

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	オープンサンドイッチイムノクロマトグラフィー(OS-IC)による非競合的な低分子抗原の検出
Title(English)	
著者(和文)	原田義孝
Author(English)	Yoshitaka Harada
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11985号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種類:課程博士, 審査員:上田 宏,中村 浩之,西山 伸宏,柳田 保子,堤 浩,北口 哲也,小林 典裕
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11985号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： 生命理工学 系
Department of Graduate major in ライフエンジニアリング コース
学生氏名： 原田 義孝
Student's Name Yoshitaka Harada

申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学)
Academic Degree Requested Doctor of (Engineering)
指導教員 (主)： 上田 宏
Academic Supervisor(main) Hiroshi Ueda
指導教員 (副)： 北口 哲也
Academic Supervisor(sub) Tetsuya Kitaguchi

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本論文は「オープンサンドイッチイムノクロマトグラフィー(OS-IC)による非競合的な低分子抗原の検出」と題し、日本語で書かれ、6章より構成されている。

第1章「序章」では、イムノクロマトグラフィー(IC)が、簡便迅速な標的物質検出法として活用されていること、ならびにICの構造について紹介している。また通常のICでは、メンブレン上のテストラインに固定した抗体が捕捉した標的物質に標識抗体が結合するサンドイッチ法によるため、二つの抗体が同時に結合する必要があり、低分子化合物の検出は不可能であること、また低分子化合物をICで検出する際には、テストラインに標的物質やそのアナログを固定し、そこに標識抗体が結合する反応をサンプル液中の標的物質と競合させる競合ICを行うことで、1種類の抗体で検出可能であることを解説している。一方、競合法ではサンプル液中の標的物質が多いほど発色が少なくなるため、低濃度の標的物質に対しては目視での判定が難しい問題点についても指摘している。これらを受けて、抗体の重鎖(V_H)と軽鎖(V_L)をそれぞれ調製し、一方を固定、もう一方を標識することによって、元々一つの抗体である二つのタンパク質で標的物質をサンドイッチし検出する、オープンサンドイッチ法をICに応用し、オープンサンドイッチイムノクロマトグラフィー(OS-IC)の構築を行うという本研究の目的を示している。そして、標的物質オステオカルシン(bone Gla protein)のC末端7残基のペプチドであるBGP-C7を検出するOS-ICの検討を、 V_H にTrx タグを付与したTrx- V_H 、及び V_L にMBP タグを付与したMBP- V_L を用いて行った事が述べられている。

第2章「金コロイド標識によるOS-IC構築の検討」では、最も一般的にICの標識に用いられる金コロイド標識によるOS-ICの検討について記されている。しかし本検討では、テストラインに固定したMBP- V_L のうち V_L と金コロイドとの間で強い非特異的な反応が生じたことから、金コロイド標識法によるOS-ICの確立は困難であると結論されている。ただし今回用いた抗体でなく、他の抗体を用いたOS-ICにおいては、非特異的な反応が少ない可能性があるとも述べられている。

第3章「アルカリホスファターゼ(AP)標識によるOS-IC構築の検討」では、酵素アルカリホスファターゼ(AP)を標識とするOS-ICの検討について述べられている。そして本系では、100 ng/mL以上でBGP-C7濃度に応じてテストラインの発色上昇が見られ、BGP-C7を検出するOS-ICが開発できたことが述べられている。一方、抗原不在時にも非特異的なテストラインの発色が見られ、目視だけで結果を判定するOS-ICとしての利用は難しいと思われることも記されている。非特異反応の低減とBGP-C7添加によるテストラインの発色強化を目的に数種の展開液が検討されたが、今回実施した条件では改善できなかった事、また、流速の速いメンブレンを用いることで、バックグラウンドと非特異的なテストラインの発色が低減できたが、高濃度のBGP-C7に対する反応も低下したため、別の標識方法の検討が望ましいと述べられている。

第4章「着色セルロース粒子によるOS-IC構築の検討」では、近年金コロイドに代わり利用されつつある着色セルロース粒子標識によるOS-ICの検討について述べられている。本系で表面電荷を利用して標識を行った場合には、金コロイド同様に非特異的な反応が見られた一方、粒子表面のカルボキシル基を利用した共有結合により標識を行った場合に、非特異反応がほとんど検出されず、かつBGP-C7添加濃度依存的なテストラインの発色を示した事が記されている。最終的にこの反応系において、10 ng/mL以上のBGP-C7を定量できることが明らかにされ、着色セルロース粒子標識により低分子抗原を非競合的に検出するOS-ICの開発に成功したことが示されている。

第5章「ヒスタミン、グリアジン由来ペプチド検出用OS-IC作製への取り組み」では、開発したOS-ICの他の食品中低分子抗原検出への応用を目的として、ヒスタミンとグリアジン由来7残基のペプチドを選定し、OS-IC開発に向けた抗体の取得を行ったことが記されている。その結果、抗ヒスタミン抗体においては、構造類似のヒスチジンとの識別が可能である抗体が得られ、抗グリアジン抗体においては、小麦と、同じくグリアジンを含むライ麦を検出できた事が述べられている。抗グリアジン抗体のクローンの一つは、表面プラズモン共鳴法により抗原結合解離定数 K_D が7.2 nMと強く、OS-ICでも使用が可能と思われると述べられている。

第6章「結論」においては各章で得られた結果を総括すると共に、今後の展望について述べている。

これを要するに、本論文は簡便迅速に低分子を非競合的に検出できるICであるOS-ICの開発について初めて報告したものであり、低濃度の抗原に対しても目視だけで陽性と陰性の識別ができる新規な分析技術の開拓に成功しており、工学上貢献する所が大きい。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース : Department of Graduate major in	ライフエンジニアリング	系 コース	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 (工学) Doctor of
学生氏名 : Student's Name	原田 義孝		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	上田 宏
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)	北口 哲也

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Immuno-chromatographic assay is an easy and rapid on-site detection method for a target molecule. However, in conventional sandwich immunochromatographies, the target molecule should have enough size to be captured and detected by two antibodies. To detect small targets with less than 1000 in molecular weight, competitive assay is almost always adopted. However, competitive assay is not suitable for visual detection of target molecule with low concentration. In this study, open sandwich immunoassay, which can detect small molecules by making a sandwich between the two variable fragments V_H and V_L derived of a single antibody, was applied to immunochromatography to develop a signal-on open sandwich immunochromatography (OS-IC). Bone Gla protein (BGP) -C7, a C-terminal 7 amino acid peptide of human osteocalcin was selected as a first detection target.

Gold colloid labeled V_H fragment showed nonspecific signal without BGP-C7 peptide. And there was no signal enhancement with addition of BGP-C7 peptide. Alkaline phosphatase labeled V_H fragment also showed nonspecific reaction, however, BGP-C7 specific signal appeared with over 100 ng/mL of BGP-C7 peptide. By using the V_L fragment fixed on a nitrocellulose membrane and the V_H fragment labeled with a colored cellulose bead, 10 ng/mL of BGP-C7 peptide was detected without nonspecific signal.

As next target of OS-IC, histamine and gliadin derived 7 amino acid peptide were selected. Hybridoma strains were constructed by immunization of mice, and reactivity and specificity of antibodies were examined. As for anti-histamine antibody, it showed reactivity against histidine, while did not with histidine. Surface plasmon resonance measurement revealed that K_D value one of anti-gliadin derived peptide antibody was 7.2 nM. Construction of OS-IC for histamine and gliadin derived peptide. As the result, suitable antibodies for OS-IC were obtained.

This is the first report of OS-IC, which is easy, rapid, and on-site, enabling non-competitive detection of small molecules.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).