



Title	Studies on Functional Membrane Biosensors Prepared by Polyelectrolyte Multilayers
Author(s)	申, 鶴雲
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58354
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	申 鶴 雲
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 24547号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用化学専攻
学位論文名	Studies on Functional Membrane Biosensors Prepared by Polyelectrolyte Multilayers (高分子積層膜を基盤とするバイオセンシング機能膜に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 明石 満 (副査) 教授 茶谷 直人 教授 三浦 雅博 教授 井上 佳久 教授 馬場 章夫 教授 神戸 宣明 教授 生越 専介 教授 関 修平 教授 真嶋 哲朗 教授 安蘇 芳雄 教授 芝田 育也

論文内容の要旨

本学位論文では、高分子積層膜表面のタンパク質の吸着挙動を制御することにより、高感度な免疫診断界面としての応用について検討し、新規な高感度、高速、および簡便な透過型バイオセンサーの開発について評価した。

第一章：交互滴下法による高分子積層膜の創製とヘテロバイオインターフェースの構築

ナノメートルオーダーの高分子積層膜の表面電荷、構造などを制御することにより、タンパク質の吸着量を精密に制御できた。新規な積層膜創成法として交互滴下法を確立し、少量の高分子溶液から簡便に基板の片面だけに積層膜を作製でき、ヘテロ積層膜界面が創製できた。交互滴下法により作製された積層膜の物性は従来の交互浸漬法と同程度であり、基板両面にヘテロ積層膜を作製することにより、基板両面のタンパク質の吸着量も精密に調整でき、ヘテロバイオ機能界面が創製できた。

第二章：高分子積層膜による混合タンパク質溶液中からの選択的吸着

カチオン性とアニオン性の積層膜は、中性の緩衝溶液中でそれぞれアニオン性とカチオン性を有するタンパク質を特異的に吸着することが明らかとなった。さらに、両面が反対電荷を有するヘテロ積層膜基板を反対電荷のタンパク質の混合溶液中に浸漬するだけで、各面における自発的な選択的吸着を見出した。

第三章：高分子積層膜を利用した高感度なELISAの構築

ポリ(ジアリルジメチルアンモニウム塩酸塩)(PDDA)/ポリ(スチレンスルホン酸ナトリウム)(PSS)積層膜の高度なタンパク質の選択的吸着を利用して、従来の酵素-免疫複合体吸着分析法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA)基板のポリスチレン(PS)プレート上を表面修飾することにより、高感度な免疫界面を作製した。最表面がカチオン性積層膜では静電相互作用によりブロッキング剤の吸着量が増加し、さらに

被覆率が100%となり、抗原や二次抗体の非特異吸着（ノイズ）が大きく抑制できたため、従来のPS基板より約4倍高い測定感度が得られた。また、カチオン性積層膜は広範囲で（2 ng/mL~5 µg/mL）精密な定量が可能であり、PS基板より効率よく抗原を検出できることが明らかとなった。7ステップのカチオン性PDDA積層膜がELISAシステムとして最適な界面であることを見出した。

第四章：高分子積層膜を修飾した多孔質膜による高速バイオセンサーの構築

ELISAの検出界面として最適化したカチオン性PDDA積層膜を多孔質膜表面に修飾させることにより、高速検出が可能な透過型バイオセンサーの開発について検討した。従来のELISAで利用する静的な抗原-抗体反応ではなく、遠心透過法により抗原溶液を多孔質膜に透過させることで、能動的に抗原分子の局所的な濃縮反応に変換させることができ、高感度を有しつつ、従来法より検出時間を約20分の1程度に短縮できる抗原検出システムを確立した。また、積層膜の修飾により、一次抗体の吸着量を増加させ、多孔質膜の内部まで三次元的に濃縮でき、未修飾な多孔質膜より効率の良い抗原検出を達成した。

本研究より、新たな免疫診断界面として、任意の基板を簡便に修飾できる高分子積層膜を利用することで、高感度、高速、および簡便なバイオセンサーを開発することができた。また上記の技術より、多様なバイオセンサーへの実用化が可能になると期待される。

論文審査の結果の要旨

高分子積層膜はナノメートルレベルの膜厚制御と、薄膜最表面及び内部の化学組成に規定された機能が付与できる。さらに生理環境下で安定に存在できるため、近年、高分子積層膜を利用した精密かつ多様なバイオ界面の創製が盛んに研究されている。酵素-免疫複合体吸着分析法（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA）は光シグナルにより精密かつ簡便に分子検出できるため、臨床検査において広汎的に応用されている。しかし、現在 ELISA の問題点は一次抗体の変性やランダムな配向性、ブロッキングの不完全性、抗原と二次抗体の非特異吸着、および長い反応時間などが挙げられ、より精密な基板界面の設計を介して、より高感度かつ高速で、特異的に分子診断を実現することが求められている。本論文は、高分子積層膜を用いて基材界面を改質することにより、従来の ELISA システムにおける多種タンパク質の吸着挙動を制御することで、高感度、高速、および簡便なバイオセンサーの開発を目的としたもので、新たな交互積層膜の作製法として交互滴下法を確立し、免疫診断界面での積層膜の最適化を行い、高速診断に向けた多孔質膜への応用について検討している。主な成果を要約すると以下の通りである。

(1) ナノメートルオーダーの高分子積層膜の表面電荷、構造などを制御することにより、タンパク質の吸着量を精密に制御できることを明らかにしている。新規な積層膜創成法として交互滴下法を確立し、少量の高分子溶液から簡便に基板の片面だけに積層膜を作製でき、ヘテロ積層膜界面が創製できることを示している。

(2) カチオン性とアニオン性の積層膜は、中性の緩衝溶液中でそれぞれアニオン性とカチオン性を有するタンパク質を特異的に吸着することが明らかとなっている。さらに、両面が反対電荷を有するヘテロ積層膜基板を反対電荷のタンパク質の混合溶液中に浸漬するだけで、各面における自発的な選択的吸着を見出している。

(3) ポリ（ジアリルジメチルアンモニウム塩酸塩）（PDDA）/ポリ（スチレンスルホン酸ナトリウム）（PSS）積層膜の高度なタンパク質の選択的吸着を利用して、従来の ELISA 基板のポリスチレン（PS）プレート上を表面修飾することにより、高感度な免疫界面が作製できることを明らかにしている。最表面がカチオン性積層膜では静電相互作用によりブロッキング剤の吸着量が増加し、さらに被覆率が 100%となり、抗原や二次抗体の非特異吸着（ノイズ）が大きく抑制できるため、従来の PS 基板より約 4 倍高い測定感度が得られることを明らかにしている。また、カチオン性積層膜は広範囲で（2 ng/mL~5 µg/mL）精密な定量が可能であり、PS 基板より効率よく抗原を検出できることが明らかとなっている。7ステップのカチオン性 PDDA 積層膜が ELISA システムとして最適な界面であることを見出している。

(4) ELISA の検出界面として最適化したカチオン性 PDDA 積層膜を多孔質膜表面に修飾した透過型バイオセンサーを用いることで、高速検出が可能であることを明らかにしている。従来の ELISA で利用する静的な抗原-抗体反応では

なく、遠心透過法により抗原溶液を多孔質膜に透過させることで、能動的に抗原分子の局所的な濃縮反応に変換させることができ、高感度を有しつつ、従来法より検出時間を約 20 分の 1 程度に短縮できる抗原検出システムを確立している。また、積層膜の修飾により、一次抗体の吸着量を増加させ、多孔質膜の内部まで三次元的に濃縮でき、未修飾な多孔質膜より効率の良い抗原検出が達成できることが明らかになっている。

以上のように、本論文は新たな免疫診断界面として、任意の基板を簡便に修飾できる高分子積層膜を利用することで、高感度、高速、および簡便なバイオセンサーを開発することができることが明らかにしている。また上記の技術より、多様なバイオセンサーへの実用化としての重要な知見をあたえるものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。