

論文の内容の要旨

論文題目 Study of Extended Nanofluidic Immunoassay Device
(免疫分析拡張ナノ流体デバイスの研究)

氏名 白井 健太郎

1. 緒言

近年の医学・生物学では、多数細胞の集団ではなく個々の細胞の細胞活動を把握し理解することの重要性が報告されつつある。そのため特に発現状態を反映するタンパク質を単一細胞レベルで調べる研究ツールの開発が急務である。しかし、分析手法として、単一細胞体積 (pL) 中の 10^0 - 10^3 個と極微量タンパク質を定量できる単一分子・可算個分子レベルの定量性、および 10^4 種類以上の夾雑物から目的分子のみを認識できる高い選択性が要求されるうえ、細胞動態を追跡するために秒スケール以下の極短時間で分析しなければならない。すなわち、定量性・選択性・分析時間において極限の分析性能が要求されている。分析化学ではこれまでに高選択的なタンパク質分析法である免疫分析法が開発され、分析場の微小化により微量・迅速分析を実現してきた。しかし、 $10^2 \mu\text{m}$ の大きさのマイクロ空間を用いたとしても分析場体積は sub-nL 程度と細胞体積 pL よりも桁違いに大きいため、単一分子・単一細胞分析は困難であり、こうした要求にはほど遠かった。一方、筆者の所属研究室では、ガラス基板上に構築した拡張ナノ空間に対して、ナノ加工法や接合法、非蛍光分子検出法、圧力流体制御法などの基盤技術を世界に先駆けて実現し、分析デバイスを創成してきた。そこで本研究では、拡張ナノ空間の体積が fL-aL と細胞体積 (pL) よりも 3 桁以上小さく極微量分析に適した空間であるため、拡張ナノ空間を分析場とする免疫分析により単一細胞レベルの分析が実現できると着想した。そのためには波長よりも小さい拡張ナノ空間の特定の場所に単一分子を確実に捕捉・分析する分析場の構築が課題となる。

本研究では、拡張ナノ空間に免疫分析を集積化して、単一分子・単一細胞分析が実現できる免疫分析拡張ナノ流体デバイスの開発を目的とした。具体的には、(1) 極微量フェムトリットル分析場の構築、(2) 拡張ナノ空間における高効率抗原抗体反応の実証、(3) 酵素免疫測定法による単一分子・可算個分子分析の実現に取り組んだ。

2. 極微量フェムトリットル分析場の構築

第 2 章では、最初に拡張ナノ空間で単一分子・可算個分子を分析するための免疫分析拡張ナノ流体デバイスの構想を述べた (図 1)。本構想では、目的分子の高効率捕捉および化学増幅による単一目的分子検出・定量の組み合わせにより単一分子・可算個分子分析を実現する。拡張ナノ流路は深さ 10^2 nm と極めて浅いため、流路に導入された目的分子は数秒の反応時間で 10^3 回以上壁面と衝突し捕捉抗体によって逃さず捕捉できると期待さ

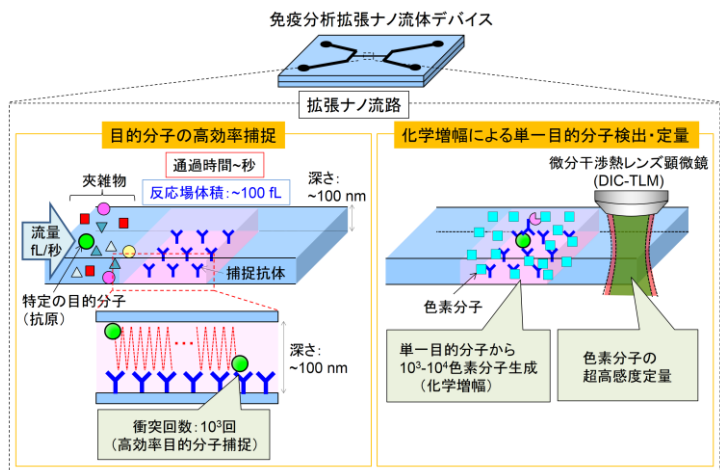


図 1 免疫分析拡張ナノ流体デバイスの構想

れる。捕捉した目的分子と酵素標識抗体でサンドイッチ複合体を形成し、酵素反応により単一目的分子から 10^3 - 10^4 色素分子を生成し化学増幅する。増幅・蓄積した色素分子を当研究室で開発した微分干渉熱レンズ顕微鏡 (DIC-TLM) を用いて超高感度に定量し、単一目的分子の検出・定量を実現する。

この構想の実現のための大きな課題として、目的分子を特定の場所に捕捉し検出するための抗体部分修飾を取り上げた。一般の免疫分析と同様に拡張ナノ流路に抗体全面修飾した場合、目的分子の捕捉位置の特定・検出が困難であるが、抗体部分修飾によりこの問題を解決できると考えた。

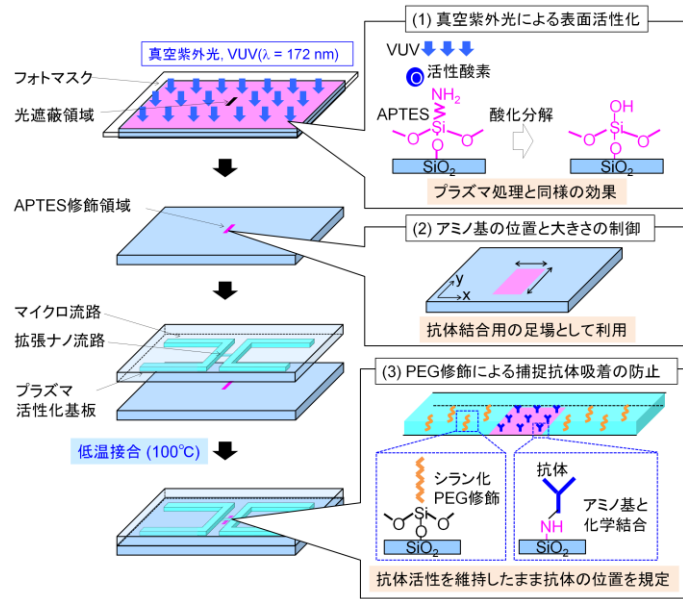


図 2 真空紫外光と低温接合を用いた抗体部分修飾法

2-1. 真空紫外光と低温接合を用いた抗体部分修飾法の提案

拡張ナノ空間で抗体部分修飾するためには、(1) $7\text{cm} \times 3\text{cm}$ の基板全体のうち決められた極微小な拡張ナノ空間 (幅 $10^2 \text{ nm} \times$ 長さ $10^2 \text{ }\mu\text{m}$) に抗体を修飾すること、(2) 流体制御のために抗体修飾領域以外は強固に接合されていること、の 2 点が必要となる。本研究では、これらの課題を解決するため、基板接合法に着目し、これまでガラス基板同士の接合に用いられてきた熱融着および低温接合における問題点を指摘したうえで、真空紫外光と低温接合を用いた新しい部分修飾・接合プロセスをはじめて開発した (図 2)。石英ガラス基板表面にアミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) を修飾してアミノ基を導入したのち、フォトマスクを通して真空紫外光を照射すると、光照射領域では大気中の酸素から生成した活性酸素が APTES を酸化分解し、プラズマと同様に表面活性化する。同時に、光遮蔽領域では位置と大きさを制御してアミノ基を残し、抗体結合の足場として利用できる。この下板と、あらかじめマイクロ・拡張ナノ流路を作製し、酸素プラズマ (フッ素添加) 処理により表面活性化した上板を 100°C の低温で接合した。接合後、シラン化ポリエチレングリコールによりガラス流路壁面を修飾し、捕捉抗体吸着を防止したのち、捕捉抗体 (抗マウス IgG 抗体) を化学的に固定し、拡張ナノ流路に抗体を部分修飾したデバイスを作製した。

2-2. フェムトリットル分析場の作製・実証

作製したデバイスの写真を図 3 に示す。真空紫外光の

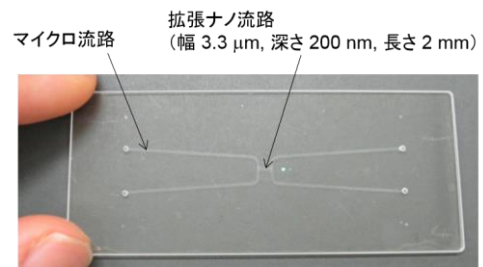


図 3 作製したデバイスの写真

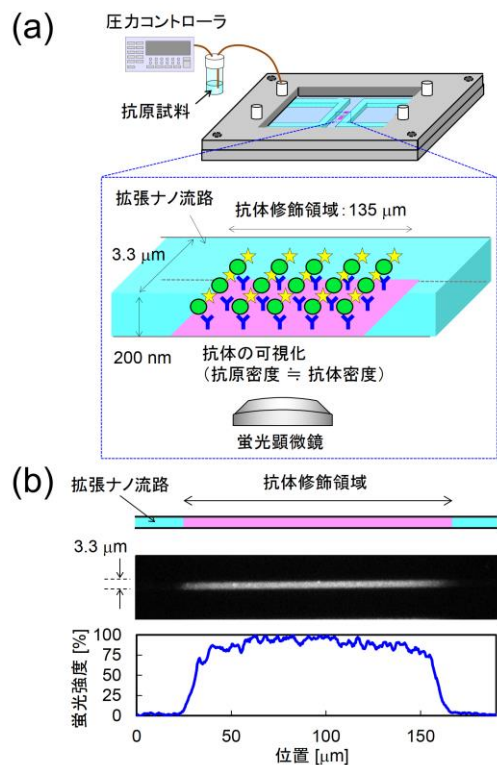


図 4 抗体修飾領域の可視化 (a) 実験 (b) 拡張ナノ流路の抗体修飾領域

高い表面活性化作用により基板全体に均一な接合を実現できた。デバイス中央部に拡張ナノ流路（幅 3.3 mm、深さ 200 nm、長さ 2 mm）があり、流路中央に長さ 135 μm に渡り抗体修飾を施した。抗体修飾領域が設計通り作製できているかを確認するため、図 4(a)のようにほぼ全ての捕捉抗体に抗原が結合する条件で蛍光標識抗原（Dylight488 標識マウス IgG, 67 nM）を導入し観察した。図 4(b)に示すように、部分修飾領域のみ明確な蛍光強度の上昇が見られ、領域の位置と幅は設計値通りであった。単一細胞よりも桁違いに小さな 86 fL の分析場を構築することに成功した。また、デバイスの耐圧性能は最大約 2 MPa であり、免疫分析のためのナノ流体制御に必要な耐圧性能（数 100 kPa）を十分に上回る接合強度を有していた。本技術は、極微小空間の固液界面の工学的設計を実現するはじめての手法であり、免疫分析に限らず固液界面を利用するマイクロ・拡張ナノ流体デバイス全般に大きく貢献できると考えられる。

3. 拡張ナノ空間における高効率抗原抗体反応の実証

第3章では、試料に含まれる単一分子・可算個分子レベルの目的分子を逃さず捕捉し定量するため、第2章で構築したフェムトリットル分析場において抗原抗体反応を確認し、ほぼ 100 % の分子捕捉率を実証した。

3-1. 抗原抗体反応の確認

抗原抗体反応を確認するため、抗原濃度を変えたときの抗体修飾領域における抗原結合速度を測定した。図 5(a)のように蛍光標識抗原を一定流量で連続的に導入し、蛍光強度の変化を蛍光顕微鏡で観察したところ、抗原濃度に応じて抗原結合速度が上昇する傾向が見られた（図 5(b)）。反応開始後 18 秒間の抗原結合速度（図 5(c)）には良好な濃度依存性がみられ、抗原抗体反応が起こっていることを確認できた。18 秒間に導入した試料体積は 810 fL と、単一細胞よりも小さな体積であった。

3-2. 拡張ナノ空間における高い分子捕捉率の実証

拡張ナノ流路が 10^2 nm と極めて浅く目的分子を逃さず捕捉できることを示すため、分子捕捉率（＝結合分子数／導入分子数）を実験から求めた。導入分子数は濃度、流量、時間から算出し、結合分子数は蛍光強度を濃度既知の抗原試料を用いて校正し分子数に換算して求めた。図 6(a)に示すように、導入分子数と結合分子数はほぼ同じ変化の割合で上昇していくことが分かった。図 6(b)に示すように、実際に分子捕捉率は 95 ± 19 % とほぼ 100 % に近い値が実験から得られ、特定の目的分子を確実に捕捉できることを実証した。

4. 酵素免疫測定法による単一分子・可算個分子分析の実現

第4章では、第2,3章の結果を総合的に応用して、酵素による化学増幅および微分干涉熱レンズ顕微鏡による超高感度定量を組み

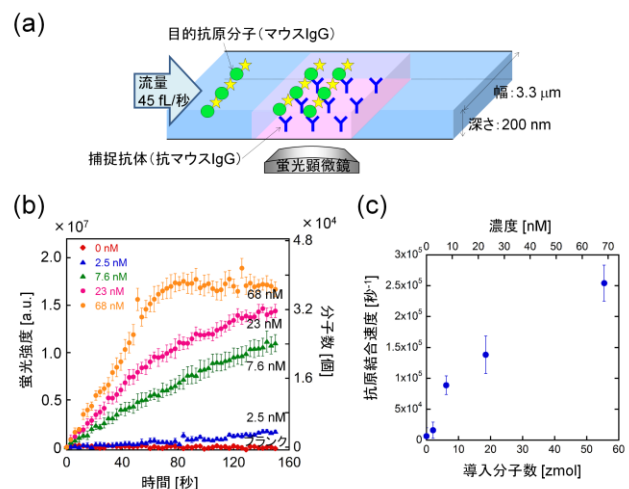


図5 抗原抗体反応の確認 (a)実験 (b)蛍光強度の時間変化 (c)抗原結合速度の濃度依存性

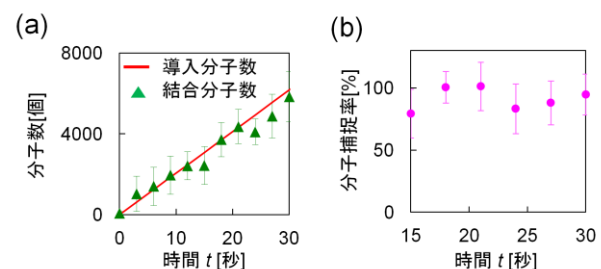


図6 分子捕捉率の評価 (a)導入分子数と結合分子数（濃度 7.6 nM） (b)分子捕捉率

合わせ、単一分子・可算個分子分析を実現する免疫分析拡張ナノ流体デバイスを開発した。

4-1. 酵素免疫測定法的设计

酵素と基質の組み合わせとして、極めて高い化学増幅効果が期待できる西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) とテトラメチルベンジジン (TMB) を選択した。この酵素反応系のもと、微分干渉熱レンズ顕微鏡を用いて目的の単一分子を検出できるように、流路サイズ、酵素反応条件および熱レンズ顕微鏡の測定波長を設計した。

4-2. 単一分子・可算個分子分析の実証

図 6 に示すように、抗原抗体反応によりサンドイッチ複合体形成後、60 秒間酵素反応させ、蓄積した生成色素を微分干渉熱レンズ顕微鏡で検出した。導入分子数を 0-16 個まで変えて実験したところ、図 8(a) に示すように実際に信号が得られた。この信号と、試料中に含まれる分子数の分布であるポアソン分布と比較した (図 8(b))。その結果、赤丸で示した実験値がポアソン分布の極大値付近に多くみられたことから、単一分子から可算個分子レベルで分析できる性能を有していることが実証できた。

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。免疫分析拡張ナノ流体デバイスをはじめ創成した。分析化学において濃度定量から可算個分子の定量への変革をもたらし、極限の分析化学を実現した。今後、単一細胞レベルの極限分析法を提供して医学・生物学などの関連分野に大きく貢献すると期待される。また、本研究の成果は、シナプスなど 10-100 nm スケールの細胞内・細胞膜間における分子反応機構の解明や、秒スケールでほぼ 100% の目的分子を分析できることを利用した超高効率・迅速医療診断へと展開できると考えられる。

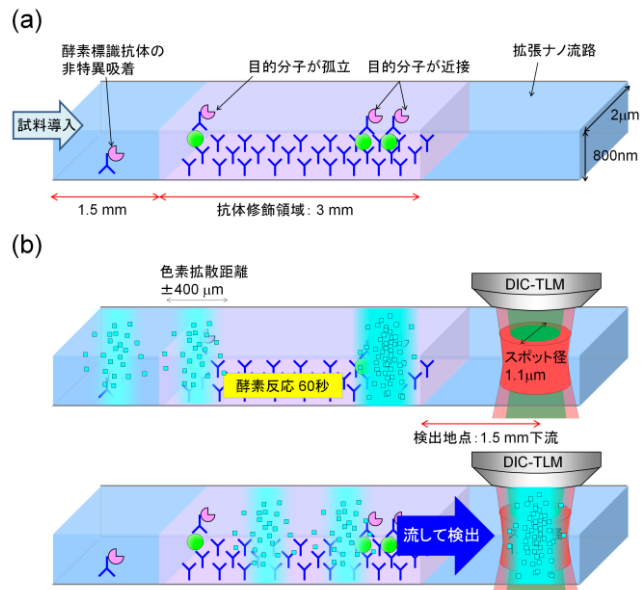


図 7 単一分子・可算個分子分析実証実験 (a) 目的分子捕捉とサンドイッチ複合体形成 (b) 酵素化学増幅による目的分子の検出

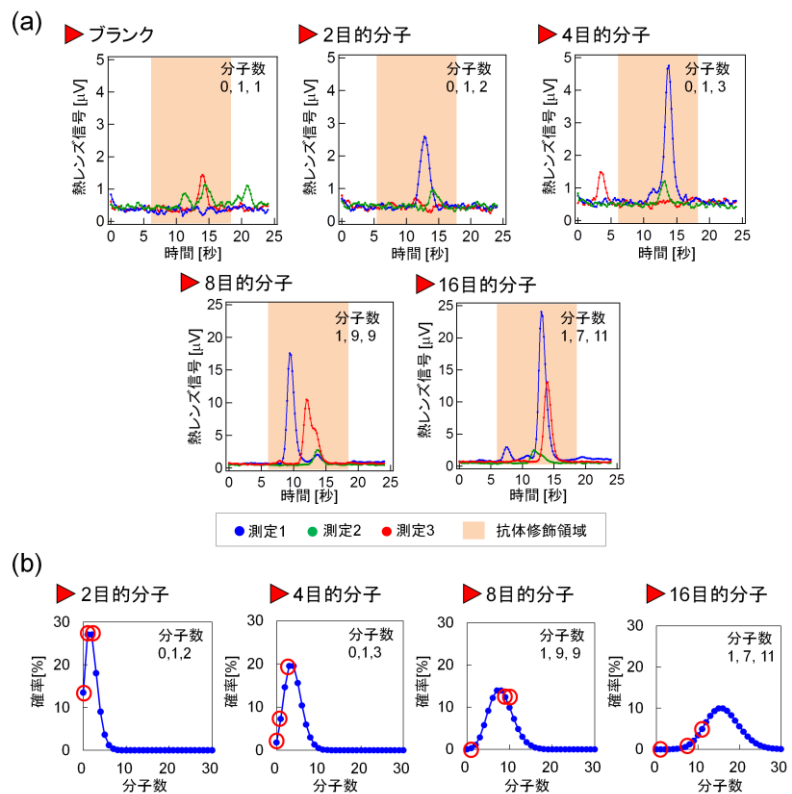


図 8 単一分子・可算個分子分析実証実験の結果 (a) 信号値の濃度依存性 (b) 実験値とポアソン分布の比較 (赤: 実験値、青: ポアソン分布)