

氏名(本籍・生年月日) 山口 明美(長野県 昭和58年7月27日)

学位の種類 博士(工学)

学位記番号 甲第652号

学位授与の日付 平成28年3月20日

学位授与の要件 信州大学学位規程 第5条第1項該当

学位論文題目 昇降式PCRを用いた遺伝子検査装置の
高性能化に関する研究

論文審査委員 主査 教授 齊藤保典 教授 石澤広明

教授 天野良彦 教授 佐藤敏郎

教授 本田孝行(信州大学医学部)

論文内容の要旨

遺伝子検査は、感度と特異度の高い検査方法であるために、感染症の診断、癌の治療選択やモニタリング、遺伝性疾患、個人識別などで広く利用されてきた。しかし、遺伝子検査は時間がかかる、専門技術や複数の機器が必要などの理由から、大病院や検査会社で実施されており、遺伝子検査結果を診断や治療に反映するまでに1週間以上の長い時間がかかっていた。高感度な遺伝子検査が迅速、簡単になれば、臨床の現場での正確な診断、適切な薬の処方などに用いることができるため、迅速、簡単な遺伝子検査が求められている。

本研究では、迅速で自動化された遺伝子検査装置の開発を目的とし、装置開発と遺伝子検査法の応用開発を行った。遺伝子検査は、①核酸抽出、②核酸増幅・検出の2つのステップから構成されている。核酸抽出部分は、手作業や機器を用いた複数のステップを自動化した自動核酸抽出装置を開発した。核酸増幅・検出部分は、ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction: PCR)を利用し、シリコーンオイルの中を微小液滴が移動することで高速PCRを実現する昇降式PCR装置を開発した。開発した自動核酸抽出装置と昇降式PCR装置の性能評価、および昇降式PCR装置を用いた新たな遺伝子検査法の応用開発を行い、研究成果をまとめた。

第1章では、本研究の背景と目的を示し、本論文の構成について述べた。

第2章では、遺伝子検査を構成する核酸抽出、核酸増幅・検出について、方法と原理を述べた。核酸抽出、核酸増幅・検出について様々な方法が実用化されているが、本研究は中でも、核酸抽出に磁性シリカビーズ、核酸増幅・検出にTaqManプローブを用いたリアルタイムPCR法を選択した。

第3章では、自動核酸抽出装置を開発し、性能評価の結果を述べた。複数のステ

ップから構成される核酸抽出を自動化、迅速化するために、磁性シリカビーズの「揺動」という特徴的な動きを利用した。開発した自動核酸抽出装置は、3分間で核酸抽出を完了し、従来式の方法と同等の洗浄効果、検出限界であった。手作業による核酸抽出のおよそ30分間、自動装置による核酸抽出のおよそ1時間と比較して、劇的に所要時間を短縮した。

第4章では、昇降式PCR装置を開発し、性能評価の結果を述べた。昇降式PCR装置は、従来式PCR装置と同等の検出限界であった。従来式PCR装置では48分かかかる50サイクルのPCRを、昇降式PCR装置を用いることにより22分間に短縮でき、高速条件で9.4分間に短縮できた。また、40サイクルでの所要時間は7.5分間であった。このような短時間でのPCRの実行は、従来式PCR装置では実現不可能なことであり、開発した昇降式PCR装置は、従来式PCR装置の性能を遥かに凌ぐものであることを実証した。

第5章では、昇降式PCR装置を用いた応用開発として、高感度な遺伝子検査法One-step RT-nested PCRと連続検出法Sequential PCRを構築した。One-step RT-nested PCRは、3つの反応が必要なRT nested PCRを1つの反応液で実行できる試薬、反応系であり、時間の短時間化、高感度化を実現した。Sequential PCRでは、1つの反応液から複数の遺伝子を連続して検出できることを実証した。

第6章では、本研究を総括し、結論を述べた。

本研究で開発した自動核酸抽出装置と昇降式PCR装置は、核酸抽出を3分間、PCRを7.5分間で実行可能であり、従来の手法、装置と比較して劇的な短時間化を実現した。現在は別々の装置であるが、将来はこの2つの装置を一体化させた装置を開発し、さらなる迅速化を検討できれば、トータルで10分以内の遺伝子検査が実現できるだろう。病気の迅速な診断、適切な治療薬の選定など医療の領域における有用性は当然のことながら、医療以外の領域でも使用されることが予想され、空港での迅速感染症検査、家畜の伝染病検査、食品工場での管理検査、犯罪捜査等、迅速な遺伝子検査は幅広い分野で活用されていくと期待される。