

枝分かれ温度応答性鎖を表面に導入した磁性ナノ粒子の調製と温度応答性

中後 朋也*1, 中原 創*2, 白石 浩平*3

Preparation of Magnetic Nanoparticles Bearing Surface-Introduced Branched Thermoresponsive Polymers and Their Thermoresponsive Behavior

Tomoya NAKAGO*1, So Nakahara*2, and Kohei SHIRAISHI*3

To accelerate thermally induced phase transition and destabilize aggregates for enhanced release of encapsulated substances upon cooling, branched poly(N-isopropylacrylamide) chains were introduced onto the surface of thermoresponsive magnetic nanoparticles (Therma-Max™). The thermoresponsive properties of the surface-grafted chains and the nanoparticles were evaluated by turbidity measurements.

Keywords: Magnetic nanoparticle, Poly(N-isopropylacrylamide), Branched thermoresponsive polymer measurements, controlled release

1. 緒言

エクソソーム(Exos)は細胞等から分泌される直径数 10 ～数 100 nm 程度の細胞外小胞であり、タンパク質や核酸などの生体分子を内包し、分泌元細胞の状態を反映することが知られている。とくに、血液中等に存在するエクソソームは、神経変性疾患やがんなどの難病において、疾患特異的情報を反映する新規バイオマーカーとしての応用が期待されている¹⁾。しかしながら、血液中におけるエクソソームの存在量は極めて低く、かつ粒径が nm スケールであることから、従来の濃縮・分離技術をそのまま適用することは困難であり、安定かつ高効率な回収手法の確立が大きな課題となっている。

温度応答性ポリマーを表面修飾した磁性ナノ粒子(Therma-Max, TM)²⁾は、下限臨界共溶温度(LCST)及び上限臨界共溶温度(UCST)をもつ温度によって、ランダムコイル/グロビュールが高速かつ可逆的に相転移する鎖を表面に導入した構造をもち、磁気/温度の両刺激によって凝集する。ターゲット分子への特異的な認識部位も導入でき、化学発光酵素免疫測定法が示され³⁾、mRNA、一本鎖 DNA、DNA 結合タンパク質等の広範な領域の活用のみならず大腸菌サイズの生物に至る分離の可能性も示されている²⁾。

Exos の分離さらには精製には様々な手法が用いられているが、サンプル汚染レベルが低い、小胞の完全性の維持、高収率、再現性、あらゆる生体液からの分離できる汎用性、1 時間以内の分離とプロセス自動化等多くの課題があり、なかでも時間と労力の削減が最大の課題⁴⁾であると考えられる。

本研究では標的 Exos 膜の構造をターゲティングする認識部位を導入可能な TM を用い、高速かつ高い汎用性さらには自動化が可能な磁気/温度分離を視野に入れ、実 Exos の分離・濃縮に先立って、Exos モデルとしての数 10 nm サイズの表面負電荷微粒子を用いた回収を検討した。ここでは、現行 TM よりも磁気/温度濃縮速度を向上させるため、温度応答性ゲルの応答を加速した枝分かれ構造をもつ温度応答性ポリマーを表面に導入した新規 TM を調製し、感温性を比較検討した。

2. 実験

2-1. 試薬

TM は(株)SEGNOS 提供品をそのまま使用した。Dextran Magnetite(DM;(株)キノスラ・ラボ提供品)をそのまま使用した。N-Isopropylacrylamide(NIPAM;東京化成工業(株))を

原稿受付 2026 年 3 月 31 日

*1 近畿大学大学院 システム工学研究科 システム工学専攻 博士後期課程 (〒739-2116 東広島市高屋うめの辺 1 番)

*2 近畿大学工学部 化学生命工学科 (〒739-2116 東広島市高屋うめの辺 1 番)

*3 近畿大学工学部 化学生命工学科, 大学院システム工学研究科, 次世代基盤技術研究所 教授 (〒739-2116 東広島市高屋うめの辺 1 番) E-mail siraisi@hiro.kindai.ac.jp 連絡先: 白石浩平 (研究代表者)

DOI: 10.15100/0002004696

トルエンから再結晶して使用し多. 2,2'-Azobis(isobutyronitrile) (AIBN)はメタノールから再結晶して使用した. 2-Aminoethanethiol (AESH)(東京化成工業(株)) N-(3-Amino-propyl)methacrylamide hydrochloride (Polyscience, USA), N-t-Butylacrylamide(富士フイルム Dimethylformamide (DMF)中, 75°Cにて 15 h 反応を和光純薬(株), Ammonium persulfate(APS; Sigma-Aldrich, USA), N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TMEA; 富士フイルム和光純薬(株)), 溶媒類はそのまま使用した.

連鎖移動剤 2-Aminoethanethiol (AESH), 開始剤として 2,2'-Azobis(isobutyronitrile) (AIBN)を用いて行った. 反応後, DMF を濃縮後, Diethyl Ether 中で再沈殿を繰り返し精製した. 真空乾燥後, 得られたアミノ基末端 Poly(NIPAM)に対し, N-Succinimidyl Acrylate を用いて DMF 中, 4°C, 2 days 反応させ, 末端にアクリレート基を導入した. 反応後, 再度 Diethyl Ether 中で再沈殿を繰り返すことで, 生成物を精製した. 再沈殿後は真空乾燥を行い, 溶媒の除去を行った. 収率 77%.

2-2 Poly(NIPAM) マクロモノマー合成

Poly(NIPAM)マクロモノマーの合成は既報⁵⁾に従って, 調製及び精製・単離した. 収率;77%

2-3 枝分かれ Poly(NIPAM) 鎖の調製

蒸留水に NIPAM に対して重量比 6.3%の 2-2 で調製した NIPAM マクロモノマー, 7.5%の N-t-butylacrylamide, 3.2% の N-(3-Aminopropyl)methacrylamide hydrochloride, 触媒量の APS と TMEA を後添加して, 室温で反応した. その後, 遠心分離して上清を除いて, 未反応モノマー等を除いた. 本精製は3回行った. 溶液を 1mL 採取して乾燥重量から収率を求めた. 収率 58%

2-4 枝分かれ Poly(NIPAM) をもつ磁性ナノ粒子(TM-g)の調製

DM([Fe]=2.0 mg/mL)240 mL を用い既報⁶⁾の Polyethyleneimine の代わりに 2-3 で調製した枝分かれ Poly(NIPAM)(10 mg/mL)160 mL を反応させた. TM-g の動的光散乱法から, 平均粒径 116 nm, Fe 濃度 0.4 mg/mL 水溶液に濃度調製し測定に供した.

2-5. 温度応答性の評価

紫外可視分光光度計(UV-1800 : (株)島津製作所製)の吸光度セル周囲に 60°C 温水を循環させ一定とした. Alumel/Chromel(線径 0.076 mm : 石川産業(株))を撚り線とした熱電対線を温度補正後に石製セル内の水溶液に直接投入して測温しながら, 濁度変化から温度応答性を評価した.

2-6. TM 中の鉄イオンの定量

TM 試料を塩酸煮沸処理後, 塩化 Hydroxyammonium 溶液, 1.10-phenanthroline 溶液を用いて, アンモニア,

酢酸緩衝液を加えて発色させ, 既知の鉄濃度で予め作成した検量線から Fe 濃度を定量した.

2-7. 動的光散乱法による粒子径測定

動的光散乱測定装置 (FPAR-1000AS ; 大塚電子(株)製)を用いて, 各サンプルの粒子径を測定した. 測定時間 300 秒, 光量調製 なし, 繰返し回数 1 回, 測定前待ち時間 300 秒, 測定間待ち時間 300 秒, 室温 25°C で実施した.

2-8 NMR 測定

日本電子(株)製共鳴周波数 400MHz の JNM-ECS SeriesFTNMR 装置を用いて, ¹H-NMR, ¹³C-NMR (プロトンデカップリング BCM 法)は Tetramethylsilane を内部標準とし, それぞれ濃度 1wt%, 8wt%で CDCl₃ 中, 室温で測定した.

3. 結果と考察

3-1. Poly(NIPAM) マクロモノマーの合成

2-3 項で調製した Poly(NIPAM)マクロモノマーの ¹H-NMR を ¹³C-NMR それぞれを Fig.1, Fig.2 に示す.

いずれのスペクトルにも末端に重合性 Acyloyl 基に帰属される明確なピークを確認できマクロモノマーの調製を確認した. 末端 Acyloyl 基と Poly(NIPAM)中の isopropyl 基プロトンの面積比からの数平均分子量は約 11,000 と見積もられた. 既報⁵⁾での Tetrahydrofuran 中 Poly(styrene)標準 SEC の結果 14,000 とほぼ同等であると考えられる.

3-2. Poly(NIPAM) グラフト鎖をもつ TM-g の調製

TM-g の調製後の Fe 濃度は 0.99 mg/mL で通常調製 TM(1.1 mg/mL)とほぼ同程度であった. また, 動的光散乱測定による粒径も 100 nm と通常 TM(108 nm)とほぼ同じとなり, グラフト鎖導入が通常 TM 調製と同様に進化したと考える.

3-3. グラフト鎖をもつ Poly(NIPAM) [Poly(NIPAM)-g] と TM-g の温度応答性評価

Poly(NIPAM)-g と磁性ナノ粒子表面導入した TM-g をグラフト鎖のない Poly(NIPAM)と TM との濁度法による温度応答性を比較した. Poly(NIPAM)は液温約 28°C で相転移が始まり, T%の低下の終了は 100 sec であった. 一方, Poly(NIPAM)-g の相転移温度はほぼ同じであるが, T%の低下は速く 80 sec 程度となった (Fig.3). これは, 枝分かれ Poly(NIPAM)の導入のためで, 枝分かれによって Poly(NIPAM)鎖の凝集が促進されたと考える. 次にこれらの鎖を表面に導入した TM 及び TM-g の濁度変化を Fig.4 に示す. TM-g の濃度は定量された TM-g の Fe 濃度一定で測定に供した. TM および TM-g とともに相転移温度はいずれも 27°C で, それぞれの Poly(NIPAM)鎖単独よりも低下した. これは, TM 表面の Poly(NIPAM)鎖が温度刺激による凝集のため, TM 表面のヒドロゲル水和層

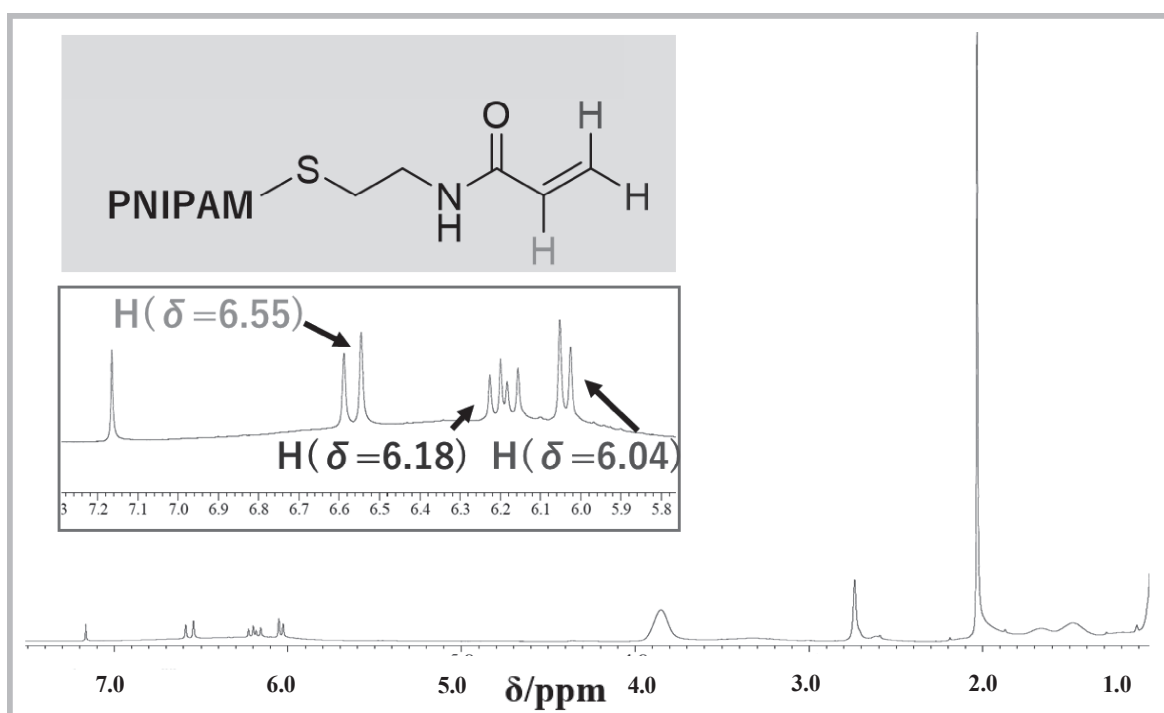


Fig. 1 ^1H -NMR spectrum of Poly(NIPAM) macromonomer in CDCl_3

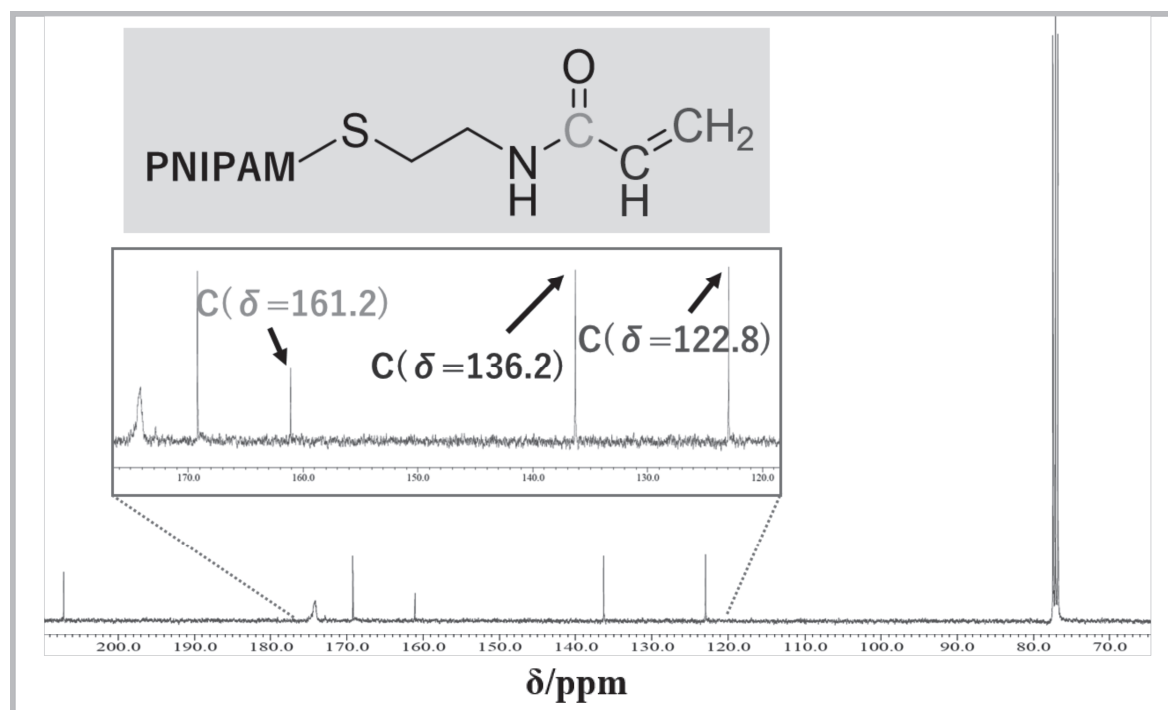


Fig. 2 ^{13}C -NMR spectrum of Poly(NIPAM) macromonomer in CDCl_3

が破壊され、TM 間の分散安定性の低下により凝集したためと考える。一方、凝集速度は TM-g が TM よりも低下している。TM 表面に固定化された Poly(NIPAM)-g 鎖は Poly(NIPAM)鎖よりも枝分かれ鎖によって、表面の水和圏が枝分かれのない Poly(NIPAM)鎖よりも厚く、相転移

による TM 表面性状の疎水化の遅延を推定するが、光散乱計測等のさらに詳細に解析が必要であると考えられる。相転移によって刺激による TM ターゲティングでも同様な傾向を認めている。また、TM による各種ターゲット種の分離・濃縮時は、各種塩、タンパク質等の生体成分等の影

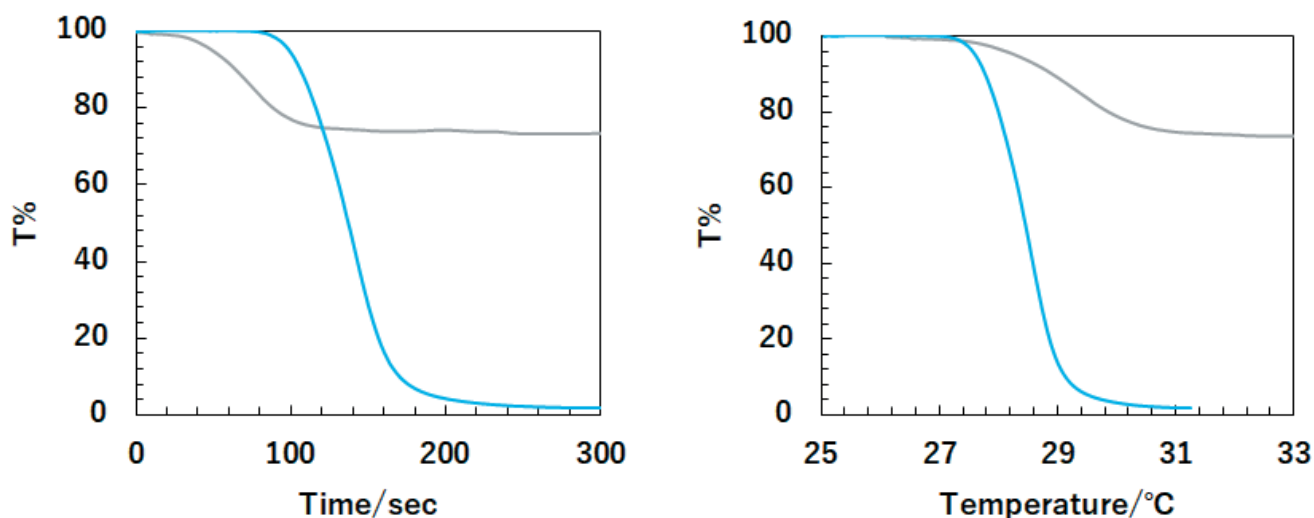


Fig.3 Tubidity change of Poly(NIPAM) (---) and Poly(NIPAM)-g (---) in aqueous solution in response to temperature from r.t. to 60°C.

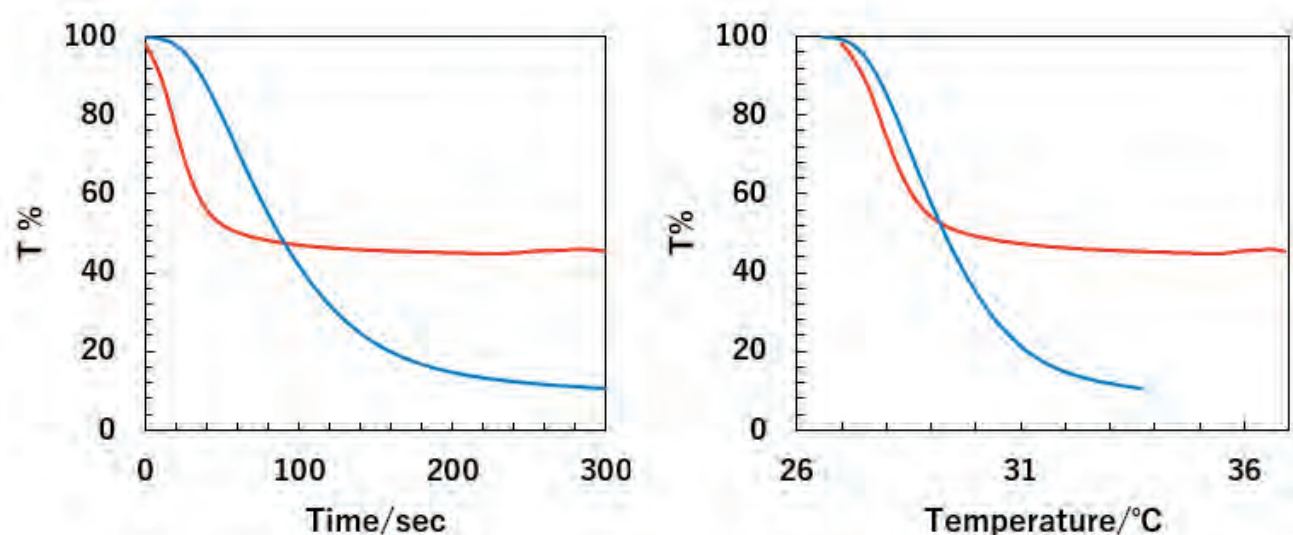
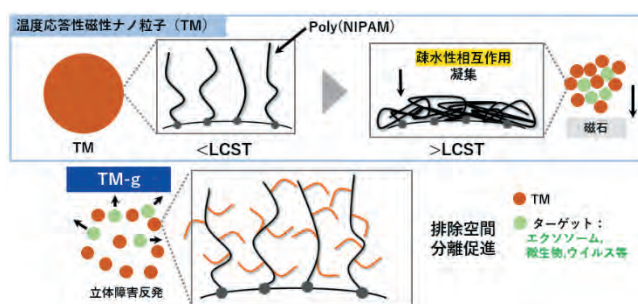


Fig.4 Tubidity change of TM (---) and TM-g (---) in aqueous solution in response to temperature from r.t. to 60°C. [Fe]=0.4mg/mL

響もあり、さらに詳細な温度応答性の検討が必要になると考えられる。Scheme1 に 枝分かれ鎖導入による表面性状変化の模式図を示す。枝分かれ鎖は表面に固定化する Poly(NIPAM)鎖がある程度多ければ、枝分かれのない Poly(NIPAM)鎖の固定化表面よりも鎖反発や排除空間も大きくなる。エクソソーム、微生物、ウイルス等のターゲット種の分離・濃縮後の回収時には、磁気印加下で、TM の凝集を保持したまま、系内温度を低下させ、表面 Poly(NIPAM)鎖を水和状態にすることによる回収が可能になると考える。このとき、排除空間の大小はターゲット種の回収に影響し、枝分かれ Poly(NIPAM)鎖の導入が回収率の向上することを期待される。



Scheme 1. Changes in the surface properties of temperature-responsive magnetic nanoparticle with introduced branched Poly(NIPAM) chains

参考文献

- 1) M. D. A. Paskeh, M. Entezari, S. Mirzaei, A. Zabolian, H. Saleki, M.J. Naghdi, S. Sabet, M. A. Khoshbakht, M. Hashemi, K. Hushmandi, G. Sethi, A. Zarrabi, A. P. Kumar, S. C. Tan, M. Papadakis, A. Alexiou, M. A. Islam, E. Mostafavi and M. Ashrafizadeh, *J. Hematol. Oncol.* 2022, **15(83)**, DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01305-4>
- 2) 大西徳幸, 古川裕孝, 近藤昭彦, 応用物理, **72(7)**, 909 (2003)
- 3) X. Xie, N. Ohnishi, Y. Takahashi, and T. Kondo, *J. Magnet Magetic Mat.*, **321(10)**, 1686 (2009).
- 4) E. I. Yakubovicha, A. G. Polischouka, and V. I. Evtushenkoa, *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, **16(2)**, 115(2022).
- 5) R. Yoshida, K. Uchida, Y. Kaneko, K. Sakai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, and T. Okano, *Nature*, **374(16)**, 240(1995)
- 6) M. S. Angga, B. Malla, S. Raya, A. Kitano, X. Xie, H. Saitoh, N. Ohnishi and E. Haramoto, *Science of The Total Enviroment*, **848(20)**, 157613(2022).

謝辞

本研究を実施するにあたり，サンプル供与等に係わり，
(株)SEGNOS 大西徳幸氏，同大西瀬連氏，(株)キノスラ・
ラボ山本竜太氏に深く感謝致します。