JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	銀ナノ粒子と電気化学計測法を用いたバイオセンサに関する研究
Author(s)	堀，信康
Citation	
Issue Date	2015-12
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/13010
Rights	
Description	Supervisor:高村　禅，マテリアルサイエンス研究科，博士

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

博士学位論文

銀ナノ粒子と電気化学計測法を用いたバイオセンサに関する研究

指導教官　教授　高村禅

北陸先端科学技術大学院大学
マテリアルサイエンス研究科

2015 年 12 月

堀　信康

Electrochemical Biosensor based on a silver-nanoparticle-labeled sandwich-type metalloimmunoassay

Nobuyasu Hori

Abstract

The electrochemical immunosensor was developed based on a silver-nanoparticle-labeled sandwich-type metalloimmunoassay. After immunoreaction, the quantity of silver nanoparticle captured on the working electrode was measured, as follows. The silver nanoparticles were electrically oxidized to silver ions. The silver ions were electrodeposited on the electrode. The amount of silver was determined using differential pulse voltammetry (DPV). The analytical performances of the immunosensor were evaluated using Hepatitis B surface (HBs) antigen as the model antigen. The detection limit was 0.78 IU mL^{-1} (estimated from three times the standard deviation for 0 IU mL^{-1}).

To fabricate a more sensitive immunosensor based on a silver-nanoparticle-labeled sandwich-type metalloimmunoassay, the dual working electrodes (W1 and W2) in which the area of W1 was one-tenth the total working electrode (W1 and W2) area were developed. After immunoreaction, the quantity of silver nanoparticles captured on W1 and W2 was measured, as follows. The silver nanoparticles were electrically oxidized to silver ions on W1 and W2. The silver ions were electrodeposited on only W1. The amount of silver concentrated on W1 was determined using DPV. Under optimized conditions, the detection limit for HBs antigen was 0.09 IU mL^{-1}, which was nine times lower than the detection limit

using the conventional immunosensor.

To fabricate a more user-friend immunosensor based on a silver-nanoparticle-labeled sandwich-type metalloimmunoassay, a pH-controlled detection solution was developed, which could act as the washing and the detection solution, and reduce the number of steps in the metalloimmunoassay. Using a pH-optimized detection solution, the detection limit for HBs antigen was 0.78 IU mL^{-1}. Although the detection limit was slightly higher compared to the conventional one, the complicated steps such as washing steps using dedicated solutions and drying step were not required. Therefore, the simplified immunosensor is user-friendly and suitable for unskilled users.

Keywords;
Electrochemical biosensor, immunosensor, silver-nanoparticle, metalloimmunoassay, Hepatitis B surface antigen

目次

第 1 章　序論 7

1.1　研究背景 7

1.2　本研究の目的 9

1.3　本論文の構成 10

第 2 章　銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサ 12

2.1　序 12

2.2　電気化学免疫センサの検出原理 12

2.3　電気化学免疫センサの作製方法 15

2.3.1　銀ナノ粒子を用いた標識の作製 15

2.3.2　HBs 抗原検出用免疫センサの作製 15

2.3.3　抗原・抗体反応 16

2.3.4　電気化学反応 16

2.4　条件検討 16

2.4.1　銀ナノ粒子サイズ依存性 17

2.4.2　電解液の検討 18

2.4.3　電気化学測定条件の検討 19

2.5　性能評価結果 21

2.6　考察 21

2.7　結論 22

第 3 章　高感度化への取り組み 23

3.1　序 23

3.2　高感度化に対するコンセプト 23

3.3　新規電極の作製 25

3.4　高感度化に対するコンセプト検証 26

3.5　実験 28

3.5.1　銀ナノ粒子を用いた標識の作製 28

3.5.2　HBs 抗原検出用電気化学免疫センサの作製 28

3.5.3　抗原・抗体反応 29

3.5.4　電気化学測定 29

3.6　電気化学的前処理条件の最適化 29
3.7　従来の電気化学免疫センサとの性能比較 32
3.8　性能評価結果 33
3.9　考察 35
3.10　結論 36
第 4 章　高感度・迅速化への取り組み 37
4.1　序 37
4.2　迅速化に対するコンセプト 37
4.3　新規電極の作製 37
4.4　実験 38
4.4.1　銀ナノ粒子を用いた標識の作製 38
4.4.2　HBs 抗原検出用免疫センサの作製 39
4.4.3　抗原・抗体反応 39
4.4.4　電気化学反応 40
4.5　各電極での性能比較 40
4.6　3 次元拡散方程式を基にした数値シミュレーション 42
4.6.1　数値シミュレーションの作製 42
4.6.2　数値シミュレーションとの比較結果 44
4.7　性能評価結果 47
4.8　理想的な電極構造の設計 48
4.9　考察 51
4.10　結論 52
4.11　数値シミュレーションのプログラム 53
第 5 章　簡易化への取り組み 57
5.1　序 57
5.2　簡易化に対するコンセプト 58
5.3　簡易化に対するコンセプト検証 59
5.4　実験 61
5.3.1　銀ナノ粒子を用いた標識の作製 61
5.3.2　HBs 抗原検出用電気化学免疫センサの作製 62
5.3.3　抗原・抗体反応 62

5.3.4　洗浄液と電解液を兼用した溶液での電気化学測定 62
5.3.5　各材料のゼータ電位及び粒子径の測定 63
5.3.6　銀ナノ粒子標識の非特異吸着量の評価 63
5.5　銀ナノ粒子標識の非特異吸着量の PH 依存性評価 64
5.6　非特異吸着への静電的相互作用の影響 66
5.7　兼用液の最適化 67
5.8　性能評価 68
5.9　考察 69
5.10　結論 70
第 6 章　総括 71
第 7 章　今後の展開 73
第 8 章　参考文献 75
研究業績 80
博士学位論文審査委員 81
謝辞 82

第１章　序論

1.1　研究背景

超高齢化、増え続ける国民医療費など多くの医療問題を抱える日本では、疾病の早期発見や予防、予後の悪化を防ぐ、生活の質（QOL：Quality of Life）を向上させるといった観点から、プライマリケア（Primary Care）が担う役割は、ますます高まってくると予想されている。被験者の傍らで医療従事者が行う検査である POCT（Point of Care Testing または POC 診断）は、迅速、且つ適切な診療・看護を可能とし、疾患の予防や健康増進等に寄与し、ひいては、医療の質や患者の QOL を向上させることができる検査である。ただし、少ない検体量（例えば、SMBG（Self-Monitoring Blood Glucose）のような指先採血で採取可能な数 uL の血液量）で、過酷な環境下（例えば、災害現場や移動車両の中など）で、既存の大型診断装置と同等の感度・特異性を有し、測定結果を出すまでの分析時間が短く、そして、小型で持ち運びが出来、専門性を有した者で（熟練の技術が）なくても、簡単に使用できるシステムが理想的な POCT に必要だと考えられる。POCT は、将来、携帯電話やパソコンと同じくらい共通、且つ必要なシステムになると予想されるほど、将来的に必要不可欠な検査の一つになると期待されている[1, 2]。また、小型の診断装置が実現し、臨床現場でその有用性が認められた後、更なる改良（ユーザビリティや安全性の向上など）が加えられることにより、家庭でも使用可能な診断装置が実現するかもしれない。その場合、日々の健康状態の把握から、疾病の予防や超早期発見できる可能性は更に高まり、QOL を大きく改善できるだろう。また、数年以内に、日本国内においてプライマリケア医が導入され、プライマリケアに対応できる診断装置がますます必要となってくることは言うまでもない。

上記に示した POCT の実現可能性が高い測定原理として、電気化学測定が挙げられる。電気化学測定を測定原理としたバイオセンサは、感度、測定速度、使いやすさといった性能・検出面に加え、測定機自体の小型化が容易であり、そのため持ち運びが可能という大きな強みを有する[3-8]。例えば、実際に家庭や医療現場で、糖尿病患者が使用している SMBG や連続血糖値モニタリング（CGM：Continuous Glucose Monitoring）システムの多くが電気化学測定を測定原理としている。CGM システムでは、測定機が身体に身につ

けられるほど小型なシステムであるし、SMBG で使用する測定装置も携帯電話サイズの持ち運びができる小型な測定機である。小型で持ち運びが出来る診断装置（免疫検査）により、ベッドサイドやクリニックでの診断が可能となるといった従来からのニーズに加え、感染症を早期に見つけ 2 次災害を防ぐ、心疾患を超早期に発見できるなどの潜在的なニーズやその可能性が近年示されている[9, 10]。このため、数多くの小型な免疫測定装置が研究開発され、実際の臨床現場にも導入され始めているが、依然として、感度、特異性などの検出性能面に関して、既存の大型診断装置にはまだ及んでおらず、また装置サイズに関しても、上記の SMBG や CGM ほど小さい訳ではなく、改良の余地が多々存在している。

ただし、例えば、タンパク質を高感度に検出するのは、遺伝子に比べ、非常に困難なことである。遺伝子の検出には PCR（polymerase chain reaction; ポリメラーゼ連鎖反応）と呼ばれるターゲット遺伝子自体を酵素反応で増幅させる技術があるため、理論的には 1 遺伝子の有無を検出できる。タンパク質の検出において、PCR のような増幅方法が無いため、様々な高感度化技術が、近年、研究開発されている。その中でも、ナノ粒子を標識材料（タンパク質の有無を判定）として用いるイムノアッセイ（Metalloimmunoassay）により、タンパク質の超高感度測定が実現できると期待されている[11-34]。これまでに、高村研究グループでは、銀ナノ粒子と電気化学的な前処理法を組み合わせた高感度な電気化学免疫センサを研究開発してきた[35]。銀ナノ粒子は、従来から多々使用されている金ナノ粒子と比べると、電気化学的に酸化しやすく、またタンパク質や遺伝子といった生体分子の固定も簡単に出来るというメリットがある。上記の電気化学免疫センサの測定原理を図 1 に示す。（1）銀ナノ粒子を結合させた 2 次抗体を用いて、サンドイッチ法により、電極上に銀ナノ粒子で標識された免疫複合体を形成する。形成後、洗浄や溶液置換などを行った後、（2）標識である銀ナノ粒子を電気化学的に酸化する。続いて、（3）酸化により生じた銀イオンを還元し、電極上に銀を析出させ、最後に、（4）析出した銀を再び酸化し、その際に流れる酸化電流を信号として測定する。標識として電極上に捕捉された銀ナノ粒子の量と最終的に測定される銀由来の酸化電流値は相関し、つまり、酸化電流を測定することにより、免疫複合体の量、すなわち抗原量を相対的に測定する。本免疫センサの利点の一つとして、測定に使用するサンプル量や試薬量が数μL である

にも関わらず、抗原を高感度に定量測定することが可能な点が挙げられる。しかしながら、微量な検体量で高感度に抗原を定量できると言うものの、その検出性能は、臨床現場（免疫検査）で実際に使用されている測定原理（CLEIA ： Chemical Luminescence Enzyme Immuno Assay または ELISA : Enzyme Labeled Immuno Sorbent Assay）には及んでおらず、また検出フローも現状のままだと CLEIA や ELISA のように煩雑な工程が多く、使用面でも課題が多々存在していた。つまり、POCT を実現させるため、将来的に家庭でも使える診断装置を実現させるために、必要な要素・要件（感度、特異度、ユーザビリティ、安全性の向上など）を満たせるように、本免疫センサの改善・改良や新たな検出方法の導入、新規のマテリアルの創出とその組み合わせなどをしていく必要がある[36]。

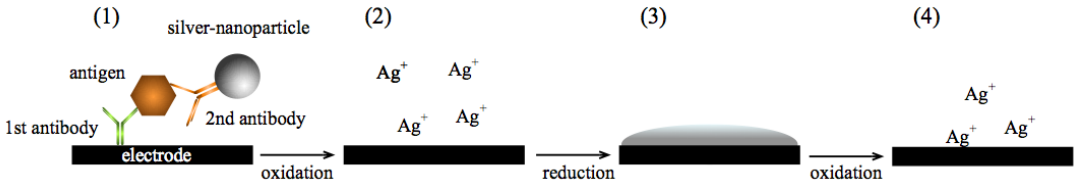

図 1 銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの測定原理の概略図

（1）免疫複合体を形成後、（2）標識として用いている銀ナノ粒子を電気化学的に酸化し、（3）酸化により生じた銀イオンを電極上に還元・析出させ、（4）析出した銀を再び酸化する際に流れる酸化電流値を測定することにより、抗原量を定量する。

1.2 本研究の目的

銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサをベースとして、①本免疫センサを高感度化させ、検出性能を大型装置同等とすること、②本免疫センサの検出フローを簡易化させ、ユーザビリティを向上させること、を目的として、本研究に取り組んだ。

①高感度化に対し、免疫センサに使用する作用電極を大小 2 つの作用電極に分け、最終的に銀を析出させ、且つ酸化電流を測定する作用電極を微小化させることにより、信号を局所に集中させ、且つノイズを抑制する方法を試みた。具体的な方法として、面積比が 1 : 9 である 2 つの作用電極を有した新しい構造のセンサを作製し、これらの上で免疫反応、及び銀ナノ粒子の酸化反応を行う。続いて、銀の還元・析出と電流測定は微小な電極のみで行う。つまり、新しい電極構造に加えて、電気化学的な前処理を工夫することで、2

つの電極上に捕捉された銀ナノ粒子の大半を、微小な電極に集約することができ、2 つの作用電極で銀由来の酸化電流値を測定する場合と比べ、その電流値が下げることなく、測定される。また、電気化学免疫センサにおけるバックグラウンド電流やそのばらつきであるノイズは、サンプル中に含まれる電気化学的な活性物質や、電極上またはその近傍に存在する不純物に由来し、それらの大きさは、作用電極の面積に比例すると考えられる。つまり、高感度化のために、作用電極を大小 2 つの作用電極に分け、酸化電流測定を微小な電極の方で行うことにより、バックグラウンド電流が抑制され、測定装置自体の検出感度を上げることができるため、より微量な信号を精度良く測定することが出来るようになる。また、ノイズも抑制されるため、抗原由来の微量なシグナルとノイズを明確に切り分けることも出来るようになると考えられる。つまり、従来の免疫センサに比べ、低濃度の抗原に対して得られる微量なシグナルを高精度で定量測定できるようになるため、高感度化が期待できる。

②簡易化に対し、従来の検出フロー・検出条件では、電極上での抗原の捕捉、及び銀ナノ粒子による免疫複合体の標識後に、捕捉されなかった抗原や銀ナノ粒子を専用液で洗浄する（B/F 分離）工程が必要となる。更に、洗浄後に電気化学測定を行うために必要な電解液をセンサ上に滴下し、そして、電気化学測定を行い、抗原を定量する。電解液には特殊な水溶液を使っているわけではないので、例えば、洗浄にも使え、且つ電気化学測定にも使える水溶液が作製できれば、専用の洗浄液の準備や溶液置換などの煩雑な工程を省くことが出来ると考えらえる。つまり、専用の洗浄液が必要のなくなるため（洗浄液用のボトルを設置する必要がないため）、装置全体としても小型化が可能となり、また電極上に滴下した検体の除去、洗浄液への溶液置換、及び洗浄液の除去、電極の乾燥工程、電解液への溶液置換といった煩雑な工程を省くことができ、ユーザビリティの向上が期待できる。

1.3 本論文の構成

本論文では、本章の序論を初めとし、以下 2 章では、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの検出原理、条件検討結果、実際に臨床現場の免疫検査（スクリーニング検査）で使用されている HBs 抗原（Hepatitis B surface antigen）をモデルターゲットとして評価した本免疫センサの検出性能の結果

を説明する。性能評価結果より生じた課題点や改善点も合わせて説明する。第 3 章では、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの高感度化を目的として取り組んだ研究内容に関して説明する。新しい構造の電極を作製し、高感度化に対するコンセプト検証、及び新しい構造の電極を用いた免疫センサの性能評価を行っている。第 4 章では、第 3 章で新たに作製した電極を更に改良することにより、分析時間の短時間化（迅速化）を目指して取り組んだ研究内容に関して説明する。3 次元拡散方程式を基本骨格とした数値シミュレーションと実際の実験結果の比較を行い、また、数値シミュレーションを用いて、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサを更に高感度化、迅速化させられる理想的な電極構造の設計も行った。第 5 章では、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサにおける検出フローを見直し、検出フローを簡易化させる取り組みを行った。銀ナノ粒子の非特異吸着量の pH 依存性の評価や洗浄液と電解液を兼用できる水溶液の開発により、検出フローが簡易化され、また専用の洗浄液を必要としない免疫センサが開発された。最後に、総括として本研究の結論をまとめ、今後の展開・展望についてまとめる。

第 2 章　銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサ

2.1 序

近年、治療開始までの時間を短くする、治療効果を高める、疾患の早期発見を行うために、患者のベッドサイドやクリニックで行われる POCT（Point of Care Testing または POC 診断）に注目が集まっている。ただし、ELISA や CLEIA といった従来の測定原理（既存の大型診断装置に採用）では、測定装置を小型化する、持ち運びが出来るようにするのは難しく、また測定には熟練の技術が必要となる[1-8]。

電気化学測定を原理としたバイオセンサの主なメリットは測定機を小型化でき（例:腕時計や名刺サイズ）、また感度や特異度といった検出性能面では、他の検出原理（光、磁気、力など）と同等またはそれ以上の性能を有している。本研究では、高村研究グループで開発された銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサ[35]に注目し、本免疫センサの臨床有用性を評価し、課題点や改良点の抽出を行った。本免疫センサでは、必要な検体量・試薬量が数μL と非常に少なく、POC 診断に適していると考えられる。本免疫センサの臨床有用性を検証するために、HBs 抗原をターゲット抗原のモデルとして選択した。B 型肝炎は、世界的に重大な感染症であり、臨床現場では、HBs 抗原（Hepatitis B surface antigen ; 表面抗原）の定量測定により、B 型肝炎ウイルスの存在有無のスクリーニングを行っている[37-39]。つまり、HBs 抗原に対して、本免疫センサが既存の診断装置と同等性能を有するならば、現状の構成で臨床有用が十分に高いと言え、また、熟練した技術を必要とせずに HBs 抗原を定量測定することが出来れば、本免疫センサにより、POC 診断を実現することが出来ると考えられる。

2.2 電気化学免疫センサの検出原理

銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの測定原理を図 1 に示す。1 次抗体を固定した電極上に、抗原・抗体反応を介して、抗原を捕捉し、また 2 次抗体を固定した銀ナノ粒子を用いて、サンドイッチ形式で電極上で形成された免疫複合体を標識する（図 1－（1））。次に、捕捉した銀ナノ粒子を電気化学的に酸化する（図 1－（2））。続いて、酸化した銀イオンを電極上に電解析出（還元）し（図 1－（3））、最後に、析出した銀を再度酸化させ、その際に

流れる酸化電流を測定する（図１−（４））。電極上に捕捉した抗原の量と標識の銀ナノ粒子の量は相関し、また銀ナノ粒子の量と最終的に測定する酸化電流は相関するため、最終的に測定する（銀由来の）酸化電流値は、間接的に抗原量と相関する。つまり、本測定原理により、検体中に含まれる抗原を定量することが出来る。実際に DPV（Differential Pulse Voltammetry；微分パルスボルタンメトリー）により測定した際の酸化電流波形を図 2 に示す。非常にシャープな銀由来の酸化ピーク電流が測定され、この酸化ピーク電流値（ピーク値からベースラインを引いた電流値）を、免疫センサの信号としている。図 2 から分かるように、非常にシャープなピークのため、夾雑物に由来したノイズが銀由来の電流値を阻害することもなく、銀に対する選択性が非常に高い測定である。

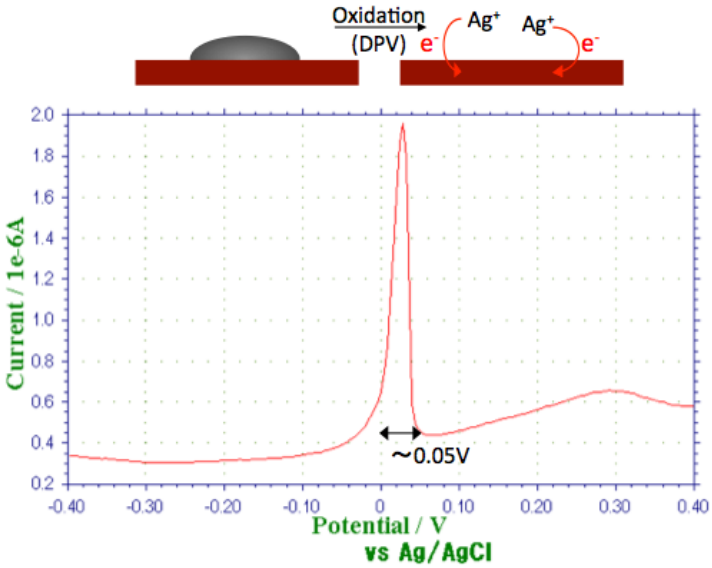

図 2　DPV により測定される酸化電流波形

銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの測定原理（図１）に従って、測定された酸化電流波形：非常にシャープな銀由来のピーク電流が測定されているのが分かる。また、本免疫センサの信号としては、ピーク電流値からベースライン電流値を引いた値としている。

また、本測定原理を高感度にしているのは、以下二つの原理が本免疫センサでは採用されているからである。一つ目は、最終的な酸化電流値の測定を DPV で行っている点、二つ目は金属イオンの高感度な検出方法である ASV（Anodic Stripping Voltammetry）が前処理の基本となっている点である。DPV は、図 3 に示すように、作用電極に電圧を印加し、一定時間後に印加す

る電圧を下げ、一定時間後に電圧を上げ、そして下げと繰り返し、電圧を下げる前に流れていた電流値から一定時間後に電圧を上げる前に流れた電流値を引いた電流値を信号としている。このため、電圧を上げ・下げに起因した充電電流（ノイズ成分）の影響を受けにくいため、高感度な電気化学測定法である。ASV は、金属イオンを一度電極上に還元・析出させ、続いて、析出し金属を酸化させる際に流れる電流値を信号とする。つまり、溶液中に存在する金属イオンを電極上濃縮（析出）しているため、高感度に金属イオンを検出できる手法である。本測定原理では、図１−（４）のシグナル測定に DPV が採用され、また図１−（３）から（４）の工程が ASV となっている[40]。

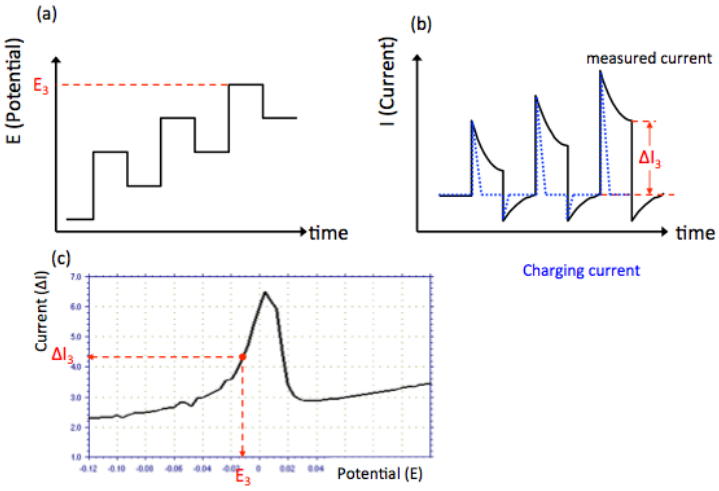

図 3 微分パルスボルタンメトリー（DPV）の原理図

DPV では、(a)に示すようなステップの上げ下げを繰り返した方式で電圧を作用電極に印加する。その時、作用電極には(b)に示す電流が流れるが、DPV で測定される電流値（実際に測定結果として表示される(c)）のは、電流値の差分（(b)の ΔI_3）である。つまり、電圧の上げ下げした瞬間に流れる充電電流（イオンの拡散に由来した電流であり、ノイズ成分となる）の影響を受けにくい測定となっている。

図 4　アノーディックストリッピングボルタンメトリー（ASV）の概略図

金属イオンを高感度に検出できる電気化学測定方法として開発された ASV の測定原理；溶液中に存在する金属イオンを、電極上で還元し、濃縮するため、最終的に得られる電流値は、非常に大きな値を示す。

2.3 電気化学免疫センサの作製方法

本免疫センサの構成は、1 次 HBs 抗体を固定した電極、HBs 抗原を含んだサンプル（検体）、2 次 HBs 抗体を固定した銀ナノ粒子から成る。以下に、HBs 抗原の検出に必要な材料の作製方法、及び検出工程を示す。

2.3.1 銀ナノ粒子を用いた標識の作製

2 次 HBs 抗体を固定した銀ナノ粒子（銀ナノ粒子標識）は、以下のように作製した。銀ナノ粒子（直径 40nm, または 60 nm；シグマアルドリッチ）を含んだ水溶液 900 μL に、1.0 M の塩酸を加え、pH を 7.0 に調整した。pH を調整した銀ナノ粒子の水溶液に、2 次 HBs 抗体濃度（シスメックス株式会社）が 100 μg mL^{-1} になるようにリン酸緩衝液を用いて調整し、100 μL を添加した。更に、銀ナノ粒子標識のチューブへの非特異的な吸着を抑制するために、10 % (w/v) Tween 20（ナカライテスク株式会社）を 10.1 μL 添加した。その後、室温にて 60 分間静置した。静置後、混合溶液に 1% (w/v) BSA を含んだ TBS-T（トリス緩衝食塩水に 0.1% Tween20 を混合した水溶液）を 400 μL を添加し、BSA により 2 次抗体が固定されずに露出している銀ナノ粒子表面をブロッキングした。その後、混合溶液を遠心処理（x7000g, 4℃, 25 分）し、銀ナノ粒子に固定されなかった 2 次抗体や BSA が含まれる上澄み液を除去した。1% BSA / TBS-T を 1mL 添加し、銀ナノ粒子標識を再度分散させた後、遠心処理を行い、上澄み液を除去した。この操作を更に 2 回繰り返し、チューブ内から未結合の抗体を除去した。最後の操作では、保存液として、1% BSA / TBS-T ではなく、1% BSA / PBS-T (1% (w/v) BSA と 0.01% Tween 20 を含んだリン酸緩衝生理食塩水)を 200 μL 加え、以下の HBs 抗原の検出に利用した。

2.3.2 HBs 抗原検出用免疫センサの作製

カーボンスクリーン印刷電極（DEP-Chip : 有限会社バイオデバイステクノロジー）を電気化学免疫センサの電極として使用した。DEP-Chip は、カーボン作用電極、カーボン対向電極、銀／塩化銀参照電極から構成される 3 極系の電極チップである。作用電極上に、1 次 HBs 抗体（銀ナノ粒子に固定した 2 次 HBs 抗体とは HBs 抗原の異なる箇所（エピトープ）を認識する）濃度が 100 μg mL^{-1} になるように pH 8.5 の炭酸緩衝液で調整し、3 μL を電極

上に滴下し、室温、高湿度下で 2 時間静置させ、1 次 HBs 抗体を電極上に固定した。固定後、未結合の 1 次抗体が含まれた溶液を除去し、PBS で電極上を洗浄した。その後、3% (w/v) BSA と 5% PEG（分子量：20,000 ）を含んだ PBS を 4 μL 滴下し、4℃、高湿度下で一晩静置し、1 次抗体が固定されずに露出したカーボン電極表面をブロッキングした。その後、ブロッキング溶液を除去し、PBS で洗浄した。

2.3.3　抗原・抗体反応

HBs 抗原のキャリブレータ（シスメックス株式会社）2500 IU mL^{-1} をウシ胎児血清（FBS）で希釈し、目的濃度の HBs 抗原／FBS を作製し、モデル検体（HBs 抗原／FBS）を得た。作製した各濃度の HBs 抗原／FBS 2 μL と上記 2.3.1 で作製した銀ナノ粒子標識 2μL を混合し、作用電橋上に滴下し、室温、高湿度下で 90 分間静置した。抗原・抗体反応後、作用電極上の反応溶液を除去し、PBS で洗浄した後、更に MilliQ を用いて洗浄した。最後に、電極はブロアーを用いて乾燥させた。

2.3.4　電気化学反応

0.03 M の塩酸または塩酸に塩化ナトリウムや塩化カリウム、塩化リチウムを添加した水溶液を電解液として用意した。電極をポテンショスタットに接続し、上記で用意した電解液を 20 μL 対向電極、作用電極、参照電極を覆うように、滴下した。そして、作用電極に、酸化電圧（1.8～2.4V）を目的時間印加した。続いて、作用電極に、還元電圧（−0.8V～−1.2V）を目的時間印加した。最後に、微分パルスボルタンメトリーにより、作用電極-対向電極間に流れる酸化電流を測定した。微分パルスボルタンメトリーの測定条件は、−0.4V から 0.4V をステップ幅 4mV、パルス幅 50mV、パルス時間 0.2 秒で電位走査している。

2.4 条件検討

本研究では、銀由来のピーク電流値に影響を及ぼす要素として、銀ナノ粒子のサイズ、電解液の組成、電気化学的な前処理（酸化・還元）の各条件検討を行い、その後、本免疫センサの性能評価を行っている。

2.4.1　銀ナノ粒子サイズ依存性

銀ナノ粒子のサイズ（直径）は、最終的に測定する銀由来の酸化ピーク電流値に直接的に大きな影響を与えると考えらえる。例えば、直径 20 nm の一つの銀ナノ粒子から得られる電流値と直径 40 nm の一つの銀ナノ粒子から得らえる電流値を比較すると、40nm の銀ナノ粒子から得らえる電流値が 8 倍大きくなると予想される。銀ナノ粒子を構成する銀原子の数が体積（半径の 3 乗）に比例するためである。第一に、本測定原理において、上記に示した理論的な効果が得られるのかを以下の実験により検証した。直径が 20nm の銀ナノ粒子（個数：9.0×10^{10}）を固定した電極と直径が 40nm の銀ナノ粒子（個数：11.2×10^{10}）を固定した電極を用意した。銀ナノ粒子を含んだ水溶液を電極上に滴下し、その水溶液を蒸発させることにより、銀ナノ粒子を電極上に固定した。各電極に 0.1 M HCl を滴下し、作用電極に 1.8V の酸化電圧を 30 秒間印加し、続いて、−0.8V の還元電圧を作用電極に 60 秒間印加し、DPV により酸化電流を測定した。図 5 に示したように、銀ナノ粒子のサイズ（銀ナノ粒子を構成する銀原子の数）に応じた酸化ピーク電流値が測定された。つまり、免疫センサに使用する銀ナノ粒子のサイズを大きくすることで、検出性能を向上させられる可能性がある。そのため、直径が 40nm または 60nm の銀ナノ粒子に比較に関しては、銀ナノ粒子上に 2 次 HBs 抗体を固定した直径が異なる銀ナノ粒子標識を用いて、実際の HBs 抗原の検出においても同様に、シグナルに差が出るのかを検討した。図 6 に示したように、実際の免疫センサにおいても、銀ナノ粒子のサイズを増大させることにより、シグナルが増大する効果が確認された。また、理論値と同様の増大効果があることも示された。本結果より、以下の検討においては、直径 60nm の銀ナノ粒子を用いた。

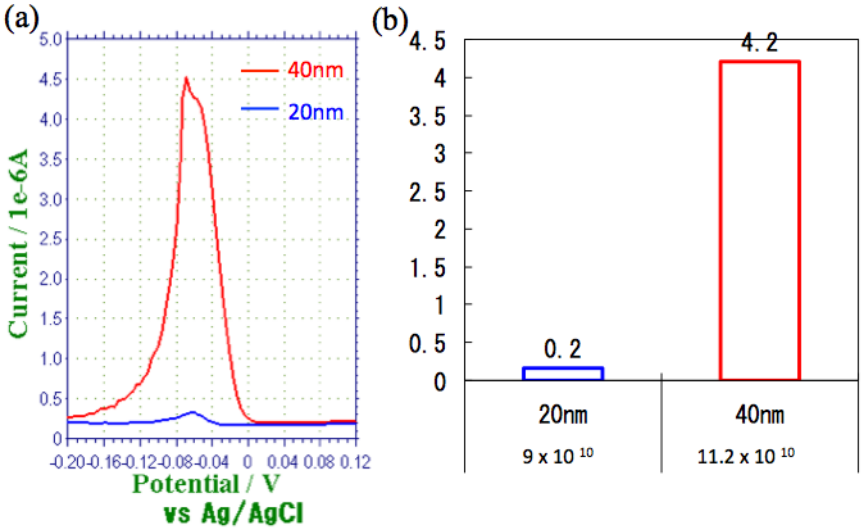

図 5 銀ナノ粒子サイズ依存性の評価 1

直径 20nm の銀ナノ粒子を 9.0×10^{10} を固定した電極（青）と直径 40nm の銀ナノ粒子を 11.2 $\times10^{10}$ を固定した電極（赤）を用いて測定された(a)酸化電流波形と(b)酸化ピーク電流値である。

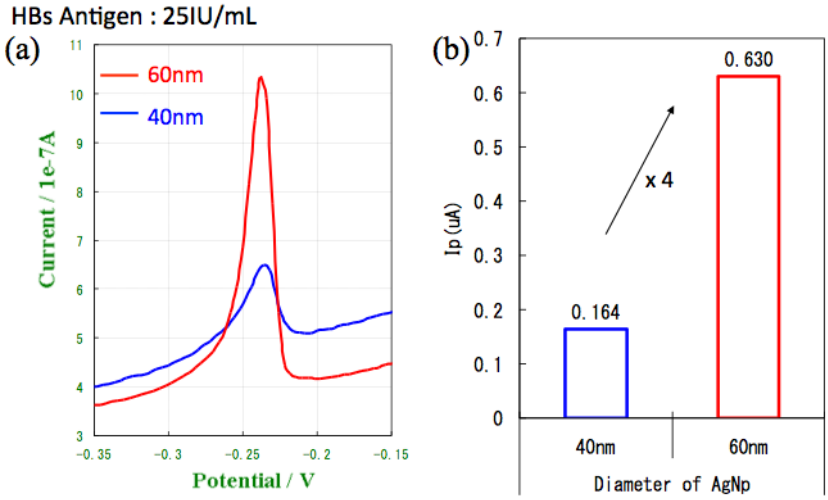

図 6　銀ナノ粒子サイズ依存性の評価 2

HBs 抗原存在下で免疫複合体を形成後、直径 40nm または 60nm の銀ナノ粒子を用いて、サンドイッチ形式により免疫複合体を標識した。その後、作用電極に 1.8V を 30 秒印加し、銀ナノ粒子を酸化した後、酸化された銀イオンを電極に−0.8V を 60 秒印加することで還元し、最後に DPV 測定した際の(a)酸化電流波形、(b)ピーク酸化電流値である。

2.4.2　電解液の検討

銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサにおいて、電解液の組成・濃度が

最終的に得られる銀由来の酸化ピーク電流値にどのように影響を与えるのかを調査した。先行の研究より、電解液中に塩化物イオンが存在していることが、シャープなピーク酸化電流に関与していることが示され、塩酸をベースとした水溶液が電解液として使用されている[35]。本検討では、塩化物イオン以外に寄与している要因（陽イオンの種類、その濃度）を調査した。今回の検討では、0.05M の塩酸に 0.05M の塩化ナトリウムまたは 0.03M の塩化カリウム、0.03M の塩化リチウムを加えた場合の各電解液での酸化ピーク電流値の比較を行った。結果、0.05M の塩化ナトリウムを加えた場合に酸化ピーク電流値が微増する結果が得られた。ただし、塩酸のみの電解液に比べ、大きな電流値増幅効果がなかったため、以後は、塩酸を用いた評価を行っている（ただし、第 5 章に示した簡易化への取り組みでは、塩酸を用いることができなかったため、塩化ナトリウム水溶液をベースとした水溶液を使用している）。

2.4.3　電気化学測定条件の検討

銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサでは、抗原・抗体反応を介して電極上に捕捉した銀ナノ粒子を、電気化学的に酸化し、次に、酸化した銀イオンを電気化学的に還元する、といった電気化学的な前処理を行う。先行研究では、前処理条件が最終的に測定される銀由来の酸化ピーク電流値に大きく影響を与えることが確認されている[35]。使用している銀ナノ粒子サイズやターゲット分子サイズなどが異なるため、本研究においても、電気化学的な前処理条件と酸化ピーク電流の関係を評価した。HBs 抗原存在下（25 IU mL^{-1}）にて、免疫複合体を形成後、電極上に捕捉された銀ナノ粒子を 1.8V を 30 秒間印加し、続いて、各還元条件で酸化された銀イオンを電気化学的に電教区上に析出させ、最後に、DPV により酸化電流を測定した。還元電位は、−0.8V に比べ、−1.0V や−1.2V で大きな酸化ピーク電流値が得られた（図 7-a）。また、−1.2V の還元電位を印加した場合、大きな酸化ピーク電流値は得られたが、還元電位が低すぎ、水の電気分解が起こり、気泡が発生したため、本系では−1.0V を最適な還元電位とした（図 7-b）。また、還元時間は図 7-a から、還元時間 140 秒以降では、酸化ピーク電流値は飽和しており、最適な還元時間は 140 秒とした。同様に、酸化電位を検討した。HBs 抗原存在下（25 IU mL^{-1}）で免疫複合体を形成後、電極上に捕捉された銀ナノ粒子を各酸化電

位で 30 秒間酸化し、続いて、-1.0V を 140 秒間作用電極に印加し、酸化された銀イオンを電気化学的に電極上に析出させ、最後に、DPV により酸化電流を測定した。結果、1.8V や 2.4V に比べ、酸化電圧が 2.1V の場合、酸化ピーク電流値が最大になることを確認した（図 8）。このため、本免疫センサでの最適な前処理条件は、酸化条件が 2.1V を 30 秒間、還元条件が−1.0V を 140 秒間が設定された。

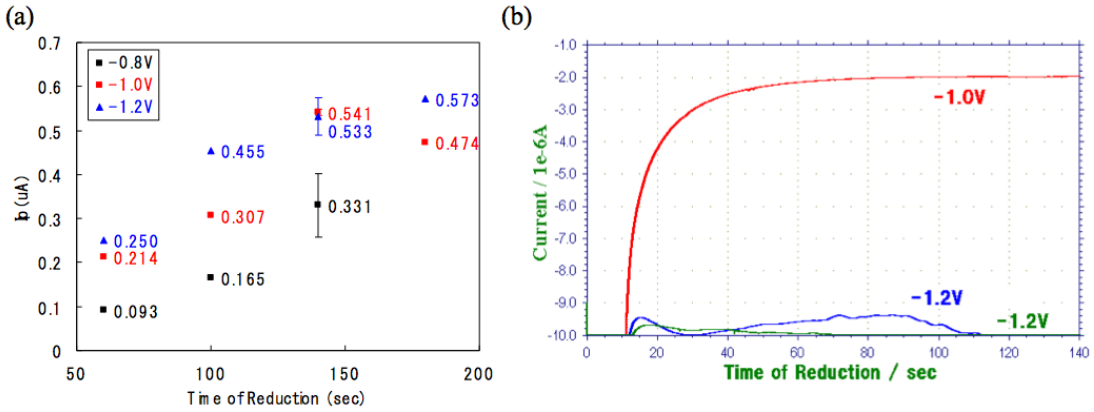

図 7 還元条件依存性

(a) 25 IU mL⁻¹HBs 抗原を用いて、免疫複合体を形成後、1.8V を 30 秒間作用電極に印加し、その後、還元電位を−0.8V(黒)または−1.0V(赤)、−1.2V(青)を各還元時間（60～180 秒間）印加し、その後、DPV により測定された酸化ピーク電流値の還元時間依存性。(b) −1.0V または−1.2V の還元電位で還元している際に作用電極に流れる電流波形

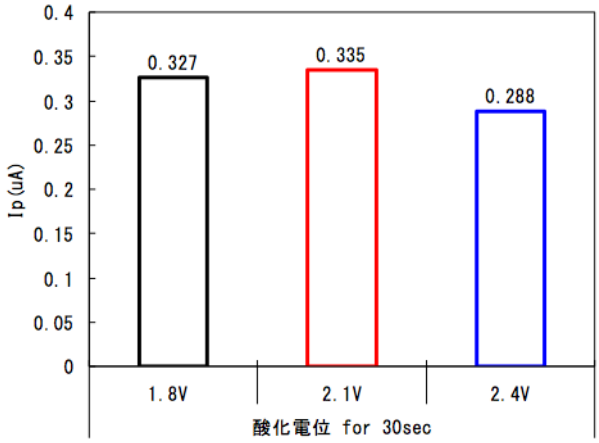

図 8 酸化電位依存性

(a) 25 IU mL⁻¹HBs 抗原を用いて、免疫複合体を形成後、1.8V または 2.1V、2.4V を 30 秒間作用電極に印加し、その後、還元電位を−1.0V を 140 秒間印加し、最後に、DPV により測定された酸化ピーク電流値の酸化電位依存性。

2.5 性能評価結果

上記の条件検討により選択された銀ナノ粒子（直径 60nm）、電解液（0.03M 塩酸）、前処理条件（2.1V を 30 秒間、−1.0V を 140 秒間）を使い、本免疫センサの検出性能を評価した。HBs 抗原を FBS（ウシ胎児血清）に添加し、モデル検体とした。実際に得られた酸化電流波形と HBs 抗原に対する検量線を図 9 に示す。HBs 抗原に対する検出限界は、0.78 IU mL^{-1} であった（ブランクサンプル（0 IU mL^{-1}）に対する電流値 ± 3 標準偏差より算出した）。検量線は、HBs 抗原の濃度に依存したものとなっており、本免疫センサを用いて、HBs 抗原の定量が可能であることが確認された。

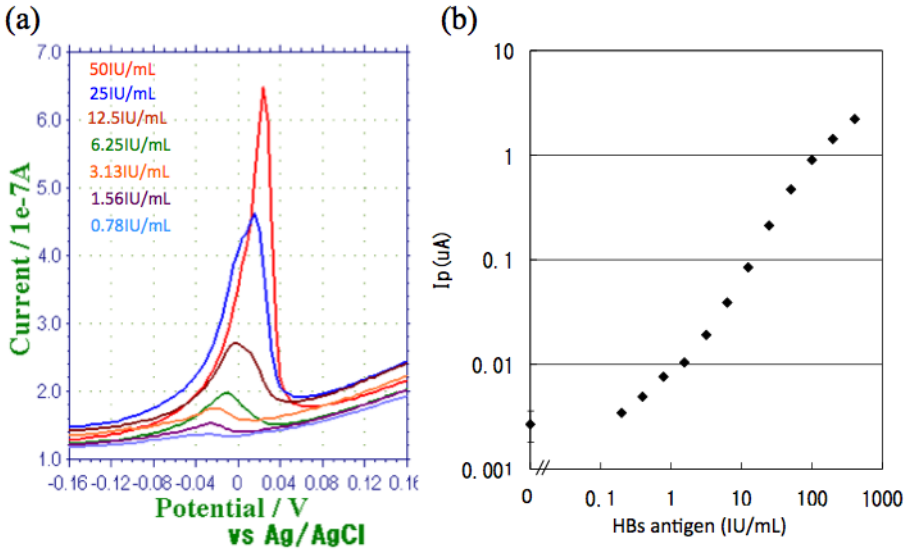

図 9 HBs 抗原に対する測定結果と検量線

0〜200 IU mL^{-1} の HBs 抗原存在下で抗原・抗体反応を介して、電極上に免疫複合体を銀ナノ粒子（直径：60nm）で標識し、電極上の銀ナノ粒子を 1.8V を 30 秒間電極に印加することで酸化し、続いて、−1.0V を 140 秒間電極に印加し銀を電極上に析出させ、最後に、DPV により測定された(a)酸化電流波形、(b)酸化ピーク電流値。

2.6 考察

本研究では、銀ナノ粒子サイズ依存性、電解液の組成・濃度、電気化学的な前処理条件、そして銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの基本性能を評価した。本研究で検討した項目全てが、最終的な性能に影響を及ぼすことが確認された。ただし、銀ナノ粒子のサイズは、60nm 以上大きくすると（例：100 nm）、銀ナノ粒子自体が沈降・沈殿してしまい、標識としての使用が難

しく、また電解液の組成・濃度の組み合わせは無限にあり、どの因子が独立して本免疫センサの検出性能に寄与するのか判断できないため、実験的に最適化するのが難しいことも、本研究を通して分かった。本免疫センサの検出性能を向上させ、大型診断装置と同等の性能にするためにも、新たな高感度化の方法・考え方が必要となる。また、POCT への適用を考えると、本免疫センサの検出フローが、従来の ELISA や CLEIA とほぼ同様の検出フローではあるため煩雑であり、より簡単に改良していく必要があることも確認された。ただし、改良前の段階で、今回評価した検出性能ならば、本免疫センサを臨床的に有用性があるセンサへ研究開発していく、性能を向上させていくことは可能であると考えらえる。

2.7 結論

本研究では、実際に臨床現場の免疫スクリーニング検査で使用されている HBs 抗原をモデルターゲットとして、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの性能を評価した。また、性能に影響を及ぼす要因として、銀ナノ粒子のサイズ、電解液の濃度・組成、及び電気化学的な前処理条件の各検討を行い、選択・最適化を行った。本免疫センサを用いて HBs 抗原を検出した場合、検出限界値が 0.78 IU mL^{-1} であり、既存の大型診断装置と比べると、一桁程度及ばない結果であった。また測定原理が電気化学測定であるため、測定機を小型化させることは可能であるが、抗原・抗体反応後に洗浄を行う必要があること、そのための洗浄液を用意・使用する必要があること、など検出フローが煩雑であり、少し使いにくい免疫センサとなっている。つまり、実際の臨床現場や POCT に適用するためには、①本免疫センサの検出感度・検出性能を向上させる、②検出フローを簡易化させ、ユーザビリティを向上させる必要があることが分かった。以下第 3 章から第 5 章では、本章での検討により抽出された課題に対して取り組んだ研究内容である。

第３章　高感度化への取り組み

3.1 序

銀ナノ粒子と電気化学的な前処理法を組み合わせた電気化学免疫センサを作製し、実際に臨床現場で使用されている検査項目の一つである HBs 抗原をモデルターゲットとして、その検出性能を評価した。しかし、現在、免疫検査で用いられている測定原理である CLEIA（Chemical Luminescence Enzyme Immuno Assay）と比べると 10～20 倍、ELISA（Enzyme Labeled Immuno Sorbent Assay）と比べると 2～4 倍、検出感度が劣っていた。そのため、本章では、本免疫センサで使用する作用電極の構造を改良し、高感度化させることを目的とし、研究に取り組んだ。本章の一部は、Electrochemica Acta（174 (2015) 799–805）に投稿した研究内容である[41]。

3.2 高感度化に対するコンセプト

銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサを高感度化させるコンセプトを以下に説明する。本センサに使用する作用電極には、大小 2 つの作用電極を使用する（以下、面積の小さい作用電極を W1、面積の大きい作用電極を W2 と呼ぶ)。測定原理を図 10 に示す。（１）抗原・抗体反応は W1 と W2 上で行い、銀ナノ粒子を W1 と W2 上に捕捉する。次に、（２）捕捉された銀ナノ粒子を電気化学的に酸化する。続いて、（３）酸化された銀イオンを W1 のみで電気化学的に還元し、銀を W1 上のみに析出させる。最後に、（４）W1 上に濃縮された銀を再度酸化させる際の酸化電流を DPV により測定する。本測定原理（本コンセプト）では、以下 2 つの効果を期待している。①：DPV による酸化電流測定を微小な電極 W1 で行うため、バックグラウンド電流が下がり、電気化学測定装置自身の検出感度を上げて、酸化電流の測定が出来るようになるため、微量な酸化電流の定量精度が向上する。更に、バックグラウンド電流のばらつきであるノイズも抑制され、抗原が含まれていないブランクサンプルに対して測定される酸化電流（ノイズ）と低濃度の抗原を含むサンプルに対して測定される微量な酸化電流（シグナル）を明確に見分けることが出来るようになる（図 11-a と b)。

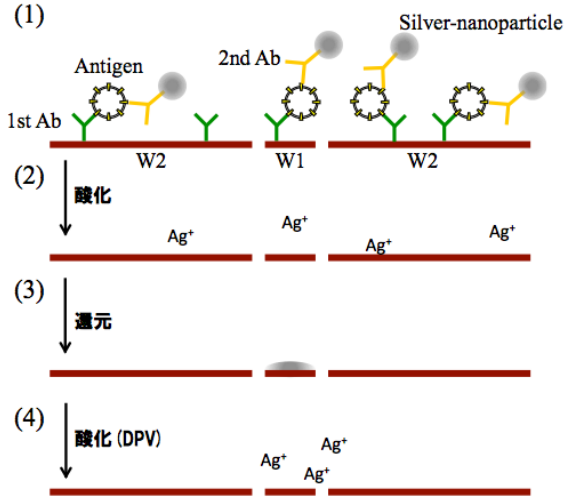

図 10 銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサを高感度化させるコンセプト図

（1）大小 2 つの作用電極（W1 と W2）上で、免疫複合体を形成後、（2）2 つの作用電極に酸化電圧を印加し、銀ナノ粒子を酸化する。続いて、（3）微小な作用電極（W1）だけに還元電位を印加し、酸化された銀イオンを W1 上にだけ還元・析出させ、最後に、（4）W1 で酸化電流測定を行う。

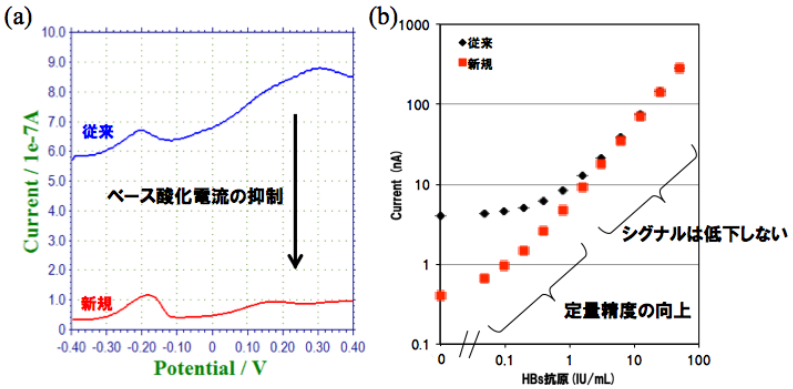

図 11 大小 2 つの作用電極を用いた高感度化コンセプトに期待する効果

(a) 最終的に DPV により酸化電流を測定する際に利用される電極は、微小電極（W1）であるため、作用電極の面積に依存するバックグラウンド電流（ベースライン）やそのばらつき（ノイズ）は抑制される。このため、電気化学測定装置の検出感度を向上でき、より微量な電流を定量精度よく測定できるようになる。(b) 本測定では、図 10 に示したように、2 つの作用電極に捕捉された銀ナノ粒子は、電気化学的な前処理を通して、微小な電極に回収される。このため、銀由来の酸化ピーク電流値は 2 つの作用電極を用いて測定した場合と変わらないが、(a)に示したように、バックグラウンド電流やそのノイズが抑制されるため、微量電流に対して定量精度が向上し、低濃度の抗原に対して測定される微量な電流を明確に定量、見分けることができるようになる。

そして、②：図 10 に示したように、電気化学的前処理を通して、抗原・抗体反応を介して W1 と W2 上に捕捉された銀ナノ粒子を、W1 上でのみ回収するため、酸化電流の測定は微小な電極で行っているにも関わらず、銀由来の酸化ピーク電流値は、W1 と W2 上で得られる酸化ピーク電流値と同等になる（図 11-b）。2 つの効果により、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの S／N 比を大幅に改善することができると考えられる。また、酸化電流を測定する作用電極を微小化することにより、バックグラウンド電流とそのばらつきであるノイズ電流が抑制される理由は、以下になる。電気化学免疫センサにおいて、バックグラウンド電流、及びノイズの主な原因は、電極表面上またはその近傍に共存する、または非特異的に吸着した電気化学的活性物質や不純物に由来する。電気化学活性物質や不純物に由来した電流値は、作用電極の面積に比例すると考えられ、作用電極を微小化することにより、抑制できるはずである。ただし、単純に作用電極を微小化するだけでは、作用電極上に捕捉される抗原量、つまり銀ナノ粒子の量は少なくなり、結果、銀由来の電流も小さくなってしまう。本測定原理では電気化学的な前処理を介して、W1 と W2 上に捕捉された銀ナノ粒子を W1 上にのみ回収することで、銀由来の酸化ピーク電流が小さくなるのを防いでいる（図 11-b）。

3.3 新規電極の作製

上記 3-2 に示した高感度化コンセプトに基づき、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサを高感度化させるために、図 12 に示す電極チップをスクリーン印刷法で作製した。作製した電極チップの構造は、2 つのカーボンスクリーン印刷作用電極（W1 と W2）、カーボンスクリーン印刷対向電極（C）と銀／塩化銀参照電極の 4 電極で構成されている。W1 の電極幅は 0.2 mm、電極長さは 1.5 mm である。つまり、W1 の電極面積は 0.3 mm^2 となる。W2 は一辺が 1.78 mm の正方形から W1 を配置する箇所だけ抜き取った形状となっており、その面積は 2.7 mm^2 である。つまり、今回作製した作用電極の 2 つの面積比は 1：9、全作用電極（W1+W2）から見ると、W1 の面積は 1/10 に微小化された構造である。また、W1 と W2 間の電極間距離は 0.05 mm である。

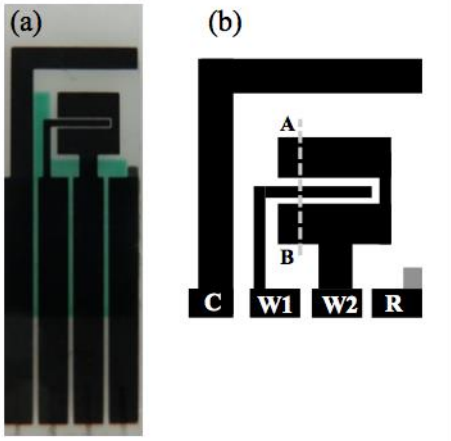

図 12 新規電極構造の電気化学免疫センサ

(a) 実際に作製した電極チップの写真；左からカーボン対向電極、カーボン作用電極 1、カーボン作用電極 2、銀／塩化銀参照電極の 4 電極から成る、(b) 概略図；点線 A-B に沿って電極上を見た場合の測定原理が図 10 に示した。

3.4 高感度化に対するコンセプト検証

図 12 に示した 2 つの作用電極（W1 と W2）を利用して、W1 と W2 に捕捉された銀ナノ粒子を、W1 上にのみ回収することが出来るのか電子顕微鏡観察により検証した。検証用の実験は、以下のように実施した。まず図 12 に示した電極チップを数枚用意し、電極チップ上に、0.1 μM 硝酸銀／0.15 M 硝酸ナトリウム水溶液 30 μL を W1 と W2 上に滴下し、W1 と W2 に−1.0V を 300 秒間印加し、銀を W1 と W2 上に析出させた。上記の水溶液を除去し、電極チップを MilliQ で洗浄した後、窒素ガスで電極チップを乾燥させた（観察対象 1）。その後、電極チップ上に 0.05M の塩酸 30 μL を滴下し、W1 と W2 に 2.1V を 30 秒間印加し、電極上に析出した銀を電気化学的に酸化した。続いて、W1 にのみ−1.0V を 300 秒間印加し、W1 上にのみ銀を析出させた。その後、0.05 M 塩酸を除去し、MilliQ と PBS を用いて洗浄し、窒素ガスで電極を乾燥させた後、電子顕微鏡を用いて電極表面を観察した（観察対象 2）。各観察対象に対して、10〜15 箇所を観察した。各工程後（観察対象 1 〜 3）の電極表面を図 13 に示す。13-a または d から分かるように、W1 と W2 の両電極上に白色の粒子が観察され、銀が析出していることが確認された。また、酸化後では W1 と W2 上のいずれでも白色の粒子（銀）は観察されなかった（図 13-b または e）。つまり、W1 と W2 上のほとんどの銀ナノ粒子が酸

化されたと考えらえる。そして、図 13-c または f では、W1 上にのみ白色の粒子である銀が観察されており、W2 上では観察されなかった。本結果より W1 と W2 上に存在する銀を、図 10 に示す電気化学的な前処理を介して、W1 にのみ回収することができることを示している。本結果により、高感度化に対するコンセプト（微小電極への銀回収）が確認できたため、以下では、実際に銀ナノ粒子を標識として利用した電気化学免疫センサを作製し、条件検討、性能比較や性能評価を実施した。

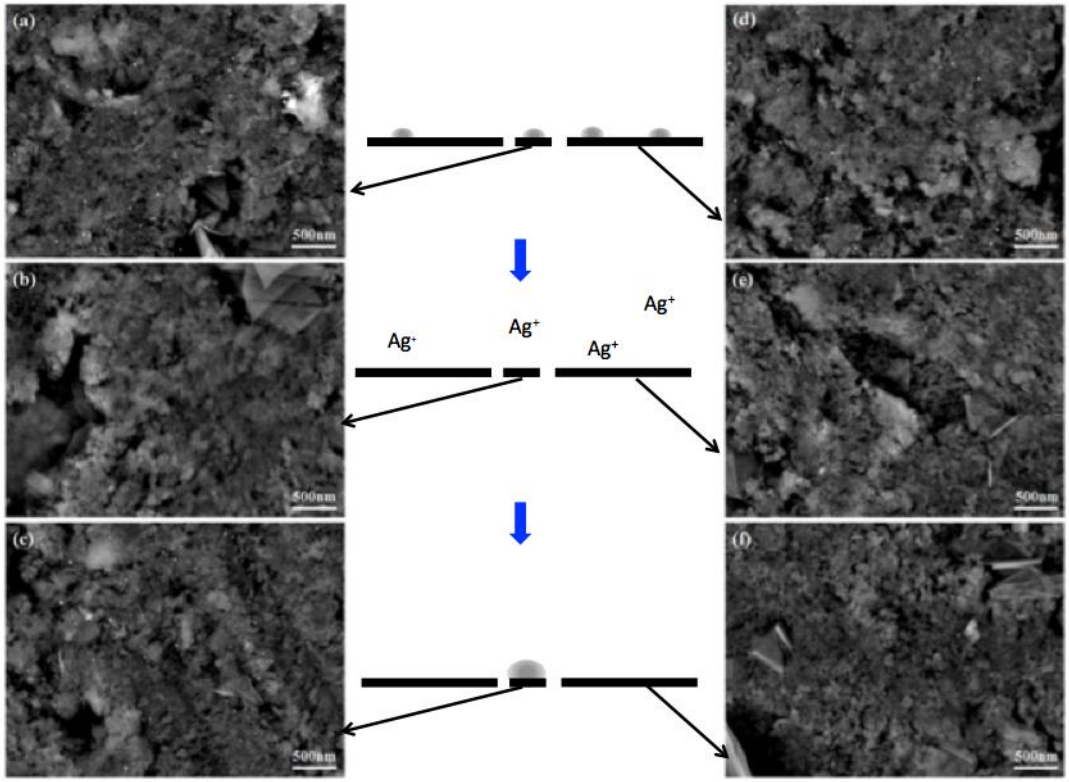

図 13　電解析出させた銀を用いた高感度化コンセプト検証結果

銀を電解析出させた後に FE-SEM を用いて観察した(a)W1 の電極表面と(d)W2 の電極表面；両電極表面上に白色の粒子（銀）が析出している様子が観察できる。電解析出させた銀を酸化した後、FE-SEM を用いて観察した(b)W1 の電極表面と(e)W2 の電極表面；ほとんどの銀が酸化により、銀イオンとなったと考えられ、白色の粒子（銀）は両電極で観察されなかった。酸化された銀イオンの W1 のみで還元した後に、FE-SEM を用いて観察した(c)W1 の電極表面と(f)W2 の電極表面；W1 でのみ白色の粒子（銀）が観察され、W2 では観察されなかった。

3.5 実験

3.5.1 銀ナノ粒子を用いた標識の作製

2 次 HBs 抗体（銀ナノ粒子標識）は、以下の方法で銀ナノ粒子上に固定した。銀ナノ粒子（直径 60 nm, 1.7 × 10^{10} 個 mL^{-1} ; シグマアルドリッチ）を含んだ水溶液 900 μL に、1.0 M の塩酸を加え、pH を 6.2 に調整した。pH を調整した銀ナノ粒子の水溶液に、2 次 HBs 抗体濃度が 100 μg mL^{-1} になるようにリン酸緩衝液を用いて調整した溶液 100 μL を添加した。更に、2 次 HBs 抗体を固定した銀ナノ粒子（銀ナノ粒子標識）のチューブへの非特異吸着を抑制するために、10 % (w/v) Tween 20 を 10.1 μL 添加した。その後、室温で 25 分間静置した。静置後、混合液に 1% (w/v) BSA を含んだ TBS-T (トリス緩衝食塩水に 0.1% Tween20 を混合した水溶液)を 400 μL を添加し、BSA により、2 次抗体が固定されずに露出している銀ナノ粒子表面をブロッキングした。その後、混合液を遠心処理（x7000g, 4℃, 25 分）し、銀ナノ粒子に固定されなかった 2 次抗体や BSA が含まれる上澄み液を除去した。その後、1% BSA / TBS-T を 1mL 添加し、再度分散させた後、遠心処理を行い、上澄み液を除去した。この操作を更に 2 回繰り返し、チューブ内から、未結合の抗体を極限まで除去した。最後の操作では、1% BSA / TBS-T ではなく、1% BSA / PBS-T (1% (w/v) BSA と 0.01% Tween 20 を含んだリン酸緩衝生理食塩水) を 200 μL 加え、以下の HBs 抗原の検出に利用した。また、銀ナノ粒子への 2 次抗体の固定は、粒子径の増大（固定化前：58 nm、固定化後：70 nm）、また吸光度の変化から確認している（詳細は、第 5 章参照）。

3.5.2 HBs 抗原検出用電気化学免疫センサの作製

図 12 に示し電極チップの W1 と W2 上に、1 次 HBs 抗体（銀ナノ粒子に固定した 2 次抗体とは HBs 抗原の異なる箇所（エピトープ）を認識する）濃度が 100 μg mL^{-1} になるように、pH 8.5 の炭酸緩衝液で調整した溶液 3 μL を滴下し、室温、高湿度下で 2 時間静置した。本手法は、ELISA において、マイクロウェルに 1 次抗体を固定する際に利用される方法（疎水相互作用を利用した固定方法）を、電極への 1 次抗体固定に応用したものである。1 次抗体を固定後、未結合の抗体を含んだ溶液を除去し、W1 と W2 を PBS で洗浄した。その後、10% (w/v) BSA / PBS を 4 μL 滴下し、4℃、高湿度下で一晩静置し、1 次抗体が固定されずに露出している W1 と W2 電極表面をブロ

ッキングした。その後、ブロッキング溶液を除去し、PBS で洗浄した。

3.5.3 抗原・抗体反応

HBs 抗原のキャリブレータ（シスメックス株式会社）2500 IU mL^{-1} をウシ胎児血清（FBS）で 1/50 に希釈し、50 IU mL^{-1} の HBs 抗原／FBS を作製した。その後、HBs 抗原を 4 倍希釈していき、12.5, 3.1, 0.77, 0.19 IU mL^{-1} の HBs 抗原／FBS を作製、最後に、0.19 IU/mL を 2 倍希釈し、0.09 IU mL^{-1} の HBs 抗原／FBS を作製した。各濃度の HBs 抗原／FBS を 3 μL と上記 3.5.1 で作製した銀ナノ粒子標識 1 μL を混合し、続いて、W1 と W2 上に滴下し、室温、高湿度下で 45 分間静置させ、電極上で抗原・抗体反応を行った。静置後、混合液を除去し、PBS と MilliQ で洗浄した後、窒素ガスで電極チップを乾燥させた。

3.5.4 電気化学測定

W1 と W2 上に抗原・抗体反応を介して捕捉された銀ナノ粒子量は、以下の電気化学的な処理方法で測定された。まず、電極チップ全体を覆うように 0.05 M の塩酸を 30uL 滴下した。滴下後、ポテンショスタットを用いて、W1 と W2 に、2.1V を目的時間（0～45 秒）印加した。続いて、W1 にのみ、還元電圧−1.0V を目的時間（60～540 秒）印加した。最後に、微分パルスボルタンメトリーにより、W1 上に析出した銀を再度酸化させ、その際に流れる酸化電流を測定した。微分パルスボルタンメトリーの測定条件は、−0.4V から 0.4V をステップ幅 4mV、パルス幅 50mV、パルス時間 0.2 秒で電位走査している。

3.6 電気化学的前処理条件の最適化

新たに作製した電極構造に最適な電気化学的な前処理条件の探索を行った。酸化電位と還元電位は、2.1V と−1.0V を最適な電圧とした。酸化電位は、上記 2.4.3 の図 8 同様に、酸化電位を 1.8V または 2.4V にした場合に測定された酸化ピーク電流値に比べ、2.1V を印加した場合の方が測定された酸化ピーク電流値が大きかったためである。また、還元電位に関しても同様に、−1.0V では−0.8V に比べ、最終的に測定される酸化ピーク電流値が大きく、また、上記 2.4.3 の図 7-b で示したように、−1.2V に比べ、−1.0V では安定的な還元

ができていると考えられたためである。図 10 に示した測定原理において、従来の免疫センサ（第 2 章参照）と大きく異なるのは、酸化により W2 上で生成された銀イオンを W1 上に回収する点である。つまり、本測定原理では W2 上で酸化された銀イオンに関しては、還元されるまでの拡散距離が長くなる。つまり、酸化によって生じた銀イオンの大半を W1 上に回収するために要する時間が長くなると予想される。これより、本測定原理においては、酸化時間、還元時間が、非常に重要な因子だと言える。まず、酸化時間の最適化を行った。HBs 抗原存在下で抗原・抗体反応により、銀ナノ粒子を W1 と W2 上に捕捉し、その後、W1 と W2 に 2.1V を 0 から 45 秒間印加した。続いて、−1.0V を W1 のみに 300 秒間印加し、最後に、DPV により W1 上に回収された銀を再度酸化させた際に流れる酸化電流を測定した。酸化ピーク電流値の酸化時間依存性を図 14 に示す。酸化ピーク電流値は、酸化時間が 15 秒以降で飽和した。これより、本免疫センサの最適な酸化条件として、2.1V を 15 秒間 W1 と W2 に印加することとした。次に、還元時間の最適化を行った。酸化時間の最適化同様、HBs 抗原存在下で抗原・抗体反応により、銀ナノ粒子を W1 と W2 上に捕捉し、W1 と W2 に 2.1V を 15 秒間印加し、銀ナノ粒子を酸化した。続いて、−1.0V を W1 のみに 60 から 540 秒間印加し、銀を W1 上にのみ析出させた。最後に、DPV により W1 上に析出した銀を再度酸化させた際に流れる酸化電流を測定した。酸化ピーク電流値の還元時間依存性を図 15 に示す。還元時間を長くなると、酸化ピーク電流値は増大し、480 秒程度でほぼ飽和状態となることが確認された。このため、本免疫センサの最適な還元条件は、−1.0V を W1 のみに 480 秒間印加することとした。本免疫センサにおける電気化学的な前処理の最適な条件は、2.1V を 15 秒間 W1 と W2 に印加し、その後、−1.0V を W1 にだけ 480 秒間印加する条件である。

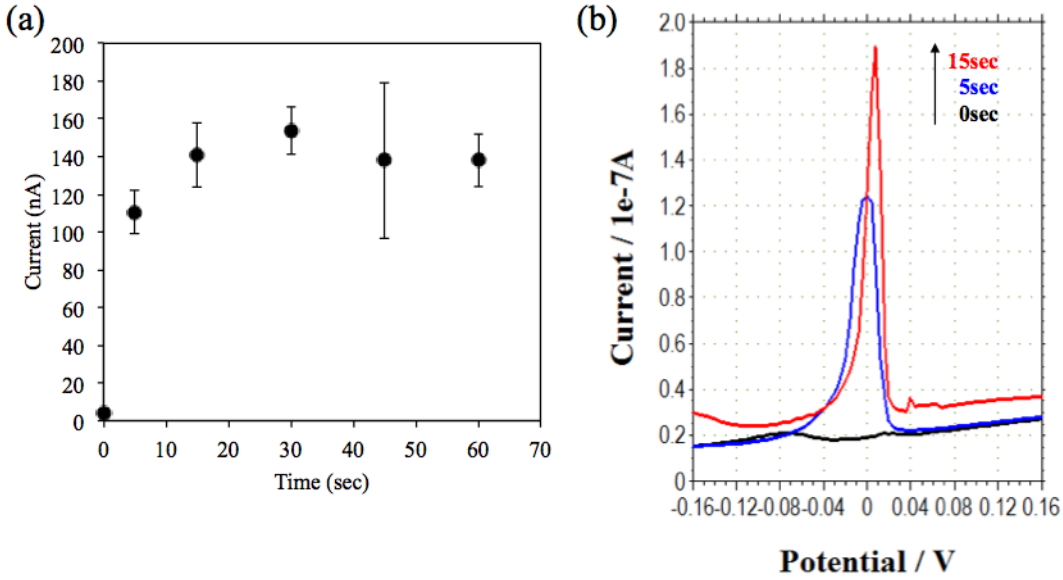

図 14 酸化ピーク電流値の酸化時間依存性

W1 と W2 上での免疫複合体形成後、2.1V を W1 と W2 に 0～60 秒間印加し、続いて、−1.0V を W1 のみに 300 秒間印加した後、DPV により測定された (a) 酸化ピーク電流値の酸化時間依存性、(b) 電流波形である（酸化時間が 0, 5, 15 秒のものを抜粋）。各酸化ピーク電流値は 3 つの免疫センサを用いて評価した結果の平均値であり、各エラーバーは標準偏差である。

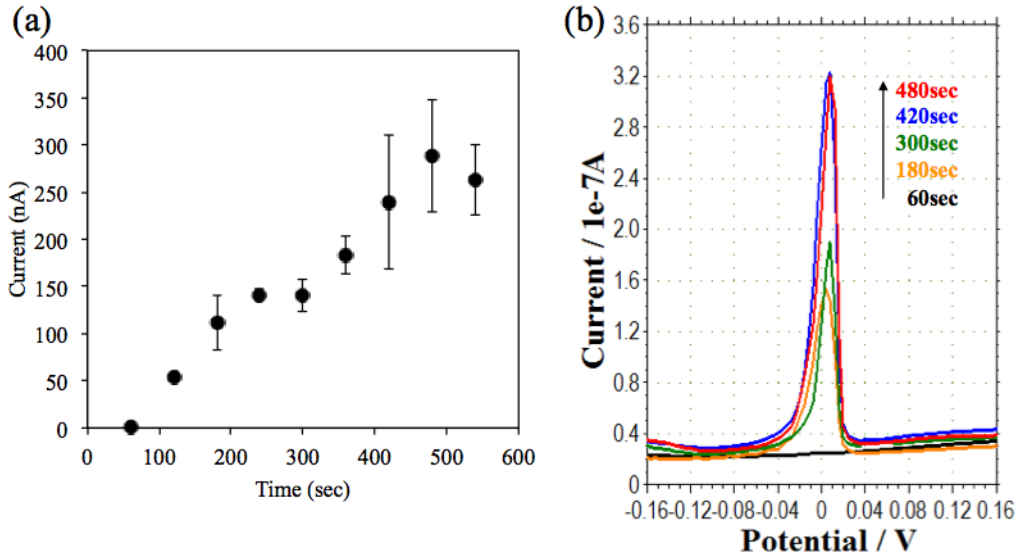

図 15　酸化ピーク電流値の還元時間依存性

W1 と W2 上での免疫複合体形成後、2.1V を W1 と W2 に 15 秒間印加し、続いて、−1.0V を W1 のみに 60～540 秒間印加した後、DPV により測定された (a) 酸化ピーク電流値の還元時間依存性、(b) 電流波形である。各酸化ピーク電流値は 3 つの免疫センサを用いて評価した結果の平均値であり、各エラーバーは標準偏差である。

3.7 従来の電気化学免疫センサとの性能比較

上記 3.6 で最適化した電気化学的な前処理条件を用いて、図 10 に示した高感度化に対するコンセプト（抗原・抗体反応を介して、W1 と W2 上に捕捉した銀ナノ粒子を電気化学的前処理により、W1 上にのみ回収する）を実際のイムノアッセイで検証した（上記 3.4 のコンセプト検証では、電解析出させた銀を用いて検証)。検証方法として、W1 上への銀イオンの回収工程を導入した場合に測定される酸化ピーク電流値と、回収工程を導入せず、従来の測定原理で測定した酸化ピーク電流値を比較した。比較用とした従来の測定原理は、W1 と W2 上に抗原・抗体反応を介して銀ナノ粒子を捕捉し、W1 と W2 上で銀ナノ粒子を電気化学的に酸化した。続いて、酸化された銀イオンを W1 と W2 上に電気化学的に還元・析出させ、最後に、W1 と W2 上に析出した銀を再度酸化させた際に流れる酸化電流を測定した。つまり、各酸化ピーク電流値が同等程度ならば、図 10 に示したように、W1 と W2 上に捕捉した銀ナノ粒子は、電気化学的な前処理（銀イオン回収工程）を介して、W1 上にのみ回収されていることになり、つまり、高感度化のコンセプトが成立していることになる。比較結果を、図 16 に示す。図 16-a は DPV による測定結果であり、銀由来の酸化ピーク電流値（ピーク値とベースラインを引いた値；図 16-b）は、W1 上への銀イオン回収工程を実施した新規の測定原理（図 10）とその工程を行わない従来の測定原理（図 1）で同等であった。本結果は、W1 と W2 上に捕捉された銀ナノ粒子の大半を、銀イオン回収工程を介して、W1 上にのみ回収できていることを示している。また、図 16-a からわかるように、W1 のみを作用電極として DPV により酸化電流を測定した場合、ベースライン（バックグラウンド電流）が、W1 と W2 の 2 つ作用電極を使って測定した従来に比べ、一桁程度小さくなっている。これは、最終的な DPV による酸化電流の測定を行う作用電極の面積の差に由来するものである。

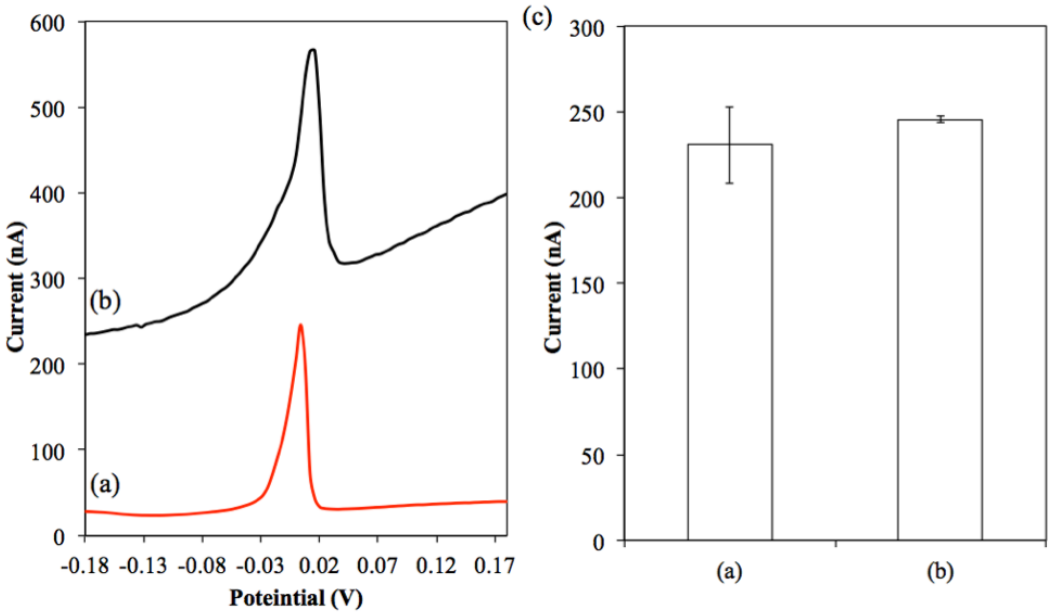

図 16 高感度化コンセプトの検証結果

HBs 抗原（12.5 IU mL^{-1}）存在下で、W1 と W2 上で免疫複合体を形成後、W1 と W2 上に捕捉された銀ナノ粒子を電気化学的に酸化し、(a)酸化された銀イオンを W1 上でのみ還元し、その後、DPV により測定された電流波形、(b) 酸化された銀イオンを W1 と W2 上で還元し、その後、DPV により測定された電流波形、及び(c)各酸化ピーク電流の大きさ。各酸化ピーク電流値は 3 つの免疫センサを用いて評価した結果の平均値であり、各エラーバーは標準偏差である。

3.8 性能評価結果

上記 3.7 の検討より、高感度化のコンセプト（図 10）が成り立つことを確認されたので、次に、微小電極への銀イオン回収工程による高感度化コンセプトに基づいた電気化学免疫センサの性能評価を行った。評価方法は、従来の測定原理の免疫センサから得られる HBs 抗原の検量線と、W1 上への銀イオン回収工程を導入した免疫センサで作成される HBs 抗原の検量線の比較、及び、検出限界を比較した。銀イオン回収工程を導入した免疫センサを用いた場合、DPV により測定した酸化電流波形を図 17-a と b に示す。HBs 抗原濃度に依存して、酸化ピーク電流値が変わることが確認された。また、酸化ピーク電流値を HBs 抗原濃度に対してプロットした結果（検量線）を図 17-c に示す。HBs 抗原の検出限界は 0.09 IU mL^{-1} であった（検出限界として、0 IU mL^{-1} (抗原を含まないブランクサンプル)に対する酸化ピーク電流値の平均値に、その標準偏差の 3 倍を足し合わせた値より大きいものとした)。比較

用に性能評価を行った従来の測定原理での免疫センサでの HBs 抗原の検出限界は、0.8 IU mL^{-1} であり、第 2 章 2.5 で示したように、市販のスクリーン印刷カーボン電極での検出限界（0.78 IU mL^{-1}）と同等であった。本結果より、微小電極への銀イオン回収工程を導入したことにより、従来の測定原理に比べ、検出限界が 9 倍向上したことになる。図 17-c の検量線の比較から明らかなように、抗原を含まないブランクサンプル（0 IU mL^{-1}）に対する酸化ピーク電流値（ノイズ）の大きさが、従来の測定原理の免疫センサで得られるノイズに比べ、約 1/9 になっている。これは、銀イオン回収工程を導入した免疫センサでは、最終的に DPV によって酸化電流を測定する電極の面積が小さいためであり、電流測定を行っている作用電極の面積が、従来の測定原理の免疫センサで使用されている作用電極の面積の 1/10 になっているためである。ただし、HBs 抗原を含んだサンプルに対して得られる酸化ピーク電流値は、銀イオン回収工程を導入した場合と従来の測定原理の免疫センサで同等であった。これは、図 10 に示したように、銀イオン回収工程により、W1 と W2 上に捕捉された銀ナノ粒子の大半を、W1 上に回収できるためである（図 16）。また、検量線の回帰直線を算出した結果、0.09 から 50 IU mL^{-1} の HBs 抗原濃度範囲に対して、$y = 6.3877\ x + 0.3016$（相関係数 0.96）であった。また、同一のサンプルに対する測定再現性を、5 つの免疫センサを作製して評価した結果、RSD は 12.2%であった。また、上記 3.5 でも示したように、性能評価は HBs 抗原を添加した血清サンプルを用いて行っている。血清中には様々な夾雑物が含まれているが、図 17-b から分かるように、非特異的に電極上に吸着した夾雑物由来の電流値（ノイズ）は検出されていない。更には、HBs 抗原濃度依存的な電流値の変化が確認されている。つまり、銀イオン回収工程を導入した免疫センサでは、特異的に HBs 抗原を検出していると考えられる。また、検出限界 0.09 IU mL^{-1} は、実際の臨床現場（免疫検査）で利用されている CLEIA や ELISA と同等であり[42]、つまり、既存の大型診断装置と同等性能を有していることを示された。検出性能に加え、電気化学測定を測定原理としているため、測定機自体が非常に小さくでき、また持ち運びも可能になると考えられる。加えて、本免疫センサにおいても、必要な検体（サンプル）量は 3 μL と非常に少なく、その微量な検体でも高感度測定が実現できている。つまり、本免疫センサは、POCT への適用が期待できる検出性能を有していると考えられる。

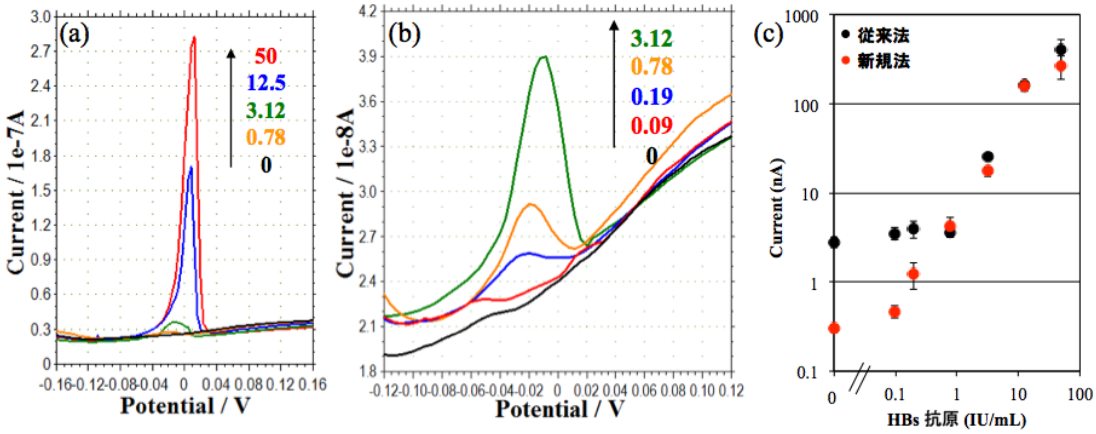

図 17 高感度コンセプトでの HBs 抗原に対する定量測定結果

(a)50, 12.5, 3.12, 0.78, (b)0.19, 0.09, 0 IU mL^{-1} の HBs 抗原存在下で、免疫複合体を形成し、W1 と W2 上に捕捉された銀ナノ粒子を電気化学的に酸化し、続いて、W1 上に酸化された銀イオンを還元・析出させ、最後に DPV により測定された酸化電流波形であり、(c)の新規法（赤丸）が、検量線であり、各酸化ピーク電流値はピーク値からベースラインを引いた値である。従来法（黒丸）は、従来の測定原理（W1 と W2 上で免疫複合体形成後、銀ナノ粒子の酸化、銀イオンの還元を行い、DPV 測定を行う）での検量線である。各酸化ピーク電流値は 3 つの免疫センサを用いて評価した結果の平均値であり、各エラーバーは標準偏差である。

3.9 考察

本研究では、作用電極を大小 2 つに分け、①最終的な電流測定を微小な電極で行うことにより、バックグラウンド電流、及びそのばらつき（ノイズ）を抑制し、電流値の測定精度を向上させた、②微小な電極への銀イオン回収工程を導入することにより、電流測定を微小な電極で行った場合でも、銀由来の酸化ピーク電流値が減少しないようにした。上記二つの効果により、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの検出性能を大幅に向上させることに成功した。しかしながら、回帰直線の相関係数がやや低い、また同一サンプルに対する再現性が悪く、各課題を改善する必要がある。更には、電気化学免疫センサや銀ナノ粒子標識の長期保存安定性、実験間再現性といった実用化を踏まえた面での評価も行っていく必要もある。例えば、臨床現場で行われている免疫検査においては、同一サンプルに対する測定再現性（RSD）は、5%以下である必要がある。本免疫センサの測定再現性を向上させるには、例えば、マイクロ流路や反応チャンバを本免疫センサと一体化し、抗原・抗体

反応の不均一性（反応液の滴下位置のズレや洗浄強度のばらつきなど）や電気化学測定のばらつき（電解液の滴下位置、電解液の対流など）を抑制する方法が考えられる。測定再現性を向上させることにより、回帰直線の相関係数も向上することが期待される。ただし、従来の免疫センサに比べ、検出限界が大幅に向上しており、それだけでも有用性は高いと考えられる。例えば、マラリア検査では、定量精度よりもマラリアの有無を高感度に検出する必要がある。更なる性能向上を行わなくても、そういった検査領域に、本免疫センサを適用できるとも考えられる。更に、上記に示したようにマイクロ流路や反応チャンバと組み合わせ、測定再現性を向上できれば、臨床現場で大型診断装置を用いて実施している免疫検査を、小型な診断装置で実現できるようになると考えられる。

3.10 結論

本研究では、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサに使用する作用電極を大小 2 つに分け（W1 と W2)、且つ、W1 上への銀イオン回収工程を導入することにより、免疫センサの検出感度の高感度化を達成した。銀イオン回収工程の導入により、抗原濃度に応じた銀由来の酸化ピーク電流値（シグナル）は、微小な電極（W1）で電流測定しているにも関わらず、W 1 と W2 上で測定する場合の酸化ピーク電流値と同等であった。つまり、銀イオン回収工程により、W1 と W2 上に捕捉した銀ナノ粒子を W1 上にのみ回収できている。また、最終的な電流測定を微小な電極（W1）で行うため、共存する電気化学的活性物質や不純物に由来するノイズが、大幅に抑制された。二つの効果により、従来の免疫センサでは定量できなかった低濃度の抗原に対して得られる微量な酸化電流を定量測定することができるようになり、結果、検出性能が大幅に向上した。本免疫センサは、電気化学測定を測定原理としているため、測定機を小型化することができ、持ち運びも可能だと考えられる。また、POCT の実現に必要な要素として上記に記載した高感度、特異性、小型、持ち運び可といった各要素を本免疫センサは満たしている。まだまだ課題は多いが、その課題を克服し、POCT、更には家庭での日々の健康状態モニタリングを実現させられる免疫センサを研究開発していきたい。

第 4 章　高感度・迅速化への取り組み

4.1 序

第 3 章では、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサを高感度化させるための研究に取り組んだ。高感度化の方法は、以下である。作用電極を 2 つに分け、最終的に電流測定を行う作用電極を微小化し、バックグラウンド電流やノイズを抑制する。更に、2 つの作用電極上に捕捉された銀ナノ粒子を電気化学的な処理を通して、微小な電極に回収することで、シグナルの低下を抑制する。結果、免疫センサの検出感度が大幅に向上した。ただし、従来の免疫センサ（第 2 章参照）に比べると、電気化学的な前処理である還元工程が非常に長くなっている。POCT では迅速な検査が求められ、分析時間（還元時間）を短くする必要がある。本章では、第 3 章で検証したコンセプト（図 10）を基に、電極構造を更に改良し、還元時間の短時間化に取り組む[43]。

4.2 迅速化に対するコンセプト

新規の電極（図 12）を用いた免疫センサでの電気化学的な前処理（図 10）に対して、従来の電気化学的な前処理（図 1）と大きく異なる点は、W2 上で捕捉した銀ナノ粒子を電気化学的な前処理を通して、W1 上に回収する点にある。酸化された銀イオンの大半を回収するまでの時間は、主に電解液中の銀イオンの拡散に由来する。つまり、W1 と W2 の距離が大きくなると、銀イオンを回収する時間は長くなると考えられ、逆に、短くなると、銀イオンを回収する時間は短くなると考えられる。つまり、図 12 に示した電極（以下、1 line 電極と呼ぶ）に対して、W1 と W2 の面積比は変えずに、可能な限り W1 の幅を細くし、W2 に対して等間隔に配置する、または、W1 を微小化し、W2 上に均等に配置する、など電極構造を改良すれば、W1 と W2 間の距離が短くなり、つまり銀イオンの拡散距離が短くなり、銀イオンの回収時間が短くなると予想される。

4.3 新規電極の作製

上記 4-2 に示した迅速化に対するコンセプトに基づき、図 18 に示す電極チップをスクリーン印刷法により作製した。作製した電極チップの構造は、2 つのカーボンスクリーン印刷作用電極（W1 と W2）、カーボンスクリーン印

刷対向電極（C）と銀／塩化銀参照電極（R）から構成される。図 18-a に示した電極（以下、2 lines 電極と呼ぶ）は、1 line 電極と比較して、W1 を 2 つに分け、W2 に対して均一な箇所に配置した。つまり、W1 は、電極幅が 0.1 mm、電極の長さが 1.5 mm である 2 本のラインから成る。W1 の面積は、0.3 mm^2 である。W2 は一辺が 1.82 mm の正方形から W1 を配置する箇所を抜き取った形状であり、面積は 2.7 mm^2 である。図 18-b に示した電極（以下、6 parts 電極と呼ぶ）は、図 18-a に示した 2 lines 電極と比較すると、W1 の 2 本のラインを 3 つずつ計 6 つに分け、W2 の端に等間隔に配置した。つまり、W1 は、電極幅が 0.1 mm、電極の長さが 0.5 mm の 6 箇所の電極から成る。W1 の面積は、0.3 mm^2 である。W2 は一辺が 1.83 mm の正方形から W1 を配置する箇所を抜き取った形状となっており、面積は 2.7 mm^2 である。つまり、作製した新規の電極構造（図 18）でも、図 12 に示した 1 line 電極同様、2 つの作用電極の面積比は 1：9 であり、全作用電極（W1+W2）から見ると、W1 の面積は 1/10 となっている。W1 と W2 間の距離は全電極構造で、0.05 mm である。

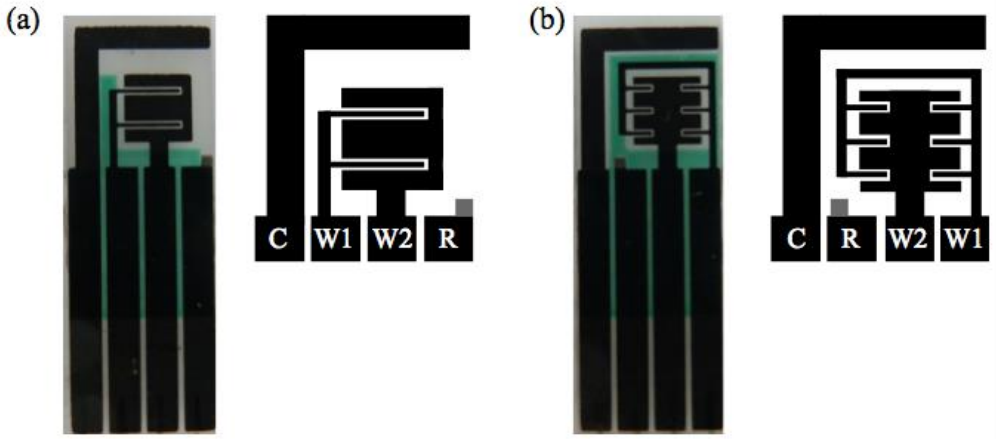

図 18 新たに作製した電極チップ

(a) 2 lines 電極；左からカーボン対向電極、カーボン作用電極 1、カーボン作用電極 2、銀／塩化銀参照電極の 4 電極から成る、(b) 6 parts 電極；左からカーボン対向電極、銀／塩化銀参照電極、カーボン作用電極 2、カーボン作用電極 1、の 4 電極から成る。

4.4 実験

4.4.1 銀ナノ粒子を用いた標識の作製

2 次 HBs 抗体は、以下のように、銀ナノ粒子上固定し、銀ナノ粒子標識を作製した。銀ナノ粒子（直径 60 nm, 1.7 × 10^{10} 個／mL；シグマアルドリッ

チ）を含んだ水溶液 900 μL に、1.0 M の塩酸を加え、pH を 6.2 に調整した。pH を調整した銀ナノ粒子の水溶液に、2 次 HBs 抗体濃度が 100 □g mL^{-1} になるように、リン酸緩衝液を用いて調整し、100 μL を添加した。更に、2 次抗体を固定した銀ナノ粒子のチューブへの非特異吸着を抑制するために、10 % (w/v) Tween 20 を添加した。その後、室温で、25 分間、静置させた。静置後、混合液に 1% (w/v) BSA を含んだ TBS-T (トリス緩衝食塩水に 0.1% Tween 20 を混合した水溶液)を 400 μL を添加し、BSA により、2 次抗体が固定されずに露出している銀ナノ粒子表面をブロッキングした。その後、混合液を、遠心処理（×7000 g, 4℃, 25 分）し、未結合の 2 次抗体や BSA を含む上澄み液を除去した。その後、1% BSA / TBS-T を 1mL 添加し、再度分散させた後、遠心処理し、上澄み液を除去した。本操作を更に 2 回繰り返し、未結合の抗体を極限まで除去した。最後の操作では、1% BSA / TBS-T ではなく、1% BSA / PBS-T (1% (w/v) BSA と 0.01% Tween 20 を含んだリン酸緩衝生理食塩水)を保存液として、200 μL 添加し、HBs 抗原検出に利用した。

4.4.2 HBs 抗原検出用免疫センサの作製

図 12 と図 18 に示す電極チップの W1 と W2 上に、1 次 HBs 抗体（銀ナノ粒子に固定した 2 次 HBs 抗体とは HBs 抗原の異なる箇所（エピトープ）を認識する）濃度が 100 μg mL^{-1} となるように、pH 8.5 の炭酸緩衝液で調整した溶液 3 μL を滴下し、室温、高湿度下で 2 時間静置した。1 次 HBs 抗体固定後、未結合の 1 次抗体を含む溶液を除去し、W1 と W2 を PBS で洗浄した。その後、10% (w/v) BSA / PBS を 4 μL 滴下し、4℃、高湿度下で一晩静置し、抗体が固定されずに露出した W1 と W2 表面をブロッキングした。その後、ブロッキング溶液を除去し、PBS で洗浄した。

4.4.3 抗原・抗体反応

HBs 抗原のキャリブレータ（シスメックス株式会社）2500 IU mL^{-1} をウシ胎児血清（FBS）で 1/50 に希釈し、50 IU mL^{-1} の HBs 抗原／FBS を作製した。その後、作製した 50 IU mL^{-1} の HBs 抗原／FBS を、更に FBS を用いて希釈し、12.5, 3.1, 0.77, 0.19, 0.09, 0.05 IU mL^{-1} の HBs 抗原／FBS を作製した。各濃度の HBs 抗原／FBS を 3 μL と上記 4.4.1 で作製した銀ナノ粒子標識 1 μL を混合し、続いて、W1 と W2 上に滴下し、室温、高湿度下で

20 分間電極チップを振動させながら、W1 と W2 上で抗原・抗体反応を行った。反応後、混合液を除去し、PBS と MilliQ で洗浄し、その後、窒素ガスで電極を乾燥させた。

4.4.4 電気化学反応

W1 と W2 上に抗原・抗体反応を介して捕捉した銀ナノ粒子の量は、以下の電気化学的な処理手順で測定された。まず、電極チップ全体を覆うように 0.05 M の塩酸を 30uL 滴下した。滴下後、ポテンショスタットを用いて、W1 と W2 に、2.1V を 15 秒間印加した（図 10-(2)）。続いて、W1 に、−1.0V を目的時間（60〜480 秒）印加した。最後に、微分パルスボルタンメトリーにより、W1 上に析出した銀を再度酸化させた際に流れる酸化電流を測定した。微分パルスボルタンメトリーの測定条件は、−0.4V から 0.4V をステップ幅 4mV、パルス幅 50mV、パルス時間 0.2 秒で電位走査している。

4.5 各電極での性能比較

本免疫センサの測定原理を振り返る。図 10 に示すように、（1）W1 と W2 上に抗原・抗体反応を介して捕捉した銀ナノ粒子は、（2）電気化学的に酸化され、銀イオンとなり、続いて、（3）酸化した銀イオンを W1 上でのみ電気化学的に還元・析出させ、最後に、（4）W1 上に回収された銀を再度酸化する際に流れる酸化電流を測定し、抗原濃度を定量する。第 3 章で作製した 1 line 電極では、上記（3）の工程に 480 秒の時間を要しており、この時間を短時間化させる必要がある。本研究では、（2）と（3）の工程において、W1 と W2 または W1 に印加する酸化電圧と還元電圧は、2.1V と−1.0V とした。上記 3.6 で示したように、酸化電圧 1.8V や 2.4V に比べて、2.1V を印加した場合、酸化ピーク電流値が高いためである。また、還元電圧−0.8V に比べ、−1.0V では酸化ピーク電流値が高く、−1.2V に比べると、−1.0V の方が安定した還元ができるためである。酸化時間は 15 秒とした。上記 3.6 で示したように、W1 と W2 上に捕捉された銀ナノ粒子の大半を、2.1V という高い酸化電圧の印加により、15 秒間で十分酸化できるためである。12.5 IU mL^{-1} の HBs 抗原を用いて、各電極構造での酸化ピーク電流値の還元時間依存性を評価した。図 19 に示したように、2 lines 電極と 6 parts 電極を用いて測定された酸化ピーク電流値は、1 line 電極を用いて測定された酸化ピーク電流値

に比べて、短時間で大きな値が得られた。例えば、1 line 電極を用いて 480 秒間還元した後に得られた酸化ピーク電流値を、2 lines 電極や 6 parts 電極を用いた場合では 300 秒間の還元で得られている。つまり、電極構造の改良により、還元時間の短時間化が可能であることが確認された。今回新しく作製した 2 lines 電極と 6 parts 電極では、図 19 から分かるように、シグナルの還元時間依存性に大きな差は見られず、同じ還元時間では、同等の酸化ピーク電流値になると考えられる。2 lines 電極は、W1 のライン長さが 1.5 mm であり、W2 の中央部付近で捕捉された銀ナノ粒子を電気化学的な前処理を通して回収できる構造になっているが、その分、W2 の端付近（図 18-a の W2 の上下）で捕捉された銀ナノ粒子は、W1 との距離があるために、銀イオンの回収には、時間がかかる構造となっている（W1 から最も離れた W2 の位置は 0.55 mm である）。それに対し、6 parts 電極は、W1 ラインの長さが 0.5mm であり、W2 の端に配置され、W2 の端付近（図 18-b の W2 の左右）で捕捉された銀ナノ粒子の大半は短時間に回収ができるが、W2 の中央部付近から W1 までは距離が離れているため、中央部付近で捕捉された銀ナノ粒子の回収には、時間がかかると考えられる（W1 から最も離れた W2 の位置は 0.53 mm である）。また、2 lines 電極と 6 parts 電極のどちらの電極を使った電気化学反応でも、W1 と W2 上で酸化された銀イオンの拡散係数は同じであり、また W2 の端付近から中央部への拡散（2 lines 電極）と W2 の中央部から端付近への拡散（6 parts 電極）は対称のため、同等である。その結果、2 lines 電極と 6 parts 電極で測定された酸化ピーク電流値は、同様の還元時間依存性を示したと考えられる。

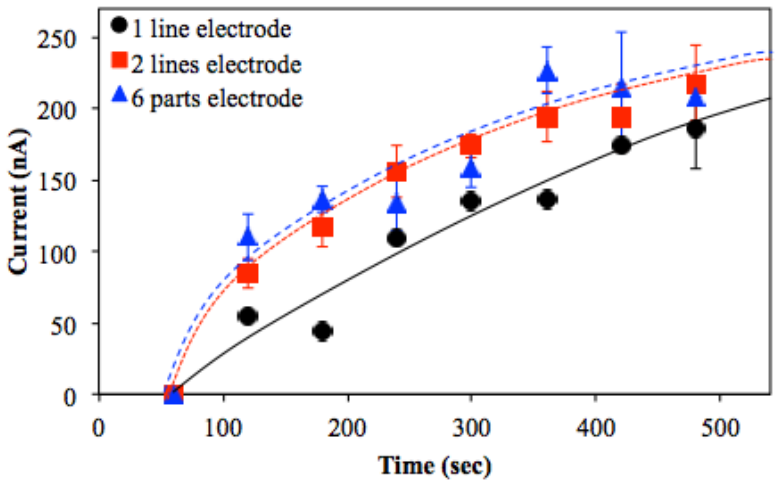

図 19 各電極構造を用いた時の酸化ピーク電流値の還元時間依存性

W1 と W2 上での免疫複合体形成後、2.1V を W1 と W2 に 15 秒間印加し、続いて、-1.0V を W1 のみに 60～480 秒間印加した後、DPV により測定された酸化ピーク電流値の還元時間依存性、（黒）1 line 電極（図 12）、（赤）2 lines 電極（図 18-a）、（青）6 parts 電極（図 18-b）で測定した電流値である。

4.6 3 次元拡散方程式を基にした数値シミュレーション

上記 4.5 で得られた酸化ピーク電流値の還元時間依存性（図 19）の理論的な妥当性（例えば、1 line 電極を使用し、480 秒間の還元後に測定された電流値が、2 lines 電極や 6 parts 電極の使用した場合に 300 秒間の還元後に測定されるのか、2 lines 電極と 6 parts 電極で酸化ピーク電流値の還元時間依存性が同じような傾向を示すのか）を、3 次元拡散方程式を基とした数値シミュレーションを作製し、図 19 に示した実験結果と比較することにより検証した。銀イオンの回収（還元）工程では、W2 から W1 への銀イオンの拡散が律速になっていると考えられ、つまり W1 上での銀の析出は、銀イオンの拡散に比べ、非常に早い反応であると考えられるため、図 19 に示した各電極での還元時間依存性は、3 次元拡散方程式に従うと考えられるためである。

4.6.1 数値シミュレーションの作製

数値シミュレーションは、各電極構造（図 12 と図 18）に対し、3 次元拡散方程式（式（1））を、表 1 の初期条件、及び境界条件の下で、有限差分法を用いて解いている。式（1）において、C は銀イオン濃度（相対値）であり、D は銀イオンの拡散係数である（今回の数値シミュレーションでは、3.1

×10^{-5} cm^2/sec を銀イオンの拡散係数として採用した)。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2}\right) \qquad (1)$$

また、数値シミュレーションでは、以下を仮定している。１）酸化工程において、W1 と W2 上で酸化された銀イオンは、3 次元拡散方程式にのみ従い、W1 と W2 の表面からバルク溶液（電解液）へ拡散していく（つまり電極表面を銀イオンの供給源とし、3 次元拡散方程式に従って、銀イオンがバルク溶液中に拡散する。更には、２）還元工程においても、3 次元拡散方程式にのみ従い、バルク溶液中に存在している銀イオンは拡散する、つまり W1 でのみ銀イオンが消失（銀の析出）するように境界条件を設定し、W1 表面からバルク溶液の濃度勾配に従って、銀イオンは W1 に向かって拡散する。3）還元開始 60 秒後から銀の析出が開始される。以上 3 点を仮定した。また、数値シミュレーションは、W1 と W2 上、及び W1 と W2 上に存在するバルク溶液（電解液）中で実行されている。また、数値シミュレーション上での還元した後、W1 上に析出した銀の（相対）量は、酸化工程後にバルク溶液中に存在した全ての銀イオン濃度（相対量）から、還元後にバルク溶液中に残っていた銀イオン濃度（相対量）の差分を求めることで算出した。数値シミュレーションは、Scilab プログラム（http://www.scilab.org）を用いて行った。数値シミュレーションのプログラムの一例（1 line 電極で 15 秒の酸化を行った後、480 秒間の還元を行う場合）を以下 4.11 に示す。他の電極構造に対しては電極構造を表す境界条件を書き換える、還元時間依存性を求めるには、還元時間を変更することにより、各電極構造で、各条件で、銀イオンを W1 上に還元・回収した際の W1 上の銀の量を計算することができる。

表 1　数値シミュレーションに用いた初期条件、及び境界条件

Step	Initial conditions		Boundary conditions	
Preoxidation	W1 表面上	C = 1	W1 表面上	C = 1
	W2 表面上	C = 1	W2 表面上	C = 1
	バルク溶液中	C = 0	W2 の両端	dC / dx = 0
				dC / dy = 0
			バルク溶液の端	dC / dz = 0
Prereduction	-		W1 表面上	C = 0
			W2 の両端	dC / dx = 0
				dC / dy = 0
			バルク溶液の上 W2 とバルク溶液間の界面	dC / dz = 0

4.6.2　数値シミュレーションとの比較結果

図 19 に示した酸化ピーク電流値の還元時間依存性の実験結果と数値シミュレーションから算出した還元時間依存性の比較結果を図 20 に示す。図 20 から分かるように、実験結果が数値シミュレーションの結果に沿う形になっており、W1 への銀イオンの回収工程は、3 次元拡散方程式に従うと考えられる。また、図 19 の実験結果と同様に、1 line 電極を用いて 480 秒間の還元をした後に析出した銀の相対量が、2 lines 電極または 6 parts 電極を用いた場合では、300 秒間の還元後に得られることが分かった。更に、2 lines 電極と 6 parts 電極では、実験結果同様に、還元時間依存性に対しては、同様の傾向を示し、大きな差がないことを確認した。数値シミュレーションを用いて、還元した後の電極上のバルク溶液中に残存する銀イオンの分布を示した結果を図 21 に示す。数値シミュレーションにより、各電極構造において、どの箇所に存在する銀イオンは回収されやすく、逆に回収されにくい箇所はどこなのか、といった視覚情報を得ることが出来る。例えば、2 lines 電極では、還元後に、W2 の中央部付近に比べると、端付近の方が銀イオンの濃度は高いことが確認できる。同様に、6 parts 電極では、W2 の端付近よりは、中央部付近に銀イオンが残存している様子が観察でき、上記 4.5 で推測したように、2 lines 電極と 6 parts 電極で同様の還元時間依存性を示した原因を解明する

こともできると考えられる。今回の実験結果と数値シミュレーションでの結果を比較したことにより、銀イオンの回収工程が 3 次元拡散方程式に従うことは確認できた。しかし、今回作製した数値シミュレーションは、上記にも示したように、様々な条件を仮定している。また、拡散係数は、従来報告されている値に比べ、約 2 倍大きい[44]。今回作製した数値シミュレーションの妥当性に関しては、更なる検証が必要となる。例えば、拡散係数が異なる原因は、銀ナノ粒子を電極上で酸化している際、本研究・本シミュレーションでは、単純に 3 次元拡散方程式に従うものとしたが、ナノ粒子の形状・サイズを取り込んだ新規モデルが必要である可能性もある[45]。更には、W1 と W2 上、及び W1 と W2 上のバルク溶液でのみ数値シミュレーションを実行するのではなく、対向電極や参照電極上、それらの上のバルク溶液といった全領域で数値シミュレーションを行う必要がある。今回作製した数値シミュレーションは、更に改良する必要性はあるが、例えば、更に還元時間を短くするにはどのような電極構造が良いのか、新たな電極構造を考案した場合、その電極構造を用いた場合に還元時間依存性はどのような傾向になるのか、といった用途には使用できると言える。

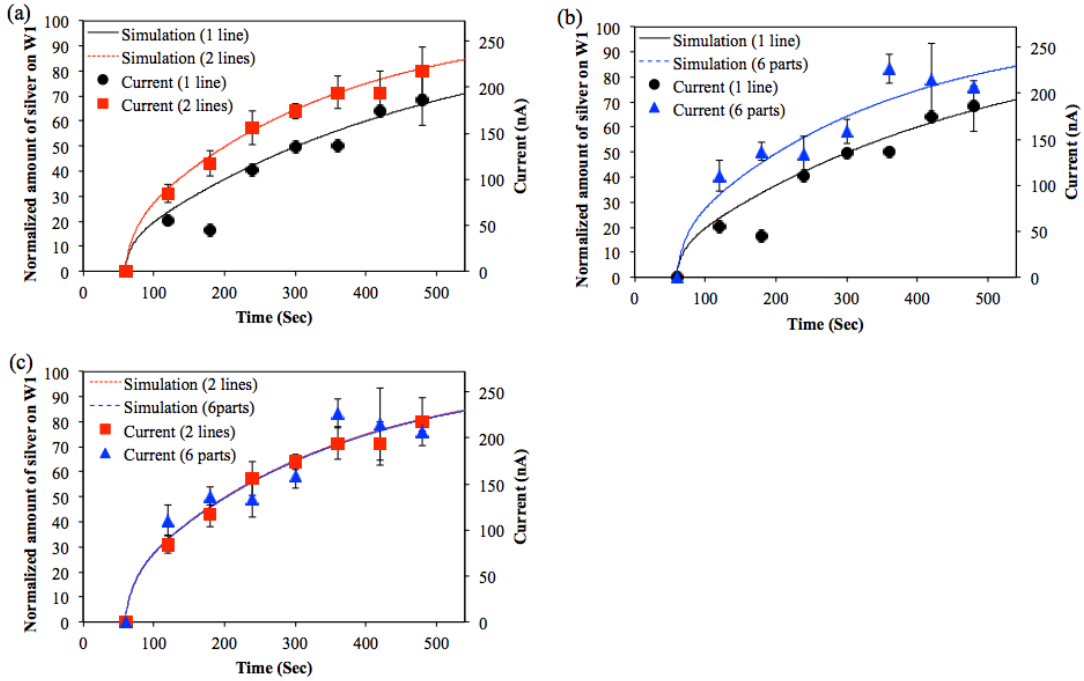

図 20 実験結果と数値シミュレーションの比較結果

各実験結果（黒丸、赤四角、青三角）に関しては、図 19 参照。(黒線）1 line 電極、(赤線)2 lines 電極、(青線)6 parts 電極に対して、3 次元拡散方程式を基にした数値シミュレーションより算出した W1 上の銀の析出量（相対量）の還元時間依存性。

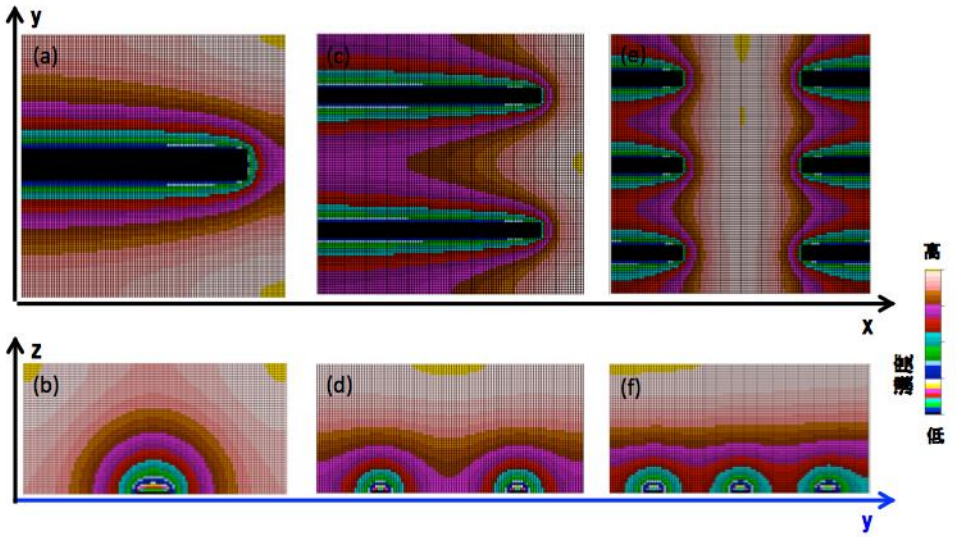

図 21　数値シミュレーションを用いて視覚化した銀イオンの濃度分布

3 次元拡散方程式を基とした数値シミュレーションを用いて計算した銀イオン回収工程後のバルク溶液中の銀イオンの濃度分布、(a, b) 1 line 電極、(c, d)2 lines 電極、(e, f)6 parts 電極を用いて銀イオンを W1 上に回収・還元した場合のバルク溶液中での銀イオンの濃度分布

4.7 性能評価結果

本研究で、新規に作製した電極構造である 2 lines 電極を用いて、免疫センサとしての検出性能評価を行った。電気化学的前処理の酸化・還元の最適な条件として、2.1V を W1 と W2 に 15 秒間印加し、その後、−1.0V を W1 にのみ 300 秒間印加する条件とした。つまり、HBs 抗原を検出・定量するまでに必要な時間は、約 25 分となる。この分析時間は、臨床現場で使用されている免疫診断装置（15〜30 分）と同等の時間である。第一に、同一サンプルに対して、5 枚の免疫センサを用意し、測定再現性を評価した。その結果は、12.7%であった。また、今回のモデル検体も HBs 抗原／FBS であり、血清を用いているが、電流測定において血清中に含まれる夾雑物由来のノイズは検出されなかった。更には、下記に示すように HBs 抗原濃度依存的な電流値が測定されていることから、本免疫センサは、特異的に HBs 抗原を検出していると考えられる。また、本免疫センサの検出限界は、0.09 IU/mL であり（図 22）、上記 3.8（第 3 章）で示したように、1 line 電極を使った免疫センサと同等であった（ただし、HBs 抗原検出までの分析時間は大きく異なる）。つまり、本結果から、W1 と W2 の面積比が同等の場合は、電極の構造に関わらず、検出限界は同等であるが、W1 の構造や配置の変更（今回の場合、1 line 電極を 2 lines 電極に変更）により、銀イオンの W1 上への回収・還元に必要な時間は変わると言える。また、従来の測定原理（W1 と W2 上での抗原抗体反応後に、W1 と W2 上の銀ナノ粒子を酸化、酸化された銀イオンを W1 と W2 上に還元・析出させ、W1 と W2 上に析出した銀を再度酸化させる際に流れる酸化電流を測定する）による検出限界は 0.8 IU/mL であった。つまり、検出限界は、従来に比べ 9 倍低くなっている（第 3 章でも同様の感度向上であった）。得られた検出限界は、CLEIA や ELISA を測定原理とする既存の大型診断装置と同等である。

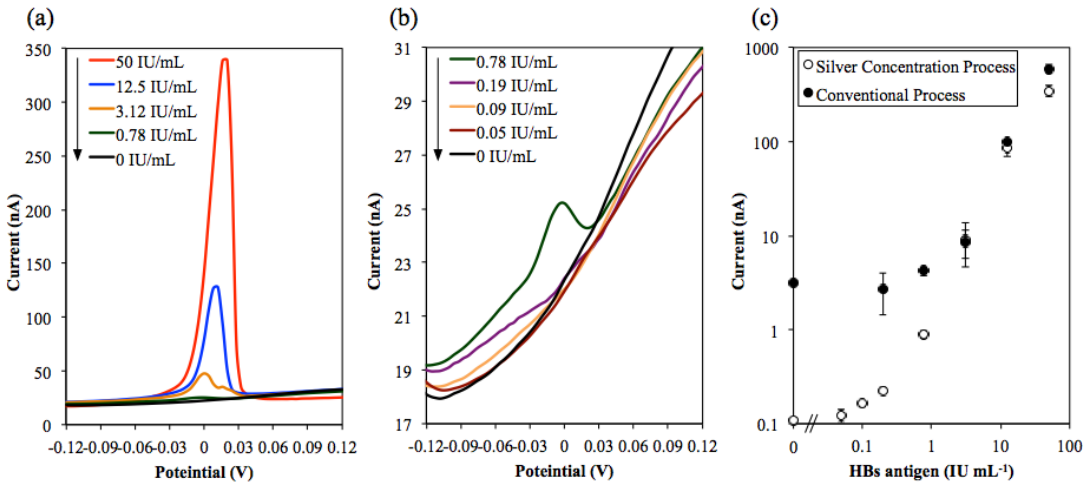

図 22 2 lines 電極を用いて作製した HBs 抗原の検量線

2 lines 電極を用いて、(a)50, 12.5, 3.12, (b) 0.78, 0.19, 0.09, 0.05, 0 IU mL^{-1} の HBs 抗原存在下で、免疫複合体を形成し、W1 と W2 上に捕捉された銀ナノ粒子を電気化学的に酸化し、続いて、W1 上に酸化された銀イオンを還元・析出させ、最後に DPV により測定された酸化電流波形であり、(c)の白丸が対応する検量線である。各酸化ピーク電流値はピーク値からベースラインを引いた値である。黒丸は、従来の測定原理（W1 と W2 上で免疫複合体形成後、銀ナノ粒子の酸化、銀イオンの還元を行い、DPV 測定を行う）での検量線である。各酸化ピーク電流値は 3 つの免疫センサを用いて評価した結果の平均値であり、各エラーバーは標準偏差である。

4.8 理想的な電極構造の設計

第 3 章の結果、及び本研究の結果より、作用電極を 2 つに分け、その面積比を変更することで、検出限界は変わり、その W1 の幅や長さ、配置を変更することにより、銀イオンの回収に要する時間が変わることが分かった。また、3 次元拡散方程式を基にした数値シミュレーションを用いれば、各電極構造で測定される還元時間依存性を求められることも確認した。つまり、W1 と W2 の面積比は 1：9 で維持した状態で、W1 の構造及び配置を変更し、銀イオンの回収時間を短縮できる電極構造を、数値シミュレーションを用いて設計することもできると考えられる。数値シミュレーションに適用した電極構造は、W1 の電極を 1, 2, 4, 8, 16・・・本と W1 の幅を順に半分にし、且つ、各ラインを W2 に対して均一に配置した電極構造である。例えば、8 lines 電極と呼ぶ電極チップにおける W1 の構造は、1 line 電極と比較して、W1 の幅が 12.5 μm、長さが 1.5 mm の 8 本のラインに分けられ、W2 に対して均一

に配置した構造としている。8 lines 電極において、W1 と W2 の電極間距離は、6.25 μm であり、W1 と W2 の面積比は 1：9 である。図 23-a に示したように、1, 2, 4, 8・・・lines 電極では、W1 のライン数を増やすと、単位時間あたりに W1 上に析出する銀の量が増大することが分かる。また、1 line 電極を用いて、480 秒間還元した後に析出する銀（数値計算上、バルク溶液中の 70%の銀イオンを回収した場合）を、各電極構造を用いて析出させることができれば、HBs 抗原の検出限界は 0.09 IU mL^{-1} になると考えられる。例えば、その量の銀を 100 秒以内に W1 上に析出させるには、44 ライン以上に W1 を分ける必要がある。44 lines 電極では、W1 の各ライン幅は 4.55 μm であり、長さは 1.5 mm となる。W1 と W2 の電極間距離は、1.14 μm となる。44 lines 電極を用いて HBs 抗原用の免疫センサを作製すると、例えば、0.09 IU mL^{-1} の HBs 抗原を、約 22 分で検出することができる。次に、検出限界を更に低くする電極構造の設計を行う。本免疫センサでは、W2 に対する W1 の面積比を小さくすると、検出限界は低くなると考えらえる。本免疫センサにおいて、バックグラウンド電流、及びそれらのばらつき（ノイズ）は、共存する電気化学活性物質と不純物に由来し、それらの大きさは、電流測定を行う作用電極の大きさに依存すると考えられ、作用電極を微小化することにより、バックグラウウンド電流やノイズは小さくなる。ただし、本測定原理では、電気化学的な前処理を通して、W1 と W2 上に捕捉した銀ナノ粒子を、W1 上に回収するため、微小な作用電極で電流測定しても、本免疫センサにおける抗原由来のシグナルは減少しない。つまり、W2 に対する W1 の面積比を小さくしていけば、検出限界は、それに応じて下がっていくと期待される。ただし、電極形状（W1 のライン数）が同じ状態で、W2 に対する W1 の面積比を小さくすると、W1 と W2 上で酸化された銀イオンの回収・還元に長時間必要になると予想される。図 23-b は、1 line 電極（図 12）（W1 と W2 の面積比は、1：9、1：19、1：39、1：59、1：119 と変更）に対して、数値シミュレーションを用いて、W1 上に回収される銀の量（相対量）を算出し、還元時間依存性を求めた結果である。予想通り、W2 に対する W1 の面積比を小さくすると、単位時間に析出する銀の量が減少するのが確認された。また、面積比が 1：9 の 1 line 電極においては、480 秒間の還元により、バルク溶液中の約 7０%の銀イオンを W1 上に回収し（図 21）、そして、検出限界は 0.09 IU mL^{-1} HBs 抗原を示す。これに対して、面積比が 1：19、1：39、1：59、

1：119 の電極構造の場合、バルク溶液中の約 70%の銀イオンを W1 上に回収できれば、検出限界は、0.045, 0.023, 0.015, 0.008 IU mL^{-1} HBs 抗原になると予想される。ただし、W1 上への約 70%の銀イオンの回収に必要な時間は、660、880、1045、1470 秒と長くなる。そのため、上記同様に、W1 を分割していき、W2 に対して均一に配置することにより、銀イオンの回収時間を短時間にできる電極構造を設計した。例えば、W1 と W2 の面積比が 1 ： 59 の電極構造を考えた場合、酸化後のバルク溶液中の約 70%の銀イオンを W1 上に回収すれば、検出限界は、0.015 IU mL^{-1} HBs 抗原となる。面積比を 1：59 として、W1 を均等に分けていき、分けられたライン（W1）を W2 に対して規則正しく配置させた電極構造に対して、数値シミュレーションを用いて W1 上の銀イオンの回収量（相対量）の還元時間依存性を計算した。図 23-c に示すように、W1 のライン数を増やすと単位時間あたりの銀の析出量が増大することが分かる。酸化後のバルク溶液中の約 70%の銀イオンを W1 上に 300 秒以内に回収するためには、W1 を 8 ライン以上に分ける必要があることが分かった。8 lines 電極では、W1 の面積は 0.05 mm^2、W2 の面積は 2.95 mm^2 であり、面積比が 1：59 となる。W1 の各ライン幅は 4.16 μm であり、長さは 1.5 mm となる。W 2 は 1.84 mm の正方形から W1 を配置する箇所を抜き取った形状であり、W1 と W2 間の電極距離は、 16.67 μm である。最後、数値シミュレーションを用いて、検出限界が 0.002 IU mL^{-1} HBs 抗原であり、銀イオンの回収時間は 300 秒以内で達成できる電極構造を設計した。濃度（活性）が 0.002 IU mL^{-1} である HBs 抗原を検出できると、HBV が再活性化した際の B 型肝炎の早期発見が可能となり、B 型肝炎患者の治療予後状態のモニタリングに利用できる[10]。その検出限界、回収時間を可能にする電極構造は、W1 の面積が 0.0067 mm^2、W2 の面積が 3.0083 mm^2、W1 と W2 の面積比が 1：449、且つ、W1 を 60 ラインに分けた電極構造である。W1 の各ラインの幅は 74 nm であり、長さは 1.5 mm である。W2 は 1.86 mm の正方形形状から W1 を配置する箇所を抜き取った形状となる。W1 と W2 の電極間距離は、2.46 μm である。上記に示した理想的な電極構造を作製するには、現状のスクリーン印刷技術では非常に難しい。ただし、カーボンスクリーン印刷に関する技術革新により、または他のパターニング電極の作製方法（フォトリソグラフィー、ナノプリントなど）により、上記に示した非常に微細な電極構造を作製することができれば、超高感度・迅速な検出がで

きる電気化学免疫センサを開発することができると考えられる。

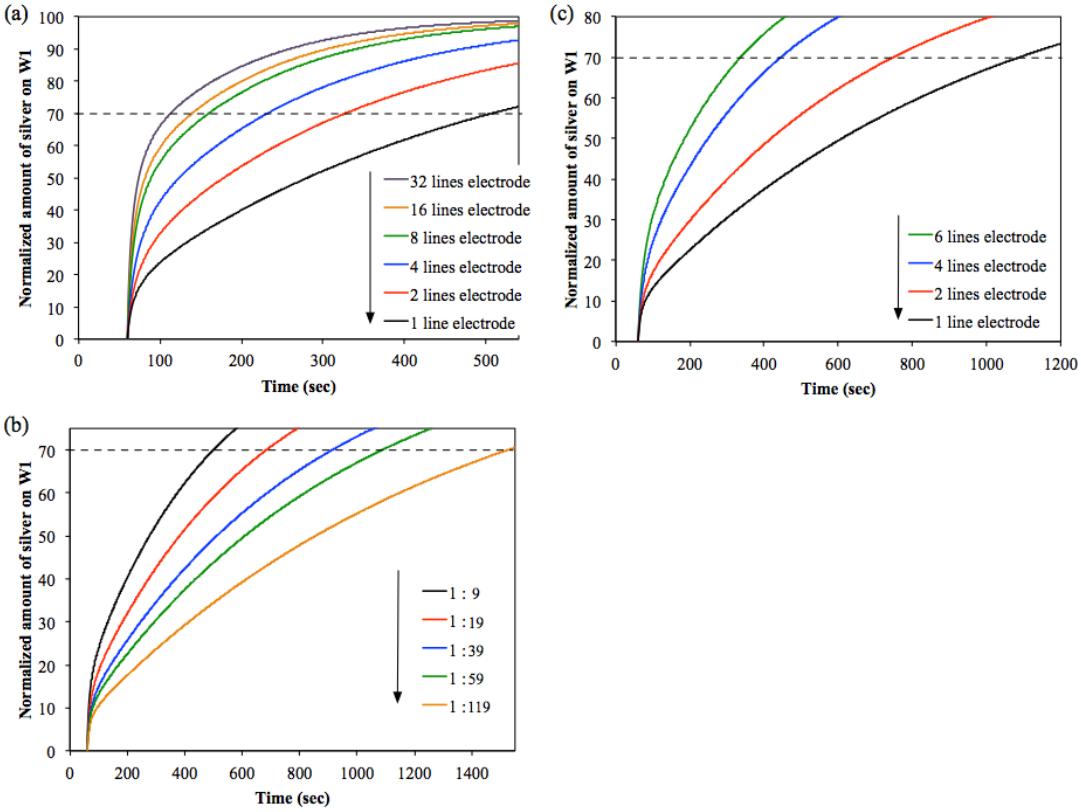

図 23 数値シミュレーションにより算出した銀イオンの回収時間依存性

(a) W1 と W2 の面積比が 1 : 9 であり、W1 を分割し、各ラインに分け、W2 に対して均等に配置した電極構造を用いた場合に、W1 上に回収される銀の量の還元（回収）時間依存性、(b) W1 と W2 の面積比が 1 : 9, 1:19, 1:39, 1:59, 1:119 であり、W1 の構造が 1 ラインの電極構造に対して、W1 上に回収される銀の量の還元（回収）時間依存性、(c) W1 と W2 の面積比が 1 : 59 であり、W1 を分割し、各ラインに分け、W2 に対して均等に配置した電極構造を用いた場合に、W1 上に回収される銀の量の還元（回収）時間依存性。

4.9 考察

本研究では、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサに使用する大小 2 つの作用電極の構造・配置を変えることにより、W1 と W1 上で酸化された銀イオンの W1 上での回収に要する時間が短くなることが確認された。また、第 3 章の結果、また本研究の結果から、2 つの作用電極の面積比により、本免疫センサの検出限界が変わることが確認された。その知見を活かし、3 次元拡散方程式を基とした数値シミュレーションを作製し、本測定原理に理想的な電極構造を設計した。電極構造の設計においては、W1 を各ラインに分

割していくという単純な方法だけを採用した。しかし、電極構造の考え方は他にも多々ある。例えば、作用電極を円形状とし、W1 をリング形状とし、W2 の中心部付近に配置する。W1 と W2 の面積の変更には、W1 のリング幅を変える、またはリングの数を増やすといった方法も考えられる。上記 4.9 で設計した W1 の形状は直線（長方形）であったが、ジグザグ形状にすることで、W2 の端付近から W1 までの距離が短くなり、結果、銀イオンの拡散距離が少し短くなり、銀イオンの回収時間が短くなる可能性もある。また、上記 4.9 では、3 次元拡散方程式を基とした数値シミュレーションを用いて、理想的な電極構造を設計した。しかしながら、現状のスクリーン印刷技術により、実際に作製することができるレベルでの理想的な電極構造を設計するのも興味深い。今回作製した数値シミュレーションは、3 次元の拡散方程式を基とし、考案した各電極構造に対して各境界条件を設定し、数値計算するという内容である。しかしながら、例えば、機械学習と組み合わせ、または現状のシミュレーションのプログラム改良により、現状のスクリーン印刷技術で作製できる電極の最小幅、面積比を設定し、銀イオンの回収時間が最短となるように電極構造を設計・見付け出せることができる数値シミュレーションができると、更に性能を向上させた高感度、迅速な電気化学免疫センサを現状の技術で開発できる可能性はある。

4.10 結論

本研究では、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサを高感度化させるために作製した大小 2 つの作用電極の構造、及び配置を改良することにより、分析時間（銀イオンの回収時間）を短時間化させることに成功した。また、実験から求めた結果と数値シミュレーションで算出した結果の比較より、本測定原理における銀イオンの回収工程は、3 次元拡散方程式に従うことを確認した。また、3 次元拡散方程式を用いた数値シミュレーションを用いて、検出感度を向上させられる電極構造、または銀イオンの回収時間を短時間化させられる電極構造を設計した。設計された電極構造は、電極幅が数 nm から数 μm と非常に細く、電極間距離も数 μm と非常に微細な構造であり、現状のスクリーン印刷技術で作製することは非常に難しい。しかしながら、フォトリソグラフィーやナノプリントといった他の微細加工技術、またはスクリーン印刷技術の更なる革新により、上記の電極構造を作製することができ

れば、検出性能を大幅に向上させた電気化学免疫センサを開発することができ、疾患の超早期発見や日常の健康モニタリングといった新たな診断を提供することができると考えられる。

4.11 数値シミュレーションのプログラム

本研究では、3 次元拡散方程式を scilab プログラム上で有限差分法を用いて解くことにより、銀イオンの回収工程後の W1 上の銀の析出量（相対量）を計算した。以下に作成した scilab プログラム[46]を示す。

```
clear; stacksize('max');
x = 108; y = 108; z = 54; 有限差分法における分割数
dx = (1.78 *10^-3)/x; 分割した際の１メモリのサイズ
Time = 1500; 酸化時間
dt = 10^-2;  数値シミュレーション上の単位時間
D =  3.0*10^-9;  拡散係数
r_x = D*dt / (dx^2);  r_y = D*dt / (dx^2);  r_z = D*dt / (dx^2);  有限差分法における係数
UU = zeros(x, y, z);
UU(1:44, :, 1) = 1; UU(48:59,1:91, 1) = 1;UU(45:62,95:y,1) = 1; UU(63:x, :, 1) = 1; 初期条件
P_x = toeplitz([-2*r_x, r_x, zeros(1, x-2)]);
P_y = toeplitz([-2*r_y, r_y, zeros(1, y-2)]);
P_z = toeplitz([-2*r_z, r_z, zeros(1, z-2)]);
＜酸化工程＞
T = 1;
for t = 1 : Time
    for i = 1: x
        Z(:,:,i) = (P_z * matrix(UU(i,:,:),[x z])')';
    end
        for k = 1 : z
          XY(:,:,k) = P_y * matrix(UU(:,:,k),[x y]) + (P_x * matrix(UU(:,:,k),[x y])')';
          a_Z(:,:,k) = matrix(Z(:,k,:),[x y])';
```

```
        end
```

＜境界条件＞

```
    UU(1:44, :, 1) = 1;
    UU(45:47,1:94, 1) = UU(45:47,1:94, 2);
    UU(48:59,1:91, 1) = 1; UU(48:59,92:94,1) = UU(48:59,92:94,2);
    UU(60:62,1:94, 1) = UU(60:62, 1:94, 2);
    UU(63:x, :, 1) = 1;
    UU(45:62,95:y,1) = 1;
    UU(x, :, :) = UU(x-1, :, :);
    UU(:, y, :) = UU(:, y-1,:);
    UU(:, :, z) = UU(:, :, z-1);
    UU(:, 1, :) = UU(:, 2, :);
    UU(1, :, :) = UU(2, :, :);
    a = [1:x];
    b = [1:y];
    c = [1:z];
    if t == T then
        resi = sum(UU(a,b,c));
        cons = (start-resi)/start;
        printf("%f¥n", resi);
        T = T + 100;
    end
 end
```

＜還元工程＞

```
Time = 48001;
U = UU;
U(48:59,1:91,1) = 0;  電極表面の銀イオン濃度を 0 とする。
P_x = toeplitz([-2*r_x, r_x, zeros(1, x-2)]);
P_y = toeplitz([-2*r_y, r_y, zeros(1, y-2)]);
P_z = toeplitz([-2*r_z, r_z, zeros(1, z-2)]);／
i = [1:x];  j = [1:y];  k = [1:z];  start = sum(U(i,j,k));  disp(start);  銀イオン
の初期濃度
```

```
T = 1;
for t = 1 : Time
    for i = 1: x
        Z(:,:,i) = (P_z * matrix(U(i,:,:),[x z])')';
    end
 //
    for k = 1 : z
        XY(:,:,k) = P_y * matrix(U(:,:,k),[x y]) + (P_x * matrix(U(:,:,k),[x y])')';
        a_Z(:,:,k) = matrix(Z(:,k,:),[x y])';
    end
    U = U + XY + a_Z //+ a_X;
```

＜境界条件＞

```
    U(48:59,1:91,1) = 0;
    U(1:47,1,1) = U(1:47,2,1);
    U(60:x,1,1) = U(60:x,2,1);
    U(x,:,:) = U(x-1,:,:);
    U(:,y,:) = U(:,y-1,:);
    U(1,:,:) = U(2,:,:);
    U(:,1,2:z) = U(:,2,2:z);
    U(48:59,92:y,1) = U(48:59,92:y,2);
    U(48:59,y,:) = U(48:59,y-1,:);
    U(48:59,:,z) = U(48:59,:,z-1);
    U(48:59,1,2:z) = U(48:59,2,2:z);
    U(1:47,1,:) = U(1:47,2,:);
    U(1:47,y,:) = U(1:47,y-1,:);
    U(1:47,:,1) = U(1:47,:,2);
    U(1:47,:,z) = U(1:47,:,z-1);
    U(60:x,1,:) = U(60:x,2,:);
    U(60:x,y,:) = U(60:x,y-1,:);
    U(60:x,:,1) = U(60:x,:,2);
    U(60:x,:,z) = U(60:x,:,z-1);
    U(1:47,1:91,1) = U(1:47,1:91,2);
```

```
    U(60:x,1:91,1) = U(60:x,1:91,2);
    U(x,1:91,:) = U(x-1,1:91,:);
    U(:,1:91,z) = U(:,1:91,z-1);
    U(1,1:91,:) = U(2,1:91,:);
    U(x,92:y,:) = U(x-1,92:y,:);
    U(1,92:y,:) = U(2,92:y,:);
    U(:,92:y,z) = U(:,92:y,z-1);
    U(:,92:y,1) = U(:,92:y,2);
a = [1:x]; b = [1:y]; c = [1:z];
    <銀の析出量の算出>
    if t == T then
        resi = sum(U(a,b,c));
        cons = 100*(start-resi)/start;
        printf("%f¥n", cons);
        T = T + 100;
    end
end
```

第 5 章　簡易化への取り組み

5.1 序

上記の第 2, 3, 4 章で研究開発してきた銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサでの検出フローは、①サンプルと銀ナノ粒子標識を含んだ溶液を混合し、作用電極上に滴下し、抗原・抗体反応を行い、電極上に抗原を捕捉し、免疫複合体を銀ナノ粒子で標識する。②反応液を除去し、洗浄液（PBS と MilliQ）で洗浄し、最後に、電極を窒素ガスで乾燥させる。③電極上に電解液を滴下し、電気化学的前処理を行った後、DPV により酸化電流を測定し、HBs 抗原を定量検出する(図 23)。つまり、従来のヘテロジーニアスイムノアッセイ同様、洗浄の操作が必要であり、溶液置換の工程や専用の洗浄液が必要となる[35, 47, 48]。本研究では、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサにおける検出フローを簡易化し、ユーザビリティを向上させることを目的としている。本章の一部は、論文 Sensing and Biosensing research（5 (2015) 78 – 83）に投稿した研究内容である[49]。

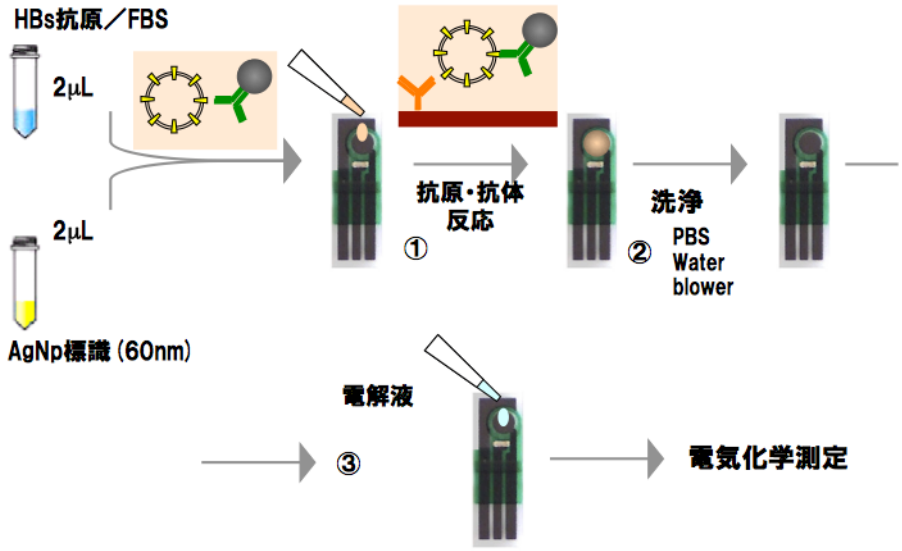

図 24　銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサにおける従来の検出フロー

検出フローの概略図（第 2 章で行った研究での検出フロー図であり、第 3, 4 章では図とは異なる電極を使用しているが、検出フローは同じである)。①サンプルと銀ナノ粒子標識を混合し、作用電極上に滴下し、抗原・抗体反応により電極上に抗原を捕捉、免疫複合体を銀ナノ粒子で標識する。②混合液を除去し、洗浄液（PBS と MilliQ）で電極を洗浄し、電極を乾燥させる。③電極上に電解液を滴下し、電気化学的前処理を行った後、DPV 測定する。

5.2 簡易化に対するコンセプト

簡単にタンパク質を検出する方法としては、以前より研究開発されているホモジーニアスイムノアッセイが挙げられる[50, 51]。ホモジーニアスイムノアッセイは、特異的に結合したターゲット分子（と標識）と未結合のターゲット分子（と標識）の分離（B/F 分離）を行わないイムノアッセイである。本免疫センサでも、ホモジーニアスイムノアッセイにより HBs 抗原を高感度に検出できるか検証した。HBs 抗原や銀ナノ粒子標識を含んだ溶液を除去せず（洗浄を行わず）に、電気化学測定を行うため、ブランクサンプル（抗原濃度が 0 IU mL^{-1}）に対する電流値（ノイズ）が非常に大きく、高感度に HBs 抗原を検出することが出来なかった（検出限界は 6.25 IU mL^{-1} であった）。そのため、ヘテロジーニアスイムノアッセイである従来の検出フローを基として、ホモジーニアスイムノアッセイに近づけていく方法を試みた。その方法は、図 25 に示すような検出フローである。本検出フローでは、①サンプルと銀ナノ粒子標識を含んだ溶液を作用電極上に滴下し、抗原・抗体反応を行い、電極上に抗原を捕捉し、免疫複合体を銀ナノ粒子で標識する。②電気化学測定に使用する電解液中に電極を浸漬し、その後、電気化学的前処理、DPV により酸化電流を測定し、HBs 抗原を定量検出する。つまり、従来の免疫センサの検出フローと比べると、専用の洗浄液（PBS や MilliQ）を用意する必要なく、且つ洗浄液での洗浄工程を省き（電気化学測定用の電解液で洗浄するため）、また溶液置換や乾燥工程といった工程も行わない。つまり、本検出フローが成り立てば、ユーザーフレンドリーな免疫センサになると期待される。

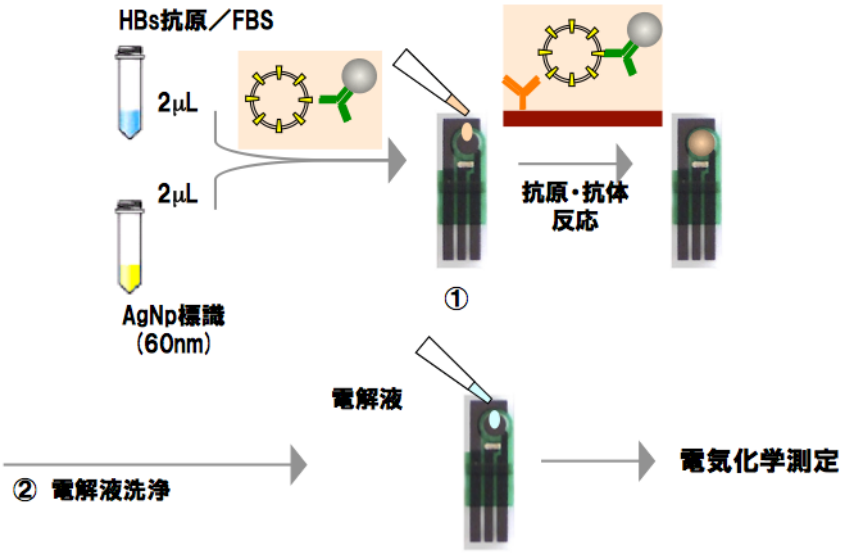

図 25 銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサにおける新規の検出フロー

新規検出フローの概略図：①サンプルと銀ナノ粒子標識を混合し、作用電極上に滴下し、抗原・抗体反応により電極上に抗原を捕捉、免疫複合体を銀ナノ粒子で標識する。②電解液中に電極を浸漬し、電解液で電極を洗浄する。その後、電極上に電解液を滴下し、電気化学的前処理を行った後、DPV 測定する。

5.3 簡易化に対するコンセプト検証

図 25 に示した検出フローで抗原を検出することができるのか、またその際のシグナルやノイズはどの程度なのか検証した。まず、抗原・抗体反応後に、反応溶液は作用電極上に残った状態で、0.1 M 塩酸 200 μL の中に電極を挿入し、軽く振盪した後、電極を取り出し、ポテンショスタットに接続し、0.1M 塩酸 20uL を滴下し、電気化学的前処理を行い、最後に DPV で電流を測定した。つまり、本プロトコルでは、専用の洗浄液を用いた洗浄工程を無くしただけであり、電解液は従来から使用している塩酸を使用している。しかし、単純に専用の洗浄液を使った洗浄工程を省くだけでは、従来の検出フローに比べて、ブランクサンプル (0 IU mL^{-1}) に対して測定された電流値 (ノイズ) は大きく、高感度に検出することが出来なかった（図 26)。図 25 で示した検出フローで高感度に HBs 抗原を検出するには、電気化学測定に使用する電解液で洗浄が行えるように、電解液の組成を検討する必要がある。

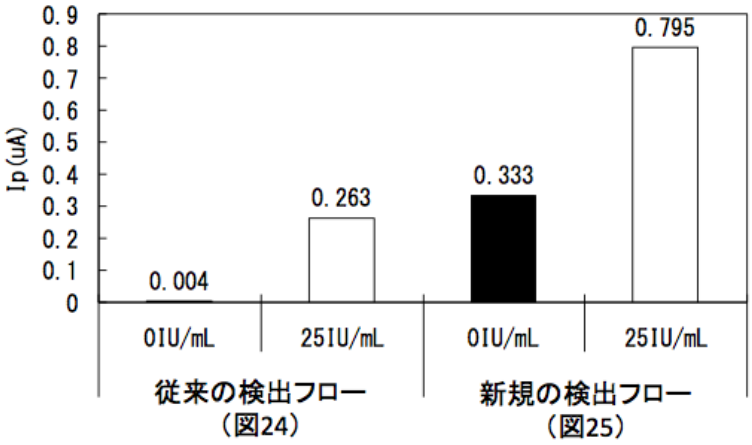

図 26　従来の検出フローと新規の検出フローで HBs 抗原を検出した結果

図 24 または図 25 で示した検出フローで HBs 抗原を検出した結果；電解液には 0.1 M HCl を使用している。従来の検出フローの方がノイズが低いため、S/N 比が非常に高い（従来：65、新規：1.4）。

近年、ナノ粒子（主に金ナノ粒子）とコラーゲンや BSA といった生体材料を固定した基板表面間の相互作用に関する研究が盛んに行われている[]。上記の相互作用の中で、静電的相互作用が中心的な役割を担っていることが確認されている。また、その静電的相互作用に影響を与える pH が生体材料固定基板へのナノ粒子の固定（量）を変化させる、制御因子であると言われている[52-59]。本研究でも pH に注目し、pH を変えることで、上記の簡易化に対するコンセプトが成立するのではないかと考えた。図 27 には、従来の免疫センサにおいて使用されてきた電解液である塩酸（pH 1.5）に代わり、塩化ナトリウム水溶液（pH5.2）を用いた場合の結果を示す。塩酸を用いた場合、ブランクサンプル（0 IU mL^{-1}）対して測定された酸化ピーク電流値（ノイズ）が非常に大きく、高感度に HBs 抗原を検出することは難しかった。しかし、塩化ナトリウム水溶液を用いた場合、ブランクサンプル（0 IU mL^{-1}）対して測定された酸化ピーク電流値（ノイズ）は非常に小さく、且つ HBs 抗原を含んだサンプルに対して測定された酸化ピーク電流値（シグナル）は従来の検出フロー以上の値であった。つまり、図 25 に示した専用の洗浄液を用いた洗浄工程を無くすことができ、且つ各溶液置換や乾燥工程といった煩雑な工程が必要無くなる可能性を見出された。以下では、実際に pH がカーボン電極表面と銀ナノ粒子標識間の静電気的相互作用、つまりは非特異吸着量に寄与

しているのか、また、その寄与は静電的相互作用に由来するものなのか、そして図 25 で示した新規の検出フローを用いた場合でも、高感度に HBs 抗原を検出することはできるのか、検証した。

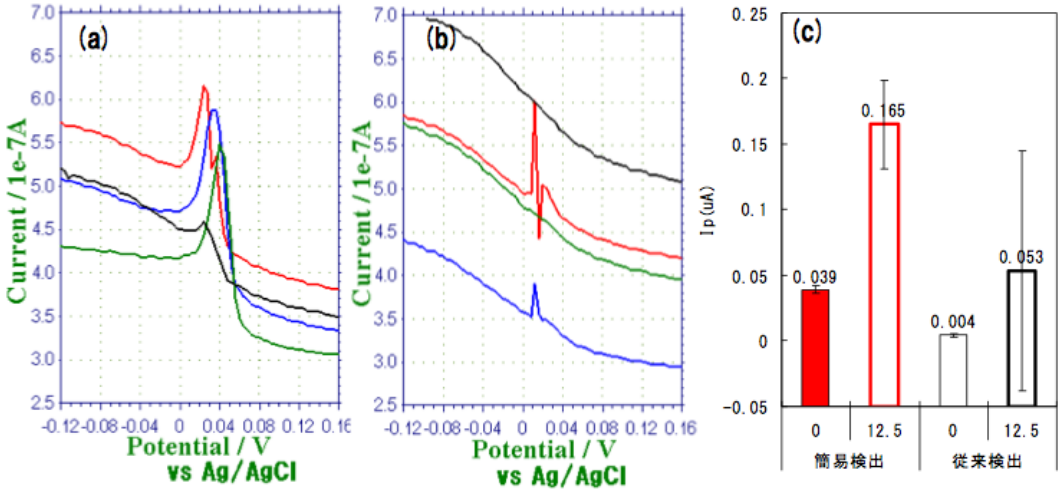

図 27　従来の検出フローと新規の検出フローで HBs 抗原を検出した結果

(a) 図 25, (b) 図 24 で示した検出フローで HBs 抗原を検出した結果；電解液には 0.05 M NaCl を使用した。(c) (a)と(b)の酸化ピーク電流値（ピーク値からベースラインを引いた値）。

5.4 実験

5.3.1 銀ナノ粒子を用いた標識の作製

銀ナノ粒子上に 2 次 HBs 抗体を以下のように固定した（銀ナノ粒子標識）。銀ナノ粒子（直径 60 nm, 1.7 × 10^{10} 個／mL；シグマアルドリッチ）を含んだ水溶液 900 μL に、1.0 M の塩酸を加え、pH を 7.0 に調整した。pH を調整した銀ナノ粒子の水溶液に、2 次 HBs 抗体濃度が 100 μg mL^{-1} になるようにリン酸緩衝液を用いて調整した溶液を 100 μL 添加した。更に、2 次 HBs 抗体を固定した銀ナノ粒子のチューブへの非特異吸着を抑制するために、10 % (w/v) Tween 20 を 10.1 μL 添加した。その後、室温で 60 分間静置させた。静置後、混合溶液に 1% (w/v) BSA を含んだ TBS-T（トリス緩衝食塩水に 0.1% Tween20 を混合した水溶液)を 400 μL を添加し、BSA を用いて、2 次抗体が固定されずに露出する銀ナノ粒子表面をブロッキングした。その後、混合液を遠心処理（x7000g, 4℃, 25 分）し、銀ナノ粒子に固定されなかった未結合の 2 次抗体や BSA を含む上澄み液を除去した。その後、1% BSA / TBS-T を 1mL 添加し、再度分散させ、遠心処理を行い、上澄み液を除去し

た。この操作を更に 2 回繰り返し、チューブ内から未結合の抗体を除去した。最後の操作では、1% BSA / TBS-T ではなく、1% BSA / PBS-T (1% (w/v) BSA と 0.01% Tween 20 を含んだリン酸緩衝生理食塩水)を 200 μL 加え、以下の HBs 抗原の検出を行った。

5.3.2 HBs 抗原検出用電気化学免疫センサの作製

スクリーン印刷カーボン電極 (DEP-Chip : 有限会社バイオデバイステクノロジー) を電気化学免疫センサの電極として使用した。DEP-Chip はカーボン作用電極、カーボン対向電極、銀／塩化銀参照電極から成る。作用電極上に、1 次 HBs 抗体（銀ナノ粒子に固定した 2 次 HBs 抗体とは HBs 抗原の異なる箇所（エピトープ）を認識する）濃度が 100 μg mL^{-1} になるように、pH 8.5 の炭酸緩衝液で調整し、3 μL を滴下し、室温、高湿度下で 2 時間静置させ、1 次 HBs 抗体を電極上に固定した。1 次抗体を固定後、未結合の 1 次抗体を含む溶液を除去し、PBS で洗浄した。その後、3% (w/v) BSA と 5% PEG（分子量 : 20,000 ）/ PBS を 4 μL 滴下し、4℃、高湿度下で一晩静置し、1 次抗体が固定されずに露出した作用電極表面をブロッキングした。その後、ブロッキング溶液を除去し、PBS で電極を洗浄した。

5.3.3 抗原・抗体反応

HBs 抗原のキャリブレータ（シスメックス株式会社）2500 IU mL^{-1} をウシ胎児血清（FBS）で 1/50 に希釈し、50 IU /mL の HBs 抗原／FBS を作製した。その後、目的濃度の HBs 抗原／FBS を得るために、FBS を用いて希釈し、モデル検体 HBs 抗原／FBS を作製した。各濃度の HBs 抗原／FBS を 2 μL と上記 5.3.3 で作製した銀ナノ粒子標識 2μL を混合し、続いて、W1 と W2 上に滴下し、室温、高湿度下で 90 分間静置させた。

5.3.4 洗浄液と電解液を兼用した溶液での電気化学測定

塩化物イオン濃度が 0.05M となるように、塩化ナトリウム水溶液に塩酸または水酸化ナトリウムを加え、且つ pH が 1.5 から 10.7 の範囲である溶液（以下、兼用液と呼ぶ）を作製した。上記 5.3.3 の抗原・抗体反応後、作用電極には反応溶液が滴下されたままの状態である。そのため、兼用液 200 μL の中に電極を挿入し、兼用液を軽く振盪させた。その後、電極を取り出し、ポテン

ショスタットに接続し、上記で使用した兼用液と同じ兼用液を 20 μL を、対向電極、作用電極、参照電極が兼用液で覆われるように、滴下した。続いて、作用電極に、2.1V を 30 秒間印加した。そして、作用電極に−1.0V を 140 秒間印加した。最後に、微分パルスボルタンメトリーにより、作用電極上に析出した銀を再度酸化させる際に流れる酸化電流を測定した。微分パルスボルタンメトリーの測定条件は、−0.4V から 0.4V をステップ幅 4mV、パルス幅 50mV、パルス時間 0.2 秒で電位走査している。

5.3.5 各材料のゼータ電位及び粒子径の測定

カーボン作用電極の模擬材料として、グラファイト粉末（シグマアルドリッチ）を利用した。グラファイト粉末を炭酸緩衝液（pH 8.5）に浸漬し、1 次 HBs 抗体濃度が 100 μg/mL となるように調整した溶液を添加し、室温、2 時間静置し、グラファイト粉末に 1 次 HBs 抗体を固定した。静置後、遠心処理により、未結合の 1 次抗体を含んだ上澄み液を除去し、PBS を添加し、グラファイト粉末を再分散させた。再度、遠心処理により上澄み液を抜き、PBS に再分散させた。次に、遠心処理を行い、上澄み液を抜いた後、ブロッキング溶液（3% BSA と 5%PEG を含んだ PBS）を入れ、4℃で一晩静置した。静置後、遠心処理で、ブロッキング溶液を除去し、その後、PBS を添加し、再分散した。この処理を更に 2 回実施した。最後に遠心処理後、各 pH に調整した兼用液中に、1 次 HBs 抗体を固定したグラファイト粉末を分散させた。上記 5.3.1 で作製した銀ナノ粒子標識を 2 μL または銀ナノ粒子を含んだ水溶液 2 μL を、各 pH に調整した兼用液 198 μL に混合した。各材料のゼータ電位、または粒子径は、ゼータサイザー Nano ZS（Malvern 社）を用いて測定した。兼用液は、塩化物イオン濃度が 0.05M となるように、pH が 1.4 から 11.7 の範囲になるように、塩化ナトリウム水溶液に塩酸または水酸化ナトリウムを加えた水溶液である。

5.3.6 銀ナノ粒子標識の非特異吸着量の評価

上記 5.3.3 に示した抗原・抗体反応後、作用電極には反応溶液が滴下されている状態である。その状態で、各 pH の兼用液 200 μL 中に電極を浸漬し、軽く振盪させ、洗浄を行った。その後、電極を取り出し、窒素ガスを用いて電極表面を乾燥させた。乾燥させた電極表面を電界放出型の電子顕微鏡

（FE-SEM；日本電子株式会社）を用いて観察した。各電極に対して 15 箇所の観察を行った。次に、電子顕微鏡で観察した各電極をポテンショスタットに接続し、対向電極、作用電極、参照電極が覆われるように、pH を 3.0 に調整した 0.05M の塩化ナトリウム水溶液を滴下し、作用電極に 2.1V を 30 秒間印加した。続いて、作用電極に−1.0V を 240 秒間印加した。最後に、微分パルスボルタンメトリーにより W1 上に析出した銀を再度酸化させる際に流れる酸化電流を測定した。微分パルスボルタンメトリーの測定条件は、−0.4V から 0.4V をステップ幅 4mV、パルス幅 50mV、パルス時間 0.2 秒で電位走査している。兼用液は、塩化物イオン濃度が 0.05M となるように、また pH が 3.0 から 10.1 の範囲になるように、塩化ナトリウム水溶液に塩酸または水酸化ナトリウムを加えた水溶液である。

5.5 銀ナノ粒子標識の非特異吸着量の pH 依存性評価

図 25 に示した新規の検出フローにおいて、洗浄と電気化学測定に使用する兼用液の pH が銀ナノ粒子標識の非特異吸着量にどれくらい影響を与えるのかを評価した（実験 5.3.6 参照）。各 pH の兼用液で処理した電極表面を FE-SEM を用いて観察し、電極表面に存在する銀ナノ粒子の密度（particles μm^{-2}）を算出した結果を図 5-3 に示す。また、図 28-a または b には観察した電極表面の一例を示したが、図の矢印は銀ナノ粒子を示す。図 28-c で示されているように、HBs 抗原が存在するサンプル（50 IU mL^{-1}）に対し、電極上の銀ナノ粒子密度（特異的に捕捉した銀ナノ粒子）は、兼用液の pH に関係なく、ほぼ一定であった。つまり、抗原・抗体反応により、作用電極上に特異的に捕捉された銀ナノ粒子は、兼用液の酸性・アルカリ性の影響を受けていないことと考えられる。ただし、HBs 抗原を含んでいないブランクサンプル（0 IU mL^{-1}）に対して算出した銀ナノ粒子の密度（非特異的に電極表面に吸着した銀ナノ粒子）は、兼用液の pH が 3.0 の場合に高い結果であった。ただし、図 28-c から分かるように、他の pH との差は非常に小さく、明確に見分けるためには別の評価が必要である。電子顕微鏡を用いた観察では、μm^2 の領域に関する情報を得ることはできるが、電極全体（mm^2）の情報は得がたい。そのため、電子顕微鏡で観察した各電極に対して、電気化学測定（測定に pH 3.0 の電解液を使用）を行った（上記 5.3.6 参照）。図 28-d から分かるように、HBs 抗原が存在するサンプル（50 IU mL^{-1}）に対して測定された

酸化ピーク電流値（シグナル）は、兼用液の pH に関係なく一定であった。図 16-c の FE-SEM の観察結果と同様のことを示しており、作用電極上に特異的に捕捉された銀ナノ粒子の量は、pH の影響を受けにくいと考えられる。そして、HBs 抗原を含んでいないブランクサンプル（0 IU mL^{-1}）に対して測定された酸化ピーク電流値（ノイズ）は、兼用液の pH に依存する結果であった。兼用液の pH が高い場合、ノイズは下がる、つまり非特異吸着した銀ナノ粒子の量が減少している傾向であった。このことより、pH の高い兼用液を使用することにより、銀ナノ粒子標識の非特異吸着を抑制できることが示唆された。次に、図 28 に示した銀ナノ粒子の非特異吸着量の pH 依存性が静電的相互作用に由来するものなのかを調べた。

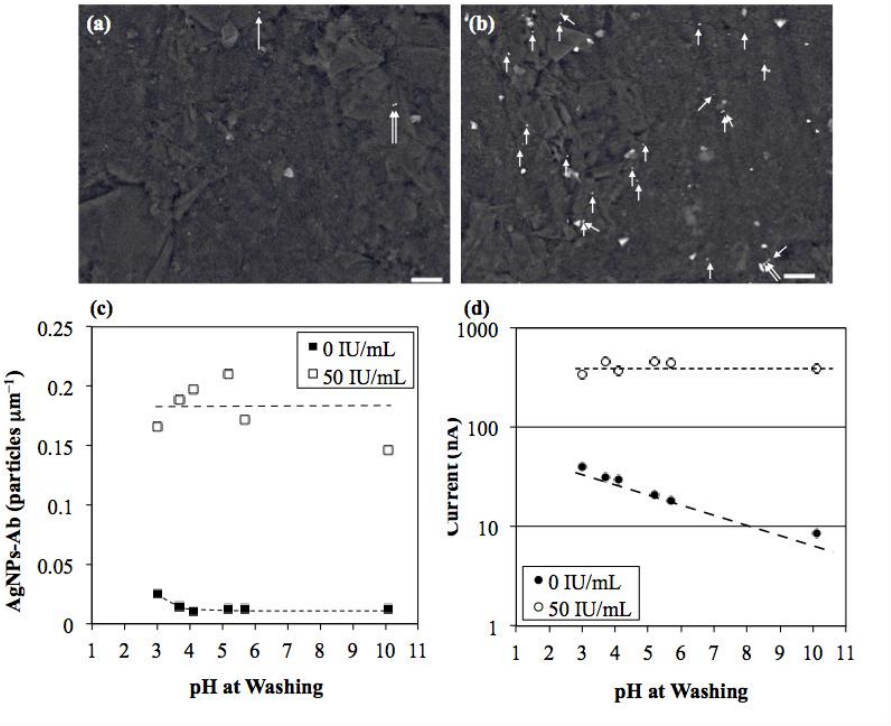

図 28 銀ナノ粒子の非特異吸着量の pH 依存性

各 pH の兼用液で洗浄した際に、銀ナノ粒子標識の電極上への非特異吸着量の pH 依存性を評価した結果；(a) 0 IU mL^{-1} HBs 抗原、(b) 50 IU mL^{-1} HBs 抗原の存在下で抗原・抗体反応を行い、pH3.0 の兼用液で洗浄した後に、電極表面を FE-SEM で観察した結果。スケールーバーは 500nm である。(c)抗原・抗体反応後、各 pH の兼用液で洗浄し、その後、電極表面を FE-SEM で観察し、銀ナノ粒子の密度を算出し、銀ナノ粒子密度の pH 依存性を示した結果。(d)FE-SEM 観察した電極を、pH 3.0 の兼用液に浸漬させ、電気化学測定を行った際に測定された酸化ピーク電流値の pH 依存性（pH は FE-SEM 観察前に洗浄で使用した兼用液の pH を示す)。

5.6 非特異吸着への静電的相互作用の影響

1 次 HBs 抗体を固定したグラファイト粉末（以下、模擬電極）または 2 次 HBs 抗体を固定した銀ナノ粒子（以下、銀ナノ粒子標識）のゼータ電位の pH 依存性を図 29-a に示す。模擬電極のゼータ電位は、pH 3.5 付近で等電点となっており、3.5 より高いと負となり、3.5 より低いと正になっている。また、グラファイト粉末のみに比べ、ゼータ電位は全体的に 6mV 程度高くなっていた。グラファイト上に、1 次 HBs 抗体や BSA、PEG が固定されたためだと考えられる。銀ナノ粒子標識のゼータ電位は、pH が 3.0 より高いと負になることが確認された。銀ナノ粒子標識も同様に、銀ナノ粒子単体のゼータ電位（−70mV）に比べ、高かった（pH は 5 から 10 の範囲）。銀ナノ粒子表面上に固定・吸着させた 2 次 HBs 抗体（等電点：7.0）や BSA（等電点：4.7）に由来するものだと考えられる。ただし、pH が低い、または高い場合、銀ナノ粒子は凝集してしまうため、ゼータ電位を正確に測定することが出来なかった。また、銀ナノ粒子標識と銀ナノ粒子の粒子径の測定結果（図 29-b）から分かるように、pH が 5 から 10 の範囲では、銀ナノ粒子の直径が 58 nm（カタログ情報：60nm）であるのに対し、銀ナノ粒子標識は 70 nm であり、2 次 HBs 抗体が銀ナノ粒子上に固定されていることを示している結果である。ただし、pH が低い場合、60 nm 程度まで小さくなっている。つまり、銀ナノ粒子上に固定されていた 2 次 HBs 抗体がはずれていることが考えられる。また、pH が低い場合（pH < 2.0）、銀ナノ粒子標識のゼータ電位を正確に測定することが出来ていない。pH の影響により、銀ナノ粒子上に固定されていた 2 次 HBs 抗体、銀ナノ粒子表面上から剥がれ、銀ナノ粒子同士が凝集し始めたために、正確にゼータ電位を測定することが出来なかったと考えられる。また、銀ナノ粒子標識のゼータ電位の pH 依存性から、pH が高くなるとゼータ電位が低くなる傾向が見られる。この傾向は、2 次 HBs 抗体または BSA 上にあるカルボキシル基の脱プロトン化に由来し、負側にシフトしたためだと考えられる[57-59]。模擬電極と銀ナノ粒子標識のゼータ電位の測定結果より、pH が 3.5 より低く、且つ、3.0 より高い場合、電極表面の電位は正であり、銀ナノ粒子標識は負のため、電極表面と銀ナノ粒子標識間には、静電的引力が働き、非特異的な吸着が促進されると考えられる。pH が 3.5 より大きい場合、電極表面の電位は負であり、銀ナノ粒子標識も負となるため、電極と銀ナノ粒子標識間には静電的斥力が働き、非特異的な吸着は抑制される。

更には、pH が高い場合、その静電的斥力は強まるため、非特異吸着量はより抑制されると考えられる。実際に図 28-c または d に示された銀ナノ粒子標識の非特異吸着量の pH 依存性の結果も、上記のゼータ電位の測定結果から予想される結果（pH が 3.5 以下では非特異吸着量は多く、pH が 3.5 より高いと非特異吸着量は抑制され、更に pH が高くなると、非特異吸着量は更に抑制される）となっている。

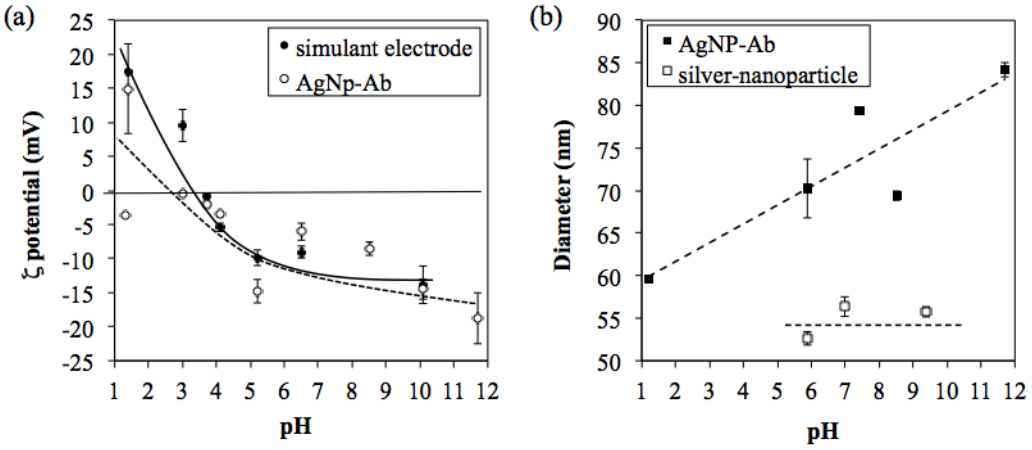

図 29 各材料のゼータ電位または銀ナノ粒子とその標識の pH 依存性

(a) 模擬電極（1 次抗体を固定したグラファイト粉末）のゼータ電位、または銀ナノ粒子標識のゼータ電位の pH 依存性、(b)銀ナノ粒子または銀ナノ粒子標識の粒子径の pH 依存性。引用論文[49]の図を使用した。

5.7 兼用液の最適化

図 25 で示した新規の検出フローで HBs 抗原を検出した場合でも、兼用液の pH を調整することにより、非特異吸着量を抑制できること、また、その抑制には静電的な斥力が大きく寄与していることが確認された。ただし、図 25 で示した検出フローに対して最適な兼用液の pH を選択する必要がある。pH が 1.5 から 11.7 の兼用液を用いて、図 25 の検出フローで HBs 抗原を検出し、兼用液の pH 最適化を行った。結果を図 30 に示す。HBs 抗原を含まないブランクサンプル（0 IU mL^{-1}）に対して測定された酸化ピーク電流値（ノイズ）は、兼用液の pH が 3.0 の場合に最大であり、3.0 より高く（4.1 以上）なると、劇的に減少した。また、3.0 より低い（pH1.5）では、ノイズのばらつきが大きかった。ゼータ電位の測定結果（図 29-a）と同様の傾向があることを確認した。つまり、pH が 3.5 以上の水溶液中では、電極表面と銀ナノ粒

子標識間には静電的斥力が働くために、銀ナノ粒子標識の非特異吸着が抑制され、ノイズが低下したと考えられる。ただし、HBs 抗原を含んだサンプル（10 IU mL^{-1}）に対して測定された酸化ピーク電流値（シグナル）は、兼用液の pH が高くなるにつれて、下がる傾向を示した。この減少傾向は、特異的に電極上に結合した銀ナノ粒子標識量の差に由来するものではなく（図 28-c または d 参照）、pH により、作用電極に印加される酸化電圧または還元電圧に差が生じたためだと考えられる。図 25 で示した検出フローにおけるシグナルの pH 依存性に関しては、更なる調査が必要である。ただし、今回の結果、pH 4.1 の兼用液を使用した場合に、S/N 比が最大になることが分かった（図 30-b）。pH が 3.5 より高い兼用液では、銀ナノ粒子標識の非特異吸着が抑制され、ノイズが劇的に下がったために、pH 4.1 において、S/N 比が最大になったと考えられる。

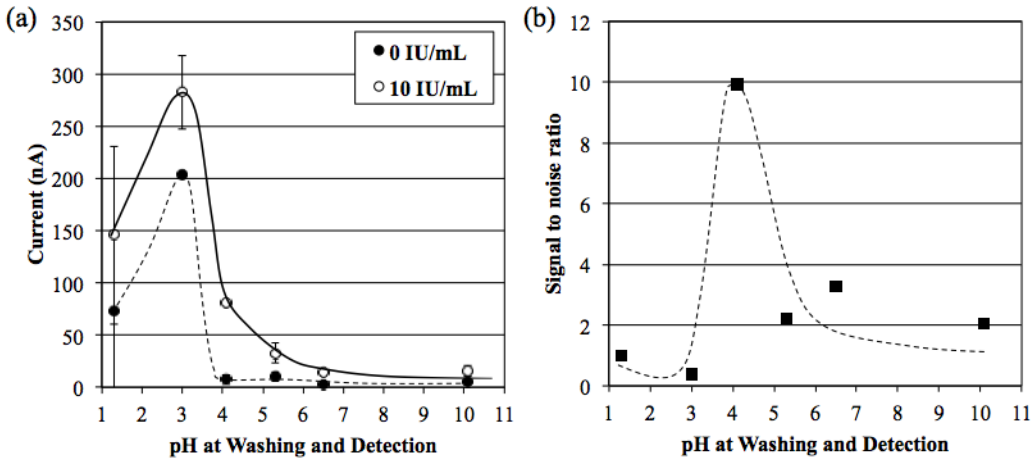

図 30 新規検出フローにおけるシグナルとノイズの pH 依存性

(a) 0 または 10 IU mL^{-1} HBs 抗原を、図 25 で示した検出フローで、pH が 1.5～10.7 の兼用液を用いて検出した時に測定された酸化ピーク電流値の pH（兼用液）依存性。(b) (a)から算出した S/N 比である。引用論文[49]の図を使用した。

5.8 性能評価

pH 4.1 の兼用液を用いて、簡易化した場合（図 25 の検出フローで）の免疫センサの性能評価を行った。比較用として、従来の検出フロー（図 24）の免疫センサの検出性能も評価した。従来の免疫センサでは、抗原・抗体反応後、反応溶液を除去し、PBS で洗浄、MilliQ で洗浄、更に電極を窒素ガスで乾燥させ、pH を 3.0 に調整した電解液（塩化ナトリウム水溶液）を滴下し、

電気化学測定を行っている。簡易化した場合の検出限界は 0.78 IU mL^{-1} HBs 抗原であった。従来の免疫センサの検出限界は 0.5 IU mL^{-1} であった（ELISA と同等性能であった）[42, 60]。本性能評価より、従来の免疫センサに比べると、簡易化した場合、検出限界は約 1.6 倍高い結果であった。しかしながら、上記に示した通り、簡易化した新規の検出フローでは、専用の洗浄液を用いた洗浄工程や電極の乾燥工程、溶液置換といった煩雑な工程を省くことができている。

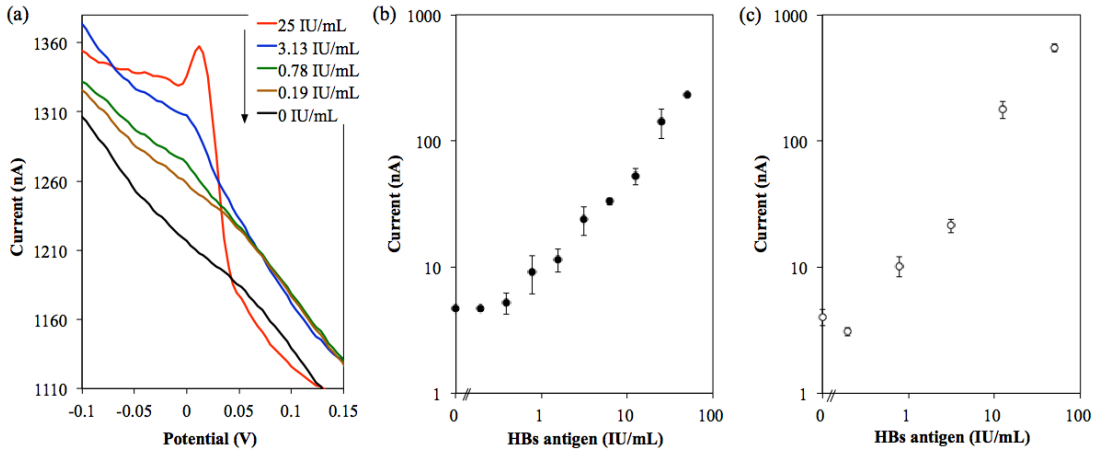

図 31 簡易検出フローでの HBs 抗原に対する検量線

(a) 0～50 IU mL^{-1} HBs 抗原存在下にて、抗原・抗体反応を行った後、電極を pH 4.1 の電解液の中に浸漬させ、その後、電極を取り出し、pH 4.1 の電解液を滴下して、電気化学的前処理（酸化・還元）を行い、最後に DPV により測定された電流波形。(b) (a)のピーク値からベースラインを引いた電流値を HBs 抗原濃度に対してプロットした検量線。(c)従来の検出フロー（抗原・抗体反応後に、PBS と MilliQ で洗浄し、電極を乾燥させ、電解液（pH 3.0）を滴下し、電気化学的前処理を行い、DPV により測定した酸化ピーク電流を HBs 抗原濃度に対してプロットした検量線。各酸化ピーク電流値は 3 つの免疫センサを用いて評価した結果の平均値であり、各エラーバーは標準偏差である。引用論文[49]の図を使用した。

5.9 考察

本研究では、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサにおける検出フローの簡易化に取り組んだ。pH を調整して、洗浄液と電解液とを兼用できる兼用液を作製したことにより、従来の免疫センサで実施されていた煩雑な工程（専用洗浄液での洗浄工程、乾燥工程、溶液置換など）を省くことができた。しかしながら、検出限界は従来の免疫センサに比べ、劣る結果であった。検出性能を向上させる方法について以下に考える。検出フローを簡易化した場合

の検出限界は 0.78 IU mL^{-1} であったが、電気化学測定の条件は、第 2 章の 2.4.3 で最適化された電気化学測定条件を採用している。ただし、その条件は、電解液として 0.05M の塩酸（pH 2.0）を使用し、且つ、洗浄工程や乾燥工程、溶液置換を行う検出フローに対して最適化した条件である。今回の簡易化した検出フローで、使用する兼用液に対して電気化学的な前処理条件を最適化する必要がある。これにより、pH が 3.5 より高い兼用液を用いた場合の HBs 抗原を含んだサンプルに対する酸化ピーク酸化電流値は増大すると考えらえる。電気化学測定条件を最適（変更）した場合でも、ノイズは増大しないと考えられる。用いた兼用液の pH は、電極表面と銀ナノ粒子標識間に静電的斥力をもたらすため、銀ナノ粒子の非特異吸着が抑制された状態にあり、酸化条件や還元条件を、用いた兼用液用に最適化すれば、S/N が増大し、検出性能が向上すると考えられる。検出性能を向上させることができれば、非常に簡単に HBs 抗原を検出でき、更に ELISA といった従来の測定原理と同等以上の性能を有した免疫センサを実現することができると期待できる。

5.10　結論

銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサにおける銀ナノ粒子の非特異吸着量の pH 依存性を評価した。結果、pH により電極と銀ナノ粒子標識間の静電的相互作用が変わり、銀ナノ粒子の非特異吸着量が pH に依存することを見出した。また、その知見を活かして、pH を調整し、洗浄液と電解液を兼ねることができる兼用液を作製し、電気化学免疫センサの検出フローを簡易化させることに成功した。従来の検出フローで必要だった専用の洗浄液を用いた洗浄工程や乾燥工程、溶液置換が、簡易化した検出フローでは必要なくなった。簡易化した検出フローでの HBs 抗原の検出性能は、従来の電気化学免疫センサに比べてやや劣るものの、上記に示したような煩雑な工程を必要としないため、熟練したスキル・技術が無い方でも容易に利用することができる免疫センサであると言え、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサのユーザビリティを向上させることに成功した。上記の第 3 章、4 章で示した高感度化・迅速化方法と組み合わせることで、高感度・迅速・簡易な電気化学免疫センサの実現が期待できる。

第 6 章　総括

本研究では、タンパク質を高感度に、迅速に、簡単に、検出できる免疫センサの実現を目的とし、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサに関する研究に取り組んだ。

第 2 章では、本研究の基本となる銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの基礎性能評価を始め、材料の選択、電気化学的な前処理条件や測定条件の検討を行った。本免疫センサで必要とされる検体（全血や血漿、血清）量は数 μL であり、指先採血で採取可能な検体量である。つまり、本免疫センサを基本原理とし、検出性能を向上させ、ユーザビリティを向上させることができれば、小型で、持ち運びができる、POCT に適用できる（適した）、理想的な診断装置が実現できる可能性が確認された。

第 3 章では、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサを高感度化させるための研究に取り組んだ。高感度化させる方法として、作用電極を大小 2 つの作用電極に分ける方法を考案した。最終的な電流測定を微小電極で行うことで、共存する電気化学活性物質や不純物に由来したバックグラウンド電流やそのばらつき（ノイズ）を抑制させることができる。また電気化学的な前処理を通して、2 つの作用電極に捕捉された銀ナノ粒子を、微小な電極にだけ回収することにより、微小な電極で測定される銀由来の酸化電流は、2 つの作用電極で測定される銀由来の酸化電流と同等の大きさとなる。つまり、低バックグラウンド・低ノイズ環境下で、従来と同程度の銀由来の酸化電流値（シグナル）を測定できるため、S/N 比が向上し、検出性能が向上した。銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサにおいて使用する作用電極を、2 つの作用電極に分け、電気化学的な前処理を工夫することにより、本研究の目的である高感度化を達成することが出来た。

第 4 章では、銀ナノ粒子を用いた電気化学センサの迅速化（抗原検出までの時間の短時間化）に関する研究に取り組んだ。第 3 章で作製した大小 2 つの作用電極を有する免疫センサでは、高感度化を達成したものの、前処理時間（銀イオンの回収時間）が長くなってしまうという課題が生じた。このため、2 つの作用電極を有する免疫センサの電極構造を改良し、銀イオンの回収工程を短時間化させることに成功した。また、銀イオンの回収工程が、3 次元拡散方程式に従うことも確認し、3 次元拡散方程式を基とした数値シミ

ュレーションを作製し、数値シミュレーションを用いて更に検出性能を向上させられる電極構造（例、検出限界を下げられる、銀イオンの回収時間を短くできる）を設計した。銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサに利用する作用電極を、2 つの作用電極に分け、且つ、作用電極を銀イオンが回収しやすい構造（配置、電極の幅など）にすることにより、本研究の目的である高感度化・迅速化を達成することが出来た。

第 5 章では、銀ナノ粒子を用いた電気化学センサの検出フローの簡易化に関する研究に取り組んだ。免疫複合体の標識として用いる銀ナノ粒子（2 次抗体固定した銀ナノ粒子）と 1 次抗体を固定した電極間に働く静電的相互作用に注目し、銀ナノ粒子の非特異吸着量が、静電的相互作用に影響を及ぼす pH に依存することを確認した。また、pH を調整し、本免疫センサで使用する洗浄液と電解液を兼用できる兼用液を作製した。つまり、従来の免疫センサにおける検出フローでは、抗原・抗体反応後に、専用の洗浄液で洗浄を行い、乾燥工程や溶液置換といった煩雑な工程を行っていたが、本検出フローでは、検出フローに適した pH の兼用液を用いることで、専用の洗浄液を使用した洗浄工程、乾燥工程や溶液置換といった煩雑な工程を省くことに成功した。つまり、本研究の目的である、簡単にタンパク質を測定することが出来るようになった。

第 7 章　今後の展開

本研究では、タンパク質を高感度に、迅速に、簡単に、検出できる免疫センサの実現を目的とし、銀ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサに関する研究に取り組み、各目標を達成することができた。しかし、本研究を通して、新たに生じた課題も同時に見つかった。そのため、本章では、それらの課題に対して、今後どのように取り組み、POCT や家庭での健康モニタリングを実現する免疫センサを、研究開発し、実現させるかを示す。

まず、本免疫センサでは、同一測定再現性を向上させる必要がある。更には、日差間再現性や長期保存安定性といった実用的な面での性能評価を行う必要がある。同一測定再現性を向上させる方法としては、マイクロ流路や反応・測定用チャンバとの組み合わせが考えられる。本研究では、抗原・抗体反応や、電気化学測定は、各溶液を電極上に滴下するだけである。つまり、各センサ、各実験で同じように溶液を滴下しているつもりだが、その滴下位置がずれている、溶液の広がりなどにより、ばらつきが生じている可能性が高い。つまり、各溶液の滴下位置や溶液の広がりを流路やチャンバで制御することにより、そのばらつきが抑制され、同一測定再現性を向上させることができると考えられる。その結果を得た上で、実用的な面での性能評価を行うべきだと考える。また、抗原検出までの時間（分析時間）を更に迅速化させていく上でも、マイクロ流路・反応チャンバは非常に有効なツールになると考えられる。

また、本研究では 3 次元拡散方程式を基とした数値シミュレーションを用いて理想的な電極構造を設計した。設計した電極を作製するには、スクリーン印刷技術の向上やフォトリソグラフィー、ナノプリンティング技術といった他の作製技術の適用が必要となる。実用化を考えた上で、現状の作製技術で作れる最適な電極構造を設計するのも非常に有用な研究である。そのためには、数値シミュレーション（プログラム）の改良だけでなく、スクリーン印刷技術やフォトリソグラフィーといった微細加工技術の条件検討等を行なっていく必要がある。

簡易化において、pH を調整し、洗浄液と電解液を兼用できる兼用液を作製し、洗浄液を使った洗浄工程や溶液置換・乾燥工程などを省くことに成功した。ただし、高感度化のために作製した電極構造（4 電極系）での簡易化の

検証は行えておらず、組み合わせることで、高感度に、迅速に、簡単に、タンパク質を検出することができる免疫センサを開発できる可能性が高い。また、更にユーザビリティを向上させるために、例えば、免疫複合体の標識に使用する銀ナノ粒子を溶液ではなく、乾燥試薬として反応チャンバ内に封入してしまう、マイクロ流路と組み合わせて、全自動で抗原・抗体反応から兼用液での洗浄、電気化学測定を行なってしまうシステム・装置を作り上げる必要もある。また、全血や血漿、血清といった検体を、精度良く採取する方法の研究開発も今後の課題である。SMBG のセンサで使われている毛細管現象を利用し、微量な血液を採取する方法やキャピラリーを用いて採取する方法も考えられるが、より精度の良い方法と組み合わせる必要もあると考えられる。

本研究では、電気化学免疫センサを、ソフトとハードの二つの面に分けるとしたら、ソフトの面（感度、検出時間、洗い方、など）を中心に取り組んだ。実用化を考えた場合、ハードな面（再現性、保存性、送液、採取、など）に時間を掛けて取り組んでいく必要がある。

第 8 章　参考文献

1. Wan. Y, Su. Y, Zhu. X, Liu. G, and Fan. C, Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics, Bios. Bioelect. 47 (2013) 1–11
2. Porter. R, Kabil. A, Forstern. C, Slevin. C, Kouwnberg. K, and Szymanski. M, A Novel, Generic, Electroanalytical Immunoassay Format Utilisiing Silver Nano-Particles as a Bio-Label, J. Immunoassay. Immunochem. 30 (2009) 428–440
3. Wang. H, Zhang. Y, Li. H, Du. B, Ma. H, Wu. D, and Wei. Q, A silver-palladium alloy nanoparticle-based electrochemical biosensor for simultaneous detection of ractopamine, clenbuterol and salbutamol, Bios. Bioelect. 49 (2013) 14–19
4. Syzmanski. S. M, and Porter. A. R, Preparation and quality of silver nanoparticle-antibody conjugates for use in electrochemical immunoassays, J. Immunol. Methods. 387 (2013) 262–269
5. Mehrgardi. A. M, and Ahangar. E. L, Silver nanoparticles as redox reporters for the amplified electrochemical detection of the single base mismatches, Bios. Bioelect. 26 (2011) 4308–4313
6. Qiu. D. J, Liang. P. R, Wang. R, Fan. X. L, Chen. W. Y, and Xia. H. H, A label-free amperometric immunosensor based on biocompatible conductive redox chitosan-ferrocene/gold nanoparticles matrix, Bios. Bioelect. 25 (2009) 852–857
7. Ting. P. B, Zhang. J, Gao. Z, and Ying. Y. J, A DNA biosensor based on the detection of doxorubicin-conjugated Ag nanoparticle labels using solid-state voltammetry, Bios. Bioelect. 25 (2009) 282–287
8. Lien. N, Viet. X, Chikae. M, Ukita. Y, and Takamura. Y, Development of Label-free Impedimetric Hcg-Immunosensor Using Screen-Printed Electrode, J. Biosens. Bioelectron. 2 (2011) 1000107
9. Maisel A, Barnard D, Jaski B, Frivold G, Marais J, Azer M, Miyamoto M, Lambardo D, Kelsay D, Borden K, Iqbal N, Taub P, Fupfer K, Clopton P and Greenberg B, Primary Results of the HABIT Trial

(Heart Failure Assessment With BNP in the Home), J. Am. Col. Card., 16 (2013) 1726 – 1735

10. Takeda K, Mruki M, Yamagaito T, Muramatsu M, Sakai Y, Tobimatsu H, Kobayashi H, Mizuno Y, and Hamaguchi Y. Highly Sensitive Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen by Use of a Semiautomated Immune Complex Transfer Chemiluminescence Enzyme Immunoassay. J. Clin. Microbiol, 51 (2013) 2238–2244.
11. Hanaee. H, Ghourchian. H, and Ziaee A. A, Nanoparticle-based electrochemical detection of hepatitis B virus using stripping chronopotentiometry, Analyt. Bioc. 370 (2007) 195–200
12. Kheyrabadi. K. L, and Mehrgardi. A. M, Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical detection of adenosine tiphosphate, Biosen. Bioelect. 37 (2012) 94–98
13. Merkoçi. A, Nanoparticles-based strategies for DNA, protein and cell sensors, Bios. Bioelect. 26 (2010) 1164–1177
14. Zhang. J, Ting. P. B, Khan. M, Pearce. C. K, Yang. Y, Gao. Z, and Ying. Y. J, Pt nanoparticle label-mediated deposition of Pt catalyst for ultrasensitive electrochemical immunosensors, Bios. Bioelect. 26 (2010) 418–423
15. Pingarrón. J, Yáñes-Sedeño. P, and Gonzáles-Cortés. A, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensor, Electrochim. Acta. 53 (2008) 5848–5866
16. Sadik. O, Mwilu. S, and Aluoch. A, Smart electrochemical biosensors: From advanced materials to ultrasensitive devices, Electrochim. Acta. 55 (2010) 4287–4295
17. Pei. X, Zhang. B, Tang. J, Liu. B, Lai. W, and Tang. D, Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review, Anal. Chim. Acta. 758 (2013) 1–18
18. Idegami. K, Chikae. M, Kerman. K, Nagatani. N, Yuhi. T, Endo. T, and Tamiya. E, Gold Nanoparticle-Based Redox Signal Enhancement for Sensitive Detection of Human Chorionic Gonadotropin Hormone, Electroanalysis 20 (2008) 14–21

19. Dequaire M., Degrand C. and Limoges B., Anal. Chem. 72 (2000) 5521–5528
20. Gnzález-García B., Fernández–Sánchez C. and Costa–García A.,Biosens. Bioelectron. 15 (2000) 315–321
21. Chu X., Fu X., Chen K., Shen. G. and Yu R., Biosens. Bioelectron. 20 (2005) 1805–1812
22. Chu X., Xiang Z., Fu X., Wang S., Shen G. and Yu R., J. Immunol. Methods. 301 (2005) 77–88
23. Mao X, Jiang J, Chen J., Huang Y., Shen G. and Yu R., Anal. Chim. Acta. 557 (2006) 159–163
24. Chumbimuni-Torres Y., Dai Z., Rubinova N., Xiang Y., Pretsch E., Wang J. and Bakker E., J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 13676–13677
25. Chen Z., Peng Z., Zhang P., Jin X., Jiang J., Zhang X., Shen G. and Yu R., Talanta. 72 (2007) 1800–1804
26. Leng C., Lai G., Yan F. and Ju H., 2010. Anal. Chimi. Acta. 666 (2010) 97–101
27. Cai H., Zhu N., Jiang Y., He P. and Fang Y., Biosens. Bioelectron. 18 (2003) 1311–1319
28. Liu G., Wang J., Kim J. and Jan M., Anal. Chem. 76 (2004) 7126–7130
29. Liu G., Wang J., Wu H. and Lin Y., Anal. Chem. 78 (2006) 7417–7423
30. Hansen A., Wang J., Kawde A., Xiang Y., Gothelf K. and Collins G., J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 2228–2229
31. Shen G. and Zhang Y., Anal. Chim. Acta. 674 (2010) 27–31
32. Wang J., Liu G. and Jan M., J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 3010–3011
33. Yu X., Munge B., Patel V., Jensen G., Bhirde A., Gong J., Kim S., Gillespie J., Gutkind J., Papadimitrakopulos F. and Rusling J., J Am. Chem. Soc. 128 (2006) 11199–11205
34. Veetil J. and Ye K., Biotechnol. Prog. 23 (2007) 517–531
35. Chikae. M, Idegami. K, Nagatani. N, Tamiya. E, and Takamura. Y, Highly Sensitive Method for Electrochemical Detection of Silver Nanoparticle Labels in Metalloimmunoassay with Preoxidation/Reduction Signal Enhancement, Electrochemistry 78

(2010) 748–753
36. 公益社団法人 電気化学会 化学センサ研究会（第 85 回） 2015. 1, ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの開発、堀信康
37. Lee. H. J, Choi. K. H, Lee. Y. S, Lim. W. M, and Chang. H. J, Enhancing immunoassay detection of antigens with multimetric protein Gs, Bios. Bioelect. 28
38. Tsai. Y. H, Chan. R. J, Li. C. Y, Cheng. C. F, and Fuh. B. C, Determination of hepatitis B surface antigen using magnetic immunoassays in a thin channel, Bios. Bioelect. 25, (2010) 2701–2705
39. Wang. X, Li. Y, Wang. H, Fu. Q, Peng. J, Wang. Y, Du. J, Zhou. Y, and Zhen. L, Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensor for sensitive detection of hepatitis B virus in buffer, blood serum and plasma, Bios. Bioelect. 26 (2010) 404–410
40. 大堺利行、加納健司、桑畑進、ベーシック電気化学, 株式会社化学同人
41. Hori N, Miyuki C, Kirimura H and Takamura Y, Highly Sensitive Detection using Dual Working Electrode and Concentration Process in Electrochemical Metalloimmunoassay. Electrochimica Acta. 174 (2015) 799–805
42. Mizuochi. T, Re-Evaluation of HBsAg Detection Kit Approved for Marketing in Japan, Jpn. I. Infect. Dis. 54 (2001) 201–207
43. Hori N, Chikae M, Kirimura H, Takamura Y, Design of Dual Working Electrodes for Concentration process in Metalloimmunoassay. Microchimica Acta, in preparation.
44. Johnston R and Spiro M. Diffusion coefficients of the silver ion and the disulfitosilver (I) ion by the rotating disk method. J. Phy. Chem. 71 (1967) 3784–3790
45. Jones S, Campbell F, Baron R, Xiao L and Compton R. Particle Size and Surface Coverage Effects in the Stripping Votammetry of Silver Nanoparticles: Theory and Experiment. J. Phys. Chem. C. 112 (2008) 17820–17827
46. 川田昌克、Scilab で学ぶわかりやすい数値計算法、森北出版株式会社
47. Aguilar Z., Vandaveer W. and Fritsch I., Anal. Chem. 74 (2002) 3321–

3329

48. Kojima K., Hiratsuka A., Suzuki H., Yano K., Ikebukuro K. and Karube I., Anal. Chem. 75 (2003) 1116–1122
49. Hori N, Miyuki C, Kirimura H and Takamura Y, pH dependence of non-specific adsorption and detection solution in electrochemical metalloimmunoassay using antibody−silver nanoparticle conjugates. Sensing and Biosensing research, 5 (2015) 78 – 83
50. Duan C. and Meyerhoff M., 1994. Anal Chem, 6, 1369–1377
51. Meyerhoff M., Duan C. and Meusel M., Clin. Chem. 41 (1995) 1378–1384
52. Semmler M., Mann E., Rička J. and Borkovec M., Langmuir. 14 (1998) 5127–5132
53. Brewer S., Glomm W., Johnson M. and Knag M. and Franzen S., Langmuir. 21 (2005) 9303–9307
54. Thobhani S., Attree S., Boyd R., Kumarswami N., Noble J., Szymanski M. and Porter R., J. Immunol. Methods. 356 (2010) 60–69
55. Mandal G., Bardhan M. and Ganguly T., Colloids Surf. B: Biointerfaces. 81 (2010) 178–184
56. Bhan C., Mandlewla R., Gebregeorgis A. and Raghavan D., Langmuir. 28 (2012) 17043–17052
57. Bhan C., Brower T. and Raghavan D., J. Colloid Interface Sci. 402 (2013) 40–49
58. Park J., De Paoli Lacerda S., Stanley S., Vogel B., Kim S., Douglas J., Raghavan D. and Karim A., Langmuir. 25 (2009) 443–450
59. Shindel M., Mohraz A., Mumm D. and Wang S., Langmuir. 25 (2009) 1038–1046
60. Wang Y. and Zhan L., Anal. Biochem. 428 (2012) 119–125

研究業績

国内学会

第 85 回 化学センサ研究会（2015 年 1 月 23 日、メルパルク大阪）
ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの開発、堀 信康

日本化学会 第 96 春季年会（2016 年 3 月 24 日～27 日、同志社大学）
ナノ粒子を用いた電気化学免疫センサの開発、堀 信康

刊行論文

Nobuyasu Hori, Miyuki Chikae, Hiroya Kirimura, Yuzuru Takamura, Highly Sensitive Detection using Dual Working Electrode and Concentration process in Electrochemical Metalloimmunoassay. Electrochimica Acta, 174 (2015) 799 – 805.

Nobuyasu Hori, Miyuki Chikae, Hiroya Kirimura, Yuzuru Takamura, pH dependence of non-specific adsorption and detection solution in electrochemical metalloimmunoassay using antibody–silver nanoparticle conjugates. Sensing and Biosensing research, 5 (2015) 78 – 83.

Nobuyasu Hori, Miyuki Chikae, Hiroya Kirimura, Yuzuru Takamura, Design of Dual Working Electrodes for Concentration process in Metalloimmunoassay. Microchimica Acta, in preparation.

特許出願

被検物質の検出方法
金属イオンの検出方法、被検物質の検出方法、電極基板および検出キット

博士学位論文審査委員

教授　高村禅（主査）
北陸先端科学技術大学院大学
マテリアルサイエンス研究科

教授　前之園信也
北陸先端科学技術大学院大学
マテリアルサイエンス研究科

教授　松見紀佳
北陸先端科学技術大学院大学
マテリアルサイエンス研究科

准教授　長尾祐樹
北陸先端科学技術大学院大学
マテリアルサイエンス研究科

准教授　永谷尚紀
岡山理科大学
工学部　バイオ・応用化学科

謝辞

本研究は、北陸先端科学技術大学院大学　マテリアルサイエンス研究科高村先生研究室において、2012 年から 2015 年までの間に実施した研究に関して、その実験方法や結果、考察をまとめたものとなります。

本研究を実施するにあたり、終始親切にご指導を賜りました高村禅教授に心から感謝申し上げます。

本研究を遂行していく上で、また、成果をまとめていく上で、有益なご討論、そしてご指導を賜りました近江みゆき氏に、心から感謝申し上げます。

高村研究室のメンバーには、実験室や装置の運用方法、使い方など教えていただき、心より感謝申し上げます。研究以外でも、各国の文化の違いや考え方の違い、将来の夢などを語り合えたこと、素晴らしい経験になりました。

本研究を遂行していく上で、シスメックス株式会社　中央研究所　桐村浩哉部長をはじめ、多くの方々に研究面や業務面で多大なるサポートをしていただきました。心より感謝申し上げます。

妻　裕美子にも多くの心配をかけました。生活面や体調面で 3 年間、隣でサポートしてくれたこと、本当に感謝しています。ありがとう。

本論文の審査委員を引き受けて頂きました前之園信也教授、松見紀佳教授、長尾祐樹准教授、永谷尚紀准教授、高村禅教授に心より感謝申し上げます。

これからもご指導、ご鞭撻いただけますよう、よろしくお願い申し上げます。