

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, 学位の種別: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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

						(神戸薬科大学)

&SSS

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<sub>H</sub>)と軽鎖(V<sub>L</sub>)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<sub>H</sub> に Trx タグを付与した Trx-V<sub>H</sub>、及び V<sub>L</sub> に MBP タグを付与した MBP-V<sub>L</sub> 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<sub>L</sub> のうち V<sub>L</sub> 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<sub>D</sub> 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。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」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。