磁性ナノ粒子を用いた迅速免疫測定法のための磁気捕集シミュレー ション評価

田中俊行

(愛知工科大学)

Simulation Study of Magnetic Promotion for Rapid Immunoassay Utilizing Magnetic Nanoparticles Toshiyuki Tanaka (Aichi University of Technology)

はじめに

臨床現場における迅速な疾患診断のために、磁性ナ ノ粒子を利用した迅速免疫測定法が開発されている^{1),2)}。 本測定法は、磁石により粒子を容器底面に捕集して抗 体抗原反応を促進させることにより、10分以内での測 定を実現している。しかし、測定シグナルとなる蛍光 色素が粒子に含まれていることから、粒径分布が測定 感度に影響することが確認されている。また一方で、 粒径が大きいと磁気泳動速度が速くなることは理解で きるものの、磁気捕集による粒径分布の変化は明らか になっていない。そこで本研究では、磁気泳動シミュ レーションによる磁気捕集の評価を行った。

方法・結果

磁性ナノ粒子の磁気泳動を一次元移流拡散方程式に よりモデル化し、粒子濃度の変化を有限体積法シミュ レーションにより求めた。この際に、容器底面を越え て移動した粒子量を積算することにより、底面での粒 子の捕集率を算出した。シミュレーション条件は次の ように設定した。磁性ナノ粒子は粒径 25~500 nm、飽 和磁化 24.1 emu/g、比重 1.43 とした。磁石は直径 6 mm、 長さ 10 mm、磁束密度 1 T とした。容器(水面)の高 さは 3 mm とした。磁石と容器の間隔は 1 mm とした。

磁気泳動による粒子濃度の時間変化の例をFig.1に示 した。粒径 200 nm よりも大きい粒子では磁気捕集 1 分 でほぼ全ての粒子が捕集されていることが判明した。ま た、粒径毎の容器底面での粒子の捕集率の時間変化の結 果(Fig.2)を元に、実際に迅速免疫測定で行っている磁 気捕集 1 分での各粒径の捕集率を算出した(Fig.3)。各 粒径での捕集率が明らかになったことから、捕集後の粒 径分布の算出ができるようになった。DLS などによる 粒径分布を用いて捕集後の粒径分布を算出した結果に ついては当日発表予定である。

参考文献

S. Sakamoto *et al.*, *Clin. Chem.*, 60, 610-620 (2014).
田中ほか, *Medical Science Digest*, 44, 449-452 (2018).



Fig.1 Variation of particle concentration of 200-nm magnetic nanoparticles.



Fig.2 Variation of magnetic promotion ratio of magnetic nanoparticles on a plate well.



Fig.3 Magnetic promotion ratio on a plate well by 1-min magnetophoresis.

生体内腫瘍における磁性ナノ粒子の磁気緩和機構の評価

小坂宏輝¹,本夛勁汰¹,二川雅登¹,清水広介²,竹村泰司³,大多哲史¹ (¹静岡大学,²浜松医科大学,³横浜国立大学)

Evaluation of magnetic relaxation of magnetic nanoparticles in living tumor

H. Kosaka¹, K. Honda¹, M. Futagawa¹, K. Shimizu², Y. Takemura³, and S. Ota¹

(¹Shizuoka University, ²Hamamatsu University School of Medicine ³Yokohama National University)

<u>はじめに</u>

磁性ナノ粒子を用いたハイパーサーミアや磁気粒子イメージングは、その優れた利点から新たながん診断 治療技術として、実用化に向けた研究が盛んに行われている。これらの技術を実用化する上で、磁性ナノ粒 子の腫瘍内における磁気緩和機構の解明が必要不可欠である。先行研究では、マウスから切除した腫瘍内で の粒子において直流磁化測定を行った研究が報告されている¹⁾。本研究では、マウスに移植された腫瘍に投 与した磁性ナノ粒子を、腫瘍を切除することなく測定することで、腫瘍内における磁気緩和機構を解明する ことを目的とし、パルス磁場を用いた磁気緩和特性の測定を実施した。

<u>実験方法・結果</u>

本研究では、 γ -Fe₂O₃ナノ粒子(Resovist[®], FUJIFILM Toyama Chemical Co., Ltd.)を測定試料として用いた。 比較試料としては、液体(純水溶媒)、固体(エポキシ樹脂により固定)試料、リン酸緩衝液や血清を溶媒と した場合の条件で計測した。さらに、純水とグリセリンの混合により溶媒の粘度を調整した試料に関しても 計測を実施した。直径 8.5 mm、高さ 9.5 mmの円柱状容器に粒子濃度が腫瘍内に近い 2.64 mg-Fe/mL になるよ うに調整した。印加するパルス磁場に関するパラメータは、磁場強度を 0.79 kA/m、立ち上がり時間を 22.5 μ s とした。

Fig. 1 にパルス磁場を印加した際の、液体試料(Liquid)、固体試料(Fixed)、血清試料(Serum)の計3サ ンプルから得られた粒子の磁気緩和特性を示した。ここで、液体および血清試料について、パルス磁場を印 加することで固体試料には観られない2段階に変化する波形が得られた。特に2段階目の変化は、ブラウン 緩和に由来する磁性ナノ粒子の磁気緩和特性と考えられる²⁾。本研究の実験条件では、磁場の立ち上がり時 間がネール緩和時間よりも遅いため、1段階目の変化は、磁場の遷移に追従する磁気モーメントの回転と考 えられる。また、液体試料に比べて血清試料では、2段階目の磁化の変化に要する時間が増加した。これは、 粘度の増加とタンパク質による凝集体形成³⁾の影響により、ブラウン緩和時間が長くなったためと考えられ る。

講演では、液体、固体、リン酸緩衝液、血清、粘度調整試料の磁気緩和特性の結果及び、腫瘍内における 粒子の磁気緩和特性の考察について詳細に述べる。

<u>謝辞</u>

本研究の一部は、科研費 20H05652、23H01419 の 助成を受けて実施した。

<u>参考文献</u>

- S. Dutz, M. Kettering, I. Hilger, R. Müller, and M. Zeisberger: *Nanotechnology.*, 22, 265102 (2011).
- S. Ota and Y. Takemura: J. Phys. Chem. C, 123, 28859–28866 (2019).
- Moritz von der Lühe, A. Weidner, S. Dutz and F.H. Schacher: ACS Appl. Nano. Mater., 1, 232 (2018).



Fig. 1 Magnetic relaxation properties of the liquid, fixed, and serum samples.

パルス磁場を用いた磁性ナノ粒子の磁気緩和特性の観測

後藤春樹¹,二川雅登¹,竹村泰司²,大多哲史¹ (¹静岡大学,²横浜国立大学)

Measurements of magnetic relaxation of magnetic nanoparticles by applying the pulsed magnetic field

H. Goto¹, M. Futagawa¹, Y. Takemura², S. Ota¹

(¹Shizuoka University, ²Yokohama National University)

<u>はじめに</u>

磁性ナノ粒子のバイオ医療応用において、磁性ナノ粒子設計や最適な磁場条件の決定には磁性ナノ粒子の 磁気特性である磁気緩和現象の評価が必要である¹⁾。磁気緩和現象は粒子自身の回転によるブラウン緩和と 磁化のみの回転であるネール緩和の2種類に大別される。本研究ではパルス磁場を用いる手法²⁾で磁気緩和 過程を直接的に観測し、溶媒の違いによる磁気緩和過程の差異を捉えることに成功した。

<u>実験方法・結果</u>

実験に用いた粒子は市販の粒子でマルチコア構造である Resovist[®] (FUJIFILM RI Pharma, Japan)、synomag[®]-D (Micromod Partikeltechnologie GmbH, Germany)、市販の粒子でシングルコア構造である SHA-20 (Ocean NanoTech, USA)を用いた。測定試料として粒子を純水中に分散した液体試料とエポキシ樹脂を用いて粒子を 固定した固体試料を用意した。測定時間領域に対応する 3 種類のインダクタンスの異なるコイルで測定を行った。それぞれの測定結果を結合することで 14 ns~数 ms の広範囲での磁気緩和過程を評価した。印加したパルス磁場強度は、79.6 A/m であった。

Fig.1 は SHA-20 の磁気緩和過程を示している。100 ns 付近までは固体試料と液体試料の磁気緩和過程が重なっていることが分かる。これは液体固体状態どちらもネール緩和により緩和しているためであると考えられる。100 ns 以降では液体ではブラウン緩和により緩和しているが粒子が固定されている固体試料ではブラウン緩和が発生せず、ネール緩和のみが起きていることが確認できる。

Fig.2 に振動試料型磁力計で計測した、SHA-20 の直流磁化曲線を示す。直流磁化曲線からも、液体試料と 固体試料の間に顕著な磁気特性の差異を確認した。講演では磁化率計測の結果も交えて磁気緩和過程の測定 結果について詳細に述べる。

<u>謝辞</u>

本研究の一部は、JST ACT-X JPMJAX21A5 及び、科研費 20H02163, 20H05652, 23H01419 の助成を受けて実施した。

<u>参考文献.</u>

1) J. Carrey, B. Mehdaoui, and M. Respaud, J. Appl. Phys., 109, 083921 (2011)

2) S. Ota and Y. Takemura, J. Phys. Chem. C, 123, 28859-28866 (2019).







Fig.2 Measured magnetization curve under DC magnetic fields.

接着細胞内における磁性ナノ粒子の磁気特性評価

西田穰¹, 倉科佑太², 二川雅登¹, 竹村泰司³, 大多哲史¹ (¹静岡大学,²東京農工大学,³横浜国立大学)

Evaluation of magnetic properties of magnetic nanoparticles in living adherent cells

M. Nishida¹, Y. Kurashina², M. Futagawa¹, Y. Takemura³, and S. Ota¹

(¹Shizuoka University, ² Tokyo University of Agriculture and Technology, ³Yokohama National University)

<u>はじめに</u>

磁性ナノ粒子は、磁場による移動・輸送や発熱が可能であるなどの機能を有している。これらの特徴を活 用し、バイオ・医療分野への応用に向けた研究が行われている⁽¹⁾。磁性ナノ粒子の医療応用のためには、生細 胞に取り込まれた粒子の特性を解析することが重要である。しかし従来では、磁性ナノ粒子を取り込ませた 接着細胞を剥離して計測しており⁽²⁾、接着状態とは細胞の状態が異なる可能性が考えられる。本研究では、接 着細胞を剥離することなく培養状態で細胞内磁性ナノ粒子の磁気緩和機構の解明に取り組んだ。

実験方法・結果

本研究では、磁性ナノ粒子として Micromod 社から購入した NH₂修飾 synomag[®]-D を、細胞はヒト間葉系 幹細胞を用いた。磁性ナノ粒子を混合した培養液を用いて、24 時間培養することで細胞に磁性ナノ粒子を 取り込ませた。その後、Miltenyi Biotec 社の磁気分離カラムと永久磁石を用いて、磁性ナノ粒子を取り込ん だ細胞のみを分離・回収して、磁性ナノ粒子を取り込んだ細胞の試料を作製した。

Fig.1に、周波数 200 Hz-2 kHz の交流磁場により励起した磁性ナノ粒子の磁化由来の信号について、液体 試料(Liquid)および固体試料(Solid)の基本波および 3 倍、5 倍、7 倍の高調波信号を示す。それぞれ 200Hz の 基本波の信号で正規化をした。各周波数において、固体試料より液体試料の方が高調波成分が大きくなっ た。磁性ナノ粒子の高調波信号は、粒子が磁場に対し磁化する際の非線形な応答により発生する⁽³⁾。粒子自 体の物理的回転が生じる液体試料では、固体試料に比べて磁化しやすいため非線形性が促進する。粒子が磁 化しにくい状態にある場合、粒子から得られる高調波信号は小さくなると考えられる。

磁性ナノ粒子の高調波信号を計測することで、粒子の状態を推定できる。講演では、接着細胞内の磁性ナノ粒子に関する計測結果も示し、接着細胞内の磁性ナノ粒子の磁気特性評価について詳細に述べる。

<u>謝辞</u>

本研究の一部は、科研費 20H02163、20H05652、23H01419 の助成を受けて実施した。

参考文献

- 1) Q.A. Pankhurst, N.K.T. Thanh, S.K. Jones, and J. Dobson, J. Phys. D: Appl. Phys., 42, 224001 (2009).
- 2) S. Ota, T. Yamada, and Y. Takemura, J. Nanomater., 2015, 836761 (2015).
- 3) D. Eberbeck, F. Wiekhorst, S. Wagner, and L. Trahms, Appl. Phys. Lett. 98, 182502 (2011).



Fig. 1 Harmonic intensity normalized by fundamental intensity in 200Hz of applied magnetic field frequency frequency derived from magnetization of magnetic nanoparticles in liquid and solid samples.

交流磁場下における磁性リポソーム懸濁液の磁気直線複屈折測定

諏訪 雅頼¹, 樋口 舞花¹, 岡本 行広², 塚原 聡¹ (¹阪大院理, ²阪大院基礎工)

Magnetic linear birefringence of magneto-liposome suspension under ac field

M. Suwa, M. Higuchi, Yukihiro Okamoto, Satoshi Tsukahara

(¹Graduate School of Science, Osaka university, ²Graduate School of engineering science, Osaka University)

<u>はじめに</u>

細胞膜の流動性や弾性といった力学特性は様々な生命現象に関与することが予想されるが、その評価法は限 られる。磁性ナノ粒子(MNP)は磁場を用いて非接触で操作でき、nm サイズの単分散粒子を合成可能であ るため、微小空間の力学プローブとして期待できる。本研究では、生体膜モデルであるリポソームと MNP の複合体である磁性リポソーム(ML)溶液に交流磁場を印加し、光学異方性変化より MNP 回転運動の観測 を行った。光散乱の影響を低減するため、近赤外光を用いた磁気直線複屈折(MLB)測定装置を構築した。 MNP 配向運動の磁場周波数、粘性率、温度への依存性を調査し、脂質膜相転移の検出を試みた。

<u>実験</u>

Fig. 1 に示すように、既存の磁気直線二色性測定装置[1]をもとに、MLB 測定装置を構築した。Voigt 配置 (光上磁場)で測定できるよう光入射窓を備えたスプリット型コイルにより、振幅 < 15 mT,周波数 0.3 Hz ~40 kHz の交流磁場を発生させた。光源として近赤外レーザー(波長 785 nm)を用い、偏光子で磁場に対 して 45°傾いた直線偏光をコイル内の試料に入射した。MLB により楕円偏光となった透過光を、1/4 波長板 で楕円率($\delta/2$)だけ傾いた直線偏光に変換した。ここで δ は光学遅延量で、 $\delta = 2\pi l(n_{\parallel} - n_{\perp})/\lambda$ (n_{\parallel}, n_{\perp} : 平行及び垂直な直線偏光に対する屈折率、l:光路長、 λ :波長)と表される。ウォラストンプリズムと差分 増幅器により旋光角を精密に測定し、 δ を見積もった。コイル内の温度は 25.5 °C ~ 60 °C で調節した。 ML はバンガム法により調製した。エバポレーターを用いてナスフラスコの壁に形成したジパルミトイルホ スファチジルコリン (DPPC)の薄膜に、共沈法で合成した MNP の分散液を添加し水和することで ML 溶液 を調製した。さらにエクストルーダーにより、ML の平均直径を 150 nm、250 nm および 400 nm とした。グ リセロール添加により外水相の粘性率 η を調節した。

<u>結果と考察</u>

周波数 fの交流磁場下で ML 懸濁液の MLB は 2f で振動した。この 2f 成分(δ_{2f})の振幅 と位相をロックインアンプで測定し、実部 (δ'_{2f})と虚部(δ''_{2f})に分解した。これらを 周波数に対してプロットすると緩和型スペク トルが得られ、虚部のピーク位置から緩和時 間 τ_0 を算出できた。 τ_0 はフリーな MNP のブ ラウン緩和時間に比べ非常に大きく、 η に比 例したため、MNP はリポソーム膜に吸着 し、一体となり回転していると考えられる。



Fig. 1 The experimental setup for MLB measurement under ac field: P is polarizer, C split-coil, S sample, QWP quarter wave plate, WP Wollaston prism, and BAP balanced amplified photodetector. The insets show the polarization states of the light.

さらに τ_0 の温度依存性を調査すると、40 °C ~ 45 °C の間で急激に減少することが分かった。この温度は DPPC 二分子膜のゲルー液晶相転移温度(41 °C)[2]と一致するため、膜の流動性の変化が MNP の配向運動 に影響を及ぼすことが示唆された。

<u>参考文献</u>

- [1] M. Suwa, A. Uotani, Y. Tojo, R. Onodera, S. Tsukahara, Langmuir 38, 9708-9719 (2022)
- [2] R. Biltonen, D. Lichtenberg, Chem. Phys. Lipids., 64, 129-142 (1993)

磁性ナノ粒子の応答性を利用したタンパク質検出 金子晃基,村山徹,本多順一,トンタットロイ,沖田和彦,薮上信 (東北大学)

Measurement of bacteria using magnetic beads by switching magnetic field K. Kaneko, T. Murayama, J. Honda, L. Tonthat, K. Okita, S. Yabukami (Tohoku University)

<u>1 はじめに</u> スイッチ磁界に対する磁性ナノ 粒子の応答性から抗原抗体反応によりタンパク質 (GDF-15)を検出した.磁性ナノ粒子表面にタンパ ク質が結合するほど,凝集体を形成しやすい性質を 利用して,抗原濃度に対する凝集体の磁気的応答性 を評価した.

2 計測方法 Fig.1は試作システムの写真を示 したものである 1). 本システムは磁性ナノ粒子への スイッチ磁界の応答性を検出可能であり,容器,回 転機構、磁石および励磁コイル、磁気ビーズからの 漏れ磁界を検出する磁界センサ(ジーエヌエス製 MI センサ)から構成される. 試料は永久磁石 (NdFeB 磁石,4mm×4mm×1mm)で約300秒間着磁され, 永久磁石を取り除いて 50 回転する. 励磁コイルによ り周回毎にスイッチ磁界により磁性ナノ粒子を反転 させつつ,段階的に磁界を増加させる.コイルによ る毎回の着磁時間は 10 秒~30 秒程度,磁界強度は 最大10mT程度とした.容器は周回して磁界センサ で磁性ナノ粒子の漏れ磁界を検出して、細菌との結 合の違いによりスイッチ磁界に対する磁性ナノ粒子 の応答性が異なることから抗原量を検出する.この システムでは6サンプルを同時に検出可能である. ここでは Protein A が添加された磁性ナノ粒子 (Nanomag-D, 平均粒径 0.5 µm)と抗体 (GDF-15 antibody)を結合させた後、抗原となるタンパク質 (GDF-15)と約30分間抗原抗体反応をさせた.GDF-15 の濃度は 0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml と変 化させた.

3 計測結果 Fig.2はタンパク質(GDF-15)の 濃度を段階的に変化させて,磁性ナノ粒子/抗原凝 集体の光学顕微鏡写真を示したものである.抗原濃 度が増えるに従って,磁性ナノ粒子/抗原の凝集が 進み凝集体が濃い茶色になっている様子が確認出来 る.Fig.1のシステムの4カ所のホルダでほぼ同様 の傾向が得られており,再現性がある.Fig.3はFig. 1の検出システムを用いて,スイッチ磁界により磁 化を反転させた場合の応答性を評価したものである. タンパク質の濃度を増大させるとスイッチ磁界に対 する磁化の反転量は有意に大きくなり,タンパク質 濃度の検出が可能であることがわかった.これはタ ンパク質により凝集体密度が高くなることで、磁化 量が増大したためと考えられる.

<u>謝辞</u>本研究は AMED Moonshot プロジェクト (JP23zf0127001), JST ASTEP(JPMJTM22AB), 御器 谷科学技術財団, テルモ生命科学振興財団, 科研費 基盤 C(JP21K04090)の成果である.

<u>参考文献</u> 1) Loi Tonthat et.al., AIP Advances, Vol.9, No. 12, 125325 (2019).



Fig. 1 Schematic view of the sensor.



Fig. 2 Photographs of the aggregates of magnetic nanoparticles and protein (GDF-15).



Fig. 3 Magnetic response by switching field as a function of protein concentration (GDF-15).

フェムト秒レーザーを用いた磁気ナノ粒子分散法の開発

朝山 柊,加古 朔也,山本 泰起,山下 慶,王 璡,紀和 利彦 (岡山大学 大学院 ヘルスシステム統合科学研究科)

Development of magnetic nanoparticle dispersion method using femtosecond laser Shu Asayama, Sakuya Kako, Taiki Yamamoto, Kei Yamashita, Jin Wang, Toshihiko Kiwa (Graduate School of Integrated Health Systems Science, Okayama University)

研究背景

現在,磁気ナノ粒子の医療応用が注目されており,その一つに磁気ナノ粒子を磁気マーカーとして用いる 磁気免疫検査がある.この検査では,抗体を修飾した磁気ナノ粒子をサンプル内に注入し,抗原抗体反応に より抗原と結合すると粒子体積が増加し磁気信号が低下することから,磁気信号の違いをもとに抗原量の推 定を行う.しかし,この検査法の課題として,磁気ナノ粒子同士の凝集による体積増加に伴う磁気信号の低 下が挙げられる.先行研究では,この問題についてサンプルにレーザーを照射することで磁気ナノ粒子の再 分散が可能であることを示した¹⁾.一方で,血清溶媒中などイオンが分布する環境ではさらに凝集が進行し 沈殿が生じることから,レーザー照射による再分散が困難であった.そこで本研究では,サンプルに粒子分 散を促進する界面活性剤を混合することで,レーザー照射による再分散性を高めることを試みた.

<u>実験方法</u>

本研究では、HTS-SQUID 磁気免疫検査装置を用いた¹⁾. 測定では励磁コイルから1.06 kHz, 8 mTp-p の磁 場を印加し、サンプルをX 軸ステージにより4 cm/s で上下に10 往復させる. このときのサンプルからの磁 気信号を検出コイルで検出し、共振回路で増幅後、HTS-SQUID で検出する. また、印加コイルの同軸上に光 ファイバーケーブルを配置し、磁気信号測定中にサンプル管へのレーザー照射を行った. 光ファイバーはコ ア径 105±3 µm のマルチモードファイバーを用いた. また、レーザーはパルス幅 150 fs、中心波長 780 nm、 光源出力 38 mW、繰り返し周波数 70 MHz のパルスレーザー(Avesta 製)を使用し、サンプル調整完了から 21 分後に照射を開始した. 測定サンプルは、血清濃度 1%、磁気ナノ粒子濃度 2 mg/mL として、界面活性剤

(Tween20)を純水で希釈し、サンプル量が 50 µL となるよう調整した.磁気ナノ粒子は粒子径 180±30 nm のマグネタイトを使用し、サンプル調整前に超音波により分散させた.

<u>実験結果</u>

Fig.1 は界面活性剤濃度を変化させたときの,レーザーに よる信号回復率である.サンプル調整完了時を0minとし, 凝集が進んだ20min時点の信号で規格化した.サンプル内 に界面活性剤を注入すると,レーザー照射による信号の回 復効果が高まっていることがわかる.また,規格化信号値 の最終値について,界面活性剤未注入のサンプルと比較し て界面活性剤1%で9.4%,5%で9.8%,10%で20%の信号 回復上昇がみられた.したがって,サンプルに粒子分散を 促進する界面活性剤を混合することで,レーザー照射によ る磁気ナノ粒子の分散性を高められることが示唆された.



<u>参考文献</u>

 Kohei Kishimoto, Hiroto Kuroda, Misaki Tsubota, Kei Yamashita, Jin Wang, Kenji Sakai, Mohd Mawardi Saari, and Toshihiko Kiwa, "Dispersion of Fe3O4 Nanoparticle Beads Driven by Femtosecond Laser Pulses for Quantitative Magnetic Immunoassay Measurements," ACS Applied Nano Materials, vol.5, No.11, pp.17258-17263, Nov. 2022