

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22360139

研究課題名（和文） 新発明・磁気増幅ビーズを用いた超感度バイオセンサの開発

研究課題名（英文） Magnetic Beads Amplification based Biosensing System

研究代表者

SANDHU ADARSH (SANDHU ADARSH)

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・教授

研究者番号：80276774

研究成果の概要（和文）：近い将来に、医療分野には大きなパラダイムシフトが訪れると予測され、生体分子間の相互作用をバイオセンサが医療診断において極めて重要な役割を果たす。本研究では、申請者が発明した「磁気増幅ビーズ」を利用して、高感度磁性粒子マーカー式バイオセンシング技術を開発した。このホールバイオセンサ装置は簡便、安価、軽量及び在宅診断であり、本研究の成果によって手術の方式をより低侵襲的にするなどして、患者の生活の質を向上できると期待される。

研究成果の概要（英文）：Detection of small concentrations of sub-200 nm sized SPBs (superparamagnetic beads) that are used as ‘magnetic labels’ is critical for rapid, highly sensitive, and portable point of care treatment (POCT). Currently, magnetoresistive (MR) biosensors are used for the detection of large concentrations of SPBs but such an approach is not suitable for monitoring small numbers of sub-200nm SPBs due to the intrinsic noise of these electronic devices. In order to overcome this limitation of conventional MR sensors, this research has led to the development of a straightforward procedure for detecting small concentrations of sub-200-nm-diameter SPBs for biosensing by exploiting magnetically induced self-assembly of micrometer sized SPBs onto nanometer targets. This approach enables the monitoring the capture of magnetically induced self-assembly of micrometer sized SPBs by nanometer magnetic beads under an optical microscope, and the physical amplification of the signal from otherwise undetectable nano-SPB targets using Hall biosensors without using the application of ac magnetic fields or lock-in detection, thereby enabling the production of a simple POCT protocol for a wide range of applications.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：バイオデバイス

キーワード：磁性粒子、医療診断、ホール素子、

1. 研究開始当初の背景

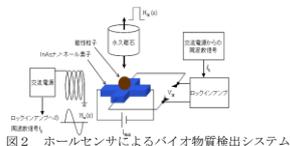
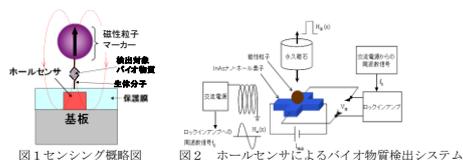
現行のバイオセンサには、主に蛍光物質を

標識（マーカー）とする光学的手法が利用されている。これらの手法は感度・精度とも医療診断に十分な性能を有しているものの、装置価格が非常に高く、一般の医療施設や家庭に設置することは困難である。

そこで申請者は、蛍光マーカーの代わりに磁性ビーズをマーカーとして用いた簡便かつ安価なバイオ物質検出手法に着目した。その利点として以下の点があげられる。

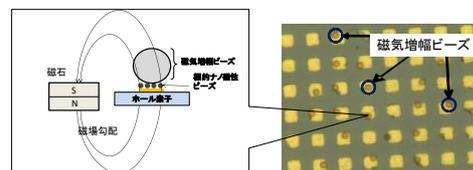
- (1)簡便かつ安価なバイオ検出システムの構築が可能である。
- (2)蛍光物質に比べて経時的に安定で定量性、再現性に優れている。

概略図を図1に示す。このように検出対象を磁性ビーズとセンサ表面とでサンドイッチ型に挟み込み磁気信号からバイオ物質を検出することができる。さらに図2に示すようなシステムを独自に開発し直径200nmの磁性ビーズの検出に成功しより安価な診断技術の構築を行った。しかし次世代医療では更なる感度の向上が要求される。つまりバイオ物質程度（100nm以下）の大きさの磁性ビーズの検出が必要不可欠である。



申請者が開発したシステムでは200nm以上の磁性マーカー、特に1 μ m以上であれば1個の磁性ビーズを容易に検出できる。だが100nm以下の磁性ビーズからの磁気信号は微弱であり、半導体センサにおけるバックグラウンドノイズなどの物理的な限界のため検出は困難である。また、世界中でも申請者と同様の研究が行われているが低

濃度の100nm以下の磁性ビーズを検出した報告例はない。そこでこの問題に対し、申請者が発見した磁性ビーズの磁気結合という現象を用いることで打開できるのではないかと考えた。その模式図と実際の観測の様子を図3に示す。



磁気結合とは基盤上にあらかじめ固定されたナノオーダーの磁性ビーズ（標的ナノ磁性ビーズ）上に垂直磁界を印加し、その上でマイクロオーダーの磁性ビーズ（磁気増幅磁性ビーズ）を投与すると磁氣的な力により結合する。これにより磁気信号が増幅されると期待できる。

2. 研究の目的

本研究で目指すもの

- (1)標的ナノ磁性ビーズと増幅磁性ビーズの結合時における磁気相互作用メカニズムの解明

標的ナノ磁性ビーズと増幅磁性ビーズがどのような力関係で結合するか、またそれぞれの粒径による個数の対応を調べる。これにより何個の標的ナノ磁性微粒子で増幅磁性ビーズを捕獲するか検証し、バイオ物質検出に応用する。

- (2)「磁気結合」をしている磁性ビーズをホール磁気センサ素子で検出

実際にホールセンサ表面上に標的ナノ磁性ビーズを固定したうえで増幅磁性ビーズを磁気結合させる。そしてその磁気信号から標的ナノ磁性ビーズの最少検出限界を調べる。

(3) 磁気結合を用いた DNA 及び抗原抗体反応の生体物質検出システムの構築

当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

・磁気信号自体の増幅

これまでに回路技術や信号処理によって磁気センサの感度を向上させる研究は数多くなされているが、磁気信号それ自体を増幅する磁気増幅微粒子を用いて感度を向上させようという手法は革新的で世界に類を見ない。

・感度の向上

標的ナノ磁性ビーズと増幅磁性ビーズの磁氣的メカニズムがわかり個数の相関性がわかるようになることで標的ナノ磁性ビーズを数個レベルで検出することが可能である。すなわちバイオセンサとして体積比で 100～1000 倍感度増幅が向上する。

・在宅で精度の高い診断が可能

感度向上により在宅医療の精度がますます高くなることが期待でき、疾患を早期発見および早期治療が可能となることで病気を未然に防ぐことができ、比較的軽微な段階で治療を開始することができ患者の生活の質(Quality of life)の向上が期待できる。

3. 研究の方法

本申請研究では研究目的で述べた世界に類をみない我々が独自に発見した「磁気増幅ビーズの標識ナノ磁性ビーズ上への磁気結合」を用いて超高感度ホールバイオセンサの作製を目指す。

初めに、直径 1.0 μm ～4.0 μm までの磁気増幅ビーズを、ガラス基板に化学的に固定化した直径 10nm, 20nm, 50nm, および 100nm の標的ナノ磁性ビーズ上に「磁気結合」で捕獲させ、1 個の磁気増幅ビーズの捕獲に必要な標的ナノ磁性ビーズの個数を

明確にする。また、生理活性物質を介してホール素子上に標的ナノ磁性ビーズを固定化させ、外部静磁界の印加による磁気増幅ビーズの磁気結合により、生理活性物質 (DNA 等) の定量的測定を行う。最終的には、磁気増幅ビーズの磁気結合に基づく革新的で超高感度、簡便、安価、軽量の在宅診断型ホールバイオセンサ装置を開発する。

本申請研究では、申請者が開発した検出システムと独自に発見した磁気結合、それらの知見を基にして高感度、簡便、安価、軽量の在宅診断型ホールバイオセンシング技術を開発する。すなわち、

(a)標的ナノ磁性ビーズと磁気増幅ビーズの磁気双極子相互作用メカニズムを明確にする。

(b)ホール素子を用いた標的ナノ磁性ビーズの検出限界の確認をする。

(c)生理活性物質を介した、ホール素子上への標的磁性ビーズの固定化および磁気増幅ビーズの磁気結合による超高感度ホールバイオセンサの実現を目指す。

実験実施

露光技術で標的ナノ磁性ビーズ (直径: 10nm, 20nm, 50nm, 100nm) を化学手法により 1.0 μm 角の範囲内に固定化した。ここで、標的ナノ磁性ビーズを固定化した。標的ナノ磁性ビーズを固定化した基板上に磁気増幅ビーズ入り溶液を滴下し、外部磁場を印加し、磁気増幅ビーズが標的磁性ビーズ上に捕獲される状況を光学顕微鏡で観察しながらホール素子を用いた標的ナノ磁性ビーズの検出限界の確認した。

次はホールバイオ素子上に化学手法を用いて標的ナノ磁性ビーズを固定化し、直径が 1 μm から 4 μm までの磁気増幅ビーズ

に外部静磁界を印加して磁気結合により標的ナノ磁性ビーズ上に捕獲させ、ホール素子の出力を測定した。

また、半導体光露光加工技術を用いてヘテロ接合2次元ガス1 μm 角のホール素子を作製した。次は標的ナノ磁性ビーズの固定化と磁気増幅ビーズの磁気結合およびホール素子出力の測定を行った。尚、磁気増幅ビーズと標的ナノ磁性ビーズの適切な組み合わせにより（例えば1 μm と10nm）、磁気増幅ビーズによる磁気信号と標的ナノ磁性ビーズの個数の相関性を調べることで、検出限界の上向がわかった。

バイオ物質実験に関しては生理活性物質を介した、ホール素子上への標的ナノ磁性ビーズの固定化および磁気増幅ビーズの磁気結合による超高感度ホールバイオセンサを作製した。

最後に磁性微粒子上への物質の固定化には、金とチオールとの強い親和性を利用し、アルキルチオール化合物を金表面上に吸着させ、金表面上に結合されたアルキルチオール化合物の単分子膜(SAM)を生成した。

4. 研究成果まとめ

一般的な磁性粒子について紹介し磁界中における磁性粒子の振る舞いを調べた。特に磁界印加方向と強度そして磁場勾配に依存した磁性粒子の振る舞いを観察することにより、磁性粒子を外部から誘導することができることがわかった。また、光リソグラフィとシランカップリング剤による基板処理により、ナノ磁性粒子を基板の特定の箇所に固定化することができ、少数のナノ磁性粒子をマイクロ磁性粒子による自己組織化を用いることで検出することに成功した。さらには、ナノ磁性粒子とマイクロ磁性粒子に働く力関係を計算し、どの程度少数のナノ磁性粒子まで検出できるか考察した。

ホール素子のセンシングエリア上に固定化された少数のナノ磁性粒子上にマイクロ磁性粒子を自己組織化させ直流磁界のみをもちいてナノ磁性粒子を磁氣的に検出する手法の提案を実験的に確認した。直流磁界下で自己組織化による反磁界係数の減少からの磁気増幅作用と従来の磁気抵抗素子とを組み合わせることで、増幅された垂直磁化成分によるホール電圧を測定することにより、従来は困難であった少数のナノ磁性粒子検出が可能であると分かった。実際のpoint of care型診断ツールの基礎となるマイクロ流路技術が必要である。磁性粒子の自己組織化による少数ナノ磁性粒子検出の結果と電界駆動によるPDMSマイクロ流路技術を組み合わせることにより、実際に少数ナノ磁性粒子の検出に成功した。これにより、病気の早期発見・早期治療に向けた高感度・簡易・携帯性に優れた診断ツール作製の可能性が明らかとなった。タンパク質であるアビジンとビオチンを用いバイオ物質反応を自己組織化で検出する実験を行い光学的手法によりアビジンの検出に成功した。これにより、自己組織化で実際のバイオ物質を検出できる大変期待できる結果を得た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Synthesis and characterization of graphite nanoplatelets, T V Thu, Y Tanizawa, N H H Phuc, P J Ko and A Sandhu, Journal of Physics Conf. Ser. 査読, 433, pp.012003-7, (2013).
- ② Biosensing Based on Magnetically Induced Self-Assembly of Particles in

- Magnetic Colloids, Ye Yang, Y. Morimoto, T. Takamura, and A Sandhu, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 査読有, 12, pp.2081-86, (2012).
- ③ Amplification of DC Magnetic Responses of Magnetic Nanobeads due to Induced Self-Assembly of Microbeads, Y. Morimoto, T. Takamura, R. Ishikawa, P. J. Ko and A Sandhu, Journal of Applied Physics, 査読有, 109, 07E516, (2011).
- ④ Planar Microfluidic System Based on Electrophoresis for Detection of 130-nm Magnetic Labels for Biosensing, T. Takamura, Y. Morimoto and A Sandhu, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, 50, pp.04DL10-14, (2011).
- ⑤ Synthesis and applications of magnetic nanoparticles for biorecognition and point of care medical diagnostics, A Sandhu, H. Handa, and M. Abe, Nanotechnology, 査読有, 21, pp.44-52, (2010).
- ⑥ Magneto-Optical Biosensing Platform Based on Light Scattering from Self-Assembled Chains of Functionalized Rotating Magnetic Beads, S.Y. Park, H. Handa and A Sandhu, Nano Letters, 査読有, 10, pp 446–451, (2010).
- ⑦ Exploring magneto-optical properties of biofunctionalized magnetic chains for developing label-free immunoassays, S.Y. Park, P. J. Ko, H. Handa, A Sandhu, Journal of Applied Physics, 査読有, 107, pp.09B324-7, (2010).
- ⑧ Compact Electro-Magnetically Operated Microfluidic System For Detection of Sub-200 nm Magnetic Labels For Biosensing Without External pumps, Y. Morimoto, T. Takamura, A Sandhu, Journal of Applied Physics, 査読有, 107, pp.09B313-7, (2010)
- ⑨ Patterning of Two-Dimensional Graphene Oxide on Silicon Substrates, R. Ishikawa, M. Bando, Y. Morimoto, A Sandhu, Journal of Applied Physics, 査読有, 49, pp.06GC02-5, (2010).
- ⑩ Detection of 8 nm diameter superparamagnetic beads by magnetically-induced manipulation of micrometer-sized magnetic beads: A novel protocol for magnetically-labeled biosensing, Y. Morimoto, T. Takamura, S. Y. Park, S. Sakamoto, S. Kawata, H. Handa, and A Sandhu, Japanese Journal of Applied Physics, 査読有, 49, pp. 04DL07-04DL07-3 (2010).
- ⑪ Determination of Inter-Molecular Forces by Magneto-Optical Transmittance of Molecule-Covered Superparamagnetic Particles in Solution, S.Y. Park, H. Handa, A Sandhu, IEEE Transactions on Magnetics, 査読有, 46, pp.1409-1411, (2010).
- [学会発表] (計 10 件)
- ① Yoshitaka Morimoto, Tsukasa Takamura, Sang Yoon Park, and Adarsh Sandhu “Compact electro-magnetically operated microfluidic system for detection of sub-200 nm magnetic labels for biosensing without external pumps” The 11th Joint MMM/Intermag Conference, January 18th-22nd (2010), Washington D.C., USA
- ② Pil Ju Ko, Yong Sang Park, Yoshitaka Morimoto, and Adarsh Sandhu “Dynamics of rotating chains of magnetic nanoparticles by optical transmittance” The 11th Joint MMM/Intermag Conference, January 18th-22nd (2010), Washington D.C., USA
- ③ Ryosuke Ishikawa, Masahi Bando, Yoshitaka Morimoto, and Adarsh Sandhu “Doping Graphene Films via Chemically

Mediated Charge Transfer”

European Materials Research Society (E-MRS 2010 Fall Meeting) September 13th-17th (2010), Strasbourg, Poland

- ④ Tsukasa Takamura, Yoshitaka Morimoto, and Adarsh Sandhu

“Compact Electro-Magnetically Operated Microfluidic System for Detection of sub-200 nm Magnetic Labels for Biosensing without External Pumps

2010 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM 2010), September 22nd-24th (2010), Tokyo, Japan

- ⑤ Pil Ju Ko, Yoshitaka Morimoto, Ryouzuke Ishikawa, B. Cho. H. Sohn, and Adarsh Sandhu

“Rapid Biosensing Platform based on Monitoring Changes in the Optical Reflectance of Porous Silicon due to Penetration by Functionalized Superparamagnetic Beads”

2010 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM 2010), September 22nd-24th (2010), Tokyo, Japan

- ⑥ Yoshitaka Morimoto, Ryouzuke Ishikawa, Tsukasa Takamura, and Adarsh Sandhu

“Magnetic amplification by Magnetically Induced Self-Assembly of Vertical Chains of Magnetic Micro-beads for the Detection of sub-200-nm Magnetic Labels by Magnetoresistive Biosensors

The 55th Magnetism and Magnetic Materials (MMM) Conference, November 14th-18th (2010), Atlanta, USA

- ⑦ Pil Ju Ko, Yoshitaka Morimoto, Ryouzuke Ishikawa, and Sandhu Adarsh

“Rapid Biosensing Platform Based on Monitoring Changes in the Optical Reflectance Shift of Porous Silicon due to Penetration by Functionalized Superparamagnetic Beads”

International Conference of the Asian union of Magnetism Societies (ICAUMS 2010), December 5th-8th (2010), Jeju Island, Korea

Domestic conferences

- ① 森本義謙、阿部正紀、半田宏、Adarsh Sandhu

Detection of Magnetic Nanoparticles by Magnetically Mediated Self-Assembly of Superparamagnetic Microbeads for Biosensing」

文部科学省学術振興調整費戦略的研究拠点育成プログラムの支援による第4回東工大統合研究院『ソリューション研究』国際シンポジウム. 東京：2009年2

月5日

- ② Yoshitaka Morimoto and Adarsh Sandhu
“Novel Protocol for Magnetically-Labeled Biosensing Platform”

Multidisciplinary International Student Workshop 2009, 4-5 August, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan

[その他]

ホームページ等

<http://www.sandhu.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Adarsh Sandhu

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・教授

研究者番号：80276774

(2) 研究分担者

(なし)

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号