

学位論文内容の要旨

申請者 五十嵐 治

論文題目 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

論文内容の要旨

近年、我々の日常生活において安全性の高い飲料水の要求は高く、一般家庭の分野にも簡易型浄水器の普及が進んでいる。しかし、浄水器の構造や使い方によっては、一旦、選択分離された菌類が、増殖するための温床に変貌する危険性を持っている。

一般的に膜の機能は、素材自身の持つ性質や細孔径の違いによって異なるが、病原性微生物などを殺菌する機能を持ち合わせていない。本論文では、膜の新しい機能を研究する中で開発し特許となった、導電性中空糸膜 (Metal Coated Hollow Fiber Membrane :MCH) を用いて、通電および電界効果による感染症の遺伝子診断の検討を行った。また、酸化還元を伴う電気化学的特性を用いて感染症に影響を与える生体内の糖検出についても検討を行った。

昨今、24時間風呂で問題となったレジオネラ菌や貝割れ大根に端を発した病原性大腸菌 0157 などによる感染症は、毒性が高く診断の遅れが患者を死に至らしめる危険性を持っている。したがって、これらの病原性微生物の殺菌を目的として非病原性大腸菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、腸炎ピ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効果の確認を行った。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た。そこで、感染症の迅速診断を目的に近年、社会的問題となっている病原性大腸菌 0157 の遺伝子診断をこの導電性中空糸膜を用いて検討を行った。実験方法は、電流通電によるものと電界効果によるものの 2 通りで行った。実験結果は、それぞれの方法に特徴的な結果が得られたが、検出感度を上げるといふ点で電界効果を用いる方法が有効で 10^5 個/ml までの遺伝子の検出が可能であることが明らかとなった。また、ドデシル硫酸ナトリウ(SDS)を実験に併用することで遺伝子抽出の感度がさらに高められることが示唆された。

次に、この方法を用いてウイルスの遺伝子を抽出し、HIV(Human Immunodeficiency Virus)や肝炎ウイルスなどの診断を行い、安全な血液および血液製剤を提供することを目的として導電性中空糸膜の応用研究を行った。本研究では B 型肝炎と同様なウイルスとして単純ヘルペスウイルスを用いた。実験結果から、導電性中空糸膜を「ウイルスの濃縮」と「遺伝子の抽出」という二つの機能に使い分けることで 3×10^3 個/ml の実用レベルの感度に達することが、はじめて明らかとなった。

さらに、この導電性中空糸膜を用いて新たな研究を行った。前述までの研究は、病原性微生物の感染時の診断であった。これに対して、病原性微生物の生体内の感染防御となる糖鎖に着目し、感染症の予防・治療分野で糖の役割を明確化させることを目的にこれらの成分を高感度に検出するための応用検討を行った。

本研究では、強アルカリ条件下で糖の水酸基が酸化還元される原理を用いて、導電性中空糸膜をはじめて糖の検出電極として検討を行った。糖の検出には、酵素法とクロマトグラフ法があるが、一般的には、高速液体クロマトグラフィ(High-Performance-Liquid-Chromatography :HPLC)が用いられている。この方法は、検出しようとする対象成分および検出感度に応じて検出器が選択されるが、通常糖検出には示差屈折率器が用いられ、検出限界値は 200pmol 程度である。また、蛍光検出器の検出限界値は一

桁下がり 10~50pmol となるが、糖を誘導体化させる煩雑さや試薬の汚染などの問題が残っている。さらに感度を上げる方法として電気化学検出器があり 10pmol 以下の検出が可能で、導電性中空糸膜は、この分野の検出電極に応用することが可能である。

導電性中空糸膜電極は、従来の金属ロッド電極に比べて極めて大きな表面積を有することから、大幅な検出感度の向上が期待できると仮説を立て検討を行った。基本性能試験での試薬はグルコースを用い、この電極が電気化学的触媒反応によって糖が酸化されることを電流-電位曲線(Cyclic Voltammogram)によってはじめて明らかにし、検出感度は銅被覆膜電極で 2.1pmol であった。また、感度を上げるための電極構造として、送液されるテフロンチューブ内径に膜電極内径を近似させることと被覆金属を銅の下地に金をハイブリッド化させることでノイズの低減を行った。その結果、グルコースの検出感度は、一桁下がって 0.24pmol となり業界最高感度となった。さらに、混合糖の同時分析では、グルコースに加えソルビトール、フルクトース、ラクトース、サッカロース、ラフィノース、マルトースなど 7 種類の全ての糖において従来電極より一桁低いサブ pmol レベルの検出限界値が得られた。この感度での検出分野は、虫歯の原因となるストレプトコッカス・ミュータンス菌に防衛機能を発揮する糖として注目されているキシリトールの唾液や血清中の生体残量(数 pmol 以下)の測定がある。また、生薬に含まれる今まで検出不能な微量糖成分の分析が可能となる。

以上のことから、電気化学検出器として市販されている島津製作所と横河 A.S(アナリティカル・システムズ)社との検出時間の比較を行った。その結果、グルコースの検出では横河 A.S 社が 10 分、島津製作所が 6 分に対して導電性中空糸膜電極を用いた検出器では 2.7 分と極めて短時間に、しかも他社より一桁低い検出限界値の検出器であることが確認された。本論文は、全 7 章から構成されており、次の内容が述べられている。

第 1 章は、序論であり研究の背景ならびに目的について述べると共に病原性微生物による感染症の遺伝子診断の状況と感染症に関与する生体内の糖鎖とその糖の検出などについて記述した。

第 2 章では、病原性微生物が体内細胞の糖鎖にどのように結合するかについて述べ、その糖を具体的に検出する方法や感染症の一般的な診断方法についてまとめた。また、本論文で用いた導電性中空糸膜の素材とメッキ工程などについて解説した。

第 3 章では、導電性中空糸膜を用いて直流通電によって殺菌された菌類と、得られた細胞内物質から遺伝子を抽出し感染症診断の可能性を検討した。加えて病原性大腸菌 O157 を供試細菌として用いて遺伝子の抽出を行った結果、陰イオン界面活性剤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た。

第 4 章では、遺伝子抽出感度を高めるために電界効果を利用して第 3 章で用いた病原性微生物の大腸菌 O157 を用いた遺伝子診断と肝炎ウイルスや HIV などへの遺伝子診断を目的として単純ヘルペスウイルスを用いた遺伝子診断について述べた。ここでは、導電性中空糸膜を電界効果の電極と遺伝子を濃縮する濃縮器として用いる全く新たな方法により実用レベルの感度に到達したことを記述した。

第 5 章では、炭水化物中の糖類を検出するためにグルコースを用いて導電性中空糸膜電極が電気化学的に応答する基本性能について述べた。

第 6 章では、糖類をより高感度に検出するための電極構造の検討を行い、導電性中空糸膜電極中の残留水酸化ナトリウムを排除することによってさらに一桁高い感度に達したことを示した。また、7 種類の混合糖を同時分析することによって具体的に現時点での糖検出の可能性について述べると共に他社との性能比較を行った。

最後の第 7 章では、得られた知見を整理し、それらに基づいて本研究の結論を述べた。