

審査の結果の要旨

氏名 シャリフ モイヌル ハサン

本論文は、疾病の診断において重要な低分子バイオマーカーの高感度検出をテーマに、高感度化が期待されるイムノ PCR 法を組換え抗体断片を用いた免疫測定と組み合わせることによる、免疫測定の高感度化に関する検討が述べられており、全部で5章から構成されている。

論文の第1章では、次章以降の内容に関わる研究領域が概観されている。免疫測定法はサンプル中の目的分子を特異的かつ高感度に検出する測定法である。この方法はその高い感度と特異性にも関わらず、簡便迅速に実施でき、比較的安価であることから、生物学の基礎研究、臨床診断さらには環境汚染物質の検出まで幅広い分野で活用されている。一方バイオマーカーとはその検出により特定の疾患あるいはその前兆が判別可能な物質である。今日まで、多くのバイオマーカーが見いだされ、そしてそれらの多くが低分子である。ゆえに本研究では新規免疫測定法による、従来より高感度な低分子量バイオマーカーの検出を第一の目標にし、併せて同様のアプローチによる病原体ウィルス蛋白の検出の試みについても述べられている。

第2章では、ファージ提示法に基づく ELISA とイムノ PCR による、2つの低分子バイオマーカー(オステオカルシンペプチド BGP-C7, エストラジオール E2)の非競合的検出が述べられている。近年、最も一般的な免疫測定法は固相化酵素免疫測定法(ELISA)であり、特に2つの抗体を用いるサンドイッチ ELISA 法は可能な限り好んで使われる方法である。しかし、通常のサンドイッチ ELISA には「2つの抗体結合部位(エピトープ)を持つ多価抗原だけが検出可能」という根本的な限界が存在し、低分子の非競合的検出には適用できない問題があった。この問題を克服するため、筆者らは抗原依存的に強く結合する抗体可変領域断片 V_H (重鎖可変領域)と V_L (軽鎖可変領域)を利用するオープンサンドイッチ(OS)免疫測定法を用いた。具体的には、マイクロプレートに固定したマルトース結合タンパク質(MBP- V_L)と、 V_H 断片を表面に提示する線維状ファージを用いて、2つの低分子バイオマーカー検出への適用が試みられた。すなわち OS ELISA のためには、プレートに V_H 提示ファージと抗原が加えられ、その後西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)標識抗ファージ抗体を用いて検出された。一方 OS イムノ PCR においては、ファージDNAが煮沸によって抽出され、それを定量 PCR 法によって増幅し検出された。この結果、OS イムノ PCR が OS-ELISA をしのぐ

検出限界と検出可能レンジを与えた。すなわち OS-ELISA では 100 pg/ml の BGP-C7 と 10 ng/ml の E2 が検出されたが、OS イムノ PCR では 10 pg/ml の BGP-C7 と 100 pg/ml の E2 がそれぞれ検出された。

第3章では、上の結果をより一般的なタンパク質ベースの方法と比較するため、タンパク質を主成分とする OS-ELISA と、これに対応する OS イムノ PCR の実施結果が述べられている。このため、BGP ペプチド認識 MBP-V_H が発現・精製され、プレートにコートされ、ストレプトアビジン V_L 融合タンパク質 (SA-V_L) が抗原検出のために使われた。ELISA では、抗原と SA-V_L を加えた後に、ビオチン-HRP が検出に使われ、イムノ PCR のためにはビオチン化 DNA がリアルタイム PCR による増幅と定量のために使われた。比較の結果、本章における OS イムノ PCR がファージ系に比べ検出感度の向上を示したことから、これらのアプローチの相違が結果に基づいて論じられている。

第4章では、第3章のアプローチを発展させ、鳥インフルエンザウイルス H5N1 由来 HA タンパク質の検出感度をイムノ PCR 法により高める試みが述べられている。具体的には可溶性一本鎖抗体 (scFv) タンパク構築のためハイブリドーマ細胞からクローニングされた HA 認識抗体 scFv 遺伝子と、SA 遺伝子とを融合し、大腸菌で可溶性発現することに成功したことが述べられている。この SA-scFv を用いて、固定化された HA タンパク質を ELISA とイムノ PCR で検出した所、イムノ PCR が顕著に高い感度を示したことが述べられている。

第5章では、結論と考察が記述されている。本論文は OS-IA とイムノ PCR の利点の融合についての最初の検討であり、ファージ上に提示、あるいはタンパク質と融合された抗体断片により、成功裏に実施された。このシステムは各種診断マーカー・環境汚染物質を含めた多くの低分子の高感度検出に適用されると期待され、さらに同様の技術により各種病原体検出への応用が可能であろうと述べられている。

以上本論文において筆者は、イムノ PCR 法による OS-IA ならびに組換え抗体を用いた免疫測定法の高感度化についていくつかの検討を行い、これらに成功した。その成果は汎用分子認識素子である抗体の蛋白質工学ならびにこれを用いた分析化学の進展に寄与するところ大である。

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。