



審査委員

主査	有澤準二	教授
副査	初田 健	教授
副査	三澤顕次	教授
副査	木村主幸	教授

導電性中空糸膜を用いた病原性微生物からの遺伝子抽出に関する研究

近年、病原性微生物による感染症に対して、遺伝子工学を基礎とする診断法が利用されている。一般にこの遺伝子診断は、1) 病原性微生物からの遺伝子抽出、2) 遺伝子の増幅、3) ゲル電気泳動・染色、4) 判定の順序で行われる。今日のように遺伝子診断が普及してきたのは2)に挙げた遺伝子増幅技術が急速に進歩し、自動化されたことにある。しかし、遺伝子診断において必要不可欠な1)の遺伝子抽出の自動化は、それらの工程の中でも特に遅れをとっており、未だにマニュアル操作に頼っている。さらに従来の化学的抽出法は、迅速性・簡便性に欠けており、また使用する化学物質の中には有機溶媒が含まれているため、取り扱いにも十分注意を払わなければならなかった。

このような背景から、本論文では、これまでに北海道工業大学大学院応用電子工学専攻生体電子・システム工学部門で検討されてきた導電性中空糸膜を用いた電流通電による殺菌の機構と、その際に見られる細胞内物質の漏出現象に着目し、それを遺伝子抽出にはじめて応用することで、従来には無かった全く新しい遺伝子抽出法の可能性について検討を行っている。病原性細菌の中でも特に大腸菌 O157 による感染症（食中毒）は、その毒性の強さから急速に症状が悪化し、最悪の場合には溶血性尿毒症症候群（HUS）や脳症などの致命的な疾患を引き起こすことが知られており、迅速な診断が必要とされている。このため、本論文では第一の目的として、大腸菌 O157 を対象とし、糞便試料から遺伝子を直接抽出することを試みている。

また、本論文では大腸菌 O157 の他に、AIDS（後天性免疫不全症候群）や肝癌などの致命的な疾患を引き起こす HIV（ヒト免疫不全ウイルス）や肝炎ウイルスに着目している。これらのウイルスに感染した患者は、過去に輸血や血液製剤の投与を経験している例が多く、血液を介した感染症であることが認知されている。従来、血液のウイルス汚染の検査にも、遺伝子診断が用いられてきたが、扱う検体量が非常に少ないため、感染初期のようにウイルス数がわずかな場合には、それらの検出が極めて困難であった。したがって、そのような血液は安全と判断され、輸血や血液製剤に利用されたため、ウイルス感染症を引き起こしていた。そこで本論文では、第二の目的として、未だに確実な検査法がない HIV や肝炎ウイルスなどの病原性ウイルスの検査にも適用することを考え、比較的危険性の低い単純ヘルペスウイルス（HSV）を用いて、ウイルスに対する導電性中空糸膜の有効性を検討している。本論文の成果は、次のように要約される。

第1章では、研究の目的と意義ならびにその背景を示し、さらに論文の構成を述べている。

第2章では、現在の病原性微生物による感染症の一般的な診断法についてまとめ、遺伝子診断の臨床学的立場を明確にしている。

第3章では、本研究で検討している遺伝子抽出法が、遺伝子診断においてどのような位置づけであるのかを明らかにし、さらに従来の遺伝子抽出法と、本研究の基礎となった導電性中

中空糸膜を用いた電流通電による殺菌および細胞内物質の抽出について述べている。

第4章では、導電性中空糸膜の電流通電による殺菌に基づいた遺伝子抽出法の大腸菌 O157 に対する有効性を検討している。その結果、導電性中空糸膜に直流電流を流すことで、膜に捕捉された大腸菌 O157 の遺伝子が抽出されることをはじめて見出している。さらに抽出感度の向上を目指して、界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を使用した結果、大幅な感度の改善が確認されている。最も高感度であった 300 mA, SDS 濃度 5% の条件では、 10^7 個/ml 以上の大腸菌 O157 が含まれた糞便試料からの遺伝子抽出が可能であることを明確にしている。従来の化学的抽出法と比較すると、この方法は、抽出工程数および所要時間がともに少なく、簡便性と迅速性に優れていることを明らかにしている。しかし、その抽出感度は従来の診断法よりも二桁程度劣っており、改善の必要性が述べられている。

第5章では、負の電荷を有する遺伝子の電気的性質を考慮し、導電性中空糸膜の利用法を電流通電用としてではなく、電界印加用の遺伝子抽出電極として使用するという別の手法で、抽出感度の向上を試みている。具体的には、導電性中空糸膜に捕捉された大腸菌 O157 を化学的に溶解し、その後、膜を陰極として 2 V/cm の電界を 10 分間印加することで遺伝子抽出を行っている。このように電界効果を利用した結果、大腸菌 O157 が 10^6 個/ml 以上接種された糞便試料からの遺伝子抽出が可能となり、約 10 倍の感度向上を遂げている。また遺伝子を増幅する PCR は、サンプル中の遺伝子を鋳型として多量の遺伝子を複製・増幅することから、サンプル中の遺伝子の密度を高めることで (遺伝子濃縮)、原理的に感度が向上するものと考え、遺伝子を抽出した後、2 V/cm の電界を 10 分間印加することで遺伝子の濃縮を行っている。検討の結果、感度はさらに約 10 倍改善され、 10^5 個/ml まで遺伝子抽出が可能であることを見出している。患者の糞便中には最低 10^5 個/g の大腸菌 O157 が含まれていること、また現在実用化されている診断法の検出限界が 10^5 個/ml 程度であることから、実用的な感度をはじめて実現している。このように、電流通電による殺菌を応用した遺伝子抽出法と原理は異なるものの、従来の抽出法よりも簡便性に優れ、また抽出に要する時間も半分に短縮している。

第6章では、HIV や肝炎ウイルスの画期的な検出法を提案するため、基礎的検討として単純ヘルペスウイルス (HSV) を用いて、ウイルスに対する導電性中空糸膜の有効性をはじめて検討している。その結果、細菌と同様にウイルス遺伝子の抽出が確認されている。さらにこの方法は、膜の捕捉能力を利用することで検体中の全てのウイルスを捕らえることができるため、検体の微量のウイルス汚染をも検出できる斬新で画期的な抽出法であることを明確にしている。

第7章は本研究の結論であり、得られた諸結果を総括している。

これを要するに、著者は殺菌・濾過基材として用いられてきた導電性中空糸膜を全く異なった観点から利用することにより、画期的で効率的な病原性細菌やウイルスの遺伝子抽出法を見出した。またこの遺伝子抽出法は、従来法よりも極めて簡便性・迅速性に優れており、生命に関わる重大な感染症を引き起こす病原性細菌に対して極めて有効であることを示した。また、これまで検体中の微量のウイルス汚染検査は困難を極めていたが、導電性中空糸膜の優れた捕捉能力を利用することで、それが可能となり、従来よりも遥かに安全な血液の提供が可能であることを示した。このように、本研究は病原性細菌やウイルスの遺伝子抽出に関して、重要な知見を提供し、致命的な疾患を引き起こす微生物感染症の早期発見・診断、さらに世界的に蔓延する HIV や肝炎ウイルスの根絶に貢献し、遺伝子工学、医用電子工学をはじめとする学際領域の発展に寄与すること大である。

よって、著者は博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。