OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Design and Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Screening of Monoclonal Antibody based on a Kinetic Model of Antigen-Antibody Interaction
Author(s)	崔, 東煥
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48715
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏　　名	崔（チェ）　東煥（ドン　ファン）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学 位 記 番 号	第　２１６４０　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 12 月 31 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学 位 論 文 名	Design and Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Screening of Monoclonal Antibody based on a Kinetic Model of Antigen-Antibody Interaction （抗原抗体反応の動的モデルに基づいた抗体のスクリーニングと ELISA の設計及び評価）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　塩谷　捨明 （副査） 教　授　清水　　浩　　教　授　仁平　卓也　　教　授　大竹　久夫 教　授　原島　　俊　　教　授　小林　昭雄　　教　授　福井　希一 准教授　大政　健史　　准教授　片倉　啓雄

論 文 内 容 の 要 旨

本研究では必要な感度と精度を持つ酵素免疫測定法（ELISA）を on-demand で設計する方法を開発するため、ELISA における抗原抗体反応の動的モデルを構築し、そのモデルを誤差モデルと組み合わせて、抗体の動特性及び反応条件と ELISA の感度を精度の関係を明らかにしている。そして、感度と精度を実現するために必要な抗体の動特性を求め、その抗体をファージ抗体ライブラリーから効果的にスクリーニングし、設計通り ELISA 構築が可能な合理的な方法を開発した。

競合 ELISA の精度、検出限界（LOD）、定量範囲（ROQ）が予測できる誤差モデルを実験で検証した。６種類の第１抗体固相化競合 ELISA キットにおいて、モデルを用いて予測した精度は実験で求めた精度と良く一致した。さらに、抗体の注入量のバラツキが主な誤差要因であることが明らかにした。このモデルは競合 ELISA の LOD と ROQ の予測に有用であることが証明された。

第１抗体固相化競合 ELISA の動的モデルに基づいて検量線をシミュレーションした。また、予測した検量線と誤差要因の parameter を誤差モデルに代入し、精度、LOD と ROQ を求めた。そして、最適な標識抗原濃度の範囲は非常に狭いという実験則を定量的に表現できた。

第２抗体固相化競合 ELISA の検量線を動的モデルに基づいてシミュレーションし、誤差モデルと組み合わせ、競合 ELISA の精度に及ぼす抗体の動特性の影響について検討した。同じ親和定数（K_A）を持つ抗体でも、k_{on}、k_{off} が共に大きい抗体、大きな分子で標識される抗原を用いた方が LOD の低下が見られた。そして、第１抗体における抗原の k_{on} が低い場合、反応時間の伴って LOD が低くなるが、定量上限は変わらないこと、などを明らかにした。

サンドイッチ ELISA に有効な抗体のスクリーニングするため、固相抗体と標識抗体に必要な動特性をデザインした。即ち、ある洗浄時間において、必要な抗体の k_{off} を求め、期待できる k_{on} の範囲と抗体ライブラリーにおける出現頻度を考慮し、各抗体の望ましい k_{on}、k_{off} を設計した。ファージ抗体ライブラリーのバイオパニングにおける回収

率は、有効抗原濃度（Ag^{tot}）、結合時間（t_b）、洗浄時間（t_w）によって与えられるので、デザインした動特性を持つファージ抗体の回収率が他のファージ抗体の回収率を上回るように Ag^{tot}、t_b 、t_w を設定した。実際、10^9 の多様性を持つ抗体ライブラリーから、４ラウンドまでバイオパニングを行い、設計通り、1×10^4～$3\times10^4\ M^{-1}s^{-1}$ の見かけの k_{on} と 3×10^{-5}～$7\times10^{-5}s^{-1}$ の見かけの k_{off} を持つ４つの scFv が得られた。サンドイッチ ELISA の動的モデルに基づいた検量線のシミュレーションを行い、抗体の組合を予測し、実験によるシミュレーションの検証を行い、動的モデルに基づいた高感度 ELISA の on demand design が可能であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究では必要な感度と精度を持つ酵素免疫測定法（ELISA）を on-demand で設計する方法を開発することであり、そのため、ELISA における抗原抗体反応の動的モデルを構築し、そのモデルを誤差モデルと組み合わせて、抗体の動特性及び反応条件と ELISA の感度を精度の関係を明らかにしている。そして、感度と精度を実現するために必要な抗体の動特性を求め、その抗体をファージ抗体ライブラリーから効果的にスクリーニングし、設計通り ELISA 構築が可能な合理的な方法を開発した。

緒論では、抗体の特性を会合速度定数（k_{on} ）と解離速度定数（k_{off} ）で評価し、ELISA に必要な抗体をデザイン、動的モデルと誤差モデルの融合させ、感度と精度が高い ELISA が構築できることを述べている。

１章では、競合 ELISA の精度、検出限界（LOD）、定量範囲（ROQ）が予測できる誤差モデルを実験で検証した。６種類の第１抗体固相化競合 ELISA キットにおいて、モデルを用いて予測した精度は実験で求めた精度と良く一致した。さらに、抗体の注入量のバラツキが主な誤差要因であることが明らかにした。このモデルは競合 ELISA の LOD と ROQ の予測に有用であることが証明された。

２章では、第１抗体固相化競合 ELISA の動的モデルに基づいて検量線をシミュレーションした。また、予測した検量線と誤差要因の parameter を誤差モデルに代入し、精度、LOD と ROQ を求めた。そして、最適な標識抗原濃度の範囲は非常に狭いという実験則を定量的に表現できた。

３章では、第２抗体固相化競合 ELISA の検量線を動的モデルに基づいてシミュレーションし、誤差モデルと組み合わせ、競合 ELISA の精度に及ぼす抗体の動特性の影響について検討した。同じ親和定数（K_A）を持つ抗体でも、k_{on} 、k_{off} が共に大きい抗体、大きな分子で標識される抗原を用いた方が LOD の低下が見られた。そして、第１抗体における抗原の k_{on} が低い場合、反応時間の伴って LOD が低くなるが、定量上限は変わらないこと、などを明らかにした。

４章では、サンドイッチ ELISA に有効な抗体のスクリーニングするため、固相抗体と標識抗体に必要な動特性をデザインした。即ち、ある洗浄時間において、必要な抗体の k_{off} を求め、期待できる k_{on} の範囲と抗体ライブラリーにおける出現頻度を考慮し、各抗体の望ましい k_{on} 、k_{off} を設計した。ファージ抗体ライブラリーのバイオパニングにおける回収率は、有効抗原濃度（Ag^{tot}）、結合時間（t_b）、洗浄時間（t_w）によって与えられるので、デザインした動特性を持つファージ抗体の回収率が他のファージ抗体の回収率を上回るように Ag^{tot}、t_b 、t_w を設定した。実際、10^9 の多様性を持つ抗体ライブラリーから、４ラウンドまでバイオパニングを行い、設計通り、1×10^4～$3\times10^4\ M^{-1}s^{-1}$ の見かけの k_{on} と 3×10^{-5}～$7\times10^{-5}s^{-1}$ の見かけの k_{off} を持つ４つの scFv が得られた。サンドイッチ ELISA の動的モデルに基づいた検量線のシミュレーションを行い、抗体の組合を予測し、実験によるシミュレーションの検証を行い、動的モデルに基づいた高感度 ELISA の on demand design が可能であることを明らかにした。

以上のように、本論文は抗原抗体反応の動的モデルに基づいた抗体のスクリーニン、ELISA の設計及び評価が迅速にできることに成功した。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。