論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目　Living Single-cell Protein Analysis by Extended-nano Fluidic Device
（拡張ナノ流体デバイスによる単一生細胞タンパク分析）

氏　　名　　中尾　達郎

1.　緒言

近年、マイクロ空間に様々な機能を集積化するマイクロ流体デバイス工学が化学・バイオの分野に広く応用され注目を集めている。当研究室では混合・反応・抽出など化学の単位操作をマイクロ空間で実現して（マイクロ単位操作）これを集積化する汎用的な方法論を世界に先駆けて確立し、様々な化学プロセスを実現してきた。さらに、空間サイズが光の波長よりも小さい10-100 nmの拡張ナノ空間に方法論を展開して、単一・可算個タンパク分子の高選択的分析（拡張ナノ免疫分析）など体積fL（10^{-15} L）・単一分子という分析化学の極限を追求してきた。また、非蛍光分子の超高感度検出を可能とする微分干渉熱レンズ顕微鏡（DIC-TLM）も実現してきた。一方、バイオ医療分野ではがんや免疫疾患などの研究において細胞の多様性が論じられ、細胞が放出するタンパクの１細胞レベルでの分析が求められている。しかし，従来の分析ツールは細胞(~pL)より遥かに大きいμL: 10^{-6} Lであるため、100万細胞でしか分析できなかった。そこで当研究室では、マイクロ空間が細胞と同サイズであることに着目し、マイクロ空間で１細胞を前処理してその細胞が放出するタンパクを拡張ナノ空間で分析する単一細胞タンパク分析デバイスを構想し研究を進めてきた。これまで数個のタンパク分子でも捕捉・定量できる免疫反応法など単一細胞タンパク分析の要素となる技術を開発してきたが、単一細胞から分子に至る全ての操作を集積化して統合デバイスとして機能させることが課題であった。

本研究ではマイクロ・拡張ナノ統合デバイスによる単一生細胞タンパク分析の実現を目的とし、（１）システム設計と拡張ナノ単位操作の開発、（２）マイクロ・拡張ナノ単位操作の集積化による統合デバイスの作製と検証、（３）単一B細胞分析への応用に取り組んだ。

２．システム設計と拡張ナノ単位操作の開発

本章では、単一生細胞タンパク分析のシステム設計と不足している拡張ナノ単位操作の

開発を目的とした。

2-1)単一生細胞タンパク分析のシステム設計

　はじめに、図 1 のように単一生細胞タンパク分析の化学プロセスを解析し、マイクロ・拡張ナノ単位操作を設計した。マイクロ空間での細胞の選別・分取、拡張ナノ空間での目的分子捕捉、酵素反応、DIC-TLM 検出などのマイクロ・拡張ナノ単位操作は当研究室で既に実現しているが、分析化学で極めて重要な定容・分取の拡張ナノ単位操作がないため、これを創る必要があることがわかった。そこで定容・分取の拡張ナノ単位操作を新たに開発することとした。

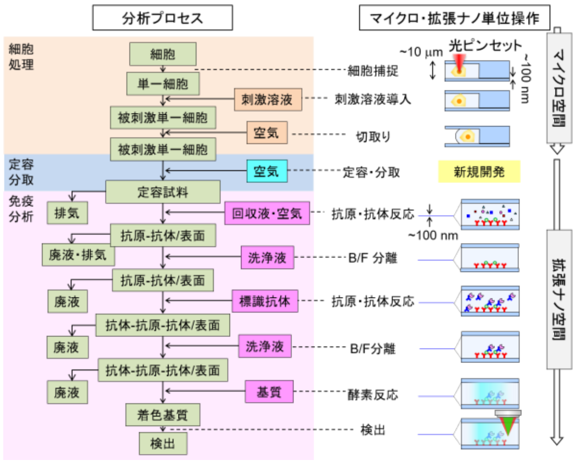

図 1: 単一生細胞タンパク分析のシステム設計

2-2) fL メスピペット・fL フラスコの提案

図2bのようにバルクのメスピペットにおいては、気液界面を利用して試料を切り取ることで定容を実現している。また、メスピペットの定容誤差は0.2%以下と定められており、これは標線の加工技術で決まる。そこで、拡張ナノ空間においてバルクと同様の精度での定容を実現するために電子線によるナノ加工法（精度10 nm）を用いたfLメスピペットを提案した。また気液界面による定容を実現するために、空気による切取りとラプラス圧による気液界面制御を用いた。ラプラス圧の大きさは流路半径に反比例するため、図2aのように流路の狭窄部分を設けることで、試料の保持が可能である。またラプラス圧以上の圧力をかけることで、試料のフラスコへの輸送ができる。一方フラスコにおいては円形にすることで、気流の回り込みにより試料の保持を実現する。

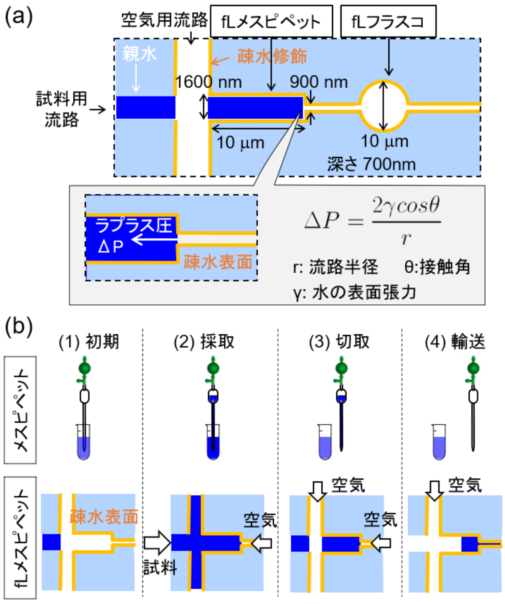

図 2: (a) fL メスピペットと fL フラスコの設計と (b) 動作原理

2-3) fL メスピペット・fL フラスコの設計と作製

　図 2a のように、2-2）で提案した fL メスピペット・fL フラスコを、それぞれ体積 11 fL、50 fL となるように設計した。続いて設計したデバイスを作製した。ガラス基板上にフォトリソグラフィ・電子線リソグラフィ・ウェットエッチング・プラズマエッチングによってマイクロ・拡張ナノ流路を加工した。修飾剤を含んだ溶液を拡張ナノ流路に導入し、流路表面を疎水性のオクタデシルシランで修飾した。その後 1M の水酸化ナトリウム水溶液を導入し、試料用流路を部分的に親水化した。設計通りの fL メスピペット・fL メスフラスコを作製することに成功した。

2-4) fL メスピペット・フラスコの機能の検証

作製した fL メスピペットとフラスコの機能を検証した。デバイスを圧力コントローラに接続して、試料溶液と空気をマイクロ流路を介して拡張ナノ流路に導入した。原理検証のため、モデル試料として水を用いた。

検証の結果、試料溶液の切取に気流を用いると、定容した試料溶液が流動する空気に晒されて 7 秒程度で蒸発・消失することがわかった。これは、体積 fL と極めて微小な拡張ナノ空間では蒸発が分析における大きな問題として顕在化することを意味している。

そこで空気用流路の上下両方から空圧をかけることで静圧駆動による切取とし、さらにオペレーション時間を 1 秒以内とすることで、試料の蒸発量を定容体積の 1 %以内（静圧駆動時）に抑制することができた。これにより、体積 11fL の試料の定容・分取に初めて成功した。以上より、単一生細胞タンパク分析に必要な単位操作を全て揃えることができた。

３．マイクロ・拡張ナノ単位操作の集積化による統合デバイスの作製と検証

本章では、第 2 章におけるシステム設計にもとづき、マイクロ・拡張ナノ単位操作を集積化した統合デバイス、即ち fL 分析デバイスを作製して、単一生細胞タンパク分析を原理検証することを目的とした。

3-1) 統合デバイスの設計と作製

fL 分析デバイスによる単一生細胞タンパク分析を実現するためには、図 1 で示した 7 種類の試薬を流す複数の拡張ナノ流路をガラス基板に加工し、さらに、4 種類の機能、即ち、定容・分取に必要な①親水性（ガラス表面）と②疎水性（オクタデシルシラン）、③免疫分析において非特異吸着を抑制するポリエチレングリコールと④目的タンパク分子を捕捉する抗体をそれぞれ異なる流路に修飾する必要がある。

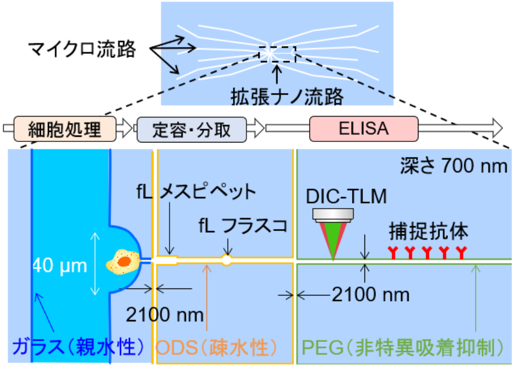

図 3: 単一生細胞タンパク分析デバイスの設計

図 1 のシステム設計をもとに fL 分析デバイスを設計すると 4 種の機能の配置は図 3 のようになる。現在の表面化学修飾法の限界は光分解を用いてガラス基板を部分的に修飾する方法と修飾剤を導入してガラス基板の全面を修飾する方法を組み合わせた 2 種類である [2]。そこで、本研究では修飾剤を導入する際に多相流を利用することで後者の方法を拡張し、上記 4 種の機能の表面修飾を実現した。これにより、単一生細胞タンパク分析デバイスの作製に成功した。

3-2) 統合デバイスの流体制御の検証

次に作製したデバイスの流体制御を試みたが、 1 流路に複数の試薬が重畳すると、試薬の切替の際に流路の圧力バランスが不安定化して、設計通りの流体制御が困難になることがわかった。これはマイクロ流路の流量（~nL/s）に対し、拡張ナノ流路の流量（~fL/s）が 10^6 倍小さいため、マイクロ流路での圧力の乱れが拡張ナノ空間に大きく影響することが原因だと考えられる。このことから、統合デバイスにおいて精緻な流体制御のために 1 試薬系統に対して 1 流路にするという、システム化の基本となる設計指針を得た。そこで、 1 流路 1 試薬の基本指針にもとづきデバイスを再設計した。ハーゲン・ポアズイユの式にもとづき流体回路を設計し、各流路の印加圧力を設定した。その結果、 8 本の拡張ナノ流路ネットワークにおいて、圧力制御による流体制御を設計通りに実現することに成功した。

3-3) fL 分析デバイスの動作検証

75 nM C 反応性タンパク質（CRP）溶液を標準試料と用いて、fL 分析デバイスを原理検証した。捕捉抗体として抗ヒト CRP 抗体、標識抗体として 10 nM の HRP 標識抗ヒト CRP 抗体、基質としてテトラメチルベンジジン（TMB）を用いた。また、洗浄液には 1%BSA、0.05%Tween20 を含んだ PBS 溶液を用いた。図 1 の分析プロセスに従い、CRP からの熱レンズ信号を取得した。また、PBS 溶液でも同様のプロセスを行い、ブランクの熱レンズ信号を取得した。

結果、図 4 に示すように、標準試料において各単位操作を実現できることを確認した。また、拡張ナノ免疫分析の測定結果からブランクと CRP500 分子（75 nM 11 fL）において有意な差を得た。これにより、11 fL の試料を対象とする fL 分析デバイスの流体制御の検証に成功した。

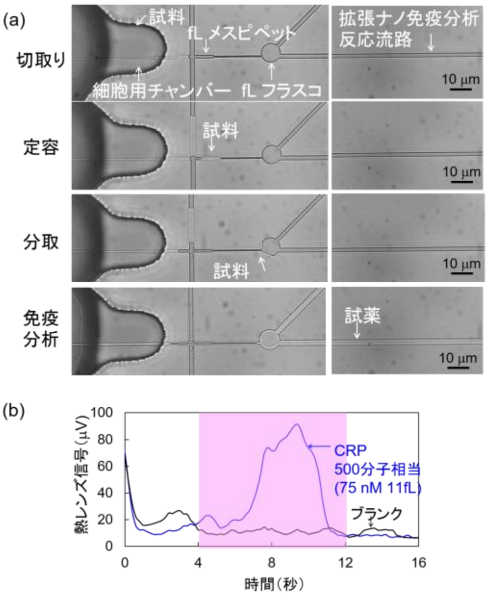

図 4: (a) 各単位操作の検証結果と(b) 拡張ナノ免疫分析の測定結果

４．単一B細胞分析への応用

第４章では、第２、３章で開発した単一生細胞タンパク分析デバイスの医学・生物学の研究への応用を試みた。当研究室の共同研究者である東大病院の吉崎グループでは自己免疫疾患の病理解明のためにB細胞が放出するサイトカインを分析している。本章では、単一生細胞タンパク分析デバイスをB細胞分析に応用する。

4-1) 分析性能の検証

まず単一生細胞タンパク分析デバイスの分析性能を評価した。B細胞が放出する自己免疫疾患の炎症促進性タンパクであるIL-6をターゲットとして分析性能を評価した。検出限界はとなり、感度としては十分分析が可能であると予想された。

4-2) 単一生細胞タンパク分析の実証

続いて、モデル細胞として不死化したB細胞であるRaji細胞を、デバイスに導入し信号を取得した。

4-3) 自己免疫疾患の患者血清への応用

自己免疫疾患の患者血清から得られるメモリーB細胞に対して、本デバイスを用いて単一生細胞タンパク分析を行った。

５．結言

第５章ではこれまでの研究をまとめ、研究の目的を達成したことを明確に述べた。細胞のプロセシングから・定容・分取・分子プロセシング・検出に至る細胞分析の複雑な化学プロセスをすべて一つデバイス上に集積化し、拡張ナノ流体デバイスによる単一生細胞タンパク分析を初めて実現した。今後、がん細胞や他の免疫細胞へと応用することで、がんや免疫疾患などの病理解明と新規治療法開拓に貢献すると期待される。