



Title	Construction of an ELISA System Based on a pH-Sensitive Field Effect Transistor and Its Application to the Clinical Examinations
Author(s)	鶴田, 仁志
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39802">https://hdl.handle.net/11094/39802</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	鶴 田 仁 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 5 4 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 8 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 基礎工学研究科化学系専攻
学 位 論 文 名	Construction of an ELISA System Based on a pH - Sensitive Field Effect Transistor and Its Application to the Clinical Exami- nations (pH 感応電界効果型トランジスターを用いた生体微量物質測定装置の 構築と臨床検査への応用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 中 戸 義 禮  (副査) 教 授 駒 沢 勲      教 授 松 村 道 雄

### 論 文 内 容 の 要 旨

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, 不均一酵素免疫測定法) は、臨床検査法の一つとして、主に血液中の生体微量物質 (腫瘍関連タンパク, ウイルスなど) の検出を目的に開発されてきた。しかし、従来の ELISA では光学的な検出法が採用され、一連の操作が煩雑となり、測定に時間を要するという問題があった。一方、検出時間を短くできる電気化学的な検出法も研究されてきているが、自動化が難しく、まだ実用化に至っていない。本研究において申請者は、固相にピペットチップ、検出器に pH 感応電界効果型トランジスター (pH-FET) 電極を用い、ピペットチップの内径をごく小さくし、かつ、この内壁に pH-FET 電極を近づけることにより、迅速かつ高感度に生体物質を測定できる実用性の高い ELISA システムを開発した。これにより、タンパクのほか、極微量の遺伝子や細菌の検出が可能となり、実際にこれらの測定に成功した。本論文ではこれらの成果を 4 章にわたって記述した。

第 1 章では ELISA システムの基本原理とシステムの自動化法およびこの微量タンパク検出への応用について述べた。この自動化システムは 1 検体当たり 21 分の処理時間と 60 検体/時間の処理能力を有した。また市販の従来製自動化機器と同様の感度と再現性を有することが示された。

第 2 章では PCR (Polymerase Chain Reaction, 遺伝子増幅法) 産物の検出と定量への応用について述べた。DNA として成人 T 細胞白血病ウイルス遺伝子を選び、増幅 DNA の両端にハプテンが結合した PCR 産物を調製した。その結果、当システムにより 1  $\mu$ l の PCR 産物で 10atto-mole ( $10 \times 10^{-18}$  mole) の DNA を検出できることがわかった。

第 3 章では mRNA の定量への応用について述べた。IL-1  $\beta$  (Interleukin-1  $\beta$ ) mRNA を選択し、内部標準 RNA を用い、Reverse Transcriptase-PCR で増幅した。その結果、 $10^2$ - $10^6$  コピーの mRNA を検出できることが明らかになった。

第 4 章では、これまで最も検査に時間を要するとされている細菌学的検査への応用について述べた。対象菌として *Helicobacter pylori* を選び、この細菌が分泌するウレアーゼをピペットチップ上の抗体でトラップし、pH-FET 電極でウレアーゼ活性を測定した。この結果、細菌学的検査に対し、良好な感度と特異性を有することが判った。

血液などに含まれる生体微量物質の定量的かつ迅速な検出は、正確な病態把握のため、臨床検査において非常に重要である。本論文は、このような生体微量物質の検出時間の短縮化と検出能力の向上を目的として、新しい ELISA（不均一酵素免疫測定法）システムを考案し、その検討を行った結果をまとめたものである。

本論文の ELISA システムの特長は、微小 pH 電極（pH-FET 電極）を検出器に用い、また、極細管の内側に被検生体物質および標識酵素を固定化して、検出器をこの細管内に挿入する構造としたことにある。これによってはじめに高感度かつ迅速な生体微量物質の検出が可能になった。さらにこのシステムでは自動化による一層の効率化がはかられている。まず、このシステムの性能を評価するため、種々の検討が行われた。たとえば、細管の内径と微小 pH 電極の電位変化量との関係が調べられ、内径が 1 mm 以下になると電位変化が急激に大きくなることが明らかにされた。また、被検生体物質および標識酵素を固定するための第 1 および第 2 免疫反応の反応時間が調べられ、これまでの方法では数時間を要していた反応が、0.55mm の細管を用いた場合、5～10 分でほぼ平衡に達することが明らかにされた。さらに、標識酵素（ウレアーゼ）による尿素分解の反応時間が調べられ、pH 電極の電位の初期変化速度をとることにより、数秒のうちに、低濃度から高濃度までの被検生体物質の量が正確に決定できること、また、このシステムがこれまで最も高感度とされていた発光法より高い検出能力（ $0.1 \times 10^{-18} \text{mol}$ ）をもつことが明らかにされている。

以上の性能評価を踏まえ、次に、この新しい ELISA システムの様々な生体微量物質の検出への応用が検討されている。まず、AFP、CEA、HBs Ag 等の抗原や抗体の検出がテストされ、従来法との良好な相関性が得られ、 $0.5 \sim 0.25 \text{ng/ml}$ （ $0.5 \sim 2 \text{pM}$ ）の検出感度を持ち、十分な臨床的感度と特異性を有することが示されている。さらに、成人 T 細胞白血病ウイルス（HTLV-I）遺伝子などの DNA の検出や mRNA の検出について検討され、前者の場合、従来の電気泳動法では数日を要していた検出が、これと同等の検出感度で簡便に行いえることが示されている。さらに、興味あることには、このシステムが *Helicobacter pylori* のような細菌の検出にも応用され、従来の CLO テストより 3 桁高い感度であることが示されている。

以上のように、本論文は、新しい ELISA システムを考案し、被検生体物質および標識酵素の固定化法、細管や微小 pH 電極等の構造などを詳細に検討し、抗原、抗体、遺伝子、細菌の検出について数多くの試験を行い、実用化できる装置にまで完成させている。これらの成果は、実用上重要であるばかりでなく、微量生体物質検出の分野に多くの有用な知見をもたらし、この分野の発展に重要な指針を与えている。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。