

審査の結果の要旨

氏名 イスラム カムルン ナハル

本論文は、最近進展の著しい抗体工学的手法を用いて低分子化合物、特に甲状腺疾患の診断に重要なホルモンの一種チロキシン (T4, Mw:776.87) の高感度かつ迅速な検出を目指した研究について述べたものであり、4章より構成されている。

第1章は序論であり、本研究の意義を明確にするために、抗体工学に関する既往の研究を中心に、研究の背景が述べられている。

第2章では、本論文の主題となる抗原濃度に依存した抗体の2個の可変領域 V_H - V_L 間の相互作用変化を利用した免疫測定法であるオープンサンドイッチ法(OS法)による、T4検出系の構築に関して述べられている。従来、免疫測定法としては分子量1000以上の蛋白質を検出するためには主に2種類の抗体を用いるサンドイッチ法が、それ以下の低分子は競合法によって検出が行われてきた。しかし競合法にはその検出感度に抗体の解離定数によって定まる限界が存在し、さらに必要な感度と測定濃度域を得るための条件検討に相当の手間を要するという問題があった。これに対しOS法は、低分子であってもこれを非競合的に検出でき、高感度と広い測定域を得られる特長が知られていた。しかしその反面、これまでは測定系構築のためには確立された抗体産生細胞(ハイブリドーマ)から遺伝子をクローニングするための手間と時間がかかり、さらに得られた抗体断片が必ずしもOS法に最適な性質を持つとは限らないという問題があった。

そこで本章で筆者は、確立されたハイブリドーマでなく抗原コンジュゲートで免疫したマウスの脾臓細胞を材料とし、ここから抗体 V_H/V_L cDNAを増幅しFab断片のファージ提示ライブラリを作製し、抗原に結合する抗体断片提示ファージを選択(パニング)することで迅速に所期の抗体断片を得ることを試みた。免疫原ならびに選択用分子としてそれぞれスカシ貝ヘモシアニンおよびウシ血清アルブミンに結合させたT4分子を用い、新規なファージ提示ベクターを用いて3回にわたるライブラリのパニングを行った結果、2個の特異的クローンが得られ、それらは競合ELISAで5~13 ng/mL (7~19 nM)という低いIC50を示すこ

と、そしてそのうち1個はV_H断片提示ファージを用いたOS免疫測定によりOS法に適した性質を持っていたことが述べられている。また塩基配列から推定されるアミノ酸配列から、測定に適したクローンと適さないクローンとの差についての考察がされ、V_H、V_L両者の配列が重要であるとの結論が得られた。さらに得られた適性クローンを大腸菌マルトース結合蛋白質との融合蛋白質として発現させ、マイクロプレート上でのOS酵素免疫測定(OS-ELISA)系を構築したところ、0.1 ng/mL以下の検出限界LODが得られ、これは競合ELISAによるLOD(>1 ng/mL)を顕著に下回った。さらに血清からエタノール抽出した全T4濃度の検出結果と、類縁体T3に対する十分な選択性も示されており、本手法により臨床診断に応用可能な検出系が構築されたことが示されている。

第3章では、前章で得られたOS法に適した抗体断片を用い、これをマイクロ流路に基づく迅速ELISAシステムの検出素子として用いた結果について述べられている。近年確立されたマイクロ流路を用いたELISAシステムは、従来のELISA系よりはるかに少ないサンプル量と短い反応時間での抗原検出を可能にすることが明らかにされている。そこで、OS-ELISAにおいても同様の効果がみられるかどうか、検討された。反応条件最適化の結果、まずPBS中でマイクロプレートを用いて得られたLODを下回るLODを、少ないサンプル量(3 μ L < 50 μ L)と短い反応時間(20 min < 4 h)で得ることができ、さらにほぼ同等の結果を血清抽出サンプルにおいても得られたことが述べられている。以上の結果より、マイクロELISAとOS法の組み合わせにより、従来より迅速かつ高感度な甲状腺疾患の臨床診断が可能になったことが述べられている。

第4章では研究全体の総括と、今後の展望が述べられている。

以上本論文において筆者は、ファージ提示法による免疫動物からの低分子認識抗体遺伝子のクローニングとスクリーニング、さらにマイクロ流路・検出技術との融合という二つの側面で、抗体工学的手法を応用した高性能な低分子免疫測定系構築法を確立できたと言える。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。