

熱ナノインプリント法を利用した
ラテラルフロー免疫アッセイデバイスの高機能化

2021年2月

千葉大学大学院融合理工学府
先進理化学専攻 共生応用化学コース

青山 周平

(千葉大学審査学位論文)

熱ナノインプリント法を利用した
ラテラルフロー免疫アッセイデバイスの高機能化

2021年2月

千葉大学大学院融合理工学府
先進理化学専攻 共生応用化学コース

青山 周平

目次

第1章 序論

1-1. 背景

1-1-1. はじめにー疾病を早期に発見するための診断技術の開発ー	1
1-1-2. 臨床検査の現状と今後	2
1-1-3. POCT とその活用例	4
1-1-4. イムノアッセイの原理と現状	7
1-1-5. ラテラルフローイムノアッセイ	12
1-1-6. ラテラルフローイムノアッセイの課題とその解決法に関する研究例	18
1-1-7. ラテラルフローイムノアッセイデバイスを構成する基材材料に関する課題とその解決法に関する研究例	23
1-1-8. ナノインプリント法	25

1-2. 本研究の目的	29
-------------	----

1-3. 本論文の構成	31
-------------	----

引用文献	33
------	----

第2章 インプリントシートを用いたラテラルフローイムノアッセイプラットフォームの構築

2-1. 緒言

2-1-1. 本章の目的	38
2-1-2. インプリント加工を施すための樹脂材料	38
2-1-3. 抗体固定化基材を作製するための本研究のアプローチ	39
2-1-4. デバイスの性能を評価するための検出対象物質	41

2-1-5. 検討内容	42
2-2. 実験方法	
2-2-1. 熱ナノインプリント	45
2-2-2. インプリントシートの評価	48
2-2-3. イムノアッセイ	50
2-3. 結果と考察	
2-3-1. インプリントシートの作製およびマイクロコーン構造の観察	52
2-3-2. 接触角測定	57
2-3-3. インプリントシートに対する抗体の吸着性の評価	61
2-3-4. 緩衝液中に希釈した CRP を対象とするイムノアッセイ	66
2-3-5. 血清中に希釈した CRP を対象とするイムノアッセイ	69
2-3-6. 本手法と既存手法の比較	72
2-4. 結論	75
引用文献	76

第 3 章 表面ナノ構造の制御によるラテラルフローイムノアッセイデバイスの高性能化

3-1. 緒言	
3-1-1. 本章の背景	79
3-1-2. 本章の目的	81
3-1-3. 検討内容	82
3-2. 実験方法	
3-2-1. 熱ナノインプリント加工用金型の作製	84
3-2-2. インプリントシートの作製	84

3-2-3. 3種類のマイクロコーン構造の形状評価	85
3-2-4. インプリントシートに対する抗体の吸着試験	85
3-2-5. インプリントシート上における水溶液の流速評価	86
3-2-6. イムノアッセイ	87
3-3. 結果と考察	
3-3-1. マイクロコーン表面のナノトポロジーのキャラクタリゼーション	89
3-3-2. インプリントシート上における抗体の吸着量の評価	95
3-3-3. イムノアッセイによるデバイスの検出性能評価	99
3-4. 結論	105
引用文献	106
第4章 結論	
4-1. 各章の要約	109
4-2. 本研究の総括と現状の課題	111
4-3. 今後の展望	114
引用文献	116
本論文に関連する研究業績	117
謝辞	119

第1章 序論

1-1. 背景

1-1-1. はじめに—疾病を早期に発見するための診断技術の開発—

2021年現在、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のパンデミックが世界中に大きな混乱をもたらしている。コロナウイルスの感染拡大を防ぐ上で、早期に感染者を見つけ適切な治療を施し重症化を防ぐこと、および、感染者と健常者を隔離することは不可欠である。このような新種の感染症に限らず、疾病のリスクを低減するためには、疾病の有無およびその兆候を早期につかみ、正確に診断を行うことが非常に重要である。他の例として、全世界の死因第1位である心血管疾患¹の代表例である急性心筋梗塞では、発症してから治療を開始するまでの時間が患者の生存率と予後に大きく影響するため、早急な診断が求められる。また、現代人の代表的な生活習慣病である糖尿病においても、できるだけ早期にその兆候を発見し血糖コントロールを行うことは、重大な慢性合併症の発生を抑制する上で有効である。

疾病を早期に発見することによって疾病の重症化を防ぐこと、さらに進んでその発症自体を未然に防ぐことは、増加の一途を辿っている莫大な医療費を削減することにも寄与する。世界の医療費は2014年時点で9.21兆ドルであり、2040年には24.24兆ドルに達すると推定されている²。特に我が国では、2025年に国民の4人に1人が75歳以上の後期高齢者になる超高齢化社会が到来し、従来の医療保険制度の維持が困難になることが懸念されているため、医療費削減に寄与する新規技術開発は不可欠である。

このような背景の下、近年、疾病を早期に発見するための新しい診断技術やサービスの開発がより一層活発化している。特にコンピューターの性能が飛躍的に向上したことによって、従来は不可能であった解析技術が実現している。次世代シーケンサーを用いた遺伝子の網羅的解析技術^{3,4}およびシングルセル（単一細胞）解析技術^{5,6}、あるいはAIを利用した画像解析技術⁷はその代表的な例である。また、バイオセンサーを埋め込んだウェアラブルデバイス^{8,9}、スマートフォンを検出器とする高性能迅速診断キット

^{10,11}, 診断機能を集積したマイクロ流体デバイスなどに代表される POCT (point of care testing: その場診断) システム ^{12,13} などの開発も活発に行われている。

このような新規「診断技術」を開発し、そして深耕することは、人々の健康を守るために、また医療を保障できる社会を持続していくために、今後ますます重要となっていくものと容易に想定される。

1-1-2. 臨床検査の現状と今後

臨床検査とは、診療目的で行われ、患者の傷病の状態を評価する検査のことであり、疾病の診断および治療方針の決定のために必要不可欠である。臨床検査は、心電図、脳波、超音波などに代表されるような、患者の身体データを直接検査する「生体検査」と、患者の身体から取り出した検体試料（血液、尿、便など）中の成分を分析する「検体検査」に大別される（Fig. 1-1）。本項では、特に本研究で対象とする「検体検査」に関して、その概要と現状、および必要とされている機能や性能について説明する。

検体検査においては、細菌、ウイルス、タンパク質、ホルモン、細胞、核酸、代謝物などが検出および分析の対象成分となる。検体検査は、検体の種類、対象成分、分析方法などによって分類されており、その種類は非常に多岐に渡っている（Fig. 1-1）。大きな分類として、血液中の細胞や代謝物を分析する「血液検査」、抗原抗体反応を利用して感染症や疾病マーカー、血中薬物濃度などを検出する「免疫検査」、感染症の要因となる微生物を培養することによって特定・発見し、薬物耐性などを調べる「培養同定検査」、DNA や RNA などの核酸を分析する「遺伝子検査」などがあり、それらもさらに細分化されている。

我が国においてこれらの検査のほとんどは、臨床検査技師と呼ばれる臨床検査を専門に行う医療従事者によって実施されている。上述のように、検査の種類が多岐に渡るため、臨床検査技師の仕事の範囲は極めて広い。また、遺伝子検査のような新たな検査の導入により必要な技量や知識も高度化しているといえる。

そして、臨床検査の多くは、比較的規模の大きな病院の中央臨床検査室や、民間の検査機関である衛生検査所にて実施されている。これらの施設において、大型の検査装置

を一箇所に集約することで、多様な検査への対応や、多量の検体の迅速かつ正確な分析が可能となり、検査の効率化、低コスト化が図られている¹⁴。

しかしながら近年では、前項でも記述したように疾病の早期診断に対するニーズが高まっており、こうしたニーズに対応するためには従来の中央化された検査体制だけでは不十分であると指摘されている¹⁵。特に我が国においては、超高齢化による人手不足や、地方医療の過疎化に対応するための在宅・遠隔医療体制の拡充が不十分であるという課題がある¹⁶。こうした課題に対応するために、いつでもどこでも簡便かつ迅速に疾病を診断する POCT という仕組みがより一層注目されており、急速に普及しつつある。

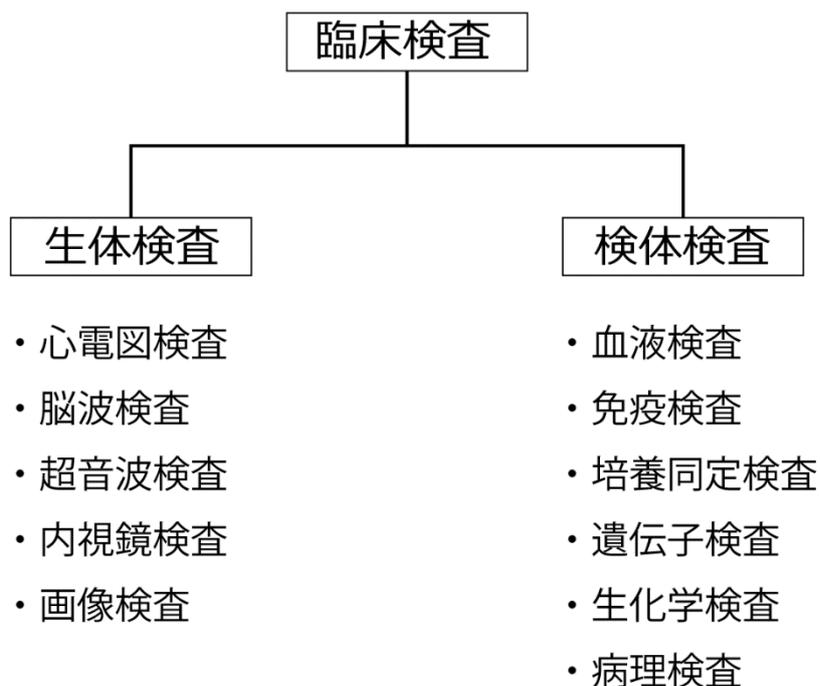


Fig. 1-1 臨床検査の分類と代表例

1-1-3. POCT とその活用例

POCT（ピーオーシーティ）とは、前述のように「その場診断」を表す言葉であるが、より具体的には、被験者の傍らで行われる簡便な検査、およびその結果を速やかに診療に活かす仕組みのことである。POCT の概念には、疾病の有無を診断するための検査だけでなく、看護、疾病の予防、健康増進に寄与する様々な検査も含まれている。医療情勢の変化とともに、近年 POCT の普及が進みつつあり、病院、診療所、在宅など、様々な場面において使用されるようになってきている。実用化されている POCT の代表例を Table 1-1 に示す。

病院や診療所において実施される POCT の代表例として、感染症の迅速検査¹⁷が挙げられる。特に、インフルエンザウイルスに対する感染の有無を簡易的に調べるための抗原検査が代表例であり、また最近では新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の抗原検査も行われている。インフルエンザの同定においては、患者から鼻腔拭い液や鼻汁などの検体をその場で採取し、専用の検査キットを用いることで、迅速に診断を行うことができる。検査室を持たない小規模の診療所などにおいては、大病院の中央臨床検査室や民間の衛生検査所に検体を輸送することなく、その場で迅速に検査結果が得られるため、大きなメリットがあり広く普及している。例えば 2017 年度、我が国のインフルエンザ迅速検査キットの供給量は 3,589 万回分に達したことが報告されている¹⁸。さらに新型コロナウイルスの感染拡大が社会問題となっている現代において、より一層その必要性が高まりつつある。

また POCT は救急外来の現場においても実施されている。例えば、急性心筋梗塞の診断において、心筋の傷害によって上昇する血液中の心筋梗塞マーカーとなるタンパク質を検出対象とした迅速検査¹⁹が行われている。代表的なマーカーとして、トロポニンと呼ばれる筋原線維の収縮調整タンパク質があり²⁰、その血液中の濃度は、心筋梗塞の発症後に数時間で上昇する。そのため、心筋梗塞が疑われる患者の血液を採取し、専用の検査装置や検査キットを用いて血中に含まれるトロポニンの濃度を分析することで、心筋梗塞の診断を行うことができる。急性心筋梗塞においては早期の診断が患者の命を左右するため、その場でリアルタイムに実施できる検査に対する必要性は極めて高い。

さらに在宅においても、被験者が自ら測定する POCT が既に利用されている。糖尿病患者が診療の一環として実施する自己血糖モニタリング²¹はその代表例である。この検査において、まず微小な針を取り付ける専用の器具（ランセット）を用いて患者が自身の手指に穿刺することで採血を行う。採取した微量の血液を専用のセンサーに付着させることによって、簡便かつ迅速に血液中のグルコース濃度を測定することができる。通常、患者は食前、食後など、1日に4回以上も血糖値測定を行う必要があるため、簡便、迅速に検査できることは重要である。2019年度の調査において、糖尿病の患者数は、全世界で4億6300万人²²、我が国においては739万人にも上ることが報告されており、今後も患者数が増加し続けることが予測されている。そのため血糖モニタリング検査の需要は高く、現在様々なメーカーから多くの種類の簡易自己血糖測定機器が販売されている。

また、一般市民がキットを薬局において購入し自ら実施できる検査として、妊娠検査は広く認知されている²³。試験者は検査キットに尿をかけるだけで、尿中の妊娠マーカータンパク質であるhCG（ヒト絨毛性ゴナドトロピン：human chorionic gonadotropin）を迅速かつ簡便に検出でき、妊娠の有無を確認することができる。このように一般市民が薬局等でキットを購入し実施できるセルフチェック検査はOTC（over the counter）検査と呼ばれている。高齢化による医療費の増加を抑制するという意味でも、このようなOTC検査の利用は今後ますます拡大していくものと予想されている。

POCTを実施する上では、迅速、簡便、かつ手軽に操作できる分析手法や分析機器が不可欠である。そのような分析機器は、POCT対応機器、POCTシステム、POCTデバイスなどと呼ばれている。前述した糖尿病患者が行う血糖の自己測定では、酵素電極法という原理を応用した電気化学センシングPOCTシステムが用いられている²⁴。このシステムにおいて、まず採取した血液を、手のひらサイズの測定機器に装着されたセンサーに付着させる。その際、酵素反応によって血液中のグルコースが酸化し、センサー上に固定された電子伝達物質の荷電状態が変化する。その後、電圧を印加することによって、血液中のグルコース量に比例した電流が流れ、その電流値からグルコースを定量することができる。測定に必要な時間はわずか数十秒と短く、また穿刺用機器、測定機器は誰でも簡便に使用できる設計となっている。

そして前述した感染症，急性心疾患，妊娠などの各種迅速検査の多くは，ラテラルフロー免疫アッセイ（lateral flow immunoassay）と呼ばれる（免疫クロマトグラフィーとも呼ばれる）測定方法によって実施されている^{17,25}。この方法は，検体を水平方向に搬送させて，免疫アッセイ（免疫測定）を行う分析法であり，迅速，簡便，安価に実施できるため広く普及している。免疫アッセイおよびラテラルフロー免疫アッセイについては，次項以降において詳細に説明する。

Table 1-1 実用化されている POCT の代表例

種類	検出対象	主な実施場所	試験者	測定方法
感染症の 迅速検査	各種ウイルスや細菌 の持つ抗原	病院，診療所	医師 看護師	ラテラルフロー 免疫アッセイ
急性心疾患の 迅速検査	血液中の心筋梗塞マ ーカーとなるタンパク質 (トロポニン T, トロ ポニン I, CK-MB など)	病院 (救急)	医師 看護師	ラテラルフロー 免疫アッセイ
妊娠検査	尿中の妊娠マーカーと なるタンパク質 (hCG)	在宅	被験者	ラテラルフロー 免疫アッセイ
自己血糖測定	血液中のグルコース	在宅	被験者	酵素電極法 酵素比色法

1-1-4. イムノアッセイの原理と現状

イムノアッセイは、抗原抗体反応を利用した分析手法であり、感度および特異性が高く、さらに簡便かつ迅速に測定できるという特徴を有している²⁶。そのため、様々な物質が混在している複雑な検体を対象とした場合においても、前処理を行うことなく、目的とする微量のターゲット物質を検出することが可能である。また、ホルモンや薬物などの低分子化合物から、タンパク質や核酸などの高分子化合物、さらにはウイルスや細菌に至る様々な対象物質を検出できるため、汎用性にも優れた手法であるといえる。そのため、医療、環境、食品などの様々な分野における分析手法として広く利用されている²⁷。

イムノアッセイの測定原理は、競合法と非競合法に大別される。競合法は、一定量の抗体に対して、あらかじめ酵素や色素、蛍光物質などの信号物質を標識した一定量の抗原と、測定対象となる非標識の抗原を競争的に反応させる方法である (Fig. 1-2)。この手法では、測定対象の抗原濃度が増加するほど、標識抗原が抗体と結合する割合が減少するため、信号は小さくなる。競合法は一般的に、高濃度の低分子化合物の測定に適しているが、その検出感度は非競合法と比較して低いと報告されている²⁶。

一方で非競合法は、測定対象となる抗原に対して、過剰量の標識抗体を反応させる方法である。抗原濃度が増加するほど、抗原と結合する標識抗体の量が増加するため、信号は大きくなる。

非競合法の代表的な例としては、サンドイッチ法 (サンドイッチイムノアッセイ) が挙げられる (Fig. 1-3)。この手法は、あらかじめ一定量の抗体を固定化した基材に対して試料液を添加し、試料液中の抗原を捕捉した後に、過剰量の標識抗体を添加することで固定化抗体-抗原-標識抗体のサンドイッチ免疫複合体を形成し、最終的に標識抗体由来の信号を測定する、というものである。サンドイッチ法に代表される非競合法では、異なる2つ以上のエピトープ (抗体が認識する抗原の部位) を有している抗原が測定対象となる。そのため測定対象はタンパク質などの比較的分子量が大きな成分に限定されるものの、競合法と比較して検出感度や特異性が高いため、微量成分の検出において頻用されている²⁶。

また免疫アッセイを反応系の違いによって分類すると、均一系と非均一系に大別される。均一系は、抗原や抗体を基材に固定化することなく、均一な溶液中で測定を行うものである。均一系による測定方法の代表例としてはラテックス凝集法が挙げられ、以下の原理により測定が行われる (Fig. 1-4)。標識物質としてラテックスを結合させた抗体の溶液に対して抗原を含む試料液を加えると、抗原の添加量に依存して、ラテックスが凝集する。その懸濁液に光を照射し、光散乱に基づく吸光度の変化を測定することによって、試料液中に含まれている抗原量を定量することができる。

一方で非均一系は、抗原または抗体を基材に固定化して反応が行われる系であり、先述したサンドイッチ法などの多くの手法が該当する。非均一系免疫アッセイは、均一系と比較して、操作が複雑になるものの検出感度や特異性が向上するため、より一般的に利用されている²⁸。

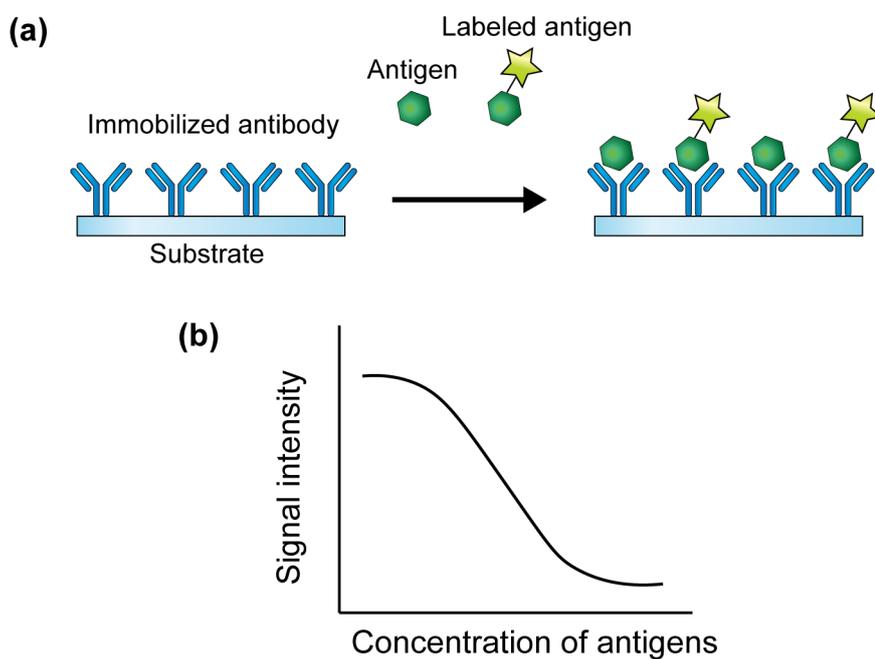


Fig. 1-2 (a) 競合法による免疫アッセイの模式図 (b) 競合法による免疫アッセイにおける抗原濃度と信号強度の関係

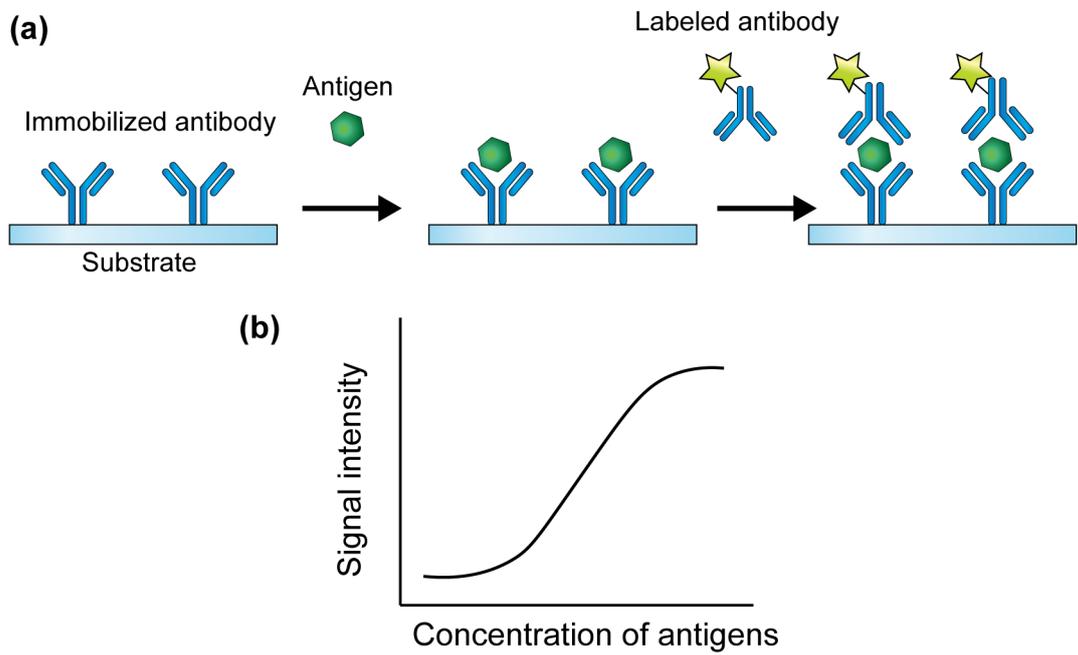


Fig. 1-3 (a) サンドイッチ法によるイムノアッセイ (b) サンドイッチ法によるイムノアッセイにおける抗原濃度と信号強度の関係

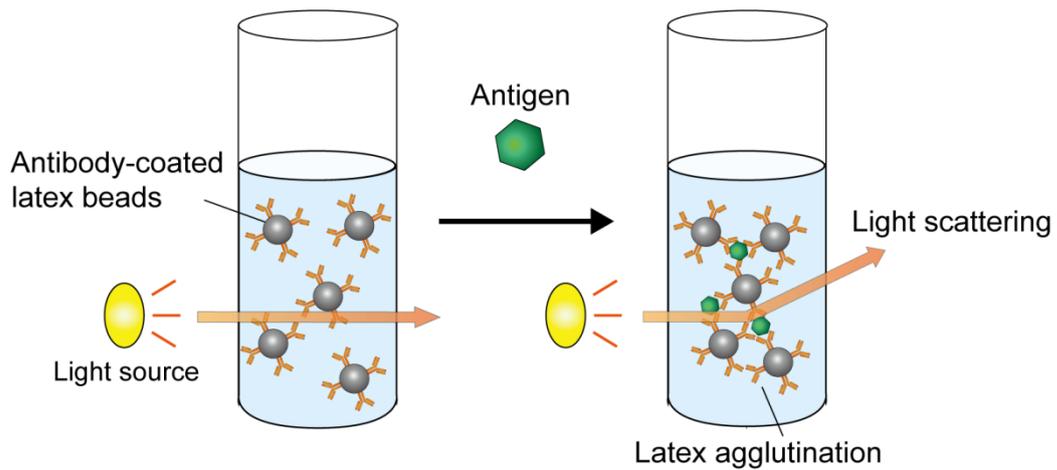


Fig. 1-4 ラテックス凝集法によるイムノアッセイの模式図

上述した原理および反応系を利用して、これまでに様々なイムノアッセイ技術が開発されてきた。以下では、測定を実施するための反応場によってイムノアッセイ（主に非競合的手法による非均一系イムノアッセイ）を分類して説明する。Fig. 1-5 に代表的な反応場の模式図を示す。

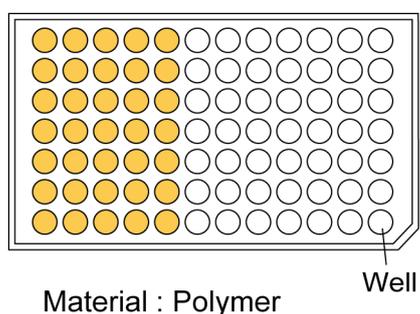
マイクロプレートは、従来、イムノアッセイの反応場として標準的に用いられてきた基材の一つである。マイクロプレートは多数のマイクロウェルが連結されたプラスチック製の容器であり、代表的な形式である 96 ウェルプレートでは、ウェルが 8 列×12 行に配置されており、一つのウェルあたり 300 μL 程度の液体を入れることができる。抗体あるいは抗原をマイクロプレートのウェル表面に固定化し、酵素によって標識した抗体を用いて抗原を検出することを特徴とする酵素免疫測定法（enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA, 酵素結合免疫吸着法などとも呼ばれる）は、基礎研究から臨床検査まで幅広く活用されている手法である²⁹。ELISA では、抗原抗体反応を行った後、酵素標識抗体と反応する基質を添加し、その結果生じる生成物の量を吸光度変化や蛍光、発光などを信号として検出することによって、抗原を定量することができる。これらの信号を検出する際には、専用の測定装置であるプレートリーダーを利用することによって、各ウェルに導入された多数の試料液を同時に分析することが可能となる。さらに、作業工程が自動化された ELISA 用の大型装置も開発されており、多数の試料を効率良く分析できるため、大規模な医療機関の臨床検査室などにおいて利用されている。

ラテラルフローイムノアッセイは、前項で述べたように、各種感染症の抗原、心筋マーカー、妊娠マーカーなどの迅速検出に利用されている分析手法である³⁰。この手法では紙や多孔質膜などの基材によって構成された、使い捨てのデバイスが用いられており、一部の基材には、抗体や試薬が乾燥状態で固定化されている。デバイスに滴下された試料液（50~100 μL 程度）が、毛細管力によって水平方向に輸送されていく過程において、基材上で抗原抗体反応が生じる。その結果、基材上に生じる着色の有無を主に目視によって確認して測定を行う、ことを特徴とする手法である。本手法は、特定の検出装置を必要とせず、簡便に短時間で測定が可能なのが利点である。本手法は、本論文の基盤となる技術であるため、その詳細については次項で詳述する。

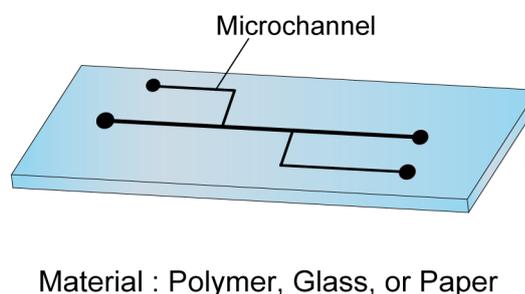
また近年、ガラスや樹脂などの材料に微細な流路構造を加工したマイクロ流体デバイスを用いたイムノアッセイ技術も盛んに開発されている³¹。これらの手法では、微小空間（体積：nL~ μ L）において抗原抗体反応を行うことによって、従来法と比較してより迅速な分析が可能となる。さらに、任意の形状の微細構造を作製できるため、チップ上に様々な機能を集積することができる。例えば、検体の前処理機能、試薬の導入、混合、洗浄などの機能を統合したイムノアッセイデバイスが報告されている^{32,33}。

これらの他にも、抗原抗体反応を電気化学的または光学的に検出するイムノセンサー^{34,35}、フェムトリットルの超微小なウェルを集積した基材を用いたデジタル ELISA³⁶ など、様々なイムノアッセイ技術の開発が進められている。

(a) Microplate



(b) Microfluidic device



(c) Lateral flow device

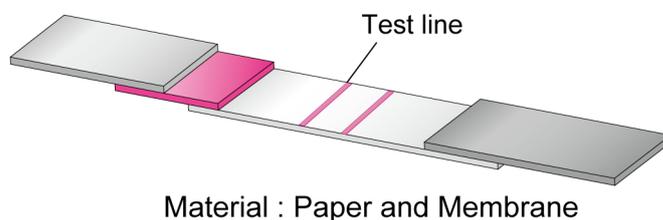


Fig. 1-5 イムノアッセイを実施するための代表的な反応場の模式図 (a) マイクロプレート (b) マイクロ流体デバイス (c) ラテラルフローデバイス

1-1-5. ラテラルフロー免疫アッセイ

前項では、感染症、急性心疾患、妊娠などの迅速な診断において広く用いられている実用的な POCT 技術として、ラテラルフロー免疫アッセイについて簡潔に記述した。本項では、その原理と利点について詳述する。

ラテラルフロー免疫アッセイは、測定デバイスに滴下された試料液を毛細管力によって搬送しながら、デバイスの一部に固定化された抗体を利用して抗原を捕捉する分析手法である。

Fig. 1-6 に一般的なラテラルフロー免疫アッセイの原理および測定デバイスの構成を示す。測定デバイスは、主にサンプルパッド、コンジュゲートパッド、ニトロセルロースメンブレン、吸収パッドなどの基材によって構成されており、これらがカートリッジ型のケース内部に収納されている。これらの基材のほとんどは紙や膜などの多孔質体であり、毛細管現象によって試料液が基材内部を輸送されていく。多くの場合、試料液としては、血液や鼻水などの検体を抗原抽出液と混和した溶液が用いられる。

次に、このデバイスの操作方法について説明する。調製された試料液をサンプルパッドに滴下すると、試料液はコンジュゲートパッドに輸送される。コンジュゲートパッドには、標識物質が修飾された抗体（標識抗体）が固定化されており、試料液中に含まれる抗原と標識抗体が反応することで、抗原と標識抗体からなる免疫複合体が形成される。なお標識物質としては、一般的に金コロイド粒子や着色ラテックス粒子が用いられている¹⁷。形成された免疫複合体は、その後、ニトロセルロースメンブレンに搬送される。ニトロセルロースメンブレンの一部には、抗体がライン状に固定化されており、抗原を捕捉するためのテストラインと、標識抗体を捕捉するためのコントロールラインがある。搬送された免疫複合体は、テストラインに固定化された抗体と反応することによって、固定化抗体、抗原、および標識抗体からなるサンドイッチ型の免疫複合体となり捕捉される。そして標識物質が凝集した結果、テストライン上に視認できる着色が生じる。抗原が含まれていない試料液をデバイスに滴下した場合は、サンドイッチ免疫複合体が形成されないため、テストラインにおいて着色はみられない。したがって試験者は、試料液を滴下した後、テストラインにおける着色の有無を目視で確認することのみによって、試料液に抗原が含まれているかどうかを判別できる。

またテストラインの後方にあるコントロールラインには、標識抗体と反応する抗体が固定されており、試料液中に抗原が含まれていない場合であっても、標識抗体が結合することで着色がみられるため、測定が正常に実施されたことを確認することができる。なお、メンブレンを通過した余分な試料液は、吸収パッドにおいて吸収される。以上が、一般的なラテラルフロー免疫アッセイの操作方法および測定原理である。

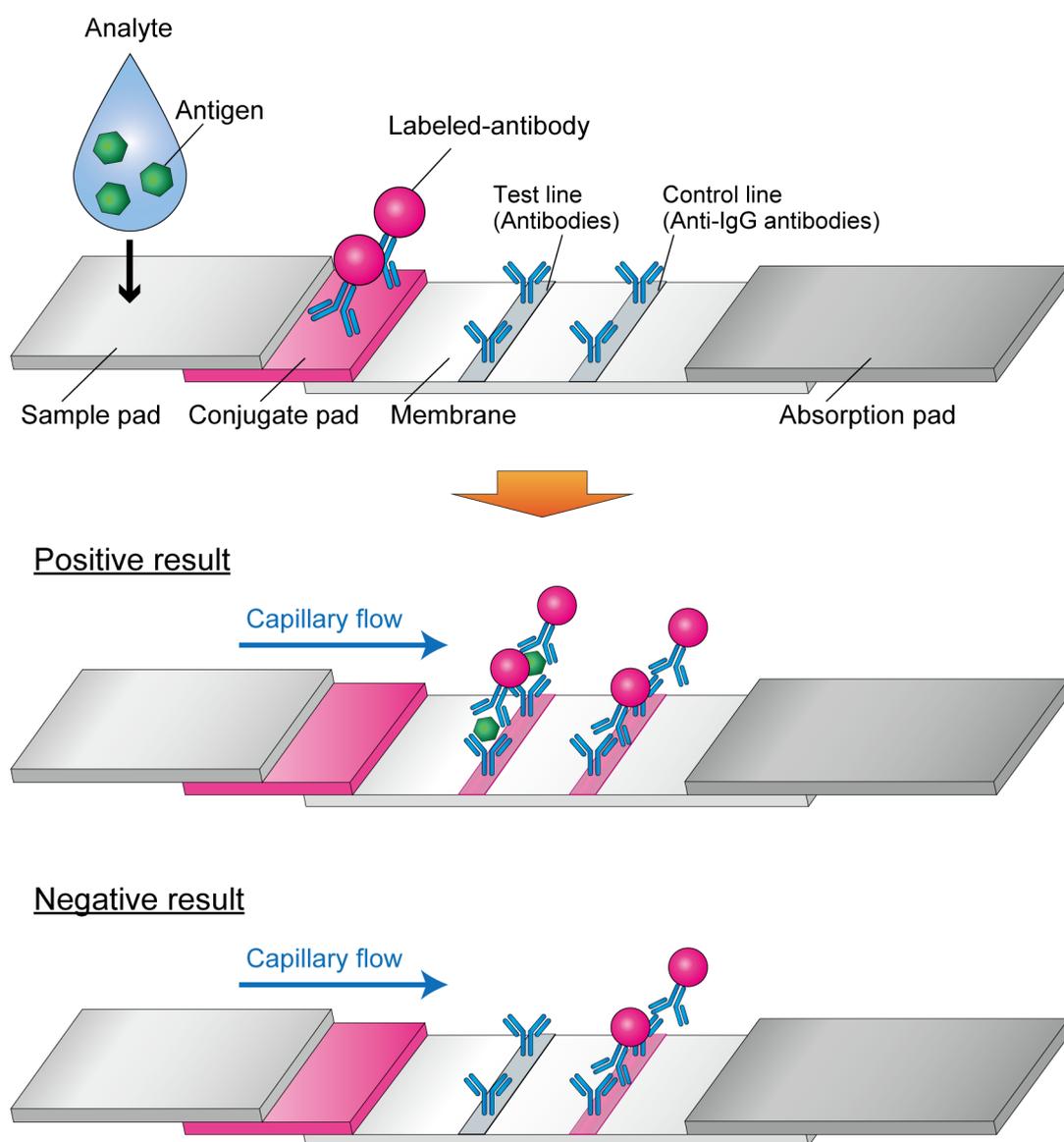


Fig. 1-6 一般的なラテラルフロー免疫アッセイデバイスの構成と原理

次に、ラテラルフロー免疫アッセイの利点について説明する。最も顕著な利点として、以下の(1)～(5)が挙げられる。

(1) 迅速に測定を実施できること。測定時間は検出対象となる抗原によって異なるが、概ね5~30分である³⁷。このように迅速な検出が可能である理由として、特異性が高い抗原抗体反応を利用していること、滴下した試料液とデバイス中に固定化されている各種試薬が順次反応していくため、試薬の添加や洗浄操作などの追加の作業を伴わないことなどが挙げられる。

(2) 操作が簡便であること。デバイスおよび検査キットは最小限の操作で扱えるように最適化されており、誰でも簡便に測定を実施することができる。具体的に試験者が行う操作は、検体の採取と試料液の調製、試料液の滴下、および、目視によるテストライン上の着色の確認のみである。デバイスを使用する上で特別な手技を必要としないため、臨床現場において一般の医師や看護師でも難なく操作することができる。

(3) 検査キットが安価であること。上述したように、測定デバイスは紙や多孔質膜などの安価な材料で構成されている。また液体の搬送や信号の検出のために、特別な装置を必要とすることもない。そのため、1キットの価格は500~1,000円程度であり、安価である³⁸。

(4) 汎用性が高く、幅広い用途に応用できること。検出対象となる抗原の種類に対応した抗体を用いることで、様々な測定に利用することができる。そのため、ラテラルフロー免疫アッセイは前述した感染症、心筋マーカー、妊娠マーカーの検査以外にも、腫瘍マーカー、薬物、アレルギーの検査など様々な用途において実用化されている。

(5) 測定デバイスを大量生産する技術が確立されていること。メーカーは測定デバイスを効率的に製造するための生産設備を有しており、生産プロセスも適正化されている。

上述した利点があるため、ラテラルフロー免疫アッセイは迅速、簡便、安価というPOCTの基本性能を満たすばかりでなく、汎用性、生産性にも優れた診断技術であるといえる。

これらの利点の中でも、特にその迅速性と簡便性は、他の分析手法と比較して特筆すべき点であるといえる。例えば感染症を検査するための代表的な手法としては、ラテラルフロー免疫アッセイの他に、検体から病原体を分離培養して同定する「培養同定法」、

および検体から抽出した遺伝子を増幅する手法の一種である「PCR (polymerase chain reaction) 法」が挙げられる。培養同定法、PCR 法はいずれもラテラルフローイムノアッセイと比べて、検出感度が高い。そのため、確定診断においては、これらの手法が利用されることが一般的である。しかしながら、これらの検査は病原体の培養や、遺伝子の抽出などの煩雑な操作を必要とするため、高度な手技を身につけた臨床検査技師が検査を実施する必要がある³⁹。また検査にかかる時間も長く、培養同定法では数日程度、PCR 法では半日程度の時間が必要であるとされている。さらに、専用の臨床検査室を有していない診療所においてはこれらの検査を実施することができないため、被験者から検体を採取して中央臨床検査室や衛生検査所に輸送する必要がある。その場合、検査結果が得られるまでに、場合によっては数日以上の間がかかってしまうこともある。その一方で、ラテラルフローイムノアッセイは、操作が簡便であり測定時間が短い手法である。医師や看護師が被験者の前で検査を実施することができ、早ければ数分程度で結果が得られるため、患者に対してすぐに治療を開始し、またその場で投薬の種類を選択することができる。

また、一般的な他のイムノアッセイ技術と比較した場合でも、迅速検査を行うことができるという意味においてラテラルフローイムノアッセイの有用性は高い。代表的なイムノアッセイ技術との比較を Table 1-2 に示す。

前項において説明したマイクロプレートを利用した ELISA は、検出感度が高く（タンパク質を検出対象とした場合、概ね pM 程度）^{40,41}、定量測定、多項目同時測定が可能なイムノアッセイ技術であるため、疾患のスクリーニング検査として頻用されている。しかしながら、試薬の添加、溶液交換、複数回の洗浄などの煩雑な操作を必要とするため、高度な技術をもつ臨床検査技師が実施する必要がある、また測定に数時間程度を要するため、迅速検査を行う上では不適であるといえる。

マイクロ流体デバイスを用いたイムノアッセイシステムは、まだその多くが研究開発段階であるが、原理的には ELISA レベルの検出感度、定量性を達成することができる検査技術である⁴²。また、測定時間も比較的短く 30 分程度という研究例が多い。そのため、次世代の POCT 技術として期待されている。しかしながら、溶液を搬送するためにシリンジポンプなどの外部動力を必要とするシステムが多く、装置構成が複雑となる

ため、誰でも簡便に使用できる操作性については開発途上であるといえる。また、デバイスの製造コストが高いことも重要な課題である。結果として、複雑な操作性と高い製造コストの問題が、この技術の実用化および普及における障壁となっている。

以上をまとめると、ラテラルフロー免疫アッセイは、現時点では他の技術をもって代替することができない、極めて実用的な POCT 技術であるといえる。そして重大疾患を早期に発見することや、在宅にて個人が自身で健康をチェックすることが、より重要視される現代において、今後ますますその需要が高まっていくことが予想される⁴³。

Table 1-2 代表的なイムノアッセイ技術の比較

イムノアッセイの種類	測定時間	使いやすさ	タンパク質を対象とした検出感度	その他特徴
ラテラルフローイムノアッセイ	5~30分	極めて簡便	nM 程度	<ul style="list-style-type: none"> ・デバイスが安価 ・主に定性的測定
マイクロプレートを用いた ELISA	数時間	煩雑	pM 程度	<ul style="list-style-type: none"> ・同時多項目測定 ・定量的測定 ・高価な自動測定装置もある
マイクロ流体デバイスを用いたイムノアッセイ	30分程度	やや煩雑	pM 程度	<ul style="list-style-type: none"> ・デバイスの製造コストが高い ・現時点では実用化例は限定的

1-1-6. ラテラルフロー免疫アッセイの課題とその解決法に関する研究例

前項において詳述したように、ラテラルフロー免疫アッセイは他の技術をもって代替することができない、実用的な POCT 技術である。その一方で、本技術においても解決すべきいくつかの重要な課題が存在する。主な課題は、「高感度化」および「再現性の向上」であり³⁰、それぞれについて、以下に説明する。

高感度化は、本技術の最も重要な課題の一つである。一般的なラテラルフロー免疫アッセイにおける検出感度は、タンパク質を検出対象とした場合、概ね nM レベルであると報告されている⁴²。この値は、他の免疫アッセイ技術と比較して高くない (Table 1-2)。感度が劣る要因としては、ELISA のように信号の増幅工程を含まないこと、信号を目視によって検出していること、基材への非特異的な吸着を十分に抑制できないこと、などが挙げられる。

もう一つの重要な課題が、再現性の向上である。ラテラルフロー免疫アッセイにおいて、試験間 (test-to-test) の測定の再現性が低いことが指摘されている³⁰。その要因としては、測定結果を目視で検出することによる測定者間の評価のばらつき、基材材料や試薬の性質のばらつき、基材に試薬を固定化する際の塗布や乾燥工程のばらつき、などが挙げられる。そして、このような再現性における問題があるため、既存の製品は主に定性試験として用いられており、定量的な試験のために用いられることはほとんどない。

ラテラルフロー免疫アッセイの検出感度、再現性を向上させることは、疾病をより早期に、正確に発見するために重要である。検出感度や再現性が低いことは、実際の臨床検査において、検査結果が「偽陰性」となることの要因となる。偽陰性とは、実際には疾病を発症しているにもかかわらず、検査結果が陰性になってしまうことである。ラテラルフロー免疫アッセイにおいては、実際には検体中に抗原が含まれている場合であっても、テストラインにおける着色が得られずに、偽陰性となることがある。特に疾病を発症してから間もない時期は、検体中に含まれる抗原の量が少ないため、偽陰性となる確率が高い。その場合、疾病の発見が遅れ、重症化につながってしまう。またインフルエンザのような感染症の場合、患者が他の人に感染させるリスクを高めることにもなる。さらに、患者にとって何度も検査を受診することの負担も大きいものである。こ

のような問題を解決するために、ラテラルフロー免疫アッセイの検出感度、再現性を向上させるための技術開発を行うことは急務である。

また検出感度、再現性を向上させることは、上述したような顕在化している問題を解決するためだけではなく、本技術の応用性を高め、従来の臨床検査をより簡易な方法で実施するためにも重要である。

例えば、ラテラルフロー免疫アッセイの高感度化を達成化することができれば、従来は侵襲性が高い操作によって得られた検体を用いる検査を、侵襲性が低い操作によって得られた検体を用いて実施できることが期待される。血液や鼻腔拭い液は、一般的に含有される抗原量が多いため、ラテラルフロー免疫アッセイの検体として頻用されている。しかしながら、採血や鼻腔に綿棒を入れて拭う行為は侵襲的であり患者への負担が比較的大きい。高感度化によって、一般的に抗原量が少ないとされている唾液、尿、涙などの非侵襲性あるいは低侵襲性の操作によって得られる検体を使用できれば、検査の簡便性がより一層向上する。また、検体の採取が容易になれば、従来の検査を在宅でも実施しやすくなると期待される。

また、再現性を向上させることができれば、本技術を用いた定量的な検査が可能となるものと期待される。従来、本技術は疾患の有無のみを判断することを主な目的としており、定性的な検査に対して適用することがほとんどであった³⁰。再現性の向上によって、定量的な検査が可能となれば、検体中の濃度の同定が必要な疾患マーカーの検査においても応用されるものと期待される。

このような背景の下、ラテラルフロー免疫アッセイの検出感度、再現性を向上させるため、これまでに様々な研究開発が行われてきた⁴⁴⁻⁴⁶。以下本項では、近年ラテラルフロー免疫アッセイの分野において多くの研究開発事例が報告されている、試薬、反応方式、検出装置に関する新規技術開発について説明する。Table 1-3 に、その代表例を示す。

高感度化のために検討されている代表的なアプローチの一つとして、二次抗体に修飾するための標識物質の開発が挙げられる。感度をより向上させるためには、より明瞭な信号が得られる物質を抗体に結合させることが有効である。従来のラテラルフロー免疫アッセイでは、金コロイド粒子や着色ラテックス粒子など、視認で検出可能な標識物

質を用いることが一般的であった。一方近年では、蛍光ナノ粒子や量子ドットなど、信号強度が高い標識物質の開発、および、それらを組み込んだデバイスの開発が盛んに進められている^{17,46}。例えば、ナイルレッドにより染色した蛍光ナノ粒子や、蛍光性プローブとして代表的な量子ドットであるテルル化カドミウム (CdTe) を、抗体に結合させてラテラルフロー免疫アッセイに利用した研究が報告されている^{47,48}。その結果として、血清中の炎症マーカータンパク質の検出において、既存の視認検出型のデバイスと比較して、10~100 倍程度の感度を達成できたことが報告されている。

また高感度化のために、従来とは異なる反応方式を適用するという研究例も報告されている。その例として、酵素反応を利用したラテラルフロー免疫アッセイが挙げられる。この手法では、一次抗体 (固定化抗体)、抗原、酵素標識抗体からなるサンドイッチ型の免疫複合体を形成した後に、基質を含む溶液を導入し、酵素反応を行う。基質が反応した結果生じる生成物由来の発色、蛍光、発光、あるいは電流などの信号を検出することで測定が行われる。このような酵素反応を利用したラテラルフロー免疫アッセイの一例として、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase; ALP) を酵素として、5- ブ ロ モ -4- ク ロ ロ イ ン ド リ ル リ ン 酸 ニ ナ ノ リ ウ ム 塩 (5-bromo-4chloro-3-indolyl-phosphate; BCIP) を基質としてそれぞれ用いた手法が報告されている^{49,50}。BCIP は酵素反応により紫色の発色色素を生じるため、視認により信号を検出することができる。この ALP と BCIP を利用したラテラルフロー免疫アッセイは、インフルエンザなどの感染症の迅速診断のためにすでに実用化されている⁵¹。

さらに、より高感度な反応方式として、化学発光性基質を利用したラテラルフロー免疫アッセイに関する研究も報告されている。化学発光とは、化学反応によって励起された分子が基底状態に遷移する際に、エネルギーを光として放出する現象である。その一例として、西洋ワサビペルオキシダーゼ (horse radish peroxidase; HRP) を酵素として、ルミノールを基質としてそれぞれ用いて酵素反応を行い、ルミノールの化学発光を検出するラテラルフロー免疫アッセイが報告されており、従来法と比較して、100 倍程度の高感度化を達成したことが報告されている^{52,53}。

このように化学反応系を取り入れたアプローチとして、酵素反応以外にも、たとえば銀塩増幅反応を利用したラテラルフロー免疫アッセイが報告されており、感染症の迅

速検査として実用化されている。この方法では、金コロイド粒子を標識した抗体を二次抗体として用いて一般的なラテラルフローイムノアッセイを実施した後に、還元剤と銀イオン液を滴下、搬送する。金コロイド粒子が触媒として働き、その表面に銀粒子が成長することで粒子が肥大化し、視認度が向上するというものである。この方法を利用したインフルエンザ検出キットの感度は、従来法と比較して 10~100 倍程度高いことが報告されている^{54,55}。

また検出感度および再現性の向上のために、上述した新規標識物質や反応方式の開発に加えて、検出機器の開発も進められている^{56,57}。蛍光や化学発光など、非視認性の検出方式をラテラルフローイムノアッセイに適用する場合、これらの方式に対応した検出機器の開発は必須である。その一例として、蛍光ナノ粒子を検出対象とするシステムが開発されており、インフルエンザなどに代表される感染症の迅速検査において既に実用化されている⁵¹。特に最近では、新型コロナウイルスのパンデミックの影響によって、高感度かつ正確な病原体検査に対するニーズがより一層高まっており、蛍光や化学発光などの非視認性の検出方式を用いた高性能ラテラルフローイムノアッセイシステムの開発は急務である。

また、目視で検出するシステムであっても、検査者間の測定誤差を低減し、測定の再現性を向上するために、テストラインを撮像して着色の程度を定量する検出器の利用も増えつつある⁵⁶。さらに、専用の検出器ではなく、スマートフォンのカメラを検出器として利用するシステムの開発も盛んに進められている^{11,58}。スマートフォンは、今日では多くの人が所有している端末であるため、スマートフォンを利用した検出システムは、誰でもどこでも利用できる高性能なラテラルフローイムノアッセイを実現し、在宅や遠隔地での POCT を普及させるための有効なツールになると期待されている¹¹。

Table 1-3 ラテラルフロー免疫アッセイの改良に関する研究例（試薬，反応方式，装置関連）

大分類	代表例
標識物質の開発	蛍光ナノ粒子（ラテックス，シリカなど），量子ドット
反応方式の開発	酵素反応（基質：BCIP, ルミノールなど），銀塩増幅反応
検出装置の開発	専用検出器，スマートフォンを利用した検出システム (方式：比色検出，蛍光検出，化学発光検出，電気化学検出など)

1-1-7. ラテラルフローイムノアッセイデバイスを構成する基材材料に関する課題とその解決法に関する研究例

前項で紹介した研究例はいずれも、既存のデバイスを利用しつつ、適用する試薬や装置を工夫するという検討である。このような検討は、これまでのプラットフォームをそのまま生かし、なるべくデバイスの変更箇所を最小限にしながらアッセイの高性能化を図るという点において効率的なアプローチであるといえる。

その一方で、ラテラルフローイムノアッセイにおいて検出感度や再現性を飛躍的に向上させるためには、試薬や装置の工夫だけでは不十分であり、デバイスを構成する新規基材材料の開発は不可欠であると考えられる。前述したように、既存のデバイスにおいては、セルロースやニトロセルロースなどによって構成された紙あるいは多孔質膜が部材として利用されている。紙や多孔質膜を基材材料として用いたデバイスは、安価に作製でき、また簡便に取り扱えるといった利点があるため POCT デバイスとして適しているが、その一方で、材料の不均一性が測定の再現性や検出感度に影響を与えることが問題である^{30,59}。

特に、抗体を固定化するニトロセルロースメンブレンは、その製造プロセスにおいて、製造ロット内およびロット間における性質のばらつきを避けることができない^{30,60,61}。ニトロセルロースメンブレンにおいて、抗体の固定化効率や毛細管流れの速度といった物理化学的性質は、イムノアッセイの性能に影響を及ぼす重要なパラメーターである。そして、その性質のばらつきが、ラテラルフローイムノアッセイにおいて検出感度や再現性が低下することの要因の一つであると指摘されている^{30,60-63}。

したがって、ラテラルフローイムノアッセイにおける検出感度や再現性の問題を根本的に解決するためには、試薬や装置の工夫だけでは不十分であり、抗体を固定化する基材材料を均質かつ再現性良く作製すること、またその基材を組み込んだ新しいプラットフォームを開発することが必要であると考えられる。

しかしながら、ラテラルフローイムノアッセイにおける基材材料を改良するという観点からなされた研究例は極めて限定的であり、上述した試薬、反応方式、あるいは装置関連の改良研究が多数存在することと比較して、その例はわずかである。以下にその具体例を説明する。

熱可塑性樹脂をホットエンボスや射出成形により加工する方法は、比較的安価に、かつ再現良く微細な構造を作製できるという利点がある^{64,65}。このような微細加工技術をラテラルフローイムノアッセイの基材材料に応用した例として、射出成型によって作製したマイクロピラー型ラテラルフローイムノアッセイデバイスが開発されている³⁰。このデバイスは、均質な大きさのマイクロピラー構造がアレイ状に配列した構造を有する樹脂基材によって構成されており、ピラー上に抗体を固定化して使用される。またこの基材は熱可塑性樹脂であるため、材料として安定であり、ニトロセルロースと比較して経年劣化しにくいという特徴がある。このデバイスを用いてサンドイッチイムノアッセイを行った結果、血中の炎症マーカーを高感度に検出できたことが示されている⁶⁶⁻⁶⁸。

しかしながらこれら既存の研究では、微細加工を施した熱可塑性樹脂上に毛細管力を発生させて試料液をスムーズに流すために、あるいは基材上に十分な量の抗体を固定化するために、シラン-デキストラン処理、高分子電解質を用いたコーティングなど^{66,69}、精密にコントロールされた表面処理工程が必要であった。このような表面処理は、基材上における液体の毛細管流れ速度、および抗体の固定量という2つの重要なパラメーターに影響を及ぼすため、そのわずかな工程や条件のばらつきが測定の再現性を損なう要因となりうる。さらに、イムノアッセイデバイスの商業的生産において複雑な表面処理工程を導入することは、その生産性を低下させるため望ましくないものと考えられる。

これらを総括すると、複雑な表面処理を行う必要なく、簡便かつ再現良く作製できる基材を組み込んだ新しいラテラルフローイムノアッセイデバイスの開発が必要であるといえよう。そのためにデバイスの基材が満たすべき要件としては、(i) 無垢、つまり化学的な表面処理を必要としない基材であること、(ii) 抗体を高効率に固定化できること、(iii) 基材表面あるいは基材内部において毛細管力によって試料液をスムーズに搬送できること、が挙げられる。

これらの要件のうち特に、(ii) 抗体を高効率に固定化するためには、基材が高い比表面積を有しており、かつ抗体を固定化しやすい微細構造を表面に有していることが効果的であると考えられる。そして、抗体分子の大きさがおよそ10~15 nmであることを考慮すると^{70,71}、ナノメートルオーダーで構造を制御した基材、およびそのような基材を作製するための精密な加工技術が必要であるといえる。

1-1-8. ナノインプリント法

ナノメートルスケールの構造を再現よく作製できる手法として、ナノインプリント法と呼ばれる技術がしばしば用いられる。ナノインプリント法は、金型に形成された微細構造を樹脂に転写する技術であり、1995年にChouらによって報告された^{72,73}。ナノインプリント法は、熱可塑性樹脂を用いた熱ナノインプリント法と、紫外線硬化樹脂を用いたUVナノインプリント法に大別される。本項では、本論文の基盤となる関連技術として、熱ナノインプリント法について詳述する。

熱ナノインプリント法は、以下のプロセス(1)~(3)によって実施される(Fig. 1-7)。(1) 転写する樹脂と金型を接触させた状態で、それらを樹脂のガラス転移温度以上に加熱する。(2) 加熱状態を保持し、樹脂が軟化した状態で圧力を印加する。(3) ガラス転移温度以下に冷却したのちに離型する。

このような熱ナノインプリント法の特徴として、加工のプロセスが簡便であること、および、様々な種類の樹脂表面に10 nm~数百 μm のスケールのマイクロ・ナノ構造を形成できることが挙げられる⁷⁴。この加工スケールの下限値(10 nm程度)は、同様に金型を用いた加工技術の代表例である射出成型法と比較しても一桁以上小さい。したがって、熱ナノインプリント法はナノメートルスケールの構造を形成する上で、転写性に優れた手法であるといえる。熱ナノインプリント法の加工方式としては、従来はバッチ方式のプロセスが一般的であったが、近年ではローラー方式のプロセスの開発が進められており、大量生産も可能になりつつある⁷⁵⁻⁷⁷。

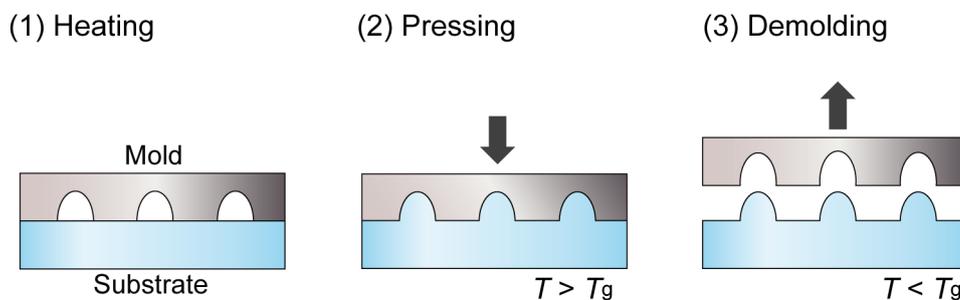


Fig. 1-7 熱ナノインプリントによる微細加工プロセス

上述したように、熱ナノインプリント法は、ナノメートルスケールの構造を再現良く作製できること、簡便なプロセスで実施できること、生産性が高いこと、といった利点を有する優れた技術である。そのため、次世代の微細加工技術として、主に半導体部品や光学部品などの生産のために利用されてきた。具体的には、高速熱インプリント装置を用いた光ディスクやデータストレージの作製⁷⁸、携帯電話や液晶テレビなどのフラットディスプレイ用の部材（導光板、反射防止膜、偏光板など）の生産⁷⁸、GaN製のLEDを高効率化するフォトニック結晶デバイスの開発などに応用されている⁷⁹。

また近年、バイオ分野の研究開発においてもナノインプリント法が応用されつつある。例えば、熱ナノインプリントを用いて、DNAやタンパク質をサイズによって分離するナノ構造体を組み込んだバイオチップが報告されているほか⁸⁰、高アスペクト比を有するマイクロ・ナノ構造体を利用した細胞培養用のシートを作製した研究例も報告されている^{81,82}。

そして非常に限定的ではあるが、免疫アッセイ用の基材の作製方法としても、熱ナノインプリント法が応用された例が報告されている。具体的には、熱ナノインプリント法によって作製した、高アスペクト比を有する樹脂製のナノピラーを用いて、高感度な蛍光検出サンドイッチ免疫アッセイを実現したという研究が報告されている⁸³。この研究では、直径100 nm、高さ4 μm の高アスペクト比ナノピラーを有する樹脂基材上に抗体を固定化し、二次抗体として蛍光標識抗体を用いて蛍光検出サンドイッチアッセイを行った結果、測定後の蛍光強度が、ナノピラーの形成されていない樹脂基材と比較して34倍高くなったことが報告されている。その要因は、ナノピラーの形成によって基材の比表面積が増加し、抗体を高密度に固定できるようになったためであるとの考察がなされている。

樹脂基材表面に抗体を固定するための足場を作製するためのナノ加工技術として、熱ナノインプリント法以外には、反応性イオンエッチングを用いた加工方法^{84,85}、およびナノ粒子やポリマーブラシを用いたボトムアップ型の加工方法^{86,87}が報告されている。これらのナノ加工技術の比較を、Table 1-4に示す。

反応性イオンエッチングを用いた加工方法は、アスペクト比の高いナノ構造を作製可能であり、極めて高い比表面積を実現することができるという利点を有している。その

一方で、加工に数十分程度の時間がかかり、また加工可能な面積が小さい、つまり生産性が低いという課題がある。ナノ粒子やポリマーブラシを用いたボトムアップ型の加工方法は、3次元的に入り組んだ複雑なナノ構造を作製可能であるが、その一方で、煩雑な表面処理プロセスが必要となる。そして上述した2つの手法はどちらも、主に研究開発段階の加工プロセスであり、製品への応用は限定的である。

これらのナノ加工技術と比較して、熱ナノインプリント法は、プロセスの簡便性、基材の生産性、加工の再現性において優れており、これらの優位性を満たすナノ加工技術は他に存在しないものと考えられる。したがって、特にラテラルフロー免疫アッセイ用の抗体固定化基材のように大量生産を必要とする製品の作製方法として、熱ナノインプリント法は高い適合性を有しているものと期待される。

しかしながら、ナノインプリントによって形成した微細加工基材を、抗体を固定するための足場として利用した研究例は限定的であり、また特に、ラテラルフロー免疫アッセイに応用した研究例は、筆者が知る限り皆無であった。

Table 1-4 イムノアッセイ用基材の作製方法として報告されているナノ加工技術と、熱ナノインプリント法の比較

方法	利点	欠点
熱ナノインプリント法を用いた微細構造の作製 ⁸³	<ul style="list-style-type: none"> ・プロセスが簡便 ・再現性が高い ・生産性が高い 	<ul style="list-style-type: none"> ・3次元的に入り組んだ複雑な構造を作製することは困難
反応性イオンエッチングを用いた微細構造の作製 ^{84, 85}	<ul style="list-style-type: none"> ・アスペクト比が高い針状構造を作製可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・生産性が低い ・作製できる形状が限定的
ナノ粒子やポリマーブラシを用いたボトムアップ型の微細構造の作製 ^{86, 87}	<ul style="list-style-type: none"> ・3次元的に入り組んだ複雑な構造を作製可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・プロセスが煩雑 ・再現性が低い

1-2. 本研究の目的

上述したように、代表的な POCT 技術の一つであるラテラルフローイムノアッセイにおいて、検出感度および再現性を向上させることは極めて重要な課題である。そしてラテラルフローイムノアッセイの性能を飛躍的に向上させるためには、試薬や装置の改良のみでは不十分であり、デバイスを構成する基材材料の不均一性や低い再現性といった問題を解決することが必要であると考えられる。特に抗体を固定化するための基材を均質に、かつ再現良く作製することは重要な要素である。さらに、測定の再現性、アッセイにおける操作性、またデバイスの生産性を考慮すると、基材に複雑な表面処理を行うことなく抗体を固定化でき、さらに、毛細管力によって試料液をスムーズに搬送できる基材の開発が求められている。

また繰り返しになるが、熱ナノインプリント法は、汎用の熱可塑性樹脂に対してナノ～マイクロメートルオーダーの微細加工を施すことが可能であり、生産性にも優れた技術である。そして、既存の研究では、熱ナノインプリント法を用いて高アスペクト比のナノピラー構造体を形成した基材上において、抗体を高密度に固定化できることが示唆されている。しかしながら筆者が調べた限り、これまでに基材表面のナノ構造を制御したラテラルフローイムノアッセイデバイスの研究は報告されていなかった。

以上の点に着目して、本研究では、『熱ナノインプリント法によって作製した微細加工樹脂基材を適用することによって、ラテラルフローイムノアッセイにおける従来の課題を解決する実用的なプラットフォームを実現できるのではないか』と考えた。より具体的には、『熱ナノインプリント法を用いて均質なマイクロ・ナノ加工基材を作製し、抗体の固定化基材として組み込んだデバイスを開発することで、従来のデバイスと比較して検出感度や再現性を向上させることができるのではないか』、という仮説を立てた。

したがって本研究では、熱ナノインプリントで作製した微細加工基材がラテラルフローイムノアッセイに応用できるか検証すること、および、それを用いたシステムを構築すること、を主な目的とした。また検出方式としては、従来の視認による検出方式と比較して、より高感度な測定を可能とし、近年実用化も盛んに進められている蛍光検出方式を検討することとした。そして、構築したシステムの性能について、既存の研究と比

較してその有用性を評価することとした。また、産業への応用を鑑みて、できるだけ再現良く、高い生産性で作製することができる基材の開発を目指した。そのために、ナノインプリントに関する既存研究の多くで検討されているような複雑なナノ構造体を作製するのではなく、比較的作製しやすいマイクロ構造を一次構造として、その表面にナノ構造が二次構造として形成された、マイクロ・ナノ加工基材の作製を検討することとした。

また、基材表面のナノメートルサイズの構造が、ラテラルフローイムノアッセイの性能に決定的な影響を与えるのではないかと、という仮説の下、基材表面のナノトポロジー（ナノメートルスケールの形態）がラテラルフローイムノアッセイの性能に及ぼす効果について検証すること、さらにナノ構造を制御することによってラテラルフローイムノアッセイデバイスを高性能化すること、をもう一つの目的とした。

1-3. 本論文の構成

本論文は、以上の目的を達成するために実施した実験内容について主に記述するものであり、第1章～第4章の4つの章によって構成されている。

まず第1章では、本研究の背景および目的について記述した。

第2章では、熱ナノインプリント法を用いて作製した微細加工シート（以下、インプリントシートと呼ぶ）がラテラルフローイムノアッセイのための抗体固定化基材として適用できるかどうかを検証し、その上でインプリントシートを用いたラテラルフローイムノアッセイデバイスを構築すること、そして、その性能と有用性を評価することを目的とした。そのために、具体的にはまずインプリントシート上に抗体を十分に固定化できるかどうか、さらにまた、毛細管力によって液体を搬送できるかどうか、という2つの点について検証を行うこととした。そして、インプリントシートを組み込んだラテラルフローイムノアッセイデバイスを構築し、モデル検出物質の測定を行うことによって、その性能について評価し、既存の研究と比較することとした。実験において、まず基材の材料としてポリカーボネート（polycarbonate; PC）、ポリメチルメタクリレート（poly(methyl methacrylate); PMMA）、シクロオレフィンポリマー（cycloolefin polymer; COP）の3種類の汎用熱可塑性樹脂を検証し、ナノメートルスケールの粗さを有するマイクロコーン（微小円錐）構造がアレイ状に配列した表面構造を有するインプリントシートを作製した。次に各材料を用いて作製したインプリントシートに対する抗体の吸着性、および界面活性剤を含有する水溶液をインプリントシートに滴下した際の濡れ性を評価した。そしてインプリントシートと吸収パッドを組み合わせた試作デバイスを作製し、血液中に存在する炎症マーカータンパク質であるC反応性タンパク質（C-reactive protein; CRP）をモデル検出物質として用い、蛍光検出サンドイッチイムノアッセイを行うことで性能を評価した。最後に、構築したデバイスの性能について、既存の研究との比較を行った。

第3章では、基材表面のナノトポロジーが、抗体の吸着性やイムノアッセイの検出感度にもどのように影響するか検証すること、そして、表面のナノ構造を制御することによってラテラルフローイムノアッセイデバイスを高性能化できるか検証すること、を目的

とした。具体的には、まず表面のナノトポロジを意図的に変化させたインプリントシートを作製し、その形状および抗体の吸着性について検証することとした。そして、それぞれの構造を有したインプリントシートを用いてラテラルフローイムノアッセイデバイスを作製し、CRP をモデル検出物質として測定することで、アッセイの性能を評価し、表面ナノ構造の効果を考察することとした。実験において、まず金型の材料および加工方法を変えることで、マイクロコン表面のナノトポロジが異なる 3 種類の PC インプリントシートを作製した。次にシート断面を SEM により観察し、得られた SEM 像の画像を解析することによって表面のナノ構造のキャラクタリゼーションを行った。そして、作製したインプリントシートに対する抗体の吸着性の評価、および CRP を検出物質に用いた蛍光検出サンドイッチイムノアッセイを行い、その測定結果に基づいて表面ナノ構造の効果を考察した。

最後に、第 4 章では、本研究の総括を行い、本技術の有用性と今後の課題についてまとめることとした。

引用文献

- 1 H. Wang, M. Naghavi, C. Allen, R. M. Barber, A. Carter, D. C. Casey, F. J. Charlson, A. Z. Chen, M. M. Coates, M. Coggeshall et al., *Lancet*, 2016, **388**, 1459–1544.
- 2 J. L. Dieleman, M. Campbell, A. Chapin, E. Eldrenkamp, V. Y. Fan, A. Haakenstad, J. Kates, Z. Li, T. Matyas, A. Micah, A. Reynolds et al., *Lancet*, 2017, **389**, 2005–2030.
- 3 Z. Wang, M. Gerstein and M. Snyder, *Nat. Rev. Genet.*, 2009, **10**, 57–63.
- 4 E. C. Hayden, *Nature*, 2014, **507**, 294–295.
- 5 F. Tang, C. Barbacioru, Y. Wang, E. Nordman, C. Lee, N. Xu, X. Wang, J. Bodeau, B. B. Tuch, A. Siddiqui, K. Lao and M. A. Surani, *Nat. Methods*, 2009, **6**, 377–382.
- 6 A. A. Kolodziejczyk, J. K. Kim, V. Svensson, J. C. Marioni and S. A. Teichmann, *Mol. Cell*, 2015, **58**, 610–620.
- 7 J. Ker and L. Wang, *IEEE Access*, 2018, **6**, 9375–9389.
- 8 J. Kim, A. S. Campbell, B. E. De Ávila and J. Wang, *Nat. Biotechnol.*, 2019, **37**, 389–406.
- 9 A. J. Bandodkar and J. Wang, *Trends Biotechnol.*, 2014, **32**, 363–371.
- 10 S. Shrivastava, T. Q. Trung and N. Lee, *Chem. Soc. Rev.*, 2020, **49**, 1812–1866.
- 11 X. Ding, M. G. Mauk, K. Yin, K. Kadimisetty and C. Liu, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 655–672.
- 12 C. Dincer, R. Bruch, A. Kling, P. S. Dittrich and G. A. Urban, *Trends Biotechnol.*, 2017, **35**, 728–742.
- 13 W. Su, X. Gao, L. Jiang and J. Qin, *J. Chromatogr. A*, 2015, **1377**, 13–26.
- 14 横田浩充, 大久保滋夫, 標準臨床検査学 検査機器総論・検査管理総論, 医学書院, 2013, pp. 141–149.
- 15 松尾収二, 日本内科学会雑誌, 2011, **100**, 3175–3181.
- 16 西成田睦未, 臨床検査学教育, 2019, **11**, 54–57.
- 17 R. Banerjee and A. Jaiswal, *Analyst*, 2018, **143**, 1970–1996.
- 18 三田村敬子, インフルエンザ, 2018, **19**, 43–50.

- 19 C. W. Hamm, B. U. Goldmann, C. Heeschen, G. Kreymann, J. Berger and T. Meinertz, *N. Engl. J. Med.*, 1997, **337**, 1648–1653.
- 20 古川聡子, 河口勝憲, 前田ひとみ, 加瀬野節子, 小野公美, 上杉里枝, 通山薫, 医学検査, 2016, **65**, 332–336.
- 21 A. J. Karter, L. M. Ackerson, J. A. Darbinian, R. B. D. Agostino, A. Ferrara, J. Liu and J. V Selby, *Am. J. Med.*, 2001, **111**, 1–9.
- 22 International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas 9th Edition*, 2019.
- 23 T. Chard, *Hum. Reprod.*, 1992, **7**, 701–710.
- 24 J. Wang, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 814–825.
- 25 K. M. Koczula and A. Gallotta, *Essays Biochem.*, 2016, **60**, 111–120.
- 26 小林典裕, 上田宏, 三宅司郎, 荒川秀俊, 免疫測定法 基礎から先端まで, 講談社, 2014, pp. 1–21.
- 27 S. K. Vashist and J. H. T. Luong, in *Handbook of Immunoassay Technologies*, eds. S. K. Vashist and J. H. T. Luong, Elsevier Inc., 2018, pp. 1–18.
- 28 T. Tachi, N. Kaji, M. Tokeshi and Y. Baba, *Bunseki kagaku*, 2007, **56**, 521–534.
- 29 S. K. Vashist and J. H. T. Luong, in *Handbook of Immunoassay Technologies*, eds. S. K. Vashist and J. H. T. Luong, Elsevier Inc., 2018, pp. 97–127.
- 30 B. O’Farrell, in *Lateral Flow Immunoassay*, eds. R. C. Wong and H. Y. Tse, Humana press, 2009, pp. 1–33.
- 31 L. Mou and X. Jiang, *Adv. Healthc. Mater.*, 2017, **6**, 1601403.
- 32 A. W. Browne, L. Ramasamy, T. P. Cripe and C. H. Ahn, *Lab Chip*, 2011, **11**, 2440–2446.
- 33 A. H. C. Ng, U. Uddayasankar and A. R. Wheeler, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 991–1007.
- 34 N. Dhull, G. Kaur, V. Gupta and M. Tomar, *Sens. Actuators B Chem.*, 2019, **293**, 281–288.
- 35 E. B. Aydın and M. K. Sezgintürk, *Anal. Biochem.*, 2018, **554**, 44–52.
- 36 Y. Zhang and H. Noji, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 92–101.

- 37 S. Rosen, in *Lateral Flow Immunoassay*, eds. R. C. Wong and H. Y. Tse, Humana press, 2009, pp. 35–49.
- 38 小林典裕, 上田宏, 三宅司郎, 荒川秀俊, 免疫測定法 基礎から先端まで, 2014, pp. 167–173.
- 39 伊藤機一, 松尾収二, 標準臨床検査学 臨床検査総論, 医学書院, 2013, pp. 1–20.
- 40 D. A. Giljohann and C. A. Mirkin, *Nature*, 2009, **462**, 461–464.
- 41 S. H. Kim, S. Iwai, S. Araki, S. Sakakihara, R. Iino and H. Noji, *Lab Chip*, 2012, **12**, 4986–4991.
- 42 小林典裕, 上田宏, 三宅司郎, 荒川秀俊, 免疫測定法 基礎から先端まで, 2014, pp. 179–185.
- 43 N. Jiang, R. Ahmed, M. Damayantharan, B. Ünal, H. Butt and A. K. Yetisen, *Adv. Healthc. Mater.*, 2019, **8**, 1900244.
- 44 T. Mahmoudi, M. de la Guardia, B. Shirdel, A. Mokhtarzadeh and B. Baradaran, *Trends Anal. Chem.*, 2019, **116**, 13–30.
- 45 J. D. Bishop, H. V. Hsieh, D. J. Gasperino and B. H. Weigl, *Lab Chip*, 2019, **19**, 2486–2499.
- 46 E. B. Bahadır and M. K. Sezgintürk, *Trends Anal. Chem.*, 2016, **82**, 286–306.
- 47 Y. Cai, K. Kang, Y. Liu, Y. Wang and X. He, *Anal. Biochem.*, 2018, **556**, 129–135.
- 48 V. Borse and R. Srivastava, *Sensors Actuators B Chem.*, 2019, **280**, 24–33.
- 49 M. Ishi, P. Preechakasedkit, K. Yamada, O. Chailapakul, K. Suzuki and D. Citterio, *Anal. Sci.*, 2018, **34**, 51–56.
- 50 V. G. Panferov, I. V. Safenkova, Y. A. Varitsev, A. V. Zherdev and B. B. Dzantiev, *Microchim. Acta*, 2018, **185**, 25.
- 51 和田淳彦, 片田順, 恵良歩, ぶんせき, 2019, **2**, 69–75.
- 52 J. Deng, M. Yang, J. Wu, W. Zhang and X. Jiang, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 9132–9137.
- 53 G. R. Han, H. Ki and M. G. Kim, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, **12**, 1885–1894.
- 54 K. Mitamura, H. Shimizu, M. Yamazaki and M. Ichikawa, *J. Virol. Methods*, 2013, **194**, 123–128.

- 55 A. Wada, Y. Sakoda, T. Oyamada and H. Kida, *J. Virol. Methods*, 2011, **178**, 82–86.
- 56 K. Faulstich, R. Gruler, M. Eberhard, D. Lentzsch and K. Haberstroh, in *Lateral Flow Immunoassay*, ed. H. Y. T. Raphael C. Wong, Humana press, 2009, pp. 157–183.
- 57 E. Pilavaki and A. Demosthenous, *Sensors*, 2017, **17**, 2673.
- 58 K. G. Shah, V. Singh, P. C. Kauffman, K. Abe and P. Yager, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 6967–6974.
- 59 W. Jung, J. Han, J. W. Choi and C. H. Ahn, *Microelectron. Eng.*, 2015, **132**, 46–57.
- 60 M. A. Mansfield, in *Lateral Flow Immunoassay*, eds. R. C. Wong and H. Y. Tse, Humana press, 2009, pp. 95–113.
- 61 T. C. Tisone and B. O’Farrell, in *Lateral Flow Immunoassay*, eds. R. C. Wong and H. Y. Tse, Humana press, 2009, pp. 131–156.
- 62 A. L. Ahmad, S. C. Low, S. Abd. Shukor, A. Ismail and A. R. Sunarti, *Desalination Water Treat.*, 2009, **5**, 99–105.
- 63 A. L. Ahmad, S. C. Low, S. R. Abd Shukor and A. Ismail, *J. Appl. Membr. Sci. Technol.*, 2007, **5**, 25–31.
- 64 M. Hecke, W. Bacher and K. D. Müller, *Microsyst. Technol.*, 1998, **4**, 122–124.
- 65 U. M. Attia, S. Marson and J. R. Alcock, *Microfluid. Nanofluid.*, 2009, **7**, 1–28.
- 66 C. Jönsson, M. Aronsson, G. Rundström, C. Pettersson, I. Mendel-Hartvig, J. Bakker, E. Martinsson, B. Liedberg, B. MacCraith, O. Öhman and J. Melin, *Lab Chip*, 2008, **8**, 1191–1197.
- 67 J. Melin, G. Rundström, C. Peterson, J. Bakker, B. D. MacCraith, M. Read, O. Öhman and C. Jönsson, *Anal. Biochem.*, 2011, **409**, 7–13.
- 68 M. M. Dudek, T. L. Lindahl and A. J. Killard, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 2029–2035.
- 69 M. M. Dudek, R. P. Gandhiraman, C. Volcke, S. Daniels and A. J. Killard, *Plasma Process. Polym.*, 2009, **6**, 620–630.
- 70 M. Reth, *Nat. Immunol.*, 2013, **14**, 765–767.
- 71 S. Uchiyama, *Yakugaku Zasshi*, 2016, **136**, 443–448.
- 72 S. Y. Chou, P. R. Krauss and P. J. Renstrom, *Appl. Phys. Lett.*, 1995, **67**, 3114–3116.

- 73 S. Y. Chou, P. R. Krauss and P. J. Renstrom, *J. Vac. Sci. Technol. B*, 1996, **14**, 4129–4133.
- 74 L. J. Guo, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 495–513.
- 75 N. Kooy, K. Mohamed, L. T. Pin and O. S. Guan, *Nanoscale Res. Lett.*, 2014, **9**, 320.
- 76 S. H. Ahn and L. J. Guo, *ACS Nano*, 2009, **3**, 2304–2310.
- 77 S. H. Ahn and L. J. Guo, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 2044–2049.
- 78 松井真二, 精密工学会誌, 2010, **76**, 137–142.
- 79 S. H. Kim, K. D. Lee, J. Y. Kim, M. K. Kwon and S. J. Park, *Nanotechnology*, 2007, **18**, 055306.
- 80 A. Pepin, P. Youinou, V. Studer, A. Lebib and Y. Chen, *Microelectron. Eng.*, 2002, **61**, 927–932.
- 81 S. Nomura, H. Kojima, Y. Ohyabu, K. Kuwabara, A. Miyauchi and T. Uemura, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 2005, **44**, L1184.
- 82 A. Miyauchi, K. Kuwabara, M. Hasegawa and M. Ogino, *Appl. Phys. A*, 2016, **122**, 265.
- 83 K. Kuwabara, M. Ogino, T. Ando and A. Miyauchi, *Appl. Phys. Lett.*, 2008, **93**, 033904.
- 84 K. Tsougeni, P. S. Petrou, D. P. Papageorgiou, S. E. Kakabakos, A. Tserepi and E. Gogolides, *Sens. Actuators B Chem.*, 2012, **161**, 216–222.
- 85 V. C. Rucker, K. L. Havenstrite, B. A. Simmons, S. M. Sickafoose, A. E. Herr and R. Shediach, *Langmuir*, 2005, **21**, 7621–7625.
- 86 L. Song, J. Zhao, S. Luan, J. Ma, W. Ming and J. Yin, *J. Mater. Chem. B*, 2015, **3**, 7499–7502.
- 87 J. Ma, S. Luan, L. Song, J. Jin, S. Yuan, S. Yan, H. Yang, H. Shi and J. Yin, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 1971–1978.

第2章 インプリントシートを用いた

ラテラルフローイムノアッセイプラットフォームの構築

2-1. 緒言

2-1-1. 本章の目的

本章では、ナノインプリント技術を用いて微細加工を施した樹脂基材をラテラルフローイムノアッセイにおける抗体固定化基材として適用できるかどうか検証すること、そして、作製した基材を用いて蛍光検出方式のラテラルフローイムノアッセイデバイスを構築し、その性能について既存の研究と比較すること、を目的とした。また測定の再現性やデバイスの生産性を考慮して、煩雑な表面処理を必要とせず再現性の高い基材の作製法を検討することとした。本節では、本研究において利用する樹脂材料の選定、抗体固定化基材を作製するための本研究におけるアプローチ、および検出対象とする疾患マーカーについて順次説明する。

2-1-2. インプリント加工を施すための樹脂材料

まず、インプリント加工を施すための樹脂材料の選定について説明する。熱ナノインプリント法において、通常、材料としては主に熱可塑性樹脂が用いられる。汎用熱可塑性樹脂の中でも、ポリカーボネート (PC)、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、シクロオレフィンポリマー (COP) はマイクロ・ナノスケールの微細加工成形のための材料として用いられる代表例である¹⁻⁵。身近な例でいえば、PCは光学ディスクの材料として、PMMA、COPは光学レンズの材料として用いられている。これらの材料は加工性が高いだけでなく、透明性が高く、自家蛍光が低いといった利点を有しているため、生体物質を検出するためのマイクロ流体デバイスや微細加工基材の材料としても利用されている⁶。

なお、研究段階においては、熱硬化性樹脂であるポリジメチルシロキサン（PDMS）を用いてマイクロ流体デバイスや微細加工基材を作製することが多い²⁷。しかしながらPDMSには、材料コストが比較的高いこと、大量生産のための設備が十分に開発されていないこと、などの課題がある。それに対して、上述した熱可塑性樹脂は、材料コストが低く、大量生産のためのプロセス開発も進んでいるため、実用的な材料であるといえる。

以上を踏まえて本研究では、熱ナノインプリント加工を施す樹脂材料として、PC、PMMA、COPの3種類の熱可塑性樹脂を用いることとした。

2-1-3. 抗体固定化基材を作製するための本研究のアプローチ

上述した樹脂材料に対して微細加工を施し、ラテラルフローイムノアッセイのための抗体固定化基材として利用するためには、加工した基材表面に抗体を十分に固定化できること、および、毛細管力によって水溶液を搬送できること、という2点を実証する必要がある。加工における再現性を担保しつつ、基材に対して化学的な表面処理を行うことなくこれらを実現するための本研究におけるアプローチについて、以下に説明する。

イムノアッセイを行うために十分な量の抗体を基材上に固定化し、高効率で抗原と反応させるためには、基材上に微小な構造体を形成することが有効であると考えられる。例えば、マイクロ流体デバイスを利用したイムノアッセイや希少細胞の捕捉に関する研究では、基材の比表面積を向上させて抗体を高効率に固定化するために、デバイス中にマイクロスケールの構造体を作製することが一般的である。

さらに、構造体を密に配置することによって、構造体に固定した抗体と、抗原や細胞などの検出対象物質が衝突する確率を高め、検出対象物質を効率的に捕捉することが可能となる。構造体の具体的な形状として、マイクロピラー構造をアレイ状に配列させたものが用いられることが多く、そのような構造を組み込んだマイクロ流体デバイスを利用した、炎症マーカータンパク質や血中循環がん細胞などの高効率な捕捉と検出に関する研究が報告されている⁸⁻¹⁰。これらの研究において、マイクロピラー構造は、光硬化性樹脂を利用したフォトリソグラフィや、フォトリソグラフィとモールドイングを組み合わせた手法によって作製されることが多い。

一方で、熱ナノインプリント法によってマイクロピラー構造を再現良く作製することは容易ではなく、そのような報告例も限定的である。その理由として、高さ方向に一様な断面を有するマイクロピラー構造を作製する場合、金型から樹脂を離型する際の抵抗力が大きいため、構造に欠損が生じやすい、という点が挙げられる。特に、マイクロピラー同士を高密度に配置する場合、構造に欠損が生じるリスクが増大する。

それに対して、構造体の上部になるほど、その径が細くなる傾斜構造の場合は、金型からの離型性が良く、構造体に欠損が生じにくいと考えられる。したがって、再現良く微小な構造体を作製するためには、ピラー構造を傾斜させたコーン（円錐）構造が適していると考え、本研究ではマイクロコーン構造がアレイ状に配列した構造（以下、マイクロコーンアレイ構造と表記する）を有する樹脂シートの作製を検討することとした。

さらに基材の比表面積をより向上させるために、マイクロコーン構造を1次構造として、その表面にナノスケールの凹凸構造を2次構造として有する、階層的なマイクロ/ナノ構造体を作製することが有効ではないか、と考えた。樹脂基材上にそのような階層構造体を作製する方法として、光硬化性樹脂材料に対して、その硬化性を制御しながら複数回の紫外線照射を実施する手法が報告されている¹¹。しかしながら、この方法を用いて作製された2次構造の大きさは数百 nm 程度と比較的大きく、さらにこの方法には加工プロセスが煩雑であり精密な条件制御を必要とする、というデメリットがある。

そのため本研究では、熱ナノインプリント法を用いて、ワンステップで簡便に階層的なマイクロ/ナノ構造体を作製することができないか検討することとした。ナノインプリント法を用いてマイクロ構造およびナノ構造を一括で成型加工するためには、対応する形状を有した金型が必要となる。つまり、マイクロスケールの微小穴の表面にナノスケールの形状が形成された金型が必要となる。

そのような形状を金属表面に形成できる加工技術として、レーザーアブレーション法に着目した¹²。レーザー加工は、金属、ガラス、ポリマーなど様々な材料に対する微細加工技術として、広く用いられてきた。特に近年、フェムト秒程度 (<10⁻¹³ 秒) の極めて短いパルス幅を有するレーザーを用いたアブレーション加工によって、材料表面にナノスケールの構造が形成されることが報告されており、超撥水性材料の作製などに応用されている^{12,13}。

そこで、レーザーアブレーション法によって加工した金型を用いて、樹脂シートに熱ナノインプリント加工を施すことで、表面にマイクロ/ナノ構造体を有する基材を作製できるのではないかと考え、本研究において検討を行うこととした。なお筆者が調べた限り、レーザーアブレーション加工を用いた金型の作製とナノインプリント法を組み合わせ、樹脂基材上に階層的なマイクロ/ナノ構造を作製したという研究例は、これまでに報告されていない。そのため、新規の微細加工プロセスを開発するという観点からも、本検討を行う意義は大きいと考えた。

次に、基材表面において水溶液を毛細管力によって搬送するためのアプローチについて説明する。疎水性の樹脂基材上において水溶液を搬送するためには、基材表面にシラン-デキストラン処理、高分子電解質のコーティング、プラズマ処理、UV/オゾン処理などの各種表面処理を施すことが一般的である¹⁴。しかしながら、前述したように、基材に対してこのような化学的な表面処理を行うことは、測定の再現性や基材の生産性を考慮すると望ましくはない。

そこで樹脂基材に対して化学的な表面処理を施すのではなく、搬送する水溶液に対して界面活性剤を添加することによって表面張力を下げ、基材に対する濡れ性を向上させることが有効ではないか、と考えた。したがって本研究では、作製した基材上に界面活性剤を含む水溶液を滴下し、その濡れ性を接触角測定によって評価した上で、ラテラルフローイムノアッセイにおける抗原や抗体の搬送用水溶液として適用することとした。

2-1-4. デバイスの性能を評価するための検出対象物質

次に、試作デバイスの性能評価のために用いる検出対象物質 (=疾患マーカーとなる抗原) について説明する。本研究では、検出対象物質として、C 反応性タンパク質 (CRP) を用いることとした。CRP はヒト血清中に存在する炎症マーカータンパク質であり、細菌感染症、ウイルス感染症、心筋梗塞、悪性腫瘍などの疾病が生じた際に、その血中濃度が上昇することが知られている¹⁵⁻¹⁷。ヒト CRP は、206 のアミノ酸からなる同一のサブユニット 5 個が環状に配列した 5 員環構造をとっており、5 員環全体の分子量は約 115,000 (1 つのユニットの分子量が約 23,000)^{18,19}、外径は約 11.1 nm、中心に存在する孔の直径は約 3.5 nm である²⁰。CRP は一般の血液検査においても測定の対象となって

おり、その臨床的閾値は $3\sim 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ である。つまり、血液中の CRP 濃度が $3\sim 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 以上となった時に、上述した疾病に起因する炎症が生じていることが疑われる。

したがって実用的な観点から、濃度 $3\sim 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ の CRP を含む試料に含まれる CRP を検出できるかどうかということを、デバイスの実用性を評価するための本研究における一つの判断基準とした。実際に CRP は、ラテラルフローイムノアッセイやマイクロ流体デバイスを用いたイムノアッセイに関する多くの研究において、検出感度を評価するための標準的なサンプルとして用いられている¹⁷。そのため、本研究で構築したデバイスの性能を他の研究と比較するという観点においても、CRP は検出対象物質として適していると考えた。

また構築したデバイスの性能を正確に評価するために、ヒト血清中に一定量の CRP を添加した試料を用いて測定を実施することとした。ヒト血清には、約 10,000 種類のタンパク質が、濃度 $60\sim 80 \text{mg mL}^{-1}$ 程度存在している²¹。そのような様々なタンパク質が混在している複雑な検体中において、目的とする微量の検出対象物質を検出できるかどうか確認することは、測定の信頼性を評価する上で重要であると判断した。

2-1-5. 検討内容

上述した観点を踏まえて、本章では熱ナノインプリントで作製した微細加工樹脂シート（インプリントシート）を用いて、ラテラルフローイムノアッセイプラットフォームの構築とその性能評価を検討した。

具体的には、まず、PC、PMMA、COP の 3 種類の熱可塑性樹脂に対して、レーザーアブレーション法によって作製した金型を用いて熱ナノインプリントを実施することで、表面にナノスケールの粗さを有するマイクロコーン構造（直径 $30 \mu\text{m}$ 、高さ $30 \mu\text{m}$ ）がアレイ状に配列したインプリントシートの作製を検討した。その際、マイクロコーンの幾何学的配置が抗体の吸着性に及ぼす影響を調べるために、マイクロコーンの中心間距離を変化させた 3 種類の構造を作製することとした。

次に、それぞれの材料を用いて作製したインプリントシートに対して、蒸留水および界面活性剤を含む水溶液を滴下した際の濡れ性、および抗体の吸着性をそれぞれ評価することによって、これらのインプリントシートが抗体固定化基材として有用であるかど

うか検証した。そして各インプリントシートと吸収パッドを組み合わせた試作デバイスを作製し (Fig. 2-1 (a)), CRP を含む緩衝液および CRP を含む血清をそれぞれ試料液として用いて蛍光検出サンドイッチ免疫アッセイを行うことで, デバイスの検出感度を評価した。

以上の結果について, ラテラルフロー免疫アッセイおよびマイクロ流体デバイスを用いた免疫アッセイに関する既存の研究と比較することによって, 作製したデバイスの利点と課題を明らかにすることとした。

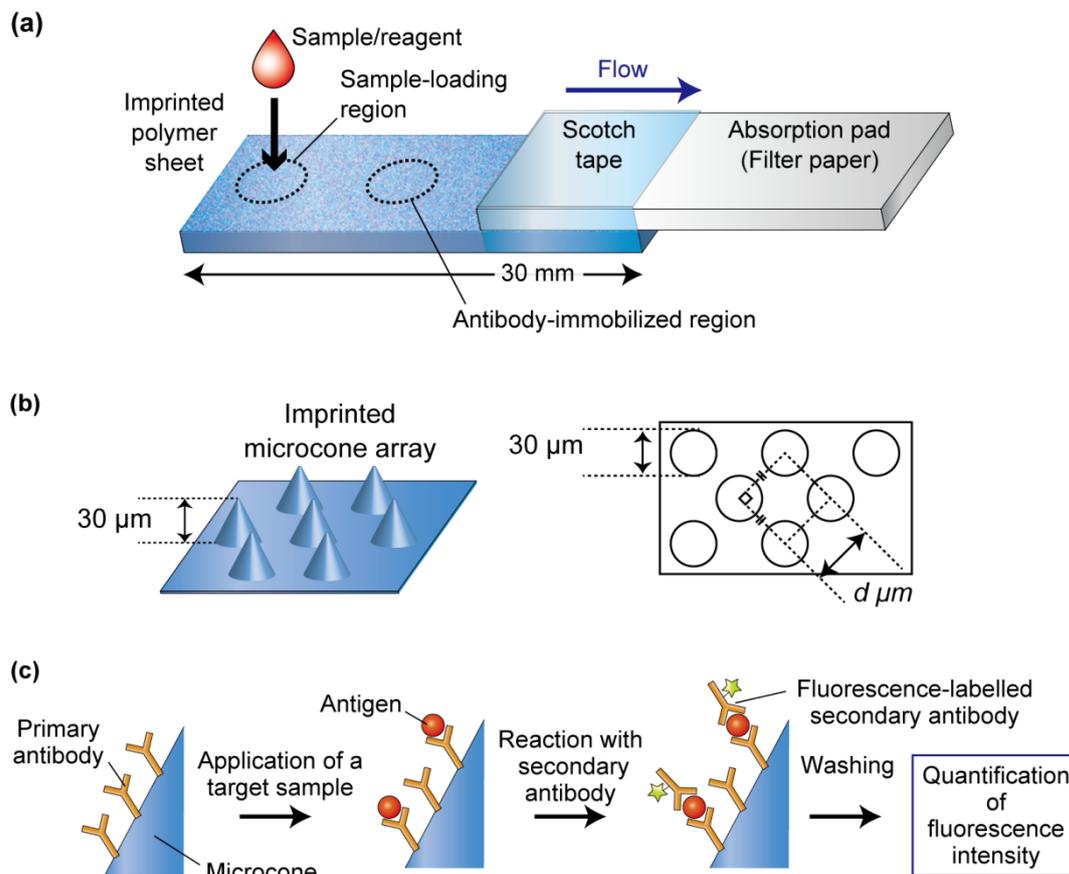


Fig. 2-1 (a) 本研究で提案する，インプリントシートを用いたラテラルフロー免疫ノアッセイデバイスの模式図。このデバイスは，マイクロコーンアレイ構造が形成されたインプリントシートと吸収パッドによって構成されている。なおマイクロコーンアレイ構造の上面は，開放系となっている。(b) マイクロコーンアレイ構造の形状。 d は最も近接するマイクロコーンの中心間距離を表しており，48, 60, 80 μm の3種類を検討した。(c) 本デバイスを用いた蛍光検出サンドイッチ免疫アッセイの手順を示した模式図 (Adapted from Ref. 22 with permission from the Royal Society of Chemistry.)

2-2. 実験方法

2-2-1. 熱ナノインプリント

Fig. 2-1 に、本研究で提案するインプリントシートを用いたラテラルフロー免疫アッセイデバイスの概念図と、測定の手順を表した模式図を示す。厚さ約 200 μm の PC シート（帝人フロンティア株式会社，日本，ガラス転移温度; $T_g = 160^\circ\text{C}$ ），PMMA シート（住化アクリル販売株式会社，日本， $T_g = 125^\circ\text{C}$ ），COP シート（日本ゼオン株式会社，日本， $T_g = 145^\circ\text{C}$ ）を熱ナノインプリントのための樹脂材料として，それぞれ用いた。これらの樹脂シート上に Fig. 2-1 (b) に示すマイクロコーン構造を形成するために，円錐形状の微小穴（直径 30 μm ，深さ 30 μm ）がアレイ状に配列した金型（アルミニウム合金製）を用いた。マイクロコーン構造の幾何学的配置を変えた形状を作製するために，微小穴の中心間距離 d を 48, 60, 80 μm と変化させた 3 種類の金型を用いた。これらの金型はいずれも東成エレクトロビーム株式会社（日本）によって，レーザーアブレーション法を用いて作製されたものである。微小穴の配列は，水溶液の流れ方向に対して，菱形状となるように設計した。それぞれの金型に対して，以下の手順で離型処理を施し，インプリント加工に用いた。まず金型をフッ素系離型剤（オプツール HD-2100，ダイキン工業，日本）に 1 分間浸漬し，引き上げた後，室温で 12 時間以上放置した。次に，金型表面の余分な離型剤をリンス剤（オプツール HD-TH，ダイキン工業）を用いて洗浄し，その後，室温で数分程度乾燥した。

熱ナノインプリント加工は，Fig. 2-2 に示す熱ナノインプリント装置（X300，SCIVAX 株式会社，日本）を用いて次の手順で行った。(1) ポリマーシートを，金型とアルミニウム製の平板の間に配置した（Fig. 2-3）。(2) 約 0.02 MPa の圧力でプレ加圧を行った。(3) 装置内を加圧温度（PC : 185°C ，PMMA : 140°C ，COP : 155°C ）まで加熱し，そのまま 3 分間維持した。(4) 金型とシートを 5.5 MPa で 3 分間加圧した。(5) 装置内部を所定の温度（PC : 140°C ，PMMA : 90°C ，COP : 110°C ）まで冷却し，そのまま 3 分間維持した。(6) 圧力を解放し，装置内部を室温まで冷却した後，シートと金型を取り出した。(7) 金型からインプリントシートを離型した。この一連のプロセスの概略図を，Fig. 2-4 に示す。

以上の方法を用いて、マイクロコーンの中心間距離 d をそれぞれ 48, 60, 80 μm としたインプリントシートを作製した。以下、これらのシートをそれぞれ d -48 構造, d -60 構造, d -80 構造と表記する。作製したインプリントシートは, 30 mm \times 30 mm の範囲に加工が施されており, それを 5 mm \times 30 mm のストリップ形状にカットした試料を, 以下の各評価およびアッセイにおいて使用した。



Fig. 2-2 熱ナノインプリント装置の外観

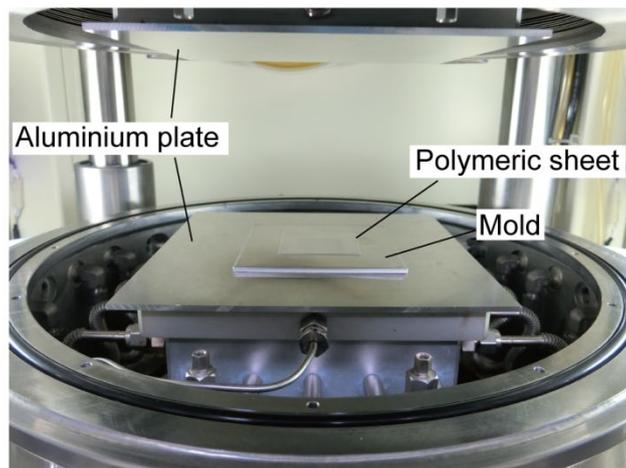


Fig. 2-3 試料ステージ内の配置

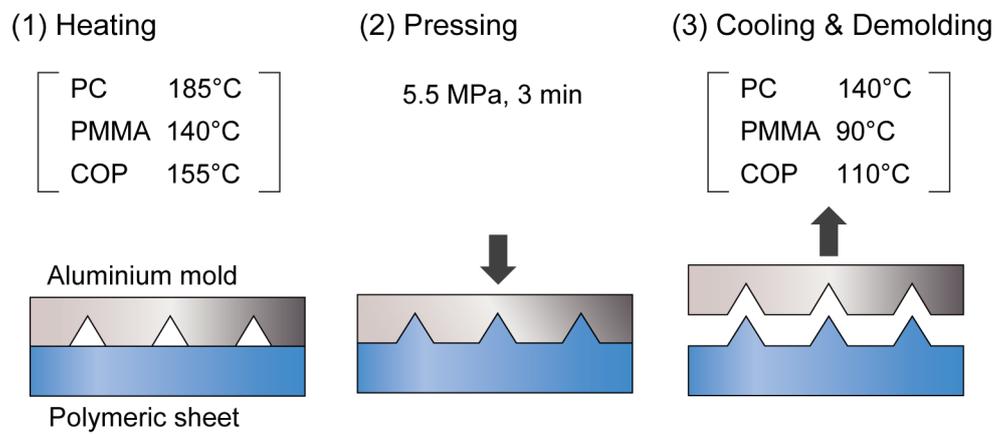


Fig. 2-4 熱ナノインプリントによる加工の手順と加工条件

2-2-2. インプリントシートの評価

インプリントシート上に形成された構造およびその表面形態を、走査電子顕微鏡 (scanning microscopy; SEM, JSM-7001F, 日本電子株式会社, 日本) を用いて観察した。インプリントシート表面に対して、あらかじめオスミウムコーター (HPC-30W, 株式会社真空デバイス, 日本) を用いて導電処理を施した。

インプリント加工を施す前のシート (以下, フラットシートと表記する) およびインプリントシートの静的接触角を, 接触角測定装置 (OCA 20, 英弘精機株式会社, 日本) を用いて測定した。なお, 室温下で本測定を行った。蒸留水または 2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) 水溶液の液滴 (体積 2 μL) を各シート表面に滴下して, 10 秒後にシート上の液滴を撮影した。撮影した液滴の画像を, 解析ソフトウェア (SCA 20, 英弘精機株式会社, 日本) を用いて解析することによって, 接触角を算出した。各サンプルに対してそれぞれ 3 回測定を行い, その平均値を算出した。

次に, 各シートに対する抗体の吸着試験を, 以下の手順で行った。Fig. 2-5 に, その手順を模式的に表した図を示す。対照として使用したフラットシート, および, インプリントシートを 5 mm \times 30 mm のストリップ形状にカットしたものを, それぞれ評価用サンプルとして用いた。FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識抗ヒト CRP 抗体 (goat, polyclonal, Bethyl Laboratories, USA) を 50 mM Tris-HCl (ナカライテスク株式会社, 日本) および 2% (w/v) トレハロース (富士フイルム和光純薬株式会社, 日本) を含む水溶液 (pH = 7.5) に添加し, 抗体濃度 0.1 mg mL⁻¹ の抗体溶液を調製した。マイクロピペットを用いて, 調製した抗体溶液の液滴 (体積 1 μL) をそれぞれのシートの表面に円形に塗布した後, 45 °C で 1 時間乾燥させた。なおトレハロースは, 乾燥状態においても抗体の活性を保持するために添加したものである。その後, シートを抗原の搬送/洗浄用の緩衝液 (2% Triton X-100 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)) に浸漬し, 超音波で 5 分間処理することによって, シートに吸着していない余分な抗体を洗浄した。なおこの洗浄操作において, 洗浄用水溶液をシートに単に滴下する方法ではなく, 超音波による洗浄方法を用いた理由は, 対照として用いたフラットシート表面では毛細管流れが生じず, その表面を十分に洗浄することが難しいためである。

次に、洗浄後のシートにエアを吹き付けることで、シートを十分に乾燥させた。乾燥させたシートをスライドガラスに貼り付け、蛍光顕微鏡（BZ-X710，株式会社キーエンス，日本）を用いて、各シートにおける抗体溶液の塗布領域を観察した。抗体塗布領域（ $\Phi = \sim 1 \text{ mm}$ ）の中心部を解析領域（円形状， $\Phi = 800 \mu\text{m}$ ）として、励起波長 450~490 nm，蛍光波長 500~550 nm の条件において，平均蛍光強度を算出した。シート上の抗体が固定化されていない領域を，同様に解析することによって算出したバックグラウンドの蛍光強度を，抗体塗布領域の蛍光強度から差し引いた値を評価値とした。以上の試験を，各シートに対して 3 回ずつ繰り返した。

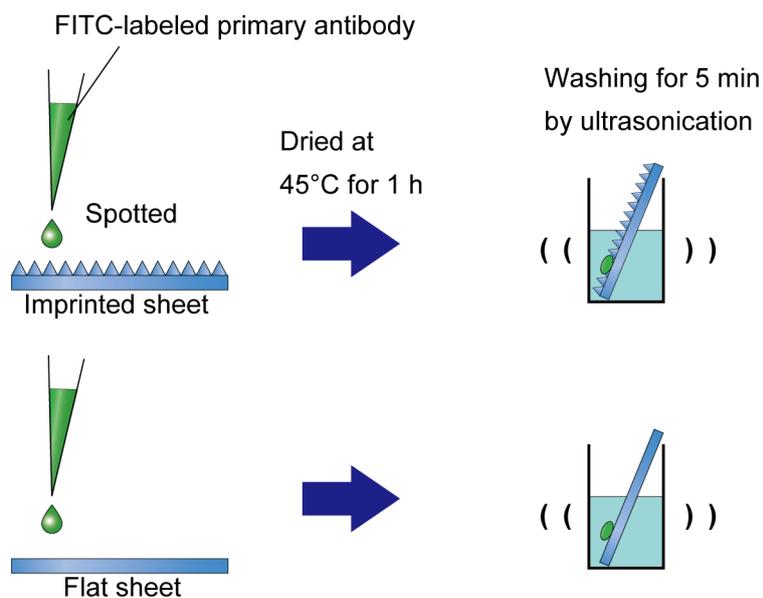


Fig. 2-5 インプリントシートおよびフラットシートに対する抗体吸着試験の手順

2-2-3. イムノアッセイ

非標識抗ヒト CRP 抗体 (goat, polyclonal, Bethyl Laboratories, USA) を 50 mM Tris-HCl および 2% (w/v) トレハロースを含む水溶液に添加し、抗体濃度 0.1 mg mL^{-1} の一次抗体溶液を調製した。マイクロピペットを用いて、調製した一次抗体溶液の液滴 (体積 $1 \mu\text{L}$) を、それぞれのインプリントシート ($5 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$ のストリップ) 上に円形に塗布した後、 45°C で 1 時間乾燥させた。乾燥後のインプリントシートと、 $5 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$ のストリップ形状にカットした吸収パッド (アイオン株式会社, 日本) を重ねあわせ、テープを用いて固定化することで、Fig. 2-1 (a) に示すラテラルフローイムノアッセイデバイスを作製した。

作製したデバイスを用いた蛍光検出サンドイッチイムノアッセイの手順を、Fig. 2-1 (c) に示す。ヒト CRP (BBI Solutions, UK) を、搬送/洗浄用緩衝液 (2% Triton X-100/PBS) を用いて希釈して、濃度 $0.1, 1, 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ の標準 CRP 試料液を調製した。また CRP を含まない搬送/洗浄用緩衝液 (2% Triton X-100/PBS) を、ネガティブコントロールとして用いて blank 試験を行った。

操作としては、初めに、搬送/洗浄用緩衝液 $10 \mu\text{L}$ をインプリントシートの端部 (サンプル滴下領域) に滴下し、毛細管力によって搬送/洗浄用緩衝液を流すことでシート上に固定されていない余剰な一次抗体を洗浄した。次に、調製した標準 CRP 試料液 $10 \mu\text{L}$ を滴下した後、10 分間室温でインキュベーションした。その後、搬送/洗浄用緩衝液を用いて希釈した FITC 標識抗ヒト CRP 抗体溶液 (抗体濃度 $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) $10 \mu\text{L}$ を滴下し、この操作をさらに 2 回繰り返した。最後に搬送/洗浄用緩衝液 $10 \mu\text{L}$ を再度滴下し、シート上に残存する余剰な抗原および抗体を洗浄した。2-2-2 項に示した抗体吸着試験と同様に、蛍光顕微鏡を用いて抗体塗布領域の観察、撮影、および蛍光強度の解析を行った。各条件において 3 回ずつ測定を繰り返した。

次に、ヒト血清に CRP を添加したサンプルを対象としてイムノアッセイを行った。あらかじめ CRP の枯渇化処理を施した標準ヒト血清 (Lot No. 3620-20, BBI Solutions, UK) に対して、一定量のヒト CRP を添加することによって、濃度 $0.1, 1, 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ の標準 CRP 血清を調製した。調製した標準 CRP 血清および CRP を添加していない標準血清を、それぞれ 4% Triton X-100/PBS と等量混合して 2 倍に希釈し、デバイスに滴下するため

の試料液とした。上述の手順と同様に、イムノアッセイを行った。各条件において4回ずつ測定を繰り返した。

2-3. 結果と考察

2-3-1. インプリントシートの作製およびマイクロコーン構造の観察

本研究では、PC、PMMA、COP の 3 種類の熱可塑性樹脂シートに対して、熱ナノインプリント加工を施し、シートの表面にマイクロコーン構造 (直径 30 μm , 高さ 30 μm) がアレイ状に配列したインプリントシートを作製した。

作製したインプリントシート (PC, d -48 構造) の外観を Fig. 2-6 に示す。中央の白色の領域がインプリント加工を施した領域であり、その表面にはマイクロコーン構造が形成されている。PC を用いて作製した、中心間距離が異なる 3 種類のマイクロコーンアレイ構造 (d -48 構造, d -60 構造, d -80 構造), および PMMA, COP を用いて作製したマイクロコーンアレイ構造 (どちらも d -48 構造のみ) の SEM 像を Fig. 2-7 に示す。これら 3 種類すべての材料において、マイクロコーン構造が形成されていることが確認された。どの材料を使用した際にも、マイクロコーンの表面には、ナノメートルスケールの凹凸が観察され、これらのシートが高い比表面積を有していることが示唆された。特に、3 種類すべての材料において、形成されたマイクロコーンの表面におけるナノメートルスケールの形態はほぼ同一のものであり、この結果から、本研究において採用した熱ナノインプリント法が微細構造の形成において極めて高い再現性を有していることが示唆された。なお、これらの微小構造がほぼ同一であったことから、レーザーアブレーション加工によって金型の表面に形成されたナノ構造が、樹脂シートの表面に精密に転写されたものと考えられる。

以上の結果から、レーザーアブレーション加工によって作製した金型と熱ナノインプリント法を組み合わせることで、表面にナノメートルスケールの粗さを有するマイクロコーン構造を作製できることが実証された。

なお今回作製した微小構造は、マイクロコーン構造を 1 次構造としつつ、その表面にナノスケールの凹凸構造を 2 次構造として有する、階層的なマイクロ/ナノ構造体であるともいえる。このような階層的なマイクロ/ナノ構造体を作製するための既存の方法として、マルチプレックスリソグラフィー¹¹ や、フォトリソグラフィーとエッチングを組み合わせた手法²³ が報告されているが、いずれも 2 段階以上の煩雑な加工プロセスを

必要とする。それに対して本手法は、1回の加工プロセスで階層的なマイクロ/ナノ構造体を作製できるため、簡便な手法である。また温度条件を変更するだけで、様々な熱可塑性樹脂に対してマイクロ/ナノ構造体を作製できることが実証されたことから、本手法の汎用性は高いといえる。さらに、金型表面のナノ構造を変化させることによって、表面形態を制御したマイクロコーン構造が作製できることも示唆された。なお、マイクロコーン表面のナノ構造の制御および作製したナノ構造の形状評価については、第3章においてより詳細に検討した。

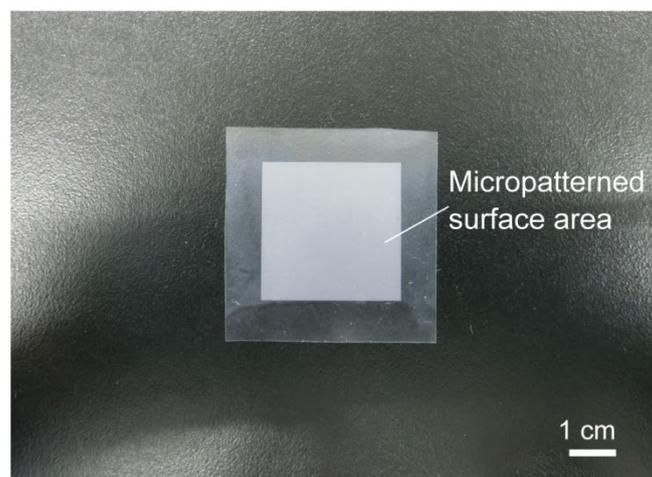


Fig. 2-6 インプリントシートの外観 (PC, d -48 構造)

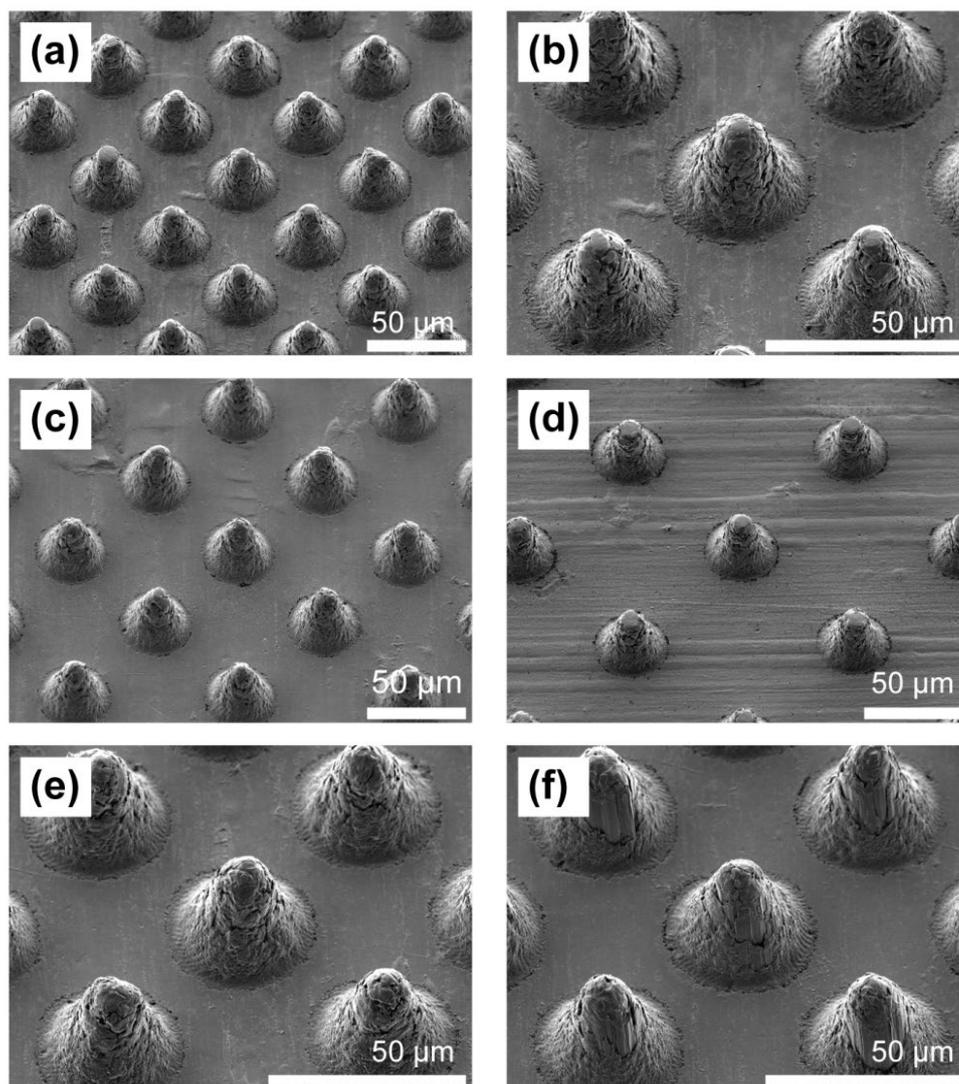


Fig. 2-7 マイクロコーン構造の SEM 像 (a, b) PC, *d*-48 構造 (c) PC, *d*-60 構造 (d) PC, *d*-80 構造 (e) PMMA, *d*-48 構造 (f) COP, *d*-48 構造 (Adapted from Ref. 22 with permission from the Royal Society of Chemistry.)

次に、熱ナノインプリント法によって作製したマイクロコーン構造が、1枚のシート内において均質に作製できているかどうか、また、製造ロットが異なるシート間において再現良く作製できているかどうかについて、それぞれ検証を行った。

製造ロットが異なる2枚のインプリントシート (30 mm × 30 mm) を観察用の試料として用い、SEM によってその中央部と端部をそれぞれ観察した。それらの SEM 像を Fig. 2-8 に示す。1枚目 (製造ロット1) のシートの中央部と端部、および2枚目 (製造ロット2) のシートの中央部と端部において、いずれも極めて類似した形態を有するマイクロコーン構造が観察され、形成された部位および製造ロットに依存した差異は観察されなかった。この結果から、作製したマイクロコーン構造は、1枚のシート内 (製造ロット内) において均質性が高いばかりでなく、さらに製造ロットが異なるシート (製造ロット間) においても再現良く作製できることが確認された。

以上の結果から、熱ナノインプリント法によって、樹脂シート上に均質な微細構造を、くり返し再現良く作製できることが示された。ただし、今回利用した金型の加工範囲は 30 mm × 30 mm であり、その面積は比較的小さいため、イムノアッセイデバイスを大量に生産する上では不十分である。したがって、実応用を目指してインプリントシートの生産性を上げるためには、今後、より加工面積が大きい平板金型を用いたインプリントシートの作製、またはローラー方式のナノインプリント装置を用いた連続加工プロセスの検討などが必要になると考えられる。

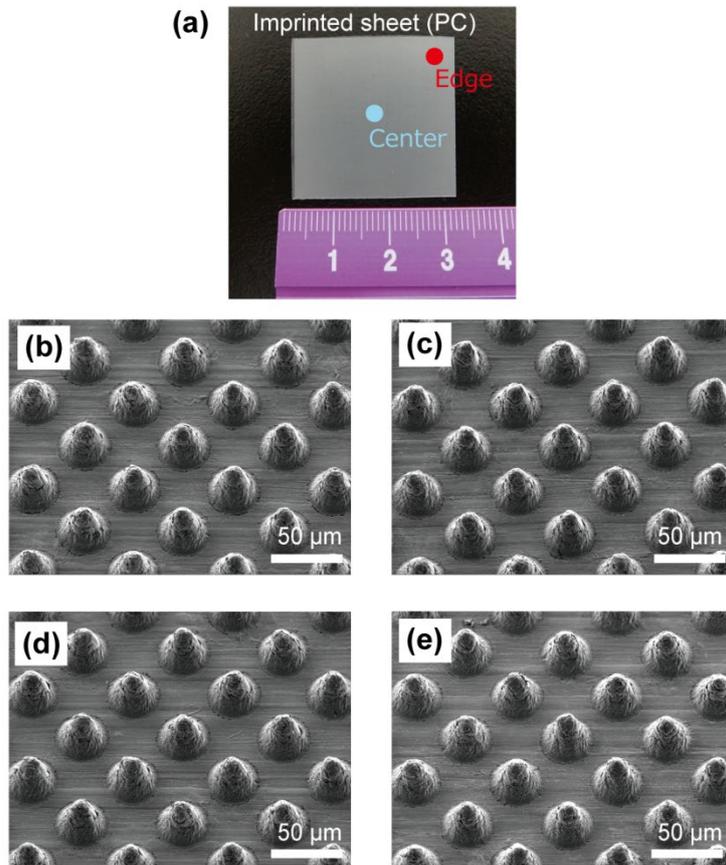


Fig. 2-8 製造ロットが異なる2枚のインプリントシートの観察 (a) インプリントシートの観察位置を表した画像 (b-e) PC, $d=48$ 構造のSEM像 (b) 1枚目 (製造ロット1)の中央部 (c) 製造ロット1の端部 (d) 2枚目 (製造ロット2)の中央部 (e) 製造ロット2の端部

2-3-2. 接触角測定

ラテラルフローイムノアッセイシステムにおいて、水溶液の流れを制御することは、測定の結果に関わる重要な機能の一つである²⁴。熱ナノインプリント法によって形成した微細構造の隙間に水溶液（試料液および洗浄液）を流し、抗体固定部に対して抗原を効率的に搬送するためには、シート上において毛細管流れを発生させる必要がある。本研究では、インプリントシート上に化学的な表面処理を施すことなく水溶液をスムーズに搬送させるために、水溶液に対して界面活性剤（Triton X-100）を添加することによって、インプリントシートに対する水溶液の濡れ性を向上させることとした。本項では、インプリントシート上に蒸留水、または界面活性剤を添加した蒸留水を滴下し、その濡れ性を接触角測定によって評価した。

PC, PMMA, COP のフラットシート、およびインプリントシート (*d*-48 構造) に対する接触角の測定結果を、Fig. 2-9 に示す。蒸留水および 2% Triton X-100 水溶液を評価用の液体として、それぞれ用いた。3 種類すべてのフラットシートに対する、蒸留水の接触角は 90~95°であった (Fig. 2-9 (b))。この結果は、今回使用した 3 種類の樹脂材料が比較的疎水的な表面を有していることを示している。一方で、3 種類の材料を用いて作製されたインプリントシートに対する蒸留水の接触角は 100~115°であり、フラットシートと比較して大きくなった。インプリントシート上に形成されたマイクロコーン構造の効果によって、見かけの接触角が大きくなったものと考えられる。撥水性を示す材料の表面に周期的なマイクロ構造およびナノ構造を形成した場合、元の平滑な表面と比較して、見かけの接触角が大きくなるという傾向は、固体の濡れ性に関する理論モデルである Wenzel モデル、および Cassie-Baxter モデルによっても説明されており²⁵、本実験の結果はこれらのモデルと定性的に一致している。

一方で、界面活性剤を含む水溶液を滴下した際、すべてのフラットシート、およびインプリントシートにおいて接触角は大きく低下した。Fig. 2-9 (c) に示すように、フラットシートの接触角は 20~30°であり、さらにインプリントシートでは測定できなくなるほど (10°未満)、接触角は劇的に低下した。撥水性を示す微細構造上に濃度を変えた Triton X-100 水溶液を添加し、その濡れ性を評価した先行研究において、臨界ミセル濃度 (critical micelle concentration; CMC) 以上の Triton X-100 水溶液を滴下すると、接触

角が大きく低下し、水溶液が濡れ広がることが報告されている²⁶。その要因としては、気液界面と比較して数倍の量の界面活性剤分子が、固液界面に対して選択的に吸着するためであると考察されている。本実験では、CMC (~0.02%) と比較して十分に濃度が高い 2% Triton X-100 を用いた。したがって、上述の研究と同様の効果によって、本実験においても接触角が大きく低下したものと考えられる。

また特筆すべき点として、蒸留水と界面活性剤を含む水溶液で、表面の微細構造に対する接触角の変化が逆になったことが挙げられる。具体的には、まず評価用の液体として蒸留水を用いた場合、インプリントシートに対する接触角はフラットシートに対する接触角よりも大きい値を示した。しかし一方で、2% Triton X-100 水溶液を用いた場合には、その反対に、インプリントシートに対する接触角のほうが小さい値を示し、大小の関係が逆転した。この結果については、粗さを有する材料表面における濡れ性の関係を表した、以下の Wenzel の式²⁵によって理解することができる。

$$\cos\theta_w = r \cos\theta$$

ここで、 θ_w は粗化表面における見かけの接触角、 θ は平滑表面における接触角、 r は表面粗さ係数をそれぞれ表す。表面粗さ係数は、固体表面における実際の表面積を、垂直方向からの投影表面積で除した値であり、粗面において $r > 1$ となる。このとき、 $\theta > 90^\circ$ の場合 $\theta_w > \theta$ という関係が、 $\theta < 90^\circ$ の場合 $\theta_w < \theta$ という関係が、それぞれ成立する。つまり平滑表面に対して濡れにくい液体は、粗面加工を施した表面において、より一層濡れにくくなり接触角が増大する。一方で、平滑表面に対して濡れやすい液体は、粗面加工を施した表面において、より一層濡れやすくなり接触角が減少する、ということを示している。

今回の実験において、蒸留水を用いた場合、フラットシート（平滑面）に対する接触角は 90° より大きく、疎水性を示したため、インプリントシート（粗面）においてはさらに濡れにくくなったということが理解できる。一方で 2% Triton X-100 水溶液を用いた場合には、フラットシート（平滑面）に対する接触角は 90° より小さい、つまり濡れやすいため、結果としてインプリントシート（粗面）においてはさらに濡れやすくなったものと考えられる。

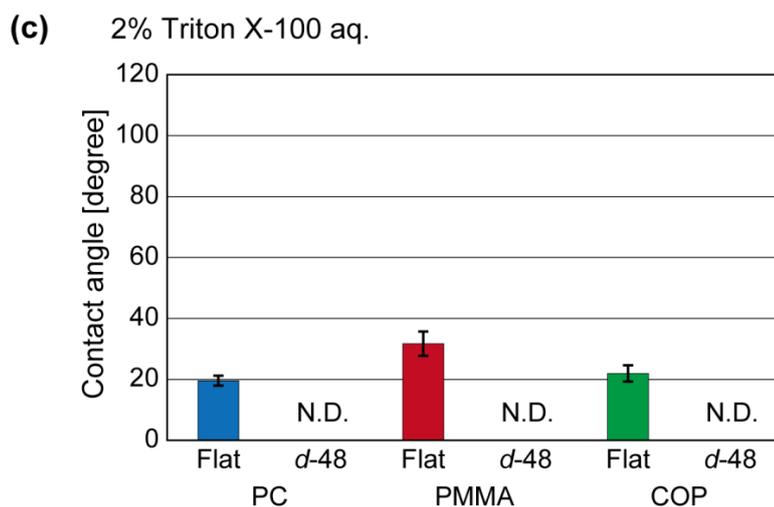
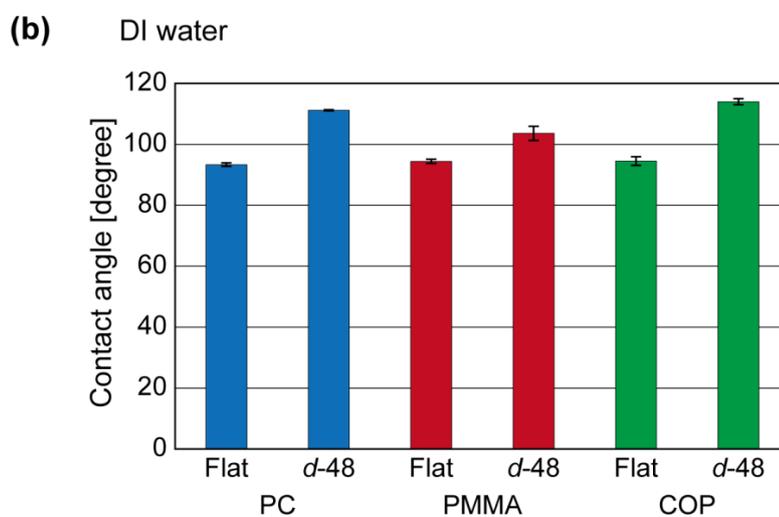
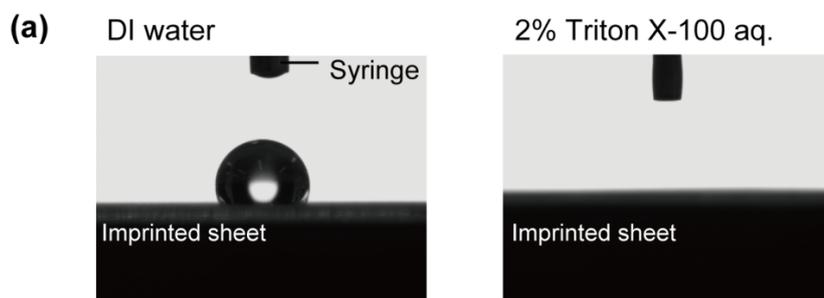


Fig. 2-9 (a) 蒸留水または2% Triton X-100 水溶液を PC インプリントシート (*d*-48 構造) 上に滴下した際の観察像 (b) 各シートに対する蒸留水の接触角測定結果 (c) 各シートに対する 2% Triton X-100 水溶液の接触角測定結果 (Adapted from Ref. 22 with permission from the Royal Society of Chemistry.)

以上の結果から、界面活性剤を添加した水溶液をインプリントシート上に滴下することによって、水溶液を効率的に搬送できることが示唆された。

そして、実際に 2% Triton X-100 水溶液 10 μL をインプリントシート (5 mm \times 30 mm) の端に滴下したところ、インプリントシートの表面を水溶液が搬送され、逆側の端まで到達することが確認された。一方で、界面活性剤を添加していない水溶液 10 μL をシート上に滴下した場合には、水溶液は滴下した位置に留まり、搬送されなかった。

一般に樹脂表面を親水化させるためには、煩雑な操作を伴う化学的な表面処理が必要であり、さらに処理方法によっては、その親水化効果が持続する期間が短い場合も多い。それに対して本手法は、水溶液に界面活性剤を添加するだけで、基材の化学的性質によらず水溶液を搬送できるため、簡便かつ実用的な手法であるといえる。一方で、界面活性剤を添加していない水溶液をインプリントシート上に滴下した場合に、水溶液が滴下した位置に留まるという性質は、一次抗体をインプリントシート上に固定するプロセスにおいて応用できる。具体的には、界面活性剤を添加していない抗体溶液をインプリントシート上に滴下することで、液滴を任意の位置に留まらせ、そのままインキュベーションできることが観察された (Fig. 2-10)。

以上の結果から、インプリントシートを用いたシステムにおいて、水溶液中の界面活性剤の有無によって、水溶液の固定および送液を簡便に制御できることが示された。

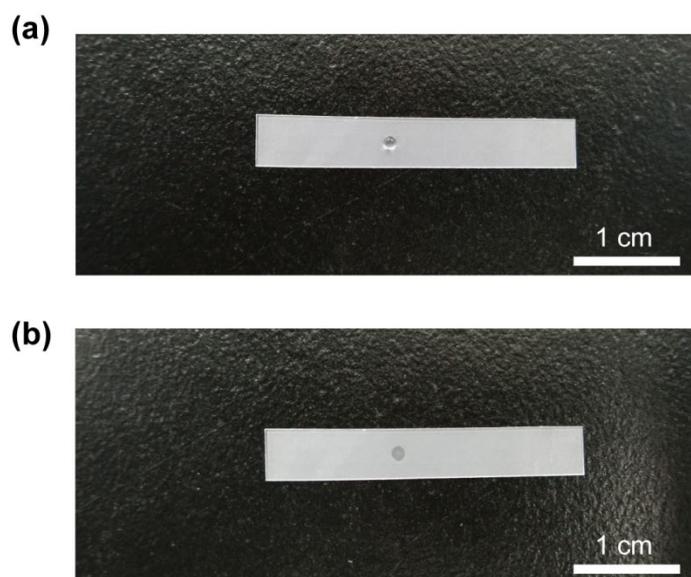


Fig. 2-10 (a) インプリントシート (PC, d -48 構造) 上に滴下した抗体溶液 (b) 抗体溶液を乾燥させた後の様子

2-3-3. インプリントシートに対する抗体の吸着性の評価

非均一系イムノアッセイを利用したシステムにおいて、基材に固定化される一次抗体の量は、測定の感度および再現性を左右する重要な要素の一つである。例えば ELISA では、平坦な樹脂基材にタンパク質を固定化するが、タンパク質を十分に吸着させるために、基材に対して、プラズマ処理や高分子電解質のコーティングなどの表面処理を施すことが一般的である^{27,28}。

それに対して本研究では、熱ナノインプリント法によって作製したマイクロコーン構造上に、表面処理を施すことなく、イムノアッセイを実施することを目標としている。そのために、十分な量の抗体をインプリントシートの表面に固定できるかどうか検証することとした。インプリントシートに形成したマイクロコーン構造は、表面にナノメートルスケールの粗さを有しているため、平板と比較して高い比表面積を有していることが推測される。そのため、マイクロコーン構造を用いることで、抗体の固定量を増加できるのではないかと考え、実際に評価を行った。

基材に用いる材料の種類が抗体の吸着性に与える影響を評価するために、3種類の樹脂（PC、PMMA、COP）を用いて作製したインプリントシート、および3種類の樹脂からなるフラットシートに対して、FITC 標識抗体の吸着試験を行った。また、マイクロコーン構造の幾何学的配置が、抗体の吸着性に与える影響を評価するために、マイクロコーンの中心間距離を変えた3種類の構造のPCインプリントシート（*d*-48 構造、*d*-60 構造、*d*-80 構造）に対して、FITC 標識抗体の吸着試験を行った。

PCインプリントシート（*d*-48 構造）に対するFITC 標識抗体の吸着試験において観察された蛍光顕微鏡像を、Fig. 2-11 (a)に示す。抗体塗布領域におけるマイクロコーン構造が形成されている部分から、強い蛍光が観察された。一方、抗体塗布領域であっても、マイクロコーン構造が形成されていない平坦な領域からは、蛍光がほとんど観察されなかった。この結果は、作製したマイクロコーン構造が、表面処理を施すことなく、抗体を吸着できる特性を有していることを示している。また、抗体を塗布していない領域からは蛍光がほとんど観察されなかったことから、インプリントシート自体の自家蛍光は十分に低いことが示された。

各シートに対する抗体の吸着試験の結果を、Fig. 2-11 (b)に示す。PCフラットシートにおける蛍光強度は、PCインプリントシートと比較して、非常に低い値であった。この結果は、平坦なPC表面が抗体の固定に適していないことを示している。一方で、PCインプリントシートにおける蛍光強度は高くなり、さらにマイクロコーン構造の中心間距離が狭い構造ほど、その強度は高くなった。この結果は、中心間距離が狭い構造ほど、マイクロコーン構造の数密度が高くなり、単位面積あたりの抗体の吸着量が高くなることを示している。このように、抗体がマイクロコーン構造上において選択的に吸着する要因の一つとして、ナノメートルスケールの粗さを有するマイクロコーン構造の形成による基材の比表面積や表面粗さの飛躍的な増加が挙げられる。また、比表面積や表面粗さの絶対値の増加だけでなく、マイクロコーン構造の表面に形成されたナノスケールの凹凸構造の形状が、抗体の吸着に寄与している可能性も考えられる。このような仮説を支持する先行研究の例として、表面のナノメートルスケール粗さの程度が異なる樹脂基材に対する抗原および抗体の吸着量が、基材の表面粗さと相関したことも報告されている²⁹。

PMMA および COP シートについても、PC の場合と同様に、それぞれのフラットシート上においては、抗体の吸着はほとんど確認されなかった。一方で PMMA および COP のインプリントシート (*d*-48 構造) 上においては、PC の場合とは異なり、マイクロコーン構造上においても蛍光強度の増加は極めて限定的であり、蛍光強度は PC インプリントシート (*d*-48 構造) と比較して著しく低くなった。この結果は、PMMA および COP を用いて作製されたマイクロコーン構造上において、抗体の吸着がほとんど生じていないことを示唆している。これはつまり、微細構造の形態に起因する比表面積や表面粗さの増加などの物理的特性だけではなく、材料の分子構造やその表面に存在する官能基などの化学的特性も、基材上における抗体の吸着性に大きく影響していることを示している。

基材に対する抗体の物理吸着において、抗体と基材の間に生じる双極子相互作用や水素結合などの静電的相互作用、および疎水性相互作用が寄与していることが報告されている³⁰。しかしながら、実際には様々な相互作用が複雑に関係しており、詳細な吸着メカニズムは明らかになっていない。

PC が抗体の吸着性能に優れていることも報告されており、そのことは本研究の結果と一致するが^{31,32}、その要因についても詳細には明らかになっていない。一つの要因として、PC の分極構造に起因する双極子相互作用が寄与したものと想定される。

また、PC インプリントシートにおいて、マイクロコーンが存在しない平坦な領域では、未加工の PC シートと同様に抗体が吸着しなかったことから、基材の化学的性質はインプリント加工の前後で大きく変化せず、主に形態のみが変化したことが推測される。

以上の結果は、樹脂の材料表面が有している化学的特性と、表面に形成された微細構造が有している物理的特性の両方が、適切な状態であることによっはじめて、抗体が効率的に吸着する、ということを示唆している。

今後の課題としては、基材ごとの抗体の吸着量のばらつきを抑制することが挙げられる。今回の試験では、同じ条件であっても基材ごとに、蛍光強度が比較的大きくばらつく場合があった。このばらつきは、マイクロピペットを用いて抗体溶液を基材に対してマニュアル操作で塗布していること、あるいは、乾燥工程において湿度などの環境条件を十分に制御できてきないこと、などに起因していると考えられる。今後、抗体の吸着

量のばらつきを抑制するために、たとえば基材に対して極少量の抗体溶液を塗布することができる専用の装置を用いた上で、塗布、乾燥の条件を適正化するなどの改良が必要であると考えられる。

(a) PC, d-48, FITC-anti CRP

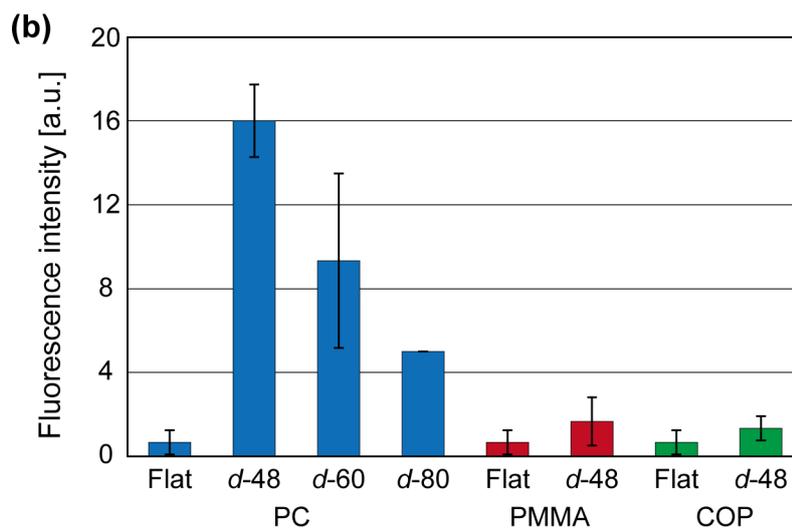
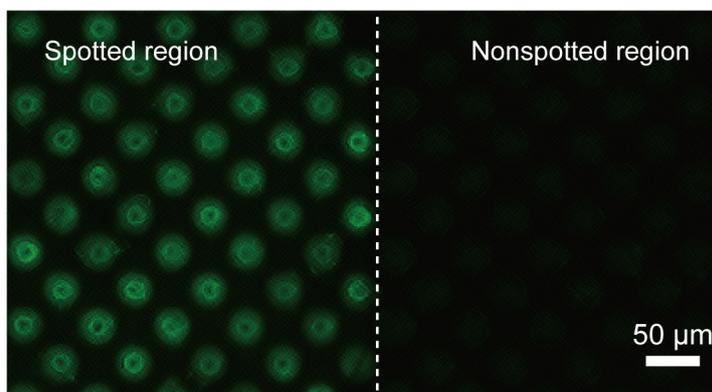


Fig. 2-11 (a) PC インプリントシート (*d*-48 構造) 表面に吸着した FITC 標識抗体由来の蛍光像。点線は抗体塗布領域と非塗布領域の境界を示している。(b) 各シートに対する抗体吸着試験の結果 (Adapted from Ref. 22 with permission from the Royal Society of Chemistry.)

2-3-4. 緩衝液中に希釈した CRP を対象とするイムノアッセイ

次に、インプリントシートと吸収パッドを組み合わせて作製したラテラルフローイムノアッセイデバイス (Fig. 2-12) を用いて、蛍光検出サンドイッチイムノアッセイを行った。作製したデバイスに対して、2% Triton X-100 水溶液 10 μL を滴下したところ、インプリントシート上において生じる毛細管力によって、水溶液は数秒で抗体固定部まで輸送され、その後、吸収パッドによって吸収された。本デバイスを用いた場合、一度に 10~20 μL の水溶液を複数回滴下することが可能であり、合計~100 μL の水溶液を搬送することができる。なお、この搬送可能な液体の体積は、吸収パッドの体積に依存するものである。

本検討では、3種類の樹脂 (PC, PMMA, COP) で作製したインプリントシートを用いてイムノアッセイを実施した。インプリントシートの構造としては、最もマイクロコーン構造が密に配置されている *d*-48 構造を用いた。イムノアッセイのモデル検出物質としては、CRP を用いた。インプリントシートに対する固定抗体 (一次抗体) として無標識抗体を、抗原の滴下後に展開する標識抗体 (二次抗体) として蛍光標識抗体を用いることによって、蛍光検出サンドイッチイムノアッセイを行った。

まず、CRP を搬送/洗浄用緩衝液によって段階的に希釈して調製した標準 CRP 試料液を用いて、イムノアッセイを行った。3種類の樹脂を材料として作製したインプリントシートを用いたデバイスのアッセイ結果を、Fig. 2-13 にそれぞれ示す。PC インプリントシートを用いたデバイスでは、抗原である CRP 濃度が高くなるほど蛍光強度が高くなる (抗原濃度に依存して蛍光強度が高くなる)、という結果が得られた (Fig.2-13 (a), (b))。また、PC インプリントシートに対する抗体の吸着試験において観察された蛍光顕微鏡像と同様に、蛍光はマイクロコーン構造が存在する部分のみから観察された (Fig.2-13 (a))。この結果は、マイクロコーン構造の表面に吸着した一次抗体に対して抗原である CRP が結合し、その後、CRP に対して二次抗体が結合したことを示している。そして、blank 試料 (CRP の濃度 0 の試料) の測定値の平均+3 σ (σ は標準偏差を表す) によって定義される最小検出感度 (limit of detection; LOD) は、0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 未満であった (Fig. 2-13(b))。この最小検出感度は、CRP の臨床的検出閾値である 3~5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ と比較しても十分に低い値であった。

一方、PMMA インプリントシートを用いたデバイスでは、抗原濃度に依存した蛍光強度の上昇は確認されず、 $0.1\sim 10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ の濃度域のCRPを検出することはできなかった (Fig. 2-13(c))。また、COP インプリントシートを用いたデバイスでは、抗原濃度に依存した蛍光強度の上昇の割合が、PC インプリントシートと比較して低くなり (グラフの傾きが小さくなり)、 $0.1\sim 10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ の濃度域のCRPを定量的に検出することはできなかった (Fig. 2-13(d))。PMMA および COP インプリントシートを用いた場合に、蛍光強度が低くなった要因としては、前項の抗体の吸着試験において示されたように、アッセイを実施するために十分な量の一次抗体がシート上に吸着していなかったことが挙げられる。

以上の結果から、3種類の樹脂で作製されたインプリントシートを用いたデバイスの中で、PC インプリントシートを用いたデバイスを用いた場合に、最も高感度に抗原であるCRPを検出できることが示された。

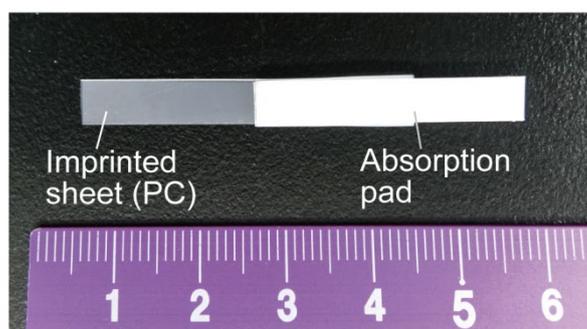


Fig. 2-12 インプリントシート (PC, *d*-48 構造) を用いたラテラルフロー免疫アッセイデバイスの外観 (Adapted from Ref. 22 with permission from the Royal Society of Chemistry.)

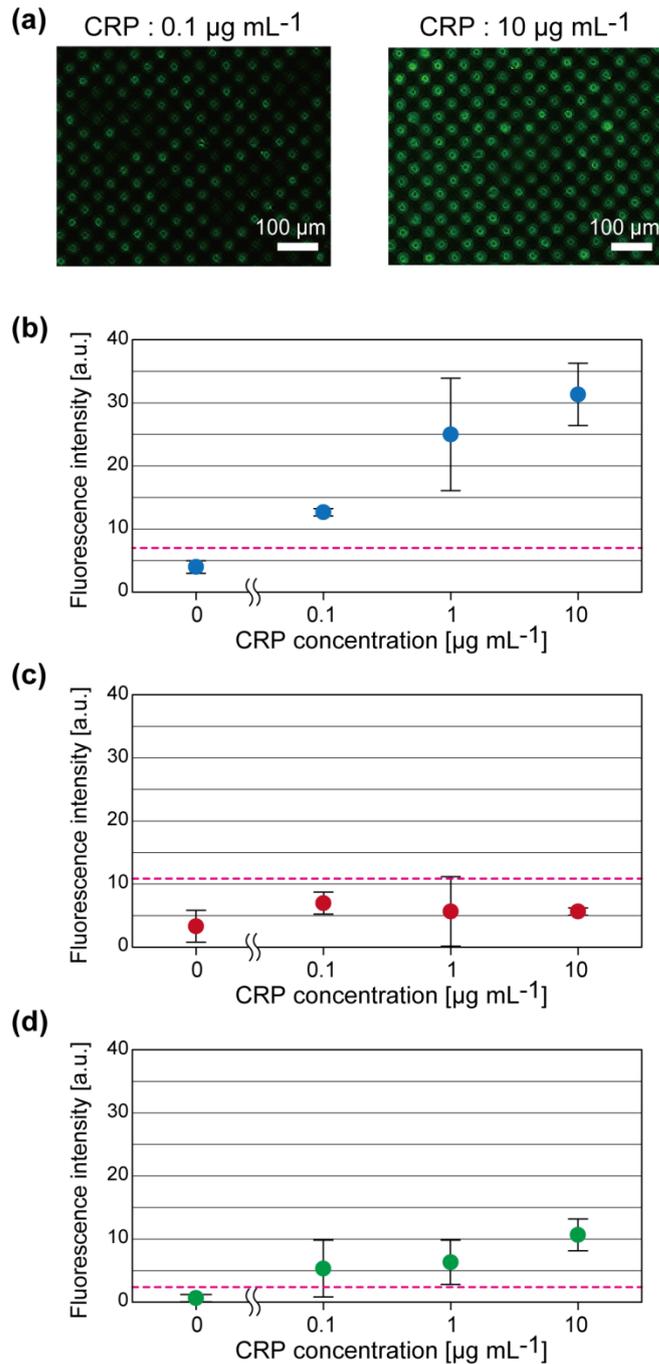


Fig. 2-13 緩衝液中に希釈した CRP を用いたサンドイッチ免疫アッセイの結果 (a) PC インプリントシート (*d*-48 構造) 表面に吸着した二次抗体由来の蛍光顕微鏡像 (b-d) CRP 濃度 0~10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ の試料液を用いたときの、各インプリントシートにおける蛍光強度の算出結果。点線は blank 試料の測定値の平均+3 σ を表す。 (b) PC インプリントシート (*d*-48 構造) (c) PMMA インプリントシート (*d*-48 構造) (d) COP インプリントシート (*d*-48 構造) (Adapted from Ref. 22 with permission from the Royal Society of Chemistry.)

2-3-5. 血清中に希釈した CRP を対象とするイムノアッセイ

次に、構築したデバイスが実際の臨床診断に適用できるかどうか検証するために、血清中に希釈した血清標準 CRP 溶液を用いてイムノアッセイを行った。ここでは、前項で説明したイムノアッセイにおいて、最も高感度に抗原を検出することができた PC インプリントシート (*d*-48 構造) を用いてアッセイを実施した。また、インプリントシート上において毛細管力を発生させるために、標準 CRP 血清を 4% Triton X-100/PBS を用いて 2 倍希釈したものを、デバイスに滴下するための試料液とした。

血清中の CRP を対象としたイムノアッセイの結果を、Fig. 2-14 (a) に示す。緩衝液中の CRP を対象としたイムノアッセイの結果 (Fig. 2-13 (b)) と同様に、CRP 濃度の上昇に依存した蛍光強度の上昇が確認され、その LOD は、約 $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ であった。この結果から、血清中に添加した CRP を用いた場合でも、イムノアッセイを実施できることが示され、さらに LOD の値から、CRP の臨床的閾値 ($3\sim 5 \mu\text{g mL}^{-1}$) と比較しても、10 倍以上高感度に CRP を検出できることが示された。したがって、本章において構築したアッセイシステムは、CRP の臨床診断として十分に応用できる検出感度を有しているといえる。さらに、この LOD の値は、量子ドットや蛍光ナノ粒子を修飾した抗体を標識抗体として用いた、高感度ラテラルフローイムノアッセイに関する最新の研究において報告されている値と同程度であった³³⁻³⁵。以上の結果から、本デバイスを用いて血清中の炎症マーカーを高感度に検出できることが示された。

なお、緩衝液中に希釈した CRP を試料液として用いた場合と比べて、LOD の値が若干高くなった (検出感度が低くなった) 要因としては、標準 CRP 血清を 2 倍に希釈して試料液として用いたこと、あるいは、血清に含まれるタンパク質が基材表面に非特異的に吸着したことによって抗原抗体反応が阻害されたこと、などが考えられる。後者の問題を抑制するためには、基材に対してブロッキング処理、つまり、タンパク質の非特異的な吸着を抑制するために、予め抗原抗体反応に関与しないタンパク質を基材上に固定化しておく処理を実施することが有効であると考えられる。ただしその一方で、基材に対してブロッキングを行わずとも、高感度な検出を実現していることは、本デバイスの有する特筆すべき特徴であるともいえる。その要因としては、希釈に用いた界面活性

剤が、樹脂基材に対するタンパク質の非特異的な吸着を抑制する効果を有していたことが考えられる³⁶。

次に、測定の再現性を確認するために、デバイスの作製日とアッセイの実施日を変えて、追加で2回アッセイを行った (Fig. 2-14 (b), (c))。そのうち1回は、製造ロットが異なる標識抗体を用いて、アッセイを行ったものである (Fig. 2-14 (c))。これらすべての試験において、蛍光強度の絶対値は変化したものの、抗原濃度に依存した蛍光強度の上昇が確認され、LOD はいずれの場合も約 $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ であった。したがって、本デバイスを用いて、再現良く高感度な測定が実施できることが示された。

一方で、同一条件において短時間にくり返し測定を行った場合の、蛍光強度のばらつきは比較的大きくなった。その要因としては、2-3-3 項でも述べたように、主に基材に対して抗体溶液をマニュアル操作によって塗布していることに起因して、基材上に固定化される抗体の量のばらつきが大きくなったことが挙げられる。今後、本デバイスにおけるアッセイの再現性を向上させ、定量的な測定を実現するために、インプリントシートに対する抗体の塗布、乾燥プロセスを自動化し、さらに適正化する必要があると考えられる。なお今回の検証では、モデル検出物質として炎症マーカーである CRP のみを利用したが、本デバイスのさらなる有効性および汎用性を実証するためには、他の種類の疾患マーカーを対象とした検証実験を行う必要性もある。

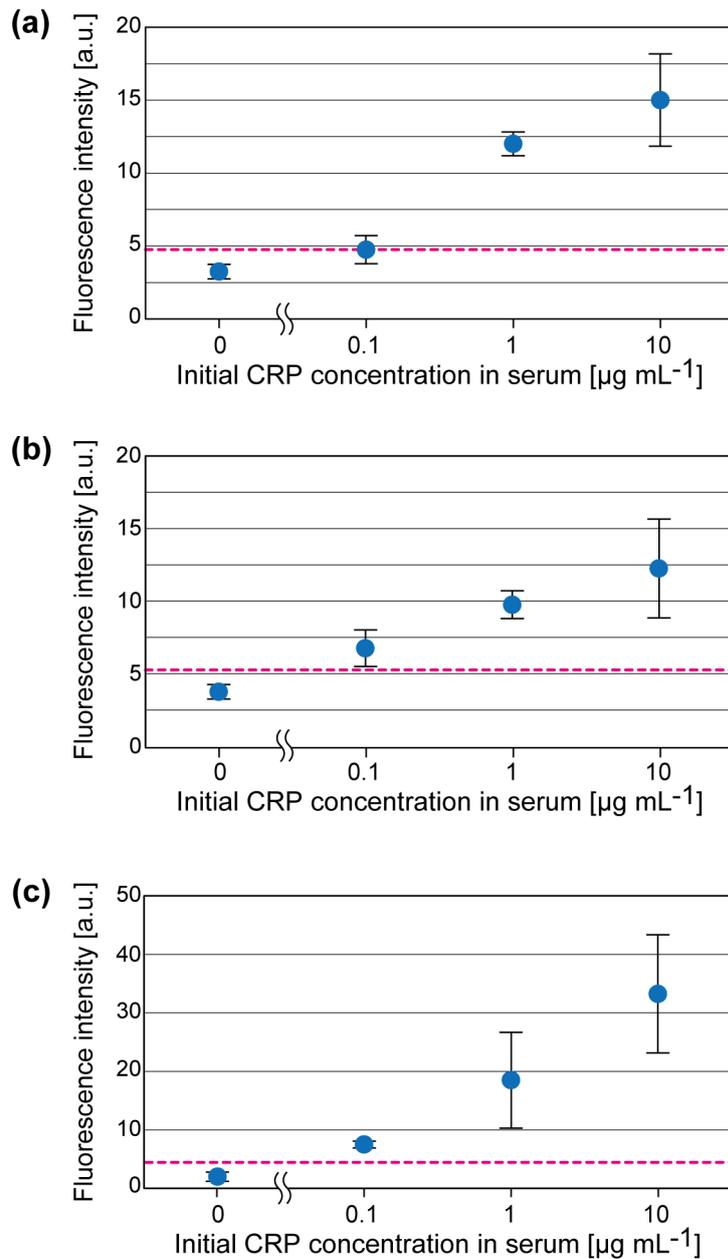


Fig. 2-14 血清中に希釈した CRP を用いたサンドイッチ免疫アッセイの結果。PC インプリントシート (*d*-48 構造) で作製したデバイスを測定に用いた。点線は blank 試料の測定値の平均+3 σ を表す。(a-b) 同じ製造ロットの抗原、抗体を用いて、デバイスの作製日およびアッセイの実施日を変えて測定した結果 (c) (a-b)の試験とは製造ロットが異なる二次抗体を用いて、さらにデバイスの作製日およびアッセイの実施日を変えて測定した結果 (Adapted from Ref. 22 with permission from the Royal Society of Chemistry.)

2-3-6. 本手法と既存手法の比較

本章の最後に、本研究において提案したインプリントシートを用いたラテラルフロー免疫アッセイシステムと、他の研究において報告されている免疫アッセイデバイスの性能を比較することによって、本手法の有用性を評価することとした。CRP を検出対象物質として用いた最近の免疫アッセイデバイスに関する研究例とその性能について、本研究のデバイスと併せてまとめた表を、Table 2-1 に示す。

まず検出感度について比較する。本研究におけるデバイスは、市販されている金コロイド粒子を用いた一般的なラテラルフロー免疫アッセイデバイス³⁷と比較して、検出感度が100倍程度高くなった。また前述したように、蛍光ナノ粒子や量子ドットを修飾した抗体を標識抗体として用いた高感度ラテラルフロー免疫アッセイの研究^{34,35}と比較しても、同程度の検出感度が得られた。したがって、本研究におけるデバイスは、現在市販されている一般的なラテラルフロー免疫アッセイデバイスと比較して、高い感度を有しているといえる。一方で、微細加工基板やマイクロ流体デバイスを用いたシステムにおいては、さらに高い検出感度も報告されている。より高感度な検出システムを目指す場合、基材上の微細構造の形状を工夫すること、アッセイのプロトコルを適正化すること、上述した研究で報告されている蛍光ナノ粒子や量子ドットなどの高輝度な標識物質を適用すること、などが有効であると考えられる。

次に測定に要する時間について比較する。本研究のデバイスは、15分程度でCRPを検出できることが示された。他の研究と比較しても、測定時間は比較的短く、特にPOCTデバイスへの応用を見据えた場合に最低限必要な性能を満たしていると言える。ただし、より迅速な測定（たとえば5分以内の検出）を実現するためには、抗原を滴下した後のインキュベーション時間などのアッセイのプロトコルを適正化することが必要であると考えられる。

次に、抗体を固定する基材材料の特性について比較する。本研究における重要な特徴の一つとして、ラテラルフロー免疫アッセイのための標準的な抗体固定化基材であるニトロセルロースメンブレンの代替として、均質かつ再現性よく作製することができる基材を用いてシステムを構築した、ということが挙げられる。前述したように、ニトロセルロースメンブレンは、製造ロット内および製造ロット間における性質のばらつきが

決定的な課題であるとされている^{24,38,39}。より高性能なラテラルフロー免疫アッセイを実現する上で、再現良く均質に作製できる材料を用いてデバイスを作製することは重要である。本研究において、抗体固定化基材を再現良く作製するプロセスを確立できたため、今後は前述したように、測定の再現性を向上させるために抗体の固定化プロセスなどを最適化していくことが必要であると考えられる。

本手法におけるもう一つの重要な特徴として、緩衝液に界面活性剤を添加したことによって、基材に対する煩雑な化学的表面処理を施すことなく、免疫アッセイを実現した、という点が挙げられる。先行研究において報告されているマイクロピラーが形成された COP 基材を用いたラテラルフロー免疫アッセイシステムは、CRP を高感度に検出できるものの (LOD : 0.0026 $\mu\text{g mL}^{-1}$)、基材表面に抗体を固定化するためにプラズマ処理、シラン-デキストラン処理などの煩雑な表面処理工程を必要とするものであった⁴⁰。それに対して、本手法は、無垢の基材 (化学的表面処理を施していない基材) に対して抗体を塗布し乾燥するだけで、アッセイに必要な抗体を固定化することができるため、基材の作製プロセスが簡便であり、表面処理に起因する再現性の低下を防ぐことができるものと期待される。

次にデバイスの作製コストについて比較する。本デバイスは、安価な材料を用いて簡便に作製できるため、マイクロ流体デバイスを用いた免疫アッセイシステム⁴¹と比較すると低いコストで作製できると考えられる。ただしその一方で、紙や多孔質膜によって構成されている既存のラテラルフロー免疫アッセイデバイスと比較した場合、インプリント加工にかかるコストが問題となる可能性がある。加工コストをなるべく低く抑えるためには、ローラー方式のインプリント装置を用いた連続加工プロセスによって、インプリントシートの生産性を向上させることが必要であると考えられる。

以上をまとめると、本研究で作製したデバイスは、迅速かつ高感度な測定が実施できる点、抗体を固定化する基材を均質に再現良く作製できる点、基材に対して煩雑な表面処理を必要としない点、において優れていると考えられる。今後の課題としては、抗体の固定化プロセスの最適化による測定の再現性の向上、生産プロセスの自動化によるデバイスの作製コストの低減などが挙げられる。

Table 2-1 CRP を検出対象物質として用いたイムノアッセイデバイスに関する研究と本研究との比較

方法	抗体の固定化基材	検出感度 [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	測定時間 [min]	その他特徴
熱インプリントシートを用いたラテラルフローイムノアッセイ (本研究)	マイクロコーンを形成したPCインプリントシート	~0.1	15	<ul style="list-style-type: none"> ・基材に対する表面処理が不要 ・蛍光検出系
金コロイド粒子を用いたラテラルフローイムノアッセイ ³⁷	ニトロセルロース	10	10~15	<ul style="list-style-type: none"> ・ Creative Diagnostics 社 (USA) より製品化されている ・視認検出系
蛍光ナノ粒子を用いたラテラルフローイムノアッセイ ³⁴	ニトロセルロース	0.091	3	<ul style="list-style-type: none"> ・蛍光検出系
量子ドットを用いたラテラルフローイムノアッセイ ³⁵	ニトロセルロース	0.3	30	<ul style="list-style-type: none"> ・蛍光検出系
微細加工基材を用いたラテラルフローイムノアッセイ ⁴⁰	マイクロピラーを形成したCOP基材	0.0026	NA	<ul style="list-style-type: none"> ・基材に対して化学的な表面処理が必要 ・蛍光検出系
ドロップレットマイクロ流体デバイスを用いたイムノアッセイ ⁴¹	抗体固定の必要なし	0.01	60	<ul style="list-style-type: none"> ・定量性が高い ・装置系が複雑 ・蛍光検出系

2-4. 結論

本章では、熱ナノインプリント法によって作製したマイクロコンアレイ構造を有する樹脂シート（インプリントシート）を用いて、蛍光検出方式のラテラルフローイムノアッセイシステムの構築を検討した。熱ナノインプリント法によって、表面にナノメートルスケールの粗さを有するマイクロコン構造を、再現性良く作製できることが示された。また、レーザーアブレーション法によって作製した金型と、熱ナノインプリント法を組み合わせた微細加工プロセスは、階層的なマイクロ/ナノ構造体をワンステップで作製する手法として有用であることが示唆された。

界面活性剤を添加した水溶液を、インプリントシート上に滴下することによって、シート上の接触角は劇的に低下し、水溶液がスムーズに搬送されることを確認した。PC, PMMA, COP を材料として作製したインプリントシートに対して、抗体吸着試験を行った結果、PC インプリントシートに対する抗体の吸着性が最も高いことが示された。表面にナノスケールの粗さを有するマイクロコン構造を形成したことに起因する基材の比表面積や表面粗さの増加、および、基材表面の化学的特性の両方が、抗体の吸着に寄与したものと考えられた。最後に PC インプリントシートを用いて試作デバイスを作製し、CRP を検出対象物質として蛍光検出サンドイッチイムノアッセイを行った。その結果、血清中の CRP を高感度に検出できることが実証された (LOD: 約 $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$)。

また既存の研究と比較すると、本研究で構築したデバイスは、迅速かつ高感度な測定が実施できる点、抗体を固定化する基材を均質に再現良く作製できる点、基材に対して煩雑な表面処理を必要としない点、において優れていると考えられる。

以上の結果より、熱ナノインプリント法を用いて作製した微細加工樹脂シートがラテラルフローイムノアッセイのための抗体固定化基材として適用できること、および構築したシステムを用いて高感度なアッセイが可能であること、が示された。今後の課題として、測定の再現性向上のために基材に対する抗体の固定化プロセスを最適化すること、シートの生産性向上のためにローラー方式のインプリント装置を用いた連続的な作製プロセスを検討すること、などが挙げられる。

引用文献

- 1 H. Mekar, T. Yamada, S. Yan and T. Hattori, *Microsyst. Technol.*, 2004, **10**, 682–688.
- 2 K. Ren, J. Zhou and H. Wu, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 2396–2406.
- 3 U. M. Attia, S. Marson and J. R. Alcock, *Microfluid. Nanofluidics*, 2009, **7**, 1–28.
- 4 B. Y. Peng, C. W. Wu, Y. K. Shen and Y. Lin, *Polym. Adv. Technol.*, 2010, **21**, 457–466.
- 5 L. Yi, W. Xiaodong and Y. Fan, *J. Mater. Process. Technol.*, 2008, **208**, 63–69.
- 6 H. Becker and C. Gärtner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 89–111.
- 7 A. H. C. Ng, U. Uddayasankar and A. R. Wheeler, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 991–1007.
- 8 J. V. Green, D. Sun, A. Hafezi-Moghadam, K. Lashkari and S. K. Murthy, *Biomed. Microdevices*, 2011, **13**, 573–583.
- 9 Z. Fu, G. Shao, J. Wang, D. Lu, W. Wang and Y. Lin, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 2685–2690.
- 10 S. Nagrath, L. V. Sequist, S. Maheswaran, D. W. Bell, D. Irimia, L. Ulkus, M. R. Smith, E. L. Kwak, S. Digumarthy, A. Muzikansky, P. Ryan, U. J. Balis, R. G. Tompkins, D. A. Haber and M. Toner, *Nature*, 2007, **450**, 1235–1239.
- 11 H. Cho, S. Moon Kim, Y. Sik Kang, J. Kim, S. Jang, M. Kim, H. Park, J. Won Bang, S. Seo, K. Y. Suh, Y. E. Sung and M. Choi, *Nat. Commun.*, 2015, **6**, 8484.
- 12 B. Guo, J. Sun, Y. Hua, N. Zhan, J. Jia and K. Chu, *Nanomanuf. Metrol.*, 2020, **3**, 26–67.
- 13 Y. Zhang, Y. Jiao, C. Li, C. Chen, J. Li, Y. Hu, D. Wu and J. Chu, *Int. J. Extrem. Manuf.*, 2020, **2**, 032002.
- 14 M. M. Dudek, R. P. Gandhiraman, C. Volcke, S. Daniels and A. J. Killard, *Plasma Process. Polym.*, 2009, **6**, 620–630.
- 15 P. M. Ridker, C. H. Hennekens, J. E. Buring and N. Rifai, *N. Engl. J. Med.*, 2000, **342**, 836–843.
- 16 W. L. Roberts, R. Sedrick, L. Moulton, A. Spencer and N. Rifai, *Clin. Chem.*, 2000, **46**, 461–468.

- 17 M. Yamada, P. Mao, J. Fu and J. Han, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7067–7074.
- 18 Y. Maekawa, T. Nagai and A. Anzai, *Inflamm. Allergy - Drug Targets*, 2011, **10**, 229–235.
- 19 E. Macchia, K. Manoli, B. Holzer, C. Di Franco, R. A. Picca, N. Cioffi, G. Scamarcio, G. Palazzo and L. Torsi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, **411**, 4899–4908.
- 20 S. Lin, C. K. Lee, Y. M. Wang, L. S. Huang, Y. H. Lin, S. Y. Lee, B. C. Sheu and S. M. Hsu, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **22**, 323–327.
- 21 J. N. Adkins, S. M. Varnum, K. J. Auberry, R. J. Moore, N. H. Angell, R. D. Smith, D. L. Springer and J. G. Pounds, *Mol. Cell. Proteomics*, 2002, **1**, 947–955.
- 22 S. Aoyama, Y. Akiyama, K. Monden, M. Yamada and M. Seki, *Analyst*, 2019, **144**, 1519–1526.
- 23 Y. S. Jheng and Y. C. Lee, *Appl. Surf. Sci.*, 2016, **384**, 393–399.
- 24 B. O’Farrell, in *Lateral Flow Immunoassay*, eds. R. C. Wong and H. Y. Tse, Humana press, 2009, pp. 1–33.
- 25 X. M. Li, D. Reinhoudt and M. Crego-Calama, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 1350–1368.
- 26 C. Zhang, X. Zhao, J. Lei, Y. Ma and F. Du, *Soft Matter*, 2017, **13**, 503–513.
- 27 Y. Bai, C. G. Koh, M. Boreman, Y. J. Juang, I. C. Tang, L. J. Lee and S. T. Yang, *Langmuir*, 2006, **22**, 9458–9467.
- 28 D. Ogończyk, P. Jankowski and P. Garstecki, *Lab Chip*, 2012, **12**, 2743–2748.
- 29 A. A. Isakova, A. V. Indenbom, O. D. Yakobson, O. L. Gribkova, V. V. Brevnov, E. O. Garina and A. V. Vannikov, *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.*, 2016, **52**, 677–683.
- 30 M. Rabe, D. Verdes and S. Seeger, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2011, **162**, 87–106.
- 31 V. C. Rucker, K. L. Havenstrite, B. A. Simmons, S. M. Sickafoose, A. E. Herr and R. Shediach, *Langmuir*, 2005, **21**, 7621–7625.
- 32 T. B. Vijaya Bhaskar, T. Roch, O. Romero, N. Ma, K. Kratz and A. Lendlein, *Polym. Adv. Technol.*, 2015, **26**, 1387–1393.
- 33 X. Cheng, X. Pu, P. Jun, X. Zhu, M. Chen and M. Chen, *Int. J. Nanomedicine*, 2014, **9**, 5619–5626.

- 34 Y. Cai, K. Kang, Y. Liu, Y. Wang and X. He, *Anal. Biochem.*, 2018, **556**, 129–135.
- 35 V. Borse and R. Srivastava, *Sens. Actuators B Chem.*, 2019, **280**, 24–33.
- 36 P. Christopher, N. Robinson and M. K. Shaw, in *Drugs of Abuse*, eds. R. C. Wong and H. Y. Tse, Humana press, 2005, pp. 87–98.
- 37 K. Phommasone, T. Althaus, P. Souvanthong, K. Phakhounthong, L. Soyvienvong, P. Malapheth, M. Mayxay, R. L. Pavlicek, D. H. Paris, D. Dance, P. Newton and Y. Lubell, *BMC Infect. Dis.*, 2016, **16**, 61.
- 38 M. A. Mansfield, in *Lateral Flow Immunoassay*, eds. R. C. Wong and H. Y. Tse, Humana press, 2009, pp. 95–113.
- 39 T. C. Tisone and B. O’Farrell, in *Lateral Flow Immunoassay*, eds. R. C. Wong and H. Y. Tse, Humana press, 2009, pp. 131–156.
- 40 C. Jönsson, M. Aronsson, G. Rundström, C. Pettersson, I. Mendel-Hartvig, J. Bakker, E. Martinsson, B. Liedberg, B. MacCraith, O. Öhman and J. Melin, *Lab Chip*, 2008, **8**, 1191–1197.
- 41 M. Y. H. Tang and H. C. Shum, *Lab Chip*, 2016, **16**, 4359–4365.

第 3 章 表面ナノ構造の制御によるラテラルフローイムノアッセイデバイスの高性能化

3-1. 緒言

3-1-1. 本章の背景

第 1 章において記述したように、近年、マイクロ・ナノ加工技術の開発が急速に進展しており、簡便、迅速、高感度な高機能イムノアッセイプラットフォームの研究開発がより一層活発化している。例えば、ラテラルフローイムノアッセイ^{1,2}、マイクロ流体デバイスを用いたイムノアッセイ^{3,4}、ペーパーマイクロ流体デバイスを用いたイムノアッセイ^{5,6}、電気化学イムノセンサー^{7,8}など、様々なタイプの測定プラットフォームが報告されている。これらの技術は、感染症の早期診断、救急時の臨床検査、在宅医療などを目的とした POCT システムとして実用化されつつある。さらに、最近では上述した測定プラットフォームに対して、サンプルの前処理⁹、信号のデジタル化¹⁰、スマートフォンを用いた検出および結果のモニタリング¹¹、などの高度な機能を実装する試みが進められている。特にラテラルフローイムノアッセイは、最も代表的な簡易診断法として広く社会に普及しているため^{12,13}、従来の課題を解決する高性能なラテラルフローイムノアッセイシステムの開発が期待されている。

ラテラルフローイムノアッセイを含む多くのイムノアッセイにおいては、抗体を基材に固定化して測定することを特徴とする非均一系が用いられている^{12,14}。非均一系の代表例であるサンドイッチ法において、測定の感度、信頼性、再現性を確立するためには、基材上において抗体を高密度に固定化し、さらにその活性と特異性を維持することが重要となる。

これまでに、シランカップリング剤とクロスリンカーを活用した固定化法¹⁵、アビジンとビオチンの高い親和性を利用した固定化法¹⁶、抗体結合タンパク質であるプロテイン A やプロテイン G を活用した固定化法¹⁷など、化学結合あるいは生物的相互作用を利用した抗体の固定化法が多数報告されている。これらの方法は、高効率に抗体を固定

化できる一方で、反応のための条件を厳密に制御する必要があること、反応機構が複雑であり固定化する抗体の活性に影響を与える可能性があること、などの欠点がある。

それに対して物理吸着法は、抗体と基材の間に生じる静電相互作用や疎水性相互作用などを利用した吸着方法であり、抗体を含む溶液を基材上に導入しインキュベーションするだけで、基材表面に抗体を固定化することができる。この方法は、極めてシンプルなプロセスによって実行できるため、イムノアッセイに関する研究開発において頻用されている¹⁷。

物理吸着法において、抗体を固定化するための基材の比表面積は、固定化される抗体の密度や総量に大きく影響を与える重要な因子である^{8,18,19}。基材の比表面積を大きくするために、セルロースやニトロセルロース、繊維ファイバーなどの多孔質材料が基材として用いられることが多い^{17,20}。これらの多孔質材料は3次元的に入り組んだ構造を有しているため、その比表面積は非常に大きくなっている。しかしながら、第1章、第2章でも述べたように、多孔質材料の形状をマイクロ・ナノメートルスケールで制御することは容易ではなく、その形状の均質性および再現性の低さが、イムノアッセイの検出感度、再現性、信頼性に深刻な影響を与えていることが報告されている^{13,21-23}。またその一方で、シリコン、ガラス、ポリマーなどの材料を用いて精密に作製した構造体上に抗体を吸着させ、その吸着量を評価した研究が報告されている^{18,19,24}。

しかしながら、筆者が調査した限り、ラテラルフローイムノアッセイシステムにおいて、マイクロ・ナノ加工技術を用いてその表面粗さを精密に制御した研究例は、これまでに報告されていなかった。

3-1-2. 本章の目的

第2章では、熱ナノインプリント法を用いてマイクロコーンアレイ構造を有する微細加工樹脂シート（インプリントシート）を作製した。そして、インプリントシートが抗体固定化基材として適用できること、インプリントシートを組み込んだラテラルフロー免疫アッセイデバイスを用いて血中の炎症マーカーを高感度に検出できることを実証した²⁵。また、作製したマイクロコーン構造表面において抗体が選択的に吸着すること、マイクロコーン構造を密に配置するほど単位面積あたりの抗体の吸着量が増大すること、などを明らかにした。

しかしながら、第2章では異なる樹脂材料間での比較を行ったものの、熱ナノインプリント加工においては同一の金型を使用したため、マイクロ構造体の表面構造に起因する抗体の吸着特性の評価を行っていなかった。つまり、表面に形成されたナノメートルスケールの粗さやナノトポロジー（ナノメートルスケールの形態）が、実際に抗体の吸着性や免疫アッセイの測定性能に及ぼす影響については、明らかにしていなかった。一方で、第2章における検討結果から、基材表面におけるナノメートルスケールの構造が、抗体の固定化量や免疫アッセイの検出感度に決定的な影響を与えるのではないかと考えられた。そして、この影響を詳細に評価することは、ラテラルフロー免疫アッセイの高機能化に寄与するばかりではなく、より広い意味で、生体分子の表面吸着に関する新しい知見をもたらすことにもつながるものと期待された。

したがって本章では、熱ナノインプリント法を用いて、表面のナノトポロジーが異なる3種類のマイクロコーンアレイ構造が形成されたインプリントシートを作製し、それらを抗体の固定化基材として用いることによって、表面のナノトポロジーが抗体の吸着性、および、免疫アッセイの性能に対して与える影響を明らかにすること、を目的とした。そのために、本研究では、機械切削加工またはレーザーアブレーション加工によって、表面粗さの程度が異なる3種類のインプリント用の金型を作製し、それらを用いて3種類のインプリントシートを作製することとした。

本章で検証する仮説は、「表面が粗い（＝表面に細かな凹凸を多数有する）マイクロコーン構造が形成されたインプリントシートは、表面が滑らかなマイクロコーン構造が形成されたインプリントシートと比較して、より多量の抗体を吸着するのではないか」

ということであり、さらに、「そのような粗い表面のインプリントシートを抗体の固定化基材としてラテラルフロー免疫アッセイデバイスに組み込むことによって、疾患マーカー分子のより高感度な測定を実現できるのではないか」、ということである。

本章におけるコンセプトおよび免疫アッセイのプロセスを、Fig. 3-1 に示す。免疫アッセイデバイスの基本的な構成およびアッセイの手順は、第2章の検討において記述したものとほぼ同様のものとした。すなわち、インプリント加工によって微小構造体を形成した樹脂基材上において、水溶液を滴下するだけで、毛細管力によって水溶液を抗体固定部まで搬送する、というものである。このシステムでは、試料液、抗体溶液などの滴下を繰り返すだけで、免疫アッセイを簡便に実施できるため、本章の目的を果たす上でも有用であると考え、採用することとした。

3-1-3. 検討内容

本研究では、具体的に以下の検討を行った。まずレーザーアブレーション法、または機械切削法を用いて作製した3種類の金型を用いて、PCシートに対して熱ナノインプリント加工を施すことによって、表面のナノポロジが異なる3種類のマイクロコーンアレイ構造が形成されたPCインプリントシートをそれぞれ作製した。作製した3種類のマイクロコーン構造の形状、およびその表面形態の差異を確認するため、SEMを用いてそれぞれのマイクロコーン構造を観察した。さらに、3種類のマイクロコーン構造表面に形成されたナノ構造の形状をより詳細に比較するために、集束イオンビーム（focused ion beam; FIB）を用いてマイクロコーン構造を切断し、高分解能SEMを用いてその断面を観察することで、各マイクロコーンの表面形状を比較した。

次に、それぞれのマイクロコーン構造表面に形成されたナノ構造が、抗体の吸着性に及ぼす影響を明らかにするために、蛍光標識抗体を用いて抗体の吸着試験を行い、マイクロコーン構造表面に固定化される抗体の量を定量した。最後に、3種類のインプリントシートを用いてラテラルフロー免疫アッセイデバイスを作製し、本章においても血清中の炎症マーカーであるCRPを検出対象物質として、蛍光検出サンドイッチ免疫アッセイを行うことによって、それぞれのデバイスの性能を評価し、検出性能を比較し

た。以上の結果から、基材表面のナノトポロジーが、抗体の吸着性や、免疫アッセイの検出性能に及ぼす影響について考察した。

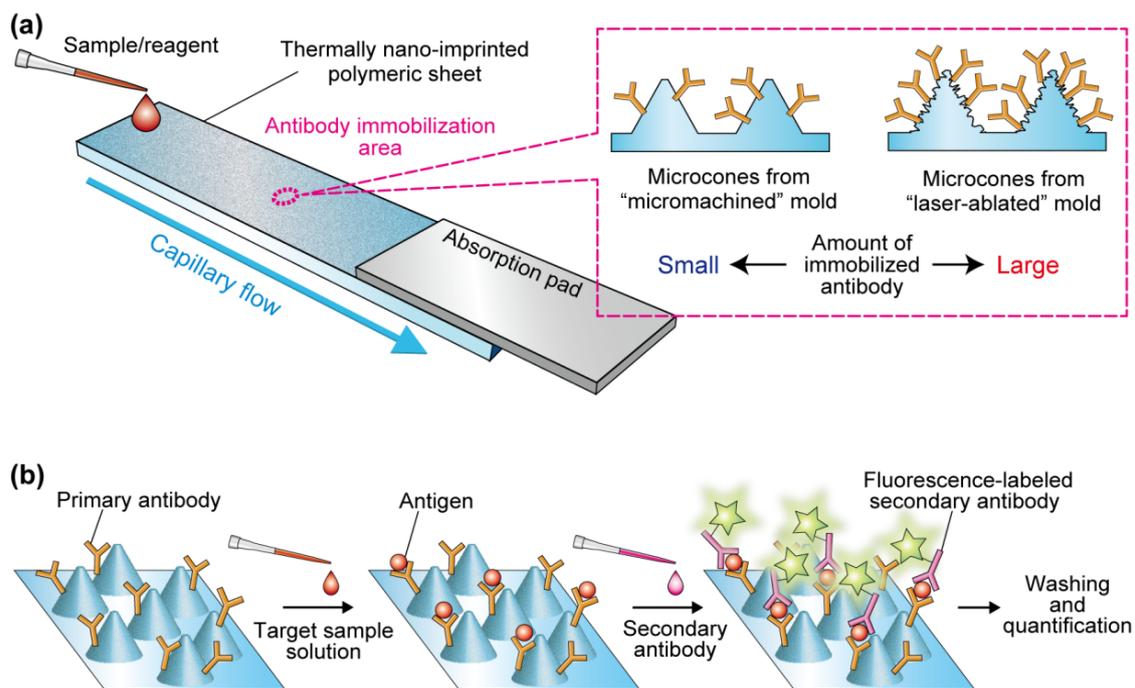


Fig. 3-1 (a) 表面のナノトポロジーを制御したマイクロコーン構造を用いたラテラルフロー免疫アッセイデバイスの模式図。機械切削法またはレーザーアブレーション法によって作製された金型を用いて、樹脂基材に対して熱ナノインプリント加工を施すことによって、マイクロコーン表面のナノトポロジーを変化させた。(b) 本デバイスを用いた免疫アッセイの手順を示した模式図 (Adapted with permission from Ref. 26. Copyright 2019 American Chemical Society.)

3-2. 実験方法

3-2-1. 熱ナノインプリント加工用金型の作製

熱ナノインプリント加工に用いる金型としては、表面粗さの程度を意図的に変化させた3種類の金型を用いた。円錐形状の微小穴（直径 30 μm ，深さ 30 μm ）が中心間距離 30~35 μm でアレイ状に配列した金型を、次の3種類の方法を用いて作製した。(1) 先端の直径が約 10 μm であるダイヤモンドドリルを用いて、アクリル板を切削することによって、微小穴を形成した。微小穴を形成したアクリル板に対して、ニッケル電鍍を行うことによって凸型の金型を作製し、さらにその金型に対してニッケル電鍍を行うことによって凹型の金型を作製した。この金型を、以下、MM-Ni (micromachining-Ni) 金型と表記する。(2) ニッケル平板に対して、レーザーアブレーション法を用いて微小穴を形成することによって、金型を作製した。この金型を、以下、LA-Ni (laser ablation-Ni) 金型と表記する。(3) アルミニウム平板に対して、レーザーアブレーション法を用いて微小穴を形成することによって、金型を作製した。この金型を、以下、LA-Al (laser ablation-Al) 金型と表記する。なお、MM-Ni 金型は浅川商会（日本）より、LA-Ni 金型、LA-Al 金型は東成エレクトロビーム株式会社より提供された。それぞれの金型に対して、2-2-1 項に記載した手順と同様の手順で離型処理を施し、インプリント加工に用いた。

3-2-2. インプリントシートの作製

厚さ約 200 μm の PC シート（帝人フロンティア株式会社，日本， $T_g = 160^\circ\text{C}$ ）を、熱ナノインプリント加工を施すための樹脂材料として用いた。上述の3種類の金型（MM-Ni, LA-Ni, LA-Al）を用いて、PC シートに対して熱ナノインプリント加工を施し、3種類のマイクロコーンアレイ構造を有するインプリントシートをそれぞれ作製した。熱ナノインプリント加工の条件は、第2章において記載した PC インプリントシートの作製条件と同様とした。

3-2-3. 3 種類のマイクロコーン構造の形状評価

作製した 3 種類の PC インプリントシートにおいて、形成されたマイクロコーン構造およびその表面の形状を観察した。オスミウムコーターを用いて各インプリントシートに対して導電処理を行った後、SEM (JSM-7001F, 日本電子株式会社, 日本) を用いてマイクロコーン構造を観察した。

さらにマイクロコーン表面に存在するナノ構造をより詳細に観察するために、マイクロコーンの断面試料を次の方法を用いて作製し、観察および解析を行った。まずインプリントシート上にプラチナおよびカーボンの保護皮膜を形成した。次に、FIB-SEM (Helios 650 NanoLab, Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて、マイクロコーン構造の中心部を通過する位置においてインプリントシートを垂直方向に切断することによって、断面試料を作製した。作製した断面試料を、高分解能 SEM (S-5500, 株式会社日立ハイテクノロジーズ, 日本) を用いて観察した。なお、断面試料の加工および観察は、一般財団法人材料科学技術振興財団の協力の下で実施した。そして、画像解析ソフトウェア (Image J, National Institutes of Health, USA) を用いて、撮影した SEM 像から、それぞれのマイクロコーン断面の表面線を解析することによって、表面線の長さを算出した。

解析方法について以下に説明する。まず倍率 30,000 倍で撮像したマイクロコーンの断面像 (観察領域 $4.2 \mu\text{m} \times 3.0 \mu\text{m}$) を、5 つのセグメントに分割した。そして、セグメントごとに設定したベースラインに対するマイクロコーンの表面線の相対的な長さを算出し、5 つのセグメントにおける平均値を求めた。なお、3 種類のマイクロコーン構造に対して、それぞれ上部、中央部、下部の 3 箇所の断面を観察し、解析を行った。

3-2-4. インプリントシートに対する抗体の吸着試験

作製した 3 種類のインプリントシートに対する抗体の吸着性の評価を、以下の手順によって実施した。まず、FITC 標識抗ヒト CRP 抗体 (Bethyl Laboratories, USA) を、50 mM Tris-HCl (ナカライテスク株式会社, 日本)、および 2% (w/v) トレハロース (富士フィルム和光純薬株式会社, 日本) を含む水溶液 (pH = 7.5) に添加し、抗体濃度 0.1 mg mL^{-1} の FITC 標識抗体溶液を調製した。マイクロピペットを用いて、調製した抗体溶液の液

滴（体積 1 μL ）を、それぞれのインプリントシート（5 mm \times 30 mm のストリップ）上に円形に塗布した後、45°C で 1 時間乾燥させた。乾燥後のインプリントシートと 5 mm \times 30 mm のストリップ形状にカットした吸収パッド（アイオン株式会社，日本）を重ねあわせ、テープを用いて固定することによって、評価用のデバイスを作製した。作製したデバイスに対して、搬送/洗浄用緩衝液（2% Triton X-100/PBS）10 μL をインプリントシートの端部（端 \sim 5 mm の位置）に滴下し、毛細管力によって搬送/洗浄用緩衝液を流すことによってインプリントシート上に固定されていない抗体を洗浄した。洗浄後のインプリントシートに対して、エアーを吹き付けることによって、インプリントシートを十分に乾燥させた。乾燥させたインプリントシートをスライドガラスに貼り付け、蛍光顕微鏡（BZ-X710，株式会社キーエンス，日本）を用いて、各インプリントシートにおける抗体塗布領域を観察した。抗体塗布領域の中心部（円形状， $\phi = 800 \mu\text{m}$ ）を解析領域として、励起波長 450~490 nm，蛍光波長 500~550 nm の条件において、平均蛍光強度を算出した。以上の試験を、各インプリントシートに対して 4 回ずつ繰り返した。

また各インプリントシート上に固定化された抗体を定量するための検量線を、インプリント加工を施す前の PC シート（以下，PC フラットシートと表記する）を用いて、以下の手順によって作成した。まず、上述の方法によって、濃度 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ の標準 FITC 標識抗体溶液を調製した。調製した標準 FITC 標識抗体溶液 1.0 μL を PC フラットシート上に円形に塗布した後、45°C で 1 時間乾燥させた。蛍光顕微鏡を用いて乾燥後の PC フラットシートにおける抗体塗布領域を観察し、単位面積あたりの平均蛍光強度を算出した。以上の操作を、各濃度に対して 4 回ずつ繰り返した。PC フラットシート上に固定された単位面積あたりの抗体の量に対して蛍光強度をプロットし、最小二乗法を用いた線形近似によって検量線を作成した。作成した検量線を用いて、各インプリントシート上に固定された、単位面積あたりの抗体の量をそれぞれ算出した。

3-2-5. インプリントシート上における水溶液の流速評価

作製した 3 種類のインプリントシート上における、毛細管現象による水溶液の流速を、以下の手順によって評価した。まず 2% Triton X-100 水溶液に対して、赤色色素（X-200，シヤチハタ株式会社，日本）を添加し、流速評価用の水溶液とした。3 種類のインプリ

ントシート（5 mm × 30 mm のストリップ）の端部（端~5 mm の位置）に、流速評価用の水溶液 10 μL を滴下し、インプリントシート上を水溶液が流れる様子を動画撮影した。撮影した動画から、インプリントシート上の所定の領域（インプリントシートの端から 15 mm~25 mm の区間）を水溶液の先端が通過する時間を計測し、平均流速を算出した。

3-2-6. イムノアッセイ

次に、3 種類のインプリントシートを用いて作製したデバイスのイムノアッセイにおける検出性能を比較するために、ヒト血清に CRP を添加したサンプルを対象として蛍光検出サンドイッチイムノアッセイを行った。非標識抗ヒト CRP 抗体（goat, polyclonal, Bethyl Laboratories, USA）を FITC 標識抗ヒト CRP 抗体の代わりとして用いたことを除いて、3-2-4 項に示したデバイスの作製方法と同様に、3 種類のインプリントシートと吸収パッドを組み合わせたラテラルフローイムノアッセイデバイスをそれぞれ作製した。

CRP を枯渇化処理した標準ヒト血清（Lot No. 3620-20, BBI Solutions）に対して、一定量のヒト CRP（BBI Solutions, UK）を添加することによって、濃度 0.01, 0.04, 0.1, 0.4, 1, 4, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ の標準 CRP 血清を調製した。調製した標準 CRP 血清および CRP を添加していない標準血清を、4% Triton-X100/PBS と等量混合して 2 倍に希釈し、デバイスに滴下するための試料液とした。これらの試料液を用いて、次の手順によってイムノアッセイを実施した。なお以下の手順すべてにおいて、インプリントシートの端部（端~5 mm の位置）に溶液を滴下した。(1) 搬送/洗浄用緩衝液（2% Triton-X100/PBS）10 μL を滴下し、インプリントシート上に固定されていない余剰な一次抗体を洗浄した。(2) 調製した CRP 試料液 10 μL を滴下した後、10 分間室温でインキュベーションした。(3) 二次抗体溶液（FITC 標識抗ヒト CRP 抗体、濃度 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2% Triton-X100/PBS）10 μL を滴下し、さらにこの滴下操作を 2 回繰り返した。(4) 搬送/洗浄用緩衝液 20 μL を滴下し、抗原と結合していない二次抗体を洗い流した。(5) エアーを吹き付けることによって洗浄後のインプリントシートを十分に乾燥させた後、蛍光顕微鏡を用いてインプリントシート上の抗体塗布領域における蛍光像を撮影した。そして 3-2-4 項と同様の方法に

よって，平均蛍光強度を算出した。以上の試験を，各インプリントシートの各条件に対して4回ずつ実施した。

3-3. 結果と考察

3-3-1. マイクロコーン表面のナノトポロジーのキャラクタリゼーション

本章における第一の目的は、基材表面のナノトポロジーが、抗体の吸着性およびラテラルフローイムノアッセイの検出感度に及ぼす効果について検証することである。そのためには、同一の材料からなる樹脂基材を用いて、表面粗さの程度が異なる微細構造を作製する必要がある。そのために本研究では、機械切削法、またはレーザーアブレーション法を用いて、円錐形状の微小穴が形成された3種類の金型を作製し、それらを用いて樹脂シートに対して熱ナノインプリントを施し、3種類のマイクロコーンアレイ構造を作製することとした。

本研究において作製した金型について、以下に説明する。機械切削法はマイクロメートルスケールの微細な切削が可能な技術であり、さらに切削表面をナノメートルスケールで平滑に仕上げることができる^{27,28}。したがって、機械切削法によって加工したMM-Ni金型には、平滑な表面が形成されることが予想された。それに対して、レーザーアブレーション法は、第2章においても言及したように、材料表面にナノメートルスケールの周期的な微細構造を形成することを可能とする技術である。そしてまた、レーザー照射の対象となる材料によって、形態が異なる微細構造を形成できることが報告されている²⁹⁻³²。したがって、Ni板またはAl板をレーザーアブレーション法によって加工したLA-Ni金型およびLA-Al金型の表面は、既存の研究において報告されているように、ナノメートルスケールの凹凸が形成された粗面となることが予想され、さらに2つの金型の表面形態は大きく異なっている可能性がある²⁹⁻³²。

この3種類の金型を用いて、PCシートを基材として用いてインプリントシートを作製した。なお基材としてPCを用いた理由は、第2章の検討において、PCインプリントシートがその他の熱可塑性樹脂（PMMA, COP）と比較して高い抗体吸着性を示し、それを用いて作製したデバイスによって血中の炎症マーカーを高感度に検出できることが実証されたためである²⁵。

PCシートを用いて作製した3種類のマイクロコーンアレイ構造のSEM像を、Fig. 3-2に示す。マイクロコーン構造同士の隙間距離は2 μm 以下であり、第2章において作製

した構造と比較して高密度に配置したものであったが、マイクロコーン構造の欠損や変形はほとんど観察されなかった。また SEM を用いて、製造ロットが異なる 2 枚のインプリントシート (30 mm × 30 mm) の中央部と端部をそれぞれ観察したところ、いずれもほぼ同一の形態を有するマイクロコーン構造が観察された (Fig. 3-3)。つまり、マイクロコーン構造の形態は、形成された部位および製造ロットに依存しないことが確認された。この結果は、熱ナノインプリント法を用いた加工プロセスが、本章の実験においても高い再現性で実施されたことを示している。

3 種類のマイクロコーン構造の表面形状を比較したところ、明確な差異が観察された (Fig. 3-2 (b), (d), (f))。まず MM-Ni 金型を用いて作製したマイクロコーン構造 (以下、MM-Ni 構造と表記する) においては、極めて滑らかな表面が観察された (Fig. 3-2 (b))。この滑らかな表面は、切削加工の際に用いられたドリル刃の先端形状を反映したものと考えられる。また MM-Ni 構造の先端は、わずかに窪んだ凹型構造となっており、その直径は約 8 μm であった。

一方で、LA-Ni 金型および LA-Al 金型を用いて作製したマイクロコーン構造 (以下、LA-Ni 構造、LA-Al 構造と表記する) の表面においては、数十～数百 nm のサイズの微細な凹凸構造が観察された。また LA-Ni 構造の先端には、マイクロスケールの隆起構造が 2~3 個形成されていることが確認された。このような差異は、金型の種類の違い、つまり 3 種類の金型表面において明確に異なるナノトポロジーが形成されたことに起因するものであると想定される。前述したように、レーザーアブレーション法によって材料表面に形成されるナノメートルスケールの微細構造は、レーザーを照射する材料やレーザーの照射条件に依存して変化することが報告されている²⁹⁻³²。具体的には、材料ごとの電子格子相互作用および熱拡散の程度の違いや、レーザーの波長およびパルス幅などの条件が、形成される微細構造の形態に影響することが報告されている。したがって、材料や加工条件の違いによって生じた金型の表面構造の差異が、それぞれのマイクロコーンの表面構造として反映されたものと考えられる。

なお本検討では、異なる材料あるいは加工方法によって作製した金型を用いて 3 種類のインプリントシートを作製したものの、それぞれの金型表面には同一の離型処理を施したため、3 種類のインプリントシート表面の化学的性質に差異はないものと考えられ

る。すなわち，熱ナノインプリントによって形状や表面粗さなどの物理的性質のみが異なる3種類のマイクロコーン構造を作製することができたと想定された。

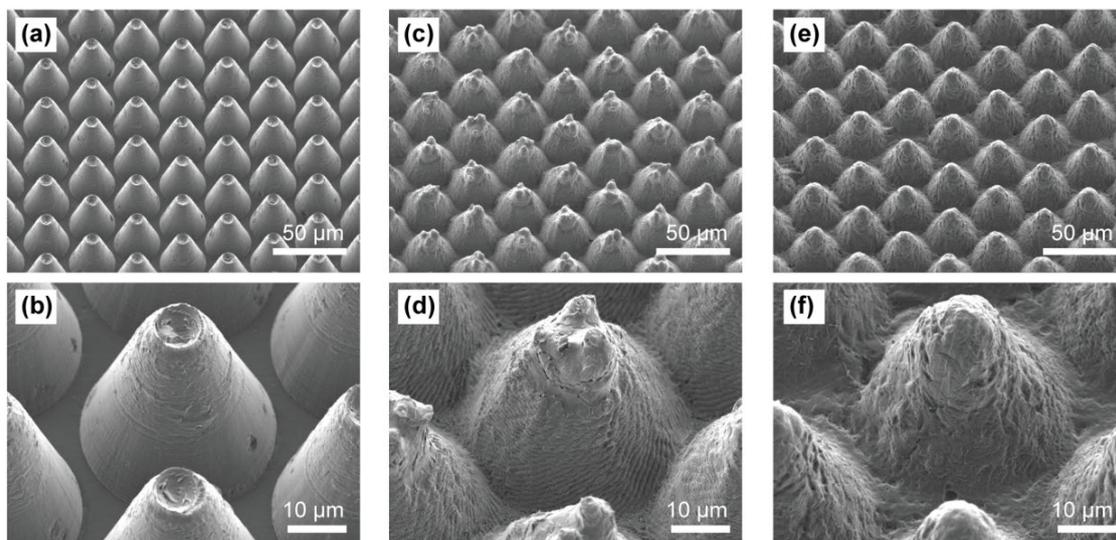


Fig. 3-2 3種類の金型を用いて作製したマイクロコーンアレイ構造のSEM像 (a, b) MM-Ni構造 (c, d) LA-Ni構造 (e, f) LA-Al構造 (Adapted with permission from Ref. 26. Copyright 2019 American Chemical Society.)

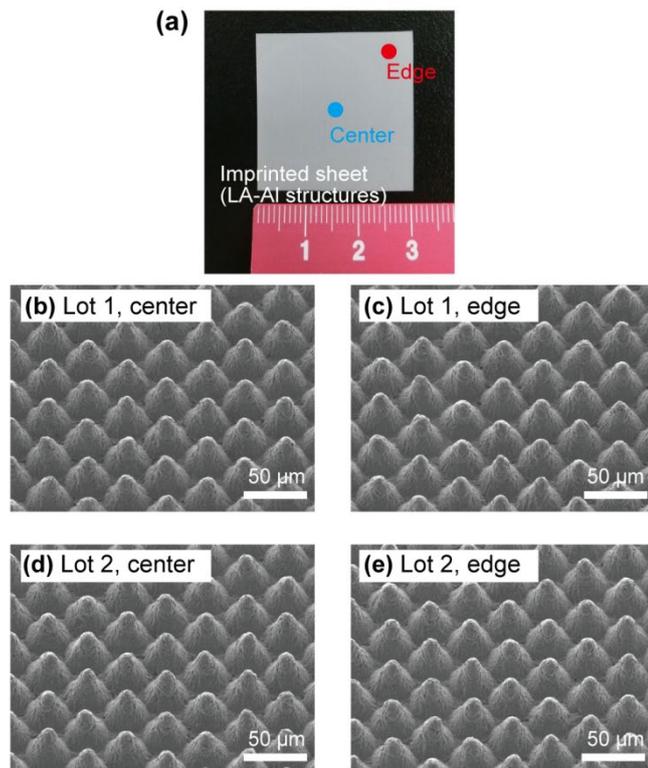


Fig. 3-3 製造ロットが異なる2枚のインプリントシート (LA-Al 構造) の観察結果 (a) インプリントシートの観察位置を表した画像 (b-e) LA-Al 構造の SEM 像 (b) 1 枚目 (製造ロット 1) の中央部 (c) 製造ロット 1 の端部 (d) 2 枚目 (製造ロット 2) の中央部 (e) 製造ロット 2 の端部 (Adapted with permission from Ref. 26. Copyright 2019 American Chemical Society.)

次に、マイクロコーン表面のナノトポロジーの差異をより詳細に評価するために、FIB を用いて 3 種類のマイクロコーン構造を切断し、その断面を観察することで、表面形状を評価した。3 種類のマイクロコーン構造の断面試料を、高分解能 SEM を用いて観察した画像を、Fig. 3-4 に示す。これらは、各マイクロコーン構造における上部、中部、下部の 3 箇所の表面形状を、より高倍率 (倍率 30,000 倍) で観察したものである。なお、図中に示した黄色の四角形は高倍率における観察箇所を、黄色の点線はマイクロコーンの表面を、それぞれ示している。Fig. 3-4 に示すように、FIB を用いることで、表

面の形状を損傷することなく、マイクロコーン構造をその中心部を通過する位置において切断することができた。

作製した断面試料から観察された各マイクロコーン構造の表面形状には、明確な差異が確認された。まず MM-Ni 構造においては、平滑な表面線が観察された。特に、MM-Ni 構造の中央部から下部にかけては、極めて滑らかな、ほぼ直線形状の表面線が観察された。この MM-Ni 構造の観察箇所ごとにおける表面形状の違いは、切削に用いたドリルの形状を反映したものと考えられる。その一方で、LA-Ni 構造および LA-Al 構造においては、粗い表面線が観察された。特に LA-Ni 構造の表面には、数十 nm の大きさの凹凸が多数形成されており、顕著に粗くなっていた。

MM-Ni 構造、LA-Ni 構造、LA-Al 構造の断面像から、基準線に対する表面線の相対長さを解析した結果、それぞれ 1.015、1.285、1.096 であった (Table 3-1)。なおこの解析においては、相対長さの解析値が 1 に近づくほど、表面が平滑であることを表している。つまりこの結果は、LA-Ni 構造の表面が最も粗い一方で、MM-Ni 構造の表面はほとんど凹凸のない平坦な面であることを示している。この結果から、3 種類のマイクロコーン構造の比表面積についても、LA-Ni 構造が最も大きく、MM-Ni 構造が最も小さくなっていることが示唆された。

以上の結果より、表面のナノポロジリーを変化させた金型を利用して、樹脂シートに対してナノインプリント加工を施すことによって、構造体表面のナノポロジリーや表面粗さを制御できることが示された。

なお第 2 章でも言及したように、表面のナノ構造を制御した金型と熱ナノインプリント法を組み合わせた本研究における微細加工プロセスは、階層的なマイクロ・ナノ構造体を簡便に作製できる手法として有用であると考えられる。本章において実施した加工方法に限らず、エッチングやブラスト処理など様々な方法を用いて、金型の表面形態を制御することによって、任意の表面形態を有するマイクロ・ナノ構造体を作製できるものと期待される。

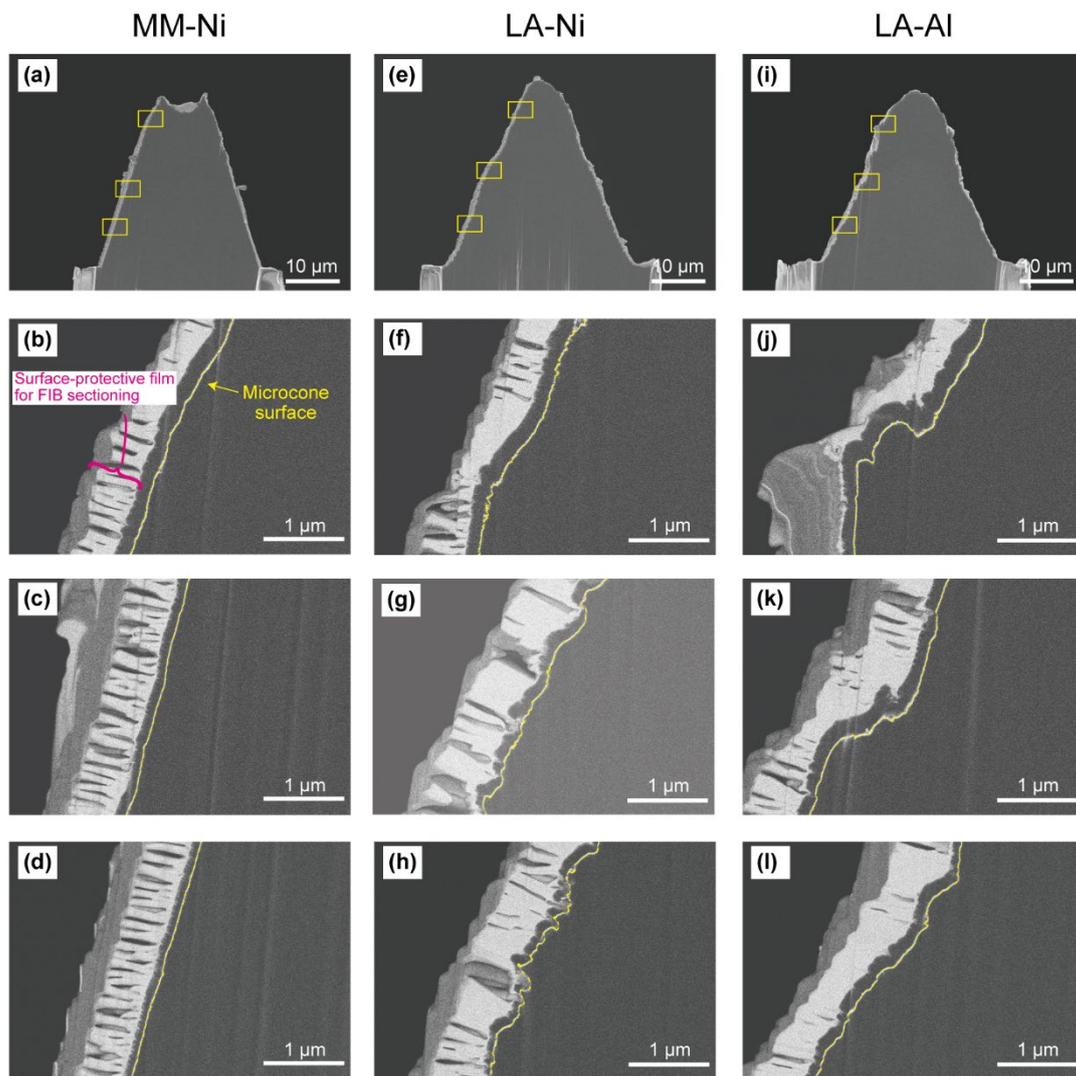


Fig. 3-4 3種類のマイクロコーン構造の断面SEM像。全体像における黄色の四角形は、高倍率における観察箇所を表している。高倍率像における黄色の点線は、マイクロコーンの表面を表している。(a-d) MM-Ni 構造 (a) 全体像 (b) 上部 (c) 中部 (d) 下部 (e-h) LA-Ni 構造 (e) 全体像 (f) 上部 (g) 中部 (h) 下部 (i-l) LA-Al 構造 (i) 全体像 (j) 上部 (k) 中部 (l) 下部 (Adapted with permission from Ref. 26. Copyright 2019 American Chemical Society.)

Table 3-1 各マイクロコーン構造の断面像から算出した表面線の相対長さ（基準線の長さ=1） (Adapted with permission from Ref. 26. Copyright 2019 American Chemical Society.)

Structure	Relative length of surface line to linear baseline [-]			
	Upper	Middle	Lower	Average
MM-Ni	1.020	1.011	1.013	1.015
LA-Ni	1.331	1.188	1.337	1.285
LA-Al	1.062	1.087	1.139	1.096

3-3-2. インプリントシート上における抗体の吸着量の評価

ラテラルフローイムノアッセイにおいて、基材上に固定化される一次抗体の量は、測定感度、再現性を左右する重要なパラメーターである^{33,34}。したがって本項では、表面のナノポロジが異なる3種類のインプリントシートを用いて、各インプリントシート上に固定化される抗体の量を評価することとした。

3種類のインプリントシートに対する FITC 標識抗体の吸着試験において観察された蛍光顕微鏡像、および蛍光強度の測定結果を Fig. 3-5 に示す。以下、LA-Ni 構造、LA-Al 構造、MM-Ni 構造が形成された PC インプリントシートをそれぞれ、LA-Ni シート、LA-Al シート、MM-Ni シートと表記する。蛍光強度については、LA-Ni シート、LA-Al シート、MM-Ni シートの順に高くなった。そして、すべてのインプリントシートにおいて、マイクロコーン構造が形成されていない平坦な領域からは、蛍光はほとんど観察されなかった。

次に、PC フラットシートに対して既知濃度の FITC 標識抗体溶液を塗布することによって作成した検量線を用いて、MM-Ni シート、LA-Ni シート、LA-Al シート上に固定された単位面積あたりの抗体の量を求めたところ、それぞれ 0.97, 2.1, 1.3 ng mm⁻²であることが算出された (Table 3-2)。これらの値は、先行研究において報告された、化学的な表面処理によって抗体の吸着性を高めたシリコン基板上に固定された抗体の量 (1.11~3.15 ng mm⁻²) と同程度であった³⁵。したがって、本研究において作製した基材

上には、免疫アッセイを実施するために十分な量の抗体を、化学的な表面処理を行なうことなく固定できることが示唆された。

前項で算出した3種類のマイクロコーン構造における表面線の相対長さに対して、固定化された単位面積あたりの抗体の量をプロットしたグラフを、Fig. 3-6に示す。マイクロコーン構造における表面線の相対長さ、抗体の固定量は正の相関を示した。またマイクロコーン構造における表面線の相対長さは、比表面積や表面粗さとの間に正の相関を示すものと容易に推察される。そのため、PCインプリントシートにおける比表面積や表面粗さが、抗体の固定化量と相関することが示唆された。

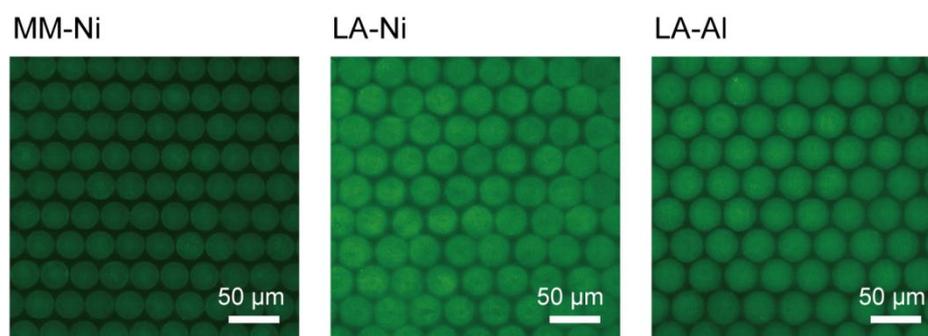
なお、単に比表面積や表面粗さの絶対値の大小だけではなく、マイクロコーン表面に形成されたナノメートルスケールの凹凸構造の形状や大きさが、効率的な抗体の吸着に寄与した可能性も想定される。特にLA-Ni構造表面において観察された表面の凹凸（大きさ数十nm）と抗体分子の大きさ（およそ10~15nm）はほぼ同程度であるため、表面上の微小構造が抗体の物理吸着を促進し、さらに安定化させた可能性もある。今後、表面のナノ構造と抗体の吸着性の関係をより詳細に評価するためには、ナノ構造のサイズや密度を系統的に変化させた複数のインプリントシートを作製して、それらの形状と抗体の吸着性を評価し、比較することが有効であるかもしれない。

なおこれまでに、樹脂製のマイクロプレート上において、固定される抗体量の上限值は5~10 ng mm⁻²であることが報告されている³⁶。そのため、本研究で評価を行ったインプリントシート上における抗体の固定化量についても、工夫次第で今回の結果よりもさらに数倍程度増加させることができる可能性がある。

抗体の固定化量を増加させるためのアプローチとして、まずインプリントシートの表面ナノ構造をさらに粗くし、比表面積を増加させる方法が考えられる。そのような構造を熱ナノインプリント法によって作製するためには、形成したい微細構造の形状に対応した金型の作製が必要となる。金型の加工方法として、例えばレーザーアブレーション法においてレーザーの照射条件や材料を最適化することや、作製した金型に対して追加でエッチング加工やブラスト加工を施すことが有効であると考えられる。そしてまた、インプリントシートに対する抗体の塗布濃度および塗布した抗体の乾燥条件を最適化することも、抗体の固定化量を増加させるために必要であると想定される。また、今回

の研究方針とは相反するが、簡便に実施することができる化学的な表面処理をインプリントシートに対して施すことも、抗体の固定化量を上限値に近づける上で必要となるかもしれない。

(a)



(b)

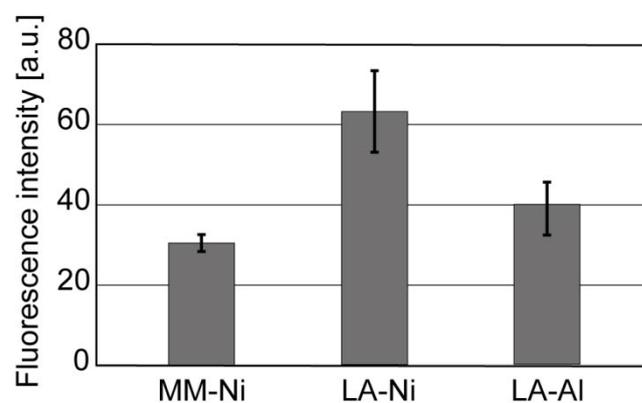


Fig. 3-5 3 種類の PC インプリントシートに対する FITC 標識抗体の吸着試験の結果 (a) 3 種類のマイクロコーン構造表面に吸着した FITC 標識抗体の蛍光像 (b) 各インプリントシートの抗体塗布領域における蛍光強度 (Adapted with permission from Ref. 26. Copyright 2019 American Chemical Society.)

Table 3-2 各インプリントシート上に固定化された抗体量の算出結果 (Adapted with permission from Ref. 26. Copyright 2019 American Chemical Society.)

Structure	Amount of immobilized antibody [ng mm ⁻²]					SD
	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Average	
MM-Ni	0.88	0.95	1.0	0.98	0.97	0.068
LA-Ni	2.1	1.9	1.9	2.6	2.1	0.35
LA-AI	1.3	1.1	1.1	1.6	1.3	0.22

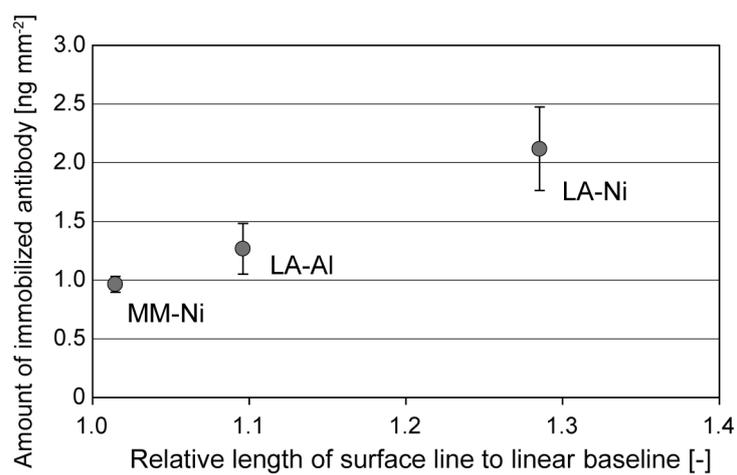


Fig. 3-6 各インプリントシートにおける表面線の相対長さと固定化された抗体量の関係を示したグラフ (Adapted with permission from Ref. 26. Copyright 2019 American Chemical Society.)

3-3-3. イムノアッセイによるデバイスの検出性能評価

最後に、基材表面のナノポロジーマトリクスがラテラルフローイムノアッセイにおける検出性能に与える影響を評価するため、3種類のインプリントシートを用いて蛍光検出サンドイッチイムノアッセイを実施した。第2章の検討と同じく、検出対象物質としては血液中の炎症マーカーであるCRPを用いた。なお繰り返しになるが、CRP検出における臨床的閾値は $3\sim 5\ \mu\text{g mL}^{-1}$ である³⁷。

本実験においても、それぞれのインプリントシートと吸収パッドを組み合わせることで、3種類のデバイスを作製した。CRP試料液、二次抗体溶液（FITC標識抗体溶液）、搬送/洗浄用緩衝液のすべてには界面活性剤（Triton X-100）が添加されており、それぞれの水溶液をインプリントシートに対して滴下するだけで、毛細管現象によって水溶液を搬送することができる。

まず、3種類のインプリントシート上における毛細管現象による水溶液の流速を評価したところ、それらの値は同程度（速度 $3.3\sim 3.6\ \text{mm s}^{-1}$ ）であり（Fig. 3-7）、3種類のインプリントシートにおいて流速に大きな差はないことが示された。また製造ロットが異なる4枚のLA-AIシートを用いて、毛細管現象による水溶液の流速を評価した場合にも同様に、流速はほぼ同じであった（Fig. 3-8）。作製したインプリントシートは製造ロット間における流速のばらつきが小さいため、アッセイの再現性を向上する上でも有用であるといえる。

これらのインプリントシートと吸収パッドを組み合わせたデバイスに対しては、液体の滴下、搬送を複数回実施することができる。具体的には、一度に $10\sim 20\ \mu\text{L}$ の水溶液を滴下でき、さらにこの操作を繰り返すことで、吸収パッドの大きさにも依存するが、合計で $100\ \mu\text{L}$ 程度の液体を搬送することができる。作製したデバイスに対し、そのような液体の滴下操作を繰り返すことによって、サンドイッチイムノアッセイを実施した。最終的に蛍光顕微鏡を用いて抗体塗布領域を観察し、蛍光強度を算出した。

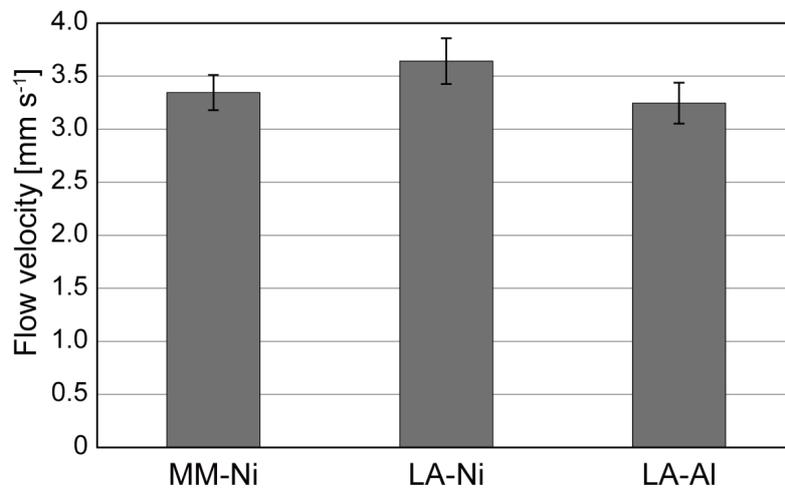


Fig. 3-7 3 種類のインプリントシート上における毛細管現象による水溶液の流速
 (Adapted with permission from Ref. 26. Copyright 2019 American Chemical Society.)

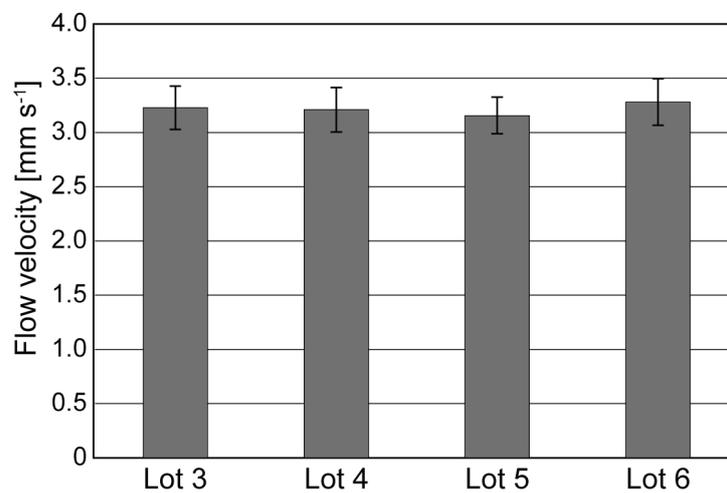


Fig. 3-8 製造ロットが異なる4枚のインプリントシート (LA-AI 構造) 上における毛細管現象による水溶液の流速
 (Adapted with permission from Ref. 26. Copyright 2019 American Chemical Society.)

3種類のインプリントシートによって作製したデバイスを用いてイムノアッセイを実施した結果を、Fig. 3-9に示す。3種類すべてのデバイスにおいて、blank 試料（CRPの濃度0の試料）の測定値の平均+3 σ によって定義される LOD は、約0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ であった。この LOD の値は、近年報告されている蛍光ナノ粒子や量子ドットを標識した抗体を用いた高感度ラテラルフローイムノアッセイに関する研究において報告されている値³⁸⁻⁴⁰、および第2章で作製したPCインプリントシート（*d*-48構造）を用いたアッセイにおけるLODの値と比較して、一桁程度小さい値である。したがって3種類のデバイスは、いずれも高い検出感度を有していることが実証された。第2章の結果と比較して検出感度が高くなった要因として、隙間なく密に配置されたマイクロコーンアレイ構造が抗原の効率的な捕捉に寄与したこと、および、アッセイの最後に滴下する搬送/洗浄用緩衝液の体積を2倍に増やしたことによって、基材に対する抗原や抗体の非特異的な吸着が抑制されたこと、などが考えられる。

すべてのデバイスにおいて高い検出感度が示された一方で、高濃度の試料液を測定した場合の蛍光強度については、3種類のデバイス間で明確な差異がみられた。具体的には、抗原濃度10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ の試料液を測定した場合、LA-NiシートおよびLA-Alシートの蛍光強度は、MM-Niシートの蛍光強度と比較して2倍程度高かった（Fig 3-9 (a)-(c)）。この結果は、サンドイッチイムノアッセイにおける二次抗体由来の信号強度と、マイクロコーン表面のナノトポロジーの間に、明確な相関があることを示唆している。つまり、マイクロコーン表面に存在するナノメートルサイズの凹凸構造が、一次抗体の吸着量を増加させた結果、アッセイの信号強度が増強されたものと考えられた。今後さらに信号を増強させるためには、3-3-2項に記載したように、金型の表面加工を工夫して、より粗い表面ナノ構造を作製することや、抗体の塗布、乾燥の条件を最適化することによって、基材に対する一次抗体の吸着量を増加させることが有効であると想定される。

また特筆すべきこととして、MM-Niシートにおいては、抗原濃度4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ の試料液を測定したときの蛍光強度と比較して、より高濃度である10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ の試料液を測定したときの蛍光強度が低くなった。その一方で、LA-Niシート、およびLA-Alシートでは、測定した抗原濃度の範囲（0.01~10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ）において、抗原濃度の増加に依存して蛍光強度は増加し続けた。MM-Niシートにおいて観察された、高濃度の抗原を測定した場

合に蛍光強度が低下するという結果は、ELISA などの一般的なサンドイッチ免疫アッセイにおいて生じる「フック現象」に起因することが考えられる。フック現象とは、基材表面に固定された抗体によって捕捉されずに遊離している抗原と、標識抗体が結合することによって、サンドイッチ免疫複合体の形成が抑制されてしまう、という現象であり、その結果、抗原濃度がある程度上昇すると信号強度が低下する、というものである⁴¹。つまり本実験においても、MM-Ni シート上に固定された一次抗体に対して過剰量の抗原を滴下した結果、一次抗体に捕捉されずに基材上に残存した抗原が、サンドイッチ免疫複合体の形成を抑制したものと考えられた。

以上の結果より、LA-Ni シート、LA-Al シートを用いたデバイスにおいては、MM-Ni シートを用いたデバイスと比較して、検出対象物質を定量できる濃度範囲（ダイナミックレンジ）が拡大することが示された。

また、LA-Ni シートおよび LA-Al シートによって作製されたデバイスを用いて、より高濃度の試料液（抗原濃度 $10\sim 400\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ）を用いて測定を行ったところ、 $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ までは抗原濃度の増加に依存して蛍光強度が上昇し、 $400\ \mu\text{g mL}^{-1}$ においては下降した（Fig. 3-10）。したがって、LA-Ni シートおよび LA-Al シートを用いたデバイスにおける、高濃度側のダイナミックレンジは、概ね $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ 程度であることが示唆された。この値は、微細加工基材やマイクロ流体デバイスを用いた免疫アッセイに関する研究において報告されている値^{42,43}と比較して 1~2 桁程度大きく、ニトロセルロースメンブレンを用いたラテラルフロー免疫アッセイデバイスの研究において報告されている値と同程度であった。したがって本デバイスは、上述した微細加工技術を用いた免疫アッセイデバイスと比較して、幅広いダイナミックレンジを有していることが示唆された。そして、この幅広いダイナミックレンジは、マイクロコーン表面に存在するナノメートルスケールの構造に起因して、一次抗体の吸着性が高くなったことによるものであると考えられた。

また Fig. 3-9 および Fig. 3-10 に示した結果から、3 種類のデバイスすべてにおいて、一般的なサンドイッチ免疫アッセイの結果と同様のシグモイド型の検量線⁴⁴が得られることが示された。

以上の結果より、マイクロ・ナノ加工技術を利用した金型の作製、および熱ナノインプリント法を組み合わせることによって、抗体固定化基材の表面に形成されたナノスケールの凹凸構造が、抗体の吸着性の向上および免疫アッセイにおけるダイナミックレンジの広範化に寄与することが示唆された。

本研究において開発したデバイスは、基材表面のナノ構造を制御することによって、アッセイの検出性能をコントロールできる。今後、本研究において開発したプラットフォームの信頼性が、紙や多孔質膜によって構成されている従来品と比較して高いことをより詳細に実証できれば、定量的な測定が可能なラテラルフロー免疫アッセイデバイスとして広く応用されることが期待される。

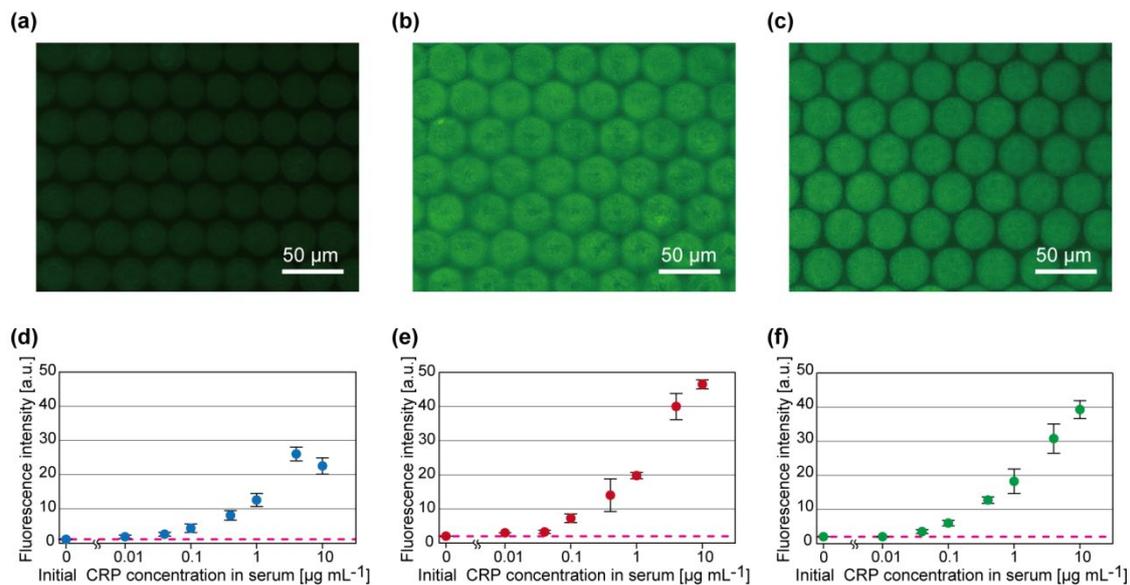


Fig. 3-9 3種類のインプリントシートを用いた、血清中のCRPを検出対象とした免疫アッセイの結果 (a-c) CRP濃度 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ の試料液を測定した際に、各マイクロコロン構造上において観察された蛍光顕微鏡像 (a) MM-Ni 構造 (b) LA-Ni 構造 (c) LA-Al 構造 (d-f) CRP濃度 $0\sim 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ の試料液を用いたときの、各インプリントシートにおける蛍光強度の算出結果。点線は blank+3 σ の値を表す。(d) MM-Ni 構造 (e) LA-Ni 構造 (f) LA-Al 構造 (Adapted with permission from Ref. 26. Copyright 2019 American Chemical Society.)

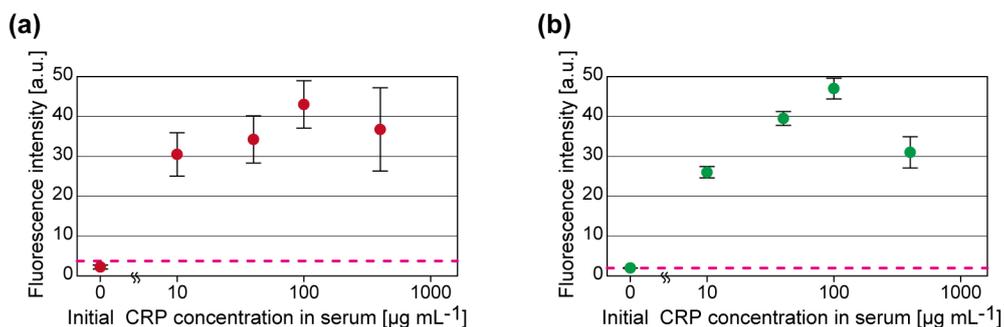


Fig. 3-10 CRP濃度 $0, 10\sim 400 \mu\text{g mL}^{-1}$ の試料液を用いたときの、免疫アッセイの結果。点線は blank+3 σ の値を表す。(a) LA-Ni 構造 (b) LA-Al 構造

3-4. 結論

本章では、表面のナノトポロジーが異なる3種類のインプリントシートを作製し、表面のナノトポロジーが抗体の吸着性やラテラルフローイムノアッセイの検出性能に与える効果について検証した。

まず、機械切削法またはレーザーアブレーション法によって作製した3種類の金型を用いて、PCシートに対して熱ナノインプリントを施すことによって、表面のナノトポロジーが異なる3種類のマイクロコーンアレイ構造を作製した。各マイクロコーン構造について、FIBを用いて作製した断面試料を観察した結果、レーザーアブレーション金型を用いて作製したマイクロコーン構造の表面において、数十 nm 程度の大きさの凹凸が無数に形成されていることが確認された。次に3種類のPCインプリントシートを用いて、抗体の吸着試験および血清中のCRPを検出対象としたラテラルフローイムノアッセイを実施した結果、すべての構造において高い検出感度を有していることが示され (LOD: 約 $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$)、さらにマイクロコーン構造の表面に形成されたナノメートルスケールの凹凸が、基材に対する抗体の吸着性の向上、さらにはイムノアッセイにおけるダイナミックレンジの広範化に寄与することが示唆された。

以上の結果より、本研究において提案されたラテラルフローイムノアッセイプラットフォームは、迅速、簡便というPOCTの特徴を満たしつつ、検出感度やダイナミックレンジといった検出性能においても優れていることが実証された。さらにまた、熱ナノインプリント法を用いた抗体固定化基材の作製プロセスは、再現性が高い手法であるといえる。今後、本研究において開発したプラットフォームの信頼性が、紙や多孔質膜によって構成されている従来品と比較して高いことをより詳細に実証できれば、定量的な測定が可能なラテラルフローイムノアッセイデバイスとして広く応用されることが期待される。

また、本研究はナノ加工技術によって作製した表面が、生体分子の物理的な吸着を促進することを実証した一例であるともいえる。したがって、今回の結果は、イムノアッセイに限らず、広く生化学的アッセイの分野において有用な知見をもたらすかもしれない。

引用文献

- 1 L. Rivas, M. Medina-Sánchez, A. De Escosura-Muñiz and A. Merkoçi, *Lab Chip*, 2014, **14**, 4406–4414.
- 2 I. N. Katis, P. J. W. He, R. W. Eason and C. L. Sones, *Biosens. Bioelectron.*, 2018, **113**, 95–100.
- 3 A. H. C. Ng, U. Uddayasankar and A. R. Wheeler, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 991–1007.
- 4 R. M. Mohamadi, Z. Svobodova, Z. Bilkova, M. Otto, M. Taverna, S. Descroix and J. L. Viovy, *Biomicrofluidics*, 2015, **9**, 054117.
- 5 K. Tenda, B. van Gerven, R. Arts, Y. Hiruta, M. Merckx and D. Citterio, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, **57**, 15369–15373.
- 6 L. S. A. Busa, M. Maeki, A. Ishida, H. Tani and M. Tokeshi, *Sens. Actuators B Chem.*, 2016, **236**, 433–441.
- 7 N. Dhull, G. Kaur, V. Gupta and M. Tomar, *Sens. Actuators B Chem.*, 2019, **293**, 281–288.
- 8 W. Hong, S. Lee and Y. Cho, *Biosens. Bioelectron.*, 2016, **86**, 920–926.
- 9 A. W. Browne, L. Ramasamy, T. P. Cripe and C. H. Ahn, *Lab Chip*, 2011, **11**, 2440–2446.
- 10 Y. Zhang and H. Noji, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 92–101.
- 11 X. Ding, M. G. Mauk, K. Yin, K. Kadimisetty and C. Liu, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 655–672.
- 12 R. Banerjee and A. Jaiswal, *Analyst*, 2018, **143**, 1970–1996.
- 13 B. O’Farrell, in *Lateral Flow Immunoassay*, eds. R. C. Wong and H. Y. Tse, Humana press, 2009, pp. 1–33.
- 14 M. Yamada, P. Mao, J. Fu and J. Han, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7067–7074.
- 15 N. S. K. Gunda, M. Singh, L. Norman, K. Kaur and S. K. Mitra, *Appl. Surf. Sci.*, 2014, **305**, 522–530.
- 16 A. K. bio Babil and J. Kim, *Analyst*, 2018, **143**, 3335–3342.

- 17 D. Kim and A. E. Herr, *Biomicrofluidics*, 2013, **7**, 041501.
- 18 K. Tsougeni, P. S. Petrou, D. P. Papageorgiou, S. E. Kakabakos, A. Tserepi and E. Gogolides, *Sens. Actuators B Chem.*, 2012, **161**, 216–222.
- 19 V. C. Rucker, K. L. Havenstrite, B. A. Simmons, S. M. Sickafoose, A. E. Herr and R. Shediach, *Langmuir*, 2005, **21**, 7621–7625.
- 20 C. F. O. Hoy, K. Kushiro and M. Takai, *Analyst*, 2018, **143**, 865–873.
- 21 W. Jung, J. Han, J. W. Choi and C. H. Ahn, *Microelectron. Eng.*, 2015, **132**, 46–57.
- 22 A. L. Ahmad, S. C. Low, S. R. Abd Shukor and A. Ismail, *J. Appl. Membr. Sci. Technol.*, 2007, **5**, 25–31.
- 23 A. L. Ahmad, S. C. Low, S. Abd. Shukor, A. Ismail and A. R. Sunarti, *Desalination Water Treat.*, 2009, **5**, 99–105.
- 24 A. A. Isakova, A. V. Indenbom, O. D. Yakobson, O. L. Gribkova, V. V. Brevnov, E. O. Garina and A. V. Vannikov, *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.*, 2016, **52**, 677–683.
- 25 S. Aoyama, Y. Akiyama, K. Monden, M. Yamada and M. Seki, *Analyst*, 2019, **144**, 1519–1526.
- 26 S. Aoyama, K. Monden, Y. Akiyama, M. Yamada and M. Seki, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 13377–13382.
- 27 K. Saptaji, in *HandBook of Manufacturing Engineering and Technology*, ed. A. Y. C. Nee, 2015, pp. 1089–1107.
- 28 S. Gao and H. Huang, *Front. Mech. Eng.*, 2017, **12**, 18–32.
- 29 P. T. Mannion, J. Magee, E. Coyne, G. M. O'Connor and T. J. Glynn, *Appl. Surf. Sci.*, 2004, **233**, 275–287.
- 30 M. Hashida, A. F. Semerok, O. Gobert, G. Petite, Y. Izawa and J. F. Wagner, *Appl. Surf. Sci.*, 2002, **197–198**, 862–867.
- 31 J. Wang and C. Guo, *Appl. Phys. Lett.*, 2005, **87**, 251914.
- 32 A. Y. Vorobyev, V. S. Makin and C. Guo, *J. Appl. Phys.*, 2007, **101**, 034903.
- 33 E. B. Bahadır and M. K. Sezgintürk, *Trends Anal. Chem.*, 2016, **82**, 286–306.
- 34 Q. Zeng, X. Mao, H. Xu, S. Wang and G. Liu, *Am. J. Biomed. Sci.*, 2009, **1**, 70–79.

- 35 H. Y. Song, X. Zhou, J. Hobley and X. Su, *Langmuir*, 2012, **28**, 997–1004.
- 36 D. Wild and W. Kusnezow, in *The Immunoassay Handbook*, ed. D. Wild, Elsevier Science, 2013, pp. 287–299.
- 37 W. L. Roberts, R. Sedrick, L. Moulton, A. Spencer and N. Rifai, *Clin. Chem*, 2000, **46**, 461–468.
- 38 X. Cheng, X. Pu, P. Jun, X. Zhu, M. Chen and M. Chen, *Int. J. Nanomedicine*, 2014, **9**, 5619–5626.
- 39 Y. Cai, K. Kang, Y. Liu, Y. Wang and X. He, *Anal. Biochem.*, 2018, **556**, 129–135.
- 40 V. Borse and R. Srivastava, *Sens. Actuators B Chem.*, 2019, **280**, 24–33.
- 41 A. N. Hoofnagle and M. H. Wener, *J. Immunol. Methods*, 2009, **347**, 3–11.
- 42 C. Jönsson, M. Aronsson, G. Rundström, C. Pettersson, I. Mendel-Hartvig, J. Bakker, E. Martinsson, B. Liedberg, B. MacCraith, O. Öhman and J. Melin, *Lab Chip*, 2008, **8**, 1191–1197.
- 43 M. Y. H. Tang and H. C. Shum, *Lab Chip*, 2016, **16**, 4359–4365.
- 44 C. F. Woolley, M. A. Hayes, P. Mahanti, S. Douglass Gilman and T. Taylor, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 8605–8615.

第4章 結論

4-1. 各章の要約

第1章 序論

第1章では、本研究の背景として、まず臨床検査およびPOCTの現状について記述した。次に、代表的なPOCT技術の一つであるラテラルフロー免疫アッセイに関して、その原理、有用性、および課題について詳述した。そして、熱ナノインプリント法を利用した本研究のアプローチ、および本研究の目的について説明した。

第2章 インプリントシートを用いたラテラルフロー免疫アッセイプラットフォームの構築

第2章では、熱ナノインプリント法によって作製した微細加工シート（インプリントシート）が、ラテラルフロー免疫アッセイのための抗体固定化基材として適用できるかどうか検証することを目的とし、インプリントシートを用いたラテラルフロー免疫アッセイプラットフォームを構築し、実際の疾患マーカー分子の検出に応用した。具体的には、ナノメートルスケールの粗さを有するマイクロコーン構造をアレイ状に配列させたインプリントシートを組み込んだ、ラテラルフロー免疫アッセイデバイスを作製した。

滴下する水溶液に対して界面活性剤を添加することによって、水溶液がインプリントシート上を毛細管力によって搬送されることを確認した。インプリントシートの材料として3種類の樹脂（PC, PMMA, COP）を用いてデバイスを作製し、その抗体吸着性を評価した結果、PCインプリントシートが優れた抗体吸着性を示し、さらにアッセイを行うために十分な量の抗体を、表面処理を施すことなく固定できることを確認した。マイクロコーン構造の形成に起因する基材の比表面積や表面粗さの増加、および基材表面の化学的特性の両方が、抗体吸着性の向上に寄与したものと推定された。さらに、構築したデバイスの性能を評価するために、血清中のCRPを検出対象物質として蛍光検出サンドイッチ免疫アッセイを行った結果、高感度な測定（LOD：約 $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ）が可能であることを実証した。

既存の研究と比較すると、本章において構築したデバイスは、迅速かつ高感度な測定を実施できる点、抗体固定化基材を均質かつ再現良く作製できる点、基材に対して煩雑な表面処理を必要としない点において、優れていると考えられた。

以上の結果から、熱ナノインプリントによって加工を施した樹脂シートはラテラルフロー免疫アッセイにおける抗体固定化基材として有望であること、および、実際に高性能なアッセイプラットフォームの構築へと適用可能であることを示すことができた。

第3章 表面ナノ構造の制御によるラテラルフロー免疫アッセイデバイスの高性能化

第3章では、基材表面のナノポロジータが、基材に対する抗体の吸着性、および免疫アッセイの検出性能に及ぼす影響を評価すること、および、ナノポロジータの制御によってラテラルフロー免疫アッセイデバイスを高性能化することを目的とした。

機械切削法、またはレーザーアブレーション法を用いて作製した3種類の金型を利用してPCシートに対して熱ナノインプリント加工を実施し、表面のナノポロジータが異なる3種類のマイクロコーンアレイ構造をそれぞれ作製した。レーザーアブレーション法で作製した金型を用いて形成したマイクロコーン構造表面において、数十nm程度の大きさの凹凸が多数形成されていること、および、その構造上において多量の抗体が吸着することを確認した。3種類のインプリントシートを用いて血清中のCRPを検出対象物質として蛍光検出サンドイッチ免疫アッセイを行った結果、いずれのインプリントシートにおいても高い検出感度を有していることが実証された (LOD: 約 $0.01\mu\text{g mL}^{-1}$)。さらにマイクロコーン構造の表面において形成されたナノメートルスケールの凹凸構造が、免疫アッセイにおけるダイナミックレンジの広範化に寄与することが示唆された。

以上の結果より、基材表面のナノポロジータを制御することによって、基材に対する抗体の吸着性、およびアッセイにおける検出性能を向上できることが示された。本章の結果は、ナノ加工技術によって作製した表面が、生体分子の物理的な吸着を促進することを実証した稀な例であり、生化学的アッセイ分野において有用な知見をもたらすかもしれない。また、本章において検証した基材のうち、特にナノメートルスケールの凹凸

を有する構造については、疾患マーカーの単なる検出にとどまらず、ラテラルフロー免疫アッセイにおける定量的な測定を実現するための新規材料としての応用が期待される。

4-2. 本研究の総括と現状の課題

繰り返しになるが、本研究では、『熱ナノインプリント法を用いて均質なマイクロ・ナノ加工基材を作製し、それを抗体の固定化基材として組み込んだデバイスを開発することで、従来のデバイスと比較して検出感度や再現性を向上させることができるのではないか』、という仮説の下、熱ナノインプリントによって作製した微細加工基材がラテラルフロー免疫アッセイのための抗体固定化基材として適用できるか検証すること、それを用いてアッセイプラットフォームを構築すること、を主な研究目的とした。また、基材表面のナノポロジジーが免疫アッセイの性能に与える影響を評価し、その制御によってデバイスを高性能化することを、もう一つの目的とした。

第2章の検討において、熱ナノインプリント法を用いることによって、表面にナノスケールの構造を有するマイクロコーン構造を樹脂基材上において再現良く作製できること、作製した構造上に表面処理を施すことなく十分な量の抗体を固定化できること、さらにその基材を組み込んだデバイスを用いて高感度なアッセイが可能であることが実証された。また、第3章の検討において、熱ナノインプリント法を利用して、基材表面のナノ構造を制御することによって、基材に対する抗体の吸着性、および免疫アッセイにおけるダイナミックレンジを向上できることが実証された。

以上の結果から、本研究において開発した微細加工樹脂基材（インプリントシート）がラテラルフロー免疫アッセイのための抗体固定化基材として適用できること、それを用いて高性能なアッセイプラットフォームを構築できること、さらに基材表面のナノ構造を制御することによって、検出性能を向上できることが示された。

本研究において、ラテラルフロー免疫アッセイのための標準的な抗体固定化基材であるニトセルロースメンブレンの代替として、均質かつ、再現良く作製することができる基材を用いてシステムを構築したことの意義は大きいものと考えられる。繰り返しになるが、ニトセルロースメンブレンには、製造ロット内および製造ロット間における

性質のばらつきという重要な課題があるため、ラテラルフローイムノアッセイのための理想的な材料ではないということが言及されている¹⁾。より高性能なラテラルフローイムノアッセイを実現する上で、均質かつ再現良く作製できる基材を用いてデバイスを作製することは重要であると考えられ、本研究において開発した基材はそのためにも適していると言える。

さらに、本研究において構築したシステムにおける検出感度は、第3章までの検討の結果、量子ドットや蛍光ナノ粒子を標識物質として利用した高感度ラテラルフローイムノアッセイの研究において報告されている値と比較して、一桁程度高かった（LODが一桁程度低かった）。したがって、本研究において開発したシステムは、ラテラルフローイムノアッセイを高感度化するためにも有用であることが示された。より、高い検出感度を実現するためには、上述した研究において報告されている蛍光ナノ粒子や量子ドットなどの高輝度な標識物質を、本システムに適用することも有効ではないかと考えられる。

一方で、測定の再現性については課題が残った。本研究において、デバイスの作製日とアッセイの実施日を変えてアッセイを行ったところ、LODはいずれも同程度の値となり、再現良く高感度な測定が実施できることが示された。しかしながら、同一条件において短時間に繰り返し測定を行った場合における、蛍光強度のばらつきは比較的大きかった。その主な要因として、基材に対する抗体の固定化プロセスを手作業で行っていること、および、抗体を塗布した後の乾燥条件が厳密に制御されていないこと、などに起因して、基材上に固定化される抗体の量のばらつきが大きくなったことが想定された。

したがって今後は、抗体の吸着量のばらつきを抑制するために、たとえば基材に対して極少量の抗体溶液を塗布することができる専用の装置を用いた上で、塗布および乾燥の条件を最適化するなどの改良が必要であると考えられる。本研究において、ナノインプリント技術を用いることで抗体固定化基材を再現良く作製できることが実証されたため、今後は抗体の固定化プロセス等の細かな条件を適正化することによって、より測定の再現性を向上できるのではないかと考えている。

また、実用化を目指した場合に解決すべき重要な課題としては、インプリントシートの作製コストの低減が挙げられる。汎用樹脂を材料として用いた熱ナノインプリント技

術は、通常のマイクロ流体デバイスの作製と比較すると簡便であるため、マイクロ流体デバイスを用いたイムノアッセイシステムと比較して本研究のデバイスは低コストで作製できるものと考えられる。しかしその一方で、紙や多孔質膜を基材として構成されている既存のラテラルフローイムノアッセイデバイスと比較した場合、インプリント加工にかかるコストが問題となる可能性がある。

既存品における抗体固定化基材であるニトロセルロースメンブレンは、ベルトコンベアを用いた連続的な生産が可能であるため、その製造コストは低い。インプリントシート of 作製においても加工コストをなるべく低く抑えるために、たとえばローラー方式のインプリント装置を用いた連続加工プロセスを適用することによって生産性を向上させる、といった工夫が必要であると考えられる。なお、ローラー方式のインプリントでは、平板金型を用いたバッチ方式と比較して、金型の接触時間が短く、またその接触範囲も狭くなるため、樹脂の加熱、充填、冷却、離型といった一連のプロセスをより短時間で行う必要がある。したがって、加工を施す材料、ロール金型における微細構造の大きさおよび形状、金型の回転速度、などの条件を十分に考慮して検討を進める必要があると考えられる。このような技術的課題を解決できれば、本研究で提案した新規材料の実応用が実現するものと期待される。

4-3. 今後の展望

今後の展望として、本研究において開発したプラットフォームを、従来品と比較して高感度かつ測定の信頼性が高いラテラルフロー免疫アッセイデバイスとして実用化することを想定している。

具体的には第一に、感染症の迅速検査など、高感度かつ信頼性が高い定性検査を必要としている検査に応用していきたい。そのような検査の実現においては、標識試薬および検出装置の開発、および最適化も併せて進めていくことが必要となる。近年、ラテラルフロー免疫アッセイの分野において、新規の高輝度標識粒子や高精度な測定が可能な検出装置の開発およびそれらの実用化が盛んに進められているが、これらの研究の多くは、ニトロセルロースメンブレンを抗体固定化基材として用いた既存の測定デバイスを適用対象としている。しかしながら、既存の測定デバイスの基材およびその構成は、ラテラルフロー免疫アッセイが開発された 1980 年代からほとんど変化しておらず、新しい技術を応用する上で適しているとは限らない。したがって、本研究において開発したプラットフォームに対して、このような高輝度な標識粒子や、信頼性の高い検出装置を適用し、より高性能なラテラルフロー免疫アッセイシステムを実現していきたいと考えている。

次に、「定量的な測定」を可能とするラテラルフロー免疫アッセイデバイスへの応用が期待される。前述したように、既存のラテラルフロー免疫アッセイデバイスには、試験間における測定の再現性が低いという問題があるため、主に定性試験のためのツールとして用いられており、定量的な試験のために用いられている製品はほとんどない。本研究において提案したプラットフォームは、既存の製品と比較して基材の均質性が高く、さらに再現良く作製できるという特長を有している。したがって、前述した抗体の固定化に関する検討を進め、既存の製品と比較してより高い測定の再現性を実証することができれば、定量的な測定を可能とするラテラルフロー免疫アッセイデバイスとして実際に適用できるものと期待される。具体的には、炎症マーカーや心筋マーカーなどの各種疾患マーカーを対象とした定量的な検査への応用が想定される。

最後に、上述したような高い検出感度および再現性を有するラテラルフロー免疫アッセイデバイスは、現在猛威を奮っている新型コロナウイルス感染症（COVID-19）のような重大な疾病に人類が対抗していくための有力なツールにもなりうる。本研究における成果が、疾病を早期かつ正確に発見できる診断技術の開発に寄与し、人々の健康が保障される豊かな社会を実現するための一助となることを願いつつ、今後も研究を継続していく予定である。

引用文献

- 1 B. O'Farrell, in *Lateral Flow Immunoassay*, eds. R. C. Wong and H. Y. Tse, Humana press, 2009, pp. 1–33.

本論文に関連する研究業績

1. 原著論文（査読有り）

(1) ShuheAoyama, Yuto Akiyama, Kenji Monden, Masumi Yamada, and Minoru Seki, “Thermally imprinted microcone structure-assisted lateral-flow immunoassay platforms for detecting disease marker proteins”, *Analyst*, 144 (5), 1519-1526 (2019). (highlighted as front cover) 【第2章】

(2) ShuheAoyama, Kenji Monden, Yuto Akiyama, Masumi Yamada, and Minoru Seki, “Enhanced Immunoabsorption on Imprinted Polymeric Microstructures with Nanoengineered Surface Topography for Lateral Flow Immunoassay Systems”, *Analytical Chemistry*, 91 (21), 13377-13382 (2019). 【第3章】

2. 国際会議プロシーディングス（査読有り）

(1) ShuheAoyama, Yuto Akiyama, Kenji Monden, Masumi Yamada, and Minoru Seki, “Thin polymeric sheet-based immunoassay platforms integrated with micro/nano-imprinted multiscale architectures”, *Proceedings of the 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2019)*, 675-676 (2019). 【第2章】

3. 学術雑誌における解説，総説

(1) 青山周平, 秋山雄斗, 門田健次, 山田真澄, 関 実, “熱インプリントシートを用いたラテラルフロー免疫測定デバイスの開発”, *化学とマイクロ・ナノシステム学会誌*, 18 (2), 25-28 (2019). 【第2章】

(2) 青山周平, “ラテラルフロー免疫アッセイの高機能化”, *化学工学*, 85 (2), 76-79 (2021). 【第2章, 第3章】

4. 国際会議における発表

(1) ○ShuheAoyama, Yuto Akiyama, Kenji Monden, Masumi Yamada, and Minoru Seki, “Lateral flow immunoassay platforms utilizing thermally imprinted polymer substrates with microcone array structures”, *The 11th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2019)*, Yangling, China, May 17-20, 2019. 【第2章】

(2) ○Shuhei Aoyama, Yuto Akiyama, Kenji Monden, Masumi Yamada, and Minoru Seki, “Thin polymeric sheet-based immunoassay platforms integrated with micro/nano-imprinted multiscale architectures”, *The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2019)*, Basel, Switzerland, Oct. 27- 31, 2019. 【第2章】

5. 国内学会における発表

(1) ○青山周平, 秋山雄斗, 門田健次, 山田真澄, 関 実, “インプリントシートを用いたラテラルフロー免疫測定デバイスの開発”, *化学工学会 第84年会*, 芝浦工業大学, 2019年 3月13-15日 【第2章】

(2) ○青山周平, 秋山雄斗, 門田健次, 山田真澄, 関 実, “熱インプリントシートを用いたラテラルフロー免疫測定デバイスの開発”, *第39回 化学とマイクロ・ナノシステム学会*, 金沢大学, 2019年 5月27-28日 【第2章】

(3) ○青山周平, 秋山雄斗, 門田健次, 山田真澄, 関 実, “熱ナノインプリントシートを用いた抗原迅速診断デバイスの開発 (企業招待講演) ”, *令和元年 電気学会 基礎・材料・共通部門大会*, 岩手大学, 2019年 9月3-4日 【第2章】

(4) ○青山周平, 秋山雄斗, 門田健次, 山田真澄, 関 実, “熱インプリントシートを用いた迅速免疫測定デバイスの開発”, *日本分析化学会第68年会*, 千葉大学, 2019年 9月11-13日 【第2章】

(5) ○青山周平, 門田健次, 秋山雄斗, 山田真澄, 関 実, “熱インプリントシート表面のナノ形態制御と次世代免疫測定デバイスへの応用”, *第80回 分析化学討論会*, 北海道教育大学, 2020年 5月23-24日 【第3章】

6. 受賞歴

(1) 青山周平, 秋山雄斗, 門田健次, 山田真澄, 関 実, “熱インプリントシートを用いたラテラルフロー免疫測定デバイスの開発”, 優秀研究賞, *第39回 化学とマイクロ・ナノシステム学会*, 2019年 5月 【第2章】

(2) 青山周平, “熱ナノインプリントシートを用いた抗原迅速診断デバイスの開発”, 優秀論文発表賞 (IEEJ Excellent Presentation Award), *令和元年 電気学会 基礎・材料・共通部門大会*, 2019年 9月 【第2章】

謝辞

本研究を進めるにあたり，終始あたたかいご指導と激励を賜りました関 実教授に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり，多大なるご指導，ご支援を賜りました山田 真澄 准教授に心より感謝申し上げます。

本論文の審査員を引き受けてくださいました，主査の梅野 太輔 教授，および副査の藤浪 眞紀 教授および唐津 孝 教授に心より感謝申し上げます。

本研究における実験の実施にあたり，技術的なご指導，ご支援を賜りました鶴頭 理恵 博士に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり，多大なるご支援，ご協力を賜りましたデンカ株式会社の門田 健次 博士および秋山 雄斗 氏に深く感謝申し上げます。

博士後期課程への進学にあたり，多くのお力添えを賜りましたデンカ株式会社の清水 紀弘 取締役兼専務執行役員，吉野 信行 先進技術研究所長，および岡田 拓也 新規材料研究部長に深く感謝申し上げます。

この他にもデンカ株式会社の多くの方々からご支援を賜りました。この場をお借りして，皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に，本研究を遂行するにあたり私をここまで支えてくれました妻と両親に感謝申し上げます。

2021年2月

青山 周平