



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_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（工学） 氏名 阿尻 大雅

審査担当者	主査	教授	佐藤 敏文
	副査	教授	渡慶次 学
	副査	特任教授	喜多村 昇
	副査	准教授	谷 博文
	副査	教授	島田 敏宏

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、タンパク質などの生体分子の分離分析は、生物学の基礎研究や臨床診断など様々な分野において重要である。分離分析の小型化・ハイスループット化においては、キャピラリー電気泳動、マイクロチップ電気泳動により達成されてきた。近年、分離媒体に人工のナノ構造体を用いる研究が注目を集めている。ナノ構造体を用いることで高い分離性能が達成される一方で、ナノ流体工学特有の分離メカニズムが存在する。また、きわめて小さな体積を扱うナノ流体デバイスでは、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、標識化による測定対象の電荷やサイズ、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、対象分子の流体内での挙動により強く影響を及ぼす。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センサーや熱レンズ顕微鏡を用いた無標識検出法が報告されているが、前者は対象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。そのような背景から筆者は、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と構築とその分離分析への応用を目的とした。具体的には、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、構築した検出システムにより、無標識での DNA の検出に成功した。さらに、マイクロ・ナノ流体デバイスを用いて無標識の DNA の分離分析に成功するとともに、標識化が分離に及ぼす影響を明らかにした。

本学位論文の概要及び主要な成果は以下に要約される。

筆者は、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。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によるデバイス作製を試みた。周期的な構造に限られるものの、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ン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。

続いて、筆者はマイクロ・ナノ流体デバイスを用いた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た。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い、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良い相関を示した。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。検出した最低 DNA 濃度は、検出体積中に 0.18 分子の λ DNA が含まれることに相当し、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示した。また、スリット状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明らかにした。

さらに、マイクロ・ナノ流体デバイスの無標識分離分析への応用を検討した。構築した無標識検出法は原理的に物質選択性がないため、検出前に対象物質を夾雑物から分離する必要がある。そこで、筆者はナノピラーによる DNA の高性能分離に着目した。ナノピラーデバイスを作製し、DNA 混合物（100 bp と 1 kbp）の分離を試みた結果、2 種類の DNA の分離を確認した。ナノピラー構造による回折光を用いることで、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観察することに成功した。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を実験的に明らかにした。

これを要するに、筆者は、マイクロ・ナノ流体デバイスを利用した簡便な無標識検出法を構築し、構築した無標識検出法により、1 分子レベルの無標識 DNA を検出すること成功した。さらに、ピラー構造が構築されたマイクロ・ナノ流体デバイスを用いて、DNA の分離・無標識検出を実現した。これらの成果は、計測科学及び分析化学分野の発展に大きく貢献するものである。よって、筆者は北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格があるものと認める。