

令和元年6月18日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03169

研究課題名(和文) 医療用微細マイクロミラーを高機能化するグアニン結晶

研究課題名(英文) Guanine crystals for highly functioned medical small micro-mirror

研究代表者

岩坂 正和 (Iwasaka, Masakazu)

広島大学・ナノデバイス・バイオ融合科学研究所・教授

研究者番号：90243922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：グアニン結晶ミラー板の磁場下での回転およびマイクロ流路内での動きを高速撮影し、その光反射挙動を明らかにすることに成功した。最大4テスラのパルス強磁場発生装置を用い、グアニン結晶の高速磁気回転運動の様子を光反射の時系列変化で計測する技術を開発した。水溶液中でのグアニン結晶集団の向き磁気ピンセットで操作し、結晶板における光干渉パターン(モアレ縞)が、生体組織(培養骨芽細胞やクシクラゲの微小管)の構造に依存して変化することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類が自然界にて光を効率良く利用するために進化の過程で獲得したバイオジェニック・ミラーを医療診断に用いる上でのヒントと活用手法について基礎研究を推進した。グアニン結晶ミラー板の磁場下での回転およびマイクロ流路内での動きを高速撮影し、医療用のミラーとして十分な応答性を有することを示した。また、結晶板における光干渉パターン(モアレ縞)が、生体組織(培養骨芽細胞)の構造に依存して変化することを明らかにできた。今後は、新たな細胞診断法へのグアニン結晶の応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Light reflection properties of guanine crystal platelet were clarified by observing the high speed rotation under magnetic fields and drift motion in a micro-fluidic chamber.

We developed a measurement system for time-course of light reflection in guanine crystal platelets rapidly rotating under magnetic fields, by utilizing a pulsed magnetic field generator which produced a maximum 4-T magnetic field. In addition, alignments of guanine crystal platelets in an aqueous solution were controlled by a magnetic tweezer, and it was revealed that the light interference pattern (moire pattern) changed depending on structures of biological tissues such as osteoblast and cilia of comb jelly.

研究分野：生体医工学

キーワード：バイオミメティクス バイオフォトンクス 生体磁気工学 グアニン結晶 マイクロ光学素子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

磁気と生物にかかわる様々な研究の歴史の中で、近年、磁気共鳴イメージング MRI や生体磁気刺激など、具体的な磁気の生体応用が推進されてきた。その一方、進化の過程にて生物が地磁気を利用してきた可能性に関する科学的追及も継続している。例えば走磁性バクテリアが遺伝的に合成する強磁性のマグネタイトは地磁気センサーのひとつと考えられている。この有機薄膜で覆われた単結晶はバイオセンサへ応用され、藻類など環境有用物質の分離回収などへの応用も進んでいる。さらに、鳥の磁気コンパスのメカニズムとして、網膜の酵素分子における常磁性のラジカルペアの磁気応答が引き金となっている可能性も指摘されている。磁場による遠隔作用的な医学応用は、強磁性微粒子による高感度バイオセンシングや常磁性イオンによるイメージングにおいて目覚ましい進展がなされてきた。その一方で、反磁性分子が凝集・結晶化することによる磁化率増幅を利用した組織病変診断・予防処置の取組が遅延している。

これまで、強磁性や常磁性物質に限らず、“第三の磁性”であり万物が有する磁性である反磁性に基づいた磁気応答について、数テスラ級の強磁場下での検出を進めてきた。磁場下での水面分割現象(モーゼ効果)、フィブリン(生体高分子重合体)の磁場配向が血液凝固・繊維素溶解系に与える影響などは8テスラ以上の強磁場が必要であった。生体に対する磁場影響と、磁気を用いた医学応用の研究は表裏一体で進められており、特に新たな磁場効果メカニズムが明らかにされた場合、磁場の安全性に関する知見とともに、影響の閾値を厳密に評価した医療応用が可能となると考えられる。コラーゲンの磁場配向は当初、8テスラ中での観測をもとにマウスの骨形成促進への寄与が認められ、その閾値は2テスラまで低減し永久磁石で配向可能となった。骨形成バランスの評価系のひとつとして、魚類鱗の一片を(骨芽細胞・破骨細胞を鱗内に含有した状態で)用い、その骨代謝に対する磁場効果研究に参加した。

また最近、魚類鱗や藻類の細胞がつくる微結晶(マイクロクリスタル)が水中にて数百ミリテスラの低磁場で磁場配向する手法開発に本申請者は成功した。これら水圏生物は進化の過程で太陽光を有効利用するために生体・細胞表面に結晶をつくり配置することを選択したと思われる。藻類は太陽光エネルギーからバイオエネルギーを産生する植物細胞で構成されるが、この細胞表面のフォトニック結晶が光合成機能に何らかの貢献をしていることが推察されている。また、魚類のウロコの裏に存在する色素胞細胞が生成するグアニン結晶板の集合体は、銀色~虹色など様々な構造色系の光沢を発するフォトニック結晶であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究は、尿酸や核酸塩基を含む生体内結晶の磁氣的応答機構を明らかにすることで、今後の予防医学を格段に充実する細胞・分子診断および治療のための磁氣的手法の開拓を進める。生体内で結晶化する尿酸結晶、グアニン結晶の磁氣応答を明らかにするとともに、微結晶の磁氣応答を検出感度の高いバイオセンシング技術へ応用するための基礎的な生体磁性研究を推進する。魚類鱗のグアニン結晶の顕著な光磁氣特性を基本原理とし、細胞近傍でのメソスケールの光制御法を開拓することで、次世代基盤ドラッグデリバリーとがん細胞診断の高機能化を加速するマイクロミラー(細胞計測制御可能な微小光学素子)への道筋を示す。

生体(魚)由来グアニン結晶板を色素胞から調整するプロトコルを整理し、結晶表面にリン脂質が付着している状態と、剥離した状態を制御する手法を確立する。また、人工的に作成したグアニン結晶の表面にリン脂質を付着させ、このグアニン結晶板・リン脂質複合体がさまざまな低分子、DNA、タンパク質と相互作用するダイナミクスを光・磁氣的に検出する手法を編み出す。

3. 研究の方法

生体由来マイクロ結晶板の磁氣応答をリアルタイムで観察し分光解析する実験系を改良しつつ、核酸塩基結晶の光磁氣特性を生かした迅速診断手法のための基礎的研究を進めた。グアニン結晶や尿酸結晶を調製し、水中で磁場を印加しつつリアルタイム観察する実験系を開発した。淡水魚以外に深海魚やイカ、動物プランクトンから得られるグアニン結晶、および発光生物ホタルの尿酸結晶微粒子の光特性解析を磁場配向原理に基づき行った。これらの天然グアニン結晶が生体高分子や細胞と相互作用する際の光磁氣応答を解析した。グアニン結晶板集団が交叉する際の光干渉による透過光・反射光の強度変化を計測する実験系を構築し、光干渉パターンを用いた細胞の状態検出を行った。

グアニン結晶板、尿酸結晶等の微結晶の磁氣回転運動解析手法の改良を進め、結晶高速回転の解析を行い、微結晶のパルス磁場応答を計測した。また、グアニンの結晶板(人工結晶および天然結晶)の磁氣光学特性のうち、結晶板の磁場配向による光反射変調と、複数枚のグアニン結晶板交叉による光干渉モアレ縞を活用し、反射グアニン結晶板を用いる分子結合センシング法を検討した。

4. 研究成果

(1) 生体由来マイクロミラーの磁気回転特性比較分類

様々な生体組織から得られる微結晶の磁気回転特性の比較分類を進めた。生物由来マイクロミラーのドナーとして、海洋性の魚類やイカ、両生類および動物プランクトンの収集を行うため、海洋調査船等のフィールドワークでのサンプリングを実施し、さまざまな生物由来マイクロミラーの光反射特性および磁気応答の解析を進めた。水中で微結晶がブラウン運動する条件を適度に調整することで、磁気回転運動が起こりやすい無拘束条件を設定し、微結晶による光反射を 300mT ~ 500mT 磁場で繰り返し変化させることに成功した。導入した高速度カメラを顕微鏡に接続し、微結晶回転速度を結晶の配向による形状変化を追跡・解析した。磁場オン・オフを繰り返した際の、結晶板表面での光反射挙動をミリ秒の時間分解能で検出するシステムを構築した。グアニン結晶の反射光変化に与える物理化学的要因の解明のため、非常に強い銀色光沢を有する深海魚ムネエソの体表でのグアニン結晶の光反射磁気応答を調べた(図1、図2)。そのグアニン結晶集団周囲の溶媒の粘性や結晶間相互作用を考慮しつつ、結晶集団の周期構造変化による反射光の強度変化が磁気制御できることを明らかにした。また、コウイカの虹色の構造色を呈する部分に含まれるリフレクチンタンパクを分離し、その光反射の磁気応答が 500mT 磁場で制御可能であることを示した(図3)。

(2) 磁気力ピンセットによるグアニン結晶板の磁気マニピュレーション

さらに、磁気力ピンセットによるグアニン結晶板の磁気マニピュレーション法開発に関し、その基礎手法開発を進めた。動物プランクトンサフィリナの甲羅組織破片を分離し、グアニン結晶板集団が付着した状態の甲羅破片の磁気マニピュレーションに成功した(図4)。また、新規な磁気力ピンセットのプロトタイプとして、液相の磁化率差と磁場勾配の積に起因した磁気力によるグアニン結晶板マニピュレーションを試みた。

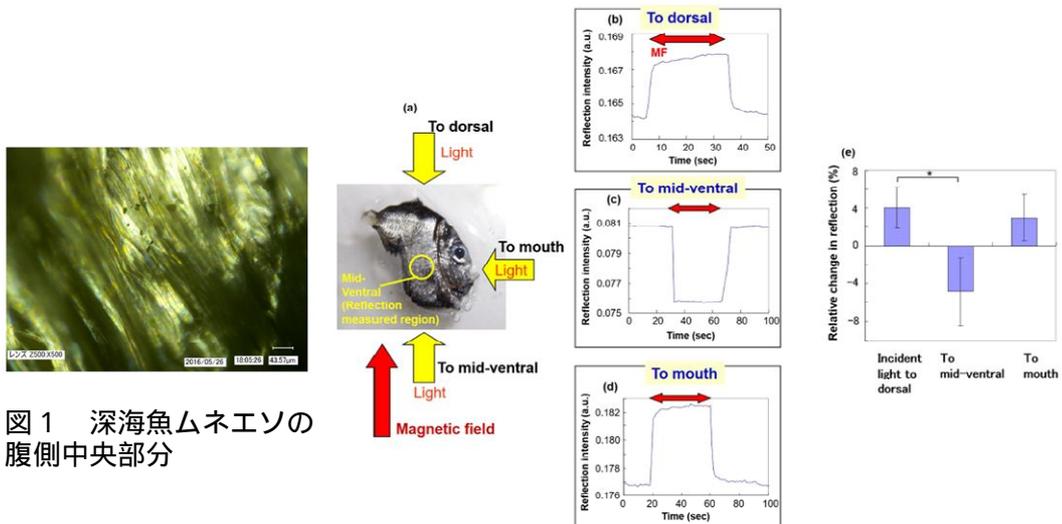


図1 深海魚ムネエソの腹側中央部分

図2 深海魚ムネエソの体表でのグアニン結晶の光反射磁気応答

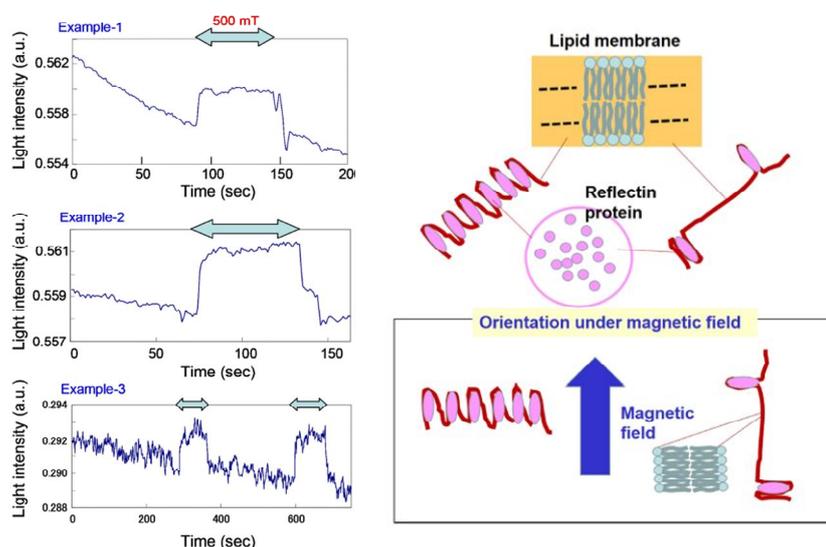


図3 コウイカのリフレクチンタンパク / 脂質膜複合体の光反射磁気応答と、その磁場配向メカニズム

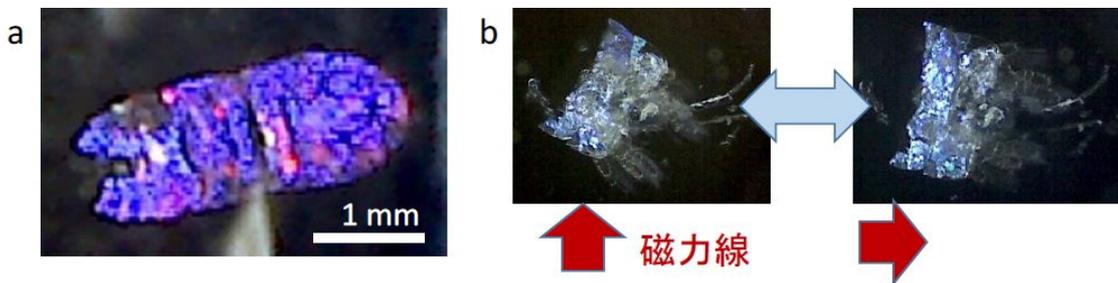


図4 磁気力ピンセットによるグアニン結晶板の磁気マニピュレーションの例 a) 動物プランクトンの一種、サフィリナ。b) サフィリナのグアニン結晶板での光反射を可逆的に磁気制御した例

(3) バイオセンシング技術応用への基礎検討(マイクロ流体可視化)

ドラッグデリバリー等でのマイクロミラー応用の可能性のひとつとして、流れ系での流速可視化性能向上のためのグアニン微結晶特性を調べた。マイクロ流路内でのグアニン結晶の流れ特性と光反射の磁気制御能率との関係を明らかにした(図5)。幅数百マイクロ程度程度の流路では、この微結晶が流れている状態で十分な磁場配向と光反射のON/OFFが可能であることを実験的に示した。

グアニン結晶の光干渉型バイオセンシングの基礎手法をさらに発展させるため、天然グアニン結晶の安定性に関する検討を行った。魚類由来のグアニン結晶の表面にはベシクル等の生体分子が残存していたため、エタノール沈殿を用い、天然グアニン結晶の溶解特性、および水中でのグアニン結晶の分解速度を調べた。また、流体回路内でグアニン結晶を長期間使用する場合の耐久性の情報を得た。脂質分子やコラーゲン、ヘモグロビン等の生体分子がグアニン結晶に付着・凝集している状態での反磁性磁気回転速度を解析し、水中浮遊状態でのグアニン結晶のミラー回転性能を明らかにした。

(4) マイクロミラー微結晶のパルス磁場応答

グアニン結晶板の磁気回転運動の過渡過程を観察するため、パルス磁場発生装置の仕様検討・開発・導入を磁石開発メカとともにに行った。その仕様検討では、2つのソレノイドコイルの空芯およびコイル間ギャップの磁場発生空間での、顕微観察および分光計測が可能であるような仕組みを開発した。2つの空芯コイルの中心部にて最大4テスラの磁場を10~25ミリ秒程度発生させ、グアニン結晶をはじめ、尿酸結晶他、さまざまな生体由来マイクロミラー材料の磁場印加過程における光反射挙動と光干渉パターン・モアレ縞の発生挙動の研究を進めた。

観察方向を磁力線と平行にした場合、20ミリ秒間の最大2.5テスラのパルス磁場印加によるグアニン結晶板(金魚由来)の反磁性磁気回転がみられ(図6)磁場オフ後の緩和過程が明瞭に観察された。また、新たにタンパク質繊維型のマイクロミラーとして、マイクロチューブス(微小管)のアレイでの光干渉および構造色の発現に対するパルス磁場印加の効果も調べた。カプトクラゲの板部分に並ぶ幅40ナノメートルの微小管アレイに暗視野照明光をあて、光干渉強度の変化をパルス磁場中での分光強度計測にて解析した。グアニン結晶板の場合とは異なり、パルス磁場の誘導電場に伴う微小管アレイの回転運動に関連すると推察できる光強度変化が得られた。開発導入したパルス磁場発生装置によるマイクロミラー回転制御試験を行いその性能確認を遂行した。

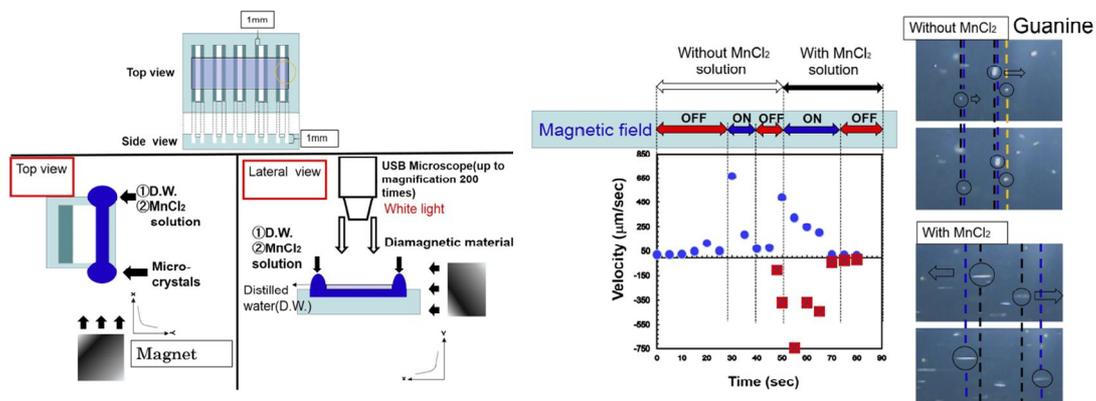


図5 マイクロ流路内でのグアニン結晶の流れ特性と光反射の磁気制御

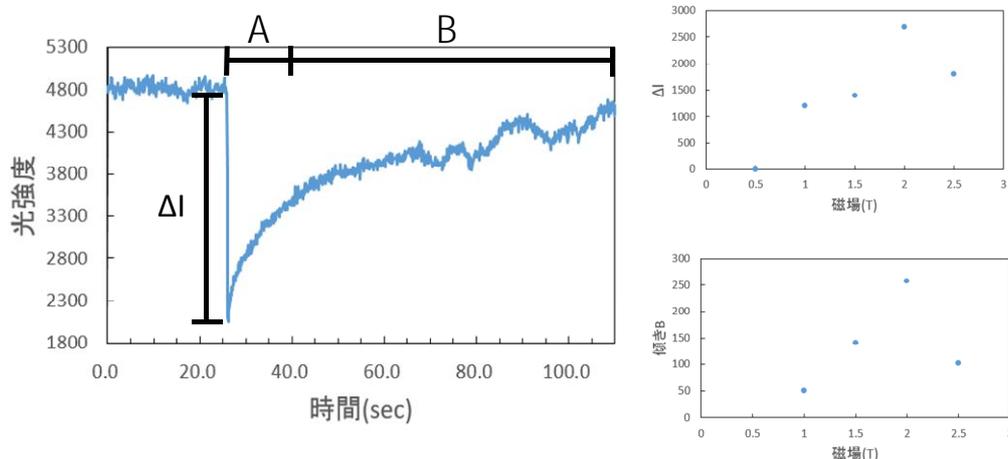


図6 パルス磁場印加の際のグアニン結晶板（金魚由来）の反磁性磁気回転による光反射強度変化（右側パネルは、その強度変化および緩和過程での変化率を示す）。

(5) 光干渉パターンを用いた細胞・生体高分子の状態検出

魚類ウロコから精製したグアニン結晶板の交差角を磁場配向で調整しつつ、光干渉を結晶板表面で制御する技術を検討した。モアレ干渉縞を利用したターゲット細胞・分子検出法の基礎原理を開拓した。その際、マイクロ・ナノスケールのモアレ干渉縞をグアニン結晶2枚の交差法で生成させ、ターゲット分子（DNA、タンパク質、脂質、核酸塩基等）近傍の屈折率分布に依存した光干渉パターンを得た。また、グアニン結晶のモアレ干渉縞作成法と磁気制御手法を顕微観察システムに実装し、グアニン結晶板ペア（重ねた結晶板）の反射・透過光スペクトルをもとに、培養細胞とディテクター用グアニン結晶板の光干渉による細胞内外の生体高分子の濃度・構造に関する情報を光干渉パターン（および色調分布）で検出することに成功した。培養骨芽細胞の細胞外マトリックスとしてのコラーゲン繊維の分布に依存したグアニン結晶との光干渉縞の出現を観察し、その干渉パターンを外部磁場で変化させることを可能とした。この光干渉パターンは動的に変化したため、細胞内外での生体高分子のメカニカルな挙動をダイナミックにとらえる手法として有望であると考えられる。今後、生化学的な刺激反応にともなう細胞成分の変化による屈折率分布変化を、グアニン結晶板によるモアレ干渉で検出する技術も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

- Y. Fukagawa, M. Iwasaka, Effects of pulsed magnetic fields on cilia of comb jelly, 査読有, *AIP Advances*, Advances 9 (3), 035240, 2019 DOI: 10.1063/1.5079635
- H. Kashiwagi, M. Iwasaka, H. Asada, T. Koyanagi, K. Kishimoto, Magnetically Controlled Light Manipulating Properties of Biogenic and Synthetic Guanine Crystals, 査読有, *2018 IEEE International Magnetic Conference (INTERMAG)*, IEEE Xplore, 25 October 2018 DOI: 10.1109/INTMAG.2018.8508139
- H. Kashiwagi, H. Asada, M. Iwasaka, Optical Behavior of Guanine Microcrystals from Aquatic Species upon Exposure to a Magnetic Field, 査読有, *2018 IEEE International Magnetic Conference (INTERMAG)*, IEEE Xplore, 25 October 2018 DOI: 10.1109/INTMAG.2018.8508337
- 岩坂正和, 生体関連の磁場効果研究の現状, 査読無, *電気学会マグネティックス研究会資料*, MAC-18-031, 1-4, 2018
- Y. Takanezawa, H. Kashiwagi, M. Iwasaka, Remote sensing of microfluidic tracers by light scattering from microcrystals under magnetic fields, 査読有, *AIP Advances*, 7, 056732, 2017 DOI:10.1063/1.4978406
- H. Kashiwagi, Y. Mizukawa, M. Iwasaka, S. Ohtsuka, Magnetic light cloaking control in the marine planktonic copepod *Sapphirina*, 査読有, *AIP Advances*, 7, 056426, 2017, DOI:10.1063/1.4976958
- H. Kashiwagi, A. Kashiwagi, M. Iwasaka, Effect of magnetic fields on green color formation in frog skin, 査読有, *AIP Advances*, 7, 056426, 2017, DOI: 10.1063/1.4976958
- M. Iwasaka, K. Tagawa, Y. Kikuchi, Magnetically tunable control of light reflection in an unusual optical protein of squid, 査読有, *AIP Advances*, 7, 056722, 2017, DOI: 10.1063/1.4976938
- M. Iwasaka, S. Ohtsuka, Modulation of light localization in the iridophores of the

deep-sea highlight hatchetfish *Sternoptyx pseudobscura* under magnetic field, 査読有, *AIP Advances*, 7, 056710, 2017, DOI: 10.1063/1.4974977

〔学会発表〕(計19件)

M. Iwasaka, Y. Takeuchi, H. Asada, Uric acid crystals control firefly bioluminescence under magnetic fields, 2019 Joint MMM-Intermag Conference, Washington DC, USA, 2019.1.17

岩坂正和、廣田憲之、浅田裕法、13 テスラ水平磁場による磁場配向乾燥グアニン薄膜の作製、日本磁気科学会年会、仙台、2018.11.10

深川雄太、岩坂正和、クラゲ構成成分の光散乱挙動に対する最大4テスラのパルス磁場効果の観測、日本磁気科学会年会、仙台、2018.11.10

林正晃、濱村恭平、岩坂正和、クシクラゲ櫛板の構造色に対する磁場効果の細胞計測応用の可能性、日本磁気科学会年会、仙台、2018.11.10

濱村恭平、林正晃、岩坂正和、クシクラゲ櫛板とグアニン結晶の光干渉効果の磁気制御、日本磁気科学会年会、仙台、2018.11.10

木村恒久、木村史子、寺野真維、岩坂正和、磁場・電場によるキラル認識、日本磁気科学会年会、仙台、2018.11.11

Y. Fukagawa, M. Iwasaka, Light intensity change of comb jelly fish by pulsed magnetic fields, The 3rd International Symposium on Biomedical Engineering, Hiroshima, 2018.11.8

M. Hayashi, M. Iwasaka, Observation of cellular conformation changes in osteoblast under strong magnetic fields, The 3rd International Symposium on Biomedical Engineering, Hiroshima, 2018.11.8

K. Hamamura, M. Iwasaka, Analysis of guanine crystal particle stream by using high resolution microscope, The 3rd International Symposium on Biomedical Engineering, Hiroshima, 2018.11.8

A. Mootha, K. Suzuki, M. Iwasaka, Magnetic Behaviour of Giant Vesicle Containing Guanine Particles as A Model of Irridophore, Material Analysis and Processing in Magnetic Fields (MAP8), Grenoble, France, 2018.6.27

M. Iwasaka, N. Hirota, Effects of Magnetic Fields on Cilia of Comb Jelly, Material Analysis and Processing in Magnetic Fields (MAP8), Grenoble, France, 2018.6.27

M. Iwasaka, Magnetic Light Control of Biologically Designed Photonic Materials, Material Analysis and Processing in Magnetic Fields (MAP8), Grenoble, France, 2018.6.27

ムタ アルチャナ、鈴木健太郎、岩坂正和、生体反射板型生細胞イメージング法のためのグアニン-ベシクル複合粒子、生体磁気学会大会、広島、2018.6.15

岩坂正和、生体磁気工学の最近の動向(シンポジウムおよびパネルディスカッション) 生体磁気学会大会、広島、2018.6.15

岩坂正和、生物磁気研究の磁気科学化加速のメリットとデメリット、第65回応用物理学会春季学術講演会、早稲田、東京、2018.3.19

武内裕香、浜崎亜富、岩坂正和、松田瑞史、疾患を伴う尿酸ナトリウム結晶の配向挙動および偏光特性、日本磁気科学会年会、京都、2017.11.15

武内裕香、岩坂正和、松田瑞史、生体内微結晶の磁気特性と医工学への応用展開、電気学会A部門大会、室蘭、19-F-a1-7、2017.9.19

水川友里、岩坂正和、ユーグレナの磁気ストレス応答に対する近赤外分光検出による細胞代謝活性評価法、電気学会A部門大会、室蘭、19-F-a1-6、2017.9.19

岩坂正和、生体分子の磁気応答高感度検出のための一手法、日本農芸化学会2017年度大会シンポジウム 4SY01 美・生物の構造と機能を支える酵素と生体分子 京都、2017.3.20

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名：岩坂 正和

ローマ字氏名：IWASAKA, MASAKAZU

所属研究機関名：広島大学

部局名：ナノデバイス・バイオ融合科学研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：90243922

(2) 研究分担者 なし