

# ポリマー修飾ナノ微粒子の二次元配列構造を有する 新規な生体物質反応用基板の開発

浦川 稔寛<sup>\*1</sup> 吉永 耕二<sup>\*2</sup>

## Adsorption Behavior of Protein to PMMA Plate which Coated SiO<sub>2</sub> Particles

Toshihiro Urakawa and Kouji Yoshinaga

タンパク質の吸着抑制機能を有する材料開発を目的として、コロイダルシリカ表面への親水性ポリマー修飾技術の開発と、そのタンパク質吸着抑制機能を評価検討した。初めに、コロイダルシリカ表面にポリ N-イソプロピルアクリルアミドを修飾した粒子を基板 2 次元面上へ被覆し、タンパク質溶液との接触で起こる基板界面へのタンパク質吸着現象を QCM と標識抗体を用いた発色法で調べた。その結果、ポリマー修飾粒子を被覆した基板はタンパク質の吸着が抑制されることが分かった。また、温度によって可逆的に親水-疎水性を示すポリ N-イソプロピルアクリルアミドを修飾した粒子を基板界面上に被覆したところ、基板へ吸着するタンパク質量が温度に応じて変化することを見出した。

### 1 はじめに

近年、サブミクロンからナノメートルサイズの高分子や無機微粒子を利用した加工技術に注目が集まっている。これらの材料の多くは、基材の表面特性を改質するための加工剤として用途展開されている。また、より付加価値の高い使用方法も検討されており、医療・バイオテクノロジー分野では、微粒子表面を用途に応じて機能化した材料を調製・利用することで、高感度、高速診断技術へ展開されている。このように、多くの分野において微粒子を用いた技術開発が目覚しく進展しており関心が高まっている。

微粒子を材料の機能化に利用する特長は比表面積の増大である。つまり、微粒子表面の状態を変化させ機能性を付与することは、バルク状態と比較して機能化できる面積が格段に広がることを意味し、機能の向上が実現される。さらに、近年の機器分析技術の発展により、微粒子の構造や粒径、表面電位等を迅速かつ正確に把握する事が可能となり、微粒子の生成技術の進展とあいまって、目的に適した微粒子の評価が容易になってきている。このように、微粒子を利用した材料開発はハード・ソフト共に実用段階となっている。

そこで、我々は微粒子を用いたタンパク質吸着抑制技術に着目した。例えば、生体適合性材料は常に生体内で使用されるため、タンパク質の吸着を少なくする

機能が求められている。一般的に、材料表面の親水性を高めることでタンパク質の吸着を抑制できる事が知られており、多くの生体適合性材料でも親水性の付与によって問題解決が図られている<sup>1)</sup>。高分子は分子構造を容易に変化させて化学的に親水化させることが可能なことから、親水性付与技術の一つとして高分子を使用する場合がある<sup>2,3)</sup>。高分子は置換基の数や位置などを自由に創製できることが特長であるが、高分子の微粒子化は合成や精製方法が煩雑であるため工業化には適していない。そこで、すでに微粒子化技術が確立しているコロイダルシリカの表面へ目的の機能性を有する高分子を被覆する方法を考案した。

本稿では、コロイダルシリカ表面に親水性高分子を導入した微粒子を調製し、この粒子を高分子基板表面へ被覆し、粒子で被覆された高分子基板のタンパク質の吸着特性がどのように変化するか評価を行って、タンパク質吸着抑制効果の検証を行った。その結果について以下に報告する。

### 2 実験方法

#### 2-1 表面修飾コロイダルシリカの合成

##### 2-1-1 SiO<sub>2</sub>-MPS の合成

還流管、温度計及び 50ml 滴下ロートを備えた 200ml の 3 つ口フラスコに、粒径 125nm のコロイダルシリカ [触媒化成工業(株)製] 2.1g を含む EtOH(無水エタノール:和光純薬製)分散液 20ml、及びチソ(株)製 3-メタクリル酸プロピルトリエトキシシラン

\*1 化学繊維研究所

\*2 九州工業大学

(MPS)1.0gを加えた。55℃で24時間攪拌後、反応溶液の遠心分離を行って上澄みを除去した。次に、残った残渣にEtOHを20ml加えて再分散後、遠心分離を行って上澄みを除去する洗浄操作を5回行った。洗浄後の残渣を減圧乾燥し、メタクリル酸プロピルを表面に修飾したコロイダルシリカ(合成物1:SiO<sub>2</sub>-MPS)1.953gを調製した。

#### 2-1-2 SiO<sub>2</sub>-NIPAMの合成

フラスコに合成物1(250mg)、及びN-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)500mg、重合開始剤アゾビスイソブチロニトリル(20mg)、およびEtOHを50ml加え、70℃で6時間攪拌した後、反応溶液の遠心分離を行って上澄みを除去した。残った残渣にEtOHを50ml加えて再分散し、遠心分離を行って上澄みを除去する洗浄操作を8回行った。洗浄後の残渣を減圧乾燥し、N-イソプロピルアクリルアミド修飾コロイダルシリカ(合成物2:SiO<sub>2</sub>-PNIPAM)253mgを調製した。

#### 2-2 QCM測定用基板の調製

ポリメタクリル酸メチル(PMMA)、及びコロイダルシリカを被覆した水晶発振子の調製は以下の方法で行った。

PMMA被覆基板の調製:19.6mm<sup>2</sup>の水晶発振子基板上へ0.5mg/mlに調製したPMMA(ポリメタクリル酸メチル:平均分子量46000)の酢酸エチル溶液を10μl添加し、25℃,3000rpmで15秒間スピンコートして、PMMA被覆水晶発振子基板(PMMA基板)を調製した。

コロイダルシリカ被覆基板の調製:合成物2(SiO<sub>2</sub>-PNIPAM)、または粒径125nmの未修飾コロイダルシリカ(125nm SiO<sub>2</sub>)を含むEtOH分散液(1mg/ml)を調製し、各分散液15μlをPMMA基板上へ滴下して25℃で乾燥を行ってPMMA基板上にコロイダルシリカを被覆したSiO<sub>2</sub>-PNIPAM/PMMA基板、及び125nm SiO<sub>2</sub>/PMMA基板を調製した。

#### 2-3 QCN測定

PMMA及びコロイダルシリカ被覆水晶発振子のタンパク質吸着特性評価は、QCM測定装置(Seiko EG&G QCA917)によって行った。測定はリン酸緩衝溶液(pH7.0)中25℃の状態、濃度既知のウシ血清アルブミン(BSA)を添加し、BSA濃度の増減に伴って変化する水晶発振子の周波数を計測した。周波数変化をBSAの各濃度における吸着量に換算し、調製した基板のBSA吸着特性を評価した。測定用基板の構造を図1に示す。

なお、周波数変化から重量変化を求める換算式は、

$$M = - F \times A \times \{(\mu \times ) / (2 \times F^2)\}^{1/2}$$

である。ここで、M:発振子の重量変化、F:発振子の周波数変化、A:発振子の表面積、μ:発振子定数、:振動子密度、F:基準周波数である。また、A、μ、Fの積は1.068である。したがって上記式は、

$$M = - F \times 1.068$$

と表記でき、例えば共振周波数が1Hz減少した場合は、発振子の重量が1.068ng増加したことを意味する。また、測定発振子の面積は19.6mm<sup>2</sup>であることから、単位面積あたりの吸着量m[ng/mm<sup>2</sup>]は、

$$m = M / 19.6$$

で求めることができる。

吸着評価は周波数変化から上記計算式で求めたmと、加えたBSA溶液の濃度との関係から吸着量を求めて行った。

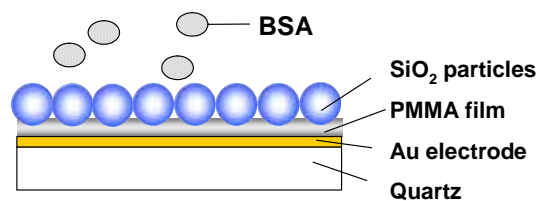


図1 QCM測定用基板の構造

#### 2-4 標識抗体を用いた吸着評価

抗原と抗体の特異的免疫反応を利用した測定方法であるELISA(酵素結合免疫吸着検定法)の評価手法を応用し、未反応抗体の測定用基板への吸着現象を発色法により観察した。なお、実験は以下の手順により調製したELISA測定用96穴プレートを用いて行った。

ブロッキング処理:ELISA用96穴プレート(Nunc社製)に、濃度0.1mg/mlのコロイダルシリカ/リン酸緩衝液(PBS)(pH7.4)分散液を300μl/ウェルの割合で分注し、40℃で1時間静置し測定プレート上へコロイダルシリカをブロッキングした。反応終了後、0.05%となるようTween20(ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート)を加えたPBSからなる洗浄液(PBS-Tween)で3回洗浄した。なお、ブロッキングには粒径125nmのSiO<sub>2</sub>-PNIPAMを用いた。また、比較として0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)/PBS-Tweenを300μl/ウェルで分注し、同様の方法でブロッキングと洗浄を行ったプレートを調製した。

非特異的吸着処理:ペルオキシダーゼ標識抗ヤギ

IgG (Invitrogen 社製) の PBS-Tween 溶液 (1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 0ng/ml) をブロッキング処理した 8 ウェルにそれぞれ 100 $\mu$ l 分注し, 40 また 5 で 1 時間静置して IgG を吸着させた後, PBS-Tween で 5 回洗浄した。

発色反応: 和光純薬製 o-フェニレンジアミン (OPD) の 0.5mg/ml クエン酸リン酸緩衝溶液 (0.03%過酸化水素含有) (pH4.5) を, 100 $\mu$ l/ウェルで分注し, プレートに吸着した IgG に標識されたペルオキシダーゼと 30 分間反応させた。2N 硫酸を 50 $\mu$ l/ウェルで分注して反応を停止させ, 各ウェル内で発色した溶液の吸光度 (492nm) をプレートリーダーで計測した。なお, プレート表面状態の観察は SEM (走査型電子顕微鏡: 日本電子 (株) 製 JSM-840F) を用いて行った。

### 3 結果と考察

#### 3-1 QCM 測定

コロイダルシリカで被覆した基板へ吸着するタンパクの吸着現象を重量変化として捉えるため, QCM を用いて評価した。25 の測定条件で各基板を用いて行った BSA の吸着等温線を図 2 に示す。

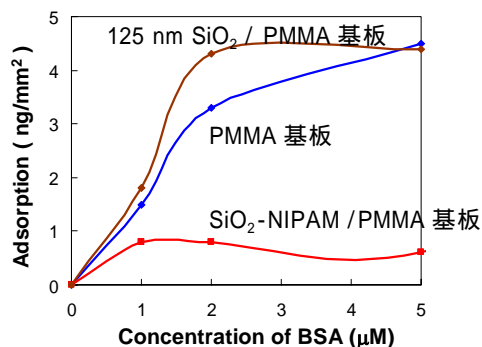


図 2 25 における吸着等温線

測定の結果, 各基板への BSA 吸着量は BSA 濃度 5 $\mu$ M において, PMMA 基板が 4.4ng/mm<sup>2</sup>, 及び 125nm SiO<sub>2</sub>/PMMA 基板が 4.5ng/mm<sup>2</sup> であった。一方, SiO<sub>2</sub>-NIPAM/PMMA 基板では約 0.8ng/mm<sup>2</sup> となり吸着量の大幅な減少が確認された。したがって, SiO<sub>2</sub>-NIPAM/PMMA 基板は NIPAM ポリマー鎖の効果で BSA 吸着が抑制された事が示唆された。ここで, ポリ NIPAM は約 32 に下限臨界溶液温度 (Lower Critical Solution Temperature: LCST) を有し, ポリマー水溶液がこの温度以上に加熱すると疎水性を示して白濁し, それ以下の温度に冷却すると親水性を示して透明に戻るという可逆的な相分

離挙動を示すことが知られている<sup>4)</sup>。そこで, NIPAM 修飾粒子の温度応答性を確認するため, BSA 濃度 5 $\mu$ M における SiO<sub>2</sub>-NIPAM/PMMA 基板への BSA 吸着量と温度変化を測定した。同様に 125nm SiO<sub>2</sub>/PMMA 基板についても測定を行い両者の結果を比較した (図 3)。

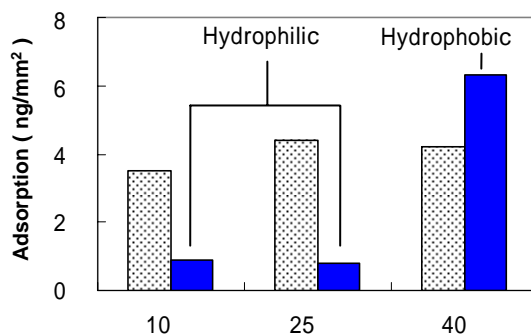


図 3 BSA 吸着量の温度依存性

■ 125nm SiO<sub>2</sub>/PMMA ■ SiO<sub>2</sub>-NIPAM/PMMA

測定の結果, SiO<sub>2</sub>-NIPAM/PMMA 基板は 125nm SiO<sub>2</sub>/PMMA 基板と比較して, NIPAM の LCST 以下である 10, 25 において BSA 吸着量が低下した。一方, LCST 以上である 40 の測定では, SiO<sub>2</sub>-NIPAM/PMMA 基板への BSA 吸着量が劇的に増大する現象が確認された。しかしながら, 125nm SiO<sub>2</sub>/PMMA 基板は温度変化と吸着量に明確な変化は確認できなかった。一般的に, 界面を親水性にすることで, タンパク質の吸着が抑制されるとの知見が多数報告されている<sup>5,6)</sup>。したがって, SiO<sub>2</sub>-NIPAM で被覆した基板は温度応答性が付与され, LCST 以下で基板表面が親水性を示して BSA 吸着量が低下し, LCST 以上では表面が親水性から疎水性へと変化して BSA との親和性が増加し, 吸着量が増大したものと考えられる。

#### 3-2 標識抗体を用いた吸着評価

ELISA の測定では, 抗原抗体反応における未反応物が測定プレート上に吸着すると, 測定シグナルが増加してノイズとして計測されるため S/N 比が悪化する。S/N 比の悪化は測定感度に重大な影響を及ぼす。したがって, 未反応物の吸着を極力防止するため, 一般的にブロッキング剤と呼ばれるタンパク質吸着抑制剤が用いられる。これを ELISA 測定用プレート上に被覆することで未反応物の吸着が抑制され, バックグラウンドが低下して検出感度が向上する。そこで, SiO<sub>2</sub>-NIPAM で被覆 (ブロッキング) した ELISA 測定用 96 穴プレートを調製し, そのタンパク質吸着特性を既存のブロッキ

ング剤である BSA 被覆プレートの吸着性と比較評価した。ブロッキング処理したプレート上に吸着させるタンパク質は、ペルオキシダーゼ標識抗ヤギ IgG を用いた。なお、吸着温度は 5 °C、および 40 °C とした。次に、IgG で標識されたペルオキシダーゼによって OPD を発色させ、IgG の吸着に伴って相対的に増減する OPD 由来発色物の吸光度を測定プレートのタンパク質吸着性として評価した。結果を図 4、図 5 に示す。

評価の結果、SiO<sub>2</sub>-NIPAM を表面に被覆した測定プレートは、BSA 被覆プレートと比較して吸光度が低下したことから、タンパク質 (IgG) の吸着が抑制されたものと考えられる。さらに、SiO<sub>2</sub>-NIPAM 被覆プレートの測定結果を吸着温度 5 °C と 40 °C で比較すると、100-1000ng/ml の領域で 5 °C の吸光度に著しい吸光度の減少が確認された。一方、BSA 被覆プレートの吸着量には変化が見られなかった。したがって、SiO<sub>2</sub>-NIPAM は LCST 以上の 40 °C ではプレート表面の親水性が低下して IgG の吸着性が増加し、5 °C においては親水性が向上して IgG の吸着性が低下したものと考えられる。

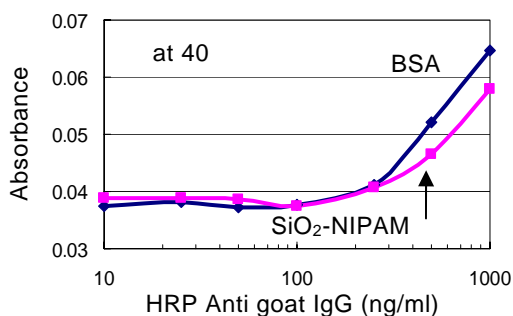


図 4 吸着性評価 (40 °C)

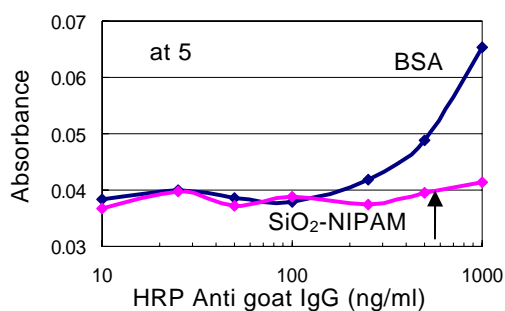


図 5 吸着性評価 (5 °C)

次に、SiO<sub>2</sub>-NIPAM プレート表面のブロッキング状態を確認するため、走査型電子顕微鏡を用いて表面観察を行った。結果を図 6 に示す。

観察の結果、プレート表面が粒子で一様に被覆されていることを確認した。したがって、プレート表面を

SiO<sub>2</sub>-NIPAM が均一に被覆したことから、測定プレート界面の性質が一様に変化し、IgG の吸着特性に変化を及ぼしたものと判断できる。

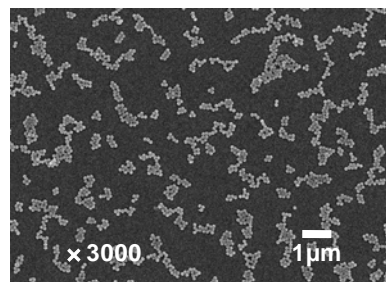


図 6 プレート表面の被覆状態

#### 4 まとめ

コロイダルシリカ表面にポリ NIPMA を導入した SiO<sub>2</sub>-NIPAM の開発と、SiO<sub>2</sub>-NIPAM で被覆した基板のタンパク質吸着抑制効果を QCM、および標識抗体を用いた発色法によって評価した。QCM による評価の結果、25 °C 及び 10 °C では基板へのタンパク質の吸着量が減少し、40 °C では吸着量が増加した。一方、標識抗体を用いた評価でも 5 °C では基板へ吸着する抗体量が減少し、40 °C では吸着量が増加した。したがって、SiO<sub>2</sub>-NIPAM で被覆した基板は NIPAM に由来する温度応答性を示し、周囲の温度に応じて基板表面の性質が親水性または疎水性に変化することが分かった。

#### 5 参考文献

- 1) M. Tanaka, et al., *Biomacromolecules*, Vol.3, p.36 (2002)
- 2) A. R. E. Holmlin, et al., *Langmuir*, Vol.17, p.2841 (2001)
- 3) 高分子学会編: 高分子の物性(3), pp.159-183, 共立出版 (1995)
- 4) Noah Malmstadt, Paul Yager, Allan S. Hoffman, Patric S. Stayton, *Anal. Chem.*, Vol.75, p.2943 (2003)
- 5) Klotz, J.L., *Methods Enzymol.*, Vol.84, p.194 (1982)
- 6) Kozber, D. and Roder, J. C., *J. Immunol.*, Vol.127, p.1275 (1981)