

氏名	岡本 俊哉
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	医工農博甲第52号
学位授与年月日	令和3年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	工学専攻 システム統合工学コース
学位論文題目	遠心マイクロ流体デバイスにおける自律制御型流体回路理論の構築と POCT 装置応用に関する研究
論文審査委員	主査 教授 藤 森 篤 准教授 浮 田 芳 昭 教授 岡 澤 重 信 教授 野 田 善 之 准教授 桑 原 哲 夫 准教授 船 谷 俊 平

学位論文内容の要旨

本論文では、POCT（Point Of Care Testing: 臨床現場即時診断）に対応する分析装置への応用を指向し、遠心マイクロ流体デバイスにおける自律制御型流体回路理論の構築と、それに基づく分析デバイスの開発を行った。

第1章の自律制御型流体回路理論の基礎制御理論の構築では、化学分析プロセスの実行に必要となる、液体の注入時間制御および液体置換を定常回転下で実行するための制御理論構築とその実証を行った。提案する自律制御型流体回路理論は、注入時間制御では、10分以上の長時間の制御を設計かつ実行可能であることを示した。また、力学的な考察から制御の安定化に有効な2種類の設計思想を提案し、それらの有用性を示した。液体置換機構の検討では、サイフォンバルブを利用した置換機構において、自律的に置換が実行されるための条件を検討し、流路の幅やチャンバ位置、動作回転数などが液体置換条件に影響することを示した。そして、これらの基礎制御理論を組み合わせることで、定常回転で動作する自律液体置換機構を実現し、1000 rpm以上の回転数において動作率100%で安定に置換が実行されることを示した。

第 2 章では、1 章で開発した自律制御型流体回路理論の基礎制御理論に基づき、ELISA (Enzyme-linked immuno-sorbent assay: 酵素免疫測定法) を実行するデバイスを作製した。デバイスの動作検証では、サンプルの注入、反応、2 度の洗浄、そして TMB 基質の注入と反応といった ELISA に対応するフローコントロールが定常回転で、実行されることを確認した。また、各試薬の注入時間の誤差が 5%以下と高い制御精度を有していることを確認した。ELISA を実行するにあたり、自律制御型分析デバイスに最適な 1 次抗体の固相条件を検討した。その結果、ポリウレタンフォームに抗体を固相化し、それを反応槽内に封入することで、定常回転下においても高い反応効率を示すことが示された。そして、デバイスを用いて ELISA を実行し、ヒトアルブミンの検出系として有効であることを確認した。検出下限値 (LOD) は 0.584 ng/mL と算出され、従来の手作業による分析と反応時間を統一して比較した場合においては、同等以上の検出感度を有していることを確認した。

第 3 章では、デバイスの集積化や微量化を指向し、定常回転にて動作する自律分注機構を提案した。それぞれ特徴的なバルブ構造と流路構造により、自律分注機構が構成されており、定常回転にて液体の保持および計量を行い、計量後、受動的に分注を実行することを実証した。分注量の誤差はおよそ 5%以下で高い分注精度を有していることを確認した。

第 4 章では、2 章で開発した ELISA デバイスと、3 章で開発した分注機構を統合した複数検体同時微量 ELISA デバイスを作製した。作製したデバイスの動作検証では、定常回転で ELISA に対応するフローコントロールを 6 検体同時に実行可能であることを実証し、自律制御型流体回路理論が広く適用可能であることを示した。また、ELISA を実行し、この複数検体同時分析デバイスを用いた反応系が、Mouse IgG の検出系として有効であることを確認した。さらに検量線の作製に成功し、検出下限値は 81.3 pg/mL を実現した。

第 5 章では、動作安定性の向上や、流路表面の濡れ性の制限を受けない分注機構の実現を指向し、流路を立体的に交差させた両面成形型の自律分注機構を提案した。両面成形型分注機構の動作実証では、3 章で提案した毛管力型分注機構と同様に定常回転にて液体の保持および計量を行い、計量後、受動的に分注が実行されることを実証した。分注量についても変動係数 (CV) はおよそ 5%以下で、ELISA デバイスに実装し、ELISA を実行可能である実績のある毛管力型の CV と同程度であることを確認した。また、繰り返し分注に対する動作安定性の評価では、毛管力型分注機構は、低回転数域において 80%以上の高い分注成功率を有していることを確認した。一方、両面成形型は、この検討で行った全分注機会当たりの分注成功率が毛管力型と比べ高いほか、低回転数域では 90%以上、高回転数域においては 100%と非常に高い安定性で計量が行われることを確認した。

第 6 章では、5 章で提案した両面成形型分注機構を実装し、かつ 2 度の抗原抗体反応をデ

バイス上で実行する複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスを提案し、その実証を行った。自律制御型流体回路理論の注入時間制御の新たな設計方針の確立により、ピペットの注入操作の低減と、プロトコルの高度化を両立した。そして一般的なサンドイッチ ELISA の実行に必要なフローコントロールが定常回転で実行されることを確認した。Mouse IgG 検出系の ELISA を実行した結果、本複数検体同時微量サンドイッチ ELISA デバイスが Mouse IgG 検出系として有効であることを示唆する結果が得られた。そして本章で開発したデバイスは、DC モータを使用した簡素な回転制御装置で動作させることができ、かつ、スマートフォンを用いた比色法にてアッセイ結果を分析できることを実証した。

そして第 7 章では、提案した手法についての総括と、本論文記載の技術による今後の展望について述べた。

提案する自律制御型流体回路理論は、定常回転で様々な制御が実行可能でかつ、マイクロ流体チップへの付加加工が不要で安価にチップを作製可能であることが特徴である。定常回転で動作するため、特別な回転制御機能のない安価で小型の遠心機で、レーザの照射機構といった外部装置なく溶液操作を実行でき、POCT 対応機器に求められる可搬性や装置のコストの条件を満たしていると考えられる。またマイクロ流体チップの構造が複雑でないため、射出成形といった安価に量産可能な加工プロセスにてチップを成形可能であることが推定される。このため、シングルユースでの使用が望まれる血液分析チップへの適用が可能で、安価な DISPOSABLE 分析チップの実現が期待される。

論文審査結果の要旨

本論文はマイクロ流体システムの化学分析適用を目的とした、新規な制御理論の構築とこれを基盤とする自律制御型マイクロ流体システムの開発及び、免疫測定技術への適用による実証研究の成果を報告するものである。

第 1 章では独自に考案したマイクロ流体システムの制御原理である自律制御型遠心マイクロ流体デバイスを提案し、この基本特性を評価した実験結果を報告している。マイクロ流体システムにおけるプロセス制御は一般にバルブによる能動的な流路ネットワーク切り替えを要するが、本論文で報告された原理はこれに依存することなく、一連の化学プロセ

スを構成する複数の単位操作の切り替えを実現しており、顕著な工学的新規性が認められる。また、この原理は研究の全体にわたる独創性の基礎を成すものでもある。

第2章では、第1章で提案された原理の応用によりマイクロ流体デバイスの機能拡張を実現することにより自動免疫測定デバイスを実現している。この中で、抗体を固相の新たな設計として、3次元ネットワーク状の樹脂製スキャホルドの活用を提案している。当該分野においては、流路表面への直接固相化や、ポリスチレンラテックス微粒子をスキャホルドとする抗体固相が提案されているが、本研究の実験系が常時遠心力が作用する環境で物理現象が進行するという特殊性を考慮し、独自の3次元ネットワークスキャホルドを提案した点においても本成果が評価できる。

第3章から第5章では、第2章で実現したデバイスの多検体化・多項目化を実現することを目的として、自律的な分注機構を開発した成果を報告している。本開発技術に於いても第1章で提案された、自律制御原理を応用することで複数箇所への同時溶液分注を実現し、より高機能な化学システムの実現に貢献する技術を開発している。特に、これは単なる検査項目の多様化のみならず、測定精度の向上と、製品の品質安定性の向上の観点から分注技術の重要性を論じた点に於いても、当該分野の発展に寄与する研究であると評価できる。

第6章では前章までに実証された技術の総括として、より複雑な免疫反応プロトコルに於いて複数同時(6検体)測定を実証している。第2章に於いて実現された免疫測定プロトコルはデバイス設計を簡略化するために独自に免疫測定プロトコルの設計を行っていた。このため、デバイスに試料を添加する前に予備反応が必要になるなどの課題が残っていた。本章では、この問題を解決し、一般的な免疫測定プロトコルであるサンドイッチ ELISA 法を自動的に複数並列実行可能なデバイス設計を提案し機能実証に成功している。

第7章では本研究によって得られた成果を要約し本論文を総括している。また、本研究により明らかになった課題について整理するとともに、今後取り組むべき研究課題についての提言がまとめられている。

また、本学位論文の基礎となっている研究成果は、2篇の英文論文を含む4篇の査読付き学術雑誌に掲載されており、いずれも岡本俊哉氏が第一著者として執筆したものである。専門家のピアレビューにおいても研究のクオリティーが評価されていることがわかる。

以上の様に、本学位論文は岡本俊哉氏が本学に在学中に取り組んだ優れた研究を纏めたものであり高い学術的価値が認められる。よって、博士論文最終審査において審査委員の合議によって、博士(工学)を授与するに相応しいものであると判断した。