トピックス (5)

超微粒子の生物物理学的应用研究

豊 玉 英 樹

スタンレー電気筑波研究所 〒300-26 茨城県筑波郡豊里町東光台 5-9-5

(1987 年 8 月 11 日受理)

Biological and Physical Application of Ultrafine Particles

Hideki TOYOTAMA

Stanley Electric Co., Ltd. Tsukuba Research Laboratory
5-9-5 Tokodai, Toyosato-machi, Tsukuba-gun, Ibaraki-ken 300-26

(Received August 11, 1987)

Recently, we often find the terms “ultrafine particles” everywhere. Ultrafine particles have been studied for the past several ten years and its particular characteristics has been elucidated mainly on the basis of physical and/or chemical understandings.

Five years ago, ERATO's ultrafine particles research project by four laboratories was started. In a research group, for biophysical application of ultrafine particles, I studied the interactions between ultrafine particles and living cells and the development of a new method for preparing organic ultrafine particles ranged from 10 nm to several 100 nm in diameter. In this paper, I will introduce the biophysical application of UFP mainly using my results during my tenure of that project.

1. はじめに

もともと生物の世界では超微粒子の大きさの領域に入るものが多く、生体構成要素として重要な、蛋白質やその集合体、あるいは脂質からなる小胞など、生体系は有機物の超微粒子の集合体であるということもできる。生体がつくりだす金属系超微粒子のうちで、その役割が特にユニークなものとして磁気感覚に関与する磁性体の超微粒子の話がある¹⁾。これはマグネタイト (Fe_3O_4) でできた超微粒子で、走磁性細菌が菌体中に産生する。この微粒子磁石 1 個が有する磁気モーメントは $6 \times 10^{-14} \text{emu}$ 程度と見積られ、地磁気を 0.5 ガウスとすると磁気エネルギーは $3 \times 10^{-14} \text{erg}$ となる。300 K の熱ゆらぎのエネルギーは $4.1 \times 10^{-14} \text{erg}$ なので、このバクテリアは細胞中にこの粒子を数個持てば、ブラウン運動に打ち勝って、地磁気の方角に進むことができる²⁾。

生体系と超微粒子のかかわりで重要なものとして、生体外部で作られた超微粒子と生体との相互作用もある。身近なものとしては、煙草の煙やエアロゾルなど我々の

健康を脅かすものや、治療に用いる微粒子状の医薬品などがある。いずれにしても超微粒子をはじめとする各種の微粉体は塗料や顔料から医薬品、建築用材料まで我々の生活の中で幅広く使われており、無意識のうちに深くかかわっている。

本稿では、筆者が創造科学超微粒子プロジェクト在職に行なった (1) 磁性超微粒子を用いた細胞内運動の定量化の研究と、(2) 新しい有機化合物超微粒子の生成技術の開発を中心に紹介をする。

2. 磁性超微粒子による細胞内運動の定量的解析

2.1 肺磁界の測定

1973 年に MIT の D. Cohen らによって肺磁界の計測研究が始められた³⁾。具体的には、まず磁性微粒子を吸引した人間や動物の肺に約 1000 ガウスの直流磁界を作用させ、肺中の微粒子を一定の方角に磁化する。その後、ただちに生体を磁気シールド内に入れ、SQUID (Super-Conducting quantum interference device) 磁

束計を用いて、肺の外部に形成される残留磁界を計測し、肺の各部での磁性粒子の沈着量などを推定する⁴⁾。現在では、鉱山労働者や鉄工所従業員の肺汚染の検査や、スパイクタイヤが原因とされる粉塵公害の診断などに我国でも活用され始めている。

2.2 肺磁界の緩和現象と細胞内運動

ところで、上に述べたような方法で肺磁界を測定する

Fig. 1 Typical relaxation data measured of lung from a hamster which was given Fe_3O_4 particles. See text for determination of the relaxation parameter.

と、磁化後、観測される肺磁界は時間がたつにつれて減少していくことがわかった（緩和）。**Fig. 1** にわれわれのところで測定した肺磁界の典型的な緩和曲線を示す。これは直径 300 nm の Fe_3O_4 粒子を肺中に 20 μg 導入されたハムスターを使って得たものである⁵⁾。

この緩和の原因を考えると、このような短時間のうちにそれぞれの粒子の磁化が弱まることはないから、粒子が時間とともに不規則に回転していく過程であることは間違いない。肺に導入された磁性超微粒子は一定時間後には、肺の中にいる肺胞マクロファージと呼ばれる細胞の中に取り込まれていると考えられるので、緩和現象を測定することは、細胞内での微粒子の回転運動を検出していることになり、これを解析することによって、細胞内のミクロな情報を知ることができるはずである。このような考えから、磁性超微粒子を用いて細胞内運動を定量化する方法の開発を行なった。

Fig. 2 Experimental apparatus for magnetizing and measuring the monocellular layer of cultured cell.

Fig. 3 Experimental raw data of relaxation curves. Because of the baseline fluctuations, the field from the cells had to be compared with the baseline field every 3-5 seconds. Therefore during measurement, the bottle was moved back and forth over the probe (modulations seen in fig. a or b). When a few drops of formaldehyde solution added to the bottle, the relaxation was immediately stopped (b).

2.3 細胞による緩和現象の測定

Fig. 2 に測定装置の概略を示す。磁化にはコンデンサをコイルで放電する方法を用いた。ピークの磁界は3000~4000 Gauss, パルスの半減期は約 3 ms である。計測する磁界の大きさは地磁気の 1/10,000 以下であるので, 測定はパーマロイの磁気シールド内で行なった。細胞は小さいガラスビンの底に付着させ, 温度を一定にして測定した。磁気測定にはフェルスター社製のフラックスゲート型磁束計を用いた。

まず肺磁界でみられる緩和現象が細胞だけの実験系で起こることを検証する実験を行なった。ハムスターの肺に磁性粒子を導入してから1~2日後に定法により肺胞マクロファージを回収し実験に用いた。**Fig. 3(a)**に, このようにして得られた細胞磁界の緩和曲線の実例を示す。**Fig. 3(b)**では緩和の途中でホルマリンを数滴加えると, たちどころに緩和が停止することがわかる。つまり緩和は細胞が生きている状態の時のみ観られる。この実験より肺磁界でみられた緩和現象が, 細胞内の磁性粒子の不規則な動きによること, さらにこの計測方法が細胞内活動の検出法として使えることがわかった。

そこで緩和の速さを定量的に解析するために, 温度の影響をみた。緩和曲線を詳しく解析すると, 緩和の速度が単一の時定数では表現できないことがわかったので, 速さを表わすパラメータとしては, 磁化後1分間のデータを指数関数 $B_0 \cdot e^{-\lambda_0 t}$ で近似したときの λ_0 (初期緩和率) や, 磁化後1分から5分までの平均変化率 (λ) を用いた。**Fig. 4** は同一サンプルを用いて測定温度を 37°C (培養温度) から 16°C まで変化させた時に得られた

Fig. 4 Relaxation curves obtained in the magnetic field measurement of hamster (-----) and the harvested alveolar macrophage (—) at various temperature.

緩和曲線の一例である。同様の測定を数回行なって, 上に述べた λ_0 や λ についての温度依存性をまとめたものが **Fig. 5** である。図中の直線は回帰直線を表わし, これから λ_0 については 6.3 kcal/mol, λ については 8.0 kcal/mol の活性化エネルギーの値が得られた。

動物の肺から回収した肺胞マクロファージを用いて細胞内運動を定量化する方法が確立したので, つぎに, 一般の培養細胞にこの測定システムが適用できるかどうかを検討した。シャーレの中で培養している細胞の培養液の中に, 磁性超微粒子を加えると, 数10分後には, 充分磁気測定を行なえるだけの粒子を細胞に取り込むことがわかった。**Fig. 6** に, 培養細胞の J 774 に直径約 80 nm の γ - Fe_2O_3 粒子を与えてから (50 μg 粒子/ 10^5 個細胞), それぞれ 15 分後, 45 分後, 60 分後, 150 分後に磁気測定を行なった結果を示す。時間が経過するとともに緩和成分が増加し, 同時に緩和の速度が速くなっていることがわかる。緩和成分の増加は, 細胞内に取り込まれて自由に回転できるようになった粒子の数が増していることを, 速度の増大は細胞内での粒子の存在状態が時間とともに変化していることを示している。

このほかにも, この測定システムを用いて (1)代謝阻害剤によって細胞内の ATP (生体運動のエネルギー源) 濃度を下げると緩和の速度が著しく減少すること⁶⁾,

Fig. 5 Relaxation characteristics as influenced by temperature. Each symbol represent a different animal. In the data shown in the upper half, the initial relaxation rate λ_0 are plotted. In the lower half, a similar plot is shown for λ .

Fig. 6 Relaxation curves measure at different time after addition of magnetic particles. The initial value of remanent field increased with time.

(2)細胞骨格系と呼ばれているマイクロチューブルやマイクロフィラメントなど、細胞内にある繊維状の蛋白質の阻害剤によって緩和の速度が影響を受けること、(3)界面活性剤で処理をして、細胞内 ATP を洗い流した細胞モデルでは、緩和がみられないが、外から ATP を与えることによって一時的に緩和を再現することができる⁷⁾、などの結果が得られた。これらの結果はいずれも、細胞内での磁性微粒子の回転が、単なる回転ブラウン運動によるものではなく、細胞内でのエネルギーの消費を伴うアクティブな運動によって引き起こされていることを直接的あるいは間接的に証明するものである。

2.4 無機超微粒子表面の認識

多くの動物細胞は、無機、有機を問わず微粒子を細胞内に取り込むことが知られているが、その程度は粒子の種類によって大きく異なる。そして細胞の粒子表面の認識は、特異的なものと非特異的なものとに大別される。ここでは無機粒子の非特異的な認識に限って述べる。

細胞が非特異的に粒子を認識する手掛りとしては、粒子表面の親-疎水性や表面電荷が考えられている。表面電荷については、細胞表面が一般には負に荷電しているから正電荷の粒子ほど取り込みを受けやすいという報告⁸⁾がある一方、全く反対に負電荷を認識するという結果⁹⁾も報告さ混乱としている。そこでガス中蒸発法(後述)という超微粒子生成法を用いて、Ni, Cu, Ag, γ - Al_2O_3 , TiO_2 , SiO_2 , γ - Fe_2O_3 , ZnS などの超微粒子を作って、細胞の食作用を調べてみた。Fig. 7 に、シャーレ上の J 774 培養細胞に Ag-超微粒子を与えてから、5時間後に撮影した位相差光学顕微鏡写真を示す。直径

Fig. 7 Phase contrast photo-micrograph of cultured cell (J774) and Ag ultrafine particles. Ag-UFP is shown as white spot and the cell is shown as bigger dark spot in the range of microvision. The particles around the cells were absence because they were uptaken inside the cells.

約 $10\ \mu\text{m}$ の細胞の周辺に銀の超微粒子(白く見える点)がほとんど存在しない所がある。これは細胞が動きまわって、粒子を細胞内に取り込んでしまった跡である。この様にして、種々の超微粒子の食作用のされかたを顕微鏡で観察し、その結果と、水溶液中(2mMKCl, 2mM イミダゾール緩衝液 pH 7.2)でのゼータ電位の値とをまとめたものが Table 1 である。測定した粒子をゼータ電位の大きいものから順に並べると、 $\text{Cu} > \text{Ni} > \text{Fe} > \gamma\text{-Al}_2\text{O}_3 > \text{Fe}_3\text{O}_4 > \text{ZnS} > \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 > \text{TiO}_2 > \text{Ag} > \text{SiO}_2$ のようになり、 Fe_3O_4 より前のもの、つまりゼータ電位が

Table 1 Comparisons between phagocytic activity of the cell (J774) and the zeta potential of ultrafine particles measured in 2mM KCl, 2mM imidazole-HCl buffer pH 7.2 solution. In remarks, the particles prepared by gas evaporating method were presented as UFP, and chem. means chemically synthesized particles. Symbol+ means well phagocytized particles.

Particles	Mobility ($\mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$)	Zeta potential (mV)	Phagocy- tosis	Remarks
Cu	+3.12	+44.9	—	UFP
Ni	+2.94	+42.3	—	UFP
Fe	+2.36	+34.0	—	UFP
$\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	+1.87	+26.9	—	UFP
Fe_3O_4	+0.81	+11.6	+	chem.
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	-0.34	-4.9	+	UFP
ZnS	-0.46	-6.6	+	UFP
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	-0.90	-12.9	+	chem.
TiO_2	-2.23	-32.1	+	UFP
Ag	-2.95	-42.5	+	UFP
SiO_2	-3.69	-53.1	+	UFP

プラスで大きい値を示す無機微粒子は細胞はあまり取り込まないが、マイナスかあるいは小さいプラスの値を示すものは、よく取り込まれることがわかった。細胞の食作用を定量的に解析するには、それぞれの被食粒子の大きさ、形、生成法などをできるだけそろえることが要求され、多くの問題点があるがガス中蒸発法で生成した粒子は、これらの要求にある程度応じてくれるすぐれたものと思われる。

2.5 今後の発展と問題点

生体に磁性超微粒子を導入し、そこから発生する磁界の時間変化を測定することによって、細胞内部の構造に関する情報を得ようという研究について紹介した。用いる磁性粒子の改良や、実験法に関するアイデア次第では、細胞運動研究に対して、さらに発展するアプローチとなるのではないと思われる。

磁性微粒子には凝集しやすいという当然の性質があり、これが本方法における一つの問題にもなっているの、適当なコーティング法によって、分散の良い粒子ができれば利用価値は大きい。

細胞のガン化によって細胞骨格の構造が変化することが報告されており、そのような変化の検出に役立つかもしれない。また細胞内において粒子の存在する場所など、もっとミクロな情報が得られないかということも検討すべき問題である。

3. ガス中蒸発法による有機化合物超微粒子の生成

超微粒子の生成法には大別して、気相生成法、液相生成法といわれる breakdown process と呼ばれている物理的粉碎法が知られている。その中の気相生成法の一つにガス中蒸発法と呼ばれている不活性ガス中で超微粒子を生成させる方法がある。従来、この方法では金属やその酸化物など無機系の超微粒子の生成が行なわれていたが^{10,11)}、有機系化合物に対しても適用できることが明らかになり、いろいろ興味ある性質を有する有機超微粒子を生成することが可能になった¹²⁾。

3.1 方 法

真空中で金属などを加熱していくと、金属原子が蒸発し基板上で薄膜を形成することが知られている。この時、真空容器内に He や Ar などの不活性ガスを入れておくと基板には薄膜ではなく数 nm から数 10 nm の超微粒子サイズの粒子が付着する。このガス中蒸発法と呼ばれている金属超微粒子の生成法を用いて、有機化合物の超微粒子を作ることができた。生成装置の概略を Fig. 8 に示す。ガラス製の真空容器内に石英あるいはセラミックス製のるつぼを配置し、原料の有機化合物をその中に入れる。真空容器内を一度、高真空に排気した後、不活性ガスを 10^{-2} ~ 10^2 Torr 導入する。それから原料を加熱し蒸発させる。るつぼから蒸発した有機分子は不活性ガス分子と衝突しながら、超微粒子に生成して、冷却された回収基板面に付着する。

3.2 有機物超微粒子の大きさと種類

得られる超微粒子の大きさは、(1)原料の種類、(2)導入する不活性ガスの種類と圧力、(3)るつぼと回収基板との距離、(4)るつぼの温度、の組み合わせで制御することができる。ガスの圧力を高くしたり、より重いガス (He よりも Ar) を使えば、粒径は大きくなり、るつぼと回収基板との距離を長くすることでも同様の効果がでる。Fig. 9 にガス中蒸発法で生成したピレン (pyrene) 微粒子の蛍光顕微鏡写真を示す。(a), (b)と

Fig. 8 Apparatus to produce the organic ultrafine particles by gas evaporating method. 1: Bell jar, 2: Leak valve, 3: Inert gas, 4: Crucible, 5: Vacuum pump, 6: Cooled plate

a

b

20μm

Fig. 9 Fluorescent photo micrographs of pyrene ultrafine particles. Particles were produced in the atmosphere of He gas (a 0.1 Torr and b 5.0 Torr) and the temperature of crucible was kept at 150°C.

もるつば温度は 150°C, るつばと基板間距離を 20 cm に固定した時に得られたものであるが, (a) は 0.1 Torr の He ガス雰囲気下, (b) は 5.0 Torr の He ガス雰囲気下で得られたものである。平均の粒径は (a) が約 100 nm, (b) が 3.0 μm であった。基板は液体窒素で冷却したものをを用いた。ガス中蒸発法を有機物系に適用した時の特徴として, このピレンの場合で示したように, 粒径のガス圧依存性が非常に大きいということがあげられる。粒径の分布については, 金属の超微粒子などでよく知られているように, 物理的に粉碎したものなどと比べるとはるかにシャープなものが得られる。

ガス中蒸発法では, ある程度加熱することによって, 一定以上の蒸気圧を有するすべての有機化合物について超微粒子化を行なうことができる。Table 2 に, 本方法で超微粒子化を確認した有機化合物を示す。一般的傾向として分子量の大きいものほど蒸発しにくく, 超微粒子化も難かしくなってくるが, 同様の分子量を持つ物質でも, 比較的容易に超微粒子化するものと, ほんのわずかしかな生成しないものが見られる。Table 2 にも示してあ

Table 2 Some examples of organic compound confirmed to produce UFP by gas evaporating method.

Low molecular weight organic compounds	pyrene, anthracene, mero-cyanine, ferrocene, metal phthalocyanine...
High molecular weight organic compounds	polyvinylchloride, polyvinylalcohol, polyethylene, polystyrene, polyvinylcarbazole...
Medicines	phenobarbital, β-carotene, phenytoin, lidocain...

るように, 生体合成物質であっても, 加熱に対してある程度安定であれば可能である。

3.3 有機物超微粒子の特性

粒子サイズがそろっていることや, 通常の方法では得られない高純度の極く微小な粒子を生成できるほかに, 本方法による超微粒子の持つ大きな特性の 1 つに粒子表面の親水性が向上するという点があげられる。Table 2 で具体例としてあげた有機物は, バルクの時はほとんどが表面疎水性(撥水性)を示すものであるが, いずれも超微粒子化したものは水に対する分散性の著しい向上がみられた。分散の程度を調べるために, 種々の有機物超微粒子についてゼータ電位の測定を行なったところ, 大きい値を示すものでは約 -90 mV, 小さいものでも -10 mV ~ -30 mV の値を示し, 分散性が良いことを裏付ける結果が得られた。現在のところ何故か, 親水的になるのか不明であるが, 真空容器内に残存する極く微量の酸素ガスの効果なども考えられるので検討したいと考えている。Fig. 10 にポリスチレン超微粒子を蒸留水中に分散させた時のゼータ電位の分布を示す。微粒子の生成は, 蒸発温度 300°C, 1.0 Torr の He 雰囲気下で行なった

Fig. 10 Distribution of electrophoretic mobility of polystyrene ultrafine particles. Mobility was measured by Marvern Zeta-sizer II.

Fig. 11 Distribution of molecular weight of polystyrene ultrafine particles measured by GPC method. Dotted line shows the data obtained from the starting material polystyrene and real line show the distribution of UFP. UFP was produced under the condition of 0.5 Torr He and at 300°C.

(平均粒径は 230 ± 54 nm)。

この生成法のもう一つの大きな特徴として、分子量のふるい効果をあげることができる。高分子を徐々に加熱溶解させていくと、分子量の小さい分子から蒸発を始める。蒸発温度を一定に保つとある分子量以下の分子は蒸発するが、それ以上の分子量をもつものは、ほとんど蒸発できないという条件を作ることができる。**Fig. 11**に、このようにして得られたポリスチレン微粒子と原料として用いたポリエチレン樹脂の GPC 法による分子量分布の測定結果を示す。るつぼの温度を 300°C に保ち、0.5 Torr の He ガス存在下で生成を行なった。原料として用いたポリマーは分子量約 1000 と 10 万にピークを持つ幅の広い分子量分布を示しているが、得られた超微粒子は分子量約 1000 の単一の鋭いピークだけを示した。るつぼの中に残ったポリマーの粘性が非常に高いことや、分子量のピークが原料のポリマーの低分子量側のピークと一致することから、熱分解を受けて低分子量側にシフトしたのではなく、比較的小さい分子量のものが蒸発して (ふるい効果)、超微粒子を形成したものと考えられる。

これに関連して精製効果もあげることができる。つまり生成した超微粒子中に含まれている不純物の濃度が、原料中に含まれる不純物濃度よりも低下する。その原因としては、上述のように原料と不純物の蒸気圧の温度依存性が異なっているためであることがまず第一に考えられる。そして、真空容器内の不活性ガス中で微粒子が成長することから、るつぼおよび回収基板の材質や、導入するガスの純度を選ぶことによって、他の微粒子化技術では到底不可能な超高純度の有機物超微粒子を生成することができる。

Fig. 12 pH dependence of fluorescent emission spectrum of anthracene ultrafine particles. Anthracene UFP were dispersed in water and excited at 380 nm monochromatic light in a various pH conditions.

3.4 応用と発展

無機超微粒子は比表面積が著しく大きいことから、粒子の持つ全エネルギーに対する表面エネルギーの寄与が大きく、触媒をはじめ各種の吸着反応などで興味ある結果が報告されている。有機物からなる超微粒子についても同様に、分子間の相互作用が粒子表面近傍と内部では異なっている可能性があり、有機触媒、有機半導体や各種センサなどへの応用が期待される。一例として、アントラセン超微粒子の蛍光発光強度の pH 依存性を **Fig. 12** に示す。アントラセンは水に不溶の物質であるが、超微粒子化アントラセンは水に分散する。その時、溶液の pH を変化させると発光強度が可逆的に大きく変化する。pH 感受性は超微粒子表面近傍の分子の蛍光量子収量の変化によると考えられるので、表面積の著しく大きい超微粒子を用いることによってこのような大きい変化が生じたものと思われる。

また超微粒子化によって各種溶媒に対する親和性を著しく改善することができるという結果は、分散系の微粒子を扱うすべての分野への展開が期待できる。たとえば水不溶性や難溶性の医薬品などの安定な分散体を得るには、その化学構造を変化させたり、界面活性剤、安定剤やその他の溶解補助剤などを添加するなどの煩雑な処理が必要である。超微粒子化を行なうことによって、これらの処理が省略できたり、効果が高まることが期待される。そのほか、顔料、化粧品、農業、印刷、食品の分野など用途は広いものと思われる。

4. おわりに

本稿では、筆者が創造科学超微粒子プロジェクト在職中に行なった研究を中心に、超微粒子の生物・化学的応

用研究について紹介した。新技術開発事業団が行なうこのプロジェクト制度は外国のものまねでない我国独自の科学技術の芽を見つけるために計画されたもので、独立心の強い、若い研究者にとっては非常に仕事をやりやすい場を提供してくれる。ただし固有の研究所や建物を持たないシステムのため、プロジェクト内外の方々の理解や協力が不可欠であることも事実である。筆者の場合にも、東京電機大学根本助教授をはじめ産官学の多くの方々の指導や協力を受けることができたことをここに深く感謝いたします。

文 献

- 1) R. P. Blakemore: *Science* **190**, 377 (1975).
- 2) R. B. Frankel and R. P. Blakemore: *J. Magn. Material.* **15-18**, 1562 (1980).
- 3) D. Cohen: *Science* **180**, 745 (1973).
- 4) A. P. Freedman, S. E. Robinson and R. J. Johnston: *J. Occ. Med.* **22**, 613 (1980).
- 5) I. Nemoto, K. Ogura and H. Toyotama: *The Transactions of the IECE Japan* **69**, 1231 (1986).
- 6) H. Toyotama and I. Nemoto: "Biomagnetism: Application and theory" ed. H. Weinberg (Pergamon Press, 1985) p. 401.
- 7) 豊玉英樹, 根本 幾: *表面* **33**, 299 (1987).
- 8) R. van Furth: "Mononuclear Phagocytes Functional Aspect" (Martinus Nijhoff Publishers) p. 895.
- 9) R. M. Evans, P. J. A. Davis and M. Cesta: *Cancer Research* **42**, 2729 (1982).
- 10) "超微粒子" 日本化学会編 (学会出版センター, 1985).
- 11) "超微粒子" 固体物理別冊 (アグネ技術センター 1984).
- 12) 豊玉英樹: *機能材料* **6**, 44 (1987).