

2023年 7月 7日

機械工学専攻		学籍番号	第 173154 号	指導教員	柴田 隆行
氏名	夏原 大悟				永井 萌土

論文内容の要旨 (博士)

博士学位論文名	マイクロ流体制御技術に基づく標的遺伝子の多検体・多項目同時定量診断システム
---------	---------------------------------------

(要旨 1,200 字程度)

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の世界的な大流行 (パンデミック) が引き起こしたように、ウイルス感染症がもたらす人々への恐怖や、経済活動へ与える影響は計り知れない。感染の拡大防止には、迅速かつ正確な診断技術が必要となる。本論文では、マイクロ流体チップテクノロジーと等温遺伝子増幅法 (LAMP法) を組み合わせることで、1回の作業工程で、標的遺伝子の多検体・多項目同時定量診断が行えるシステムを開発した。

はじめに、提案するマルチプレックス遺伝子診断デバイスの基本原理として、横型相ガイドによる複数の反応容器への検体・試薬の分注技術、横型ミキサによる高効率な混合、蛍光LAMP法による多項目同時遺伝子診断を示した。しかし、実用化向けの技術的課題として、多段階の作製プロセスが必要なこと、迅速診断が困難であること、蛍光観察のための特殊な装置が必要であることが挙げられた。

次に、分注操作における受動バルブの決壊圧力の向上を目的とし、縦型相ガイドを考案し、導入流量の向上を実現した。また、本デバイスの分注理論を構築し、各反応容器に設置した2個1組のバルブに必要な決壊圧力の設計指針を明らかにした。さらに、受動バルブを空気排出流路内に配置したエアブラグインバルブ構造を考案し、導入流量のさらなる向上を実現した。反応容器への充填が完了すると、対向する受動バルブ間に捕捉された空気を介して液体が互いに押し合い、受動バルブに印加される圧力が減殺できることを示した。その結果、最大導入流量70 $\mu\text{L}/\text{min}$ の導入を可能にした。

続いて、混合部において、1回のプロセスで簡易に作製できる高効率な受動ミキサ (P-ACEミキサ) を開発した。流路長手方向に対し、左右非対称な障害物構造を流路壁面に設けることで、2液が流路幅方向に対して交互に入れ替りながら混合が促進されることを示した。その結果、広いレイノルズ数の範囲 ($Re=0.13\sim 13$) において高い混合性能を実現した (送液距離20mmで混合効率90%以上)。

現場即時検査を目的として、デバイス上で比色指示薬を用いた遺伝子増幅実験を行った。節足動物媒介性ウイルス、有毒植物、ヒト感染性ウイルス、農作物病害虫、植物性食物アレルギー物質の多項目同時診断を実現し、反応容器の色の変化による定性診断が可能であることを示した。さらに、遺伝子増幅中のデバイス画像を取得するタイムラプス撮影装置と、取得画像から反応容器の色相変化を解析するプログラムを開発し、比色指示薬を用いた検体中の標的遺伝子の定量診断手法を確立した。ヒトヘルペスウイルスの遺伝子定量診断に適用し、その有効性を実証した。

多検体の同時遺伝子診断を実現するために、遠心力によって送液が可能なデバイスを開発した。遠心力による流体操作に適した流路デザインを検討し、複数の反応容器への逐次的な分注を行うための遠心分注理論を構築した。開発した遠心送液型デバイスを用いて、食物アレルギー物質の4検体・4項目同時定量検査を実現した。

Date of Submission (month day, year) : July 7, 2023

Department of Mechanical Engineering	Student ID Number D173154	Supervisors Takayuki Shibata Moeto Nagai
Applicant's name Daigo Natsuhara		

Abstract (Doctor)

Title of Thesis	A Microfluidic-Based Quantitative Analysis System for the Simultaneous Detection of Multiple Nucleic Acid Targets in Multiple Samples
-----------------	---

Approx. 800 words

A risk management strategy to address emerging and reemerging viral infectious diseases is a pressing global public health challenge. Early detection of viruses through rapid and accurate diagnostic technologies is preventing the spread of infection. Therefore, a microfluidic-based quantitative analysis system has been developed for the multiplexed genetic diagnosis of multiple nucleic acid targets in multiple samples in a single operation by combining the microfluidic technology and the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method.

The basic principle of the multiplex genetic diagnosis device, including liquid dispensing into an array of microchambers, highly efficient liquid mixing, and multiplexed genetic diagnosis based on a fluorescent LAMP method, was presented. However, several technical challenges remain for practical application, such as the need for a two-step fabrication process, the difficulty of rapid diagnosis, and the need for the fluorescence observation setup.

To address such issues, a vertical-type phaseguide structure was introduced to improve the burst pressure of the passive valve in the dispensing region, thus resulting in an increase in flow rate to be dispensed into microchambers. Moreover, a microfluidic flow control theory was developed to provide design guidelines for a pair of passive valves. To further improve the maximum flow rate, a passive valve configuration with high pressure resistance performance, termed an "air plug-in valve", was proposed. By implementing the air plug-in valve, a maximal allowable flow rate of 70 $\mu\text{L}/\text{min}$ could be achieved for sequential liquid dispensing into 10 microchambers.

In a mixing region, an efficient micromixer with a simple geometrical feature, termed a "P-ACE mixer", was developed. The P-ACE mixer with vertical obstacle structures asymmetrically arranged on both sidewalls, which can be easily fabricated via only a single-step photolithography process, exhibited a high mixing efficiency of 90% or more within a microchannel length of 20 mm over a wide range of Reynolds numbers ($Re = 0.13\text{--}13$).

With the aim of enabling on-site diagnostics, LAMP assays were performed using a colorimetric indicator on the fabricated devices. Simultaneous diagnosis of arbovirus infections, toxic plants, human viral infections, agricultural pests, and plant food allergens were demonstrated. A qualitative detection was made possible by a color change in a positive reaction chamber. Moreover, a microfluidic-based quantitative analysis system was developed; it consists of a time-lapse imaging equipment to acquire the device image during DNA amplification reaction and a program to analyze the hue change of reaction chambers from the obtained images based on the colorimetric LAMP assays. Using this system, a quantitative genetic diagnosis of human herpesvirus with high accuracy was successfully demonstrated.

To realize simultaneous genetic diagnosis of multiple samples, a newly designed centrifugal microfluidic device capable of sequential dispensing of multiple samples was developed. In addition, the design guideline was proposed to sequentially dispense a liquid into multiple microchamber in a centrifugal pumping system. Furthermore, a quantitative diagnosis of four food allergens was performed simultaneously for four food samples.