

## 論 文 内 容 要 旨

|   |                           |     |         |
|---|---------------------------|-----|---------|
| 報 告<br>番 号  | 甲 薬 第 2 0 5 号             | 氏 名 | 左 少 理 恵 |
| 学位論文題目  | マイクロチップを用いた生体高分子の分離分析法の確立 |     |         |
| <p>内容要旨</p> <p>近年、半導体微細加工技術を利用してプラスチックやガラスなど数センチ角の基板の上に試料注入から分離計測までを集約するマイクロ化学分析システムが注目されている。マイクロ化学分析システムを用いることで核酸・タンパク質などの生体高分子を、場所を選ばず迅速かつ省サンプルに分析でき、特に医療の分野では患者のすぐそばで行う臨床現場即時検査 (POCT) への応用が期待されている。そこで私は、POCT への応用を鑑みてプラスチック基板上に微細な流路(マイクロチャネル)を形成したマイクロチップを用いた生体高分子の解析系の構築を試みた。</p> <p>私の所属した研究室ではこれまでの研究でマイクロチップ電気泳動装置の有用性を検討しており、マイクロチップ電気泳動装置は単に核酸の電気泳動分析に有用なだけでなく、オンチップで DNA の制限酵素処理と解析が可能なことなど、分子生物学の実験に幅広く応用可能であることなどを明らかにしている。本研究では、この装置の POCT 応用の可能性を探るべく、制限酵素断片長多型 (RFLP)解析に応用して遺伝子多型の迅速高感度な解析系の構築を試みた。具体的には ABO 式血液型の遺伝子型を対象とし、O 対立遺伝子での 261 番目の塩基欠損と B 対立遺伝子での 526 番塩基の G 置換によるそれぞれ当該部位での <i>Kpn</i> I と <i>Ban</i> I の認識切断を利用した RFLP 解析により遺伝子型 AA、AO、BB、BO、OO、AB の解析を行った。各遺伝子型を有するヒトの毛髪から染色体 DNA を抽出し目的部位を含む領域を PCR で増幅した。試料を制限酵素で処理しアガロース電気泳動に供する従来法と、市販のマイクロチップ電気泳動装置を用いてオンチップで制限酵素処理、引き続き電気泳動を行う方法を比較検討した。その結果、どちらの方法でも RFLP 解析は可能であったが、マイクロチップ電気泳動は①DNA 鎖長解析の誤差はわずか数塩基、②制限酵素処理は 20 分、電気泳動と鎖長解析は 7 分に短縮可能、③サンプル量は従来法の 1/10 でよく、④多試料解析用基板を用いることで多くの試料の遺伝子型の同時解析が可能という長所を持ち合わせていた。</p> <p>次に、タンパク質の分離分析に汎用されるサンドイッチ ELISA 法をマイクロチップで行うことを検討した。本研究では、骨粗鬆症の診断マーカーである I 型プロコラーゲン C 末端ペプチド (PICP)を検出対象とした。pl 単位の液滴の操作が可能な微細化インクジェット技術を用いて、プラスチック製基板上のマイクロチャネル(幅 300 <math>\mu</math>m、深さ 100 <math>\mu</math>m)底面の特定位置に、一定間隔で極微量の一次抗体溶液を吐出・固定することで、マイクロチャネル内での抗原抗体反応による抗原検出系の構築を試みた。その結果、マイクロチップを用いた検出法により従来のマイクロプレートをを用いた ELISA 法と同様な解析が可能であった。抗原抗体反応時間は 30 分、試料量は 0.4 <math>\mu</math>l と従来法に比べ、それぞれ 1/6 および 1/50 と迅速・省サンプルで、検出限界でも ELISA 法の 2 倍と高感度な検出系を構築できた。また、ELISA 法と本実験系の血中 PICP 測定値の相関性試験を行ったところ、相関係数 <math>R^2 = 0.9914(n=6)</math>と非常に高い相関を示した。さらに PICP 測定値の日内・日差変動でも、各々 3.2-9.8%(n=4)、4.4-6.8%(n=4)、と良好な再現性を得ることができた。</p> <p>以上から、マイクロチップを用いた生体高分子の分離分析法の一例として、迅速かつ省サンプルな RFLP の同時解析法と、既存のマイクロプレートをを用いた ELISA 法より迅速・省サンプル・高感度に血中 PICP を検出できる系を構築することができた。</p> |                           |     |         |