

氏名	Isa Anshori
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第 8475 号
学位授与年月日	平成 30年 3月 23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	数理物質科学研究科
学位論文題目	Highly sensitive coulometric detection of proteins based on metallization (金属置換クーロメトリーによる高感度タンパク質検出)
主査	筑波大学教授 博士(工学) 鈴木 博章
副査	筑波大学教授 理学博士 黒田 眞司
副査	筑波大学准教授 博士(農学) 辻村 清也
副査	筑波大学准教授 工学博士 小林 正美
副査	筑波大学准教授 博士(工学) 栗田 僚二 (連携大学院)

## 論 文 の 要 旨

この論文では、微量サンプル中のタンパク質の高感度検出のためのクーロメトリックデバイスについて述べている。

第1章では、この研究の背景を述べている。まず、発展途上国における伝染病被害の現状を述べ、Point of Care Testing (POCT) の必要性について述べている。また、これを実現するための MEMS 技術と POCT デバイスの過去の研究例について述べている。さらに、ここで電気化学的原理に基づくデバイスが有利であることを述べ、その中でも特に電気量測定(クーロメトリー)に基づくものが微量サンプル中成分の定量に適していることが述べられている。これらをもとに、本研究の目的が述べられている。

第2章では、金属析出を用いた高感度クーロメトリックマイクロデバイスを用いたタンパク質の検出について述べている。モデル的なタンパク質として $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)を用い、検出には ELISA 法を用いている。一つの流路中に形成された金パターン上に捕獲用抗体を固定して、ここでサンプル中の AFP を捕獲し、さらに酵素グルコースオキシダーゼを結合した二次抗体を結合させている。酵素反応により生成された過酸化水素は、同じ流路内にある白金微小電極アレイ上で酸化し、これと接続された別の流路中の別の白金微小電極アレイ上で銀に置換し、これをクーロメトリーにより定量している。AFP の検出限界として 0.4 ng/mL が達成されたことを述べている。

第3章では、第2章で述べたデバイスの高感度化に向けての新しい手法について述べている。第2章のデバイスでは、2つの流路を液絡で接続して、片方の流路で過酸化水素の酸化、他方の流路で銀の析

出を行っていた。しかし、これらの反応は混成電位で進行するため、これらの反応の進行を増大させることはできなかった。この問題を解決するため、2つの流路を液絡ではなく、金属ワイヤで接続することを提案している。これにより、酸化側電位をより正に、還元側電位をより負に調節し、酸化・還元に伴う電流を増幅できることを説明している。ここでは、3つの方法を試している。第一の方法では、両端に塩化銀を形成した銀線を2つの流路中の電解液と接触させている。電解液中の KCl 濃度を変えることにより銀線両端の銀/塩化銀の電位を変化させ、応答の変化が出ることを述べている。しかし、この方法では、電位差の変化量には限界があった。そこで、第二の方法では、第一の方法で用いた銀線の末端の片方をニッケルまたは亜鉛で置き換えている。これにより、両端に銀/塩化銀を用いた場合よりも信号が増幅できることを述べている。しかし、この方法では、白金電極間の電位を制御するのは不自由であった。第3の方法では、電圧源を用いて2流路間に電位差を直接印加する方法を採用している。この場合は、電位差を変えることにより、検出感度を増大させることができるだけでなく、それを自由に調節できることを述べている。この方法を用いることにより、過酸化水素の検出限界として、2.4 nM が達成されたことを述べている。

第4章では、第2章で述べたタンパク質検出用デバイスの問題点を検討し、改良を加えた結果について述べている。まず、牛血清アルブミン(BSA)による流路等の表面のブロッキングについて検討している。次に、酵素反応をより効率的に進行させるための溶液プラグの体積を最適化する検討を行っている。さらに、酵素反応生成物を酸化する微小電極および銀を析出する微小電極の形状についても改良検討を行っている。これらの最適化をもとに、第3章で述べている2つの流路中の溶液間に電位差を印加する方法を用いて AFP の検出を試みている。その結果、検出限界として 76.7 pg/mL が達成されたことを述べている。次に、別の手法として、微小櫛型電極アレイを用いたレドックスサイクリングで感度向上を図った結果が述べられている。反応生成物として p-aminophenol (PAP)を生成するために、標識として用いる酵素にアルカリフォスファターゼを用いた。予備実験として PAP をレドックスサイクリングで直接検出した場合、検出限界として 80 pM が達成されたことを述べている。これをもとに AFP の検出を試みたところ、その検出限界として最終的に 19.6 pg/mL が達成されたことを述べている。

第5章では、以上の内容を総括している。

## 審 査 の 要 旨

〔批評〕

本研究では微小クーロメトリックデバイスによるタンパク質のセンシングについて述べている。電気化学的手法はデバイスの微小化、一括大量生産を行う上で有利である。また、その中でもクーロメトリーは微量サンプル中の成分分析において、従来から多用されているアンペロメトリー等の他の手法よりも有利である。本研究で用いたデバイスでは、2本の微小流路を用いて検出対象物質を一旦銀に置換してこれをクーロメトリーで定量しており、この方法は検出限界を下げる上で有効である。本研究では、さらに、これら2つの流路を結ぶ液絡を金属接続に変更することにより、検出対象物質の酸化および銀イオンの還元を起こす電位を意図的にずらしてこれらの反応を増幅しているが、この手法はこれまでに全く例のない新規なもので、高く評価できる。また、レドックスサイクリングによる感度改善も試みており、この手法も極めて有効であることを示している。この研究により、タンパク質(AFP)の検出限界については良好なレベルのものが得られていると思われるが、抗原・抗体反応において、ナノテクノロジーの導入によりさらなる改善も可能

であると思われる。POCT 等への今後の展開に期待したい。

〔最終試験結果〕

平成30年2月9日、数理物質科学研究科学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。