

熱応答性磁性ナノ粒子 (Therma-Max[®]) の開発とその実用化

～産学連携がもたらした若手研究者たちの挑戦～

マグナビート株式会社¹、神戸大学²

大西徳幸¹、畑英之¹、王景明¹、近藤昭彦²

1. 緒言

1990年、米国でスタートしたヒトゲノム解析計画は当初の予定より大幅に早く、2000年には大まかな解析は終了し、現在はそのゲノム情報から生命現象の解明において細胞や組織で発現するRNAの総体の解析(トランスクリプトミクス)、たんぱく質の網羅的な解析(プロテオミクス)と、ポストゲノムシーケンスの時代を迎えている。

また、2001年に米国のクリントン前大統領により発表された「ナショナル・ナノテクノロジー・イニシアティブ」を皮切りに、その翌年には日本でも経済産業省を軸にナノテクノロジープログラム、さらに翌年には文部科学省よりナノテクノロジー支援プロジェクトが発足するなど、ナノテクノロジーに対する期待も高まっている。

さらに近年、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの融合領域であるナノバイオテクノロジーへの期待も高まっており、ナノ粒子を含めた微粒子(磁気ビーズ、ラテックスビーズ等)を積極的にポストゲノムシーケンスに利用する動きが高まっている。

具体的には酵素や抗体、DNA等が固定化された微粒子は、酵素反応、免疫沈降、DNA精製のようなバイオテクノロジーの分野に多く利用され研究されている。これらの研究で使用されている微粒子の中でも特に、粒径が数ミクロンの磁気ビーズが頻繁に使用されているが、磁気ビーズの分子認識性の向上には、その表面積がより大きいほうが有利である。単位体積あたりの磁気ビーズの表面積をより大きくするにはその粒径をより小さくすれば効果的であるが一方、磁気ビーズの粒径が数百ナノメートル以下になると磁気ビーズ自体

の磁性が弱まり、さらに水に対するブラウン運動の影響で磁石による磁気分離が極めて困難になる。このジレンマを解決するために、我々は粒径が数十ナノメートルの磁性ナノ粒子の表層に熱応答性高分子を固定化した熱応答性磁性ナノ粒子¹⁾

(商標名: Therma-Max[®])

(サーマ・マックス)の

開発を行なった(図1)。

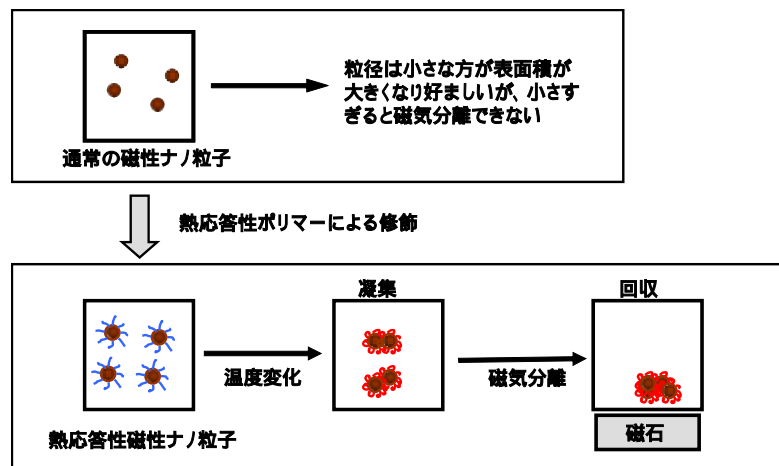


図1. Therma-Maxの開発コンセプト

その結果、僅かな温度変化による熱応答性高分子の相分離を利用して磁性ナノ粒子を凝集させる事により、磁石による磁気分離を可能とした。Therma-Max の革新的な概念を元に、従来の磁気ビーズでは不可能とされていた高感度でかつ迅速な磁気分離を世界に先駆けて成功した。また平成 17 年 7 月に日本では初めてとなる、神戸大学とチッソ間の産学ジョイントベンチャーである【マグナビート株式会社】を創業するに至った。

本稿では Therma-Max の開発とそのバイオ領域への応用について述べるとともに、Therma-Max の革新的な技術革命による社会的な波及効果について述べる。

2. 従来の技術と課題

抗体を表層に固定化した磁気ビーズ（免疫磁気ビーズ）を用いると、ラテックスビーズのような非磁性のビーズやアフィニティーカラムクロマトと比較して抗原の精製が迅速かつ簡便に行える。その理由はラテックスビーズは遠心分離と洗浄操作を繰り返すことによりにより抗原の精製を行い、一方アフィニティーカラムクロマトでは大量の溶媒を必要とするが、磁気ビーズはこのような煩雑な操作は全く必要がなく、磁石で容易にビーズを分離出来るからである。

免疫磁気ビーズによる抗原の精製は、遠心分離や大量の溶媒を必要としないことから機械を用いた自動化にも優れているため近年、免疫診断（サンドイッチ法）の担体として免疫磁気ビーズは頻繁に利用されている。（図 2）。

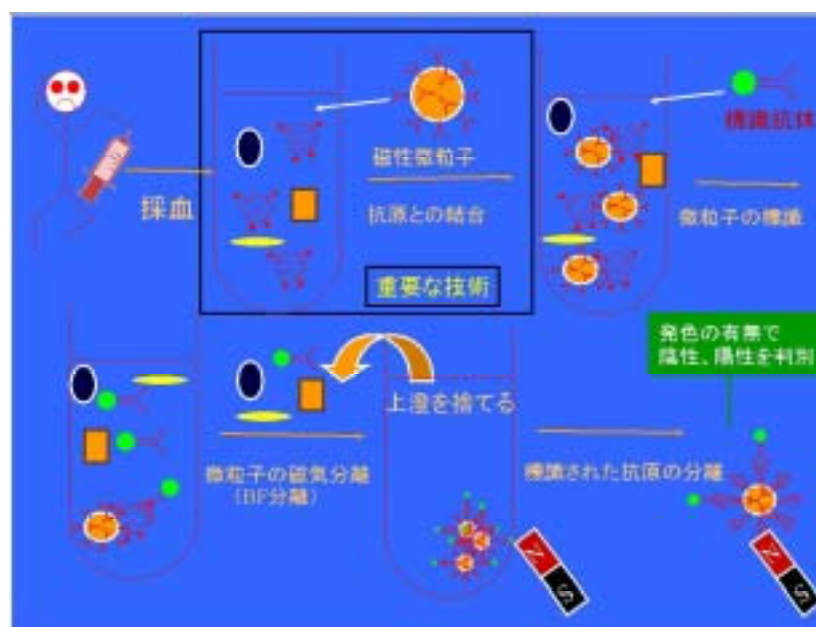


図 2. サンドイッチ法による免疫磁気ビーズを用いた標識免疫測定

検体に特定の抗原が存在した場合、抗原は抗体が固定化された磁気ビーズに吸着される。吸着後、標識（発色団等）された抗体（二次抗体）を加え、標識された複合磁気ビーズと過剰の標識抗体及び共雑物を磁石で分離する（BF 分離）。標識された複合磁気ビーズの標識部を分光工学的な手法等を用いて抗原の定量を行う。より高感度で短時間に診断を行うためには、この磁気

ビーズと抗原との認識効率（図中の黒枠）が最も重要な技術となる。

一方、診断薬メーカーでは免疫診断の高感度化の検討を行っている。高感度化で最も重要となるのが磁気ビーズを含めた抗体を固定化した担体の性能である。磁気ビーズの感度の向上には、その表面積がより大きいほうが有利である（より多くの抗体を固定化出来るため）。即ちその粒径をより小さくする事により高感度化が可能であるが一方、磁気ビーズの粒径が数百ナノメートル以下になると磁気ビーズの磁性が弱まり、さらに水に対するブラウン運動の影響を強く受け磁石による磁気分離が極めて困難になる。

その結果現在では磁石による磁気分離が可能な磁気ビーズとして粒径が数ミクロンの磁気ビーズが免疫診断において多用されている。

3. 熱応答性磁性ナノ粒子（Therma-Max®）の開発

熱応答性高分子の一種である水溶液中で下限臨界溶液温度（LCST）を示すポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを磁性ナノ粒子の表層に固定化する事により、水溶液中で LCST を示す Therma-Max（水温を上げると凝集し、下げると再分散する）を開発した²⁾。さらに熱に対して不安定なたんぱく質等、バイオ分野への応用を考慮場合し、LCST を示す Therma-Max の特性とは逆に温度を下げると凝集分離が可能な上限臨界溶液温度（UCST）を示す Therma-Max の開発にも成功した^{3) 4)}。（図 3）

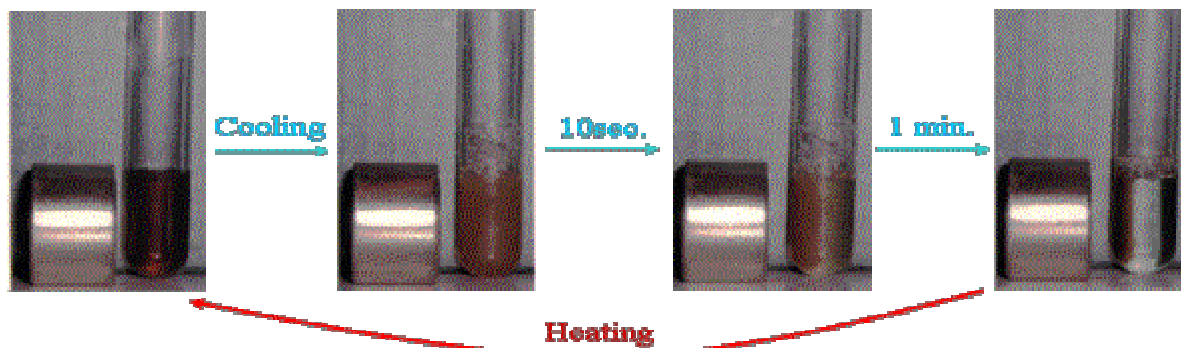
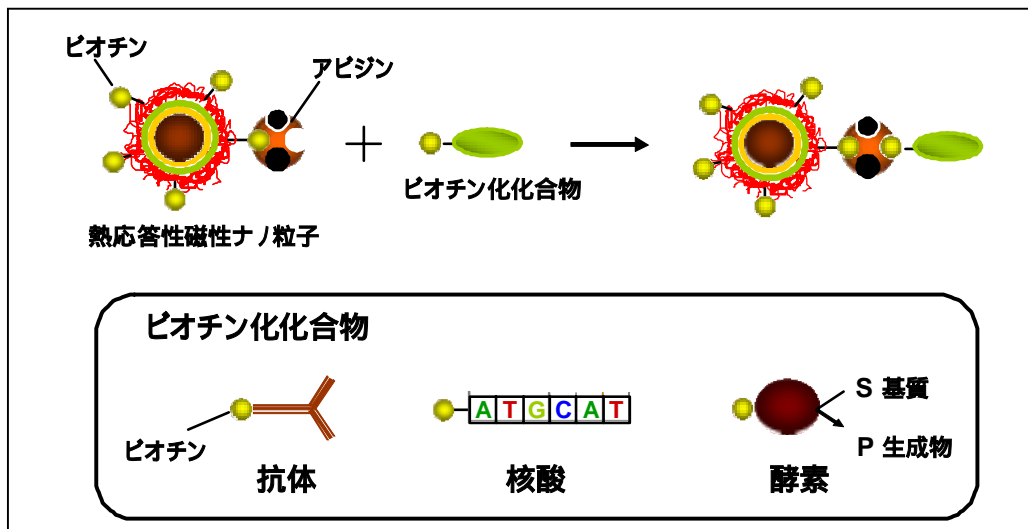


図 3. Therma-Max の温度変化による相転移挙動と磁石を用いた磁気分離

さらに現在、Therma-Max シリーズとしては UCST タイプ、LCST タイプ、それぞれに官能基としてアビジンに加えて、カルボン酸、アミノ基、プロテイン A、プロテイン G を開発するに至っている。

4. Therma-Max®の応用

Therma-Max 表層にはビオチンが固定化されているため、目的とする抗体等をビオチン化することにより、アビジンを会して水溶液中で Therma-Max と混合するだけで容易に、目的とする抗体等を Therma-Max 表層に固定化する事が出来る（図 4）。



応用例 1 具体的な応用例として大腸菌に対するビオチン化抗体を用いて、その分離効率を Thermo-Max と粒径が数ミクロンの市販の磁気ビーズとの比較を行なった。磁気分離を行った後の上澄液中の大腸菌と磁気ビーズに結合した大腸菌数をプレート法で測定した。

ミクロンサイズの磁気ビーズの場合、分離後の上澄みに多数の大腸菌が残って回収率は低かったが、Thermo-Max を用いた場合には、大腸菌をほぼ完全に磁気分離で濃縮することが出来た (図5)。

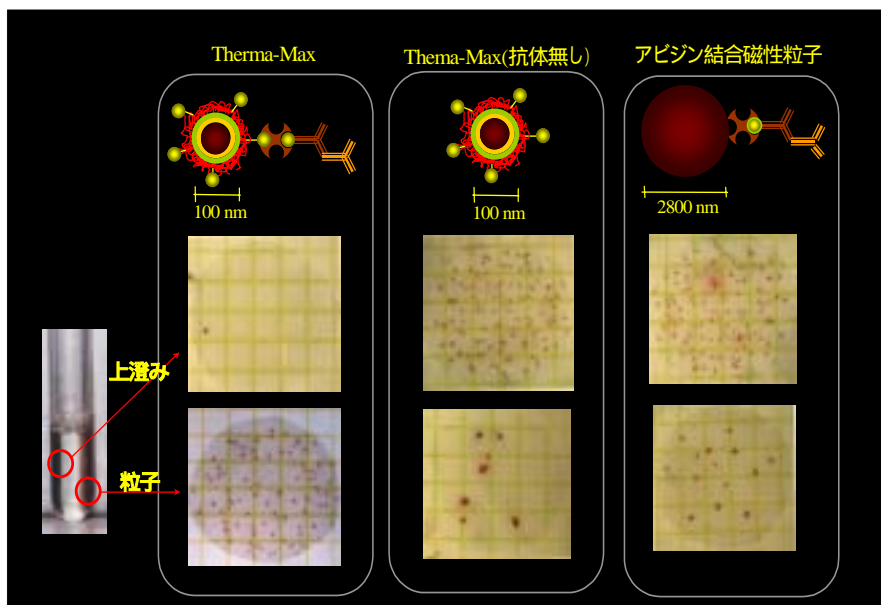


図5. Thermo-Max と市販の磁気ビーズを用いた大腸菌の分離特性の違い
市販のアビジン磁気ビーズでは大腸菌は上澄み液に大量に残っているが (図右上)、Thermo-Max を用いた場合は上澄み液には残っていない (図左下)。

応用例 2 Therma-Max にグルタチオン (GSH) を固定化し、GST の分離特性を市販のグルタチオン固定化セファロースビーズ (粒径：数ミクロン) と比較検討を行なった。

従来のセファロースビーズでは GST を認識するための平衡時間は約 60 分を必要とするのに対して Therma-Max の粒径は約 90 ナノメートルと小さいため、数分で平衡に達する。短時間で処理する必要があるタンパク質の分離精製に Therma-Max は非常に有効な手段であること確認された (図 6)。

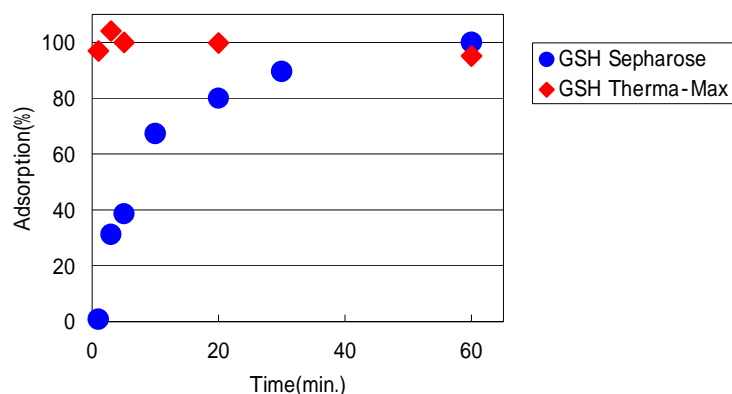


図 6. GSH を固定化したセファロースビーズと Therma-Max の GST 吸着能の比較

5. まとめ (競合技術と比較しての Therma-Max[®]の独創性、新規性)

Therma-Max はその粒径が 90 ナノメートルと小さいため、従来使用されているミクロンサイズの磁気ビーズやラテックスビーズに比べて分子認識性が格段に向上した。更にわずかな温度変化で素早く凝集するため磁石による回収も容易に行う事が可能となった。その結果、従来の分析法で使用されている磁気ビーズやラテックスビーズ等を Therma-Max に置き換えるだけで大幅な感度アップと測定時間の短縮が見込まれる。

以下 Therma-Max の独創性、新規性について磁気ビーズを含めた競合技術と比較すると、

①市販の磁気ビーズ (粒径がミクロンサイズ) との比較では

Therma-Max は粒径が 90 ナノメートルと非常に小さいので、

1. バインディングキャパシティーが上がる (5倍以上)。
2. タンパク質精製等の処理時間が大幅に短縮 (30分→30秒)。
3. 細胞分離に使用した場合、細胞に対する負荷が非常に小さい。
4. 磁気分離を行った後の再分散性が良好。→洗浄操作が容易

Therma-Max の表層は非常に親水処理をしているので、

1. 非特異的吸着が非常に少ない。
2. 水に対する分散性が非常に高いため自然沈降しない。→自動化に最適

- ②勾配磁気分離法等の磁性ナノ粒子と磁気カラムを用いた磁気ビーズとの比較では
1. 磁気カラムは不要（温度変化を行うことで直接磁石による分離が可能のため）。
 2. 磁気カラムへの詰まりを回避できるため目的物質の習得のロスがない。
- ③セファロースビーズやカラムクロマトグラフィーとの比較では
Therma-Max は磁性ビーズなので上記優位性に加えて
1. 磁石による迅速分離が可能のため、遠心分離が不要。
 2. カラムなどへの充填作業が不要でバッチ処理が出来る。

と、既存の分離技術と比較してして全ての分離性能面で圧倒的に優位であり、**Therma-Max** は磁気ビーズ市場のみならず、クロマト市場全体のパラダイムシフトを引き起こすであろうと考えている。

〔おわりに〕

Therma-Max は図 7 に示したように様々なサイエンスが融合して完成したインテリジェント材料である。

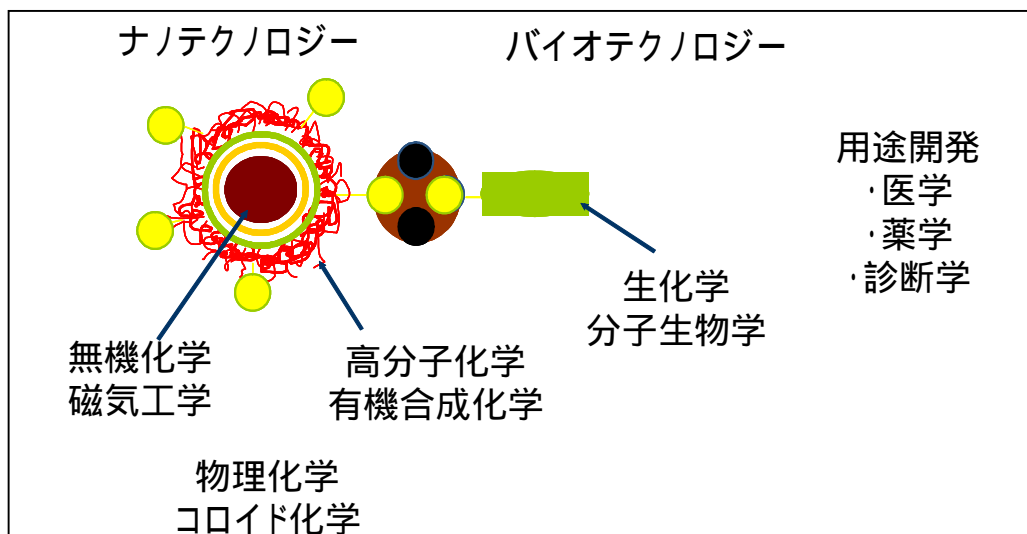


図 7. **Therma-Max** に関わるサイエンス

この技術を完成するにあたっては多数の大学の先生方の技術指導が無くしては決して達成するものでは無かったことを最後に書き記しておきたいと思う。またこの技術の完成により、改めて産学連携の重要性が再認識され世界に向けて日本の、ものづくりに対するエンジニアの技術力の高さが評価されることに弊社の技術が微力でも貢献できれば幸いである。

本研究開発は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の助成により産業技術実用化開発補助事業で行われたものである。

〔参考文献〕

- 1) 大西徳幸： バイオサイエンスとインダストリー、60, 175 (2002)
- 2) Kondo A. et al: Appl. Microbaio. Biotechnol(1994), 41, 99-105
- 3) 大西徳幸： Polym. Prepr. Jpn., 47, 2359 (1998)
- 4) Ohnishi N. et all, NanoBiotechnology, (in press).

【出願リスト】

- | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1. 特開 2005-082538 | 2. 特開 2005-060244 | 3. 特開 2004-201648 |
| 4. 特開 2002-226362 | 5. 特開 2002-223793 | 6. 特開 2002-060436 |
| 7. 特開 2000-086729 | 8. 特開平 11-263760 | 9. 特開平 11-255839 |
| 10. 特開平 11-255831 | 11. 特開平 11-171928 | 12. 特開平 11-171846 |

【メディアでの紹介】

1. 毎日新聞、読売新聞、日経新聞、日刊工業新聞、化学工業日報他多数紹介
2004年4月15日
紹介内容：バイオビジネスコンペ JAPAN 最優秀賞受賞
2. ウイクリー千葉・ニュースCマスター（千葉テレビ）
2004年4月22日
紹介内容：大西社長・千葉県科学技術功労者表彰受賞
3. 日本経済新聞
2006年6月14日 第43257号、15面
紹介内容：マグナビート共同研究の事業化・チッソから神戸大へ寄付形式で株式取得
4. 日本経済産業新聞
2006年6月20日 17面
紹介内容：マグナビート、たんぱく質試薬を本格販売