

トピックス (4)

磁性超微粒子のコーティングと生体機能物質による修飾

宮 本 宏

新技術開発事業団宝谷超分子プロジェクト 〒606 京都市左京区下鴨森本町 15 生産開発科学研究所内

(1987年8月3日受理)

Coating of Magnetic Ultrafine Particle and its
Modification with Biological Substances

Hiroshi MIYAMOTO

Research Development Corporation of JAPAN, Hotani Molecular Dynamic Assembly Project
15 Morimoto-cho, Shimogamo, Sakyo-ku, Kyoto 606

(Received August 3, 1987)

Procedures for coating ultrafine particles of iron with synthetic polymers were developed. The magnetic particles were covered with synthetic polymers such as polymethyl methacrylate, polystyrene, polyacrolein or their mixtures. Those polymers are containing functional groups that can be covalently bonded to protein and biochemically active substances.

At an initial step of the modification, surface hydroxyl groups of iron particles were reacted with silane coupling reagent which can be copolymerized with vinyl monomers.

Polymer coated particles were conjugated with immunoglobulins, protein A, bovine serum albumin or glucose oxidase. Those coated ultrafine particles can bind proteins up to 20% of their weight. In addition, those particles are well dispersed in aqueous solutions upon sonication and still magnetically active. Those particles may be useful for immobilization of enzyme or for magnetic affinity chromatography of cell and its organelle.

1. はじめに

我々の生活している環境の中には非常に多くの種類の超微粒子が存在している。それらはエアロゾルの形で空気中に浮遊しておりまた水の中にコロイド粒子として含まれている。人間やその他の生物は常にそれらの超微粒子に曝されており、生物はこれらをごみとして認識する。色々な超微粒子は体表から、呼吸器からまたは消化器から体内へと侵入してくるが、生物は一般にそれらを排除する機能を持っており、特別な場合を除き、長く体内に留まることはない^{1,2)}。ところが、超微粒子を積極的に利用している生物がいる。それは細菌の一種で磁気を感じ取る能力をもっており、走磁性細菌と呼ばれている。名前の通りこの細菌は磁場中で磁力線の方向にそって泳ぐ。はじめてこの細菌が発見されたのは、1975年であるが、その後の研究により、この種の細菌の体内には超微粒子の磁石があることがわかった^{3,4)}。超微粒子1

個の大きさは約 40 nm でそれらが一列あるいは数列に並んで存在しているのが電子顕微鏡の観察により認められた。これらの粒子には鉄が多く含まれており、メスバウアー効果による測定及び電子顕微鏡による格子像観察から、各粒子はマグネタイト (Fe_3O_4) の単結晶であることがわかった。マグネタイトはフェリ磁性を示し、40 ~ 100 nm のマグネタイト粒子は常温で安定な単磁区構造をとることが知られているので、この粒子を体内に持つことが、細菌に磁気感受性を賦与していると考えられる。マグネタイト粒子は細菌の体内で作られ、約 6 nm の薄い皮膜に覆われている。そして各粒子は体内で一定の場所に方向を定めて固定されている。各粒子が単一磁区からなりそれらが一列に配列していることから大きな形状異方性があり、全体として配列の方向に大きな磁気モーメントを持つことになる。これが体に固定されているため、地磁気程度の磁場であってもそれとの相互作用により菌体の方向が一定に保たれる。走磁性細菌はこの

磁気感受性を生存のために利用している。この種の細菌は嫌氣的であり、酸素の豊富な水面付近から早く逃れて、水底の泥にもぐり込むために地磁気の伏角成分を利用している。従って北半球に棲息する磁気細菌は北の方向、磁石のS極に向かって泳ぐが、南半球に棲息する種は南（磁石のN極）に向かって泳ぐ。細菌中に含まれるマグネタイトの量は重量にして、乾燥重量の2%、全重量の0.6%である。従って6gの磁石で、1kgの重さの物体の方向が、地球磁場程度の弱い磁力でコントロールされていることになる。この細菌の英知を取り入れて何とか応用できないかということから以下に述べる研究を行ったわけである。

2. 超微粒子の高分子によるコーティング

2.1 超微粒子の性質と原材料の選択

磁気細菌を見習うことにより得たアイデアは金属の磁性超微粒子に高分子でコーティングを行いその表面に活性基をつけることにより、タンパク質、酵素、抗体、DNA等を結合させ、磁気誘導、磁気分離、ラベル用試薬として用いる様なものが作れないかということだった。そのためにまず、磁石となる超微粒子として何を選択するのかを検討した。磁性を持つ超微粒子としては鉄、ニッケル、コバルト及びそれらの合金があり、さらに鉄の酸化物であるフェライト、マグネタイトがある。ところがニッケルには発がん性があり、コバルトでも発がん性の疑いがある⁵⁾。従ってニッケルやコバルト及びそれらを含む合金、化合物は生物や医学的应用には向いていない。鉄は金属の中では最も生体に害が少ないと言われているが、それでも特殊化合物での発がんが動物実験で報告されたりしている。酸化鉄は相対的に安定であり、安全と思われるが、不純物のないきれいな超微粒子が入手できなかったことと、磁性が鉄の方が強いことから鉄超微粒子をコーティングを施す原材料として選んだ。

不活性ガス中で蒸発法により作られた鉄超微粒子はたいへんきれいで、表面層は一部酸化を受けているもののその製法から見て酸素、水以外の物質が混入して来る可能性は皆無であり、試験用の原材料としては非常に適している⁶⁾。しかし、問題点もあった。それは、上記方法で

作られた鉄超微粒子は1次粒子は20~30nmの直径を持っているが、縦に1列に並んで融合し、フィラメント状になっておりその長さはミクロンのオーダーに達する。このままでは凝集等の点で取扱いが困難なため、これを超音波処理し短縮化を図った。試料をドライアイス-エタノール中で1~2時間超音波処理することにより得た磁性超微粒子の平均粒径及び比表面積は以下の通りであった。

平均粒径 30×500 nm

比表面積 50 m²/g

2.2 磁性超微粒子の高分子によるコーティング

金属の超微粒子に生物的活性をもつ物質を結合させるには直接行うよりもあらかじめ高分子で被覆し、その表面にある活性基を利用して生体物質を結合させた方が以下の2点で優れている。

① 金属微粒子と生体物質との直接の相互作用により失活する危険性を、高分子による被覆で減らすことができる。

② 金属微粒子を高分子で被覆することにより超微粒子の耐酸、耐アルカリ性等を向上させることができる。

コーティングは超微粒子の全面を覆う必要がある。金属粒子による毒性は通常表面より溶け出す金属イオンによってもたらされる。被覆を施すことによりこの漏出を格段に抑制できると考えられる。後に述べる通り、このことは耐酸性の向上という結果にも表れている。

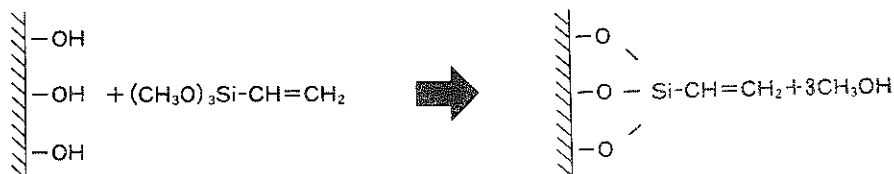
金属超粒子の表面を合成高分子で被覆するためには、表面の反応性や性質に基づいていくつかの方法が選択できる。

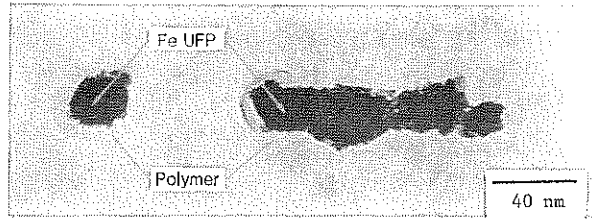
1) 粒子表面に吸着あるいは共有結合させたモノマーと加えたモノマーで共重合させる。

2) 粒子表面に吸着させたポリマー同志を、別に加えたモノマーで架橋する。

3) 触媒を粒子に吸着させてからモノマーを加えて粒子表面で重合反応を起こさせる。

鉄超微粒子の表面には酸化層が存在し、水との反応で水酸基が表に出ていると考えられる。そこで、シランカップリング剤を表面反応させ、導入した反応基にモノマーを重合させるという基本的に1)の方法をとってコーティングを行った。使用したシランカップリング剤はビ





Electron Micrograph of encapsulated Fe UFP.

Fig. 1 Electron micrograph of Fe ultrafine particle after polymer coating.

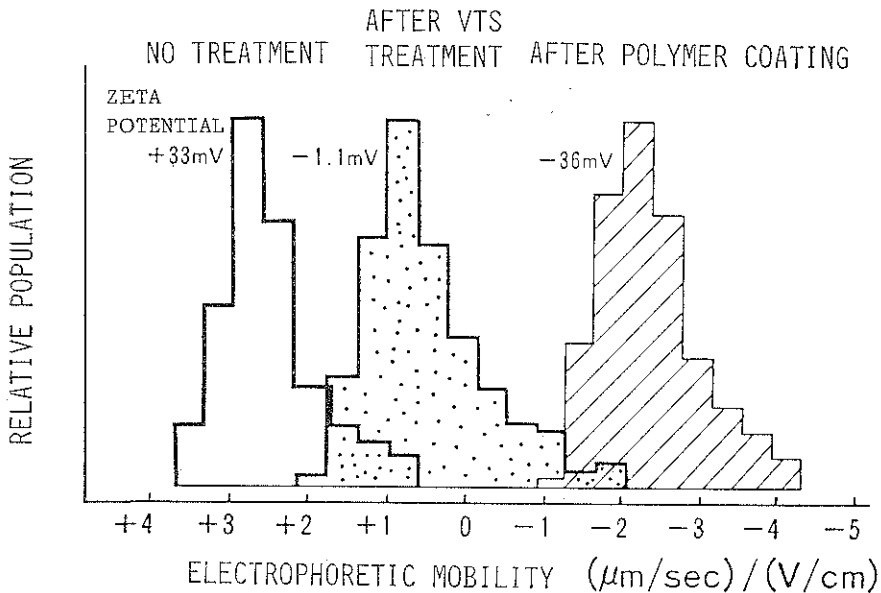


Fig. 2 Zeta potential of Fe ultrafine particles before and after polymer coating.

ニトリメトキシシラン (VTS) で次式の通りの反応で表面修飾を行いビニル基を微粒子表面に導入した。

この反応により飽和レベルで 20 mg の VTS が 1 g の鉄超微粒子に結合した。このことは、鉄超微粒子の表面に $1.6 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ のビニル基が導入されたことになる。およそ 0.8 nm の四辺形当り 1 個である。

VTS で前処理しビニル基が導入された鉄超微粒子と各種ビニルモノマーを反応させ、被覆化する。分散を良くするために 0.5% SDS, 0.5% Triton X-100 等の界面活性剤を添加した水溶液中に前処理した鉄超微粒子を分散させ、ビニルモノマーを加える。反応の開始剤としてはアゾイソブチロニトリル (AIBN) を用い窒素気流下で 60~70°C に加温しながらかくはんし、約 2 時間縮重合反応を行わせコーティングを行った。ビニルモノマーはメチルメタクリル酸 (MMA), ヒドロキシエチル

メタクリル酸 (HEMA), アクリルアルデヒド (AA) スチレン等を用いた。HEMA の添加により水酸基を、またアクリルアルデヒドの添加によりアルデヒド基を超微粒子表面に導入できる。上記の方法により合成高分子でコーティングした鉄超微粒子の電子顕微鏡写真を Fig. 1 に示す。超微粒子全体が高分子により均一に被覆されているのが認められる。被覆高分子の厚さはモノマーの添加量等を変えることにより 5~20 nm の範囲で変えることも可能である。超微粒子の VTS 処理や合成高分子によるコーティングによってその表面の特性は大きく変わっていると考えられる。実際水への分散性もコーティングにより向上している。そこで表面電位 (ゼータ電位) の測定を無処理, VTS 処理後および合成高分子によるコーティング後の各超微粒子について行った。この結果 Fig. 2 に示す通り、無処理の鉄超微粒子は正

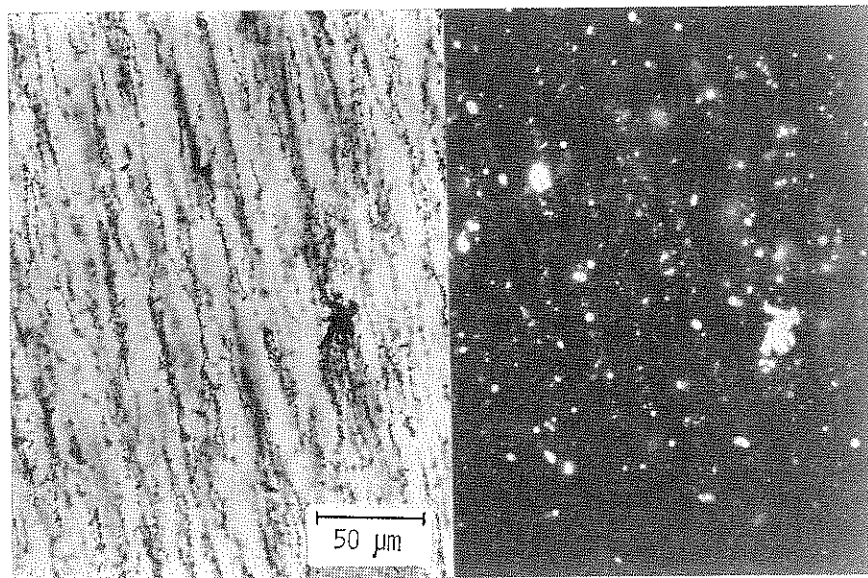


Fig. 3 Optical microscope images of magnetic ultrafine particles which bound fluorescence labeled antibody.

Left panel: Bright field image Right panel: Fluorescence image

のゼータ電位を示すのに対し、VTS 処理後は 0 に近くなり、コーティング後は大きく負へ変化する。従って、コーティングによる表面の親水化が分散性の向上に寄与していると考えられる。さらに被覆されたことにより鉄超微粒子同士の磁氣的相互作用も多少弱くなり、このことも分散性に寄与すると考えられる。またコーティング後のゼータ電位分布が単一のピークを示し、他の分布との重複がほとんど無いことから、鉄超微粒子の大部分が高分子により被覆化されていると言える。

コーティングを施した粒子は分散性が向上するだけでなく、環境条件に対する安定性も増大すると考えられる。特に耐酸性については裸の超微粒子は緩衝液の選択によっては pH 5.0 でも溶けてしまう。ところが、コーティング後の鉄超微粒子は同様の条件のもとで 1 週間でも安定に存在する。

3. 酵素、抗体の鉄超微粒子への結合

酵素や抗体を鉄超微粒子表面に結合させるためにアルデヒド基を持つアクロレインをモノマーに加えてコーティングを行った。アルデヒド基はアミノ基と反応し、シッフ塩基を作って結合する。従って酵素や抗体のリジン残基、アルギニン残基等と反応する。結合物質として (1) 蛍光ラベルしたウサギの抗マウス抗体、(2) プロテインA、(3) 牛血清アルブミン、(4) グルコースオキシダーゼを選びモデルとして結合実験を行った。結合実験はアクロレイン、HEMA、スチレンを使ったコーティン

グ鉄超微粒子がエタノール中に保存してあるのをまずリン酸緩衝液に置き換える。遠心操作と超音波照射による分散を 3 回繰り返しアルコールを完全に除いてから蛍光色素ラベルした抗マウス IgG を加え、4°C で 2 時間かくはんする。こうして蛍光色素付の抗体を結合した超微粒子を磁場配向させると、分散していた粒子は磁力線の方向に並ぶ。この様子を明視野及び蛍光顕微鏡で撮影したものが **Fig. 3** である。蛍光画像の光る点は磁場にそって配向した微粒子に対応しており、抗体が確かに超微粒子に結合し、それが磁氣的に制御し得ることを示している。2 番目にプロテインAを結合した場合は抗体と本質的に同じである。抗体の場合、その抗体としての特異的な相互作用を発揮する場所は Y 字型の構造の先端部分である。そこで上記のように抗体を直接超微粒子に結合させるとその機能部位が微粒子への結合に関与して本来の抗体としての結合能が阻害される危険性がある。実際、抗体を直接微粒子に結合させたのではうまくいかないケースが多い。そこでプロテインAという抗体の尾の部分の認識して結合することのできる特異的なタンパク質をまず超微粒子に結合させ、洗浄後そこに抗体を混ぜることにより微粒子の表面に機能部位を外側に向けて抗体をつけることができる。この方法により抗サルモネラ菌フラジェラ抗体を鉄超微粒子に結合させたと、鉄超微粒子はサルモネラ菌のべん毛に結合し、外から磁場を加えると菌を、顕微鏡下で回転させたり動かしたりすることができた。3 番目に牛血清アルブミンを使ってタ

ンパク質の超微粒子への結合量を測定した。抗体の場合と同様の実験条件で、牛血清アルブミンを加えると、コーティングした超微粒子 1g 当り、約 140 mg のタンパク質が結合し得ることがわかった。第 4 に酵素の一例として、酸化酵素の一種で、グルコースセンサ等の用途にしばしば固定化処理して使われているグルコースオキシダーゼを選び、その結合実験を行った。この場合、コーティング鉄超微粒子 1g 当り、約 200 mg のグルコースオキシダーゼを結合することができ、磁気超微粒子担体への酵素の固定化により、従来の報告されている多孔性無機担体を使用した場合より 30 倍高い比活性（単位担体重量当り）が見られた⁷⁾。

これらの結果から、コーティングした鉄超微粒子がタンパク質である酵素や抗体をその機能を維持したまま極めて多量に結合し得ることと、磁気を使用した制御が可能なることを示すことができた。従ってコーティングした鉄超微粒子を使って、磁気による細胞や細胞内小器官等の分離精製あるいは、磁性を有する固定化酵素用担体と

して使うことが可能である。

この研究は超微粒子プロジェクト生物化学的応用研究グループにて行われ、主に角田研究員が担当し、スタンフォード研究所と北海道大学高分子研究室にも協力をあおいだ。

文 献

- 1) 宮本 宏：日本の科学と技術 **25**, 76 (1984).
- 2) 宮本 宏：“超微粒子” 固体物理別冊特集号 128, (1984).
- 3) R. P. Blakemore: Ann. Rev. Microbiol. **36**, 217 (1984).
- 4) R. P. Blakemore, R. B. Frankel: Science **12**, No. 2, 16 (1982).
- 5) R. P. Beliles: “新毒性学の基礎と応用” 第 18 章 金属 (日本メディカルセンター, 1977) p. 486.
- 6) 三枝紀雄: 林超微粒子プロジェクト研究要旨集, p. 51 (1986).
- 7) 角田英男: 化学装置 2 月号, 94 (1987).