HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of Microdevice-based Immunoassay Systems for Point-of-Need Testing [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	西山, 慶音
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第14471号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81279
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NISHIYAMA_Keine_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　西山　慶音

学位論文題目

Development of Microdevice-based Immunoassay Systems for Point-of-Need Testing

（現場即時検査のためのマイクロデバイスを用いたイムノアッセイシステムの開発）

現場即時検査（Point-of-Need Testing; PONT）とは、検査対象の傍らで行う検査・診断システムの総称である。生体分子や病原体の測定ニーズが高い PONT において、免疫分析法（イムノアッセイ）は高い感度・特異度を有する汎用性の高い測定法として用いられてきた。しかし、PONT に要求される感度と迅速性を両立させることは、イムノアッセイを用いた PONT システム開発の大きな課題であった。これらが両立した PONT システムの実現は、従来の PONT の利便性の大幅な改善および新たな PONT 用途の開拓に大きく貢献する。そこで、本学位論文では、この課題を解決するマイクロデバイスを用いたイムノアッセイシステムの開発を目的とした。蛍光シグナルの利用をシステム構築の基軸として、特徴の異なる 2 種類のイムノアッセイシステムを開発した。測定対象は、PONT において応用範囲の広い、タンパク質およびウイルスとした。より測定感度に重点を置いた PONT への応用を目的として、マイクロ流路内のポリマー構造体を利用した酵素サンドイッチイムノアッセイシステムを開発した。また、より迅速性かつ簡易性に重点を置いた PONT への応用を目的として、非競合型の蛍光偏光イムノアッセイ（FPIA）とマイクロデバイスを組み合わせたイムノアッセイシステムを開発した。

本学位論文は全 6 章から構成されている。各章の概要を以下に示す。

第 1 章では、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、イムノウォールデバイスを用いた超高感度サンドイッチイムノアッセイシステムの開発について述べた。イムノウォールデバイスとは、マイクロ流路中に光硬化性ポリマーの壁状構造体（イムノウォール）を、抗体の固定化担体として配置したデバイスである。イムノウォールデバイスの測定感度を大幅に向上させるため、抗体標識にアルカリホスファターゼを用いた酵素イムノアッセイのイムノウォールデバイスへの適用を検討した。蛍光基質に 9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one-7-yl)リン酸（DDAO リン酸）を用いた場合に、イムノウォールの内部で局所的な蛍光強度の増大が観察された。この現象を利用し、C-反応

性タンパク質（CRP）を検出限界 2.5 pg/mL で測定することに成功した。従来の蛍光標識抗体を用いた場合のイムノウォールデバイスで得られた CRP の検出限界は 1.7 ng/mL であるため、酵素イムノアッセイの適用により大幅な測定感度の向上に成功した。

第 3 章では、イムノウォール内部での蛍光増大現象のキャラクタリゼーションおよびメカニズムについて述べた。イムノウォールを有するマイクロ流路に蛍光分子溶液のみを導入すると、蛍光分子が拡散によりイムノウォール内部に堆積し、蛍光シグナルが増大されることを明らかにした。また、蛍光シグナルの増幅率と蛍光分子の疎水性に強い相関があることを明らかにし、疎水性相互作用により蛍光分子がイムノウォールに吸着している可能性が示唆された。イムノウォール内部の蛍光強度を用いて、蛍光分子 DDAO の検量線を作成したところ、流路部と比較し約 5 倍の感度で DDAO を定量可能であることを明らかにした。

第 4 章では、マイクロデバイスを用いた簡便・迅速な非競合 FPIA システムの開発について述べた。これまで FPIA で測定が難しかったタンパク質などの高分子を簡便・迅速に測定するため、蛍光標識 Fab フラグメントを用いる非競合 FPIA を開発した。フルオレセイン標識 Fab を用いたコンセプト検証を行い、蛍光標識 Fab とタンパク質の結合前後で予想された偏光度変化が得られることを確認した。また、生体試料中の夾雑物の影響を低減するため、長波長蛍光分子を標識した Fab フラグメントを作製し、非競合 FPIA に用いた。その結果、長波長蛍光標識 Fab をサンプルに混合し、マイクロデバイスで偏光度を測定するのみで、血清中の CRP の測定に成功した。全測定時間は約 15 分であり、ラテラルフロー法などの定性的な測定法と同等の測定時間で、定量的な測定に成功した。

第 5 章では、マイクロデバイスを用いた非競合 FPIA システムの H5 型鳥インフルエンザウイルス（AIV）抗原および抗体検出への応用について述べた。抗原検出には、フルオレセイン標識抗 H5-ヘマグルチニン（H5-HA）Fab フラグメントを用いた非競合 FPIA を開発した。また、抗体検出には、フルオレセイン標識 H5-HA フラグメントを作製することで、抗体を測定対象とする非競合 FPIA を可能とした。その結果、それぞれ 1 種類の試薬を混合し、マイクロデバイスで偏光度を測定するのみで、20 分以内に H5 型 AIV 抗原および抗体の選択的な測定に成功した。

第 6 章では、本論文の総括および本研究の将来性について述べた。開発したマイクロデバイスと蛍光シグナルを用いたイムノアッセイシステムは高感度であり、測定の迅速性、簡易性、低コスト性を兼ね備える。これらの特徴は、在宅医療や感染症予防などの分野で広く貢献すると考える。また、抗体や Fab フラグメントを変更することで、原理的にはどのようなタンパク質にも応用可能である。この特徴は、新たな PONT の活用法を開拓することを可能にし、ニーズが多様化する PONT 分野の発展に貢献できると考える。また、マイクロデバイスにより必要試薬量を従来法と比較し大幅に低減できるため、測定のランニングコストを大幅に削減できる。以上から、本研究の成果は、PONT の応用範囲を拡大し、医療の効率化や公衆衛生の保全に貢献することが大いに期待される。