



Title	Development of Highly Sensitive Label-Free Detection Method and its Practical Application Using Micro- and Nanofluidic Devices [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	阿尻, 大雅
Citation	北海道大学. 博士(工学) 甲第13683号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/74169
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Taiga_Ajiri_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（工学） 氏名 阿尻 大雅

学 位 論 文 題 名

Development of Highly Sensitive Label-Free Detection Method and its Practical Application
Using Micro- and Nanofluidic Devices

(マイクロ・ナノ流体デバイスを用いた高感度無標識検出法の開発とその応用)

DNA や RNA、タンパク質、エクソソームなどの生体分子の分析は、古くから基礎研究や診断目的など様々な分野において重要視されている。ヒトゲノム計画が 2003 年に完了し、解析技術の進展により、医療・創薬の変革が起き、遺伝子診断等による個別化医療の重要性が高まっている。最新の技術を全人類が享受するためには、生体試料の取り扱いの高速化・ハイスループット化・低コスト化が必要である。このような要求のもと、従来の実験室で行う化学・生化学分析操作や分析装置を小型のデバイス上に集積化する研究が世界中で行われている。マイクロ流体工学は急速に進展し、小型化したデバイスは多くの実用技術の一部として取り込まれている。また近年、マイクロ流体デバイスをさらに小型化したナノ流体デバイスが注目されている。ナノ流体工学は単純なマイクロ流体工学の拡張とは言えず、ナノ流体特有の現象が報告されている。これらの現象は、生体内の微細環境における未解明現象の解明などへの貢献が期待されている。また、ナノ流体特有の現象を利用することで、ハイスループットな生体分子操作への応用が報告されている。一方で、ナノ流体デバイスのような体積の小さなデバイスでは、高感度に測定対象を検出するために、測定対象の蛍光標識化が必要不可欠であった。しかし、標識化・蛍光観察のプロセスは煩雑・高価だけでなく、標識化による電荷やサイズ、基板への吸着量の変化、分子間相互作用への影響等が報告されている。マクロ系と比較してナノ流路のように空間的に制限された領域における標識体の存在は、流体操作に影響をより強く及ぼすと考えられる。試料を蛍光色素で標識化することなく分析する方法の開発は、分析操作の簡便化の観点からのみでなく、分子動力学等の基礎的な研究へのツールとしても重要であると考えられる。これまでに、表面プラズモン共鳴や熱レンズ顕微鏡を用いた方法が報告されているが、前者は標的物質と相互作用する物質をセンサー表面へ固定化する必要があり、後者は複雑な光学系が必要である。そこで本学位論文では、マイクロ・ナノ流体デバイスを用いた簡便な無標識検出法の開発に取り組んだ。ナノ流路に特有な回折光を用いることで、高感度で簡便な無標識検出法を開発出来るのではないかと着想した。また、ナノ流体工学特有の現象は注目されている一方で、研究を行っているグループは限られている。その要因の一つとして、研究に用いるデバイスを作製する方法が煩雑であるということが挙げられる。本学位論文では、マイクロ・ナノ流体デバイスの作製方法や構造体サイズを検討し、構築した無標識検出システムにより、無標識 DNA の検出に成功した。また、ナノ流体工学の中で最も広く研究されている分野の一つである分離分析の様子を無標識でモニタリングすることに成功し、標識化に伴う影響を観察することができた。

本学院論文は全五章から構成されている。各章の概要を以下にまとめる。

第一章は序論であり、本学位論文における背景を述べた。

第二章では、本学位論文に用いるマイクロ・ナノ流体デバイスの作製方法について検討した。本章では、マイクロ・ナノ流体デバイス作製に一般的に用いられている電子線リソグラフィ技術を用いた方法と、簡便化を目指してレーザー干渉露光法を用いた方法でデバイスを作製し、それぞれの方法の比較を行った。それぞれの方法でパターニングした石英ガラスをエッチングすることで、マイクロ・ナノ流体デバイスを作製した。加工したナノ流路を SEM や AFM で観察することで、目的の構造がパターニングされていることを確認した。周期構造のパターニングに限られるものの、レーザー干渉露光法を用いることで、簡便・迅速に流路をパターニングすることが可能となり、マイクロ・ナノ流体デバイス作製方法として有用であることを示した。

第三章では、無標識検出法の開発に取り組んだ。本検出法はスリット状の回折格子を模倣したナノ流路によって生じる回折光の強度が、ナノ流路を流れる溶液の屈折率に応じて変化することに基づいている。倒立顕微鏡とレーザーや光学部品を組み合わせることで、回折光強度の変化を計測するシステムを構築した。厳密結合波理論に基づくシミュレーションにより、最適な構造体サイズを検討し、測定原理を実証するために、屈折率が異なる溶媒の測定を行った。回折光の信号強度が、屈折率に応じて変化することを確認した。また、これらの結果はシミュレーション解析とも良い相関が得られた。最適化したデバイスを用いて、モデル物質として無標識の DNA 試料 (λ DNA、49 kbp) の測定を行った。 λ DNA の濃度の増加に伴う回折光由来の信号強度の変化が観測された。また、検出に用いたレーザー光のスポットサイズから計算した検出体積当たりで、今回検出した最低濃度は λ DNA 0.18 個に相当し、本法が 1 分子レベルで無標識の生体分子を検出可能であることを確認した。また、スリット状構造以外の構造においても無標識検出が可能であることを確認した。周期的に配列された円柱構造 (ナノピラー) による回折光においても、スリット状に配列したナノ流路と同様に、回折光強度が屈折率に応じて変化し、無標識の DNA (100 bp) が検出可能であることを示した。

第四章では、分離分析への応用を検討した。第三章までに、本無標識検出法の有用性を実証してきたが、本法は本質的に選択性がないため、事前に夾雑物から目的物質の分離が必要である。そこで、ナノピラーによる DNA の高性能分離に着目した。ナノピラーで目的物質の分離を行い、さらにナノピラー構造による回折光をモニタリングすることで、流路を流れる試料組成の変化をモニタリングすることが出来る。作製したナノピラーデバイスを用いることで DNA の分離場と検出場を分けることなく、無標識で分離の様子をモニタリングすることが出来た。また、YOYO-1 によって蛍光標識化した分離結果と比較を行い、DNA と標識体が複合体を形成することで、分離を行う際の動力学に影響を及ぼすことが示唆された。

第五章では、本学位論文において得られた結果や今後の展望をまとめた。本学位論文では、周期構造による回折光を用いたが、単一のナノ流路等、様々なナノ流体デバイスによる回折光を用いることが出来ると考える。蛍光検出に匹敵する感度は、ナノ構造の最適化や光学系の改良 (光源の高強度化やヘテロダイン検出システムの導入など) によって達成できるであろう。本システムはマイクロ・ナノデバイスによる生体分子の操作・モニタリングにおいて有用なツールとなることが期待される。