

氏名(本籍)	森 ^{もり} 本 ^{もと} 克 ^{かつ} 也 ^や (大分県)		
学位の種類	博士(工学)		
学位記番号	博甲第4594号		
学位授与年月日	平成20年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	数理物質科学研究科		
学位論文題目	生体内酵素分析のための高機能集積化マイクロシステムの研究		
主査	筑波大学教授	博士(工学)	鈴木博章
副査	筑波大学教授	工学博士	長崎幸夫
副査	筑波大学教授	工学博士	山部紀久夫
副査	筑波大学准教授	工学博士	小林正美
副査	筑波大学准教授	理学博士	野口巧

論文の内容の要旨

本研究は、生体内で酵素分析を含む生化学分析が可能な、生体内駆動型マイクロ診断デバイスの実現を目的として、その基盤技術を確立したものである。まず、研究背景として、近年の医療用分析装置の微小化・高性能化の研究は著しく、その究極形態として、生体内駆動型マイクロデバイスの実現が期待されており、これに関わる研究の最先端には、消化管内分析を目的としたカプセル内視鏡の研究があることを紹介している。ここで、現在の消化管内分析は、画像情報や物理情報のセンシングに限られているのが現状であり、高精度な医療診断のためには、各消化管内に存在する酵素活性等の生化学情報のセンシングが非常に重要であるにも関わらず、これまで全く実現されていないため、これを可能とするデバイスの構築が重要な研究対象であると位置づけている。そこで、消化管内の目的部位において酵素活性を測定するための必要な事項として、a) 消化液サンプリング機構、b) サンプルと測定試薬の混合機構、およびc) pH制御機構を備えたデバイスの開発を挙げている。そこで、サンプリング機構を有する酵素活性測定システムを試作し、モデル酵素の活性測定を行うことで、体内動作型マイクロシステム構築のための課題を列挙している(第2章)。そしてこれらの課題の解決策として、後述するように、凍結乾燥プロセスを利用した基質固定化法(第3章)、pHスタットを用いた酵素活性測定法(第4章)、およびpH応答性バルブの構築を行っている(第5章)。さらに第5章では、これら全ての機能を集積化したマイクロシステムを構築し、その生体内駆動型マイクロデバイスへの応用の可能性を評価している。

第2章では、微小空間で溶液が自発的に輸送される毛細管現象と、エレクトロウエッティングに基づくバルブを利用したサンプリング機構を構築している。また、プロテアーゼ活性測定のためのセンシング機構には、ポテンシオメトリックpHセンサを用いている。モデル酵素反応として、消化管プロテアーゼの一つであるトリプシンによる牛血清アルブミン(BSA)の加水分解反応を用いて評価している。本章を通じて、生体内駆動型マイクロデバイスを用いて酵素分析が実現するためには、以下の課題が存在することを見出している。1) 限られたマイクロ空間内に酵素基質を十分量固定化でき、なおかつ消化液サンプリング時に迅速に混合される手法を考案する必要がある。これについては第3章で解決されている。2) ポテンシオメトリック

ク pH センシングに基づく酵素活性の定量は、溶液中の緩衝液の濃度に影響を受けるため、緩衝液の影響を受けず、至適 pH を安定に維持できる酵素活性測定法を確立する必要がある。これについては第 4 章で解決されている。3) エレクトロウエッティングに基づくサンプリング機構を構築したが、胃液や腸液を自動的かつ選択的にサンプリングするために、胃や腸に到達したことを認識して駆動するサンプリング機構であることが望まれる。これについては第 5 章で解決されている。

第 3 章では、第 2 章で挙げられた課題の一つである、酵素サンプル溶液と基質溶液の迅速な混合を可能とするデバイスを実現するため、凍結乾燥プロセスを利用して、マイクロ空間内に基質を担体とともに固定化する手法を考案している。サンプル中の酵素活性を測定するためには、サンプル溶液と基質の混合が必要である。従来の酵素測定では、サンプル溶液と基質溶液をマイクロ流路内に送液し、溶液同士を混合させることで測定が行われてきた。しかしこの手法では、ポンプなどの搭載が必要となるため、システムが複雑化するばかりでなく、分子量の大きい酵素は基質溶液側への拡散に時間を要するため、鋭敏な応答が得られない。そこで、カプセル型マイクロシステムへの応用を視野に、凍結乾燥プロセスを用いた基質固定化技術を考案している。基質をあらかじめマイクロ空間内に凍結乾燥により固定化しておくことで、基質混合用のポンプの搭載を必要とせず、また固定化基質は、サンプル溶液を吸い込みながら迅速に溶解するため、サンプル溶液と基質の迅速な混合も可能になった。本章では、モデル酵素反応として、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT) による 2 基質転移反応を用い、アンペロメトリックセンシングに基づく測定を試みている。凍結乾燥基質を用いることによって、従来の二液混合におけるサンプル希釈の問題を回避できるだけでなく、凍結乾燥基質とサンプル溶液の混合が迅速であり、顕著な感度向上が認められている。また、反応速度論解析からも、凍結乾燥基質を用いることで基質・酵素混合相は素早く均一に混合されることが示され、今後様々な酵素活性の反応速度論的解析に本デバイスが利用可能であることが結論付けられている。

第 4 章では、第 2 章で挙げられたもう一つの課題の一つである、pH 制御機能を有するデバイスを実現するため、電気化学的三電極系を変則的に使用することにより、自動的に負のフィードバック制御を行うことのできるマイクロ pH スタットを考案している。酵素活性を分析するためには、分析液の pH を至適 pH に維持しておく必要があるが、カプセル型マイクロシステムへの展開を考えると、通常の実験系と同様に緩衝液を使用することは、システムを複雑化してしまう。そこで、水の電気分解により、酵素・基質混合溶液の pH を一定に維持する機能を有するマイクロ pH スタットを微小空間内に実現し、さらにこの滴定により酵素活性を測定することを目指している。作製した pH スタットは、pH を一定に維持する機能を有するだけでなく、ポテンシオメトリック pH センシングの代替としての機能を有し、出力が溶液緩衝能の影響を受けにくいことが確かめられている。このデバイスをプロテアーゼ活性測定システムに用いることにより、酵素至適 pH における測定が適切に行えることが結論付けられている。

第 5 章では、前章までに構築されたエレクトロウエッティングによるサンプリング機構、凍結乾燥を用いた溶液混合機構、および pH スタットを集積化し、プロテアーゼ活性測定システムを構築している。特に、サンプリング機構については、より自動的かつ選択的なサンプリングを目指すために新しく pH 応答性バルブとして発展させることが試みられている。これにより、例えば、マイクロカプセルが pH 7 の口腔・食道内を通過する時には、外部溶液がカプセル内に導入されず、pH 2 の胃内に到達した時にのみ胃液をサンプリングすることが可能となると述べられている。最終的には、消化液のサンプリングからプロテアーゼ活性測定までを自動的に行える実用化を考慮したシステムを構築した。pH 応答性バルブの構築によって、エレクトロウエッティングに基づくバルブをさらに自動化することができ、pH の異なるサンプル溶液を選択的にサンプリングすることが可能となったことが示されている。また、凍結乾燥基質とマイクロ pH スタットを組み合わせることで、バルブ通過後のサンプル液と基質との迅速な混合および高感度測定を行う、一連の自動的な測定システムが構築することができたと結論付けられている。

第6章では、本研究及び今後の展望が総括的に述べられている。本研究を通じて構築されたシステムは、自律的駆動が可能であり、ワイヤレス機能などの他の必要な機能をさらに集積化することで、消化管内の酵素活性を生体内で計測可能なマイクロ診断デバイスへの展開が期待されると述べられている。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文の目的は、新規診断法である経口カプセル型内視鏡の概念を発展させ、生化学分析機能を搭載したカプセル型システムを作製することである。このために必要な主要技術のうち、この論文では3つの技術開発を行っている。1つは、pHに応答して開くバルブ機能であり、胃や腸の消化液のpHを感知して自動的にサンプリングする機構を提案している。2つ目は、サンプルと測定試薬を素早く混合するための試薬固定化法、3つ目は消化酵素の活性を検出する機構である。それぞれの機構について、新規性や独自のアイデアが含まれており、これらを高度な次元で組み合わせることでオリジナリティの高い装置を作製しているといえる。生体内での使用や臨床診断機器への実用化には、解決しなければならない技術的・倫理的問題がまだ多く存在するものの、基盤技術として非常に魅力的な成果が示されている。

よって、著者は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。