

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24246072

研究課題名(和文)磁気マーカーを用いた先端バイオ免疫検査システムの開発

研究課題名(英文)Development of biological immunoassay system using magnetic markers

研究代表者

圓福 敬二 (ENPUKU, KEIJI)

九州大学・超伝導システム科学研究センター・教授

研究者番号：20150493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では磁気マーカーと高感度な磁気センサを用いて、従来の光学的手法には無い新機能を持つ磁気的な免疫検査法を開発した。最初に、本手法の基礎となる磁気マーカーの磁気特性を定量的に評価するための解析手法を開発し、バイオ応用に適した磁気マーカーの開発指針を明らかにした。次に、B/F(Bound/Free)分離の洗浄工程を不要とする、迅速・高感度な液相免疫検査法を開発し、アトモルレベルの微量なタンパク質の高感度検出を実証した。最後に、免疫検査を体内診断へと展開するための磁気マーカーイメージング法を開発し、センサから50 mmの深部に配置した磁気粒子の位置と量を高精度に検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a biological immunoassay technique utilizing magnetic markers and highly sensitive magnetic sensors. First, we quantitatively characterized the properties of magnetic markers. These results can be used to find markers suitable for bio-application. Next, we developed a liquid-phase detection method of biological targets, where bound and free markers are magnetically distinguished by using Brownian relaxation. Therefore, we can omit a time consuming washing process called bound/free separation. We demonstrated highly sensitive detection of biological targets using this technique. Finally, we developed a magnetic-particles-imaging system for the application to in-vivo diagnosis. Magnetic particles, that were placed 50 mm below the sensors, were successfully detected with high sensitivity and spatial resolution. These results indicated the usefulness of the present systems.

研究分野：電気電子工学・計測工学

キーワード：免疫検査 磁気マーカー SQUIDセンサ 磁気ナノ粒子 ブラウン緩和 磁気粒子イメージング

1. 研究開始当初の背景

磁気ナノ粒子を高分子で被覆し、その表面に検査抗体や薬剤を結合したものは磁気マーカーと呼ばれており、種々のバイオ・医療分野への応用が研究されている。そのなかの一つが、医療診断や医薬開発の分野で必要となる蛋白質や病原菌などの種々のバイオ物質を検出するための磁気的なバイオ免疫検査法である。本手法には従来の光学的手法にはない多くの新機能が期待されており、次世代の診断・解析機器としてその開発に大きな期待が寄せられている。

しかしながら、磁気的検査システムの実現のためには、まだ解決すべき課題も多く残されている。特に、バイオ用に適した磁気マーカーを開発するとともに、検査システムを高感度化して検査の高性能化を達成する必要がある。また、磁気的手法に期待されている種々の新機能を定量的に明らかにし、その有効性を実証する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では磁気マーカーを用いた磁気的な免疫検査手法を開発し、従来の光学的手法には無い種々の新機能を持つ免疫検査システムを開発することを目的としている。すなわち、(1) B/F(Bound/Free)分離の洗浄工程を不要とする、迅速・高感度な液相免疫検査法、及び、(2)体内診断への展開のための磁気マーカーイメージング法を開発する。また、本手法を用いた検査システムを試作するとともに、磁気的手法による検査実験を通して本手法の有効性を実証する。

3. 研究の方法

本研究では、磁気的なバイオ免疫検査法の開発を以下の方法により行なった。

(1) 本手法の基礎となる磁気マーカーの磁気特性を定量的に評価するための解析手法を開発する。また、この手法を用いて種々の磁気マーカーを評価し、バイオ応用に適した磁気マーカーの開発指針を明らかにする。

(2) 磁気マーカーを用いたB/F分離不要の液相検査法と検査システムを開発するとともに、免疫検査実験により本手法の有効性を実証する。

(3) 体内診断への応用を目指して、体内に集積した磁気粒子の位置と量を検出するための磁気粒子イメージング法を開発する。また、検出システムを開発し、イメージング実験により本手法の有効性を実証する。

4. 研究成果

1) 磁気マーカーの特性説明

免疫検査に用いられる磁気マーカーの模式図を図1に示す。同図に示すように磁気ナノ粒子の凝集体を高分子で被覆し、その表面に抗体を結合している。このため、磁気マーカーの磁気特性はナノ粒子自身の特性とともに粒子間の磁気的相互作用に強く依存す

る。

図1に示す様に、ナノ粒子の凝集の程度により磁気マーカーは大きく3つのタイプに分類される。Type 1はナノ粒子間の凝集がない場合であり、Type 2は中程度の凝集、Type 3は凝集が強い場合に対応する。ナノ粒子間の磁気的相互作用のため、磁気マーカーの磁気モーメント m は3つのタイプにより大きく異なることになる。

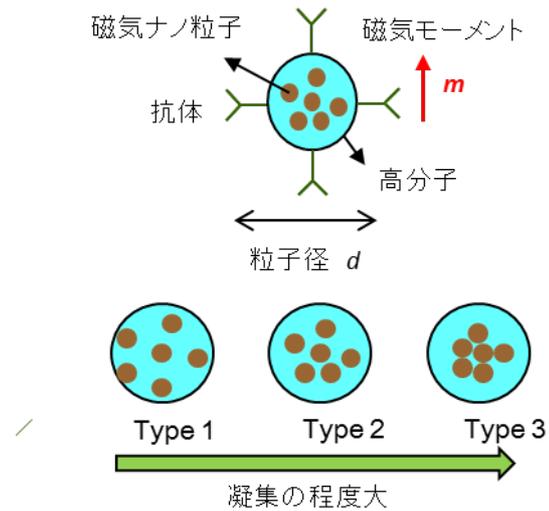


図1. 磁気マーカーの模式図と凝集の程度

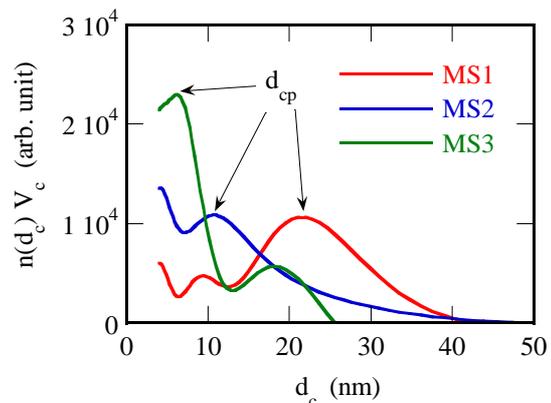


図2. 磁気マーカーサンプル内の磁気モーメント m の分布。3つ Type のマーカーについての結果を示す。

図2に磁気マーカーサンプルの磁気モーメント m の分布を評価した結果を示す。磁気マーカーの M-H 特性を解析することによりサンプル内の m の分布を求めている。図の横軸は磁気マーカーの磁気モーメント m を、縦軸はその分布を nm^2 の値で示している。ここで、 n はサンプル内でモーメント m を持つマーカーの個数を表す。

図2では図1に示す3つの Type の磁気マーカー (MS1, MS2, MS3) の m の分布を評価した結果を示している。図に示す様に、磁気モーメントの分布はある m の値でピークを示す。この値がサンプル内での磁気モー

ントの平均値を表す。ただし、図に示す様に m の値はサンプル内で広く分布していることが分かる。

また、磁気モーメントの平均値は、MS1, MS2, MS3 の順番に大きくなっていることも分かる。図 1 に示したように MS1, MS2, MS3 の順にナノ粒子間の凝集の程度が増大しており、その結果磁気モーメント m も増加していることが分かる。

図 3 には、市販の 4 種類の磁気マーカーの残留磁気特性を比較した結果を示す。磁気マーカー内の Fe_3O_4 の重さは 100 ng と統一している。図の横軸は磁気マーカーに印加する励起磁界 B_{ex} を表す。図の縦軸は励起磁界 B_{ex} を取り去った後の磁気マーカーの残留磁気を測定した結果である。なお、残留磁気は SQUID センサで測定しており、磁気信号は磁束量子 $\Phi_0 = 2.07 \times 10^{-15} \text{ Wb}$ の単位で表している。図に示す様に、 Fe_3O_4 の重さが同じでも残留磁気の大きさは磁気マーカー毎に大きく異なっている。これは、図 1 に示す様に、ナノ粒子の凝集の程度が異なるためである。

このように、ナノ粒子間の凝集による磁氣的相互作用が磁気マーカーの磁気特性に大きな影響を及ぼす。磁気マーカーに要求される特性は応用に応じて異なるため、応用に適した磁気マーカーを選定する必要がある。

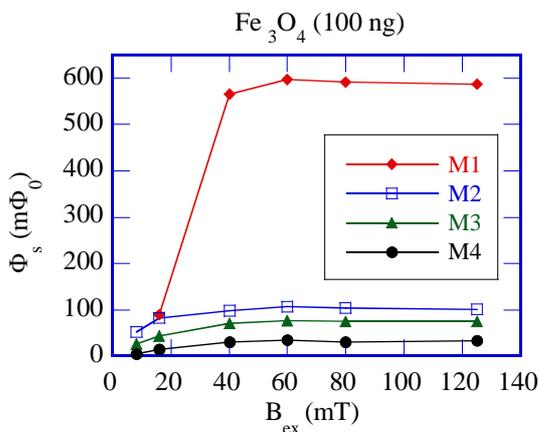


図 3 . 各種磁気マーカーの残留磁気特性の比較。

(2) 液相免疫検査法の開発

図 4 に本研究で開発した、固定用ポリマービーズを用いた、洗浄工程による B/F (Bound/Free) 分離なしでの液相免疫検査法の原理図を示す。図に示すように、検出するバイオ物質(target)をポリマービーズの表面に固定する。この後に、磁気マーカーを投入すると、一部はtargetと結合する。この磁気マーカーを結合(Bound)マーカーと呼ぶ。これに対して未結合のマーカーを未結合(Free)マーカーと呼ぶ。溶液サンプル中にはこれら

の二つのマーカーが共存している。

溶液中の粒子は熱雑音によりブラウン回転運動を行っている。この回転時間 τ_B は粒子直径 d により決まる。本研究で使用している磁気マーカーの直径が $d = 240 \text{ nm}$ であるため、図 4 の未結合マーカーの回転時間は $\tau_B = 5 \text{ ms}$ となる。このため、未結合マーカーからの磁気信号は時間とともに急激に減衰(ブラウン磁気緩和)しゼロとなる。一方、ポリマービーズに結合した結合マーカーのブラウン回転時間はポリマービーズの粒子径が $d_p = 3.3 \text{ }\mu\text{m}$ であるため、 $\tau_B = 14 \text{ s}$ となる。このため、結合マーカーの磁気信号は長時間保持される。本検出法では、ブラウン磁気緩和の差を利用して、結合マーカーと未結合マーカーを、洗浄工程なしに磁氣的に識別している。

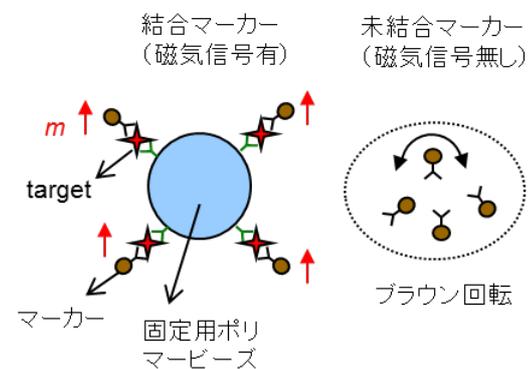


図 4 . 結合マーカーと未結合マーカーのブラウン磁気緩和。緩和時間の差を利用して両者を磁氣的に識別する。

結合マーカーからの磁気信号は SQUID 磁気センサにより検出した。図 5(a) にその写真を示す。高温超伝導薄膜を用いて作製されており、液体窒素温度($T = 77 \text{ K}$)で動作する。SQUID システムの雑音は $\Phi_{\text{np}} = 55 \text{ }\mu\Phi_0$ となった。

この SQUID システムを用いて、磁気マーカーの検出感度を測定した結果を、図 5(b) に示す。図の横軸は磁気マーカーの個数 N_m であり、縦軸が SQUID で測定した磁気信号 Φ_s を示す。図に示す様に磁気信号はマーカー個数に比例しており、SQUID の雑音から評価される磁気マーカーの最小検出個数は $N_m = 2.8 \times 10^3$ 個となった。磁気マーカー 1 個がターゲット 1 個に結合するとすれば、この結果は 2.8×10^3 個のターゲットが検出可能なことを示している。従って、本システムを用いれば、極めて微量なターゲットの検出が期待できることになる。

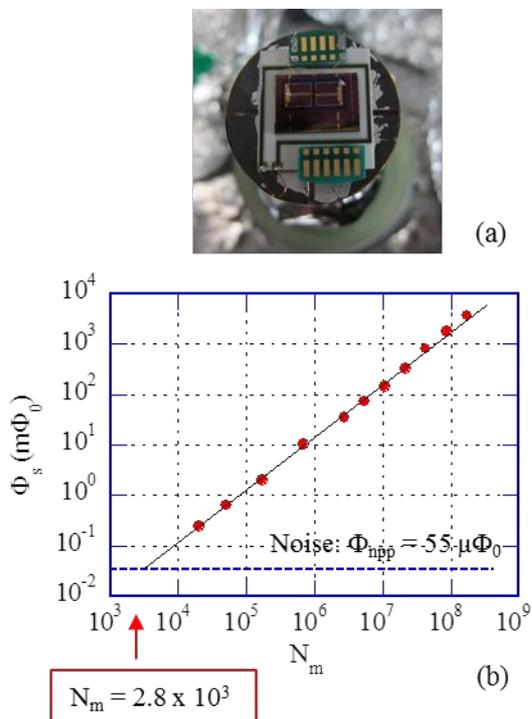


図5. ブラウン磁気緩和を用いた液相免疫検査法の測定手順

本検出手法を用いて、ビオチンと呼ばれる蛋白質の検査実験を行なった。図4に示すように、直径が $3.3 \mu\text{m}$ のポリマービーズにビオチンを固定し、これにアビジンを付加した磁気マーカー(FGビーズ：多摩川精機)を結合させた。なお、ポリマービーズの表面には1個当たり1,500個程度のビオチンが固定されている。

図6にビオチンの検出結果を示す。図の横軸はビオチンの個数であり、縦軸はSQUIDにより検出した磁気信号である。同図に示すように両者はほぼ比例しており、B/F分離無しでの液相免疫検査が正常に行なわれていることを示している。また、この実験では 10^4 個/ $60 \mu\text{l}$ のビオチンの検出に成功した。モル濃度に換算すると $3 \times 10^{-19} \text{ mol/ml}$ (0.3アトモル/ml)であり、液相検査法によりこの高感度を達成したのは本研究が初めてである。

なお、磁気マーカーとビオチンを結合させる際に「反応磁場」と呼ぶ磁界($B_{\text{re}} = 1.5 \text{ mT}$)を印加する方法を新たに開発した。この反応磁場を印加することにより、図4に示す結合マーカーの磁気モーメント m の揃い具合を大幅に改善することが可能になった。その結果、図6に示す様に、反応磁場を用いない場合($B_{\text{re}} = 0 \text{ mT}$)に比べて、結合マーカーからの信号を増大することに成功した。従って、「反応磁場」の導入は検査の高感度化の有効な方法であることが分かる。

また図6に示す様に、ビオチンが無い場合($N = 0$)にも、磁気信号が測定されている。すなわち、未結合マーカーからも若干の信号が測定されている。理想的には未結合マーカーからの信号はゼロになるはずであるが、実際には、未結合マーカーの凝集のため磁気信号が若干発生する。従って、更なる高感度化のためには未結合マーカーからの磁気信号の発生を抑制する方法を開発する必要がある。

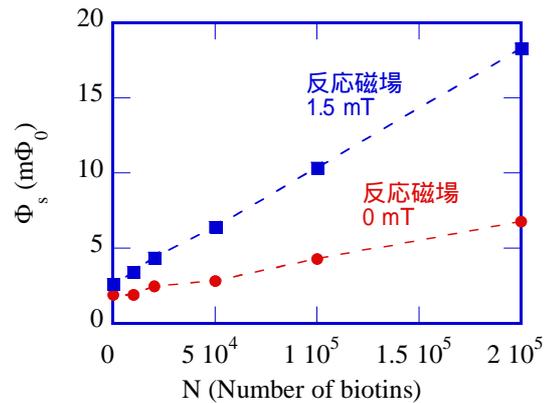


図6. 液相免疫検査実験の結果。ビオチンの個数と検出信号の関係を示す。

3) 磁気粒子イメージング法の開発

体内診断への応用を目指して、体内に集積した磁気粒子の位置と量を検出するための磁気粒子イメージング法を開発した。本方法では、交流の励起磁界(実効値 1.6 mT 、周波数 3 kHz)を磁気粒子に印加し、磁気粒子の非線形磁化特性から発生する第3高調波信号(周波数 9 kHz)を検出した。高感度な磁気センサシステムを実現するため、検出コイルを液体窒素温度に冷却して熱雑音の影響を低減し、測定周波数における磁界雑音として $12 \text{ fT/Hz}^{1/2}$ を達成した。

この測定システムを用いて磁気粒子の検出感度を調べた結果を図7に示す。実験では磁気粒子の重さを $100 \mu\text{g}$ とし、磁気粒子とセンサの距離 Z を変化した場合の磁気信号を測定した。図の横軸が距離 Z であり、縦軸が信号の強さを示す。図に示す様に、磁気粒子からの信号は距離に対して $1/Z^3$ で急激に減少する。本実験では 100 mm の深部にある $100 \mu\text{g}$ の磁気粒子の検出に成功した。この時の磁気信号は1ピコテスラ程度である。

次に、二つの磁気粒子サンプルのイメージング実験を行った。重さが $5 \mu\text{g}$ の二つの磁気粒子サンプルをセンサから 50 mm の位置に配置した。なお、サンプル間の間隔は 15 mm とした。

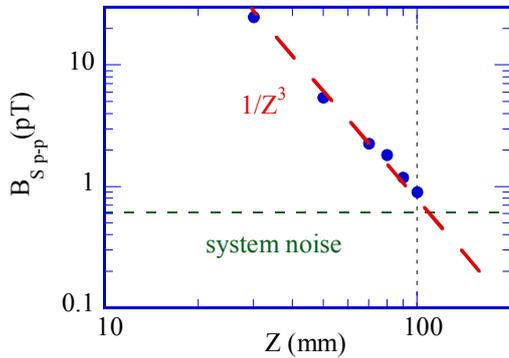


図7. センサから距離 Z にある磁気粒子の検出。粒子の重さは 100 μg 。

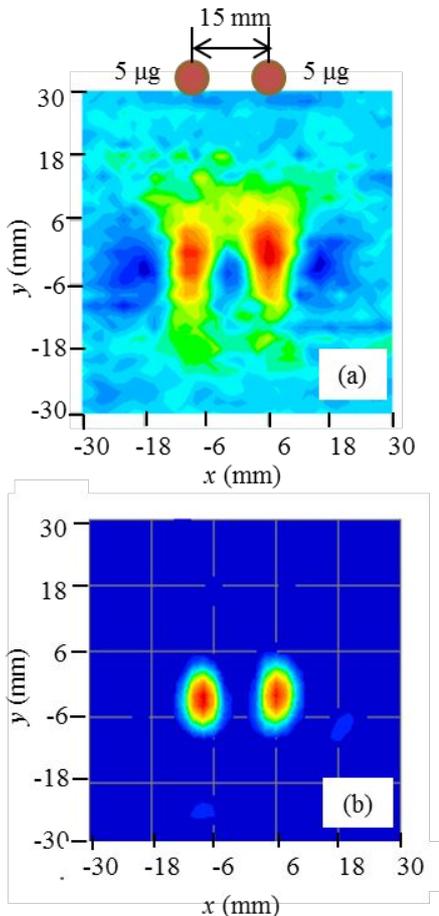


図8. (a)二つの磁気粒子サンプルからの磁気信号のマップ。(b)磁界マップから再構成した磁気粒子の分布。

図8(a)に磁気粒子から発生する信号磁界のマップを測定した結果を示す。図に示す様にサンプルの位置で大きな磁気信号が得られており、この結果から二つのサンプル位置を推定することが出来る。

サンプル位置を推定する際の空間分解能を高めるため、図8(a)の磁界マップから磁気粒子の分布を再構成するイメージング法を開発した。特異値分解法と呼ぶ手法を用いて再構

成した磁気粒子の分布を図8(b)に示す。図に示す様に二つの磁気粒子サンプルを明瞭に識別でき、粒子検出の際の空間分解能を改善する事に成功した。

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 22 件)

K. Enpuku, S. Bai, A. Hirokawa, K. Tanabe, T. Sasayama and T. Yoshida, “The effect of Neel relaxation on the properties of the third harmonic signal of magnetic nanoparticles for use in narrow-band magnetic particle imaging”, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 53 (2014) 103002. 査読有り

S. Uchida, Y. Higuchi, Y. Ueoka, T. Yoshida, K. Enpuku, S. Adachi, K. Tanabe, A. Tsukamoto, and A. Kandori, “Highly sensitive liquid-phase detection of biological targets with magnetic markers and high Tc SQUID”, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* 24, (2014) 1600105. 査読有り

T. Yoshida, N. B. Othman, and K. Enpuku, “Characterization of magnetically fractionated nanoparticles for magnetic particle imaging”, *J. Appl. Phys.* 114 (2013) 173908. 査読有り

K. Enpuku, T. Morishige, T. Mihaya, T. Miyazaki, M. Matsuo, S. Haku and T. Yoshida, “Magnetic nanoparticle imaging using cooled pickup coil and harmonic signal detection”, *Jpn. J. Appl. Phys.* 52 (2013) 087001. 査読有り

A. Bhuiya, K. Enpuku, M. Asai, H. Watanabe, T. Hirata, Y. Higuchi and T. Yoshida, “Characterization of magnetic markers and sensors for liquid phase immunoassay using Brownian relaxation”, *IEEE Trans. Magn.* 48 (2012) 2838. 査読有り

T. Yoshida, N. Othman, T. Tsubaki, J. Takamiya and K. Enpuku, “Evaluation of harmonic signals for the detection of magnetic nanoparticles”, *IEEE Trans. Magn.* 48 (2012) 3788. 査読有り

〔学会発表〕(計 44 件)

T. Sasayama, T. Yoshida, M. M. Saari, and K. Enpuku, “Comparison of volume distribution of magnetic nanoparticles obtained from M-H curve with a mixture of log-normal distributions” 59th Annual Magnetism and Magnetic Material Conference, 2014. 11. 5, Hawaii (USA).

Y. Ueoka, S. Uchida, M. Ura, T. Yoshida, K. Enpuku, and A. Kandori, “HTS SQUID System for Liquid-Phase Detection of Biological Targets Using Brownian

Relaxation of Magnetic Markers”, Applied Superconductivity Conf. (ASC2014), 2014. 8. 13, Charlotte (USA).

S. Uchida, Y. Higuchi, Y. Ueoka, T. Yoshida and K. Enpuku, “Liquid-phase detection of biological targets using highly sensitive HTS SQUID”, Int. Superconductive Electronics Conference (ISEC2013), 2013. 7. 10, Boston (USA).

T. Yoshida, N. B. Othman, T. Tsubaki, D. Kitahara and K. Enpuku, “Magnetic nanoparticle imaging using harmonic signals of magnetic nanoparticles”, European MRS meeting, 2013. 5. 30, Strasbourg (France).

K. Enpuku, R. Momotomi, T. Mihaya, T. Yoshida, M. Matsuo, A. Kandori, K. Tanabe, S. Adachi and A. Tsukamoto, “HTS SQUID coupled to cooled Cu pickup coil for high sensitive measurement of AC magnetic fields”, Applied Superconductivity Conf. (ASC2012), 2012. 10. 14, Portland (USA).

N. B. Othman, T. Tsubaki, T. Yoshida, K. Enpuku and A. Kandori, “Magnetic nanoparticle imaging using harmonic signal”, Int. Magnetic Conference (INTERMAG 2012), 2012.5. 10, Vancouver (Canada).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sc.kyushu-u.ac.jp/~enlab/>

6 . 研究組織

圓福 敬二 (ENPUKU KEIJI)

九州大学・超伝導システム科学研究センター・教授

研究者番号：20150493

(2) 吉田 敬 (YOSHISA TAKASHI)

九州大学・システム情報科学研究院・准教授

研究者番号：30380588

(3) 研究分担者

隈 博幸 (KUMA HIROYUKI)

長崎国際大学・薬学部 准教授

研究者番号：40435136

(4) 研究分担者

井上 昌睦 (INOUE MASAYOSHI)

九州大学・システム情報科学研究院・准教授

研究者番号：80346824

(5) 研究分担者

笹山 瑛由 (SASAYAMA TERUYOSHI)

九州大学・システム情報科学研究院・助教

研究者番号：60636249

(H26 から参画。)