

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22545

研究課題名（和文）超音波定在波による平衡反応系の超微量計測

研究課題名（英文）Trace detection in equilibrium system using ultrasound standing wave

研究代表者

宮川 晃尚（Akihisa, Miyagawa）

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：80881599

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：超音波定在波を用いた新規微量計測法を開発した。粒子表面上のin situ計測は新規セルを用いて、流れ場中で1粒子をトラップする手法を考案した。中空粒子を用いた計測法では、中空マイクロ粒子と金ナノ粒子の組み合わせで、浮揚位置のダイナミックな変化を誘起し、微量計測につなげられることを示した。結合破断を利用した計測法では、マイクロ粒子とガラス基板間のDNAを数千個程度計測できることを示した。また、さらに発展させ、マイクロ粒子とガラス基板間の分子相互作用を平衡定数として半定量的に評価する手法を確立させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、分析化学の分野では定性的にしか利用されてこなかった超音波を定量的な微量計測法に応用している。これにより、音響場を利用している研究者や分析化学者に学術的な影響を与えることができる。また、数千分子の微量計測はPCR法のような増幅を用いずに行うことが可能である。計測はシンプルな装置によって構成されており、コンパクトな計測装置として構築可能である。したがって、医療などの現場でも簡単に活躍できる手法となると考えている。

研究成果の概要（英文）：Novel trace detection schemes using ultrasound standing wave were proposed. In the in situ measurement of target on a particle surface, entrapment of single microparticle in the flow cell was achieved. In the detection scheme using hollow particles, the dynamic change in levitation coordinate of the particle, which allows us to detect the target with high sensitivity, was observed through the binding of the hollow microparticles and gold nanoparticles. In the detection scheme based on the bond breaking between the microparticle and glass plate, several thousand molecules of DNA molecule were detectable. Moreover, the semi-quantification of binding constant for the complex between the microparticle and glass plate was demonstrated.

研究分野：分析化学

キーワード：微量計測 超音波 マイクロ粒子 DNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

電場・光場・磁場・音響場といった物理場は粒子の物性を認識することができるため、粒子分離によく用いられている。しかし、その利用法は定性的なものに限られ、定量的利用は少ない。少例として、渡會らの磁場泳動によるマイクロ液滴表面吸着量の評価(*Anal. Sci.*, **2008**, *24*, 133) や、Whitsidesらの磁場を用いた密度計測やラジカル重合の反応速度評価がある(*J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 18688 など)。このように物理場を定量的に用いる方法は分析化学だけでなく物理化学においても重要であるにも関わらず、その利用法の困難さ・汎用性の低さから波及していない。Masudoらは超音波-重力複合場(CAG)を提唱し、大きさには依存しない、密度と圧縮率の関数による粒子分離を達成した(*Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 3467)。申請者はこのCAGがMPの密度変化を認識し、浮揚位置の変化として観測できるという特徴を利用し、反応計測を行った。密度変化誘起物質としてAuNPを用いることで生体関連物質(タンパク質、DNA/RNA、生理活性物質)の zmol オーダーでの検出を達成した。

平衡反応による結合を利用した計測法では、一般的に平衡定数が小さくなるにつれて感度が悪くなる。申請者の計測法も例にもれず、 $K > 10^8 \text{ M}^{-1}$ の反応系しか計測できない。そのために、多くの研究者が酵素による増幅反応などによる分子増幅やシグナル増幅を行ってきた。しかし、これらの方法はより微量なターゲットを検出しようとするほど増幅によるエラーを引き起こしやすい。したがって、増幅を利用せずに、少量の反応でより物性値の変化を起こす手法、または平衡定数の小さい系に適した実験系を構築する必要がある。一般的な分光法などによる定量法ではなく、反応によって密度変化を誘起し、浮揚位置の変化として定量するというこれまでにない計測原理によって、微量計測を実現するという事は、学術的にも非常に意義深いと考えている。

2. 研究の目的

超音波定在波を利用した超微量計測の新規計測原理の確立を目的としている。実施者はこれまでに、CAGの密度変化を浮揚位置の変化(長さ)として検出ができる特性を生かし、生体関連物質を zmol レベルで計測できることを示してきた。しかし、これまでの手法は適用範囲が平衡定数の大きな反応系($K > 10^8 \text{ M}$)しか計測できないことが現状である。そこで、微小空間内におけるその場計測や、結合が切れることを計測するという考え方を導入することにより、弱い平衡反応を超高感度で計測できる原理を確立することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)微小空間内での in situ 計測

CAGの存在する微小空間内でマイクロ粒子表面反応を誘起することで、可逆系、平衡系を含めた反応を可能にする。新規セルを設計し、その場計測による微量なMPの浮揚位置の変化を計測することで、平衡定数の小さい反応を定量できる。また、フローシステムを導入することにより、反応のリアルタイム計測を行えるため、粒子表面反応の速度論的評価を可能にする。

(2)中空ナノ粒子を利用したデジタル計測

超音波定在波中では粒子の圧縮率と密度によってあらわされるパラメーターが正ならば定在波の節に、負ならば腹に集まる。MPと金ナノ粒子の結合ではこのパラメーターは常に正であったが、空気などの気体が内包された中空粒子(HP)をMPまたはナノ粒子と結合させるとこのパラメーターが正から負または負から正に変化するため、この点を境にダイナミックな浮揚位置の変化が起きる。中空ナノ粒子の作製や中空マイクロ粒子を用いて浮揚位置の観測を行った。

(3)結合破断を利用した反応計測

従来の計測法は結合が形成されることを利用し、そのときの物理量の変化を計測することで、微量計測を行ってきた。逆に申請者は、結合が切れたことを計測することで、微量計測を行うことを考案した。ガラス基板上にMPを反応により結合させる。超音波定在波を発生させると、粒子は節の方向へ力を受ける。この力は密度の関数であり、MPへのAuNPの結合により力が大きくなる。この力がMPとガラス壁面の結合力を越えると、結合が切れるため、AuNPの結合数に基づき微量計測が可能である。

4. 研究成果

(1)微小空間内での in situ 計測

図1に示す新規セルを用いて、1粒子浮揚実験を行った。溶液を流しながらでも粒子浮揚が可能になるように、1 MHzのトランスデューサーを用いて超音波エネルギーが大きくなるようにした。これにより、一粒子の浮揚が可能となったため、粒子表面反応の in situ 計測を行った。しかし、粒子浮揚は維持されたものの、溶液フローによる流れ場と超音波による複雑な流れ場によって、浮揚位置の座標に関しては解析できなかった。本実験セルでは、粒子浮揚の最安定位置が溶液の排出部近くに生じてしまったため、流れ場による浮揚位置の不安定性を誘起してしまっ

た。したがって、流路の横幅を長くし、排出部より遠くに最安定な浮揚座標を形成することで解決を図る。

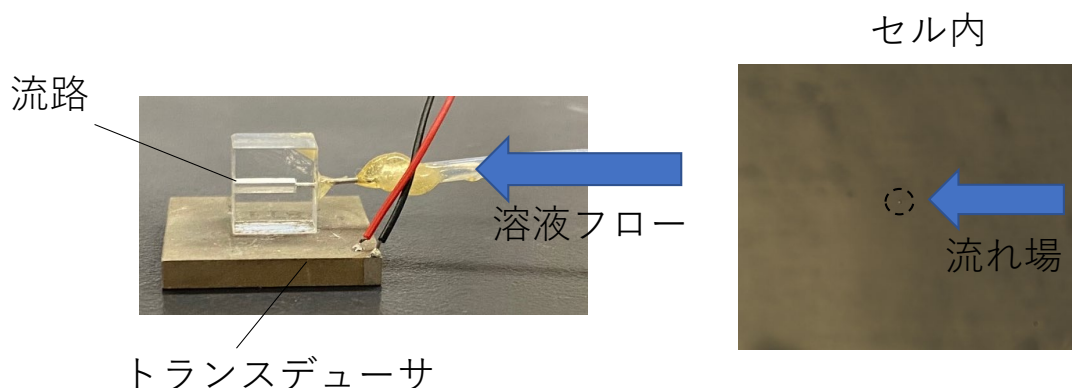


図 1 in situ 計測測定セルと一粒子トラップ

(2) 中空ナノ粒子を利用したデジタル計測

こちらについても図 2 に新規セルを設計し、計測を行った。流路は 500 kHz の周波数で腹が 2 つ、節が 1 つ形成されるように設計した。中空ナノ粒子の合成を行い、マイクロ粒子に結合させることで節から腹への移動を観測しようとしたが、数 μm オーダーの中空粒子しか作製できず、このコンセプトを変更した。

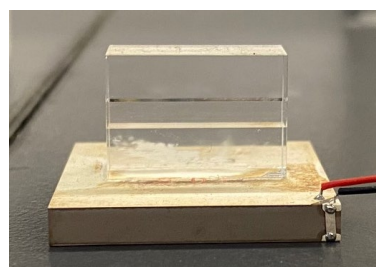
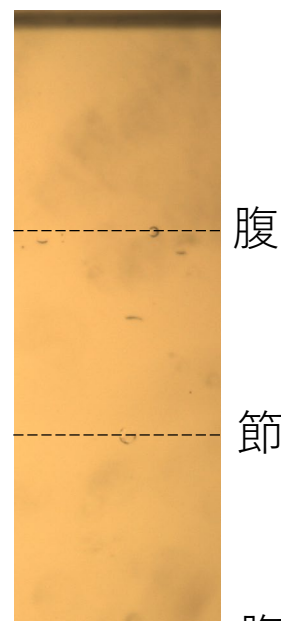


図 2 中空粒子を用いた微量計測セル

変更した手法は、中空のガラスマイクロ粒子に金ナノ粒子を結合させる手法である。これにより、腹から節へのダイナミックな変化を観測できるはずである。様々な粒子を検討したところ、中空ガラス粒子は Potters 社製 Spherical 60P18 が最適であると判明した。こちらの表面にシラノールカップリングにより、エポキシ基を導入し、その後アビジンを修飾した。これらとビオチン修飾金ナノ粒子を結合させることで、中空マイクロ粒子の密度および圧縮率を変化させた。

図 3 に中空粒子 1 個に対し、金ナノ粒子を 40000 個結合させたときの粒子浮揚画像を示す。明らかに腹の位置と節の位置にそれぞれ粒子が集まっていることがわかる。これによって、中空粒子を用いたダイナミックな浮揚位置変化の観測というコンセプトを達成した。全て腹または節に集まらない理由は粒径や固体部の厚さにばらつきがあるためである。30000 個の金ナノ粒子を結合させても中空粒子は腹にしか集まらないことから考えて、本手法は 30000-40000 個の金ナノ粒子またはアビジン-ビオチン反応を計測できることを示している。細かい条件検討を行うことで、新規計測法として確立させる。



(3) 結合破断を利用した反応計測

結合破断を利用した微量計測では、装置構成(図 4)から行った。これまではセルを横から観測し、浮揚位置を計測していたが、ガラス面に固定化された粒子数を計測するために、上から観測するようにした。コの字型のセルにガラス板を載せることで、流路が形成されるようにした。ガラス板とマイクロ粒子には相補的な DNA を修飾し、結合解離が起きやすくなるように 4 塩基で相互作用するようにした。一方でマイクロ粒子と金ナノ粒子は 20 塩基の DNA で強力に結合するように設計した。ガラス面にマイクロ粒子を固定化した後、ぶら下げるといった形で、コの字型セルにのせ、超音波を発生させた。これにより、マイクロ粒子には音響放射力と沈降力の二つの力が働く。超音波定在波は電圧の関数であり、電圧を増加させる

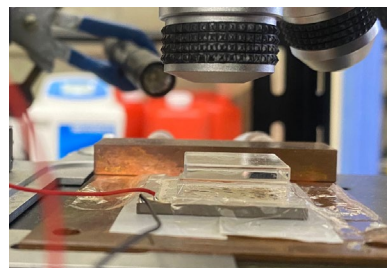


図 4 測定セル

とガラス板-マイクロ粒子間の DNA の相互作用力を越えたところで、結合が解離する。粒子解離が起きるときの印加電圧 (V) とマイクロ粒子の物性の関係は以下の式で与えられることを明らかにした。

$$V = \sqrt{\frac{F_{\text{bind}} - A(\rho' - \rho)}{\left(\frac{5\rho' - 2\rho}{2\rho' + \rho} - \frac{\gamma'}{\gamma}\right) \alpha B}}$$

$$A = \frac{4}{3}\pi r^3 g$$

$$B = \frac{8\pi^2}{3\lambda} r^3 \sin\left(\frac{4\pi z}{\lambda}\right)$$

ここで、 F_{bind} は粒子-ガラス間の結合力、 ρ と ρ' はそれぞれ媒質 (水) と粒子の密度、 γ と γ' はそれぞれ媒質と粒子の圧縮率、 α は装置依存パラメーター、 r は粒子半径、 λ は超音波の波長、 z は節からの位置である。この式に従い、粒子の解離が起きることを実証した。

この原理に従い、金ナノ粒子の結合量 ($r_{\text{AuNP/SP}}$) と粒子が解離する電圧の変化量 (ΔV_{50}) をプロットすることで、検量線を作成した (図 5)。結果として良好な直線性を得ることができ、数千個の金ナノ粒子または DNA の結合を定量できることを明らかにした。^{1,2}

また、上式は粒子解離する電圧が粒子-ガラス間の結合力の関数であることを示している。結合力は反応の平衡定数と相関があるため、平衡定数と解離電圧の関係から平衡定数の半定量が可能であると考えた。平衡定数があらかじめわかっている短鎖の DNA を粒子-ガラス板間の結合に使い、解離電圧を測定することで、平衡定数における検量線を作成した。モデルターゲットとして、BSA-イブプロフェン、コンカナバリン A-グリコーゲン、コンカナバリン A-マンナンを用いたところ、文献値とよく一致した。したがって、本計測原理が微量計測だけでなく、平衡定数の半定量法としても利用できることを示した。³

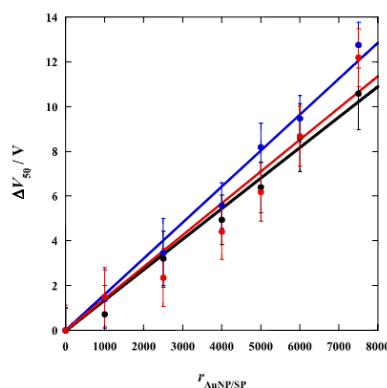


図 5 検量線

引用文献

1. [A. Miyagawa*](#), K. Oshiyama, S. Nagatomo, K. Nakatani, Zeptomole Detection of DNA Based on Microparticle Dissociation from a Glass Plate in a Combined Acoustic-Gravitational Field., *Talanta* **2022**, 238, 123042. [Featured Article] [Front Cover]
2. [宮川晃尚](#), 中谷清治, 長友重紀, 押山健悟, “超音波放射力による浮揚粒子計測に基づく超微量計測方法”, 筑波大学, 2021, 特願 2021-78624.
3. [宮川晃尚](#), 中谷清治, 長友重紀, 押山健悟, “平衡定数の半定量装置の開発”, 筑波大学, 2022, 特願 2022-041347.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyagawa Akihisa, Oshiyama Kengo, Nagatomo Shigenori, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 238
2. 論文標題 Zeptomole detection of DNA based on microparticle dissociation from a glass plate in a combined acoustic-gravitational field	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 123042 ~ 123042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2021.123042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hagiya Kenta, Miyagawa Akihisa, Nagatomo Shigenori, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 94
2. 論文標題 Direct Quantification of Proteins Modified on a Polystyrene Microparticle Surface Based on Potential Change	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6304 ~ 6310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.2c00457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyagawa Akihisa, Komatsu Hiroyuki, Nagatomo Shigenori, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 125
2. 論文標題 Effect of Molecular Crowding on Complexation of Metal Ions and 8-QuinolinoI-5-Sulfonic Acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 9853 ~ 9859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.1c05851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小松 弘幸; 宮川 晃尚; 長友 重紀; 中谷 清治
2. 発表標題 分子クラウディング環境下におけるオキシ錯形成反応の評価
3. 学会等名 第81回分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 押山 健悟; 宮川 晃尚; 長友 重紀; 中谷 清治
2. 発表標題 超音波放射力によるDNA二重鎖の解離を利用した微量計測
3. 学会等名 第81回分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 押山 健悟; 宮川 晃尚; 長友 重紀; 中谷 清治
2. 発表標題 超音波-重力複合場中のガラス基板固定粒子の解離挙動に基づくDNAセンシング
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萩谷 健太; 宮川 晃尚; 長友 重紀; 中谷 清治
2. 発表標題 ゼータ電位計による粒子表面上タンパク質の定量
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 平衡定数の半定量装置の開発	発明者 宮川 晃尚, 中谷 清治, 長友 重紀, 押山 健悟	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-041347	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 超音波放射力による浮揚粒子計測に基づく超微量計測方法	発明者 宮川晃尚, 中谷清治, 長友重紀, 押山健悟	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-78624	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------