プラズマ修飾ナノ微粒子のバイオ・医療応用

永津雅章^{1,2}・楊恩波¹・張 晗²・作道章一³・生田和良⁴¹静岡大学創造科学技術大学院 432-8561 静岡県浜松市中区城北 3-5-1²静岡大学大学院工学研究科 432-8561 静岡県浜松市中区城北 3-5-1³琉球大学医学部 903-0215 沖縄県中頭郡西原町上原 207⁴大阪大学微生物病研究所 565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1

(2013 年 6 月 29 日受付 ; 2013 年 7 月 30 日掲載決定)

Bio- and Medical-Application of Plasma-Functionalized Nanoparticles

Masaaki NAGATSU^{1,2}, Enbo YANG¹, Han CHO², Akikazu SAKUDO³ and Kazuyoshi IKUTA⁴¹Shizuoka University, Graduate School of Science and Technology, 3-5-1 Johoku, Naka-ku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561²Shizuoka University, Graduate School of Engineering, 3-5-1 Johoku, Naka-ku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8561³University of the Ryukyus, Faculty of Medicine, 207 Uehara, Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa 903-0215⁴Osaka University, Research Institute for Microbial Diseases, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

(Received June 29, 2013 ; Accepted July 30, 2013)

In the present study, we have carried out the study to understand the interaction between the plasma and nano-structured materials. The main research subjects are to fabricate nano-sized particles by using dc arc discharge, to modify their surfaces of nanoparticles or nano-structured materials by using plasma chemical modification, and to immobilize the biomolecules onto the surface of nanoparticles for bio- and medical application. Immobilization of the antibody of influenza virus onto the surface of aminated magnetic nanoparticles has been carried out for aiming at developing the feasibility of the selective detection of virus. The significant enhancement of condensation rate of influenza A type virus was confirmed by magnetic collection of antibody-immobilized magnetic nanoparticles. The result suggests a feasibility of the present method for selective influenza virus detection.

KEYWORDS : plasma chemical modification, magnetic nanoparticle, RF plasma, virus collection, medical application

1. は じ め に

非熱平衡プラズマを用いたバイオ・医療分野への応用に関する研究が、近年注目されている。非熱平衡プラズマを用いる大きな利点は、低圧放電あるいは大気圧放電のいずれにおいても、対象物をほぼ常温に保ったまま、生成された励起原子・分子による化学的反応プロセスを実現できる点であり、さらに生成される電子やイオンなどの荷電粒子による基板表面での物理的相互作用、あるいは電子励起による原子・分子の紫外線発光による材料表面の活性化を相乗的に活用できる点である。特に、バイオ・医療分野における低温プロセスの実用化では、用

途あるいは処理対象物は様々であるが、(1) 一般的に樹脂などの対象物に熱的ダメージを与えないこと、(2) 化学薬品を用いたウェットプロセスと異なり環境に優しいこと、さらに(3) 短時間で所望の効果を実現できることなどが実用化の観点から求められている。プラズマのバイオ・医療分野への応用では、近年、「プラズマ医療科学」と呼ばれるプラズマ科学と医学とを融合した新たな学際領域が国内外において注目され、精力的に研究が行われている。また、バイオ・医療分野に必要とされる各種材料の生体適合性や血液凝固特性（あるいは逆に抗凝固特性）などの様々な機能性を付加するためのプラズマ表面処理に関する研究も、古くより行われている。

本稿では、筆者らが医療分野への応用を目的としてこれまで行ってきた、大きさ数 10 nm~100 nm の磁性体

ナノ微粒子を用いたプラズマ化学修飾, および多糖類等のバイオ高分子の固定化など, バイオ・医療分野への応用を目指した最近の研究成果について報告する。なお, 本稿の記載にあたり, 科学研究費・新学術領域研究「プラズマとナノ界面の相互作用に関する学術基盤の創成」(代表; 白谷正治教授) において, 筆者らが担当した成果報告書の記載を一部引用した¹⁾。

2. プラズマ化学修飾による各種微粒子の表面機能化

近年, 金や磁性体などのナノ微粒子の医療関係への応用に関する研究が精力的に行われている²⁻¹⁰⁾。特に, カーボン層によりカプセル化された鉄などの磁性体ナノ微粒子は, 大気下において安定で酸化に強く, ドラッグ・デリバリー・システム (Drug Delivery System; DDS) などへの実用化が考えられている⁹⁾。

しかしながら, これらの微粒子の医療応用を可能にするためには, ナノ微粒子の生体適合性や液体中での分散性の向上が不可欠である。磁性ナノ微粒子を用いた DDS では, 一般に Fig. 1 のようにウイルスほどの大きさ (数 10 nm 程度) の磁性体コアに, シリカあるいはポリマー膜を被覆コーティングし, その表面に様々な薬剤を付加して用いている。人間の体は, 体内に取り込まれた物質の大きさが 3 nm より小さいものに対しては, 体が血液中の栄養を吸収するように自然に吸収したり排出したりするように働き, 逆に, 極端に大きく, 400 nm 以上の大きさのものは異物として認識され, 分解して排出されるといわれている。このことから, DDS では, 一般に 4~400 nm の大きさの微粒子を使い, 血管の中を循環させ患部へ導入する方法が考えられている。

本研究では, 直流アーク法により作製したグラフェン層でカプセル化された磁性体ナノ微粒子を用い, RF 誘導結合型プラズマを用いたナノ微粒子の表面化学修飾およびその医療応用に関する実験を行った^{11, 12)}。

直流アーク放電により作製したグラフェン層でカプセ

Fig. 1. (color online). Illustration of magnetic nanoparticle for medical application.⁹⁾

ル化された磁性体ナノ微粒子の高解像透過電子顕微鏡 (HR-TEM) 画像を Fig. 2 に示す¹¹⁾。粒子径は 20~30 nm 程度であり, コア部の鉄微粒子の周りにグラフェン層が幾層も覆った構造であることがわかる。

Fig. 3 に作製した鉄ナノ微粒子の X 線回折法 (XRD) による解析結果を示す¹¹⁾。コア部の鉄結晶成分あるいは Fe_3C 成分を示す 45° 付近に見られるピークに加え, 26.6° においてグラファイト成分を示す鋭いピークが確認できる。また, 炭化鉄あるいは酸化鉄成分の存在も確認できる。さらに, エネルギー分散型 X 線分析による元素マッピングの測定から, コア微粒子内部に酸素が含まれていることを確認している¹¹⁾。

Fig. 4 はグラフェン層でカプセル化された鉄ナノ微粒子の直流磁場による磁化特性の測定結果を示している¹²⁾。図からわかるように, 外部磁界を取り去った際

Fig. 2. (color online). HR-TEM image of magnetic nanoparticles.¹¹⁾

Fig. 3. XRD spectrum of graphite-encapsulated Fe nanoparticles.¹¹⁾

に、磁化はほぼゼロとなっており、DDS の磁性体微粒子に必要とされる、いわゆる超常磁性の磁気特性を示している。

RF プラズマによる化学修飾を行った鉄ナノ微粒子のエタノール液中での分散特性の様子を Fig. 5 に示す。ここで、サンプル A はプラズマ未処理の微粒子、サンプル B は直接 NH_3 プラズマ処理した微粒子、サンプル C は前処理として Ar プラズマで 5 分間の処理を行った後、 NH_3 プラズマで 1 分間のアミノ基修飾を行った微粒子を示している。

処理した微粒子をエタノール溶液中に超音波洗浄器で

Fig. 4. (color online). Magnetic characteristics of magnetic iron nanoparticles (Courtesy of Prof. T. Kisu, Kyushu Univ.).¹²⁾

Fig. 5. (color online). Comparison of dispersion characteristics of magnetic nanoparticles (A : untreated, B : NH_3 plasma only, C : Ar plasma pre-treatment + NH_3 post-plasma treatment).

混ぜ合わせた後、24 時間から 96 時間経過したときの様子を示しており、この結果から、サンプル C、すなわち Ar プラズマによる前処理を行った後、 NH_3 プラズマによるアミノ基修飾した場合の方が、直接 NH_3 プラズマ処理したサンプル B に比べて飛躍的に分散性が改善しており、Ar プラズマによるグラフェン層の前処理の効果の重要性を示している。

3. プラズマ化学修飾された微粒子表面への多糖類の固定化

前章で記述したアミノ基の表面修飾を施したグラフェン層外包鉄ナノ微粒子を用いて、デキストラン (Dextran) の固定化を行った¹²⁾。デキストランは、ショ糖を原料として乳酸菌が生産する多糖類の一種で、グルコースを唯一の構成成分とし、医薬品、化粧品、写真フィルムなど様々な用途に用いられている。Fig. 6 はデキストランを過ヨウ素酸ナトリウムで酸化してアルデヒド基を導入した後、プラズマ化学修飾により磁性体微粒子表面に添加したアミノ基と共有結合させる反応手順の概略を示している。本実験では、デキストラン量を変化させたときの磁性体ナノ微粒子表面のアミノ基がデキストラン固定化に使われるかを調べることにした。

まず、デキストランによる固定化を行う前に、微粒子表面に修飾したアミノ基の量を誘導体化法を用いて評価し、次にデキストランを固定化した後に残ったアミノ基の量を調べることにより、アミノ基と結合したデキスト

Fig. 6. (color online). Schematic illustration of plasma surface modification of nanoparticles by Ar and NH_3 plasma and periodate oxidation of dextran by NaIO_4 followed by covalent immobilization path of aldehyde groups of dextran onto the treated nanoparticles.¹²⁾

ラン量を評価した。誘導体法によるアミノ基の評価では、Fig. 7 に示したように、アミノ基を有するサンプルに 4-Trifluoromethyl benzaldehyde (TFBA) を反応させることにより、アミノ基 1 個がフッ素原子 3 個に置換されることを利用し、XPS による F 原子の評価からアミノ基の量を評価した。

Fig. 8 は、デキストランの量を 2.0 g/100 ml まで増加させたときの、デキストラン固定化に使われたアミノ基の変化を示している。アンモニアプラズマにより表面化学修飾を行った微粒子表面のアミノ基数の定量には、化学的誘導体法を用いた。化学的誘導体法では、化合物の一部をほかの原子や原子団に置換して誘導体とする手法である。本研究では、SPDP (Sulfosuccinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio) propionamido] hexanoate) を用い、SPDP 溶液とアミノ基修飾グラフェン外包磁気ナノ微粒

Fig. 7. (color online). Illustration of chemical derivatization method for measuring amino groups.

Fig. 8. (color online). The dependence of area percentage of C=N peak taken from N 1s XPS spectra before amino group derivatization and atomic percentage free amino groups estimated by chemical derivatization vs. dextran concentration.¹²⁾

子を反応させることで、一つのアミノ基に対して SPDP 分子を結合させた。

次に、SPDP 分子を結合させた微粒子に DTT (Dithiothreitol) 溶液を加え反応させることによって、SPDP 分子中の S-S 結合を切断し、SPDP 分子から Pyridine-2-thione (P2T) 分子を分離する。この P2T 分子の波長 343 nm での吸光度を測定することによって、溶液に含まれる P2T 分子の量を評価することができる。P2T 一分子はアミノ基一つに対応するため、使用した微粒子の質量、比重を事前に測定し、総微粒子数で P2T 分子数を割ることで一微粒子当たりのアミノ基数の算定が可能となる。この方法を用いて吸光度解析を行った結果、微粒子 1 個当たりのアミノ基数として約 2×10^4 個が得られた。なお、微粒子を配置した金属基板ステージに負電圧パルスを加えることにより、微粒子をプラズマ中に導入する方法を用いることによって、約 8×10^4 個にアミノ基数を増加させることに成功している。この数値は、市販されている磁気ビーズに比べて 1~2 桁高い値となっており、より高い修飾率のアミノ基添加を実現している。

4. アミノ基修飾磁気ナノ微粒粒子を用いたインフルエンザウイルスの濃縮化

前章におけるグラフェン層外包磁気微粒子表面へのデキストラン固定化実験の結果を踏まえ、磁気微粒子のインフルエンザウイルスなどの選択的回収、高感度検出技術の開発を目的として、Fig. 9 に示したようにウイルスを模擬した糖結合性タンパク質として ECA (Erythrina Cristagalli) レクチンを用い、微粒子に固定化する糖鎖として LacNAc (N-acetylglucosamine) を用いて糖鎖固定化の有無によるレクチン回収率を比較する予備実験を行った¹³⁾。

Fig. 10 にレクチンの回収率の測定結果を示す。LacNAc 糖鎖を固定化していない磁気微粒子の場合には、10~15% のレクチン回収率であるのに対して、糖鎖を固定化した場合には 80% 程度の回収に成功しており、きわめて高い回収率であることが示された。糖鎖を固定していないサンプルの場合においてもレクチンが結合した原因は、恐らく微粒子表面への直接的な凝集、吸着によるものと考えられる。

次に、アミノ基修飾を行った磁気ナノ微粒粒子にインフルエンザウイルス抗体を固定化した場合のウイルス濃縮に関する研究を実施した。実験では、磁性体ナノ微粒粒子表面に修飾したアミノ基にインフルエンザウイルス抗体である C111 を結合した。ここで、抗体 C111 は、ウイルスのヘマグルチニンに選択的に結合する抗体であり、

Fig. 9. (color online). Illustration of selective protein collection using MNPs.¹³⁾

Fig. 10. (color online). Collection rate of ECA lectin by MNPs with and without immobilization of LacNAc sugar chain.¹³⁾

Fig. 12. (color online). Results of ELISA of virus condensation for samples using C111 antibody.

Fig. 11. (color online). Procedure of magnetic collection of influenza virus by antibody-immobilized magnetic nanoparticles.

この抗体を用いてインフルエンザウイルスの濃縮率を調べた抗体結合磁気ナノ微粒子によるインフルエンザウイルス濃縮の手順を Fig. 11 に示す。インフルエンザウイルスを含んだサンプルを BF (濃縮前サンプル) とし、抗体結合磁気ナノ微粒子と反応させた。さらに微粒子を磁石により回収し、回収後の溶液を SP (上清)、回収した微粒子を BD (濃縮後サンプル) とした。

次に BF, SP, BD の各サンプルについて、1 ml 中に含まれるインフルエンザウイルスの量を測定した。C111 抗体を用いた場合の測定結果を Fig. 12 に示す。

BF, SP は約 6.2 ng/ml に対し、BD は約 70 ng/ml であり、BF に対する BD の濃縮率はおよそ 10.9 倍であった。表面修飾したアミノ基に結合した抗体により、インフルエンザウイルスが抗原抗体反応で結合し、磁気回収によりウイルスの濃縮が可能になった結果である。

また抗体 C111 に対してサンプルの PCR 解析を行った結果から、ウイルスの DNA 成分が SP 部分では検出されていないが、磁気回収したサンプル BD では検出が確認できたことから、改めて本手法によるウイルスの磁気回収による濃縮化が達成できていることを示してい

る。

本研究によるウイルス回収および高濃縮化の達成により、イムノクロマトグラフィーやPCRなどの既存の検出法へサンプルを供する前に、本手法によりインフルエンザウイルスの濃縮を行うことで感度や確度を向上させることが可能になるものと期待される。また、最近の研究結果から、本手法により生きたままウイルスを回収、増殖することにも成功しており、将来的なワクチン製造への展開の可能性が大いに期待される。

5. 終 わ り に

本研究では、磁性体ナノ微粒子のバイオ・医療分野への応用を目的とし、プラズマと微粒子との物理的・化学的表面相互作用、さらにRFプラズマによる微粒子表面の機能性付加、ナノサイズ境界面を有する微粒子とプラズマとの表面相互作用に関する研究を行った。また、RFプラズマによるグラフェン外包鉄ナノ微粒子の表面化学修飾、およびその表面にデキストランなどの多糖類、あるいはウイルスを模擬したタンパク質に選択的に結合する糖鎖の固定化実験を行い、その効果を明らかにした。さらに、RFプラズマによりアミノ基修飾を行った磁性体ナノ微粒子の表面に、インフルエンザウイルス抗体を固定化し、磁気回収によるウイルスの濃縮効果を確認する検証実験を行った。実験結果は、10倍以上の濃縮回収を示しており、インフルエンザウイルスの選択的回収システムあるいは高速検出システムへの展開の可能性を示す結果となっている。今後は、ウイルス回収率・濃縮率のさらなる改善を図るとともに、ほかのウイルスについても本手法の適用の可能性を調べていく予定である。

謝 辞

本研究は、文部科学省科学研究費新学術領域研究「プラズマとナノ界面の相互作用に関する学術基盤の創成」(代表者：白谷正治教授)の計画研究「プラズマプロセスによる微粒子マイクロ表面のバイオ活性制御技術の開発

と医療応用」の採択をいただき、平成21年度より行ったもので、これまでの支援に厚く謝意を表します。また、本研究において作製した磁性体ナノ微粒子の磁気測定に多大なるご協力をいただきました九州大学工学研究科の木須隆暢教授に深く感謝いたします。本研究における磁性体ナノ微粒子の糖鎖固定化実験でご協力いただいた、静岡大学農学部碓氷泰市教授、創造科学技術大学院朴龍洙教授および尾形慎助教に厚く謝意を表します。また、日頃、実験で協力いただいた研究室の大学院生諸氏に感謝します。

文 献

- 1) 永津雅章：文部科学省新学術領域研究計画研究「プラズマプロセスによる微粒子マイクロ表面のバイオ活性制御技術の開発と医療応用」平成22-24年度成果報告書(2011, 2012, 2013).
- 2) Q.A. Pankhurst, N.K.T. Thanh, S.K. Jones and J. Dobson : J. Phys. D : Appl. Phys. **42**, 224001 (2009).
- 3) Q.A. Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones and J. Dobson : J. Phys. D : Appl. Phys. **36**, R167 (2003).
- 4) A-H. Lu, E.L. Salabas and F. Schuth : Angew. Chem., Int. Ed. **46**, 1222 (2007).
- 5) S. Kim, E. Shibata, R. Sergiienko and T. Nakamura : Carbon **46**, 1523 (2008).
- 6) A. Ito, M. Shinkai, H. Honda and T. Kobayashi : J. Biosci. Bioeng. **100**, 1 (2005).
- 7) C.C. Berry and A.S.G. Curtis : J. Phys. D : Appl. Phys. **36**, R198 (2003).
- 8) C.C. Berry : J. Phys. D : Appl. Phys. **42**, 224003 (2009).
- 9) M. Bystrzejewski, S. Cudzilo, A. Huczko, H. Lange, G. Soucy, G. Cota-Sanchez and W. Kaszuwara : Biomol. Eng. **24**, 555 (2007).
- 10) C. Sun, J.S.H. Lee and M.Q. Zhang : Adv. Drug Delivery Rev. **60**, 1252 (2008).
- 11) T.E. Saraswati, T. Matsuda, A. Ogino and M. Nagatsu : Diamond Relat. Mater. **20**, 359 (2011).
- 12) T.E. Saraswati, A. Ogino and M. Nagatsu : Carbon **50**, 1253 (2012).
- 13) M. Nagatsu, R.V. Bekarevich, A. Balmakov, I. Motrescu, A. Ogino, A. Murakawa and E.Y. Park : MRS Online Proc. Libr. (2012) p. 1469.