

## (論文内容の要旨)

生体成分の分析手法を開発・改良することは、生化学などの基礎研究分野のみならず、環境化学や臨床化学など実分析にかかわる産業分野でも重要な課題となっている。このような分析法に関する最近の展開のひとつとして、微細構造体の利用が注目されている。これは、反応・分離・検出等の一連の機能を、一辺が数センチ角のチップ上の微細流路内で実現させるもので、micro total analysis system ( $\mu$ TAS) と称されている。その利点としては、1) 分析に必要なサンプルおよび試薬量の低減、2) 分析時間の短縮、3) 分析装置の小型化等が挙げられる。

本研究では、誘電泳動とキャピラリ電気泳動の2種の原理に注目し、生体成分の  $\mu$ TAS の基礎技術の開発を目的とした。また、分析試薬を改良することにより、測定対象に関する制約を低減するとともに、再現性と感度を向上させる試みを行った。

第一章では、誘電泳動に基づく生体分子分析法の開発を検討した。微細電極構造を有する誘電泳動クロマトグラフ装置を作製し、流路内に発生させた不均一電界によって生ずる誘電泳動力と各種生体関連分子の特性との関係について調べた。その結果、誘電泳動力はその分子の大きさを反映することを明らかにし、DNA やタンパク質などの生体分子も分離対象にできることを示した。この誘電泳動クロマトグラフィーを、免疫的手法を用いた検出法と組み合わせることによって  $\lambda$ DNA の定量分析に応用した。

さらに、誘電泳動法の分離性能を向上させるために、分析対象成分を免疫反応やハイブリダイゼーション反応によってスチレンビーズ表面に固定し、そのビーズを誘電泳動により所定の領域に移動させる手法を提案した。本法を、免疫反応を利用した癌マーカー  $\alpha$ -フェトプロテイン (AFP) の定量や、ハイブリダイゼーション反応を利用した  $\lambda$ DNA の検出に応用した。

第二章では、キャピラリチップ電気泳動による生体成分の分離定量法の高感度化を検討した。これまで、タンパク質キャピラリチップ電気泳動においては、その分離バンドの広

がりが問題となっていた。この課題に対して、DNA 分子を抗体分子に結合させたハイブリッド分子を用いることによって、分離対象の電荷を均一化する分離手法を提唱した。このハイブリッド分子が抗原タンパク質と複合体を形成すると、DNA 分子の負電荷がタンパク質の電荷に勝り、DNA 分子のみを泳動させた時と同様のシャープな分離バンドを与えることを明らかにした。実際に AFP をモデルタンパク質として本手法を適用し、特異的な検出ができた。最適化された条件での AFP の定量直線性は良好で、50 pM までの検出限界が得られた。さらに、抗体に結合させる DNA 鎖長と分離性能およびピーク形状との関係を調べ、DNA 鎖長をパラメータとして分離パターンを調節できることを示した。これらの知見をもとに DNA 鎖長を最適化したところ、癌マーカーである前立腺特異抗原 (PSA) と AFP の同時分析に成功した。

さらに、等速電気泳動とゲル電気泳動の 2 種類の電気泳動法に基づいた electro kinetic analyte transfer assay (EATA 法)を開発した。本法では分析対象物の濃縮および分離工程を同一チップ上で行なうことにより、シグナル強度として約 140 倍の濃縮に成功した。濃縮時の印加電圧と抗原抗体反応効率の関係を調べたところ、低電圧では分析所要時間は長くなるものの低濃度の抗体で反応を完了させることができ、一方、高電圧では高濃度の抗体が必要であるものの分析所要時間は短縮できることを示した。このような知見を基にして AFP 分析のための電圧と抗体濃度を最適化した結果、良好な定量直線性 ( $R = 0.999$ ) と測定再現性  $CV\% = 7.6$  を実現した。また、検出限界は 5 pM まで向上した。このように、分離手法の開発・改良により、TAS としては初めて実分析レベルの分離検出特性を示すことに成功した。

## (論文審査の結果の要旨)

マイクロデバイスを用いて生体成分を分析する $\mu$ TASは、多くの利点を持つ分析法として注目され、基礎的研究が盛んに進められてきた。しかしながら、従来の測定法と同等もしくはそれ以上の分離検出能を $\mu$ TASで実現することはこれまでは困難であり、デバイス、試薬、測定条件等の大幅な改良が重要な課題のひとつであった。

本論文は、誘電泳動およびキャピラリ電気泳動の2種の分離技術に基づく分析デバイス並びに分離効率を向上させるための試薬や測定条件の提案と最適化を行うことにより、測定対象物に関する制約の少ない実用的 $\mu$ TASを確立したものであり、評価できる点は以下の通りである。

- 1) 微小電極により高い誘電泳動力を発生させるマイクロデバイスを作製し、生体成分分子に働く誘電泳動力がその分子サイズに依存することを初めて実験的に示した。これにより誘電泳動を生体成分の分離に応用できることを示した。
- 2) スチレンビーズを用いることで誘電泳動的な分離性能が向上することを見だし、誘電泳動を利用する $\mu$ TAS分離法を、免疫測定およびハイブリダイゼーション測定に応用できることを実証した。
- 3) キャピラリチップ電気泳動を分離原理とする測定法において、DNA結合抗体を利用することで、タンパク質の高感度・高分離分析を実現した。また、抗体に結合させるDNA鎖長を変えることにより、分離パターンを任意に操作できることを示し、タンパク質の同時検出が可能であることを実証した。
- 4) キャピラリチップ電気泳動チャンネル構造と電気泳動方法を改良し、定量性、測定再現性および検出感度を向上させ、キャピラリチップ電気泳動による生体分子の分離検出特性を実用可能なレベルに到達させた。

以上のように本論文は、分離原理選択並びにそれに最適化されたマイクロデバイスと測定試薬の開発、さらに実験的裏付けによる分析条件の最適化により、分析技術として実用化レベルの性能を $\mu$ TASで実現したものであり、分析化学、物理化学、臨床化学、環境化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成20年11月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。