

## 審査の結果の要旨

氏名 中尾 達郎

本論文はマイクロ・拡張ナノ流体デバイス工学による単一生細胞タンパク分析デバイスに関する研究をまとめたものである。10-100  $\mu\text{m}$  の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進展している。本学位申請者が所属する研究室は、混合・反応など化学の単位操作を微小化してこれを集積化する汎用的な方法論（マイクロ単位操作）を世界に先駆けて確立した。さらに、光の波長以下の 10-100 nm 空間（以下、拡張ナノ空間と称する）に研究を展開して、単一・可算個分子の免疫分析（ELISA）など分析化学の極限を追求している。一方、バイオ・医学では、同種の細胞が持つ機能の 1 細胞レベルでの不均一性が論じられ、1 つの細胞を生かしたまま産生タンパクを分析する必要性が具体化している。しかし、現状の単一細胞分析の大多数は核酸を対象としており、タンパクでは報告例がない。タンパクは核酸と異なり化学増幅できず、分析種は膨大で、ELISA など高選択性をもつ複雑な化学プロセッシングが必要となる。しかも体積 pL の 1 細胞が産生する目的分子は可算個となり、細胞より遥かに大きな従来ツール（体積  $\mu\text{L}$ -mL）では目的分子が分散・希釈され分析できない。そこで本研究では、マイクロ単位操作の方法論にもとづき、細胞プロセッシング、分子プロセッシングをそれぞれマイクロ空間（体積 pL）、拡張ナノ空間（体積 fL）に集積化して統合すれば、目的分子の分散や希釈のない極微小空間での単一細胞・可算個分子プロセッシングを実現でき、単一生細胞タンパク分析デバイスを創成できると着想した。以上、本学位請求論文は次の構成とした。

第 1 章 本研究の背景と目的

第 2 章 定容・分取の拡張ナノ単位操作の開発

第 3 章 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検証

第 4 章 統合デバイスの分析性能の評価

第 5 章 単一 B 細胞分析への応用

第 6 章 まとめ・本研究の意義

以下、各章について簡単に説明する。

第 1 章ではマイクロ・拡張ナノ流体デバイス工学と単一細胞分析の現状など本研究の背景をまとめた。現状の単一細胞分析の問題点を整理して、単一生細

胞タンパク分析デバイスの構想を提案し、課題として（１）分析に必要な全てのマイクロ・拡張ナノ単位操作の開発、（２）ナノ流体制御や超高感度検出などデバイスを動作させるシステム技術の構築を挙げ、本研究の意義を明確にして、その目的を明らかにした。

第 2 章では単一生細胞タンパク分析デバイスを設計し、必要な拡張ナノ単位操作を開発した。マイクロ・拡張ナノ単位操作の方法論にもとづくシステム設計により、1 細胞捕捉・刺激から産生タンパクの ELISA に至る計 11 の単位操作が必要であり、その中で定容・分取の拡張ナノ単位操作が不足していることを見出した。そこで、拡張ナノ空間で空圧により気液界面を操作して極微量液体試料を定容する fL メスピペット・fL フラスコを創成し、体積 11 fL、誤差 0.9% の定容・分取を世界ではじめて実現した。また、試料体積が fL と極めて小さいため、空圧に伴う気流に起因した液体試料の蒸発が分析の大きな問題として顕在化することを見出した。そこで、操作時間を蒸発に要する時間より十分短い 0.7 秒とすることで、蒸発量を試料体積の 1%以内に抑制した。以上、単一生細胞タンパク分析に必要な全てのマイクロ・拡張ナノ単位操作を揃えた。

第 3 章では単一生細胞タンパク分析デバイスを作製し動作させるシステム技術を開発した。計 11 のマイクロ・拡張ナノ単位操作を 1 つのデバイス上で全て実現するには、複数の流路の圧力バランスをとりながら 9 個の試薬を独立に送液する極めて複雑な圧力流体制御が課題となる。そこで、気液界面による試薬の相互拡散防止、1 流路 1 試薬という流体制御の新たな設計指針を打ち立てた。また、拡張ナノ流路における定容・分取では親水および疎水、ELISA では抗原抗体反応および非特異吸着抑制の計 4 種の機能を有する表面が必要となる。そこで流路に気液界面または液液界面を形成して部分的に修飾剤を流す表面部分修飾法を開発し、光分解を用いた表面部分修飾法と組み合わせて上記 4 種の表面を拡張ナノ流路内に実現した。以上により、単一生細胞タンパク分析デバイスの作製とその動作検証にはじめて成功した。

第 4 章では単一生細胞タンパク分析デバイスに集積化した拡張ナノ ELISA の分析性能を評価した。炎症促進性のサイトカインであるインターロイキン-6 (IL-6) を目的分子とし、拡張ナノ ELISA において流路の捕捉抗体の位置と液体の流速から IL-6 由来の信号を求める方法を提案・実証した。また、ELISA の検量線を作成するために、測定後の流路をグリシン塩酸緩衝液により洗浄し、表面の捕捉抗体を維持したまま免疫化学結合した目的分子および酵素標識抗体を解離平衡により除去することで、ELISA 流路の繰り返し利用をはじめて実現

した。以上により、濃度の異なる IL-6 標準試料系列による検量線の作成に成功し、検出限界 7 分子・定量限界 45 分子の性能を得た。

第 5 章では単一生細胞タンパク分析デバイスを完成して B 細胞分析に応用した。第 3 章で開発した表面部分修飾法によりデバイスのマイクロ流路を疎水化、マイクロ流路に接続した単一細胞チャンバーを親水化し、チャンバーへの 1 細胞捕捉における液相保持と産生タンパクの非特異吸着抑制を実現した。モデル B 細胞 (RAJI 細胞) に対して、マイクロ空間での 1 細胞捕捉・刺激 (6 時間)、拡張ナノ空間での 940 fL の定容・分取、産生 IL-6 の ELISA を実証し、計 11 のマイクロ・拡張ナノ単位操作を全て集積化した単一生細胞タンパク分析デバイスを世界ではじめて実現した。これにより、単一 B 細胞が刺激応答して産生する IL-6 が 479 分子/時間 (8.0 分子/分) であることを明らかにした。

第 6 章では本研究の学術上の意義をまとめた。マイクロ・拡張ナノ単位操作の方法論によるシステム設計にもとづき、fL 定容・分取の拡張ナノ単位操作を実現して、デバイスを動作させるシステム技術を確立することで、細胞から分子に至る化学プロセッシングを全て集積化した単一生細胞タンパク分析デバイスを世界ではじめて実現した。本研究は、複雑な化学プロセスをマイクロ・拡張ナノ流体デバイスに集積化するためのシステム化の方法論をはじめて創成したものであり、この分野の工学的規範となる研究である。また、単一細胞プロテオミクスの重要なツールを創成したものであり、細胞病理学における自己免疫疾患の病理解明と新規治療法開拓に繋がる他、神経科学、がん研究、幹細胞生物学など様々な分野の進展に大きく貢献する極めて重要な研究である。

以上、本論文はマイクロ・拡張ナノ流体デバイス工学のシステム化の方法論を構築して単一生細胞タンパク分析デバイスを創成し、バイオ・医学に極めて重要なツールを提供しバイオエンジニアリングに貢献するものである。よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。