

論文審査の結果の要旨

氏名： 阪 本 美 里

博士の専攻分野の名称： 博士(理学)

論文題目： 増幅機能を利用するバイオセンシング法の高度化に関する研究

審査委員：(主査) 教授 菅原 正雄

(副査) 教授 橋本 伸哉

(副査) 教授 斎藤 稔

内部に水相を持つ球状の脂質二分子膜はリポソームと呼ばれ、細胞膜と同様の構成であるため人工細胞として生体膜機能の研究に利用されている。内水相にはカチオンやアニオン、高分子など種々の分子を封入できる。また、リポソームの脂質二分子膜表面にも多様な機能を付加することができる。このような特性をもつことから臨床分析などのアッセイの分野でも広く利用されている。リポソームを用いるイムノアッセイもその一つである。一般に、生体内の疾病に関連する分子は極微量でしか存在しないものも多い。それらを計測する際は固相抽出や免疫沈降などの濃縮操作が必要であるが、操作の複雑化や回収率の低下といった課題がある。これらの課題の改善には検出される信号を化学的に増幅することが考えられる。このような背景のもと、申請者は、極微量の分子を定量するため、リポソームをシグナル増幅に利用する高感度イムノアッセイ法の構築を二つのアプローチにより行った。一つは、多重膜リポソームにチャンネルによるシグナル増幅能、免疫凝集および免疫沈降の三つの機能を同時に組み込んだ高機能化リポソームイムノアッセイの構築であり、二つ目は巨大単層リポソーム (GUV) の内水相に蛍光色素を封入してイムノアッセイのマーカーに用いる方法である。

まず、申請者は、チャンネル物質グラミシジンによるシグナル増幅に加え、免疫凝集および免疫沈降の機能を組み込んだ高機能化リポソームを利用するイムノアッセイの構築を行った。申請者は提案した方法を GIPA 法 (gramicidin-incorporated immuno-liposome precipitation assay) と命名している。この方法は、pH 勾配のもと蛍光色素 BCECF を封入したリポソームを溶液中で免疫凝集させ、さらにチャンネル物質グラミシジンを膜中に包埋してガラス基板上に免疫沈降させるものである。それによりアッセイに関与するリポソーム数を増加させ、かつ免疫沈降によりアナライトの濃縮を促進させることができる。その結果、痛覚に関する神経伝達物質であるサブスタンス P に対して検出限界 0.32 pg/mL ($S/N=3$) を達成した。この方法は、これまでに報告されているリポソームアレイよりも約 10^4 倍検出下限が優れている。実際に GIPA 法を用いて、希釈したヒト血清を測定し、健常人の血清中に含まれるサブスタンス P 濃度と同程度なことを示した。この結果は市販されている競合 ELISA 法での定量結果とも一致することを示し、本法の正確さを実証した。また、毒素であるストレプトリジン O の測定も可能であった。通常ストレプトリジン O は感染後に抗体が増加してから抗体量を定量するが、本法では直接抗原を測定できるため感染症の初期において診断に有用であることを示した。

次に申請者は、巨大リポソーム (直径 1000 nm 以上、GUV) は内水相の体積が非常に大きく、単層リポソーム (LUV) の約 1.5×10^6 倍の分子を封入可能なことに着目した。この大きな内水相をイムノアッセイに利用すれば、分析法のシグナルが増幅されてイムノアッセイの高感度化を達成できると考えた。これまで GUV をバイオセンシングに応用した研究は限られた例しかないが、その理由を考察し、レセプターが修飾された GUV と修飾されなかった GUV を分離、回収することが困難な点を挙げた。そのため、申請者は抗体を修飾した GUV を回収する方法を丁寧に検討した。その結果、牛血清抗体 (anti-BSA antibody) を化学修飾した GUV を通常の遠心条件 (14,000 g、30 分間) で行くと、遠心分離後の下層に抗体が修飾された GUV が優先的に存在していることを見出した。この手法では過剰なアミンカップリング剤や未反応の抗体、GUV に封入されなかった色素などは遠心後の回収液中に含まれたままとなるが、申請者は、ガラス基板上で機能化した GUV を固定した後、フロー系で洗浄することでこれらの妨害化合物は除去できることを示した。本法を適応して牛血清 (BSA) の濃度依存性について調べ、 $1.0 \times 10^{-14} \sim 1.0 \times 10^{-12}$ g/mL の範囲で BSA の濃度に依存して蛍光シグナルが上昇することを示し、検出限界 4 fg/mL (10^{-15} g/mL) を得た。また、リポカリン

ファミリーの糖たんぱく質である LCN2 についても BSA と同様に濃度依存性を調べ、検出限界が 80 fg/mL であることを示した。さらに、50000 倍希釈（最終希釈倍率）したヒト血清に応用し、本法による LCN2 の回収率が $106 \pm 30\%$ ($n=3$) であることを示し、実分析に十分応用できることを示した。以上のように、蛍光色素を封入した GUV に抗体を化学修飾し、マーカーとして使用することでイムノアッセイの高感度化に成功した。

以上のように、本申請論文では、シグナル増幅のツールとして蛍光色素を封入した異なるタイプのリポソームを用いることで、極めて高感度なリポソームイムノアッセイを構築できることを実証した。構築したイムノアッセイはいずれも fg/mL (10^{-15} g/mL) レベルの検出限界を有しており、従来のリポソームイムノアッセイや ELISA 法よりもはるかに優れた検出限界である。申請者のアプローチは、今後のイムノアッセイ分野の発展に著しく寄与すると判断できる。

よって本論文は、博士（理学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

平成 28 年 7 月 20 日