

磁性ナノ粒子とタンパク質の抗原抗体反応による凝集効果の評価

Evaluation of aggregation effect of magnetic nanoparticles by antigen-antibody reaction with proteins

金子晃基 ^{a)†}, 村山徹 ^{b)}, トンタットロイ ^{a)}, 沖田和彦 ^{c)}, 坂天弥 ^{b)}, 田中深雪 ^{d)}, 田中良和 ^{d)}, 藪上信 ^{a),b),c)}

^{a)} 東北大学大学院工学研究科, 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-05 (〒980-8579)

^{b)} 東北大学大学院医工学研究科, 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-05 (〒980-8579)

^{c)} Tohoku-TMIT, Ltd., 宮城県仙台市宮城野区小田原 2-3-14 (〒983-0803)

^{d)} 東北大学大学院生命科学研究科, 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1 (〒980-8577)

K. Kaneko ^{a)†}, T. Murayama ^{b)}, L. Tonthat ^{a)}, K. Okita ^{c)}, A. Ban ^{b)}, M. Tanaka ^{d)}, Y. Tanaka ^{d)},

S. Yabukami ^{a), b), c)}

^{a)} Graduate School of Engineering, Tohoku Univ., 6-6-05 Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

^{b)} Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku Univ., 6-6-05 Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

^{c)} Tohoku-TMIT, Ltd., 2-3-14 Odawara, Miyagino-ku, Sendai 983-0803, Japan

^{d)} Graduate School of Life Sciences, Tohoku Univ., 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan

We developed a rapid, low-cost protein detection method using magnetic nanoparticles and demonstrated that GDF-15 (Growth Differentiation Factor 15) binding induces nanoparticle aggregation through an antigen-antibody reaction. This aggregation by cross-bridging increased magnetic responsiveness to switch magnetic fields with increasing GDF-15 concentration, although this aggregation was not quantitatively verified. In this study, transmission electron microscopy (TEM) was used to quantitatively assess the role of GDF-15 in promoting the aggregation of magnetic nanoparticles. TEM analysis showed that the GDF-15-bound samples formed approximately 1.5% more aggregates larger than $0.03 \mu\text{m}^2$ compared to controls, confirming the cross-bridge effect was confirmed.

Keywords: magnetic nanoparticles, protein, GDF-15, TEM, image analysis

1. はじめに

ミトコンドリア病 ¹⁾⁻⁵⁾ や転移性癌 ⁶⁾⁻⁸⁾ の診断においてバイオマーカーとして機能するタンパク質の迅速診断のニーズが高まっている。現状の主なタンパク質検出法としては、ウェスタンブロッティング法 ⁹⁾, 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) ¹⁰⁾, 質量分析法 ¹¹⁾ が挙げられる。これらの方法は測定に前処理, 後処理, 洗浄など専門的な操作が必要であり, 装置価格も高価である。タンパク質バイオマーカーの一種である GDF-15 (Growth Differentiation Factor 15) ¹²⁾⁻¹³⁾ はミトコンドリア病患者の血液や尿中に含まれ, ミトコンドリア病早期検知のために用いられる。ミトコンドリア病は, ミトコンドリア DNA または核 DNA の変異が原因でミトコンドリア成分の組み立てやミトコンドリア機能に影響を及ぼす病気であり, 難病に指定されている ¹²⁾。

筆者らは迅速, 簡便, 低コスト, 高精度なタンパク質検出の開発を目的とし, 磁性ナノ粒子を用いたタンパク質検出システムを開発している。磁性ナノ粒子は磁界を用いて遠隔操作が簡便であることから, 過去にも磁性ナノ粒子を用いて抗原抗体反応を評価する様々な研究が行われてきた ¹³⁾⁻²⁴⁾。

筆者らはこれまで, 磁気インピーダンスセンサ (MIセンサ) を用いた口腔内細菌の検出システムを開発した ^{25), 26)}。また, 磁性ナノ粒子, 抗体, 抗原凝集体の磁気特

性を利用して細菌 (*Fusobacterium Nucleatum* 等) を検出することに成功した ^{27), 28)}。その後, 筆者らは複数のサンプルを同時に評価可能な新たな検出システムを開発し, タンパク質 (GDF-15) を検出した ²⁹⁾。

筆者らの先行論文 ²⁹⁾ では, 磁性ナノ粒子に GDF-15 を抗原抗体反応によって結合させ, スイッチ磁界を印加することで, 磁性ナノ粒子を凝集させながら磁気信号を取得した。この際, 磁気信号は GDF-15 が高濃度ほど強くなった。これは, 磁性ナノ粒子とタンパク質間にできたクロスブリッジにより磁性ナノ粒子が連鎖的に結合し, 磁性ナノ粒子間の距離が短くなり, 磁気結合が強化されるためだと考えられる。しかし, 先行論文ではこのことを定量的に示すことは困難であった。

そこで本研究では, 磁性ナノ粒子の凝集がタンパク質によって強まることを定量的に示すために, 磁性ナノ粒子に GDF-15 を結合させ, 透過型電子顕微鏡 (TEM) ^{30), 31)} で観察した。TEM 観察では, 磁性ナノ粒子に GDF-15 を結合したサンプルと未結合のサンプルを比較し, GDF-15 の有無による凝集体の寸法の違いを画像解析によって定量的に比較した。その結果, GDF-15 を結合させたサンプルの方が, より大きな磁性ナノ粒子凝集体を形成した。これは, 磁性ナノ粒子が GDF-15 を介して連鎖的に凝集したためだと考えられることから報告する。

Corresponding author: K. Kaneko

(e-mail: koki.kaneko.s4@dc.tohoku.ac.jp).

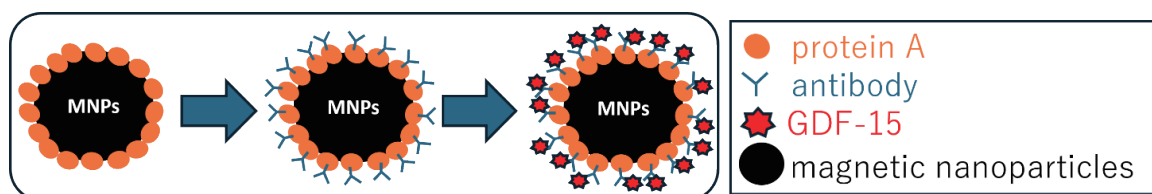


Fig. 1 Sample preparation procedure.

2. 実験方法

2.1 サンプル調製

Fig. 1 は protein A でコーティングされた磁性ナノ粒子に抗体を結合させた後、抗原抗体反応で GDF-15 を結合させる様子を模式的に示したものである。スイッチ磁界に対する磁気応答性評価および透過型電子顕微鏡観察で測定するサンプルを以下の手順で作製した。

最初に、protein A でコーティングされた磁性ナノ粒子 nanomag ® -D (130 nmφ, 10 mg/mL, micromod Partikeltechnologie GmbH) に PBS-T 100 μL を加えて希釈し、超音波洗浄器 (yamato 5510) で 1 分間分散させた。抗体は Anti-Human GDF-15 antibody (0.5 mg/mL) を使用し、磁性ナノ粒子溶液と抗体を混合させ、ロータリーミキサー (AS ONE MTR-103) で 30 分間反応させた。次に遠心分離機 (4 °C, 3000 rpm, 20 min) で磁性ナノ粒子を分離し上清を取り除き、PBS-T 100 μL を加えた後に GDF-15 溶液と等量混合し、再度ロータリーミキサーで 30 分間抗原抗体反応させた。

磁性ナノ粒子への抗体の結合量は BCA キット (Visual Protein 社, Dual-Range™ BCA Protein Assay Kit, BC03-500) により評価した。磁性ナノ粒子 20 μL と抗体 10 μL を PBS-T で 200 μL に希釈し、上記の手順で結合させた溶液 (抗体濃度 25 μg/mL)、および磁性ナノ粒子 20 μL を PBS-T で 200 μL に希釈した溶液を調製した。また、タンパク質 Bovine Serum Albumin Standard を PBS-T で希釈し、タンパク質濃度 0, 5, 25 μg/mL の標準サンプルを調製した。Fig. 2 は、磁性ナノ粒子/抗体混合溶液の上清および磁性ナノ粒子溶液の上清の波長 560 nm における吸光度である。Fig. 2 より、磁性ナノ粒子溶液の上清にも protein A が流出していることがわかる。標準サンプルから算出した較正直線を用いて、磁性ナノ粒子に結合した抗体量を以下の式を用いて求めた。

$$\text{Antibody binding} = 25 \cdot \{(A-B)/0.00437\} [\mu\text{g/mL}] \quad (1)$$

ただし、A は磁性ナノ粒子/抗体混合溶液の上清の吸光度、B は磁性ナノ粒子溶液の上清の吸光度である。上清中の抗体は磁性ナノ粒子とは結合していない分であり、全体量から上清中の抗体量を差し引くことで結合している抗体量を求めた。式(1)より、加えた抗体 10 μL のうち約 14% が磁性ナノ粒子に結合し、磁性ナノ粒子: 抗体 = 1: 39 程度の個数比で結合していることが判明した。この結果から、いずれの実験条件でも抗体は磁性ナノ粒子に対するほぼ飽和量が結合するよう、以下のよ

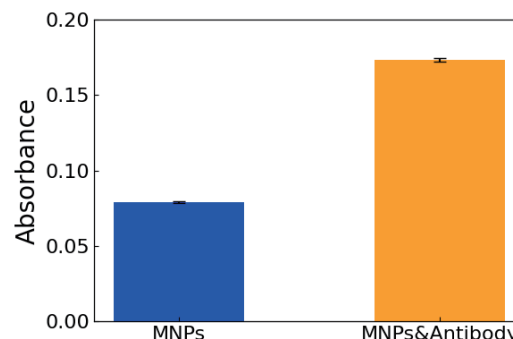


Fig. 2 Average absorbance of supernatant of magnetic nanoparticle solution and supernatant of magnetic nanoparticle/antibody mixture solution (n=3).

うに磁性ナノ粒子および抗体の量を定めた。

スイッチ磁界に対する磁気応答性評価実験では、2つのサンプルを測定した。1 サンプルあたり、磁性ナノ粒子 0.8 μL、抗体 0.4 μL を加え、抗体付着後の磁性ナノ粒子濃度は 80 μg/mL であった。GDF-15 溶液は、PBS-T 中に GDF-15 濃度 0, 1000 ng/mL の 2 サンプルを作製した。

TEM 観察では、2つのサンプルを観察した。1 サンプルあたり、磁性ナノ粒子 0.25 μL、抗体 0.2 μL を加え、抗体付着後の磁性ナノ粒子濃度は 25 μg/mL であった。GDF-15 溶液は、PBS-T 中に GDF-15 濃度 0, 1000 ng/mL の 2 サンプルを作製した。

2.2 スイッチ磁界に対する磁性ナノ粒子の応答性評価

磁性ナノ粒子および抗原凝集体に磁界を印加して凝集させ、磁気応答を検出した。

Fig. 3 は、磁性ナノ粒子と抗原による凝集体にスイッチ磁界^{25), 29)}を印加し、サンプルの漏れ磁界を測定するシステムである²⁹⁾。Fig. 4 は上記の Fig. 3 のシステムのフローチャートである²⁹⁾。サンプルは、表面磁束密度約 300 mT の NdFeB 磁石によって 300 秒間凝集された。続いて凝集した磁性ナノ粒子サンプルを針状 NiFe ヨーク上約 250 mT で 300 秒間磁化した。その後、上方向及び下方向に直流磁界 H_{bc} を 23.5 mT のステップ間隔で、0 mT から 211.5 mT (+0 mT, -0 mT, +23.5 mT, -23.5 mT, +47.0 mT, -47.0 mT, ..., +211.5 mT, -211.5 mT) まで変化させてサンプルに磁場印加した²⁵⁾。各直流磁界 H_{bc} は 30 秒間印加し、印加後にサンプルを MI センサヘッド近傍 53 °/sec の速度で回転させた。回転ごとに MI センサで磁性ナノ粒子サンプルからの漏れ磁界を測定した。

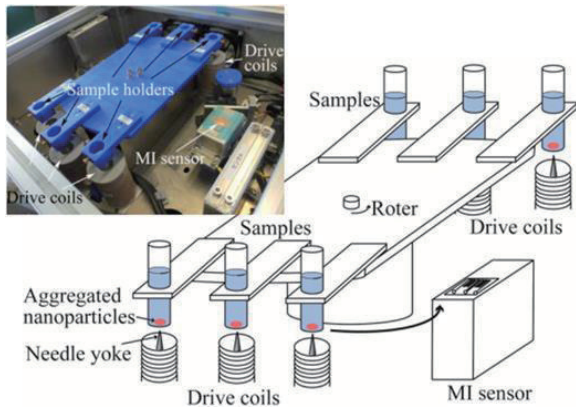


Fig. 3 Schematic (bottom) and photo (top) of a laboratory-made system for detecting protein in a liquid phase using magnetic nanoparticles. Reproduced from 29), with the permission of AIP Publishing.

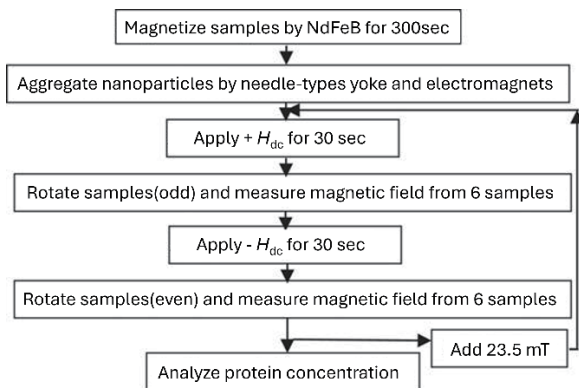


Fig. 4 Flowchart of protein measurement system. Reproduced from 29), with modification and permission of AIP Publishing.

2.3 透過型電子顕微鏡(TEM)観察

GDF-15 によって磁性ナノ粒子の凝集が強まることを定量的に示すために透過型電子顕微鏡(JEM-1400 Plus)で観察した。磁性ナノ粒子に GDF-15 を結合したサンプルと未結合のサンプルを作製し、以下の手順でネガティブ染色 TEM 観察用グリッドを準備した。

親水化した Holey マイクログリッド(EM ジャパン社)に作製したサンプルを 3 μ L 滴下し、30 秒間静置した後ろ紙でグリッド上に残ったサンプル液を吸い取った。その後、グリッドに 25 %EM ステイナー(日新 EM 社)を 3 μ L 滴下し、30 秒間静置した後にグリッド上に残った 25 %EM ステイナーをろ紙で吸い取った。再度 25 %EM ステイナーで染色した後、同様にグリッド上に残った 25 %EM ステイナーをろ紙で吸い取った。

3. 実験結果および考察

3.1 スイッチ磁界に対する磁性ナノ粒子の応答性評価

Fig. 5 は、Fig. 3 のシステムで測定した出力波形と測

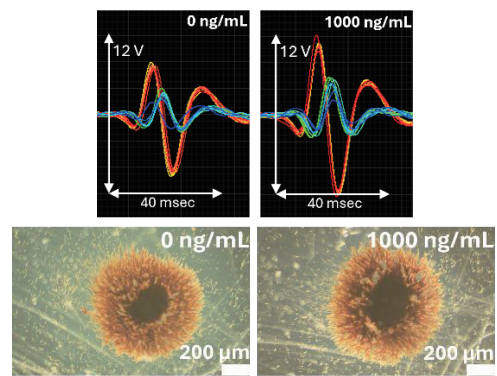


Fig. 5 Output waveform and optical micrographs of magnetic nanoparticle/antigen aggregates.

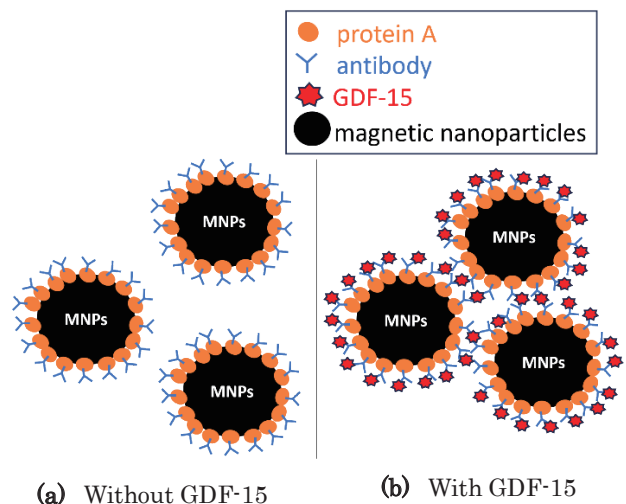


Fig. 6 Aggregation of magnetic nanoparticles via GDF-15 (antigen).

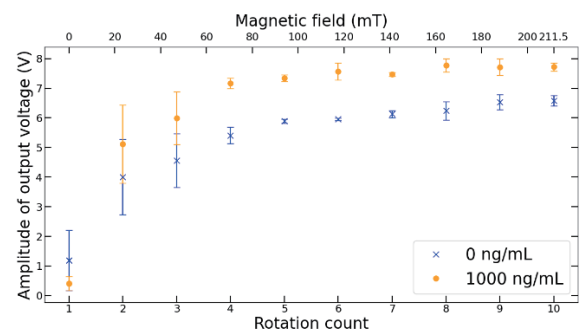


Fig. 7 Output voltage in each concentration of GDF-15 and magnetic field strength as a function of rotating number.

定後の磁性ナノ粒子および抗原凝集体の光学顕微鏡写真である。出力波形は、磁性ナノ粒子サンプルからの磁気信号をセンサで測定したものである。サンプルはセンサ素子近傍を通過するため、時間に応じて出力が変化している。奇数回転時に着磁した場合の信号波形は青い系列、偶数回転時に着磁した場合の信号波形は赤い系列で示している。信号波形の色は、回転数が増加す

るにつれて奇数回転では青から黄緑に、偶数回転では赤から黄色に変化する。回転するごとに印加磁場の上昇に伴って磁気信号が増大しており、偶数回転における出力が強くなるよう MI センサのバイアス点をずらしている。Fig. 6は、GDF-15 と抗体の抗原抗体反応を介して、磁性ナノ粒子が凝集した様子を示したものである。Fig. 5 のサンプル凝集体画像から、GDF-15 が高濃度ほどサンプルの色の濃度が増し、凝集が促進されていることが確認できる。これは Fig. 6(b)のように、磁性ナノ粒子が GDF-15 を介して連鎖的に凝集したためであると考えられる。

Fig. 7 は、回転ごとの出力波形の振幅である。Fig. 5 の波形の偶数回転時と奇数回転時のピーク値の差 (peak-to-peak) をプロットした。回転数の増加に伴ってスイッチ磁界の強度が増大し、振幅が大きくなった。また、GDF-15 が高濃度なサンプルほど振幅が大きい。これは Fig. 6(b)に示すように、磁性ナノ粒子が GDF-15 を介して連続的に凝集したことで、磁性ナノ粒子間の距離が短くなったためであると考えられる。このことを定量的に示すために、TEM で磁性ナノ粒子および抗原凝集体を観察した。

3.2 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察結果

Fig. 8 は凝集体のネガティブ染色 TEM 画像を示し、黒い凝集物は磁性ナノ粒子、円状に見える部分はグリッドのカーボン支持膜由来の背景である。本節では、3.1 節のスイッチ磁界に対する磁性ナノ粒子の応答性評価と異なり、磁場を印加せず、2 次元的な磁性ナノ粒子の凝集を観察する。磁気力の無い状況下でも、磁性ナノ粒子同士がタンパク質を介したクロスブリッジ結合によって凝集することを示すために、GDF-15 濃度 0, 1000 ng/mL サンプルを TEM 観察した。0 と 1000 ng/mL を比較すると、1000 ng/mL の方が磁性ナノ粒子の凝集体のサイズが大きく観測される。

これを定量的に示すため、解析ソフト MIPAR (株式会社ライトストーン社) を用いて画像解析した。解析では、カーボン膜の上にある磁性ナノ粒子凝集体の面積を求めた。Fig. 9 は解析結果である。横軸は画像上の凝

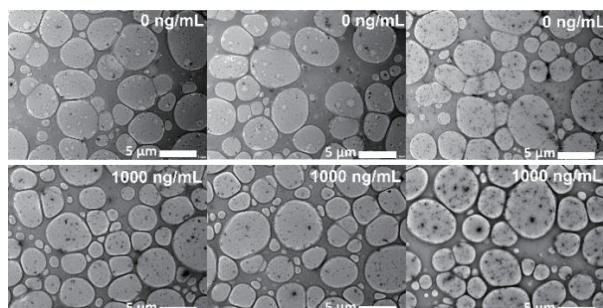
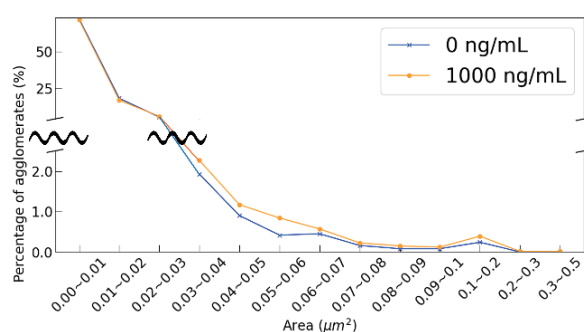
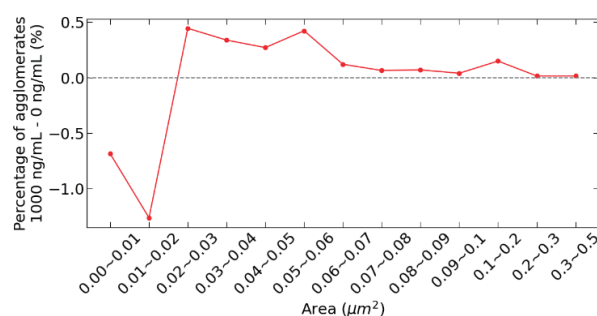


Fig. 8 Negative stain TEM images.
(Upper 3 images: GDF-15 concentration 0 ng/mL
Bottom 3 images: GDF-15 concentration 1000 ng/mL)



(a) Percentage comparison greater than 0.03 μm^2 .



(b) Subtraction difference between 1000 ng/ml and 0 ng/ml agglutination.
(1000 ng/ml) — (0 ng/ml).

Fig. 9 Percentage distribution of magnetic nanoparticle aggregates.

集体の面積、縦軸は凝集体の各面積範囲における凝集体の個数の割合を示す。縦軸の算出方法には、以下の式を用いて実効的面积を求めた。

$$\{S(i)/n\} \times 100 [\%] \quad (2)$$

ただし、 $S(i)$ [個] は横軸の i 番目に該当する凝集体の個数、 n は画像上の凝集体全ての個数の総和である。

Fig. 9(a)は、凝集体個数の割合を GDF-15 濃度 0 と 1000 ng/mL で比較したものである。磁性ナノ粒子 nanomag® -D (130 nm ϕ) の断面積は単独で約 0.013 μm^2 である。Fig. 9(a)より、2 つ以上の磁性ナノ粒子で形成された 0.03 μm^2 より大きい凝集体割合は、1000 ng/mL の方が約 1.5 %高い結果となった。また Fig. 9(b) は、GDF-15 濃度 0 と 1000 ng/mL の凝集体個数の割合の差を示したものである。0.02 μm^2 以下の粒子割合は抗原無しの方が高くなっており、0.02 μm^2 より大きい凝集体個数の割合は 1000 ng/mL が高くなっている。これは Fig. 6(b)のように、磁性ナノ粒子が GDF-15 によって連鎖的に凝集したためであると考えられる。3.1 節のスイッチ磁界に対する磁性ナノ粒子の応答性評価では、磁場を印加した状況下で GDF-15 高濃度ほど磁気応答が強くなった。スイッチ磁界による凝集に加え、TEM 観察で明らかになった GDF-15 を介した凝集も作用したためと考えられる。

本観察は、真空中で観察されるため、液相中での磁性ナノ粒子と抗体および GDF-15 との実際の結合を直接観測することは困難である。そこで今後は、クライオ透過型電子顕微鏡を用いて、磁性ナノ粒子に結合した抗体および GDF-15 を凍結させた観察を検討する。また、本磁気的手法は、現状 GDF-15 検出下限値が 10 pg/mL 程度³²⁾であり、代表的なタンパク質検出法の ELISA(abcam 社, Human GDF-15 ELISA Kit, ab155432)の精度は 2 pg/mL³³⁾である。筆者らのタンパク質検出感度を上げる手段として、MI センサの感度向上が挙げられる。MI センサの感度向上により、微小な漏れ磁界を検知でき、タンパク質低濃度においても磁気信号の変化を測定可能だと考えられる。

4. まとめ

1. 磁性ナノ粒子に GDF-15 を抗原抗体反応で結合させ、スイッチ磁界に対する磁気応答性および透過型電子顕微鏡 (TEM) で磁性ナノ粒子凝集体の寸法を測定した。
2. GDF-15 が高濃度ほど、スイッチ磁界に対する磁性ナノ粒子の磁気応答性が強かった。
3. 磁性ナノ粒子に GDF-15 を 0, 1000 ng/mL 結合させたサンプルを透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。GDF-15 濃度 1000 ng/mL の方が、 $0.03 \mu\text{m}^2$ より大きい凝集体割合が約 1.5 % 高いことを示した。

謝辞 本研究の一部は AMED Moonshot プロジェクト(JP23zf0127001), JST 大学発新産業創出基金事業可能性検証(JPMJSF23C4), テルモ生命科学振興財団, 株式会社ライトストーン, 東北大学未来型医療創生センター (INGEM) の成果である。

References

- 1) K. Sawalha, N. B. Norgard, B. M. Drees, and A. López-Candales: *Curr. Heart Failure Rep.*, **20**, 287 (2023).
- 2) Y. Wan and J. Fu: *Mol. Cell. Biochem.*, **479**, 453 (2024).
- 3) A. Assadi, A. Zahabi, and R. A. Hart: *Pfluegers Arch.*, **472**, 1535 (2020).
- 4) A. Hanaford and S. C. Johnson: *Orphanet J. Rare Dis.*, **17**, 335 (2022).
- 5) S. A. Sulaiman, Z. M. Rani, F. Z. M. Radin, and N. A. A. Murad: *J. Transl. Genet. Genom.*, **4**, 159 (2020).
- 6) L. Wu and X. Qu: *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 2963 (2015).
- 7) V. S. P. K. S. A. Jayanthi, A. B. Das, and U. Saxena: *Biosens. Bioelectron.*, **91**, 15 (2017).
- 8) M. K. Masud, J. Na, M. Younus, M. S. A. Hossain, Y. Bando, M. J. A. Shiddiky, and Y. Yamauchi: *Chem. Soc. Rev.*, **48**, 5717 (2019).
- 9) C. Favrot, M. Linek, J. Fontaine, L. Beco, A. Rostaher, N. Fischer, N. Couturier, S. Jacquenet, and B. E. Bihain: *Vet. Dermatol.*, **28**, 189-e42 (2017).

- 10) D. M. Rissin, C. W. Kan, T. G. Campbell, S. C. Howes, D. R. Fournier, L. Song, T. Piech, P. P. Patel, L. Chang, A. J. Rivnak, E. P. Ferrell, J. D. Randall, G. K. Provuncher, D. R. Walt, and D. C. Duffy: *Nat. Biotechnol.*, **28**, 595 (2010).
- 11) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, and T. Matsuo: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
- 12) <https://www.nanbyou.or.jp/entry/194> (As of October 30, 2024)
- 13) K. Enpuku, Y. Tamai, T. Mitake, M. Matsuo, A. Tsukamoto, T. Mizoguchi, and A. Kandori: *Appl. Phys. Express.*, **2**, 037001 (2009).
- 14) H. Shao, T. J. Yoon, M. Liong, R. Weissleder, and H. Lee: *Beilstein J. Nanotechnol.*, **1**, 142 (2010).
- 15) T. Wang, L. Guo, C. Lei, and Y. Zhou: *RSC Adv.*, **5**, 51330 (2015).
- 16) T. Wang, Y. Zhou, C. Lei, J. Luo, S. Xie, and H. Pu: *Biosens. Bioelectron.*, **90**, 418 (2017).
- 17) G. V. Kurlyandskaya and V. Levit. Venuganti: *Mater. Sci. Eng.: C.*, **27**, 495–503 (2007).
- 18) H. Chiriac, D. D. Herea, and S. Corodeanu: *J. Magn. Magn. Mater.*, **311**, 425 (2007).
- 19) F. Blanc-Béguin, S. Nabilly, J. Gieraltowski, A. Turzo, S. Querellou, and P. Y. Salaun: *J. Magn. Magn. Mater.*, **321**, 192 (2009).
- 20) G. V. Kurlyandskaya, D. S. Potnov, I. V. Beketov, A. Larranaga, A. P. Safronov, I. Orue, A. I. Medvedev, A. A. Chlenova, M. B. S. Ilarduya, A. M. Amesti, and A. V. Svalov: *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **1861**, 1494 (2017).
- 21) D. de Cos, N. Lete, M. L. Fdez-Gubieda, and A. García-Arribas: *J. Magn. Magn. Mater.*, **500**, 166346 (2020).
- 22) V. D. Krishna, K. Wu, A. M. Perez, and J. P. Wang: *Front Microbiol.*, **7**, 400 (2016).
- 23) Y. Wu, Y. Liu, Q. Zhan, J. P. Liu, and R. W. Li: *AIP Adv.*, **7**, 056658 (2017).
- 24) T. Mizoguchi, A. Kandori, R. Kawabata, K. Ogata, T. Hato, and A. Tsukamoto: *IEEE Trans. Appl. Supercond.*, **26**, 1602004 (2016).
- 25) L. Tonthat, S. Takahashi, H. Onodera, K. Okita, S. Yabukami, K. Yokota, M. Furuya, H. Kanetaka, Y. Miura, H. Takahashi, Y. Watanabe, and R. Akiyama: *AIP Adv.*, **9**, 125325 (2019).
- 26) S. Yabukami, T. Murayama, S. Takahashi, S. Ohno, J. Washio, and N. Takahashi: *IEEE Trans. Magn.*, **58**, 5300306 (2022).
- 27) Y. Pu, H. Zhao, T. Murayama, L. Tonthat, K. Okita, Y. Watanabe, and S. Yabukami: *J. Magn. Soc. Jpn.*, **47**, 66 (2023).
- 28) K. Okita, P. Youcheng, L. Tonthat, T. Murayama, S. Yabukami, Y. Ozawa, S. Asamitsu, H. Okamoto, and T. Kamei: *IEEE Magn. Lett.*, **14**, 1 (2023).
- 29) S. Yabukami, T. Murayama, K. Kaneko, J. Honda, L. Tonthat, and K. Okita: *AIP Adv.*, **14**, 035102 (2024).
- 30) I. C. Masthoff, F. David, C. Wittmann, and G. Garnweitner: *J Nanopart Res.*, **16**, 2164 (2014).
- 31) S. K. Sahu, A. Chakrabarty, D. Bhattacharya, S. K. Ghosh, and P. Pramanik: *J Nanopart Res.*, **13**, 2475 (2011).
- 32) K. Kaneko, A. Ban, T. Murayama, L. Tonthat, S. Yabukami, M. Tanaka, Y. Tanaka, T. Abe, 16th Joint Conference on MMM and Intermag, HE-03 (2025).
- 33) <https://www.abcam.co.jp/products/elisa-kits/human-gdf-15-elisa-kit-ab155432.html> (As of January 15, 2025)

2024年11月7日受理, 2025年1月21日再受理, 2025年2月14日採録