

微小作用力を利用するマイクロ分析法



技術解説

渡 會 仁*

Micro-analytical methods utilizing feeble working forces

Key Words : dielectrophoresis, photophoresis, magnetophoresis, electromagnetophoresis, Faraday effect imaging

1. はじめに

J. C. Giddings の著書 “ Unified Separation Science ” (1991年)¹⁾ は、分子の化学ポテンシャルに外場の項を加えることで、様々な分離法を統一的に分類した画期的な教科書である。外場の勾配は力を発生し、分子や微粒子はその力に応じた速度で移動する。ここでいう外場とは、電場、磁場、光、壁、流れ等である。たとえば、共に反磁性である水中の数 μm の有機液滴に磁気力を作用させると、有機液滴は常磁性物質のように磁石に向かって移動する。この時の力は 1pN 以下である。微粒子を介して 100pN の力で分子を引っ張ると構造の異性化や結合の解離が促進される。このような現象を利用して微粒子・分子の新しい分析法が開発できる。近年、タンパク質、細胞、細菌、環境浮遊微粒子等の分析が極めて重要となっているが、従来法では十分な対応ができず、新たな方法の開発が強く望まれている。外場の勾配をマイクロに設計することにより、微小な力を発生させて微粒子の移動を制御し、微粒子の分離法や分析法の新たな原理を開発することができる。遠心分離法、キャピラリー電気泳動法、原子間力顕微鏡等は、すでに微小作用力を利用した分析法として利用されているが、さらに多くの可能性がある。ここでは、微粒子および分子に対して、 $\text{fN} \sim \text{pN}$ の外場力を利用して検討されたマイクロ分析法を紹介する。

2. 誘電力の利用

H. A. Pohl (1951年)²⁾ により提案された誘電力は、電解質溶液中の電荷をもたない微粒子を泳動させるのに有効であり、誘電泳動法 (dielectrophoresis) と呼ばれている。誘電力は交流電場によっても発生することができ、この点は静電力を利用する電気泳動と異なる特徴である。交流電場により分極した微粒子 (または微粒子表面) と電束密度勾配の相互作用により誘電力が発生する。この力は、微粒子と媒体の複素誘電率の差に比例する。平面四重極電極の対向する二対の電極 (距離 $100 \mu\text{m}$) に、 $10^3 \sim 10^6\text{Hz}$ 、 10V の交流電場を印加すると、 40kbp の DNA は、 1kHz では電極方向に向かう正の誘電泳動を示し、 1MHz では電極中心に向かう負の誘電泳動を示す。このように、周波数を変えると泳動の方向が反転するので、複素誘電率の異なる微粒子の分離に利用できる。そこで、この平面四重極電極を三次元的に伸ばしてキャピラリー型の四重極電極を製作し、流れを与えながら壁面の電極に交流電場を印加すると³⁾、周波数に応じた DNA のトラップ分離やポリスチレン微粒子のサイズ分離 (図1)、酵母の生細胞と死細胞の分離等が可能である。

3. 光散乱力の利用

光が微粒子に及ぼす力が A. Ashkin (1970年) により報告⁴⁾ されて以来、レーザーの進歩と普及により、分析法としての光泳動法 (photophoresis) の利用研究も行われている⁵⁾。レーザーの進行方向に作用する散乱力により生ずる光泳動速度は、微粒子のサイズと複素屈折率に依存する。泳動効率は Mie 散乱理論により予測できる⁶⁾。この方法により、水中の無色透明な有機液滴を、その屈折率の違いにより分離することが可能であり、また、赤血球のような光を吸収する微粒子は泳動効率が大きいいため、白



* Hitoshi WATARAI

1947年3月生
 東北大学大学院理学研究科化学専攻
 (1971年)
 現在、大阪大学名誉教授、大阪大学ナノサイエンスデザイン教育研究センター招聘教授 理学博士 分析化学
 TEL : 06-6856-4613
 FAX : 06-6856-4613
 E-mail : watarai@chem.sci.osaka-u.ac.jp

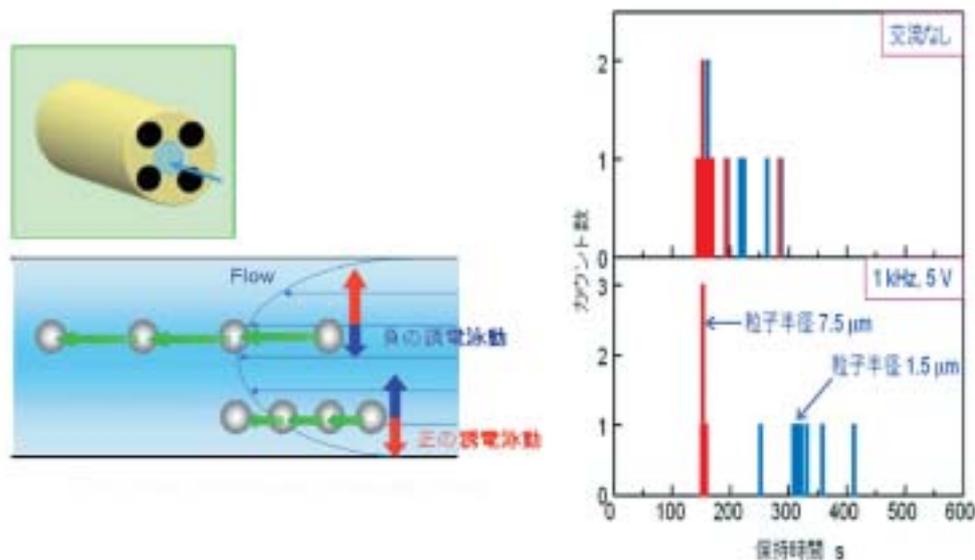


図1 キャピラリー四重極電極による誘電泳動分離の概念図(左)によるポリスチレン微粒子の誘電泳動分離例(右):長さ2.3 mm,内径100 μm,1 kHz,5 V

血球等との分離が可能である。光を吸収すると一般に光熱変換により微粒子の温度が上昇する。水中に直径10-20 μmの、514nmの光を吸収するコバルト錯体を溶解したベンジルピリジンをも有機溶媒とするwater-in-oil型マイクロエマルジョン液滴を分散させる。この液滴に514nmのAr⁺レーザーを照射すると、光を吸収して10以上温度が上昇し、液滴内部で相分離が起こって内部に水滴が生じ、熱浸透によって水を取り込みながら膨張する。油層の厚さが100nm程度になると破れて内部の水が放出され、もとの液滴状態に戻る。この膨張収縮を数秒の周期で繰り返しながら泳動する(図2)。周期は含まれる光吸収化合物の濃度に比例するので定量に利用できる⁷⁾。

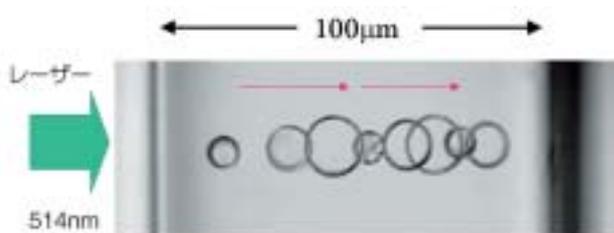


図2 4秒の周期で膨張収縮を繰り返すマイクロエマルジョン液滴の光熱変換相分離光泳動(レーザーパワー50mW)

4. 磁気力の利用

近年、永久磁石の高性能化(0.4T Nd-Fe-B磁石の回路化により容易に3T発生)や高温超電導体を用

いる無冷媒型超電導磁石(10-15T)の普及により、材料、情報、プロセス、エネルギー、分離・分析等において磁気科学の新たな発展が期待されている。微粒子に作用する磁気力は、媒体との磁化率の差、体積、磁束密度およびその勾配に依存するので、磁気勾配における微粒子の泳動速度の解析から、その磁化率を決定することができる。半径rの微粒子の磁気泳動(magnetophoresis)の速度vは、

$$v = \frac{2}{9} \frac{(\chi_p - \chi_m)}{\mu_0 \eta} r^2 B \frac{dB}{dx}$$

と表わされる。ここで、 χ_p は粒子の体積磁化率、 χ_m は媒体の体積磁化率、 η は粘性率、 μ_0 は真空の透磁率、Bは磁束密度である。細胞や有機微粒子は一般に反磁性であり、磁気的作用力は極めて小さいが、磁束密度やその勾配を大きくすると、水(体積磁化率 - 9.01×10^{-6})中の2-フルオロトルエン液滴(体積磁化率 - 8.19×10^{-6})があたかも常磁性液滴のように磁石に向かって泳動する(図3)。塩化マンガン(II)等を加えて、媒体を常磁性にすると、永久磁石を用いて微粒子の磁気泳動を測定することができる。有機液滴の界面にDy(III)錯体が吸着すると界面が常磁性となるため、液滴全体の磁化率は次式に従い、半径に反比例して常磁性側に増大する。

$$\chi_p = \frac{3}{r} \chi_{Dy}^M C_{int} + \chi_{2FT}^V$$

ここで、 χ_{Dy}^M は Dy(III) のモル磁化率、 χ_{2FT}^V は有機溶媒の体積磁化率である。

この関係から界面の磁化率が決定でき、Dy(III) のモル磁化率 ($512 \times 10^{-6} \text{ dm}^{-3} \text{ mol}^{-1}$) を用いて、 $10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ レベルの界面濃度が決定できる (図4)⁸⁾。磁化率に加成性があることは、分析法として有用である。キャピラリー内の微粒子を磁気力でトラップし、媒体の流速を連続的に増大させると、サイズと磁化率に応じた分離が可能である (図5)⁹⁾。磁気力は熱の発生を伴わないので、細胞の分離等に有用である。

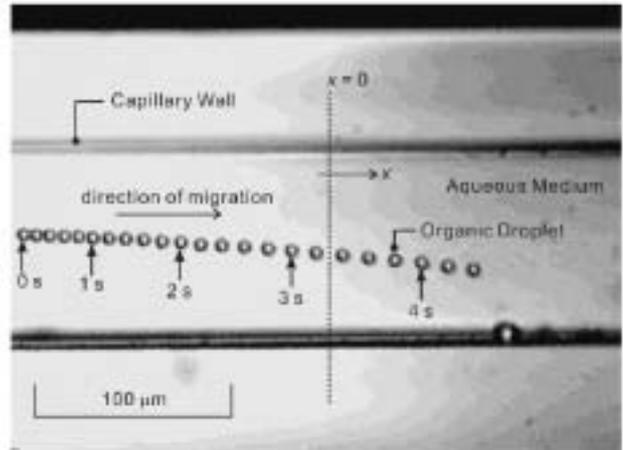


図3 水中の2-フルオロトルエン液滴の磁気泳動挙動。点線のポールピース端で $B(dB/dx)$ が最大 ($47000 \text{ T}^2/\text{m}$) となるため、この領域で加速している。0.5 s 間隔で重ねた画像

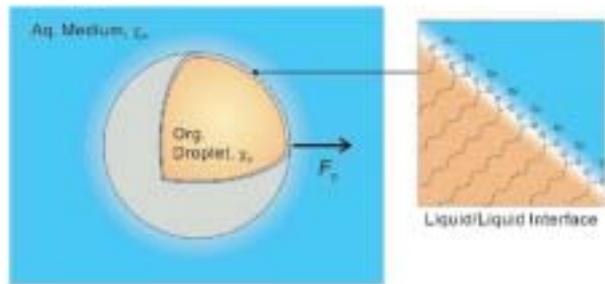
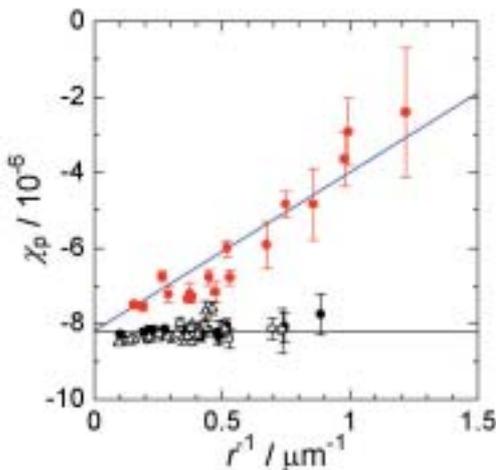


図4 (左) 液滴の磁化率が半径に反比例。正の勾配をもつ直線は Dy(III) とラウリン酸の両者を含む場合、勾配ゼロの直線は両者を同時には含まない場合。
(右) 界面磁化率を生じる Dy(III)-ラウリン酸錯体の界面吸着の概念図

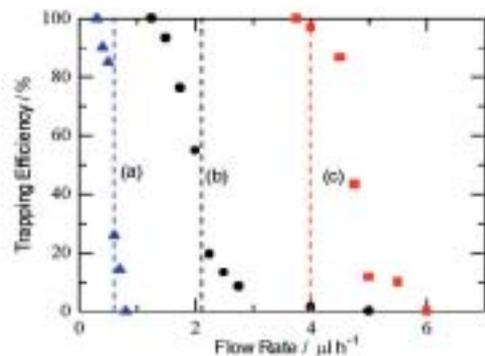
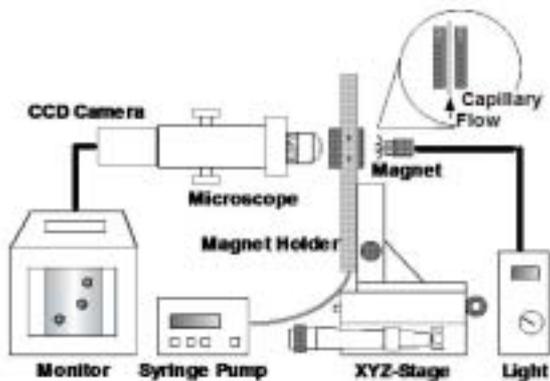


図5 磁気トラップ装置 (左) と測定例 (右); 磁気トラップされた微粒子を、媒体の流速を徐々に増大することによりサイズ分離が可能。
試料; ポリスチレン微粒子直径, (a) $3 \mu\text{m}$, (b) $6 \mu\text{m}$, (c) $9 \mu\text{m}$ 、媒体 0.6 M MnCl_2 、 $B(dB/dx) = 400 \text{ T}^2/\text{m}$

質量 m の微粒子に外場の力 F が作用するとき、微粒子は加速度 $a = F/m$ で移動すると考えられ、周囲の媒体との摩擦により、 $\tau = m/6\pi\eta r$ の緩和時間で一定の速度に到達する。この緩和時間は液体中では極めて短い、大気中ではマイクロ秒以上に長くなるため、測定が可能となる。したがって、磁気力を作用させたときの磁気泳動速度と加速度の測定により、緩和時間を決定することができ、緩和時間は質量 / 半径に比例するため、質量の決定に利用できる。これが、磁気質量分析法の原理である。たとえば、直径 $5\ \mu\text{m}$ のシリカ微粒子の質量 0.24ng と質量磁化率 $7.6 \times 10^{-9}\ \text{m}^3\text{kg}^{-1}$ が同時に決定でき、さらに付着した Dy(III) 濃度が決定できた。この磁気質量分析法は、イオン化も高真空も不要であり、かつ、磁気力は半径の3乗に比例して作用するため、小分子よりも微粒子に有効に作用する。この点でも通常の静電力やローレンツ力を利用する質量分析法よりも高分子量の微粒子に有効である。現在、 10nm レベルのタンパク質の分析が目標とされている (図6)¹⁰⁾。

分子の幾何異性平衡は、異性体のギブス自由エ

ルギー差に支配されるが、この分子を引っ張ると平衡はどうなるだろうか？ システアミン分子のチオール端を銀ナノ粒子基板に固定し、アミノ基を磁気微粒子に結合させ、磁気微粒子を磁気力で引張りながらシステアミンの表面増強ラマンスペクトルを測定した。 100pN の磁気張力を作用させると、Trans型の割合が37%から52%に増大した。これは、Gauche型よりもTrans型の分子長が1倍長いので、張力の作用下ではTrans型がより安定となったことを示す。張力は、仕事として分子に自由エネルギーを与えることができる (図7)¹¹⁾。

5. 電磁力の利用

均一な磁場中で、磁場に垂直に設置されたシリカキャピラリー内の微粒子を含む電解質溶液に電流を流すと、媒体にローレンツ力が作用する。この力は微粒子に浮力として作用し、媒体へのローレンツ力とは逆向きに、壁面に垂直な力を微粒子に作用させることができる。この電磁浮力は電磁泳動 (electromagnetophoresis) を引き起こし、その力と速度は磁場の強さと電流値により制御できる。シリカキャ

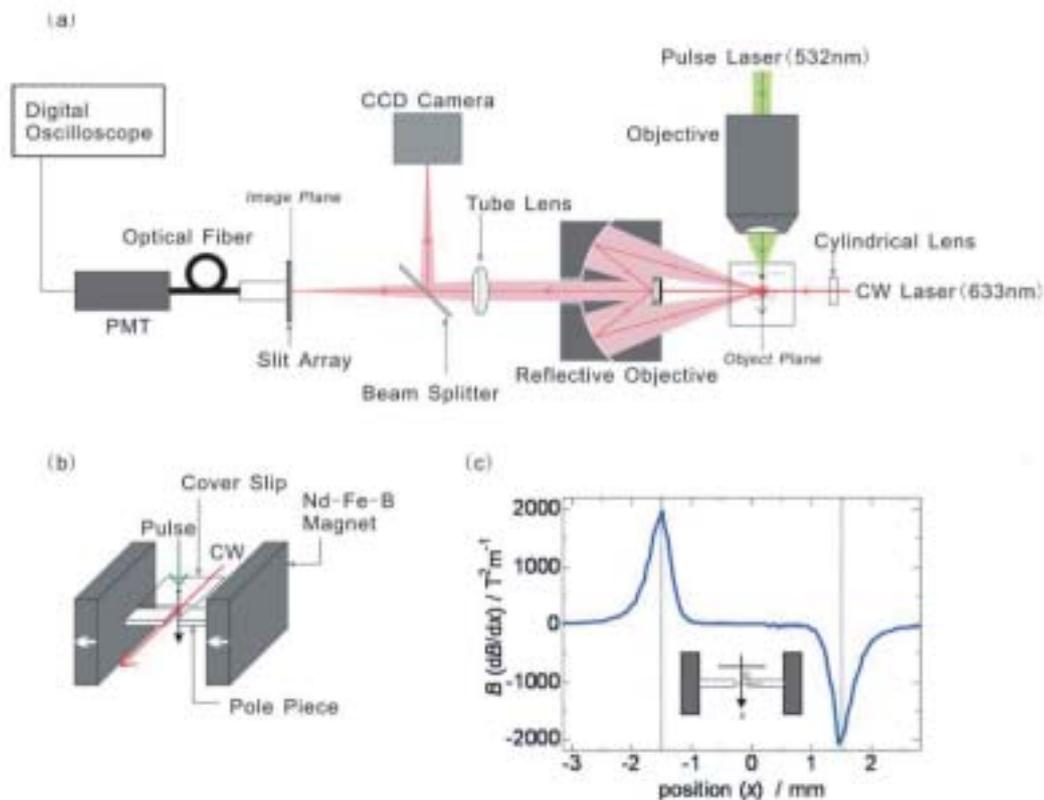


図6 (a) 磁気質量分析装置の概要、
 (b) パルスレーザーでカバーガラスから微粒子を落下させる概念図、
 (c) 微粒子がポールピースを通過するときの $B(dB/dx)$ の変化 (磁気力の変化に相当)

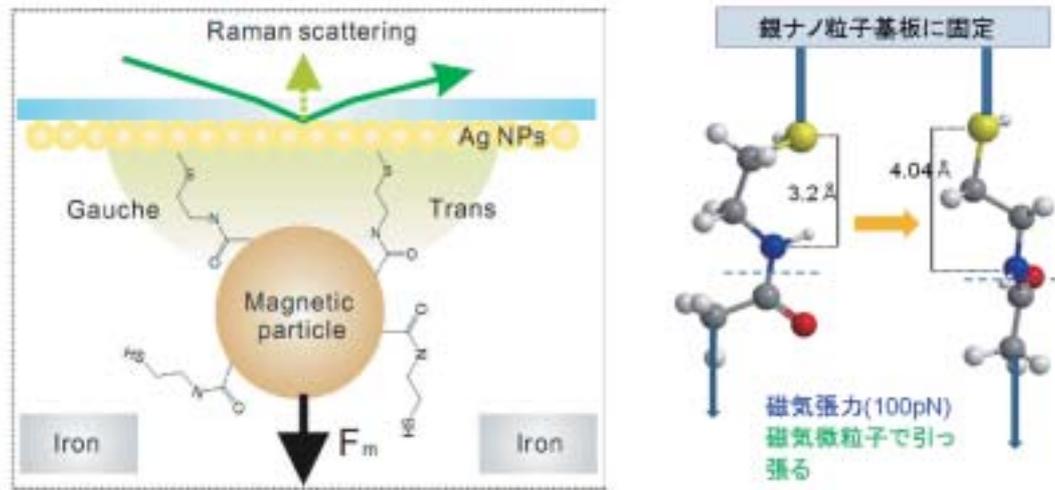


図7 (左) 銀ナノ粒子 (AgAPs) を静電的に付着させたガラス基板にシステアミン分子を結合させ、磁気微粒子で引っ張り、表面増強ラマンスペクトルを測定。
 (右) システアミン部の分子構造はTrans型が長いことを示す。

ピラリーの内壁面にコンカナバリン A (ConA) を化学的に結合させておく。この ConA に対し酵母細胞は細胞表面の糖鎖 (マンノース鎖) により選択的に結合する。そして、酵母細胞を電磁力により引っ張ると、張力と結合の解離頻度との関係が得られる。毎秒 3pN の増加する力で引っ張ったときの解離頻度の解析から、ConA-酵母間の自発的解離速度定数 $4.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ と、解離に至る臨界伸長距離 $x = 0.25 \text{ nm}$ が得られた (図8)¹²⁾。張力による仕事は、ConA-酵母間の水素結合を切断するための活性化エネルギーを低下させる作用を果している。すなわち、張力 F は、活性化自由エネルギーを Fx だけ低下させる。これは、熱的な解離の励起と同様の効果を張

力が果していることを意味し、生物の運動そのものが生体反応の促進効果をもつことを示唆していて興味深い。

電磁力により、キャピラリー内壁に微粒子を押し付ける力や引き離す力を制御できるので、電解質溶液を流しながら電磁力をのこぎり刃状に反転して作用させると、微粒子の吸脱着クロマト分離ができる。これを電磁吸脱着クロマトグラフィーと呼んでいる。長さ 1mm のキャピラリーで $10 \mu\text{m}$ と $20 \mu\text{m}$ のポリスチレン粒子を分離することができる (図9)。

ファラデー効果は、磁場と同方向に直線偏光を物質に透過させたとき、直線偏光が回転する現象である。これは、電子へのローレンツ力の作用が原因で

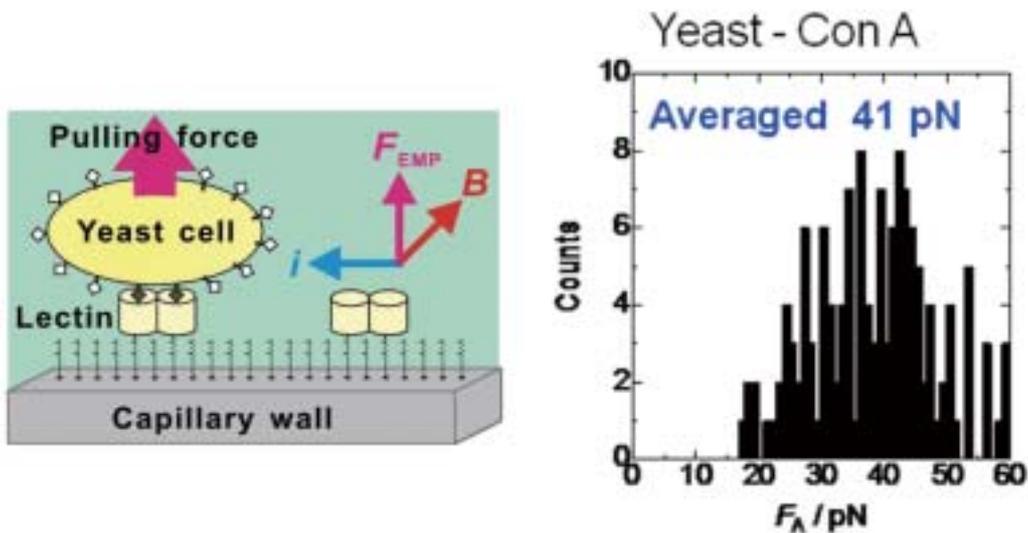


図8 左図は電磁浮力による酵母細胞に掛かる力の概念図。右図は 3pN/s で引っ張ったときの平均解離力のヒストグラム。

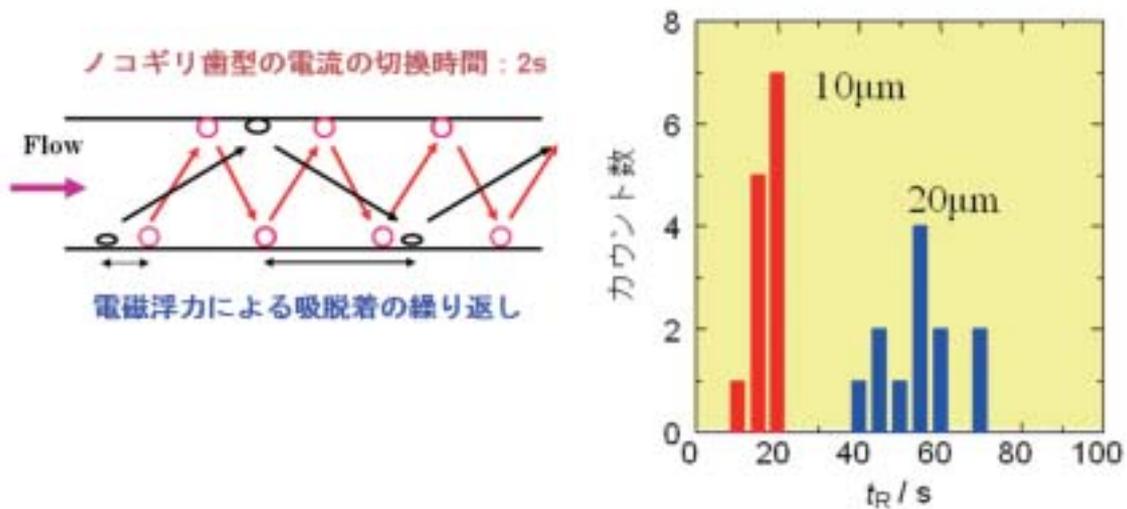


図9 (左図) 電磁吸脱着クロマトグラフィーの概念図、(右図) 10 μm と 20 μm のポリスチレン粒子の分離例、キャピラリー長 1mm, 流速 60 μL/h, 最大電流 2mA。

ある。ファラデー回転角は、物質の厚さと磁束密度に比例する。ファラデー回転は電子の運動に起因するので極めて応答が速い。したがって、測定には、高磁束密度が得られるパルス磁場の利用が有効である。比例係数であるヴェルデ定数は物質に固有の値であり、混合物においてはその成分のモルヴェルデ定数とモル濃度に比例することから、定量に利用できる。回転方向は、反磁性物質では右回転、常磁性物質では左回転を示すことから、磁性の判定ができる。常磁性の希土類イオンのモルヴェルデ定数は、4f 電子数と磁気モーメントに比例した¹³⁾。反磁性物質のモルヴェルデ定数もモル磁化率に比例するが、電子を有する物質は大きな値を示す。また、光学活性物質の自然旋光と区別できるため、磁性、電

子性、キラリティーの同時イメージングも可能である(図10)¹⁴⁾。

この他、音波、温度勾配、濃度勾配、壁のナノ空隙等が微粒子や分子の分析に利用できる。特に、化学結合への力の作用は反応促進効果をもたらすので、生体反応への影響が明らかにされることにより、メカノバイオケミストリーの新領域につながるものと期待される。

謝辞：ここで紹介した研究は、大阪大学大学院理学研究科化学専攻の分析化学研究室においてなされたものであり、ご協力いただいた皆様に感謝申し上げます。

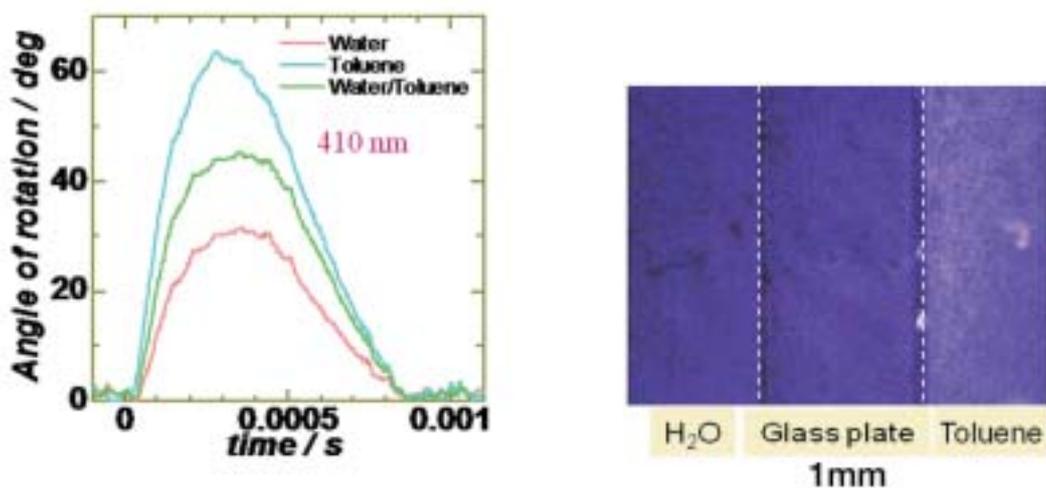


図10 (左図) パルス磁場により観測されるファラデー回転(セル長 1cm, 磁場 5.5T) (右図) 水(体積磁化率 -9.01×10^{-6}) とトルエン (-7.77×10^{-6}) のファラデー回転画像

参考文献

- 1) J. C. Giddings, *Unified Separation Science*, John Wiley, New York, **1991**.
- 2) H. A. Pohl, *J. Appl. Phys.* **1951**, 22, 869.
- 3) S. Tsukahara, K. Yamanaka, H. Watarai, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5661.
- 4) A. Ashkin, *Phys. Rev. Lett.* **1970**, 24, 156.
- 5) T. Imasaka, Y. Kawabata, T. Kaneta, Y. Ishizu, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1763.
- 6) A. Hirai, H. Monjushiro, H. Watarai, *Langmuir*, **1996**, 12, 5570.
- 7) M. Tanaka, H. Monjushiro, H. Watarai, *Langmuir*, **2004**, 20, 10791.
- 8) M. Suwa, H. Watarai, H. Watarai, *J. Ion Exchange*, **2009**, 21, 41.
- 9) H. Watarai, M. Namba, *Anal. Sci.*, **2001**, 17, i169-i171.
- 10) M. Arase, M. Suwa, H. Watarai, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391, 701.
- 11) T. Goto, H. Watarai, *Langmuir*, **2010**, 26, 4848.
- 12) Y. Iiguni, H. Watarai, *Analyst*, **2010**, 135, 1426.
- 13) K. Miyamoto, K. Isai, M. Suwa, H. Watarai, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 6328.
- 14) K. Isai, M. Suwa, H. Watarai, *Anal. Sci.* **2009**, 25, 1.

