

(続紙 1)

京都大学	博士 (工学)	氏名	勝本 洋一
論文題目	DNA および細胞のマイクロ分析への誘電分光法の適用		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、DNA や細胞を対象に、従来の化学的手法に立脚したマイクロ分析法の短所を克服、代替し得る物理的手法として、誘電分光法を応用した新規な測定法を提案し、それをを用いて DNA の量・鎖長、および、赤血球の細胞膜・細胞質に関する電気物性、変形能を算定することを検討した研究を纏めたものであり、以下の 6 章から構成されている。</p> <p>第 1 章は緒論として、DNA や細胞の誘電分極理論、誘電分光測定法に関連する過去の知見を概観し、誘電分光法をそれらの物性測定に適用する場合に不足する基礎的知見、解明すべき問題点を提起している。その中でとくに、短鎖 DNA の誘電分極に関して、DNA 近傍に凝集した対イオン (凝集相) ではなく、空間的に広がった対イオン (散漫相) の寄与の大きいことは確認したが、過去の理論は凝集相の変位のみ、もしくは、薄相近似による凝集相 - 散漫相の分極のみを扱っており、空間的に広がった散漫相の寄与に関する理論的検証は行われていないことを指摘した。また、短鎖 DNA に関する実験結果はとくに不足しており、誘電緩和の特性と、DNA の鎖長や濃度、あるいは塩濃度との関連については、決定的な知見が存在しない現状を指摘した。その一方、細胞は一般に複雑な形状をしているために、誘電分光法により細胞電気物性を定量的に算出する上で、過去の球形細胞等を対象にした界面分極の解析式の適用に限界があることも指摘している。</p> <p>第 2 章では一般論としての誘電体の分極や複素比誘電率、誘電緩和現象に関する概説を行った後に、誘電緩和の計測法およびそれによって得られたデータの解釈法を、本論文で扱う測定対象ごとに詳述している。</p> <p>第 3 章では誘電分光法を用いて DNA 量と鎖長の計測を行うことを目的に、溶媒中での短い 1 本鎖 DNA (ss-DNA) の濃度と塩濃度を変化させてイオン雰囲気空間的広がりを制御し、対イオン構造とその分極機構に及ぼす影響を調べている。そして、塩を添加しない状態での高周波誘電緩和の特徴として、凝集対イオンの分極理論には従わないこと、ならびに、希薄高分子電解質の濃度および鎖長への依存性に類似していることを明らかにした。また、この依存性は臨界塩濃度以下の領域である限り、塩が存在しても無塩状態と同様に成立するこ</p>			

とを明らかにした。次に、その誘電緩和の特徴は、対イオンが揺動しうる周期的な静電ポテンシャルの井戸の長さスケールに高分子電解質濃度で規定される相関長を選んだ場合のセルモデルによってよく説明できることを示した。その結果として、ss-DNA 溶液の高周波誘電緩和は弱く拘束された対イオンの分極によるものであることを結論づけている。さらに、緩和強度と緩和時間はともに、臨界塩濃度値以下の塩濃度域で塩濃度に無関係であり、その一方で、臨界値以上の塩濃度域で塩濃度に反比例して低下することを明らかにした。このような臨界塩濃度は、相関長に代わる対イオン揺動長さスケールとして塩濃度依存性を持つ散漫相の直径を取る拡張セルモデルによって見積もることができること、また、その臨界塩濃度は実験的に得られた値ともよく一致することを新たに示した。さらに、これらの知見を基にして DNA 量と長さを測定するための具体的な測定系の構成・測定方法を提案している。なお、DNA 対イオン雰囲気構造変化に関する知見は、生体内で高度に制御された反応調節機構の解明に資する情報でもあり、DNA を標的物質とした薬剤開発のための基礎的知見としても有用であるとしている。

第4章では誘電分光法による細胞電気物性の非破壊計測において未解決であった解析式の存在しない形状を有する細胞について、具体的に電気物性を算出する方法を提案し、その妥当性を検証している。測定対象には浮遊単一細胞の例として赤血球を取り上げ、まず、溶液の pH 操作によって赤血球形状を様々に変えて、そのそれぞれの赤血球懸濁液の誘電分散を実測した。その結果、誘電分散は赤血球形状に依存して異なるスペクトル波形を示し、その波形は Cole-Cole 式にフィッティングさせて得られる誘電パラメータにより特徴づけられることを示した。さらに、誘電分散についての解析式の存在しない形状を有する赤血球の場合について、有限差分法を適用して細胞膜キャパシタンス及び細胞質導電率を簡便に算出する手法を提案した。次に、この手法によって算出した各電気物性値を基に、有限差分法により赤血球の誘電分散スペクトルを再度算出すると、元のサンプルの誘電分散を再現できることから、本手法の妥当性を確かめた。この電気物性の算出法は赤血球に限らず様々な形状の浮遊細胞にも適用可能と考えられ、流路中における浮遊細胞の連続的な物性解析とマイクロアレイの手法を複合化して Lab-on-a-Chip などのマイクロデバイス上に実現し得れば、多種の薬剤に対する経時的な細胞応答の解析など医学的な応用も期待できる。

第5章では、前章で得た誘電分散スペクトルが細胞形状の変化を反映するという結果を踏まえて、個々の赤血球の変形能を簡便に調べる手法の理論的検討および実験による検証を行っている。まず、マイクロ流路内高剪断流れ中

氏名	勝本洋一
----	------

において赤血球を流し、流路底面に付設されたセンサ部を赤血球が通過する際の抵抗値変化を測定・解析して変形能を見積もる手法を提案した。次に、等価複素比誘電率の考え方を適用して、赤血球を中心としたセンサ内部の3次元調和電場解析を行い、電極間抵抗値の分布を求めた。その上で、赤血球の中心がセンサ電極間の中央断面内に位置する場合について、赤血球中心と下壁面間距離、電極間距離、流路高さ、センサ電極幅、および、ガード電極の有無、それぞれについての電極間抵抗値に及ぼす影響を数値的に検討し、測定感度向上の指針を得ている。次いで赤血球の主流方向位置を変化させた計算を行い、赤血球の通過に伴う電極間抵抗値変化を調べた。その結果、得られた抵抗値の半値幅 δ が変形指数 DI に対して単調増加し、変形能を表す指標として有用であることを示した。これらの知見に基づいてセンサ電極付設マイクロ流路を作製し、正常赤血球とグルタールアルデヒド処理による硬化赤血球について、画像撮影と同時に抵抗値測定を行った。また、各抵抗値変化から算出される δ を比較すると、正常赤血球と硬化赤血球との間には有意な差が認められ、さらに、画像処理により求めた DI と δ との対応関係は、数値解析によって得られたものと定性的に一致する傾向にあることを示した。これらのことから、提案・試作したセンサの有用性を明らかにしている。

第6章では本論文の結論として、前章までの各章で得られた成果を改めて纏め、要約しているとともに、それらを総括して今後の研究展望を行って結びとしている。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は DNA や細胞を対象に、従来の化学的手法に立脚したマイクロ分析法の短所を克服、代替し得る物理的手法として、誘電分光法の応用を提案し、DNA の量・鎖長、赤血球の細胞膜・細胞質に関する電気物性、変形能を算定することを検討した研究を纏めたものであり、得られた主な成果は以下のとおりである。

まず、DNA や細胞の誘電分極に関連する過去の知見を概観し、誘電分光法をそれらの電気物性測定に適用する場合に不足している基礎的知見、解明すべき問題点を提起した。

その上で、短い 1 本鎖 DNA 溶液の濃度と塩濃度を変化させてイオン雰囲気空間的広がりを制御し、誘電緩和への影響を調べた結果、溶液の高周波誘電緩和は凝集対イオンの分極理論に従わず、散漫相の分極に依存すること、その緩和強度と緩和時間は塩濃度に反比例するが臨界塩濃度以下では塩濃度に無関係であることを明らかにした。また、その挙動は散漫相直径に基づく新たな拡張セルモデルによってよく説明できることを示した。

次に、浮遊単一細胞である赤血球について、その懸濁液が赤血球形状に応じて特徴的な誘電分散を示すことを見出した。また、細胞膜のキャパシタンスおよび細胞質の導電率の新たな算出法を提案した。この算出法は赤血球に限らず様々な形状の細胞にも適用可能であり、流路中における浮遊細胞の連続的な物性解析などにも応用できることを示した。

さらに、個々の浮遊細胞の連続解析に適用するための先駆的研究として、マイクロ流路内高剪断流れ下の赤血球が流路底面に付設されたセンサ部を通過する際に、単一周波数における抵抗値変化の測定・解析を行って個別赤血球の変形能を簡便に測定する手法を提案し、数値計算および実験の両面からその有用性を示した。

以上のことから本論文は、誘電分光法を DNA および細胞のマイクロ分析に応用展開することで、Lab-on-a-Chip 等のマイクロデバイスを用いた総合検査技術の進展、医用工学の発展に大いに資するものあり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 22 年 2 月 12 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。