

審査の結果の要旨

氏名 白井 健太郎

本論文は、10-100 nm スケールの拡張ナノ空間を分析場として用いる免疫分析拡張ナノ流体デバイスの創成と単一分子・可算個分子分析に関する研究結果をまとめたものである。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、数百 μm 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った。一方、申請者の研究室では、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。そこで申請者は、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。本論文の構成は以下の通りである。

第1章 緒言

第2章 極微量フェムトリットル分析場の構築

第3章 拡張ナノ空間における高効率抗原抗体反応の実証

第4章 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5章 結言

以下、各章について簡単に説明する。

第1章では、医学・生物学における単一細胞分析の必要性と免疫分析への極限性能の要

求を述べ、これまでの微小化のアプローチと課題を明らかにした。次に、この課題を解決する有望な手段として、拡張ナノ空間の $\text{fL}\cdot\text{aL}$ の極めて微小な空間体積を分析場とする免疫分析の着想を述べた。本研究の目的を (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、とした。

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拡張ナノ免疫分析法の具体的な構想を述べた。免疫分析法では抗体修飾した固相を利用して分析するが、一般の免疫分析と同様に拡張ナノ流路全表面に抗体修飾した場合、目的分子の捕捉位置の特定・検出が困難である。そこで、構想を実現する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法を取り上げた。具体的には、(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 (幅数 $100\text{ nm}\times$ 長さ数 $100\mu\text{m}$) 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、申請者の研究室で開発された基板接合法に着目した。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。その結果、ナノ流体制御に求められる耐圧性能 (数百 kPa) を保持しつつ、設計通りに抗体を極微小領域に部分修飾したデバイスを作製し、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。本技術は、極微小空間の固液界面を工学的に設計でき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。

第 3 章では、試料に含まれる目的の単一分子・可算個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ける抗体の機能を確認し、ほぼ 100% の分子捕捉率を実証した。拡張ナノ流路は深さ数百 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確実に捕捉されると期待できる。実際に分子捕捉率は $95\pm 19\%$ 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。また、抗原結合速度には良好な濃度依存性が見られ、さらに抗原・抗体反応の平衡定数がバルクの値とオーダーで一致したことから、抗体が十分な活性を有していることも確認できた。また試料体積は 810 fL であり単一細胞よりも十分に小さな体積であった。

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渉熱レンズ顕微鏡による超高感度定量を組み合わせ、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。単一分子を検出可能な測定系 (酵素反応条件・

流路サイズ・測定波長)を設計した。導入分子数を0-16個まで変えて実験したところ、実際に信号が得られた。この信号からそれぞれの信号を構成する分子数を推定して、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。その結果、ポアソン分布の確率分布に従う信号が得られたことから、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。

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。今後の展望として、シナプスなど10-100nm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・迅速医療診断への展開について述べた。

以上、免疫分析拡張ナノ流体デバイスをはじめて創成した。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、本論文で扱うテーマはバイオ分析や医療診断などバイオエンジニアリング専攻がターゲットとする領域にも大きく寄与すると考えられる。したがって、バイオエンジニアリング専攻の博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。