

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23760369

研究課題名（和文） 磁気ナノ粒子のブラウン緩和を用いた迅速・高感度なバイオ免疫センサの開発

研究課題名（英文） Development of highly sensitive bio-immunoassay sensor using Brownian relaxation of the magnetic nanoparticle

研究代表者

吉田 敬（YOSHIDA TAKASHI）

九州大学・システム情報科学研究院・助教

研究者番号：30380588

研究成果の概要（和文）：免疫検査は血液中に含まれる疾患由来の蛋白質や病原菌などのバイオ物質を抗原-抗体の結合反応を用いて検出する方法であり、バイオ計測において基盤となる検出法である。本研究では、溶液中での磁気マーカーのブラウン磁気緩和特性を用いた迅速・高感度なバイオ免疫センサを開発し、ビオチン個数  $10^6$  個以下の検出、ビオチン検出感度 20 amol/ml 以下を可能とした。

研究成果の概要（英文）：Immunoassay is a test that uses the binding of antibodies to antigens to identify and measure certain disease related protein or pathogenic bacteria. In this study, we developed a rapid and highly sensitive bio-immunoassay sensor system using Brownian relaxation of the magnetic nanoparticles. We could detect  $10^6$  biotins and achieved a detection sensitivity of 20 amol/ml.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・計測工学

キーワード：計測システム、バイオセンサ

## 1. 研究開始当初の背景

ナノメートルサイズの磁気ナノ粒子を高分子で被覆し、その表面に検査試薬や薬剤等を結合したものは磁気マーカーと呼ばれており、磁氣的免疫検査、磁気粒子イメージング、磁氣的薬物搬送、磁氣的癌温熱治療（ハイパーサーミア）等へのバイオ応用が精力的に研究されている。

この中で、免疫検査は血液中に含まれる疾患由来の蛋白質や病原菌などのバイオ物質を抗原-抗体の結合反応を用いて検出する方法であり、バイオ計測において基盤となる

検出法である。

従来手法である光学マーカーを用いた手法では、抗原と結合した結合マーカー（Bound マーカー）と結合していない未結合マーカー（Free マーカー）を分離する B/F 分離の洗浄工程が必要であり迅速な検査を実現することが困難であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、溶液中での磁気マーカーのブラウン磁気緩和特性を用いた新規なバイオ免疫センサを開発する。この磁氣的手法によ

り、従来の光学的手法で必要とされてきた時間と手間のかかる B/F(Bound/Free)分離の洗浄工程を省き、迅速・高感度な検査を可能とする。B/F 分離不要の免疫検査の原理を図 1 に示す。

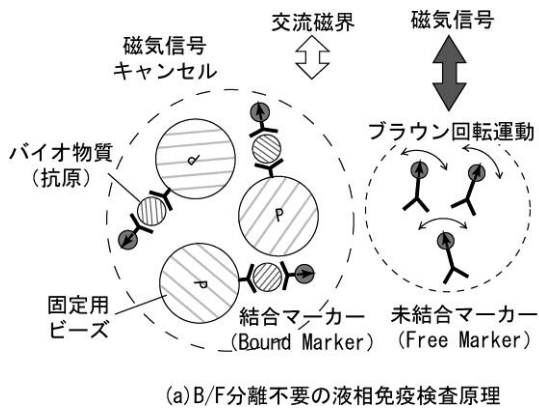


図 1

図に示すように、固定用のポリマービーズを用いてバイオ物質を固定する。この後に磁気マーカーを投入すると、一部がバイオ物質に結合し（結合マーカー）、残りは未結合（未結合マーカー）のまま存在する。結合マーカーと未結合マーカーは溶液中で異なるブラウン緩和特性を示すため、この違いを利用して、両者が混在した状態で結合マーカーのみを検出することができる。B/F 分離不要の新機能は磁気マーカーのブラウン磁気緩和特性を利用した磁気マーカーに特有なものであり、他の手法に対する大きな利点である。

しかしながら、結合、未結合マーカーが混在する状態での結合マーカーの定量的測定には高度な検出技術が必要となる。すなわち、両者が磁氣的に完全に識別出来ない場合には、不要な磁気雑音が発生し、検出感度、検出限界向上の妨げとなる。この磁気雑音は、磁気マーカー同士の凝集やマーカーサイズの分布などによって発生するため、磁気マーカー特性を定量的に解明し、この結果を基に高感度な検出法を開発する必要がある。

また、磁気緩和法を用いた高度な磁氣的検出技術を開発し、これらの結果を基に、磁気ナノ粒子のブラウン緩和を用いた迅速・高感度なバイオ免疫センサを開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、磁気ナノ粒子のブラウン緩和を用いた迅速・高感度なバイオ免疫センサを開発する。このために必要な以下の3つの項目の研究開発を行なう。

#### (1) 磁気マーカー特性の定量的解明

ナノ粒子の凝集体から構成される磁気マーカー（図 2）を免疫検査に応用するために

は凝集体の磁気特性の定量的な評価が不可欠となる。本研究では、磁気マーカーの粒度分布、磁気モーメントとブラウン緩和時間の関係を申請者の開発した評価法を用いて定量的に明らかにし、免疫検査に最適な磁気マーカー設計指針を明らかにする。

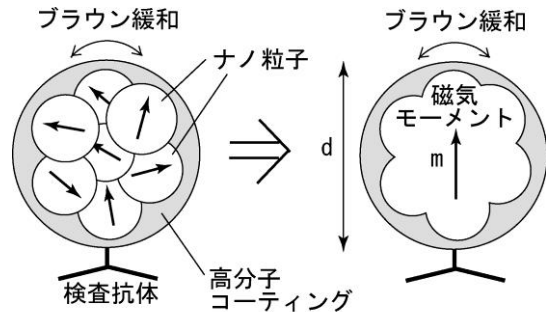


図 2 磁気マーカーの模式図

#### ①粒度分布（d 分布）

ブラウン緩和時間は磁気マーカーの直径  $d$  の 3 乗に比例し、粒径  $d$  依存性が非常に強い。しかしながら、マーカーを単一粒子径で作製することは難しく、マーカーの粒径  $d$  は 10 nm 程度から数 100 nm 程度までに及ぶ。このため実際のマーカーにおいて、粒度分布を定量的に明らかにすることは、ブラウン緩和を利用した B/F 分離不要の免疫検査の高度化には必要不可欠である。申請者が開発した手法により磁気マーカーの粒度分布を明らかにし、粒度分布が免疫検査に及ぼす影響を定量的に明らかにする。

#### ②磁気モーメントとブラウン緩和時間の関係

マーカーからの磁気信号強度は、マーカーの磁気モーメント  $m$  に強く依存する。このため、粒度分布が存在する実際のマーカーにおいて、磁気モーメントとブラウン緩和時間の関係を明らかにすることは、免疫検査の定量性に大きく影響する。

#### (2) 迅速・高感度な液相免疫検査法の開発

(1) での磁気マーカー特性の定量的解明の結果を基に、B/F 分離不要な迅速な免疫検査法として、磁気緩和測定法を用いた液相での高感度検出法を開発を行う。

磁気緩和測定法は、試料の磁化、緩和、検出の 3 つの機構で構成されており、結合、未結合マーカーのブラウン緩和時間の違いから、結合マーカーからの信号のみを検出する検査法である。未結合マーカーのブラウン緩和が不完全な場合、不要な磁気雑音を検出することになる。本研究では、両者を高度に識別し、結合マーカーのみを高感度に検出するための最適な磁化機構（磁界強度、磁化時間）、検出法を開発する。

#### (3) MR センサを用いた磁氣的免疫検査シ

システムの開発

(1), (2) の結果を基にMRセンサを用いた磁氣的免疫検査システム (図3) の開発を行い、実際の免疫検査実験により本手法の有用性を実証する。

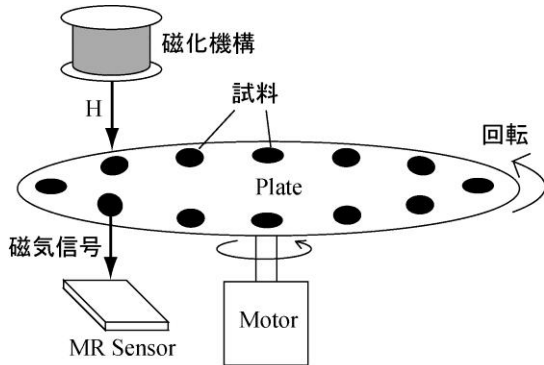


図3 MRセンサを用いた磁気免疫検査システム

4. 研究成果

(1) 磁気マーカー特性の定量的解明

図4はM-Hカーブから推定した磁気マーカーの磁気モーメントの分布の例を示す。図に示す磁気マーカーは、磁気モーメントに二つの大きなピーク値を取っており、小さいピーク ( $m = 8 \times 10^{-20} \text{ Am}^2$ ) は磁気微粒子の一次粒径 (数 nm) に対応し、大きいピーク ( $m = 2.8 \times 10^{-18} \text{ Am}^2$ ) は一次粒子が凝集した凝集体の等価的な磁気モーメントに対応している。また、磁気モーメントとブラウン緩和の関係も明らかにし、定量的にどの程度の割合の磁気マーカーが免疫検査として磁気信号に寄与しているかの評価法を確立した。

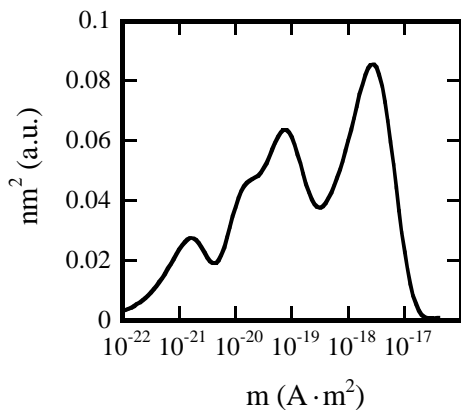


図4 磁気モーメントの分布

(2) 迅速・高感度な液相免疫検査法の開発  
磁気マーカー特性の定量的解明の結果を基に、B/F分離不要な迅速な免疫検査法として、磁気緩和測定法を用いた液相検査法の高感度検出法の開発を行った。

(3) MRセンサを用いた磁氣的免疫検査シ

システムの開発

MRセンサを用いた磁氣的免疫検査システム (図5) の開発を行い、実際の免疫検査実験により本手法の有用性を実証した。特に、MRセンサのセットリセットを用いた低雑音化、磁気シールドによる高感度化を達成した。



図5 磁気シールドボックス内に設置したMRセンサを用いた磁氣的免疫検査システム

サンプルとしては直径  $3.3 \mu\text{m}$  のポリマー粒子に固定したビオチンを用いた。ポリマー粒子1つには約1000個のビオチンが固定化されている。プレート容器に磁気マーカー ( $2.33 \mu\text{g}/40 \mu\text{l}$ ) とビオチンを固定したポリマー粒子 (ポリマー数/  $20 \mu\text{l}$ ) を反応させた試料  $60 \mu\text{l}$  を入れた。このサンプルを  $40 \text{ mT}$  の永久磁石で磁化した後の磁気信号をMRセンサで測定した。図6はブラウン緩和を用いた液相での免疫検査結果を示す。横軸は固定用ポリマー粒子の数  $N_p$  を、縦軸は信号電圧  $V_s$  を示す。

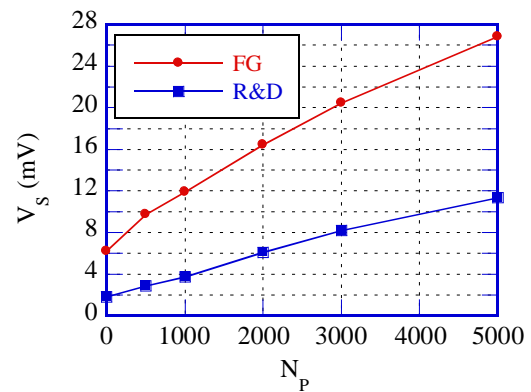


図6 液相でのビオチンの検査実験

図には、MagCollect ビーズ (R&D) と FG ビーズ (FG) の2種類の磁気マーカーを用いた結果を示している。液相試料中のポリマーの個数  $N_p$  と信号の大きさが比例していることがわかる。この結果から、MRセンサを用いた検出システムで液相での免疫検査が正常に行われていることが分かる。すなわち、BF分離の洗浄工程を省いた検査が正常に行われていることを示している。

なお、図6に示すように  $N_p = 0$  の場合、すなわちビオチンが無い場合にも信号電圧が発生している。この電圧はMRセンサの雑音電圧よりも大きく、未結合マーカーから信号が発生していることを示している。これは未結合マーカーのブラウン緩和が完全には終了していないことに対応しており、その原因としては未結合マーカーの凝集が考えられる。図に示すように、MagCollect ビーズに比べてFG ビーズの方が凝集の程度が大きい。微量なビオチンの検出のためにはこの影響を更に小さくすることが今後の課題である。図6に示すように、今回の実験でのポリマー粒子の検出限界数は500個となっている。ポリマー粒子1つには約1000個のビオチンが結合しているため、ビオチンの検出限界数は  $5.0 \times 10^5$  個となり、検出感度としては13.8 amol/ml となる。この感度は従来の光学的手法と比較しても高感度といえる結果である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9件)

- (1) T. Yoshida, N. B. Othman, T. Tsubaki, J. Takayama, K. Enpuku, "Evaluation of Harmonic Signals for the Detection of Magnetic Nanoparticles", IEEE Transactions on Magnetics, 査読有, Vol. 48, 2012, pp. 3788-3791, DOI: 10.1109/TMAG.2012.2198198
- (2) T. Yoshida, K. Enpuku, J. Dieckhoff, M. Schilling, and F. Ludwig, "Magnetic fluid dynamics in a rotating magnetic field", Journal of Applied Physics, 査読有, Vol. 111, 2012, pp. 053901-1-10, DOI: 10.1063/1.3688254
- (3) T. Yoshida, K. Ogawa, T. Tsubaki, N. B. Othman, and K. Enpuku, "Detection of Magnetic Nanoparticles Using the Second-Harmonic Signal", IEEE Transactions on Magnetics, 査読有, Vol. 47, 2011, pp. 2863-2866, DOI: 10.1109/TMAG.2011.2157805

[学会発表] (計 4件)

- (1) 平田 智一、吉田 敬、圓福 敬二：ブラウン緩和を用いた液相でのバイオ免疫検査法の開発、電気学会マグネティックス研究、2013年2月28日、東京
- (2) T. Yoshida, K. Enpuku, "Nonlinear Behavior of Magnetic Fluid in Brownian Relaxation: Numerical Simulation and Derivation of Empirical Model", International

Workshop on Magnetic Particle Imaging, 2012年3月15日, Lubeck, Germany

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 敬 (YOSHIDA TAKASHI)

九州大学・システム情報科学研究所・助教

研究者番号：30380588