

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25620107

研究課題名(和文) 単一粒子の超音波浮揚に基づく超微量検出

研究課題名(英文) Trace analysis based on the acoustic levitation of a single particle

研究代表者

岡田 哲男 (Okada, Tetsuo)

東京工業大学・理工学研究科・教授

研究者番号：20183030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：超音波-重力複合場では粒子の大きさによらず密度や圧縮率の違いのみを見分けることができる。マイクロ粒子表面での反応により超音波物性の変化を起こし、それを捉えることを目的とした。溶液中の微量成分が、高分子粒子と金ナノ粒子の結合を誘起させる系を想定して検討を行った。金薄膜層をメッキしたアクリル粒子では想定通りの挙動が確認できた。ポリスチレン(PS)粒子表面で特異的反応で金ナノ粒子の凝集を誘起し、密度変化を捉えることを試みたが、PS粒子は密度のばらつきが大きくこの目的に適さないことがわかった。そこで、表面修飾が容易で均一組成の高分子の合成を検討し、本目的に適した粒子の作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：The particle levitation in an acoustic-gravity field depends on the density and compressibility of the particle, but is independent of the particle size. When Au nanoparticles are aggregated on the surface of a microparticle by an appropriate reaction, the acoustic properties of the microparticle should be changed. From the levitation coordinate, the extent of the reaction can be evaluated. This should allow the detection of trace compound in a solution by designing an appropriate reaction system. For Au-plated plastic beads, predicted results were obtained. However, the levitation coordinate for polystyrene (PS) particles was varied for individual particles. Although various functional groups can be introduced on the PS particles, this particle has proven inapplicable to the present study. We have succeeded in the preparation of microparticles, which have uniform acoustic properties. A protein was bonded on the particle in a simple way.

研究分野：分析化学

キーワード：超音波 マイクロ粒子 表面反応 金ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

超音波放射力は、主に細胞や粒子のマニピュレーションやトラッピングのために用いられており、マイクロフルイディクスとの相性の良さもあり、ヨーロッパを中心にバイオアプリケーションの分野で研究されている。代表者は、単に粒子をトラッピングするのではなく、鉛直方向に超音波定在波を形成することで、粒子の大きさに依らず、音響物性のみを見分けることができることを明らかにし、粒子分離の観点から有意義であることを指摘した (*Anal. Chem.* 73, 3467, 2001)。その後、大きさを見分けず組成のみを見分ける粒子分離法へとこの原理を発展させた (*Anal. Sci.* 20, 753, 2004 & 23, 385, 2007)。また、粒子の大きさに依らないという特徴を反応追跡にも利用し、イオン交換反応を樹脂一粒の浮揚位置の時間変化から動的に評価することにも成功している (*Anal. Chem.* 79, 3003, 2007 & 82, 4472, 2010)。一方、金属ナノ粒子を用いる種々のセンシング原理や技術が開発されており、バイオセンシングに応用されている。多くは分光法や電気化学検出法との組み合わせ、または粒子の凝集に基づくものである。本研究では、微量の粒子表面反応を密度変化に伴う位置情報から得ようと考えている。このような試みはこれまでにない。

密度変化を高感度に検出することは容易ではなく、特に単一粒子の密度変化を測定することは困難である。しかし、実現すれば粒子上で起きる種々の反応評価に適用可能である点で極めて有用である。また、通常の計測法は、微量を取り扱おうとそれに応じて検出が困難になり、感度を補償するための新たな検出原理が必要になる。一方、本法では粒子の位置を測定することが検出原理であり、反応試料の溶液量が微量であっても、基本原理は不変である。また、単一マイクロ粒子を用いるため反応に必要な物質の量は amol 程度である。本研究は微小試料の取り扱いを検討事項としていないが、マイクロフルイディクスなどとの結合によりさらに有望な計測法として展開できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の通りである。

音響放射力と重力(沈降力)の均衡を利用すると、粒子の大きさに依らず、その音響物性だけを見分けられることを既に示した。本研究では、粒子表面で起きる反応を代表的な音響物性の一つである密度の変化として捉え、音響放射力-重力場における単一粒子の浮揚位置の変化から反応の程度を見分けることを目指す。ポリスチレン粒子等の表面に金ナノ粒子が単層吸着するだけで、浮揚位置が変化し、粒子間の相互作用を検出することが可能であることを計算により確認している。この検出法の原理を確立し、実験的に確認すると共に、抗原抗体反応を

始めとする生体分子の関与する溶液内反応の超微量、高感度検出に適用できることが期待される。

3. 研究の方法

本研究の基盤となる超音波-重力複合場について述べる。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。この原理を図1に示す。

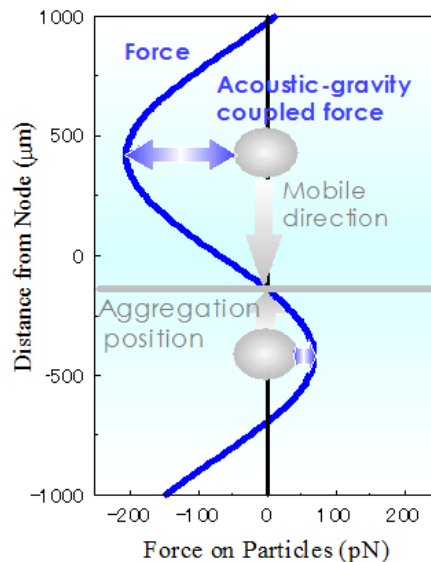


図1 音響放射力-重力場の粒子集合原理

上記の方法をベースとして、粒子表面で反応が起きたときに予想される粒子の一変化について述べる。当初の計画ではポリスチレン(PS)粒子を利用して表面に反応により金ナノ粒子の薄層を形成することを想定していた。模式図を図2に示す。金ナノ粒子は錯生成、DNAのハイブリダイゼーション、抗原抗体反応など多岐の反応で粒子表面に導入できる。このとき、この結合を媒介する物質が水中にあれば、その物質の濃度や量によ

て粒子表面への金ナノ粒子の結合量が規定され、それにより高感度分析が可能になると考えた。

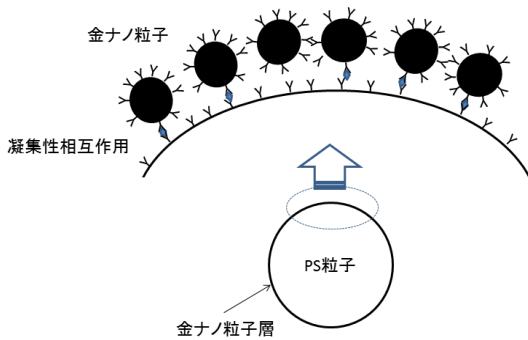


図2 粒子表面相互作用の概念図

PS 粒子に対して金ナノ粒子が結合した際に予想される密度変化を図3に示す。

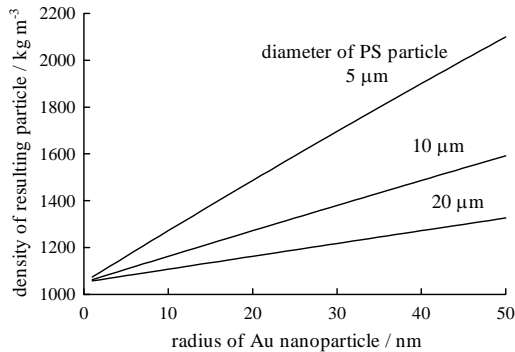


図3 PS 粒子への金ナノ粒子結合により起る密度変化

この図は小さい PS 粒子に大きな金ナノ粒子が結合するほど密度変化が大きいことを示している。しかし音響放射力は粒子の体積に比例するため、あまり小さな粒子では適切な力がかからない。そのため、実際には 5-10 μm 程度の PS 粒子を用いて検討を行うことにした。

4. 研究成果

4-1 金メッキ粒子の超音波-重力複合場挙動

粒子周りの金薄膜の効果を確認するために、直径約 10 μm のアクリル系樹脂粒子の周りを金メッキした粒子の挙動を検討した。金薄膜厚さとして 30-90 nm のものを用いた。図4に結果を示す。測定のために若干基準点がずれるために、測定間の誤差はあるものの金薄膜が厚くなるにつれて密度が高くなり、粒子の不要位置が下に移動していることが確認できた。この挙動を上述の式に基づいて解析した結果を表1にまとめる。70 nm 金薄膜の粒子の結果を除いて、圧縮率は金薄膜の厚さによらずおおむね一定であり、金薄膜の厚さの増加と共に密度が増加したことが、浮揚位置の低下をもたらしていることがわかる。このことから、金薄膜形成による浮揚位

置から金薄膜の厚さを評価できることが明らかになった。

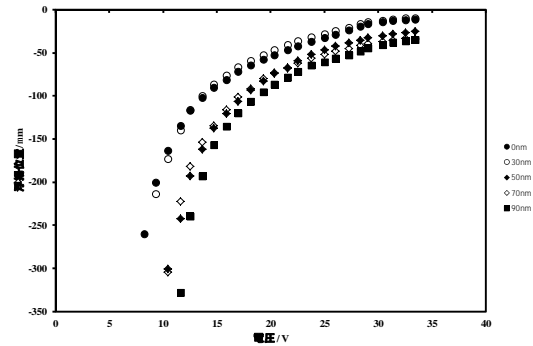


図4 金メッキアクリル粒子の浮揚位置の電圧依存性

表1 超音波-重力複合場挙動から決定した金メッキアクリル粒子の密度と圧縮率

Au layer / nm	Density / g cm ⁻³	Compressibility / 10 ⁻¹⁰ Pa ⁻¹
0	1.265	3.381
30	1.560	3.158
50	1.775	3.291
70	1.948	2.702
90	2.160	3.273

本手法で、金薄膜層の厚さによる違いが区別できるかどうかを確認するために、薄膜相厚さが 30 nm の粒子と 90 nm の混合物の挙動を検討した。図5に画像を示す。上側が 30 nm 金薄膜層粒子、下側が 90 nm 金薄膜層粒子である。両者は明確に区別されており、50 nm の金の層が形成できれば十分にその浮揚位置から結合薄膜層厚さを評価できることがわかった。



図5 30 nm (上側)と 90 nm(下側)金薄膜層粒子の分離。超音波トランスデューサーへの印加電圧、10.4 V。

4-2 PS 粒子表面反応と浮揚位置の変化

上記の目的を達成するための基礎検討として、アビジン修飾 PS 粒子とビオチン修飾金ナノ粒子の反応による浮揚位置の変化を検討した。アビジン-ビオチンは強く結合することが知られた組み合わせであり、混合により PS 粒子周りに金ナノ粒子が結合し、金薄膜が形成されることが期待できる。図6に金ナノ粒子が結合前の粒子と結合後の粒子の混合物の浮揚状態の画像を示す。



図6 金ナノ粒子結合したPS粒子としていないPS粒子混合物の超音波浮揚

金ナノ粒子が結合していないPS粒子では画像ほど浮揚位置のばらつきはない。したがって、画像における浮揚位置のバリエーションは金ナノ粒子の結合により密度が増加したことによると考えられる。しかし、PS粒子の場合密度が水に比較的近いいため、金ナノ粒子結合の有無にかかわらず若干浮揚位置が不安定な傾向がある。このことから、本研究の目的である溶液中の微量成分の計測にPS粒子を用いることは困難であると結論した。市販品で種々の表面修飾粒子が入手できることからPS粒子を用いることを考えたが、他の粒子を検討する必要があることが明らかになった。

4-3 表面修飾可能な高密度高分子粒子の合成

アクリル系粒子は安定な計測が可能であったが、この粒子は表面修飾に向かない。そこで、新たに粒子を合成して本目的に供することを考えた。これは、当初の予定ではなかったが、上記の検討を受けて避けて通ることは困難であると考えた。

タンパク質を結合することを考慮してジビニルベンゼンとグリリシジルメタクリレートの共重合体粒子を合成することとした。水相には0.2%メチルセルロース、有機相には0.5%アゾビスブチロニトリルを含む4:1ジビニルベンゼンとグリリシジルメタクリレートを用いて、ポンピングコネクタでエマルジョンかすることで単分散の粒子の合成を検討した。

分散条件、加熱条件などを種々検討したが

単分散の粒子合成には至らなかった。しかし、粒子合成には成功したので、アビジンの表面修飾の可能性を追究した。アシルレッドによりタンパク質を染色したところ、アビジン結合粒子のみタンパク質の存在を示す赤色を示し、このアプローチが有効であることがわかった。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2件)

「超音波-重力-流れ複合場による粒子の組成と大きさの二次元分離」、金崎隆宏、岡田哲男、第73回分析化学討論会、函館(北大水産学部)、2013年5月18日

“Two-dimensional Separation of Particles with Acoustic-Gravity-Flow Field”, T.Kanazaki and T.Okada, FFF2014, Salt Lake, Utah. 2014年10月13日

6 . 研究組織

(1)研究代表者 岡田哲男(Tetsuo Okada)

東京工業大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：20183030