

# 学位論文内容の要旨

北海道工業大学大学院工学研究科  
応用電子工学専攻  
博士後期課程  
生体電子・システム工学部門  
申請者氏名 菅原 俊継

## 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、微生物学、免疫学、遺伝子工学などの発展に伴って、病原性微生物による感染症の検査技術も向上し、適切な診断や治療が行われるようになってきた。特に遺伝子診断は、検体から病原性微生物の遺伝子を直接検出するものであり、誤診のない診断法として現在普及しつつある。一般に遺伝子診断は、1) 病原性微生物からの遺伝子抽出、2) 遺伝子の増幅 (PCR)、3) ゲル電気泳動・染色、4) 判定の順序で行われる。遺伝子診断が今日のように普及したのは 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) の遺伝子抽出は、それらの工程の中でも特に遅れをとっている。現在、主に用いられている遺伝子抽出法は化学的手法であるが、その操作は繁雑であり、それゆえに自動化が進んでおらず、未だにマニュアル操作に頼っている。さらにこの手法で使用する化学物質の中には有機溶媒も含まれており、取り扱いにも十分注意を払わなければならない。

このような背景から、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を見出せるものと確信し、本論文ではその可能性について検討した。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ため、迅速な診断が必要とされている。このことから、本論文では大腸菌 O157 を供試細菌として選択し、糞便試料からの遺伝子の直接抽出を第一の目的とした。

また、上記の大腸菌 O157 の他に病原性ウイルスとして、長い時間を経て AIDS (後天性免疫不全症候群) や肝癌を誘発し、多くの人々を死に至らしめている HIV (ヒト免疫不全ウイルス) や肝炎ウイルスに着目した。これらの主な感染源は、輸血や血液製剤の投与とされている。従来、血液のウイルス汚染検査にも、遺伝子診断法が応用されていたが、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す例があった。そこで本研究では、未だ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検査にも適用することを第二の目的とし、比較的危険性の低い単純ヘルペスウイルス (HSV) を用いて、導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出法のウイルスへの有効性を検討した。

本論文は全 7 章から構成されており、各章の内容は以下のようになっている。

第 1 章では、本論文における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た。

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、遺伝子診断法の臨床学的立場を明確にした。

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た。

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た。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た。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た。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 が含まれていれば糞便試料からの遺伝子抽出が可能であった。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が判明した。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、さらなる改善の必要があった。

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た。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 分間印加した。このように電界効果を利用したところ、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 倍の感度向上に成功した。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 (遺伝子濃縮) で原理的に感度が向上するものと考えた。そこで上述のように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た。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た。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、電界効果を利用した遺伝子濃縮によって、実用的な感度をはじめて実現することができた。この方法は、前述の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、従来の化学的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できるという利点を有していた。

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 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た。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た。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除去できるため、検体の微量のウイルス汚染をも捕らえることができる斬新で画期的な抽出法である。

最後の第 7 章では、得られた知見を整理し、それらに基づき本研究の結論を述べた。本研究で得られた最も重要な知見は、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が可能になったことである。

このように導電性中空糸膜を用いた遺伝子抽出法は、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り、今後、医療現場で大きく貢献することが期待される。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を可能にし、世界的に蔓延する HIV や肝炎ウイルスの根絶に大きく貢献できることが明確となった。