

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 李 来 琮

本論文は、細胞からの DNA の抽出・精製・増幅・分離を含めたトータル解析システムのための、圧力駆動によるマイクロ流体デバイスの開発に関する研究を纏めたものである。特に、微量の DNA 試料のための、小型でハイスループットなシステムの構築のために必須の要素技術について新規な手法を提案している。具体的には、電気泳動のための新しい原理に基づく圧力駆動式微量液体導入方法の提案、小型で製作の容易な新規受動マイクロミキサー構造の提案と有効性の検証、トータル解析に適した DNA の固相抽出による精製法の有効性の実証などを含んでいる。特に本論文では、DNA の増幅・電気泳動だけでなく、前処理も含めたトータルシステムの集積化を念頭に、これらの技術がすべて簡単な圧力操作によって駆動するところに特徴がある。

本論文は、全5章から構成されている。

第1章では、本論文の意義を明確にするために、本研究の背景およびその目的について述べている。

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ている。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等の問題点があった。そこで、本研究では、圧力操作によって微量サンプルを再現性高く操作するための、新規な原理に基づく、微量液体導入システムを開発した。このシステムでは、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、細くて濡れ難いチャンネルによって連結し、導入時の圧力差を利用することによって、任意の量の液体サンプルを正確に導入することができる。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、エアー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 解析に関わる操作を圧力駆動で行うトータル 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ている。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新規なミキサー構造を提案した。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。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、構造がシンプルで作製も容易であるため、トータル DNA 分析システムへの統合が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。マクロスケールでは有機溶媒を使用し、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ための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。溶離液として 15 mM MgCl₂を用いることで、精製後の DNA の直接 PCR が可能であることを明らかにした。本研究では、ヒトの染色体 DNA の一部分で、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 D1S80 locus を増幅対象とし、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。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事が可能な DNA サンプル前処理システムの構築についても述べている。

第5章では、本研究の纏めと展望について述べている。

以上述べてきたように、本論文は、バイオテクノロジーや医科学の研究だけでなく、今後、医療や診断、環境や食品分析、犯罪捜査など広範な分野での利用が期待されているハイスループットな DNA 簡易解析システム、特に、DNA の抽出・精製を含めた「トータル DNA 解析システム」の構築を念頭に、オンチップキャピラリー電気泳動法のための圧力駆動サンプル導入システム、簡単な構造を有する3次元受動マイクロミキサー、固相抽出法によるオンチップ DNA 精製システムの開発を行い、それらの有用性を実証したものである。これらの要素技術は、トータル DNA 解析システムの構築に取って重要なものであるのみならず、クロマトグラフィーをはじめとする種々のマイクロスケールの流体システムの構築にとって、極めて有用な要素技術を提供している。これらの結果は、マイクロ流体工学、化学反応工学の分野で重要な意味を持つとともに、マイクロスケールにおける分析化学の分野にも意義深いものと考えられる。

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。