

氏 名	カク 郭	シゲ 茂	キ 樹
学位(専攻分野)	博 士	(学 術)	
学 位 記 番 号	博 甲 第 46 号		
学位授与の日付	平成 5 年 11 月 22 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科・専 攻	工芸科学研究科機能科学専攻		
学位論文題目	低温プラズマ技術による新しいタンパク質固定化膜担体の開発 およびそれを用いるアンペロメトリー・酵素免疫測定法の研究		
審 査 委 員	(主査) 教 授 佐 藤 昌 憲		
	教 授 清 原 壽 一	教 授 板 谷 明	教 授 牧 野 圭 祐

論 文 内 容 の 要 旨

低真空下のグロー放電により発生させた水蒸気プラズマの反応で、疎水性の多孔質ポリプロピレンフィルムを親水性に改質し、オクタメチレンジアミンついでグルタルアルデヒドで処理することにより、蛋白質を固定化するための膜状担体を得た。プラズマ処理に際しては、直径 6 mm の孔を一定間隔で 64 個配置したアルミニウム板 2 枚でシートを挟み、孔の部分だけがスポット状に親水性に改質されるようにした。

まず得られたスポット膜の基本的性能を調べるため、広く用いられている酵素の一つであるグルコースオキシダーゼ (GOD) を固定化することを試みた。数種類の固定化方法のうち、加圧浸透法が一番簡便、迅速であり、3 分間で 1 スポット当り 3 ~ 0.3 μg の GOD を固定化できた。各スポットを切り取り、その一つを白金電極の表面に装着し、電流測定法 (アンペロメトリー) でグルコースの酸化反応により生成する過酸化水素の定量を行った。約 0.9 μg 以下のグルコースと電流値とは比例し、スポット膜がセンサーとして有効に機能していることが解かった。

次に本スポット膜の酵素免疫測定法への適用について研究を行った。一つは尿中のアルブミンの定量である。尿試料を希釈することなしに、臨床診断で重要とされるヒト血清アルブミン特にマイクロアルブミン (20 ~ 100 mg/l) の定量を実現する方法について検討した。酵素免疫測定の手法として常用される競合法、サンドイッチ法、逐次飽和法の中では競合法が本法に適していることが解かった。競合法ではまずスポット膜に抗体を固定化した後、抗原を含む尿試料と GOD で標識した抗原の混合溶液 20 μl を膜に滴下し、一定時間静置し反応させた。洗浄後、膜を電極に装着し、一定量のグルコースを含む溶液中で反応させ、生成した過酸化水素量をアンペロメトリーで定量した。

アルブミン定量に関して臨床検査で現在常用されているラジオイムノアッセイ法と本法との相関性は極めて高い。

さらに一層微量の生理活性物質である血清中のインシュリンの定量について検討した。臨床検査に必要とされるインシュリン濃度 (2 ~ 300 $\mu\text{IU/ml}$) を測定するのに適切な量の抗体を効率よく膜に固定化するため、先にスポット膜に抗体の Fc 部と特異的に結合するプロテイン A を固定化しておく方法を用いた。酵素免疫測定には競合法と逐次飽和法を比較検討したが、逐次飽和法の方が競合法よりも感度が高い。プロテイン A および抗インシュリン抗体を膜に固定化後、インシュリンを含む試料と反応させる。膜の洗浄後、さらに既知量の GOD 標識インシュリンと膜を反応させてから電極表面に装着し、一定量のグルコースを含む溶液と反応させ、生成する過酸化水素量を測定する。ヒト正常血清に既知量のインシュリンを添加したモデル血清で定量を行った結果、血清を 3.5 ~ 5 倍に希釈することにより数 $\mu\text{IU/ml}$ の定量が

でき、その感度はラジオイムノアッセイ法と同等であることが解かった。

本研究で開発したスポット膜は分析用の蛋白質固定化担体として有用であり、それを用いることにより、多くの生理活性物質に対する臨床検査のためのアンペロメトリー・酵素免疫測定法を開発できる可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は国際的な分析化学の学会誌に英文で発表された3編の論文（いずれも申請者が筆頭名）を基礎にしている。

申請者の研究目的は、現在、生命関連物質の高感度定量法の一つとして広く用いられている酵素免疫測定法（Enzyme Immunoassay）について一層の高感度化を計るため、新しいシステムを開発することである。この方法は、目的成分あるいはその抗原または抗体に標識となる酵素を結合させ、基質と酵素の反応の結果生成する低分子量の分子、例えば過酸化水素を定量することにより、元の目的成分を定量するものである。本論文では、測定には物質の電解酸化還元に基づく電流測定法（アンペロメトリー）を用いている。

本論文で第一に評価されることは電極表面に装着する機能性膜の設計および作製である。本論文で開発した、疎水性の多孔質高分子膜（ポリプロピレン製）を低温プラズマ処理により親水性に改質する方法は、処理時間の短いことと、ロットごとに多数のスポットに対し均質な処理が可能であることなどに特色がある。得られたスポット状親水性膜を処理することにより、蛋白質、例えば酵素の直接固定化、あるいは抗原もしくは抗体を固定化することができる。その際の試薬濃度、反応方法などを検討することにより、既存の方法よりも処理が迅速で、固定化量の制御が容易な操作手順を確立した。

また、測定上の特色は、従来の機能性膜を用いる化学センサーでは電極と膜の間に保持体を必要とするため、測定値が安定するのに時間がかかるが、本論文の膜では保持体を必要とせず直接電極表面に装着でき、速やかに測定値が安定することである。

さらに多孔性膜の深さ方向に濃度勾配をもたせた機能性基または物質の固定が可能であることを示した。ここで開発された膜は一種の傾斜機能材料として広く用いられる可能性がある。

本測定方法を用い、実際の測定対象として尿中の血清アルブミン、あるいは血清中のインシュリンを、それぞれ選択的に高感度定量を行う方法を創案した。例えば血清中のインシュリンに関しては既存のアンペロメトリー・酵素免疫測定法よりも2桁感度が向上している。本法は現在臨床検査で広く用いられている放射性物質によるラジオイムノアッセイ法と同等な感度を持ち、これらの既存の方法と本法との相関性も極めて高い。

本法は放射性物質を使用せず、また有害物質の発生も伴わない上、装置的にも簡便でベッド・サイドにおける臨床検査に応用できる可能性を持つ有用な測定法である。すでにプロトタイプとして可搬用の小型測定装置も試作している。

現在までに酵素免疫測定法の研究は多く行われているが、いずれも標準物質のみを用いた研究、あるいは原理的な研究に留まっており、本論文では、臨床用の実試料分析に影響する各種の要因についても極めて詳細に検討しているのが特色である。

以上に述べたように、本論文の内容は独創的に富み、新しい原理の機能性膜を製作し、高感度分析法として完成させたことを高く評価できる。

論文審査および最終試験の結果を総合し、学位を授与するに値するとの結論を得た。