

主 論 文 要 旨

報告番号	甲 ㊦ 第	号	氏 名	尾 曲 健 司
主 論 文 題 名				
Magnetically Promoted Rapid Immunoreactions Using Functionalized Fluorescent Magnetic Beads:A Proof of Principle (高機能性蛍光磁性ビーズを用いた免疫反応の磁性による高速化・高感度化の証明)				
(内 容 の 要 旨)				
疾患関連バイオマーカーを正確かつ迅速に検出することは、診断または病態生理学を理解する上で重要なことである。現法では微量な抗原からのシグナルを増強するために、抗原・抗体反応後に酵素反応やPCR反応などを施し、時間の掛かる増幅反応を行っている。本研究では、磁性体として酸化鉄、蛍光物質としてユーロピウム (Eu) 錯体を選択し、ポリグリジシルメタクリレート (Poly GMA) 製のカプセルに封入した蛍光・磁性ビーズを作製、さらに抗体を固定化し、磁石によって抗原の存在する特定部位に捕集し、抗原・抗体反応に要する時間を短縮し、さらに増幅反応を省略できるかどうかの検証を行った。この磁性ビーズは粒径が140nmであり、ビーズ1個にユーロピウム錯体が約1×10^6個封入されている。また蛍光顕微鏡下ではビーズ1個から検出することができる。この蛍光・磁性ビーズをFF (Fluorescent-Ferrite) ビーズと呼ぶ。 サンドイッチ法によるELISAと免疫組織学検査でFFビーズの有効性の検証を行った。サンドイッチ法では、抗原としてBrain natriuretic peptide (BNP) とprostate-specific antigen (PSA) を用いた。通常の工程と同様に捕獲抗体で固相化したマイクロプレートに、抗原と、抗体を固定化したFFビーズを添加し、プレートの下に磁石を置き、1～2分間集積させ、洗浄後蛍光を測定した。免疫組織学検査では、抗EGFR抗体を条件検討に使用した。EGFR過剰発現細胞株A-431と低発現株H69を用い、ヌードマウス皮下でゼノグラフトモデルを作製し、腫瘍摘出後パラフィン切片とした。通常と同様に、脱パラフィン、抗原賦活、ブロックングの工程を行い、抗EGFR抗体を固定化したビーズを反応させ、切片の下に磁石を置き、1次抗体の反応を10分にて行った。洗浄も磁石を用い、水溶性封入剤で封入して顕微鏡した。条件設定後、臨床検体を用いて精度・確度を従来法と比較した。 磁気捕集時にはBNPを固定化したFFビーズで、1分以内にBNPを用量依存性に検出でき、またその後、飽和状態を確認することができ、反応を高速化・高感度化できた。PSAは、0.02 ng/mLのPSAを5分以内で検出することに成功した。これらの結果を従来法のサンドイッチ法によるELISAと比較した。化学発光EIA (CLEIA) で測定したPSAの濃度とFFビーズでのサンドイッチ法のPSA濃度は、良好な相関関係が得られた。$Y = 0.472 + 0.879x$, $r^2 = 0.953$ 免疫組織染色の磁性による高速化・高感度化において、A-431のゼノグラフトサンプルを用いた検証では、従来法で行ったDABで染色されている部位に一致して、鮮やかな赤い蛍光での発色を確認できた。対照的にH69では、蛍光部位はほとんど認めなかった。次に、乳癌の針生検検体で同様の検討を行った。ゼノグラフトと同様、DABで染色されている部位に一致して従来法との相関を認めた。 抗体を固定化したFFビーズを用いた免疫反応の磁性による高速化・高感度化を立証した。				