

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 洪 鍾 昱

本論文は、動物・植物・微生物等の遺伝子の分析を一つのチップ上で行い、その情報を短時間で収集することが可能な遺伝子解析用マイクロ生化学システムの開発に関する研究について纏めたものであり、DNA の増幅反応 (PCR) と増幅された DNA 断片のキャピラリゲル電気泳動 (CGE) による分離を一つのチップ上で行うためのマイクロチップの製作方法、及び、マイクロチップ上での PCR を可能とするための温度調節系、マイクロチャネル内で微量液体をハンドリングするためのマイクロ流体系、分離した遺伝子を検出するためのマイクロ検出系等のシステム構築と、これらを用いた遺伝子解析方法に関する検討などが含まれている。特に、本論文では、これまでマイクロチップの主要な材料として頻用されてきたシリコンやガラスではなく、安価で加工が容易なシリコン高分子の PDMS (polydimethylsiloxane) を主要な材料としたチップを作製し、周辺の構成要素と組み合わせて全体システムの構築を試みたところに特徴がある。本論文は、全 5 章から構成される。

第 1 章では、本論文の意義を明確にするために、研究の背景およびマイクロアプリケーションの特徴及びその応用について述べている。

第 2 章では、マイクロシステムの特徴、マイクロ構造内の流体の力学的な特徴、そして、本研究における主要な材料である PDMS (polydimethylsiloxane) の特徴について述べている。PDMS は、微細構造の形成が容易で、しかも、安価であるため、サンプル間でのクロスコンタミネーションを避けたシングルユースの分析に適した材料であり、光の透過性・電気的な絶縁性についても優れた材料である。

第 3 章では、マイクロチップ上でのキャピラリゲル電気泳動 (CGE) について検討している。これまで報告されてきたキャピラリ電気泳動はクロスリンクしたゲルを用いていないため、分離能や安定性に問題があった。これは、CGE では一旦充填したゲルを取り出せないためにシングルユースにする必要があり、コスト面で不利になるためと考えられた。そこで、安価な PDMS を利用したマイクロキャピラリチップを作製し、これにクロスリンクしたゲルを充填する方法の検討を行っている。バブルのない均質なゲルを充填することは分離の分解能や再現性の確保に本質的に重要であるが、通常の圧入や吸引法でマイクロチャネルに充填することは極めて難しかった。そこで、本論文では、高温でのキャピラリアク

ションを利用してゲルを導入する方法を提案し、酸素プラズマを用いたチャネル表面の改質、充填する際のポリマー溶液の濃度・温度、環境条件（気温・湿度）などの条件を明らかにした。さらに、このゲル充填マイクロキャピラリ電気泳動用チップを利用し、わずか 120 秒以内で、100 bp から 1 kbp までの DNA 分子をそのサイズ別に高速分離することに成功した。また、この際の分離に必要な DNA サンプルの量は 2.5 nL という微量で充分であることも明らかにしている。これらの結果は、PDMS マイクロチップによる CGE の初めて報告である。

第 4 章では、マイクロチップ上での遺伝子増幅反応及び増幅された特定遺伝子フラグメントの連続的な分離・分析について述べている。マイクロ反応は、高価な試薬や廃液の減量、高い界面-体積比に基づく高い熱伝導・物質移動・分解能の実現、集積化・並列処理および複製による大量生産を可能にすることが期待される。また、生体物質、触媒、プロセスの効率的なスクリーニングを、集積化されたマイクロリアクターチップで構築する可能性もある。まず、PCR 反応のために、PDMS 製のチップに一部 glass 板を組み合わせた hybrid 型のマイクロチップと、ペルチェ素子とパソコンを用いた温度コントロールシステムを開発し、このチップ上で、 λ DNA の 500 bp gene をターゲットとした DNA 分子の増幅に成功した。続いて、PCR 反応の生成物を CGE によって同じチップ上で分析することができる、集積型遺伝子解析チップを開発した。このチップでは、塩酸によって CGE チャネル内の部分親水化処理を行い、PCR 用の chamber と CGE の separation channel を幅 50 μ m の疎水性 channel でつなぐことによって、PCR 後に CGE チャネル内へのサンプル圧入が可能となるような新規な手法とデザインを提案している。このチップを用いて、PCR による増幅と増幅後の電気泳動分離（CGE）によるフラグメントの確認を one チップ上で行うことに成功した。PDMS-base の集積型遺伝子解析チップは、本研究によって初めて実現されたものである。

第 5 章においては、本研究を総括し、今後の展望を述べている。

以上述べてきたように、本論文は、様々な利点を有する PDMS ポリマーを主要材料として、PCR と CGE を one chip 上で可能とする遺伝子解析用チップを開発し、その作製条件及び分離条件を明らかにして、その有用性を実証したものである。この結果は、MEMS (Microelectromechanical Systems)、バイオテクノロジー、生物化学工学等の分野を融合した学際的な研究として重要な意味を持つとともに、遺伝子工学分野の研究や医療・環境計測分野の分析用のツールとして実用的な応用も可能なものであり、生物化学工学の発展に貢献するものである。

よって、本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。