

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790031

研究課題名 (和文) ナノ物質の高効率・高精度な分離精製法の開発

研究課題名 (英文) Development of an efficient and precise separation method for nano materials

研究代表者

加藤 大 (KATO MASARU)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任准教授

研究者番号：30332943

研究成果の概要：

ナノテクノロジーの進展により、優れたナノ物質が開発され注目を集めているが、高効率な分離精製法は報告されていなかった。我々は、カーボンナノチューブ (CNT) やアミロイドβなどのナノ物質の高精度な分離法を開発し、さらに分離したナノ物質 1 個の構造決定に成功した。分析法の開発と共に、溶媒に分散しないため分離することが難しい CNT を溶液や乾固した状態で安定に孤立分散させる方法を開発した。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分離科学、ナノ物質、ナノバイオ、電気泳動、クロマトグラフィー、βアミロイド、ナノカーボン、アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

2000 年のクリントン元大統領の一般教書演説と、米国での国家ナノテクノロジーイニシアチブの開始以来、ナノテクノロジーが一躍注目を集め、科学技術の最もホットな話題の一つになっている。そして現在では、ナノテクノロジーを利用した商品が次々と開発され市販されるようになり、その恩恵を実感できるようになってきている。しかし現時点で、実用化されているこれらの商品の中には、

医薬品などの生体内に投与する物質は存在していない。その原因の一つには、医薬品は承認までに時間がかかるため、まだ認可が得られず市場に投入できないという原因以外にも、ナノメートルサイズの物質 (ナノ物質) の安全性を正確に評価する手法が存在しないことも原因であると考えられる。そこで本研究では、ナノ物質の優れた分離分析法の開発を行う。

2. 研究の目的

現在、医薬品等での実用化を目指し高精度な手法でナノ物質が調製されている。これらの上市にあたりナノ物質を分析し、製品の品質を保証する必要がある。さらに生体内に投与される医薬品の場合には、動態や安全性の評価が必要不可欠であることから、生体試料等の混合試料中に存在するナノ物質の分離分析法の開発が渴望されている。そこで本研究では、ナノ物質の分離分析法の開発を行った。

3. 研究の方法

(1)カーボンナノチューブ (CNT) の分散

CNT を水に分散させるために新たな分散剤としてトリフェニレン誘導体に注目した。分散剤のトリフェニレン骨格がCNTの表面と π - π 相互作用により、また分散剤のアルキル直鎖が π -アルキル相互作用によってCNT表面に巻きつくと期待された。分散剤のアルキル末端にある6個のカルボン酸が水との分散に利用されると予想される。そこで分散剤を溶解した水溶液をCNTと混合し、バス型の超音波発生装置で超音波を照射することで分散を行った。バンドル化したCNTを除き、孤立分散したCNTのみを得るために、さらに分散溶液を超遠心 (396,000g) 処理した。分散したCNTの評価には、吸光もしくは発光分析を用いた。

(2)CNT の分離

CNT の分散液をキャピラリー電気泳動 (P/ACE System MDQ, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) を用いて分離した。分離には、全長 100cm、内径 100mm のフューズドシリカキャピラリーを用い、泳動液には Gly-NaOH 緩衝液を、印加電圧は 30kV とした。分離した各フラクションをガラス基板に分取し、乾燥後、各フラクションを顕微ラマン分光計 (LabRAM HR-800, LabRAM ARAMIS systems, HORIBA Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) とプローブ顕微鏡 (NanoWizard, JPK Instrument, Berlin, Germany) で測定することで、各フラクションに存在するCNTを同定した。

(3)アミロイド線維の分離

42 アミノ酸よりなる β アミロイドを試料とし、37°Cに加熱することで重合反応を進行させた。泳動液にチオフラビン T を添加することで、 β シート構造を形成した重合体のみを選択的に検出した。検出には、レーザー励起蛍光検出法を用いた。

4. 研究成果

(1)CNT の分散

CNT は自身の大きなファンデルワールス相

互作用によって凝集し易く、また溶媒和が非常に困難である。そこでまず始めに、CNT の水溶液への分散法を検討した。凝集を防いだ状態で CNT を水溶液に孤立分散するために、図 1 に示すトリフェニレン誘導体を開発した。本分散剤を用いることで、CNT は水溶液中で安定に孤立分散した。また、分散溶液を凍結乾燥や再分散を繰り返しても吸収スペクトルに変化が見られなかったことから、本分散剤によって分散したCNTは乾燥や再分散により凝集せず、安定に孤立分散状態を維持

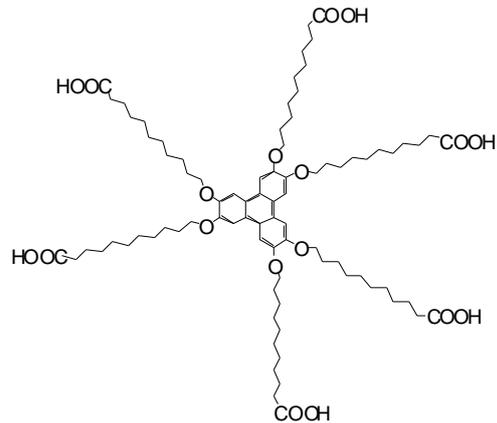


図 1 CNT の分散剤

していることが示唆された。さらにリンカー部位のアルキル鎖長を変化させることで、分散され易いCNTの太さが増加した。例えば、アルキル鎖長を短くすると細いCNTの方が、逆にアルキル鎖長を長くすると太いCNTの方が分散され易かった。以上より、本分散剤を用いることで、溶液や固体状態でCNTを安定に孤立分散させることが可能であり、アルキル鎖長を調節することで分散され易いCNTの太さを制御することができた。

(2)CNT の分離

我々は、ナノファイバー類を分析するために、高分離能を有するキャピラリー電気泳動 (CE) で分離した超微量な試料を正確に分取し、評価するシステムを構築した。分取には、多数の円形の親水部 (直径 1mm) を持つ撥水性のスライドガラス (図 2) を用いることで、数 100nL のフラクションの分取を可能にした。分取したフラクションをスライドガラス上で乾固した後、ラマン分光やプローブ顕微鏡

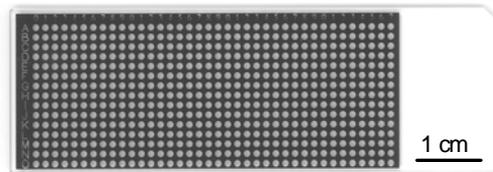


図 2 分取用プレート

でナノファイバー類を分析した。乾燥の過程でナノファイバー類は濃縮されるため、微量の試料を高感度に検出することができた。

CEで分離したCNTをラマン分光やプローブ顕微鏡で分析した結果、CNT 1本に由来する信号が検出され、さらにそれぞれの太さ、長さ、キラリティ等の同定が可能であった。本分離条件ではCNTは太さに基づいて分離され、細かいCNTほど早く泳動される傾向が見られ、直径が僅か0.02nm異なるCNTが分離された。

以上より、ナノファイバーを微細な構造の違いに基づいて分離し、さらに分離されたナノファイバー1本の構造を正確に決定することが可能な手法を開発した。本手法は、試料の構造をナノメートルスケールで正確に決定できることから、ナノファイバーを始めとした各種ナノ物質の高精度な分離分析への応用が期待される。

(3) アミロイド線維の分離

アルツハイマー病、プリオン病、ハンチントン病、パーキンソン病などの重要な神経変性疾患や各種の全身性アミロイドーシスでは、タンパク質が本来の生理的構造から逸脱し、異常あるいは病的構造をとり、細胞内での凝集体や細胞外でのアミロイド線維を形成することによって、細胞機能に様々な不都合をもたらされるという共通した病態を呈する。これらの異常構造を形成したタンパク質の大きさは、ナノからマイクロメートルサイズであり、既存の手法では迅速にその微細構造の違いで分離分析することが難しかった。

アミロイド線維は、CNTと同様にナノサイズのファイバー構造を有することから、上記の検討で開発したCNTの分離法を用いてアミロイド重合体の分離を試みた。アミロイド重合体を高感度に検出するために蛍光試薬であるThioflavin T(ThT)とレーザー光源を用いた。ThTは、 β シート構造を有するタンパク質重合体と結合すると蛍光波長が変化するため、本手法を用いることでアルツハイマー病との関連で注目を集めているアミロイド重合体を選択的、高感度かつ短時間(10分以

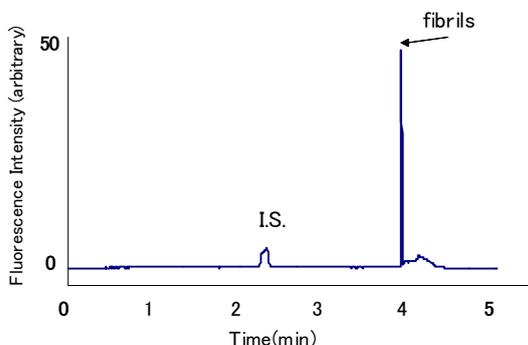


図3 アミロイド重合体の分離

内)に分析することができた(図3)。開発した手法で重合反応を追跡すると、重合反応の進行に伴い検出されるピークの泳動時間や強度が変化した。そこで検出されたピークを(2)の検討で開発した分取装置を用いて分取し、さらにプローブ顕微鏡で構造を解析した。その結果、図4に示すようなアミロイド線維や、中間体のプロトフィブリルなどが分離されていることがわかった。

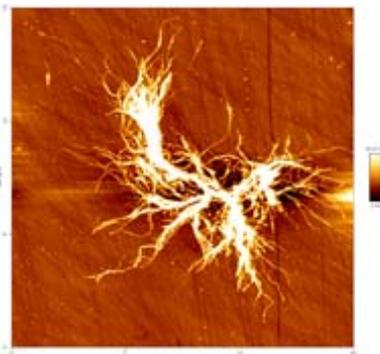


図4 分取したアミロイド重合体

次に本分析法をアミロイドの重合反応の阻害剤の探索に利用した。アミロイドのモノマー溶液を調製し、候補化合物を添加し、重合反応を解析し、反応を阻害する化合物が探索することで、アルツハイマー病患者の脳内に蓄積する老人斑の生成を抑制する化合物、つまりアルツハイマー病の予防や治療に有効な化合物が見出されると予想した。アミロイドのモノマー溶液に既知の重合阻害剤を添加し、重合体の生成を解析した結果、阻害効果が強い化合物を添加するほど、重合体の生成が抑制された。つまり、本分析法は抗アルツハイマー病薬の探索にも利用できることが示唆された。既存の重合体の分析法では、重合体の総量しか測定できないのに対し、今回開発した手法では、重合の過程で生じる各種中間体を分離し、測定できることから、重合の初期段階で生成する中間体や、重合の末期で生成する中間体など、標的の中間体に対して選択的な阻害作用を示す医薬品の開発に有効であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

全て査読有

- ① Kyojiro Morikawa, Kazuma Mawatari, Masaru Kato, Takehiko Tsukahara, Takehiko Kitamori: Streaming potential/current measurement system for investigation of liquid confined in extended-nano space. *Lab Chip* **10**, 871-875 (2010)

- ② Masaru Kato, Masanori Inaba, Takehiko Tsukahara, Kazuma Mawatari, Akihide Hibara, Takehiko Kitamori: Femto Liquid Chromatography with Atto-Liter Sample Separation in the Extended Nanospace Channel. *Anal. Chem.* **82**, 543-547 (2010)
- ③ Tatsuhiro Yamamoto, Yoichi Murakami, Jin Motoyanagi, Takanori Fukushima, Shigeo Maruyama, Masaru Kato: An Analytical System for Single Nanomaterials: Hyphenation of Capillary Electrophoresis with Raman Spectrometry or with Scanning Probe Microscopy for Individual Single-Walled Carbon Nanotube Analysis. *Anal. Chem.* **81**, 7336-7341 (2009)
- ④ Tatsuhiro Yamamoto, Jin Motoyanagi, Yoichi Murakami, Yuhei Miyauchi, Shigeo Maruyama, Masaru Kato: Surfactant-Stabilized Single-Walled Carbon Nanotubes Using Triphenylene Derivatives Remain Individually Dispersion in Both Liquid and Dried Solid States. *Applied Physics Express* **2**, 055501 (2009)
- ⑤ Masaru Kato, Naomi Shoda, Tatsuhiro Yamamoto, Reiko Shiratori, Toshimasa Toyo'oka: Development of a silica-based double network hydrogel for high-throughput screening of encapsulated enzymes. *Analyst* **134**, 577-581 (2009)
- ⑥ Tatsuhiro Yamamoto, Yuhei Miyauchi, Jin Motoyanagi, Takanori Fukushima, Takuzo Aida, Masaru Kato, Shigeo Maruyama: Improved bath sonication method for dispersion of individual single-walled carbon nanotubes using new triphenylene-based surfactant. *Jap. J. Appl. Phys.* **47**, 2000-2004 (2008)
- ⑦ Masaru Kato, Hiroyuki Kinoshita, Mitsue Enokita, Yukiko Hori, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo, Toshimasa Toyo'oka: Analytical method for beta-amyloid fibrils using CE-laser induced fluorescence and its application to screening for inhibitors of beta-amyloid protein aggregation. *Anal. Chem.* **79**, 4887-4891 (2007)

[学会発表] (計 47 件)

- ① 日本分析化学会第 58 年会、高性能分離分析法の開発とナノ物質への応用についての研究、札幌、2009 年 9 月
- ② BioNano2009、Development of a Silica-Organic Hydrogel for High-Throughput Screening、エーグル (スイス)、2009 年 9 月

[図書] (計 1 件)

- ① 加藤 大、技術教育出版社、生体分子固定化マイクロチップ. in マイクロ・ナノ化学チップと医療・環境・バイオ分析 2009、216-223

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ナノカーボン物質分散液とその製造方法、ナノカーボン物質構成体
 発明者: 加藤 大、丸山 茂夫、相田 卓三、福島 孝典、山本 竜広、宮内 雄平
 権利者: 国立大学法人東京大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2008-033640
 出願年月日: 平成 20 年 2 月 14 日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 分析方法、及び該分析方法に用いる装置
 発明者: 加藤 大、豊岡利正、加藤くみ子
 権利者: 科学技術振興機構
 種類: 特許
 番号: 第 4139829 号
 取得年月日: 平成 20 年 6 月 13 日登録
 国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/CNBI/kato/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 大 (KATO MASARU)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任准教授

研究者番号: 30332943

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者