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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（工学）　氏名　若尾　摂

審査担当者

主査	教授	佐藤 敏文
副査	教授	渡慶次 学
副査	教授	石森 浩一郎
副査	准教授	谷 博文
副査	教授	島田 敏宏

学 位 論 文 題 名

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（FP）法は、サンプルの蛍光の偏光成分から、生体分子間の相互作用や結合状態などの分析が可能な均一系測定法である。その中でも抗体を用いる蛍光偏光イムノアッセイ（FPIA）は、分析対象の濃度を測定する均一系免疫分析法として知られる。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、従来の測定装置は原理上、単サンプル測定であり、また複雑な光学系を必要とするといった課題がある。このような背景から筆者は、これらの課題を解決する、新しい原理に基づく FP 測定システムの開発を目的とした。具体的には、液晶素子とイメージセンサーを利用した FP 測定システムを新たに構築することで、従来法で不可能であった複数サンプル同時 FPIA を実現した。また、システムの原理的な最適化、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 測定システムを開発した

本論文の概要及び主要な成果は以下に要約される。

筆者は、液晶素子とイメージセンサーを用いた新たな FP 測定原理の構築とその原理検証を行った。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、入射光に対して平行および垂直方向に自在に切り替えられる。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ることを実証した。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 に成功した。

次に筆者は、FP の画像化における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同期ずれの影響について検討した。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 の画像化を行っている。それらの周波数にずれが生じた場合、偏光度の測定結果への影響が懸念されることから、理論的および実験的に周波数の同期ずれの影響について検討した。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 における偏光度のダイナミックレンジおよび測定精度が低下することを明らかにした。また、ある同期ずれにおいては、測定サイクル数によって偏光度の値が大きく異なることを見いだした。このことから、本原理において、周波数の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。

続いて筆者、本原理を用いた小型の FP 測定システムの精度向上について検討した。得られた結果から、従来の市販の液晶素子では透過率が低く、市販の FP 測定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た。また同時に、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同期性を改善することで、測定精度の向上を図った。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を削減した新たな測定システムを構築した。モデル生理活性物質の FPIA において、測定のばらつきは、以前の 16.9 %から 3.9 %に改善した。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 測定装置に匹敵する精度をもつ新たな FP 測定システムの開発に成功した。

さらに筆者は、ポータブルな低コスト FP 測定システムの開発と、ハイスループットな FPIA を可能にするマイクロデバイスを開発した。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、測定システムを持ち運び可能なサイズまで小型化した。測定視野内に複数のサンプルが集積され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 1 2 サンプルの同時測定（ 9 6 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。

これを要するに、筆者は、液晶素子とイメージセンサーを用いた新たな FP 測定原理を構築し、偏光度 P の二次元画像の取得に成功した。これにより多サンプル同時計測が可能となり、蛍光偏光イムノアッセイのハイスループット化に成功した。これらの成果は、計測科学及び分析化学分野の発展に大きく貢献するものである。よって、筆者は北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格があるものと認める。