

学 位 論 文 題 名

Experimetnal Analysis of Piezoelectric Quartz
Crystal at Liquid Interface : Improvement and
Mechanistic Consideration Of Latex Piezoelectric
Immunoassay at A Liquid Phase-Based Sensor

（溶液界面における水晶エピゾ振動子の振動に関する実験：
ラテックスピエゾ電気免疫センターの改良と振動数変化の機構の考察）

学位論文内容の要旨

化学センサーによって、迅速、高感度かつ高再現性で、微量の物質が検知されるようになった。化学センサーは検知部分と信号変換部分とからなり、多くの研究がなされている。検知部分に生体由来の物質（酵素や抗体等の蛋白）や細胞、オルガネラを用いたセンサーを特にbiosensorと呼んでいる。信号変換部分にピエゾ素子を使用すると質量変化が検知され、いわゆる、mass-sensorとなる。よく使用されるピエゾ素子は水晶振動子であり、本研究でも水晶振動子を用いた。水晶結晶平板の両面に電極を付け、電極間に交流電圧をかけると、外部印加交流電場の周波数と結晶の固有振動数が一致すれば共振が起こる。水晶振動子の共振の鋭さを示すQ値は極めて大きく、発振の周波数が正確に一定となる。従って、この性質により、水晶振動子は電気回路ではフィルターおよび発振回路の部品として用いられている。このための電気回路は比較的簡単である。物質が水晶振動子に吸着すると固有振動数が減少するので、共振の周波数が減少する。すなわち、共振周波数の変化から吸着物質の量を求める事が出来る。感度は鋭敏であり、本研究で主に使用した9 MHzの水晶振動子（直径8 mm）では、1 ngの吸着で1 Hz変化する。デジタル回路を用いており、数Hzの変化が検出限界であるので、数ngを検知することが出来る。この意味で、この系をquartz crystal microbalance (QCM)と呼ばれることがある。

このような簡便で高感度のデバイスを免疫センサーに使用しようとする試みが多くなされてきた。すなわち、抗体または抗原を水晶振動子表面に固定化しておくと、免疫反応によって重量変化が生じるので、周波数の変化が観測される。抗体または抗原を水晶振動子表面に固定化するのは、表面に官能基をもった薄膜を作製し、化学結合で固定化するのが通常である。しかし、固定化の操作があるために、感度の一定した振動子を、すなわち振動子毎のばらつきのない素子を作製することは一般には簡単ではない。

黒澤等は latex piezoelectric immunoassay (LPEIA)と彼らが呼んだ水晶振動子を用いた新しい免疫センサーを考案している。抗体又は抗原を吸着させたラテックスが免疫反応によって凝集する際に、溶液中に水晶振動子を挿入しておくと、振動数の減少が見られることを

利用している。本方法は表面に薄膜をつくり固定化する必要がないという利点を持つ代わりに、水晶振動子の片面をシリコン剤で覆う必要があり、大変な労力がある。また、シリコン剤の存在それ自身が振動子にすでに負荷を与えているので、振動子にとってオーバーロードになっていることが予想され、感度の低下が予測される。また、水晶振動子を繰り返し使用できない。

そこで、まず、最初にLPEIAの改良を行なった。それは、水晶振動子の片面をシリコン樹脂で覆う必要をなくすることから開始した。このためのセルの開発に成功した。更に、このセルを使用することによって、通常400 μ lのサンプル量で実験でき、必要ならば100 μ lの微量でも測定できるようになった。研究が進むにつれて明らかになった点は、一度使用した水晶振動子は、2度目では、その感度が低下することである。これは水晶表面が汚れるためであろうと考察し、クリーニング法を考案した。この方法によって、38回までの繰り返し使用で感度の低下が見られず、また、新しい水晶振動子を使用するにあたって、この操作により感度が上昇した。LPEIA法によるリユーマチ因子の測定のための最適化を行なった。

次いで、LPEIAの周波数変化の原因を考察した。水晶表面を種々の方法で改変し、LPEIAの実験を行ない、周波数変化の原因を次のように考察した。溶液中で振動子の周波数が変化する原因は2つある。1つは溶液中における吸着であり、他の1つは溶液の密度と粘度の変化である。ラテックスが凝集する事によって密度と粘度が変化する可能性がある。しかし、(1) 抗体を吸着させたラテックスが電極表面に簡単な洗浄では落ちない程強く結合すること、(2) 電極表面を種々の方法で修飾したものをを使うと、ラテックスの吸着量の順と ΔF の順が、完全には比例しないが、一致した。したがって、周波数変化の原因として凝集体が振動子に吸着すること又は吸着したラテックスから凝集が起こるので、質量変化が観測されると考えられる。

最後に、LPEIAから離れて、溶液中における水晶振動子の発振周波数変化を引き起こす因子について考察した。粘性流体中での水晶振動子の発振周波数については、つぎの2つの式が提案されている。

$$\Delta F = -2.26 \times 10^{-6} F_b^{3/2} (\rho\eta)^{1/2} \quad (1)$$

$$\Delta F = -F_b^{3/2} \left(\frac{\rho\eta}{\rho_p \mu_q} \right)^{1/2} \quad (2)$$

ここで、 ρ および η は溶液の密度及び粘度である。また、 ρ_p および μ_q は水晶の密度およびずり応力係数である。(1)と(2)式は同じ形をしているが、係数が異なる。種々の濃度のショ糖溶液を用いて行なった実験値は(2)式の計算値よりもずっと小さい。(1)式との比較を行なうと、希薄溶液では実験値は理論値よりも若干大きい、濃度が濃くなるにつれて、実験値は理論値を下まわるようになる。これらの原因は現在不明である。発表されているデータは $(\rho\eta)^{1/2}$ に比例はするが、希薄溶液でも、実験値は理論値よりも有意に小さい。これは本研究で開発したセルの優秀さを示すものと思われる。

電解質溶液中の振動子の実験式として、(3)式が提出されている(純水中での発振周波数を基準にとっている)。

$$\Delta F = 2.87 \times 10^3 \kappa^{0.611} - 8.69 \times 10^3 (\rho - 1)^{1.02} \quad (3)$$

ここで、 κ はコンダクタンスである。KClとNH₄Cl溶液を用いてこの式の検証を行なったが、(3)式は実験値を説明することは出来なかった。種々の理由から、電気二重層が重要な役割をしているのではないかという示唆を得た。将来の問題である。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	加 茂 直 樹
副 査	教 授	栗 原 堅 三
副 査	助教授	三 宅 教 尚
副 査	講 師	宮 内 正 二

学 位 論 文 題 名

Experimetal Analysis of Piezoelectric Quartz
Crystal at Liquid Interface : Improvement and
Mechanistic Consideration Of Latex Piezoelectric
Immunoassay at A Liquid Phase-Based Sensor

(溶液界面における水晶エピゾ振動子の振動に関する実験：
ラテックスピエゾ電気免疫センタの改良と振動数変化の機構の考察)

化学センサーによって、迅速、高感度かつ高再現性で、微量の物質が検知されるようになった。化学センサーは検知部分と信号変換部分とからなる。信号変換部分にピエゾ素子を使用すると質量変化が検知され、いわゆる、mass-sensorとなる。よく使用されるピエゾ素子は水晶振動子であり、本研究でも水晶振動子を用いている。水晶結晶平板の両面に電極を付け、電極間に交流電圧をかけると、外部印加交流電場の周波数と結晶の固有振動数が一致すれば共振が起こる。物質が水晶振動子に吸着すると固有振動数が減少するので、共振の周波数が減少する。すなわち、共振周波数の変化から吸着物質の量を求める事が出来る。感度は鋭敏であり、本研究で主に使用した9 MHzの水晶振動子（直径8 mm）では、1 ngの吸着で1 Hz変化する。デジタル回路を用いており、数Hzの変化が検出限界であるので、数ngを検知することが出来る。この意味で、この系をquartz crystal

microbalance (QCM)と呼ばれることがある。

このような簡便で高感度のデバイスを免疫センサーに使用しようとする試みが多くなされてきた。すなわち、抗体または抗原を水晶振動子表面に固定化しておく、免疫反応によって重量変化が生じるので、周波数の変化が観測される。抗体または抗原を水晶振動子表面に固定化するのは、表面に官能基をもった薄膜を作製し、化学結合で固定化するのが通常である。しかし、固定化の操作があるために、感度の一定した振動子を、すなわち振動子毎のばらつきのない素子を作製することは一般には簡単ではない。

黒澤等は latex piezoelectric immunoassay (LPEIA) と彼らが呼んだ水晶振動子を用いた新しい免疫センサーを考案している。抗体又は抗原を吸着させたラテックスが免疫反応によって凝集する際に、溶液中に水晶振動子を挿入しておく、振動数の減少が見られることを利用している。本方法は表面に薄膜をつくり固定化する必要がないという利点を持つ代わりに、水晶振動子の片面をシリコン剤で覆う必要があり、大変な労力がある。また、シリコン剤の存在それ自身が振動子にすでに負荷を与えているので、振動子にとってオーバーロードになっていることが予想され、感度の低下が予測される。また、水晶振動子を繰り返し使用できない。

そこで、まず、申請者は最初にLPEIAの改良を行なった。それは、水晶振動子の片面をシリコン樹脂で覆う必要をなくすることから開始した。このためのセルの開発に成功した。更に、このセルを使用することによって、通常400 μ lのサンプル量で実験でき、必要ならば100 μ lの微量でも測定できるようになった。研究が進むにつれて明らかになった点は、一度使用した水晶振動子は、2度目では、その感度が低下することである。これは水晶表面が汚れるためであろうと考察し、クリーニング法を考案した。この方法によって、38回までの繰り返し使用で感度の低下が見られず、

また、新しい水晶振動子を使用するにあたって、この操作により感度が上昇した。LPEIA法によるリユーマチ因子の測定のための最適化を行なった。

次いで、LPEIAの周波数変化の原因を考察した。水晶表面を種々の方法で改変し、LPEIAの実験を行ない、周波数変化の原因を次のように考察した。溶液中で振動子の周波数が変化する原因は2つある。1つは溶液中における吸着であり、他の1つは溶液の密度と粘度の変化である。ラテックスが凝集する事によって密度と粘度が変化する可能性がある。しかし、(1) 抗体を吸着させたラテックスが電極表面に簡単な洗浄では落ちない程強く結合すること、(2) 電極表面を種々の方法で修飾したものを使うと、ラテックスの吸着量の順と ΔF の順が、完全には比例しないが、一致した。したがって、周波数変化の原因として凝集体が振動子に吸着すること又は吸着したラテックスから凝集が起こるので、質量変化が観測されると考えられる。

最後に、LPEIAから離れて、溶液中における水晶振動子の発振周波数変化を引き起こす因子について考察した。粘性流体中での水晶振動子の発振周波数については、過去の研究者によって理論式が提案されていたが、この式は、完全には実験と一致しないとされていた。しかし、申請者は測定セルを工夫することにより、この理論が実験と一致することを示した。この事は、逆に、今まで他の研究者の行ってきた過去の実験の不都合な点を明らかにしたことになる。電解質溶液の中での発振についても研究しているが、電気二重層が重要であると指摘したにとどまっており、将来の問題である。

この様に、申請者は水晶振動子の免疫センサーへの応用への開発および振動子の発振周波数の変化の原因等に関する徹底的な研究を行なったものであり、その成果は極めて興味深い。従って博士(薬学)の学位を授与するに十分であると認めた。