

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)	要約
Type(English)	Outline

論文要約

学生氏名：宮川 晃尚

博士論文題目

Acoustic Levitation-Based Trace-Level Biosensing. -Design of Detection Systems and Applications to Real Samples-

【緒言】超音波-重力複合場(Coupled Acoustic-Gravitational Field; 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 中では浮揚位置の差によって粒子が分離、識別される。CAG での粒子の浮揚位置(z)は次の式で与えられる。

$$z = \frac{\lambda}{4\pi} \sin^{-1} \left\{ \frac{(\rho - \rho')g\lambda}{AE_{ac}2\pi} \right\} \quad A = \frac{5\rho' - 2\rho}{2\rho' + \rho} - \frac{\gamma'}{\gamma} \quad (1)$$

ここで、 λ は超音波の波長、 ρ と ρ' はそれぞれ媒質と粒子の密度、 γ と γ' はそれぞれ媒質と粒子の圧縮率、 g は重力加速度、 $E_{ac}(=aV^2)$ はエネルギー密度、 a は装置依存定数、 V は電圧である。この式は粒子の浮揚位置が粒径には依存せず、音響物性によってのみ決まることを示している。したがって、反応を介して粒子に音響物性の変化を与えることができれば、粒子の浮揚位置の変化から、反応の程度を評価できる。マイクロ粒子(MP)は微小な反応空間を有しているため、浮揚位置の変化から微量計測が可能であると考えた。また、単位時間当たりの z の変化や反応濃度依存性を解析することにより、粒子表面反応の速度論的、熱力学的評価が可能である。本研究では、金ナノ粒子をポリマーMPに結合させて密度の変化を誘起し、浮揚位置の変化として計測した。一粒子計測の実験系を構築し、(1)アビジン-ビオチン反応の検出、(2)溶存ビオチンの定量、(3)DNA (HIV-2, 一塩基多型)の非修飾計測、(4)生体試料中 miRNA (miR-21, miR-122)の同時計測、(5)アプタマーを利用した有機小分子の検出を行った。本研究を通じて、本計測法が高感度で高汎用性を有することを示した。ここでは、(1), (3), (5)について述べる。

【実験】高さ 1.5 mm のチャンネル(水中における 500 kHz 超音波の 1/2 波長)を持つ石英セルをトランスデューサ上に固定した。トランスデューサに 500 kHz の交流を印加することで、セル内に一つの節を有する定在波を発生させた。超音波定在波が発生したチャンネル中に粒子懸濁液を導入することで、単一粒子をトラップし、その浮揚位置変化を CCD カメラにより計測した。

【アビジン-ビオチン反応の検出】MP と金ナノ粒子(AuNP)をアビジン-ビオチン(AB)反応を介して結合させることで、計測原理を実証した。図 1 にその概念図を示す。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

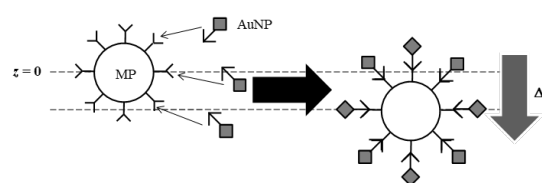


図 1 AB 反応の検出の概念図

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 倍大きいいため、AuNP の結合により MP の密度が大きくなり、 z は低下する。このときの z の変化量(Δz)は AuNP の結合量と相関があり、AuNP の結合数と反応に関与した分子数は同じとみなせるため、 Δz からマイクロ粒子表面反応の計測が可能である。

図 2 に示すように MP 一粒子あたりの AuNP 反応量($r_{\text{AuNP/MP}}$)と Δz は比例関係を示した。検出限界は AuNP 700 個であり、反応に関与した AB 複合体を zmol オーダーで計測可能である。速度論解析を行ったところ、粒子間反応の反応速度定数は $k_1 = 4.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_{-1} = 1.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ であり、本法における AB 反応の結合定数 K は $4.0 \times 10^9 \text{ M}$ であった。この値は溶液中での AB 反応の結合定数($K = 10^{15} \text{ M}$)より 5 桁ほど小さい。これは、アビジンとビオチン分子が粒子上に固定されており、見かけの拡散係数が小さくなったことに起因する。以上の結果から、単一粒子計測と zmol オーダーの計測法を確立し、反応速度解析にも利用できることを示した。

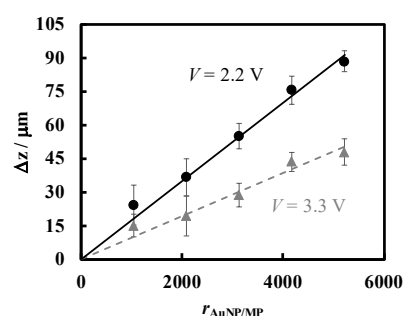


図 2 $r_{\text{AuNP/MP}}$ と Δz の関係

【DNA の非修飾計測】 上述の方法では、ターゲット分子を粒子表面上に直接結合する必要があった。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、このような懸念のない非修飾法として DNA のサンド

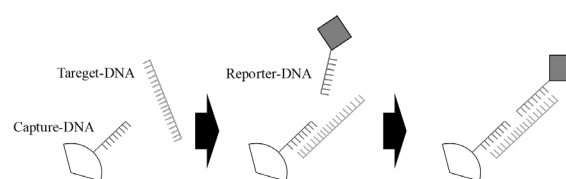


図 3 DNA 非修飾計測の概念図

イッチ結合による非修飾計測法を検討した。図 3 に概念図を示す。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($r_{\text{DNA/MP}}$)を変化させることで、AuNP の MP への結合量を調節した。

DNA は塩基数、塩濃度、DNA 濃度などの要因によって、二重鎖の安定性が変化する。したがって、はじめに MP および AuNP 上の DNA を直接結合させることで、DNA 塩基数および MP 濃度(=DNA 濃度)の感度への影響を検討した。図 4 に示すように、DNA の塩基数および MP 濃度の減少に伴い、感度が減少し、感度が DNA 塩基数と MP 濃度により制御できることがわかった。しかし、DNA 塩基数と感度の関係は予測される平衡モデルと一致しなかった(図 4 実線および点線)。これは、上述の拡散係数による平衡定数の減少と、ナノ粒子に修飾された DNA の熱力学的配向による平衡定数の増加の相反する効果に起因する。8 塩基と 9 塩基の間で感度に大きな差を生じることがわかったので、この感度の差を一塩基多型(SNP)の非修飾検出に利用した。

MP 表面上には wild と mutant DNA に強力に結合するように 12 塩基の DNA を修飾した。AuNP 表面上には 9 塩基の DNA を修飾し、wild タイプとは 9 塩基、mutant タイプとは 8 塩基で結合するように設計した。この塩基数設計と MP 濃度制御により wild DNA のみの検出に成功した。検出限界は 2700 分子であり、zmol オーダーの非修飾計測法を達成した。この方法は、塩基のデザインを変えるだけで様々な SNP に対応できるため、汎用性の高い計測法である。

【アプタマーを利用した有機小分子の検出】上記の方法をアプタマー(AP)による有機小分子の検出に展開した。原理を図 5 に示す。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する。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 Δz が減少する。このときの Δz の減少量から、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 (DA)、アンピシリン (AMP)を用いた。ターゲット濃度(c)の増加にともない、ターゲット-AP 会合体の解離定数を反映した特定の濃度領域で Δz は減少した(図 6)。AuNP 結合 MP と AP の平衡反応モデルから、会合体の解離定数の計算を行ったところ、ATP, DA, AMP に対してそ

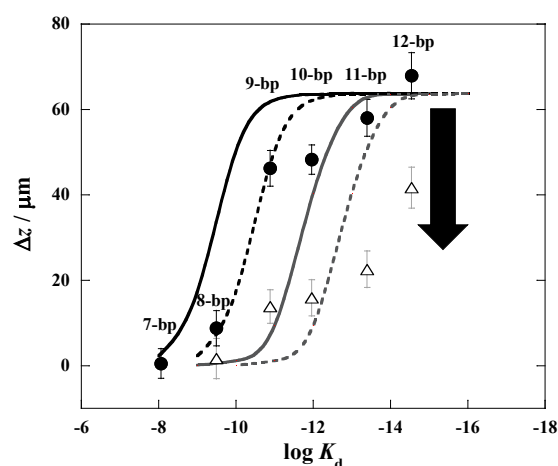


図 4 塩基数および塩濃度における Δz の依存性

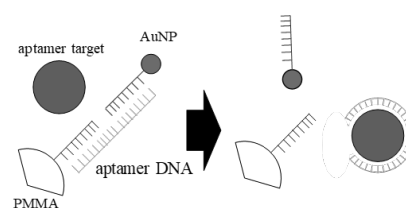


図 5 アプタマーを利用した計測の原理図

れぞれ 1.59×10^{-7} , 4.00×10^{-8} , $6.33 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ となった。これは、本法がアプタマー会合体の解離の評価にも利用できることを示している。タンパクや細胞など、様々な物質に対する AP が開発されているため、本法は、AP を変えるだけで、広範なターゲットの微量計測に利用できる。

この計測法を豚の血中の ATP 濃度の定量に適用した。104 倍に希釈した血液試料中に AuNP 結合 MP を導入し、反応後の Δz を計測した。 Δz から、血液原液中には $176 \mu\text{M}$ の ATP が含まれていた。この値はルミノアッセイによる定量値 $202 \mu\text{M}$ と一致した。このように、本検出法は実サンプルに対して、マトリクスの影響がなく測定できる。