

報告番号	甲 第 12275 号
------	-------------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目      Microfluidic Devices for Analysis of Single DNA  
Molecules and Single Cells

(単一 DNA 分子及び単一細胞分析のためのマイクロ  
流体デバイスに関する研究)

氏 名      矢崎 啓寿

## 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、マイクロ流体デバイスによる単一 DNA 分子及び単一細胞の分析に関する研究論文である。

第一章では、本研究の序論を示す。近年、早期の疾病診断や蔓延の防止を目的として、DNA 分子などの生体分子や細胞を対象としたバイオ分析が広く研究されている。DNA 分子の分析では、後天的な遺伝子変異などを早期に発見することでがんなどの生活習慣病を早期に診断可能となる。ヒト細胞の分析では、血中細胞の中からがん由来する血中循環がん細胞(CTC)などを検出することで、どの臓器にがんがあるのか特定することが可能となる。細菌細胞の分析では、患者の体液に存在する病原性細菌を発見して薬剤耐性の有無などから処置を決めることが可能となるだけでなく、疾病の原因となった細菌の発生場所を突き止めることで蔓延を防ぐことが可能となる。これらの生体分子や細胞の分析は、被検者および被検体の負担軽減や感染拡大を防止するために、迅速に結果を得られることが求められる。このため、試料の精製や増幅、培養などの前処理に長時間を要する既存の分析法の問題点を解決するために、マイクロ流体デバイスを用いたバイオ分析が注目を集めている。マイクロ流体デバイスとは、反応、分離、抽出、精製、計測などの様々な化学的操作あるいはそれを行うための装置を、サブミリ～ナノメートルオーダーまで小型化・集積化することを目的とした研究によって生み出されたデバイ

スのことを指す。現在では、DNA やタンパク質などの生体分子の分離システム、細胞生化学実験システム、分析化学システムや合成化学システムなど、あらゆる分野の化学システムをマイクロ流体デバイス上へ集積化する研究が盛んに行われている。この技術を用いることにより、既存の分析手法に比べて、測定時間の大幅な短縮と高効率化、試薬量・排液量の低減、省スペース、携帯性などの様々なメリットをもたらすことが期待されている。こうした背景を受けて、本研究では、マイクロ流体デバイス内で DNA 分子や細胞を迅速に分析する手法を創成することを目的に、測定対象となる単一 DNA 分子及び単一細胞をマイクロ流体デバイス内の計測領域へ効率よく導入する技術、測定対象を計測領域で高感度に検出する技術、得られた情報を元に評価した測定対象の特性に基づく識別に関する検討を行った。

第二章では、DNA 分子及び細胞の分析のために単一 DNA 分子や単一細胞を計測領域に導入することを目的として、電気泳動を用いた手法と気液界面の移動を用いた手法を報告する。迅速に単一 DNA 分子及び単一細胞を分析するために、計測領域への高効率な導入法が重要となる。電気泳動を用いた手法では、溶液中の単一 DNA 分子及び単一細胞をマイクロ流体デバイス中の計測領域で分析することを目的に、負に帯電した DNA 分子及び細胞に対して電場を印加し、計測領域へ効率よく連続的に導入するための検討を行った。電圧を用いて DNA 分子や細胞などの測定対象を駆動させることで、負に帯電しない夾雑物を除いて分析することが可能となる。マイクロ流体デバイス内に計測領域として設けたマイクロチャネルに対して、電圧印加によって生じるジュール熱が与える影響を観察した。また、印加電圧を高めることで測定対象が測定領域を通過する時間を 80 ms から 285 ms まで自由に制御し、測定時間を縮めることに成功した。条件検討の結果をもとに、単一 DNA 分子と単一細胞を計測領域に電気泳動によって導入することに成功した。気液界面の移動を用いた手法では、ガラス基板上に DNA 分子の整列標本を作り光学観察を用いてゲノムイメージングを行うことを目的に、マイクロ流体デバイス中で気液界面を移動させ、マイクロ構造体を用いて伸長固定するための検討を行った。高速に DNA 分子の分析を行うためには、顕微鏡の狭い視野内の計測領域に高効率に DNA 分子を整列化させる技術が必要となる。溶液中の DNA 分子が気液界面の移動の際に基板に非特異的に吸着して伸長されることに着目し、マイクロ流体デバイスの中に DNA 伸長用の窪みを作ることで光学観察の計測領域に単一 DNA 分子を伸長固定することに成功した。窪みの深さ、大きさ、形の条件検討を行うことで、マイクロ流体デバイス中に DNA を 1,500 分子伸長固定することが可能となり、超解像顕微鏡を用いた光学観察に成功した。本章の研究成果によって、溶液中の単一 DNA 分子及び単一細胞を高効率に計測領域へ導入し、液相での単一 DNA 分子及び単一細胞の分析、気相中で伸長固定した単一 DNA 分子の分析が可能となった。

第三章では、マイクロ流体デバイス内で単一 DNA 分子と単一細胞を検出し、個々の測定対象の情報を高感度で得ることを目的に、電気的な分析法の 1 つであるイオン電流計測法の Signal-to-noise (S/N) 比を高めるための検討、光学的な検出法を電氣的検出と同時に行うための検討、様々な環境での分析を可能とするための検討について報告する。電氣的検出法では、イオン電流計測法を使用して測定対象のサイズ情報を得ることが可能である。イオン電流計測法で従来使用されてきた直列回路では、印加電圧の制限により、様々なサイズの測定対象を同一の計測領域で計測するための感度が不足していた。本研究では、ブリッジ回路を用いて電流計測を行うことで、従来法に比べて 100 倍の検出感度を実現し、マイクロスケールの計測領域でナノ粒子や DNA 分子、細菌、がん細胞を検出することに成功した。また、マイクロ流体デバイス内の計測領域の構造が持つ電気抵抗によって任意にシグナル形状を変化させられることを示し、電磁ノイズの影響を受ける環境下でも電流シグナルの視認性を向上することに成功した。光学的な検出法を電氣的検出と同時に行うための検討として、マイクロ流体デバイスを顕微鏡管体上に固定し、計測領域を通過する測定対象の電流シグナルと蛍光を観察した。電流計測結果と蛍光観察結果を同期することで、計測領域を通過する測定対象のサイズ情報と傾向情報を得ることが可能となった。様々な環境での分析を可能とするための検討として、電磁シールドを簡易化した電流計測装置を作製し、温度や湿度の変化による影響を観測した。作製した電流計測装置は持ち運び可能であり、屋外での電流計測も可能とした。本章の研究成果によって、計測領域に導入された単一 DNA 分子及び単一細胞のサイズ情報をあらゆる環境下においても高感度に検出することや、個々の単一 DNA 分子及び単一細胞のサイズ情報と蛍光情報を同時得て多面的に分析することが可能となった。

第四章では、測定対象の識別や細胞の成長プロセスの解明を目的とした、単一細菌細胞の特性評価について報告する。細菌細胞の特性評価は、光学的な検出法と電氣的検出と同時に行うことで得た情報や、電氣的検出のシグナルに含まれる情報を用いて行った。光学的検出と電氣的検出を同時に行う特性評価では、電氣的に得られたシグナルの強度情報と、光学的に得られた蛍光色の情報をもとに単一細菌細胞のサイズと蛍光染色能を検出することに成功し、同サイズの細菌を細胞表面の染色能の違いから識別することが可能となった。電氣的検出のシグナルに含まれる情報を用いた特性評価では、高電場を計測領域に印加することで、通過する細菌細胞が損傷し細胞質を放出することで、計測領域に存在する電荷の密度増加が電流シグナルの形状に反映されることを見出し、電場への耐性の異なる細菌種や薬剤耐性菌を識別することが可能となった。細菌細胞の成長プロセスの解明を目的とした実験では、電氣的に得られたシグナルの強度情報、形状情報、光学的に得られた蛍光色の情報をもとに個々の枯草菌芽胞を多面的に評価することで、芽胞の発芽プロセスにおいて、芽胞外殻の消失時に細胞膜染色能が生じると結論づけた。また、外殻消失同時に電場耐性が栄養状態の細胞と同等まで著しく低下すること

も明らかとなった。本章の研究成果によって、単一細胞を電氣的、光学的に演出することで、細胞表面の化学的特性や物理的特性に基づく分析が可能となった。

第五章では、本研究の結論を示す。単一 DNA 分子及び単一細胞を測定対象としてマイクロ流体デバイス内の計測領域へ導入する技術の検討では、気液界面移動を用いた DNA 分子整列固定を任意の密度で行うことと、電気泳動を用いた DNA 分子及び細胞の連続導入を任意の速度で行うことに成功し、高効率な分析に向けた測定対象の導入を可能とした。計測領域へ導入された測定対象を高感度に検出する技術の検討では、ブリッジ回路を用いたイオン電流計測により、測定対象のサイズ計測の高感度化だけでなく、光学計測との組み合わせや、持ち運び可能な粒子計測装置の作製に成功し、測定環境に左右されず測定対象の情報を高感度かつ多面的に取得することで、迅速な分析結果の取得を可能とした。得られた情報をもとに評価した測定対象の特性に基づく識別に関する検討では、単一細菌細胞を対象として、顕微鏡を用いた光学観察によって得られた細胞表層の染色能に基づく蛍光と、電流計測によって得られた細胞サイズをもとにした多項目分析から、同形状の細菌である枯草菌と大腸菌を識別することに成功した。また、電流計測の際に計測領域へ高電場を印加することで生じる細菌表層の損傷が、計測領域の電荷密度上昇を誘発し、電流シグナルの形状に変化をもたらすことを明らかにした。この知見は、電場耐性の異なる枯草菌と大腸菌を電流シグナルの形状のみから識別することを可能とするだけでなく、薬剤耐性菌の識別にも有用であることを確認した。さらに、光学計測による染色能の情報、電流計測によるサイズの情報と電場耐性の情報を単一細菌細胞ごとに評価することで、細菌細胞の成長プロセス解明への応用も可能とした。以上のことから、本研究において開発された単一 DNA 分子及び単一細胞の操作、検出、特性評価による分析技術は、単一分子や単一細胞レベルの省試料を迅速に多項目分析することを可能とし、被検者および被検体の負担軽減や感染拡大の防止が求められる医療・食品・環境分野などへの大きな貢献が期待される。