

氏名(本籍)	橋本正利(埼玉県)		
学位の種類	博士(工学)		
学位記番号	博甲第4598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	マイクロフルーイディックデバイス中におけるバイオセンサの高感度化に関する研究		
主査	筑波大学教授	博士(工学)	鈴木博章
副査	筑波大学教授	理学博士	中村潤児
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	木島正志
副査	筑波大学講師	博士(工学)	福田淳二

論文の内容の要旨

マイクロメートルサイズの微小な流路や空間を形成し、化学プロセスを集積化する微小化学分析システム(Micro-Total Analysis System: μ TAS)は、反応・分析・計測の効率化・高速化のための革新的な技術として、医療、バイオ、食品、環境などの幅広い分野から期待が寄せられている。既に、電気化学的検出原理を一枚のチップ上に集積化した μ TASデバイスは、国内外の多くの研究者らによって活発に研究がなされている。しかし、検出という観点から見ると、検出部を微小化することは試料が極微量で済み混合操作などを含む検出時間が短縮されるといったメリットがある一方で、検出値自体も小さくなるというデメリットがある。また、現在医療現場で求められているのは酵素やタンパク質をターゲットとした低濃度の生体物質の高感度検出である。そのための μ TASデバイスの実現には、上記の課題を解消することが不可欠である。このような背景のもとマイクロ流路を用いる酵素センサの特徴を捉えた上で、微小化と高感度化という相反する性能を備えたデバイスの構築するのに必要な技術の検討を行った。

まず、微小流路中に酵素を固定したモデル的なアンペロメトリックセンシングシステムを構築し、流路構造や実験条件を変化させたときの酵素センサ出力電流値の依存性を実験的に検討した。モデル酵素には、グルコースオキシダーゼ(GOD)を使用することで、グルコースセンサを作製し測定を行った。システムは、微小流路を形成したポリジメチルシロキサン(PDMS)基板と三電極系を形成したガラス基板により構成された。本研究では、酵素固定位置を自由に選ぶため、酵素をPDMS流路基板側に固定する技術を導入した。作用極に+0.7Vの一定電位を印加して得られた出力電流値を測定した。実験の結果、酵素をPDMS流路側に固定した場合、酵素を作用極より上流に固定するほど出力電流値が増加する傾向を示した。逆に、電極基板側に酵素を固定した従来法では、酵素固定位置が電極から離れるにつれ出力電流値は減少した。また、流路高さや流量に大きな依存性があることが確認された。しかし、変換効率が最も高くなる条件においてさえも30%以下となることから、いずれの場合もマイクロ流路という微小な領域においてグルコースが酵素に到達して変換され、この時生じた電極活性物質が電極に到達するという一連の反応プロセスは、非常に限られ

たごく一部の物質にしか生じないことが分かった。

続いて、可能な限り多量の酵素を電極基板側の電極に直接固定化することで、検出感度の向上を試みた。固定化酵素量の増加により、単位時間当たり酵素反応により生成される電極活物質の量そのものが増加することが期待できる。ここでは超撥水面を利用した蒸発的濃縮という新しい方法を用いて、作用極上にもみ酵素 GOD を濃縮固定化した。超撥水面の導入に撥水性物質であるテフロンビーズ（直径 1 μ m）を利用した。まず、バッチ系において酵素量と電極サイズを同じにしたときの、濃縮固定と従来固定の場合の比較を行った。その結果、従来法に比べ、濃縮法では顕著な電流密度の増大が確認された。また、電極サイズの効果を評価するため、作用極のサイズを変化させたときの電流密度の変化を調べた。その結果、作用極面積の減少に伴い、電流密度の増加が見られた。電極サイズを一定とし濃縮固定法を用いて酵素固定密度変化させたとき、ある値までは酵素密度増加と共に電流密度が増加したが、それを超えると、逆に減少した。フロー系での測定では、作用極サイズを小さくし、流路幅を狭めることで効率的な測定が行えることを確認した。特に高流速側で顕著な効率の向上を観察した。また、濃縮酵素電極をアレー化することで、さらなる感度の向上が見られた。高流速送液においても高い感度を維持することができるアレー電極は実用化への有効な手段となると予想された。

次に、電極形状に工夫を施し、酵素反応により産生された電極活物質を効率よく検出できるセンサを作製した。マイクロ流路内に三次元的な凹凸構造をもつ電極を形成し、電極表面積を増加させて酵素固定量を増大させるとともに、電極反応の及ぶ領域を流路上面まで拡大させることを目的とした。三次元電極は厚膜フォトレジスト（SU-8）を用い、平行平板またはピラー構造を形成した。次に作用極の位置に開口部が設けられているメタルマスクにて電極基板を覆い、スパッタリングすることで、三次元電極の側面を含めて金属薄膜を形成することで電極とした。三次元電極の性能を評価するために、GOD を作用極から 3mm 上流に固定し、グルコースセンサとしての特性を評価した。電極形状は平面及び数種類のピラー状と平行平板状の三次元電極を用い、比較検討を行った。その結果、三次元電極の有効性は、ピラー数、平行平板数が増加するにつれ顕著になった。平行平板電極の場合、単純に表面積が増えただけでなく、流路中に平板があることで流路が狭まり平板付近の流速が増加した影響も考えられた。また、ピラー電極の場合、微小電極のエッジ効果も高感度化に影響を及ぼしていると考えられた。ピラー径 20 μ m、143 本のピラー電極を用いた場合、平面電極と比べ約 7.5 倍もの高出力となった。

続いて、前の実験で得られた知見を利用し、三次元電極を免疫センサへ応用し、本研究で確立した三次元電極が広くバイオセンサの分野で利用可能であることを示した。ここでは骨粗鬆症に着目し、検出ターゲットとして骨代謝マーカーと呼ばれる血中もしくは尿中のタンパク質の検出を試みた。臨床的にも大きな意味をもつ骨代謝マーカーを三次元電極で高感度に検出できる免疫センサの構築を目的とした。電極表面への一次抗体の固定には自己組織化単分子膜（SAM）を利用した。三次元電極では、限られたマイクロ空間内で高い比表面積が得られることから、抗体固定量も増加させることが可能であるといえる。さらに、電極活物質を産生する酵素を二次抗体にラベルしておくことで、骨代謝マーカーの濃度に依存した出力電流値が得られる。二次抗体へは酵素をラベル化した。骨代謝マーカーには bone alkaline phosphatase（BAP）を使用し、標識酵素には β -ガラクトシダーゼ、基質に p-aminophenyl- β -D-galactopyranoside（PAPG）を用い、+ 0.7V を印加し、測定した。電極はさらなる高密度ピラー電極をホットエンボス成型で構築し、金電極をメタルマスクスパッタリングすることで形成した。その結果、ピラー径 10 μ m、550 本の電極を用いた場合、平面電極と比べ 4 倍の出力電流値の差が確認され、免疫センサにおいても三次元電極の有用性が示された。この結果により、微小流路内の免疫反応における立体電極の効果が確認された。

以上の研究により、酵素センサの設計に関わるいくつかの指針が得られた。特に、酵素の選択的濃縮は今後マイクロアレイ電極へと適用することで飛躍的に反応効率を高めることができると期待される。また、今

回はその有効性を示すに留まったが、三次元電極に関してもより緻密な三次元円柱電極をフォトリソグラフィを駆使して形成することで、酵素反応などによって生じた電極活物質を高い効率で収集できることが期待でき、酵素濃縮法と組み合わせることで従来にはないバイオセンサを構築できるものと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、医療、食品分野などで近年期待が寄せられている微小化学分析システムに関するものである。その中でも特に電気化学検出について、微小化と高感度化という同時に実現することが困難な技術課題を幾つかの方法で解決することを目的としている。本論文では、まずマイクロ流路構造や送液条件などが酵素センサの出力電流値へ及ぼす影響を明らかにしている。その上で、高感度化には微小電極上のみへの酵素の高密度固定が重要であるとの仮説を立て、超撥水による酵素濃縮固定法を新しく確立して、これを実証するに至っている。これより、問題点を見出しこれを解決する一定の能力が認められる。一方、電極構造そのものを三次元化することで、マイクロ流路中の限られた空間内で、効率よく電極反応を生じさせる工夫も示されている。この技術は臨床診断への応用例として、骨粗鬆症診断の指標に対する免疫センシングに用いている。一連の技術をすべて組み合わせた結論には至っていないものの、各技術要素の重要性と意義についてはそれを支持するに足るデータが示されている。

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。