

学位論文要約

オンサイト測定を指向したマイクロ化学分析システムの開発と 感染症検査への応用

森岡 和大

1. 緒言

マイクロ化学分析システムは、Micro Total Analysis System (μ TAS) や Lab-on-a-chip (LOC) などと呼ばれる、従来の分析手法を刷新する革命的なシステムであり、分析化学において近年最も盛んに研究されている分野の一つである。 μ TAS のイメージを図 1 に示す。 μ TAS とは、ガラスやプラスチック製の手のひらサイズの基板(マイクロチップ)上に形成された微細流路(マイクロチャネル)内で、試料導入から分離、検出に至る一連の化学分析操作を行うシステムのことを指す。

μ TAS では、マイクロチャネルという極めて微小な空間の中で化学反応が行われるため、従来の分析手法と比較し、数多くの利点を有する。例えば、マイクロチップ自体が非常に小さなサイズであるため、省スペース化が可能である。従来は、実験室で多数の器具や装置を使用して化学分析や生化学分析が行われていたが、 μ TAS ではこれを手のひらに載るサイズの一枚の基板上で行うことが出来る。また、 μ TAS を用いると試料や試薬の使用量や廃液量の削減が可能である。マイクロチップ分析で用いられる試薬や試料は、 μ L や nL 程度の極めて微量なので、生体試料のようにわずかにしか手に入らない貴重な試料や高価な試薬を用いて行われる分析に μ TAS は非常に有効である。また、マイクロチャネルのような微小な空間では、比界面積が大きく、分子の拡散距離が極めて短いため、物質の拡散に基づく化学反応が平衡状態に達する時間が大幅に短縮される。例えば、長さと幅を一定とし、厚さが 1mm (=1000 μ m)と 10 μ m の空間で同じ物質の拡散時間を比較すると、拡散距離の比は 100 : 1 であるが、拡散時間は拡散距離の二乗に比例するために、拡散時間の比は 10000 : 1 となる。このため、 μ TAS では反応効率や抽出効率の向上も期待できる。また、微小空間は熱容量が小さく、迅速な加熱/冷却などの温度制御が容易であるので、精密な温度制御が必要な分析にも μ TAS は有用である。 μ TAS はこのようなアドバンテージを持つことから、オンサイト測定において大いに役立つ分析技術として注目されている。

μ TAS の研究は世界中で盛んに行われており、既存の分析法をマイクロチップ上で実現した研究が多数報告されている。しかし、その大部分は送液系に多数のポンプやバルブ、検出系にレーザーや顕微鏡などの大型で高価な機器を用いているため、 μ TAS を用いて環境試料や生体試料中に含まれる微量成分を、少ない試薬・試料量で、高感度に、短時間で測定すること自体は可能になったが、 μ TAS によるオンサイト環境計測やポイントオブケアテストは今もなお不可能で、採取した試料を大学の研究室や研究機関に持ち帰って分析を行っている。

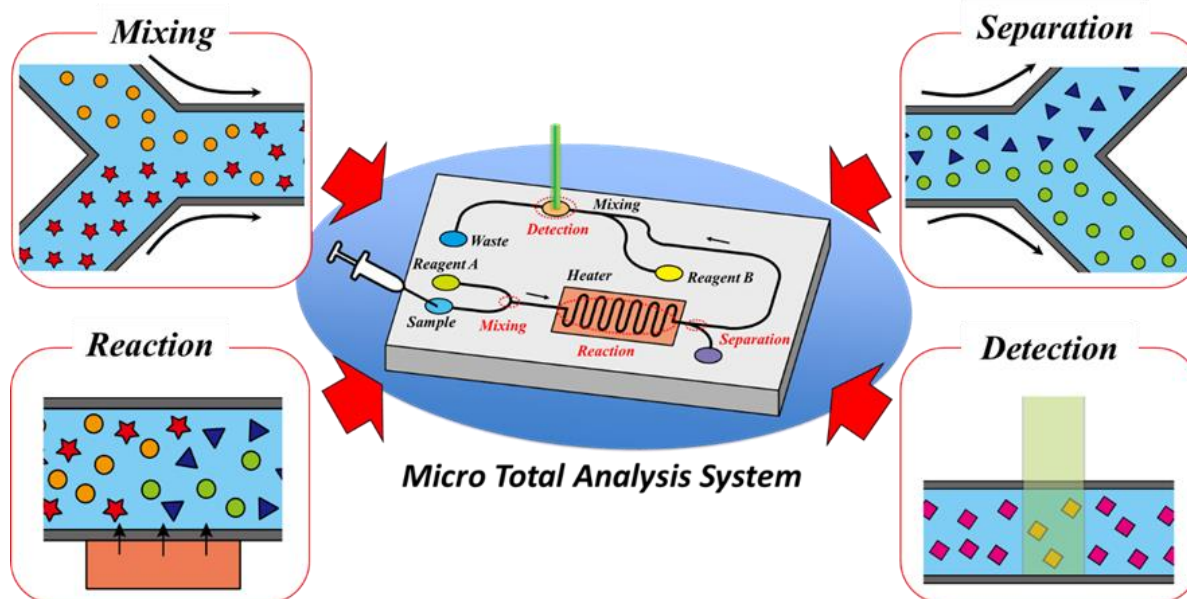


図1 マイクロ化学分析システムのイメージ

μ TAS による迅速なオンサイト環境計測やポイントオブケアテストが可能になれば、迅速な環境汚染対策や病気の診断が可能となり、地球環境保全と人類の健康福祉に大いに貢献すると考えられる。

そこで本研究では、現場で、誰もが、簡便、迅速かつ高感度に測定が可能な、小型でポータブルな μ TAS を開発することを目的として、 μ TAS の送液系と検出系の小型化と低コスト化に焦点を当て研究を行った。すなわち、遠心力を利用したポンプレス・バルブレスな送液法を理論と実験の両面から検討するとともに、蛍光、電気化学および表面プラズモン共鳴(SPR)の3種類の検出法に基づく小型で安価な検出システムを試作し、これらを組み合わせた新規分析システムを開発した。本研究では、これらの分析システムの性能評価と免疫測定などへの応用を詳細に検討した。また、バッテリー駆動が可能で耐久性に優れる、オンサイト測定に特化した小型で安価かつ操作の簡便な携帯型分析システムを開発し、ベトナムのフエ医科薬科大学病院にて感染症検査の実証試験を行った。

2. 有機 EL を光源とする蛍光検出システムの開発

μ TAS は試薬や試料の使用量が超微量で済むという利点を有するが、このことは検出の観点から考えると大きなデメリットとなり、 μ TAS には必然的に超高感度な検出法が必要不可欠となる。このため、 μ TAS の検出法としてはレーザー誘起蛍光法(LIF)が汎用されている。しかし、LIF で使用するレーザー顕微鏡がマイクロチップそのものに比べて極めて大型かつ高価であるため、 μ TAS をオンサイト測定に適用することは不可能であった。そこで本研究では、近年ディスプレイや照明などの分野で注目を集めている有機エレクトロルミネッセンス(有機 EL)に着目した。有機 EL デバイスは

小型かつ軽量であり、ガラスやプラスチックの基板の上に様々な発光特性を持つデバイスを任意の形状・サイズで作製することが可能である。本研究では、これを LIF の光源として利用することにより、 μ TAS 全体の小型化を実現した。光源に用いるりん光発光有機 EL デバイスは、フォトソグラフィおよびウェットエッチング法により作製した ITO 電極基板の上に、種々の有機および金属薄膜を真空蒸着法により形成し、これを窒素雰囲気下で封止することにより作製した。また、マイクロチップは、フォトソグラフィにより作製したテンプレートにポリジメチルシロキサン(PDMS)を流し込み、熱で硬化させることにより作製した。このようにして作製した有機 EL デバイスとマイクロチップを用いて、図 2 に示すようなフローインジェクション分析システムを構築し、レゾルフィンモデル試料として用い、開発した蛍光検出システムの性能を評価した。また、本システムを用いて、酵素免疫測定法(ELISA)による唾液中に含まれるストレスマーカーの一種である IgA の測定にも成功した。本法は、レーザーや顕微鏡などの大型周辺機器が不要であるため、 μ TAS の検出システムの小型化に極めて有用であると考えられる。

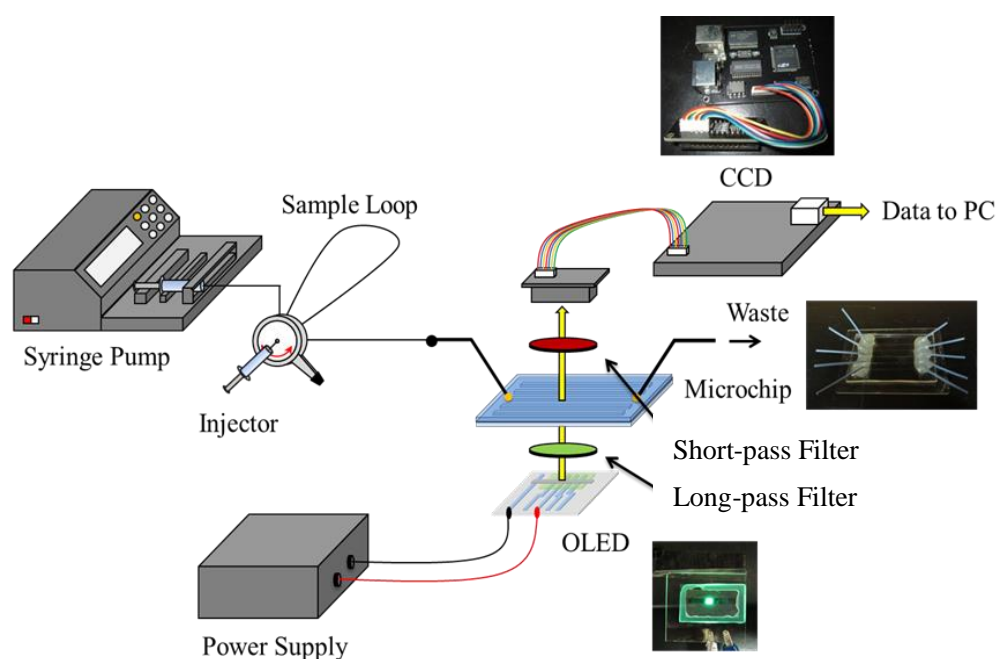


図 2 有機 EL を光源とする蛍光検出システム

3. 遠心力を利用する送液法の検討と分析システムへの応用

μ TAS を用いて多成分や多検体の同時測定を行う場合、多数の送液ポンプと試料導入用バルブが必要となるため、分析システム全体が大型化する問題がある。そこで本研究では、CD 型マイクロチップを開発し、これを回転させることにより生じる遠心力を利用して、マイクロチップ上のリザーバー内の試薬・試料溶液を分離検出チャン

バーに送液する方法を検討した。まず、フォトリソグラフィーにより作製したテンプレート上に PDMS を流し込んで硬化させ、マイクロチャネルを転写した PDMS ディスク基板を作製した。次に、PDMS ディスク基板にリザーバー用の穴を開け、これをポリカーボネートディスク基板と貼り合わせることで、図 3 に示すような CD 型マイクロチップを作製した。CD 型マイクロチップの試薬・試料用リザーバーに、レゾルフィン水溶液を入れ、プレートシールで蓋をした後に、CD 型マイクロチップを回転させた。そして、回転速度を徐々に増加させていくことにより、溶液が流れ出す様子を観察した。その結果、図 4 に示すように、CD 型マイクロチップの回転速度を増加させていくと、回転半径の大きなリザーバーから順々に溶液が流れ出すことを確認できた。溶液がリザーバーから流れ出す回転速度は、リザーバーの位置(回転半径)、リザーバー出口のサイズ、溶液の表面張力、接触角などに依存する。これらのパラメーターから導かれる溶液が流れ出す回転速度の理論値と実験値を比較したところ、各リザーバーから溶液が流れ出す回転速度の差が理論値よりも小さい結果となったが、マイクロチャネル内壁の親水/疎水化処理やリザーバー出口のサイズ変更などにより、改善が可能であると考えられる。また、本研究では LED を光源に用いる小型の蛍光検出システムを試作し、CD 型マイクロチップと組み合わせた新規蛍光分析システムを開発した。このシステムを用いて ELISA による IgA の測定に成功した。CD 型マイクロチップを用いる分析システムは、ポンプレス・バルブレスの送液が可能なので、 μ TAS の送液系の小型化と自動化に極めて有用であると考えられる。

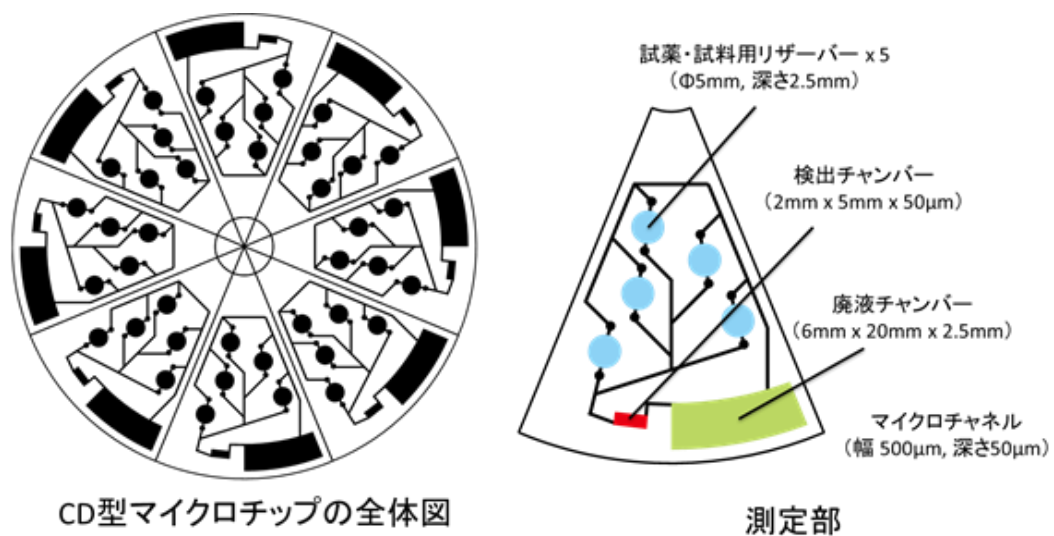


図 3 CD 型マイクロチップの構造

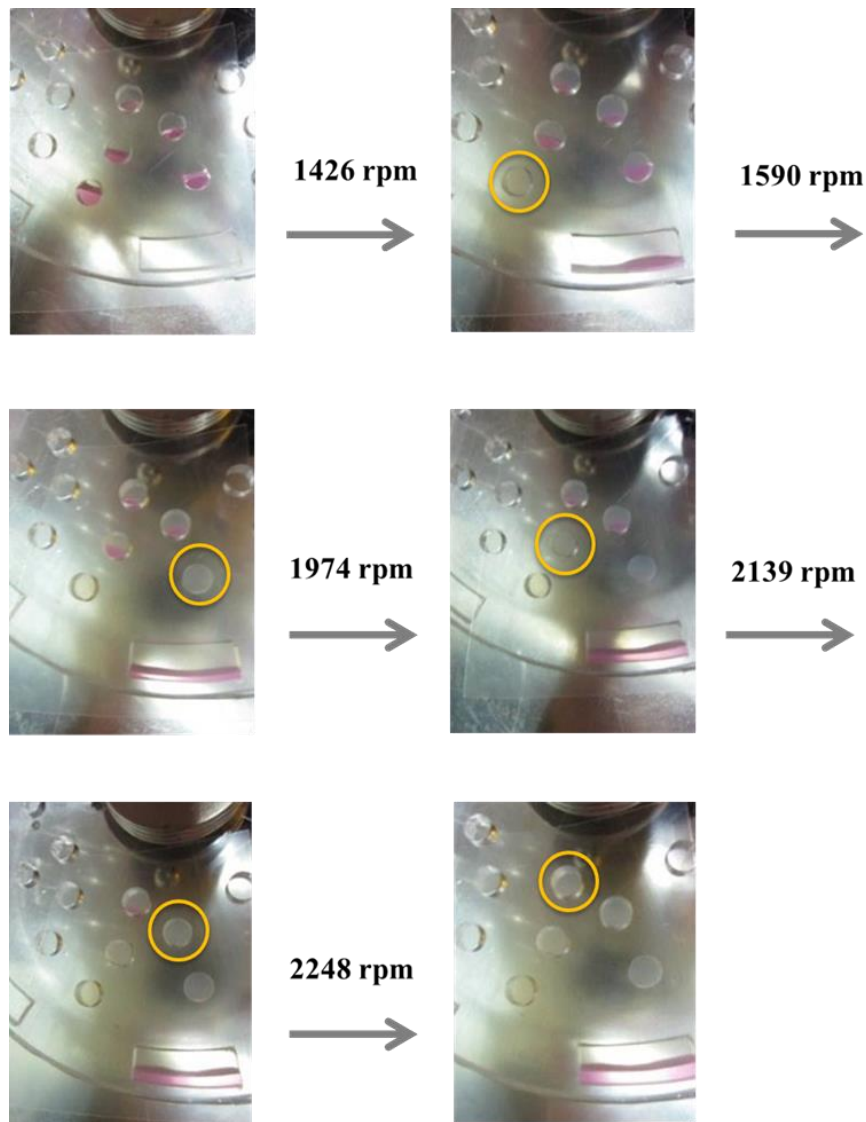


図 4 CD 型マイクロチップの回転により，リザーバーから溶液が順々に流れ出す様子

4. CD 型マイクロチップを用いる種々の検出システムの開発

CD 型マイクロチップを用いる分析システムにおいても，検出に必要な周辺機器が大型かつ高価であるという問題が残されている．そこで本研究では，蛍光，電気化学および SPR の 3 種類の検出法に基づく小型の検出システムを試作し，CD 型マイクロチップと組み合わせた新規分析システムを開発した．蛍光検出システムではレゾルフィン，電気化学検出システムではフェリシアン化カリウム/フェロシアン化カリウム，SPR センサではスクロースをそれぞれモデル試料として使い，システムの性能評価を行った．その結果，いずれのシステムにおいてもモデル試料の測定が可能なが確認された．また，これらのシステムを用いて唾液中に含まれる IgA の測定が可能なが実証した．本研究で開発した CD 型マイクロチップを用いる分析システムは，分

析システム全体の小型化、低コスト化および操作の自動化が可能なので、オンサイト環境計測やポイントオブケアテストに極めて有用であると考えられる。

5. 携帯型マイクロプレートリーダーの開発と感染症検査への応用

CD型マイクロチップを用いる分析システムは、迅速に多成分や多検体の同時測定が可能であることから、大規模な医療機関等で実施される医療検査などに極めて有用であると考えられる。しかし、操作に一定の技術を必要とし、また、電源が内蔵されていないことから、災害現場などでの使用は困難である。そこで本研究では、酵素免疫測定法(ELISA)で一般的に用いられている96穴マイクロタイタープレートとマイクロプレートリーダーを小型化した、より操作が簡便なシステムを開発した。すなわち、遮光性9穴マイクロタイタープレートおよび有機ELとフォトダイオードを用いる蛍光マイクロプレートリーダーからなる小型のELISAシステムを開発した。これを用いて、唾液中に含まれるIgAや血清に含まれる麻疹IgGの測定に成功した。また、光源にLEDを用いた、耐久性に優れ、バッテリー駆動が可能で、Bluetooth通信によりワイヤレス測定が可能な、より実用性の高い、手のひらサイズの携帯型ELISAシステムを開発した。ベトナム国立フエ医科薬科大学にて本システムの実証試験を行ったところ、市販のデスクトップサイズのELISAシステムと一致した検査結果が得られ、本システムを感染症検査に適用できることが確認された。

6. 結言

以上のように、本研究では、 μ TASの研究の中で特に進展が遅れていた送液系と検出系に焦点を当てて研究を行い、これまでにない、小型で安価な実用性の高い分析システムを開発することに成功した。

本研究で開発した分析システムは、大規模医療機関での感染症検査のみならず、災害現場での迅速な感染症検査に極めて有力である。世界的に流行する多くの感染症は、接触感染や飛沫感染により感染する可能性があるため、検査を行う医療従事者が感染する可能性がある。このため、鳥インフルエンザやエボラ出血熱のような、致死率が極めて高く、危険性の高い感染症の検査は、物理的封じ込めが可能な限られた実験室でしか実施できないため、患者の血液採取から検査結果が出るまでにかかなりの長時間を要していた。一方、本研究で開発したようなCD型マイクロチップを用いる分析システムは、全血から血清の分離や、血清の希釈などの前処理操作も遠心力を用いて行うことが可能であり、密閉した空間内で全自動で分析操作を行うことができることから、迅速かつ安全に感染症の検査を実施することが可能である。また、地震や津波などによる大規模な災害が発生した場合、被災者が検査を実施する医療機関までたどり着くことが困難であるとともに、停電により検査装置が動かず検査自体を行うことができない可能性が高い。そのような場合でも、バッテリーで駆動する手のひらサイズの検査システムがあれば、災害現場で検査を実施することが可能なので、多くの被災者が適切な治療を受けることができるだろう。

本研究で開発した分析システムは、感染症検査のみならず、他の医療検査や食品分析、環境計測などにも適用可能であり、これらの分野における従来の分析法を飛躍的に革新する可能性を秘めている。このような分析システムが実用化されれば、人々の健康福祉や地球環境保全に多いに貢献できると考えられる。