

新規分子診断への応用を志向する
網羅的ナノ相互作用解析技術の研究

山梨大学大学院
医工農学総合教育部
博士課程学位論文

2022年3月

大竹 真央

目次

序章 緒論.....	6
第1章 生体分子間相互作用測定原理の実証.....	11
1.1 緒言.....	11
1.2 観察系の構築.....	13
1.3 抗体修飾マイクロビーズの調製.....	18
1.4 ビーズ免疫複合体の形成.....	22
1.5 ビーズ免疫複合体の遠心分離実験.....	25
1.5.1 最適ビーズ系の算出.....	25
1.5.2 ビーズ複合体の遠心分離実験.....	26
1.6 実験結果の考察.....	30
1.7 結言.....	32
第2章 複数同時測定に向けた検討.....	33
2.1 緒言.....	33
2.2 実験方法.....	34

2.3	抗体修飾ガラス基板の調製	35
2.4	分子間相互作用の複数同時測定	37
2.4.1	ビーズの観察	38
2.4.2	遠心力によるビーズ付着力の測定	39
2.4.3	測定の結果	39
2.4.4	考察	41
2.5	結言	42
第3章	測定の高スループット化に向けた検討	43
3.1	緒言	43
3.2	溶媒置換動作を伴わない測定原理の改良	44
3.3	高密度抗体修飾基板の調製	45
3.3.1	APTES 処理によるアミノ基修飾基板の調製	45
3.3.2	GA を用いた抗体修飾基板の調製	48
3.3.3	抗体修飾ガラス基板の活性評価	49
3.4	高スループット測定系の構築	52
3.4.1	基板ホルダーの開発	52

3.4.2	ビーズの自動カウントプログラムの構築.....	53
3.5	分子間相互作用のハイスループット測定.....	57
3.6	結言.....	63
第4章	非特異的ナノ界面間力学現象の評価.....	64
4.1	緒言.....	64
4.2	基板表面官能基によるビーズ物理吸着への影響.....	65
4.3	ビーズ分散溶媒による物理吸着量への影響.....	67
4.4	DLVO理論を基にしたビーズ物理吸着メカニズムの考察.....	69
4.4.1	DLVO理論の概要.....	69
4.4.2	イオン強度によるビーズ物理吸着率の変化.....	70
4.4.3	ゼータ電位の測定.....	71
4.4.4	DLVOポテンシャルエネルギーの試算.....	73
4.5	結言.....	77
第5章	分子間相互作用測定のための界面設計戦略の構築.....	78
5.1	緒言.....	78
5.2	ビーズ粒子径の影響評価.....	79

5.3	ビーズ付着率の時間変化観察.....	82
5.3.1	ブラウン運動解析法の概要.....	82
5.3.2	ブラウン運動解析法の実証.....	83
5.3.3	ブラウン運動解析法によるビーズ付着率の時間変化観察.....	86
5.4	分子間相互作用に向けた界面設計戦略.....	88
5.4.1	界面設計戦略の検討.....	88
5.5	結言.....	89
第6章	総括.....	90
	参考文献.....	94
	謝辞.....	101

序章 緒論

生体中に含まれる分子の中には、抗体や酵素、核酸など特定の物質を認識して結合する性質を持つものが存在する。これらの分子が持つ優れた分子認識能はバイオセンサーとして工業的に利用されている。例としてグルコースオキシダーゼと呼ばれる酵素を利用した血糖センサー¹⁻⁵やヒト絨毛性ゴナドトロピンを認識する抗体を用いた妊娠検査薬⁶⁻¹⁰などが挙げられる。

こうしたバイオセンシング技術の開発現場においては、検査の対象となる標的物質 (Analyte) に対してより親和性の高い捕捉分子 (Ligand) を探索する必要がある。したがって、バイオセンサーの研究開発段階では、分子間の相互作用について定量・評価する必要がある。

現在、もっとも広く利用されている分子間相互作用の測定技術として表面プラズモン共鳴法 (Surface Plasmon Resonance, SPR) が挙げられる¹¹⁻²⁰。図 1 に SPR 法の測定原理を模した図を示す。

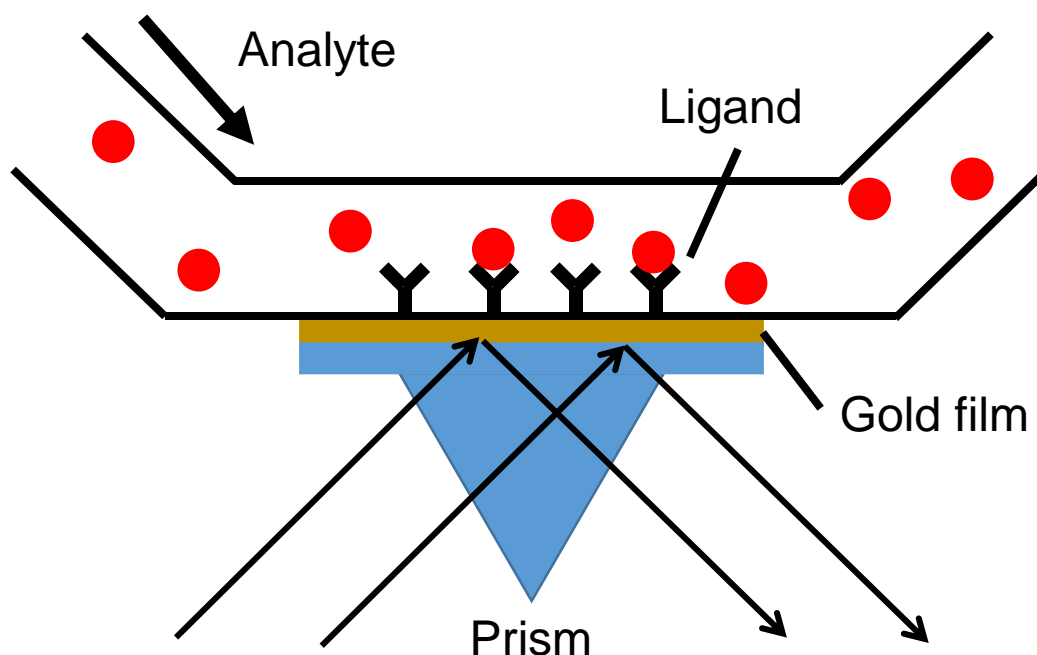


図 1 SPR 法の概要

SPR 法では金薄膜に固定した捕捉分子にフローセルから流れてきた標的物質が結合することで生じる僅かな質量変化を金薄膜に反射するレーザー反射光の変化によって検出する手法となっている。その他の測定技術として、等温滴定型熱測定法²¹⁻²³や蛍光相互相関分光

法²⁴⁻²⁶、水晶振動子マイクロバランス測定法²⁷⁻²⁹等多数の手法が存在するが、これらの手法は共通して無数に発生している分子間反応の平均的な挙動を測定パラメータとしている。すなわち、測定基板に固定した全リガンド分子の内何割のリガンド分子が標的物質と結合したかを量的に評価している。そのため、個々の分子間に作用する相互作用について詳細な解析ができない。

個々の分子間に作用する相互作用の解析によって高度化されるバイオセンサーの性能の1つに検出限界値による検出感度が挙げられる³⁰⁻³²。現在のバイオセンシング技術の多くは図2に示すようにリガンド分子が標的物質を捕捉したことによって発生するシグナルの大きさを読み取ることで診断を行っている。このとき、試料中に含まれる別の物質との誤った結合によるシグナルが混在している場合がある。試料中に標的物質が十分多く含まれる場合、誤認識によるシグナルは総シグナル量に対して微小であるため、検査の信頼性への影響を無視することができる。一方、十分な標的物質を含まない試料の場合では、総シグナル量に対して誤認識シグナルが相対的に大きくなってしまうため測定系の信頼性が低下してしまう。以上のように、分子間相互作用について結合の量的評価を行う従来のバイオセンシングでは測定原理の根本的な問題によって検出感度が大きく制限されてしまう。そこで、より高度なバイオセンシング技術の研究開発では分子間結合の量的評価だけでなく、結合の質的評価を同時に行う必要があると考えられる。

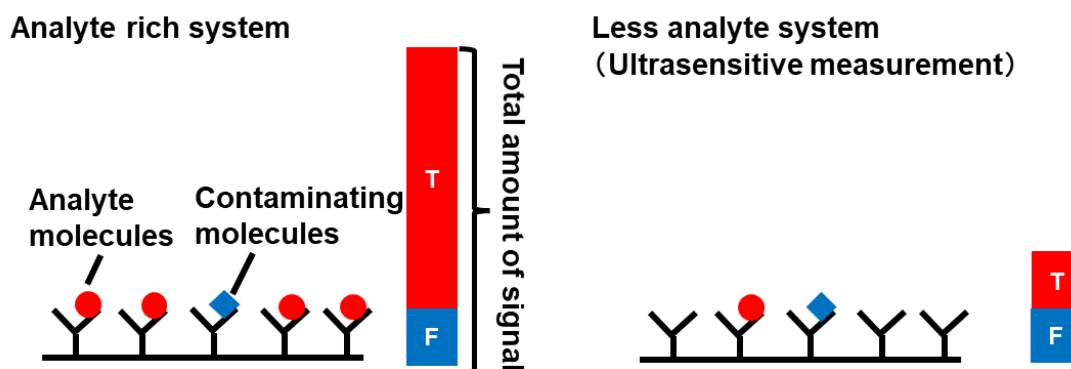


図2 超高感度バイオセンシングにおける課題

また、個々の分子について結合の質的評価を行うことで、より高度な診断が可能となるバイオマーカー分子の一つに前立腺特異抗原(Prostate Specific Antigen, PSA)が挙げられる。PSAは前立腺疾患の際、循環系への放出量が増加することから、酵素免疫吸着測定法(Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay, ELISA)等を用いて血中のPSA濃度を定量評価することで前立腺がん患者のスクリーニングが可能となる³³⁻³⁷。この手法は既に医療機関で広く利用されている。しかし、PSA濃度は前立腺肥大症等のがんでない疾病においても増加することが知

られているため、PSA 濃度が有意に高い患者には別途生体検査が行われる。生体検査は敗血症のリスクもあり³⁸⁻⁴⁰ 肉体的にも負担が大きいため、検体検査の時点で高精度にスクリーニングを行う必要がある。一方、血中の PSA は α_1 -antichymotripsin と結合した PSA(ACT-PSA)と遊離型 PSA(free-PSA)の2つの異なるサブフォームを形成しており、全 PSA(Total-PSA)濃度と free-PSA 濃度の比である F/T 比を求めることで前立腺がんと前立腺肥大症の識別が可能であることが知られている⁴¹⁻⁴⁵。しかし、この2つの PSA は同一の抗体分子に対して反応性を持つため、ELISA 法のような従来の量的評価によるバイオセンシングでは PSA サブフォームの識別を行うことは困難である。そこで、個々の分子について結合の質的評価を行うことで PSA のサブフォームの識別を行うことができる新規がん診断技術への応用が期待できる。以上のように、個々の分子間結合について質的評価を行うことは既存のバイオセンサーの精度を向上させるだけでなく、全く新しい測定原理を利用したバイオセンシング技術への応用が可能になると考えられる。

そこで、個々の分子間結合について結合力を指標とすることで結合の質的評価が可能になるのではないかと考えた。1分子レベルの分子間相互作用について結合力を測定する手法は力分光法等と呼ばれ、マイクロマニピュレーション技術の発達とともに盛んに研究開発がなされている⁴⁶⁻⁵⁰。ここで、代表的な分子間相互作用の力学解析手法について紹介する。まず、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy, AFM)を用いた力学解析が挙げられる⁵¹⁻⁶⁰。AFM はシリコン製の微小な針がついた片持ち梁状のプローブが基板表面を走査することで基板表面の微細構造を原子レベルで可視化することのできる装置である⁶¹。図3に示すようなカンチレバーの先端に固定したリガンド分子と基板に固定した標的物質を接近させ、分子間相互作用で結合を形成させた後に、結合が破断するまでプローブを引き上げる。このときのプローブのたわみ量から結合力を推定することができる。しかし、一つの分子間について結合力測定を行うたびにプローブを操作する必要がある。そのため、測定のスループットが低く、統計的な解析が困難であるという問題がある。

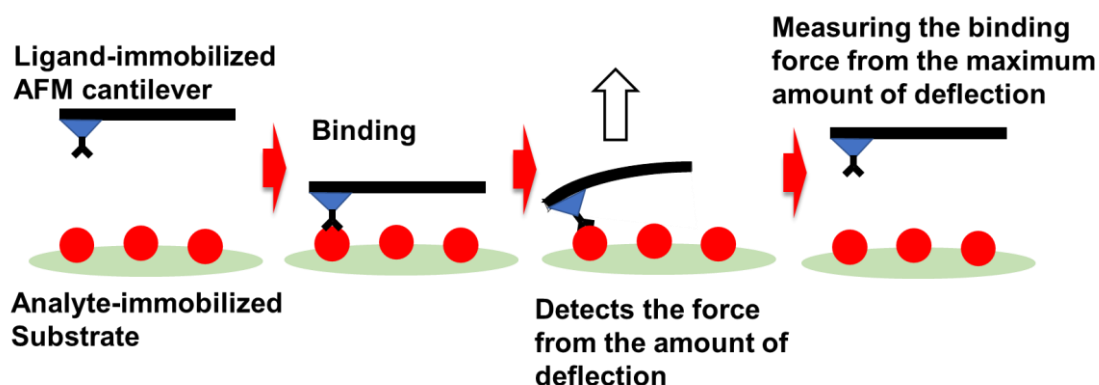


図3 原子間力顕微鏡による分子間相互作用測定の概要

次に、光ピンセットを用いた測定が挙げられる⁶²⁻⁷¹。光ピンセットは、集光したレーザー光を用いて生体分子を固定したマイクロビーズを捕捉・操作する技術である⁷²。光ピンセット法は検査対象と接触することなく数百ピコニュートンの力を印加することが可能であるが、AFM法と同様に統計的な解析に時間がかかることに加えて、レーザー光の照射による検査対象のフォトダメージが問題となっている。磁気ピンセット法は、磁性粒子に磁力を作用させることで複数の粒子に同時に力を作用させる測定や、ねじり方向の測定など複雑な測定が可能となる手法である⁷³⁻⁸²。しかし、磁場を生成するための電磁石に流す電流による発熱が問題となっている。また、これらの既存手法に共通する問題点として標的分子をプローブとなるカンチレバーやマイクロビーズの表面に直接固定する処理が必要な点が挙げられる。標的分子を直接プローブへ固定するためには架橋剤等を用いた化学的処理が必要となることが多く、それが分子の微細な構造を変化させるために、リガンド分子との結合活性が失われてしまう場合や、固定化処理の最中に標的分子が自己崩壊してしまい、正常な測定が行えないという問題点がある。以上のように、分子間相互作用の力分光法は、実験系の複雑さや操作の煩雑さから統計的な解析が困難であるという課題がある。特に、分子間の結合は熱揺らぎの影響を受けることによって結合力が一意に決まらないため、統計的な解析が必須である。したがって、分子間相互作用の力分光法は基礎研究的な報告に留まり、応用研究への発展に至っていない。

一方、Wongらによって遠心力による生体分子間相互作用のハイスループット測定が報告されている⁸³。この方法では、マイクロビーズに対して一様に作用する遠心力を作用させることで測定の並列化を行っている。しかし、この手法においても被検分子の固定処理が必要であるため、臨床応用に向けた迅速測定が困難である。

以上より、本論文では複数の分子間結合について簡便にハイスループット測定が可能な分子間相互作用測定システムの開発を目指す。

第1章では、本論文で提案する分子間相互作用の測定技術について基本的な測定原理を示す。また、観察用デバイスの作製や表面へのリガンド分子の固定を通じて観察系の構築を行う。上記検討からモデル分子としてマウス IgG と抗マウス IgG 抗体を使った抗原抗体反応の結合力測定によって測定原理の実証を行った。

第2章では、第1章にて実証を行った測定手法について、測定原理の改良や抗体分子修飾ガラス基板の調製を行うことで分子間結合力の複数同時測定を行った。

第3章では、さらなる測定のハイスループット化を目指してビーズ分散媒の変更や高密度抗体修飾基板の調製、反応チャンバーの複数配置が可能な基板ホルダーの開発、ビーズの自動カウントプログラムの構築を行った。

第4章では、開発した分子間相互作用のハイスループット測定プラットフォームにおける非特異的な相互作用の影響を評価するため、物理吸着メカニズムの考察を行った。

第5章では、第4章にて検討を行ったビーズの物理吸着現象メカニズムを基に分子間相

相互作用に適用可能なビーズ—基板間の界面設計戦略について検討を行った。

第 6 章では、本論文にて提案した分子間相互作用測定技術に関する総括と今後の展望について述べる。

第 1 章 生体分子間相互作用測定原理の実証

1.1 緒言

提案する測定原理を下の図 1-1 に示す.

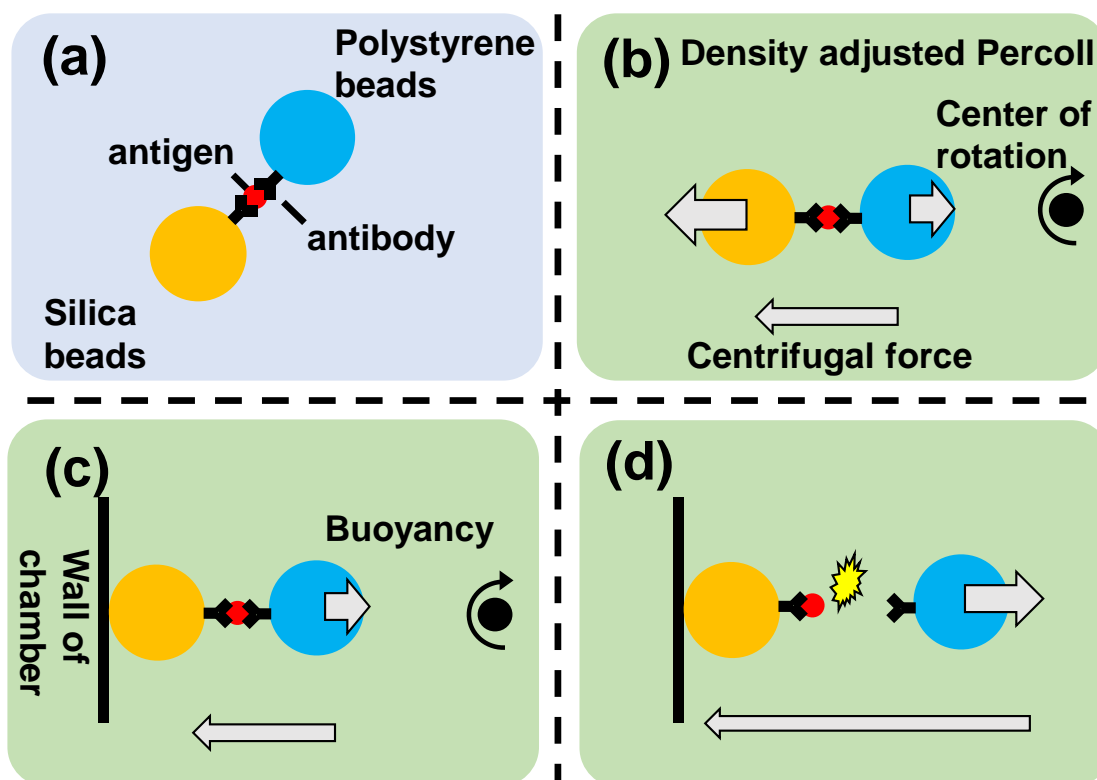


図 1-1 分子間相互作用測定原理の概要

表面に抗体分子を固定した 2 種類のマイクロビーズが混在した分散液中に抗原を加えて攪拌することで免疫反応によるビーズ複合体を形成させる(図 1-1(a)). 次に, ビーズ複合体を 2 つのビーズの中間密度に調整した溶媒とともにマイクロチャンバーに封入し, 遠心力を印加する. すると, 比重の小さいポリスチレンビーズには浮力が, 比重の大きいシリカビーズには遠心力が作用しビーズ複合体の結合部に引張力が作用する(図 1-1(b)). 回転速度が低速の場合には, 結合部の分子間結合は破断せず, ビーズ複合体は遠心力方向に沈降していく. 沈降するビーズ複合体はやがてチャンバー壁面と接触し, 反作用によって遠心力方向の力が打ち消され結合部に作用するのは浮力のみとなる(図 1-1(c)). この状態から徐々に回転速度を大きくしていくと浮力も大きくなり, ある時点で分子間結合が

破断してビーズ複合体が分離する(図 1-1(d)). このときの回転速度からポリスチレンビーズに作用していた浮力を求めることで, 分子間の結合力を推定することができる.

第 1 章では, 上記測定原理の実証を目的とし, マイクロビーズ表面への抗体分子の固定や, 観察系の構築, ビーズ免疫複合体の形成率評価等の検討について述べる.

1.2 観察系の構築

ビーズに固定化した抗体分子による結合の破断を観察するためには、2種類のビーズの中間密度に調製した溶媒が必要となる。また、地球の重力によって生じるビーズ複合体への引張り力は生体分子間の結合力よりもはるかに小さいため、回転による遠心力でビーズに重力や浮力を発生させる必要がある。以上より、溶媒の密度調製や、観察用チャンバーの作成を行い、観察系の構築を行った。

初めに、一般的なバイオセンシングに用いられる緩衝液である DPBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)の調製を行った。リン酸二水素カリウム(和光純薬, 特級)を 0.2 g, 塩化カリウム(和光純薬, 特級)を 0.2 g, リン酸水素二ナトリウム 12 水和物(和光純薬, 特級)を 2.9 g, 塩化ナトリウム(和光純薬, 特級)を 8.0 g これらを 100 ml のイオン交換水によって溶解し、10x DPBS を調製した。これをイオン交換水で 10 倍に希釈した DPBS を緩衝液として使用した。この DPBS は標準的な組成で pH7.4 に調製した。密度の調整には、Percoll(GE Healthcare, #17-0891-01)を使用した。Percoll を 7.15 ml, DPBS を 1 ml, イオン交換水を 1.85 ml 混合させることで、Percoll の密度が 1.10 g/cm^3 になるよう調製を行った。実際に密度を測定したところ、調整した Percoll の密度は 1.098 g/cm^3 となった。

次に、ビーズに遠心力を加えて複合体の分離観察を行う実験装置について述べる。実験には研究室独自の遠心マイクロストロボスコープ⁸⁴を使用した。マイクロストロボスコープの概略図を下の図 1-2 に示す。

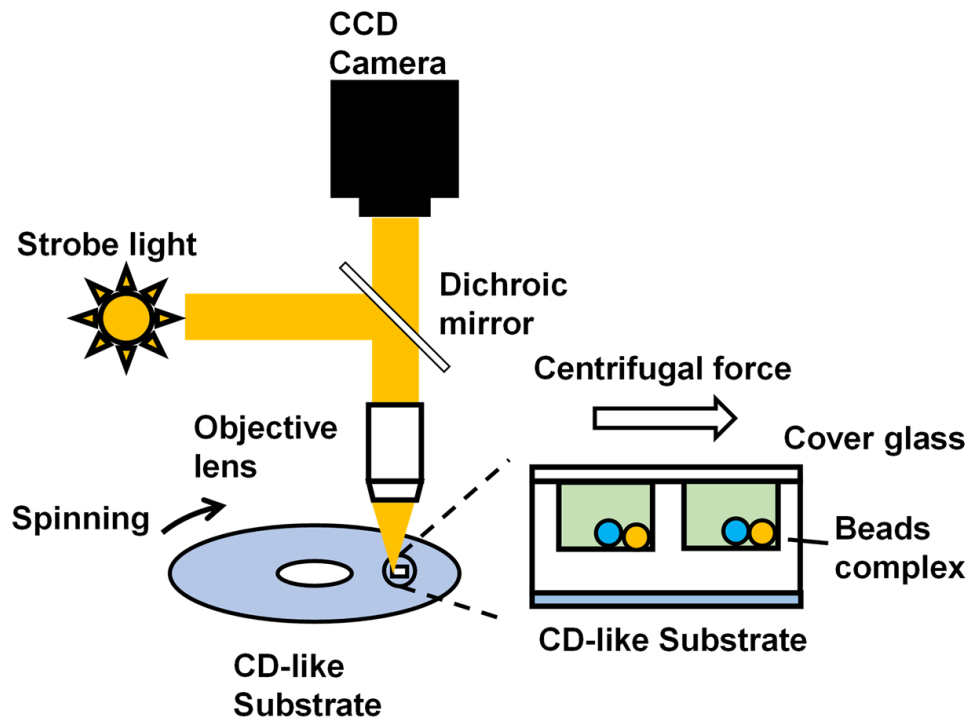


図 1-2 マイクロストロボスコープ概略図

装置に取り付けた CD 状の基板を装置に組み込んであるモーターによって回転させると、キセノンランプがモーターの回転周期と同期したストロボ光を発光させる。このストロボ光によって対物レンズに映ったマイクロビーズの挙動を CCD カメラによって撮影することで回転する微小な物体の静止画を撮影、観察することができる。

次に、ビーズを加えて基板に貼り付けるポリジメチルシロキサン(Polydimethylsiloxane, PDMS)チャンバーの作成について述べる。PDMS チャンバーはフォトリソグラフィーによって作成した⁸⁵。PDMS チャンバー作成の手順を下の図 1-3 に示す。

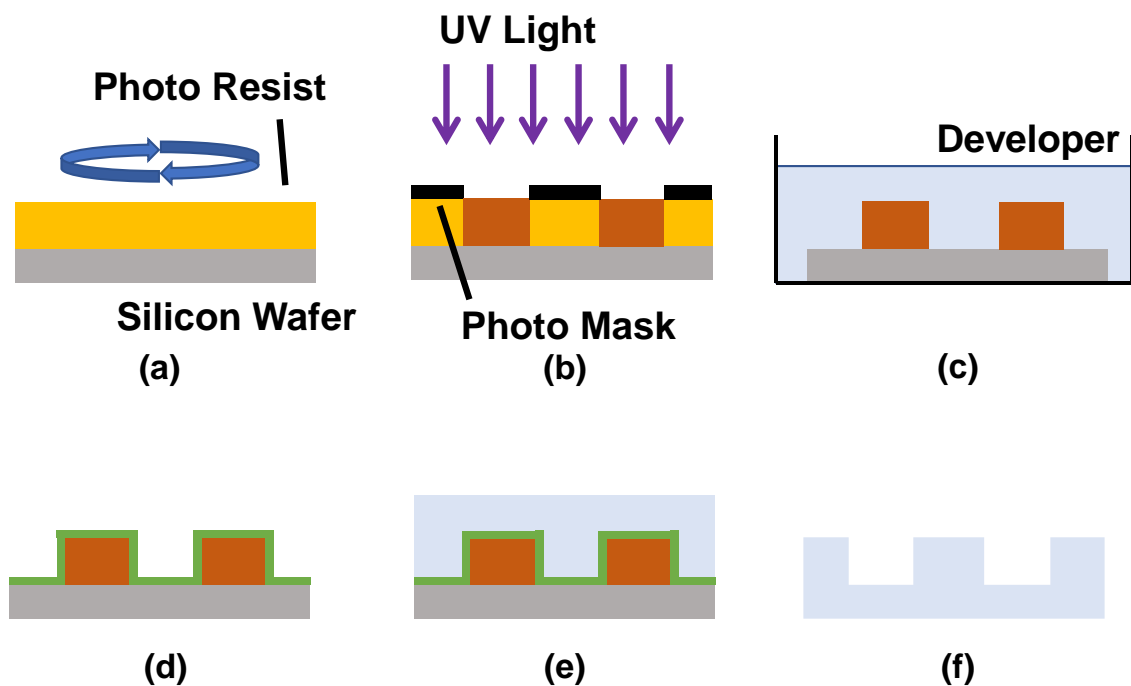


図 1-3 PDMS チャンバー作成手順 (a)シリコンウエハに SU-8 フォトレジストを塗布し、ソフトベイク (b)紫外線露光によってフォトレジストを硬化させ、ポストベイク (c) 現像液に浸し、軽くゆすりながら現像して未硬化部を除去(d)完成したシリコンモールドにシラン蒸着 (e)未硬化 PDMS を流し込む (f)硬化した PDMS をモールドから外す

まず、4 インチのシリコンウエハに SU-8 フォトレジスト (Nippon Kayaku Co., Ltd., Japan) をスピコートによって均一の厚さに塗布し、95°Cのホットプレートで45分間ソフトベイクする(図 1-3(a)). フォトマスクをかぶせて紫外線に45秒間露光した後、65°Cで5分間、95°Cで15分間ポストベイクを行うことで紫外線に晒された部分のSU-8を硬化させる(図 1-3(b)). SU-8 Developer にシリコンウエハごと浸漬して硬化していないSU-8を取り除く(図 1-3(c)). こうして作成したシリコンモールドとシラン化剤(Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane, 97%, SIGMA-Aldrich, # 448931)を20 μ l分注したマイクロチューブとともに真空デシケータに加えて30分間真空中で保持することで基板表面をシラン化して離型性を向上させる(図 1-3(d)). PDMS ((SILPOT 184; Dow Corning Toray Co., Ltd., Japan) は、モノマーと架橋剤を10:1 (W:W)となるよう調製し、シリコンゴムで土手を作ったモールドに流し込んだ。真空脱泡の後、OHPシートで封をし、平らにした状態で75°Cに加熱してPDMSを硬化させた(図 1-3(e)). モールドとPDMSを離して、PDMSチャンバーを任意の大きさにカットして使用した(図 1-3(f)). 上記のPDMSチャンバーをCD状の透明なプラスチック基板の中心から3.5 cmの位置に貼り付け、図 1-4 にしめすような遠

心型マイクロ流体デバイスを作製した。PDMS チップには直径 $200\ \mu\text{m}$ のマイクロチャンバーがパターンニングされており、このチャンバー内にビーズと調製した Percoll を加えてカバーガラスをかぶせて密封した。その後、マイクロストロボスコープに取り付け、基板を回転させることで遠心力を印加した。

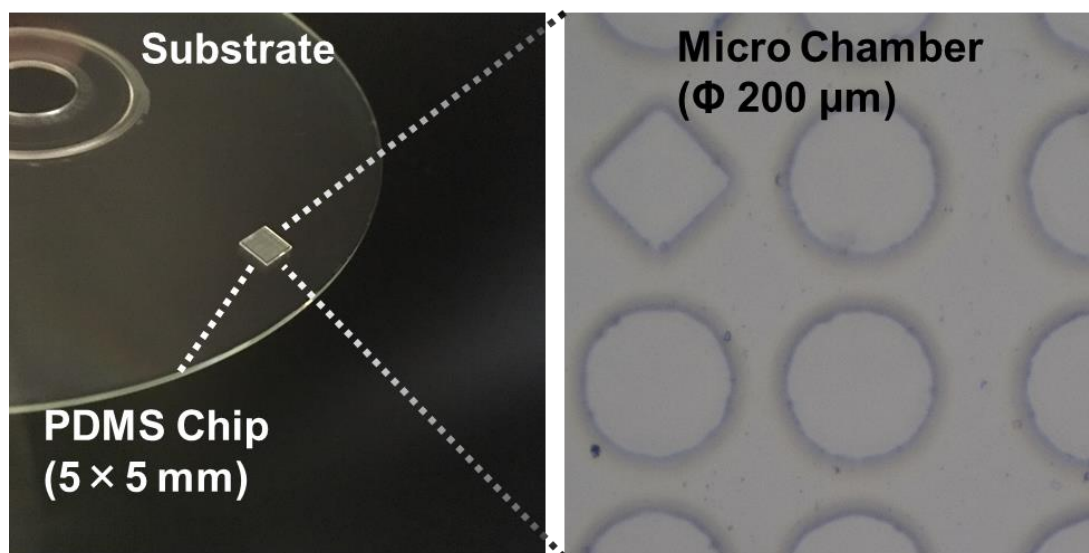


図 1-4 遠心型マイクロ流体デバイスの概略図

上記のマイクロストロボスコープに遠心型マイクロ流体デバイスを取り付けてポリスチレンビーズとシリカビーズそれぞれに遠心力を印加した際の挙動を下図 1-5 に示す。

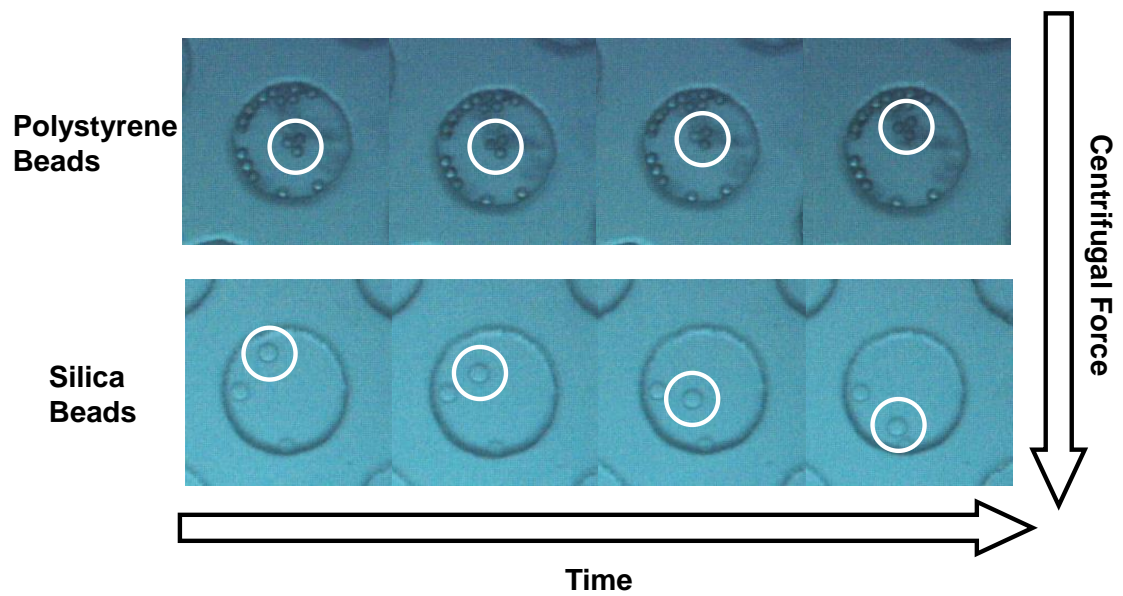


図 1-5 ビーズ遠心挙動観察

図 1-5 より、Percoll よりも密度の大きいシリカビーズは遠心力と同じ方向に沈降しているのに対し、ポリスチレンビーズは遠心力方向と逆方向にビーズが動いていることがわかる。これは、ポリスチレンビーズの密度が Percoll の密度よりも小さいため、浮力が重力を上回り、ビーズが浮上したためと考えられる。以上より、ポリスチレンとシリカの2つのビーズの挙動についてマイクロストロボスコープによる観察に成功し、観察系の構築を完了した。

1.3 抗体修飾マイクロビーズの調製

プローブとなるマイクロビーズ表面に抗体分子を固定する必要がある。固体表面への生体分子の固定方法として分子間力を利用した物理吸着による固定や特異的な相互作用を利用したアビジン-ビオチン相互作用による固定方法等が存在する。今回の場合、結合力測定を行う分子間結合よりも弱い結合力で抗体分子を固定すると結合の破断よりも先に抗体分子がビーズ表面から脱離してしまうと考えられる。したがって、今回は架橋剤である EDAC(1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide Hydrochloride)を用いて非常に強固な結合である共有結合による抗体分子の固定を試みた。

密度の小さいマイクロビーズとして、Polystyrene beads (Polybead Carboxylate Microspheres (2.5% Solids-Latex), 10.0 μ m, Polysciences #18133)を使用し、密度の大きいマイクロビーズとして Silica beads(Silica Microspheres, Carboxyl Functional 5.0 micron, Polysciences, #24755)を使用した。この2種類のマイクロビーズに固定する抗体には、Goat anti-Mouse IgG(H+L) cross Absorbed Secondary Antibody(Thermo, #31164)を使用した。ビーズと抗体を共有結合で固定するために PolyLink Protein Coupling Kit for COOH Microparticles(PolyScience, #24350)を使用し、キットの手順に従って抗体分子の固定を行った。大まかなビーズへの抗体固定化の手順を図 1-6 に示す。

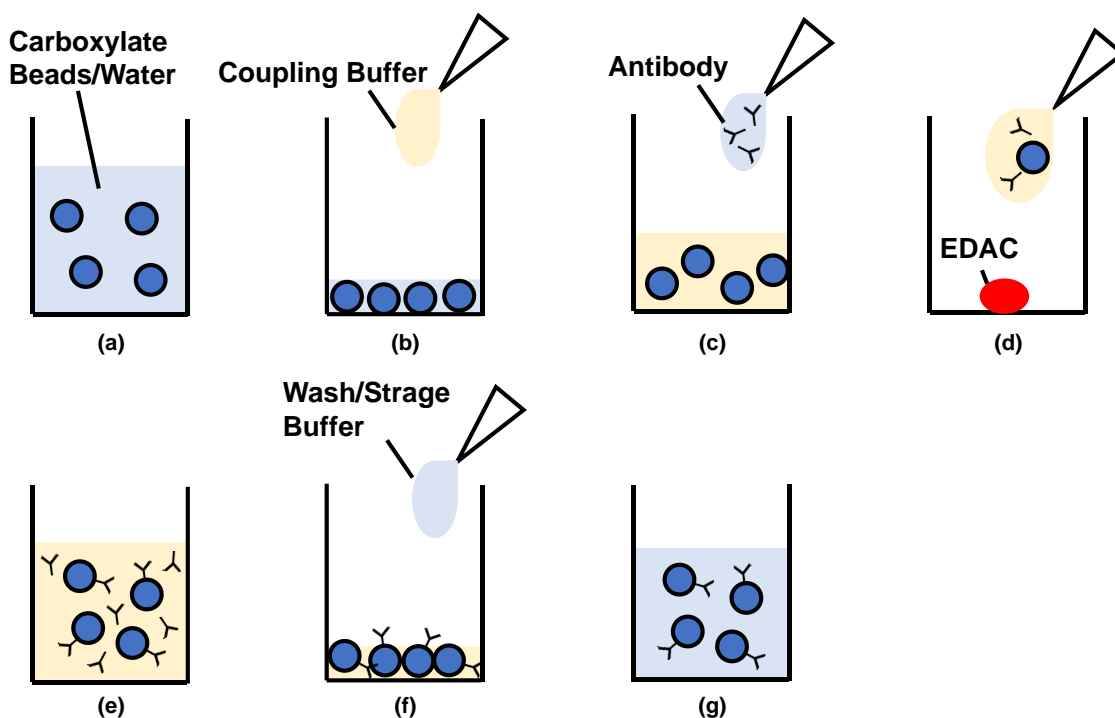


図 1-6 抗体修飾マイクロビーズの調製手順

はじめに、PS beads と、Si beads をそれぞれマイクロチューブに 12.5 mg ずつ加える (図 1-6(a)). 1000 G にて 10 分間遠心分離を行って上清を取り除いた後、キット付属の PolyLink Coupling Buffer 0.17 ml を加えて voltex ミキサーを用いてビーズを懸濁させる (図 1-6(b)). Goat anti-Mouse IgG(H+L) cross Absorbed Secondary Antibody 0.2 ml をそれぞれに加えて voltex を用いてビーズを懸濁させる (図 1-6(c)). PolyLink EDAC 1~2 mg を新しいマイクロチューブに加え、その中にビーズを溶媒ごと加える (図 1-6(d)). ミックスローターを用いて室温中で 1 晩攪拌しながら反応することでビーズの表面に抗体分子を固定した (図 1-6(e)). 未反応の抗体分子を除去するため、1000G で 10 分間遠心分離を行い、上清を取り除いた後、キット付属の Wash/Storage Buffer を加えてビーズを懸濁させる (図 1-6(f)). チューブ壁面に付着している抗体分子を完全に除去するため、ビーズ懸濁液を新しいマイクロチューブ移し替えた (図 1-6(g)). 洗浄工程を 3 回繰り返して行うことで未反応の抗体分子を完全に除去した. 上記手順によって図 1-7 に示すようにビーズ表面に固定されているカルボキシル基と抗体分子に含まれる第 1 級アミンの間で架橋反応が起こり、アミド結合が形成されることでマイクロビーズの表面に抗体分子が固定される.

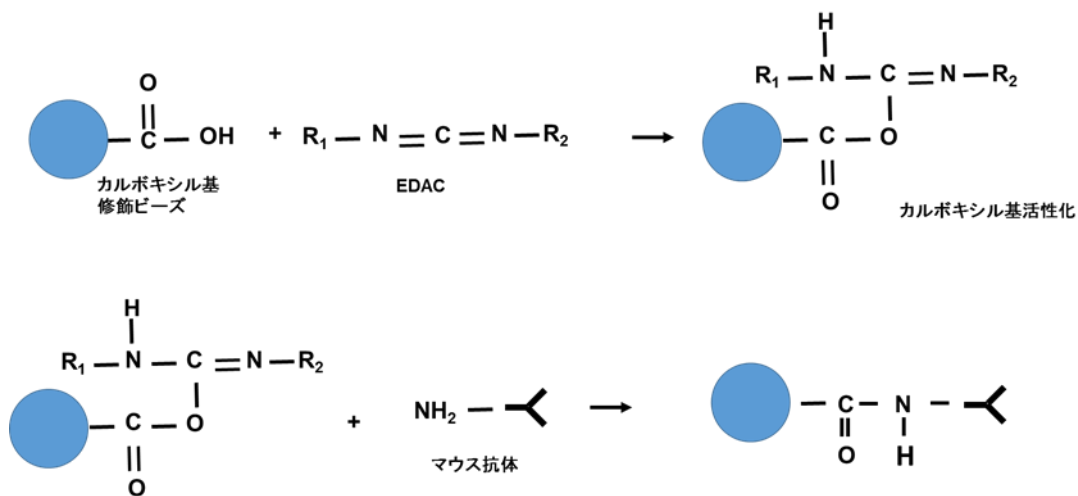


図 1-7 EDAC 反応機序

次に、ビーズに固定化した抗体分子の活性を評価する必要がある。ビーズとの結合に使用したアミノ基が抗原抗体反応による生体分子間の結合に影響を与える可能性があるためである。そのため、蛍光色素であるフルオレセインイソチオシアネート (FITC, Fluorescein-Iso-Thio-Cyanate) によって標識した抗マウス IgG 抗体と反応させることによって活性の評価を行った。

使用した試薬類を以下に記す. DPBS に 1%(w/w)のウシ血清アルブミン(BSA : Albumin from bovine serum(SIGMA, #A7030)を溶解して 1%BSA 含有 DPBS を調整した. さらに, DPBS にポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(富士フィルム和光純薬, #167-11515)を 0.05%(v/v)添加し, 0.05%Tween20 含有 DPBS を作成した. Pierce™ Ms IgG, Whole Molecule Control(Thermo, #31903)をマウス抗原とし, Anti-IgG(H+L), Mouse, Goat-Poly, FITC(KPL, #02-18-06)を FITC 標識抗体として抗体修飾ビーズとの反応を行った. 蛍光観察を行うために, 厚さ 1 mm の PDMS シートに直径 3 mm の穴をパンチしてカバーガラスに貼り付けたものをチャンバーとして使用した. 蛍光標識抗体によるビーズの結合活性評価の手順を下の図 1-8 に示す.

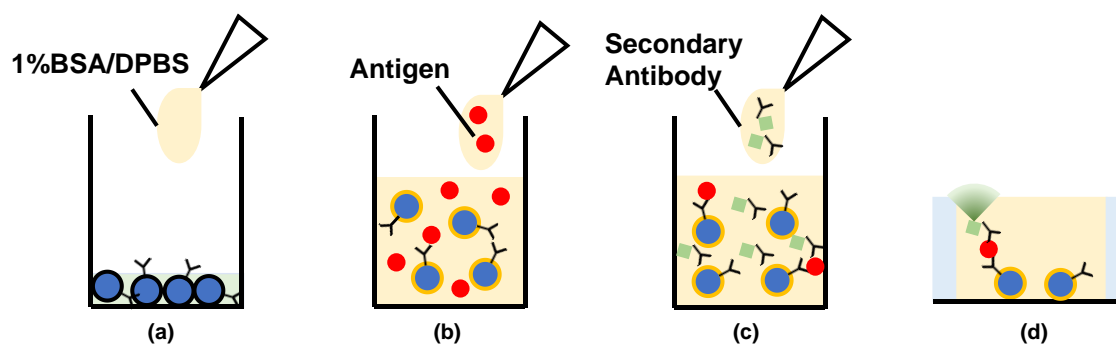


図 1-8 蛍光標識抗体による抗体修飾マイクロビーズの反応性評価

それぞれのビーズを表面積が等しくなるように 1%BSA 含有 DPBS で希釈し, 1000 μ l ずつマイクロチューブに加えた. すると, 非抗原性タンパク質である BSA がビーズの表面に吸着することで抗原分子や 2 次抗体の非特異的な付着を抑制することができる. 1000G にて 1 分間遠心分離し, 上清を取り除いた後に 0.05%Tween20 含有 DPBS を 1 ml 加えて洗浄した. 同様の手順で洗浄を 3 回行った(図 1-8(a)). 洗浄後のビーズに, 1%BSA 含有 DPBS で 1000 ng/ml に希釈した抗原を 100 μ l 加えて攪拌しながら 1 時間室温で反応させる(図 1-8(b)). 3 回洗浄した後, 1%BSA 含有 DPBS で 11 倍に希釈した FITC 標識抗体を加え攪拌しながら 1 時間室温で反応させる(図 1-8(c)). 3 回洗浄後, PDMS チャンバーにビーズが懸濁した液体を 5 μ l 加え, 倒立顕微鏡にて蛍光観察を行った(図 1-8(d)).

下の図 1-9 に露光時間 1 秒, 20 倍対物レンズによって撮影した抗体修飾マイクロビーズの蛍光画像と明視野画像を示す.

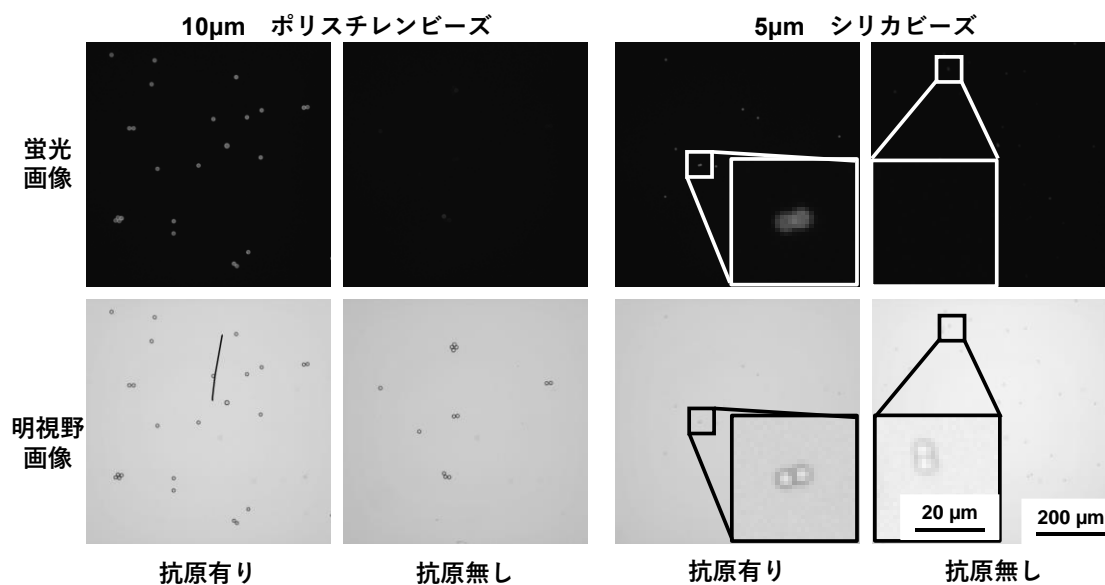


図 1-9 抗体修飾ポリスチレンビーズの蛍光観察

この実験ではビーズの材質に関わらず抗原有りの場合においてのみ蛍光画像でビーズの像が得られた。これは、ビーズ表面に修飾した抗体分子と蛍光色素を標識した 2 次抗体が抗原分子を介した免疫反応によって結合しているためだと期待できる。また、抗原分子を加えていない場合、明視野画像では確認できるビーズの像が蛍光画像では確認できなかった。これは、洗浄工程によってビーズの表面に非特異的に付着した 2 次抗体が除去されたためであると考えられる。したがって、図 1-9 の蛍光画像はビーズ表面に固定した抗体分子の免疫反応によって蛍光発色していると言える。以上より、EDAC を用いた架橋反応による抗体分子の固定がなされており、ビーズ表面に固定した抗体分子はマウス IgG に対する反応性を維持したままであることが確認できた。

1.4 ビーズ免疫複合体の形成

1.1 節の測定原理を実証するために、2種類のビーズが抗原抗体反応で結合することを確認する必要があるため、下の図 1-10 に示す方法で2つのビーズを反応させ、ビーズの総数に対してポリスチレン-シリカ間で結合しているビーズの比を求めた。この比について抗原を加えた場合と加えない場合で比較し、結合するビーズの比に違いがあるかどうかについて調べた。

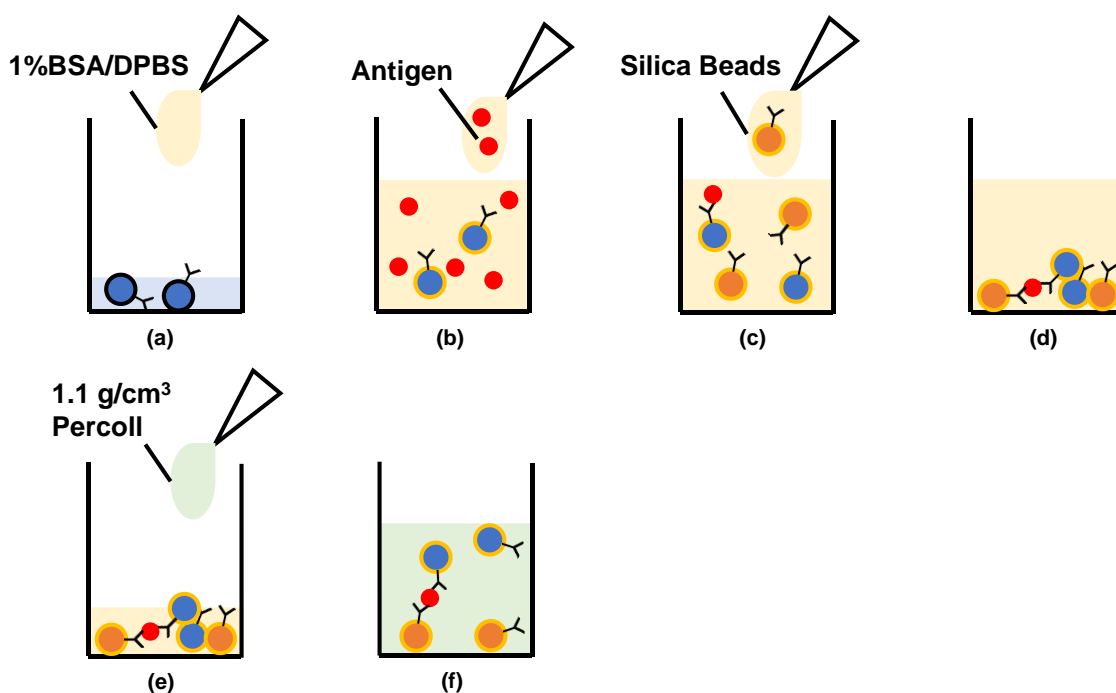


図 13-10 ビーズ免疫複合体形成実験

使用した試薬類を以下に示す。1.3 と同様に調製した 1%BSA 含有 DPBS をブロッキング剤やたんぱく質の希釈に使用した。また、洗浄液に 0.05%Tween20 を使用した。ビーズ同士を反応させるために加える抗原分子には Pierce™ Ms IgG, Whole Molecule Control(Thermo, #31903)を使用した。

はじめに、抗体修飾したポリスチレンビーズを 1000G で 10 分間の遠心分離及び上清の除去を行い、1%BSA 含有 DPBS に再懸濁させることで表面のブロッキングを行った(図 1-10(a))。抗原分子を 1%BSA 添加 DPBS で 10 倍に希釈(v/v)することで濃度を 570 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製し、2.0 ml のマイクロチューブに抗体固定化済ポリスチレンビーズを 6 μl と抗原分子を 2 μl 加えて voltex ミキサーで軽く攪拌した後に 30 分間室温中に静置することで反応

させた(図 1-10(b)). 次に, 遠心分離と上清の除去を 3 回繰り返して未反応の抗原分子を洗浄し, シリカビーズを 6 μl 加え, voltex ミキサーで攪拌した(図 1-10(c)). その後, 30 分間室温中に静置することで, 抗原分子と反応したポリスチレンビーズとシリカビーズを反応させた(図 1-10(d)). 密度を調整した Percoll を 350 μl 加えてビーズを懸濁させることで未結合のポリスチレンビーズを分離した(図 1-10(e)).すると, 免疫反応によってビーズ複合体が形成されている場合はポリスチレンビーズが分離せずに複合体が維持されたままであると予想できる(図 1-10(f)). ビーズの一部を血球計算盤に取り, 倒立顕微鏡を用いて観察を行い, ビーズの総数とポリスチレン-シリカ同士で隣接し, 結合しているように見えるビーズの個数を数えて比を求めた.

図 1-11 に図 1-10(d)の状態ですべて倒立顕微鏡を用いてビーズの様子を観察した結果を示す. 図 1-11 より, 抗原を加えた場合でも加えていない場合でも結合しているように見えるビーズを確認した. このことにより, 抗原を加えなくてもポリスチレンビーズとシリカビーズが物理吸着等の要因で非特異的に結合する可能性が示唆された. したがって, 抗原を加えてビーズを反応させた場合でも非特異的結合によるビーズの結合が発生している可能性があり, 遠心力を印加してビーズを分離させることで相互作用を測定しても, 生体分子に起因した相互作用でない可能性が生じた.

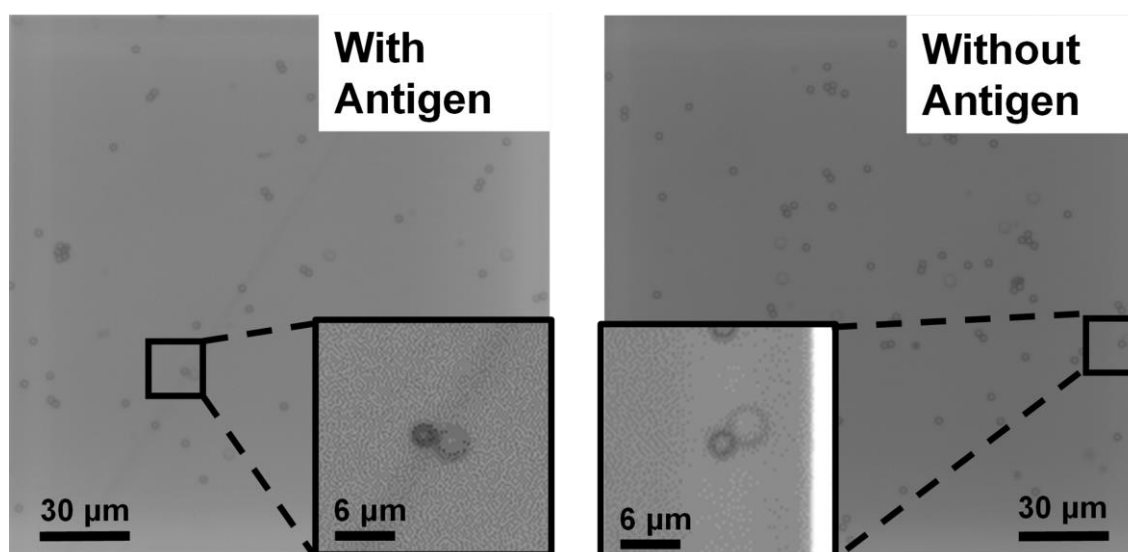


図 1-11 ビーズ複合体の観察

そこで, Percoll での分離操作前後の隣接ビーズの存在比を下の図 1-12 に示す.

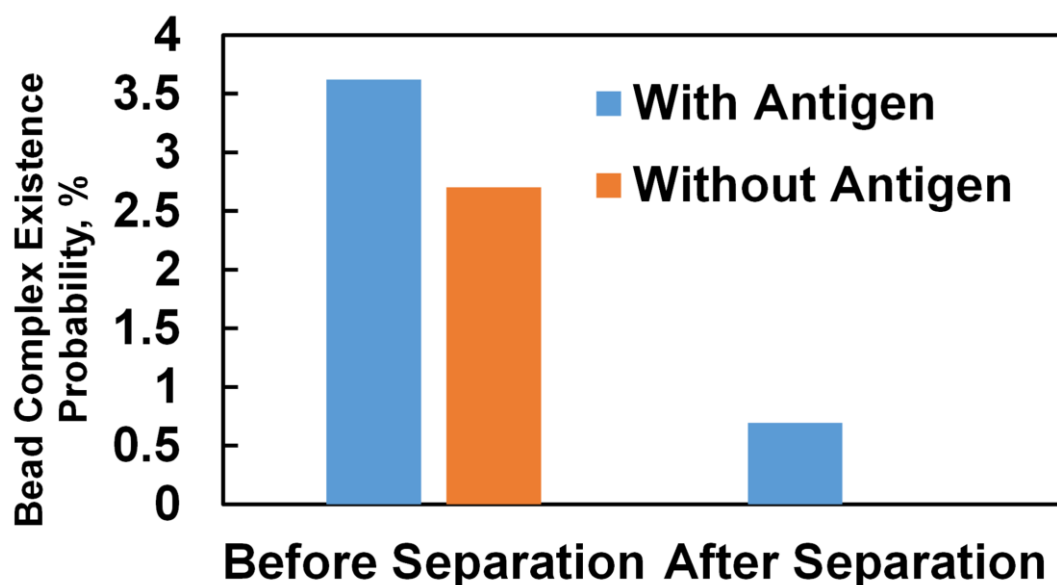


図 1-12 ビーズ分離前後の複合体存在確率

図 1-12 より、Percoll を用いてビーズを分離する前には抗原の有無どちらの場合でも隣接するビーズが見られた。対して、分離後のグラフでは、抗原を加えない場合において隣接するビーズがまったく見られなかった。以上のことから、Percoll で溶媒を置換し、ビーズを分離することで物理吸着などの非特異的な結合によるポリスチレン-シリカ同士で隣接していたビーズは排除され、溶媒を置換した後に見られるポリスチレン-シリカ同士で隣接しているビーズは、抗原-抗体反応による特異的な結合によって結合していると考えられる。これにより、溶媒を置換して遠心力を印加した際にビーズの分離に要した力は、抗原-抗体反応の結合力とみなすことができる。

以上より、マウス IgG 抗原とした抗原-抗体反応系によるマイクロビーズの免疫複合体形成を確認することができた。

1.5 ビーズ免疫複合体の遠心分離実験

1.5.1 最適ビーズ系の算出

結合したビーズに遠心力を印加する前に、ビーズの粒径を選定する必要がある。マイクrostロボスコープは 60~3000 rpm の間で良好な顕微鏡画像が得られることが判明している 9)。そのため、回転数が 1000 rpm 程度の回転中にビーズ間の結合が破断するようにビーズの粒径を選定した。ビーズに作用する遠心加速度と遠心力によって発生する浮力の算出過程を以下に示す。

初めに、回転系の加速度 a は以下の式で求められる。

$$a = r\omega^2 \quad \dots\dots\dots(1.1)$$

ここで、 r は回転半径[cm]を表す。次に、回転角速度 ω は以下の式で表せる。

$$\omega = \frac{2\pi N}{60} \quad \dots\dots\dots(1.2)$$

ここで、 N は回転数[rpm]を表す。以上より、回転するビーズにかかる相対遠心加速度 CRF(Relative Centrifugal Force)は、 $CRF=a/g$ (g : 重力加速度)のように表すことができる。この式に上記の(1.1)式、(1.2)式を代入すると

$$CRF = \frac{r\left(\frac{2\pi N}{60}\right)^2}{g} = \frac{4\pi^2 r N^2}{3600 \times g} \doteq 1118 \times r \times N^2 \times 10^{-8} \quad \dots\dots\dots(1.3)$$

と求められる。今回の実験では、PDMS チップを基板に張り付ける位置を回転中心から 3.5 cm とする。そのため、1000 rpm の時の相対遠心加速度は、 $39.13 \times G$ となった。

ポリスチレンビーズに作用する浮力の計算を以下に示す。
物体に作用する浮力と沈降力の差 F は以下のように表せる。

$$F = (\rho_m - \rho_b) V g \quad \dots\dots\dots(1.4)$$

ここで、 ρ_m はビーズ分散媒の密度、 ρ_b はビーズの密度、 V はビーズの体積を表す。遠心力によってビーズに作用する引張力を求めるには上式の g の代わりに CRF を用いればよい。

溶媒の密度は 1098.3 kg/m^3 、ポリスチレンビーズの密度は 1052.6 kg/m^3 、

ポリスチレンビーズの直径を $20 \mu\text{m}$ と仮定すると、

ポリスチレンビーズの体積は 約 $4.19 \times 10^{-15} \text{ m}^3$ となる。

以上の数値を上記の式に代入し整理すると、ビーズが分離した際に作用していた力は、約 73 pN となり、先行研究の数十～数百 pN と近い値となるため、ポリスチレンとシリカビーズの粒径を $20 \mu\text{m}$ とした。

1.5.2 ビーズ複合体の遠心分離実験

これまでに行った検討を基に測定原理の実証を行った。図 1-13 に手順の概略図を示す。

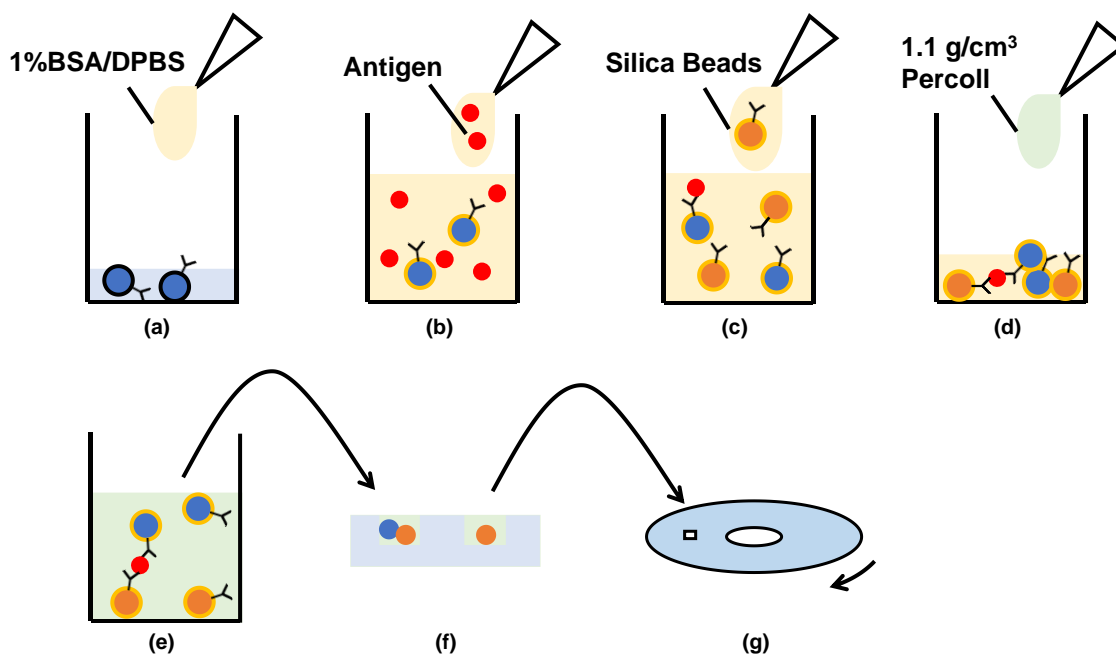


図 1-13 分子間相互作用測定原理の実証実験手順

1.5.1 節で求めた最適粒子径を基に直径 $20 \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズ (Polybead Polystyrene Microspheres (2.5% Solids-Latex), $20.0 \mu\text{m}$, Polyscience #18329) 及びシリカビーズ (sicastar, COOH, $20 \mu\text{m}$ (50 mg/ml), Micromod Partikeltechnologie GmbH # 43-02-204) を実験に使用した。量ビーズは 1.3 節に記載した方法を用いてビーズの表面に抗体分子を固定した後、 $5000 \text{ 個}/\mu\text{l}$ になるように 1% BSA 含有 DPBS で希釈した(図 1-13(a))。ポリ

スチレンビーズを加えたチューブに 1%BSA 含有 DPBS で 10 倍に希釈した抗原分子を加え、室温静置で 1 時間反応させた(図 1-13(b)). 次に、0.05%Tween20 含有 DPBS で 3 回洗浄し未反応分子を取り除いた. シリカビーズをチューブに加え、室温静置で 1 時間反応させた(図 1-13(c)). 洗浄後、上清を取り除き Percoll を加えることで溶媒を置換した(図 1-13(d)). 溶媒置換によってシリカビーズと結合していないポリスチレンビーズは浮上し、シリカビーズと分離する(図 1-13(e)). こうして分離したシリカビーズやビーズ複合体を 1.2 節で作成した PDMS チャンバーに分散媒ごと封入して(図 1-13(f)), マイクロストロボスコープに取り付けた(図 1-13(g)). この PDMS チャンバーを CD 状の基板に自己吸着にて取付け、100 rpm/s の加速度で 1000 rpm まで加速し 20 秒間 1000 rpm で定常回転した際のビーズの挙動を観察した(図 1-13(h)).

図 1-14 にビーズ間の結合が破断しビーズの分離を観察することに成功した際のビーズ挙動のスナップショットを示す(Case B).低回転数のときには、ビーズ複合体はその他のシリカビーズと同様に重力方向に沈降している.やがて、複合体のシリカビーズはチャンバー壁面や他のシリカビーズと接触し重力方向の力が反作用によって打ち消される.回転数が上昇するにつれて、ポリスチレンビーズに作用する浮力が増加し、重力と反対の方向に引っ張られている様子が確認できる.そして、回転開始から約 10.2 秒後、1000 rpm に到達した瞬間にビーズ複合体を形成している抗原-抗体間の結合が破断し、2 種のビーズが分離していく様子が確認された.

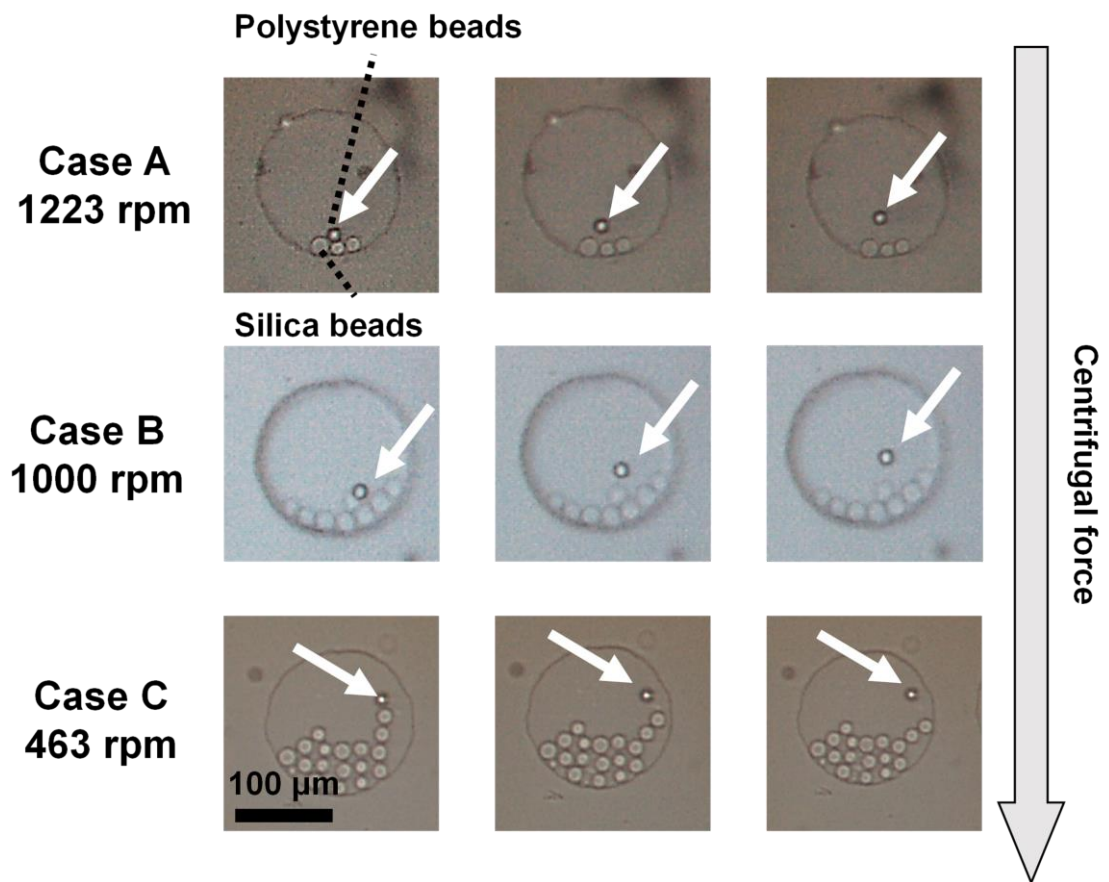


図 1-14 ビーズ複合体分離時のスナップショット

また, 加速中にビーズ複合体の分離が観察できるように 50 rpm/s の加速度で 2000 rpm まで加速し 10 秒間 2000 rpm で定常回転した際のビーズの挙動を観察した際のスナップショットを示す(図 17(Case A, C)). 図 17 より, 矢印が示すポリスチレンビーズについて分離の様子が確認された. このとき, ビーズは Case A からそれぞれ 1223, 1000, 463 rpm のときに分離した. このときに試算したポリスチレンビーズに作用する浮力とそれぞれのビーズの様子を下の図 1-15 のグラフに示す.

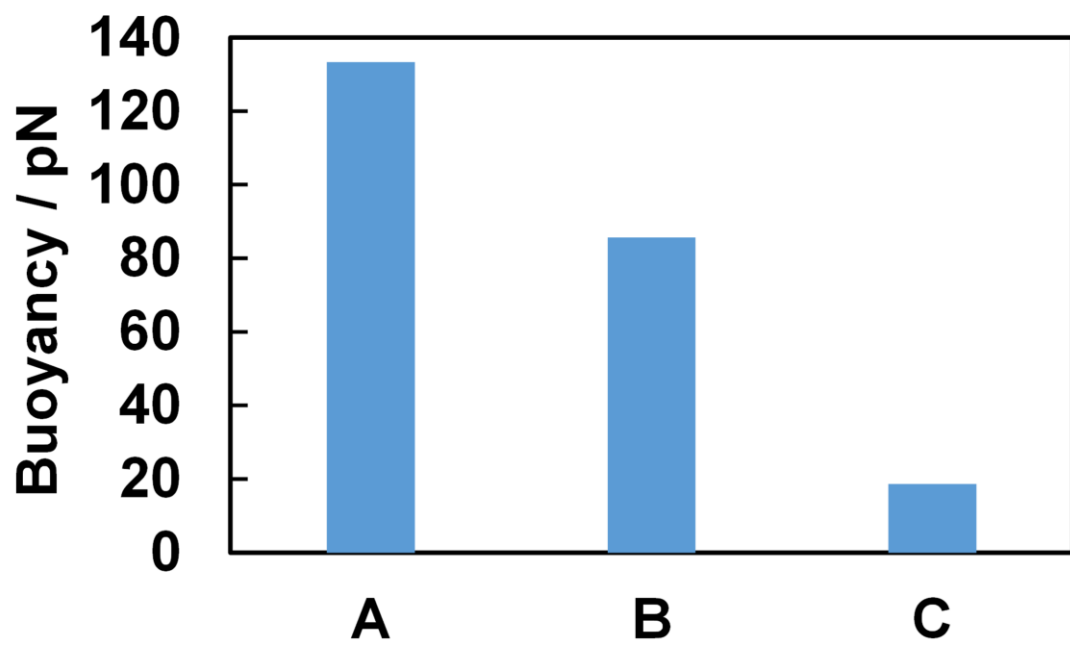


図 1-15 ポリスチレンビーズに作用した浮力

1.6 実験結果の考察

図 1-14 より、浮力によってビーズが分離する様子の観察に成功した。また、図 1-15 のビーズが分離するまでに要した浮力を見ると、どの数値も数十～数百 pN の値を取っている。これは、先行研究である AFM による抗原抗体反応の結合力測定とも整合性のある数値である⁸⁶⁻⁹⁰。したがって、測定原理の実証に成功することができたと考えられる。本手法は遠心力を利用することで生体分子に直接接触することなく結合力の力学測定を行うことができることに加えて、2 種類のマイクロビーズに固定した抗体分子が標的物質である抗原分子に対してサンドイッチ状に結合することで標的分子をプローブに直接固定する必要が無い。したがって、迅速な診断が要求されるような試料であっても測定可能であり、臨床応用に適していると言える。加えて、マイクロビーズの粒子径を変更することで力の印加範囲を簡単に変更することができる。光学顕微鏡の分解能の限界は光の波長によって決まり、0.2 μm 程度であるため、それ以上に小さい粒子は観察することができない。実験に用いたマイクロストロボスコープは 60～3000 rpm の間で良好な顕微鏡画像が得られる。以上より、0.2 μm のポリスチレンビーズを 60 rpm で回転した場合にポリスチレンビーズに生じる浮力は、約 0.2 aN と算出された。したがって、本測定手法で測定可能な引張り力の最小値は、0.2 aN であると考えられる。また、最大値は、現在使用している表面カルボキシル基修飾ポリスチレンビーズの最大粒径が 20 μm であるため、20 μm のポリスチレンビーズを 60 rpm で回転した場合にポリスチレンビーズに生じる浮力である約 517 pN と算出された。以上より本測定手法は 0.2 aN～500 pN 程度の広いダイナミックレンジを持つ測定手法だといえる。

しかし、今回の算定された測定したポリスチレンビーズの浮力は実験ごとのばらつきが大きい。これは、2 種類のマイクロビーズの曲率半径が抗体分子の大きさと比べて非常に大きいためだと考えられる。抗体分子の大きさは約 5 nm であり、2 種類のビーズが理想的な点接触で接触した場合、二つのビーズの距離が 10 nm 以内となる円形の範囲内において抗体分子がビーズの結合に寄与すると考えられる。この円の面積は、0.30 μm^2 と求めることができた。以上より、ビーズへの抗体分子固定密度が高い場合は、ビーズ間の結合に複数の抗体分子が関与している可能性が十分に考えられる。また、今回の実験で分離したビーズ複合体は、ポリスチレンビーズがシリカビーズに結合する相対的な位置によって浮力が結合分子に対して鉛直方向に作用していない可能性や、ポリスチレンビーズ 1 個に対して複数個のシリカビーズが結合している可能性、ビーズに固定した抗体がポリクローナル抗体であるため、ビーズ複合体ごとに結合部の様態が異なる可能性や、抗体分子の配向性が制御できていない可能性が考えられる。

本手法は顕微鏡視野内にビーズ複合体を複数配置することでハイスループットな結合力測定が可能となる。一方、ビーズ複合体の形成収率が悪く顕微鏡視野内にビーズ複合体

を配置することが難しく、ハイスループット測定には至っていない。

1.7 結言

本章では、遠心力を利用して 2 つの粒子間に引張力を加えることで生体分子間の相互作用を測定する方法を考案し、Mouse IgG 抗原と抗 Mouse IgG 抗体をサンプルとした実験を行うことで測定原理の実証に成功した。従来の生体分子間相互作用測定法では操作が煩雑で熟練した技術が必要であることに加えて装置が複雑で大型であるため、基礎研究から応用研究への発展に至らないのが現状である。

提案した測定原理は簡便に数アトニュートンから数百ピコニュートンのワイドダイナミックレンジな力測定をハイスループットに行うことが可能な点や標的分子をプローブに固定する必要が無く、迅速な測定が可能である点、顕微鏡視野内に複数のビーズ複合体を配置することでハイスループットな測定が可能である点等の特徴を有しており、生体分子の相互作用の違いを利用したバイオセンサーの開発や、既存のバイオセンサーへの組み込み交差性ノイズを除去するなどの応用が期待できる。

一方、ビーズ複合体の形成収率が悪く、ハイスループットな測定には至っていない点やポリスチレンビーズとシリカビーズの相対的な位置関係によって分子間結合に対して鉛直な力印加が行えていない点、1 つのビーズ複合体に対して複数の抗原抗体結合が寄与している可能性がある点等が課題として挙げられた。

第2章 複数同時測定に向けた検討

2.1 緒言

前章にて遠心力を用いた分子間結合の結合力測定技術について測定原理の実証に成功した。本手法は、ハイスループットな測定が可能である点や標的分子をプローブに直接固定する必要が無い点など臨床応用に適した特徴を有している。一方、ビーズ複合体の形成収率が悪くハイスループット測定が実現できていない点や、ビーズの相対的な位置関係によって測定される結合力がばらついてしまう点などの課題があった。そこで、本章では複数の分子間結合について結合力測定を可能にするため、測定原理の改良や、抗体修飾ガラス基板の調製等の検討を行う。また、改良した測定原理を用いた分子間相互作用の複数同時測定を行い、分子間相互作用の統計的解析を試みた。

2.2 実験方法

図 2-1 に改良した分子間相互作用測定の実験原理を示す。

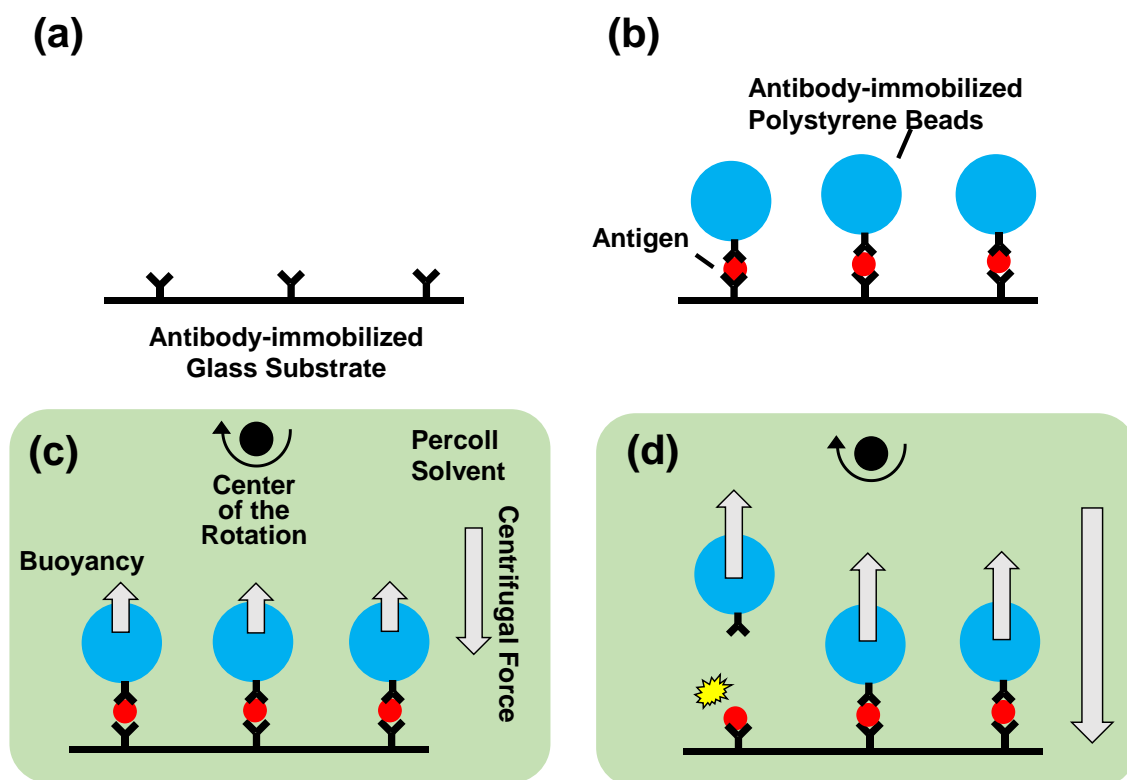


図 2-1 改良した分子間相互作用測定原理の概略図

第 1 章の測定原理から大きく変更した箇所として、シリカビーズの代わりに抗体分子を固定したガラス基板を使用することが挙げられる。これによって、ポリスチレンビーズを基板表面に播種するだけでビーズ-基板間の結合が形成されることが考えられる。また、基板に対して垂直方向に浮力が作用するため、ビーズの相対的な位置を考慮する必要が無く、一様な力を分子間結合に印加することが可能になると考えられる。

2.3 抗体修飾ガラス基板の調製

2.2 節に記載した測定原理による分子間相互作用の複数同時測定を行うため、架橋剤を用いたガラス基板表面への抗体分子の固定を試みた。抗体分子の固定には 1.3 節にて修飾技術を確立した EDAC を使用した。

ガラス基板にはアミノシランによる単分子層コーティングがなされている市販のスライドガラス(APS コートスライドガラス, 松浪硝子工業, # S8111)を使用した。ガラス基板への抗体固定化には(EDAC kit: PolyLink Protein Coupling Kit for COOH Microparticles (PolyScience, #24350))を使用した。

EDAC による抗体分子とガラス基板間の反応プロセスを下の図 2-2 に示す。

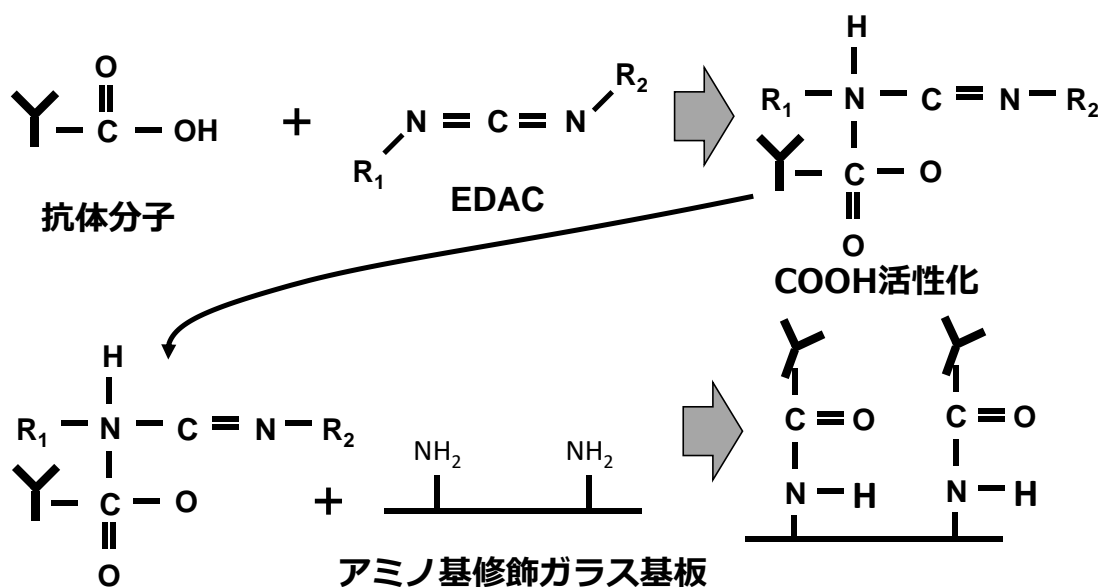


図 2-2 EDAC 抗体固定化プロセス

基板上に存在するアミノ基と抗体分子に存在するカルボキシル基が架橋剤を介してアミド結合を形成することで基板上に抗体分子が固定される。

基板と抗体を共有結合で固定するために大まかな基板への抗体固定化の手順を以下の図 2-3 に示す。

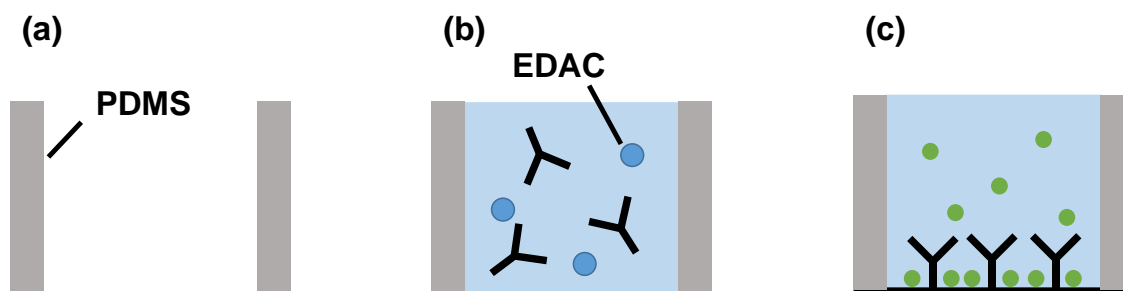


図 2-3 EDAC 抗体固定化基板作成手順

はじめに、PDMS シートに 3 mm の穴をパンチして基板と共にエタノール・イオン交換水の順に 3 分ずつ超音波洗浄する。窒素ブローにて水気を取り除き、PDMS シートを基板に貼り付け、自己吸着によって接合させることで反応チャンバーを作成した(図 2-3(a)). Polylink EDAC を 20 mg 量り、0.2 ml チューブに加え、Coupling Buffer で 0.2 mg/μl になるよう溶解した。1 μM になるように抗体分子を Coupling Buffer で希釈し反応チャンバーに 10 μl 加え、EDAC 溶液を 5 μl 加えて数回ピペッティングすることで攪拌し、1 時間室温で静置することでガラス基板と抗体分子を共有結合にて固定した(図 2-3(b)). チャンバー内の液体を取り除き、キット内の Wash/Strage Buffer を 10 μl 加える洗浄プロセスを 3 回繰り返して未反応の抗体分子および EDAC を除去した。その後、液体を取り除き、1%BSA 含有 DPBS を 10 μl 加えて 30 分静置してブロッキングを行った(図 2-3(c)).

2.4 分子間相互作用の複数同時測定

実験前に、保存した抗体固定化済みのマイクロビーズを 1%BSA 含有 DPBS で 1000 個/μl 程度になるよう希釈し、4°C で 1 晩以上静置することでビーズのブロッキングを行った。

今回行った実験の手順を以下の図 2-4 に示す。

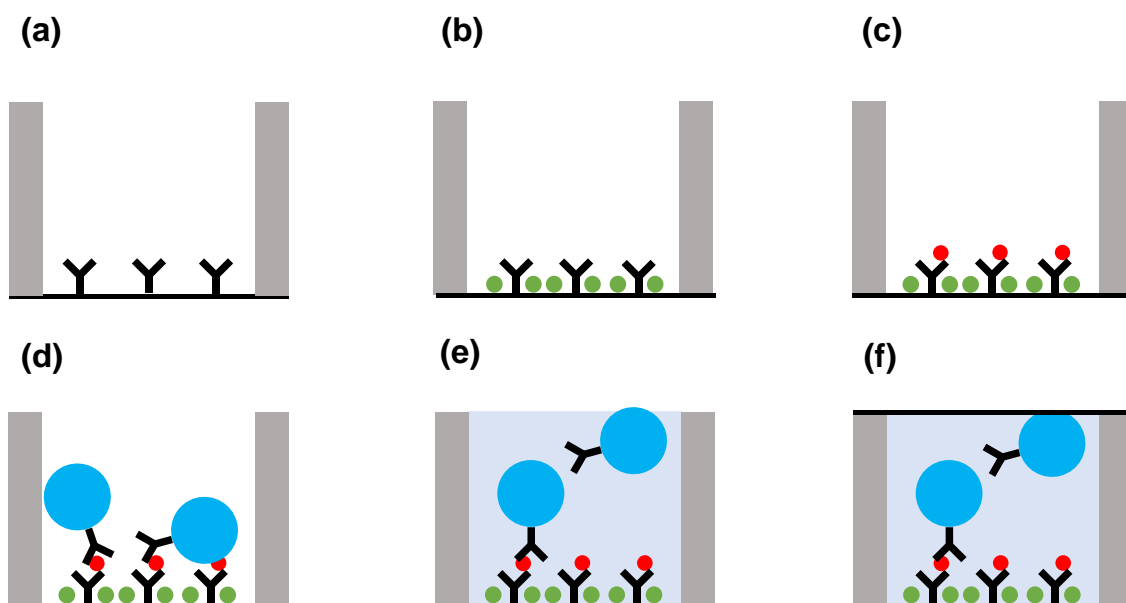


図 2-4 基板とビーズの結合手順

APS コートスライドガラスを 5 mm 角にカットし、2.3 と同様の手順で抗マウス IgG 抗体の固定化を行った(図 2-4(a)). ブロッキング後、チャンバー内の液体を取り除き、0.05%Tween20 含有 DPBS を 20 μl 加える洗浄プロセスを 3 回繰り返して行い、基板に付着していない BSA を除去した(図 2-4(b)). 1%BSA 含有 DPBS でマウス IgG を 550 μg/ml に希釈した抗原溶液を 20 μl 加えて 30 分間室温静置で基板表面の抗体分子と反応させた。反応後、上記の洗浄プロセスを 3 回繰り返して洗浄し、未反応の抗原分子を除去した(図 2-4(c)). ブロッキングを行ったビーズ溶液を 4 μl 加えて、30 分間室温静置で反応することで基板とビーズを抗原抗体反応で結合させた(図 2-4(d)). 反応後、ビーズ溶液が残っているチャンバーに密度調整溶媒を 16 μl 加えることでチャンバー内のポリスチレンビーズに浮力を作用させ、基板に付着していないビーズを浮上させることで基板と分離した(図 2-4(e)). 5 mm 角にカットしたカバーガラスをかぶせて PDMS と自己吸着で接合することで、溶媒とビーズを密封した(図 2-4(f)).

2.4.1 ビーズの観察

抗原を加えて正常に免疫反応を行った場合と抗原溶液の代わりに1%BSA含有DPBSを加えて免疫反応を行わなかった場合でビーズと基板の反応を行った. 図2-4の手順が完了した状態で顕微鏡にて基板表面を観察することで, 基板表面にビーズが特異的反応によって結合していることを確かめた. その結果を下の図2-5に示す.

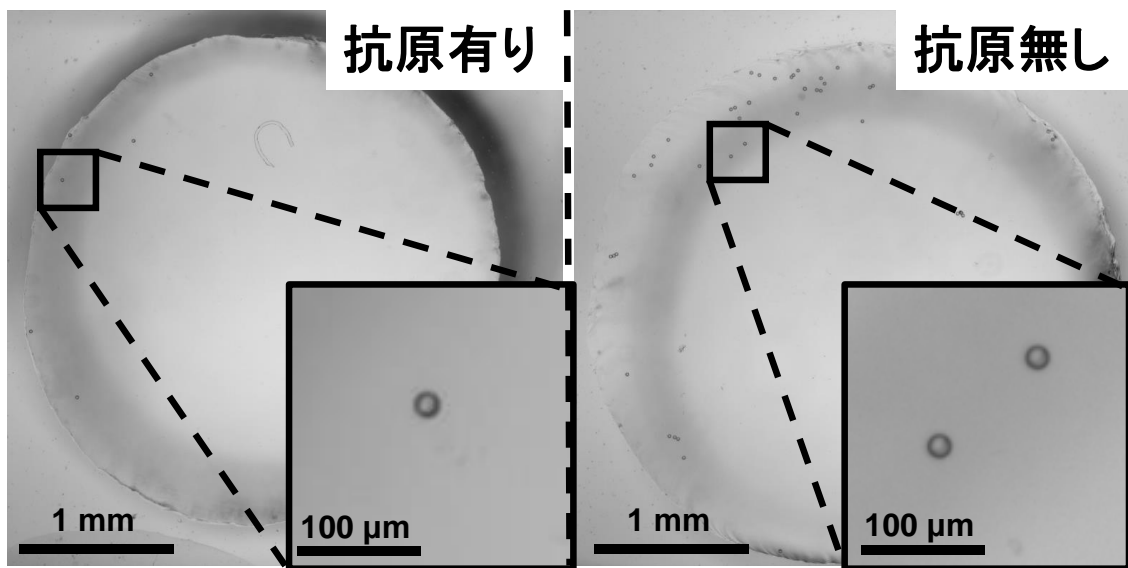


図 2-5 基板表面の観察

図 2-5 の画像を用いて基板表面に付着しているビーズの個数をカウントしたところ, 抗原を加えた基板では 14 個, 抗原を加えなかった基板では 69 個のビーズが基板に付着していた. 抗原を加えていない基板ではビーズの基板の間に免疫反応による分子間結合が形成されないため, ビーズはほとんど基板に付着しないと考えられる. しかし, 実際には抗原を加えた場合よりも多くのビーズが基板に付着している. これは, 疎水性相互作用や静電相互作用, ファンデルワールス力などの分子間力によってビーズが付着している可能性が考えられ, 抗原を加えた基板の場合でもこうした分子間力による付着と免疫反応による結合が混在していると考えられる. したがって, 目視による基板表面の観察では, 基板表面に付着しているビーズが免疫反応によって結合しているかどうかを確認することができなかった.

2.4.2 遠心力によるビーズ付着力の測定

基板を回転させる装置の概略図を下の図 2-6 に示す。

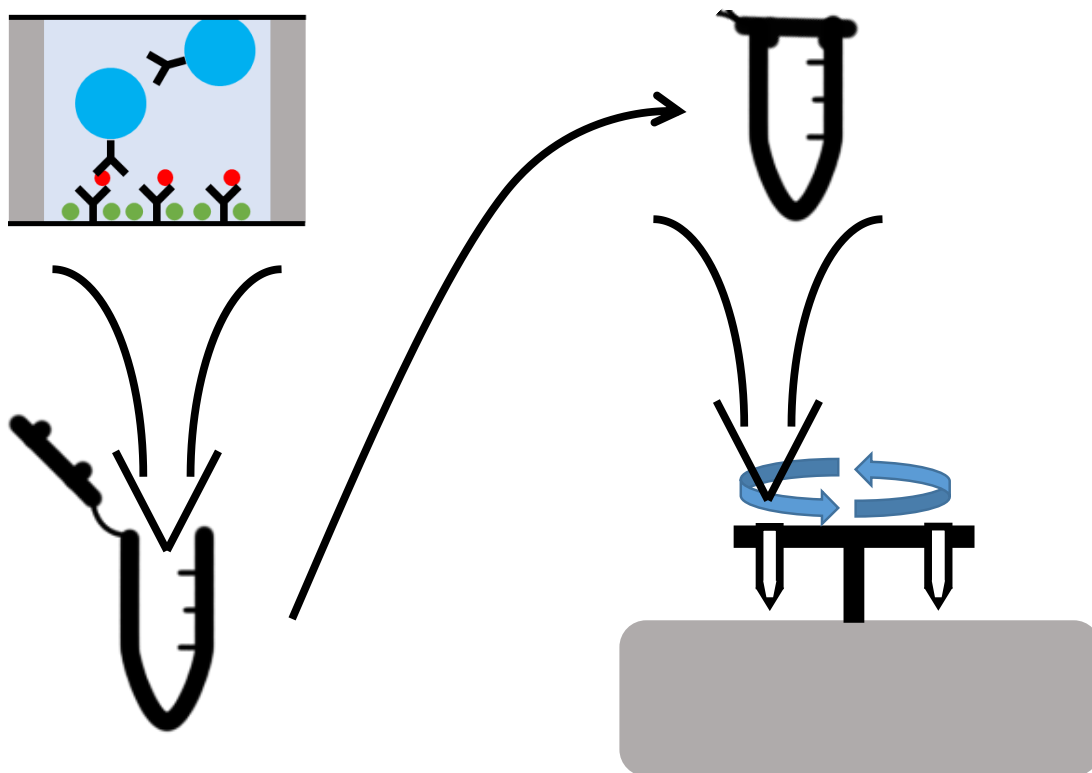


図 2-6 基板遠心装置概略図

ビーズの基板への付着力を測定するため、溶媒とビーズを密封した基板を 2.0 ml のマイクロチューブに加えた。このチューブごと遠心機に取り付け、回転させることで遠心力を印加した。遠心機は回転速度と加速度、最高速度での回転時間が設定でき、10～100G まで 10G ずつ遠心力が大きくなるよう回転速度を設定した。50 rpm/s で加速して設定した最高速度に到達した後、60 秒間最高速度を保持し、50 rpm/s で停止するまで減速させた。停止した遠心機から基板を取り出し、顕微鏡で観察、基板に付着するビーズをカウントすることでビーズの吸着力分布図を作成した。

2.4.3 測定の結果

こうして得られたビーズの吸着力分布図を下の図 2-7, 2-8 に示す。

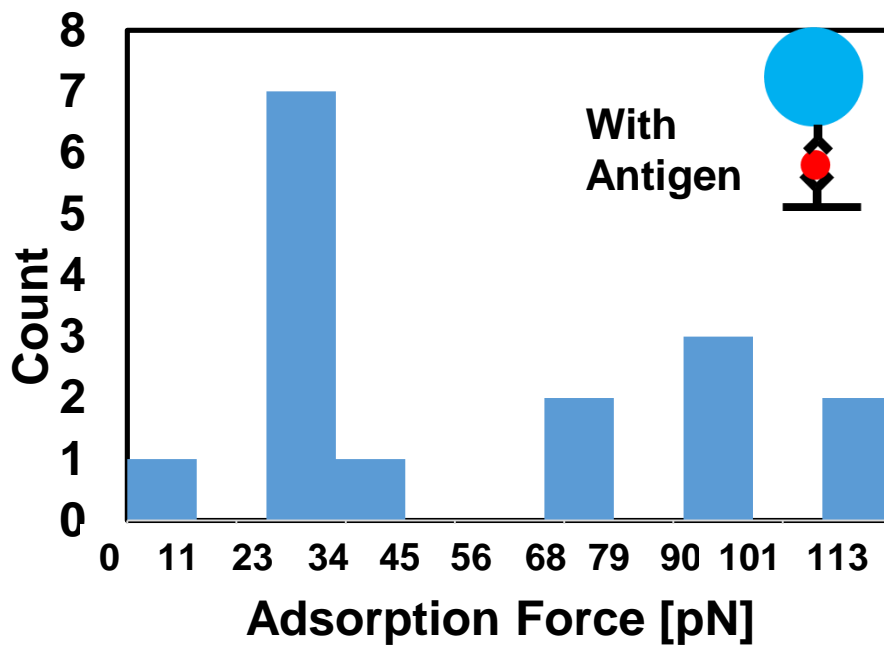


図 2-7 EDAC 抗体固定化基板ビーズ吸着力分布(抗原有り)

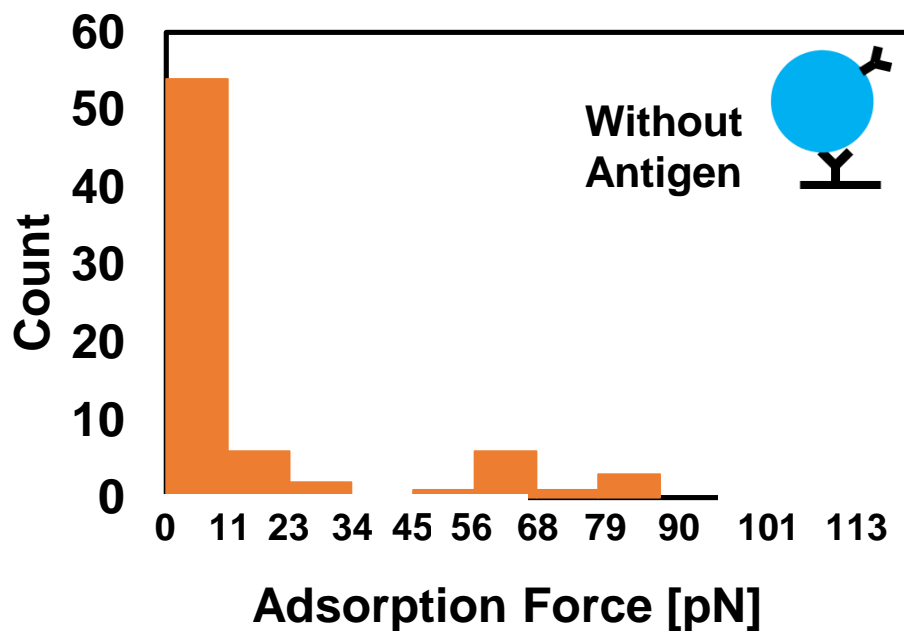


図 2-8 EDAC 抗体固定化基板ビーズ吸着力分布(抗原無し)

抗原ありの基板では、20-30G すなわち 22.5-33.8 pN の区間で最も多くのビーズが基板から離れて浮上していた。また、90.0-113 の区間に 2 つ目のピークのように見える箇所が存在していた。一方、抗原なしの基板では、0-11.3 pN の区間でほとんどのビーズが基板から分離し、ピークを持たないように見える分布が得られた。

2.4.4 考察

今回の実験で得られた 2 つの結合力分布は、形状が大きく異なっており、基板表面に固定した分子の特異的反応によって形成された結合が影響していると考えられる。抗原を加えていない条件でのビーズ付着力分布は特異なピークが見られなかった。これは、非特異的な相互作用によって微弱な力で基板に付着していたビーズがわずかな遠心力を印加することによって基板から脱離したためであると考えられる。一方、抗原を加えた基板でのビーズ吸着力のピークは前章で述べた AFM による実験の結果と非常に近い値を取っている。したがって、抗原ありの基板ではビーズと基板の結合に抗原抗体反応が寄与していることが期待される。また、抗原有りの条件では 22.5-33.8 pN の区間で最も大きいピークと 90.0-113 pN の区間に 2 つ目のピークが見られた。これは、1.6 節に記載したようにマイクロビーズの曲率半径に対して抗体分子が非常に小さいためビーズ-基板間の結合に複数の抗原抗体結合が寄与しているためだと考えられる。

以上より、目視による観察では判別することができなかったビーズと基板の結合因子を吸着力分布の比較によって識別することに成功した。以上より、複数配置したマイクロビーズに一樣の引張り力を加えてビーズの結合力を測定する測定原理の実証に成功したといえる。

一方、AFM による結合力スペクトルの取得に用いる力測定が約 100 回であることから、少なくとも 100 個以上のビーズについて吸着力測定を行うことで統計的な解析が可能となるハイスループットな測定法と言える。しかし、今回の実験で吸着力の測定に成功したビーズの個数は、14, 69 個と少なく、統計的な解析に必要な計測数とは言えない。そこで、反応系の最適化を行うことで測定のハイスループット化を行う必要があると考えられる。

2.5 結言

第 2 章では、第 1 章で実証した遠心力による分子間相互作用の結合力測定について複数同時測定を可能にするべく測定原理の改良を行った。

測定原理の改良として密度の大きいシリカ製マイクロビーズを抗体修飾ガラス基板に置き換えた。これによって、ポリスチレンビーズを播種するだけで結合の形成ができ、ビーズの相対的な位置関係に関係なく分子間結合に対して一様な方向に力を印加することができると考えられる。抗体修飾ガラス基板の調製には第 1 章にて修飾技術を確立した架橋剤である EDAC を用いた。ガラス基板表面の機能化のためにアミノシランコートがなされた市販のスライドガラスを使用して抗体修飾基板の調製を行った。調製した抗体修飾基板を使用してビーズとの結合が形成されるか確認したところ、抗原の有無に依らず基板表面と付着したビーズが確認され、ビーズの付着量による量的な評価では抗原抗体反応の反応特異性を確認することができなかった。そこで、ビーズに浮力を印加してビーズの付着力を測定したところ、抗原を加えた場合とそうでない場合はビーズの付着力分布が異なっていた。抗原を加えた場合には第 1 章の測定結果や既存法による報告と近い値を取っており、抗原を加えていない場合には特異なピークが見られなかった。以上より、ビーズの付着力という質的な評価によって目視では判別できなかったビーズの結合様式を識別することに成功したと言える。

一方、既存法による統計的解析と比べると測定数は依然として少なく、ハイスループット測定と呼ぶにはさらなる測定の並列化が必要である。

第3章 測定の高スループット化に向けた検討

3.1 緒言

前章において遠心力による抗原抗体反応の結合力測定の複数同時測定に成功した。一方、その測定数は AFM による繰り返し測定の測定回数よりも少ないため、さらなる高スループット化が課題となる。そこで、さらなる高スループット化に向けた検討として反応チャンバーの複数配置を行うための基板ホルダーの開発や、Percoll 溶液による溶媒置換を行わない実験手法の確立、抗体修飾密度を高めたガラス基板調製、自動ビーズカウントプログラムの構築等の検討を行った。

3.2 溶媒置換動作を伴わない測定原理の改良

これまでの実験では、遠心力を印加する前に密度を調製した Percoll 溶液に溶媒を置換していた。この場合、マイクロピペットによる溶液の操作が伴うため、溶媒の流れによる力がビーズに作用してしまう可能性がある。また、Percoll を主成分としている密度調整溶媒は、生体中と環境が大きく異なっているため測定結果が実際の臨床応用に適用できない可能性がある。そこで、図 3-1 に示すような測定原理の改良を行った。

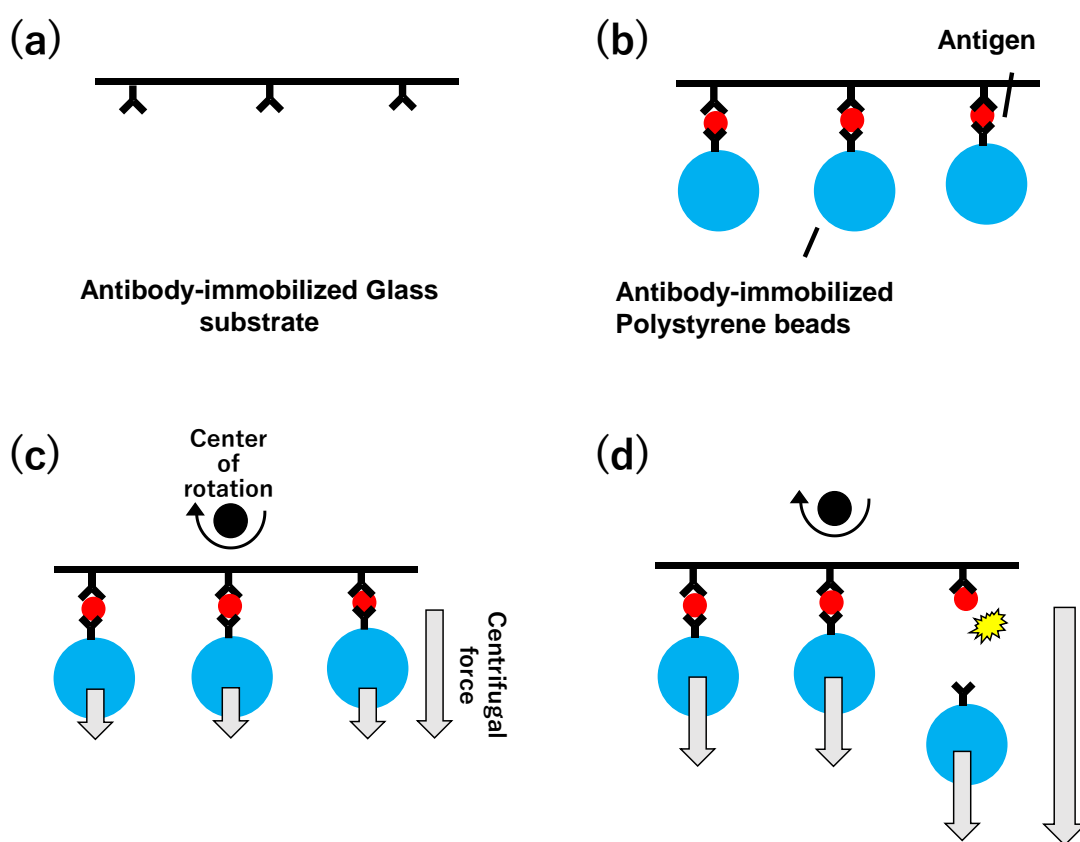


図 3-1 改良測定原理の概略図

図 3-1 の測定原理は第 2 章での測定原理に対して基板の向きを反転させたものになっている。これまでポリスチレンビーズに作用する浮力によって結合の破断を行っていたのに対して本手法ではポリスチレンビーズに直接遠心力を印加することで溶媒の密度に関する制約を取り除くことができる。したがって、今後の実験では DPBS 等バイオアッセイに一般的に使用される緩衝液を利用した結合力測定が可能になると考えられる。

3.3 高密度抗体修飾基板の調製

3.3.1 APTES 処理によるアミノ基修飾基板の調製

ハイスループットな分子間相互作用測定を行うには、ガラス基板に対して抗体分子を高密度に固定する必要がある。また、1.3 節で述べたように固体表面と抗体分子は強固に固定される必要があるため、1.3 節のマイクロビーズと同様に架橋剤を用いた共有結合によって抗体分子の固定を行う必要がある。しかし、ガラス基板の表面は官能基による機能化がなされていない。したがって、ガラス基板に対して 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES, 3-aminopropyltriethoxysilane, 98%, Strem Chemicals, Inc., #93-1042) の被膜を製膜することでガラス基板の機能化を試みた。

アミノ基修飾基板の作成には APTES を真空蒸着させる CVD (Chemical Vapor Deposition) 法を用いた⁹¹。以下の図 3-2 に手順の概要を示す。超純水は超純水製造装置 (Simplicity UV, Merck KGaA) より採水したものを使用した。

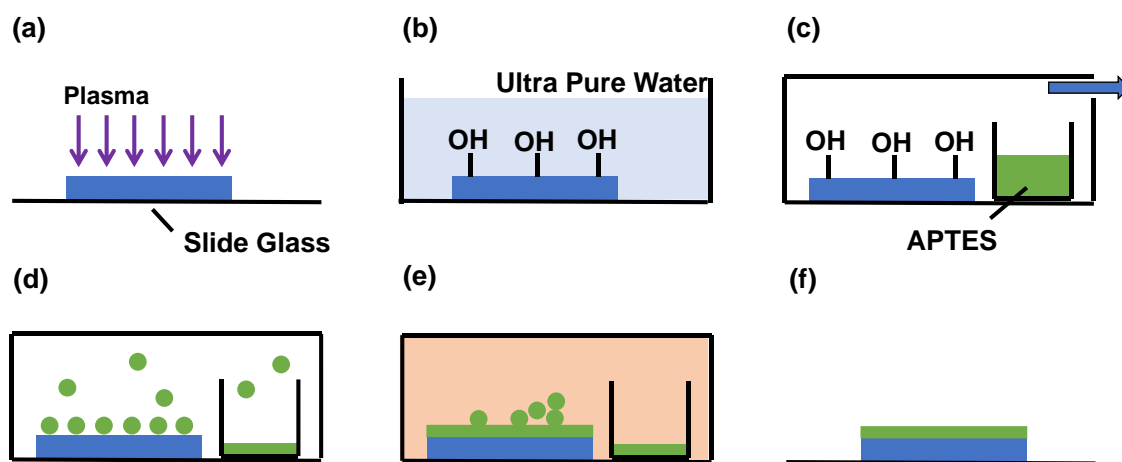


図 3-2 CVD 法によるガラス基板への APTES 修飾手順

初めに、洗浄したスライドガラス(松浪硝子工業株式会社, #S1111)を真空プラズマ装置 (YHS-R, 株式会社魁半導体)に加えて 60 Pa に減圧した後、5 分間プラズマ照射を行うことで有機物の除去及び表面の活性化を行った(図 3-2(a))。プラズマ照射した基板を超純水に浸漬することで表面の水酸基を露出させた(図 3-2(b))。窒素ブローで基板を乾燥させた後、APTES の入った容器とともに真空デシケータに加え、-0.9 MPa に減圧した状態で 2 時間保持した(図 3-2(c))。すると、揮発した APTES が基板表面に堆積する(図 3-2(d))。110°Cのオーブンで 30 分間保持することで堆積した APTES はガラス基板と脱水縮合反応

を生じて被膜を形成する(図 3-2(e)). 最後に無水エタノール(富士フイルム和光純薬, #050-08425), エタノール, 超純水の順に基板をすすぐことで過剰な APTES を除去した(図 3-2(f)).

調製したアミノ基修飾スライドガラスについて APTES 被膜が正常に成膜されているか確認するため, 基板表面の接触角測定及び X 線光電子分光法(XPS)^{92,93} による表面元素の解析を行った.

図 3-3 に超純水, 2 μ l の液滴を用いて静的接触角を測定した結果を示す.

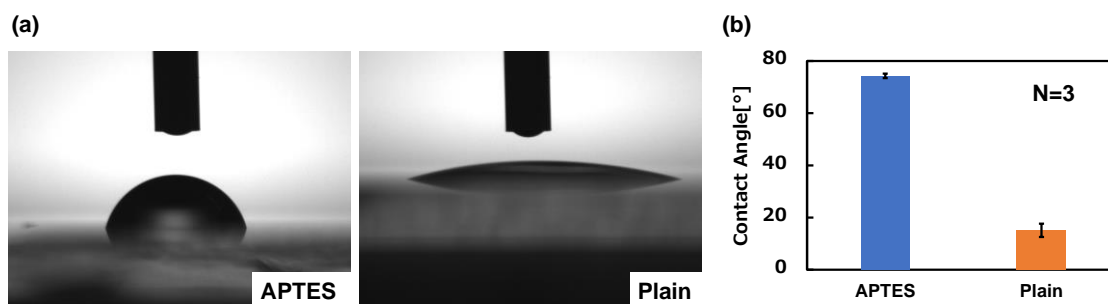


図 3-3 接触角測定結果(a)液滴の様子(b)接触角測定結果

図 3-3(a)を見ると, APTES 処理前後で大きく接触角が変化している様子が見られた. APTES 処理後の接触角は約 74.3°であり, APTES 処理前の接触角は約 15.1°であった. スライドガラスは表面の水酸基によって親水性を示すことから APTES 処理によってガラス基板表面の微細構造に変化が生じていることが期待できる.

次に, XPS 解析の結果を図 3-4 に示す. 本分析では MgK α を X 線源とし, X 線のエネルギーはその K α 線である 1253.6eV となる. また, 図 3-4 における X 軸は電子の結合エネルギーを表し, 以下のように計算を行った.

$$[\text{結合エネルギー(eV)}] = [\text{X 線のエネルギー(eV)}] - [\text{運動エネルギー(eV)}]$$

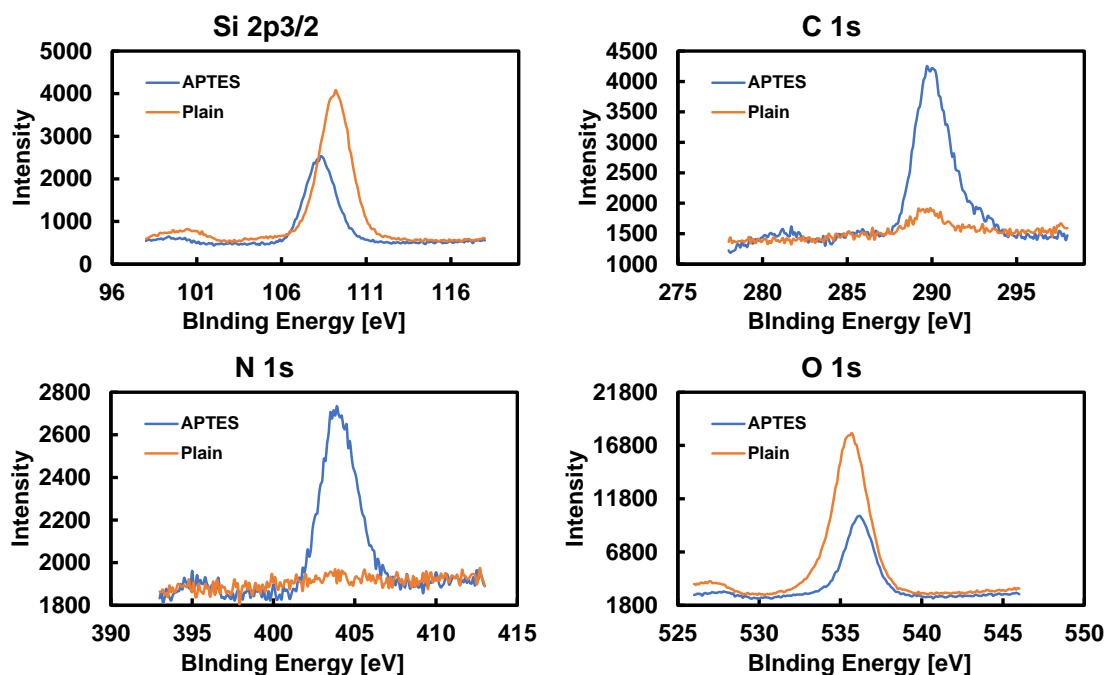


図 3-4 APTES 処理基板の XPS 解析結果

図 3-4 を見ると、APTES 処理の前後で Si と O の元素を示すシグナルが減少し、C のシグナル及び N のシグナルが増加していることがわかる。図 3-5 に示す APTES 処理の反応機序を見ると、正常なスライドガラスの表面は炭素や窒素を含んでおらず、APTES 処理によって APTES に起因する C 及び N のシグナルが増加していると考えられる。また、基板表面に APTES の被膜が形成されることで基材の Si や O を検出しなくなったために Si や O のシグナルが減少しているものと考えられる。

以上より、APTES 処理工程によってスライドガラスの表面に APTES の被膜が成膜し、アミノ基を導入することによる機能化技術を確立したと言える。

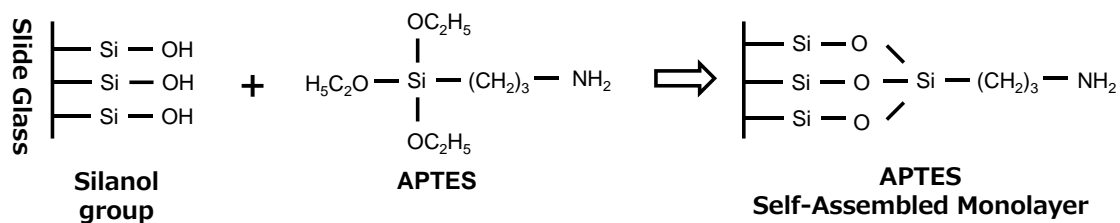


図 3-5 APTES 処理反応機序

3.3.2 GA を用いた抗体修飾基板の調製

これまでの抗体修飾基板の調製には EDAC を架橋剤として使用していた。EDAC はアミノ基とカルボキシル基を結合させアミド結合を形成することで強固に抗体分子を固定することができる。一方、抗体分子はカルボキシル基とアミノ基を両方有した構造であるため、EDAC によって抗体同士が重合してしまい基板との結合収率が低下してしまう可能性がある。そこで、アミノ基同士を架橋させる架橋剤であるグルタルアルデヒド (Glutaraldehyde, GA) を用いて基板表面のアミノ基を事前に活性化させることで基板と抗体分子の結合収率を向上させることが可能か検討を行った。

GA を用いた抗体分子固定化基板の作成手順を下の図 3-6 に示す。

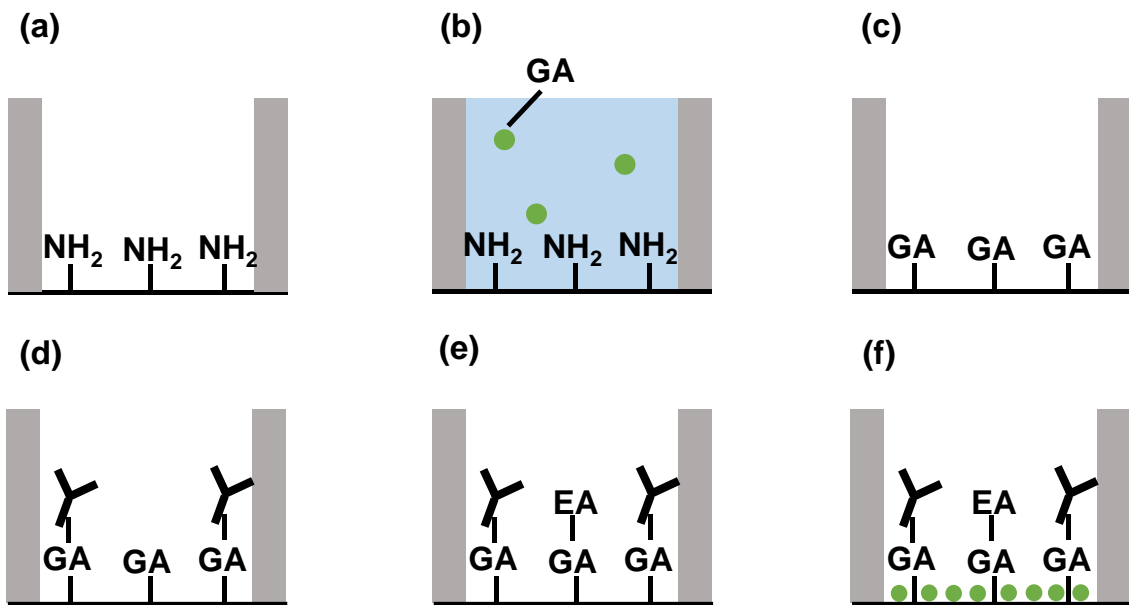


図 3-6 GA 抗体固定化基板の作成手順

APTES 処理スライドガラスに穴をパンチした PDMS シートを貼り付けることで反応チャンバーを作成した(図 3-6(a)). キットに付属する 8%GA in PBS をチャンバーに 10 μ l 加えて室温で 1 時間静置反応することで、基板上に存在するアミノ基を活性化した(図 3-6(b)). チャンバーに残る液体を取り除き、キットに付属する PBS を 20 μ l 加えた。この洗浄プロセスを 2 回繰り返し行うことで未反応の GA を除去した(図 3-6(c)). 次に、1 μ M に PBS で希釈した抗マウス IgG 抗体を 10 μ l 加え、1 時間室温静置反応することで基板上の活性化したアミノ基と抗体分子に存在するアミノ基を共有結合で結合した(図 3-6(d)). 反応後、上記の洗浄プロセスを 2 回繰り返して行い、未反応の抗体分子を除去した。洗浄後、キット付属の 0.2 M エタノールアミン in PBS を 20 μ l 加えて室温

で 30 分静置反応を行い、抗体と反応せずに残った基板上の架橋剤とエタノールアミン (EA)を反応させることで架橋剤の反応を停止した(図 3-6(e)). チャンバー内の液体を取り除き、キット付属の BSA solution を 20 μ l 加えて室温で 30 分静置反応を行うことで、基板表面のブロッキングを行った(図 3-6(f)).

3.3.3 抗体修飾ガラス基板の活性評価

基板表面に抗体分子が確かに固定されていることや、抗体分子が抗原への活性を維持していることを確認するため、ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)法による活性評価を行った。

ELISA 法は抗原抗体反応を利用して微量な生体分子を検出する手法として広く用いられる測定技術である⁹⁴⁻⁹⁶。ELISA 法の概要を下の図 3-7 に示す。

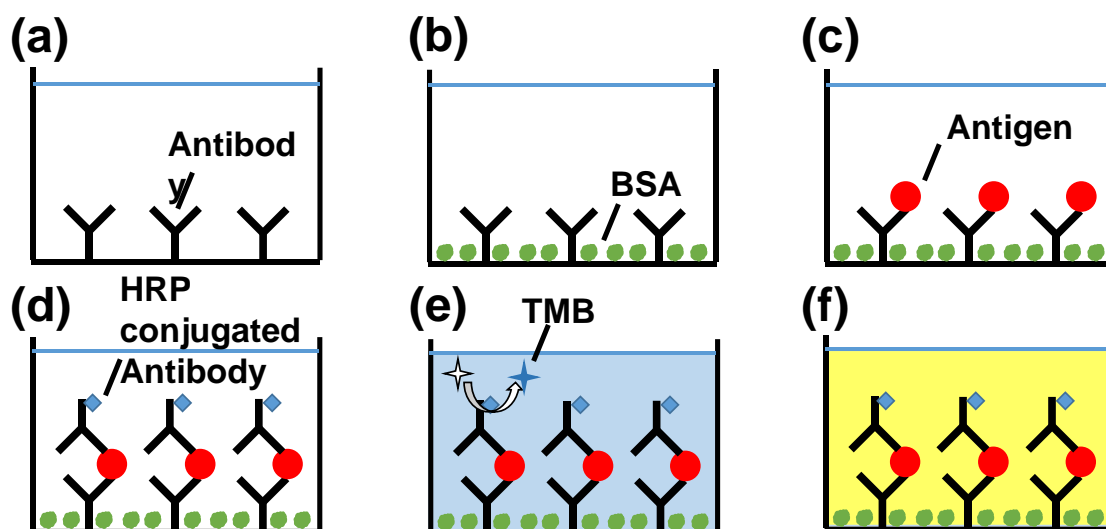


図 3-7 ELISA 法概要

検体となる 1 次抗体を固相化したマイクロプレート(図 3-7(a))に非抗原タンパク質であるウシ血清アルブミン(BSA, Bovine Serum Albumin)をあらかじめ吸着させて非特異的な分子の吸着を抑えるためのブロッキングを行う(図 3-7(b)). 1 次抗体と反応性を持つ抗原分子を加えて 1 次抗体と結合させる(図 3-7(c)). 発色気質との反応を行うため西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP, Horse Radish Peroxidase)を標識した抗体分子を加えて既に 1 次抗体と結合している抗原分子と反応させる(図 3-7(d)). 発色気質である 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine base (TMB)を加えると TMB が HRP によって反応し青色を呈する(図 3-7(e)). TMB の反応をとめるためりん酸を加えると青色から黄色に変化して 450 nm

の波長における吸光度を測定することで発色の強さから、生体分子の存在する量を評価することができる(図 3-7(f)).

上記手順による抗体固定化基板の免疫活性評価の結果を下の図 3-8, 3-9 に示す.

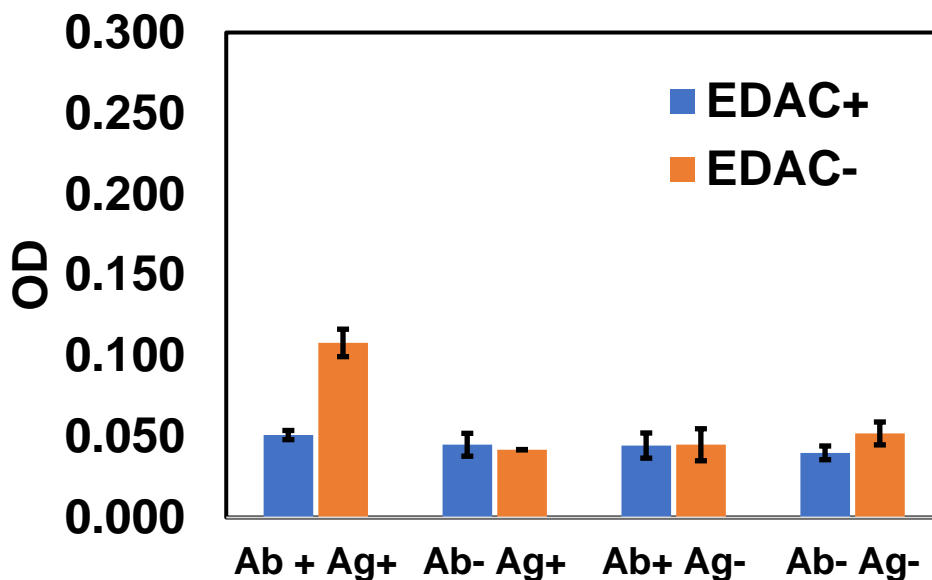


図 3-8 EDAC 抗体固定化基板活性評価

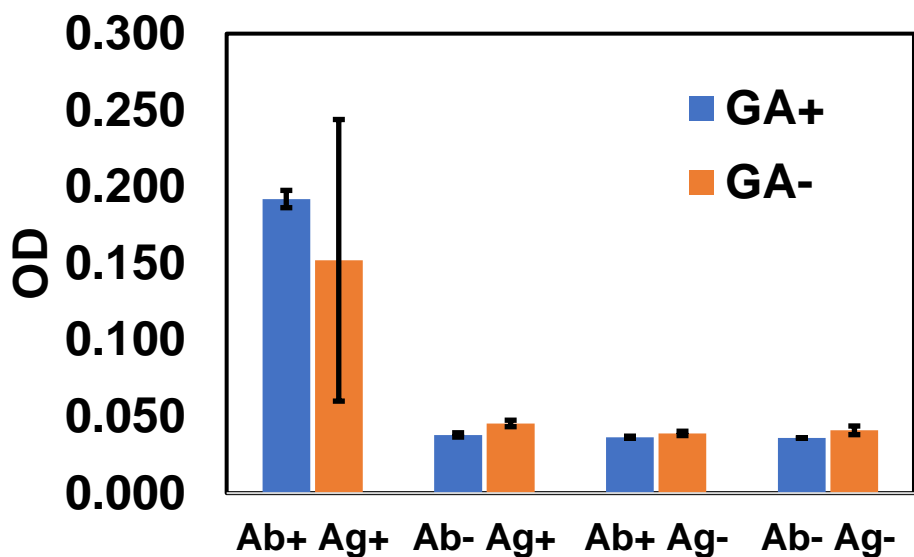


図 3-9 GA 抗体固定化基板活性評価

図 3-8, 3-9 のどちらも基板表面に固定化した抗体分子の有無(Ab+, Ab-)及び抗原分子の有無(Ag+, Ag-)の各条件で発色の強さを比較している. どちらの図においても Ab+

Ag⁺の条件において最も発色が強くなっている。これは、免疫反応によって酵素標識した 2 次抗体が捕捉されているためだと考えられる。その他の条件においても若干のシグナルが見られるが、これは 2 次抗体が基板表面に物理吸着している可能性や TMB 発色基質が元々わずかに変色していたことによるバックグラウンドノイズによるものだと考えられる。図 3-8 に示した EDAC 抗体固定化基板での吸光度は、EDAC を加えない場合における Ab⁺ Ag⁺で最も高い吸光度が得られた。これは、APTES 処理を行ったことでガラス表面のトポロジーが変化し、固定化抗体の物理吸着が増加したためだと考えられる。反対に EDAC を加えた場合では、バックグラウンドとほとんどシグナルの大きさに違いが見られなかった。これは、架橋剤を抗体分子の溶液に加えたことで抗体分子同士が重合してしまい、基板との反応性が失われてしまったためだと考えられる。以上より、EDAC を架橋剤とした抗体修飾基板では抗体分子が共有結合によって基板表面に固定されていることを確認できなかった。

図 3-9 での GA 抗体固定化基板の吸光度は、EDAC と同様に Ab⁺ Ag⁺の条件において最も大きいシグナルが得られた。GA 無しの場合においても発色が見られており、抗体分子の物理吸着が生じていると予想される。しかし、GA⁺のシグナルは GA⁻の物よりも有意に大きいため、基板に固定されている抗体分子は物理吸着による固定と共有結合による固定が混在していると考えられる。また、GA⁺ Ab⁺ Ag⁺におけるばらつきが小さく、安定した抗体固定化が行われていると考えられる。以上より、GA を使用することで抗体分子を基板表面に高密度に修飾することができた。

3.4 ハイスループット測定系の構築

3.4.1 基板ホルダーの開発

前項にて効率よくビーズ-基板間の結合が形成されるよう抗体の修飾密度を高めたガラス基板の開発に成功した。これまでの実験ではマイクロチューブに基板を加えスイングローターに取り付けることで遠心力を印加していた。この方法では、1度に測定することのできるチャンバーの数が少なく、測定のハイスループット化が困難である。以上より、複数チャンバーを並列に配置することが可能なガラス基板ホルダーの開発を行った。

基板ホルダーの概要を図 3-10 に示す。

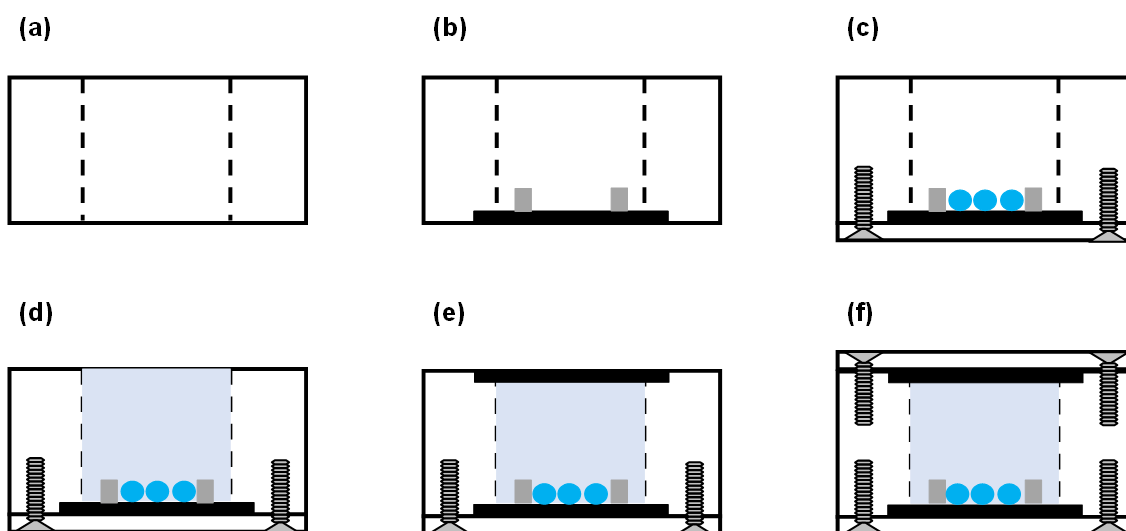


図 3-10 基板ホルダー概要図

貫通穴を持つ厚さ 25 mm のアクリル板(図 3-10(a))にガラス基板を下から取り付け、PDMS シートを貼り付けることで反応チャンバーを作成する(図 3-10(b)). アルミフレームでガラス基板を押さえ、ねじを締めることで固定し、ホルダー内で抗体分子の固定化や、ビーズの結合等の反応プロセスを行う(図 3-10(c)). 反応後、ホルダー内部に溶媒を注入し、反応チャンバーごとビーズを溶媒で満たす(図 3-10(d)). ホルダー上部にスライドガラスを取り付け(図 3-10(e)), 底部同様にアルミフレームで固定することで、溶媒を完全に密封する(図 3-10(f)).

このような基板ホルダーを図 3-11 に示す遠心実験系に取り付けることで複数チャンバーの同時測定が可能となった。

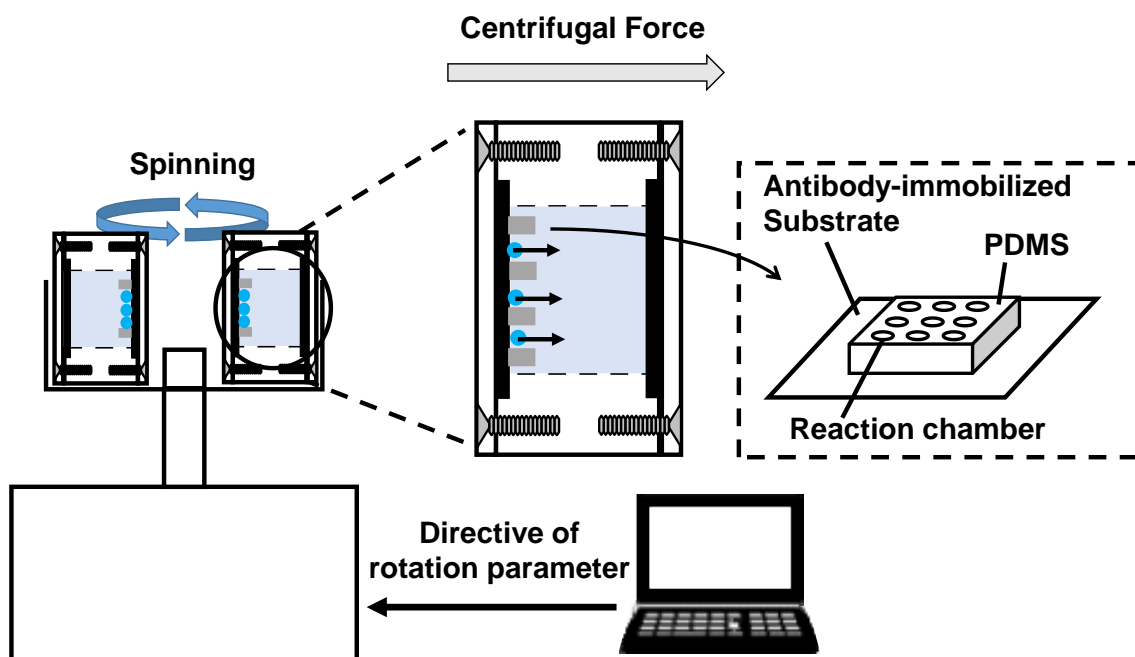


図 3-11 ハイスループット分子間相互作用測定実験系の概要

回転制御装置に取り付けたビーズに作用する遠心力が 10 pN になるよう回転速度を設定し 50 rpm/s の加速度で回転させ設定した回転速度に到達後 60 s の間定常回転させた。その後、50 rpm/s で停止するまで減速した。停止した後に、基板ホルダーを回転制御装置から取り出して倒立顕微鏡で観察し基板に付着するビーズの顕微鏡画像を撮影した。上記の操作を 10~200 pN まで 10 pN 毎に繰り返し行い、顕微鏡画像を取得した。1 度の実験によってひとつの反応チャンバーにつき 22 枚の顕微鏡画像を取得した。

3.4.2 ビーズの自動カウントプログラムの構築

第 2 章の実験では、基板表面に残存しているビーズの個数を目視によってカウントしていた。測定のハイスループット化に伴い基板表面に存在するビーズ個数が増加すると目視でのカウントは負担が大きくなることが予想される。したがって、画像解析技術を用いたビーズの自動カウントプログラムについて構築を行った。

画像解析にはオープンソースソフトウェアである ImageJ を使用した⁹⁷。また、ImageJ の操作を行うプログラムは Python を用いて記述し、ImageJ のプラグインパッケージである Fiji⁹⁸ を用いて ImageJ 上で Python で記述されたコードが動作するようにした。

図 3-12 に ImageJ による自動ビーズカウントのフローチャートを示す。

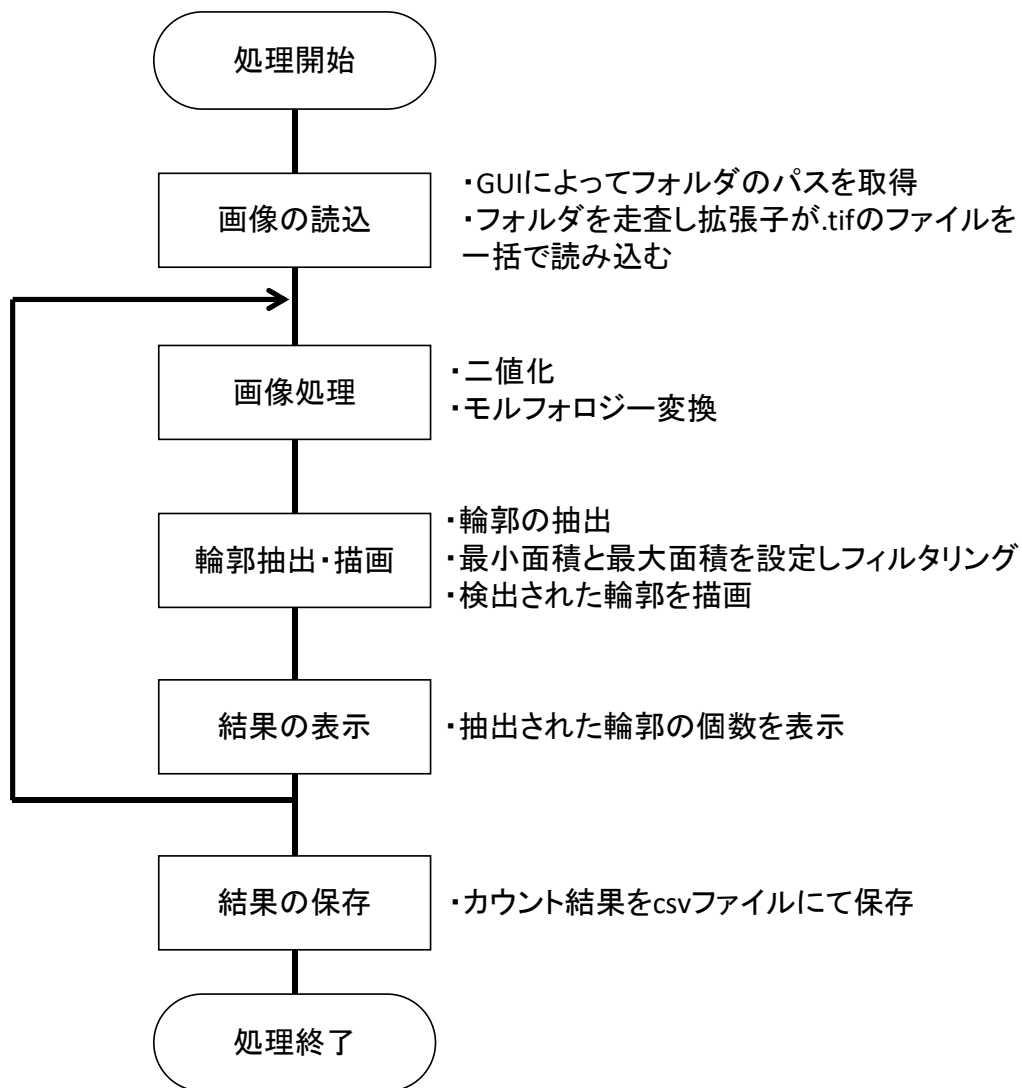


図 3-12 ビーズ自動カウントフローチャート

以上の処理を行うことでビーズの自動カウントを行った。

作成したビーズ自動カウントプログラムが正常に動作することを確認するため、直径 3 mm の反応チャンバーにマイクロビーズを封入し、画像解析によるビーズのカウントを行った。その結果を下の図 3-13 に示す。

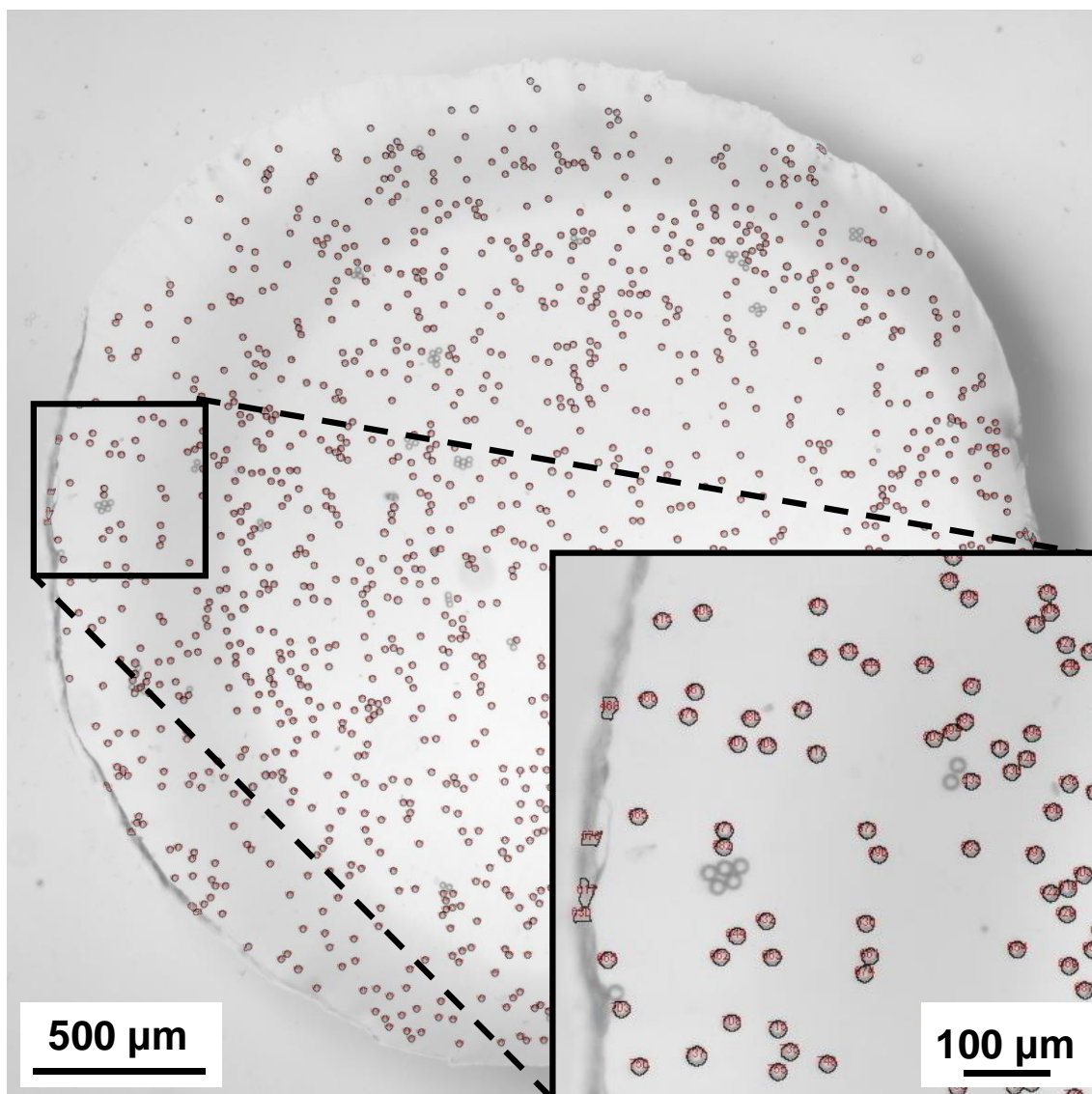


図 3-13 ビーズ自動カウント結果

図 3-13 ではカウントされた箇所を黒線で囲って表示している．図 3-13 を見るとほとんどのビーズは正常にカウントされ黒線で囲まれて表示されているが，複数個のビーズが密集している箇所ではうまくカウントされない場合がある．また，反応チャンバーのエッジ付近でビーズでない部分をビーズとして誤認識し，カウントしている部分が見られた．また，実際に 1 つの反応チャンバーで相互作用測定を行う際に取得する 22 枚の顕微鏡画像について，目視によるカウントと画像解析によるカウントのカウント結果を比較した結果を図 3-14(a)に示す．また，目視によるカウント結果を縦軸に，画像解析によるカウント結果を横軸にとり，カウント結果をプロットした結果を図 3-14(b)に示す．

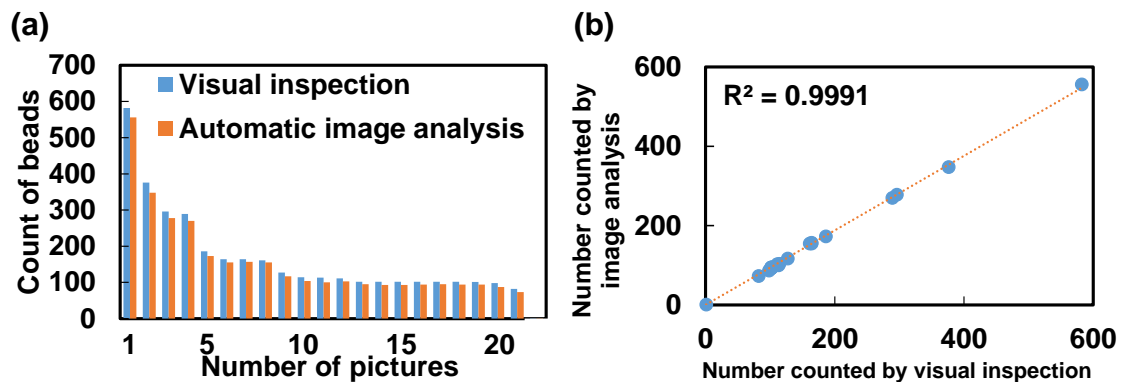


図 3-14 目視カウントと自動カウントの相関

図 3-14(a)では、画像解析によって得られるカウント結果は目視によるものと比べると若干少なくカウントされており、画像ごとの誤差を平均すると約 $7.1 \pm 4.4\%$ であった。図 3-14(b)をみるとビーズの個数は直線上に分布しており、目視によるカウント結果に追従する結果を画像解析によって得ることができたと考えられる。以上より、画像解析によって基板に付着するビーズの自動的に取得するシステムの構築に成功したと考えられる。以降の実験では、このシステムを利用して基板に付着したビーズの個数を計測する。以上の検討からハイスループット測定系の構築に成功したと言える。

3.5 分子間相互作用のハイスループット測定

3.3.2 で作成した GA 抗体固定化基板は，ELISA 法による反応活性評価で EDAC 抗体固定化基板よりも高い吸光度を示しており，EDAC 固定化基板よりもより多くの抗原分子や抗体修飾ビーズと反応すると考えられる．そこで，GA 抗体固定化基板について抗体修飾ビーズとの反応を行い，基板に付着するビーズの個数について EDAC 抗体固定化基板との比較を行った．以下に実験の手順を示す．

厚さ 0.5 mm の PDMS シートに直径 3 mm の穴をパンチし，市販の APS コートスライドガラスと共にエタノール，純水で 3 分間超音波洗浄を行い，基板ホルダーに取り付けたガラス基板に PDMS シートを貼り付けることで反応チャンバーを作成した．EDAC，GA 抗体固定化基板の作成はそれぞれ第 2 章，第 3 章に記載した方法で行った．ブロッキング後，チャンバー内の液体を取り除き，0.05% Tween20 含有 DPBS を 10 μ l 加える洗浄プロセスを 3 回繰り返して行い，基板に付着していない BSA を除去した．1% BSA 含有 DPBS でマウス IgG を 100 μ g/ml に希釈した抗原溶液を 10 μ l 加えて 1 時間室温静置で基板表面の抗体分子と反応させた．反応後，上記の洗浄プロセスを 3 回繰り返して洗浄し，未反応の抗原分子を除去した．1 \times DPBS を 5 μ l 加えたブロッキングを行ったビーズ溶液を 5 μ l 加えて，1 晩室温静置で反応することで基板とビーズを抗原抗体反応で結合させた．反応後，基板ホルダー内に 1 \times DPBS を注入し，上からスライドガラスを取り付けることでホルダー内に溶媒を封入した．ホルダーごと基板を反転させることでビーズに重力を作用させ，未結合のビーズを基板と分離した．

重力によってビーズの分離を行う前後で顕微鏡による観察および顕微鏡画像の撮影を行い，付着しているビーズの個数を 3.4.2 の自動カウントを用いてカウントすることで EDAC，GA 抗体固定化基板のビーズ結合収率を求めた．実験はそれぞれ 9 個の反応チャンバーで同時に行い，平均値をプロットした．

基板を反転させることでビーズには約 1.6 pN の重力が作用し，未結合のビーズは基板から分離する．すなわち，1.6 pN 以上の吸着で基板と吸着しているビーズを抗原抗体反応によって基板と結合したビーズであると仮定した．各架橋剤のビーズ-基板間の結合数と結合収率を示したグラフを下の図 3-15 に示す．

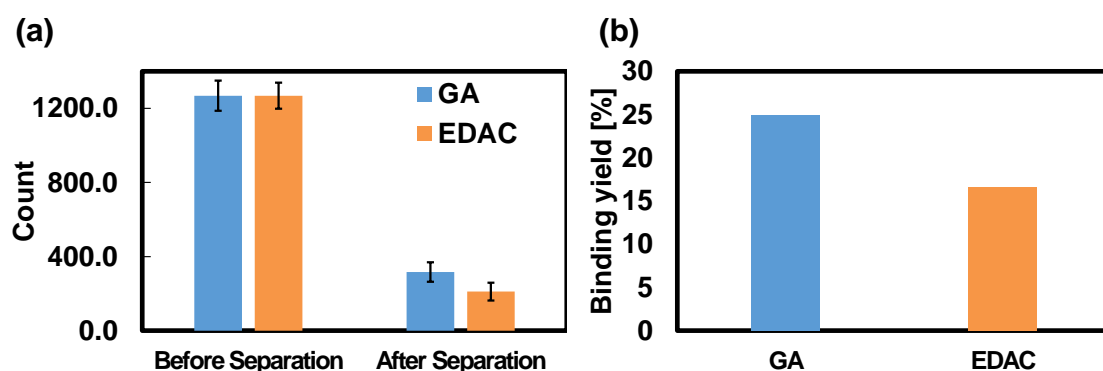


図 3-15 架橋剤によるビーズ結合収率の影響
(a)ビーズ結合数カウント結果(b)ビーズ結合収率

重力によるビーズの分離を行う前の GA 抗体固定化基板と EDAC 抗体固定化基板の反応チャンバーに加えられたビーズの個数はそれぞれ 1268.1, 1268.4 とほぼ同数のビーズが反応チャンバーに加えられていた。分離後、GA 抗体固定化基板と EDAC 抗体固定化基板に付着していたビーズの数はそれぞれ 316.6, 211.2 個であった。したがって、GA 抗体固定化基板と EDAC 抗体固定化基板のビーズ結合収率はそれぞれ 25.0%, 16.7%であった。

ビーズの結合収率は、GA 抗体固定化基板のほうが EDAC 抗体固定化基板と比べて高く、より多くのビーズが基板に付着していた。ELISA 法による吸光度が高く、抗原分子との反応活性が高い基板のほうがより多くのビーズを結合させることができると考えられる。

一方、EDAC 抗体固定化基板においても第 2 章で行った実験と比べても多くのビーズが基板に付着していた。これは、溶媒置換による対流が発生しなくなったためだと考えられる。また、反応時間を 1 晩に変更したことによってビーズ-基板間の結合がより多く形成された可能性も考えられる。しかし、反応時間を変更することで物理吸着によって付着するビーズも増加すると考えられるため、GA 抗体固定化基板において物理吸着の影響を調査する必要がある。

次に、GA 抗体修飾基板において物理吸着の影響を評価するため GA を介した架橋反応によって抗体分子を固定した抗体固定化基板に対してビーズとの免疫反応を行い、重力を作用させて未結合のビーズを分離した。抗原を加えた場合とそうでない場合の 2 つの反応条件において重力による分離後に基板と付着しているビーズの個数を比較することで物理吸着の影響を評価した。物理吸着の影響を評価した結果を下の図 3-16 に示す。

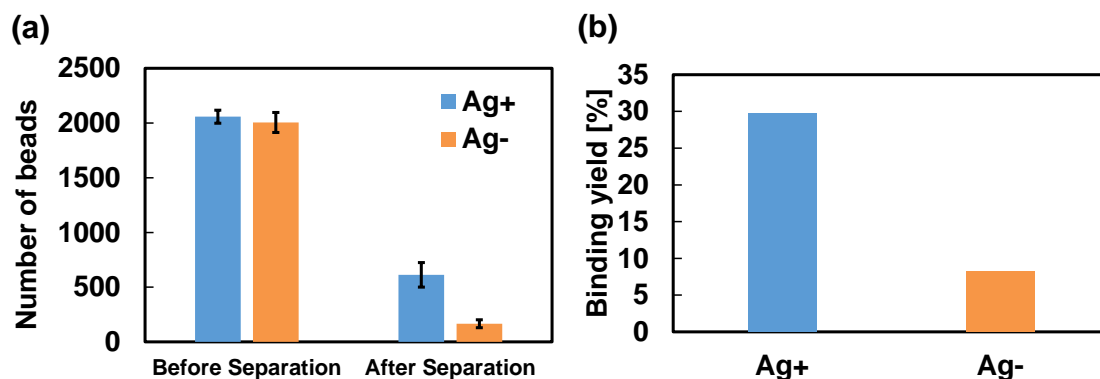


図 3-16 GA 抗体固定化基板の物理吸着評価

抗原を加えない場合では固体表面間の抗体分子同士が結合しないため、基板表面に付着したビーズは免疫反応の影響を受けず物理吸着などの非特異的な相互作用によって基板に付着していると予想される。重力をビーズに作用させる前に反応チャンバーに加えていたビーズは、それぞれ 2058.0 個、2004.5 個であった。重力によって約 1.6 pN の沈降力をビーズに作用させることで未結合のビーズを基板から分離した。分離後、基板表面に付着していたビーズは抗原を加えた場合では平均 612.8 個、抗原を加えない場合では平均 166.5 個であった。図 3-16(b)に示す結合収率はそれぞれ、29.8%、8.31%であった。

以上より、免疫反応を生じない反応系でも多くのビーズが基板に付着していた。また、実験ごとに基板に付着するビーズの個数は大きく変動しているため、抗体固定化基板におけるビーズの結合が抗原抗体反応による特異的な結合であるか、物理吸着などの非特異的な相互作用によるものであるかを判別することは難しい。分子間相互作用測定を導入し、吸着力分布を得ることで結合因子の識別が可能だと考えられる。

それぞれの基板について付着したビーズに対して遠心力を作用させることでビーズの付着力分布を作成した。作成したビーズ付着力分布を下の図 3-17、3-18 に示す。それぞれ 3 つのチャンバーについてビーズの付着力を調べ、全チャンバーで検出されたビーズの個数を用いて検出頻度を正規化した。

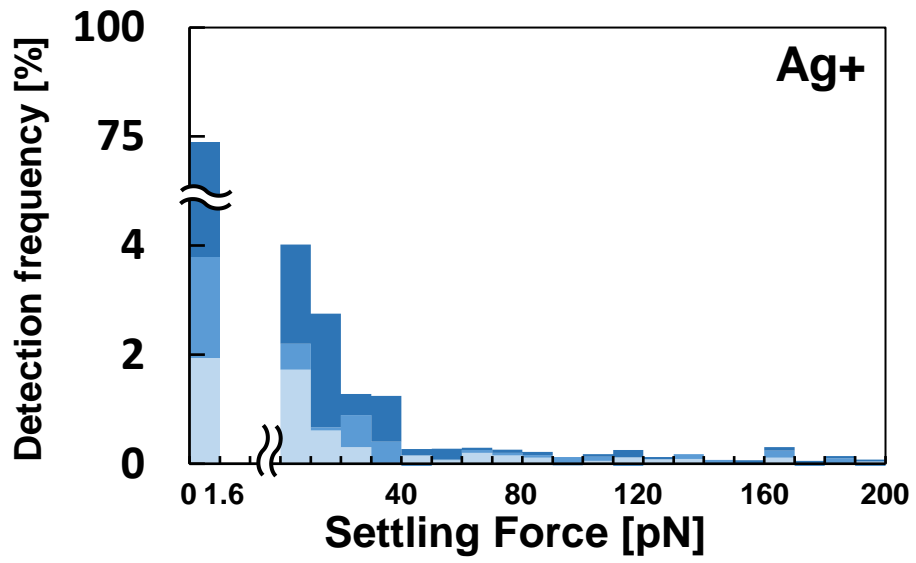


図 3-17 ビーズ付着力分布(Ag⁺)

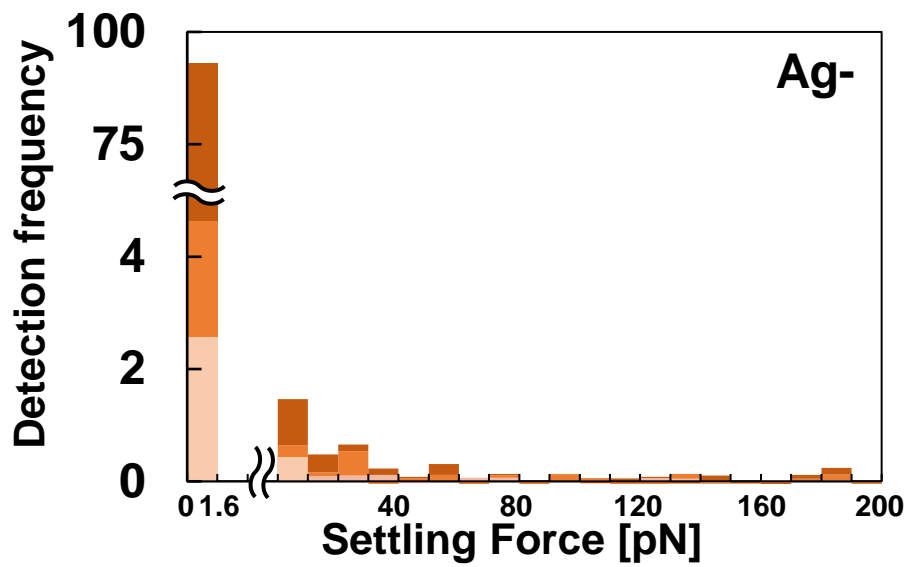


図 3-18 ビーズ付着力分布(Ag⁻)

抗原あり反応系では合計 2550 個のビーズについて、抗原なし反応系では 996 個のビーズについて相互作用の検出に成功した。複数配置されたビーズに対して同時に遠心力を印加することによって単一分子間相互作用のハイスループット解析を行い、スペクトル状の結合力分布を得ることができた。AFM による分子間結合の統計的解析における測定数が 100 程度であることから、ハイスループットな分子間相互作用測定が達成できたと言える。今回の実験で得られた 2 つの結合力分布は、基板表面とビーズの間に形成された結合様式が影響していると考えられる。また、抗原あり反応系は抗原なし反応系に比べてビーズの結合収率が高く、抗原抗体間相互作用が一定数存在すると考えられる。以上の理由から、ビーズの分離に要した遠心力は、生体分子間の相互作用を示していると期待される。しかし、今回の実験では、抗原あり反応系と抗原なし反応系のビーズ吸着力分布について分布形状から結合力の差を見出すことができなかった。この原因として、基板表面への抗原分子の物理吸着が考えられる。基板表面に抗原分子が非特異的に吸着している場合、基板表面とビーズに修飾された抗体分子が免疫反応によって結合することで基板表面に残留する。しかし、遠心力を印加すると抗原抗体間の結合部が破断する前に基板表面から抗原分子が脱離してしまうため、抗原なし反応系との差が見られなくなってしまったと考えられる。抗原分子の有無でビーズの結合量が異なる二つの反応系について力測定を導入することで、どちらの反応系にも物理吸着が影響しているという新たな知見を得ることができた。

また、ビーズが基板と非特異的な相互作用によって物理吸着を生じている可能性も考えられる。ビーズ-基板間に生じる非特異的な相互作用としてファンデルワールス相互作用や静電相互作用などが引力として作用している可能性があり、分子間相互作用解析時にもこれらの非特異的相互作用がバックグラウンドノイズになりうる。したがって、ビーズ-基板間の非特異的相互作用について影響を評価・制御することが必要である。

一方、200 pN の遠心力を印加しても基板表面に付着したまま残っているビーズが存在しており、これらのビーズは非常に強い力で基板表面に付着していると考えられる。基板に付着していたビーズの総数に対して強力で基板と結合していたビーズの割合は抗原あり反応系では 55.7%、抗原なし反応系では 37.9%であった。強固に基板と付着したビーズも抗原あり反応系のほうが抗原なし反応系よりも多いことから、抗原抗体反応が基板とビーズの強固な結合に寄与していると考えられる。基板とビーズが強固に結合する要因として、抗体分子の大きさに対してビーズの粒径が大きいため、基板との結合に複数の抗体が関与している可能性が挙げられる。

一方、抗原なし反応系においても強固に付着しているビーズが見られることから、基板とビーズが直接共有結合で結合指定してしまった可能性も挙げられる。抗体分子を固定した基板の場合は多重結合によってビーズと基板の結合が形成されている可能性があるが、免疫反応を生じないはずの基板でも同様の現象が見られることから、2 つの条件で共通した操作によって強固な付着が発生していると考えられる。2 つの基板に共通している

操作は、GA で基板表面のアミノ基を活性化させる工程であり、ビーズ表面にはアミノ基を持つ抗体分子が固定されていることから、エタノールアミンによる反応停止が十分でなく、GA によって活性化されたアミノ基とビーズ表面の抗体に存在するアミノ基によって共有結合が形成され、強力にビーズと基板が結合したなどの原因が考えられる。

3.6 結言

第 3 章では、これまでに実証した分子間相互作用の複数同時測定原理を基にさらなる測定のハイスループット化に向けた検討を行った。

これまでの浮力を基にした力の印加から遠心力による沈降力を利用した力印加に変更することで測定原理の改良を行った。これによって、溶媒を置換する際に生じる対流の影響によりビーズが基板から分離することなく測定を行うことができると考えられる。また、分散媒の制約もなくなり、バイオアッセイに一般的に使用される DPBS などの緩衝液中での分子間相互作用が測定可能になると考えられる。

次に、抗体修飾基板の調製方法についても再検討を行った。APTES 処理によるアミノ基修飾や架橋剤の変更によってこれまでの抗体修飾基板と比べてより高密度に抗体分子を固定することができた。

最後の検討としてビーズの自動カウントプログラムの構築を行った。オープンソースの画像解析ソフトウェアである ImageJ 及びプラグインパッケージの Fiji を利用したビーズ自動カウントプログラムによるカウント結果を目視によるカウント結果と比較した。その結果、自動カウント結果は目視によるカウント結果に追従しており精度よくビーズカウントを行うことができた。

これらの検討を基にビーズ—基板間に生じた結合の結合力分布を取得した。すると、免疫反応を生じうる系と生じない系で分布形状に違いが見られなかった。これは、抗原分子の物理吸着によって正常に抗原抗体反応の結合力が測定できていない可能性が挙げられる。

さらに、ビーズ—基板間の結合力測定では 200 pN の沈降力で基板から分離しないビーズが多数観察された。これらは非特異的な反応条件下でも観察されたため静電相互作用やファンデルワールス力等の分子間力によって生じているものであると考えられる。このような固体表面間の非特異的な相互作用は抗原抗体反応の結合力測定においてもバックグラウンドノイズとして作用していると考えられる。したがって、固体表面間に作用する非特異的な相互作用について評価を行う必要がある。

第4章 非特異的ナノ界面間力学現象の評価

4.1 緒言

前章の検討によって分子間相互作用のハイスループット測定プラットフォームの構築に成功した。一方、得られた結合力分布は抗原抗体反応の反応特異性を反映していなかった。これは、ビーズ-基板間における非特異的な相互作用がバックグラウンドノイズとして作用しているためであると考えられる。したがって、分子間相互作用のハイスループット測定技術を診断技術等に応用するためにはこのバックグラウンドノイズが及ぼす影響を評価する必要があると考えられる。

一方、マイクロビーズ表面に固定したリガンド分子を用いて基板と結合するマイクロビーズやビーズ凝集体を光学的技術や肉眼で観察することにより標的物質の検出及び定量評価を行う測定技術をビーズベースバイオアッセイと呼ぶ。一般的なバイオアッセイ技術では、分子間結合を検出する方法として放射性同位体⁹⁹⁻¹⁰¹や蛍光色素¹⁰²⁻¹⁰⁴、酵素³³⁻³⁷が利用される。一方、ビーズベースバイオアッセイでは、標的物質との反応を行った後の洗浄操作を簡略化でき、測定迅速化や装置の低コスト化が期待できる点が特色である。こうしたビーズベースバイオアッセイでも非特異的な相互作用が大きな問題となる。非特異的なビーズの付着や凝集はバックグラウンドノイズの増大を引き起こし、検出感度の低下等、測定信頼性の低下が予想される。このため、ビーズベースバイオアッセイ法の開発では、非特異的吸着を低減するために様々な試行錯誤が行われる。ビーズの非特異的吸着を抑えるための検討として、表面改質を行う方法と非特異的に吸着した粒子の除去の2つが挙げられる¹⁰⁵。例えば、ポリエチレングリコールの分子鎖を基板に導入することで非特異的なビーズの吸着を抑える効果があることは広く知られている¹⁰⁶。しかし、このような技術を導入する場合にも十分な効果を得るには修飾密度や分子鎖長を試行錯誤する必要がある¹⁰⁷。このような試みの効果を評価するために、実際のアッセイに近い実験系を構築し、特異的な結合が生じない反応条件の下で磁力¹⁰⁸や流体によるせん断力¹⁰⁹などを印加することで非特異的な吸着を破断して非特異的相互作用を推定する。また、既存手法の場合、評価を行うたびに電磁石や送液ポンプを用いた実験系を構築する必要があるため、操作が煩雑となりシステムティックな検討が困難である。

以上より、本章では本手法におけるバックグラウンドの影響をシステムティックに解析するため生体分子を介さないマイクロビーズとガラス基板表面の微小な界面間に作用する相互作用について評価を行った。また、コロイド粒子の凝集を予測する古典的な理論であるDLVO理論を基に考察を行い、ビーズの物理吸着メカニズムについて考察を行った。

4.2 基板表面官能基によるビーズ物理吸着への影響

固体表面が近接した際に生じる分子間力は静電相互作用やファンデルワールス力、疎水性相互作用等様々な要因が重畳して作用している。したがって、主要因となるものを特定し影響を評価する必要があると考えられる。そこで、免疫反応が生じ得ない反応系でビーズの物理吸着を評価することで物理吸着の要因を見つけることができるのではないかと考えた。初めの検討として基板表面の官能基が異なる条件で物理吸着がどのように変化するか調べた。

ガラス基板には 3.3.1 に記載した手順で作成した APTES 処理ガラス基板及び未処理のスライドガラスを使用した。未処理の基板は 3.3.1 に記載したものと同条件で真空プラズマを照射し、超純水に浸漬することで確実に基板表面の水酸基を露出させた。両基板をエタノール、超純水の順に 3 分ずつ超音波洗浄し窒素ブローで乾燥させた。乾燥した基板を基板ホルダーに取り付け、厚さ 0.5 mm の PDMS シートに直径 3 mm の穴をパンチして作成した PDMS チャンバーを自己吸着にて取り付けた。反応チャンバーに GA キット付属の 8%Glutaraldehyde 溶液を加えて 1 時間室温静置することで基板表面のアミノ基を活性化させた。溶液を取り除いた後、キット付属の PBS を加え、1 時間室温静置した。溶液を除去し、PBS を加えることで洗浄した。この洗浄工程を 3 回繰り返した。キット付属の EA(Ethanol Amine) in PBS を反応チャンバーに加え、30 分間室温静置することで未反応の活性アミノ基の反応停止を行った。溶液を除去し、キット付属の BSA solution を加えて 30 分間室温静置することで基板表面のブロッキングを行った。溶液を除去し、0.05%Tween20 含有 DPBS を加えることで洗浄した。上記の洗浄工程を 3 回繰り返して基板に付着していない BSA 分子を完全に除去した。1%BSA 含有 DPBS で 10 μ M に希釈した Ms IgG を加えて 1 時間室温静置で反応させた。0.05%Tween20 含有 DPBS を用いた洗浄工程を 3 回繰り返した後に 1%BSA 含有 DPBS で懸濁したポリスチレンビーズを加えて 1 晩室温静置で反応させた後、基板ホルダー内を 0.05%Tween20 含有 DPBS で密封し、基板ホルダーを反転させることでポリスチレンビーズに重力を作用させた。その後、200 pN の遠心力を印加することで強固に付着しているビーズの割合を調べた。

作成したビーズの付着率及び強固な結合の存在割合を下の図 4-1 に示す。

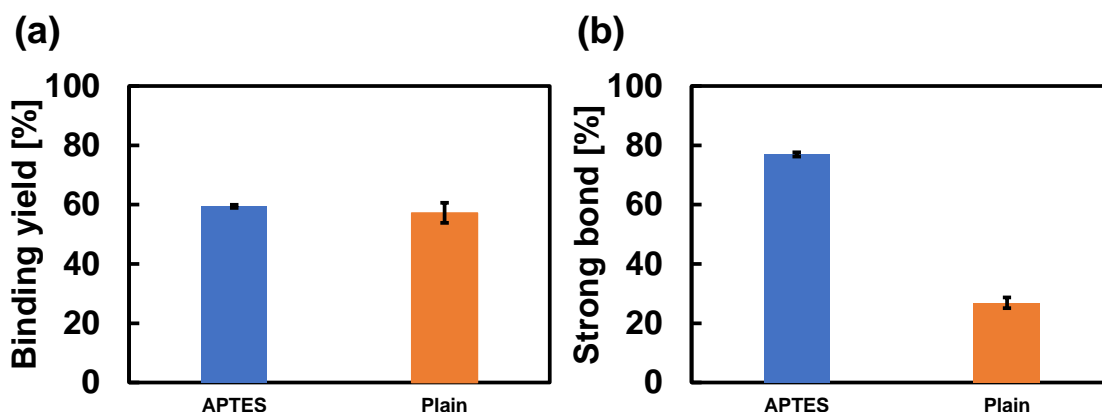


図 4-1 基板表面の官能基が及ぼすビーズ物理吸着への影響(N=2)

今回の実験ではマイクロビーズと基板表面のどちらにも抗体分子を固定していないため、図 4-1(a)でみられるビーズの付着はすべて物理吸着によるものと考えられる。図 4-1(a)では、どちらの基板でも 6 割程度のビーズが基板表面に吸着している。一方、図 4-2(b)を見ると APTES 基板においては強固に付着したビーズは基板に付着したビーズ全体の内 8 割近くと多くのビーズが基板と強固に付着していた。それに対して、無修飾の基板を使用した場合には強固に付着したビーズは付着ビーズ全体のうち 3 割程度と無修飾基板を使用の方がビーズの付着力が弱い傾向にあった。以上より、マイクロビーズとガラス基板の強固な付着には固体表面の官能基が影響していることが示唆された。

マイクロビーズや基板の表面は官能基によって機能化されている。水溶液中ではこの官能基がプロトン化や脱プロトン化することによって電荷を生じていると考えられる。特にガラス基板表面は APTES 処理によって高密度にアミノ基が修飾されており、アミノ基は DPBS 溶媒中でプロトン化し正電荷となることで基板表面は+の電位を帯びていると予想できる。一方、マイクロビーズ表面はカルボキシル基修飾されており、カルボキシル基は DPBS 中で脱プロトン化し負電荷となることで-の電位を帯びていると予想される。以上より、異符号に帯電した固体表面が接近することでビーズと基板が強固に付着していると考えられる。

一方、1.6 pN の重力印加によるビーズの分離操作でも基板から分離しなかったビーズはどちらの基板でも 60%程度であり、官能基以外の要因がビーズの非特異的な付着を引き起こしていると考えられる。今回の実験系は固体表面の抗体修飾自体は行っていないものの抗原分子や BSA 等の様々なタンパク質が界面間に介在している。これらタンパク質の非特異的な相互作用によってビーズの非特異的な付着が生じている可能性も同時に考えられる。したがって、今後の検討では反応系を簡素化しタンパク質が介在しない系において固体表面間の相互作用を評価する必要があると考えられる。

4.3 ビーズ分散溶媒による物理吸着量への影響

前節において基板表面の官能基をアミノ基から水酸基に変更することで、200 pN の遠心力を印加しても分離しない強固な付着が減少した。このことから、ビーズの物理吸着には基板表面の官能基が影響していることがわかった。一方、1.6 pN の重力印加でも分離しないビーズの付着率はどちらも 60%程度であり、免疫反応を生じない抗原分子や BSA 等のタンパク質が界面に介在することによって物理吸着が発生するのではないかと考えた。そこで、実験系にタンパク質が介在しない状態でビーズの物理吸着量を調べた。

無修飾のスライドガラスは適当な大きさにカットしてエタノール、超純水の順に 3 分ずつ超音波洗浄を行った後に窒素ブローで乾燥した。乾燥したガラス基板を基板ホルダーに取り付けた。厚さ 3 mm の PDMS シートに直径 2 mm の穴をパンチしてガラス基板に自己吸着によって貼り付けることで反応チャンバーを作成した。直径 3 μm のカルボキシル基修飾ポリスチレンビーズ(PS-COOH, Polybead Carboxylate Microspheres 3.0 μm , Polysciences, #09850)を DPBS 及び超純水に懸濁させてビーズ懸濁液を調製した。調製したビーズ懸濁液を反応チャンバーに加えてビーズが十分に沈降するまで室温静置を行った。

ビーズの沈降に要する時間はビーズの沈降速度より推定した。ストークスの式から粒子の沈降速度 v は、

$$v = \sqrt{\frac{4(\rho_b - \rho_m)gd}{3\rho_m C_d}} \dots\dots\dots(4.1)$$

と表せる。このとき ρ_b , ρ_m はそれぞれ粒子の密度と溶媒の密度を表す。また、 g は重力加速度、 d は粒子直径、 C_d は粒子の抵抗係数を表す。ここで、抵抗係数 C_d は粒子レイノルズ数 Re^* を用いて、

$$C_d = \frac{24}{Re^*} \dots\dots\dots(4.2)$$

と表せる。粒子レイノルズ数 Re^* は以下の式で表せる。

$$Re^* = \frac{vd}{\eta/\rho_m} \dots\dots\dots(4.3)$$

ここで η は分散媒の粘性[Pa \cdot s]を表す。

以上の式より，粒子の沈降速度 v は

$$v = \frac{(\rho_s - \rho_w)g}{18\eta} d^2 \dots\dots\dots(4.4)$$

と表せる．ここに各物性値を代入することで純水に分散しているビーズの沈降速度 $v \approx 0.29 \mu\text{m/s}$ と求められた．チャンバー高さが 3 mm であることから，全てのビーズが基板表面に到着するまでには 172 分程度要すると考えられる．したがって，加えたビーズが十分沈降するよう密封したホルダーは反応チャンバーに加えたビーズを十分沈降させるため 3 時間室温静置した．ビーズが十分に沈降して基板に接近した状態で基板ホルダーを反転し，1 晩室温静置することでビーズに重力を印加させることで付着していないビーズを基板から分離した．重力によるビーズ分離前後の基板表面に存在するビーズの付着率を下の図 4-2 に示す．

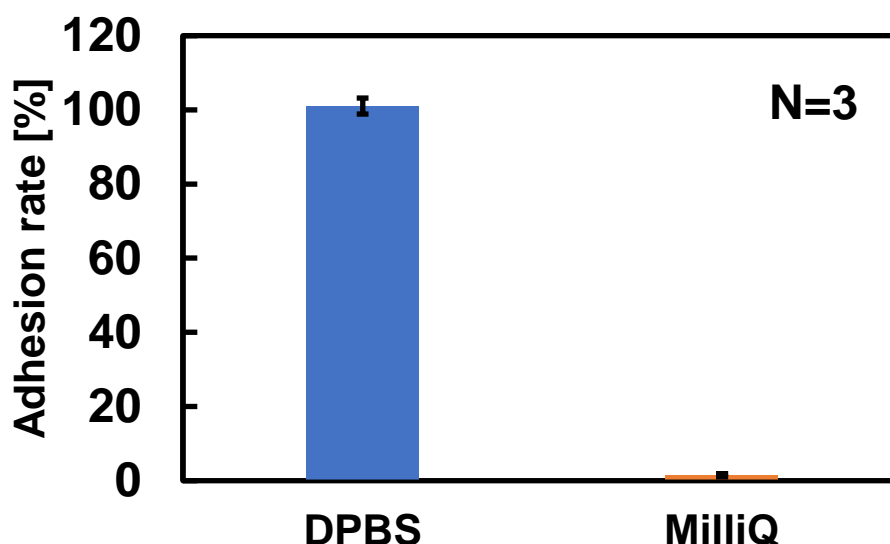


図 4-2 分散媒が及ぼすビーズ付着率への影響

図 4-2 より，ビーズの分散媒に DPBS を使用した場合の付着率はほぼ 100%であり，超純水(MilliQ)では基板にビーズがほとんど付着していなかった．タンパク質の介在していない DPBS でもビーズは基板表面に付着していることから，ビーズ付着の主要因はタンパク質間の非特異的な相互作用によるものではないと考えられる．一方，超純水をビーズ分散媒に使用した場合はほとんどビーズの付着が見られないことから，ビーズの物理吸着は DPBS の成分が主要因であると考えられる．

4.4 DLVO 理論を基にしたビーズ物理吸着メカニズムの考察

前節においてビーズの分散媒を DPBS から超純水に変更したところ、基板との物理吸着がほとんど見られなくなった。この現象についてコロイド粒子の分散・凝集を評価する古典的な理論である DLVO 理論(Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek theory)¹¹⁰ を基に考察を行った。

4.4.1 DLVO 理論の概要

DLVO 理論を基にしたビーズの物理吸着メカニズムを下の図 4-3 に示す。

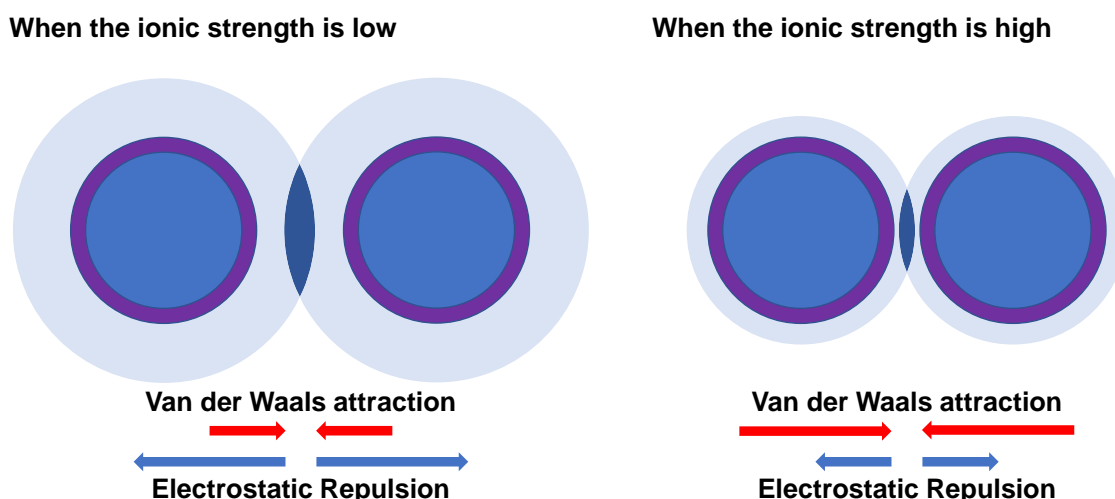


図 4-3 DLVO 理論の概要

粒子表面の官能基が水中で電荷となると、反対符号のイオンが分散媒中からクーロン力によって引き寄せられて固体表面に吸着する。その後も分散媒中の対イオンを引き寄せることで、完全に粒子表面に固定された対イオンによって形成される固定層と熱運動などによって拡散しながらもバルク溶媒より対イオン同度が高くなる拡散層による電気二重層が形成される。この電気二重層の厚さはバルク溶媒との相対的な対イオン濃度差によって決まるため、分散媒のイオン強度が大きいほど、電気二重層は薄くなる。2つの粒子同士が熱運動などによって接近するとこの電気二重層が重なり合うことで反発力が生じる。電気二重層厚さが大きい場合、斥力は長距離に影響し粒子は凝集を起こさない。しかし、電気二重層厚さが小さい場合、粒子同士はごく微小な距離まで接近する。すると、電気双極子によるわずかな電荷の偏りによって発生する普遍的な

引力であるファンデルワールス力が作用して、粒子は凝集を起こす。

以上より、DLVO 理論によると固体表面間の物理吸着現象は電気二重層による斥力とファンデルワールス力による引力の総和によって評価することが可能である。

4.4.2 イオン強度によるビーズ物理吸着率の変化

4.4.1 よりビーズが基板に物理吸着してしまう要因は電気二重層による斥力が十分に作用していないために生じるファンデルワールス力によるものであると考えられる。この仮説を立証するため、イオン強度を調製した分散媒を用いてビーズの付着率とイオン強度の関係を調べた。

ビーズの分散媒には HEPES(2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (Dojindo & Co., Ltd., Japan, #344-08231)) 溶媒を使用した。HEPES 溶媒は細胞培養等のバイオ用途に使用される緩衝剤であり、水酸化ナトリウムと塩化ナトリウムを添加することで溶液の pH 及びイオン強度をそれぞれ調節することが可能である。HEPES を超純水で 1 M に溶解した。次に、水酸化ナトリウム(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Japan #198-13765)を超純水で 1 M に溶解した。塩化ナトリウム(Nacalai tesque, INC., Japan #31320-05)は超純水に 1 M に溶解した。1 M HEPES 溶液に 1 M NaOH 溶液を加えることで pH を調整し、1 M NaCl 溶液を加えることでイオン強度の調整を行った。上記の混合溶液を Milli-Q 水で HEPES 濃度が 10, 25, 50 mM になるよう希釈することで、pH 6.90±0.05 の HEPES 溶媒を調整した。pH の調整に必要な水酸化ナトリウムの濃度は、Henderson-Hasselbalch の式¹¹¹に基づき HEPES の酸解離定数及び最終濃度から求めた。調製した HEPES 溶媒に PS-COOH を懸濁させてビーズ懸濁液を調製した。その他の観察方法は 4.3 と同様に行い、重力印加の前後でビーズの付着率を求めた。得られたビーズ付着率を下の図 4-4 に示す。

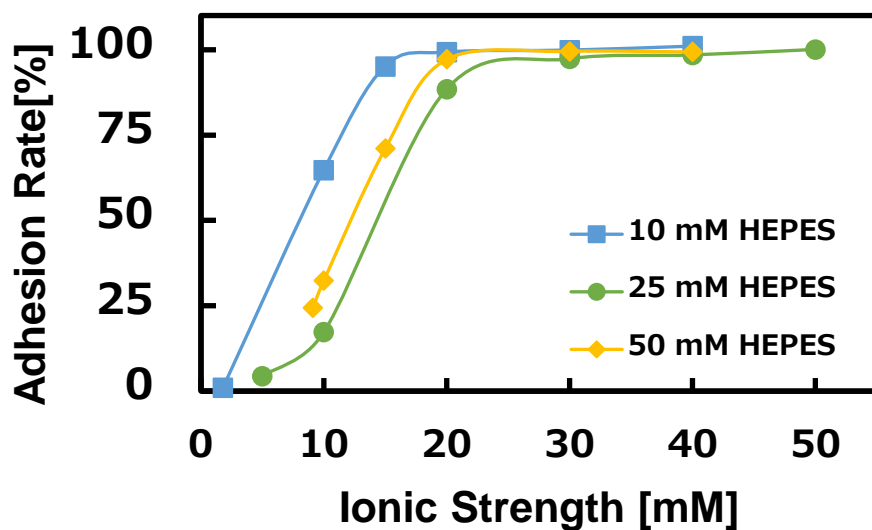


図 4-4 イオン強度とビーズ付着率

図 4-4 を見ると、イオン強度の増加に応じてビーズ付着率が大きくなっていることがわかる。これは、イオン強度の上昇によって粒子や基板表面の電気二重層厚さが小さくなり、ファンデルワールス力が優位になったためだと考えられる。以上より、仮説の実証に成功した。

また、HEPES は水溶液中で脱プロトン化する部位とプロトン化する部位を両方持ち合わせる両性イオンであり、HEPES イオンが溶媒中のイオン強度に影響を及ぼすかどうかについては議論の対象となっている¹¹²。今回の実験では同イオン強度条件におけるビーズ付着率において HEPES 濃度とビーズ付着率の間には相関が確認できなかった。したがって、今回の実験では HEPES イオンが実験系のイオン強度に及ぼす影響は限定的であると言える。

以上より、ビーズ-基板間に生じる物理吸着はファンデルワールス力により生じており、DLVO 理論に基づいて非特異的相互作用によるバックグラウンドノイズの影響を評価することができると思われる。

4.4.3 ゼータ電位の測定

DLVO 理論に基づいた固体表面間の相互作用によるポテンシャルエネルギーを試算するためには固体の表面電位について知る必要がある。しかし、表面電位はイオン吸着によって直接測定を行うことが困難であるため、一般的に固定層と拡散層の間にあるすべり面における電位であるゼータ電位を測定している。そこで、DLVO ポテンシヤ

ルエネルギーの試算に使用するために、マイクロビーズ及びガラス基板のゼータ電位測定を行った。

マイクロビーズには PS-COOH 及びアミノ基修飾ポリスチレンビーズ(PS-NH₂, Polybead Amino Microspheres 3.00 μ m, Polysciences, #17145) を使用した。ガラス基板には洗浄したスライドガラスを使用した。ゼータ電位の測定には ELSZ-2000 (大塚電子株式会社) 及びゼータサイザーナノ ZSP(Malvern Panalytical Ltd)を使用した。ビーズ及び基板の等電点計測のためのタイトレーション測定を行った。また、実験環境下でのビーズ及び基板表面の表面電位を推定するための絶対値測定を行った。絶対値測定では、ビーズの分散媒としてイオン強度 10 mM, pH 6.9 \pm 0.5 になるよう調整した HEPES バッファを使用した。タイトレーション測定では、ビーズの分散媒として 10 mM NaCl 水溶液を使用した。それぞれのバッファでビーズ原液を 1 万倍に希釈することでビーズを懸濁し、測定装置に加えた。タイトレーション測定では、ここから 0.1 M 塩酸と 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液を pH 測定しながら滴下していくことでゼータ電位の変化を観察した。

図 4-5(a)に示す絶対値測定によるゼータ電位測定結果は、ガラス基板が-39.45 \pm 1.63 mV, PS-COOH が-74.98 \pm 0.42 mV, PS-NH₂ が-24.1 \pm 1.73 mV であった。図 4-5(b)にゼータ電位のタイトレーション測定結果を示す。図 4-5(b)より、ガラス基板表面及びカルボキシル基修飾ビーズ表面の等電点はそれぞれ、4.04, 4.18 である。すなわち、今回の実験条件である pH 6.9 付近ではビーズと基板のどちらも表面の官能基が脱プロトン化し負に帯電しているため、静電相互作用は斥力方向に作用すると考えられる。

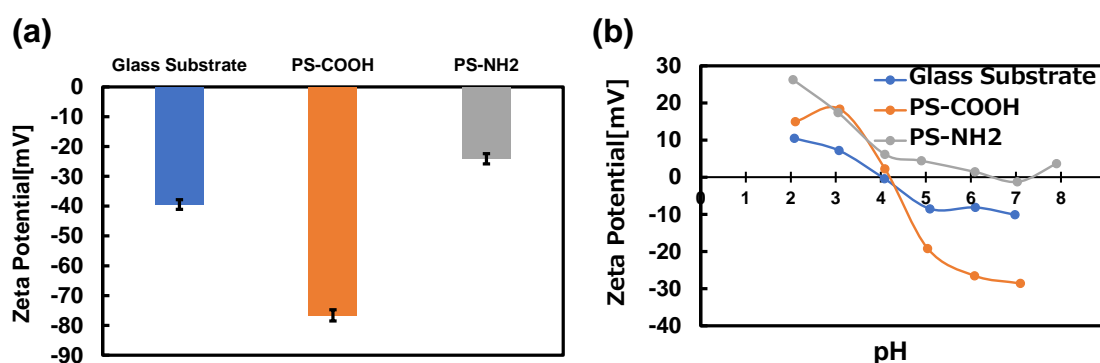


図 4-5 ゼータ電位測定結果

pH 7 付近におけるタイトレーション測定結果ではガラス基板のゼータ電位が約-10 mV, ビーズのゼータ電位が約-30 mV であり、絶対値測定の結果と大きく異なっていることがわかる。これは、タイトレーション測定では分散媒のイオン強度が不安定であるためだと考えられる。タイトレーション測定では、分散媒に HCl 溶液と NaOH 溶液を

滴下することで pH を調製しながらゼータ電位測定を行っている。したがって、分散媒のイオン強度は不安定であり、初期条件のイオン強度である 10 mM から増加していることが予想される。したがって、イオン強度の増加によって電気二重層厚さが小さくなりゼータ電位の値も変動してしまったと考えられる。DLVO ポテンシャルエネルギーの試算では、より実験環境に近い絶対値測定の結果を表面電位の近似値として使用する。

4.4.4 DLVO ポテンシャルエネルギーの試算

4.4.2 の実験によってイオン強度とビーズ付着率には相関があることがわかった。この相関が DLVO 理論に基づくものであるか確認するため、DLVO 理論に基づいたビーズ-基板表面間のポテンシャルエネルギーについて試算し、実験結果について考察を行う。

DLVO 理論では、双極子によるファンデルワールス力によるポテンシャルエネルギー V_a と表面の帯電によって分散媒中の対イオンが吸着することによって形成される静電ポテンシャルエネルギー V_r との和によって固体表面間相互作用を推定することができる。

粒子-基板間のファンデルワールスポテンシャル V_a は、

$$V_a = \frac{-Aa}{6D} \dots\dots\dots(4.5)$$

と求められる。ここで、 a は粒子半径、 D は粒子-基板間の距離を表す。また、 A は物質ごとに異なる一定値を持つハマカー定数であり系全体のハマカー定数は粒子の材質、基板の材質、分散溶媒のハマカー定数をそれぞれ A_1 , A_2 , A_3 として次のように表せる。

$$A = (\sqrt{A_1} - \sqrt{A_3})(\sqrt{A_2} - \sqrt{A_3}) \dots\dots\dots(4.6)$$

電気二重層によるポテンシャルエネルギーは、以下の式を使用して求めた。

$$V_r = \pi\epsilon_0\epsilon a(\psi_1^2 + \psi_2^2) \left\{ \frac{2\psi_1\psi_2}{\psi_1^2 + \psi_2^2} \ln \frac{1+e^{-\kappa D}}{1-e^{-\kappa D}} + \ln(1 - e^{-2\kappa D}) \right\} \dots\dots\dots(4.7)$$

ここで、 ϵ_0 は真空の誘電率、 ϵ は分散溶媒の比誘電率、 e は電気素量、 ψ_1 , ψ_2 はそれぞれ粒子と基板の表面電位を表す。また、 $1/\kappa$ は電気二重層の厚さを表すデバイ長であり、

次の式で求められる。

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon k T}{2 \rho_{\infty} e^2}} \dots\dots\dots (4.8)$$

ここで k はボルツマン定数, T は絶対温度, ρ_{∞} はバルク溶媒中に存在する対イオンの数密度を表している。ここで, 数密度 ρ_{∞} の代わりにイオン濃度 C [mol/L] を用いると, 以下の式となる。

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon k T}{2000 N_A C e^2}} \dots\dots\dots (4.9)$$

ここで, N_A はアボガドロ数を示す。イオン強度は以下の式で求められる。

$$I = \sum_{i=1} \left(\frac{1}{2} C_i Z_i^2 \right) \dots\dots\dots (4.10)$$

ここで, Z はイオン種の価数である。今回の実験では, 使用したイオン種の価数はすべて1であるので, イオン強度は以下のように求められる。

$$I = \sum_{i=1} \left(\frac{1}{2} C_i Z_i^2 \right) = \frac{1}{2} (2C_{NaOH} + 2C_{NaCl}) = C_{NaOH} + C_{NaCl} \dots\dots\dots (4.11)$$

以上より, 今回の実験では溶媒に加えた塩の総濃度がそのままイオン強度となり, デバイ長の計算に使用している。

以上より, DLVO 理論に基づく固体粒子—固体基板間に作用する総ポテンシャルエネルギー $-V_t$ は

$$\begin{aligned} V_t &= V_a + V_r \\ &= \frac{-Aa}{6D} + \pi \epsilon_0 \epsilon a (\psi_1^2 + \psi_2^2) \left\{ \frac{2\psi_1 \psi_2}{\psi_1^2 + \psi_2^2} \ln \frac{1+e^{-\kappa D}}{1-e^{-\kappa D}} + \ln(1 - e^{-2\kappa D}) \right\} \dots\dots\dots (4.12) \end{aligned}$$

と表すことができる。また、粒子—基板間に作用する力 F は V_t を粒子—基板間距離 D について微分することで

$$F = \frac{dV_t}{dD} = \frac{dV_a}{dD} + \frac{dV_r}{dD}$$

$$= \frac{AR}{6D^2} + \pi\epsilon_r\epsilon_0a(\varphi_1^2 + \varphi_2^2) \left(\frac{2\varphi_1\varphi_2}{\varphi_1^2 + \varphi_2^2} \cdot \frac{-2\kappa e^{-\kappa D}}{1 - e^{-2\kappa D}} + \frac{2\kappa e^{-2\kappa D}}{1 - e^{-2\kappa D}} \right)$$

(4.13)

と表すことができる。

以上の式を用いてビーズ—基板間の DLVO ポテンシャルエネルギーの試算を行った結果を下の図 4-6 に示す。

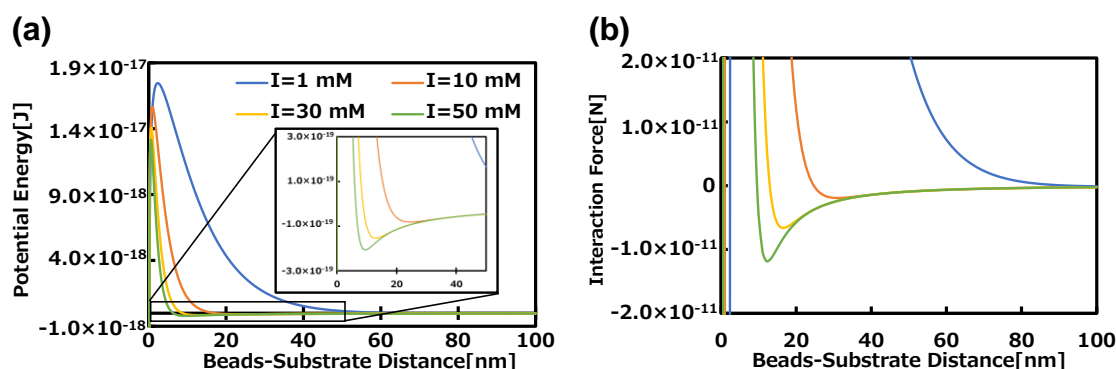


図 4-6 DLVO 理論によるビーズ付着挙動の試算(a)ポテンシャルエネルギー曲線(b)相互作用による力曲線

イオン強度 $I=1$ mM と低い場合、ビーズ—基板間にはより遠くにまで及ぶ斥力が作用することが図 4-6(b)から分かる。DLVO 理論によると、分散媒のイオン強度が高い場合、粒子表面は電氣的に中和されてファンデルワールス引力が優位になる。一方、分散媒のイオン強度が低いと表面電位を中和する対イオンが減少するため表面電位の影響が遠くに達することになる。表面と粒子との相互作用においてファンデルワールス力よりも表面電位の影響が遠くにまで及ぶ場合、遠方から粒子が表面に近づく場合を考えると電氣的な斥力がファンデルワールス力による引力よりも先に優位になる。図 4-6(a)から分かるように、イオン強度が高くなるとポテンシャル曲線の極大より手前にあ

る極小値によってビーズ-基板間に引力が作用するようになる。したがって、今回の実験においてもイオン強度が大きくなるにつれてファンデルワールス力が優位に働くようになり、付着率が増加したものと考えられる。以上のように DLVO 理論に基づき、ビーズの非特異的な吸着現象はファンデルワールス引力の影響によるものと考えられる。

4.5 結言

本章では、第 3 章で見られたビーズの非特異的な付着現象について実験及び理論的考察によって検討を行った。

免疫反応が生じない反応系でビーズを基板に接近させ、物理吸着による付着率と 200 pN の遠心力を印加しても分離しない強力な付着の存在割合を調べた。その結果、APTES 処理を行ってアミノ基を修飾した基板とそうでない基板では物理吸着量は変化しないものの、強固な付着の割合は変化しており、基板表面の官能基の違いが物理吸着に何らかの影響を及ぼしていることがわかった。

次に、タンパク質の介在しない DPBS と超純水の 2 条件でビーズの付着率を調べたところ、DPBS を使用した場合にはほぼ全てのビーズが基板に付着しており、超純水を使用した場合にはほぼ全てのビーズが基板から分離していた。このことから、ビーズの非特異的な付着には溶媒中に含まれる成分が強く影響していることがわかった。

上記の結果より、コロイド粒子間相互作用の古典的な理論である DLVO 理論に着目し、溶媒中のイオン強度とビーズ付着率の関係を評価した。その結果、溶媒のイオン強度が大きくなるほどビーズの付着率は増加していた。このことから、ビーズの非特異的な付着は高いイオン強度を持つ分散溶媒を使用することによって発生することが確認された。

この結果を DLVO 理論に基づいて考察するため、粒子のゼータ電位測定及び DLVO ポテンシャルエネルギーの試算を行った。その結果、実験結果と整合性があることを確認した。したがって、ビーズの非特異的な付着はファンデルワールス力が主要因となって生じることが確認できた。

以上より、ビーズの非特異的な付着メカニズムについて考察することができた。一方、今回の実験系はタンパク質が介在しない単純なものであり、分子間相互作用の測定を行う際には実際の実験手順に応じた界面設計戦略を構築する必要がある。したがって、分子間相互作用の実証を目的とした反応系に対して DLVO 理論を適用し、分子間相互作用の測定が可能となる界面設計戦略について検討を行う。

第 5 章 分子間相互作用測定のための界面設計戦略の構築

5.1 緒言

前章では、ビーズが基板表面に非特異的に付着してしまう現象について、DLVO 理論に基づいた考察を行い、ファンデルワールス力がビーズ付着の主要因であることを確認した。一方、分子間相互作用の測定実験の際には実験条件に応じた界面設計戦略が必要となる。そこで、DLVO 理論による考察を基に分子間相互作用の測定を指向した界面設計戦略の構築を行う。

これまでの固体表面間相互作用の検討では粒子に作用する重力ポテンシャルの影響を考慮していなかった。粒子径が大きくなると体積はその 3 乗に比例して増加するため重力ポテンシャルの影響が無視できない可能性がある。そこで、同一の溶媒を使用して粒子径と付着率の関係を調べた。

また、生体分子間の相互作用測定においては、分子間の結合が形成されるまでの時間について数時間オーダーで反応を行う必要がある。こうした場合において、電気二重層によって生じる斥力ポテンシャルが安定しているかどうか評価する必要があると考えられる。しかし、これまでのビーズ付着率測定では、ビーズが付着していることを確認するために基板からビーズを分離する必要があり、時間経過による付着率の変化を評価することは難しい。そこで、ビーズのブラウン運動に着目した分離動作を伴わないビーズ付着率の測定手法について開発を行った。

開発した新規粒子付着率測定手法について測定の信頼性を評価するため、従来の重力印加による方法との比較を行った。また、開発した新規粒子付着率測定手法を用いてビーズ付着率の時間変化を評価した。

5.2 ビーズ粒子径の影響評価

前章の検討によって、粒子の非特異的な付着現象は固体表面間に作用するファンデルワールス力によるものだと判明し、DLVO 理論に基づくポテンシャルエネルギーの試算によって現象の予測が可能であることを示した。一方、前章の検討では粒子に作用する重力の影響について考慮していない。ビーズに作用する重力は粒子径の 3 乗に比例して大きくなるため、電気二重層斥力によるポテンシャル障壁を乗り越えてしまう可能性がある。この場合、ファンデルワールス力による 1 次極小にビーズが捕らわれることによって非常に強固に粒子が付着してしまい分子間相互作用の測定は困難であることが予想される。そこで、粒子径を変更した際の付着率の変化を測定し、DLVO 理論に基づくポテンシャルエネルギーの試算結果を基にビーズ粒子径の影響について評価を行った。

実験に使用するポリスチレンビーズは直径 3, 10, 20 μm のカルボキシル基修飾ビーズを使用した。分散媒は 10 mM に溶解した HEPES バッファーを基に pH を 6.90 ± 0.05 になるよう調整した。ガラス基板をエタノール、超純水の順に 3 分ずつ超音波洗浄し窒素ブローで乾燥する。乾燥した基板を基板ホルダーに取り付け、厚さ 3 mm の PDMS シートに直径 2 mm の穴をパンチしてガラス基板に自己吸着によって貼り付けることで反応チャンバーを作成した。粒子径の異なる 3 つのビーズをそれぞれ HEPES バッファーに懸濁させることでビーズ懸濁液を調製した。反応チャンバーに HEPES バッファーを 5 μl 加えたのちにビーズ懸濁液を 5 μl 加えた。基板ホルダー内を HEPES バッファーで満たし上からスライドガラスで密封した。3 時間室温静置してビーズを十分に沈降させた後、倒立顕微鏡で底面にあるビーズの顕微鏡画像を撮影した。その後、基板ホルダーを反転することでビーズに重力を作用させた。3 時間室温静置することで完全ビーズを基板から分離した後、基板ホルダーを元に戻して底面に付着しているビーズの顕微鏡画像を撮影した。

測定したビーズ付着率を下の図 5-1 に示す。

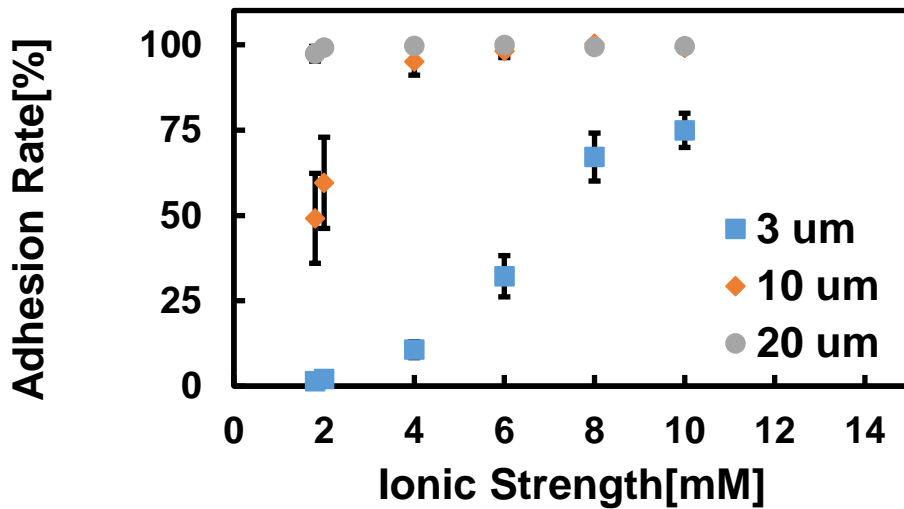


図 5-1 粒子径によるビーズ付着率の影響

図 5-1 を見ると直径 3 μm のビーズはイオン強度が 10 mM の分散溶媒でも付着率が 75% 程度であるのに対して、直径 10 μm のビーズではイオン強度 4 mM 以上で付着率がほぼ 100%、直径 20 μm のビーズでは全ての分散溶媒で付着率がほぼ 100% を示していた。以上より、粒子径が大きくなるにつれてビーズは基板と非特異的に付着しやすくなることがわかる。これには、前述のようにビーズに作用する重力によって斥力ポテンシャルによる障壁を乗り越えてしまう可能性と曲率半径による界面の変化が挙げられる。ポテンシャル障壁の乗り越えであった場合、ビーズが基板に限りなく接近し非常に強固に基板と付着することが予想される。一方、界面の変化による付着の場合はビーズの付着はポテンシャルの極大の手前にある極小部分によって発生しているため、遠心力による分離が可能だと考えられる。以上より、粒子径によるビーズ付着率の影響がどちらの要因によるものか判別する必要がある。

イオン強度 $I=10$ mM におけるビーズの直径を変化させた場合の DLVO ポテンシャルについて試算した結果を下の図 5-2 に示す。

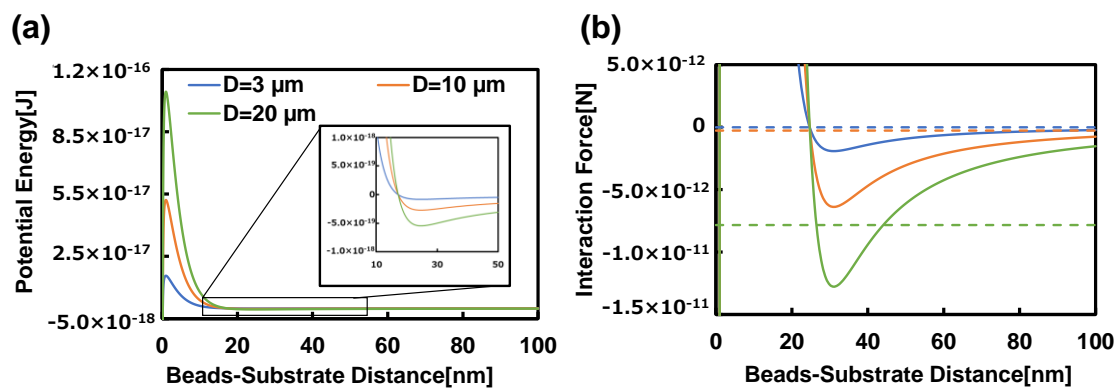


図 5-2 粒子径と DLVO ポテンシャル(a)ポテンシャルエネルギー曲線(b)相互作用力曲線

図 5-2(a)より、同じイオン強度条件下において粒子径が大きくなるとポテンシャルの極大値は大きくなるのがわかる。また、2次極小の値は粒子径が大きくなるにつれて小さくなっている。これは、粒子サイズが大きくなったことによってビーズ-基板間ナノ界面における曲率が大きくなり表面間に作用する相互作用の影響が大きくなったためであると考えられる。また、どの粒子径においてもビーズが付着していると考えられる2次極小よりもポテンシャル障壁の極大値の方が100倍以上大きいことがわかる。図 5-2(b)の実線は2次極小によってビーズに作用する引力を示す。一方、図 5-2(b)の点線はビーズに作用する重力を示している。図 5-2(b)によると、どの粒子径においても2次極小による引力よりも重力の方が小さく、重力印加による分離が困難であることを示している。ポテンシャル障壁による極大は2次極小よりもはるかに大きいことから、今回の実験における粒子径の範囲においてはビーズがポテンシャル障壁を乗り越えることは起こりにくいと言える。以上より、粒子径が大きくなることでビーズの付着率が増加する要因は曲率半径の増大によるものであると言える。

5.3 ビーズ付着率の時間変化観察

分子間相互作用測定を行うには生体分子間の結合が形成されるまでの間数時間オーダーの反応を行う必要がある。したがって、ポテンシャル障壁によるビーズの保持が時間に対して安定であるかを調べる必要がある。しかし、これまでのビーズ付着率測定ではビーズに重力を印加して基板から分離することでビーズの付着/非付着を識別していた。そのため、これまでの重力印加法ではビーズの付着率が時間に対してどのように変化するか評価できない。以上より、ビーズを基板から分離する動作を伴わないビーズの付着/非付着状態を識別する手法について開発を行う必要がある。

5.3.1 ブラウン運動解析法の概要

5.3 節より、ビーズの分離動作なしにビーズの付着状態を識別可能な解析手法を開発する必要がある。そこで、ブラウン運動による粒子の位置揺らぎを利用したブラウン運動解析法を考案した。下の図 5-3 にブラウン運動解析法の概要を示す。

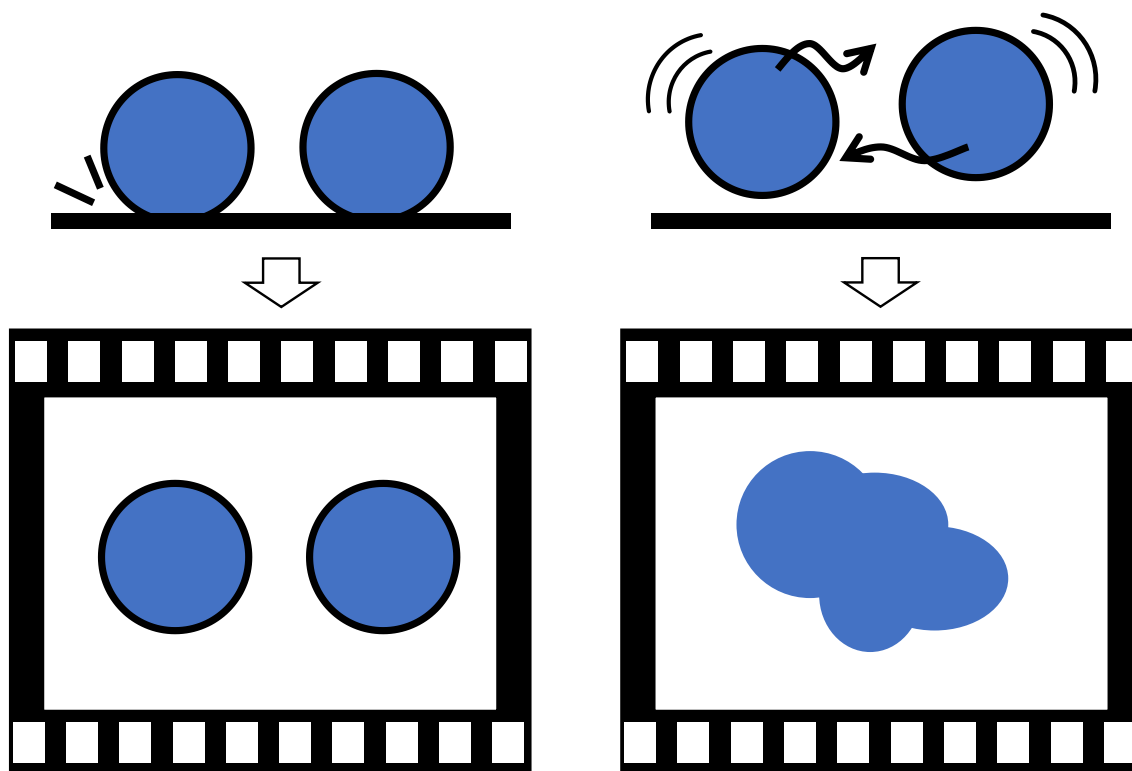


図 5-3 ブラウン運動解析法の概要

分散媒分子の熱運動によってビーズは絶えず分散媒分子が衝突し、わずかに運動し

ている。このブラウン運動による位置揺らぎを検出することで粒子の付着状態が識別できるのではないかと考えた。ビーズが基板と付着していない場合、ビーズは基板表面においてブラウン運動による位置揺らぎが見られる。一方、ビーズが基板と付着している場合、ビーズは基板との相互作用によって拘束されているため位置揺らぎが小さくなると考えられる。したがって、一定時間でタイムラプス動画を撮影し、フレーム画像について平均化処理を行うと基板と付着したビーズは位置揺らぎによるブレが見られず明瞭な像が得られるのに対して基板と付着していないビーズは位置揺らぎによってビーズの像がぼやけて検出が難しくなると考えられる。これによって、基板表面に存在するビーズの付着状態が識別できると考えられる。

5.3.2 ブラウン運動解析法の実証

5.3.1 に示したブラウン運動解析法によるビーズの付着状態の識別が可能であることを実証するため、下記の手順で実験を行った。

ポリスチレンビーズは直径 $3\ \mu\text{m}$ のカルボキシル基修飾ビーズを使用した。分散媒は $10\ \text{mM}$ に溶解した HEPES バッファーを基に pH を 6.90 ± 0.05 になるよう調整した。分散溶媒のイオン強度は、 $6\ \text{mM}$ に調整した。ガラス基板をエタノール、超純水の順に3分ずつ超音波洗浄し窒素ブローで乾燥する。乾燥した基板を基板ホルダーに取り付け、厚さ $3\ \text{mm}$ の PDMS シートに直径 $2\ \text{mm}$ の穴をパンチしてガラス基板に自己吸着によって貼り付けることで反応チャンバーを作成した。反応チャンバーに HEPES バッファーを $5\ \mu\text{l}$ 加えたのちにビーズ懸濁液を $5\ \mu\text{l}$ 加えた。基板ホルダー内を HEPES バッファーで満たし上からスライドガラスで密封した。3時間室温静置してビーズを十分に沈降させた後、 $\times 10$ の対物レンズと倒立顕微鏡で底面にあるビーズについて $20\ \text{fps}$ で5秒間のタイムラプス動画を撮影した。ImageJ を使用して撮影された動画毎に全フレームを平均化した画像を生成した。撮影した動画の同一画素の最大の輝度を全フレームから抽出し、各画素の最大輝度値で解析用画像を生成した。

生成された平均化画像を図 5-4 に示す。図 5-4 では視認性の為に実験環境とは異なる $\times 40$ 対物レンズにて撮影を行っている。新しく生成された画像を見ると、図 5-4 に示すように基板と付着していないビーズはブラウン運動により粒子が運動しているため粒子の輪郭線が不明瞭になる。一方、基板に付着したビーズは基板との相互作用によってブラウン運動が拘束されているため、明瞭なビーズ像が得られる。図 5-5 には、同一チャンバーに存在するビーズについて画像合成前後に検出された粒子のサイズに関するヒストグラムを示す。4つの反応チャンバーについて画像解析を行い、結果を積算した。図 5-5 を見ると、平均化を行う前に検出された粒子サイズは画像を合成することによって検出された粒子のサイズが変化している。画像の平均化を行う前に検出された粒子サイズは平均 $31.8\ \text{pixel}$ 、標準偏差 $4.9\ \text{pixel}$ であった。それに対して、画像平均化後に検

出された粒子サイズは平均 19.1 pixel, 標準偏差 6.0 pixel と粒子サイズが平均化処理によって 60%程度に小さくなっていることがわかる. 以上より, 適切なしきい値を与えることで, ビーズの付着/非付着状態を識別することができる.

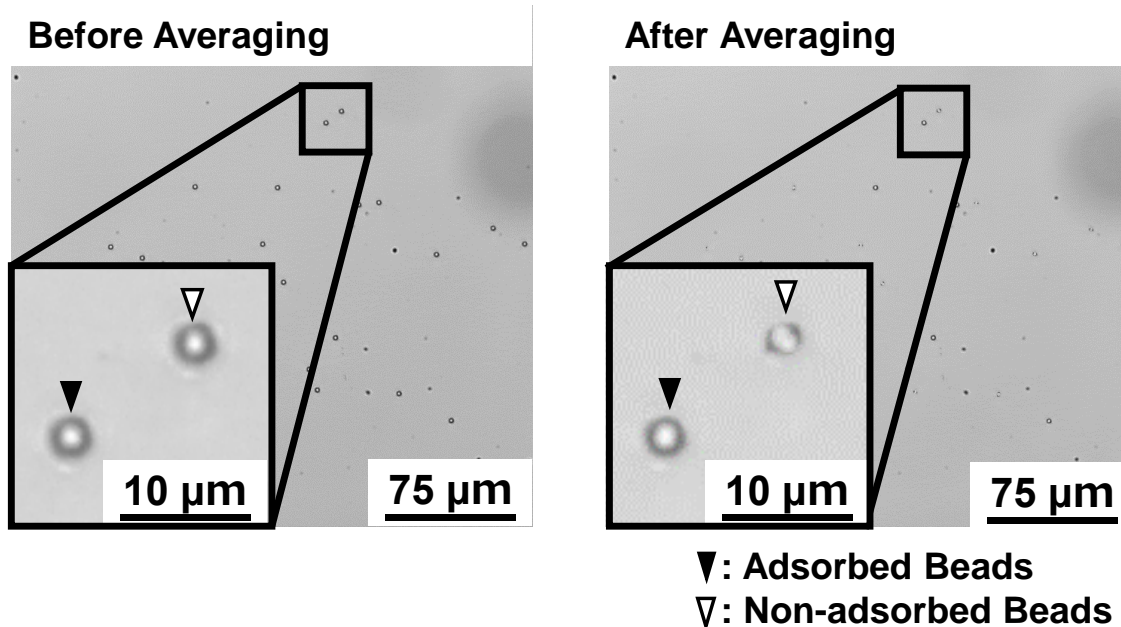


図 5-4 生成された平均化画像

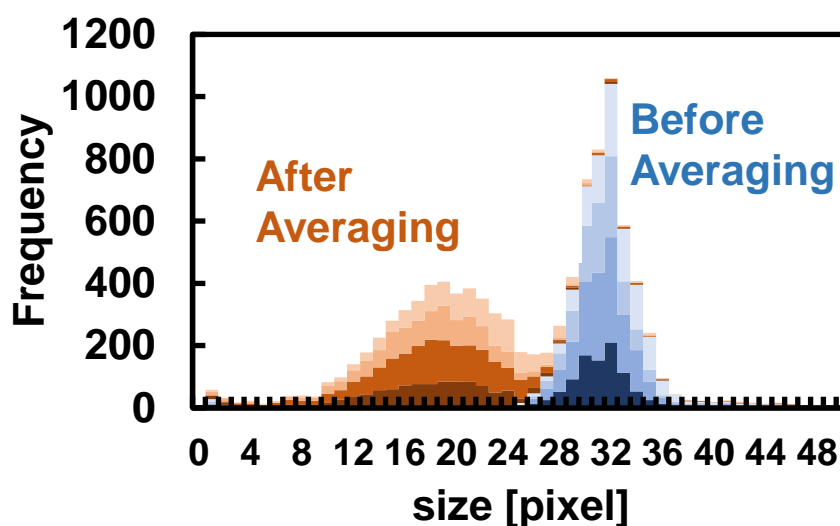


図 5-5 ビーズ検出サイズのヒストグラム

次に, ブラウン運動解析による付着率測定と重力印加による付着率測定の相関を調

べるため、直径 3 μm の PS-COOH についてイオン強度を 1.8 mM~40 mM に変化させた溶媒を使用した場合の付着率の変化をブラウン運動解析法と重力印加法の両方で調べた。同様の実験を 3 回行い、実験間の誤差についても調べた。その結果を図 5-6 に示す。重力印加法による付着率測定では 4.4.2 と同様の結果が得られ、ビーズに作用する重力を用いた分離動作によってビーズの付着率を評価することができた。図 5-6 では、重力印加法とブラウン運動解析法のどちらも同様の傾向を持っており、ブラウン運動解析法でも重力印加法と同様イオン強度とビーズ付着率の相関関係が見られた。以上より、分離動作を伴わないブラウン運動解析法によっても重力印加法と同様にビーズの付着/非付着状態を識別することが可能であると言える。一方、高イオン強度条件においては、ブラウン運動解析法によって求めた場合よりも重力印加法の場合の方がより高い付着力を示していた。これは、基板と非特異的吸着を生じた粒子の内若干数の粒子が基板上でわずかにブラウン運動していることを示している。したがって、ビーズの非特異的吸着の中にもブラウン運動が拘束されるほど強固な吸着とわずかにブラウン運動を生じる微弱な吸着が混在していることを示す。これらの吸着挙動の違いが生じる原因については今後の調査が必要であると考えられる。

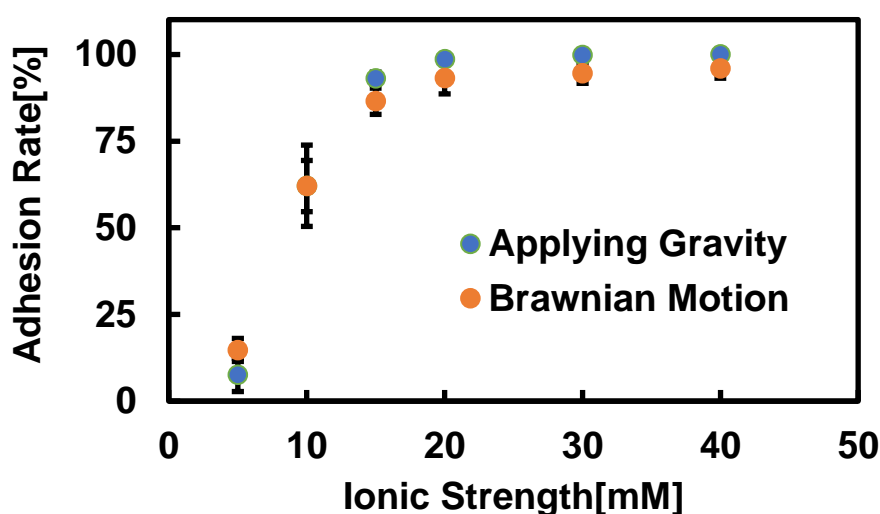


図 5-6 ブラウン運動解析法と重力印加法の比較

5.3.3 ブラウン運動解析法によるビーズ付着率の時間変化観察

5.3.2 の検討によってブラウン運動解析法によるビーズ付着率測定が重力印加法によるものと同様にビーズの付着挙動を反映していることがわかった。ブラウン解析法の場合、ビーズ分離動作を伴わないため、ビーズ付着率の時間変化を観察することでできる。したがって、ブラウン運動解析法を用いてビーズ付着率の時間変化について調べた。

マイクロビーズには、直径 $3\ \mu\text{m}$ のカルボキシル基修飾ポリスチレンビーズ及びアミノ基修飾ポリスチレンビーズ(Polybead Amino 3.0 Micron Micro Spheres(2.5% Solids-Latex, Polysciences #17145-5)を使用した。分散媒は $10\ \text{mM}$ に溶解した HEPES バッファーを基にイオン強度を $10\ \text{mM}$ 、pH を 6.90 ± 0.05 になるよう調整した。ガラス基板をエタノール、超純水の順に3分ずつ超音波洗浄し窒素ブローで乾燥する。乾燥した基板を基板ホルダーに取り付け、厚さ $3\ \text{mm}$ の PDMS シートに直径 $2\ \text{mm}$ の穴をパンチしてガラス基板に自己吸着によって貼り付けることで反応チャンバーを作成した。反応チャンバーに HEPES バッファーを $5\ \mu\text{l}$ 加えたのちにビーズ懸濁液を $3\ \mu\text{l}$ 加えた。ビーズ懸濁液を滴下してすぐに $20\ \text{fps}$ 、5秒間のタイムラプス動画撮影を行った。同条件によるタイムラプス動画撮影を1分おきに行い、ビーズの付着率の時間変化を調べた。

図 5-7 にビーズ付着率の時間変化観察を行った結果を示す。

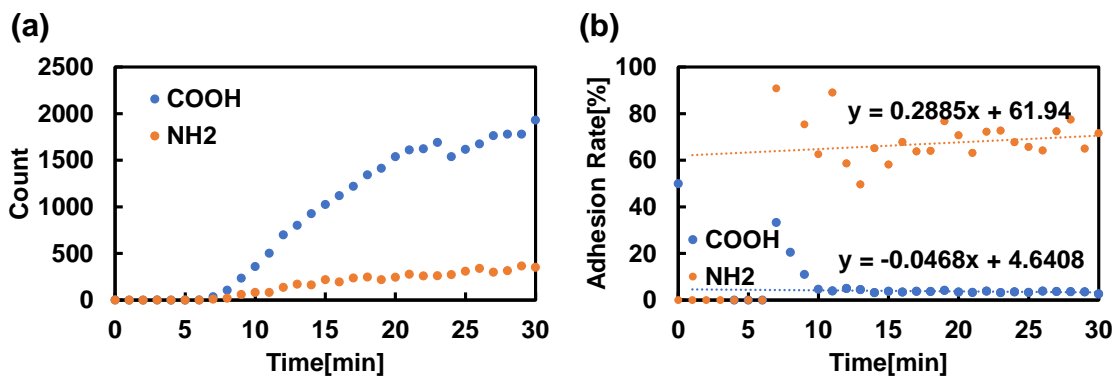


図 5-7 ビーズ付着率の時間変化観察(a)ビーズ総数の時間変化(b)ビーズ付着率の時間変化

図 5-7(a)は画像平均化前に検出されたビーズ総数の時間変化を示す。図 5-7(a)を見るとどちらの条件でも時間とともに基板と近接するビーズの総数が増加しており、ビーズが徐々に沈降して基板と接近していることが確認できる。図 5-7(b)では、0~10分経過時点までの付着率が他の点と比べて高くなっている。これは、画像解析において塵などを誤検出することによるノイズによるものだと考えられる。誤検出によるノイズは数個程度と少数であるため、ビーズ総数が多い場合は付着率に及ぼす影響が小さい。し

かし、ビーズを反応チャンバーに加えて間もない場合、数個の誤検出ノイズが無視できず、付着率が大きくなってしまったと考えられる。図 5-7(b)を見ると、アミノ基修飾ビーズはカルボキシル基修飾ビーズと比べて付着率が高い。これは、ゼータ電位の測定結果からもわかるように、ビーズの表面電位が中性に近いこととも整合性がある。また、カルボキシル基修飾ビーズにおいてビーズ総数は単調な微増傾向が認められるのに対し、付着率は大きな変動が無く常に一定であった。これは、ビーズの付着/非付着はビーズが基板に接近した瞬間に決定され、時間によって付着/非付着の遷移が生じにくいことを表す。対して、アミノ基修飾ビーズの付着率は微増傾向にあった。これは、アミノ基修飾ビーズはビーズ表面のアミノ基によって電位が中性方向に若干シフトしており、静電相互作用による斥力ポテンシャルが小さいため、ブラウン運動によって基板表面の吸着サイトに移動して非付着状態から付着状態に遷移するためだと考えられる。すなわち、ビーズの付着現象はビーズの僅かな電荷分布の違いや、基板上のどの位置に接近するかによって決まると考えられる。

また、アミノ基修飾ビーズの付着率が時間経過とともに増加していく様子は再現性良く確認することができたが、ビーズ懸濁液の調製から日数が経つにつれて付着力の推移する範囲が徐々に変化する様子が確認された。これは、アミノ基修飾ビーズの表面電位が何らかの原因によりマイナス方向にシフトしているものと考えられ、今後の調査が必要である。

5.4 分子間相互作用に向けた界面設計戦略

5.4.1 界面設計戦略の検討

5.3 節ではブラウン運動による付着率解析を提案した。重力印加によるビーズ分離では、ビーズに作用する重力から浮力を差し引いた沈降力を特異的・非特異的結合のしきい値としてビーズの非特異的な付着を識別している。一方、ブラウン運動による付着率解析では、ビーズ—基板間に作用する引力を受けブラウン運動が拘束されることによりビーズの非特異的な付着を検出している。これから得られた付着現象は、DLVO 理論に基づいて説明できることが示されている。よって、本提案の粒子付着解析手法はビーズベースバイオ分析システムの開発に於いて有用な知見を提供するものである。本項では、以上の結果から得られた知見をもとに、分子間相互作用測定における界面の設計戦略をまとめる。

DPBS のように高いイオン強度の分散媒を用いると顕著な物理吸着が示された。この様な吸着現象に対しては、ビーズ分散媒のイオン強度を調整することが有効であるのは明白である。また、イオン強度が同じ分散媒を使用する場合に於いても粒子径によって付着率は大きく変動する。今回行った実験では、粒子直径 $3\ \mu\text{m}$ のポリスチレン製マイクロビーズにおいてイオン強度 $2\ \text{mM}$ 以下の溶媒を使用した場合非特異的なビーズの付着がほとんど見られず、ビーズベースバイオアッセイに良好な実験条件であることを確認した。一方、粒子径の小さいビーズでは分子間の結合を破断するために必要な沈降力が得られない可能性がある。したがって、大径粒子の表面に微小粒子を固定するなどして大径粒子による界面間の非特異的な相互作用を抑える検討が必要だと言える。

また、ブラウン運動解析からは十分なポテンシャル障壁が存在する場合には数時間という相互作用の時間スケールにおいても、ポテンシャル障壁に安定に保持され、顕著な付着は発生しない。また、これは一般的な免疫反応のインキュベーションに比べると長い。ビーズベースバイオアッセイに向けて、より実践的な検討事項として生体分子を修飾した状態でビーズ-基板間の相互作用について検討する必要がある。抗体分子を修飾することによって表面電位が 0 に近づいてしまう可能性が考えられる。今回の検討では、ビーズの表面電位が中性に近い場合においてビーズの非特異的な基板への付着が時間とともに増加していくという知見が得られている。したがって、抗体修飾密度などをコントロールすることによってポテンシャル障壁を維持し、非特異的なビーズの付着を抑える界面設計が必要だと考えられる。

5.5 結言

第 5 章では、分子間相互作用のハイスループット測定に向けた界面設計戦略を立てるため、重力ポテンシャルの影響やビーズ付着率の時間変化などについて評価を行った。

重力ポテンシャルの影響については、粒子径の異なる 3 種類のビーズを用いて基板との物理吸着によるビーズ付着率を測定した。すると、粒子径が大きい程基板との付着率が高くなる傾向を示した。これは、重力ポテンシャルの影響によるものである可能性とナノ界面の曲率半径変化によるものである可能性の 2 つの可能性が考えられた。そこで、DLVO ポテンシャルエネルギーの試算を行い、重力ポテンシャルとの比較を行ったところ、固体表面間に作用する DLVO ポテンシャルの影響が支配的であることがわかった。したがって、今回の実験系では重力ポテンシャルの影響はあまり大きくないと考えられる。

ビーズ付着率の時間変化については、画像解析によってビーズの付着状態を識別することができる新規解析手法を開発し、官能基の異なる 2 種類のマイクロビーズについて付着率の時間変化観察を行った。すると、ゼータ電位が中性に近づいているアミノ基修飾マイクロビーズでは時間とともに付着率が増加していく様子が確認できた。これは、ビーズがブラウン運動によってわずかに運動し基板表面の電荷の偏りなどによって生じる結合サイトに結合している可能性がある。以上より、分子間相互作用測定においては抗体分子の固定化密度等の調節や分子スペーサーの導入によって界面が安定的に斥力ポテンシャルを維持できるような界面設計が必要であると考えられる。

第 6 章 総括

本論文では、これまで結合の量的評価が主体であった分子間相互作用について結合力による質的評価を導入するべく、ハイスループットかつ簡便な分子間相互作用の力学解析手法の開発及びビーズに作用する非特異的な分子間相互作用による影響の評価手法について開発を行った。

第 1 章では、遠心力を用いた分子間の結合力測定について測定原理の提示を行った。また、提示した測定原理の実証を行うため、マイクロビーズ表面への抗体修飾技術の確立や、観察系の構築、ビーズ複合体の形成を行った。その結果、Percoll 溶液を使用してポリスチレンビーズを分離した後に見られるビーズ複合体は抗原抗体反応によって結合していることが確認できた。こうして作成したビーズ複合体に対して遠心力を印加するとある時点で結合部の分子間結合が破断して複合体が分離していく様子が観察できた。この時得られた結合力の値は既存法である AFM による解析と同程度であることから抗原抗体反応の結合力測定に成功したと言える。以上より、測定原理の実証に成功した。

本手法は遠心力を利用することで複数の分子間結合に対して一様な引張力を印加することができることが最大の特長である。一方、ビーズ複合体は形成収率が悪く、顕微鏡視野内に複数のビーズ複合体を集めることが困難であったため、ハイスループット化に向けた測定原理の改良が必要であった。

第 2 章では、第 1 章で実証に成功した分子間相互作用の測定原理について複数同時測定を可能にするための改良を行った。シリカビーズから抗体修飾ガラス基板に変更することで、ポリスチレンビーズの播種を行うだけで複数の結合が見られるようになった。EDAC を用いて抗体修飾したガラス基板に対して抗体修飾ポリスチレンビーズを加えたところ、抗原分子の有無に関わらず基板表面に吸着しているビーズが見られた。そこで、ポリスチレンビーズに遠心力を印加してビーズの付着力を調べたところ抗原有りと抗原無しでは付着力分布に違いが見られた。また、抗原有りで見られた付着力のピークは第 1 章で得られた抗原抗体反応の結合力と近い値を示しており、抗原抗体反応の結合力を示していることが期待された。以上より、複数同時測定が実証できた一方、1 度の実験で測定に成功した結合の数は数十個程度と少なく、さらなるハイスループット化が必要であった。

第 3 章では、測定のさらなるハイスループット化とバイオ計測に向けた測定系の改良を行った。初めに、引張力の印加方法をポリスチレンビーズに作用する浮力から遠心力による沈降力に変更した。これによって、Percoll 溶液を使用する必要がなくなり、バイオ計測に一般的に用いられる緩衝液が使用可能となった。また、ハイスループット化に向けた検討とし

て APTES 処理によるアミノ基修飾ガラス基板の調製と GA による抗体修飾技術の確立を行った。これによって、これまでの抗体修飾ガラス基板と比べて高密度な抗体修飾基板が調整可能となった。さらに、チャンバーを複数配置可能な基板ホルダーの開発やビーズの自動カウントプログラムの構築を行った。以上の検討によって 1 度の実験で数千個のビーズについて付着力測定が可能となり、ハイスループット測定プラットフォームの構築に成功したと言える。

一方、得られたビーズ付着力分布は抗原有り と 抗原無し の反応系の違いを分布形状によって識別することができなかった。さらに、200 pN の沈降力を加えても分離しないビーズが多く見られた。これは、これまでの分子間相互作用測定結果と比べると非常に強固にビーズが基板と付着しており、ビーズ-基板間に作用する非特異的な相互作用について影響の評価を行う必要があった。

第 4 章では、第 3 章で見られた非特異的なビーズの付着について主要因となる分子間力を調べた。初めに、アミノ基と水酸基の異なる基板表面官能基におけるビーズの付着率を調べたところ、付着率には違いが見られなかったが、200 pN の強固な付着は水酸基基板において減少していた。このことから、ビーズの付着には表面官能基による帯電が影響していることが示唆された。さらに、分散溶媒に DPBS と超純水を使用してビーズ付着率の比較を行ったところ、DPBS ではほぼ全てのビーズが基板に付着しており、超純水ではほぼ全てのビーズが基板から分離していた。このことから、コロイド粒子の分散予測に用いられる DLVO 理論を基に考察を行った。その結果、ビーズの物理吸着はファンデルワールス力が主要因であることがわかった。

第 5 章では、第 4 章にて行った DLVO ポテンシャルエネルギーの試算結果を基に分子間相互作用を指向した界面設計戦略について検討を行った。初めに、粒子径の変更が及ぼす影響について実験及び DLVO ポテンシャルエネルギーの試算結果から検討を行った。実験では、粒子径が大きいほどビーズが基板と吸着しやすい傾向が見られた。これには界面における曲率半径が増加したことによる影響と重力ポテンシャルによって斥力のポテンシャルを乗り越えてしまったことによる影響の 2 つの要因が考えられた。そこで、DLVO ポテンシャルエネルギーの試算結果を見ると斥力ポテンシャルエネルギーの極大は重力よりも数十倍以上大きく、重力によってこれを乗り越えたとは考えにくい。したがって、界面間の曲率半径の増大によって物理吸着が生じていると考えられる。

次に、生体分子の反応時間の間斥力ポテンシャルによるビーズの保持が安定的であるか調べた。これまでのビーズ付着率測定では、ビーズに重力を印加して基板から分離することでビーズ付着率を測定していた。しかし、この方法では同一ビーズの付着状態の変化を観察することができないため、分離動作を行わずにビーズの付着率測定が可能なブラウン運動解析法を開発した。開発したブラウン運動解析法によってビーズ付着率の時間変化を調べ

たところ、十分負に帯電しているカルボキシル基修飾ビーズでは、時間による付着率変化がほとんど見られなかった。それに対して電氣的に中性に近づいているアミノ基修飾ビーズでは時間に応じて付着率が増加していく様子が確認された。以上の検討から分子間相互作用測定における界面設計戦略を提示した。

以上の新規分子診断への応用を目的としたナノ界面間相互作用測定技術の測定原理実証とハイスループット測定プラットフォームの構築、非特異的相互作用によるバックグラウンドノイズの評価を通じてこの解析技術が新規分子診断技術への応用に対して有意性を持つことを示した。

これまでの分子間相互作用測定は、無数に発生している分子間結合の平均的な挙動を測定パラメータとしており、個々の結合について詳細な解析を行うことができない。このような量的評価によるバイオセンシングの場合、夾雑分子の誤認識によるノイズの影響が無視できなくなるため、高感度化に限界がある。個々の結合に対して質的な評価を行うことで標的分子によるシグナルと夾雑分子によるノイズを識別することでバイオセンシングのさらなる高感度化が可能になると考えられる。また、既存のバイオセンシング技術の高感度だけでなく、PSA のサブフォーム解析による前立腺がんの高精度スクリーニング等、結合の質的な評価を行うこと全く新しい測定原理を基にしたバイオセンシング技術の開発が可能になると考えられる。

結合の質的な評価を行う指標として分子間の結合力を測定する力分光法は AFM や光ピンセット、磁気ピンセット等のマイクロマニピュレーション技術によって報告されるようになった。しかし、これらのマイクロマニピュレーション技術は装置や操作の複雑さによって統計的な解析が困難であるという課題がある。この課題によって分子間結合の力分光法は基礎研究的な報告にとどまり、応用的な発展に至っていない。

一方、本手法は遠心力を利用することで複数のビーズに対して一様な引張力を印加することができる。この特徴によって 1 度の実験で千個以上の分子間結合に対して結合力測定が可能であることを示した。これは、従来の方法では数か月以上の時間を要する測定を数時間で行ったものであり、簡便な分子間相互作用のハイスループット測定を実現することができた。今回の実験では分子間結合の反応特異性を確認することができなかったが、DLVO 理論を基にしたビーズ付着現象の解析によって非特異的な相互作用によるバックグラウンドノイズを排除することで分子間結合力の測定が可能になると考えられる。

さらに、SPR のフローセルに複数種類のリガンド分子を固定して交差反応によるシグナルを多変量解析することで特定の疾病に限らない網羅的診断技術の提案がなされている¹¹³。こうしたバイオセンシング技術においても非特異的なバックグラウンドノイズの影響について評価を行うことは重要であり、本成果は分子のサブフォーム解析以外の全く新しいバイオセンシング技術の開発においても有用な知見を提示したと言える。

参考文献

1. S. B. Bankar, M. V. Bule, R. S. Singhal, L. Ananthanarayan, Glucose oxidase--an overview. *Biotechnol Adv* **27**, 489-501 (2009).
2. N. S. Oliver, C. Toumazou, A. E. Cass, D. G. Johnston, Glucose sensors: a review of current and emerging technology. *Diabet Med* **26**, 197-210 (2009).
3. C. Chen *et al.*, Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review. *RSC Advances* **3**, (2013).
4. H. Lee, Y. J. Hong, S. Baik, T. Hyeon, D. H. Kim, Enzyme-Based Glucose Sensor: From Invasive to Wearable Device. *Adv Healthc Mater* **7**, e1701150 (2018).
5. S. Ferri, K. Kojima, K. Sode, Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: a bird's eye view of glucose sensing enzymes. *J Diabetes Sci Technol* **5**, 1068-1076 (2011).
6. S. A. Butler, S. A. Khanlian, L. A. Cole, Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices. *Clin Chem.* **47**, (2001).
7. J. L. Vaitukaitis, Development of the home pregnancy test. *Ann N Y Acad Sci* **1038**, 220-222 (2004).
8. J. Blum *et al.*, Can at-home semi-quantitative pregnancy tests serve as a replacement for clinical follow-up of medical abortion? A US study. *Contraception* **86**, 757-762 (2012).
9. M. Montagnana, T. Trenti, R. Aloe, G. Cervellin, G. Lippi, Human chorionic gonadotropin in pregnancy diagnostics. *Clin Chim Acta* **412**, 1515-1520 (2011).
10. L. A. Cole, S. A. Khanlian, J. M. Sutton, S. Davies, W. F. Rayburn, Accuracy of home pregnancy tests at the time of missed menses. *Am J Obstet Gynecol* **190**, 100-105 (2004).
11. K. A. Peterlinz, R. Georgiadis, In Situ Kinetics of Self-Assembly by Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *Langmuir* **12**, 4731-4740 (1996).
12. L. K. Wolf, D. E. Fullenkamp, R. M. Georgiadis, Quantitative angle-resolved SPR imaging of DNA-DNA and DNA-drug kinetics. *J Am Chem Soc* **127**, 17453-17459 (2005).
13. R. Georgiadis, K. P. Peterlinz, A. W. Peterson, Quantitative Measurements and Modeling of Kinetics in Nucleic Acid Monolayer Films Using SPR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 3166-3173 (2000).
14. C. T. Campbell, G. Kim, SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics. *Biomaterials* **28**, 2380-2392 (2007).
15. S. Sonezaki, S. Yagi, E. Ogawa, A. Kondo, Analysis of the interaction between monoclonal antibodies and human hemoglobin (native and cross-linked) using a surface plasmon resonance (SPR) biosensor. *Journal of Immunological Methods* **238**, 99-106 (2000).
16. J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **54**, 3-15 (1999).

17. E. Danelian *et al.*, SPR biosensor studies of the direct interaction between 27 drugs and a liposome surface: correlation with fraction absorbed in humans. *J Med Chem* **43**, 2083-2086 (2000).
18. V. V. Silin, H. Weetall, D. J. Vanderah, SPR Studies of the Nonspecific Adsorption Kinetics of Human IgG and BSA on Gold Surfaces Modified by Self-Assembled Monolayers (SAMs). *J Colloid Interface Sci* **185**, 94-103 (1997).
19. J. Buijs, G. C. Franklin, SPR-MS in functional proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* **4**, 39-47 (2005).
20. Y. Li, H. J. Lee, R. M. Corn, Fabrication and characterization of RNA aptamer microarrays for the study of protein-aptamer interactions with SPR imaging. *Nucleic Acids Res* **34**, 6416-6424 (2006).
21. S. Leavitt, E. Freire, Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 560-566 (2001).
22. M. M. Pierce, C. S. Raman, B. T. Nall, Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* **19**, 213-221 (1999).
23. P. C. Weber, F. R. Salemme, Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 115-121 (2003).
24. S. T. Hess, S. Huang, A. A. Heikal, W. W. Webb, Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review. *Biochemistry* **41**, 697-705 (2002).
25. D. E. Koppel, Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review A* **10**, 1938-1945 (1974).
26. E. L. Elson, Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future. *Biophys J* **101**, 2855-2870 (2011).
27. K. Bizet, C. Gabrielli, H. Perrot, Immunodetection by Quartz Crystal Microbalance. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **89**, 139-150 (2000).
28. H. Ogi *et al.*, Nonspecific-adsorption behavior of polyethyleneglycol and bovine serum albumin studied by 55-MHz wireless-electrodeless quartz crystal microbalance. *Biosens Bioelectron* **24**, 3148-3152 (2009).
29. S. Kurosawa *et al.*, Quartz crystal microbalance immunosensors for environmental monitoring. *Biosens Bioelectron* **22**, 473-481 (2006).
30. M. E. Zorn, R. D. Gibbons, W. C. Sonzogni, Evaluation of Approximate Methods for Calculating the Limit of Detection and Limit of Quantification. *Environmental Science & Technology* **33**, 2291-2295 (1999).
31. I. Kuselman, F. Sherman, Assessment of limits of detection and quantitation using calculation of uncertainty in a new method for water determination. *Accreditation and Quality Assurance* **4**, 124-128 (1999).
32. A. Shrivastava, V. Gupta, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* **2**, (2011).

33. B. T. Howrey, Y. F. Kuo, Y. L. Lin, J. S. Goodwin, The impact of PSA screening on prostate cancer mortality and overdiagnosis of prostate cancer in the United States. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **68**, 56-61 (2013).
34. F. H. Schröder, PSA screening — a review of recent studies. *European Journal of Cancer* **45**, 402-404 (2009).
35. R. Etzioni *et al.*, Quantifying the role of PSA screening in the US prostate cancer mortality decline. *Cancer Causes Control* **19**, 175-181 (2008).
36. D. A. Armbruster, Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin Chem.* **39**, (1993).
37. 荒. 陽一, 前立腺癌腫瘍マーカー — PSA を中心に —. *日本泌尿器科学会雑誌* **85**, (1994).
38. E. Anderson, O. Leahy, A. C. Cheng, J. Grummet, Risk factors for infection following prostate biopsy - a case control study. *BMC Infect Dis* **15**, 580 (2015).
39. M. Shahait, J. Degheili, F. El-Merhi, H. Tamim, R. Nasr, Incidence of sepsis following transrectal ultrasound guided prostate biopsy at a tertiary-care medical center in Lebanon. *Int Braz J Urol* **42**, 60-68 (2016).
40. S. Loeb *et al.*, Systematic review of complications of prostate biopsy. *Eur Urol* **64**, 876-892 (2013).
41. E. L. McJimpsey, Molecular Form Differences Between Prostate-Specific Antigen (PSA) Standards Create Quantitative Discordances in PSA ELISA Measurements. *Sci Rep* **6**, 22050 (2016).
42. W. J. Catalona *et al.*, Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease - A prospective multicenter clinical trial. *Jama-J Am Med Assoc* **279**, 1542-1547 (1998).
43. B. Djavan *et al.*, PSA, PSA density, PSA density of transition zone, free/total PSA ratio, and PSA velocity for early detection of prostate cancer in men with serum PSA 2.5 to 4.0 ng/mL. *Urology* **54**, 517-522 (1999).
44. W. J. Catalona *et al.*, Comparison of percent free PSA, PSA density, and age-specific PSA cutoffs for prostate cancer detection and staging. *Urology* **56**, 255-260 (2000).
45. A. W. Partin *et al.*, Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: Influence of total psa, prostate volume, and age. *Urology* **48**, 55-61 (1996).
46. K. C. Johnson, W. E. Thomas, How Do We Know when Single-Molecule Force Spectroscopy Really Tests Single Bonds? *Biophys J* **114**, 2032-2039 (2018).
47. F. Ritort, Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications. *J Phys Condens Matter* **18**, R531-583 (2006).
48. A. Janshoff, M. Neitzert, Y. Oberdörfer, H. Fuchs, Force Spectroscopy of Molecular Systems—Single Molecule Spectroscopy of Polymers and Biomolecules. *Angewandte Chemie* **39**, 3212-

- 3237 (2000).
49. H. Clausen-Schaumann, M. Seitz, R. Krautbauer, H. E. Gaub, Force spectroscopy with single biomolecules. *Current Opinion in Chemical Biology* **4**, 524-530 (2000).
 50. O. K. Dudko, G. Hummer, A. Szabo, Theory, analysis, and interpretation of single-molecule force spectroscopy experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15755-15760 (2008).
 51. M. De Odrowaz Piramowicz, P. Czuba, M. Targosz, K. Burda, M. Szymoński, Dynamic force measurements of avidin-biotin and streptavidin-biotin interactions using AFM. *Acta Biochimica Polonica* **53**, 93-100 (2006).
 52. C. Yuan, A. Chen, P. Kolb, V. T. Moy, Energy landscape of streptavidin-biotin complexes measured by atomic force microscopy. *Biochemistry* **39**, 10219-10223 (2000).
 53. A. Kishino, T. Yanagida, Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature* **334**, 74-76 (1988).
 54. S. Izrailev, S. Stepaniants, M. Balsera, Y. Oono, K. Schulten, Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex. *Biophysical Journal* **72**, 1568-1581 (1997).
 55. M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub, How strong is a covalent bond? *Science* **283**, 1727-1730 (1999).
 56. A. B. Patel *et al.*, Influence of architecture on the kinetic stability of molecular assemblies. *J Am Chem Soc* **126**, 1318-1319 (2004).
 57. T. Morisaku, Y. Kido, K. Asai, H. Yui, Mechanical Properties of the Coat Protein Layer and Cortex in Single Bacillus subtilis Spores Studied with an Atomic Force Microscope and Laser-induced Surface Deformation Microscope. *Anal Sci* **35**, 45-48 (2019).
 58. E.-L. Florin *et al.*, Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope. *Biosensors & Bioelectronics* **10**, (1995).
 59. M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, H. E. Gaub, Single Molecule Force Spectroscopy on Polysaccharides by Atomic Force Microscopy. *Science* **275**, 1295-1297 (1997).
 60. Z. Walsh-Korb *et al.*, Single-Molecule Force Spectroscopy Quantification of Adhesive Forces in Cucurbit[8]Uril Host-Guest Ternary Complexes. *Langmuir* **33**, 1343-1350 (2017).
 61. G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* **56**, 930-933 (1986).
 62. S. C. Kuo, M. P. Sheetz, Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers. *Science* **260**, 232-234 (1993).
 63. J. R. Moffitt, Y. R. Chemla, S. B. Smith, C. Bustamante, Recent advances in optical tweezers. *Annu Rev Biochem* **77**, 205-228 (2008).
 64. J. P. Rickgauer, D. N. Fuller, D. E. Smith, DNA as a metrology standard for length and force measurements with optical tweezers. *Biophys J* **91**, 4253-4257 (2006).
 65. Y. Jun, S. K. Tripathy, B. R. Narayanareddy, M. K. Mattson-Hoss, S. P. Gross, Calibration of

- optical tweezers for in vivo force measurements: how do different approaches compare? *Biophys J* **107**, 1474-1484 (2014).
66. R. I. Litvinov, H. Shuman, J. S. Bennett, J. W. Weisel, Binding strength and activation state of single fibrinogen-integrin pairs on living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7426-7431 (2002).
 67. M. J. Footer, J. W. Kerssemakers, J. A. Theriot, M. Dogterom, Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2181-2186 (2007).
 68. S. Bayouth, M. Mehta, H. Rubinsztein-Dunlop, N. R. Heckenberg, C. Critchley, Micromanipulation of chloroplasts using optical tweezers. *J Microsc* **203**, 214-222 (2001).
 69. R. I. Litvinov, J. S. Bennett, J. W. Weisel, H. Shuman, Multi-step fibrinogen binding to the integrin (α)IIb(β)₃ detected using force spectroscopy. *Biophys J* **89**, 2824-2834 (2005).
 70. M. Dao, C. T. Lim, S. Suresh, Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* **51**, 2259-2280 (2003).
 71. C. T. Lim, M. Dao, S. Suresh, C. H. Sow, K. T. Chew, Large deformation of living cells using laser traps. *Acta Materialia* **52**, 1837-1845 (2004).
 72. A. Ashkin, Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4853-4860 (1997).
 73. A. Celedon *et al.*, Magnetic tweezers measurement of single molecule torque. *Nano Lett* **9**, 1720-1725 (2009).
 74. R. Sarkar, V. V. Rybenkov, A Guide to Magnetic Tweezers and Their Applications. *Frontiers in Physics* **4**, (2016).
 75. J. Lipfert, X. Hao, N. H. Dekker, Quantitative modeling and optimization of magnetic tweezers. *Biophys J* **96**, 5040-5049 (2009).
 76. C. Gosse, V. Croquette, Magnetic Tweezers: Micromanipulation and Force Measurement at the Molecular Level. *Biophysical Journal* **82**, 3314-3329 (2002).
 77. A. R. Bausch, W. Möller, E. Sackmann, Measurement of Local Viscoelasticity and Forces in Living Cells by Magnetic Tweezers. *Biophysical Journal* **76**, 573-579 (1999).
 78. M. Kruithof, F. Chien, M. de Jager, J. van Noort, Subpiconewton dynamic force spectroscopy using magnetic tweezers. *Biophys J* **94**, 2343-2348 (2008).
 79. S. Hodeib *et al.*, Single molecule studies of helicases with magnetic tweezers. *Methods* **105**, 3-15 (2016).
 80. I. De Vlaminck, T. Henighan, M. T. van Loenhout, D. R. Burnham, C. Dekker, Magnetic forces and DNA mechanics in multiplexed magnetic tweezers. *PLoS One* **7**, e41432 (2012).
 81. X. Long, J. W. Parks, M. D. Stone, Integrated magnetic tweezers and single-molecule FRET for investigating the mechanical properties of nucleic acid. *Methods* **105**, 16-25 (2016).
 82. B. A. Berghuis, M. Kober, T. van Laar, N. H. Dekker, High-throughput, high-force probing of

- DNA-protein interactions with magnetic tweezers. *Methods* **105**, 90-98 (2016).
- 83.
84. Y. Ukita, Y. Takamura, A new stroboscopic technique for the observation of microscale fluorescent objects on a spinning platform in centrifugal microfluidics. *Microfluidics and Nanofluidics* **18**, 245-252 (2014).
85. D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. Schueller, G. M. Whitesides, Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem* **70**, 4974-4984 (1998).
86. R. Ros *et al.*, Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7402-7405 (1998).
87. S. Allen *et al.*, Detection of antigen-antibody binding events with the atomic force microscope. *Biochemistry* **36**, 7457-7463 (1997).
88. U. Dammer *et al.*, Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy. *Biophysical Journal* **70**, 2437-2441 (1996).
89. J. Wakayama, H. Sekiguchi, S. Akanuma, T. Ohtani, S. Sugiyama, Methods for reducing nonspecific interaction in antibody-antigen assay via atomic force microscopy. *Anal Biochem* **380**, 51-58 (2008).
90. M. Li *et al.*, Atomic force microscopy study of the antigen-antibody binding force on patient cancer cells based on ROR1 fluorescence recognition. *J Mol Recognit* **26**, 432-438 (2013).
91. F. Zhang *et al.*, Chemical vapor deposition of three aminosilanes on silicon dioxide: surface characterization, stability, effects of silane concentration, and cyanine dye adsorption. *Langmuir* **26**, 14648-14654 (2010).
92. Y. Nakayama, K. Takahashi, T. Sasamoto, ESCA Analysis of Photodegraded Poly(ethylene terephthalate) Film Utilizing Gas Chemical Modification. *Surface and Interface Analysis* **24**, 711-717 (1996).
93. M. Qin *et al.*, Two methods for glass surface modification and their application in protein immobilization. *Colloids Surf B Biointerfaces* **60**, 243-249 (2007).
94. M. F. Clark, A. N. Adams, Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* **34**, 475-483 (1977).
95. S. D. Gan, K. R. Patel, Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol* **133**, e12 (2013).
96. R. M. Lequin, Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* **51**, 2415-2418 (2005).
97. C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671-675 (2012).
98. J. Schindelin *et al.*, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682 (2012).

99. S. J. Goldsmith, Radioimmunoassay: Review of basic principles. *Seminars in Nuclear Medicine* **5**, 125-152 (1975).
100. P. K. Besch, L. P. Brown, D. S. Skelley, Radioimmunoassay. *Clinical Chemistry* **19**, 146-186 (1973).
101. R. S. Yalow, S. A. Berson, Radioimmunoassay of gastrin. *Gastroenterology* **58**, 1-14 (1970).
102. J. Briggs, V. B. Elings, D. F. Nicoli, Homogeneous fluorescent immunoassay. *Science* **212**, 1266-1267 (1981).
103. J. M. Hicks, Fluorescence immunoassay. *Human Pathology* **15**, 112-116 (1984).
104. J. Sun *et al.*, Fluorescence Immunoassay System via Enzyme-Enabled in Situ Synthesis of Fluorescent Silicon Nanoparticles. *Anal Chem* **88**, 9789-9795 (2016).
105. J. Y. Lichtenberg, Y. Ling, S. Kim, Non-Specific Adsorption Reduction Methods in Biosensing. *Sensors (Basel)* **19**, (2019).
106. S. Upadhyayula *et al.*, Coatings of polyethylene glycol for suppressing adhesion between solid microspheres and flat surfaces. *Langmuir* **28**, 5059-5069 (2012).
107. J. V. Jokerst, T. Lobovkina, R. N. Zare, S. S. Gambhir, Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)* **6**, 715-728 (2011).
108. R. Edelstein, The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents. *Biosensors and Bioelectronics* **14**, 805-813 (2000).
109. W. Cui *et al.*, Cellphone-Enabled Microwell-Based Microbead Aggregation Assay for Portable Biomarker Detection. *ACS Sens* **3**, 432-440 (2018).
110. E. J. Verwey, Theory of the stability of lyophobic colloids. *J Phys Colloid Chem* **51**, 631-636 (1947).
111. H. N. Po, N. M. Senozan, The Henderson-Hasselbalch Equation: Its History and Limitations. *Journal of Chemical Education* **78**, (2001).
112. E. Stellwagen, J. D. Prantner, N. C. Stellwagen, Do zwitterions contribute to the ionic strength of a solution? *Anal Biochem* **373**, 407-409 (2008).
113. H. Sugai, S. Tomita, S. Ishihara, K. Yoshioka, R. Kurita, Microfluidic Sensing System with a Multichannel Surface Plasmon Resonance Chip: Damage-Free Characterization of Cells by Pattern Recognition. *Anal Chem* **92**, 14939-14946 (2020).

謝辞

本研究を遂行するにあたって必要不可欠な知識のご指導，非常に充実した研究環境，非常に有益な助言を賜りました浮田芳昭准教授に心から深謝の意を表します。また、本研究の討論の場で大変有益なご指導、ご助言を賜りました藤森篤教授、伊藤安海教授、鍵山善之准教授、船谷俊平准教授、桑原哲夫准教授に深く感謝いたします。そして、本研究において様々な視点からのご助言を頂き、また有益な議論を交わした浮田研究室の皆様心から感謝の意を表します。

最後に、ここまでの学生生活に対して、長期間に渡る勉学への理解と惜しみない援助をして頂いた家族に深謝の意を表します。

大竹 真央