

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13722

研究課題名(和文)音-流れ複合場によるマイクロスフィアのサイズセンシングと反応の動的評価

研究課題名(英文)Size sensing and dynamic evaluation of reactions with acoustic-gravitational field

研究代表者

岡田 哲男 (Okada, Tetsuo)

東京工業大学・理学院・教授

研究者番号：20183030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ粒子表面で起こる反応を利用して、マイクロ粒子の物性を変化させ、それを超音波放射力によって計測した。マイクロ粒子上での反応に必要な物質量はわずかであり、それを物理量の変化として捉えれば新たな微量分析の開発が可能である。平均粒径 $4.4\mu\text{m}$ の単分散エポキシ粒子を調製し、表面にアビジン就職を行った。これとビオチン結合した金ナノ粒子を結合させることで、マイクロ粒子の密度を大きくした。この変化を超音波-重力複合場での浮揚位置として捉えた。これにより、 zmol レベルの物質を計測できる新手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：This work proposes a concept for sensing based on the density change of microparticles (MPs) caused by a biochemical reaction. The MPs are levitated by a combined acoustic-gravitational force at the position determined by the density and compressibility. When gold nanoparticles (AuNPs) are bound on the surface of polymer MPs through a reaction, the density of the MPs dramatically increases, and their levitation position in the acoustic-gravitational field is lowered. Because the shift of the levitation position is proportional to the number of AuNPs bound on one MP, we can determine the number of molecules involved in the reaction. The avidin-biotin reaction is used to demonstrate the effectiveness of this concept. The number of molecules involved in the reaction is in a zmol range; thus, the method has potential for highly sensitive detection.

研究分野：分析化学

キーワード：超音波 マイクロ粒子 金ナノ粒子 密度 微量計測

1. 研究開始当初の背景

音響放射力による粒子凝集は、細胞や粒子を一カ所に集める方法として利用されている。申請者は鉛直方向の音響放射力と重力を均衡させると、凝集位置が粒子の組成で決まることを指摘し、それを分離や反応解析に利用できることを示してきた(*Anal. Chem.* 73, 3467; 79, 3003; 83, 4472 など)。また、基本音場に直交する音場(直交音場)と同じ方向の流れを利用して大きさを見分けられることを見出した(*Anal. Chem.* 84, 10750)。粒子は流れがないときの位置から、流体中では横方向の超音波放射力とストークス抵抗が均衡する位置に移動する。この位置は粒子の大きさに依存し、小さい粒子ほど下流に移動する。つまり、変位は粒子の大きさを反映する。また、多用されている縦方向の超音波放射力に関しても反応による浮揚位置変化から微量分析などを達成した研究例はない。つまり、縦方向、横方向いずれの超音波放射力もこれまでは有効な計測、分析方法としては用いられてこなかった。特に定量まで視野に入れた研究例はない。

一方、マイクロ粒子上での反応はオフライン計測あるいは in situ では分光測定により評価される。多くの反応では有意な分光特性の変化を起こすような設計が必要であり、また未反応物質と粒子と反応したものを分離する必要がある。この点で反応量を分光法以外の方法で計測することは有意義である。超音波定在波を用いると粒子上に起きた密度変化や大きさの変化を粒子の位置に変換して計測することが可能である。つまり、これまでの計測原理とは異なる新たな計測法への発展が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、マイクロ粒子表面で起こる反応を利用して、マイクロ粒子の物性を変化させ、それを超音波放射力によって計測した。マイクロ粒子上での反応に必要な物質量はわずかであり、それを物理量の変化として捉えれば新たな微量分析の開発につながる。本研究では、当初横方向の音響放射力と流れの複合場による粒子の大きさの変化を捉えることで微量分析を達成することを考えていた。しかし、検討過程で縦方向の音響放射力を利用して密度変化として粒子浮揚位置の変化を計測する方がより柔軟な系の設計が可能であり、また比較的容易に微量計測に展開できると考え、方法を変更した。これにより、 μmol レベルの物質を計測できる新手法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

音の定在波中にある粒子は次式で表される音響放射力を受ける。音響放射力は粒子の体積に比例し、大きな粒子ほど大きな力を受ける。しかし、この力と重力(沈降力)を釣り合わせると、その浮揚位置の座標(z ;

定在波の節からの距離)は

$$z = \frac{1}{2k} \sin^{-1} \left\{ \frac{(\rho - \rho^*)g}{kAE_{ac}} \right\}$$

$$A = \frac{5\rho^* - 2\rho}{2\rho^* + \rho} - \frac{\rho c^2}{\rho^* c^{*2}} = \frac{5\rho^* - 2\rho}{2\rho^* + \rho} - \frac{\gamma^*}{\gamma}$$

となる。ここで、 r は粒子の半径、 λ , k , E_{ac} は、それぞれ音波の波長、波数、平均エネルギー密度であり、 z , ρ , c , γ は、それぞれ媒質と粒子(*を付したもの)の密度、音速、圧縮率である。この式は、粒子は大きさによらず同じ組成の粒子は同じ位置に浮揚することを示している。これが他の物理場にはない、音響放射力-重力(沈降力)複合場の特徴である。

実験は図1の装置を用いて行った。ファンクションジェネレータで発生した500 kHzのサイン波をパワーアンプで増幅し、圧電素子に電圧を印加した。超音波は石英製のセルに伝わり、その後セル中央の方形チャンネル内の水中に定在波が発生した。セルの壁とチャンネルの高さはそれぞれ石英と水中の音速を考慮して500 kHzの超音波の波長に合わせて設計、作製した。水中には後述する粒子を分散させ、その挙動をCCDカメラで観察した。

市販のポリスチレン粒子は密度が水に近く超音波によるトラップが弱いので高密度のエポキシ粒子(EP)を合成した。エポキシ粒子作製にはポンピングコネクターおよびダイレクトコネクターを用いた。ポンピングコネクターの中央にはシリカ多孔質ガラス膜が組み込まれており、左右の開口部にシリンジを差し込み使用する。シリカ多孔質ガラス膜に水相と油相の混合液を通すことで、エマルションを作製した。この操作を繰り返すことにより、径の小さいエマルションを作製した。

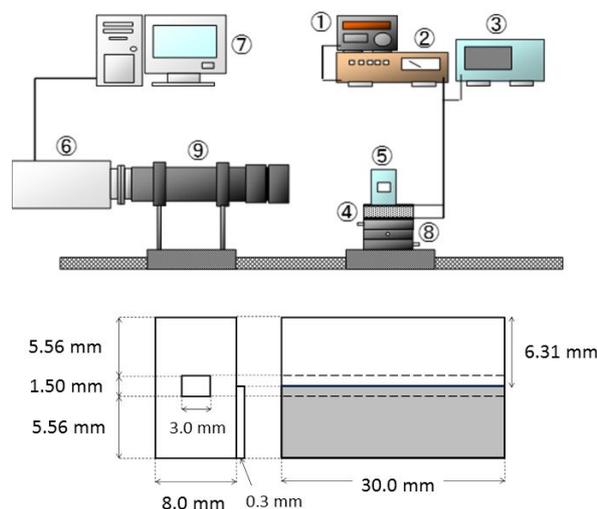


図1 実験装置の概略図

エマルジョンは以下の油相と水相から調製した。油相にはエチレングリコールジメタクリレート(EDMA)とグリシジルメタクリレート(GMA) 4:1 混合溶液に重合開始剤である 1w/v% 2,2'-アゾビスイソブチロニトリルを加えたものを用いた。EDMA および GMA の構造式を図 2 に示す。水相には 0.2 %メチルセルロース水溶液を用いた。水相と油相は 4:1 で混合した。シリカ多孔質ガラス(SPG)膜の細孔径は最終的なエマルジョン径に大きく影響を及ぼす。ポンピングを同速度で複数回行うことにより、エマルジョン径は SPG 膜の細孔径以下になることが知られている。本研究では、超音波の特性と粒子表面反応に対する感度を考慮して直径 10 μm 程度の粒子の調製を目指すことにした。これらのことを考慮して粒子を作製するために SPG 膜の細孔径が 20 μm のポンピングコネクタを用いることにした。ポンピングコネクタにより調製したエマルジョンを銅容器に入れ、スターラーにより 850 rpm で 78 $^{\circ}\text{C}$ 、6 時間加熱することで重合させた。ポンピング速度とポンピング回数を変えながら条件の最適化を行った。得られた粒子は超純水とエタノールを用いて洗浄した。

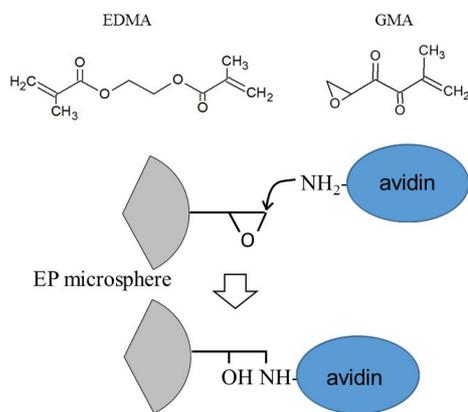


図 2 EDMA と GMA の構造式および調整したエポキシマイクロ粒子表面へのアビジンの結合反応

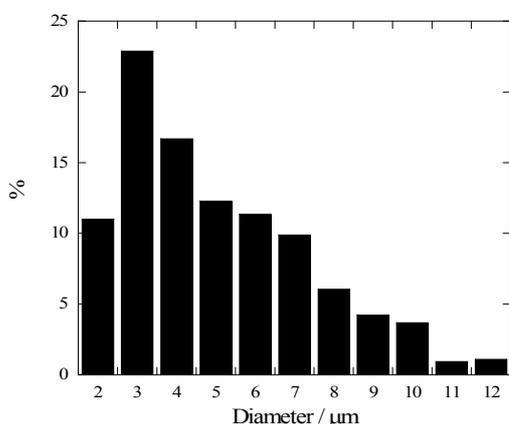


図 3 合成した EP 粒子の粒径分布

表 1 EP 粒子の粒径、密度、質量

粒径 / μm	密度 / g cm^{-3}	一粒子質量 / g
4.41 (2.29)	1.304	1.10×10^{-7}

調整した EP 粒子の粒径分布を図 3 に示す。粒径の分散はあるが、平均粒径 4.4 μm の粒子が調製できた。当初想定した粒径よりも小さかったが、小粒径の方が密度変化が大きく、高感度が期待できたので、以下の検討ではこの粒子を用いた。EP 粒子の物性値を表 1 にまとめる。

4. 研究成果

本研究における表面反応による粒子物性変化誘起のコンセプトを図 4 に示す。マイクロ粒子と密度が 10 倍以上大きい金ナノ粒子(AuNP)を適当な反応を介して結合させることを想定した。本研究では、結合定数が 10^{15} 程度あることが知られているアビジン-ビオチン反応を利用することにした。ビオチン結合 AuNP は市販品が入手可能なので、調製した EP にアビジンを結合させた。アビジンの結合は EP 粒子表面のエポキシ基を利用して行った。反応の概略を図 2 に示す。このようにアビジンを導入した EP 粒子にビオチン結合 AuNP が結合することにより、EP 粒子の密度が大きくなり浮揚位置が変化することを想定した。

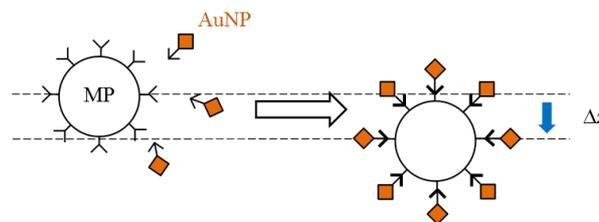


図 4 マイクロ粒子表面への金ナノ粒子結合の模式図

EP 粒子、および AuNP をアビジン-ビオチン反応により結合させた EP の浮揚位置画像を図 5 に示す。AuNP の粒径が 50 nm、100 nm と大きくなるにつれて浮揚位置が下がっていることがわかる。これは AuNP の結合により EP 粒子全体の密度が大きくなったこと、粒径の大きな AuNP の方が効果が大きいを示している。実際には表面のアビジンの一部にのみ AuNP が結合しており、AuNP の粒径が大きいつきに結合 AuNP 数が小さくなる傾向があった。しかし、密度への効果は 100 nm AuNP の方が明らかに大きいので、以降の検討では 100 nm AuNP を主に用いることにした。

超音波放射力は、密度だけでなく圧縮率によっても影響される。金の圧縮率はエポキシ樹脂に比べて小さく、AuNP の結合は圧縮率の低下を誘起する。しかし、浮揚位置に対するこの効果は小さく、密度変化による影響に



図5 エポキシ粒子および 50 nm、100 nm の AuNP をそれぞれ表面結合したエポキシ粒子の音場-重力複合場内での凝集、浮揚の様子

密度と圧縮率による影響を計算した結果を図6に示す。図6Aはエポキシ粒子一粒子当たり結合したAuNPの数とAuNPが結合したEP粒子の密度の関係を示す。50 nm、100 nmのAuNPいずれに対してもほぼ直線的に密度が変化していることがわかる。図6Bはエポキシ粒子一粒子当たり結合したAuNPの数と音場内での浮揚位置の関係を示している。ほぼ直線的に変化しているが若干曲がっている。この非直線性は主に圧縮率により起こっているが、狭い範囲の議論ではあまり重要でないことがわかる。

以上のことから、結合するAuNPの数と密度の間には直線関係があること、密度変化により超音波浮揚位置もほぼ直線的に変化することがわかった。したがって、浮揚位置からマイクロ粒子に結合したAuNPの数、最終的にはマイクロ粒子とAuNP間の結合に関与した分子の数がわかることが示された。

実際に、反応するAuNPの数を調節し、表面に結合したAuNPの数が異なるEP粒子を複数調製し、その浮揚位置を計測した。図7にその結果をまとめる。この図から、浮揚位置と反応したAuNP数には直線関係があることがわかる。精度をさらに高める必要があるが、浮揚位置の標準偏差がおおよそ10 μmであることから、500個程度の金ナノ粒子を測定できていることがわかった。これは500組のアビジン-ビオチン反応を計っていることに相当する。つまり、zmolでの計測が可能になったことを意味する。

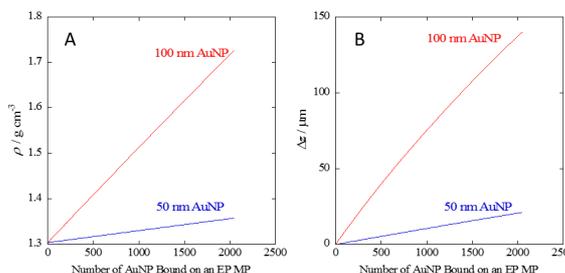


図6 エポキシ粒子一粒子当たり結合したAuNPの個数と粒子の密度(A)および粒子の浮揚位置(B)の関係

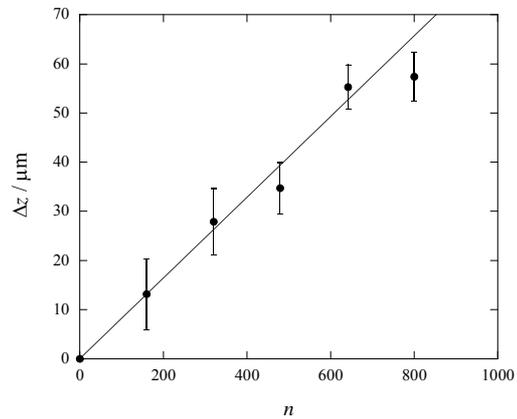


図7 アビジン-ビオチン反応を利用してエポキシ粒子に100 nmAuNPを結合した際の浮揚位置と結合AuNPの個数の関係

以上のように、超音波を利用することにより、反応量を浮揚位置、つまり長さ次元で計測する新しい方法を確立することに成功した。また、この方法を用いて zmol レベルでの計測が可能であることを証明した。しかし、現状では、複数粒子の集団挙動を計測しており、実際に zmol の物質を計っているわけではない。今後、真に zmol レベルの計測が可能であることを示すためには、単一粒子の浮揚位置変化に基づく測定をする必要がある。

本研究で開発した手法は、様々な反応に適用可能である、DNAのマッチングやミスマッチング、抗原抗体反応、ホストゲスト反応、錯体生成による金属イオンの定量など適用範囲は極めて広いことが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) Acoustic Sensing Based on Density Shift of Microspheres by Surface Binding of Gold Nanoparticles, Akihisa Miyagawa, Yoshinori Inoue, Makoto Harada, and Tetsuo Okada, *Anal.Sci.* in press. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 超音波定在波を利用した粒子表面反応の評価、宮川晃尚, 原田誠, 井上嘉則, 岡田哲男、第65回日本分析化学会第65年会、札幌、2016年9月14日。

(2) 超音波トラッピングによる粒子表面反応の検出、宮川晃尚, 原田誠, 井上嘉則, 岡田哲男、第77回分析化学討論会、京都、2017年5月28日。

6. 研究組織

(1)研究代表者 岡田 哲男(Tetsuo Okada)
東京工業大学・理学院・教授
研究者番号：20183030