

## 論文の内容の要旨

論文題目 同時多項目診断ヘルスケアチップに関する研究

氏名 沖 明男

本論文は、極微量の血液から日々の健康状態を診断する「ヘルスケアチップ」の創製に関する研究である。ヘルスケアチップとは、半導体微細加工技術を用いて 2 cm 角の石英あるいは poly(ethylene terephthalate)(PET)フィルム上に断面 30 ~100  $\mu\text{m}$  のマイクロキャピラリを形成し、そこへ無痛針を用いて採血した 1  $\mu\text{L}$  以下の極微量血液を導入して血液分析するマイクロキャピラリチップのことである。1  $\mu\text{L}$  程度の血液から多項目を同時に診断する血液分析マイクロチップといったものは現存していない。その理由としては、単なる従来の血液自動分析装置のスケールダウンだけでは解決しない問題があると考えた。例えば、血液サンプリングは非常に重要な問題であり、現在市販されている簡易型の血液検査装置においても注射器と注射針を使った採血作業をせざるを得ない。あるいは小型血糖測定装置で行うように微細針で皮膚に穴を開けて滲出する血液を採取する方法も、血液量が 1  $\mu\text{L}$  以下になってくると水分の蒸発により血液成分濃度が濃くなる恐れがあり適当ではない。したがってヘルスケアチップを創製するためには

従来とまったく異なる採血方法を研究する必要がある。その他に解決すべき課題として (1)血液をガラスや高分子板でできたマイクロキャピラリー内に注入したとき、血中たんぱく質、赤血球や血小板など血球がキャピラリー内壁に付着、凝固してキャピラリーを塞ぐことを防ぐための、キャピラリー内壁の生体適合化 (2)血球がセンサ部に付着して感度の低下等をまねかないよう血漿と血球との分離 (3)微量血液をマイクロキャピラリーに注入し、搬送するためのマイクロポンプ (4)血液中の数千種類におよぶ血液成分の中から目的とする健康マーカーのみを選択的に検出する高選択性マイクロ化学センサ、 (5)マイクロチャンネル内ではレイノルズ数が小さいため一般に液体の流れは層流となることが知られている。したがってマイクロキャピラリー内での血漿と試薬の混合 (6)高感度比色測定、等が挙げられる。本研究の目的は、これらの課題を解決するとともに、それにより確立した要素技術をもとにチップを集積化し、微量血液から pH、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>++</sup>などの電解質濃度や肝機能診断に欠かせない GOT、GPT、 $\gamma$ -GTP などの酵素活性といった各種の健康マーカーを測定することである。本論文では以下に述べる章構成により、得られた結果について報告している。

まず第 1 章で本研究の背景と目的、本論文の構成について述べた。第 2 章ではプロトタイプヘルスケアチップを石英で作製しその基本的な特性を評価した。マイクロキャピラリーパターンを深さ 30  $\mu\text{m}$  までドライエッチングする際に生成する穴欠陥の問題をエッチングガスの混合比を最適化することにより解決した。マイクロキャピラリー内壁を生体適合化するために 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC)ポリマーをコートした。生体適合性を評価するために、まず石英表面に MPC)ポリマーをコートし血清タンパク質の吸着を Fourier transformed infrared attenuated total reflection(FTIR-ATR)により測定したところ、コートしていない関栄養面よりも明らかにたんぱく質の吸着が少ないことが分かった。また血清をマイクロキャピラリー内へ電気浸透流ポンプで注入したところ、MPC ポリマーをコートしたマイクロキャピラリーは血清が詰まりにくく、マイクロキャピラリー内壁においてもその生体適合性の効果を発揮することが分かった。血清をマイクロキャピラリー内に電気浸透流ポンプを用いて注入する時、血清中の成分が電気泳動しないよう、また Ion sensitive field effect transistor(ISFET)センサの絶縁破壊を避けるために電気浸透流ポンプを下流側

に配置した。この電気浸透流ポンプを用いたところ 900 V で 400 Pa のポンプ圧力を得た。

第3章ではヘルスケアチップを、①安価 ②使い捨て可能 ③大量生産可能とするため、PET で作製した。マイクロキャピラリのマスターとなる反転パターンは第2章でのべた石英微細加工技術を用いた。石英反転パターンをドライエッチングする際の穴欠陥生成の問題を改善するために、電圧の印加方法を工夫しエッチングガスの混合比の最適化することで穴生成をなくした。PET で作製したマイクロキャピラリの内壁を MPC ポリマーでコートしたところ、赤血球の吸着を抑える効果があり、石英マイクロキャピラリの場合と同様に生体適合性の効果があることを確かめた。さらに MPC ポリマーをコートした ISFET は血清の長時間の浸漬に対しても感度の劣化が見られなかった。また PET チップに埋め込んだ ISFET で、極微量の校正液中の pH、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>イオン濃度を測定した。

第4章においては、無痛針の作製方法と無痛針による採血を試みた。痛みを感じることなく採血できるように、針は外径100 μmのステンレス微細管で作製した。針先端をChemical mechanical polishing(CMP)で先端を10度に研磨し、さらに先鋭にするためにリン酸溶液中で電界研磨した。この作製した無痛針で実際に採血したところほとんど痛みを感じることはなかった。電気浸透流ポンプは一般的に1~数 kVの高電圧を印加しなければならないが、人体への影響をなくし装置の携帯性から考えて低電圧化することが必要であった。そこで10 V程

度の電圧で動作する低電圧駆動型電気浸透流ポンプを作製しポンプ能力を測定した。そのポンプ力は採血するのに十分な圧力であることが明らかになった。マイクロ化学センサのイオ

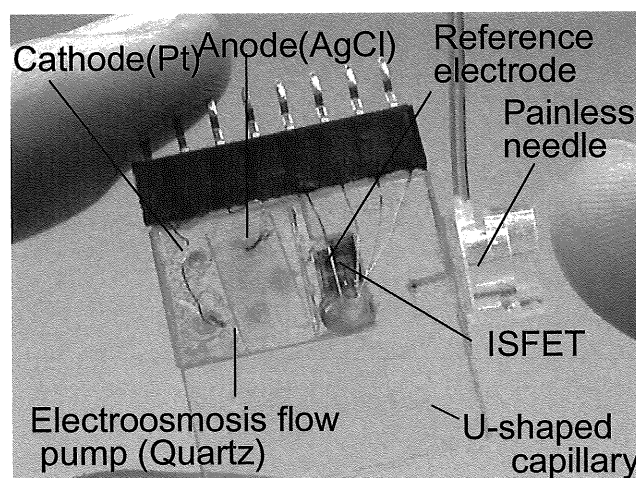


図1 試作したヘルスケアチップ

ン感応膜の密着性を良くするために、センサと感応膜の間にpolyHEMAの層を形成した。またイオン選択性を高めるためNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>イオンセンサの感応膜を構成するイオノフォアとアニオン排除剤の比率を最適化した。それによりNa<sup>+</sup>イオンセンサはK<sup>+</sup>イオンに対して約1000倍、K<sup>+</sup>イオンセンサはNa<sup>+</sup>イオンに対して約100倍の高選択性を示し、血液中のこれらのイオン濃度を測定が可能になった。無痛針、低電圧電気浸透流ポンプ、高選択性マイクロ化学センサを集積し、ヘルスケアチップを試作した。試作したヘルスケアチップを図1に示す。またこのチップを実際に操作し、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>イオン濃度を測定した。

第5章では、体内免疫機構に関係の深いリンパ球をマイクロキャピラリチップ内で電気泳動させ分離することを目的としたT、B細胞分離チップにおいて、キャピラリやリザーバ内で電解液のpH変化の問題があったため、そのpH変化の抑制する方法を検討した。ひとつは電極に塩橋を用いる方法でもう一つはpH変化した電解液を中和する方法であった。両方法はいずれも有効に機能することが分かり、マイクロ電気泳動チップにおいて必ず直面する問題に解決策を提示することができた。

第6章では $\gamma$ -GTP、GOT、GPTを測定することにより肝機能を診断できるチップの作製をした。測定光学的に比色法により測定した。マイクロチャンネル中で、試薬と血漿を遠心力により混合するミキサーチップを用いて1分間でほぼ均一に混合した。キャピラリの内壁を撥水処理した比色測定チップを作製した。光源からの光はキャピラリ内を全反射して伝達し、より効率的に光検出器に到達する構造のチップを作製した。 $\gamma$ -GTP、GOT、GPTの三項目について検量線を作成した。 $\gamma$ -GTPは反応終了後の吸光度を測定するエンドポイント法で、GOT、GPTは酵素反応速度を吸光度で測定するレートアッセイで測定した。そして最後に第7章では本研究において得た知見についてまとめた。