顕微鏡による構造観察では不十分で、電気特性評価が欠かせない。ナノポアの開発を始めた当時、標準的に使われていたイオン電流計測装置があった。直径数 nm 用に開発されたこの装置は、直径 50 nm 以上のナノポアを流れる大きなイオン電流を計測できなかった。ナノポアの作製法の開発と並行して、電気計測装置を作

ることになった。数 nA 以下のイオン電流を、10 μ s 以上の早い速度で計測する技術開発である。この技術開発は、微小電流を増幅して電圧で出力するトランスインピーダンスアンプの開発となった。エレクトロニクスは、電圧モードで動作している。電圧増幅技術は多く開発されてきたが、電流増幅技術はマイナーである。しかも、微小電流計測技術の開発は、ノイズとの戦いになる。トランスインピーダンスアンプの開発だけで、数年を要した。日々、半田ごとと電気素子で試作を繰り返し、研究室の隅に試作品のスクラップが溜まっていった。アナログ回路職人の力で、ようやく計測装置が完成した。アンプの技術開発の詳細は、本誌の記事で紹介している⁴⁾。

ナノポアの作製プロセスとアンプの開発を同時並行で行った。どちらも開発段階であるため、何が悪いのかを突き止めるのは難しく、一進一退の日々であった。現在は、ナノポアと計測装置ともに、ナノポア計測システムとして製品化できた (図 2)⁵⁾。改良点は、まだまだある。世界中で行われた研究は、ナノポアの電気ノイズ特性を明らかにした。ナノポア計測システムの電気ノイズの最小化が、ナノポア材料、構造、プロセス、および電気計測装置に残された課題である⁶⁾。



図 2 製品化されたナノポア計測装置 (Nano-SCOUTER™)。文献 5 から許可を得て転載。

ナノポア内の物質輸送メカニズム

ナノポア計測システムの試作ができて、ナノ粒子の計測からはじめた。イオン電流をモニターすると、スパイク状のシグナルが多く観察された。ナノポア計測で得られたスパイク状のシグナルは、イオン電流-時間波形の最大電流値 (I_p) と電流持続時間 (t_d) で解析されている。 I_p と t_d は、それぞれ、ナノポアを通過する物質の体積と、ナノポアを通過する時間の目安となる。1 つのイオン電流-時間波形は、1 個のナノ粒子がナノポアを通過したシグナルである。当時は、誰もがそう信じて研究を進めていた。実際

の実験では、複雑な波形が得られることが多かった。

細菌と同じ大きさのマイクロ粒子を使って、イオン電流計測と顕微鏡観察の同時計測を行った⁷⁾。ガラス基板上にマイクロポアを作製して、マイクロポアを通過するマイクロ粒子の運動を調べた。多くのスパイク状のシグナルは、マイクロ粒子がマイクロポアを通過するときに得られた。マイクロポアに接近して、通過しないで、離れていく運動をする場合も、スパイク状のシグナルが得られた。この運動は、電流持続時間が短いのが特徴だった。マイクロポアを通過しないシグナルを確認できたことは、科学的な重要な発見と同時に、デバイスとして大きな不安材料となった。ナノポアを流れるイオン電流と、ナノポアを通過する物質の流動ダイナミクス、およびデバイスの動作原理の詳細が不明であった。

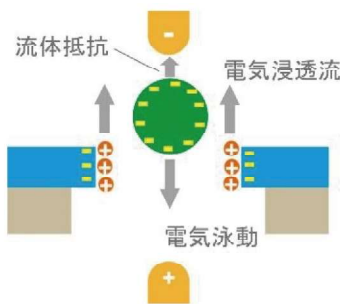


図3 ナノポアを通過する生体分子が受ける力。多くの生体分子と窒化シリコンの表面は負に帯電している。窒化シリコンと溶液の界面に集積するカチオンが、電界により、上向きの流れ（電気浸透流）を作る。

直径数 nm のナノポアは、水分子が数個しか横並びできない大きさである。イオン電流や物質の流動ダイナミクスは、さらさら流れる流体のイメージではないと直感的に感じる。ピコ秒のシミュレーションをする分子動力学では実験を説明できない。まず、流体力学をベースにナノポアを流れるイオン電流のシミュレーションから研究を始めた。直ぐに、流体力学だけでは実験結果を説明できないことが分かった。一番の原因は、ナノポアの表面電荷だった。表面電荷は、ナノポア表面に形成される電気二重層とデバイス長に強く影響する（図3）。さらに、表面電荷は、ナノポアを満たす電解質と、電極間の電圧が形成する電界にも影響する。流体力学はナビエ・ストークス方程式、電気二重層はポアソン・ボルツマン方程式、電解質中のイオン流はネルンスト・プランク方程式で記述される。この3つの方程式は、

電界やイオン流を含むため、互いに独立ではなく、相互作用する。3つの方程式を連成して解く必要があった。ここまで行き着いたものの、複雑すぎる方程式のシミュレーションであるため、一度はあきらめた。特に、ナビエ・ストークス方程式は、偏微分方程式で、特殊条件以外では解析解が得られないことが知られている難物である。車や飛行機の空気の流れをシミュレーションする方程式である。

2010年から始まったプロジェクトで、流体力学を専門とする留学生在が、ポスドクとして来た。無理は承知で、シミュレーション法の開発を始めた。最初は、紙と鉛筆で、モデルを作った。その後は、スーパーコンピューターを使って、モデルの検証とシミュレーション方法を探していった。丁度、その頃、COMSOLというマルチフィジックスシミュレーションソフトが使いやすくなった。早速、これを使って、計算条件を最適化すると、実験結果を説明できそうなシミュレーション結果が得られた^{8,9)}。この時、開発したシミュレーション法は、研究室で標準的に使われる手法となった。実験とシミュレーションの融合により、イオン電流一時間波形は、ナノポアを通過する物質の体積、構造、表面電荷の情報を持つことが分かった。重要な発見は、 I_p や t_d のようなスカラー量ではなく、波形自体が、これら3つの情報を持つことである。これらの情報を用いると、同じ大きさの物質でも、構造や表面電荷の違いから、高精度で識別できる可能性がある。ここに大きな原理的な壁があった。複雑に絡み合う3つの方程式から、体積、構造、表面電荷を与える解析解を導き出すことはできない。イオン電流一時間波形から、3つのパラメータを含む情報を引き出す方法が、次の課題となった。

AIの導入

探していたのは、波形そのものを使って、物質を識別する指標を作る方法であった。ナノポアと並行して、ナノギャップの研究を進めてきた¹⁰⁾。ナノギャップは、量子力学的な電流で、数 nm 以下の1分子を識別する第5世代シークエンサーのコアデバイスである。丁度、その頃、塩基配列を決める次世代DNAシークエンサーでは、機械学習が使われ始めていた。第5世代シークエンサーにも機械学習を導入し始めようとしていた¹¹⁾。機械学習は、ま

さに、波形そのものを使う方法であった。

予測通り、研究室の全員は、機械学習の導入に反対だった。計測結果を見て、考えるのが研究者であり、機械学習の利用は、思考の放棄と映った。研究所の機械学習の大家の力を借りて、徐々に結果を出していった。

機械学習では、波形の対称性や尖り具合などに加え、波形を時間方向と電流方向に8等分や16等分にしたベクトルを特徴量に用いた。機械学習する人が作る特徴量が、学習結果を大きく左右する。深層学習は、この恣意性を排除することができる。経験的には、機械学習が1000個のイオン電流-時間波形を必要とすると、深層学習は数万の波形が必要である。今では、数100の特徴量を自動生成するオープンプラットフォームの tsfresh¹²⁾ が、用いられることが多い。計測データの特徴量を決めると、計測データを多数の分類器に入力して機械学習を行う。ナノポア計測データで、高い精度を出したのは、RandomForest や XGBoost などの分類器であった。機械学習に用いる分類器は、オープンプラットフォームの scikit-learn に多く実装されている¹³⁾。tsflash と scikit-learn を組み合わせると、大体の機械学習が可能となっている。実際の機械学習では、100個の特徴量と30個の分類器を使うと、総組合せの3000通りの結果が得られる。論文に出てくる精度は、その中で最高値である。

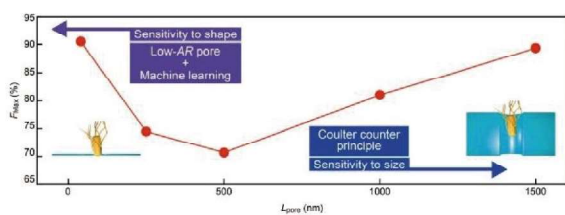


図4 大腸菌と枯草菌の識別精度のナノポアの厚み依存性。縦軸は、 F -measureを示す。文献14より許可を得て転載。

直径 $3\mu\text{m}$ のマイクロポアを用いて、数 μm の大きさの培養した枯草菌と大腸菌の識別からはじめた¹⁴⁾。 I_p や t_d のヒストグラムは、ほぼ完全に重なっていた。機械学習を行うと、1つのイオン電流-時間波形で、 F -measure = 0.90で、2つの細菌を識別できた。 F -measureは、機械学習における精度指標として使われる。 F -measureが1/2より大きいとき、2種類の細菌は識別される。機械学習を用いた最初の実験

だったので、ナノポアの厚みを変えて F -measureの変化を調べた(図4)。 F -measureは、50nmと500nmの厚みで、それぞれ、最高値と最小値を示した。この結果は、識別精度がナノポアデバイスの寸法に依存することを示していた。この後、直径300nmのナノポアを用いて、100nm程度の直径の培養インフルエンザウイルスのA型とB型の高精度識別にも成功した¹⁵⁾。ナノポアとAIを融合させたAIナノポアは、細菌もウイルスも高精度に識別できることを示せた。この一連の実験で明らかになったのは、AIの迷惑なまでの優秀さであった。同じ細菌をロットの異なる装置とナノポアで計測すると、精度は低い、AIは装置とナノポアの違いを識別した。同じ細菌を、同じ装置とナノポアで、異なる人が計測しても、低い精度ながら、AIは計測者の違いを識別した。大学で開発する装置やナノポアデバイスは手作りである。デバイスの歩留まりは高くても、高い精度のデバイスを大量に作ることは困難である。AIを使う計測は、品質管理された装置とデバイスを使って、大量にデータを生成する必要がある。これが、なかなか大学の実験研究とAIが結びつかない原因と実感している。

新型コロナウイルス検査装置

品質管理の重要性を念頭に、2018年10月にAIナノポアを実用化するため、ベンチャー企業のアイポアを創業した。大学で試作まで仕上げたナノポアデバイス、計測装置、AIを、まずは理化学機器として製品化することを目指した。はじめのうちは、計測装置とナノポアデバイスの品質管理を重点的に進めた。ようやく製品化の目途が見えてきた2021年の1月、新型コロナウイルスが、世界でまん延し始めた。元々、細菌やウイルスにターゲットを絞って研究開発してきたので、直ぐに新型コロナウイルス検査装置の開発に取りかかった。阪大医学系研究科や阪大微生物研究所とともに、培養されたSARS-CoVやMERS-CoVに加え、SARS-CoV-2を高精度に識別することに成功した¹⁾。また、培養されたSARS-CoV-2とインフルエンザA型の識別精度は、1つの波形で90%であった。計測データを変えるだけで、望む検査法を作る原理実証ができた。

ナノポア計測から見ると、唾液の臨床検体は、培養ウイルスとは全く異なる。0.45 μm のフィルター

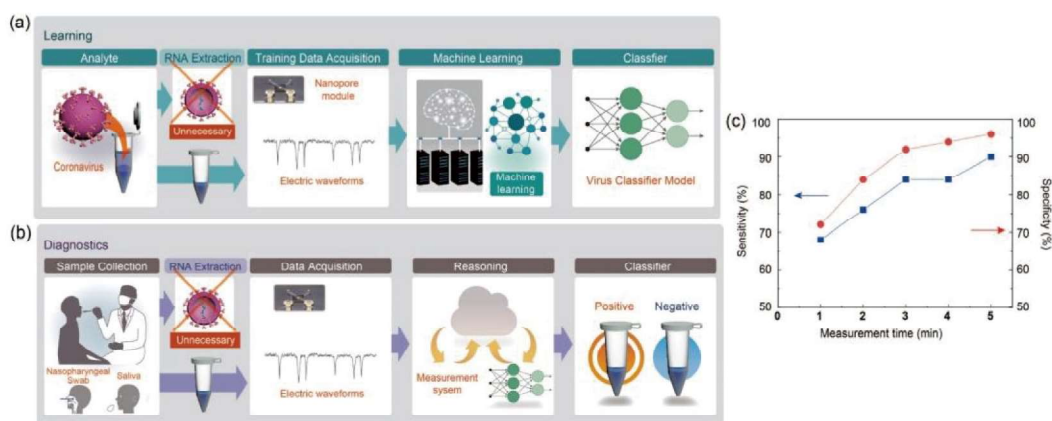


図5 AI ナノポアを用いた新型コロナウイルス検査法。時間のかかるRNAの抽出・増幅を必要としない。a)とb)は、それぞれ、トレーニング過程とテスト過程。c)感度と特異度の計測時間依存性。文献1から許可を得て転載。

で処理したPCR陰性検体をナノポアで計測すると、イオン電流—波形が得られた。この波形の正体は、エクソソームであった。また、PCR陽性検体にも、エクソソームが含まれていた。臨床検体は、ウイルスと夾雑物との混合物である。ナノポアは、ウイルスを1個単位で検出する能力を持つ。この能力は、少量の夾雑物を検出する。全ての夾雑物を物理的に除去することは極めて困難であるため、機械学習でPCR陽性検体のイオン電流—時間波形から、ウイルスの波形を抽出することにした。PCR陰性検体から得られるイオン電流—時間波形を夾雑物(正例:Positive)として学習する。PCR陽性検体から得られる波形(未知の波形:Unlabeled)は、ウイルス(負例)か夾雑物かのどちらかである。PCR陽性検体と陰性検体の波形を機械学習することで、ウイルスの波形を抽出し、ウイルスと夾雑物に分類するPUC(Positive Unlabeled Classifier)法を開発した^{11,16)}。PUC法を用いることで、PCR陽性・陰性検体を、5分間の測定で、感度90%、特異度96%で識別できることに成功した(図5)。この検査法は、ウイルス自体を計測するため、時間のかかるRNA抽出は不要である。はじめての臨床検体であったので、約7000検体の計測を行った。この研究で得た実験手順は、現在の臨床検体計測に活かされており、100検体程度の計測で新たな検査法開発が可能になりつつある。

おわりに

ナノポアとAIを融合したAIナノポアは、検出

ターゲットに応じて、ナノポアの直径を変更し、波形データを変えるだけで、目的とする検査装置を作れるデジタルオープンプラットフォームである。データ量が、検査できる細菌やウイルスの種類を決める。また、AIナノポアデータに、検査の時間や位置、臨床所見を紐づけることで、新たなデータマネジメントビジネスを開拓できる。

AIナノポアは、計測装置が集積回路化された1チップ上にナノポアを集積させた時、本領を発揮する。ナノポアは、1つの細菌やウイルスを検出する。高い検査精度を得るには、多くの波形データが必要となる。現在でも、計測時間を長くすると高い検査精度を得ることができる。ナノポアを集積すると、短時間で波形データの大量取得が可能となる。1つのナノポアで5分間の計測時間は、100個のナノポアを使うと、3秒で終わる計算になる。ナノポアの集積化は、1チップで多種の細菌やウイルスの同時検査も可能にする。

スマートフォンに接続できる集積型AIナノポアは、半導体技術により、低コスト生産が可能である。世界のインフラであるスマートフォンを経由して、世界の、いつ、どこで、どんな感染症が発生しているかを知ることが可能になる。科学データに基づく予防対策や局所的なロックダウンは、経済損失を最小限に留める。学術的には、感染症の拡散メカニズムや発生源を調べることができる。現在、AIナノポアの医療機器承認に向けて全力で研究開発を進めている。

文献

- 1) M. Taniguchi, et al., *Nat. Commun.*, **12**, 3726 (2021).
- 2) <https://nanoporetech.com/>
- 3) M. Taniguchi, M. Tsutsui, K. Yokota, T. Kawai, *Appl. Phys. Lett.*, **95**, 123701-123703 (2009).
- 4) 谷口正輝, 生産と技術, 70, 14-28 (2018).
- 5) 谷口正輝, 応用物理, 91, 498-502 (2022).
- 6) M. Taniguchi, *Appl. Phys. Express*, **15**, 070101 (2022).
- 7) S. Tanaka, M. Tsutsui, H. Theodore, Y. He, A. Arima, T. Tsuji, K. Doi, S. Kawano, M. Taniguchi, T. Kawai, *Sci. Rep.*, **6**, 31670 (2016).
- 8) Y. He, M. Tsutsui, C. Fan, M. Taniguchi, T. Kawai, *ACS Nano*, **5**, 5509-5518 (2011).
- 9) Y. He, M. Tsutsui, C. Fan, M. Taniguchi, T. Kawai, *ACS Nano*, **5**, 8391-8397 (2011).
- 10) M. Di Ventra, M. Taniguchi, *Nat. Nanotech.*, **11**, 117-126 (2016).
- 11) M. Taniguchi, T. Ohshiro, Y. Komoto, T. Takaai, T. Yoshida, T. Washio, *J. Phys. Chem. C*, **123**, 15867-15873 (2019).
- 12) <https://tsfresh.readthedocs.io/en/latest/>
- 13) <https://scikit-learn.org/stable/>
- 14) M. Tsutsui, et al., *Sci. Rep.*, **7**, 17371 (2017).
- 15) A. Arima, et al., *Sci. Rep.*, **8**, 16305 (2018).
- 16) T. Yoshida, T. Washio, T. Ohshiro, M. Taniguchi, *Intelligent Data Analysis* **25**, 57-79 (2021).

