

《様式B》

研究テーマ 「磁性ナノ粒子を用いた細胞内粘度のリアルタイム計測技術の開発」

研究責任者 所属機関名 静岡大学

官職又は役職 准教授

氏 名 大多 哲史

メールアドレス ota.s@shizuoka.ac.jp

共同研究者 所属機関名 東京農工大学

官職又は役職 准教授

氏 名 倉科 佑太

(令和4年度募集) 第35回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要(1,000字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願(予定も含む)の有無についてもご記載ください。

細胞内粘度の解析は、細胞の機能や状態観測指標として重要である。例えば、がん細胞内の粘度を蛍光プローブにより計測し、細胞死直前にその上昇を確認した報告がある(Kuminova, *Nature Chemistry*, 2009.)。一般的に、細胞の機能・状態の解析には、細胞培養装置外での顕微鏡観察や細胞を培養シャーレから剥離しての計測が必要とされるため、同一細胞の長時間リアルタイム観測は困難であった。本研究では、磁性ナノ粒子と外部磁場を用いて、培養装置内で生きた細胞内の粘度を経時的に計測可能なシステム開発を目的とする。磁性ナノ粒子の磁場に対する応答は、周囲の溶媒の粘性に依存する。これは磁性ナノ粒子の内部磁化の応答による生じる磁気トルクが粒子自体の物理的回転を促すためであり、細胞内に取り込まれた磁性ナノ粒子の磁化応答を観測することで、細胞内の粘性を定量化できる。

具体的には、酸化鉄のナノ粒子を接着細胞に添加して取り込ませた後に、交流磁場を印加して磁性ナノ粒子由来の磁束密度の変化を観測した。生細胞内部に取り込み可能な磁性ナノ粒子の量には制限があるため、微量の磁性ナノ粒子の内部磁化応答に対応するため、本研究では培養シャーレに接着した細胞を生きたまま計測できることに加えて、微小磁気信号計測を可能な定量システムの構築に取り組んだ。

同一の磁性ナノ粒子について、溶媒の粘性を変化させた試料と、樹脂により固体化した試料について比較計測を実施した。結果として、接着細胞内では固体状態よりも大きく、高粘度な液体状態よりも小さな磁気信号が観測された。接着細胞内部

に取り込まれた磁性ナノ粒子由来の磁気信号の観測に成功した一方で、細胞内部においては、粒子自体の物理的回転のみならず、粒子同士の凝集や細胞内小器官などとの相互作用も考慮した磁化応答解析の必要性という課題も明確化された。

細胞内部に取り込まれた磁性ナノ粒子の状態も考慮した磁化応答解析と微量の磁性ナノ粒子の応答を正確に定量可能な計測システムの構築により、細胞種や細胞の状態に起因した磁化応答を解明し、磁化応答の変化から細胞内部の状態を予測する技術開発を展望している。特許出願について現状では予定していないが、将来的には細胞内磁性ナノ粒子のリアルタイム計測を高確度で実現することで、特許出願に結びつく可能性も考えられる。

2. 実施内容および成果の説明（A 4 で、5 ページ以内）

2-1. 研究背景

細胞内粘度の解析は、細胞の機能や状態観測指標として重要である。例えば、がん細胞内の粘度を蛍光プローブにより計測し、細胞死直前にその上昇を確認した報告がある（Kuminova, *Nature Chemistry*, 2009.）。また、細胞死に近づくほど細胞内粘度が上昇することが報告されている（Jiang, *Sensors and Actuators B*, 2014.）ことから、細胞内粘度は細胞機能・状態の観測指標となることが示唆される。一般的に、細胞の機能・状態の解析には、細胞培養装置外での顕微鏡観察や細胞を培養シャーレから剥離しての計測が必要とされるため、同一細胞の長時間リアルタイム観測は困難であった。本研究では、図 1 に示すように、磁性ナノ粒子を細胞内に取り込ませて、外部磁場を印加することで生じる、磁性ナノ粒子の内部磁化応答を観測することで、細胞内性状を予測可能なシステム開発に取り組んだ。

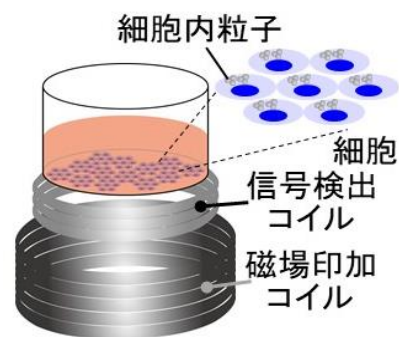


図 1 提案計測手法

磁性ナノ粒子の磁化応答は、粒子径や形状、印加磁場の振幅や周波数、溶媒の粘性などの周囲環境に依存して変化する。印加磁場が内部磁化に対して作用することで生じる磁気トルクにより、粒子自体の物理的回転が生じる（図 2）。このため、特に周囲環境に対する依存性について、液体中など粒子自体の物理的回転が可能な

環境においては、例えば溶媒の粘性などが磁化応答に影響する。

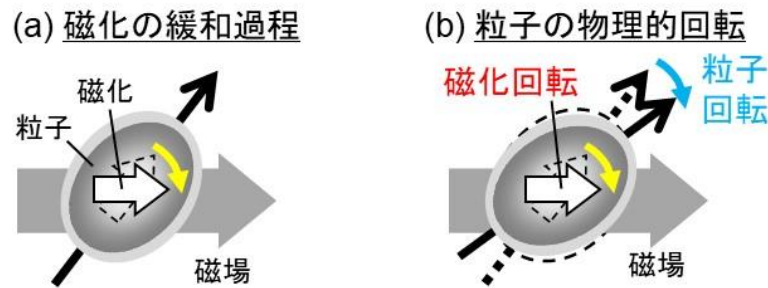


図 2 磁性ナノ粒子の磁化応答

2-2. 実験方法

本研究では、磁性ナノ粒子として、アミノ基で表面修飾された酸化鉄磁性ナノ粒子 Synomag[®]-D (Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, Germany) を用いた。細胞内部に取り込まれた磁性ナノ粒子の磁化応答に対する比較試料として、純水および純水にグリセリンを混合して粘度を調整した溶媒に粒子を分散させた試料（純水の約 3 倍の粘度）と、エポキシ樹脂に粒子を混合して固体化した試料を用意した。固体化することで、粒子自体の物理的回転の生じない状態を再現できる。

接着細胞であるヒト間葉系幹細胞 (MSC : Mesenchymal Stem Cell) に対して、磁性ナノ粒子を添加した際に、粒子を取り込んだ細胞と取り込まない細胞が存在するため、粒子添加の 1 日後に細胞を剥離して、磁性ナノ粒子を取り込んだ細胞 (positive) のみを磁気的に分離した。この positive な細胞のみを再度培養シャーレに接着させることで、磁性ナノ粒子を取り込んだ細胞のみを含んだ計測用の試料を作製した。

図 3(a)には、実際に磁化計測に用いた、磁性ナノ粒子を取り込んだ接着細胞試料の写真を、図 3(b)には、計測に用いた外部磁場印加と磁化検出用のコイルセットの写真を示した。正弦波信号を入力したバイポーラ電源から交流電流を励磁コイルには印加して、計測試料に交流磁場を印加した。計測試料に含まれる磁性ナノ

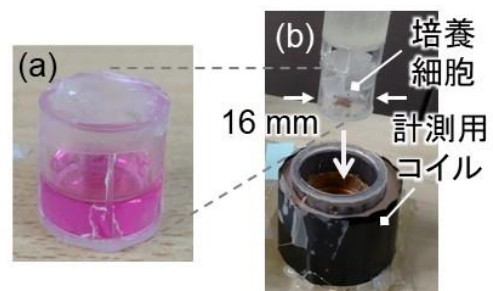


図 3 (a) 接着細胞試料および
(b) 計測用コイルセット

粒子由来の磁束密度の変化を検出コイルで電圧信号として取得して、ノイズカット

フィルタや電圧増幅器を通した後にロックインアンプへと入力して、周波数成分ごとに分けて計測を実施した。

特に磁性ナノ粒子の磁化は、入力された励起磁場に対して非線形的に応答するため、奇数倍の高調波信号が多く含まれるという特徴がある。図4に示すように、空芯状態と磁性ナノ粒子を計測時では、時間変化する電圧信号波形では僅かな振幅の差であり、励起磁化の基本波成分（図4では1 kHz）については、空芯状態と磁性ナノ粒子を挿入した場合で、ほとんど差を観測できないが、奇数倍の高調波信号は顕著な増加を確認できた。

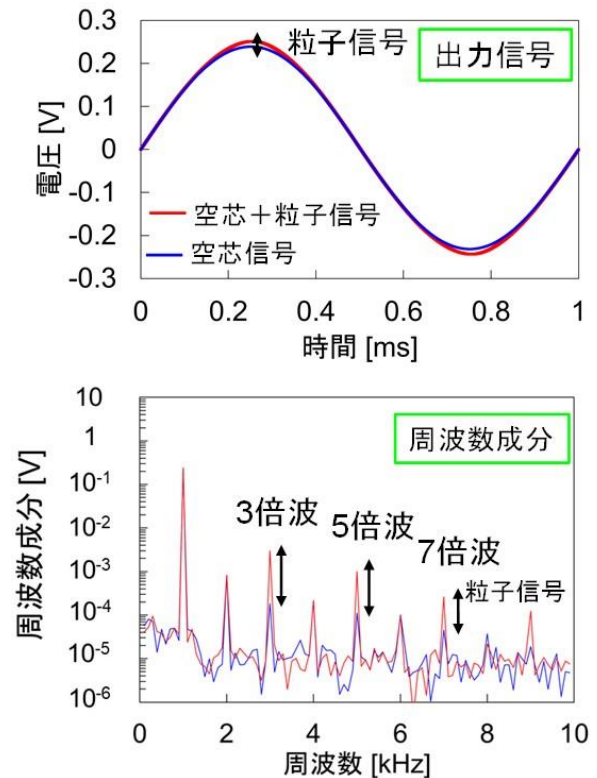


図4 計測信号波形と周波数成分

空芯状態では、印加磁場の磁束密度の変化を観測している。ここで空芯状態の電圧信号量を低減させることで、計測感度の向上につながるため、励磁コイル内部には検出コイルと同等の仕様を有するキャンセルコイルを配置して、2つのコイルからの電圧信号の差動を取ることで、空芯状態の信号低減を図った。

2-3. 研究成果

2-3-1. 磁気分離による効果の確認と接着細胞

内磁性ナノ粒子の定量

図5は、磁性ナノ粒子添加後の接着細胞を剥離して磁気分離を実施するというプロセスを2回繰り返した後の、磁気分離において磁性ナノ粒子を取り込んでいる細胞（positive）と取り込んでいない細胞（negative）を分画した結果である。多くの細胞が positive に分

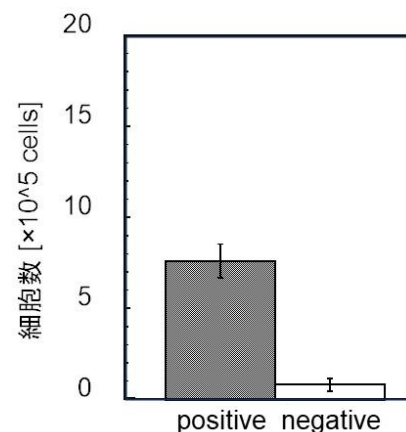


図5 磁気分離による細胞数

画されていることが確認でき、磁化計測時の細胞にはほとんど磁性ナノ粒子が含まれていたことが予想される。

加えて、振動試料型磁力計（Vibrating Sample Magnetometer: VSM）を用いて、接着細胞試料内に含まれる磁性ナノ粒子の質量の見積もりを実施した。細胞に添加した磁性ナノ粒子と同一種類の粒子について、試料内含まれる粒子質量を定量済みの固体状態の試料と、細胞試料について VSM による磁化計測結果から定量された磁化を比較することで、接着細胞試料内においては 380 ns 程度の磁性ナノ粒子が含まれると定量された。本実験において、接着細胞試料に含まれる細胞数は 7.60×10^5 cells であったことから、単位細胞あたりに 0.5 pg 程度の粒子が取り込まれていたと考えられる。

2-3-2. 高調波磁化計測

交流磁化計測において、比較用の非細胞試料について、印加磁場の振幅 11 mT、周波数 0.2–2 kHz の範囲で計測を実施して、主に第三高調波を評価した。純水試料、高粘度試料、固体試料の順に磁化が低下した。これは、純水中では磁性ナノ粒子の物理的回転が生じ、高粘度になることでこの物理的回転が抑制されるためであり、固体状態では粒子回転が極めて生じ難くなるため、磁化が大幅に低減したと考えられる。

接着細胞試料については、周波数 0.7–2 kHz の範囲で計測を実施した。これは検出コイルにより磁化を計測する場合、周波数に電圧信号量が比例するため、高周波になるほど電圧信号の絶対量が増加して、計測確度が向上したためである。接着細胞試料においては、試料に含有される磁性ナノ粒子の量が極めて少ないため、特に低周波における計測は困難であった。

接着細胞試料の第三高調波磁化は、高粘度試料より小さく、固体試料よりは大きいという結果であった。細胞内に取り込まれた磁性ナノ粒子において、粒子回転が高粘度試料よりも抑制されている一方で、固体試料に比べて僅かに生じている可能性が示唆される。これは、細胞内に磁性ナノ粒子が取り込まれると小胞体内に封入されるため、粒子同士の凝集が生じたためと考えられる。

2-4. おわりに

本研究では、細胞内粘度のリアルタイム計測を実施するため、細胞内に取り込ませた磁性ナノ粒子の磁化計測システムの構築に取り組んだ。細胞内に取り込まれる磁性ナノ粒子量は極めて少ないため、計測確度の高い励磁条件の調整、計測回路および励磁・検出コイルの設計が必要であった。接着細胞試料において、磁性ナノ粒子の定量と、比較用の非細胞試料と比べることによる細胞内での磁性ナノ粒子の磁化応答を予測することには成功したが、僅かな細胞の状態変化の観測を実現するため、計測確度のさらなる向上に今後取り組む。

