

## 学位論文の審査結果の要旨

本論文は、感染症等の診断に利用されている遺伝子検査における検査時間の短縮化と検出法の高性能化に関して、装置開発とその実証試験結果についてまとめたものである。

はじめに遺伝子検査の現状と課題について分析した。遺伝子検査装置の一般普及を妨げている要因として、遺伝子検査技術の専門性の高さや検査時間が長いこと等の問題を指摘し、高性能遺伝子検査装置の必要性を述べた。また、遺伝子検査を構成する核酸抽出、核酸増幅・検出方法に、それぞれ磁性シリカビーズとTaqManプローブを用いたリアルタイムPCR法が適すること等の理論的な裏付けを行った。

複数のステップから構成される核酸抽出作業を自動化し迅速化する試みとして、移動速度と振動周波数の制御された磁性シリカビーズの「揺動」技術と「揺動」に適したカートリッジを有する自動核酸抽出装置を開発した。「揺動」における磁性シリカビーズの移動速度1mm/sec、振動周波数5Hzの最適化を行うことにより、従来と同等の洗浄効果や検出限界の性能を維持しながら、抽出時間は3分と従来方法の1時間を遙かに凌駕する短時間検出を達成した。検査技術も自動化により汎用性の高いものとなった。

PCR装置における酵素反応時間短縮化の試みを行った。酵素反応による核酸増幅の熱サイクル手法を、新たに開発したシリコンオイル封入の反応チューブを高温と低温用のヒートブロックで固定し、ブロック毎回転させる「昇降式」を提案開発して、従来装置との比較を行った。反応液に含まれるプラスミドのコピー数で増幅とCt値の評価を行った結果、従来方式の検出限界を維持しながらも、増幅に必要な時間は通常条件では22分、高速条件では9.7分と、従来48分と比較して大幅な時間短縮ができた。

昇降式PCRの応用開発として、One-step RT-nested PCRとSequential PCRの2つの遺伝子検査方法への適応を試みた。One-step型においては、検査に必要な3つの反応を1つの反応液で実行できるように構築することで、従来6時間必要であった反応時間を40分まで短縮できた。また1つの反応液内での実行を可能にした事で、従来法の1000倍の高感度を実現した。Sequential型では、1つの反応液に含まれる2つの遺伝子を連続して検出できることを実証した。これは、増幅可能温度を狭い範囲でそれぞれ単独かつ迅速に設定できるという昇降式PCRの特徴を反映した結果となった。開発した昇降式PCR装置以外では不可能である。

これらの結果は、PCRを用いた遺伝子検査が、感度と特異度に優れながらも「時間がかかる、特定病院でしか扱えない特殊検査」という認識を覆し、「数分で可能な検

査、普及性のある検査」として、公益上の極めて大きな貢献を期待させる。医療以外の領域での使用も予想され、空港での迅速感染症検査や家畜の伝染病検査、食品工場での管理検査、犯罪検査など、高速な遺伝子検査の活躍の舞台は広範囲に渡る。

申請学位論文は、申請者を筆頭著者とする原著論文2件と審査付き国際会議論文1件に基づいてまとめられており、学術的に十分高い評価を得ている。以上により、本論文は博士（工学）の学位論文として十分価値のあるものと審査委員全員一致で判断した。

#### 公表主要論文名

1. Akemi Yamaguchi, Kazuyuki Matsuda, Masayuki Uehara, Takayuki Honda, Yasunori Saito, “A novel automated device for rapid nucleic acid extraction utilizing a zigzag motion of magnetic silica beads”, *Analytica Chimica Acta* 906 (2016) 1-6.
2. Akemi Yamaguchi, Kazuyuki Matsuda, Akane Sueki, Chiaki Taira, Masayuki Uehara, Yasunori Saito, Takayuki Honda, “Development of a rapid and sensitive one-step reverse transcription-nested polymerase chain reaction in a single tube using the droplet-polymerase chain reaction machine”, *Clinica Chimica Acta* 448 (2015) 150-154.
3. Akemi Yamaguchi, Fumio Takagi, Kazuki Kobayashi, Takayuki Honda, Yasunori Saito, “Simple gene testing method using an automated nucleic acid purification device and a micro chamber array”, 17<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (2013) 738-741.