

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01760

研究課題名(和文) 磁性ナノ粒子 - 生体分子間相互作用による磁気緩和の変調と高感度バイオセンシング

研究課題名(英文) Magnetic biosensing based on modulation of magnetic relaxation induced by interaction between magnetic nanoparticles and biomolecules

研究代表者

北本 仁孝 (Kitamoto, Yoshitaka)

東京工業大学・物質理工学院・教授

研究者番号：10272676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：体液や生体組織のような流動性のある環境中での磁性ナノ粒子 - 生体分子間相互作用がナノ粒子の磁気緩和に及ぼす影響を明らかにし、その変調を磁気的に検出する手法に基づくリキッドバイオセンシングの原理を確立するための研究を行った。磁性ナノ粒子ラベルと標的となる生体分子との相互作用を効率的、かつ特異的に検出するには塩濃度等の溶液環境の調整が重要であること、ラベルと生体分子との相互作用が不均一で周波数スペクトルの変調が微小であっても、磁性ナノ粒子 - 生体分子クラスター分布解析に機械学習を導入することでより高い精度で濃度推定ができる、つまり高感度な検出ができることを示唆する成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リキッドバイオセンサーなど生体にかかわる診断のためのセンシング技術として、磁性ナノ粒子をラベルとする磁気センシング技術に寄与する研究である。学術的には生体環境に近い溶液中で、生体分子とラベルとなる磁性ナノ粒子の相互作用、特に磁気緩和現象がどのように変調されるかを明らかにすることに意義があり、実用的な観点からは高感度なバイオセンシングに供するために、磁性ナノ粒子ラベルをどのように設計するだけでなく、それらが相互作用した結果を適切な診断に供するのに必要な溶液環境をも明らかにするという意義を有している。より高感度なセンシング技術の開拓により、高度な診断技術につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study has been conducted to clarify the effect of the interaction between magnetic nanoparticle and biomolecules in fluid environments such as body fluids and biological tissues on the magnetic relaxation of nanoparticles, and to establish the principle of liquid biosensing based on a method to magnetically detect the modulation of the relaxation. The results suggested that adjusting the solution environment, such as salt concentration, is important for efficient and specific detection of the interaction between magnetic nanoparticle labels and target biomolecules. In addition, even if the interaction between the labels and biomolecules is nonuniform and the modulation of the frequency spectrum is small, the concentration of a biomolecule can be estimated with higher accuracy by introducing machine learning into magnetic nanoparticle-biomolecule cluster distribution analysis, leading to the capability of highly sensitive detection.

研究分野：磁気工学

キーワード：磁気バイオセンシング 磁性ナノ粒子 磁気緩和 分子間相互作用 緩和時間分布解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

磁性ナノ粒子をセンシングやイメージングのラベルとして活用する技術においては、検出のために磁性ナノ粒子の静的な磁化や磁気緩和現象(磁場を印加した直後から磁化状態が平衡に至るまでの過程で観測される動的な現象)で見られる動的な磁化(磁気ダイナミクス)を磁気センサーで検出している。ここでは、磁性ナノ粒子は液体やゲルとみなされる流動性媒体の中に存在し、磁性ナノ粒子は印加した磁場によって物理的な運動が可能な状態にある。本研究では、交流磁場下での磁性ナノ粒子の磁気ダイナミクスである磁気緩和現象、中でもブラウン緩和現象に着目した。磁性ナノ粒子の流体力学的な振舞がその存在する環境の物理化学的状态によって変化するためである。これにより、磁性ナノ粒子の存在する環境に共存する分子やイオンなどの化学・生化学物質やその状態の計測が可能になり、磁性ナノ粒子の有無、量、場所に関する情報を調べているのに加え、粒子がどのような状態で存在しているのか、つまりどのような化学的・生化学的環境下に存在しているのかも調べることができる。これにより、より高度な生体情報をもとに健康や疾患の状態を検査・診断することができるようになる。

磁性ナノ粒子の流体力学的振舞は流体力学的体積と溶媒の粘度に依存するが、*in vivo*、*in vitro*を問わず生体環境では生体分子(核酸、タンパク質、脂質、糖質、細胞外小胞、生理活性小分子)が存在する電解質溶液に、磁性ナノ粒子を検査のために混合させた状態である。この式の中では溶媒の粘度は磁性ナノ粒子の運動に対する拘束力を反映していると言えるので、ミクロな視点では溶液中に存在する磁性ナノ粒子周囲の生体分子、さらには水和した水分子と磁性ナノ粒子を修飾する有機分子との間の相互作用の結果として決まるパラメータである。つまり、粘度は共存する生体分子の振舞を反映したパラメータである。そのため、生体分子が存在する環境で、磁性ナノ粒子 - 生体分子(水和水分子)間の相互作用に起因するミクロな視点の粘度によって磁性ナノ粒子のブラウン緩和現象がどのように影響を受けるかをあきらかにすることが高感度な生体分子センシングを実現する上で不可欠である。

2. 研究の目的

体液や生体組織のような流動性媒体中での磁性ナノ粒子 - 生体分子間相互作用が磁気緩和現象に及ぼす影響により変調された磁性ナノ粒子の磁気緩和現象の交流磁化計測をもとに、生体分子を高感度に検出するバイオセンシングの原理を確立することを目的とする。また、その手法に最適なセンシングラベル(標識)の設計指針を明らかにすることを目的とする。また、従来のマクロな視点よりも、生体分子やその存在する環境というミクロな視点に立った技術開発に資する知見を得ることである。

磁性ナノ粒子 - 生体分子間相互作用の本質を理解し磁気緩和現象に及ぼす影響に関する知見を得て、その知見をもとに磁気緩和の変調信号を増強する磁気センシングラベルや反応条件を最適化設計するとともに、交流磁場下での磁気緩和特性とその変調に対応した交流磁化(磁気緩和)信号の信号処理と統計的なデータ解析を行う技術を確立する。

3. 研究の方法

合成した酸化鉄磁性ナノ粒子をタンパク質等の生体分子と相互作用するプローブ分子で表面修飾し、標的となる生体分子と溶液中で混合して、交流磁化測定を行い、その周波数スペクトルを得るとというのが基本的な研究の進め方である。磁性ナノ粒子の表面修飾方法と検出対象となる生体分子によってプローブ分子の修飾条件が異なる。また磁性ナノ粒子ラベルと生体分子との相互作用を調べるのに適した反応溶液条件を探索するために塩濃度を変える実験も行った。

まず、ストレプトアビジンとビオチンの相互作用を磁氣的に検出する実験を例にとって基本的な手順を示す。テトラエチレングリコールに鉄アセチルアセトナトを溶解した反応溶液を耐圧容器に入れ、250 で 15 時間反応させて酸化鉄ナノ粒子を合成した。合成した酸化鉄ナノ粒子の一次平均粒径は約 20 nm であった。その酸化鉄ナノ粒子をクエン酸で表面修飾した。作製したクエン酸修飾酸化鉄ナノ粒子を N-Hydroxysuccinimide と 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide Hydrochloride で活性化エステルとした後、Amino-PEG2-Biotin を反応させてビオチンを粒子表面に結合させ、エタノールアミンでクエンチすることでビオチン修飾酸化鉄ナノ粒子を作製した。ストレプトアビジン (SA) との相互作用を検出する実験ではビオチン修飾酸化鉄ナノ粒子懸濁液に SA 水溶液を添加した後、静置した。この混合溶液の交流磁化測定を周波数 10 ~ 10,000 Hz の範囲で 10 Oe の磁場を印加して室温で行った。この周波数スペクトルを機械学習を用いた手法でデータ分析を行い、磁性ナノ粒子 - 生体分子の相互作用により生成するクラスタの解析を行った。

磁性ナノ粒子と生体分子との相互作用が起こる最適溶液条件を探索するためには水ではなく塩を含む電解質溶液とする必要があった。そこで、塩濃度を上げると沈殿しやすいクエン酸修飾粒子の上にさらにポリアクリル酸 (PAA) ポリマーで被覆し、立体障害による分散性向上を図った。

生体分子として、SA だけではなく糖鎖も用いたが、そのためには糖鎖と相互作用するレクチンというタンパク質で磁性ナノ粒子表面を修飾して、レクチンをプローブとして糖鎖と相互作用した結果を交流磁化測定により検出する実験を行った。

4. 研究成果

4-1. ストレプトアビジン - ビオチン相互作用の磁氣的解析とその機械学習によるデータ分析

図 1 に SA を混合したビオチン修飾酸化鉄ナノ粒子分散液の交流磁化虚数部の周波数スペクトルを示す。SA 濃度の増加とともにスペクトルのピークとなる周波数 (緩和周波数) が低周波数側にシフトしていることがわかる。ストレプトアビジンはビオチンを 4 つ結合するサイトを有していることからストレプトアビジンがクロスリンカーとしてビオチン修飾磁性ナノ粒子を結合させたクラスタを形成するのに寄与していると考えられ、この緩和周波数は液中での磁性ナノ粒子の物理的な回転・振動における流体力学的体積を反映している。つまり、分散液中の SA 濃度の増加とともに流体力学的体積が増加していると考えられる。また、図 1 (a)、(b) の比較から、磁性ナノ粒子濃度が低いほうが周波数スペクトルの変化、特 SA 濃度の増加に伴う緩和周波数の減少が顕著であることがわかる。これはビオチン修飾磁性粒子と相互作用するストレプト

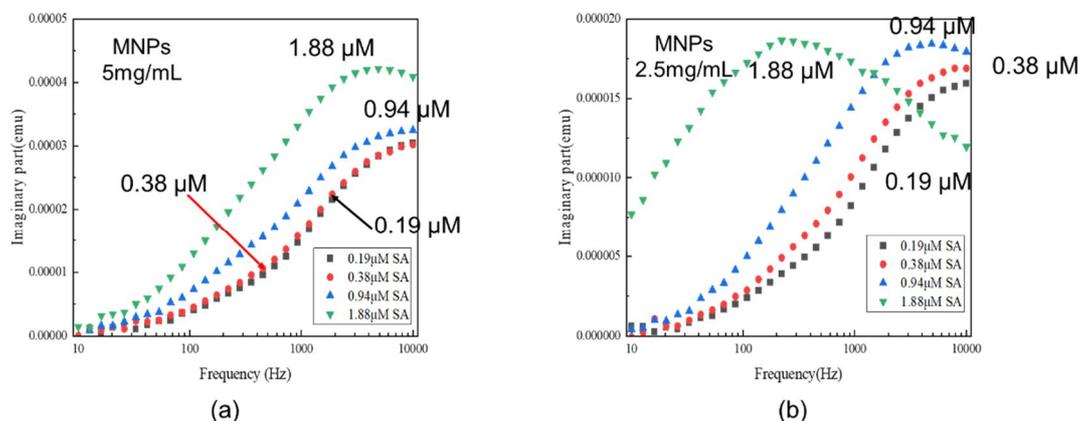


図1 交流磁化虚数部の周波数特性のSA濃度依存性。(a)磁性ナノ粒子濃度：5 mg/mL、(b)同：2.5 mg/mL。

アビジンのモル比に対する依存性を反映しており、より多くの磁性ナノ粒子ラベルがストレプトアビジンとの相互作用に与するほうがスペクトルの変化を大きくすることにつながる。

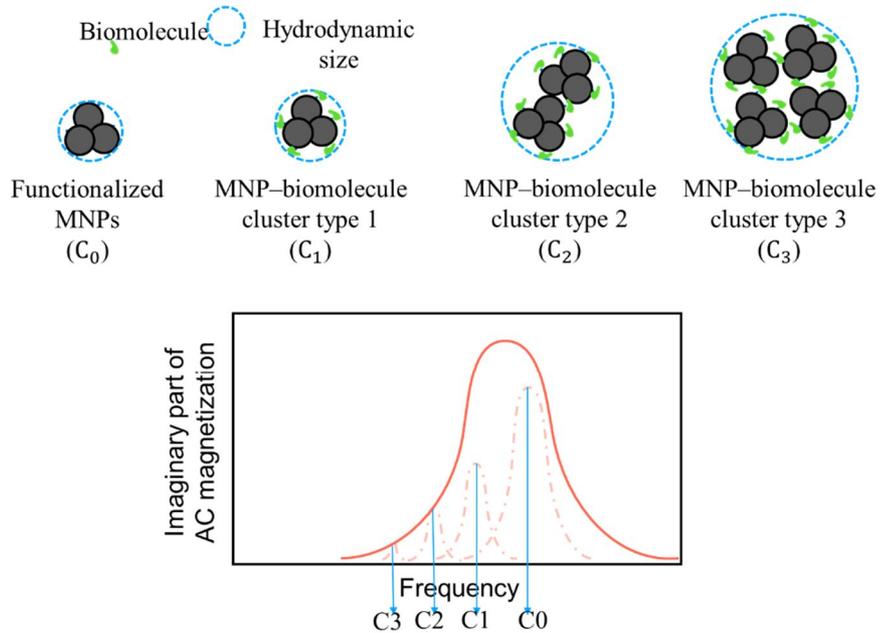


図2 磁性ナノ粒子-生体分子クラスタモデルとクラスタ分布解析に基づく周波数スペクトル解析の概念図

しかし、磁性ナノ粒子ラベ

ルと標的となる生体分子との相互作用は不均一なものであり、そのモル比はバランスのとれたものではないことがほとんどである。そこで、周波数スペクトルの変化をもたらす磁性ナノ粒子-生体分子（ここではSA）クラスタがどのように形成されるかを、機械学習を用いたクラスタ分布解析より評価した。図2に示すようなSA分子をクロスリンカーとして形成された1個から数個の磁性ナノ粒子クラスタを想定して、機械学習するためのスペクトルモデルを実験データに基づいて作成した。従来、デバイ緩和モデルに基

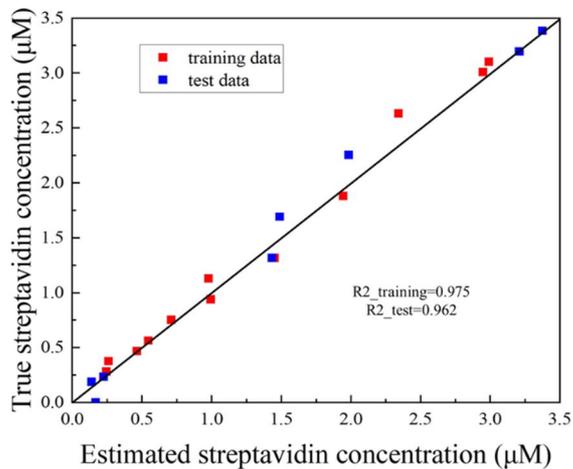


図3 クラスタ分布解析に基づいて推定されたSA濃度と実濃度との相関図

づくクラスタ分布解析は報告されているが、より精密な分布解析を行うのは困難であり、それに基づくSA濃度推定の精度にも課題があったが、本研究ではより低い濃度から正確なSA濃度推定が可能であることを示唆する結果を得た。図3にはそのクラスタ分布解析結果から求めたSA濃度推定の結果を実際の濃度との相関として示す。高い相関係数が得られていることがわかる。このようにセンシングラベルと標的となる生体分子との相互作用は不均一で周波数スペクトルの変化が小さなものであっても精密なクラスタ分布解析に機械学習を導入することでより高い精度で検出することができる、つまり高感度な検出ができることを示唆した成果を得たと言える。

4-2. 糖鎖-レクチン相互作用解析における反応溶液条件の探索

4-1の実験はすべて純水中での磁性ナノ粒子とSAとの相互作用から得られた結果であるが、DNAのハイブリダイゼーションの効率が塩濃度の増加とともに向上し、1塩基違いの組合せでも塩濃度が増加するとその効率が増加した。つまりセンシングの観点からセンシングラベルと

検出対象との相互作用の強さや効率、加えて特異性や非特異性はその溶液環境、特に塩濃度に依存する。これを踏まえて、塩濃度により相互作用の状況が変化するかどうかをレクチン修飾した磁性ナノ粒子とそれらと相互作用する糖鎖との組合せで磁氣的に検出できるかどうかを調べた結果を示す。ここではイオン強度が増加しても高い分散性を維持することができるようにクエン酸修飾後にポリアクリル酸(PAA)ポリマーでさらに被覆して立体障害により分散性を向上させた。PAA からクエン酸同様にカルボキシ基がでているため、2 で述べたビオチン修飾磁性ナノ粒子の作製と同じプロセスで、PAA 修飾磁性ナノ粒子に糖鎖と相互作用するタンパク質であるレクチンを結合させたレクチン修飾磁性ナノ粒子を作製した。

図4はレクチン修飾磁性ナノ粒子と糖鎖を混合するときの溶液の塩濃度を調整し、交流磁化実数部の周波数スペクトルの変化を調べた結果を示している。塩濃度がPBSの1/2で糖鎖量が10 μ gのときには沈殿のために交流磁化が計測できていないことを示している。塩濃度、及び混合する糖鎖量の増加とともに交流磁化の値が減少しており、相互作用により沈殿が生じていること、加えて磁性ナノ粒子ラベルの液中での交流磁場に対する応答が制限されていることがわかった。また水中では同様な交流磁化の変調が起こらないことが確認されており、糖鎖とレクチンとの相互作用には塩濃度依存性があることを磁氣的に検出した結果であると言える。糖鎖とレクチンとの相互作用には特異性があるが、相互作用しない組合せでも水中同様に交流磁化の変調は起きないことがわかっており、特異性があることも確認されている。このようにセンシングラベルと標的となる生体分子との相互作用を効率的にかつ特異的に検出するには溶液環境が重要であることを見出したことが本研究の成果の一つである。

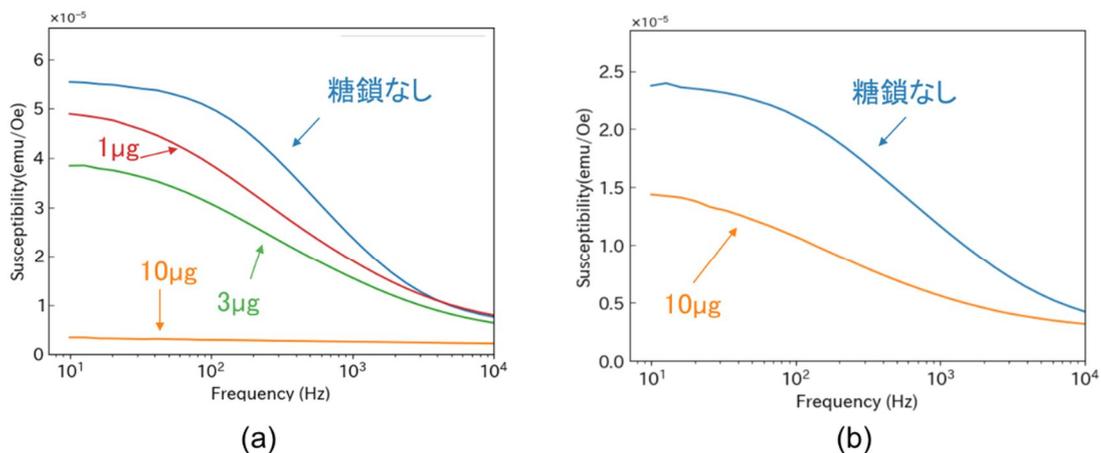


図4 レクチン修飾磁性ナノ粒子と糖鎖との相互作用による交流磁化実数部の周波数スペクトルの変調。(a)塩濃度：PBS濃度の1/2、(b)同：PBS濃度の1/4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chen Ye, Abe Masataka, Tomita Ikuyoshi, Kurashina Yuta, Kitamoto Yoshitaka	4. 巻 565
2. 論文標題 Synthesis and characterization of pH-responsive ferrogels comprising sulfamethazine-based polymer and magnetic nanoparticles for sensing ammonia gas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Magnetism and Magnetic Materials	6. 最初と最後の頁 170201 ~ 170201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmmm.2022.170201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Romdoni Yoga, Kadja Grandprix T.M., Kitamoto Yoshitaka, Khalil Munawar	4. 巻 610
2. 論文標題 Synthesis of multifunctional Fe3O4@SiO2-Ag nanocomposite for antibacterial and anticancer drug delivery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Surface Science	6. 最初と最後の頁 155610 ~ 155610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.apsusc.2022.155610	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tan Zheng Lin, Miyanaga Kazuhiko, Kitamoto Yoshitaka, Yamamoto Naoyuki	4. 巻 622
2. 論文標題 Levilactobacillus brevis surface layer protein B promotes liposome targeting to antigen-presenting cells in Peyer's patches	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 121896 ~ 121896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpharm.2022.121896	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Munawar Khalil, Ely Arina Haq, Astari Dwiranti, Eka Sunarwidhi Prasedya and Yoshitaka Kitamoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Bifunctional folic-conjugated aspartic-modified Fe3O4 nanocarriers for efficient targeted anticancer drug delivery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 4961-4971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1RA08776B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Xinyue Chen, Shun Iwatani, Yoshitaka Kitamoto, Hiroji Chibana and Susumu Kajiwara	4. 巻 9
2. 論文標題 The Lack of SNARE Protein Homolog Syn8 Influences Biofilm Formation of <i>Candida glabrata</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 607188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.607188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rondoni Yoga, Prasedya Eka Sunarwidhi, Kadja Grandprix T.M., Kitamoto Yoshitaka, Khalil Munawar	4. 巻 1868
2. 論文標題 Efficient delivery of anticancer drugs using functionalized-Ag-decorated Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ nanocarrier with folic acid and β -cyclodextrin	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 130643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2024.130643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hassan Syed Mujtaba ul, Anis Tanzeela, Kitamoto Yoshitaka	4. 巻 112676
2. 論文標題 Magenta-fluorescent uniform sub-micron up-conversion capsules for potential simultaneous MRI/PL imaging and drug delivery capabilities	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Inorganic Chemistry Communications	6. 最初と最後の頁 112676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.inoche.2024.112676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 Ye Chen, Konstantinos Slavakis, Yoshitaka Kitamoto
2. 発表標題 A Machine Learning Based Analysis Method of AC Magnetization Spectra of Magnetic Nanoparticles and Its Application to Magnetic Biosensing
3. 学会等名 International Conference on Fine Particle Magnetism (ICFPM2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wibias Muliawan, Yoshitaka Kitamoto
2. 発表標題 Dynamic Magnetization Response of Magnetic Nanoparticles in Ionic Solutions
3. 学会等名 International Conference on Fine Particle Magnetism (ICFPM2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shaomeng Yang, Yoshitaka Kitamoto
2. 発表標題 Analyses and Modulation of Magnetic Relaxation Behaviour of Nanoparticles Under Diverse Interactions During Biosensing
3. 学会等名 International Conference on Fine Particle Magnetism (ICFPM2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Runze Huang, Yoshitaka Kitamoto
2. 発表標題 Composition and Its Effects on Efficiency of Magnetic Temperature Responsive Catalytic Core- Shell Nanocomposites as Phase Transfer Catalyst
3. 学会等名 International Conference on Fine Particle Magnetism (ICFPM2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北本仁孝
2. 発表標題 磁性ナノ粒子及び集積体によるバイオメディカル応用のための材料・デバイス開発に関する研究
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会2022年春季大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Bi Qi, Chen Ye, 北本仁孝
2. 発表標題 pH応答性磁性ゲル中の磁性ナノ粒子の交流磁化特性に及ぼす網目構造の影響
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会2022年秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ye Chen, Masataka Abe, Yuta Kurashina, Yoshitaka Kitamoto
2. 発表標題 Study on ferrogel composed of pH-responsive hydrogel and iron oxide nanoparticles for biogas sensing
3. 学会等名 INTERFINISH2020 20th World Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 R. Huang, Y. Kurashina, Y. Kitamoto
2. 発表標題 Temperature Responsive Core-Shell Nanocomposites Consisting of Iron-oxide Nanoparticles and Catalytic Co-polymer as Phase Transfer Catalyst
3. 学会等名 INTERFINISH2020 20th World Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Bi Qi, 倉科 佑太, 北本 仁孝
2. 発表標題 温度応答性ポリマー・ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAM)ゲル中の磁性ナノ粒子の交流磁化特性に関する研究
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会2021年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 CHEN YE, 阿部 雅崇, 倉科 佑太, 北本 仁孝
2. 発表標題 pH応答性ポリマー / 酸化鉄ナノ粒子複合ハイドロゲルの作製
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会2021年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wibias Muliawan, Yuta Kurashina, Yoshitaka Kitamoto
2. 発表標題 Electrostatic Influence on Dynamic Magnetization Behaviors of Iron-oxide Nanoparticles in Hydrogels Using Charged Polymers
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会2021年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ye Chen, Kyohei Okubo, Konstantinos Slavakis, Yoshitaka Kitamoto
2. 発表標題 A Machine Learning Based Analysis Method of AC Magnetization Spectra for Estimating Cluster Distribution of Magnetic Nanoparticles
3. 学会等名 Intermag 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wibias Muliawan, Ye Chen, Kyohei Okubo, Yoshitaka Kitamoto
2. 発表標題 Magnetization Dynamics of Interacting Iron Oxide Nanoparticles (IONPs) in Ionic Solutions
3. 学会等名 Intermag 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 CHEN YE , XU XIN, Slavakis Konstantinos, 北本 仁孝
2. 発表標題 生体分子検出のための磁性ナノ粒子の 交流磁化スペクトル解析
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会2023年度春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋葉 健, 大久保 喬平, 北本 仁孝
2. 発表標題 バイオセンシングのための高い分散安定性を有するタンパク質固定化酸化鉄磁性ナノ粒子の作製
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会2023年度秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北本 仁孝
2. 発表標題 ナノメディシン, バイオセンシングのための磁性ナノ粒子 / 高分子複合体の創製
3. 学会等名 セラミックス協会第36回秋季シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------