

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2014

課題番号：21245022

研究課題名(和文) 磁場を利用する界面・微粒子の新分析法の開発

研究課題名(英文) Development of new analytical methods of microparticles and interfaces by using magnetic field

研究代表者

渡會 仁 (Watarai, Hitoshi)

大阪大学・学内共同利用施設等・招へい教授

研究者番号：30091771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,200,000円

研究成果の概要(和文)：以下のような界面・微粒子の新分析法を開発した。

1. 磁気力を利用して、微粒子のゼロ速度磁気泳動法、ブラウン運動磁気泳動法、二次元フロー磁気泳動法、ナノギャップ磁気泳動法、液液界面磁化率測定法を開発した。2. 磁気張力を利用して、化学結合力法、細胞表面とタンパク質の相互作用力測定法、力による化学平衡変位のラマン測定法等を開発した。3. 界面キラリティ分子測定法として、界面全内部反射円二色性測定法、マイクロエマルジョン中および液液界面におけるポルフィリン会合体によるキラリティ認識法等を開発した。4. 磁場と光を利用する新たな分析法として、液液界面全内部反射磁気光学測定法、パルス磁場ファラデー顕微鏡等を開発した。

研究成果の概要(英文)：Novel analytical methods of interfaces and microparticles were developed.

1. By using magnetic force to the particle or droplet, zero-velocity magnetophoresis, Brownian motion magnetophoresis, two-dimensional flow magnetophoresis, and liquid-liquid interfacial magnetic susceptibility determination method were invented. 2. Magnetic pulling force was employed to measure the chemical bonding strength, the cell-protein interaction force, and the chemical equilibrium shift detected by the surface enhanced Raman scattering. 3. As the detection methods of chirality of molecules, the liquid-liquid interfacial internal reflection circular dichroic method and the chiral recognition method with porphyrin aggregates in microemulsion and in liquid interfaces were developed. 4. Novel analytical methods by using magneto-optical effect were developed; the liquid-liquid interfacial total internal reflection magneto-optical method and Faraday rotation imaging method by using pulsed magnetic field.

研究分野：分析化学

キーワード：界面 微粒子 磁気泳動 磁気光学効果 キラリティー ファラデー効果 ポルフィリン

1. 研究開始当初の背景

従来の界面や微粒子の分析法の多くは、古典的方法が多く、特に界面・微粒子を対象とする分光法の開発が求められていた。これは、従来の方法では困難な、界面濃度や界面化学種をより直接的に測定する方法が材料、環境、バイオの分野で求められていたためである。微粒子の分離分析法についても、新しい方法の開発が必要とされていた。研究代表者は、微粒子の分離には微小な作用力の活用が原理的に重要であることを提案し、様々な新規な泳動法を提案していたので、それを更に発展させることが必要であった。特に磁場を用いる分析法は、特に新たな可能性に満ちているとの確信をもっていた。

2. 研究の目的

本研究は、「磁場を利用する界面・微粒子の新分析法の開発」を目標に、分離法、検出法、イメージング法における新たな磁場利用法を開拓する。具体的には、

(1) ナノ・マイクロ粒子の磁気泳動法の確立：ナノおよびマイクロメートルの微粒子を分析する新たな方法として、磁気力を利用する磁気トラップ分析法および磁気泳動速度解析法の新原理を開発する。

(2) 磁気張力の作用下における分子分光測定法の開発：生体分子に磁気張力を作用させ、分子の機能と構造を計測、評価する新方法を開発する。

(3) 界面を利用するキラル測定法の開発：マイクロエマルションCDおよび界面MCD法の利用により、生体分子や製剤分子の新たなキラル認識法を開発する。また、界面のキラル発現機構を解明する。

(4) 磁気光学効果を利用する界面イメージング法の開発：ファラデー効果を利用し、水や有機物の表面や界面の反磁性、キラリティー、電子密度等を検出する新方法を開発する。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、それぞれ必要な装置を設計・製作し、また必要な解析法を独自に開発した。個別には次の研究成果の項に記す。

4. 研究成果

界面・微粒子の新分析法の開発を目標に研究を行った。主な成果の概要を記す。

(1) 磁気泳動法の確立を目指した開発研究
ゼロ速度磁気泳動法の発明(図1)

微粒子の磁化率を磁気泳動速度から求めるには、微粒子を球とみなして、その半径を測定する必要があるが、精度の点で問題が多い。これを解決する方法として、磁気泳動速度がゼロとなる媒体の磁化率を知ることのみで、

微粒子の磁化率を決定する方法を開発した。

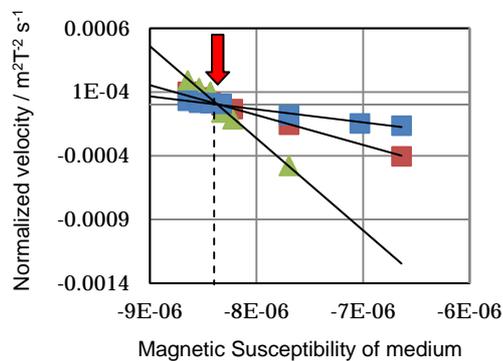


図1 ゼロ速度法によるポリスチレン微粒子の磁化率(矢印)の決定

ブラウン運動磁気泳動法の開発

1 μm以下の微粒子のサイズを光学顕微鏡で測定することは一般に困難である。その解決法として、ブラウン運動から実効的なサイズを求め、磁化率を決定する方法を開発した。この方法は、ナノ粒子に対して特に有効であることを実証した。

二次元フロー磁気泳動法の開発

マイクロ流路に対して斜めに磁気勾配を設置することにより、微粒子は二次元的に泳動する。この原理を用いて、微粒子のサイズ分離が可能であることを示した。

ナノギャップ磁気泳動法の開発

微粒子のサイズを測定する方法として、ナノギャップデバイスを組み込んだ磁気泳動セルを製作し、これをラマン顕微鏡に設置し、単一微粒子の磁気泳動速度と半径とラマンスペクトルを一つのセルで測定可能とした。この方法を大気中の浮遊微粒子の分析に応用した。

液液界面磁化率測定法の開発

エマルション液滴の磁気泳動速度から求められる液滴の磁化率は、一般に半径に依存しない。しかし、液滴界面に磁化率の異なる化学種が吸着すると、半径に依存することを理論的に予測し(図2)、実験でこれを証明した。Dy(III)と長鎖カルボン酸の錯体が界面で生成する系において界面磁化率を求め、Dy(III)の界面濃度を決定した。

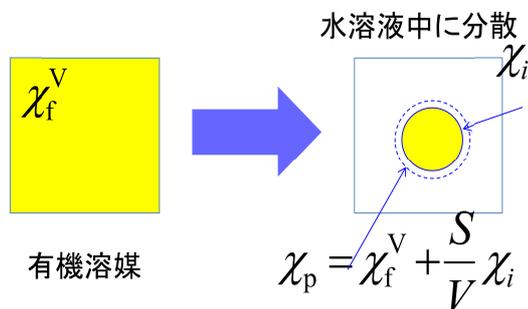


図2 界面磁化率の定義の説明図

(2) 磁気張力を利用する分析法の開発

液滴の特異な電磁泳動挙動の発見

キャピラリー内の有機液滴に電磁力が作用すると、液滴が等間隔に並んで回転したり、大きな液滴の周りに小さな液滴が周回する現象を見出した。これを、局所電磁力を解析することで説明した。

磁気力 QCM法の開発

QCMの金電極にあるリンカ分子を用いて磁性微粒子を化学結合させ、磁性微粒子を一定の磁気力で引っ張り上げ、周囲の温度を徐々に上昇させる。結合の切れる確率を温度の関数として求めることより、解裂の活性化エネルギーを求めた。この方法は、分子の解裂が力で起こることを直接的に証明し、新たな分子力の評価法として有効である。

細胞表面の糖鎖とタンパク質の相互作用力の電磁張力測定法の開発

酵母細胞の周りには糖鎖をキャピラリー内壁に固定したレクチンに結合させ、酵母を電磁浮力により20pN/sで増大する力で引っ張り、ダイナミックな解裂過程を解析した。その結果、張力のない状態での解離速度定数 $k_{off}(0)$ と臨界解離距離 x を求めることができた(図3)。

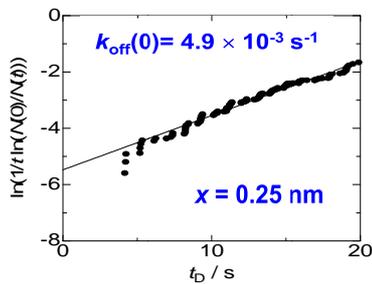


図3 酵母細胞とコンカナバリンAの結合の電磁張力ダイナミクス解析

磁気張力で誘起される化学平衡変位のSER S測定

銀ナノ粒子を結合させたガラス基板と磁性微粒子をシステアミン分子でつなぎ、磁性微粒子を一定の磁気力で引っ張りながらシステアミンのSER Sスペクトルを測定したところ、100pNの張力において、システアミンのトランス型の割合が37%から52%に増加した。これより、力はシス型よりも分子長の長いトランス型の自由エネルギーを低下させ、平衡を移動させることを実証した。

(3) 界面キラリ測定法の開発

液液界面全内部反射CD測定法による界面アミロイド生成反応の加速現象の解明

液液界面は、インスリンのアミロイド化に対して触媒作用を示すことを発見した。特にトルエン/水界面はアミロイド生成反応を促進した。これは、インスリン分子が界面に吸着し易いこと、界面ではヘリックス型が容易にシート型に変換し集合体の核を生成する

ためであることを明らかにした(図4)。

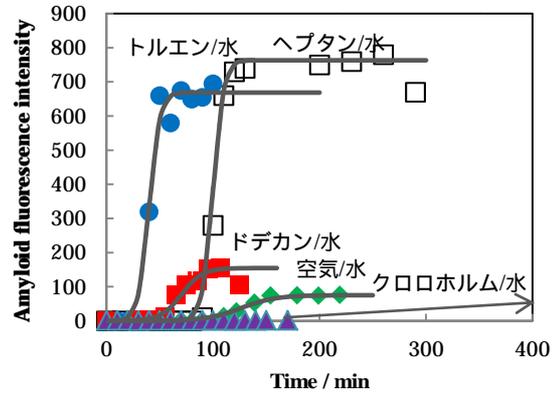


図4 インスリンのアミロイド生成速度

マイクロエマルション中のポルフィリン会合体によるキラリ認識法の開発

o/w型マイクロエマルションを溶媒としてポルフィリンのJ会合体を生成させると、鎖長の異なる2-アルキルアルコールのキラリティーを反映したCDスペクトルが得られることを発見した。

液液界面におけるポルフィリン会合体のキラリ認識能

遠心液膜セル中の液液界面において、ポルフィリンJ会合体のCDスペクトルが、共存する2-アルキルアルコールのキラリティーを識別できることを発見した。

ROAによるアミロイド生成反応の解析
ラマン光学活性(ROA)スペクトルにより、インスリンのアミロイドへの変換過程と、その一部が逆反応を示す過程を観測した。

遠心液膜系におけるキラリ会合体生成反応のミューラー行列解析

遠心液膜系の界面において、アキラリな会合体がCD類似のスペクトルを示す場合があることを、ミューラー行列解析法により明らかにした。

(4) 磁気光学効果を利用する新分析法の開発

液液界面全内部反射磁気光学測定

ドデカンと水相の界面にDy(III)とカルボン酸の錯体を生成させ、これを全内部反射ファラデー配置で磁気光学効果を測定した。反射光の回転角は磁場強度に比例し、またDy(III)濃度にも比例したことから、磁気光学効果に依ることを実証した。本研究は、液液界面の磁気光学効果を測定した稀な例である。

パルス磁場ファラデー効果測定法による反磁性液体の検出

ファラデー回転角が、試料液体の磁性の評価に利用できることを示し、得られるヴェルデ定数は、液体分子の原子数に比例すること、および芳香族電子を有する分子では一様

にモルヴェルデ定数が増大することを実験的に明らかにした(図5)。

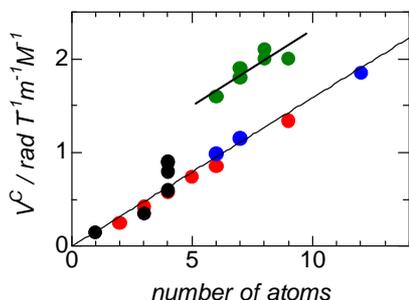


図5 有機液体のモルヴェルデ定数と原子数の関係(上方に離れている点は芳香族分子)

パルス磁場ファラデー顕微鏡による自然旋光と磁気旋光の同時測定
磁気旋光と自然旋光は互いに干渉しないことから、キラルな液体の磁性とキラリティーをファラデー顕微鏡により画像として識別できることを明らかにした。

ランタノイド(III)イオン溶液のヴェルデ定数の電子構造依存性
一連のランタノイドイオンのモルヴェルデ定数を決定し、そのf電子との相関性を明らかにした。

(5) その他

レーザー光泳動法により、キャピラリー中の赤血球と白血球を分離することに成功した。これは、レーザー光を吸収する赤血球がより早い移動速度を持つためであることを明らかにした。

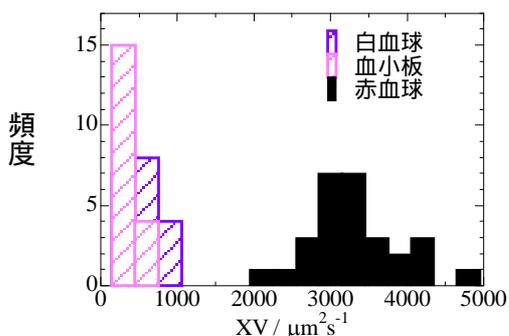


図6 フローセルに直角にレーザーを照射したときの血球の光泳動分離ヒストグラム(Xは光泳動距離、Vは泳動速度)

液液界面におけるオクタデシルローダミンBの単一分子の顕微蛍光検出を、水相のpHを変化させて行ったところ、pHが3以上では蛍光の観測時間が著しく減少することから、単一分子のラクトン化が起こったためであると結論した。

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 47 件)

(1) 磁気泳動関連

Zero-velocity magnetophoretic method for the determination of particle magnetic susceptibility

Watarai, Hitoshi; Duc, Hoang Trong Tien; Lan, Tran Thi Ngoc; Zhang, Tianyi; Tsukahara, Satoshi, Analytical Sciences 査読有(2014), 30(7), 745-749.

DOI:10.2116/analsci.30.745

Brownian motion-magnetophoresis of nano/micro-particles

Kawano, Makoto; Watarai, Hitoshi Analyst 査読有 (2012), 137(18), 4123-4126. DOI:10.1039/c2an35199d

Nano-gap magnetophoresis with Raman spectroscopic detection

Kawano, Makoto; Young, Jennifer L.; Watarai, Hitoshi Analytical Sciences 査読有 (2010), 26(12), 1211-1213.

DOI:10.2116/analsci.26.1211

Magnetophoretic measurements of interfacial magnetic susceptibility of micro-organic droplet

Suwa, Masayori; Watarai, Hitoshi Journal of Ion Exchange 査読有(2009), 21(1), 41-47. DOI:10.5182/jaie.21.41

(2) 磁気張力関連

Electromagnetic behavior of particles and droplets in capillary.

Watarai, H.; Funaki, M.; Kato, T. ECS Transactions 査読有(2013), 45(12), Exploiting Magnets in Electrochemistry), 21-24, DOI:10.1149/04512.0021ecst

Magnetic-force quartz crystal microbalance for the detection of chemical interactions

Imai, Shinichi; Watarai, Hitoshi Analytical Sciences 査読有 (2012), 28(9), 833-836. DOI:10.2116/analsci.28.833

Dynamic electromagnetophoretic force analysis of a single binding interaction between lectin and mannanpolysaccharide on yeast cell surface, Iguni, Yoshinori; Watarai, Hitoshi, Analyst 査読有 (2010), 135(6), 1426-1432. DOI:10.1039/b924339a

SERS measurements of magnetic stretching force-induced trans-gauche conformational change, Goto, Takeyoshi; Watarai, Hitoshi Analytical Sciences 査読有 (2010), 26(2), 135-136. DOI:10.2116/analsci.26.135

SERS Study of Rotational Isomerization of Cysteamine Induced by Magnetic Pulling Force, Goto, Takeyoshi; Watarai, Hitoshi Langmuir 査読有(2010), 26(7), 4848-4853. DOI:10.1021/la903637t

(3) 界面キラル測定関連

Acceleration of Insulin Amyloid Fibrillation at Liquid-Liquid Interfaces Watanabe, Shiori; Watarai, Hitoshi Bull. Chem. Soc. Jpn. 査読有 2015, DOI: doi:10.1246/bcsj.20150058

Induced optical chirality of porphyrin J-aggregates with 2-alkyl alcohol in a microemulsion system, Watarai, Hitoshi; Hiramatsu, Fumie; Duc, Hoang Trong Tien; Lan, Tran Thi Ngoc, Chemistry Letters 査読有 (2014), 43(8), 1257-1259. DOI:10.1246/cl.140366

Alignment and Chirality of Porphyrin J Aggregates Formed at the Liquid-Liquid Interface of a Centrifugal Liquid Membrane Cell, Takechi, Hideaki; Canillas, Adolf; Ribo, Josep M.; Watarai, Hitoshi Langmuir 査読有 (2013), 29(24), 7249-7256. DOI:10.1021/la304437g

Chiral recognition of 2-alkyl alcohols with porphyrin J-nanoaggregates at the liquid-liquid interface, Watarai, Hitoshi; Mitani, Koji; Morooka, Nanami; Takechi, Hideaki, Analyst 査読有 (2012), 137(14), 3238-3241. DOI:10.1039/c2an35494b

Raman optical activity study on insulin amyloid- and prefibril intermediate Yamamoto, Shigeki; Watarai, Hitoshi Chirality 査読有 (2012), 24(2), 97-103. DOI:10.1002/chir.21029

Chiroptical measurement of chiral aggregates at liquid-liquid interface in centrifugal liquid membrane cell by Mueller matrix and conventional circular dichroism methods Takechi, Hideaki; Arteaga, Oriol; Ribo, Josep M.; Watarai, Hitoshi Molecules 査読有 (2011), 16, 3636-3647 DOI:10.3390/molecules16053636

Monitoring the Backbone Conformation of Valinomycin by Raman Optical Activity Yamamoto, Shigeki; Watarai, Hitoshi; Bour, Petr, ChemPhysChem 査読有 (2011), 12(8), 1509-1518. DOI:10.1002/cphc.201000917

(4) 磁気光学効果関連

Total internal reflection magneto-optical detection of dysprosium(III) ions adsorbed at liquid-liquid interface, Watarai, Hitoshi; Gangopadhyay, Palash; Norwood, Robert A.; Peyghambarian, Nasser, Chemistry Letters 査読有 (2014), 43(10), 1651-1652. DOI:10.1246/cl.140566

Faraday rotation dispersion measurements of diamagnetic organic

liquids and simultaneous determination of natural optical rotatory dispersion using a pulsed magnetic field, Suwa, Masayori; Miyamoto, Kayoko; Watarai, Hitoshi Analytical Sciences 査読有 (2013), 29(1), 113-119. DOI:10.2116/analsci.29.113

Faraday Rotation Dispersion Microscopy Imaging of Diamagnetic and Chiral Liquids with Pulsed Magnetic Field, Suwa, Masayori; Nakano, Yusuke; Tsukahara, Satoshi; Watarai, Hitoshi, Analytical Chemistry 査読有 (2013), 85(10), 5176-5183. DOI:10.1021/ac400541k

Effective Transition Probability for the Faraday Effect of Lanthanide(III) Ion Solutions, Miyamoto, Kayoko; Isai, Kento; Suwa, Masayori; Watarai, Hitoshi Journal of the American Chemical Society 査読有 (2009), 131(18), 6328-6329. DOI:10.1021/ja9006468

(5) その他

Laser-photophoretic migration and fractionation of human blood cells Monjushiro, Hideaki; Tanahashi, Yuko; Watarai, Hitoshi, Analytica Chimica Acta 査読有 (2013), 777, 86-90. DOI:10.1016/j.aca.2013.03.036

Single-Molecule Lactonization of Octadecylrhodamine B at a Liquid-Liquid Interface, Matsui, Tomoko; Tsukahara, Satoshi; Watarai, Hitoshi Langmuir 査読有 (2012), 28(44), 15428-15432. DOI:10.1021/la302375z

Simple and precise size-separation of microparticles by a nano-gap method Enomoto, Yukiko; Monjushiro, Hideaki; Watarai, Hitoshi Analytical Sciences 査読有 (2009), 25(5), 605-610. DOI:10.2116/analsci.25.605

〔学会発表〕(計 36 件)

Novel magnetic and optical measurements of liquid-liquid interfacial reactions, Hitoshi Watarai, ISEC2014, September 7-11, 2014, Wurzburg, Germany

Conformational change and amyloid formation of protein at liquid-liquid interfaces, Hitoshi Watarai, Kimika Matsuura, Shiori Watanabe, September 1-6, 2013, Sofia, Bulgaria

Magnetophoresis of single particles in liquid and in air, Hitoshi Watarai, International Conference on Magneto-Science, October 13-17, 2013, Bordeaux, France

Chiral recognition ability of

nao-J-aggregate of porphyrin, Hitoshi Watarai, ASIANALYSIS XII, August 22-24, 2013, Fukuoka, Japan

Separation and characterization of nano/microparticles using magnetic force, Hitoshi Watarai, NAUN International Conferences, December 2-4, 2012, Paris, France

Optical Chirality Analyses of Adsorbed Molecules at Liquid-Liquid Interfaces, Hitoshi Watarai, Pittcon2012, March 11-15, Orlando, Florida, USA.

Characterization of nano/microparticle and its chemical binding applying magnetic force, Hitoshi Watarai, Makoto Kawano, Shinichi Imai, Pittcon2012, March 11-15, Orlando, Florida, USA.

Optical chiral reactions observed at liquid-liquid interfaces, Hitoshi Watarai, ISEC2011, October 3-8, Santiago, Chile

Chiral molecular aggregation at liquid-liquid, Hitoshi Watarai, Hideaki Takechi, Koji Mitani, Shiori Watanabe, Chirality at the nanoscale, July 9-11, 2011, Liverpool, UK

Magnetophoresis; A useful characterization method of single microparticles, Hitoshi Watarai, ASIANALYSIS XI, August 23-26, 2011, Nanjing, China

Magnetic characterization of single microparticle in liquid, Hitoshi Watarai, EURO analysis2011, September 11-16, 2011, Belgrade, Serbia

Magnetophoresis for separation and analysis of microparticles, Hitoshi Watarai, 46th IUPAC Congress, August 4th, 2011, San Juan, Puerto Rico, USA

Novel application of magnetic field for microparticle analysis, Hitoshi Watarai, 14th Asian Chemical Congress, September 8, 2011, Bangkok, Thailand

Magnetic Force/Raman Spectroscopy for Chemical Conformation Analysis, Watarai, H. The 4th International Conference on Materials Analysis and Processing in Magnetic Fields (MAP4), May 10, 2010, Atlanta, USA

Raman optical activity of insulin amyloid, Shigeki Yamamoto, Hitoshi Watarai, Molecular Chirality 2010 & Chirality 2010 (ISCD-22), July 11-15, 2010, Sapporo, Japan

CD and LD measurements of molecular complexation of bilirubin at liquid/liquid interface

Matsuura, K.; Watarai, H. Pacifichem 2010, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, HI, United States, December 15-20, 2010 (2010), ANYL-356.

Formation of chiral hetero-aggregate of porphyrine at liquid-liquid interface Takechi, H.; Watarai, H.

Pacifichem 2010, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, HI, United States, December 15-20, 2010 (2010), ANYL-357.

Magnetic and electromagnetic separation, detection, and imaging, Watarai, H.

Pacifichem 2010, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, HI, United States, December 15-20, 2010 (2010), ANYL-463.

Magnetic micro-analysis of droplet interface and cell surface, Watarai, H. Pacifichem 2010, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, HI, United States, December 15-20, 2010 (2010), ANYL-479.

Simultaneous measurement of natural and magnetic optical rotation under pulsed magnetic field, Suwa, M.; Miyamoto, K.; Nakano, Y.; Watarai, H. Pacifichem 2010, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, HI, United States, December 15-20, 2010 (2010), ANYL-464.

【その他】

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡會 仁 (WATARAI, Hitoshi)
大阪大学・ナノサイエンスデザイン教育研究センター・招へい教授
研究者番号：30091771

(2) 研究分担者

諏訪雅頼 (SUWA, Masayori)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：90403097