

博士論文（要約）

拡張ナノ流体デバイスを用いた単一分子 ELISA

Single- or Countable-molecule ELISA
Utilizing Extended-nano Fluidic Device

太田 諒一

<目次>

第一章 緒言	4
1.1. 本研究の背景	5
1.1.1. 単一細胞分析における単一・可算個分子分析への要求	5
1.1.2. マイクロ・拡張ナノ流体デバイス工学	11
1.1.3. 単一・可算個分子分析に向けた課題	20
1.2. 本研究の目的	22
第二章 単一分子レベルのアーチファクトの原因解明と除去	23
2.1. 緒言	24
2.1.1. 本章の背景	24
2.1.2. 本章の目的	25
2.2. 拡張ナノ流体デバイスを用いた ELISA の原理	26
2.3. アーチファクトの発生要因の推定	29
2.4. 酵素標識抗体以外の要因の検証	32
2.4.1. 原因化学種の推定	32
2.4.2. APTES, F, PEG の検証実験	33
2.4.3. Cr の検証実験	42
2.4.4. Cr フリー加工プロセスの開発	45
2.4.5. 考察	47
2.5. 酵素標識抗体の非特異吸着の検討	51
2.6. まとめ	59
第三章 単一分子領域における検出効率の検討	60
3.1. 緒言	61
3.1.1. 本章の背景	61
3.1.2. 本章の目的	64
第四章 単一・可算個分子定量法の確立	65
4.1. 緒言	66
4.2. 単一・可算個分子定量デバイスの設計・製作	67
4.3. 単一・可算個分子定量の実証	82
4.4. まとめ	85
第五章 結言	86
5.1. 本研究のまとめ	87

5.2. 今後の課題と将来展望.....	90
APPENDIX.....	93
A-1 ナノ加工.....	94
A-2 Crを用いたマイクロ加工.....	98
発表状況.....	100
参考文献.....	102
謝辞.....	110

第一章 緒言

1.1. 本研究の背景

1.1.1. 単一細胞分析における単一・可算個分子分析への要求

近年、バイオや医学では分析対象の超微量化・低濃度化が進んでいる。同時に、分析対象に含まれる目的分子の量は減少し、わずか単一・可算個分子となるケースも生じている。その一例が単一細胞分析である。

同一のゲノムを持ち、均一な環境で培養された細胞集団ですら、個々の細胞の性質が不均一性を示すことが最近の研究により明らかになってきている[1]–[4]。例えば、細菌のクローン集団に薬剤などのストレスを与えると、大部分の細胞が死滅する一方で、少数の細胞が長期間生き残ることがある[5]。生存した細胞は *persister* と呼ばれ、多くの場合ゲノムの変異を伴わずに耐性を獲得している。耐性獲得のメカニズムは長らく未知であったが、近年の研究で徐々に明らかになってきている。Y. Wakamoto らは、細菌 *Mycobacterium smegmatis* が抗生物質イソニアジドに対して *persister* を形成するメカニズムを検証した。その結果、転写・翻訳の統計的な揺らぎによって酵素 *katG* の発現量が変動し、偶然 *katG* の発現量がゼロとなった細胞がイソニアジドに対する *persister* となることを明らかにしている[6]。 *persister* は細菌だけではなく、ヒト癌細胞に抗がん剤を与えた場合にも形成される[7]。 *persister* の形成はほんの一例であり、細胞間の不均一性はゲノム[8]、RNA[9]、タンパク質[10]、代謝産物[11]などのあらゆる階層で観察される(図 1-1)。また、細胞間の不均一性は一部の遺伝子にのみ起きるものではない。Y. Taniguchi らは、大腸菌 *E. Coli* の 1018 種の遺伝子の発現を解析し、全ての遺伝子の発現量が細胞間でばらつき、その変動係数が 30%以上であることを示している[12]。

従来、細胞の遺伝子発現や機能を解析する場合、クローンされた細胞集団がサンプルとして用いられていた。この方法で様々な知見が得られるが、数万もの細胞の平均値のみをデータとするため、重要な情報を見落とす可能性が指摘されている[13], [14]。例えば、 *persister* のように集団内の少数の細胞が異なる機能を持つ場合、少数の細胞

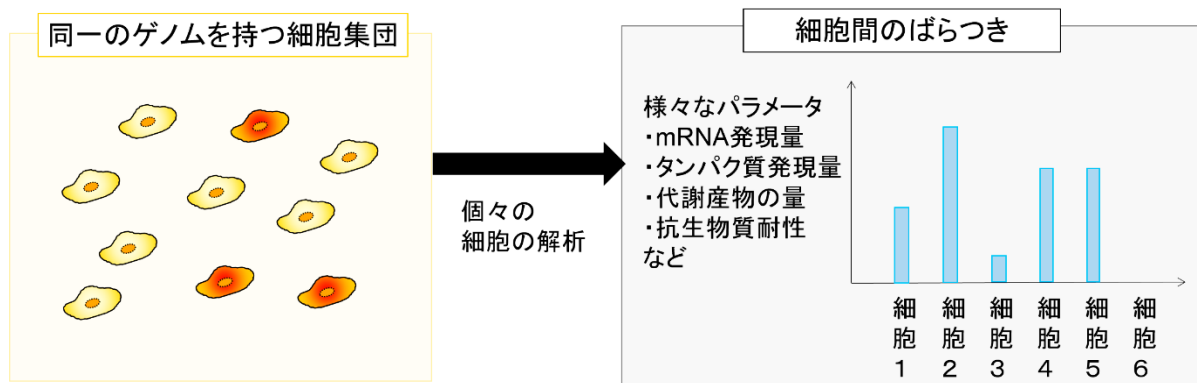


図 1-1 遺伝的に同一な細胞集団に発生する細胞間のばらつき

の信号は多数の細胞の信号にマスクされてしまう可能性がある。また、Toriello, L らは RNA 干渉によって Jurkat 細胞の GAPDH の遺伝子をノックダウンした結果、GAPDH の発現量が 50%程度に低下する細胞と、0%に低下する細胞の 2 グループに分かれることを示した[15]。細胞集団全体における GAPDH 発現量の平均値は 20%であり、どの細胞の発現量とも一致しない。このように、細胞集団を平均したデータが、個々の細胞の機能を反映しないケースがありえるため、個々の細胞を解析する単一細胞分析が注目を集めるようになった。

単一細胞分析では、多数の細胞を扱う実験と比べて、目的分子の量が桁違いに小さい。個々の細胞に含まれる DNA は多くの場合 2 分子である。典型的な真核細胞に含まれる RNA は 10 pg 程度であり[16]、このうち 1~5%を占める mRNA は 10^5 分子程度であると推定される[17]。mRNA は 10^4 種程度存在することから、少ないものは 10^0 - 10^1 分子であると推定される。実際に単一細胞内の RNA を定量分析した研究によれば、酵母菌の大部分の mRNA は 5 コピー未満であり、lncRNA は平均 0.5 コピー未満である[18]。また、大腸菌 *E.Coli* の mRNA は平均 0.4 コピーである[12]。細胞内におけるタンパク質の濃度は種類に応じて様々であり、pM から μ M のオーダーである[19]。ヒトの細胞体積は 0.5~2 pL 程度であるため、単一細胞中に含まれる濃度 10^0 pM のタンパク質の存在量は 10^0 pM \times 10^0 pL = 10^0 個、すなわち単一・可算個分子レベル

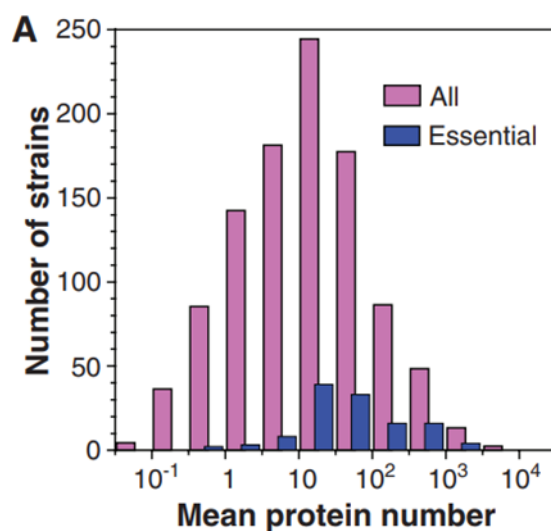


図 1-2 *E.Coli* 1 細胞あたりのタンパク質の発現量

From Y. Taniguchi, P. J. Choi, G.-W. Li, H. Chen, M. Babu, J. Hearn, A. Emili, and X. S. Xie, "Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells.," *Science*, vol. 329, no. 5991, pp. 533–538, 2010.. Reprinted with permission from AAAS."

である。単一細胞に含まれるタンパク質の分子数は、Y. Taniguchi らによって実験的に確かめられている[12]。図 1-2 のヒストグラムは、*E.Coli* の 1080 種のタンパク質に対する 1 細胞あたりの分子数を示している。横軸は 1 細胞あたりのタンパク質分子数、縦軸は該当するタンパク質の種類の数である。この図によれば、多くの遺伝子の発現量が 10^1 分子以下の可算個分子領域であり、中には平均 10^{-1} 分子と確率的に発現する遺伝子も見られる。ヒト細胞に関しては、Martin. B らがヒト骨肉腫細胞株のタンパク質発現量を網羅的に解析している[20]。ここでは 1 細胞あたりの各遺伝子の発現量 (copies per cell) がまとめられており、解析の対象となった 7309 種のタンパク質のうち 2681 種が 1000 分子未満、2108 種が 500 分子未満である。このように、個々の細胞に含まれる DNA・RNA・タンパク質は極めて微量であり、種類によっては単一・可算個分子レベルとなる。

微量な目的分子の定量は、単一細胞分析の大きな課題である。近年のいくつかの研

究では、特定の条件下において単一・可算個の目的分子の定量に成功している。1つ目の例は、目的分子が DNA の場合である。DNA は Polymerase Chain Reaction (PCR)法や Multiple Displacement Amplification(MDA)法などの手法を用いて増幅することができる。目的分子の増幅技術・断片化技術・分離技術を応用することで、単一細胞中の DNA はわずか 1, 2 分子であるにも関わらず、全ゲノム配列の解読が実現している [8],[21]。目的分子が RNA の場合、逆転写酵素によって相補的な配列の DNA(cDNA)を合成することで、DNA と同様に増幅できるようになる。この手法によって 2009 年に Tang らが単一細胞中の RNA 定量に成功し [22]、現在では商品化が進んでいる。この分析法における RNA のロス は 50~60%と推定されており [17]、単一細胞中の存在量が 5 分子未満の場合には検出に失敗するリスクがあることが課題ではあるが [23]、可算個分子領域の定量が実現している。2つ目の例は、目的分子が酵素の場合である。1 分子の酵素は触媒作用によって多数の基質を反応させることができる。L.Cai らはこれを応用し、単一細胞内の β -ガラクトシダーゼの発現量を定量することに成功している [24]。この実験では β -ガラクトシダーゼの発現量は、 β -ガラクトシダーゼが酵素反応により生成するフルオレセインの蛍光強度から測定される。各細胞における蛍光強度が離散的であることから、各細胞に含まれる β -ガラクトシダーゼは単一・可算個分子であり、単一・可算個分子の酵素の検出・定量が達成されたことが示唆された。3つ目の例は、目的分子が蛍光を発する場合である。遺伝子組み換え技術を用いれば、目的タンパク質分子が蛍光分子と融合して発現するような細胞を得ることができる。1962 年に O. Shimomura らは単独で蛍光を出すタンパク質 GFP を発見した [25]。1992 年に M. Chalfie らは *E.Coli* の標的遺伝子に GFP をコードする遺伝子を組み込み、標的遺伝子の発現の可視化に成功した [26]。この手法により、様々な細胞株の目的タンパク質を、生きたまま可視化することが可能となった。また、X. S. Xie らの研究グループは、標的遺伝子に蛍光タンパク質とともに膜貫通タンパク質を組み込むことで、目的タンパク質分子の拡散速度を下げ、輝点として可視化した [27]。1つ1つの輝点の蛍光強度が退色によって離散的に消失することから、それぞれの輝点は単一・可算個の目的分子に由来し、単一・可算個の目的分子の検出・定量が達成され

たことが示唆された。

このように、目的分子が増幅可能な場合、あるいは目的分子が蛍光を出す場合、単一細胞内の単一目的分子の検出・定量が実現してきている。しかし、これらの分析法はそれぞれの目的分子特有の機能を利用したものであるため、増幅できず蛍光も発しない一般の目的分子への応用は難しい。単一細胞に含まれる単一・可算個目的分子の分析が実現している範囲を表 1-1 に纏めた。一般的な細胞に対して、DNA・RNA・酵素の単一分子レベルの分析は実現しているが、酵素活性を持たない大部分のタンパク質や代謝産物に関しては単一分子レベルの分析は未実現である。蛍光タンパク質を導入した遺伝子組み換え生物であればタンパク質の単一分子分析が可能であるが、たとえばヒトから採取された細胞を扱う研究など、遺伝子組み換え生物の作成が困難なケースは多い。

表 1-1 単一細胞内の単一・可算個分子分析が実現している範囲

目的分子の種類	単一・可算個分子分析の実現状況
DNA	実現済み（増幅可能）
RNA	実現済み（増幅可能）
酵素	実現済み（増幅可能）
酵素以外のタンパク質	蛍光タンパク質を導入した 遺伝子組換え生物に対してのみ実現済み 一般的な細胞では未実現（増幅困難）
代謝産物	未実現（増幅困難）

これまでに述べたように、現状の単一細胞分析は、DNA、RNA、蛍光タンパク質、発現量の大きなタンパク質に限られている。発現量が小さく、単一細胞中に単一・可算個分子しか存在しないタンパク質の分析法を開発できれば、単一細胞分析の研究対象を大きく広げることができる。このとき分析法に要求される性能を図 1-3 に示す。分析における最初の操作は、サンプリングである。ここでは、単一細胞から体積 pL-fl のサンプルを採取することが求められる。次の操作は化学プロセッシングである。こ

ここでは、サンプルに化学反応・分離・濃縮・抽出などの操作を加え、夾雑物から目的分子を取り出し、検出可能な状態とする。生体内には多種多様な物質が存在し、ヒトのタンパク質のみを取り出しても数百万種あると言われている[28]。一方、目的分子は1種類であり、少ないものでは単一細胞中に1分子しか含まれない。従って、化学プロセッシングにおいては数百万種以上もの夾雑物の中からわずか1種類の目的分子を取り出す選択性が求められる。また、目的分子が単一分子であった場合、化学プロセッシングの過程は目的分子を1分子たりとも逃すことはできない。従って、高い収率が要求される。分析における最後の操作は、検出である。取り出された目的分子は何らかの検出器によって信号へと変換される。この時、単一・可算個の目的分子を検出可能な高い感度が要求される。これらの要求を全て満たすことで、はじめて単一細胞・単一分子分析が実現する。

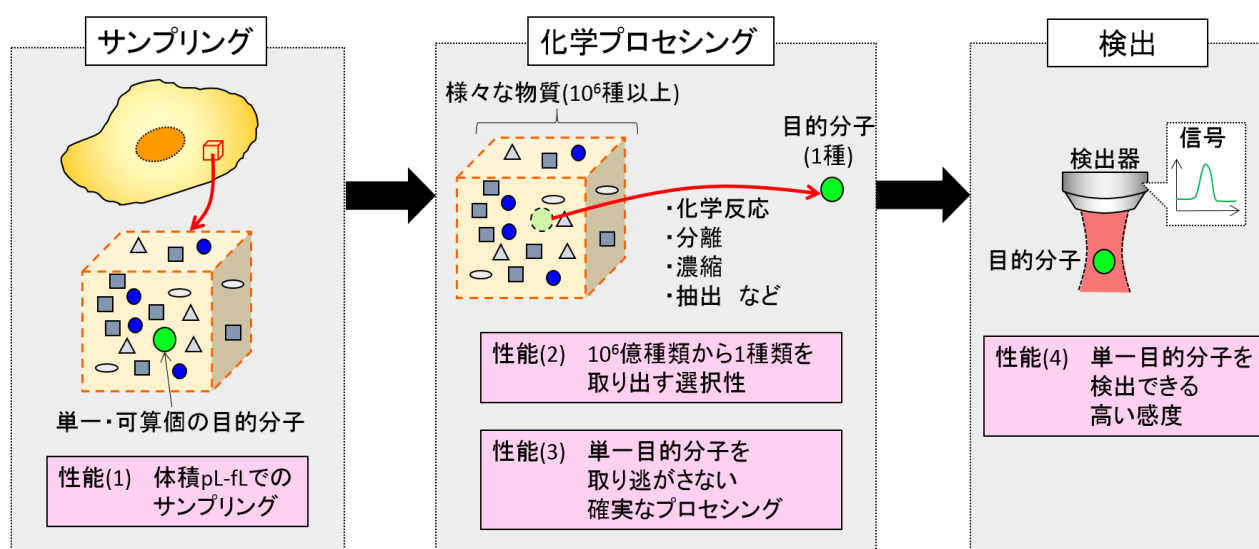


図 1-3 単一細胞中の単一・可算個タンパク質分子を分析するのに必要な性能

サンプリング・化学プロセッシング・検出のうち検出のプロセスに関しては、単一分子検出の報告が数多く存在する。これまでにレーザー誘起蛍光法[29]、表面散乱ラマン分光法[30]、ナノポア[31]、デジタル ELISA[32],[33]など、様々な手法で単一タンパク分子の検出が実現している。いっぽう、体積 pL-fL でのサンプリング技術や、単一・

可算個分子試料に対する化学プロセッシングに関しては、未だ研究途上である。このため、多量の目的分子の中から単一分子を検出することは可能であっても、単一・可算個の目的タンパク質分子を含む試料の分析は困難であった。

1.1.2. マイクロ・拡張ナノ流体デバイス工学

サンプリング・化学プロセッシング・検出のプロセスを縮小な空間へと集積化することで、分析の性能を飛躍的に向上することができる。このアプローチによって発展を遂げてきたのが、マイクロ流体デバイス工学や拡張ナノ流体デバイス工学である。

マイクロ流体デバイスの特徴と歴史

マイクロ流体デバイス工学とは、溶液の混合、反応、分離、精製、検出などの様々な化学操作を小型化し、数 cm 角の基板上に集積して化学分析や小型反応器などへ応用する研究領域である[34], [35]。μTAS(Micro Total Analysis Systems)、あるいは Lab on a chip などとも呼ばれている。基板にはポリマー・石英ガラス・シリコン・紙など様々な材料が用いられ[36]、基板上に微細加工技術を利用してマイクロスケールの構造体や流路(マイクロチャネル)を作製し、その内部へと様々な物質を導入し、反応や分析の場として活用する。このようにマイクロ構造を作製された基板は、マイクロチップ、マイクロ流体デバイスなどと呼ばれる。

マイクロスケールの空間は、マクロスケールの系(バルク)に対する様々な優れた特徴を持ち、これらが化学プロセスの単なるスケールダウンにとどまらない迅速化・高効率化に寄与している。以下にマイクロ空間における代表的な特徴を挙げる[37]。

- ① 液相空間が狭い。流路内の空間が狭いため分子の拡散移動距離が短くなり、混合などの物質移動が律速となるような化学プロセスの時間を大幅に短縮できる。
- ② 比界面積が大きい。試料体積に対して接触する固体あるいは液体の体積の割合が大きいいため、抽出や吸着などの界面を利用したプロセスを機械的操作なしで

迅速に行える。

- ③ 熱容量が小さい。空間が小さいため、熱容量も小さくなる。そのため、急速な温度切り替えが可能となる。

さらに、小型化された一連の化学実験プロセスを一枚のチップへと集積化することで、マクロスケールの化学実験に対し、以下に示すような利点が生じる[38]。

- ① 使用する検体量・試薬量を小さくできる。
- ② 従来の化学プラントのような巨大な施設を小型化できる
- ③ 廃液量を小さくできる。
- ④ 高毒性・高感染性・可燃性・爆発性などの危険な反応が必要なとき、隔離が容易である。
- ⑤ 複雑な操作の自動化・簡易化により、労力を低減できる。

化学操作の集積化の始まりは、1979年に Stanford University の S.C.Terry らによって開発されたガスクロマトグラフィーシステムであると言われている[39]。1枚のシリコン基板上にインジェクションバルブ、分離カラム、熱伝導度検出器を集積化し、炭化水素の混合物の分離を数秒で行うことに成功したものの、この報告は当時あまり注目を集めなかった。その後、1980年代には微細加工技術の進歩によってマイクロ構造体を比較的簡単に作ることができるようになり、マイクロバルブ、マイクロポンプ、センサーなどといった要素技術がめざましい発展を見せた。1990年には A. Manz らは液体クロマトグラフィーの前処理から検出までの一連の操作をシリコンウェハー上に集積することに成功し[40]、同時に、試料の前処理、分離、検出等の一連の操作を基板上に集積するという μ TAS の概念を提唱した[41]。さらに、1993年に A. Manz らがキャピラリー電気泳動をチップ化したマイクロ電気泳動チップを開発し[42]、生化学分析の分野での有効性が認められるようになった。当初はサンプル・試薬は電気泳動や電気浸透流によって駆動されていたが、1998年に T. Kitamori らが圧力を用い

た流体駆動法を導入した。その結果、電荷のない溶液が扱えるようになり、さらに複数の溶液を同時に導入・操作できるようになることで、 μ TAS の汎用性は大きく拡張された[43]。また、熱レンズ顕微鏡の開発により、蛍光分子だけではなく、非蛍光分子がマイクロ空間内から検出できるようになった[44]。そこで、T. Kitamori らは一般的な化学実験で用いられる 1 つ 1 つの操作（混合・反応・分離・抽出など）をマイクロ空間へとスケールダウンし、それらの単位操作の組み合わせによって多種多様な化学プロセスをマイクロチップ内へと集積化する方法論を提唱した[44]。このアプローチによって、多種類イオン連続分析[45]、合成反応システム[46]、細胞生化学実験システム[47]、重金属の湿式分析[48]、アンモニアガスモニター[49]等、様々な機能を持つマイクロ流体デバイスが実現された。マイクロ流体デバイス工学に関する研究は増え続けており、現在では化学分析や化学工学の分野のみならず、細胞挙動の分析[50]などバイオ・医療分野でも様々なツールとして応用されている。

マイクロ流体デバイス工学による免疫分析法の集積化

単一細胞中の任意の目的分子を分析するには、化学プロセシングの工程において、 10^6 種以上の夾雑物から 1 分子の目的分子を選び出す高い選択性が要求されることを 1.1.1 節で述べた。免疫分析法はタンパク質などの多種多様な目的分子を対象とでき、化学プロセシングにおける選択性が極めて高い分析法である。従って、免疫分析法の微小化・集積化は、単一細胞・単一タンパク分子分析の実現に有望なアプローチである。そこで、ここでは免疫分析法について解説し、マイクロ流体デバイスを用いて免疫分析法を集積化した例を取り上げる。抗体は生物が病原菌などから身を護るために生産する分子である。抗体は対応する抗原に対して極めて高い親和性を持ち、選択的に結合する。この抗原・抗体間の反応を利用して目的分子である抗原を検出・定量する分析法が免疫分析法、あるいはイムノアッセイである。抗原抗体反応を用いて抗原（目的分子）の量を信号強度へと変換するには、いくつかの方法がある。図 1-4 に示す競合法は、1960 年に Berson と Yalow らによって開発されて以来[51]、ホルモンなどの低分子の目的分子の分析に広く使われている手法である。まず、サンプルを一定

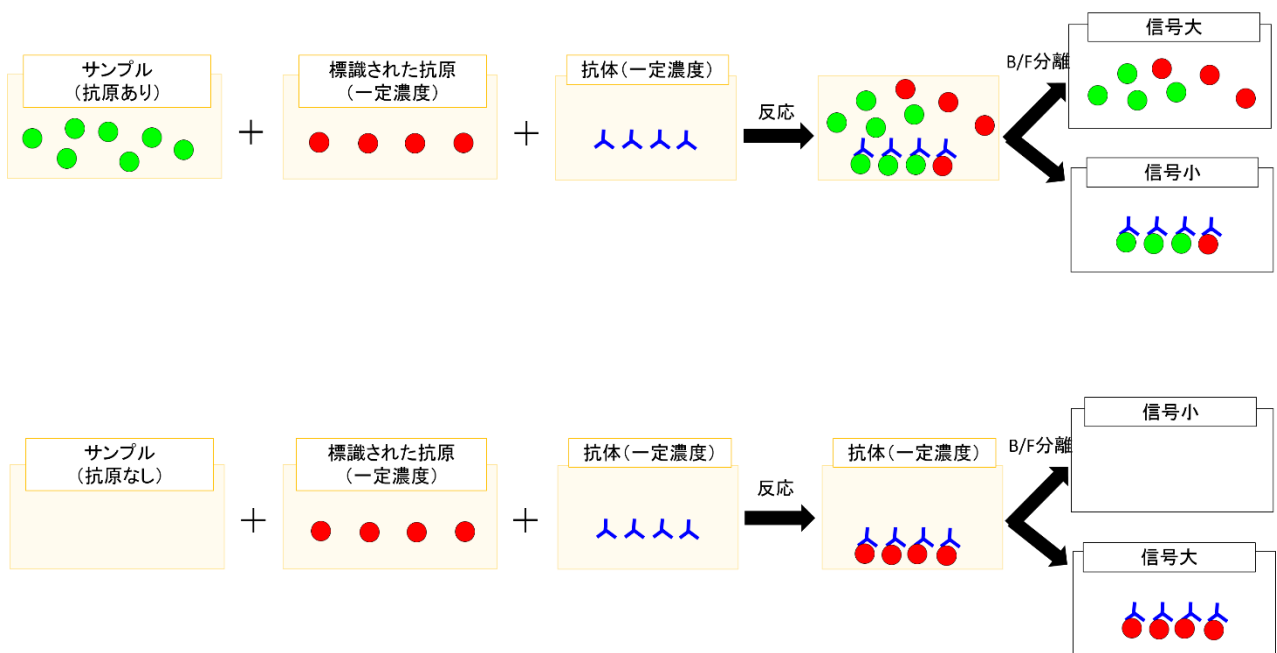


図 1-4 競合法でのイムノアッセイの原理

濃度の抗体と、一定濃度の標識された抗原を反応させる。次に、遊離している抗原 (Free) と、抗体と結合した抗原 (Bound) を分離する。サンプル中に抗原が存在しない場合は、抗体に結合するのは標識された抗原ばかりである。いっぽう、サンプル中に抗原が十分な濃度存在した場合、これらが抗体に結合するため、抗体と結合した抗原を占める標識抗原の割合は低下する。従って、Bound と Free の標識抗原の量を測定することで、サンプルに含まれる抗原を定量することができる。

タンパク質などの比較的大きな分子を分析するには、非競合法がよく用いられる。典型的な手法であるサンドイッチ法の原理を図 1-5 に示す。まず固相に抗体を吸着し、サンプルと反応させる。サンプルに抗原が含まれていた場合、十分な時間反応させることによって抗体に抗原が結合する。次に、標識された抗体を添加する。抗原が存在する場合、標識された抗体は抗原と反応して固相に吸着される。最後に、遊離の標識抗体を除去し、固相に吸着した標識抗体を定量する。サンプルに抗原が十分含まれていれば、多量の標識抗体が固相に吸着され、信号が大きくなる。サンプルに抗原が含まれていない場合、標識抗体は固相とは特異的には結合しないため、信号は小さくなる。抗原や抗体を標識する方法はいくつか存在する。ラジオアイソトープを標識に用

いるものはラジオイムノアッセイと呼ばれる。酵素を標識に用いる手法は、エンザイムイムノアッセイや ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) と呼ばれる。

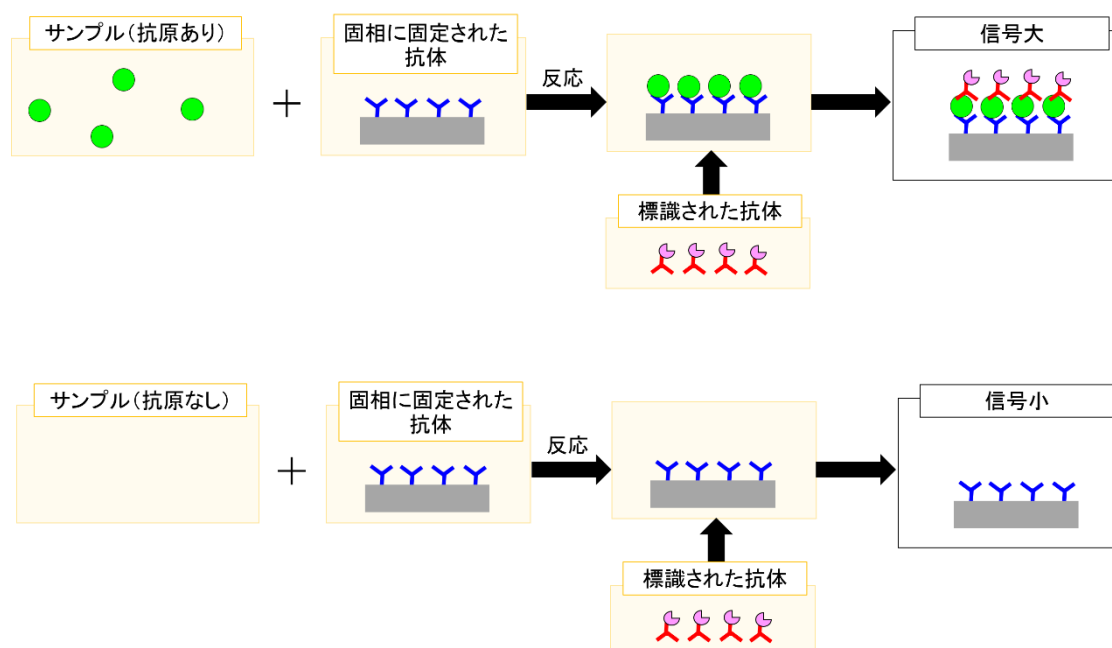


図 1-5 サンドイッチ法の原理

マイクロ流体デバイス工学を用いて免疫分析法をダウンスケールする大きな利点として、抗原抗体反応を短時間で達成できることが挙げられる[52], [53]。例として、図 1-6 のように、サンドイッチ法で抗原を固相表面の抗体と結合させる場合を考える。典型的な ELISA では固相としてマイクロウェルプレートが用いられ、反応場のサイズは数 mm、体積として数 10^1 - 10^2 μL である。反応は固相の界面でのみ起きるため、サンプルに含まれる抗原分子は拡散によって数 mm の距離を移動する必要がある。これにより一般的な ELISA のプロセスは数時間を必要とする。いっぽう、マイクロ流体デバイス工学を用いて 10^1 - 10^2 μm のサイズの反応場を作り出すことができれば、抗原は 10^1 - 10^2 μm の移動によって界面に到達することができ、反応時間を短縮することができる。

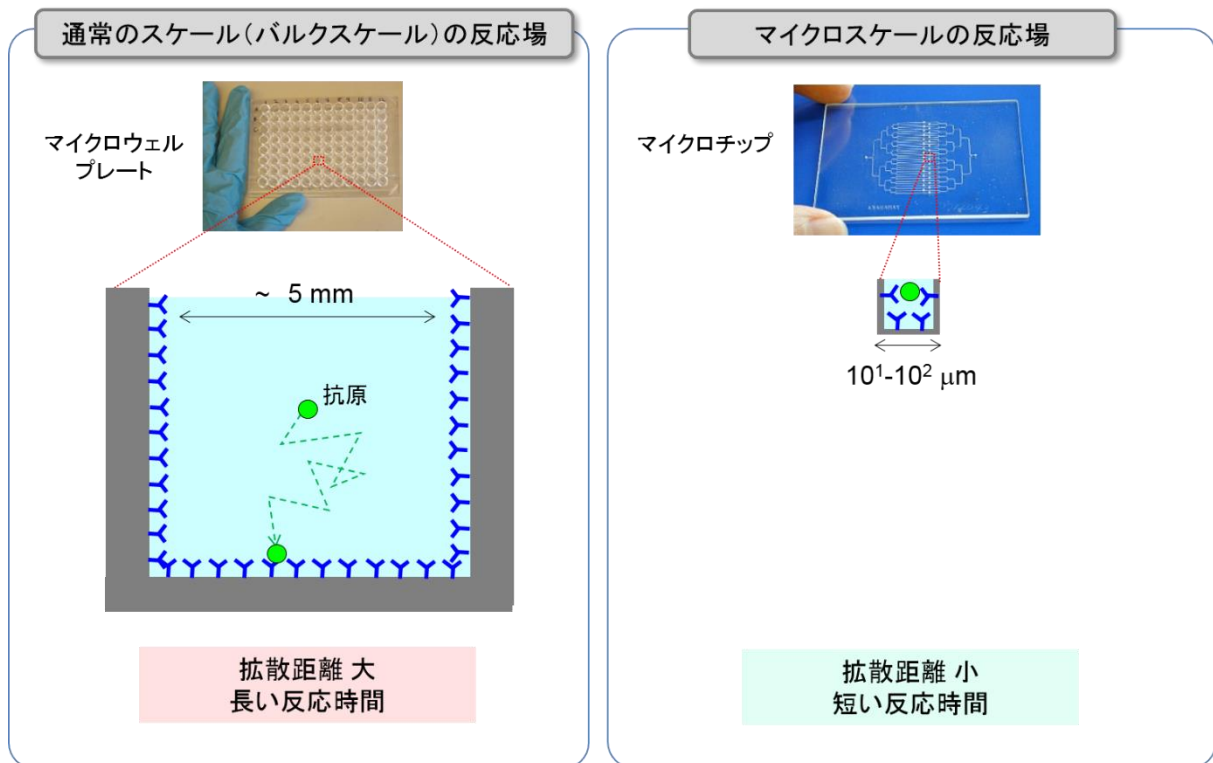


図 1-6 免疫分析のダウンスケールによる反応時間の低減

2000年に T. Kitamori らの研究グループは、抗体が修飾されたポリスチレンビーズをマイクロ流路内へと充填することで、免疫分析法のマイクロ空間への集積化に成功した[54]–[57]。図 1-7 に示すように、石英ガラス製マイクロチップの内部にダム状の構造を持つマイクロ流路が作製されている。ダム構造の深さは $10\ \mu\text{m}$ であり、直径 $40\ \mu\text{m}$ のビーズをトラップすることができる。ビーズ表面には抗体が修飾されており、サンプル、洗浄バッファ、標識抗体を導入し、標識されている金ナノ粒子あるいは酵素が生成した色素を熱レンズ顕微鏡によって検出することで信号を獲得する。この手法によって、マイクロウェルプレートでの ELISA では 15 時間必要とされた反応時間が、20 分にまで低減されている。2008 年に R. S. Sista らは、電気で濡れ性を制御するエレクトロウエットングを用いて液滴を操作し、免疫分析のプロセス時間を 7 分へと短縮することに成功した[58]。また、近年では単一細胞に対する免疫分析デバイスが開発されている。2013 年に、K. Eyer らは $625\ \text{pL}$ のマイクロ空間の内部で単一細胞を捕獲・破碎し、ELISA で目的分子を定量することができるデバイスを開発した[59]、

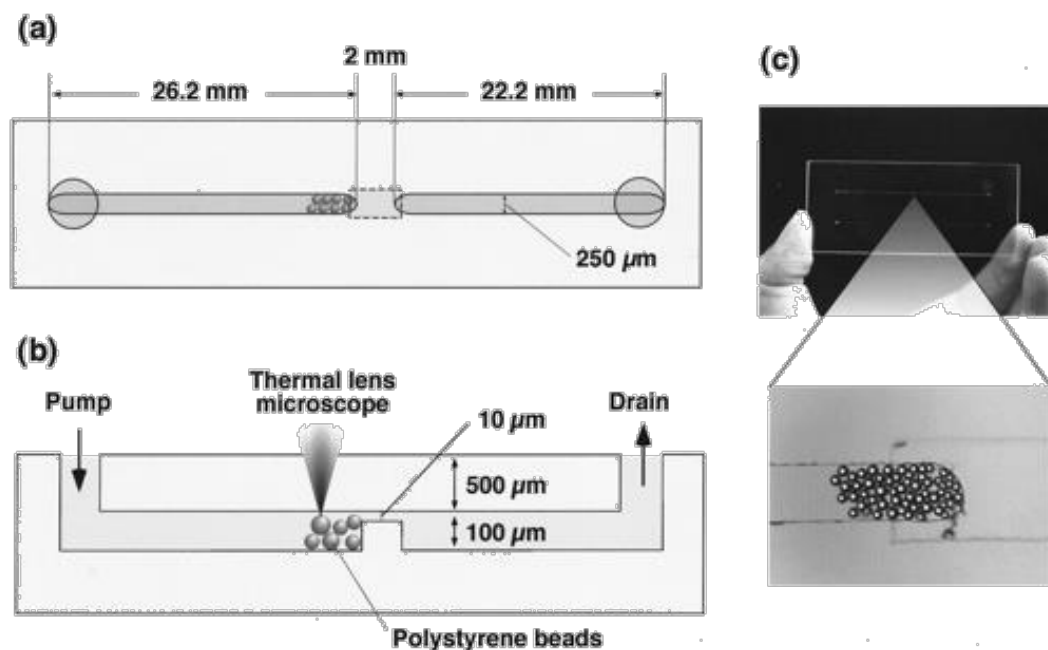


図 1-7 ビーズを用いた免疫分析チップ (a)上面図 (b)断面図
(c)抗体修飾ビーズが充填されたマイクロ流路

From K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, and T. Kitamori, "Determination of carcinoembryonic antigen in human sera by integrated bead-bed immunoassay in a microchip for cancer diagnosis.," *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 6, pp. 1213–1218, 2001..

Reprinted with permission from AAAS."

[60]。ウェル状のマイクロ空間の周囲の流路には空圧で駆動するバルブが加工されており、ウェルの内部に細胞を閉じ込め、様々な溶液を導入することができる。1つ1つのウェルの底面にはマイクロコンタクトプリンティングと呼ばれる手法によって抗体が修飾されており、溶解した細胞質に含まれる目的分子を捕捉し、ELISAによって定量する。このウェルを用いて GAPDH を定量した結果、濃度の検出限界はマイクロウェルを用いた ELISA と同程度であったが、分子数としては 6,000,000 分子であり、マイクロウェルと比べて 3 桁以上小さくなった。また、2014 年に A. E. Herr らの研究グループは、ゲル電気泳動によるタンパク質分離と免疫分析法を組み合わせたウェスタンブロッティング法によって個々の細胞を分析するデバイスを開発した[61]。厚さ 30 μm のゲル薄膜に直径 20 μm のウェルが多数作製されており、ウェル内で細胞膜を破碎し、泳動後、標識抗体で染色する。緑色蛍光タンパク質 GFP をサンプルとし、免

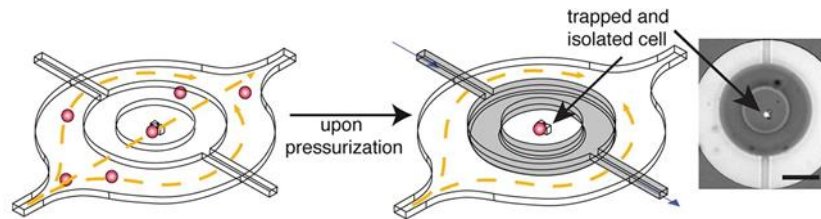


図 1-8 単一細胞 ELISA デバイス

From K. Eyer, S. Stratz, P. Kuhn, S. K. Küster, and P. S. Dittrich, "Implementing enzyme-linked immunosorbent assays on a microfluidic chip to quantify intracellular molecules in single cells.," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 6, pp. 3280–7, Mar. 2013... Reprinted with permission from AAAS."

疫染色による定量結果と蛍光強度を比較した結果、免疫染色での検出限界は 27,000 分子であると見積もられた。1 細胞あたり 27,000 分子はヒトのプロテオームの 50% に相当する。目的分子が複数種の場合でも、電気泳動によって分離できる場合は同時に計測することができ、さらに多数の細胞を同時に扱うことができるため、極めて有望な手法である。このように、免疫分析法をマイクロ空間へと集積化することで、反応時間の短縮、検出可能な目的分子数の低減など、さまざまな性能が向上されている。しかしながら、いずれの手法も単一・可算個分析には至っておらず、発現量の小さい目的分子に対する単一細胞分析にはさらなる性能向上が必要である。

拡張ナノ流体デバイス工学による免疫分析法の集積化

近年では、微細加工技術・流体制御法・検出器の発展により、マイクロ流体デバイスからの更なるスケールダウンが可能になった[62]。マイクロ流体デバイス工学が 10^0 - $10^2 \mu\text{m}$ の空間を扱うのに対し、 10^1 - 10^2nm の空間（拡張ナノ空間）を扱う領域は拡張ナノ流体デバイス工学と呼ばれる。T. Kitamori らは世界に先駆けて拡張ナノスケールの流路を組み込んだデバイスを作製し、拡張ナノ流路内部の流体の駆動法[63]、非蛍光分子の検出法[64]、拡張ナノ流路表面の部分修飾法[65]などの基盤技術を確立してきた。

拡張ナノ空間は、体積に換算すると fL ~ aL と、これまでのマイクロチップの流路がもつ nL ~ μL の体積と比べて三桁～六桁小さく、極めて微小な反応容積をもつ器と

して利用できる。免疫分析法の分析場を拡張ナノスケールにまでスケールダウンできれば、マイクロスケールの分析場を用いた免疫分析法に対してさらなる性能向上が期待できる。この着想から、2014年に K. Shirai らは ELISA を拡張ナノ空間へと集積した拡張ナノ ELISA デバイスを開発した[66]。拡張ナノ ELISA デバイスと、マイクロスケールの ELISA デバイスのスケールの比較図を図 1-9 に示す。拡張ナノ ELISA デバイスでは、ガラス製マイクロチップの内部に拡張ナノ流路を構築し、その界面に抗体が修飾されている。サンドイッチ ELISA の原理そのものはマイクロスケールの ELISA デバイスと同様であるが、分析場体積が nL から fL へと桁違いに小さく、抗原・抗体の反応も桁違いの速度で進む。K. Shirai らは、拡張ナノ流路における抗原抗体反応速度を評価した[65]。その結果、界面に抗体が修飾された幅 3.3 μm 、深さ 200 nm の拡張ナノ流路へと導入された抗原分子は、わずか数秒で全量が捕捉されること

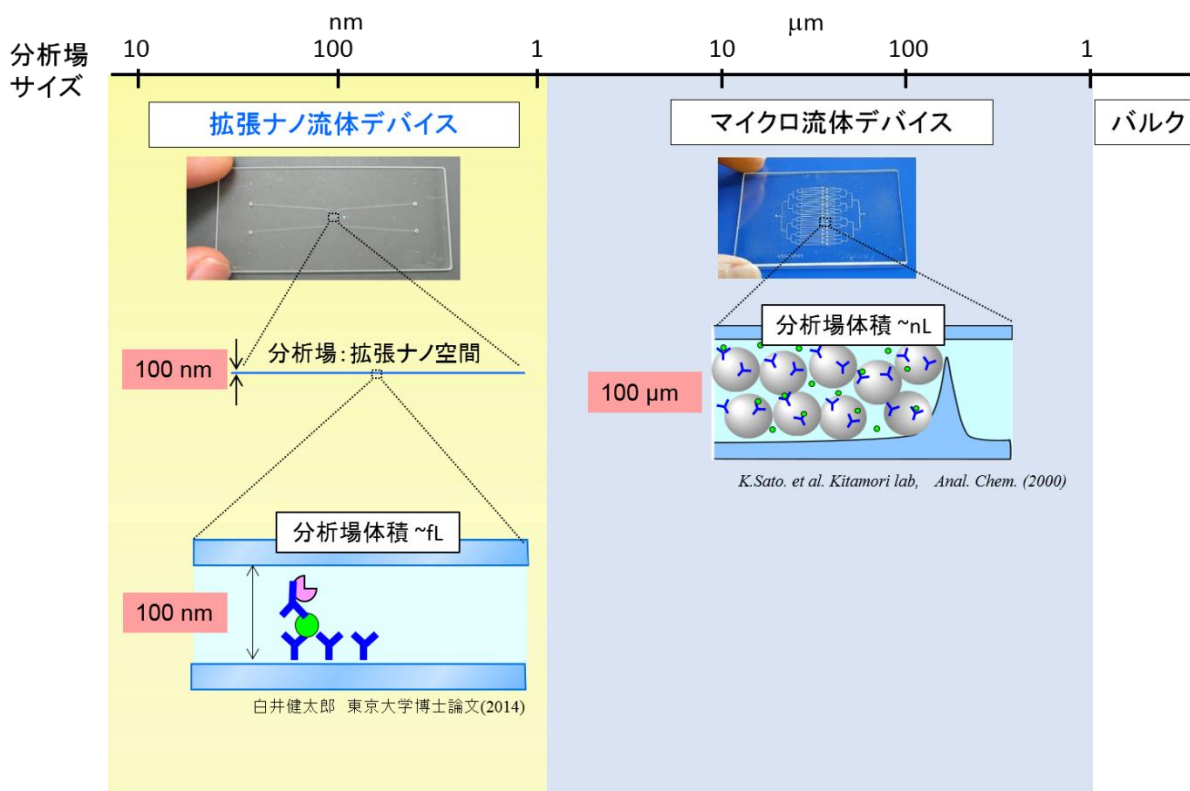


図 1-9 拡張ナノ ELISA デバイスと
マイクロスケールの ELISA デバイスのスケール比較

が示された。抗原を捕捉するにはバルクスケールでは数時間、マイクロスケールでは数分が必要である。この桁違いに短い反応時間は、拡張ナノ空間では抗原分子は拡散によって毎秒 10^2 - 10^3 回界面に衝突し、界面にある抗体と常に反応できる状態にあるためだと考えられる。K. Shirai らは更に、このデバイスを用いて ELISA の原理検証実験を行った。その結果、試料体積 16 pL、目的分子数 16 の条件でブランクより大きな信号が獲得され、体積 pL のサンプルに対する化学プロセッシングを実証し、拡張ナノ ELISA デバイスが単一・可算個分子レベルの分析法として有望であることが示された。

1.1.3. 単一・可算個分子分析に向けた課題

しかし、拡張ナノ ELISA デバイスを用いた単一・可算個分子レベルの測定は、定量性・再現性が確保されておらず、信号が出ない場合や偽信号が出る場合があるなど分析化学として未確立であった。本研究では、この問題の背景には、単一・可算個の目的分子を扱うことで生じる特有の課題があると考えた(図 1-10)。拡張ナノ ELISA で、目的分子が 2 分子存在するケースを考える。2 つの目的分子が、流路表面の抗体に捕捉され、酵素標識抗体と結合すれば、検出器は 2 つの目的分子から信号を得ることができる。しかし、プロセスの途中で 1 つの目的分子が、あるいは 1 つの目的分子に結合した標識抗体が失われてしまうと、検出器が信号を得ることができるのは 1 分子となる。わずか 1 分子のロスによって正しい測定結果から 50%のずれが生じてしまう。また、夾雑物が混入した場合を考える。夾雑物としては様々な物質が考えられ、中には酵素標識抗体と同様に基質と反応する物質が存在することもあり得る。夾雑物が基質と反応すれば、夾雑物が検出の対象となり、偽の信号（アーチファクト）を発生させてしまう。標識として使われる酵素は基質との反応性が高い物質であるが、基質の反応速度は酵素の量に比例するため、酵素が単一分子しか存在しなければ反応する基質の量も小さい。夾雑物がわずか 1 分子の酵素標識抗体と同程度の反応性を有していれば、夾雑物が 1 分子信号として検出されてしまう。このとき、目的分子の量が 2 分子であれば、正しい測定から 50%のずれが生じてしまう。いっぽう、バルクスケール

やマイクロスケールの従来の ELISA は、 $10^5 - 10^{12}$ 個もの目的分子が扱われ、一般的には分子数よりも mol の単位で書き表される。mol 単位で存在する目的分子から 1 分子が失われても、あるいは酵素標識抗体 1 分子相当の夾雑物が混入しても、測定される信号の変化はきわめて小さく、分析結果には影響しない。このように、従来の ELISA では単一分子レベルの誤差の影響は無視できるが、拡張ナノ ELISA デバイスを用いた単一・可算個分子分析では単一分子レベルの誤差の影響が大きく現れることが予想される。従って、これらの誤差、すなわちアーチファクトや目的分子のロスを検証し低減することが単一・可算個分子分析の確立における最大の課題であると考えた。

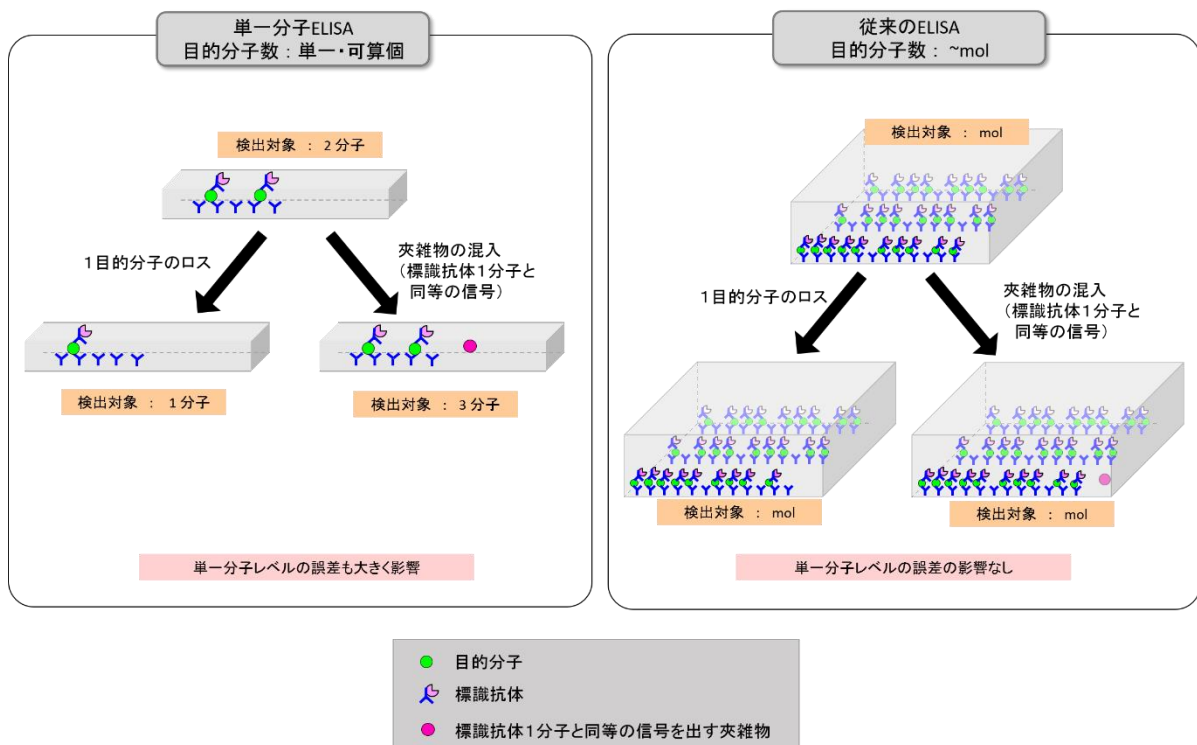


図 1-10 単一分子レベルの誤差が分析に与える影響

1.2. 本研究の目的

以上から、本研究では拡張ナノ流体デバイスを用いた単一分子 ELISA の方法論の確立を目的とした。具体的には以下の3つの項目に取り組んだ。

- (i) 単一分子レベルのアーチファクトの原因解明と除去
- (ii) 単一分子領域における検出効率の検証
- (iii) 単一・可算個分子定量法の確立

本稿では第一章を諸言とし、第二章で (i) に関して、第三章で (ii) に関して、第四章で (iii) に関して取り組んだ。そして第五章で本研究の成果と今後の展望をまとめ、結言とした。

第二章 単一分子レベルのアーチファクトの 原因解明と除去

2.1. 緒言

2.1.1. 本章の背景

典型的な ELISA では、まずサンプル中の目的分子を固相表面の抗体へと捕捉する。次に、捕捉された目的分子に酵素標識抗体を結合し、酵素反応によって生成される色素を検出する。このプロセスはバルクスケール・マイクロスケール、そして拡張ナノスケールの ELISA の間で共通であるが、取り扱う目的分子の量には大きな差がある。mol 単位の目的分子を取り扱う従来の ELISA に比べて、拡張ナノ ELISA で取り扱う目的分子の量は $10^{-5} - 10^{-12}$ 倍と桁違いに小さい。酵素反応によって生成される色素分子の量は、目的分子の量に比例する。従って、拡張ナノ ELISA では桁違いに小さい量の色素分子を信号として取り扱う(図 2-1 a)。信号が微弱であるために、単一分子レベルのごくわずかな偽信号すら分析結果に大きく影響する(図 2-1 b)。単一・可算個分子

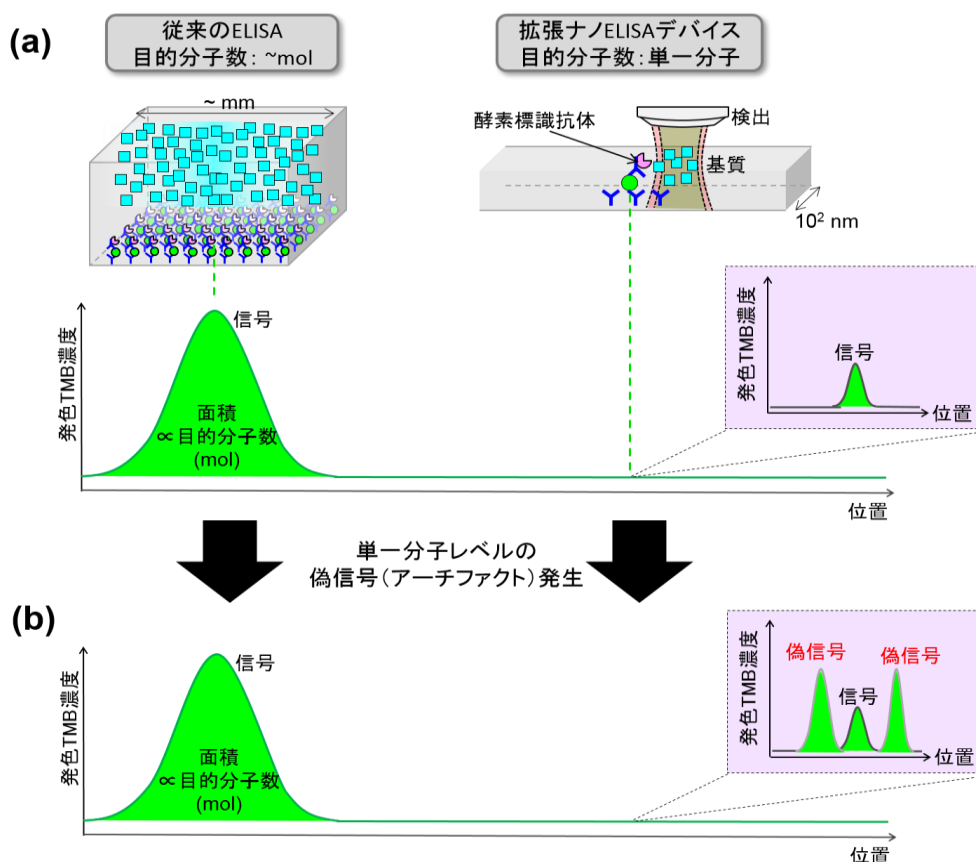


図 2-1 (a) 従来の ELISA と単一分子 ELISA で発生する信号の比較図

(b) 単一分子レベルの偽信号が与える影響の比較図

領域の定量分析法を確立するには、単一分子レベルのアーチファクトすら取り除くことが要求される。

2.1.2. 本章の目的

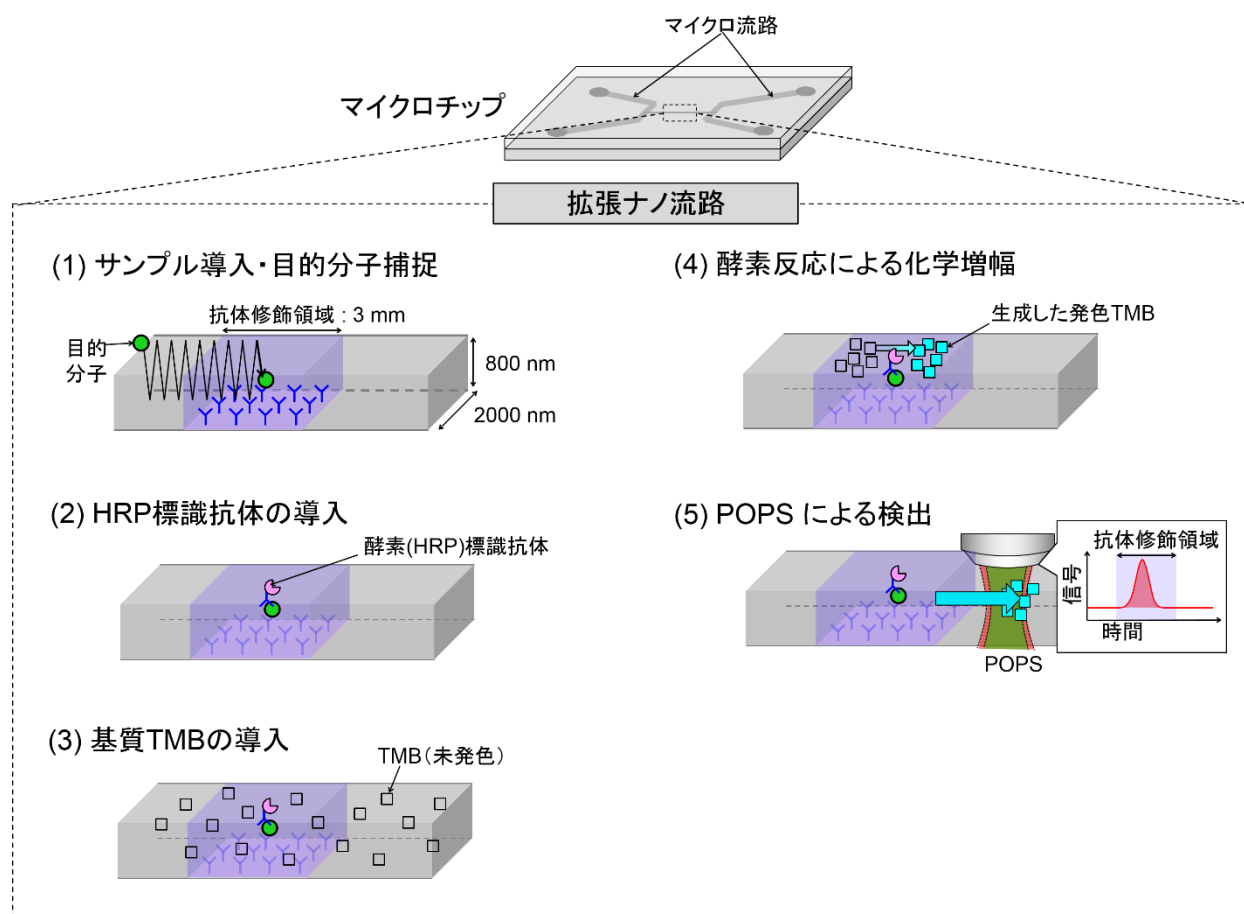
そこで、拡張ナノ流体デバイスを用いた ELISA において、アーチファクトを単一分子レベルで取り除くことを本章の 1 つの目的とした。また、その手段としてアーチファクトの原因を解明することを 2 つ目の目的とした。具体的には、以下の 2 つの項目に取り組んだ。

- (i) アーチファクトの発生要因の推定
- (ii) 推定された要因の検証とアーチファクトの除去

(i) の内容を 2.3 節に、(ii) の内容を 2.4 節と 2.5 節に示した。また、2.2 節では拡張ナノ流体デバイスを用いた ELISA の原理を解説した。

2.2. 拡張ナノ流体デバイスを用いた ELISA の原理

本節では、2014年に K. Shirai らによって開発された拡張ナノ ELISA デバイスの原理について説明する[66]。図 2-2 に示すように、石英ガラス製の 30 mm × 70 mm × 1.4 mm の基盤に幅 2000 nm、深さ 800 nm、長さ 6 mm の拡張ナノ流路が加工されている。拡張ナノ流路の両端は、試薬導入用のマイクロ流路と接続されている。拡張ナノ流路の長さ 6 mm のうち、中央の長さ 3 mm の領域の表面は抗体によって修飾されている。そのほかの領域の表面は、目的分子や試薬が非特異的に吸着することを防ぐために、分子量 5000 のポリエチレングリコール(PEG)で修飾されている。まず、拡張ナノ流路の内部へサンプルを導入し、目的分子を抗体修飾領域で捕捉する。次に、酵素である西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish peroxidase, HRP)で標識された抗体を導入し、目的分子と結合させる。次に 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)と過酸化水



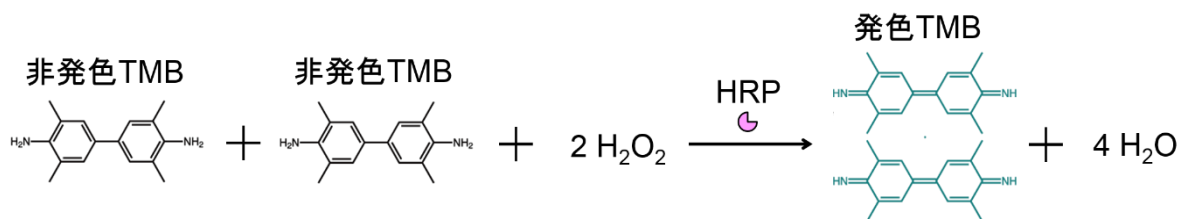


図 2-3 HRP が触媒する TMB の発色反応

素を含む溶液を導入する。ナノ流路内の流れを止めて 60 秒間インキュベートすると、HRP が触媒する TMB の酸化反応が進行する(図 2-3)。TMB は酸化によって 655 nm に吸収極大を持つ青緑色の二量体を形成する[67]。この反応によって、単一の HRP 標識抗体分子から 10^6 分子の TMB が発色すると推定される[66]。最後に、蓄積した発色 TMB をナノ流路下流の検出点へと流し、光熱変換光位相差検出器(Photothermal Optical Phase Shift detector, POPS)によって検出する。POPS は、物質を光励起し、発生した熱によって生じる屈折率変化を光で捉える検出器であり[68]、拡張ナノ空間内部の 10^2 個の色素分子を検出することができる。

信号の処理方法を図 2-4 に示す。酵素反応が終了した時点で、拡張ナノ流路内には発色した TMB が局所的に存在している。これらを流して検出すると、検出点に近い位置に存在していた TMB は早いタイミングで検出され、信号となる。検出点に遠い位置に存在していた TMB は遅いタイミングで検出され、信号となる。検出の結果、横軸を時間、縦軸を信号強度とした生データが得られる。TMB の流速から、グラフの横軸(時間)は流路内の位置へと変換できる。また、グラフの縦軸(POPS 信号強度)は、発色 TMB の濃度へと変換することができる。すると、拡張ナノ流路内における発色 TMB の濃度分布データが得られる。ある 1 点から発生した TMB は、拡散によってピーク状の濃度分布を形成するはずである。濃度分布グラフにおけるピーク面積は、発色 TMB の生成量に比例する。発色 TMB の生成量は酵素の量および目的分子の量に比例することが期待されるため、濃度分布グラフのピーク面積を本手法における信号値として定義する。

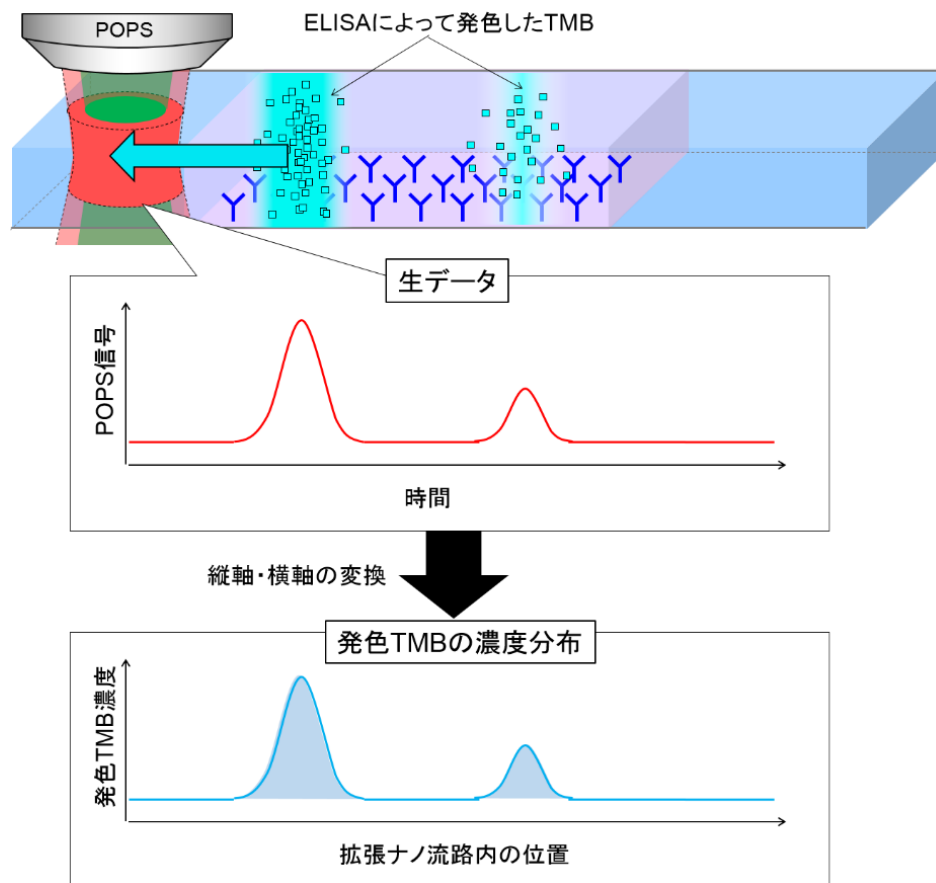


図 2-4 POPS から得られるデータの処理方法

拡張ナノ流路の深さ 800 nm は、POPS による発色 TMB の検出性能を最適化するために設計されており、幅 2000 nm、深さ 800 nm の拡張ナノ流路における検出限界(2σ) は 0.46 μM である。60 秒間の酵素反応によって単一の HRP 標識抗体から生成される発色 TMB の酵素近傍での濃度は 2 μM 程度と推定されるため、POPS によって単一 HRP 標識抗体の検出は理論上可能である。

2.3. アーチファクトの発生要因の推定

アーチファクト（偽信号）は、目的分子に由来しない信号を指す。バルクスケール・マイクロスケールの ELISA でも目的分子に由来しない信号はもちろん発生する。夾雑物のない標準試料をサンプルとしている場合、アーチファクトの主な要因は酵素標識抗体の非特異的な吸着である。目的分子が存在しない場合、導入された酵素標識抗体はどの分子とも結合することなく、洗浄によって完全に除去されることが理想である(図 2-5 a)。この場合、信号はゼロとなり、導入目的分子ゼロと合致した結果が得られる。しかし、酵素標識抗体が界面に非特異的に吸着してしまえば、洗浄によって除去されことなく残留する(図 2-5 b)。この酵素が検出の対象となり、目的分子が存在しないにも関わらず、信号（アーチファクト）が発生する。この酵素標識抗体の非特異吸着は ELISA の分析性能に大きく影響するため、BSA やスキムミルクなどを用いて表面を被覆し、非特異吸着を抑制するブロッキングを行うのが一般的である[69]。このように、酵素標識抗体の非特異吸着に由来する信号はバルクスケールの ELISA において常に検討されてきた。

(a) 非特異吸着なし



(b) 非特異吸着あり

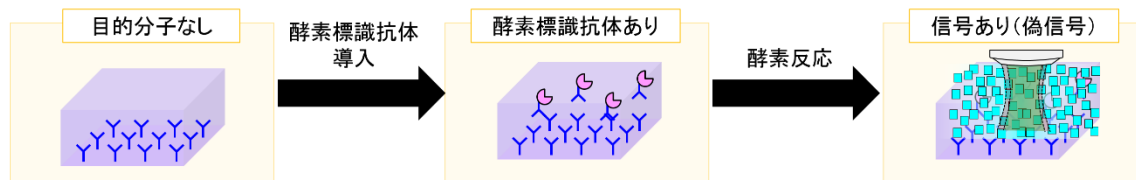


図 2-5 酵素標識の非特異吸着に由来する偽信号

アーチファクトの発生要因が酵素標識抗体の非特異吸着のみであるならば、酵素標識抗体と目的分子の濃度をゼロとして ELISA を行うと、信号はゼロとなるはずである。しかしながら、本研究では拡張ナノ ELISA デバイスにおいて、酵素標識抗体と目的分子の濃度ゼロの条件でアーチファクトが発生することを見出した。図 2-6 に示すのは、拡張ナノ流路に目的分子と酵素標識抗体を導入せずに TMB 溶液のみを導入し、ELISA 測定時と同様に 60 秒間流れを止め、発色 TMB を POPS によって検出した結果である。(詳細の実験条件は 2.4.2 節で説明する。) 複数のピーク状の信号が発生し、ピーク面積の平均値は $12.4 \mu\text{V} \cdot \text{sec}$ であった。そこで、このアーチファクトがどれだけの酵素標識抗体に相当するかを考察した。既知濃度の色素溶液の POPS 測定結果を用いてグラフの縦軸を TMB 濃度へと換算し、流速の推定値を用いて横軸をナノ流路内の位置へと換算した結果、ピーク面積の平均値は $20.1 \mu\text{M} \cdot \text{mm}$ であった。この値に流路の断面積を掛けると、 $3.13 \times 10^{-17} \text{ mol}$ であった。これは、このピークを構成する発色 TMB の分子数の指標である。いっぽう、典型的な HRP 標識抗体には抗体 1 分子あたり 4 分子の HRP が標識されており、バルクスケールの測定によればそれぞれの HRP 分子は毎秒 6000 分子の TMB を発色させる。従って、HRP 標識抗体 1 分子は

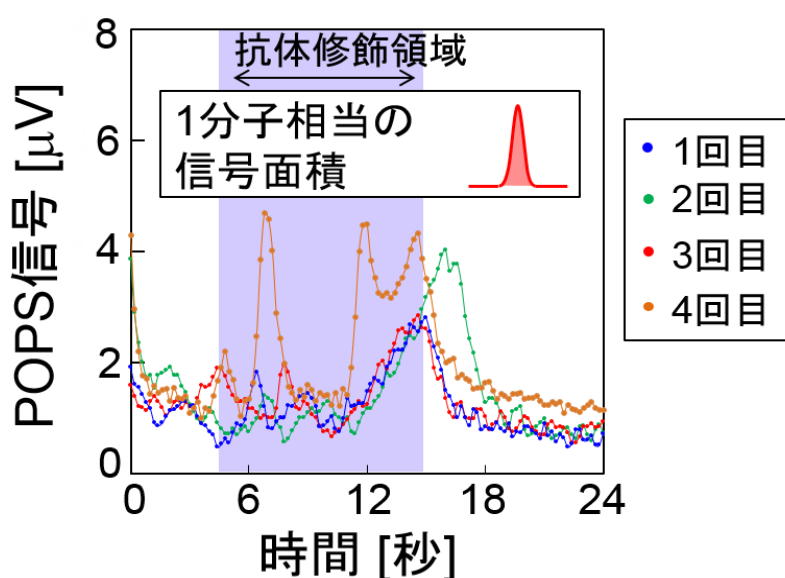


図 2-6 酵素標識抗体濃度ゼロの条件で拡張ナノ ELISA デバイスで観察されたアーチファクト

60 秒間の反応時間で 2.4×10^{-18} mol の TMB を発色させることが期待される。この値はアーチファクトを構成する TMB 分子数の 1 / 10 であることから、アーチファクトは 10 目的分子に相当する大きさであることがわかった。アーチファクトの発生位置・大きさにはばらつきがあるため、単一目的分子由来の信号と区別することは困難である。以上より、拡張ナノ ELISA デバイスでは酵素標識抗体に由来しないアーチファクトの発生要因が存在し、その影響が単一・可算個分子分析を困難にするほど大きいことが明らかとなった。

以上から、アーチファクトの原因の候補を

- (i) HRP 標識抗体以外の要因
- (ii) HRP 標識抗体の非特異吸着

の 2 種類に分類し、2.4 節では (i) の原因解明と低減に取り組み、2.5 節では (ii) の検討に取り組んだ。

2.4. 酵素標識抗体以外の要因の検証

2.4.1. 原因化学種の推定

まず、酵素標識抗体に由来しないアーチファクトに関して、何らかの HRP 以外の TMB 発色化学種が拡張ナノ流路内に存在するという仮説を立てた。拡張ナノ ELISA デバイスの実験プロセスは、デバイス加工・アッセイ・検出から構成される(図 2-7)。そこで、これらのプロセス全体について HRP と同様に酸化活性を有する原因化学種を探索した。

まずは、プロセス後半のアッセイ・検出について検討した。ここで用いられる試薬は、捕捉抗体、酵素標識抗体、TMB 基質溶液、ブロッキング剤である BSA、バッファの PBS である。ここでは酵素標識抗体のない条件下における TMB 発色を扱っているため、酵素標識抗体と TMB 基質溶液は候補から除外される。また、他の捕捉抗体・BSA・PBS についても、従来の ELISA と共通の試薬であるため、分析を妨げるような酸化活性を有する可能性は低いと考えられる。

そこで、プロセス前半のデバイス加工に着目した。拡張ナノ ELISA デバイスの加工法を図 2-8 に示す。まず、石英ガラス基板上にスパッタリングによって Cr 膜を形成し、フォトリソグラフィによって Cr 膜のパターンを作製する。次に、Cr パターンを保護膜としたプラズマエッチングにより、マイクロ流路を加工し、Cr エッチングによって Cr 膜を除去する。次に、ガラス基盤表面にアミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)を気相修飾し、Cr マスクと真空紫外光 (172nm) により APTES を部分的に分解することでパターンを作製する。また、別の基板には電子線リソグラフィにより拡張ナノ流路(幅 2 μm 、深さ 800nm、長さ 6 mm)を作成し、フッ素添加酸素プラズマを照射する。二枚の基板を低温接合 (110 度, 5000N, 3 時間) により接合した後、非特異吸着を抑制するためにポリエチレングリコール (PEG) 溶液を流路内へ導入し、表面を修飾する。こうして流路界面が APTES と PEG の 2 種類の物質で塗り分けられ

た拡張ナノ流体デバイスが得られる。APTES 修飾領域には後にグルタルアルデヒドをリンカーとして捕捉抗体を固定することができる。

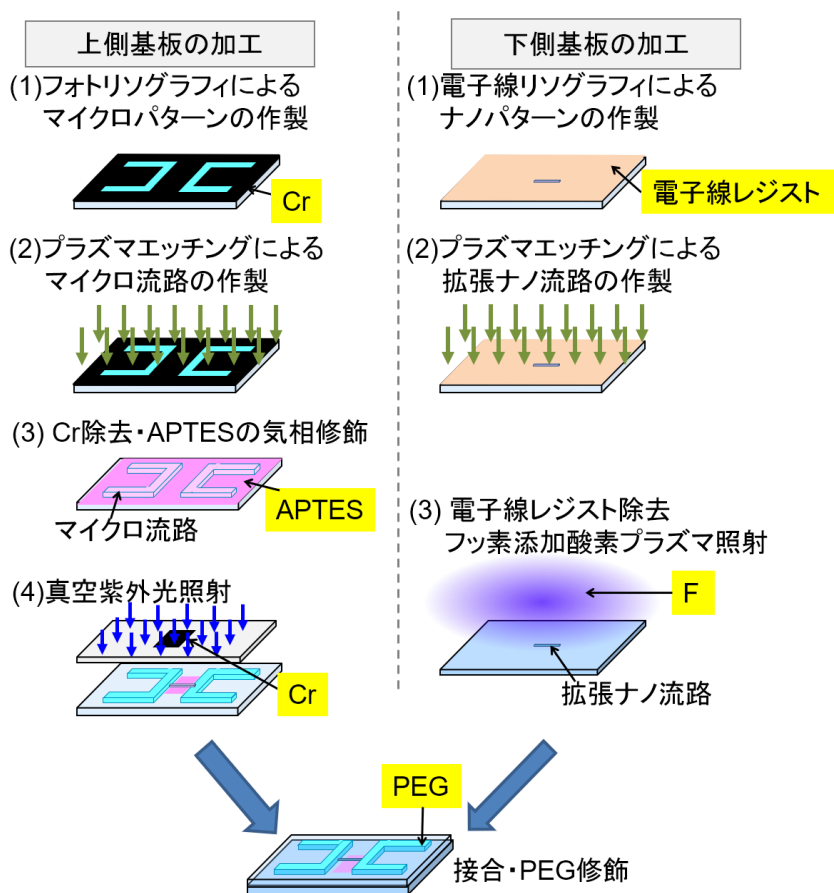


図 2-8 拡張ナノ ELISA デバイスの加工法

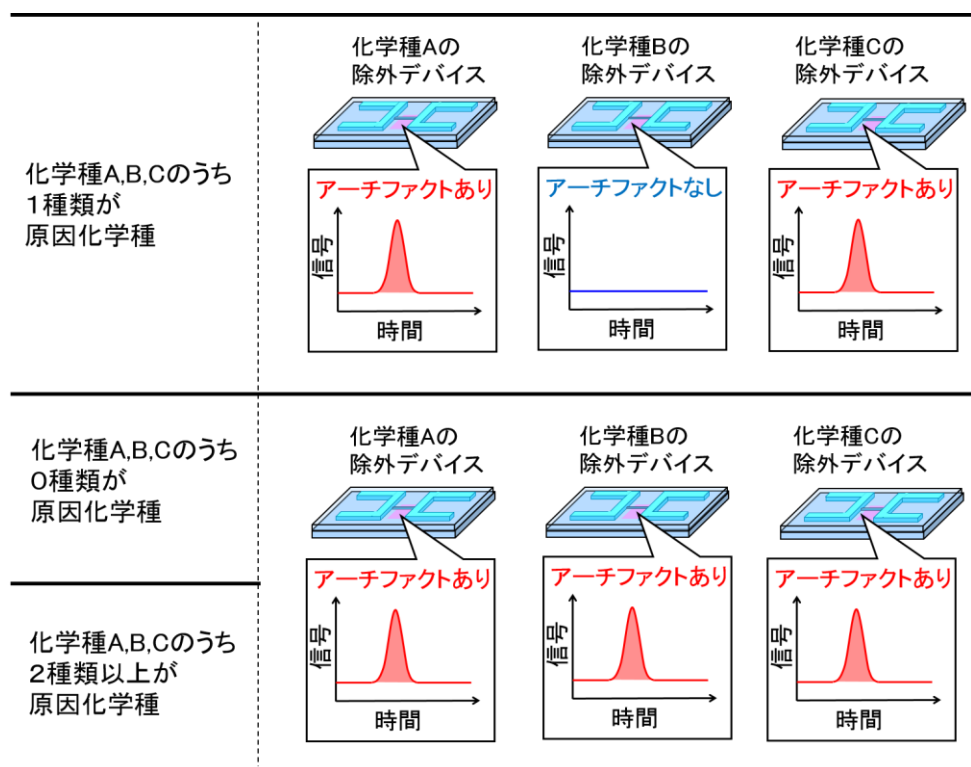
このように、デバイス加工プロセスでは様々な化学種を使用しているため、これらの化学種のいずれか極微量に流路内部に残留し、単一分子レベルのアーチファクトの原因になっている可能性が高いと考えた。そこで、デバイス加工プロセスで用いられる化学種として、APTES、PEG、フッ素、Cr、電子線レジストの5つを候補とした。

2.4.2. APTES, F, PEG の検証実験

APTES、PEG、フッ素、Cr、電子線レジストのうち、1種類がアーチファクトの主原因であると仮定する。この場合、原因化学種を除外した条件で加工されたデバイスを用いれば、アーチファクトが観察されなくなることが予想される(表 2-1)。いっぽ

う、2種類以上の原因化学種が存在した場合、あるいは原因化学種が候補のうち存在しなかった場合、候補化学種1種を除外したデバイスを用いてもアーチファクトが消えることはない。従って、1種類の候補化学種を除外したデバイスを用いることで、原因化学種の絞り込みが可能であると考えた。しかしながら、Crと電子線レジストは流路の加工に用いられるため、プロセスから除外して加工することは困難である。他の物質に代替すれば加工は可能であると考えられるが、代替物質の導入は新たな原因化学種候補を生むため、ここでは取り扱わないことにした。以上から、本節ではAPTES・PEG・フッ素の除外デバイスを作製し、アーチファクトが発生するかどうかを評価することで、原因化学種候補の絞り込みを試みた。

表 2-1 化学種1種類を除外した場合のアーチファクトの発生パターン



実験手順1：デバイスの加工

デバイスは、K. Shirai らによる拡張ナノ ELISA デバイスと同様の加工プロセスで作製した。まず 30 mm × 70 mm、厚さ 0.7 mm の石英ガラス基板 (信越化学工業社製)

を2枚用意した。片側の基板には、電子線リソグラフィーとプラズマエッチングによって幅 $2\ \mu\text{m}$ 、深さ 800nm 、長さ $6\ \text{mm}$ の拡張ナノ流路を作製した。ここでの加工法は筆者の所属する北森研究室でよく用いられているものであり、詳細は APPENDIX A-1. ナノ加工 の節を参考されたい。他方の基板には、フォトリソグラフィーによってCrパターンを作製し、プラズマエッチングによって幅 $500\ \mu\text{m}$ 、深さ $4\ \mu\text{m}$ のマイクロ流路を作製した。また、ドリル加工によって試薬導入用の穴を作製した。詳細は APPENDIX A-2. Crを使ったマイクロ加工法を参考されたい。

次に、マイクロ流路が加工された基板の表面を APTES で気相修飾した。具体的には、まず硫酸過水（硫酸3：過酸化水素水1 = $30\ \text{mL} : 10\ \text{mL}$ ）に約8分間浸して、基板表面の有機物や金属残留物を除去した。その後流水で硫酸過水溶液を洗い流し、超純水中で超音波洗浄を約10分間行った。この間、超音波洗浄を開始して1分後、3分後、5分後に純水を入れ替えた。エアガンで乾燥させた後、シリコンウェハ上に洗浄を終えた2枚の基板を置き、図2-8に示すプラズマ照射装置（WP-100、bondtech社製）のプラズマチャンバー内にセットした。次に、チャンバー内を減圧し、酸素ガスを流入させて酸素プラズマを生成し、基板表面に照射した。この時、プラズマ照射装置の設定出力は $250\ \text{W}$ 、酸素ガスの流量は $20\ \text{ml/min}$ 、プラズマ照射時間は40秒間とした。基板をチャンバーから取り出し、セパラブルフラスコ内に $200\ \mu\text{L}$ の APTES 溶液（東京化成工業社製）とともに封入した。真空ポンプによる減圧と1気圧のアルゴ



図 2-8 プラズマ照射装置（WP-100、bondtech 社製）

ン置換を2回繰り返す、さらに5分間の減圧後に密封し、オイルバス中で120度に加熱した。2時間の反応後、過剰のAPTESを除去するために基板をトルエンに浸し5分間超音波洗浄した。ただし、APTES除外デバイスを作製する場合は、APTES気相修飾の工程をスキップした。

次に、全面がAPTESで修飾された基板に対して真空紫外光(Vacume ultraviolet, VUV)を照射し、APTESのパターンを形成した。VUVの露光にはVUVアライナーSUS746(ウシオ電機社製)を用いた。具体的には、Crパターン(3mm × 3mm、厚さ150nm)を有する石英基板とAPTES修飾基板を0.14mmの距離まで接近させ、パターンの位置を拡張ナノ流路の中央部へと合わせた後、窒素ガスを流速5NL/minで2分間導入して装置内の酸素を除去した。次に、窒素ガスを流速3NL/minで導入しながら波長172nm、照度10mW/cm²のVUVを12分間照射した。

次に、マイクロ流路を持つ基板とナノ流路を持つ基板を低温接合法によって接合した。低温接合法は、接着剤やフッ化水素酸を用いず、かつ穏やかな温度条件での接合を実現するために開発された方法であり[70]-[72]、APTESパターンを喪失することなく基板を接合することができる[65]。具体的には、ナノ流路を持つ基板を硫酸過水に約8分間浸し、流水洗浄後に超純水中で超音波洗浄を10分間行った。この間、超音波洗浄を開始して1分後、3分後、5分後に純水を入れ替えた。エアガンで乾燥させた後、シリコンウェハ上に洗浄を終えた基板とテフロン片を置き、プラズマ照射装置のプラズマチャンバー内にセットした。チャンバー内を減圧し、酸素ガスを流入させて酸素プラズマを生成し、基板表面に照射した。この時、プラズマ照射装置の設定出力は250W、酸素ガスの流量は20ml/min、プラズマ照射時間は40秒間とした。ただし、フッ素除外デバイスを作製する際にはテフロン片を用いず、フッ素添加のない酸素プラズマを照射した。取り出した基板を流水洗浄し、VUV照射後のマイクロ流路基板と貼り合わせた。貼り合わせた基板を図2-9に示す低温接合装置(μTAS100T、bondtech社製)のステージヒータ上にセットし、ステージヒータとヘッドヒータの温度を110°Cに設定し、基板を上下から挟み込んだ。温度を維持しながら上下から5000Nの力を印加してそのままの状態です3時間プレスした。その後、室温(25°C)で24時間

静置した。

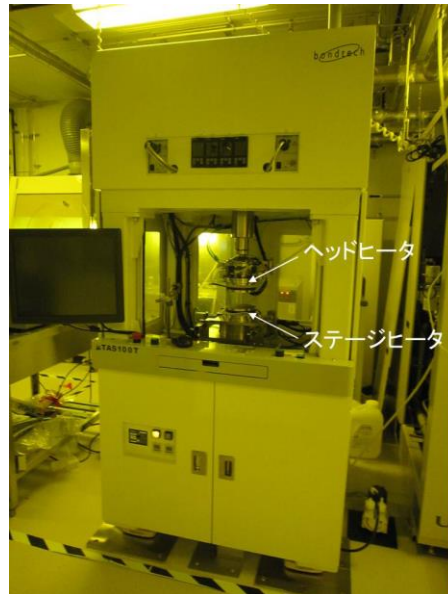


図 2-9 低温接合装置 (μTAS100T、bondtech 社製)

接合の結果、図 2-10 a に示すマイクロチップが得られた。次に、マイクロ流路・拡張ナノ流路の界面を PEG で修飾した。具体的には、水とエタノールを 5:95 の質量比で混合し、分子量 5000 の trimethoxysilane-PEG(NANOCS 社製)の粉末を添加して濃度を 0.1 wt%とした。得られた PEG 溶液をバイアル瓶に入れ、アルミニウム製の治具に固定されたマイクロチップの導入口とバイアル瓶を、PEEK 製のキャピラリーとテフロン製のネジを介して接続した (図 2-10 b)。バイアル瓶はさらに圧力コントローラー (MFCS-EZ, Fluigent 社製)と接続した。圧力コントローラーから 150 kPa の圧力を PEG 溶液に印加することで、片側のマイクロ流路に PEG 溶液を導入した。毛細管現象でナノ流路内まで PEG 溶液が満たされたことを確認後、他方のマイクロ流路には 50kPa

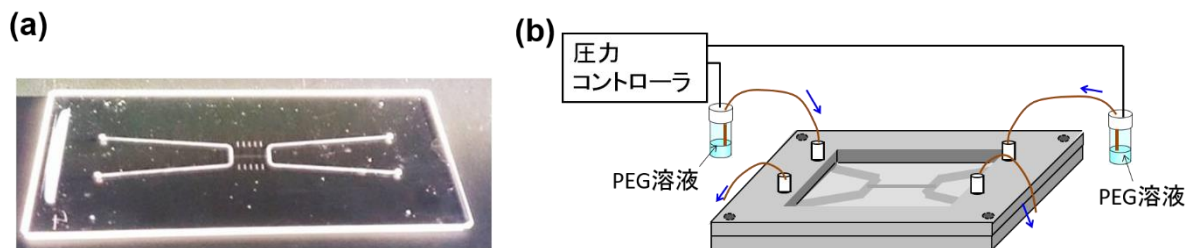


図 2-10 (a)接合されたマイクロチップ (b) PEG 修飾の実験セットアップ

の圧力で PEG 溶液を導入し、満たした。ナノ流路の左側のマイクロ流路には 150kPa を、右側のマイクロ流路には 50 kPa を印加し、この圧力差を利用してナノ流路内部へ PEG 溶液を 90 分供給し続けた。反応後、バイアル瓶の中身をエタノールとし、2 本のマイクロ流路の印加圧力をそれぞれ 450kPa, 300kPa とすることで流路内を洗浄した。最後にマイクロチップを取り外し、ホットプレートで 110°C に加熱することで流路内のエタノールを除去した。ただし、PEG 除外デバイスを作製する際には、これらの PEG 修飾工程をスキップした。

実験手順 2 : アーチファクトの評価

上記の工程によって APTES が除外されたデバイス、PEG が除外されたデバイス、F が除外されたデバイスが得られた。これらのデバイスに対して、目的分子や酵素標識抗体に由来しないアーチファクトが発生するかどうかを評価した。実験セットアップを図 2-11 a に示す。TMB 溶液で満たされたバイアル瓶・圧力コントローラー MFCS・マイクロチップをキャピラリーとテフロンネジで接続した。TMB 溶液としては、ELISA 用の基質溶液として市販されている SureBlue TMB 1-Component (KPL 社) を用いた。TMB 溶液における TMB 濃度は 1.7 mM である。POPS の励起光の波長は発色 TMB の吸収極大に近い 660 nm、強度は 20 mW とした。プローブ光の波長は 532 nm、強度は 2 mW とした。

実験のプロトコールを図 2-11 b に示す。拡張ナノ流路の両端にあるマイクロ流路に 250 kPa の圧力差を生じさせ、TMB 溶液を拡張ナノ流路内へ導入した。(以下、このような圧力操作を ” 250 kPa の圧力で拡張ナノ流路へと導入する ” と表記する。) 次に、印加圧力を 0 kPa とし、拡張ナノ流路内の流れを 60 秒間停止する。この操作は ELISA における酵素反応の工程と同一である。最後に、125 kPa の圧力で TMB を流し、下流に配置された POPS で検出した。拡張ナノ空間内に TMB 発色化学種が存在する場合、60 秒間の停止操作の間に発色した TMB が蓄積し、アーチファクトが観察されると予想される。拡張ナノ空間内から TMB 発色化学種が除外されていた場合、アーチファクトはゼロとなることが予想される。

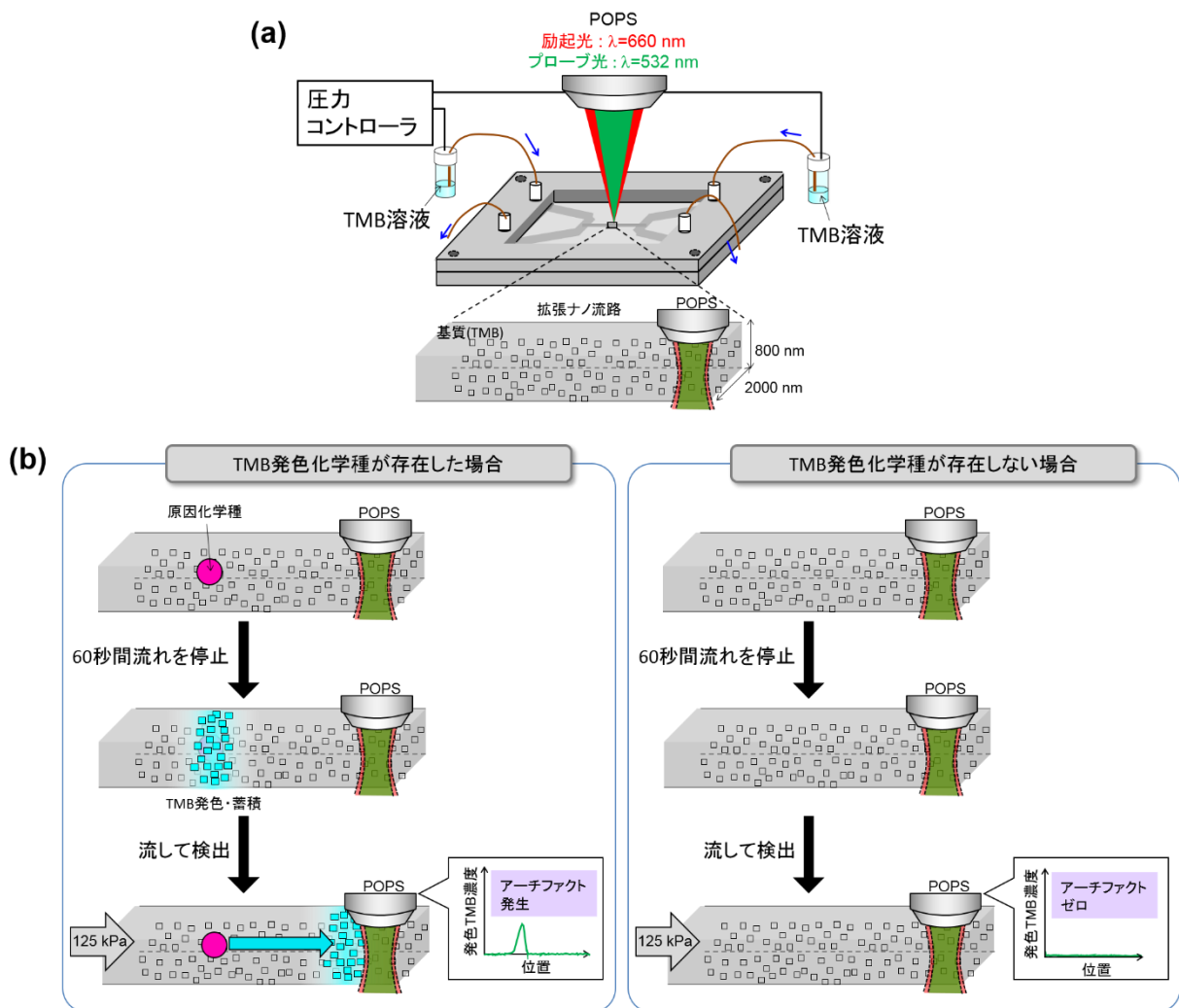


図 2-11 アーチファクトの評価実験

(a) 実験セットアップ

(b) 実験プロトコールと予想される結果

また、アーチファクトが観察された場合、その信号面積から TMB の生成量を推定するために、既知濃度の発色 TMB 溶液から生じる POPS 信号値を測定し、さらに拡張ナノ流路に 125kPa の圧力を印加した場合の TMB 溶液の流速を測定した。流速測定のプロトコールを図 2-12 a に示す。拡張ナノ流路の左側のマイクロ流路には、発色 TMB を含む溶液を導入する。拡張ナノ流路の右側のマイクロ流路には、発色 TMB 濃度ゼロの溶液を導入する。左側に 400 kPa、右側に 200 kPa の圧力を印加すると、拡張ナノ流路内の流れは右向きとなり発色 TMB 溶液で満たされる。拡張ナノ流路から右側のマイクロ流路へと発色 TMB 溶液が放出され続けるが、右側のマイクロ流路にお

ける色素濃度ゼロの溶液の流量は十分高いため、マイクロ流路へ放出される発色 TMB はただちに下流へと輸送され、発色 TMB 濃度はゼロに保たれる。従って、拡張ナノ流路と右側のマイクロ流路の接続部に濃度勾配が形成される。印加圧力を切り替え、拡張ナノ流路内部の溶液を左方向に流すと、濃度勾配が左方向へと輸送される。濃度勾配が検出点に到達すると、POPS 信号値が急激に変化し、図 2-11b に示すようなステップ状の信号が得られる。この信号の変化する時間を、濃度勾配の到達時間とする。今回は、変化前の信号平均値と、変化後の信号平均値の平均値を取り、その値を通過した時間を濃度勾配の到達時間と定義した。検出点を拡張ナノ流路の左端と右端に設定し、到達時間の差から溶液の流速を求めた。

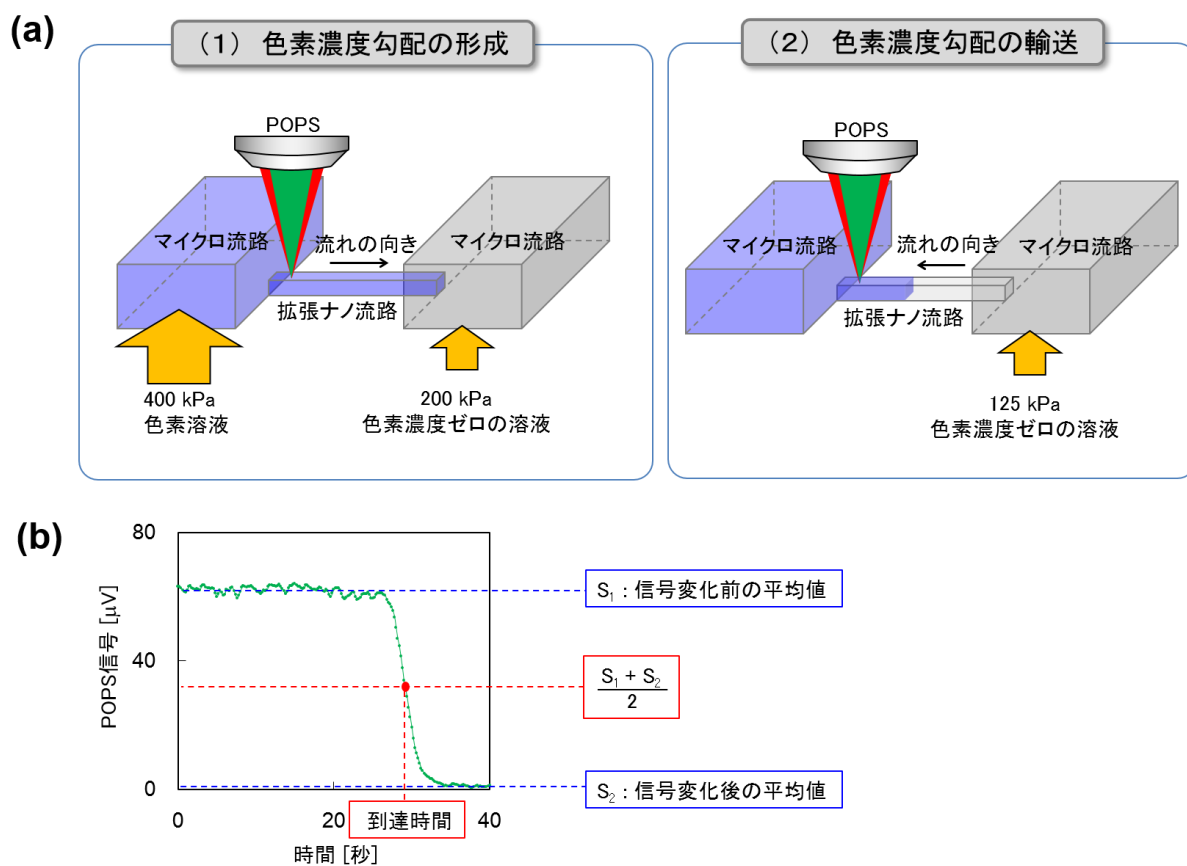


図 2-11 拡張ナノ流路における流速評価実験

(a) 流体操作プロトコール

(b) 典型的な信号データと解析法

実験結果

アーチファクトの評価実験結果を図 2-13 に示す。APTES 除外デバイス、フッ素除外デバイス PEG 除外デバイスのいずれもアーチファクトが観察された。アーチファクトは1つまたは複数のピークが重複するような形状であり、ピーク面積から TMB 分子数を推定した結果、APTES 除外デバイスでは平均 3×10^6 分子、フッ素除外デバイスでは平均 4×10^6 分子、PEG 除外デバイスでは平均 6×10^6 分子であった。これは ELISA において 3-10 目的分子に相当する。

▶ 実験条件

デバイス1	デバイス2	デバイス3
除外 APTES	APTES	APTES
F	除外 F	F
PEG	PEG	除外 PEG
Cr	Cr	Cr
電子線レジスト	電子線レジスト	電子線レジスト

▶ 結果

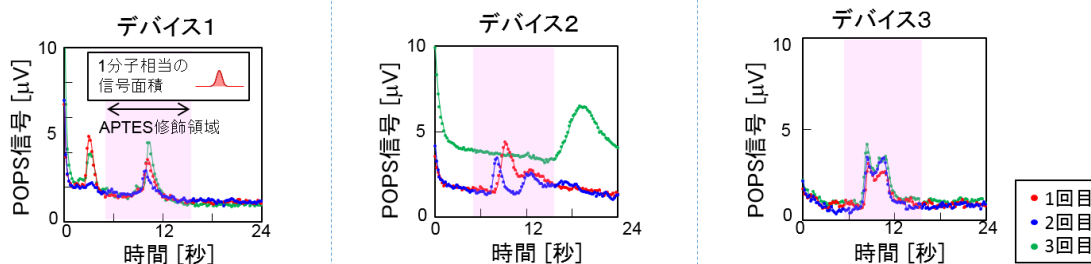


図 2-13 アーチファクトの評価実験結果

いずれの条件でもアーチファクトが観察されたことから、APTES、フッ素、PEG が単独の原因化学種ではないことがわかった。従って、残された可能性は以下の 2 通りである。

- (i) APTES、フッ素、PEG は原因化学種ではなく、他の原因化学種が存在する
- (ii) APTES、フッ素、PEG のうち複数が原因化学種である

(i) を仮定すれば、残された原因化学種の候補は Cr と電子線レジストである。

これらのうち、いくつかの Cr 化合物は強い酸化作用を持つことから、Cr が原因化学種である可能性が高いと判断した。そこで、次節では Cr について検討した。

2.4.3. Cr の検証実験

反応場における Cr の存在の確認実験

マイクロ流路の加工に用いられる Cr は、Cr エッチング液によって除去される。この Cr が反応場に微量に残留している可能性があると考え、検証実験を行った。

前節と同様の手順で拡張ナノ ELISA デバイスを加工し、接合前の基板表面の組成および化学結合状態を X 線光電子分光法 (XPS: X-Ray Photoelectron Spectroscopy) によって評価した (図 2-14 a)。具体的には、石英ガラス基板に Cr を用いてマイクロ流路を加工し、APTES 修飾し、VUV を照射した。VUV からマスクされた領域 3 箇所と、VUV が照射された領域 3 箇所を測定した。また、コントロールとして新品の石英ガラス基板を硫酸過水洗浄したものを用意し、3 箇所を測定した。分析装置として PHI 5000 VersaProbe II (アルバック・ファイ社) を用いた (図 2-14 b)。データ解析ソフトウェアとして同社の PHI MultiPak を用いた。

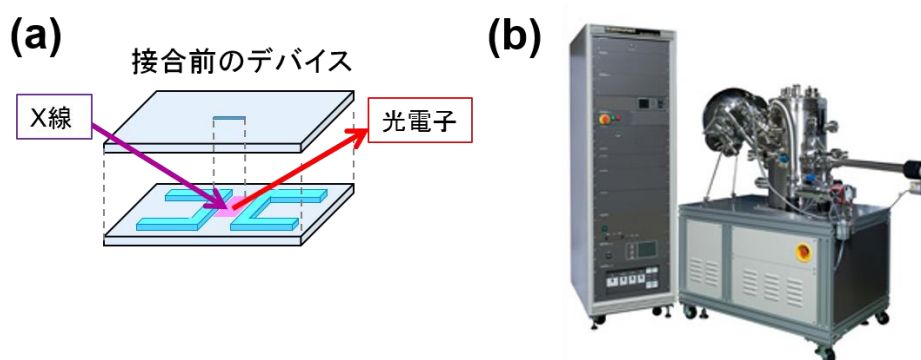


図 2-14 Cr の存在の確認実験

(a) 実験概要

(b) 利用した XPS 装置 : PHI 5000 VersaProbe II (アルバック・ファイ社製)

XPS の原理を簡単に説明する。真空中で固体表面に X 線を照射すると、X 線によってエネルギーをもらった電子が原子核による束縛から脱し、飛び出してくる。この電

電子の運動エネルギーは、X線のエネルギーから元々の電子の束縛エネルギーを引いた値となり、電子の運動エネルギーをエネルギー分光器によって測定することによって、電子の束縛エネルギーを求めることができる。束縛エネルギーは元素固有の値であり、その元素の化学状態によって変化する。従って、束縛エネルギーから表面の組成や化学結合状態を推定することができる。また、固体内で電子がエネルギーを保持したまま通過できる距離はせいぜい数 nm であるため、試料表面数 nm の元素のみの種類・量・化学状態の分析ができる。

分析の結果を図 2-15 に示す。得られた電子の束縛エネルギーから、解析ソフト MultiPak によって自動的に元素組成が求められた(図 2-15 a)。新品基板の表面からは、石英ガラスに対応する Si と O に加えて、C が検出され、Cr は検出されなかった。C は基板を装置内へ輸送するまでの間に表面に付着した有機物に由来したものと推

(a)

元素	VUVからマスクされた領域	VUVが照射された領域	新品基板(コントロール)
C (atomic %)	27.4 ± 5.9 %	12.0 ± 1.6 %	5.2 ± 0.3 %
N (atomic %)	5.2 ± 1.6 %	0.5 ± 0.9 %	0
O (atomic %)	47.7 ± 5.8 %	63.2 ± 1.6 %	65.9 ± 0.2 %
Si (atomic %)	19.3 ± 1.6 %	23.0 ± 0.7 %	28.9 ± 0.1 %
Cr (atomic %)	0.4 ± 0.1 %	1.4 ± 0.2 %	0

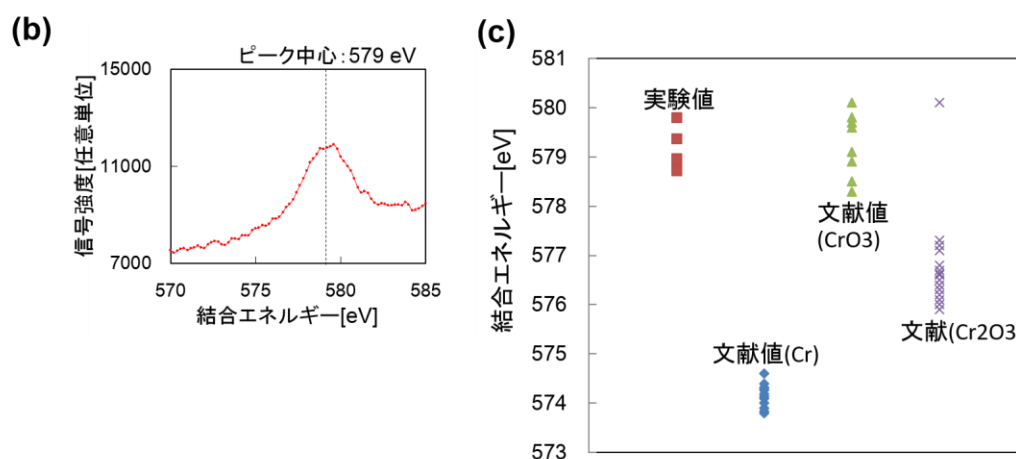


図 2-15 Cr の存在の確認実験結果

(a) 基板表面の元素組成

(b) Cr に対応した信号ピーク

(c) 結合エネルギーの実験値と Cr 化合物の文献値との比較

定される。いっぽう、デバイス接合前の基板表面からは、VUV 照射の有無にかかわらず Cr が検出された。VUV 照射領域とマスク領域では Cr の組成比に差が生じているが、これは基板表面が APTES で被覆されているかどうかによって由来していると推定される。マスク領域では APTES に含まれる N が多く検出されている。

検出された Cr の化学結合状態を推定するために、Cr に相当する信号を詳細に解析した(図 2-15 b)。ピークを中心となる結合エネルギーは 579 eV にであった。この結合エネルギーを、NIST XPS Database に掲載されている様々な Cr 化合物の結合エネルギーと照合した。検出された C, N, O, Si, Cr から成る Cr 化合物として、CrO₃, Cr₂O₃, Cr の結合エネルギーの文献値と、6 回の測定で得られた結合エネルギーを図示した(図 2-14 c)。照合の結果、デバイス表面において Cr は CrO₃、すなわち Cr(VI)の状態が存在している可能性が高いことがわかった。また、元素組成から、Cr の表面密度は 0.3 原子 / nm² と推定された。

Cr(VI)による TMB 発色の確認

Cr(VI)は強い酸化活性を有することが知られており、酸化酵素である HRP と同様に TMB を発色する可能性が高い。そこで、Cr(VI)による TMB 発色の確認実験を行った。

Cr(VI)の試薬として、K₂Cr₂O₇(東京応化工業社)の粉末を TMB 溶液 SureBlue TMB 1-Component (KPL 社)に混合し、TMB 1.7 mM と Cr(VI) 20 μM を含む溶液を調整した。30 分静置した結果、図 2-16 a に示すように TMB の発色が観察された。そこで、発色反応の速度を評価するために、混合した溶液の波長 652 nm における吸光度の時間変化を吸光度計 Ultraspec 2100 pro (Biochrom 社製、図 2-16 b)を用いて測定した。その結果、経過時間にほぼ比例して吸光度は増加した(図 2-16 c)。原点近傍の傾きから Cr(VI)1 原子あたり毎秒 2.7×10^{-4} 分子の TMB を発色させることがわかった。以上より、基板表面に残留した Cr(VI)がアーチファクトの原因化学種である可能性が極めて高いと考えられる。

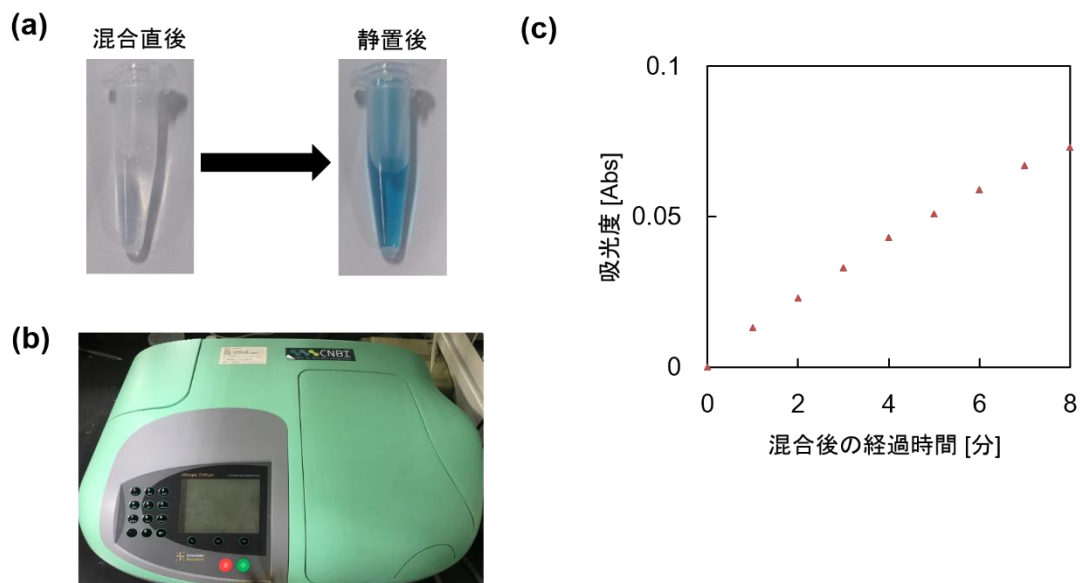


図 2-16 Cr(VI)による TMB 発色の確認実験結果
 (a) 発色した溶液
 (b) 吸光度計 Ultraspec 2100 pro (Biochrom 社製)
 (c) 波長 652 nm における吸光度の時間変化

2.4.4. Cr フリー加工プロセスの開発

前節までの考察に基づき、Cr(VI)がアーチファクトの原因化学種であると仮説を立てた。仮説が正しい場合、デバイスから Cr を完全に除去することができれば、アーチファクトは低減される。また、原因化学種が Cr のみである場合は、アーチファクトはゼロになることが期待される。そこで、Cr を用いないデバイス加工プロセスを開発した。従来の Cr を用いたプロセスとの変更箇所を図 2-17 に示す。

従来の加工プロセスでは、プラズマエッチングによるマイクロ流路加工時の保護膜として Cr を用いていた。Cr フリープロセスでは、厚膜レジストである THB-111N (ELPAC 社製)を採用した。マイクロ流路の加工の工程では、まずスピコート (1H-360S、ミカサ社製) 上に石英ガラス製基板をのせ、THB を塗布した。スピコートのレシピは 300 rpm / 10 sec、1700 rpm / 40 sec とし、THB の膜圧を 10 μm とした。次に、基板を 90°C のホットプレートで 5 分間加熱した。再度 THB のスピコートと加

熱を行い、THB の膜圧を $20\ \mu\text{m}$ とした。次に、パターンが描画されたフィルム製のフォトマスクをマスクアライナーにセットし、基板に 50 秒間紫外線を照射した。マスクがない部分には紫外線が照射され、THB は硬化する。照射後、NMD-W(テトラメチルアンモニウムヒドロキシド、東京応化工業社製)に基板を浸漬し、紫外線が照射されない部分を溶解した。このとき、60 秒間の NMD-W 浸漬、流水洗浄、窒素ガスによる乾燥の工程を 3 度繰り返した。得られた THB のマイクロパターンを保護膜としてプラズマエッチングで流路を加工し、2% 水酸化テトラメチルアンモニウム / ジメチルスルホキシド溶液に 2 日間浸漬することで THB を除去した。

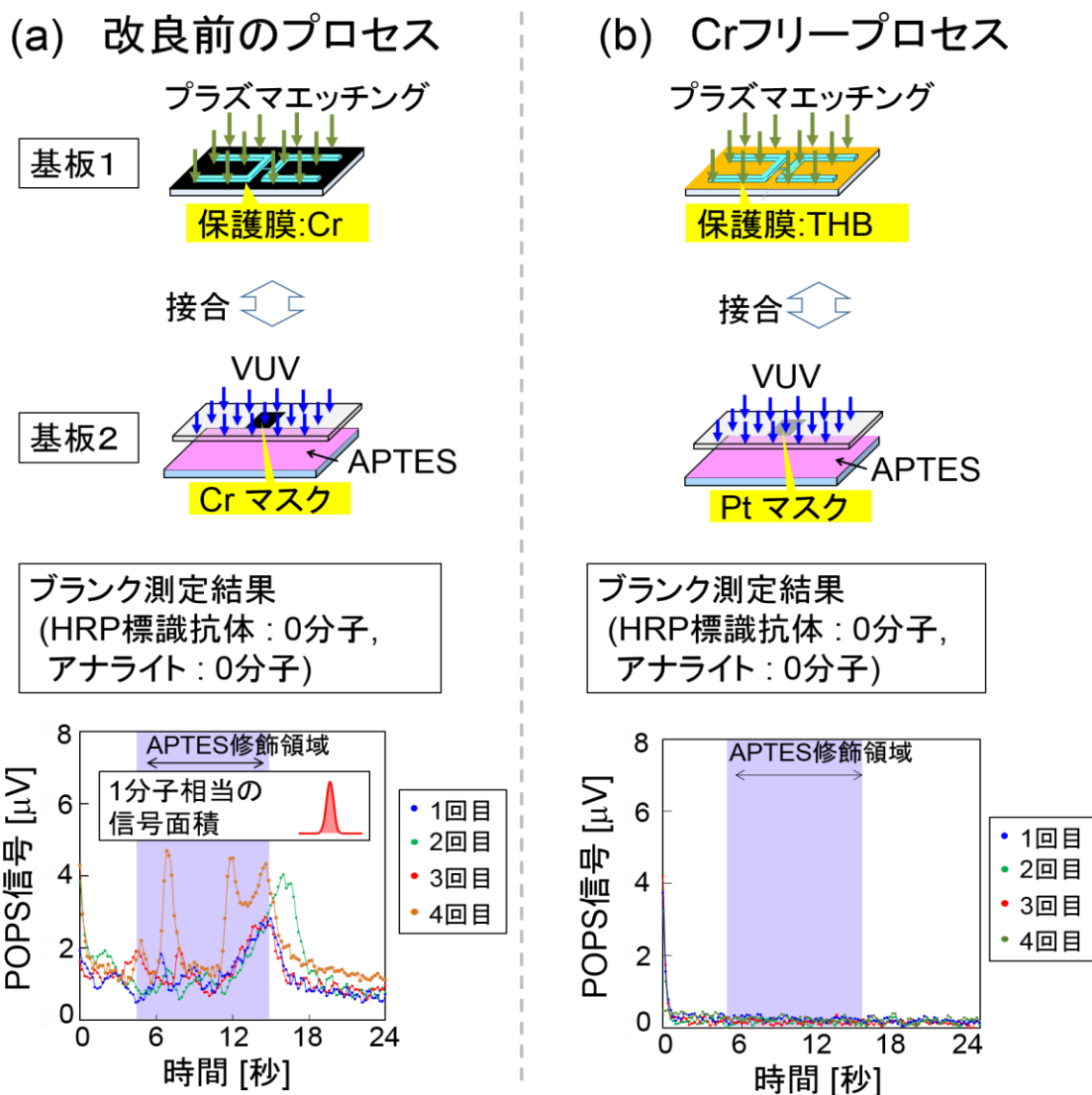


図 2-17 Cr フリープロセスの開発とアーチファクトの測定結果

また、従来の加工プロセスでは VUV のマスクとして Cr マスクを用いていたが、Cr フリープロセスでは Pt マスクを採用した。Pt マスクは THB を用いたリフトオフ法によって作製した。まず石英ガラス製基板に THB のマイクロパターンを作製し、Pt のスパッタリング後に THB を溶解した。このとき THB 上にスパッタされた Pt は基板から剥離し、THB が存在しなかった領域にのみ Pt が残存する。このようにして Pt のマイクロパターンを有するマスクを得た。

次に、得られた Cr フリーデバイスを用いて 2.4.2 節と同様のアーチファクト評価実験を行った。その結果、アーチファクトは完全にゼロとなった。従って、酵素標識抗体に由来しないアーチファクトの原因化学種は Cr 単独であることが明らかとなった。

2.4.5. 考察

まず、今回アーチファクトの原因として見出された Cr が、単一分子分析においてどのような影響を与えるかを考察した。単一の目的分子には、単一の酵素標識抗体分子が結合する。単一の酵素標識抗体分子には 4 分子程度の HRP 分子が標識される。それぞれの HRP 分子は、最大で毎秒 6,000 分子の TMB を発色させる[66]。従って、単一目的分子は毎秒 20,000 分子程度の TMB を発色させることが期待される(図 2-18)。いっぽう、2.4.3 節の実験結果によれば、Cr(VI)は 1 原子あたり毎秒 2.7×10^4 分子の TMB を発色させる。Cr(VI)が 160 amol 存在すれば、Cr(VI)に由来する TMB 発色は毎秒 20,000 分子となり、単一目的分子由来の信号と同等となる。160 amol の Cr の体積は $101 \text{ nm} \times 101 \text{ nm} \times 101 \text{ nm}$ のナノ粒子に相当する。従って、ナノ粒子 1 つ分の Cr(VI)の存在が単一目的分子相当を発生させることになる。

以上から、単一分子分析とは、デバイス内部にナノ粒子レベルの夾雑物の影響すら許されない極限的な条件であることが明らかとなった。この知見は今後 ELISA に限らず、様々な単一分子分析デバイスを創生する上で重要な指針となることが期待できる。

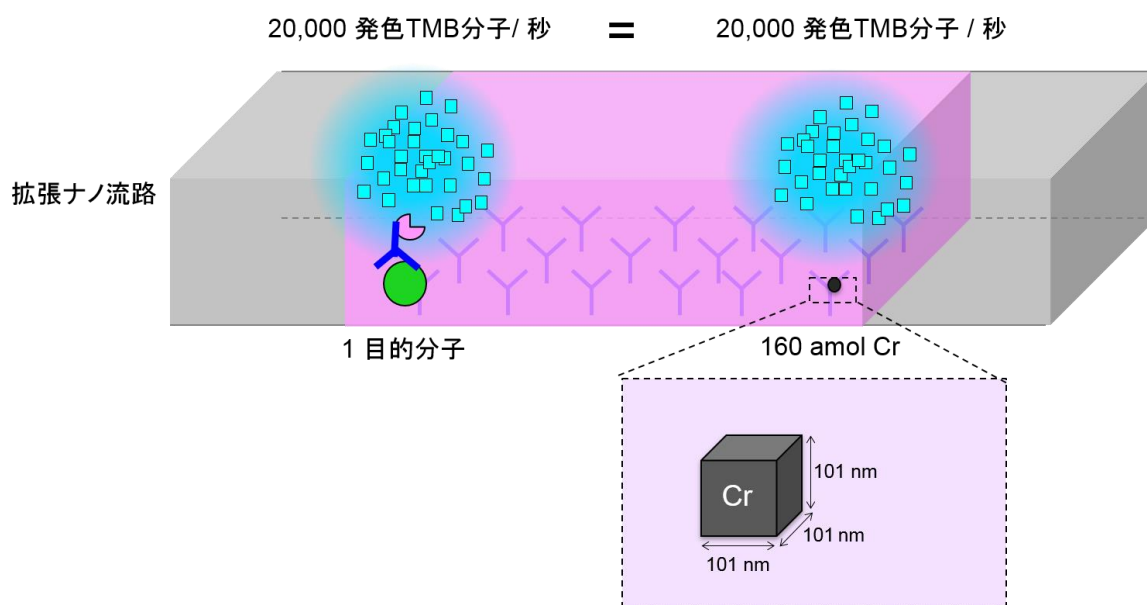


図 2-18 単一目的分子に由来する信号と
夾雑物 Cr に由来する信号のスケール比較

次に、残留 Cr の存在状態について考察した。デバイス加工プロセスにおいて、マイクロ流路の加工前はガラス基板の上に単体の Cr がスパッタされている。いっぽう、流路加工後の基板表面には、酸化した Cr が存在することが XPS の結果から示されている。従って、流路加工プロセスの中で、Cr の化学状態が何らかの要因によって変化していることがわかる。また、XPS の結果から、基板表面の Cr は CrO_3 に近い化学状態であり、基板表面には Cr・Si・O・N・C の 5 種類の元素が存在することが示唆されている。

以上を踏まえ、Cr の存在状態と、その原因を推定した。まず、基板表面の Cr は単体ではない。また、Cr は CrO_3 に近い化学状態であるものの、純粋な CrO_3 結晶である可能性は低い。というのも、残留 Cr が CrO_3 結晶である場合、水溶性の CrO_3 結晶は純粋洗浄プロセスで除去されるからである。残留 Cr の存在状態の候補として、 $\text{SiO}_2\text{-CrO}_3$ の混合酸化物が挙げられる。関連技術として、イオンビームによる界面ミキシングについて説明する(図 2-19 左)。まず Al_2O_3 や SiO_2 などの様々な基板の上に、Cr や Ni や Ti などを 20 nm 程度の厚みで成膜する。次に、膜の上から 2000 eV 程度の運動エ

エネルギーのイオンビームを照射すると、薄膜を構成する原子が基板内へと押し出され、基板と薄膜の混合層が形成される[73]。混合層では、物理的な混合のほか、化学状態が変化することもある。例えば、 Al_2O_3 を基板上にFeを蒸着してイオンビームミキシングを行った場合、界面からは Al_2O_3 やFeのほかにもFeOや FeAl_2O_4 が検出される[74]。いっぽう、本研究のデバイス加工時のプラズマエッチングプロセスにおいては、 SiO_2 基板上にCrが100 nmの厚みでスパッタされており、その上からフッ素ラジカルが数百 eV のエネルギーで照射されている(図 2-19 右)。プロセス中にCrはエッチングされ、10-50 nmの厚みとなる。これはイオンビームミキシングと類似した状態である。従って、イオンビームミキシングと同様、Crと SiO_2 の界面では混合層が形成されていることが推定される。また、XPSによればCrの存在状態は CrO_3 に近いことから、 $\text{SiO}_2\text{-CrO}_3$ の混合酸化物の形成が示唆される。 $\text{SiO}_2\text{-CrO}_3$ 混合酸化物の存在や構造は過去に示されている[75]。

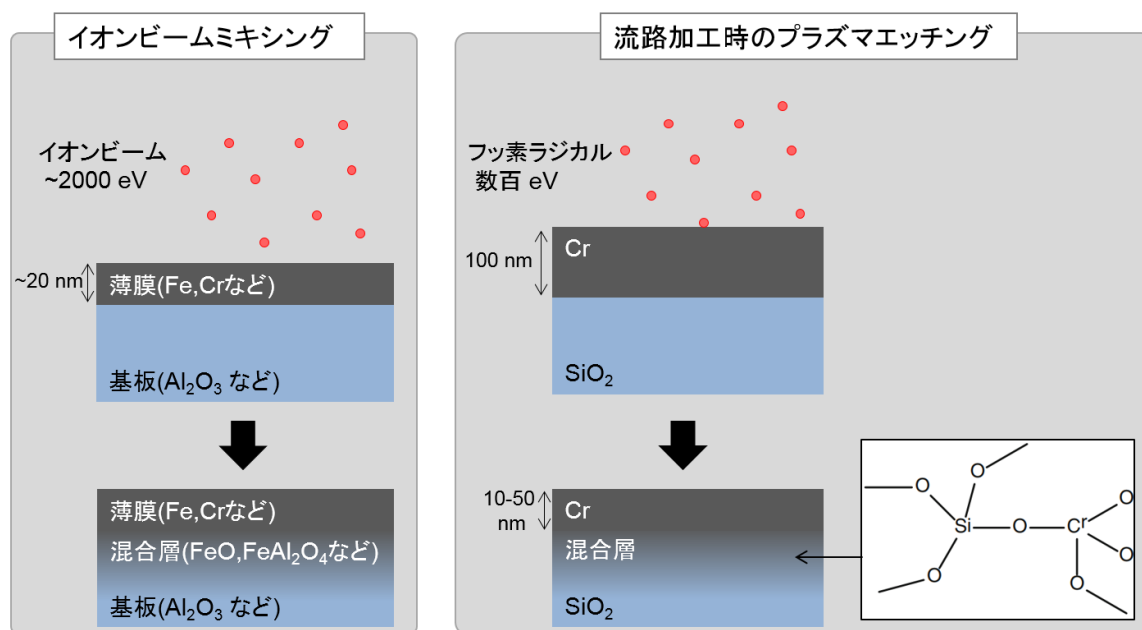


図 2-19 残留 Cr の存在状態の推定

Crの存在状態が $\text{SiO}_2\text{-CrO}_3$ の混合酸化物であるならば、一般的なCrエッチャントである硝酸二アンモニウムセリウム(IV)での除去は困難である。他の洗浄法として、酸・酸化物を用いる場合も困難である。アルカリ過水洗浄は、 $\text{SiO}_2\text{-CrO}_3$ の混合酸化物の除去が可能である。しかし、アルカリ過水洗浄はガラス基板を溶解し、流路を変形

させてしまう。従って、ELISA デバイスの加工には Cr フリーの加工プロセスを用いることが望ましい。

2.5. 酵素標識抗体の非特異吸着の検討

2.3 節では、アーチファクトの原因の候補を以下の 2 項目に分類した。

- (i) HRP 標識抗体以外の要因
- (ii) HRP 標識抗体の非特異吸着

2.4 節での検証により (i) の要因を除去することができた。そこで、本節では (ii) の影響を評価した。

実験手順 1 : 拡張ナノ流路への抗体修飾

2.4.4 節で開発した Cr フリーの加工プロセスを用いて、2 本のマイクロ流路の間に幅 2000 nm × 深さ 800 nm × 長さ 6 mm の拡張ナノ流路を有するデバイスを作製した。APTES の修飾領域は、拡張ナノ流路の長さ 6 mm のうち、端部から 1.5–4.5 mm の領域に設定した。次に、2.4.2 節と同様の手順で流路表面に PEG を修飾した。

PEG 修飾後、K. Shirai らによる拡張ナノ ELISA デバイスと同様の手順で APTES 修飾領域にグルタルアルデヒドを介して捕捉抗体を固定した[66]。グルタルアルデヒドは 2 つのアルデヒド基を持ち、抗体・APTES のアミノ基と結合する。また、本実験では目的分子として C 反応性タンパク質(CRP)を選択したことから、捕捉抗体として抗ヒト CRP モノクローナル抗体 (マウス) (オリエンタル酵母社製) を用いた。具体的には、まずマイクロ流路・拡張ナノ流路全体を純水で満たした。次に、左側のマイクロ流路を 2.5% グルタルアルデヒド / 10 mM ホウ酸緩衝液 (pH 7.0) へと置換し、50 kPa の差圧で拡張ナノ流路内に 2 時間導入し続けた。この溶液は 25%グルタルアルデヒド(和光純薬工業社製)を希釈することによって導入の直前に調整された。次に、右側のマイクロ流路に 400 kPa の圧力をかけ、200 kPa の差圧で拡張ナノ流路内に純水を導入し、10 分間リンスした。同時に両側のマイクロ流路を PBS へと置換した。次

に、右側のマイクロ流路を 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 捕捉抗体/PBS (pH 7.4) に置換し、50 kPa の差圧で拡張ナノ流路内へ 1 時間導入し続けた。PBS で 10 分間リンスした後、残されたアルデヒド基のサイトを埋めるために 0.5 M エタノールアミン / PBS を拡張ナノ流路へ 10 分間導入した。全ての試薬は使用直前にポア直径 220 nm のシリンジフィルターでろ過し、拡張ナノ流路の詰まりを抑止した。

実験手順 2 : アッセイ前ブロッキング

ELISA やウェスタンブロッティングをはじめとした様々な免疫分析法では、試薬・試料の非特異吸着による分析能の低下を防ぐためにブロッキング剤を用いた表面処理が行われている[76][77]。タンパク質は疎水性相互作用、静電的相互作用、水素結合などの様々な相互作用によって固液界面に非特異的に吸着される。酵素標識抗体はタンパク質であるため、同様に非特異的に吸着されうる。そこで、酵素標識抗体の導入に先立ち、BSA やスキムミルクなどの抗原抗体反応や酵素反応への関与が小さいと考えられるタンパク質を導入する。すると BSA やスキムミルクが基板表面のタンパク質が吸着しうる領域に次々と吸着し、被覆する。その結果、後から導入された酵素標識抗体が表面に吸着される可能性が低下し、非特異吸着が抑制される。Y. L. Jeyachandran らは表面を BSA で被覆することによる IgG の非特異吸着抑制効果を評価し、疎水表面の場合は 68%、親水表面の場合は 95%の非特異吸着をブロックすることができたと報告している[78]。このように、基板の材質に伴いブロッキングの効果は変化し、最適なブロッキング条件も異なる。

本研究では、石英ガラス表面に APTES や PEG が修飾された基板を用いている。T. Kitamori らの研究グループが開発した Thin-liquid layer ELISA デバイスは同様に石英ガラス基板を APTES・PEG で修飾した表面を用いている[79]。また、Thin-liquid layer ELISA デバイスの分析場は深さ 5.2 μm のマイクロスケールであり、拡張ナノ ELISA デバイスと近いスケールである。そこで、Thin-liquid layer ELISA デバイスで検討されたブロッキング条件は、拡張ナノ ELISA デバイスでも至適な条件である可能性が高いと考え、Thin-liquid layer ELISA デバイスで検討されたブロッキング条件を採用し

た。

具体的には、抗体修飾後、2% BSA / PBS をマイクロ・拡張流路全体に導入し、50 kPa の差圧で拡張ナノ流路内を流しながら 10 分間インキュベートした。次に、2% BSA, 0.05% Tween20 / PBS を 10 分間導入した。また、後述するアッセイの工程では酵素標識抗体を 2% BSA, 0.05% Tween20 / PBS で希釈した。

実験手順 3 : ELISA による酵素標識抗体の非特異吸着の評価

ブロッキングされたデバイスを用いて、目的分子なしの ELISA 測定により、酵素標識抗体の非特異吸着を評価した。ELISA の実験セットアップを図 2-20 に示す。治具に固定されたマイクロチップとバイアル瓶と圧力コントローラーを PEEK 製キャピラリーで接続した。サンプルとして PBS (pH 7.4) を用意した。酵素標識抗体溶液として、Anti-C Reactive Protein antibody [C6] (HRP) (アブカム社製) を 2% BSA, 0.05% Tween20 / PBS で希釈し、標識抗体濃度 0.3, 3, 6, 16, 32 nM へと調整した。TMB 溶液としては、ELISA 用の基質溶液として市販されている SureBlue TMB 1-Component (KPL

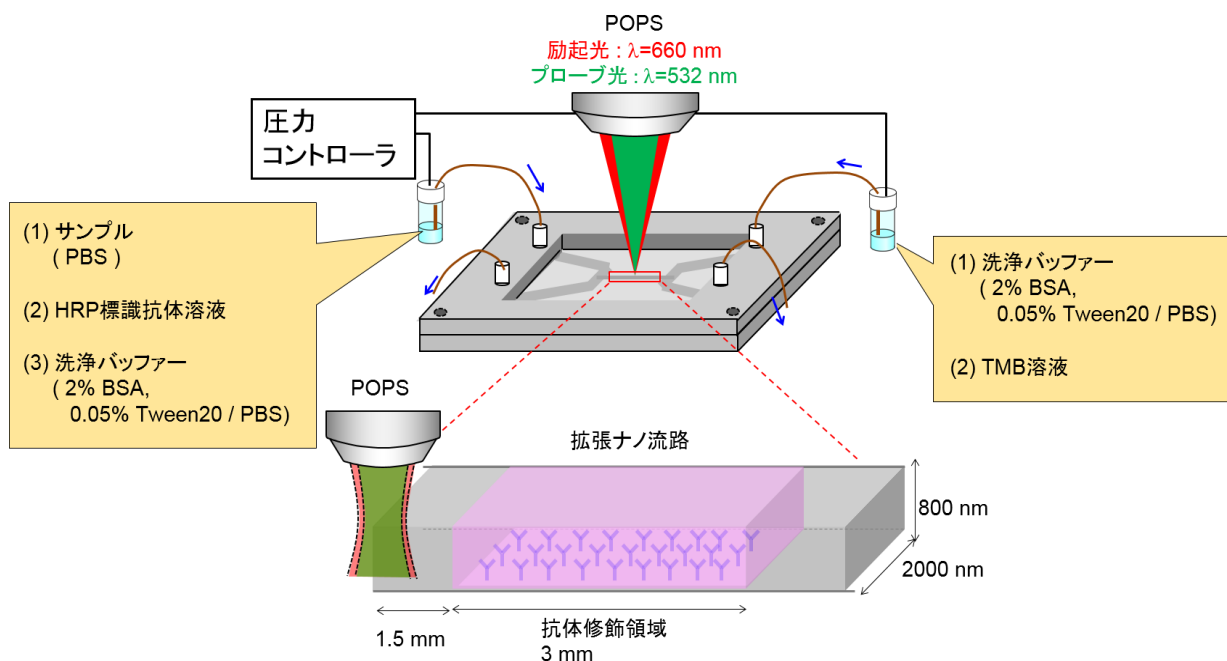


図 2-20 ELISA のセットアップ

社)を用いた。洗浄バッファーとして、2% BSA, 0.05% Tween20 / PBS を用意した。マイクロチップには幅 2000 nm × 深さ 800 nm × 長さ 6 mm の拡張ナノ流路が加工されており、拡張ナノ流路の長さ 6 mm のうち、端部から 1.5 – 4.5 mm の領域に捕捉抗体が修飾されている。拡張ナノ流路の左端から 0.3 mm の地点を検出点とし、POPS を配置した。

ELISA の流体操作プロトコールを図 2-21 に示す。まず、洗浄バッファーで拡張ナノ流路とマイクロ流路を満たした。次に左側の流路をサンプル溶液で置換した。このとき、右側には更に高い圧力を印加することでナノ流路内の流れを左向きとし、拡張ナノ流路内へサンプルが侵入することを防止した。次に、サンプルを 120 fL / sec の流量で 70 秒拡張ナノ流路内へ導入した。導入後、拡張ナノ流路をリンスするとともに左側のマイクロ流路を HRP 標識抗体溶液に置換した。次に、200 kPa の差圧で HRP 標識抗体溶液を 10 秒間導入し、拡張ナノ流路内を HRP 標識抗体溶液で満たした。流れを止めて 60 秒間インキュベートした後、拡張ナノ流路内をリンスするとともに左側のマイクロ流路を洗浄バッファーへ置換した。ここでのリンス操作は遊離の標識抗体(Free, F)と結合した標識抗体(Bound, B)の分離という、ELISA を機能させるために欠かせない重要な操作であることから、B/F 分離と呼ばれる。B/F 分離後、右側のマイクロ流路を TMB 溶液で置換し、拡張ナノ流路へと導入した。次に、印加圧力をゼロとすることで流れを止め、60 秒間酵素反応を進めた。再び TMB 溶液を流し、下流の POPS で発色した TMB を検出した。

サンプルを指定された流量で導入するために、アッセイ前にあらかじめ 2.2.4 節と同様の流速測定法によって、印加圧力あたりの流量を求めた。流体の粘度を揃えるために、2.2.4 節の流速測定法とは異なり、洗浄バッファーで希釈された 100 μM キシレンシアノール FF(和光純薬社製)を色素溶液として用いた。デバイスごとに結果は異なるが、15~20 kPa の印加圧力が採用された。



図 2-21 ELISA の流体操作プロトコール

実験結果

HRP 標識抗体濃度 0.3, 3, 6, 16, 32 nM の条件でそれぞれ 3 回ずつ測定し、得られた POPS 信号を図 2-22 に示す。HRP 標識抗体濃度 0.3 nM の条件ではアーチファクトは観察されなかった。HRP 標識抗体濃度 3 nM 以上の条件では単一のピークもしくは複数のピークが重複したような形状のアーチファクトが観察され、HRP 標識抗体濃度が大きいほどアーチファクトは大きくなる傾向が観察された。

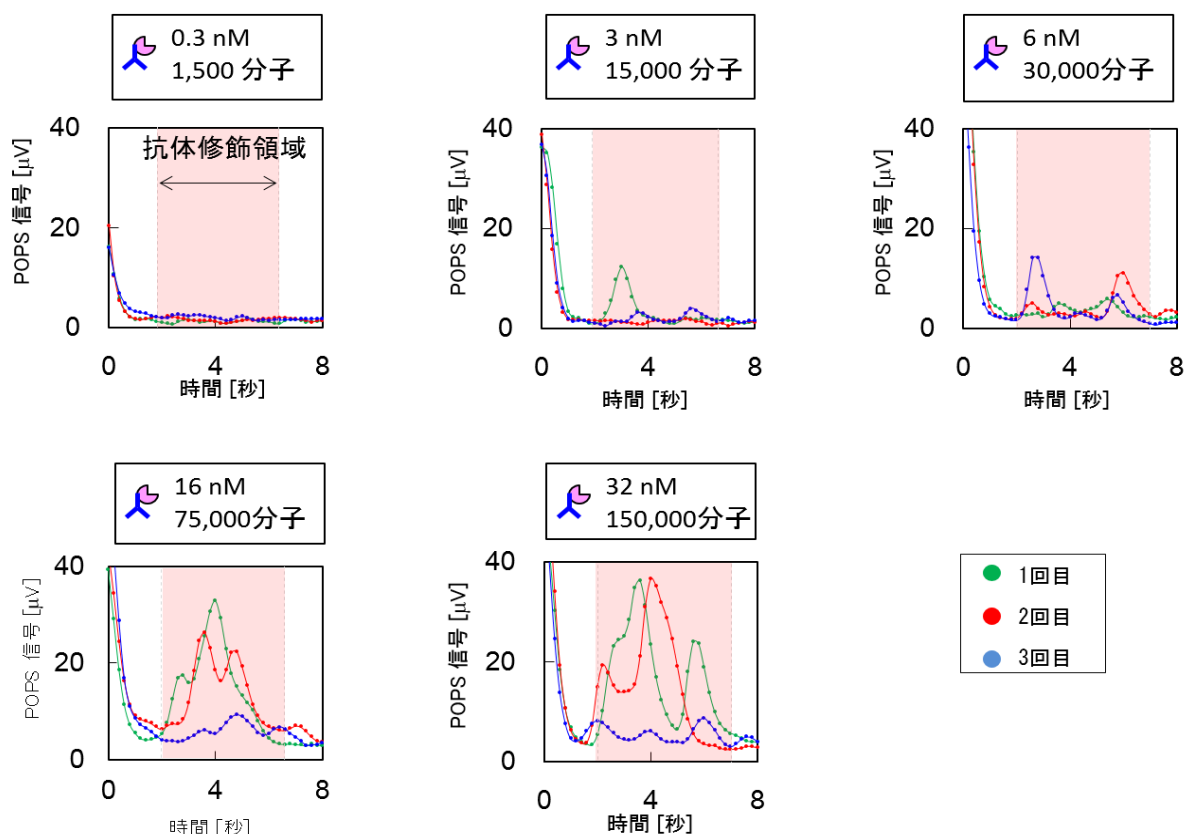


図 2-22 HRP 標識抗体の非特異吸着に由来するアーチファクトの評価実験結果

これらのアーチファクトがどれだけの HRP 標識抗体の非特異吸着に由来するかを推定するために、図 2-22 の生データの縦軸を TMB 濃度に変換し、横軸を拡張ナノ流路内の位置へと変換した(図 2-23 a)。縦軸の変換には既知濃度の発色 TMB 溶液から得られる POPS 信号値を用いた。横軸の変換には 2.2.4 節と同様の TMB 流速測定結果を用いた。得られたグラフは、TMB 溶液の流れを止めて 60 秒間インキュベートした直後における拡張ナノ流路内の発色 TMB 濃度分布を推定するものである。アーチファ

クトを解析ソフト Igor の multi peak fitting プラグインを用いてピークフィットし、その面積を求めた。アーチファクト面積の HRP 標識抗体濃度依存性を図 2-23 b に示した。アーチファクトの面積は HRP 標識抗体濃度にほぼ比例する傾向が観察された。最小二乗法で直線近似すると、その傾きは $1.1 \mu\text{M} \cdot \text{mm} / \text{nM}$ であった。いっぽう、単一分子信号は $1.4 \mu\text{M} \cdot \text{mm}$ 程度であると推定される。(単一の酵素標識抗体から生成される発色 TMB は、抗体 1 分子あたりの HRP 分子数 4 と、HRP のターンオーバー $6000 / \text{sec}$ と、反応時間 60 秒を掛けることで計算され、 1.4×10^6 分子程度と推定される。この値を流路の断面積で割ると $1.4 \mu\text{M} \cdot \text{mm}$ である。) HRP 標識抗体濃度 1.3 nM の条件では、単一分子信号相当のアーチファクトが平均的に観察されることが予想される。

平均 1 分子の非特異吸着が発生するような条件下で、実際にどれだけの非特異吸着が発生するかは、吸着現象が確率過程であることからポアソン分布で与えられると考えられる。非特異吸着が平均 1 分子の場合、非特異吸着がゼロとなる確率は 37% である。非特異吸着がゼロとなる確率を 90% 以上とするには、平均 0.105 分子以下の非特異吸着が発生するような条件が要求される。アーチファクトが平均 0.105 分子相当、すなわち $0.14 \mu\text{M} \cdot \text{mm}$ 以下になる条件は、図 2-23 b のグラフの傾きから推定すると 0.1 nM である。実際に 0.3 nM での測定結果はいずれもアーチファクトゼロであり、HRP 標識抗体濃度 0.1 nM 以下に設定することでアーチファクトゼロの分析が実現することが期待される。

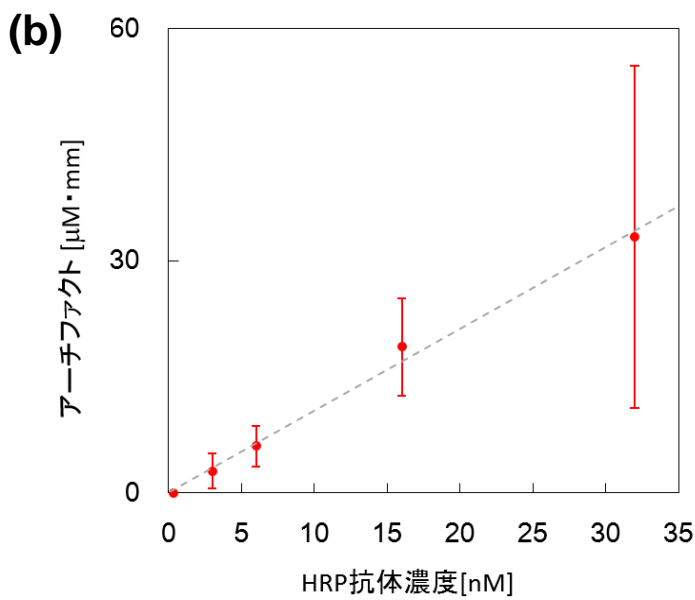
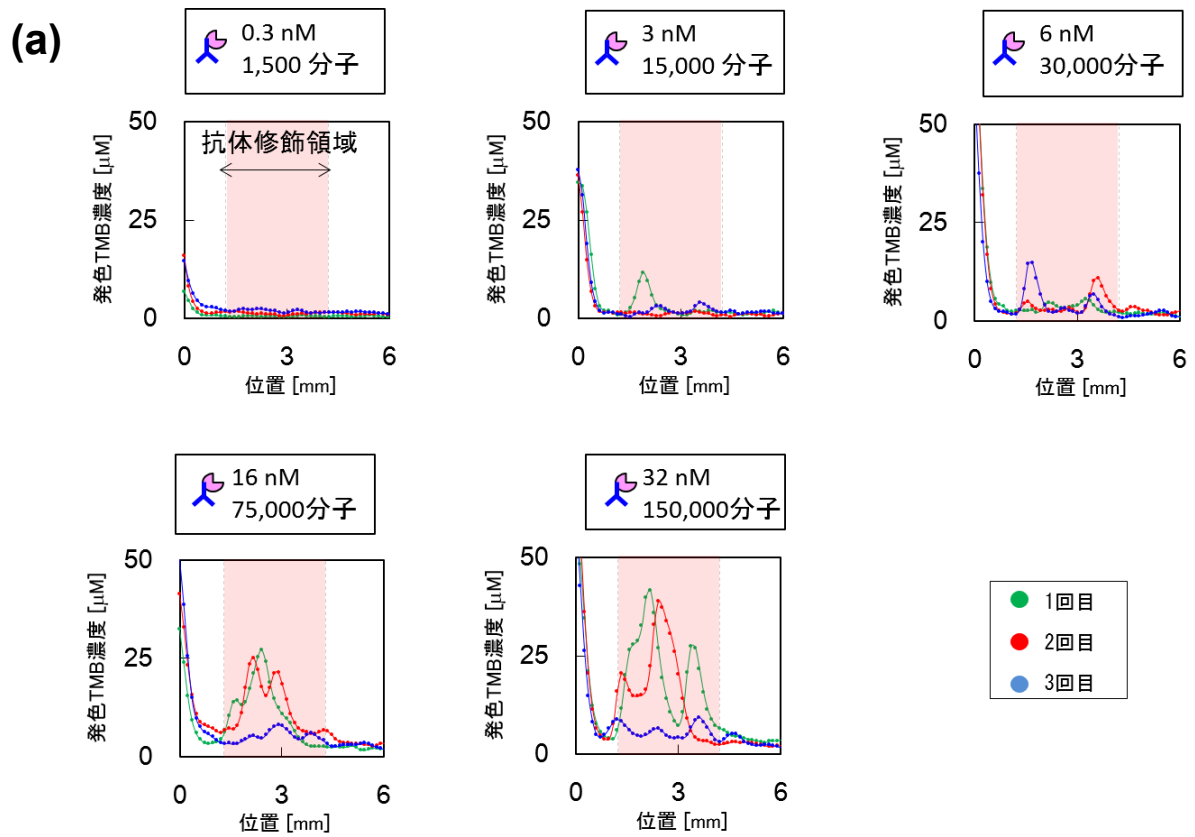


図 2-23 アーチファクトに由来する HRP 標識抗体数の推定
 (a) 拡張ナノ流路内の発色 TMB 濃度分布の推定
 (b) アーチファクト面積の HRP 標識抗体濃度依存性

2.6.まとめ

第二章では、拡張ナノ流体デバイスを用いた ELISA において、アーチファクトの発生要因を解明し、単一分子レベルのアーチファクトすら取り除くことに成功した。

まず、アーチファクトの発生要因を推定した。従来の ELISA においてアーチファクトの発生要因は主に酵素標識抗体の非特異吸着であったが、本研究では酵素標識抗体に由来しない要因が存在することを見出した。そこで、酵素標識抗体に由来しない要因を探索した。多くの化学種が用いられるデバイス加工プロセスに着目し、APTES、フッ素、PEG、電子線レジスト、Cr を原因化学種の候補とした。検証の結果、デバイス表面に微量に残留した Cr が TMB を酸化し、アーチファクトの原因となっていることが明らかとなった。そこで Cr フリーの加工プロセスを開発し、酵素標識抗体に由来しないアーチファクトを完全に除去することに成功した。ELISA において単一目的分子に由来する信号は、わずか 100 nm の粒子に相当する量の Cr によってマスクされることが推定された。従って、将来さまざまな単一・可算個分子分析デバイスを創生するには、微量な夾雑物すらも影響を考慮する必要があるという指針を獲得した。

また、酵素標識抗体の非特異吸着の影響を評価した。酵素標識抗体の濃度を 0.3 nM とした条件では、3 回の測定でアーチファクトはゼロとなった。また、酵素標識抗体濃度を 0.1 nM 以下とすることで、アーチファクトを 90%以上の確率でゼロにできることが推定された。

第三章 単一分子領域における検出効率の検討

3.1. 緒言

3.1.1. 本章の背景

第一章で述べたように、目的分子が単一・可算個分子である場合、わずか単一分子のロスが分析の結果に大きな影響を与える。従って、単一・可算個分析では目的分子をロスすることなく化学プロセッシング・検出する必要がある。そこで、目的分子のロスの指標として、以下のように定義される「検出効率」を導入した。

検出効率 = 実際に検出される目的分子数 ÷ サンプルに含まれる目的分子数

例として、検出効率が 50%であるような分析法を図 3-1 に示した。まず、従来の ELISA のように目的分子が無数に存在する場合を考える(図 3-1 a)。サンプルに含まれる目的分子は、化学プロセッシングを経て、検出される。このとき、導入された目的分子の 50%が何らかの原因によって検出の対象から外れると、残りの 50%のみが検出され、検出効率は 50%となる。信号の大きさも、検出効率 100%の場合と比べて半分となる。しかしながら、検出効率が常に 50%であるならば、信号強度はサンプル中の目的分子数に比例する。検出効率が 100%ではなくても検量線を書くことは可能であり、定量分析に影響は与えない。このように、目的分子が無数に存在する従来の ELISA では、検出効率が 100%であることは要求されない。要求されるのは、検出効率のばらつきが小さいことである。

いっぽう、目的分子が単一・可算個である場合を考える(図 3-1 b)。導入された目的分子は、50%の確率で検出の対象から外れる。サンプルに含まれる目的分子が 2 分子であった場合、検出される分子数は 2 のケースもあれば、1 のケースもあれば、0 となるケースもある。逆に、検出された分子数が 1 であった場合、もともとサンプルに含まれていた目的分子数が 1 であったのか、2 であったのか、3 であったのかを決定

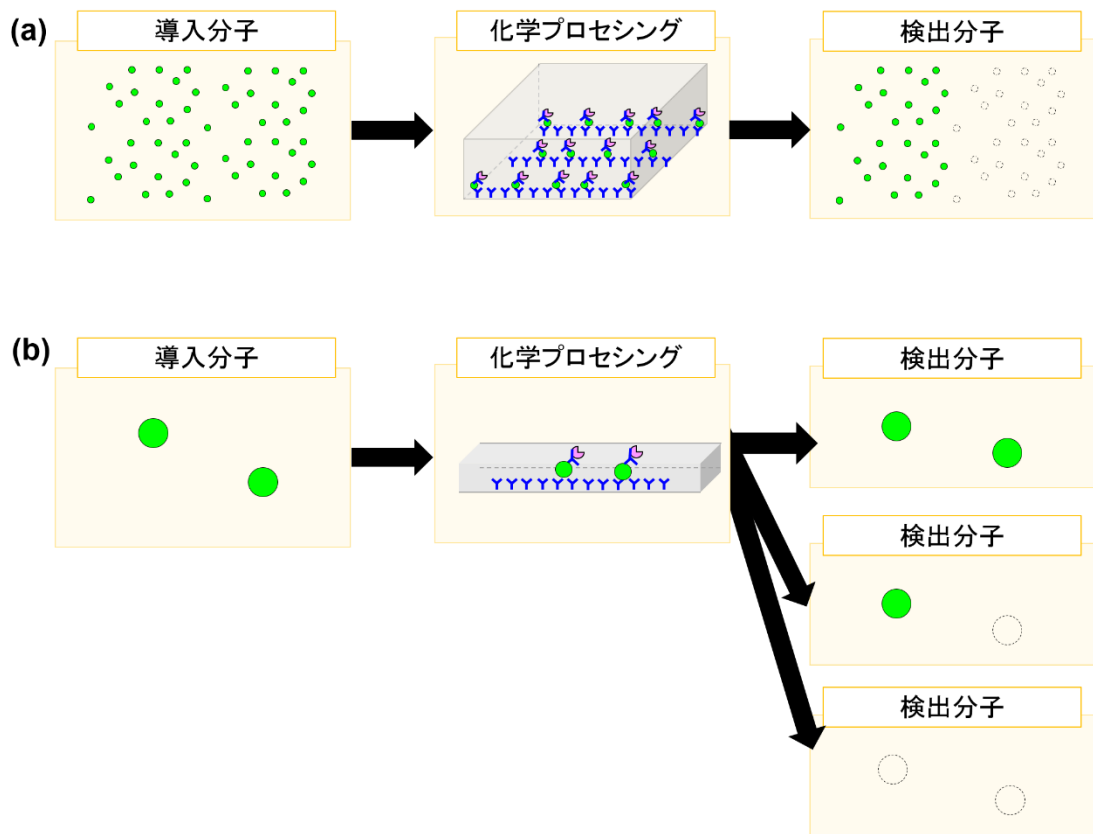


図 3-1 検出効率が 50%である分析法

- (a) 目的分子が無数に存在する場合
- (b) 目的分子が単一・可算個である場合

することはできない。従って、従来のバルクスケールの ELISA とは異なり、単一・可算個分子分析では検出効率を 100%に近づけることが要求される。

そこで、拡張ナノ ELISA デバイスにおいて検出効率に影響する可能性のある要因を考えた。ELISA において目的分子が検出対象から外れるケースを図 3-2 に示す。導入された分子はまず界面に修飾された抗体に捕捉される。捕捉されなかった目的分子は次の洗浄操作によって除去され、検出の対象から外れる。捕捉された目的分子は次に酵素標識抗体と結合することが期待される。酵素標識抗体と結合しなかった目的分子は TMB を発色させることができないので、検出の対象から外れる。酵素標識抗体との反応から検出までの間には、B/F 分離・TMB の導入の工程がある。この間に目的分子に結合していた酵素標識抗体が脱離・流失すると、検出の対象から外れる。残された目的分子のみが検出の対象となる。

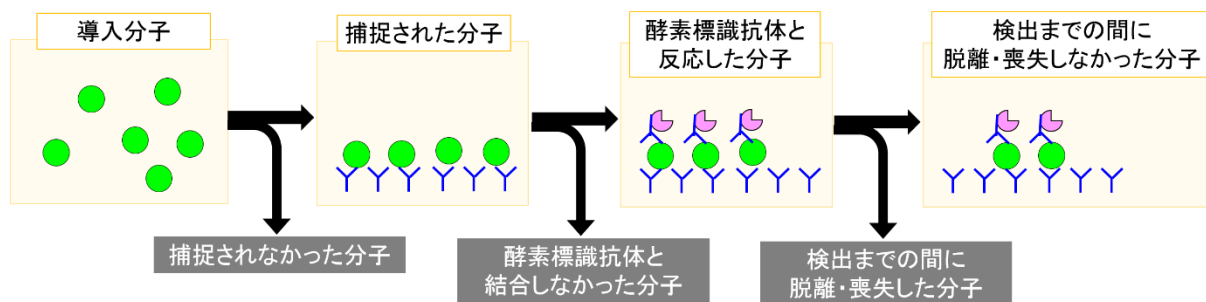


図 3-2 目的分子が検出対象から外れるケース

以上から、検出効率に影響する可能性のある要因を以下の 3 項目に分類した。

- (i) 目的分子の捕捉率
- (ii) HRP 標識抗体の反応率
- (iii) HRP 標識抗体・目的分子の脱離率

(i) に関して、K. Shirai らは抗体が修飾された拡張ナノ流路に抗原を導入し、数秒の反応で 100%が捕捉されることを示している[65]。現在の拡張ナノ ELISA デバイスでは、サンプルが抗体修飾領域上を通過する時間を 30 秒としている。従って、目的分子の捕捉率は 100%に達している可能性が高い。いっぽう、(ii) (iii) の影響については、単一分子分析法の確立のためには新たに検証が必要である。

(ii) HRP 標識抗体の反応率の検証には、HRP 標識抗体の導入条件の検討が必要であると考えられる。また、(iii) HRP 標識抗体あるいは目的分子の脱離率の検討には、B/F 分離時間の影響評価が必要であると考えられる。従って、拡張ナノ ELISA デバイスを用いた数多くの測定が必要である。従来のバルクスケールの ELISA では 96 個のウェルを持つプレートが一般的に用いられ、1 枚のプレートで 96 種類の条件を同時に測定できる。しかしながら、拡張ナノ ELISA デバイスでは 1 度に測定可能な条件は 1 種類であり、さらにデバイス 1 つの加工に多くの時間とコストを必要とする。測定 1 回につき 1 枚のデバイスを作製する場合、ELISA の条件検討には現実的ではないコストと時間が必要となる。従って、1 つのデバイスで複数回の測定する手法の開発

が課題である。

3.1.2. 本章の目的

以上から、拡張ナノ ELISA デバイスにおける検出効率の検討を本章の目的とした。具体的には、以下の3つの項目に取り組んだ。

- (i) 拡張ナノ ELISA デバイスの繰り返し測定法の開発
- (ii) 酵素標識抗体の反応率の検証
- (iii) 目的分子の脱離の検証

(i) の内容を 3.2 節に、(ii) の内容を 3.3 節に、(iii) の内容を 3.4 節に示した。また、結論を 3.5 節にまとめた。

3章の以降の内容を、特許申請のために非公表とさせていただきます。

第四章 単一・可算個分子定量法の確立

4.1. 緒言

単一・可算個分子分析の実現に向けた課題として、単一・可算個分子分析においては1分子レベルのアーチファクトや1目的分子のロスすらも許されないことを第一章で述べた。そこで、第二章ではアーチファクトの原因解明と低減に取り組み、アーチファクトをゼロとするための知見を得た。第三章では、目的分子をロスせず 100% 検出するために、検出効率に影響を与える要因を検討した。本章では、第二章と第三章で得た知見をもとに、単一・可算個分子レベルの定量分析手法の確立を目指した。

具体的には、以下の3つの項目に取り組んだ。

- (i) 二章・三章の知見をもとにした単一・可算個分子定量デバイスの設計・製作
- (ii) 単一・可算個分子定量の実証

(i) の内容を 4.2 節に、(ii) の内容を 4.3 節に示した。また、結論を 4.4 節にまとめた。

4.2. 単一・可算個分子定量デバイスの設計・製作

第二章・第三章で得られた知見は以下の4項目である。

- (i) Crに由来するアーチファクトが発生する
- (ii) HRP 標識抗体濃度を 0.3 nM 以下とすることで非特異吸着に由来するアーチファクトをゼロとできる
- (iii) 3章の内容：特許申請のために非公表とさせていただきます。
- (iv) 3章の内容：特許申請のために非公表とさせていただきます。

(i) は Cr フリープロセスの採用により解決済みである。(ii) (iii) は、現状のデバイスでは両立しない。両立には、非特異吸着を低減する何らかの革新的な技術開発が必要である。(iv) は、従来の拡張ナノ ELISA デバイスの設計では困難であるが、新規デバイスの開発によって解決しうる。そこで、本章では (iv) に着目し、B/F 分離時間を短縮可能なデバイスの開発に取り組んだ。

デバイスの設計

従来の拡張ナノ ELISA デバイスの流路デザインは、図 4-1 のように2本の試薬導入用マイクロ流路と、その間の拡張ナノ流路から構成されていた。このようなシンプルなデザインは拡張ナノ流路内の流体操作が容易であり、拡張ナノ流体デバイスを用いた種々の研究で用いられてきた[96]。しかし、このデザインで同時にデバイス内に導入できる試薬は2種類のみであり、数多くの試薬を用いる ELISA では工程ごとにマイクロ流路内の試薬を置換する操作が必要である。このことは、脱離の影響のあるプロセス時間を短縮する上で問題となる。

HRP 標識抗体を導入後、ただちに B/F 分離を行うには、2本のマイクロ流路内は HRP 標識抗体溶液と洗浄バッファーで満たされていることが必須である。従って、次

に TMB 溶液を導入するにはマイクロ流路内を置換する必要がある。図 4-1 の例では、B/F 分離のために洗浄バッファを右から導入している。このとき、置換できるマイクロ流路は左側であるが、マイクロ流路内における HRP 標識抗体溶液と TMB 溶液の混合を防ぐため、まず左側のマイクロ流路を洗浄バッファで置換し、その後右側のマイクロ流路を TMB 溶液で置換することで、はじめて拡張ナノ流路内へ TMB が導入可能となる。ここまでにマイクロ流路の置換が 2 度必要であり、それぞれ 90 秒程度の時間が必要である。また、置換作業はバイアル瓶の交換作業を伴い、20-50 秒の時間を要する。合計すると、HRP 標識抗体の導入から TMB 溶液導入までに 300 秒が経過する。以上の理由から、試薬導入用マイクロ流路が 2 本のみのデザインでは ELISA のプロトコルが制約され、脱離の影響のあるプロセス時間は 300 秒以下とすることが困難である。また、3.4.2 節の実験結果によれば、脱離の影響のあるプロセス時間が 300 秒である場合、25%の目的分子がロスしていると推定される。

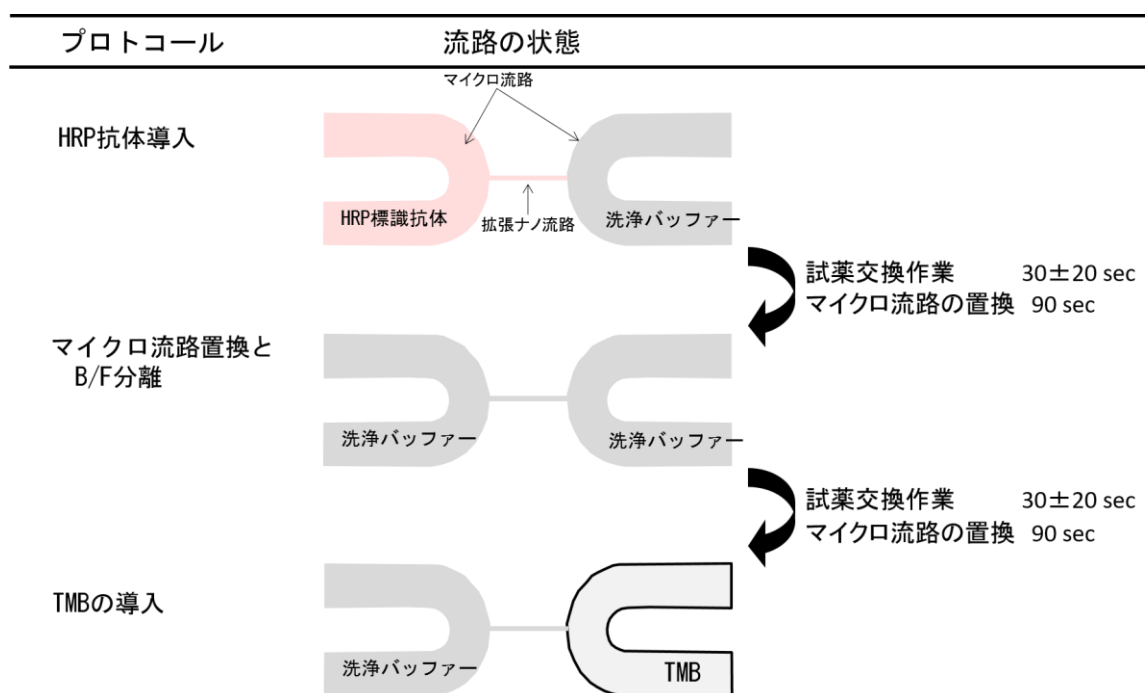


図 4-1 2本の試薬導入用マイクロ流路を持つデザインの問題点

従来のデザインにおける問題点を解決するために、試薬を迅速に切り替え可能なデ

バイスを新たに設計した(図 4-2 a)。そこで、マイクロ流路の置換操作を排除するために、試薬導入用のマイクロ流路を 6 本設け、ELISA で用いられる試料・試薬（洗浄バッファ・サンプル・酵素標識抗体溶液・TMB、POPS のキャリブレーション用の標準色素溶液）を常にマイクロチップ内に保持できるようにした。拡張ナノ流路の両端には、T 字型の試薬切り替え流路(幅 40 mm × 深さ 800 nm × 分岐点から端部までの長さ 1 mm)が存在し、それぞれ 3 本のマイクロ流路へと接続されている。ハーゲンポアズイユ流れを仮定すると、それぞれの流路における流量と圧力損失の比（電気回路での抵抗に相当する値）が、マイクロ流路：切り替え流路：拡張ナノ流路 = 1:10²:10⁴ となるように設計されている。これは、流路ネットワークにおける流れの向きと大きさのコントロールの単純化を目的としている。拡張ナノ流路・切り替え流路の回路図を図 4-2 b に示す。6 つのマイクロ流路における圧力をそれぞれ $P_1, P_2, P_3, P_4, P_5, P_6$ とおく。拡張ナノ流路左端の圧力を P_{left} 、拡張ナノ流路右端の圧力を P_{right} とおく。切り替え流路における圧力損失と流量の比を抵抗 r と定義し、拡張ナノ流路における圧力損失と流量の比を抵抗 R と定義する。また、拡張ナノ流路における流量を I_{nano} 、切り替え流路における流量を $I_1, I_2, I_3, I_4, I_5, I_6$ とおく。圧力損失と流量の比や、物質収支から以下の方程式が得られる。

$$P_1 - P_{\text{left}} = rI_1 \quad 1$$

$$P_2 - P_{\text{left}} = rI_2 \quad 2$$

$$P_3 - P_{\text{left}} = rI_3 \quad 3$$

$$P_4 - P_{\text{right}} = rI_4 \quad 4$$

$$P_5 - P_{\text{right}} = rI_5 \quad 5$$

$$P_6 - P_{\text{right}} = rI_6 \quad 6$$

$$I_1 + I_2 + I_3 = I_{\text{nano}} \quad 7$$

$$I_4 + I_5 + I_6 = -I_{\text{nano}} \quad 8$$

$$P_{\text{left}} - P_{\text{right}} = R I_{\text{nano}} \quad 9$$

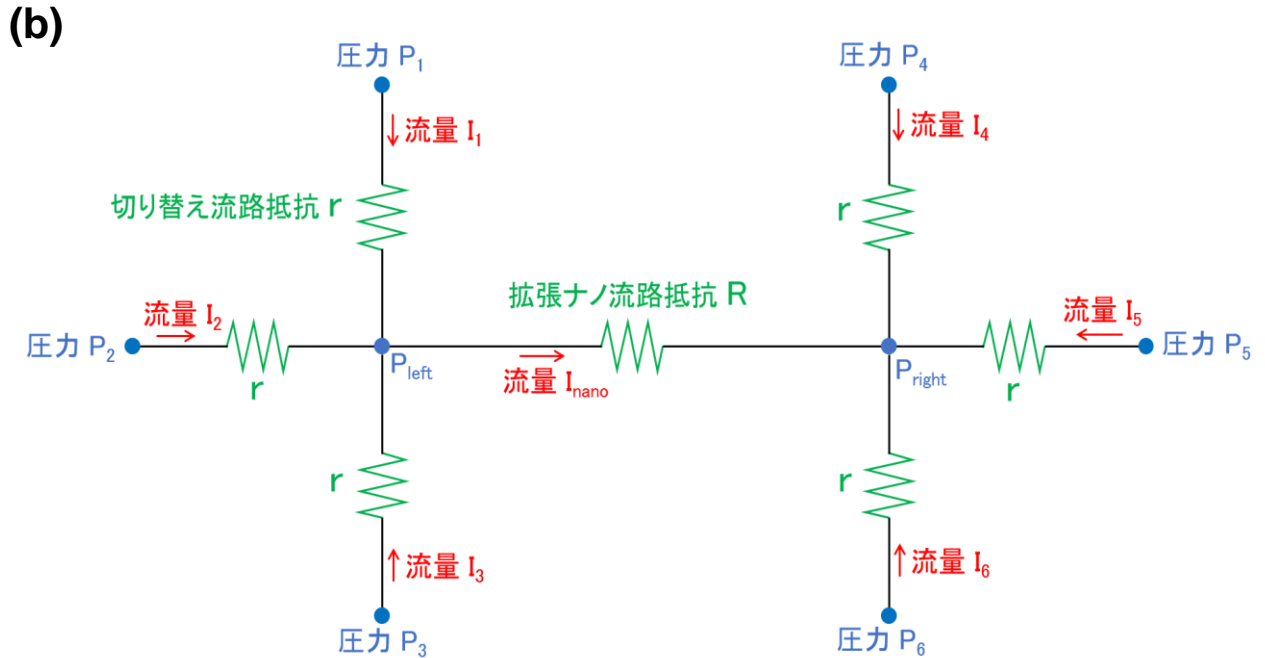
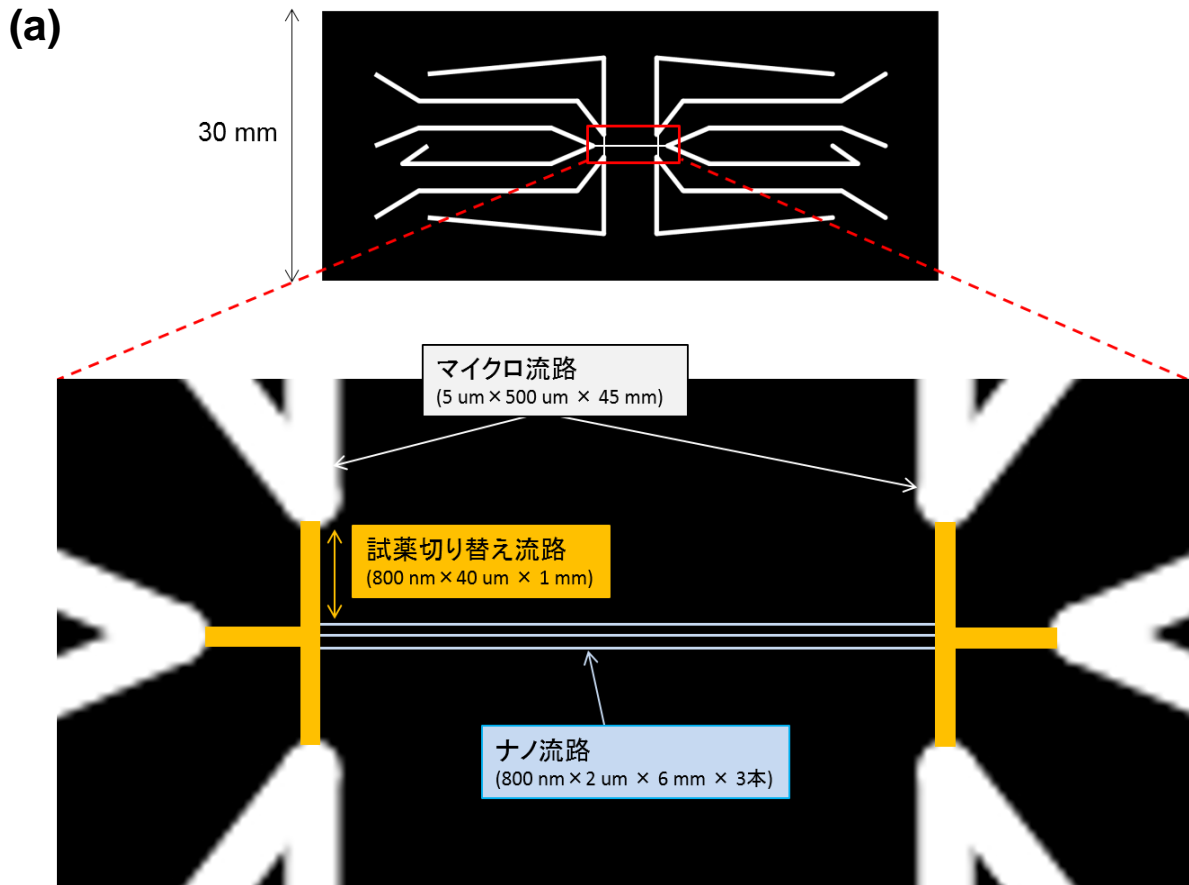


図 4-2 試薬を迅速に切り替え可能なデバイスのデザイン
(a) 流路の寸法 (b) 切り替え流路・拡張ナノ流路の回路図

式 1, 2, 3, 7 から以下の式 10 が得られる。

$$P_{\text{left}} = P_{123\text{average}} - \frac{r}{3} I_{\text{nano}} \quad 10$$

式 4, 5, 6, 8 から以下の式 11 が得られる。

$$P_{\text{right}} = P_{456\text{average}} + \frac{r}{3} I_{\text{nano}} \quad 11$$

ただし、 $P_{123\text{average}}$ は P_1, P_2, P_3 の平均値、 $P_{456\text{average}}$ は P_4, P_5, P_6 の平均値である。式 10, 11 の差をとり、式 9 を代入することで I_{nano} が求められる。

$$I_{\text{nano}} = \frac{P_{123\text{average}} - P_{456\text{average}}}{R + \frac{2r}{3}} \quad 12$$

式 12 を式 10 に代入することで、 P_{left} が求められる。

$$P_{\text{left}} = P_{123\text{average}} - \frac{\frac{r}{R}}{3 + 2\frac{r}{R}} (P_{123\text{average}} - P_{456\text{average}}) \quad 13$$

式 12, 13 は、 R が r に比べて十分大きい場合、以下のように近似される。

$$P_{\text{left}} \sim P_{123\text{average}} \quad 14$$

$$P_{\text{right}} \sim P_{456\text{average}} \quad 15$$

$$I_{\text{nano}} \sim \frac{P_{123\text{average}} - P_{456\text{average}}}{R} \quad 16$$

以上の式から、まずは拡張ナノ流路内の流れの制御を考える。拡張ナノ流路の左端には P_1, P_2, P_3 を平均した圧力がかかり、拡張ナノ流路の右端には P_4, P_5, P_6 を平均した圧力がかかる。左端と右端の圧力差に比例して、拡張ナノ流路内の流れの向きと大きさが決定される(式 16)。 $P_1 + P_2 + P_3 > P_4 + P_5 + P_6$ のとき拡張ナノ流路の流れは右向きとなり、 $P_1 + P_2 + P_3 < P_4 + P_5 + P_6$ のとき拡張ナノ流路の流れは左向きとなる。今回の設計では $r/R = 0.01$ であり、近似式 16 の誤差は 0.7 % である。 $P_1 +$

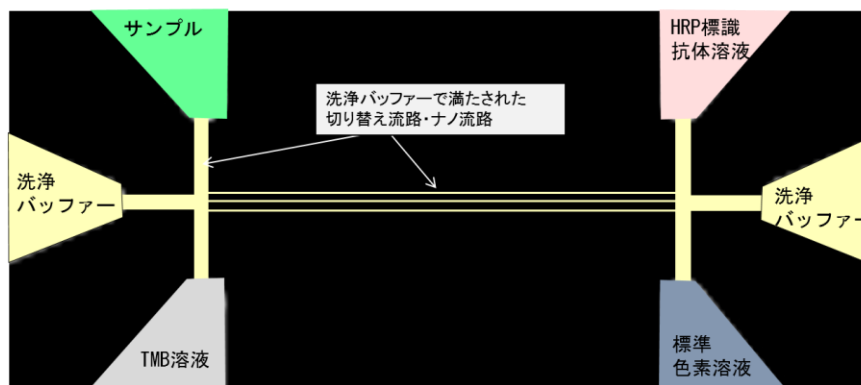
$P_2 + P_3$ と $P_4 + P_5 + P_6$ が同じオーダー（比が 0.1~10 の間）であれば、近似式 14 と 15 の誤差は 3%未満である。

次に、試薬切り替え流路の流れの制御を考える。 $P_1 > P_2 = P_3$ と設定すると、式 1, 2, 3, 14 から、 $I_1 > 0$ 、 $I_2 < 0$ 、 $I_3 < 0$ となる。また、今回の設計では、 R が r に比べて十分大きいいため、 P_1 から P_6 が同じオーダーであれば $|I_{\text{nano}}|$ は I_1 に対して無視できるほど小さい。したがって、切り替え流路内への流入は、大部分が圧力 P_1 のマイクロ流路からの流入である。このように $P_1 > P_2 = P_3$ と設定することで、切り替え流路内は圧力 P_1 のマイクロ流路内の溶液で満たされる。切り替え流路の溶液置換に必要な時間の目安として、切り替え流路体積に相当する試薬が流入する時間を計算すると、 $(P_1, P_2, P_3) = (300 \text{ kPa}, 0 \text{ kPa}, 0 \text{ kPa})$ のとき 0.3 秒である。試薬の置換に 10^2 秒を必要としていた従来のデバイスに比べて、大幅な置換時間の短縮が見込める。また、このとき P_4, P_5, P_6 が 500 kPa 以下であれば、 $|I_{\text{nano}}|$ は I_1 の 2%未満であり、十分小さい。

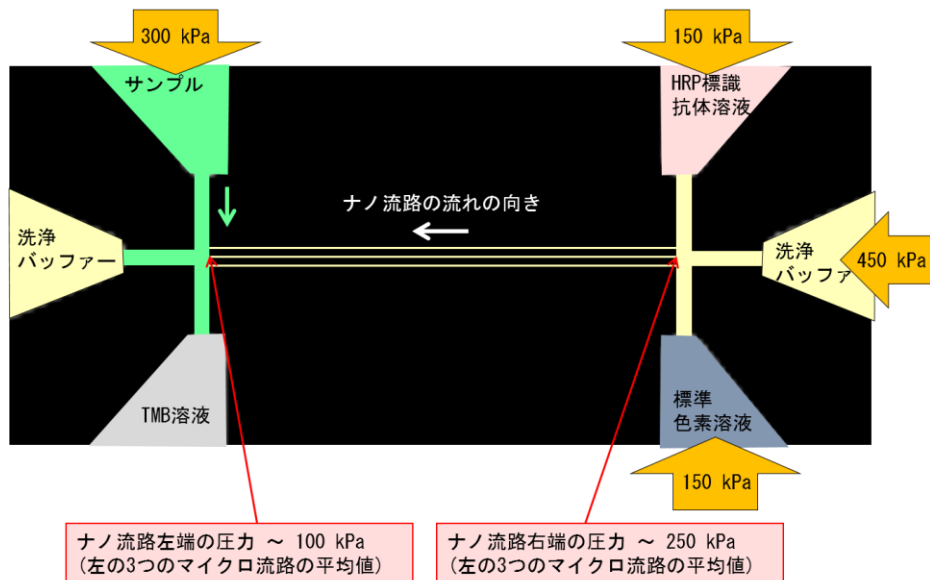
このデバイスを用いた ELISA の流体操作手順を図 4-3 a, b, c に示す。拡張ナノ流路の左側のマイクロ流路 3 本には、それぞれ洗浄バッファとサンプルと TMB 溶液を満たす。拡張ナノ流路の右側のマイクロ流路 3 本には、それぞれ洗浄バッファと HRP 標識抗体溶液と POPS 検出時の較正用の標準色素溶液を満たす。ELISA の前の段階では、左右の洗浄バッファに圧力を印加し、拡張ナノ流路と切り替え流路を洗浄バッファで満たす (図 4-3 (1))。次に、サンプル溶液に 300 kPa の圧力を印加し、左側の切り替え流路をサンプルで満たす (図 4-3 (2))。このとき、拡張ナノ流路内の流れを左向きすることで、拡張ナノ流路内へのサンプルの侵入を防ぐ。次に、サンプル流路に 100 kPa 程度の圧力を印加し、拡張ナノ流路内へとサンプルを導入する (図 4-3 (3))。このとき、サンプル以外のマイクロ流路にも 20 kPa の圧力を印加する。これによりマイクロ流路の内部は常にリンスされ、拡張ナノ流路から侵入するサンプル溶液が絶えず除去される。次に、左側の切り替え流路を洗浄バッファに置換し (図 4-3 (4))、拡張ナノ流路へ導入する (図 4-3 (5))。次に、右側の切り替え流路を HRP 標識抗体溶液に置換し (図 4-3 (6))、拡張ナノ流路へ導入する (図 4-3 (7))。インキュベート後、右側の切り替え流路を洗浄バッファへと置換し (図 4-3 (8))、拡張ナノ流路へ導入して

B/F 分離する(図 4-3 (9))。最後に、左側の切り替え流路を TMB 溶液と置換するとともに拡張ナノ流路へ導入し(図 4-3 (10))、酵素反応・検出を行う。このように、切り替え流路の置換と導入の 2 つの流体操作を繰り返す。

(1) ELISA前



(2) 切り替え流路内の溶液置換



(3) サンプル導入

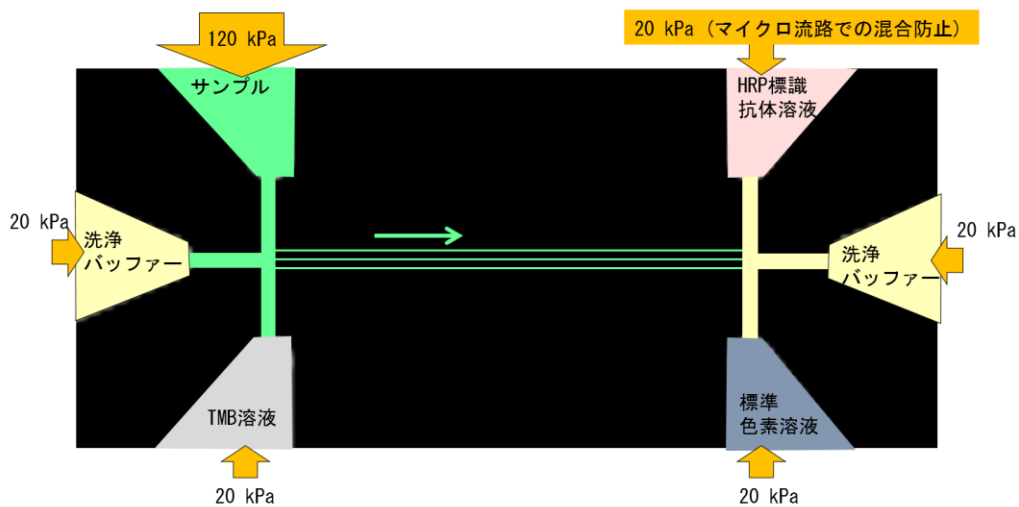
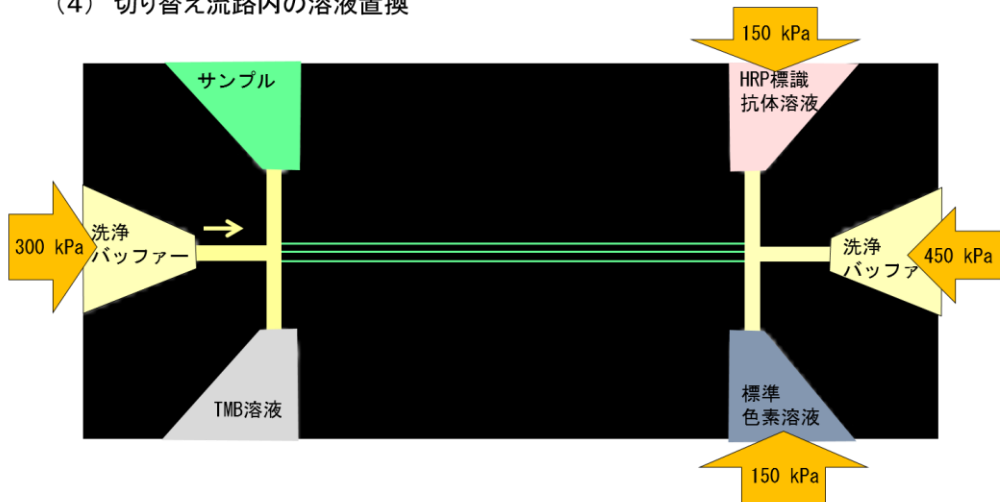
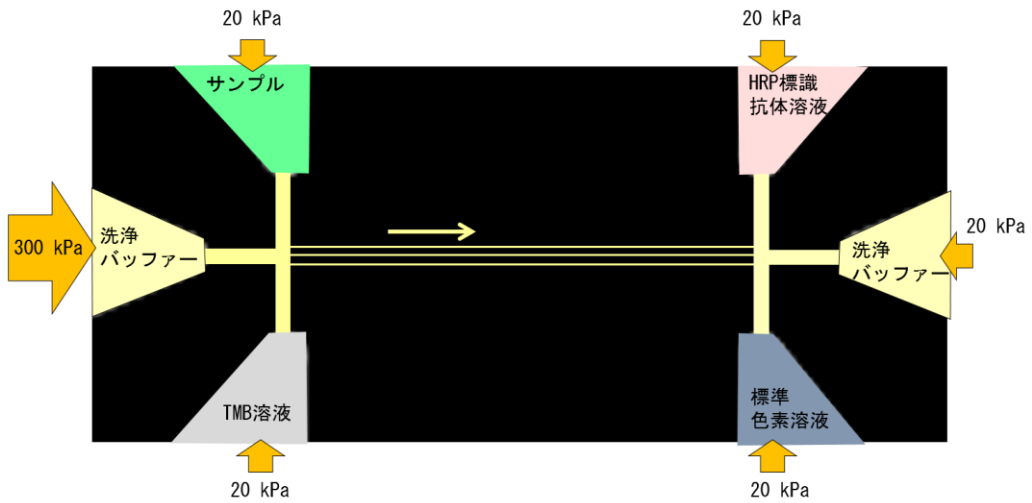


図 4-3 a ELISA における流体操作

(4) 切り替え流路内の溶液置換



(5) バッファー導入(B/F 分離)



(6) 切り替え流路内の溶液置換

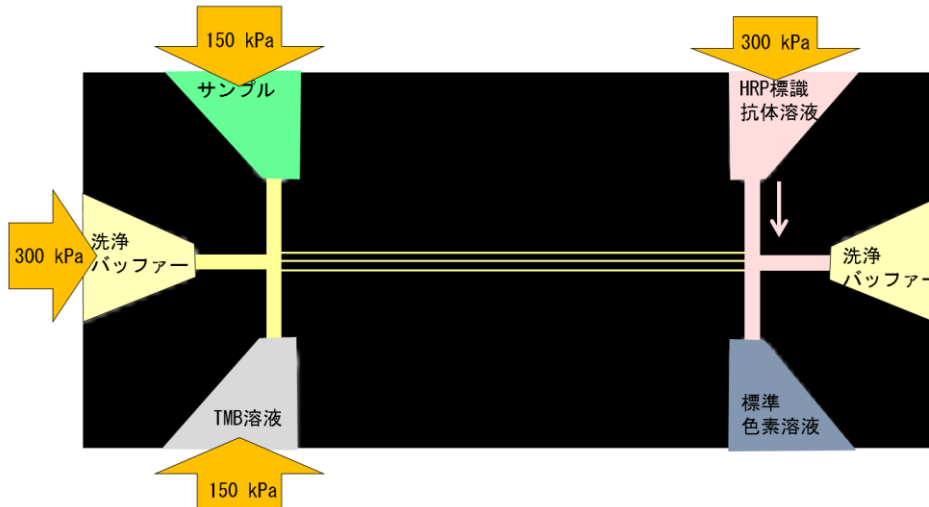


図 4-3 b ELISA における流体操作

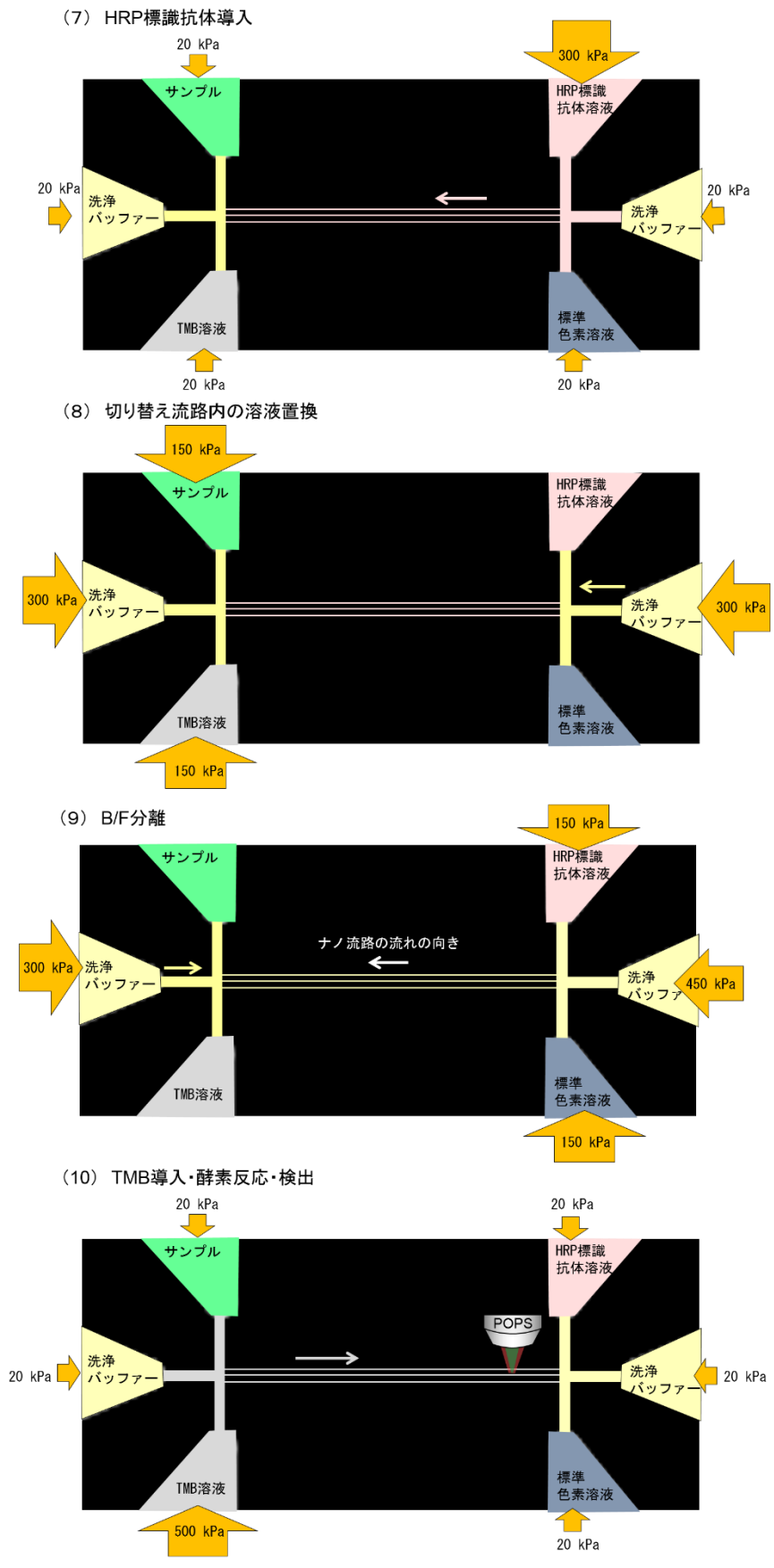


図 4-3 c ELISA における流体操作

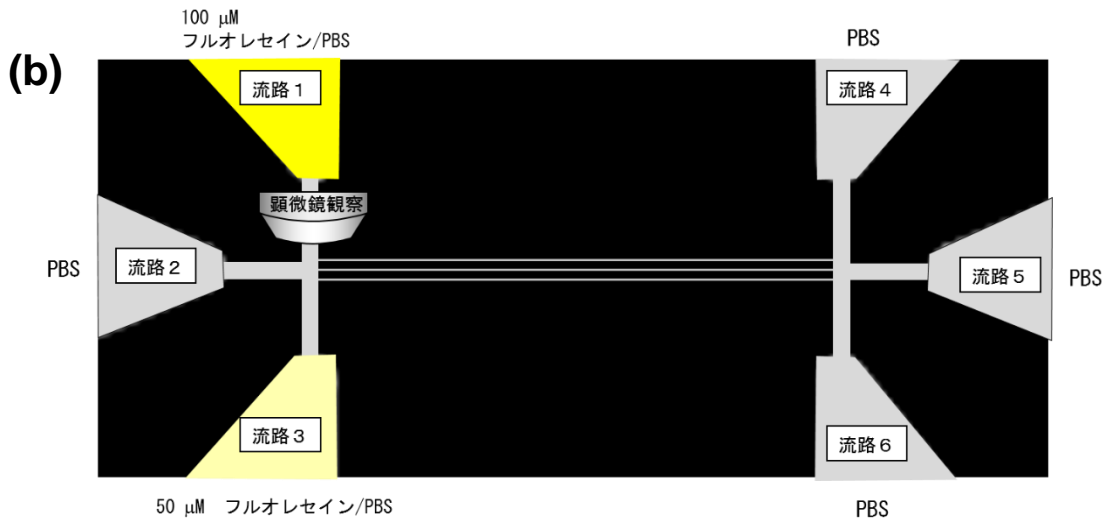
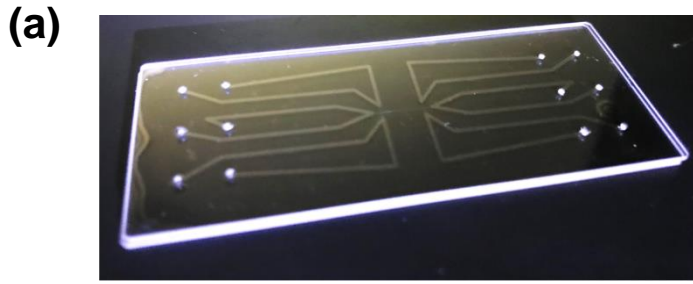
試薬の切り替え操作の実証実験

「拡張ナノ流路に導入される試薬を短時間で切り替える」という設計コンセプトを実証するために、デバイスを作製し、蛍光試料で可視化された試料の切り替え実験を行った。

流路のパターンが変化したが、第三章と同様にCrフリープロセスで流路を加工し、再生可能な接合条件で接合した。その結果、図 4-4 a のデバイスを得た。

まずは試薬切り替え流路内の試薬が切り替えられることを確認した。図 4-4 b に示すように、マイクロ流路 2, 4, 5, 6 に PBS を導入し、マイクロ流路 1 には 100 μM フルオレセインナトリウム(和光純薬工業社製)、マイクロ流路 3 には 50 μM フルオレセインナトリウム(和光純薬工業社製)を導入した。左側の切り替え流路の合流部を蛍光顕微鏡で観察しながら、図 4-4 c に示すプロトコールで各マイクロ流路に圧力を印加した。具体的には、流路 4,5,6 にはそれぞれ 150, 450, 150 kPa の圧力を印加し続け、拡張ナノ流路の流れを左向きとした。はじめの 8 秒間は、流路 1 に 300 kPa の圧力を印加し、100 μM フルオレセイン溶液を切り替え流路に導入した。次の 8 秒間は、流路 2 に 300kPa の圧力を印加し、切り替え流路をバッファーで置換した。次の 8 秒間は流路 3 に 300kPa の圧力を印加し、切り替え流路を 50 μM フルオレセイン溶液で置換した。これらの操作を繰り返した。

切り替え流路の蛍光像を図 4-4 d に示す。導入されたフルオレセイン溶液の濃度に応じて切り替え流路内の蛍光強度が変化する様子が観察され、切り替え流路内の置換が達成されていることがわかった。そこで、切り替え流路の合流部における蛍光強度の時間変化を測定した(図 4-5 a)。圧力が印加される流路が切り替わるたびに蛍光強度は変化した。8 秒の間に蛍光強度は定常に達していたことから、8 秒間の切り替え操作によって切り替え流路内の試薬は十分に置換されていることが示された。切り替え操作の時間を最小限とするために、より短い切り替え時間 4, 2, 1, 0.5 秒を設定し、図 4-4 c と同様のプロトコールで流体操作した。蛍光強度の時間変化を図 4-5 b に示す。切り替え時間 0.5 秒の条件では、蛍光強度が定常となる前に次の試薬へと切り替えられ、切り替え時間内での置換が十分ではないことが示唆された。



(c)

継続時間		流路1 100 μM フルオレセイン	流路2 PBS	流路3 50 μM フルオレセイン	流路4 PBS	流路5 PBS	流路6 PBS
1周目	8秒	300 kPa	0 kPa	0 kPa	150 kPa	450 kPa	150 kPa
	8秒	0 kPa	300 kPa	0 kPa	150 kPa	450 kPa	150 kPa
	8秒	0 kPa	0 kPa	300 kPa	150 kPa	450 kPa	150 kPa
2周目	8秒	300 kPa	0 kPa	0 kPa	150 kPa	450 kPa	150 kPa
	8秒	0 kPa	300 kPa	0 kPa	150 kPa	450 kPa	150 kPa
	8秒	0 kPa	0 kPa	300 kPa	150 kPa	450 kPa	150 kPa

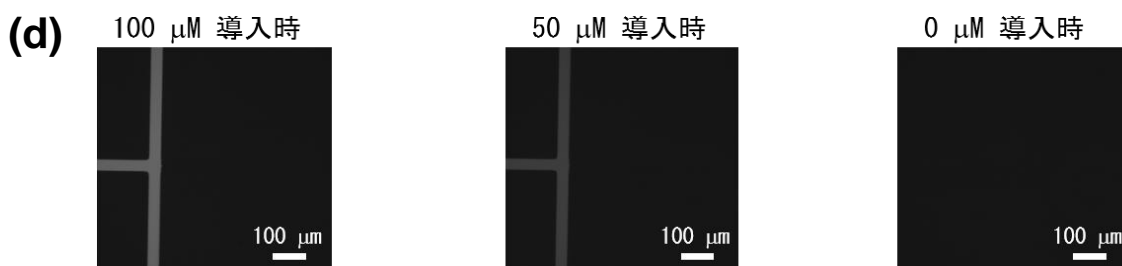


図 4-4 切り替え流路の置換実験

(a) 使用したデバイス (b) 流路と試薬の配置

(c) 流体操作プロトコール (d) 切り替え流路の蛍光像

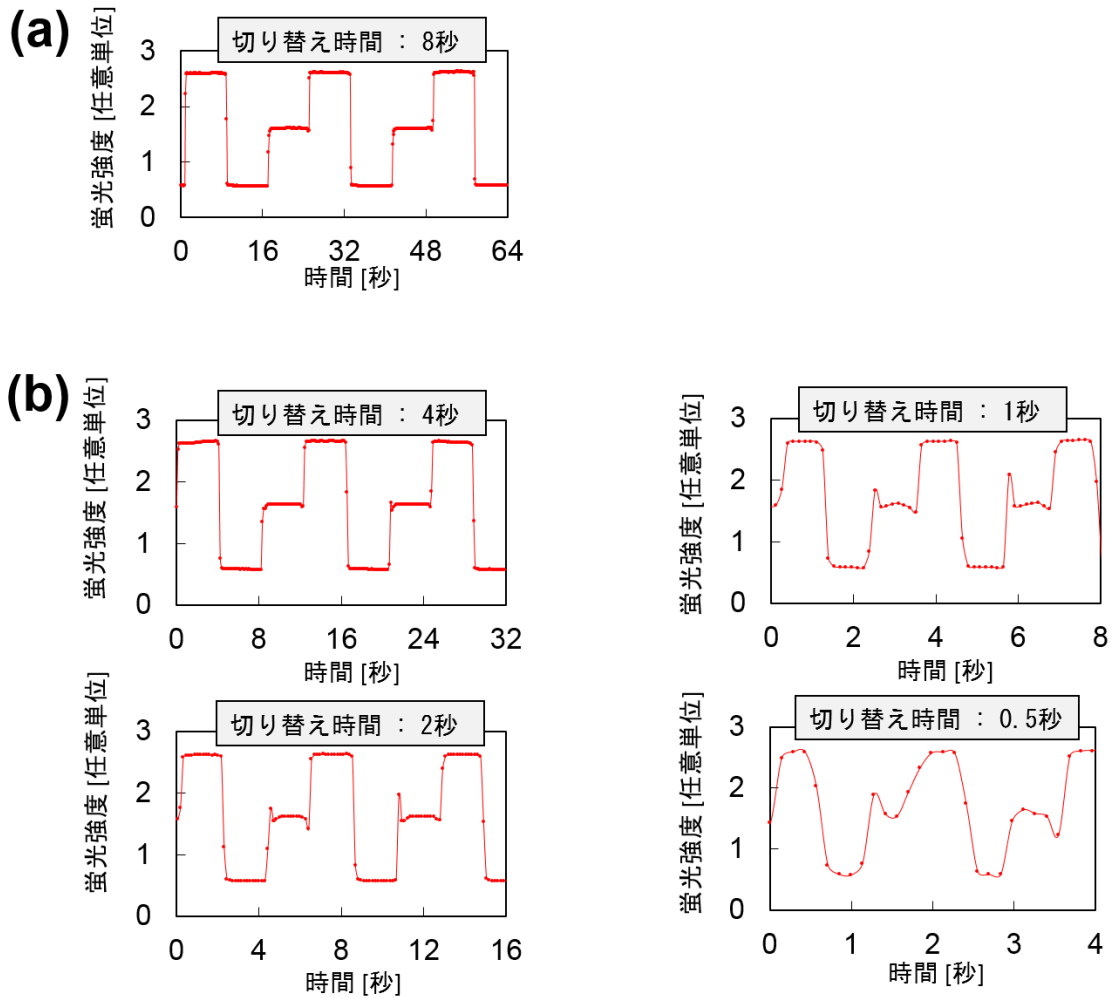


図 4-5 切り替え流路の置換実験における蛍光強度の時間変化

(a) 切り替え時間 8 秒の場合

(b) 切り替え時間 4, 2, 1, 0.5 秒の場合

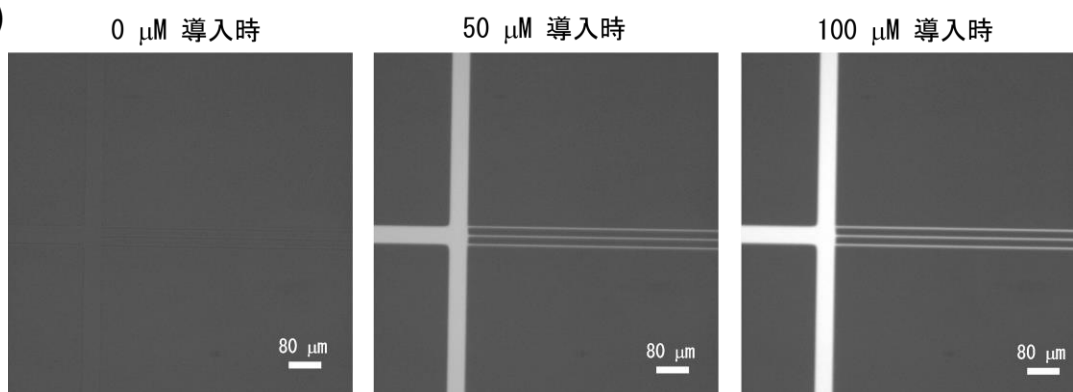
そこで、以後の実験において試薬の切り替え時間を 1 秒に設定した。

また、拡張ナノ流路への導入試薬の切り替え操作の実証実験を行った。図 4-6 a に示すプロトコルで、切り替え流路の置換・ナノ流路への導入を繰り返し、8 秒ごとに導入試薬を切り替えられるかどうかを検証した。その結果、図 4-6 b に示すように、導入試薬の濃度に応じて拡張ナノ流路の蛍光強度が変化する様子が観察された。拡張ナノ流路の蛍光強度の時間変化を測定した結果、図 4-6 c に示すように、8 秒ごとに蛍光強度が変化し、導入操作中の蛍光強度は一定となった。以上から、拡張ナノ流路に導入される試薬を 8 秒ごとに切り替えることができるデバイスの開発に成功した。

(a)

継続時間		流路1 100 μ M フルオレセイン	流路2 PBS	流路3 50 μ M フルオレセイン	流路4 PBS	流路5 PBS	流路6 PBS
置換	4秒	300 kPa	0 kPa	0 kPa	150 kPa	450 kPa	150 kPa
導入	4秒	500 kPa	400 kPa	400 kPa	0 kPa	0 kPa	0 kPa
置換	4秒	0 kPa	300 kPa	0 kPa	150 kPa	450 kPa	150 kPa
導入	4秒	400 kPa	500 kPa	400 kPa	0 kPa	0 kPa	0 kPa
置換	4秒	0 kPa	0 kPa	300 kPa	150 kPa	450 kPa	150 kPa
導入	4秒	400 kPa	400 kPa	500 kPa	0 kPa	0 kPa	0 kPa

(b)



(c)

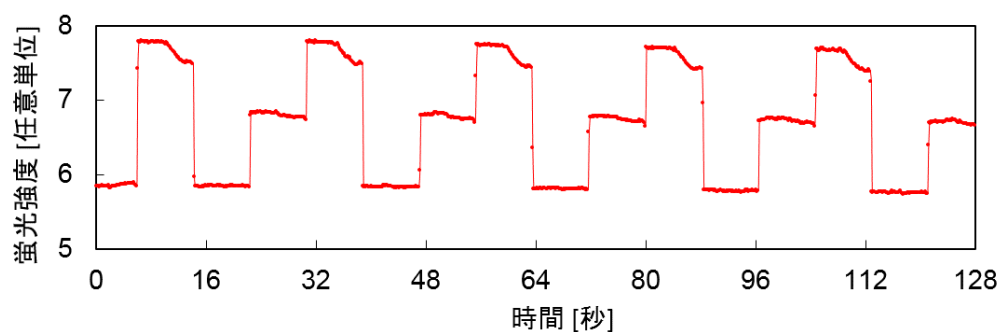


図 4-6 拡張ナノ流路への導入試薬の切り替え実験

- (a) 流体操作プロトコール
- (b) ナノ流路への導入時の蛍光像
- (c) ナノ流路の蛍光強度の時間変化

このデバイスを用いて、脱離の影響のあるプロセス時間をどれだけ短縮できるかを考察する。脱離の影響のあるプロセスは

- ①B/F 分離 (拡張ナノ流路へのバッファ導入)
- ②切り替え流路の溶液をバッファから TMB に置換する
- ③拡張ナノ流路への TMB 溶液導入

である。続く酵素反応は流速ゼロで行われるため、酵素反応中に脱離が発生しても目的分子・酵素標識抗体は失われず、検出効率には影響しない。

①に関しては、十分な洗浄が必要のために、拡張ナノ流路の5倍の体積のバッファを導入することを考える。550 kPa の印加圧力では洗浄時間は24秒である。②に関しては、本節の実験結果によれば1秒以上が必要である。③に関しては、拡張ナノ流路と同体積の TMB 溶液を導入することを考える。550 kPa の印加圧力では8秒である。①②③を合計すると、脱離の影響のあるプロセス時間は33秒である。

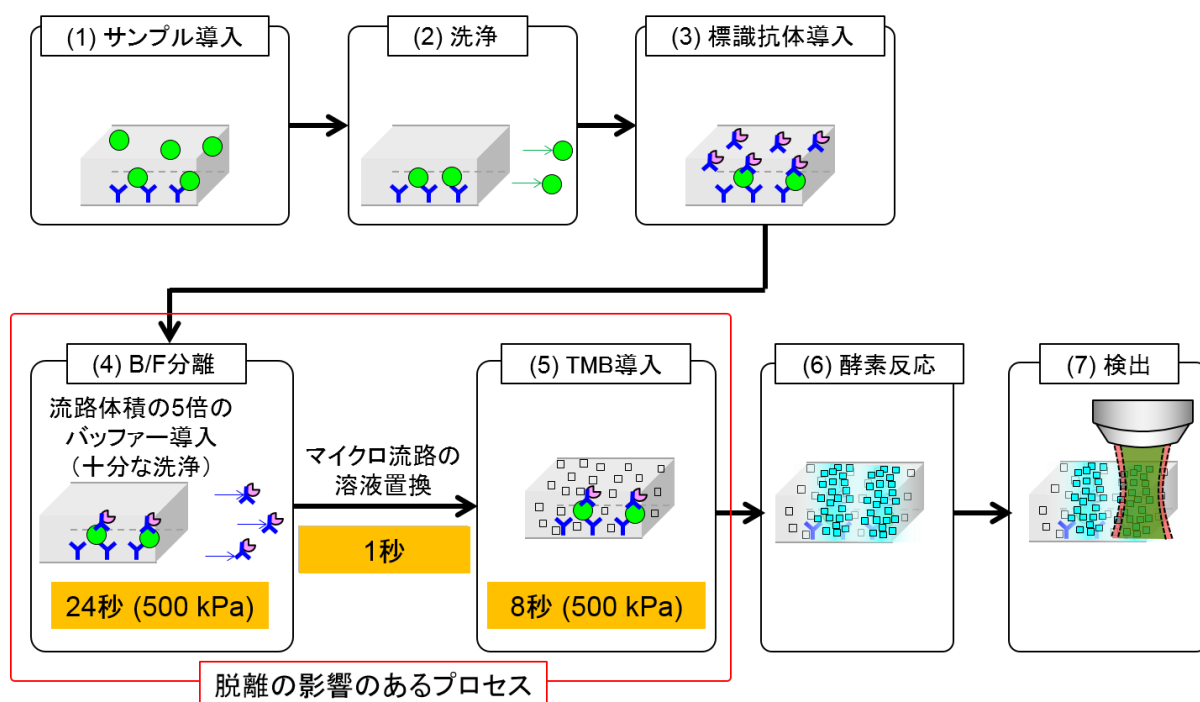


図 4-7 脱離の影響のあるプロセス

4.3. 単一・可算個分子定量の実証

本節では、前節で開発されたデバイスを用いて、実際に ELISA 測定を行った。実験プロトコールを図 4-8 に示す。サンプルとして CRP を PBS で希釈し、濃度を 0, 2, 4, 12, 40, 120 pM に設定した。拡張ナノ流路へ 120 fL/sec の流量で 70 秒導入した。導入体積 8 pL から、それぞれの濃度で導入される分子数は 0, 10, 20, 60, 200, 600 分子とした。導入後、20 秒間流れを止めてインキュベートし、バッファで 10 秒間洗浄した。次に HRP 標識抗体溶液（濃度：特許申請のため非公開）を導入し、60 秒間流れを止めてインキュベートした。次に、両側の切り替え流路を洗浄バッファで 1 秒間置換し、拡張ナノ流路内へ洗浄バッファを導入して B/F 分離を 25 秒行った。次に左側の切り替え流路を 1 秒かけて TMB 溶液で置換し、拡張ナノ流路内へ 8 秒かけて導入した。60 秒間流れを止めて酵素反応させ、再び流し DIC-TLM で検出した。各工程における具体的な印加圧力は、図 4-3 に示した。それぞれの CRP 濃度条件を 3 回ずつ測定した。

特許申請のため非公開とさせていただきます

図 4-8 ELISA プロトコール

獲得された POPS 信号を図 4-9 に示す。抗体修飾領域に対応する時間窓からピーク状の信号が得られた。目的分子数の増大に伴い、ピークの面積は増大する傾向が観察された。

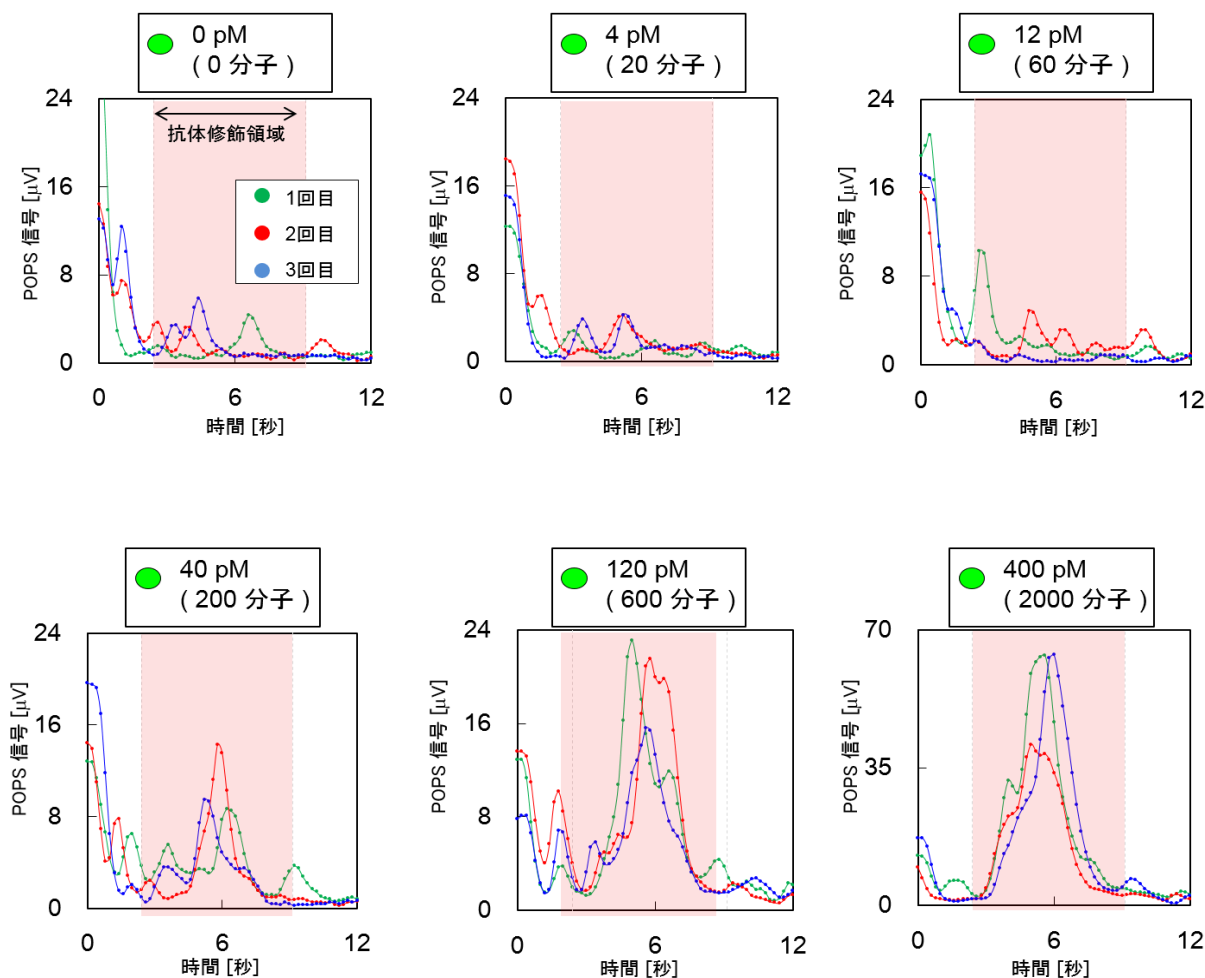


図 4-9 測定された POPS 信号

これらの信号をガウシアンピークでフィッティングし、抗体修飾領域に由来するピークの面積の総和を信号と定義した。得られた検量線を図 4-10 a に示す。また、目的分子数 0-200 の領域を拡大した検量線を図 4-10 b に示す。一般的なサンドイッチ ELISA では、抗原・抗体間の平衡論や速度論を考慮すると、抗体が抗原に比べて大過剰である濃度領域では検量線は直線となる[97]。そこで、最小二乗法で直線にフィッティングし、検量線とした。決定係数は 0.999 であり、良い直線性が得られた。

この検量線から、本手法における CRP の定量分析性能を評価した。まず、装置検出

限界(Instrument detection limit, $S/N=2$)を求めた。 N は検出器に由来するノイズであり、ここでは酵素反応を伴わずに TMB を導入した場合の POPS 信号の標準誤差と、60 秒間の酵素反応による拡散距離の積を N と定義した。装置検出限界($S/N=2$)は N の 2 倍の信号が得られる CRP 分子数として定義され、その値は 2.6 分子であった。

次に、方法検出限界(Methodological detection limit, 3.3σ)を求めた。 σ は、CRP 濃度ゼロの条件で測定された信号面積のばらつきである。方法検出限界(3.3σ)は σ の 3.3 倍の信号が得られる CRP 分子数として定義され、その値は 17.2 分子であった。この指標は国際標準化機構などで用いられている。

最後に、定量限界(2σ)を求めた。ここでの σ は検量線に対する信号のばらつきの指標である。測定された全データの回帰直線からの偏差の二乗和をとり、これを測定点数で割ってから平方をとることで σ を得た。定量限界(2σ)は σ の 2 倍の信号が得られる CRP 分子数として定義され、その値は 30.6 分子であった。

いずれの評価基準にせよ、単一・可算個分子領域での CRP の定量分析を実現した。

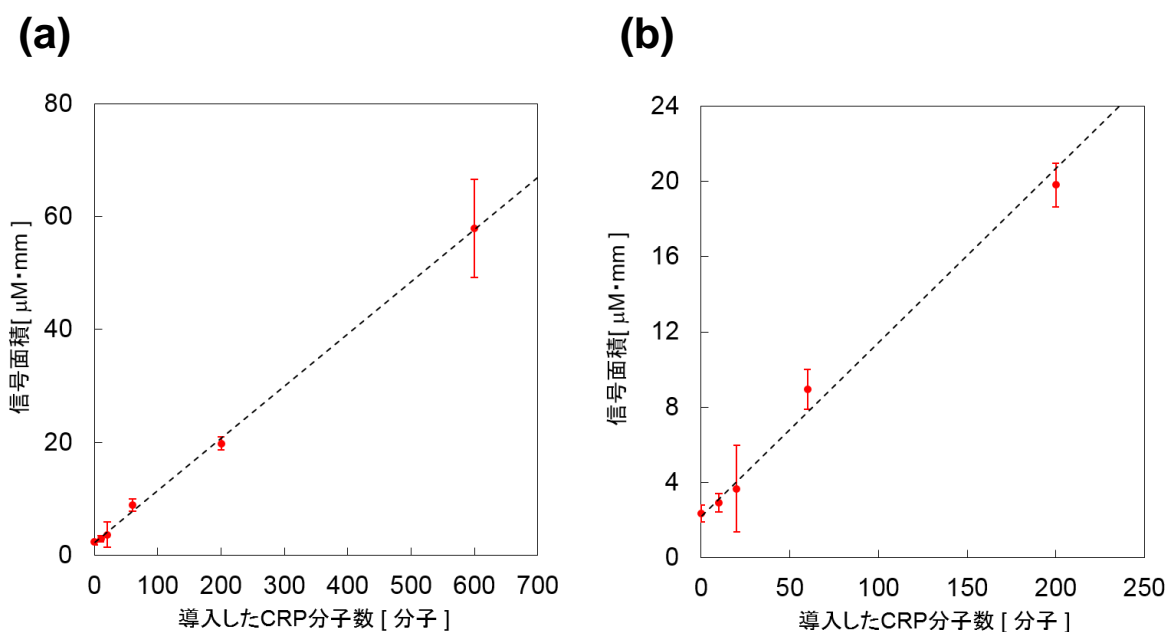


図 4-10 CRP の検量線 (a)分子数 0-600
(b)拡大したグラフ：分子数 0-200

4.4.まとめ

本章では、第二章と第三章で得た知見をもとに、単一・可算個分子レベルの定量分析手法を確立した。

まず、Cr に由来するアーチファクトを除去するために、Cr フリーの加工プロセスを採用した。抗原抗体間の結合の解離による検出効率低下を防ぐため、B/F 分離時間を短縮可能なデバイスを設計した。その結果、拡張ナノ流路に導入される試薬を 8 秒ごとに切り替えることができるデバイスの開発に成功した。新規デバイスを用いて ELISA 測定を行った結果、C 反応性タンパク質を方法検出限界(3.3 σ)17.2 分子で定量することに成功した。

第五章 結言

5.1. 本研究のまとめ

本研究では拡張ナノ流体デバイスを用いた単一分子 ELISA の方法論を確立した。わずか単一・可算個の目的分子の定量分析を実現するには、アーチファクトを単一分子レベルで取り除くこと、目的分子をロスすることなく化学プロセッシング・検出することが課題であると考えた。まずは、アーチファクトの原因を探索した。その結果、酵素標識抗体の非特異吸着のほかに、デバイス加工プロセスで用いられる Cr がアーチファクトの原因であることを解明し、アーチファクトをゼロとする条件を見出した。次に、検出効率に影響する要因を検討した。その結果、目的分子と酵素標識抗体の反応率を 100% とする条件を見出した。また、検出効率を 100% とするには、抗原抗体間の結合の解離の影響を小さくするために、短時間で B/F 分離を行う必要があることを明らかにした。最後に、これらの知見をもとに単一分子 ELISA デバイスを創生した。その結果、方法検出限界(3.3σ)17.2 分子でのタンパク質の定量に成功した。

第二章では、拡張ナノ流体デバイスを用いた ELISA において、アーチファクトの発生要因を解明し、単一分子レベルのアーチファクトすら取り除くことに成功した。まず、アーチファクトの発生要因を推定した。従来の ELISA においてアーチファクトの発生要因は主に酵素標識抗体の非特異吸着であったが、本研究では酵素標識抗体に由来しない要因が存在することを見出した。そこで、酵素標識抗体に由来しない要因を探索した。多くの化学種が用いられるデバイス加工プロセスに着目し、APTES、フッ素、PEG、電子線レジスト、Cr を原因化学種の候補とした。検証の結果、デバイス表面に微量に残留した Cr が TMB を酸化し、アーチファクトの原因となっていることが明らかとなった。そこで Cr フリーの加工プロセスを開発し、酵素標識抗体に由来しないアーチファクトを完全に除去することに成功した。ELISA において単一目的分子に由来する信号は、わずか 100 nm の粒子に相当する量の Cr によってマスクされることが推定された。従って、将来さまざまな単一・可算個分子分析デバイスを創生するには、微量な夾雑物すらも影響を考慮する必要があるという指針を獲得した。また、酵素標識抗体の非特異吸着の影響を評価した。酵素標識抗体の濃度を 0.3 nM とした

条件では、3回の測定でアーチファクトはゼロとなった。また、酵素標識抗体濃度を 0.1 nM 以下とすることで、アーチファクトを 90%以上の確率でゼロにできることが推定された。

第三章では、**(特許申請のため3章の内容を非公開とさせていただきます)**

第四章では、第二章と第三章で得た知見をもとに、単一・可算個分子レベルの定量分析法を確立した。まず、Cr に由来するアーチファクトを除去するために、Cr フリーの加工プロセスを採用した。抗原抗体間の結合の解離による検出効率低下を防ぐため、B/F 分離時間を短縮可能なデバイスを設計した。その結果、拡張ナノ流路に導入される試薬を 8 秒ごとに切り替えることができるデバイスの開発に成功した。新規デバイスを用いて ELISA 測定を行った結果、C 反応性タンパク質を方法検出限界 (3.3 σ)17.2 分子で定量することに成功した。

一般的に分析プロセスは、①サンプリング、②化学プロセッシング、③検出の3つの要素からなる。単一分子レベルのタンパク質の定量分析には、これらのプロセスを単一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、単一分子レベルのサンプリングや化学プロセッシングは実現していなかった。このため、単一分子レベルのタンパク質分析法はなかった。いっぽう、本研究では、拡張ナノスケールの ELISA を、単一分子レベルの化学プロセッシング手法として確立した。その結果、体積 fL の試料を化学プロセッシングしてその中に含まれる可算個タンパク分子を定量する、分析化学の極限をはじめて達成した。本手法を、単一細胞からのサンプリング技術と組み合わせることができれば、単一細胞・単一分子レベルのタンパク質分析の実現が期待される。

従来の単一細胞タンパク質分析法は、単一細胞あたり 10^4 分子以上存在するような発現量の大きいタンパク質にのみ適用することができた。しかし、1 細胞あたり 10^4 分子よりも発現量の小さいタンパク質は数多く存在する[20], [98]。発現量の小さいタンパク質の分析には、目的遺伝子が蛍光を発するように遺伝子操作された細胞という、極めて限定的なサンプルが必要とされた。本研究で確立された単一分子 ELISA を単一細胞分析に応用すれば、発現量の低いタンパク質を含め、あらゆるタンパク質をあ

らゆる細胞から分析可能になることが期待される。

5.2. 今後の課題と将来展望

酵素標識抗体の非特異吸着の低減

第三章での検討によれば、検出効率を 100%とするには一定以上の酵素標識抗体濃度が要求される。また、その条件は抗原・抗体ペアに固有の結合速度定数・解離速度定数に応じて変化しうる。目的分子の種類によっては、今回用いた CRP よりも高濃度の酵素標識抗体溶液が要求される可能性がある。しかし、第二章での検討によれば、酵素標識抗体の濃度が増大するにつれて、アーチファクト発生のリスクが高まる。従って、アーチファクトゼロかつ検出効率 100%を様々な目的分子に対して実現するには、酵素標識抗体が高濃度でも非特異吸着がゼロとなる手法の開発が必須である。

考えうる 1 つ目の対策は、ガラス基板表面への抗体修飾法の改良である。本稿 56p の図 2-22 に示す非特異吸着に由来するアーチファクトは、全て抗体修飾領域に対応する時間窓から観察された。このことは、抗体修飾領域とそれ以外の PEG 修飾領域における非特異吸着の発生確率に差があることを示唆している。従って、抗体修飾領域の表面状態を PEG 修飾領域の表面状態へと近づければ、非特異吸着が低減される可能性が高い。例えば、図 5-1 のように、抗体修飾領域に PEG を導入する方法である。従来は抗体と APTES 表面は低分子のグルタルアルデヒドを介して結合された。高密度の PEG ブラシ表面はタンパク質の非特異吸着を抑制することが知られており [99]、両端に NHS エステル基などのアミノ基と結合可能な官能基を有する PEG リンカーの導入により、酵素標識抗体の非特異吸着の低減が期待される。

2 つ目の対策は、分析場のさらなる微小化である。3.3 節での考察によれば、酵素標識抗体の反応率を 100%とする条件は、分析場の体積・表面積に依存しない。大きな空間に 1 つの目的分子があろうと、小さな空間に 1 目的分子があろうと、反応率を 100%とするには同じ濃度の酵素標識抗体を同じ時間導入する必要がある。一定濃度の酵素標識抗体が一定時間導入された時、空間全体の非特異吸着の発生量は表面積に比例すると推定される。従って、目的分子数の等しい分析では、表面積が大きい空間ほど不利であり、スケールダウンによって非特異吸着を低減できる可能性が高い。

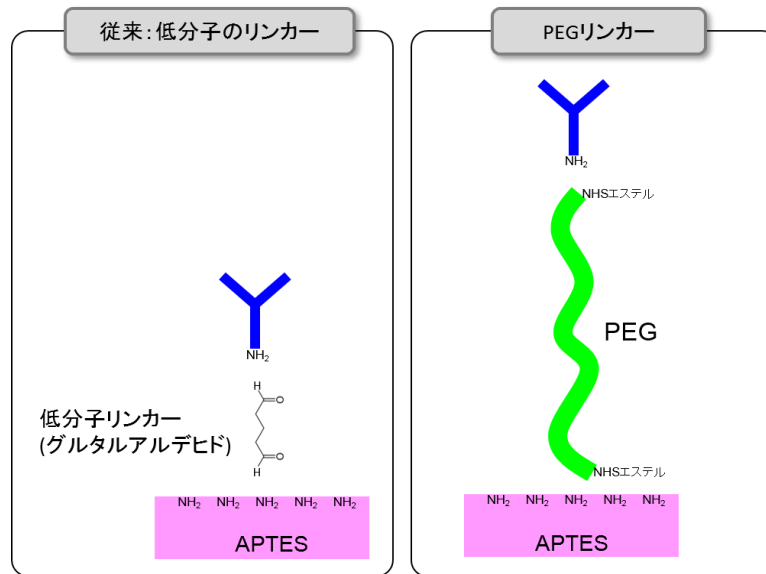


図 5-1 抗体修飾領域への PEG の導入

現在の拡張ナノ ELISA デバイスは、POPS 検出に適したサイズとして深さ 800 nm、幅 2000 nm に設定されている。いっぽう、筆者らの研究グループではより小さな拡張ナノ空間での検出を可能とする手法が開発された。この検出法により深さがスケールダウンできれば、体積あたりの捕捉抗体分子数増加・目的分子の拡散に必要な時間の短縮により、目的分子捕捉に必要な時間が更に減少し、分析場の長さのスケールダウンも可能になる。

バルク ELISA の至適条件と拡張ナノ ELISA の至適条件の関係性の解析

本研究ではモデル試料として CRP を用いたが、別の種類の目的分子を分析するためには、別の抗体を用いることになる。一般的な ELISA では、目的分子や抗体の種類が変わると、ブロッキング条件や酵素標識抗体との反応時間など、さまざまな実験条件の最適値が変化することが知られている。したがって、異なる目的分子を分析するには新たに条件検討が求められる。しかし、拡張ナノ ELISA デバイスを用いた実験には、マイクロプレートを用いたバルクスケールの ELISA に比べて必要な時間とコストが大きい。そこで、バルク ELISA の至適条件と拡張ナノ ELISA の至適条件の関係性が明らかにすることで、バルク ELISA での条件検討結果から拡張ナノ ELISA の至適条件を推定することが可能となる。拡張ナノ ELISA デバイスを様々な種類の目的分子へと応用するためには、重要な知見である。

抗体の塗り分けによる複数ターゲットの分析

複数種の遺伝子の発現量の相関は、細胞機能の解明のためには強力な手がかりである。均一なサンプルが潤沢に用意できるならば、複数ターゲットを同時に分析できない場合でも、サンプルを分割して逐次的に分析すれば良い。しかし、サンプルに含まれる目的分子が単一・可算個である場合、サンプルを分割する操作そのものが不確かさを生む。従って、単一・可算個分子分析では複数ターゲットの同時分析がいっそう重要である。これは図 5-2 に示すように、複数種の抗体が組み込まれたデバイスによって可能となる。導入された試料に含まれていた複数種の目的分子は、それぞれ別の位置に捕捉される。信号が検出される位置から、それぞれの種類の目的分子の量を推定する。このデバイスを実現するには、複数種の抗体を拡張ナノ流体界面に塗り分ける加工法の開発が課題である。コンタクトプリンティング法を用いて複数種のシランカップリング剤を基板表面に修飾する方法や、紫外線などの刺激を与えている状態でのみ抗体と結合できるリンカーの開発など、いくつかの方法が考えられる。

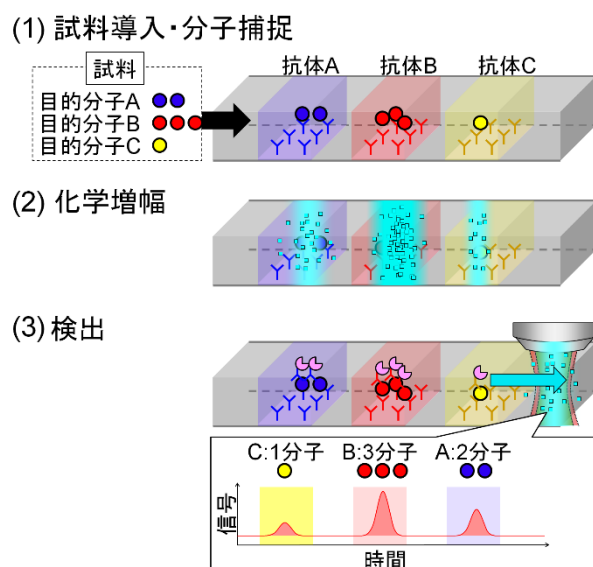


図 5-2 抗体の塗り分けによる複数ターゲットの分析

APPENDIX

A-1 ナノ加工

幅・深さがともに数 10 nm から数 100 nm である拡張ナノ流路は、図 A-1 に示す手順で作製した。基板として 30 mm×70 mm、厚さ 0.7 mm の石英ガラス基板（信越化学工業社製）を使用した。

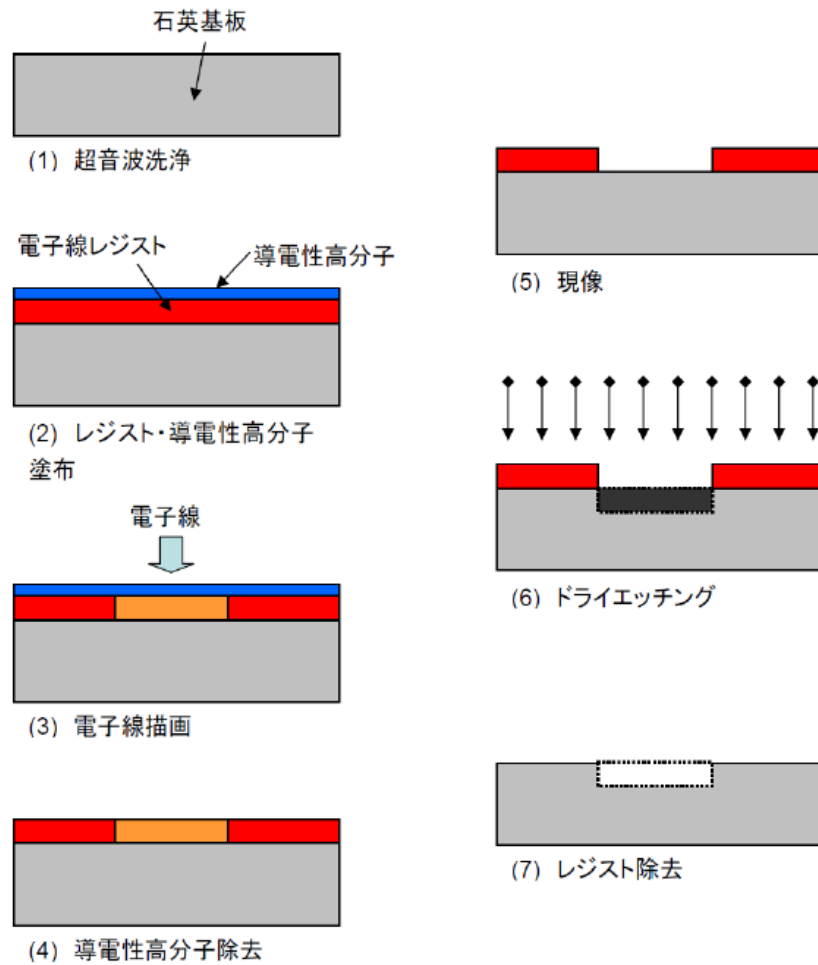


図 A-1 ナノ加工の手順

この手法は、電子線リソグラフィと呼ばれる。これは、基板に塗布した電子線レジストに電子線を照射することでチャンネルデザインを直接パターンニングする方法である。

まず、基板を超音波で約10分間洗浄し、その後エアガンで乾燥させて表面を清浄化した（図A-1 (1)）。次にスピンコーター（1H-360S、ミカサ社製）上に基板を

のせ、電子線レジストをスピコーティングにより均一の厚さで塗布した。ここで電子線レジストには、ZEP520A（日本ゼオン社製）を使用した。ZEP520Aは、電子線を照射することで有機溶媒に溶解しやすくなるポジ型のレジストである。電子線レジスト塗布後の基板を180℃のホットプレート上で2分間プリベイクしてからテーブル上で急冷することで、電子線レジストを基板上に定着させた。その後基板を再びスピコーター上に乗せ、導電性高分子エスペイサー300Z（昭和電工社製）をスピコーティングにより塗布した（図A-1(2)）。これは、非導電性の石英基板に電子線描画を行う際に基板上に電子が溜まり（チャージアップ）、描画精度が低下するのを防ぐためである。

つづいて、電子線レジストおよび導電性高分子を塗布した基板を電子線描画装置に入れ、チャンネルデザインのパターニングを行った（図A-2(3)）。本研究室で使用している電子線描画装置は図A-2に示したELS7500（エリオニクス社製）である。この装置は走査型電子顕微鏡（SEM：Scanning Electron Microscope）と同じ技術を用いている。描画はパソコンソフトAutoCADにより作成したCADファイルのチャンネルデザインと同じ場所に電子線を照射することで行った。



図 A-2 電子線描画装置（ELS7500、エリオニクス社製）

チャンネルデザインのパターニング終了後、基板を電子線描画装置から取り出し、

超純水で導電性高分子を洗い流した（図A-1(4)）。その後22°Cの恒温槽上に置かれた α -キシレン中に基板を5分間浸して電子線照射部の電子線レジストを溶解させ、チャンネルデザインの現像を行った（図A-2(1)）。現像後、基板を2-プロパノールに浸してリンスし、エアガンで乾燥させた。

現像が終わると、次に基板のドライエッチングを行った。ドライエッチングには、図A-3に示したプラズマ装置NE-550（ULVAC社製）を使用した。この装置は、NLDプラズマエッチング法（Neutral Loop Discharge Etching）により、CHF₃とSF₆のフッ素系ガスをプラズマにし、基板をエッチングしてゆく。低圧下でのエッチングが可能なので、イオン同士の衝突が極めて少なく、プラズマの直進性が保たれて異方性選択的エッチングが可能となる（図A-1(6)）。この装置のエッチング速度は、およそ1 nm/sである。電子線レジストZEP520Aはプラズマ耐久性が高いので、レジストが塗布されている部分はエッチングされないが、現像により電子線レジストが除去された部分は基板表面がプラズマに曝されるのでエッチングされる。



図 A-3 プラズマ装置（NE-550、ULVAC 社製）

ドライエッチング終了後、基板をジメチルスルホキシド (DMSO) と o -キシレンの2:1混合溶液に約30分間浸し、超音波洗浄を行った。これにより、基板に残った電子線レジストを除去することができる。最後に超純水ですすぎ、エアガンで乾燥させた (図A-2 (7)) 。

なお、基板にZEP520Aをスピコーティングする際には以下のレシピを用いた。

500 rpm, 5 s \rightarrow 10 s slope \rightarrow 1000 rpm, 60 s

このレシピでは、膜圧は約700 nmへと制御される。本研究では全てのナノ流路は深さ800 nmに設計している。ガラスのエッチングレートが約1.0–1.2 nm/s、レジストのエッチングレートが約1.4 nm/sであることを考慮し、一度レジストをスピコーティングしてプリベイクを行った後、さらに重ね塗りをして膜圧を1400 nmとした。

A-2 Cr を用いたマイクロ加工

本研究では、第二章で Cr フリーのマイクロ加工法を開発し、第三章・第四章では Cr フリーの加工法を用いてマイクロ流路を加工した。いっぽう、Cr フリーの加工法に至るまでの第二章の実験においては、K. Shirai らの開発した拡張ナノ ELISA デバイスと同様に、図 A-5 に示す Cr を用いた加工法を用いてマイクロ流路を作製した。

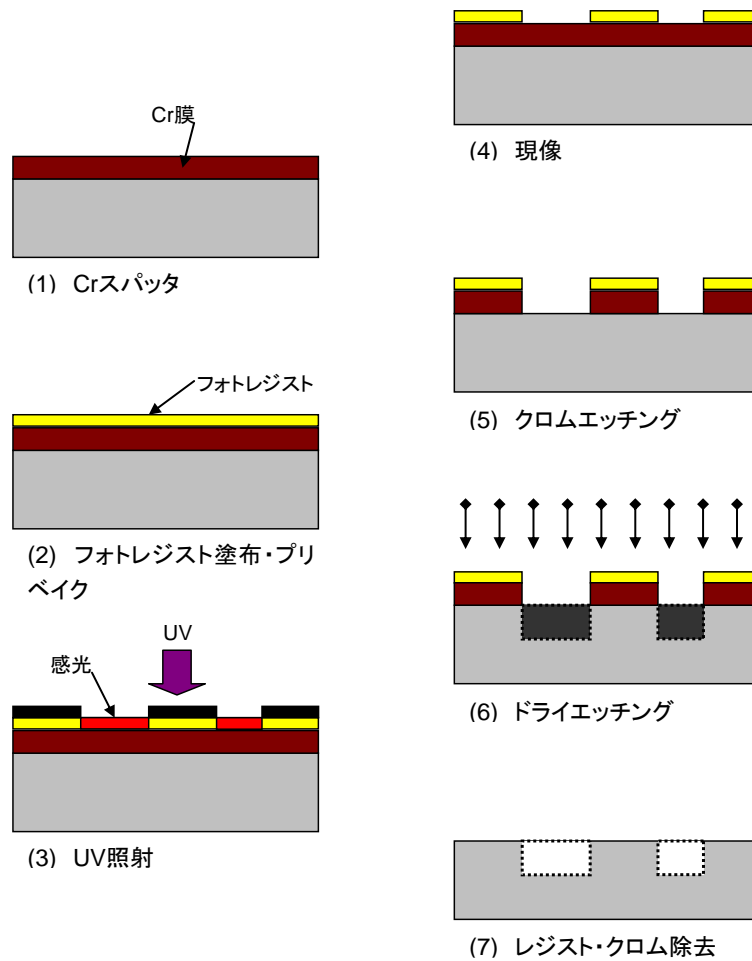


図 A-4 Cr を用いたマイクロ加工の手順

フォトレジストはドライエッチングに対する選択比が悪いため、フォトレジストを塗布する前に基板に 100 nm 厚さのクロムを基板保護膜として外注により蒸着した。クロム蒸着基板の汚れや塵を取り除くため、超純水によって軽く洗浄した。基板をスピンドーターに乗せ、フォトレジスト(OFPR-800、東京応化工業社製)を塗布した。

OFPR は光照射によりアルカリに溶解しやすくなるポジ型のレジストである。塗布後、120°Cのホットプレート上で 90 秒間プリベイクし、フォトレジストを定着させた(図 A-4(1)、(2))。

次にパターン転写を行う。パターンが描画されたフィルム製のフォトマスクをマスクアライナーにセットし、基板に 15 秒間紫外線を照射した。マスクがない部分には紫外線が照射されてアルカリに溶解しやすくなる。照射後、現像液に基板を浸漬し、露光部分を溶解した。現像液として NMW-D(テトラメチルアンモニウムヒドロキシド、東京応化工業社製)を用いた。さらにクロムエッチャー(HICRETCH、和光純薬)でレジストが除去された部分のクロムを溶解した。マスクと同じパターンでクロムが抜けた基板をドライエッチング装置でエッチングした。エッチング後、基板全面に紫外線を照射し、残存しているフォトレジストを除去した(図 A-4(3)-(6))。

マイクロ流路の作成後、溶液の出入り口確保のために基板に穴あけ加工を行った。石英基板を蠟で固定し、ダイヤモンド粒子を先端に電着させた $\phi = 0.5 \text{ mm}$ のドリルを用いて穴あけ加工を行った。このとき石英の粉の飛散防止とドリルの回転から生じる摩擦熱による加熱を抑えるために水を基板上に垂らしながら穴あけ作業を行った。穴あけ後、再びクロムエッチャーに 12 時間浸し、基板上の残存クロムを除去した(図 A-4(7))。

発表状況

(1) 学術雑誌等に発表した論文又は著書

【査読付き講演論文】

1. Ryoichi Ohta, Kazuma Mawatari, Emi Mori, Takehiko Kitamori, “Single-molecule ELISA Utilizing Extended-nano Fluidic Device” *The Proceedings of Conference μ TAS 2016*, 933-935(2016)
採択率 60%
2. Ryoichi Ohta, Kazuma Mawatari, Kentaro Shirai, Hisashi Shimizu, Takehiko Kitamori, “Single-molecule Immunoassay by Developing Extended-nano Fluidic Device” *The Proceedings of Conference μ TAS 2015*, 817-819(2015)
採択率 60%

(2) 国際会議における発表

【口頭発表】

1. Ryoichi Ohta, Kazuma Mawatari, Kentaro Shirai, Hisashi Shimizu, Takehiko Kitamori, “Detection of countable-number of molecules by integrating ELISA in extended-nano space” THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES 2015 (Pacifichem 2015), Honolulu , Hawaii , 2015/12/15-20
2. Ryoichi Ohta, Kazuma Mawatari, Emi Mori, Takehiko Kitamori, “Development of Single- and Countable-molecule ELISA Utilizing Extended-nano Fluidic Device” 2016 International Conference on Microfluidics, Nanofluidics and Lab-on-a-chip, Dalian, China, 2016/6/10-12

【ポスター発表】

1. Ryoichi Ohta, Kazuma Mawatari, Emi Mori, Takehiko Kitamori, “Single-molecule ELISA Utilizing Extended-nano Fluidic Device” , The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences(μ TAS2016), Dublin, Ireland, 2016/10/9-13
2. Ryoichi Ohta, Kazuma Mawatari, Kentaro Shirai, Hisashi Shimizu, Takehiko Kitamori, “Single-molecule Immunoassay by Developing Extended-nano Fluidic Device”, The

19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences(μ TAS2015), Gyeongju , Korea , 2015/10/25-29

3. Ryoichi Ohta, Kazuma Mawatari, Kentaro Shirai, Hisashi Shimizu, Takehiko Kitamori, “Countable-molecule Immunoassay by Integrating ELISA in Extended-nano Space”, International Workshop on Extended-nano Fluidics, Tokyo, Japan, 2015/3/26-27

(3) 国内学会・シンポジウム等における発表

【口頭発表】

1. 太田 諒一, 馬渡 和真, 清水 久史, 北森 武彦, 拡張ナノ流体デバイスを用いた単一・可算個分子 ELISA 法”, 第 76 回分析化学討論会, 岐阜, 2016/5/28-29

【ポスター発表】

1. 太田 諒一, 馬渡和真, 森絵美, 北森武彦, “拡張ナノ流体デバイスを用いた単一分子 ELISA におけるアーチファクトの原因解明と低減”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 33 回研究会, 東京, 2016/4/25-26
2. 太田 諒一, 馬渡 和真, 白井 健太郎, 清水 久史, 北森 武彦, “単一タンパク分子検出に向けた拡張ナノ免疫分析デバイスの開発”, 日本分析化学会 第 64 年会, 福岡, 2015/9/9-11
3. 太田 諒一, 馬渡 和真, 白井 健太郎, 清水 久史, 北森 武彦, “拡張ナノ空間を用いた免疫分析デバイスによる可算個分子検出”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 30 回研究会, 北海道, 2014/10/2-3

(4) 受賞

1. 優秀ポスター賞、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 30 回研究会, 北海道大学フロンティア応用科学研究棟, 2014/10/2-3

参考文献

- [1] D. Wang and S. Bodovitz, “Single cell analysis: the new frontier in ‘omics’.” *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 6, pp. 281–90, Jun. 2010.
- [2] C. E. Meacham and S. J. Morrison, “Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity,” *Nature*, vol. 501, no. 7467, pp. 328–337, Sep. 2013.
- [3] A. Marusyk and K. Polyak, “Tumor heterogeneity: Causes and consequences,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1805, no. 1, pp. 105–117, Jan. 2010.
- [4] M. A. Walling and J. R. E. Shepard, “Cellular heterogeneity and live cell arrays,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 7, p. 4049, Jun. 2011.
- [5] K. Lewis, “Persister cells, dormancy and infectious disease,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 5, no. 1, pp. 48–56, Jan. 2007.
- [6] Y. Wakamoto, N. Dhar, R. Chait, K. Schneider, F. Signorino-Gelo, S. Leibler, and J. D. McKinney, “Dynamic Persistence of Antibiotic-Stressed Mycobacteria,” *Science (80-.)*, vol. 339, no. 6115, pp. 91–95, Jan. 2013.
- [7] M. J. Hangauer, V. S. Viswanathan, M. J. Ryan, D. Bole, J. K. Eaton, A. Matov, J. Galeas, H. D. Dhruv, M. E. Berens, S. L. Schreiber, F. McCormick, and M. T. McManus, “Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition,” *Nature*, vol. 551, no. 7679, p. 247, Nov. 2017.
- [8] C. Gawad, W. Koh, and S. R. Quake, “Single-cell genome sequencing: current state of the science,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 17, no. 3, pp. 175–188, Mar. 2016.
- [9] O. Stegle, S. A. Teichmann, and J. C. Marioni, “Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 16, no. 3, pp. 133–145, Mar. 2015.
- [10] J. R. S. Newman, S. Ghaemmaghami, J. Ihmels, D. K. Breslow, M. Noble, J. L. DeRisi, and J. S. Weissman, “Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise,” *Nature*, vol. 441, no. 7095, pp. 840–846, Jun. 2006.
- [11] A. J. Ibáñez, S. R. Fagerer, A. M. Schmidt, P. L. Urban, K. Jefimovs, P. Geiger, R. Dechant, M. Heinemann, and R. Zenobi, “Mass spectrometry-based metabolomics of single yeast cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 22, pp. 8790–4, May 2013.
- [12] Y. Taniguchi, P. J. Choi, G.-W. Li, H. Chen, M. Babu, J. Hearn, A. Emili, and X. S. Xie, “Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells,” *Science*, vol. 329, no. 5991, pp. 533–538, 2010.
- [13] D. Di Carlo and L. P. Lee, “Dynamic Single-Cell Analysis for Quantitative Biology,”

- Anal. Chem.*, vol. 78, no. 23, pp. 7918–7925, Dec. 2006.
- [14] S. J. Altschuler and L. F. Wu, “Cellular heterogeneity: do differences make a difference?,” *Cell*, vol. 141, no. 4, pp. 559–63, May 2010.
- [15] N. M. Toriello, E. S. Douglas, N. Thaitrong, S. C. Hsiao, M. B. Francis, C. R. Bertozzi, and R. A. Mathies, “Integrated microfluidic bioprocessor for single-cell gene expression analysis.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 51, pp. 20173–8, Dec. 2008.
- [16] D. Ramsköld, S. Luo, Y.-C. Wang, R. Li, Q. Deng, O. R. Faridani, G. A. Daniels, I. Khrebtukova, J. F. Loring, L. C. Laurent, G. P. Schroth, and R. Sandberg, “Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 30, no. 8, pp. 777–82, Aug. 2012.
- [17] S. Islam, A. Zeisel, S. Joost, G. La Manno, P. Zajac, M. Kasper, P. Lönnerberg, and S. Linnarsson, “Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers,” *Nat. Methods*, vol. 11, no. 2, pp. 163–166, Feb. 2014.
- [18] S. Marguerat, A. Schmidt, S. Codlin, W. Chen, R. Aebersold, and J. Bähler, “Quantitative Analysis of Fission Yeast Transcriptomes and Proteomes in Proliferating and Quiescent Cells,” *Cell*, vol. 151, no. 3, pp. 671–683, Oct. 2012.
- [19] U. Landegren, J. Vånelid, M. Hammond, R. Y. Nong, D. Wu, E. Ullerås, and M. Kamali-Moghaddam, “Opportunities for Sensitive Plasma Proteome Analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 4, pp. 1824–1830, Feb. 2012.
- [20] M. Beck, A. Schmidt, J. Malmstroem, M. Claassen, A. Ori, A. Szymborska, F. Herzog, O. Rinner, J. Ellenberg, and R. Aebersold, “The quantitative proteome of a human cell line.,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, no. 1, p. 549, Nov. 2011.
- [21] P. C. Blainey, “The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 37, no. 3, pp. 407–427, May 2013.
- [22] F. Tang, C. Barbacioru, Y. Wang, E. Nordman, C. Lee, N. Xu, X. Wang, J. Bodeau, B. B. Tuch, A. Siddiqui, K. Lao, and M. A. Surani, “mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell,” *Nat. Methods*, vol. 6, no. 5, pp. 377–382, May 2009.
- [23] A.-E. Saliba, A. J. Westermann, S. A. Gorski, and J. Vogel, “Single-cell RNA-seq: advances and future challenges,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 14, pp. 8845–8860, Aug. 2014.
- [24] L. Cai, N. Friedman, and X. S. Xie, “Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level.,” *Nature*, vol. 440, no. 7082, pp. 358–62, Mar. 2006.
- [25] O. Shimomura, F. H. Johnson, and Y. Saiga, “Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea,” *J. Cell. Comp. Physiol.*, vol. 59, no. 3, pp. 223–239, Jun. 1962.

- [26] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher, “Green fluorescent protein as a marker for gene expression.,” *Science*, vol. 263, no. 5148, pp. 802–5, Feb. 1994.
- [27] J. Yu, J. Xiao, X. Ren, K. Lao, and X. S. Xie, “Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time.,” *Science*, vol. 311, no. 5767, pp. 1600–3, Mar. 2006.
- [28] E. A. Ponomarenko, E. V Poverennaya, E. V Ilgisonis, M. A. Pyatnitskiy, A. T. Kopylov, V. G. Zgoda, A. V Lisitsa, and A. I. Archakov, “The Size of the Human Proteome: The Width and Depth.,” *Int. J. Anal. Chem.*, vol. 2016, p. 7436849, 2016.
- [29] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, and T. Yanagida, “Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution,” *Nature*, vol. 374, no. 6522, pp. 555–559, Apr. 1995.
- [30] A. Sujith, T. Itoh, H. Abe, A. A. Anas, K. Yoshida, V. Biju, and M. Ishikawa, “Surface enhanced Raman scattering analyses of individual silver nanoaggregates on living single yeast cell wall,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 92, no. 10, p. 103901, Mar. 2008.
- [31] S. Wang, F. Haque, P. G. Rychahou, B. M. Evers, and P. Guo, “Engineered nanopore of phi29 dna-packaging motor for real-time detection of single colon cancer specific antibody in serum,” *ACS Nano*, vol. 7, no. 11, pp. 9814–9822, 2013.
- [32] D. M. Rissin, C. W. Kan, T. G. Campbell, S. C. Howes, D. R. Fournier, L. Song, T. Piech, P. P. Patel, L. Chang, A. J. Rivnak, E. P. Ferrell, J. D. Randall, G. K. Provuncher, D. R. Walt, and D. C. Duffy, “Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, no. 6, pp. 595–9, Jun. 2010.
- [33] S. H. Kim, S. Iwai, S. Araki, S. Sakakihara, R. Iino, and H. Noji, “Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules.,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 23, pp. 4986–4991, 2012.
- [34] Darwin R. Reyes, Dimitri Iossifidis, and Pierre-Alain Auroux, and A. Manz, “Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology,” 2002.
- [35] Pierre-Alain Auroux, Dimitri Iossifidis, and Darwin R. Reyes, and A. Manz, “Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications,” 2002.
- [36] K. Ren, J. Zhou, and H. Wu, “Materials for Microfluidic Chip Fabrication,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 46, no. 11, pp. 2396–2406, Nov. 2013.
- [37] 北森武彦, 庄子習一, 馬場嘉信, 藤田博之, “マイクロ化学チップの技術と応用,” 丸善, 2004.
- [38] 堀池靖浩, 宮原裕二, バイオチップとバイオセンサー. 共立出版, 2006.
- [39] S. C. Terry, J. H. Jerman, and J. B. Angell, “A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer,” *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 26, no. 12, pp.

- 1880–1886, Dec. 1979.
- [40] A. Manz, Y. Miyahara, J. Miura, Y. Watanabe, H. Miyagi, and K. Sato, “Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 1, no. 1–6, pp. 249–255, Jan. 1990.
- [41] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer, “Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 1, no. 1–6, pp. 244–248, Jan. 1990.
- [42] D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, and A. Manz, “Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip,” *Science (80-.)*, vol. 261, no. 5123, pp. 895–897, Aug. 1993.
- [43] T. Kitamori, M. Tokeshi, A. Hibara, and K. Sato, “Peer reviewed: thermal lens microscopy and microchip chemistry.” ACS Publications, 2004.
- [44] T. Kitamori, M. Fujinami, T. Odake, M. Tokeshi, and T. Sawada, “Photothermal Ultrasensitive Detection and Microchemistry in the Integrated Chemistry Lab,” in *Micro Total Analysis Systems '98*, Dordrecht: Springer Netherlands, 1998, pp. 295–298.
- [45] K. S. Ato, M. T. Okeshi, T. K. Itamori, and T. S. Awada, “Integration of Flow Injection Analysis and Zeptomole-Level Detection of the Fe(II)-o-Phenanthroline complex,” *Anal. Chem.*, vol. 15, no. 7, pp. 641–645, 1999.
- [46] H. Hisamoto, T. Saito, M. Tokeshi, A. Hibara, and T. Kitamori, “Fast and high conversion phase-transfer synthesis exploiting the liquid–liquid interface formed in a microchannel chip,” *Chem. Commun.*, vol. 0, no. 24, pp. 2662–2663, Dec. 2001.
- [47] E. Tamaki, K. Sato, M. Tokeshi, K. Sato, M. Aihara, and T. Kitamori, “Single-cell analysis by a scanning thermal lens microscope with a microchip: Direct monitoring of cytochrome c distribution during apoptosis process,” *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 7, pp. 1560–1564, 2002.
- [48] M. Tokeshi, T. Minagawa, K. Uchiyama, A. Hibara, K. Sato, H. Hisamoto, and T. Kitamori, “Continuous-Flow Chemical Processing on a Microchip by Combining Microunit Operations and a Multiphase Flow Network tion of complicated chemical processing on a microchip,” vol. 74, no. 7, pp. 1565–1571, 2002.
- [49] S. Hiki, K. Mawatari, A. Aota, M. Saito, and T. Kitamori, “Sensitive Gas Analysis System on a Microchip and Application for On-Site Monitoring of NH₃ in a Clean Room,” *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 12, pp. 5017–5022, Jun. 2011.
- [50] H. Yin and D. Marshall, “Microfluidics for single cell analysis,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 23, no. 1, pp. 110–119, Feb. 2012.
- [51] R. S. YALOW and S. A. BERSON, “Immunoassay of endogenous plasma insulin in

- man.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 39, no. 7, pp. 1157–75, Jul. 1960.
- [52] A. H. C. Ng, U. Uddayasankar, and A. R. Wheeler, “Immunoassays in microfluidic systems.,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 3, pp. 991–1007, 2010.
- [53] L. Mou and X. Jiang, “Materials for Microfluidic Immunoassays: A Review,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 6, no. 15, p. 1601403, Aug. 2017.
- [54] K. Sato, M. Tokeshi, T. Odake, H. Kimura, T. Ooi, M. Nakao, and T. Kitamori, “Integration of an Immunosorbent Assay System: Analysis of Secretory Human Immunoglobulin A on Polystyrene Beads in a Microchip,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 6, pp. 1144–1147, Mar. 2000.
- [55] K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, and T. Kitamori, “Determination of carcinoembryonic antigen in human sera by integrated bead-bed immunoassay in a microchip for cancer diagnosis.,” *Anal. Chem.*, vol. 73, no. 6, pp. 1213–1218, 2001.
- [56] K. Sato, M. Yamanaka, T. Hagino, M. Tokeshi, H. Kimura, and T. Kitamori, “Microchip-based enzyme-linked immunosorbent assay (microELISA) system with thermal lens detection.,” *Lab Chip*, vol. 4, no. 6, pp. 570–575, 2004.
- [57] T. Ohashi, K. Mawatari, K. Sato, M. Tokeshi, and T. Kitamori, “A micro-ELISA system for the rapid and sensitive measurement of total and specific immunoglobulin E and clinical application to allergy diagnosis.,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 7, pp. 991–995, 2009.
- [58] R. S. Sista, A. E. Eckhardt, V. Srinivasan, M. G. Pollack, S. Palanki, and V. K. Pamula, “Heterogeneous immunoassays using magnetic beads on a digital microfluidic platform.,” *Lab Chip*, vol. 8, no. 12, pp. 2188–2196, 2008.
- [59] K. Eyer, S. Stratz, P. Kuhn, S. K. Küster, and P. S. Dittrich, “Implementing enzyme-linked immunosorbent assays on a microfluidic chip to quantify intracellular molecules in single cells.,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 6, pp. 3280–7, Mar. 2013.
- [60] S. Stratz, K. Eyer, F. Kurth, and P. S. Dittrich, “On-chip enzyme quantification of single *Escherichia coli* bacteria by immunoassay-based analysis.,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 24, pp. 12375–81, Dec. 2014.
- [61] A. J. Hughes, D. P. Spelke, Z. Xu, C.-C. Kang, D. V Schaffer, and A. E. Herr, “Single-cell western blotting,” *Nat. Methods*, vol. 11, no. 7, pp. 749–755, Jul. 2014.
- [62] T. Tsukahara, K. Mawatari, and T. Kitamori, “Integrated extended-nano chemical systems on a chip.,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 3, pp. 1000–1013, 2010.
- [63] T. Tsukahara, K. Mawatari, A. Hibara, and T. Kitamori, “Development of a pressure-driven nanofluidic control system and its application to an enzymatic reaction.,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 391, no. 8, pp. 2745–2752, 2008.
- [64] H. Shimizu, K. Mawatari, and T. Kitamori, “Detection of nonfluorescent molecules

- using differential interference contrast thermal lens microscope for extended nanochannel chromatography.” *J. Sep. Sci.*, vol. 34, no. 20, pp. 2920–2924, 2011.
- [65] K. Shirai, K. Mawatari, and T. Kitamori, “Extended Nanofluidic Immunochemical Reaction with Femtoliter Sample Volumes,” *Small*, vol. 10, no. 8, pp. 1514–1522, Apr. 2014.
- [66] 白井健太郎, 免疫分析拡張ナノ流体デバイスの研究. 東京大学博士論文, 2014.
- [67] V. R. Holland, B. C. Saunders, F. L. Rose, and A. L. Walpole, “A safer substitute for benzidine in the detection of blood,” *Tetrahedron*, vol. 30, no. 18, pp. 3299–3302, Jan. 1974.
- [68] H. Shimizu, N. Miyawaki, Y. Asano, K. Mawatari, and T. Kitamori, “Thermo-optical Characterization of Photothermal Optical Phase Shift Detection in Extended-Nano Channels and UV Detection of Biomolecules,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 11, pp. 6043–6049, Jun. 2017.
- [69] Y. Xiao and S. N. Isaacs, “Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)--not all BSAs are alike.” *J. Immunol. Methods*, vol. 384, no. 1–2, pp. 148–51, Oct. 2012.
- [70] Y. Xu, C. Wang, Y. Dong, L. Li, K. Jang, K. Mawatari, T. Suga, and T. Kitamori, “Low-temperature direct bonding of glass nanofluidic chips using a two-step plasma surface activation process.” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 402, no. 3, pp. 1011–1018, 2012.
- [71] Y. Xu, C. Wang, L. Li, N. Matsumoto, K. Jang, Y. Dong, K. Mawatari, T. Suga, and T. Kitamori, “Bonding of glass nanofluidic chips at room temperature by a one-step surface activation using an O₂/CF₄ plasma treatment,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 6, p. 1048, Feb. 2013.
- [72] K. Jang, C. Wang, Y. Xu, and T. Kitamori, “DEVELOPMENT OF FLUORINE INDUCED PLASMA ACTIVATING ROOM-TEMPERATURE BONDING STRATAGE FOR HIGH-PRESSURE MICRO-NANO FLUIDIC DEVICES,” *Proc. MicroTAS2012*, pp. 1237–1239, 2012.
- [73] K. FUJII, M. KIUCHI, A. CHAYAHARA, and M. SATOU, “Surface modification by ion beam mixing.” *J. Soc. Mater. Sci. Japan*, vol. 37, no. 421, pp. 1131–1138, 1988.
- [74] Ogale, Phase, Chaudhari, Ghaisas, Kanetkar, Patil, Bhide, and Date, “Ion-beam mixing at the Fe/Al₂O₃ interface as revealed by conversion-electron Mössbauer spectroscopy.” *Phys. Rev. B. Condens. Matter*, vol. 35, no. 4, pp. 1593–1601, Feb. 1987.
- [75] A. A. Bernardes, C. Radtke, M. D. C. M. Alves, I. M. Baibich, M. Lucchese, and J. H. Z. Dos Santos, “Synthesis and characterization of SiO₂-CrO₃, SiO₂-MoO₃, and SiO₂-

- WO₃ mixed oxides produced using the non-hydrolytic sol-gel process,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 69, no. 1, pp. 72–84, 2014.
- [76] P. Hornbeck, “Enzyme-Linked Immunosorbent Assays,” *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 1, no. 1, p. 2.1.1-2.1.22, Mar. 1992.
- [77] T. Mahmood and P.-C. Yang, “Western blot: technique, theory, and trouble shooting,” *N. Am. J. Med. Sci.*, vol. 4, no. 9, pp. 429–34, Sep. 2012.
- [78] Y. L. Jeyachandran, J. A. Mielczarski, E. Mielczarski, and B. Rai, “Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 341, no. 1, pp. 136–142, Jan. 2010.
- [79] T. Nakao, K. Mawatari, H. Shimizu, E. Mori, A. Yoshizaki, and T. Kitamori, “THIN-LIQUID LAYER FORMED BY μ m-SIZED CHANNEL FOR SENSITIVE IMMUNOASSAY,” *Proc. MicroTAS2016*, pp. 585–586, 2016.
- [80] Jun Wei, S. M. L. Nai, C. K. S. Wong, Zheng Sun, and Loke Chong Lee, “Low temperature glass-to-glass wafer bonding,” *IEEE Trans. Adv. Packag.*, vol. 26, no. 3, pp. 289–294, Aug. 2003.
- [81] B. R. Fonslow and M. T. Bowser, “Free-flow electrophoresis on an anodic bonded glass microchip,” *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 17, pp. 5706–5710, 2005.
- [82] S. Queste, R. Salut, S. Clatot, J.-Y. Rauch, and C. G. Khan Malek, “Manufacture of microfluidic glass chips by deep plasma etching, femtosecond laser ablation, and anodic bonding,” *Microsyst. Technol.*, vol. 16, no. 8–9, pp. 1485–1493, Aug. 2010.
- [83] L. Chen, G. Luo, K. Liu, J. Ma, B. Yao, Y. Yan, and Y. Wang, “Bonding of glass-based microfluidic chips at low- or room-temperature in routine laboratory,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 119, no. 1, pp. 335–344, Nov. 2006.
- [84] Y. Xu, M. Takai, T. Konno, and K. Ishihara, “Microfluidic flow control on charged phospholipid polymer interface,” *Lab Chip*, vol. 7, no. 2, pp. 199–206, 2007.
- [85] T. Tsukahara, K. Mawatari, A. Hibara, and T. Kitamori, “Development of a pressure-driven nanofluidic control system and its application to an enzymatic reaction,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 391, no. 8, pp. 2745–2752, Aug. 2008.
- [86] P. Mao and J. Han, “Fabrication and characterization of 20 nm planar nanofluidic channels by glass–glass and glass–silicon bonding,” *Lab Chip*, vol. 5, no. 8, p. 837, Aug. 2005.
- [87] J. S. Mellors, V. Gorbounov, R. S. Ramsey, and J. M. Ramsey, “Fully Integrated Glass Microfluidic Device for Performing High-Efficiency Capillary Electrophoresis and Electrospray Ionization Mass Spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 18, pp. 6881–6887, Sep. 2008.

- [88] Y. Xu, C. Wang, Y. Dong, L. Li, K. Jang, K. Mawatari, T. Suga, and T. Kitamori, “Low-temperature direct bonding of glass nanofluidic chips using a two-step plasma surface activation process,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 402, no. 3, pp. 1011–1018, Jan. 2012.
- [89] 片桐純平, 拡張ナノ空間の高分子修飾法の開発と拡張ナノクロマトグラフィーへの応用. 東京大学修士論文, 2012.
- [90] W. P. Maszara, G. Goetz, A. Caviglia, and J. B. McKitterick, “Bonding of silicon wafers for silicon - on - insulator,” *J. Appl. Phys.*, vol. 64, no. 10, pp. 4943–4950, Nov. 1988.
- [91] D. Blatt, R. John, and D. Coker, “Stress intensity factor and compliance solutions for a single edge notched specimen with clamped ends,” *Eng. Fract. Mech.*, vol. 47, no. 4, pp. 521–532, Mar. 1994.
- [92] T. H. H. Le, K. Mawatari, Y. Pihosh, T. Kawazoe, T. Yatsui, M. Ohtsu, and T. Kitamori, “Novel sub-100 nm surface chemical modification by optical near-field induced photocatalytic reaction,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 17, no. 4, pp. 751–758, Oct. 2014.
- [93] H. Shimizu, K. Morikawa, Y. Liu, A. Smirnova, K. Mawatari, and T. Kitamori, “Femtoliter high-performance liquid chromatography using extended-nano channels,” *Analyst*, vol. 141, no. 21, pp. 6068–6072, Oct. 2016.
- [94] A. Campbell, 利昭大沢, モノクローナル抗体 (生化学実験法). 東京化学同人, 1998.
- [95] R. Karlsson, A. Michaelsson, and L. Mattsson, “Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system,” *J. Immunol. Methods*, vol. 145, no. 1–2, pp. 229–240, Dec. 1991.
- [96] H. Chinen, K. Mawatari, Y. Pihosh, K. Morikawa, Y. Kazoe, T. Tsukahara, and T. Kitamori, “Enhancement of Proton Mobility in Extended-Nanospace Channels,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 51, no. 15, pp. 3573–3577, Apr. 2012.
- [97] C. F. Woolley, M. A. Hayes, P. Mahanti, S. Douglass Gilman, and T. Taylor, “Theoretical limitations of quantification for noncompetitive sandwich immunoassays,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 28, pp. 8605–8615, Nov. 2015.
- [98] K. Taniguchi, T. Kajiyama, and H. Kambara, “Quantitative analysis of gene expression in a single cell by qPCR,” *Nat. Methods*, vol. 6, no. 7, pp. 503–506, 2009.
- [99] A. Hucknall, S. Rangarajan, and A. Chilkoti, “In Pursuit of Zero: Polymer Brushes that Resist the Adsorption of Proteins,” *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 23, pp. 2441–2446, Jun. 2009.

謝辞

私、太田諒一が北森研究室に配属されてから7年間の経とうとしています。今、ようやく、博士論文を書き上げることができました。途中、全く答えが見えずに途方にくれることもありました。北森教授も、馬渡准教授も、両親も、その相談に対して真剣に考えてくださりました。皆様のサポートがなければ、間違いなく書き上げることはできませんでした。この先、研究者としての活動など、何らかの形でご恩に報いてゆければと思います。もちろん、先生方のみならず、北森研究室の皆様をはじめ多くの方のお力添えがあってここまで辿り着くことができました。ここに深くお礼申し上げます。

北森教授からは、7年間ご指導ご鞭撻を賜りました。北森教授からの教えは、研究の枠を超え、より根本的な考え方を変えるようなものが多く、大変勉強になりました。特に、自分の言いたいことよりも相手の聞きたいことを考えろ、という教えは強く印象に残っており、なんとか実行できるように心がけております。また、学会先でも様々な経験を積ませていただくことができました。おいしい、変わったご飯をいただくこともできました。北森教授のように活発で交友関係の広い研究者になれるよう、精進していきます。心より深く感謝いたします。

馬渡准教授には修士の頃からずっと直接の指導教官としてお世話になりました。論理の組み立て方、実験の進め方、伝え方、いろいろなことを教えていただきました。馬渡准教授のように、無駄なく、論理的に考え、仕事ができる研究者になりたいです。こちらからは何度も心配や、苦勞を掛けてしまい、申し訳ない限りです。馬渡准教授が指導教官で良かったです。

嘉副特任准教授には、研究や事務など、いろいろなことでの相談に乗っていただきました。嘉副特任准教授はとても話しやすく、お忙しい中に何度かお邪魔してしまいましたが、それでも相談に乗っていただき深く感謝いたします。ドライの件は申し訳ございませんでした。頼りにさせていただきました。

Le 講師には、POPSの組み方、調整方法などを教えていただきました。ベトナム料理もごちそうになり、大変感謝いたします。

森川特任助教には、クリーンルームの管理や、装置の使い方で、何度も助けていただきました。いつも丁寧に教えていただけるあまり、少々甘えすぎているように感じております。森川さんのように上手に実験できるように精進いたします。

森研究員と朝岡研究員は、実験を進める上で大変お世話になりました。特に苦しかった時期に優しく声をかけていただき、心の助けになりました。いろんな差し入れも美味しかったですし、小話も楽しかったです。

作田研究員は、デバイスの加工を教えてください、時には助けていただいたりと大変お世話になりました。感謝いたします。

秘書の小川淑子さん、遠山亜希さんには日頃から事務関連などで大変お世話になりました。感謝申し上げます。

D3の中尾さんが共に戦ってくれたおかげで、なんとか私も走り切ることができそうです。一緒に通学しようと家まで来てくれたこともあり、とても励みになりました。D2の山本君からは、明るさとエネルギーをもらえました。こんな私を頼りにしていただき、感謝します。D1の高木くんと津山くんが夜遅くまで頑張っている姿を見て、私も走る勇気やクリスマスケーキをもらえました。B4からM2の学生の皆さんも、暖かく私に接してくれたり、研究室を明るくしてくれたり、本当にありがとうございました。

また、すでに卒業した先輩方、とくに山下博士や白井博士は様々な面で私の手本であり、あこがれでした。山下さんのように苦しい時も遊び心を失わず研究室を明るくしようとする姿勢を持ち続けたいと思います。

最後になりましたが、研究に従事する人生を送りたいという私の希望に多大なる理解を示し、何度もつまずき心配をかけることがあっても、それでも私の学生生活を支え続けてくれた両親に深く感謝いたします。ありがとうございました。

2018年
太田 諒一