

審査の結果の要旨

氏名 太田 諒一

近年、医学やバイオでは、単一細胞や単一分子レベルの極限分析が必要になっている。特に、タンパクは、DNA や RNA などの核酸と異なり、増幅困難であり、分析困難であった。一般的に分析プロセスは、1. サンプリング、2. 化学プロセス、3. 検出の大きく 3 つの要素からなり、これらを単一・可算個（以下、単一分子）分子レベルで実現することが不可欠である。これまで検出においては、レーザー蛍光法などさまざまな単一分子検出法が実現されてきたが、単一分子のサンプリングと化学プロセスは実現していなかった。一方、数 cm 角の基板に構築したマイクロ（10-100 μm ）・拡張ナノ流路（10-100nm）の微小空間に分析プロセス全体を集積化するマイクロフルイディクスが発展してきている。これまで、当研究室では、タンパクを選択的かつ高感度に分析できる ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）を拡張ナノ空間に集積化してきた。壁面に修飾した抗体により抗原を 100% 捕捉できる拡張ナノ空間の特徴を利用して、単一分子感度を実現した。しかし、分析化学に重要な再現性や定量性は未検証であり、分析化学として未確立であった。これは、従来モルを対象としていた ELISA に対して、単一分子 ELISA ではわずか単一・可算個レベルの非特異吸着や夾雑物（以下、アーチファクト）、さらには脱離による検出効率変化も分析性能に大きく影響することが考えられ、未知な領域であるからである。そこで、本博士論文では、アーチファクトや検出効率を明らかにして、改善することで、分析化学として単一分子 ELISA 法を確立することを目的とした。

第 1 章では前述のように、研究の背景と目的と述べた。

第 2 章では、単一分子分析を実現するためのアーチファクトの原因解明と低減を目的とした。最初に、通常アーチファクトとなる酵素標識抗体の非特異吸着（以下、非特異アーチファクト）だけでは説明できないアーチファクトが単一分子レベルでは生じることを見出した。そして、この原因について、ELISA デバイス加工プロセスから ELISA 測定まで全体を考慮して候補を挙げ、絞り込む実験を提案した。その結果、デバイス加工に用いる Cr が六価になり流路表面に残留することで、酵素（HRP）と同様の酸化活性を発現してアーチファクト（Cr アーチファクト）の原因となることを明らかにした。また、この残留量は 10nm ナノ粒子でわずか 1 個に相当する量であり、通常影響しない極微量残留 Cr が単一分子 ELISA になると大きく影響することを明らかにした。そして、Cr を用いない Cr フリーの加工プロセスを提案して、アーチファクトを測定したところ、Cr アーチファクトをゼロに低減できることを確認した。また、酵素

標識抗体濃度に対して非特異アーチファクトが比例して増加することを明らかにして、酵素標識抗体を 0.3nM 以下で非特異アーチファクトをゼロにできることも見出した。以上から、単一分子 ELISA におけるアーチファクトの原因を説明してゼロに低減した。

第 3 章では、検出効率を検証した。単一分子 ELISA では単一分子レベルでロス（未反応や脱離）が生じて検出効率に大きく影響する。そこで、最初に検出効率に影響する要因を、1. 捕捉抗体との反応効率、2. 酵素標識抗体との反応効率、3. 酵素標識抗体や抗原の脱離率、の 3 つに整理した。そして、すでに 100% 反応効率が実証されている項目 1 以外について調べた。最初に、項目 2 について、酵素標識抗体濃度を変えて、CRP（目的タンパク）の検量線から感度を求めたところ、 6nM 以上で感度が最大、すなわち検出効率が最大となることがわかった。また、項目 3 について、酵素標識抗体反応後の洗浄中に発生する脱離（目的分子や酵素標識抗体）について、洗浄時間を変えて測定した。その結果、洗浄時間に対して検出効率が指数的に減少する結果を得た。そして、ほぼ 100 検出効率を実現するための洗浄時間が 33 秒であることがわかった。

第 4 章では、第 2 章と第 3 章の知見と技術を統合した ELISA 分析デバイスを開発した。最初に、第 3 章で現象を明らかにしたが制御技術として確立していない洗浄時間の短縮化（ <33 秒）を目指した。単一分子 ELISA では 6 種類以上の試薬を用い、マイクロ流路を通じて拡張ナノ流路に順次導入する。そして、通常マイクロ流路を共通であるため、試薬置換にはマイクロ流路の試薬置換が不可欠となる。しかし、マイクロ流路の確実な置換にはこれまで 300 秒の置換時間が必要であり、第 3 章の結果からは 25% 以上の検出効率の低下につながっていた。そこで、試薬数に応じてマイクロ流路を準備して、予めマイクロ流路に試薬を導入しておく流路構造により置換時間を短縮化するデバイスを開発し、設計・製作した。実際に、マイクロ流路の試薬置換を 1 秒以下に抑え、拡張ナノ流路への試薬導入時間 31 秒と合わせ、合計 32 秒に短縮することができた。この統合デバイスを用いて CRP の検量線を作製したところ、検出限界 ($S/N=2$) 2.7 分子を実現して、単一分子レベルの分析性能を実現した。以上から、単一分子 ELISA を分析化学として確立した。

第 5 章では、本研究を総括した。

以上、単一分子レベルの極限分析法を実現して、バイオや医学に極限分析ツールを提供する本研究は、与えるインパクトが大きく、博士に相応しい研究である。また、バイオエンジニアリング専攻を構成するバイオデバイス分野の中心的な研究であり、専攻との関連も深い。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。