

論文の内容の要旨

論文題目 **Development of Pressure-Actuated Microfluidic Devices for
Total DNA Analysis System**
(DNA 解析システムのための圧力駆動式マイクロ流体デバイスの開発)

氏 名 李 来ユン

ゲノム解析技術の発展に伴い, DNA サンプルの抽出から精製, 分離, そして検出に至るまでの一連の操作を迅速かつ正確に行う必要性は非常に高まりつつある。しかしながら現在の一般的な手法では最終的な分析までに要する段階数が多く, 個々の操作も煩雑であるため, 多くの時間と手間が必要となる。また, 必要となるサンプル・試薬の量も多くなる。一方, 近年, 半導体微細加工技術の応用として, マイクロスケールで少量のサンプルからのより迅速な DNA 分析に関する研究が盛んに行なわれて来た。しかし, それらのほとんどは DNA の増幅反応(PCR)や電気泳動を用いた分離に限られていた。従ってマイクロスケールで一連の DNA 分析を一度に迅速に行うためには, PCR や電気泳動以外のデバイスの開発も必要となっている。

本研究は, 一連の DNA 分析に要する操作を一つのマイクロ流体デバイス上で実現する「トータル DNA 分析」を行うために必要となるマイクロデバイスの開発に関する研究である。本研究ではまず, 圧力によって超微量の液体サンプルを正確かつ簡単に, また再現性高く秤り取る方法についての研究を行った。次に, この方法を DNA 分離の主な手段として用いられている電気泳動の際のサンプル導入法として応用した。更に, マイクロスケールでの DNA サンプル前処理システムの構築に関する研究を行った。一般的な DNA の前処理では, 必要となる有機溶媒の量が多く, また処理段階が多いため, 時間と手間がかかり更に大型の装置も必要とされる。従って本研究では DNA サンプルの前処理システムをマイクロデバイス上で行う際に必要となる, マイクロミキサーと DNA 精製システムの開発を行った。これら一連のマイクロデバイスは, 操作を圧力によって安定に行うことにより, トータル DNA 分析デバイスのための統合を容易に行うことができると考えられる。本研究ではマイクロデバイスの材料として Polydimethylsiloxane (PDMS)を用いた。PDMS はその高い透明性により光学的な観察に適しており, また複製も容易であるために, より安価なデバイスの作製が可能であり, シングルユーズの用途にも適している。

本論文は全 5 章で構成されている。第 1 章では, 本研究の背景と全体的な目的に関して述

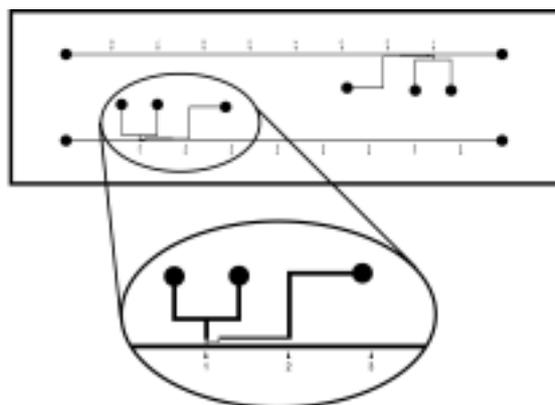


図1. 圧力駆動式サンプル導入法による電気泳動のためのマイクロデバイス

べた。第2章では、電気泳動によるDNA分離の際の微量サンプルの定量的導入法の開発について述べた。マイクロスケールで電気泳動を行う場合、通常は電氣的な手法によるサンプルの導入が一般的であるが、操作が簡便である半面、電圧の複雑な切り替えが必要となり、また、電気によってサンプルが導入されるためにサンプルを構成している成分が均一に導入されない可能性がある等の問題点があった。本研究では、圧力操作でサンプルを再現性高く導入する事を試み、新たな圧力駆動微量液滴サンプル導入システムを開発した(図1)。このシステムでは、一定量の液体サンプルを正確に秤り取るための流路と電気泳動による分離流路を、細長い構造の受動バルブによって繋げ、それらの構造に液体を導入する際に必要となる圧力差を利用することで、任意の量の液体サンプルを導入する仕組みになっている。また受動バルブにエアイベントを付け加える事によって、分離流路が溶液で満たされているときでもスムーズにサンプルを導入することが可能となっている。

実際に、ピコリットルからナノリットル程度の微量なDNAサンプルを簡単な圧力操作によって秤り取り、分離流路に導入した後に電気泳動を行う事に成功した。この方法では、サンプルを秤り取る流路のサイズを変える事によって、導入するサンプルの量を自在に変えられるため、定性的のみならず定量的な分析も可能となる。また、エアイベントの形状を最適化することで、サンプル導入の際の圧力制御を更に単純化する事にも成功した。このサンプル導入方法はその簡便性と再現性の高さから、一連のDNA操作を圧力操作で行うトータルDNA分析システムへの応用において、重要な役割を果たすと考えられる。

第3章では、三次元受動マイクロミキサーの開発について述べた。二つの異なるアスペクト比のマイクロ流路を互いに直角に重ね合わせた構造を繰り返すことで混合を行うミキサーを提案した(図2左)。このマイクロミキサーは、直角に交わる部分において流体の回転が引き起こされ、更に回転した流体をアスペクト比が低く平たいマイクロ流路の中に導入する事で拡散距離を短くし、混合を促進する、という原理に基づくものである。具体的には、マイクロ流路の断面の形やサイズがマイクロミキサー内での流体の回転に及ぼす影響を検討し、更

に混合効率を評価した。その結果,組み合わせる流路のアスペクト比の違いが大きくなるほど,流体の回転が引き起こされ,アスペクト比の低いマイクロ流路において混合が促進されることが確認された。

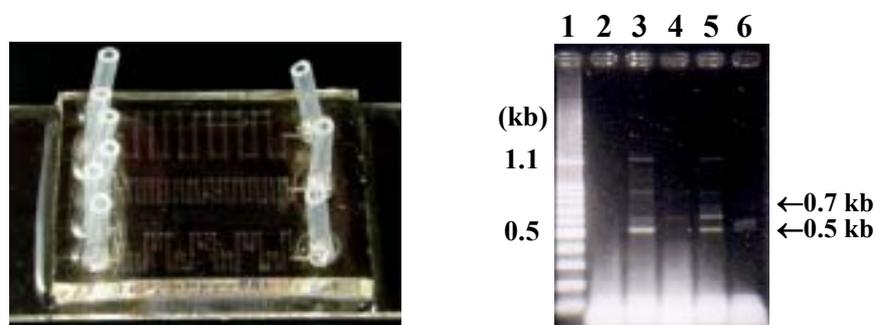


図2. 三次元受動マイクロミキサー (左) と DNA 精製マイクロデバイス上で精製した DNA の D1S80 locus 増幅結果 (右)

なお,このマイクロミキサーでは,流速が低い場合でも混合効率が高いため,他のマイクロデバイスと組み合わせる場合に圧力損失が比較的少ないという利点がある。このマイクロミキサーは濃度勾配による DNA の精製に応用することが可能であり,構造がシンプルであるため,トータル DNA 分析システムへの統合も容易であると考えられる。

第4章では,DNA の精製を行うためのマイクロデバイスの開発について述べた。有機溶媒を使用し,更に遠心分離することによって DNA の精製を行う方法が一般的であるが,本研究ではシリカビーズを用いて DNA の吸着と溶離を行う Solid Phase Extraction(SPE)法を,マイクロスケールで実現するシステムの構築を行った。微小なスケールで行う事により,無駄なく効率的に,また迅速に必要な量の DNA を精製する事が可能となる。またこの方法には,様々な種類のサンプルから得られた DNA の精製を複雑な装置を用いずに行う事ができるという利点もある。実験としては,微量の DNA サンプルとして毛根から抽出した DNA をモデルサンプルとして用いた。この方法によって精製した DNA を直接 PCR のテンプレートとして用いるために,DNA の溶離バッファーとして 15 mM MgCl₂を用いた。15 mM MgCl₂は PCR 反応のために必要な成分でもあるため,溶離した DNA 溶液を直接 PCR に応用できるという利点がある。本研究では,ヒトの染色体 DNA の一部分である D1S80 locus を増幅対象とした。この locus は親子鑑定や犯罪捜査等のために頻繁に用いられている領域でもある。実際に,一本の毛根から抽出した DNA をマイクロデバイス上で精製し,溶離した 5 マイクロリットルの DNA 溶液を用いて PCR を行った結果,増幅された D1S80 locus の DNA バンドを電気泳動により確認することができた (図2右)。今回提案した手法は,DNA の量が非常に少ない一本の毛根から DNA を効率的に抽出し,増幅可能な程度に精製する事が可能であるため,病気の診断や犯罪捜査等にも幅広く応用できると考えられる。またこの DNA 精製システムを

第3章で述べたマイクロミキサーと組み合わせることにより、微量の DNA サンプルを迅速に精製することができる DNA サンプル前処理システムの構築についても述べた。

第5章では、本研究の纏めと展望について述べた。本研究は、トータル DNA 分析を行うためのマイクロ流体デバイスの開発に関する研究である。異なるマイクロデバイスを同じ材料で作製し、圧力駆動により操作する事で、より迅速で容易に操作可能な一連のマイクロデバイスを開発した事に意味を持つ。このような一連のマイクロデバイスを既存の電気泳動や PCR のためのマイクロデバイスと組み合わせることで、トータル DNA 分析システムの構築が可能となり、ハイスループットな DNA 分析への新たなツールとして重要な役割を果たすことが期待される。