

審査の結果の要旨

氏名 金田 祥平

本論文は、マイクロ流体デバイス上において pL(ピコリッター)スケールの微量液体をハンドリングし、複数の反応・分離操作を伴うバイオ分析の高速化、自動化を図るための技術を構築しようとするものである。マイクロ流体デバイスにおける液体操作には、いくつかの方法があるが、デッドボリュームを最小限に抑え、なおかつ流路内に発生する気泡の影響を受けない方法として、液滴単位で微量液体をハンドリングする方法が、これまでに何通りか提案されている。本論文は、それらのうち、疎水性微細管ベントを介して空気圧によって液滴を駆動する方式を採用し、その機能を発展させることを目指すものである。具体的には、液体サンプルの輸送、位置決め、pL スケールの液滴の生成および合一等の操作を実現するため、空気圧操作と疎水性ベントに加え、パッシブストップバルブ構造を組み合わせた「オンデマンド型微量液滴ハンドリングデバイス」を提案している。デバイスを実際に設計・製作し、上記の各種操作や電気泳動による DNA の分離操作などの機能を実現し、デバイスの設計要件ならびに必要な技術課題を解決するに至っている。

さらに、開発したデバイスの応用として、DNA の反応・分離に関わる複数の操作が必要とされる一塩基置換検出を取り上げ、具体的な分析操作を実現した。DNA の一塩基置換検出法として、制限酵素による RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法とペプチド核酸 (PNA: Peptide Nucleic Acid) をプローブとして用いる二つの手法を考え、常染色体劣性遺伝病である嚢胞性線維症の原因となる CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) 遺伝子上の一塩基置換をモデル系として、その検出を試みた。デバイス上での液体操作としては、2 種類の溶液から液滴を生成、両者を合一することによって DNA の反応操作を実現するとともに、反応後の液滴をサンプルプラグとして電気泳動を行い、反応産物の分離操作を行っている。RFLP 法の実験では、デバイス上で、サンプル DNA 溶液と制限酵素反応液から約 420 pL の液滴を生成・合一させて反応を行った後に、その産物である DNA 断片を電気泳動によって分離し、一連の反応・分離操作を 10 分

以内に、かつ自動的に出来ることを示した。PNAプローブ法の実験では、反応・分離操作によるDNAの一塩基置換検出が3分以内で高速に実現可能であることを示した。さらにPNA-DNA反応条件について、液滴を合一させる際の相互の位置関係と混合時間に関する検討を行った結果、液滴の配置によって反応操作に必要な時間をさらに短縮できることが明らかになった。

本論文の第1章では、研究の目的と概要および背景を述べており、前半はマイクロ流体デバイスの技術的な特徴とその歴史的背景を、後半は微量液滴ハンドリング技術をバイオ分析に応用することの重要性を論じている。

第2章では、微細管ベントとパッシブストップバルブを組み合わせ、空気圧操作により液体ハンドリングを行なう手法を提案し、2種類の液体サンプルから、必要な時に必要な量、必要な種類の溶液の液滴を生成するオンデマンド形式のハンドリングが可能であることを示し、その性能評価を行っている。

第3章では、生成した液滴をサンプルプラグとして用いる新しい電気泳動方式を提案し、従来のチップ電気泳動では困難であった、ポリマー溶液導入の簡便化・自動化を実現する方法を示している。さらに本手法では、液滴とポリマー溶液界面における濃縮効果によって、分解能の向上および分析時間の短縮が可能であることも併せて議論、考察している。

第4章では、オンデマンド型デバイス上で、RFLP法およびPNAプローブ法によるDNAの一塩基置換検出を行った結果について述べ、デバイスの遺伝子検査応用への可能性について考察している。また、DNA-PNA反応において、液滴の配置によって反応操作の時間短縮が可能であることを示し、PNAプローブ法による一塩基置換検出の高速化の可能性について議論している。

最後に、第5章において論文のまとめと、開発した微量液滴ハンドリングデバイスの遺伝子関連分野への応用展開の見通しについて述べている。

以上のように、本論文は、マイクロ流体デバイスのバイオ分析への応用を想定し、複数の反応・分離操作を自動的に実行するための微量液滴ハンドリング技術を構築し、実際に一塩基置換検出に必要なDNAの反応・分離操作を連続的かつ高速に実行可能であることを示したものである。本論文で研究、開発された技術は、近い将来の先端的な診断手法として期待される遺伝子診断における微量・低侵襲化、高速化を支える技術的基盤を与えるものであり、工学に資するところがきわめて大きい。

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。