HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of High-Throughput Fluorescence Polarization Immunoassay System by a Fluorescence Polarization Imaging Technique [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	若尾, 摂
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第13692号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74157
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Osamu_Wakao_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（工学）　　氏名　若尾　摂

学位論文題目

Development of High-Throughput Fluorescence Polarization Immunoassay System

by a Fluorescence Polarization Imaging Technique

（蛍光偏光イメージングによるハイスループット蛍光偏光イムノアッセイシステムの開発）

蛍光偏光測定法（FP）は、サンプルの蛍光の偏光成分から、生体分子間相互作用や結合状態などの測定が可能な均一系測定法である。また、蛍光偏光免疫測定法（FPIA）は、分析対象の濃度を測定する均一系免疫分析法である。分析法として広く用いられる、抗体の固定化が必要な不均一系免疫分析法に対して、FPIA は抗体の固定化が不要であるため、反応・測定が短時間、操作が簡便という特長を持ち、食品分析や臨床診断ほか、多分野での迅速分析への応用が期待される。しかし、従来の測定システムは原理上、単サンプル測定であり、また複雑な光学系が必要であるといった課題がある。そこで、本研究では、これらの課題を解決する、新しい測定原理に基づく FP 測定システムの開発を目的とした。液晶素子とイメージセンサーを利用した新たな測定原理に基づき、FP 測定装置を構築することで、従来法で不可能であった複数サンプル同時 FPIA に成功した。また、装置の原理的な最適化、光学系設計の改良により、小型・低コスト・ハイスループットな FP 測定装置の開発に成功した。本装置は、将来的に、食品分析や臨床診断のみならず、相互作用解析や蛍光イメージングなどの分野での貢献が期待される。

本論文は、全 6 章から構成される。

第 1 章は、序論であり、本研究の背景および目的について述べた。

第 2 章では、液晶素子とイメージセンサーを用いた新たな蛍光偏光測定原理の構築とその原理検証結果について述べた。液晶素子と偏光フィルターを用いると、それらを透過する光の偏光方向は、液晶への印加電圧によって、入射前の偏光方向に対して平行および垂直方向に切り替えられる。蛍光の偏光成分を液晶により変調し、液晶を透過した蛍光をイメージセンサーによって同期検出すると、FP 測定の指標である偏光度 P を二次元画像として一度に取得できた。モデルサンプルを用いて、イメージセンサー視野内に存在する複数サンプルの同時 FPIA を試みたところ、蛍光偏光度の画像化により、世界で初めて多サンプル同時 FPIA 測定に成功した。

第 3 章では、液晶の動作周波数とイメージセンサーのサンプリング周波数のずれについて検討した結果を述べた。本原理は、液晶の動作周波数とイメージセンサーのサンプリング周波数を同期させることにより、FP の画像化に成功している。そこで、理論的および実験的にそれら周波数の同期ずれについて検討した。その結果、液晶とイメージセンサーの周波数に同期ずれが生じた場合、FPIA 結果に影響を及ぼすことがわかった。また、ある同期ずれにおいては、測定サイクル数により結果が大きく異なるとわかった。そのため、本原理において、同期ずれが生じる場合は、測定サイクルの最適化が必要であるという知見を得た。

第 4 章では、本原理を用いた小型の FP 測定システムの精度向上の結果について述べた。以前の結果から、従来の市販の液晶素子では透過率が低く、市販の FP 装置に比べて測定精度が低いことがわかった。そこで、本測定に適した高透過率の液晶素子を開発し、測定精度の向上を図った。開発した液晶素子を用いて、同期性を改善した新たな測定システムを構築することにより、システムの性能が飛躍的に向上した。さらに、安価な CCD イメージセンサーを検出器、LED を励起光源として使用することにより、システム全体のコストが削減された。モデル生理活性物質の FPIA において、測定ばらつきは、以前の 16.9%から 3.9%に低下した。その結果、複数サンプル同時測定が可能でありながら、市販の FP 装置に匹敵する精度をもつ新たな FP 装置の開発に成功した。

第 5 章では、イメージセンサーに CMOS センサーを用いて、ポータブルな低コスト FP 装置を構築すると同時に、ハイスループットな FPIA 測定が可能なマイクロデバイスを開発した結果を述べた。検出器に CMOS センサーを用い、さらに光学系設計の改良により、持ち運び可能なサイズまで、装置を小型化した。本装置に適したマイクロデバイスを用いて、赤カビ産生毒素の FPIA を行った結果、異なる 8 濃度のサンプル、各１２サンプルの同時測定（９６サンプル同時測定）に成功した。また、１濃度 500 サンプルの同時測定にも成功した。

第 6 章は、本論文の総括および本研究の将来性について述べた。FP 法の、短時間性、操作の容易性という特長と、本 FP 装置の可搬性、低コスト性、ハイスループット性という特長の組み合わせは、様々な研究分野に貢献すると考えられた。これらの特長は測定対象の濃度測定を全体的に、迅速かつ低コストで行うことが可能になるため、食品サンプルのオンサイト測定や、臨床患者のポイント・オブ・ケア・テスト（POCT）などに貢献すると考えられた。また、本装置のハイスループット性という特長は、分子間相互作用の研究に貢献できると考えられた。 本 FP 装置は、将来的に反応のための混合部分を統合することが可能で、研究者による取り扱いは試料注入のみとなる。また、本装置の必要サンプル量は 1 nL であり、従来法に比べ分析のための総コストが大幅に削減されると考えられた。さらに、本装置は潜在的に細胞イメージング分野での応用が期待され、例えば、細胞に対する相互作用解析への応用が可能であると考えられた。以上から、本研究で開発した、蛍光偏光イメージングによるハイスループット蛍光偏光イムノアッセイシステムは、さまざまな研究分野に貢献する可能性があると結論づけた。