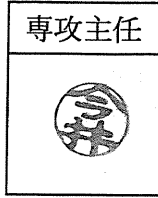


学位論文審査結果の要旨



博士（工学）申請者 五十嵐 治

審査委員

主査 教授 有澤 準二
副査 教授 今井 和明
副査 教授 三澤 顕次
副査 教授 木村 主幸

導電性中空糸膜を用いた感染症の遺伝子診断と 生体内の糖検出に関する研究

感染症の診断には、迅速かつ正確な診断方法として遺伝子診断法が多く用いられるようになってきた。この方法は、検体中の病原性微生物から直接遺伝子を分離・検出するため微生物培養を必要としないことから迅速な診断ができる利点がある。遺伝子診断法では、細菌やウイルスからの遺伝子抽出が必要不可欠で現在、化学的手法が主に用いられているが、その操作は自動化に適していないことや使用する化学物質に人体に害のある有機溶媒も介在することから新たな抽出方法が望まれている。

一方、病原性微生物の感染には、生体内の特定の糖が関与していることが次第に明らかになってきた。すなわち、細菌やウイルスが生体宿主細胞の表面にある糖に結合すると考えられている。この発見は、特定の部位に選択的に結合することによって発現する癌を含むさまざまな疾病予防や治療の面で重要な意味を持っている。しかし、生体内における糖質の解明は、膨大な組み合わせをもつ複雑な糖鎖構造のためにメカニズムの解明が進まず、部分的な実験による実証に留まっている。また、感染の成立に関与する微量な糖を検出する方法が確立されていないことも研究を阻害する要因となっている。

このような背景から、本論文では、感染症に関する遺伝子診断と感染症を未然に予防するための糖検出を著者が開発した導電性中空糸膜 (Metal Coated Hollow fiber membrane :MCH) を用いてはじめて検討している。本論文は全7章から構成され、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、病原性微生物による生体感染のメカニズムを従来の研究を概括して明らかにし、感染予防における糖鎖の役割とその可能性について述べている。そこで、糖鎖を解明するにあたって必要となる糖類の分析方法および高速液体クロマトグラフィ (High-Performance-Liquid-Chromatography:HPLC) に用いられる電気化学検出器について解説を加えている。また、感染した際の一般的な診断方法から遺伝子診断法に至る感染症診断の概要について述べ著者の研究の位置付けとその独自性を明らかにしている。

第3章では、病原性微生物の中で細菌を例に取り上げ非病原性大腸菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、腸炎ビブリオ菌などの供試細菌を用い、導電性中空糸膜に電流を通電させることで機能の確認を行っている。その結果、殺菌効果があると同時に細菌から遺伝子を取り出せることを見出し、そこで感染症の迅速診断を目的に病原性大腸菌 0157 の遺伝子診断の検討を行っている。この遺伝子診断では、単独試料

による診断に留まらず医療現場を想定した糞便試料に至る評価まで検討しており実用化を意識した研究となっている。また、陰イオン界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl Sulfate: SDS) を併用することでさらに検出感度が上がることをはじめて示している。

第4章では、遺伝子検出感度を上げるための検討を行っている。通電による遺伝子の回収では、一部の遺伝子が電流によるジュール熱などで損傷を受け、PCR(Polymerase Chain Reaction)にかけても増幅されていないことが感度向上の障壁となっている。そこで著者は遺伝子が負に帯電していることに着目し、導電性中空糸膜を陰電極として用い、膜内の遺伝子を電界効果によって損傷なく抽出するという全く新たな方法で検討を行っている。さらに、検出感度を上げるためにこの導電性中空糸膜を遺伝子の濃縮器に応用することで病原性大腸菌 0157 の検出感度を 10^5 個/ml まで高め、実用レベルでの検出をはじめて可能にしている。またその後、この手法をウイルス遺伝子の抽出法へと発展させている。その結果、アガロースゲルに遺伝子を集積化させることで、血液中のウイルス数が 3×10^3 個/ml 存在すると遺伝子が抽出できることを明らかにしている。これにより、著者はこの手法で安全性の高い血液や血液製剤が提供できることを示唆している。

第5章では、感染症を未然に防御し、治療に役立つ糖を検出することを目的に導電性中空糸膜の新たな検討を行っている。著者は、多孔質中空糸膜の大きな表面積に着目し、この表面全てが酸化還元反応電極となれば従来にない極めて高感度な電極になると仮説を立て検討した。実験の結果から銅を被覆した電極が最も感度がよく、信号対ノイズ比(S/N)を3とした時のグルコース検出感度は 2.1 pmol となり、既存電極の中で最も高感度となっている。

第6章では、さらにこの感度を高めるための検討を行っている。導電性中空糸膜電極は、反応室を兼ね備えた特異な袋構造のため残留水酸化ナトリウムを排除することが望まれる。また、高感度であるがゆえにノイズも多く検出してしまう課題もあった。そこで著者は、酸化還元を行う従来の銅電極の下地に金を積層させることで低ノイズの電子授受を実現させ、感度を一桁上げて 0.24 pmol とし業界最高感度を達成させた。さらにこの電極を用いて7種類の多成分糖を同時検出することを試み、全ての糖においてサブピコモルの検出感度をはじめて達成した。また、検出時間の比較では、グルコース、ソルビトール、フルクトース、ラクトース、スクロース、マルトースの6種類の糖に対していずれも業界最短時間での検出が可能であることを明らかにしている。

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、膜の新しい機能を研究する中で誕生したこの導電性中空糸膜に従来の分離膜にはない画期的な機能を取り入れ、それを積極的に応用している。すなわち、膜自身を導電体として直流を通電させて病原性微生物を電気殺菌し、その遺伝子を分離することで全く新しい遺伝子診断手法を確立したことである。また、この導電性中空糸膜を電界印加用の電極と濃縮器にすることで、大腸菌 0157 やヘルペスウイルス遺伝子の抽出をはじめて実用化レベルの感度まで向上させたことである。さらに、導電性中空糸膜の被覆金属材質と膜自身の極めて大きな表面積に着目し、電気化学検出器の酸化還元電極として全く新たな応用分野を構築したことである。この研究によって高速液体クロマトグラフィーの検出器の感度が上がり、微量な生体内の糖分析が可能になれば、感染症に関与する糖鎖解明の研究をさらに掘り下げていく上で極めて有効な手段となる。

これらの研究に用いられた電子工学的手法は、現代社会が求める医学、薬学、微生物学および糖鎖生物学などのさまざまな分野において寄与することが極めて大きく、学際領域の発展に貢献するものである。

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。