

氏名(本籍)	あいざわひでのぶ 愛澤秀信(福島県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第2822号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	水晶振動子と抗体を用いた免疫センサーの開発
主査	筑波大学教授 工学博士 田中秀夫
副査	筑波大学教授 工学博士 松村正利
副査	筑波大学助教授 農学博士 James C. Ogbonna
副査	筑波大学教授 農学博士 前川孝昭

### 論文の内容の要旨

本研究では、水晶振動子と抗体を用いた高感度・高選択的な免疫センサーの開発を目的とし、水晶振動子上に抗体を固定化する固相化免疫測定法、水晶振動子上に抗体を固定化しない水晶振動子式免疫ラテックス凝集測定法を用いた環境汚染物質モデル化合物と疾病マーカーの測定を検討し、その携帯センサーの試作も併せて行った。

C-reactive protein (CRP) は感染症に罹患すると血中に急増する疾病マーカーである。このCRPをモデルに選び、抗CRP抗体及び抗CRP-F(ab')<sub>2</sub>-IgG抗体を水晶振動子上に固定化し、抗原抗体反応による水晶振動子周波数変化よりCRP測定を行い、CRP-F(ab')<sub>2</sub>-IgG抗体を固定化した方が低濃度の固定化量で、CRPを10ng/mL～100pg/mLの広い濃度範囲で検出できた。

環境汚染物質のモデル化合物として用いた2,4-dinitrophenol (DNP) は低分子化合物であるため、水晶振動子による抗原抗体反応の直接測定は困難である。そこで、DNP結合タンパクとDNPとの競争反応を用いてDNP測定を行い、0.1～100ng/mLの広い濃度範囲でDNPを検出できた。また化学的増幅法として抗DNP抗体固定化ラテックスを用いた二回目の抗原抗体反応や電気的増幅法として30MHzの高周波数水晶振動子を用いることで免疫反応で得られる発振周波数変化を各10倍増幅できることを見出した。

抗体(抗原)が固定化された免疫ラテックスと水晶振動子を用いた疾病マーカーの測定を行った。*Treponema pallidum* (TP) 菌体成分固定化ラテックスを用いた水晶振動子の発振周波数の経時変化は、添加した血清中の抗TP抗体濃度に依存性を示した。発振周波数の時間変化は分光光度計の吸光度の時間変化と非常に良い相関を示した。抗Fibrin degradation products (FDP) 抗体固定化ラテックスを用いたFDP測定、及び抗CRP抗体固定化ラテックスを用いたCRP測定においても同様の結果が得られた。Scanning electron microscopeによる水晶振動子の電極表面観察より、添加した血清中の抗原(抗体)量の多い方が電極上に付着した免疫ラテックスの凝集量が増加することから、水晶振動子の発振周波数変化は、抗原(抗体)によって凝集したラテックスが電極表面に吸着することが原因であることが示唆された。水晶振動子の電極表面をPhilanha溶液で洗浄することで、3～9回繰り返し使用できることが示された。

在宅医療用に試作した携帯型CRPセンサーⅠ及びCRPセンサーⅡによるCRP測定では、共に臨床検査でCRP判定に十分な検出感度を持つことを確認した。CRPセンサーⅡでは電池による駆動を可能とし、CRPセンサーⅠよりも小さく、軽量化できた。以上のことよりCRPセンサーは、従来の血液自動分析装置でのCRP測定に代替し得

る簡易測定法であることが示された。

水晶振動子上に抗体を固定化した免疫センサーでは、水晶上への抗体の固定化条件が抗原抗体反応に及ぼす影響を明らかにした。一方、免疫ラテックス凝集反応を利用することで、一度の反応操作で目的の疾病マーカー濃度（血清中の抗TP抗体濃度）を僅か10分で検出できることを示した。免疫反応による水晶発振周波数変化を化学的手法と電気的手法により各々において10倍の周波数変化の増幅が可能であることを示した。本研究成果は、医療診断や環境モニタリングへの応用が可能である。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請論文は、水晶振動子と抗体を用いた高感度・高選択的な免疫センサーの開発を目的とし、水晶振動子上に抗体を固定化する固相化免疫測定法、水晶振動子上に抗体を固定化しない水晶振動子式免疫ラテックス凝集測定法を用いた環境汚染物質モデル化合物と疾病マーカーの測定の検討を行ったものである。すなわち水晶振動子と抗体を用いた免疫センサーの開発における抗体の固定化条件が抗原抗体反応に及ぼす影響について明らかにした。特に免疫ラテックスを用いる手法では、水晶振動子上に抗体を固定化する手法に比べ容易にかつ迅速に目的の疾病マーカーを測定することに成功した。また本手法を用いた携帯型CRPセンサーは臨床検査におけるCRPの検出感度と同等の感度を持ち、従来の手法に代わりうる簡易測定法になることを明らかにした。以上のように、本研究は、抗体の固定化による抗原抗体反応への影響を明らかにし、環境モニタリングや医療診断などへの応用の可能性があり、成果の役割は大きいと判断する。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。