

RNA発現解析を用いた疾患早期発見用マイクロデバイスの研究

著者	木村 雄亮
学位授与年月日	2018-03-22
URL	http://doi.org/10.15083/00078111

審査の結果の要旨

氏名 木村 雄亮

木村雄亮君の論文「RNA 発現解析を用いた疾患早期発見用マイクロデバイスの研究」は 8 章から成っており、Point of care testing (POCT) による、あらゆる場所での早期疾患発見を行うためのマイクロデバイスの開発を目的としたものである。目的達成のため、qRT-PCR あるいは LAMP による RNA 発現解析を可能とした、2 種類のマイクロデバイスの開発に成功している。

第 1 章では、まず本論文の概要について述べている。POCT の重要性、及び従来装置で POCT を行う際に生じる問題点を提示している。そこから、本研究の目的について論じ、本論文構成について述べている。

第 2 章では、qRT-PCR の詳細な原理、及び従来開発されてきた qRT-PCR 用マイクロデバイスの特徴と、その問題点について述べている。その問題点の解決のため、化学 IC コンセプトに基づいた新型 qRT-PCR マイクロデバイスについて提案している。

第 3 章では、逆転写反応を可能とするマイクロデバイスの開発に成功している。化学 IC チップのコンセプトに沿って設計することで、加熱制御に必要な面積を最小限に抑える事に成功し、ノートパソコン 1 台でのデバイスの全システムの制御に成功している。開発デバイスを用い、最大 9 サンプルの同時反応に成功している。

第 4 章では、前章で課題となったリアクタモジュールの改善のため、新たな基盤技術であるポリプロピレン (PP) フィルムリアクタの作製手法の確立、及び作製を行っている。本リアクタは、厚さ 100 μm の PP フィルムを熱変形させる事で、低コストかつ簡単に作製する事ができ、ディスポーザブル性に優れる。リアクタは 4 つのウェルを持ち、少量試薬での 4 サンプル同時反応解析が可能である。また、熱伝導率も高く、qRT-PCR で実施される短時間での急激な温度変化にも十分追従できる。更に高い透明度を持ち、蛍光観察時に使用する励起光、蛍光を阻害しない特長を有する。

第 5 章では、PP フィルムリアクタモジュールを用い、qRT-PCR を可能とするマイクロデバイスの開発を行っている。さらに qRT-PCR 実行のため、蛍光観察用モジュールも開発している。本モジュールを搭載しても、デバイスは手のひらと同程度の大きさである。また加熱制御、蛍光観察、及び解析は全て 1 台のノートパソコンで行うため、ポータブル性に優れる。作製したマイクロデバイスで qRT-PCR を実行し、標的遺伝子を含むサンプルにおいて、有意な蛍光強度の増加を確認している。

第6章では、LAMPの詳細な原理、及び従来開発されてきたLAMP用マイクロデバイスの特徴と、その問題点について述べている。その問題解決のため、本報で開発するマイクロデバイスのコンセプトモデルを提示している。

第7章では、ウィルス感染の早期発見を目的とする、LAMP法用マイクロデバイスの開発を行っている。本デバイスはqRT-PCRマイクロデバイスと同様に、化学ICコンセプトを基に、反応に必要なモジュールを3次元的に構築することで、デバイスを開発している。本デバイスでは200 nl/wellのサンプルを用い、0.5 mm²以下の微小な空間内において、最大16サンプルの解析を同時に行う事を可能としている。また毛細管現象を利用し、リアクタ上の全ウェルに、サンプルを同時にアプライできるシンプルなシステム開発にも成功している。これによりサブマイクロリットルスケールの微量なサンプルを簡単に操作できる。標的遺伝子の増幅は、サンプル内の蛍光強度の増加を、目視で確認する事で行う。そのため解析装置などの、複雑な機構を追加する必要が無く、qRT-PCRマイクロデバイスよりも更に小型化する事に成功し、デバイス本体、及び制御システムを含めても手のひらの上で完結するマイクロデバイスとなっている。本デバイスを用い、16サンプルでの同時遺伝子発現解析に成功している。また、その結果は目視で確認できるほど明瞭なものであった。さらに、実用化に向け、実際にヒトに感染するウィルスである、デングウィルスRNAの検出実験を行ったところ、デングウィルスRNAを含むサンプルでのみ反応が生じ、反応特異性の確認に成功している。

第8章では、開発した2種類のPOCT用のマイクロデバイスの特長をまとめ、今後の展望を述べている。高熱伝導率、透明性、ディスプレイ性を兼ね揃えた、PPフィルムリアクタを基盤とし、qRT-PCR用マイクロデバイスは、微小空間内での、従来装置の1/50の試薬量での4サンプル同時発現解析に成功している。LAMP用マイクロデバイスは、微量のサンプルを簡単に操作できるシステムを搭載し、200 nlの微量試薬での、16サンプル同時発現解析に成功している。更に全制御システムを含め、デバイスを手のひらサイズに収める事に成功している。

本研究ではこれまでにない実用性に富んだRNA発現解析用マイクロデバイスの開発に成功し、POCT分野の発展に甚大な貢献をしている。

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。