

審査の結果の要旨

氏名 赤間 健司

高感度なタンパク質の計測技術は、生命現象の解明や創薬などのライフサイエンス領域の研究の推進や、先制医療・個別化医療などの新たな医療の実現において、重要な基盤技術となる。従来、試料中のタンパク質バイオマーカーの分析には、酵素による信号増幅を利用した酵素結合免疫吸着法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay、ELISA)が標準法として用いられており、その検出下限は nM から pM であった。一方、1 分子計測技術を応用した Digital ELISA は世界で最も高感度且つロバストな分析技術の一つとして知られており、従来の ELISA と比較して 1000 倍以上の高感度化を実現した。しかし、複数の試薬を添加する工程と検体中の夾雑物質や添加試薬中の未結合の物質を除去するための洗浄工程とを繰り返し実施する必要があり、多数の工程は分析の長時間化やばらつきが増大、さらには自動化や小型化の困難化を引き起こす可能性がある。また、信号増幅に必須の酵素は、同品質での安定供給や長期の安定保存が難しく、品質管理に課題がある。本論文では、ナノ粒子の運動に着目し、洗浄工程、及び酵素による信号増幅工程を含まない新たなデジタル計測技術を提案した。一般に、洗浄工程を必要としないタンパク質の分析法をホモジニアスイムノアッセイと呼ぶ。つまり、本論文ではバイオマーカー測定のためのホモジニアスデジタルイムノアッセイの構築に取り組んだ。本論文の内容は以下の 5 章から構成されている。

第 1 章では、序論として、研究の背景と目的について説明した。バイオマーカーの高感度計測の必要性を述べ、従来の計測技術の高感度化のための課題を議論した。さらに、近年注目されているデジタル計測技術を説明し、その課題を議論した。

第 2 章では、ナノ粒子を用いたホモジニアスデジタル計測技術の原理及びアッセイプロトコルを提案した。具体的には、①ナノ粒子の運動解析に基づくターゲット分子に特異的な信号と非特異的な信号の判別、②フェムトリットルサイズの微小反応場を用いた抗原抗体反応の高効率化、③磁場を用いたターゲット分子の微小反応場内への濃縮技術、の三点を特徴とする分析方法を提案した。続いて、これら三点の要素技術を構築・評価した。①に関して、高速カメラと暗視野顕微鏡を用いた評価の結果、抗原抗体反応後のナノ粒子がその運動によ

って三種類に大別できることを見出し、制限されたブラウン運動を示す粒子がターゲット特異的な信号であることを示した。②に関して、微小空間の形成によって迅速な抗原抗体反応が可能であることを理論計算と実験から証明した。さらに、微小空間の有無を比較し、微小空間の形成によって S/N が大幅に向上することを確認した。③では、フローセル内に均一磁場を発生することで、磁性ナノ粒子の効率的な微小反応場への封入を実現した。評価の結果、従来の自由拡散による封入法と比較して、570 倍もの封入効率を達成した。

第 3 章では、第 2 章で構築した測定系を用いてバイオマーカーの定量のための技術開発を行い、その定量性能を評価した。まず、定量に必要な粒子数を実効的なスループットで撮影するために、フレームレートの抑制、及び暗視野観察から明視野観察への変更による視野サイズの拡大を検討した。続いて、Digital ELISA (Quanterix, SR-X) を参照系とし、本技術の検出下限の評価を行った。前立腺のバイオマーカーである PSA を添加した PBS を測定した結果(純系 PSA 測定)、Digital ELISA に匹敵する検出下限の実現可能性が示された。一方、人血清に添加した PSA を測定した結果(夾雑系 PSA 測定)、Digital ELISA では純系と同程度の検出下限を示したが、本系は検出下限が上昇した。血清中の夾雑物質の影響が原因と考えられ、その抑制が課題であることが明確となった。さらに、特異シグナル向上のためのリアクター内部の抗原抗体反応の改善、微小反応場形成のためのデバイスの品質改善、ナノ粒子の運動解析における各運動の明確な分離、非特異吸着抑制が課題であることを議論した。また、タンパク質だけでなく他のバイオマーカーの定量へのアプリケーション展開を試み、DNA の測定が可能であることを示した。

第 4 章では、バイオマーカーの多項目同時計測の原理検証を行った。PSA 及び IL6 をモデルターゲットとし、2 項目同時検出を検討した。まず、蛍光波長の異なる複数の異なる粒子、及び複数の抗体で修飾した微小反応場を用いたプロトコルを提案した。続いて、粒子の光学的クロストークの影響、及び位置決定精度を議論した。さらに、微小反応場の抗体修飾量の測定値から 2 項目以上の多項目測定に必要な条件を議論した。最後に、PSA と IL6 の同時計測を実施し、単項目測定と同等の検出下限を示した。今後の課題として、非特異吸着の抑制と位置の決定精度向上のための粒子の最適化、光学系の簡易化、抗原抗体の交差反応の抑制、及び撮影の短時間化を抽出した。

第 5 章では、本論文の総括を行った。さらに、本技術を用いた今後の展開に関して議論した。

以上の内容から、本論文が提案した新しい分析手法は、学術的・産業的に大きく貢献し得ると考えられる。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。