

氏名	嶋倉 知希		
学位の種類	博士（工学）		
学位記番号	乙第247号		
学位授与の日付	平成31年3月20日		
学位授与の要件	信州大学 学位規程 第5条 第2項 該当		
学位論文題目	非侵襲唾液分析のための流体制御を利用した遠心式イムノセンサに関する研究		
論文審査委員	主査	教授	山口 昌樹
	副査	教授	石澤 広明
	副査	教授	小林 俊一
	副査	准教授	小関 道彦
	副査	准教授	田原 祐助（九州大学）

論文内容の要旨

近年、臨床現場での即時診断 (point of care testing, POCT) を可能とするため、その実現化に向けて、様々な研究が進んでおり、高感度な分析が可能とされるイムノセンサが注目されている。イムノセンサでは、微量液体における送液などといった流体制御機構がその設計に必須な基本技術となっており、その駆動原理は、遠心力、毛細管力、熱駆動および電場駆動などが挙げられる。その中でも、遠心力は分析装置自体の小型化および自動化に適しているが、遠心力を利用するイムノセンサにおける遠心流体弁では、その開閉機構が遠心流体弁の素材自体の撥水性に依存しているため、意図的に制御することが困難である。その撥水性を向上させるために、「化学的」表面処理を施す方法が考案されているが、その撥水性の向上には限度がある。そこで、微細で周期的な凹凸構造 (微細周期構造) を付与する「物理的」表面処理を施す方法が注目されている。

本研究では、撥水性に大きく関与すると考えられる表面改質技術として、従来の化学的処理に微細周期構造という物理的処理を重畳させることで、遠心流体制御における撥水性の向上を図った遠心式イムノセンサを開発し、その有効性に関する基礎的検討を実施した。更には、慢性的なストレス評価の指標であるコルチゾールに着目し、非侵襲的に採取可能なヒトの唾液に含まれるコルチゾール濃度とされる 0.1 – 10 ng/mL の範囲で、高感度分析を維持しながら、迅速かつ簡便な分析を可能とする遠心式イムノセンサとしての有用性に関する評価を実施した。

第2章では、遠心式イムノセンサに適用させる微細周期構造および遠心流体弁の基礎的検討を実施した。遠心流体弁の微細流路内に微細周期構造を付与した結果、撥水性の指標とされる見かけの接触角および接触角ヒステリシスが向上した。特に、平行型の微細周期構造を付与することによって、微細周期構造を付与していない構造と比較し、移動流量が 20 % 程度増加し、49.3 rpm という僅かな回転加速度の変化で遠心流体弁を切り替えられる可能性が示唆された。

第3章では、非侵襲的に採取が可能なヒトの唾液に含まれるコルチゾールが分析可能な分析技術の構築を目指し、遠心式イムノセンサにおける開発を実施した。従来から高感度分析が可能である ELISA 法の競合法を採用し、第2章で示された撥水性向上が期待される微細周期構造を付与した遠心流体弁を組み合わせることで、高感度分析を維持しながら、迅速かつ簡便に分析可能な分析技術であると考えられた。一方で、開発した遠心式イムノセンサを実用化させるためには、その分析系における基本パラメータを最適化させる必要があり、その評価を実施した。本研究で開発した遠心式イムノセンサの最適化条件を検証した結果、(i) 発光基質溶液の滴下直後における乱流除去のために1秒間の空白時間を設定すること、(ii) 発光強度測定における測定時間の間隔を5分間と設定すること、(iii) コンジュゲート濃度を7.1 ng/mL と設定すること、(iv) 未反応物質における完全除去のために洗浄回数を3回と設定すること、これらの条件下で分析することで、遠心式イムノセンサの分析系が最適化された。

第4章では、第3章で最適化した遠心式イムノセンサによって遠心流体弁に付与された微細周期構造の機能性を評価した結果、ピッチ幅 60.1 μm 、深さ 9.2 μm および歯幅 10.1 μm を施した平行型の微細周期構造を遠心流体弁に組み込むことで、微細周期構造を付与していない構造と比較し、移動流量に対する移動率が91%に達したことから、従来の化学的効果に微細周期構造という物理的効果を重畳させることで、超撥水性が発現された。

本研究で開発した遠心式イムノセンサに最適化された微細周期構造を組み込み、最適化された分析下で、ヒトの唾液に含まれるコルチゾール濃度とされる 0.1 – 10 ng/mL の範囲における検量線を作成した結果、 $\Delta I = 2.49 \times 10^5 e^{-0.197C_{\text{Cort}}}$ (counts/gate), $R = 0.994$, $R^2 = 0.988$ という良好な検量線が得られたことから、ヒトの唾液でも分析可能な分析系を確立できた。この分析系を確立した遠心式イムノセンサにおいて、ヒトから非侵襲的に採取された唾液サンプルを使用して、その有用性を評価した結果、ヒトの唾液に含まれるコルチゾールが 1 – 7 ng/mL の範囲の場合、従来法である ELISA 法と $R = 0.877$ の良好な相関性を示した。

従って、本研究では、非侵襲的に採取が可能であるヒトの唾液に含まれるコルチゾール濃度である 0.1 – 10 ng/mL の範囲において、高感度分析を維持しながら、僅か15分以内という短時間で分析可能な遠心式イムノセンサを確立し、更には将来展望として POCT 対応装置への応用が期待される。