

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	<a href="http://hdl.handle.net/10119/13010">http://hdl.handle.net/10119/13010</a>
Rights	
Description	Supervisor:高村 禪, マテリアルサイエンス研究科, 博士

氏 名	堀 信 康		
学 位 の 種 類	博士(マテリアルサイエンス)		
学 位 記 番 号	博材第 388 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 27 年 12 月 24 日		
論 文 題 目	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		
論 文 審 査 委 員	主査 高村 禅	北陸先端科学技術大学院大学	教授
	松見 紀佳	同	教授
	前之園 信也	同	教授
	長尾 祐樹	同	准教授
	永谷 尚紀	岡山理科大学	准教授

## 論文の内容の要旨

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, and then, 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  $0.78 \text{ IU mL}^{-1}$  (estimated from three times the standard deviation for  $0 \text{ IU mL}^{-1}$ ).

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 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  $0.09 \text{ IU mL}^{-1}$ , which was nine times lower than the detection limit using the conventional immunosensor (see the above).

To fabricate a more simplified and user-friendly immunosensor based on a silver-nanoparticle-labeled sandwich-type metalloimmunoassay, the 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  $0.78 \text{ IU mL}^{-1}$ . 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*

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、銀ナノ粒子を抗体の標識に用いた電気化学免疫センサにおいて、銀イオンを微小な作用極へ一旦濃縮することによりバックグラウンドを抑え、特に血液等の共雑物が多い試料を測定した際の検出限界を改善することを目的としたものである。同時に迅速化、簡易化も試みている。

第 1 章では、バイオセンサに要求される性能とその社会的背景、及び従来のバイオセンサの課題について述べ、本研究の目的を明らかにしている。

第 2 章では、銀ナノ粒子を標識に用いた電気化学免疫センサを用いて、血清中の B 型肝炎ウイルス表面抗原 HBs を測定し、粒子サイズや電解液組成等の影響を調べ、臨床に近い条件における基礎的な特性を評価した。得られた検出限界は  $0.78\text{IU mL}^{-1}$  であり、既存の大型装置に 1 桁ほど及ばない結果となった。

第 3 章では、より低い検出限界を達成するため、作用極を面積比 1:9 の作用極 1 と作用極 2 に分け、両方の作用極で抗原抗体反応を行った後、銀イオンを作用極 1 に集めて電気化学測定を行うことを試みた。これにより作用極面積に比例する信号のばらつきとバックグラウンドノイズを抑えることができ、検出限界が 1 桁ほど改善した。

第 4 章では、より迅速に測定するために、銀イオンの濃縮時間や電極構造が感度に及ぼす影響を調べた。その結果、面積比を大きくするほど感度が高くなり、また電極を細かく分割するほど短い濃縮時間でも感度を落とさずに測定できることが分った。また、これらの実験結果をほぼ再現できる銀イオンの 3 次元拡散数値シミュレーションモデルを構築し、計算機上で電極構造と濃縮時間の影響を予測する手法を確立した。このシミュレーションモデルを用いて、限界性能について議論し、また実践的な電極構造と濃縮条件を設計した。これによりトータルの測定時間 25 分で  $0.09\text{IU mL}^{-1}$  の検出限界を達成した。これらは現在臨床現場で用いられている大型機器と同等である。

第 5 章では、本検出法をより簡易・実用的にするため、抗原抗体反応の後未結合のものを除く洗浄液と、銀標識の量を電気化学的に測定する際に用いる測定液の共通化を試みた。銀ナノ粒子の非特異吸着量が、静電相互作用に影響する pH に依存していることを突き止め、pH=4 に調整した兼溶液を用いることにより、性能を落とさずに洗浄と検出が行えることを示した。

以上、本論文は、銀ナノ粒子を標識に用いた電気化学免疫センサにおいて、感度・検出限界に及ぼす様々な要因を調べ、特に銀イオンを微小な作用極へ一旦濃縮することにより検出限界を1桁改善できることを示したものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。