

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	超音波浮揚を利用した生体分子の微量計測 -検出原理の設計と実試料への応用-
Title(English)	Acoustic Levitation-Based Trace-Level Biosensing. -Design of Detection Systmes and Applications to Real Samples-
著者(和文)	宮川晃尚
Author(English)	Akihisa Miyagawa
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11377号, 授与年月日:2020年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:岡田 哲男,小松 隆之,河野 正規,西野 智昭,福原 学
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11377号, Conferred date:2020/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	化学 化学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 (理学) Academic Degree Requested Doctor of
学生氏名： Student's Name	宮川 晃尚		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main) 岡田 哲男
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub) 福原 学

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

超音波一重力複合場(CAG)は粒子分離や凝集に用いられる物理場の一つであり、粒子の密度・圧縮率などの音響物性に応じた粒子分離が可能である。CAG 中では音響物性の異なる粒子が異なる位置に浮揚する。反応を介して粒子の音響物性の変化を与えることにより、粒子の浮揚位置の変化から粒子表面反応の評価が可能である。そこでポリマーマイクロ粒子(MP)に金ナノ粒子(AuNP)を結合させることで、密度変化を誘起し、浮揚位置の変化量から微量計測が可能であると考えた。この実験系を基に、以下に示す(1)アビジン-ビオチン反応(AB 反応)の検出、(2)溶存ビオチンの定量、(3)DNA の非修飾計測、(4)生体試料中の複数 microRNA(miRNA)の同時計測、(5)アプタマー(AP)を利用した有機小分子の検出を行った。

(1)計測原理の実証のために、MP と AuNP を AB 反応により結合させた。アビジン修飾した MP とビオチン修飾した AuNP を AB 反応により結合させることで AuNP 結合 MP を作製した。AuNP は MP より密度が約 18 倍大きいため、AuNP の結合により MP の密度が大きくなり、浮揚位置は低下した。このときの浮揚位置の変化量は AuNP の反応量と比例関係を示した。AuNP の結合数と AB 反応に関与した分子数は同じとみなせるため、MP 表面反応の計測が可能であることを示した。検出限界は AuNP 700 個であり、反応に関与したアビジン-ビオチン複合体を zmol オーダーで計測できることを示した。また、単位時間当たりの浮揚位置を計測することで、粒子表面反応の速度論的評価を可能にした。

(2)アビジン修飾した MP と溶存ビオチンと反応させ、その後ビオチン修飾した AuNP と反応させた。溶存ビオチンによって阻害されたアビジン分子は AuNP と結合できなくなるため、阻害されていないときと比較し、浮揚位置が上昇する。この浮揚位置の増加量から溶存ビオチン分子を pM オーダーで検出した。また、このときの反応を速度論的に解釈した。

(3)上述の手法はターゲット分子を粒子表面上に直接結合する必要がある。これは、ターゲット分子の物理化学的、生化学的性質を変える可能性がある。そこで、DNA のサンドイッチ結合を利用した非修飾計測法を実現した。ターゲット DNA の一部と相補的に結合する DNA を MP と AuNP の表面上に修飾した。これらを混合することで、ターゲット DNA を介した AuNP 結合 MP を作製した。MP 一粒子当たりの AuNP の反応量を一定にし、ターゲット DNA の反応量を変化させることで、AuNP の MP への結合量を調節した。DNA の二重鎖形成における安定性を DNA 塩基数および DNA 濃度の観点から評価し、非修飾計測を行った。この結果、HIV-2 と一塩基多型のターゲットに対し、非修飾で zmol レベルの計測法を確立した。

(4)(3)の手法を生体試料中の複数 miRNA の同時計測に展開した。ターゲットである miR-21 と miR-122 を計測できるように DNA を設計し、粒径の異なる 2 つの MP 表面上に修飾した。これらの MP は顕微画像から識別可能なため、二つの粒子を同時に検出できる。そこで、total RNA 中の miR-21 と miR-122 を標準添加法により定量し、pM オーダーの定量値を得た。これらの値は報告値と一致しており、本法が生体試料中でも機能することを示した。

(5)上記の非修飾計測法を AP による有機小分子の検出に展開した。AP を介した AuNP 結合 MP を作製し、AP と特異的に相互作用するターゲット分子を導入した。AP とターゲット分子の相互作用の結果、AuNP は MP から解離するため、MP の密度は小さくなり、結果として浮揚位置が上昇する。(2)と同様に、このときの浮揚位置の変化から、ターゲット分子の定量が可能である。ターゲット分子として、生体関連物質である ATP、ドーパミン、アンピシリンを用いた。ターゲット-AP 会合体の解離定数に応じて、pM-nM レベルの検出限界を達成した。また、本法が複雑な平衡モデルの解析にも利用でき、非修飾でターゲットとアプタマー会合体の解離定数の評価にも適用できることを示した。さらに、本法は豚を血中の ATP 濃度の定量に適用し、176 μ M の定量値を得た。この値はルミノアッセイによる定量値と一致した。このように、本法が実サンプルにおいてもマトリクスの影響を受けず測定できることを示した。

以上のように、本計測法が高感度で高汎用性、高適用性を有し、実サンプルにも応用できることを示した。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース：	化学	系
Department of, Graduate major in	化学	コース
学生氏名：	宮川 晃尚	
Student's Name		

申請学位 (専攻分野)：	博士	(理学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員 (主)：	岡田 哲男	
Academic Supervisor(main)		
指導教員 (副)：	福原 学	
Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

A combined acoustic-gravitational (CAG) field is one of the external fields that can be used for the particle separation or aggregation. The CAG field can recognize the acoustic properties of a particle such as the density and compressibility. Particles with different acoustic properties are levitated at the different coordinates in the CAG field. If the acoustic properties of a particle are modified by a reaction on the surface of the particle, we can evaluate the extent of the reaction from the levitation coordinate shift. The trace analysis is possible by measuring the levitation coordinate change. Also, the kinetics and thermodynamics of the particle surface reaction can be evaluated from the changes in the levitation coordinate with a reaction time and the reactant concentration. In this thesis, the density change is induced by the gold nanoparticle (AuNP) binding to microparticle (MP), which leads to the decrease in the levitation coordinate. Based on this concept, the following studies are conducted; (1) the detection of avidin-biotin reaction, (2) the quantification of dissolved biotin, (3) the label-free detection of DNA, (4) the simultaneously detection of multiple microRNA molecules in the biological sample, (5) aptamer-based detection of small organic molecules. The proposed method allows highly sensitive sensing and highly versatile system designs.

The various detection schemes for the avidin-biotin reaction, dissolved biotin, HIV-2, single nucleotide polymorphism, microRNA, ATP, dopamine, and ampicillin are designed based on the approach stated above. In some cases, the zmol or pM order detections are possible. These detection methods are applied to biological samples. The values obtained by proposed method are in good agreement with the reported values, indicating practical usefulness of the present approach.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).