



Title	金ナノ粒子の酸化還元特性解析とバイオセンサへの応用
Author(s)	大崎, 脩仁
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/88084
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (大 崎 脩 仁)

論文題名 金ナノ粒子の酸化還元特性解析とバイオセンサへの応用

論文内容の要旨

予防医療の観点からストレスや疾病と関連する生体物質であるバイオマーカーの早期検出技術に注目が集まっている。バイオマーカーにはタンパク質や核酸、脂質、有機物、無機物など多種多様な物質がありそれらを選択的に認識する分子認識素子が用いられる。バイオセンサはその分子認識素子と、認識時の化学的/物理的变化を信号に変換するトランスデューサーから構成され、在宅血糖値計など一部は実用化されている。近年ではナノテクノロジーの発展により、特異な性質を持つナノ材料をバイオセンサに適応し従来品を超える性能のバイオセンサを開発しようとする試みが盛んである。なかでも金ナノ粒子は抗体やDNAの修飾が容易といった性質と、ナノ構造の表面積/体積比の増大に伴う特異な酸化還元特性を持つために、バイオセンサの分子認識および信号源として機能する可能性がある。そこで、本論文では抗体を修飾した金ナノ粒子を用いて測定対象である抗原分子を、電極上に修飾した1次抗体と反応させて酸化還元特性から抗原を定量する手法に着目した。本論文はバイオセンサ構築の観点から、金ナノ粒子の酸化還元特性を明らかにし、バイオセンサの高感度、高性能化について検討したものであり、内容については以下の全5章から構成される。

第1章は序論である。既往の知見をまとめるとともに本研究の背景と目的について示した。

第2章ではカーボン電極上における金ナノ粒子の酸化還元反応速度に関して、バイオセンサの構成要素である抗体およびブロッキングタンパク修飾時と非修飾時の違いを定量的に議論した。金ナノ粒子前駆体である金錯体イオンに対してCyclic Voltammetry(CV)やDifferential pulse voltammetry (DPV)による反応速度パラメーターの解析を行った。その結果、反応速度パラメーターである拡散係数 D と電子移動速度 k^0 はタンパク修飾電極では一桁ほど低下することが分かった。またDPV条件を最適化することで得られる信号が増加したためイムノアッセイ系でもDPV条件を最適化する必要性が見いだされた。

第3章では2章で得られた知見をもとにバイオセンサを作製しイムノアッセイ系の最適化と、オンサイトでの測定を考慮し検量線と選択性などの評価を行った。測定対象としてはストレスや免疫系に関連するバイオマーカーである免疫グロブリンA (IgA)を選定した。反応速度パラメーターをもとに最適な金ナノ粒子定量条件を検討することで従来の検出限界 (LOD) より20%感度が向上した。また作製したバイオセンサの検量範囲は15-150 ng/mLであり、これはヒト唾液中IgAの計測に十分利用できる検出範囲であると結論した。3章ではさらなる検討として、2つの作用電極を有する電気化学測定系を用いた。本法はバイポテンショスタット法と呼ばれ、第1作用電極は分子認識と金ナノ粒子の酸化反応を担い、第2作用電極ではDPVによる金イオンの検出を行った。金イオンの検出を行う第2電極はタンパク非修飾であるため、単一の電極で行うイムノアッセイより検出電極の反応速度が速くなり高感度であった。結果として単一の電極を用いて金ナノ粒子を測定した場合と比べて、得られる電流値が2倍に向上した。また、第1作用電極を抗体とブロッキングタンパクで修飾した場合でも単一の非修飾電極を用いる場合と同等の電流値が得られた。バイポテンショスタット法により従来よりも広い検出範囲のバイオセンサが構築できる可能性が見いだされ、金ナノ粒子の酸化還元反応を用いるバイオセンサのデバイス設計における自由度の高さが示された。

第4章では、より高感度なバイオセンサが必要なバイオマーカーを想定し、3章で明らかにした感度をさらに向上するために、バイオセンサ表面の分子改変に取り組んだ。酸素プラズマを用いて電極表面のカーボンにカルボキシル基を生成し、共有結合試薬による化学修飾法を検討した。結果としてプラズマ照射5秒時に検出限界 (LOD) として0.20 ng/mLが得られた。この結果は第3章で示した物理吸着法により抗体を修飾した場合のバイオセンサが示すLODより6倍ほど高感度を示すもので、プラズマ照射と共有結合試薬利用の有効性が示された。本論文ではその他の表面改質に関する結果についても示した。

第5章は結論である、本研究で得られた研究内容を総括するとともに、その意義、将来展望について述べた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (大 崎 脩 仁)			
論文審査担当者	(職) 氏 名		
	主 査	教授	藤田 克昌
	副 査	教授	井上 康志
	副 査	教授	関谷 毅
	副 査	副ラボ長	永井 秀典 (産業技術総合研究所)

論文審査の結果の要旨

本学位論文は金ナノ粒子の酸化還元活性を指標としたバイオセンサの開発に関するもので、電極反応を用いた金ナノ粒子の反応解析を基礎に、バイオセンサ応答の解析と高感度化などについてまとめたものである。その成果は、以下のとおりである。

1. 金ナノ粒子およびその前駆体である金錯体について、Cyclic voltammetry (CV) および Differential pulse voltammetry (DPV) 法を用い、カーボン印刷電極上での反応速度パラメーターを解析している。その結果、それら材料において準可逆系の酸化還元応答が顕れること、その応答をセンサに利用した場合に感度を決定する拡散係数や電子移動速度を明らかにしている。特に、抗体を修飾したバイオセンサでは、金錯体の拡散係数、電子移動速度がいずれも 1/10 程度に減少することを示し、バイオセンサの特性を評価する上での基礎的な知見を得ている。さらに、DPV のパルス電位を最適化することで、金ナノ粒子の酸化還元による応答を 1.5 倍に増加でき、抗体修飾型センサの高感度化が可能であることを示している。
2. ストレスのバイオマーカーである分泌型イムノグロブリン A (sIgA) を対象として、金ナノ粒子の酸化還元電流を指標とするバイオセンサを開発している。開発したバイオセンサでは、15-300 ng/mL の範囲で出力電流値が線形増加を示し、定量的なセンシングが可能であることを確認している。ヒト唾液の模擬溶液の測定を実施し、開発したバイオセンサがヒト唾液 IgA の測定に十分な感度を持ち、実用性があることを示している。
3. バイオセンサの高感度化を目的とし、電極表面の分子修飾による抗体固定化方法を開発している。カーボン印刷電極に酸素プラズマ照射を行い、カルボキシル基及びカルボニル基が新たに生成できることを確認し、これらの官能基に対してカルボジイミド架橋試薬を用いて抗体を印刷電極に直接結合できることを示している。開発した手法を利用し、金ナノ粒子の酸化還元電流を用いるバイオセンサの検出限界を 0.2 ng/mL に向上することに成功している。従来の物理吸着による結合方法に比べ約 6 倍の感度向上を達成し、酸素プラズマ処理と架橋化試薬による電極表面分子改変の有用性を示している。
4. バイオセンサにおける抗体修飾電極での拡散係数および、電子移動速度の低下を解決する上で、抗体修飾電極近傍に新たに作用電極を設けてバイポテンショスタット法による金ナノ粒子の予備酸化後の還元電流を測定している。その結果、金ナノ粒子の還元電流が 3 倍に増加し、電極構造の改変による高感度化が可能であることを示している。

以上のように、本学位論文では金ナノ粒子の酸化還元活性を指標とするバイオセンサにおいて、金ナノ粒子の電極上における反応速度パラメーターを解析し、得られた知見はバイオセンサの高感度化などに貢献する。実際に得られた知見を活用し、ストレスマーカーである唾液中のイムノグロブリンを計測するバイオセンサを開発している。これらの研究はナノ材料を活用した生体分析に関する研究に資すると評価でき、応用物理学、特にバイオセンシングの発展に寄与するに貢献するところが大きい。よって本論文は、博士学位論文として価値あるものと認める。