

称号及び氏名 博士（工学） 船野 俊一

学位授与の日付 2015年3月31日

論文名 「化学修飾角型キャピラリーを用いるマイクロ分析チップ
の作製と流体制御・イムノアッセイへの応用」

論文審査委員 主査 久本 秀明
副査 河野 健司
副査 松岡 雅也

論文要旨

近年、マイクロ流体デバイスが注目され、その研究・開発が進められている。これは、マイクロチップとも呼ばれ、数センチメートル角のガラスやプラスチック製の基板の上に形成された数十から数百マイクロメートル幅・深さのマイクロ流路に、前処理、分離、検出など様々な機能を付与することで、これまで大型装置や煩雑な多段階処理が必要であった各種化学システムの小型化・高性能化を指向したものである。

これまで種々の機能を集積化したマイクロ分析チップが開発されてきているが、今後さらなる高性能チップを具体的に実現していくためには、分子認識、分離、信号変換、流体制御等の機能を有する機能性分子・材料を、流路内の特定位置に化学修飾し、複数配置・固定化することが重要となる。この方法としてこれまでにフォトリソグラフィーやマイクロ多層流パターニング等の手法が提案されてきた。これらの方法は単機能の集積には極めて有力な手法である一方、多くの異なる機能を1枚の流体デバイス中に複数配置するには、固定化操作中の試薬のコンタミネーションや劣化、段階的操作による長い作製時間等が問題となり、理論的に可能ではあっても技術的に困難な側面があった。したがって、1枚のマイクロ分析チップ中に複数の機能性分子・材料を化学修飾し、高性能マイクロ分析チップを構築するためには新たな作製法の開発が必要であった。

一方、免疫測定法は、主にタンパク質などの生体物質を対象とした分析法の1つであり、生命科学系の研究分野や医療分野において広く利用されている。この方法は通常、マイクロプレートと呼ばれる容量数百マイクロリットルの大容量ウェル内で反応を行う手法であり、かつ、多段階操作が必要であるために、必要試料・試薬量が多く、煩雑かつ分析時間が長いことが問題であ

った。

そこで本研究では、多くの機能を自由自在に集積できるマイクロ分析チップ作製法の開発として、あらかじめ種々の化学修飾が施された角型キャピラリーをポリマー流路基板に埋め込んで作製するキャピラリーアセンブルド・マイクロチップ (CAs-CHIP) の開発、また、その重要なパーツとなる流体制御機能、免疫反応機能、1 ステップタンパク検出機能を有するキャピラリーの開発を実施し、流体制御、タンパク検出、実試料測定など、その性能評価を目的とした。

本論文は、全 6 章で構成されている。

第 1 章は緒言であり、本論文の主軸であるマイクロ分析チップおよび酵素免疫測定に関連付けながら、本研究の背景、目的および概要について述べた。

第 2 章では、CAs-CHIP の作製方法について述べた。従来のマイクロ分析チップでは、1 枚のチップに複数の機能性分子・材料を化学修飾して集積することが技術的に困難であった。その理由は、それらの分子・材料を流路内に化学修飾固定する際、実験手順的に機能性分子・材料含有溶液を一度流路全体に満たす必要があるため、たとえ流路内の一部に目的機能性分子・材料を固定できても、2 種類目以降の機能性分子・材料溶液が固定済みの機能性分子・材料表面に接触せざるを得ないため、固定済み分子・材料表面のコンタミネーションや劣化が避けられないためである。そこで、1 枚のチップに複数の機能性分子・材料を集積するための新しいチップとして、CAs-CHIP を開発した。これは、細いガラス管である角型キャピラリーの内壁に様々な化学修飾を施すことであらかじめ機能を付与しておき、この機能性キャピラリーをシリコンゴム製の流路ネットワークに組み込むことで作製する。したがって、異なる機能が付与された複数の機能性キャピラリーを任意の位置へ配置することで、1 枚のチップ内に複数の機能性分子・材料を容易に集積可能となる。実際に、上記の作製方法によってセンサー機能キャピラリーを流路に配置し、試料溶液を導入したところ、流路外への溶液の漏れは観察されず、設置したキャピラリーがセンサーとして機能することが確認された。以上から、任意の流路形状と複数の機能性流路を有するマイクロ分析チップを簡便な手順で作製できることを明らかにした。

第 3 章では、CAs-CHIP の応用として、流体制御型免疫測定用チップを設計・製作し、その流体制御機能および免疫測定の基礎的評価を行った結果について述べた。免疫測定のマイクロチップ化は、反応場の小型化による試料量低減や分析時間短縮などが見込まれるため、将来の医療分野における患者の経済的・身体的負担低減が期待できる。その実現のためには通常の免疫測定と同様に、固定した抗体と試料・試薬を一定時間反応させるためにマイクロ流路内液体の送液・停止制御が必要と考えた。しかしながら、マイクロ流路内では毛細管現象等マイクロ空間に特有な現象が優位に現れるため、一般的に溶液流れを完全に停止させることは困難であり、溶液流れ制御のためにはバルブ機能が必要である。そこで、キャピラリー内壁に温度に応じて膨潤・収縮する高分子を化学修飾固定し、バルブキャピラリーを作製した。このバルブキャピラリーの性能を評価したところ、耐圧は 1.2 MPa、応答時間は加熱・冷却温度がそれぞれ 120°C ・ 3.4°C の場合、閉→開で 1.4 秒、開→閉で 3.2 秒と迅速な制御が可能であった。また、耐久性を評価したところ、70 回の開閉動作後に機能劣化は認められなかった。以上から、温度応答性高分子を化学修飾固定したキャピラリーの開発によって温度操作による迅速かつ高耐久性の溶液流れ制御が可能となった。

次に CAs-CHIP の特長を生かし、先に開発したバルブ機能を利用した並列型免疫測定チップの開発に取り組んだ。まず、3 本のキャピラリー内壁にそれぞれ異なる抗体を固定し、これを流路ネットワークに並列配置した。また、免疫測定に必要な送液・停止制御を行うため、抗体固定キャピラリーの上流部分にバルブキャピラリーを配置した。作製したマイクロ分析チップへ 3 種抗原の混合溶液・酵素標識抗体混合溶液を順次導入後、最後に抗原濃度検出のための基質を導入してこのチップの性能を評価したところ、それぞれの抗体固定キャピラリーにおいて測定対象となる抗原濃度に応じた信号が観察され、検出下限は約 0.1 ng/mL であった。その際、抗原・酵素標識抗体との反応最適時間は、ともに約 12 分、酵素反応測定時間は約 30 秒であった。その結果、従来と同程度の感度が得られるのみならず、測定時間は従来の 4 時間から 30 分以下にまで大幅に

短縮された。以上の結果から、複数機能の容易な集積化が可能という特長を生かすことで、簡便かつ迅速な並列型免疫測定チップの作製が可能であることを明らかにした。

第4章では、キャピラリーを用いた免疫測定チップが患者由来試料中バイオマーカー分析に適用できるかどうかを明らかにするため、抗体固定化キャピラリーを用いてその高感度化および脳梗塞患者由来血漿中バイオマーカーの実測を行った結果について述べた。トロンビン切断型オステオポンチン (trOPN) は脳梗塞のバイオマーカー候補であるが、発病した場合を除いて一般的に血中濃度が非常に低く、マイクロプレートを用いた一般的な手法では発病前の検出・定量が困難であるため、その高感度化が求められていた。そこで、一般的な手法より使用試薬量を低減させつつキャピラリー内壁に化学修飾固定する抗体の密度を高めることで、より多量の trOPN を捕捉することによる高感度化を着想した。実際にこのキャピラリーを作製して測定したところ、導入する固定抗体溶液の濃度を $0.85 \mu\text{g/mL}$ から $8.5 \mu\text{g/mL}$ に高めることで、検出下限は 50 pM 程度から 2 pM 程度に改善された。また、一般的な手法では測定に 8 時間を要していたが、本手法によって 3 時間程度にまで短縮された。以上の結果から、キャピラリーを用いた免疫測定チップがバイオマーカー検出のツールとして有用であること、患者血漿を使用した実験により臨床への応用も可能であることが明らかとなった。

第5章では、免疫測定チップの革新的な簡便化を実現するため、1ステップ免疫測定キャピラリーを開発し、基礎的性能評価およびバイオマーカー検出への適用を検討した結果について述べた。一般的な手法や前述のキャピラリーを用いた免疫測定では、各反応段階での反応時間は短縮できるものの、複数の溶液導入や洗浄など煩雑な操作を避けられず、これが測定操作の長時間化や、手動で実験を行う際の大きな誤差要因となっていた。その改善のため、毛細管力による試料導入操作だけの簡便な1ステップ免疫測定キャピラリーの開発に取り組んだ。これを実現するために、キャピラリー内壁から内側に向かって順に、基質固定膜、ハイドロゲル膜、酵素標識抗体固定膜をそれぞれ固定し、ハイドロゲル膜の分子ふるい効果および抗原と酵素標識抗体の複合体形成比率によって、基質固定膜に到達する酵素標識抗体量が変化する機構を着想した。作製したキャピラリーを用いて3種類のバイオマーカーを測定したところ、それぞれのバイオマーカーにおいて抗原濃度に応じた信号強度が得られ、診断基準値内外の判別も可能であった。以上の結果から、本キャピラリーを用いることで、操作が毛細管力による試料導入だけと簡便であり、再現性が良く迅速な免疫測定が実現可能であることを明らかにした。

第6章では、本研究で得られた結果や知見について総括した。

以上の結果から、これまでに作製してきた CAs-CHIP や1ステップ免疫測定キャピラリーは、現場で求められる生体試料の並列測定や微量測定に有効であることが明らかになった。今後、作製したキャピラリーやチップの応用や実用化によって、生命科学研究や医療診断へ大きく寄与することが期待される。

審査結果の要旨

本論文は、これまで困難であった多種類の化学的機能を集積したマイクロ分析チップの開発およびそのチップに集積可能なパーツとして流体制御機能・免疫分析機能等を有する化学修飾角型キャピラリーの開発を行い、流体制御、タンパク検出、実試料測定等の性能評価を目的とした研究であり、以下の成果を得ている。

(1) 細いガラス管である角型キャピラリーの内壁に様々な化学修飾を施すことであらかじめ機能を付与しておき、この機能性キャピラリーをシリコンゴム製の流路ネットワークに組み込むことで作製するマイクロ分析チップ作製法のコンセプトを提案した。ここでは実際に、多様なマイクロ分析チップを簡便な手順で作製できることを明らかにした。

(2) 温度応答性高分子、酵素、抗体をそれぞれキャピラリー内壁に共有結合固定し、熱による膨潤・収縮に基づく流体制御機能、酵素反応機能、免疫分析機能を有する角型キャピラリーを作製した。これらの性能評価を行い、外部からの温度制御による流体の迅速な ON-OFF 制御および、酵素基質検出、タンパク濃度検出が可能となることを実験的に明らかにした。

(3) 脳梗塞のバイオマーカー候補とされるトロンビン切断型オステオポンチン (trOPN) を例に、その高感度化および脳梗塞患者由来血漿中 trOPN の実測を試み、従来法では困難であった低濃度 trOPN の検出および実試料測定が可能となることを明らかにした。以上の結果から、キャピラリーを用いた免疫測定デバイスがバイオマーカー検出のツールとして有用であること、患者血漿を使用した実験により臨床への応用も可能であることを明らかにした。

(4) これまで煩雑な多段階操作を余儀なくされていた免疫測定を、毛細管現象で吸い上げるだけの簡便な 1 ステップとする分析デバイスを開発し、基礎的性能評価およびバイオマーカー検出への適用を検討した。前述のキャピラリー酵素免疫測定では、各反応段階での反応時間は短縮できるものの、多段階の煩雑な操作を避けられなかったが、本研究により、操作が著しく簡便化され、再現性良く迅速な免疫測定が実現可能であることを明らかにした。

以上の研究成果は創薬・診断・生命科学研究分野に極めて有益な知見を与えるものであり、本分野の学術的発展に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。

学位論文審査委員会は、本論文の審査および最終試験の結果から、博士（工学）の学位を授与することを適当と認める。