

博士学位論文審査結果の要旨

学位申請者氏名	山崎 朋美		
論文題目	Multicomponent analysis by surface plasmon resonance- based immunosensor for control of food hygiene (食品衛生管理へ向けた表面プラズモン共鳴イムノセンサーによる多成分解析法の開発)		
論文審査担当者	主 査	八田 一	印
	審査委員	川添 禎浩	印
	審査委員	成田 宏史	印

食品の衛生管理のためには迅速・簡便にターゲット分子を同定・定量する事が重要である。表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance) を利用したイムノセンサー (SPR イムノセンサー) は、標識せずに抗原抗体反応を追跡できる免疫化学的測定法であり、迅速な多成分分析を可能にすることから近年注目されている。本研究は、残留農薬と腸管出血性大腸菌に対する SPR イムノセンサーを開発し、さらにこの技術を腫瘍マーカータンパク質の検出に応用したものであり、今後の食品衛生や細胞表面因子の解析に貢献できる技術として大いに期待出来る。以下に本論文の審査結果を要約する。

第1章 3農薬の同時分析

アニリド系殺菌剤ボスカリド、ネオニコチノイド系殺虫剤クロチアニジンおよびニテンピラムは、いずれも国内で汎用されている代表的な農薬である。これらは従来個別に定量されてきたが、殺菌剤と殺虫剤は農作物へ同時に使用されることが多いため、これらの同時分析が求められてきた。そこで申請者は、各々の農薬に対するモノクローナル抗体を作製し、これら3種類の農薬を同時に測定できるマイクロ流路型の SPR イムノセンサーを開発した。できあがった検出系は感度、特異性共に優れ、かつ従来法と高い相関のある結果を示した。本研究によりモノクローナル抗体という生物学的技術と SPR という物理学的技術の合体による多成分同時分析の道が開かれた意義は大きい。実際、現在では本法に端を発し、10農薬の同時分析まで可能となっている。

第2章 腸管出血性大腸菌 O 抗原(10種類)の同時型別

腸管出血性大腸菌は、O 抗原の型別により迅速検査が行われている。現在、検査されている O 抗原は、O26、O103、O111、O121、O145、O157 の6種類であり、9割以上の腸管出血性大腸菌がカバーされる。しかし、他の O 抗原の感染報告も多数あることから、より多種類の O 抗原を同時に型別できる方法が求められていた。そこで申請者は、マイクロチップの使用により細胞レベル

の大きさの多成分同時分析が可能な最新型の SPR イムノセンサーを導入した。ここで開発された方法によれば、合計 10 種類の O 抗原（前述の 6 種類に加えて腸管出血性大腸菌としての報告がある O91、O115、O128、O159）を同時に、いずれも独立して、しかも 1 分以内に型別することが可能である。さらに、ゼラチンゲルの導入により、これまで困難であったセンサーチップの再生にも成功し、100 回以上の繰り返し使用を可能にした。またチップの再生が容易であることから、将来的には完全自動化も可能となった。本結果は、論文発表だけでなく国際特許も出願されている。

第 3 章 開発した大腸菌 O 抗原型別試験法による臨床分離株の試験

本章では上述した測定法について、O45 を加えた合計 11 種類の O 抗原の臨床検査に適用した例が示されている。ヒト便由来腸管出血性大腸菌の臨床分離株（188 株）を用いて SPR 解析を行い、従来法であるスライド凝集法と比較したところ、感度・特異性・検出限界共に同等の分析力を示した。従って、本 SPR イムノセンサーは、臨床の現場で腸管出血性大腸菌の O 抗原血清型別を一斉かつ迅速に行いうる実用的な方法であることが示された。有害成分の分析が自動化されれば、臨床検査自体の安全確保にも有益である。

第 4 章 動物細胞表面の膜タンパク質 c-Kit の検出

更に申請者はマイクロアレイ SPR 法を動物細胞の膜タンパク質の検出に応用した。c-Kit は、チロシンキナーゼ活性をもつ細胞膜受容体で、細胞の増殖・分化・生存・代謝・移動を制御するタンパク質である。また、消化管間質の腫瘍や、セミノーマなどの胚細胞腫瘍、悪性黒色腫、急性骨髄性白血病などで高発現することが知られており、腫瘍マーカーとして重要である。そこで、センサーチップ表面に市販の抗 c-Kit 抗体を固相化し、そこに c-Kit を発現しているヒト巨血芽球性白血病細胞、およびヒト胎児腎細胞の懸濁液を流してみたが、非特異的反応によるバックグラウンドの顕著な上昇のためうまく解析できなかった。しかし、前述の経験を活かして固相化・送液にゼラチンを混合することにより良好な解析が可能となり、更に大腸菌 O 抗原型別試験法で開発した方法と同様にゼラチンゲルを用いたセンサーチップの再生にも成功した。今後多種類の腫瘍マーカーの同時分析が可能となれば、ガン研究やガン診断に多いに資するものと期待できる。

以上のように、本研究は高度な知識・テクニック、既成概念にとらわれない自由な発想に裏打ちされたものであり、基礎から応用に至る広い範囲において今後も実用化、応用展開の期待される十分な成果が得られている。よって審査員一同は、本論文が京都女子大学大学院家政学研究科博士（学術）の学位論文として価値あるものと認めた。