THE KANTO CHEMICAL CO., INC. CHEENCLOCAL TIMES 2013 No.3 (iii #2295)

		13311 0203-2440
原始クラミジアから紐解く病原体の細胞内生存戦略と制御	山口博之	2
コア粒子表面にグラフトされたシェル層を触媒に利用した複合粒子の調製	谷口 竜王	9
脂質ラフトに存在する糖脂質の詳細な構造解析	樺山 一哉 小島 寿語	夫 鈴木 佑典 15
	吉野 和典	23
		28



原始クラミジアから紐解く 病原体の細胞内生存戦略と制御

Primitive chlamydiae: a hint to uncover the intracellular survival strategy of human pathogens

北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 感染制御検査学研究室 山口 博之 Hiroyuki Yamaguchi

Departoment of Medical Laboratry Sciences, Faculty of Health Sciences, Hokkaido University Graduate School of Health Sciences

1. はじめに

性感染症や呼吸器疾患を起こすクラミジアは、長い 年月をかけ感染する細胞に認識されないようにさまざま な分子を捨てとトを含む哺乳細胞に適応進化してきた。 失った分子の中には、感染細胞にいち早く認知され、 病原体の排除機構を効率良く活性化する分子が含ま れているはずであり、その分子の機能解析は、細胞内 に持続的に寄生するさまざまな病原体を制御する上 で、新たな戦略を生み出す可能性がある。だが残念な ことに、クラミジアが一度失った分子は、そう容易く手に 入らない。一方、2004年、Scienceに一本の興味深い 論文が掲載された。驚いたことに自然環境に広く生息 する原生動物アカントアメーバ(以下アメーバ)に、クラミ ジアが進化の過程で捨ててしまった分子をいまだ温存 する原始的なクラミジアが現存しているというものであっ た[ヒトに起病性のあるクラミジアの平均ゲノムサイズが 1.0-1.2Mbp程度と比較的小さいのに比べ、この原始 クラミジア(Protochlamydia UWE25)のゲノムサイズは 約2.4Mbpと2倍近く大きい]。そこで私達は、クラミジ アが哺乳細胞に適応進化する過程で捨てた分子を 求め、土壤や水系環境から原始クラミジアが共生す



図1 16S rRNAを指標にしたクラミジアの系統分類 参考文献1、Figure 1 より引用

るアメーバを株化し、共生する原始クラミジアのユニー クな特性について細胞分子レベルでの検討を始め た。本稿では、まずクラミジアの概要を説明した上で 原始クラミジアのユニークな特徴について私達の実 験データをもとに紹介したい。

2. 病原性クラミジアと原始クラミジア

クラミジアの分類上の広がりは極めて広くクラミジアスー パーファミリーとも称されている(図1)1)。現在クラミジア目 lt, Chlamydiaceae, Parachlamydiaceae, Waddliaceae, Simkaniaceaeの4科に分類されている。ヒトに感染し、 肺炎や性感染症の原因となる Chlamydia pneumoniae や C. trachomatis などを含む病原性クラミジアは Chlamydiaceaeの1科に属し、後者3科が原始クラミジ アである。原始クラミジアと病原性クラミジアの分岐は今 から7億年以上前に遡るが、分岐後の進化の過程で 適応した宿主域は大きく異なり、病原性クラミジアが哺 乳動物から魚類に至るまで、脊椎動物に幅広く生息す る一方、原始クラミジアの生息環境は主にアメーバなど 原生動物に限られている1,2)。一方、どちらのクラミジア も他の細菌種には見られないユニークな増殖環を持 ち、宿主細胞への感染能力はあるが分裂増殖能を欠 いた基本小体 (elementary body: EB) と感染能力はな い細胞内にて分裂する網様体(reticulate body:RB)よ り構成されている(図2)1)。原始クラミジアには更にユ ニークな形態学的な特徴があり、環境の劣悪化に伴 い、EBから三日月体(crescent body:CB)という特異な 形態が観察される場合がある(図2B、c)。病原性クラミ ジアの細胞への付着ならびに細胞内での生存・増殖 様式は大変良く調べられている。まず病原性クラミジア の宿主細胞への付着には、菌体表層に発現している 外膜蛋白OmcBやストレス蛋白質HSP70が宿主細胞 上の細胞外マトリックスプロテオグリカンの側鎖へパリン や繊維芽細胞増殖因子2に結合することが重要であ る³⁻⁵⁾。その後、細胞に付着したEBのIII型分泌装置 にて細胞質に打ち込まれるTARP(translocated actin recruiting phosphoprotein)によりアクチンの再重合が 誘導され、それに伴い形成される細胞表層の台座を介 して宿主細胞内へと取り込まれて行く。、7)。宿主細胞内 に移行したEBは食胞に類似した封入体膜に包まれRB

へと変換して行くが、封入体膜上には食胞が成熟する ために必要なマーカーが見られず、リソソームとの融合 が起こらない^{8,9)}。更に、感染した宿主細胞がアポトーシ スに陥らない様な細胞修飾機構を保有している¹⁰⁾。そ の機構も良く調べられていて、菌体から分泌され細胞質 に放出されるCPAF(chlamydial protease/proteosomelike activity factor)が、アポトーシス刺激の主要なセン サーであるBH3-only proteinを分解することで、感染 細胞がミトコンドリアの機能不全を介してアポトーシスに 陥ることを防いでいる¹¹⁾。その一方、強力な殺菌機構 を備えたアメーバへの感染様式やアメーバ内での原始 クラミジアの宿主細胞への修飾機構は全く明らかに なっていない。



Annu. Rev. Microbiol. 62:113-31



図2 原始クラミジアの増殖環と形態学的な特徴

- A. 原始クラミジアの増殖環。最終分化や死滅する過程ではないので生活 環とは呼ばない。aからg:増殖環の進行方向。EB:基本小体、RB:網 様体、CB:三日月体。参考文献1、Figure 3より引用
- B. 原始クラミジアの形態学的な特徴を示す透過型電子顕微鏡像。左(a): ヒト上皮細胞 HEp-2 細胞に感染した病原性クラミジア(Chlamydia pneumoniae TW183株)とその封入体。感染後72時間。右(b, c): ア メーバに感染したParachlamydia acanthameobae。三日月体(c)はP. acanthaomebaeの特徴と考えられているが、電顕固定時のアーチファ クトの可能性も否定できない。一部の電顕写真は、私達の発表論文 (Microbiology and Immunology, 54: 63-73, 2010)より転用。

	アメーバ18SrRNA	共生細菌16SrRNA	Merge	
Protochlamydia R18			Res	原始クラ
Neochlamydia S13				きジア
α-Proteobacteria S23				
α-Proteobacteria S31				
α-Proteobacteria S40a				重複感染す
Neochlamydia S40b				る共生細菌

図3 FISHによる株化アメーバ内共生細菌の可視化 アメーバを固定後、アメーバ18SrRNA(緑)とクラミジアあるいはクラミジアを除く細菌 16SrRNA(赤)に特異的なプローブを用いてFISHを行い、共焦点レーザー顕 微鏡にて観察した。参考文献12, Figure 2 より引用、一部改変

原始クラミジアが共生する アメーバの株化と共生細菌の可視化

既に述べたように原始クラミジアは、病原性クラミジア の適応進化を紐解く鍵になる有用なモデルにもかかわ らず、その宿主細胞への修飾機構は明らかになってい ない。そこで私達は、土壌や河川水から41株のアメー バを株化し、共生細菌の有無を調査することから始め

た。その結果、偏性細胞内寄生性 の細菌が共生する5株のアメーバ 株の樹立に成功し系統解析の結 果、そのうち3株に原始クラミジア (*Neochlamydia EProtochlamydia*) が共生していることをつきとめた12)。 FISHによる可視化からは、いずれ の共生細菌もアメーバ細胞質に広 く分布していることが判明した(図 3)12)。樹立したアメーバ内でのこ れら原始クラミジアの共生様式は 極めて興味深く、以下に紹介す る。原始クラミジアNeochlamydia S13とProtochlamydia R18が共 生するアメーバ株は土壌ならびに 河川水よりそれぞれ分離株化され た。これらアメーバに共生するどち らの原始クラミジアも、アメーバから 取り出すと24時間以内に死滅し た。興味深いことにアメーバより取り 出された Protochlamydia R18 は 容易にアメーバへ再感染したが、 Neochlamydia S13 はアメーバに 侵入できるが消化されてしまい再 感染の成立は確認できなかった (図4)¹²⁾。このように他の原始クラ ミジア Protochlamydia R18に比べ *Neochlamydia* S13は進化の過程 で、アメーバへの依存度が増したも のと考えられる。

一方、アメーバは、栄養分が豊 富にある環境では活発に分裂増殖 する栄養型として存在するが、乾燥 や栄養分枯渇など生育環境の悪化に伴い耐久型シストに移行する。シストに移行した休眠状態のアメーバは分裂・増殖せず、代謝活性が極めて低い状態に維持されているので、シストは偏性細胞内寄生性の環境クラミジアにとっても極めて過酷な環境であると考えられる。そこで私達は、アメーバシスト内でもProtochlamydia R18の生存性や感染性が維持されているかどうか検討した。シスト移行後1ヶ月間4℃に放置したアメーバを復帰



図4 原始クラミジア Protochlamydia R18はアメーバに再感染できるが Neochlamydia S13はできない。 上段:アメーバより取り出した Neochlamydia S13のアメーバへの再感染後の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像。アメーバに侵入するが、その後の分裂増殖は認められない。 下段:アメーバより取り出した Protochlamydia R18のアメーバへの再感染後のTEM 像。 参考文献 12, Figure 4 より引用、一部改変



図5 TEM 解析で観察されたアメーバシスト内の原始クラミジア Protochlamydia R18の局在と栄養型に復帰したアメーバ細胞質での分裂増殖。

- A. アメーバシスト内のProtochlamydia R18。E:基本小体 □は拡大(B)
- B. シスト内共生細菌の微細構造。mt: ミトコンドリア
- C. 栄養型に復帰したアメーバ内のProtochlamydia R18。E:基本小体 R:網様体 □は拡大(D)
- D. 栄養型に復帰したアメーバ内共生細菌の微細構造。mt: ミトコンドリア



図6 Protochlamydia 除菌アメーバで観察された糸状仮足の異常発現。 Neochlamydia S13除菌アメーバではこのような現象は観察されなかった。 参考文献14、Figure 5より引用



無添加



スタウロスポリン添加



Protochlamydia R18添加

図7 Protochlamydia R18刺激ヒト上皮細胞株 HEp-2細胞はアポトーシスを誘 導する。

Protochlamydia R18をMOI 90でHEp-2細胞に添加し、24時間後に、 TUNEL染色にて核酸の断片化を可視化した。緑はTUNEL染色陽性のア ポトーシス細胞。倍率:100倍 参考文献16、Figure 2 より引用、改変 させ菌数算定やFISHにてアメー バ内のProtochlamydia R18の 動態についてモニタリングした。そ の結果、シストから復帰後のア メーバで菌数の増加が確認され たことより、Protochlamydia R18 がアメーバシスト内においても感染 性を維持しながら生存できること が明らかになった(図5)¹³⁾。このよ うにProtochlamydia R18にとって アメーバシストは土壌や河川水など 自然環境中で普遍的に起こりうる激 しい温度や栄養分の変化から身を 守るためのシェルターとして機能し ている可能性がある。

4. 原始クラミジア Protochlamydia R18による 宿主アメーバの運動能と発育スピードの制御

何故、アメーバは原始クラミジアの共生を許容したの だろうか。その理由を探るためにアメーバに共生する原 始クラミジアを抗菌剤で除菌し無菌アメーバを樹立し、 除菌前の親アメーバの発育スピードや運動能などの表 現型について比較した。その結果、原始クラミジア



図8 低温30℃培養条件下ヒト細胞株HEp-2細胞内で増殖するParachlamydia Bn₀。

HEp-2細胞にParachlamydia Bn₉を添加し低温 (30℃) 下で3日間培養し、 固定後、抗Parachlamydia ポリクローナル抗体で染色した. 標本は共焦点 レーザー顕微鏡にて観察した。緑:菌体 青: DAPI Protochlamydia R18を除菌したアメーバでは、アメー バの増殖と運動能が顕著に低下し、再感染アメーバで は回復することを見つけた14)。一方、除菌はアメーバの 飲作用や貪食には影響を与えなかった¹⁴⁾。興味深いこ とにProtochlamvdia 除菌アメーバではアクチン再重合 の鈍化と異常な糸状仮足が観察され、共生細菌による アメーバの制御は、アメーバアクチン重合系の修飾を要 求する可能性が示唆された(図6)14)。これらの現象は Neochlamydia S13共生アメーバでは見いだすことがで きなかった。このように、アメーバと共生する原始クラミジ アとの間には極めて安定したしかも特異な共生様式が 存在する可能性が示唆された。Protochlamydia R18 の共生は、アメーバが効率良く周囲の細菌を補食する ことを可能とし、アメーバの生存性に大きな優位性を賦 与している可能性が高い。一方、Neochlamydia S13 の除菌は、アメーバの増殖スピードを向上させた14)。予 想に反したこの結果はどのように解釈したら良いのだろ うか。私達はその理由を探るべく検討を進めている。

5. 原始クラミジア Protochlamydia R18による ヒト上皮系細胞株 HEp-2 細胞へのアポトーシス誘導

私達は、通常の培養条件下において一部の原始ク ラミジア(Parachlamydia Bn₉)が株化ヒト細胞内で増 殖できないことを見つけた15)。何故、増殖できないのだ ろうか。その理由を明らかにすべく、Protochlamydia R18をヒト上皮細胞株 HEp-2 細胞に添加し細胞の修 飾変化について詳細に解析することにした。その結 果、驚いたことに Protochlamydia R18 生菌刺激は HEp-2細胞にアポトーシスを誘導した(図7)¹⁶⁾。このア ポトーシス誘導は、アクチン重合阻害剤サイトカラシンD やカスパーゼ3阻害剤の添加で顕著に抑制された16)。 その一方、細胞内でのProtochlamydia R18の増殖 は確認できなかった16)。これらの結果は、このアポトー シス誘導には、Protochlamydia R18の細胞内への侵 入が不可欠であるが、菌体増殖に伴う代謝活性は要 求しないことを示唆している。このアポトーシスを誘導す る Protochlamydia R18 エフェクターとはどのような分 子なのだろうか。私達はそのヒントを既に見つけている。 プロテオソーム阻害剤ラクタシスチンは病原性クラミジア から分泌されるCPAFに結合し、CPAFのプロテアーゼ 活性を阻害することで、アポトーシスからの回避を妨げるコンパウンドとして知られているが¹⁷⁾、この薬剤添加は*Protochlamydia* R18によるアポトーシス誘導も顕著に抑制した¹⁸⁾。この結果は、病原性クラミジアと原始クラミジアがそれぞれ保有するCPAFの基質特異性が、進化の過程で大きく変化した可能性を示唆するものであり極めて興味深い。

6. 原始クラミジア(Parachlamydia Bng)の 低温下でのヒト株化細胞HEp-2内不完全増殖

既に述べたように原始クラミジアは、37°Cではヒト株 化上皮細胞へ侵入できるが増殖できない。その一方、 低温下(30°C)でParachlamydia Bngは細胞に侵入し 核周囲にて活発に分裂増殖できることを見つけた(図8) (未発表データ)。しかしながら原始クラミジアの成熟は 不完全であり、周辺細胞への二次感染は起こらない (未発表データ)。何故、低温下で原始クラミジアはヒト 細胞に侵入し不完全ながらも増殖できるようになるのだ ろうか。クラミジアの細胞への侵入にはIII型分泌装置 を介して細胞質に打ち込まれるエフェクターTARPへの グアニンヌクレオチド交換因子 (VAV)の結合を介した Rho GTPaseの活性化に伴うアクチン重合が必要であ る¹⁹⁾。しかしながらいずれの原始クラミジアゲノムにも TARPホモログは存在せず、未知エフェクターとVAV の結合を介してアクチン重合が促進されている可能性 がある。また感染細胞の脂質を利用し成熟するクラミジ アは、その菌体周囲に形成した"封入体膜"へ宿主細 胞のCERT(脂質輸送蛋白)とSMS(スフィンゴ脂質合 成酵素)を、エフェクターIncを巧みに利用し動員してい ることが明らかにされた²⁰⁾。競合するエフェクターの存 在は脂質の獲得に障害を与えている可能性がある。 現在VAV、CERT、SMSと会合する菌体エフェクター 分子を原始クラミジアのゲノム情報を基に見つけだす 作業を現在進めている。

7. 今後の展望

病原性クラミジアは長い年月をかけ、感染細胞の監 視ネットワークに捉えられ易い分子を捨てることで哺乳 細胞への適応進化に成功したと考えられる。失った分 子を見つけその機能を紐解く作業は細胞寄生性病原 体の細胞内生存戦略を理解する上で極めて興味深い 研究の方向性であるが、失った分子を病原性クラミジ ア自身から求めことはできない。そこで私達は独自に株 化した原始クラミジアのエフェクター分子の機能解析か らその手掛かりを探っている。幾つかの原始クラミジア のゲノム解読も並列して進めているが、ユニークなゲノ ム構造やその配列から蛋白・蛋白相互作用に関わるロ イシンリッチリピートやアンキリンモチーフを含む機能未 知の分子が多数同定されている。これら分子中にはク ラミジアの進化を説明するものや、細胞内に侵入する 病原体の制御に極めてクリティカルな機能を保有するも のが含まれているものと期待している。まだ研究は始 まったばかりである。

本研究プロジェクトは松尾淳司先生(北海道大学保 健科学研究院)、中村眞二先生(順天堂大学医学研 究科)、林田京子先生(北海道大学人獣共通感染症 リサーチセンター)、杉本千尋先生(北海道大学人獣 共通感染症リサーチセンター)、黒田誠先生(国立感 染症研究所)、関塚剛史先生(国立感染症研究所)、 竹内史比古先生(国立感染症研究所)、永井宏樹先 生(大阪大学微生物病研究所)との共同研究として進 められています。また研究に関わってくれた多くの大学 院生に深謝します。

参考文献

- 1) Horn, M. Annual Review of Microbiology. 2008, 62, 113-131.
- 2) Horn, M.; Collingro, A.; Schmitz-Esser, S.; Beier, C.L.; Purkhold, U.; Fartmann, B.; Brandt, P.; Nyakatura, G.J.; Droege, M.; Frishman, D.; Rattei, T.; Mewes, H.W.; Wagner, M. Science. 2004,304, 728-730.
- 3) Zhang, J.P.; Stephens, R.S. Cell. 1992, 69, 861-869.
- Raulston, J.E.; Davis, C.H.; Paul, T.R.; Hobbs, J.D.; Wyrick, P.B. Infection and Immunity. 2002, 70, 535-543.
- 5) Kim, J.H.; Jiang, S.; Elwell, C.A.; Engel, J.N. PLoS Pathogenesis. 2012, 7, e1002285.
- 6) Clifton, D.R.; Fields, K.A.; Grieshaber, S.S.; Dooley, C.A.; Fischer, E.R.; Mead, D.J.; Carabeo, R.A.; Hackstadt, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101, 10166-10171.
- Jewett, T.J.; Fischer, E.R.; Mead, D.J.; Hackstadt, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006, 103, 15599-15604.

- Scidmore-Carlson, M.A.; Shaw, E.I.; Dooley, C.A.; Fischer, E.R.; Hackstadt, T. Molecular Microbiology. 1999, 33, 753-765.
- 9) Beatty, W.L. Journal of Cell Science. 2006, 119(2), 350-359.
- Byrne, G.I.; Ojcius, D.M. Nature Review Microbiology. 2004, 2, 802-808.
- Pirbhai, M.; Dong, F.; Zhong, Y.; Pan, K.Z.; Zhong, G. Journal of Biological Chemistry. 2006, 281, 31495-31501.
- 12) Matsuo, J.; Kawaguchi, K.; Nakamura, S.; Hayashi, Y.; Yoshida, M.; Takahashi, K.; Mizutani, Y.; Yao, Y.; Yamaguchi, H. Environmental Microbiology Reports. 2010, 2, 524-533.
- 13) Nakamura, S.; Matsuo, J.; Hayashi, Y.; Kawaguchi, K.; Yoshida, M.; Takahashi, K.; Mizutani, Y.; Yao, Y.; Yamaguchi, H. Environmental Microbiology Reports. 2010, 2, 611-618.
- 14) Okude, M.; Matsuo, J.; Nakamura, S.; Kawaguchi, K.; Hayashi,
 Y.; Sakai, H.; Yoshida, M.; Takahashi, K.; Yamaguchi, H.
 Microbes and Environments. 2012, 27, 423-429.
- 15) Hayashi, Y.; Nakamura, S.; Matsuo, J.; Fukumoto, T.; Yoshida, M.; Takahashi, K.; Mizutani, Y.; Yao, T.; Yamaguchi, H. Microbiology and Immunology. 2010, 54, 707-713.
- 16) Ito, A.; Matsuo, J.; Nakamura, S.; Yoshida, A.; Okude, M.; Hayashi, Y; Sakai, H.; Yoshida, M.; Takahashi, K.; Yamaguchi, H. PLoS One. 2012, 7, e30270.
- 17) Jorgensen, I.; Bednar, M.M.; Amin, V; Davis, B.K.; Ting, J.P.; McCafferty, D.G.; Valdivia, R.H. Cell Host Microbe. 2011, 10, 21-32.
- 18) Matsuo, J.; Nakamura, S.; Ito, A.; Yamazaki, T.; Ishida, K.; Hayashi, Y.; Yoshida, M.; Takahashi, K.; Sekizuka, T.; Takeuchi, F.; Kuroda, M.; Nagai, H.; Hayashida, K.; Sugimoto, C.; Yamaguchi, H. PLoS One. 2013, 8, e56005.
- 19) Lane, B.J.; Mutchler, C.; Al Khodor, S.; Grieshaber, S.S.; Carabeo, R.A. PLoS Pathogenesis. 2008, 4, e1000014.
- 20) Elwell, C.A.; Jiang, S.; Kim, J.H.; Lee, A.; Wittmann, T.; Hanada, K.; Melancon, P.; Engel, J.N. PLoS Pathogenesis. 2011, 7, e1002198.

コア粒子表面にグラフトされたシェル層を 触媒に利用した複合粒子の調製

Preparation of hybrid particles by using shell layers grafted on core particles as catalysts

千葉大学大学院工学研究科 准教授 谷口 竜王 Tatsuo TANIGUCHI (Associate Professor) Graduate School of Engineering, Chiba University

1. はじめに

高分子微粒子およびその水分散液であるラテックス は、塗料や接着剤などに使用される重要な工業用分散 材料のひとつであるが、液晶ディスプレイ用スペーサー、 カラム充填剤、臨床検査薬などの高付加価値材料への 応用も盛んになっている。また、近年では有機化合物と 無機化合物の特性を兼ね備えた有機/無機複合材料 のテンプレートとして、様々な分野で利用されている。高 分子微粒子とシリカやチタニアなどの金属酸化物との複 合化については、カチオン性高分子微粒子へのシリカの 吸着、シラノール基を有するモノマーとの共重合など 様々な手法が提案されており、大きな比表面積を有する 高分子微粒子のコロイド特性を支配する粒子表面の物 理化学的特性の重要性が指摘されている。

粒子の表面組成が内部組成と異なるコア-シェル型 構造を有するラテックス粒子は、高分子微粒子の用途を 拡大することが期待され、多種多様な表面修飾法が開 発されており、なかでも表面グラフト重合が注目されてい る。表面グラフト重合は、既成の高分子と表面の官能基 の反応による"grafting-to"法と、表面に化学的に固定さ れた開始基からの重合反応による"grafting-from"法に 大別することができる。"grafting-to"法では、予め調製し た分子量分布の狭いポリマーを用いることにより、均一な 長さのグラフト鎖を導入することができるが、溶液中に溶 解した高分子鎖の広がりのためグラフト密度の増加に限 界がある。一方、"grafting-from"法では高密度なグラフ ト鎖の構築が可能となるが、グラフト鎖長の制御が問題 となる。近年では、分子量および分子量分布を制御する ことのできる制御/リビングラジカル重合(Controlled/ Living Radical Polymerization: CRP)を"graftingfrom"法に応用した研究が活発に行われている。CRP の進展とともに新しい重合系が数多く開発されており、 遷移金属錯体を用いた原子移動ラジカル重合(Atom Transfer Radical Polymerization: ATRP)、連鎖移動 剤を用いた可逆的付加開裂連鎖移動(Reversible Addition Fragmentation chain Transfer: RAFT)重合、 そして安定ニトロキシドを用いたニトロキシド媒介重合 (Nitroxide Mediated Polymerization: NMP)は、精力 的に研究されている。

我々は、ソープフリー乳化重合などのラテックス合成 法により調製したコア粒子表面からのATRPによる各種 モノマーのグラフト重合を行い、コア粒子表面にグラフト されたシェル層をシリカ生成の反応場および堆積場とし て利用した有機/無機複合粒子の調製について検討し てきた。本稿では、ATRP開始基を有する高分子コア粒 子の合成、高分子微粒子表面からのATRPによるコア-シェル粒子の調製、そして無機材料との複合化につい て紹介する。

2. ATRP開始基を有するコア粒子の合成

ラテックス合成法として最もよく知られている乳化重合 は、界面活性剤(乳化剤)水溶液中で水溶性開始剤を 用いて油溶性モノマーを重合する手法である。乳化重 合の動力学的研究は、Harkinsの定性的な反応機構を 基盤とするSmith-Ewartの定量的な解析により進展し、 モノマーで膨潤した高分子微粒子が主要な生長場とし

て重合反応が進行することが示されている1)。乳化重 合において界面活性剤はミセル形成など重要な役割を 果たしている一方で、界面活性剤の脱離による泡立ち やブリードアウト、バイオメディカル分野における応用では タンパク質の変性などの問題が指摘されている。このよ うな問題を解決する方法として、界面活性剤を使用しな い乳化重合であるソープフリー乳化重合が広く行われ ている。油溶性モノマーの代表である styrene (St)もわ ずか(0.03wt%)ながら水に溶解するため、水相中でSt の重合が進行する。高分子鎖が臨界鎖長まで生長す ると析出して核を生成するが、開始剤由来の親水基が 核の表面に露出したミセル類似構造を形成するため、 以降は乳化重合と同様の過程を経てポリマー粒子とな る(均一相核生成プロセス)。ソープフリー乳化重合の 利点として、図1に示す様々な機能性モノマーとの共重 合による高分子微粒子表面への官能基および反応性 基の導入と、水溶性モノマーを添加することによる高分 子微粒子の粒径制御をあげることができる2)。

ATRP開始基を高分子微粒子表面に導入する方法として、ATRP開始基を有するモノマーとの乳化重合、シード重合、懸濁重合、さらには粒子表面の官能基の変換などが報告されているが、我々はソープフリー乳化重合の特徴を活かして、重合開始時に粒径制御に使用する水

溶性モノマーを仕込み(batch)、重合開始後に機能団を 導入するために機能性モノマーを追加して加える(shot addition)手法を組み合わせた高分子微粒子合成を行っ ている³⁾。粒径を制御するためにカチオン性の*N-n*-butyl-*N*-2-methacryloyloxyethyl-*N*,*N*-dimethylammonium bromide (C₄DMAEMA)、表面にATRP開始基を導入す るために2-(2-chloropropionyloxy)ethyl methacrylate (CPEM)、開始剤に2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (V50)を用いたStのソープフリー乳化 重合により、高分子微粒子を合成した(図2)。Stに対す るC₄DMAEMA 仕込み濃度の増加とともに高分子微







図2 ソープフリー乳化重合によるATRP開始基を有する高分子微粒子の合成

粒子の粒径は減少しており、水溶性モノマーの添加量 によりサブミクロンサイズの高分子微粒子の粒径を制 御することが可能であることがわかる(図3)。¹H NMR 測定より、高分子微粒子にはATRP開始基を有する CPEMがStに対して10 mol%程度まで定量的に共重 合されることが示されている。

3. ATRPによる高分子微粒子表面からのグラフト重合

ATRPは、澤本、Matyjaszewski、そしてPercecらにより開発され、現在ではブロックポリマー、グラフトポリマー、 星形ポリマーなど様々な形態の高分子が開発されている⁴⁾。ATRPでは、ドーマント種(P_n-X)のハロゲンが遷移 金属錯体(MtⁿX_nLigand)に引き抜かれることにより、活 性種である生長炭素ラジカル(P_n•)が生成し、重合が進 行する。ドーマント種と活性種の平衡によりラジカル濃度 が低く保たれるため、ラジカルどうしの二分子反応である 停止反応が一次反応である生長反応に対して相対的 に抑制され、リビング的にラジカル重合が進行する(図 4)。これまでにATRPに適用できるモノマーの種類、開 始剤、錯体など重合系の設計に関する研究が行われて おり、総説などにまとめられている。

高分子微粒子表面からのATRPによるグラフト重合では、目的とする用途に適合するモノマーを選択することが重要である。我々は、PEGマクロモノマー、糖骨格を有するモノマーのATRPによるグラフト重合を検討してきたが、無機材料との複合化には水溶性の2-(*N*,*N*-dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA)に

着目している。DMAEMAを用いたポリマーのテンプ レートとしては、ArmesらによるDMAEMAと疎水性の2-(*N*,*N*-diisopropylamino) ethyl methacrylateとのブ ロックポリマーからなるポリマーミセル、四級化した DMAEMAとacrylamideとのミクロゲルなどが報告され ているが、いずれもシリカとの静電吸着を基盤とした複 合化である⁵⁾。DMAEMAは側鎖にジメチルアミノ基を 有しており($pK_a = 7.4$)、DMAEMAの重合により得られ るポリマーPDMAEMAが水溶液中でプロトン化すると、 PDMAEMA 周辺における水酸化物イオンの局所濃度 が高く、コア粒子表面にグラフトしたPDMAEMAシェル 層内で選択的にシリカやチタニアなどの金属酸化物の 前駆体である金属アルコキシドが加水分解と重縮合が 進行することが期待できる(図5)。また、ジメチルアミノ 基の還元作用を利用した金属イオンの還元による複合 化も可能であることも別途報告しているの。

図3に示したATRP開始基を有するラテックス粒子を 用いて、DMAEMAの表面開始ATRPを行ったところ、 それぞれ100 nm程度までシェル層の厚みを増加させる ことができた。また、¹H NMRによりグラフト量を測定した ところ、DMAEMA 仕込み量とともにSt に対して30 mol%程度まで増加しており、コアの粒径とシェルの厚 みを独立に制御することが可能であった。なお、高分子 微粒子表面のATRP開始基密度を見積もる方法として は滴定法しか報告されていないが、クリックケミストリーと 蛍光法とを組み合わせた我々の評価手法では、0.2 groups/nm²程度であり、準濃厚ブラシ密度に相当する グラフト鎖の導入が可能であると考えられる。



図5 コア-シェル粒子をテンプレートに用いた有機/無機複合粒子および中空粒子の調製

4. コア粒子表面にグラフトしたシェル層における 金属酸化物の触媒的担持による複合化

はじめに、コア-シェル型の高分子微粒子とシリカとの 複合化について検討した。コア-シェル粒子の水/ methanol分散液にtetraethoxysilane (TEOS)を加え、 シリカとの複合化を行った。複合化に最適な反応条件 を検討したところ、60/40 (v/v)の混合溶媒中、20°Cで 48 h反応させることにより、均一なモルフォロジーを有す る有機/無機複合粒子を得ることができた(図6)⁷⁾。

本手法は、tetra-*n*-butyl titanate (TnBT)を用いたチ タニアとの複合化も可能である⁸⁾。なお、TEOSと比較し てTnBTの加水分解と重縮合の反応速度が大きいこと が知られており、acetylacetoneを少量添加して検討し た。熱重量分析装置(TGA)により測定したコア-シェル 粒子1個あたりに担持されたシリカの重量は、コア粒子と は無関係にPDMAEMAグラフト量に比例した(図7)。コ ア粒子表面には親水性モノマーC4DMAEMAおよび開 始剤V50に由来する四級アンモニウム基およびアミジン 基が存在するため、チタニアが静電的に吸着する機構も 考えられるが、PDMAEMAグラフト量が0であるコア粒 子表面に担持されたチタニアの重量(切片)はきわめて 小さく、PDMAMEAグラフト層がTnBTの加水分解と重 縮合の効果的な触媒として機能することにより、チタニア が担持されていることがわかる。また、500°Cでポリマー 成分を熱分解すると、5~10nm程度の大きさを有するチ タニア結晶から成る中空粒子を得ることができた(図8)。 X線回析(XRD)測定によりチタニアの結晶構造を評



図6 各種粒子のSEM写真.(a)コア粒子,(b)コア-シェル粒子,(c)有機/無機複合粒子



図7 コア-シェル粒子のPDMAEMAグラフト量に対するチタニアの担持量



図8 各種粒子のTEM写真. 粒径の小さなコア-シェル粒子(流体力学的直径 d_{core}=211nm, d_{core-shell}=342nm)から調製した(a-1)有機/無機複合粒子 および(a-2) チタニア中空粒子. 粒径の大きなコア-シェル粒子 (d_{core}=442nm, d_{core-shell}=619nm)から調製した(b-1)有機/無機複合粒子 および(b-2)チタニア中空粒子. Scale bars 100nm

価したところ、コア-シェル粒子および加熱前の複合粒 子は20°付近にアモルファスあるいは長周期構造を持た ないガラスに見られるハローパターンが現れているだけ であったが、加熱処理後の中空粒子では光活性を示す アナターゼ型のチタニアに特徴的なピークを観察するこ とができた(図9)。また、ルチルやブルッカイトなど他の構 造がないことから、純度の高いチタニア中空粒子が得ら れていると考えられる。グラフトポリマーを触媒として利用 する本手法は、従来までのチタニア中空粒子調製法と は異なる手法として有効であることが示された⁹⁾。

また、テンプレートの形状をどの程 度まで反映することができるのか検 討するために、異種粒子間凝集体 (ヘテロ凝集体)を用いた複合粒子 および中空粒子の調製を試みた(図 10)10)。なお、ミクロンサイズのコア粒 子および ATRP 開始基を有するミクロ ンサイズのシェル粒子は、それぞれSt の分散重合および前述のソープフ リー乳化重合により合成し、被覆率 の異なるヘテロ凝集体を調製した。 被覆率の低いヘテロ凝集体(a-1)で は、コア粒子上にシェル粒子表面の PDMAEMAグラフト層が孤立して存在 しているため、複合化粒子を熱分解す ると表面に空孔構造を有するサブミク ロンサイズのシリカ中空粒子(a-2)が 得られた。一方、被覆率の高いヘテロ凝集体(b-1)で は、シェル粒子表面で連続的なPDMAEMAグラフト層 が形成されるために、ミクロンサイズのラズベリー型のシ リカ中空粒子(b-2)が得られた。破断面を観察すると、 コア粒子とシェル粒子とが接する部分にはシリカが堆積 せず、内壁に多数の空孔が形成されていた。以上の結 果より、固体材料表面にグラフトしたPDMAEMAシェル 層の触媒作用を利用した本手法は、テンプレートの形 状を反映した有機/複合粒子および無機中空粒子の調 製法として有用であると示された。



図10 被覆率(θ)の異なるヘテロ凝集体をテンプレートに用いて調製したシリカ中空粒子のSEM写真. (a-1):ヘテロ凝集体(θ = 0.51), (a-2):サブミクロンサイズの空孔を有するシリカ中空粒子, (b-1):ヘ テロ凝集体(θ = 0.81), (b-2):ミクロンサイズのラズベリー型シリカ中空粒子とその内部構造(inset)



図9 各種粒子のXRDパターン. (a)コア-シェル粒子, (b) 有機/無機複合粒子, (c)チタニア中空粒子, (d) アナターゼチタニア (from the International Center for Diffraction Center)

5. おわりに

本稿では、サブミクロンサイズの高分子微粒子を用い たDMAEMAの表面開始ATRPによりコア-シェル粒子 を合成し、PDMAEMAの触媒活性を利用した有機/無 機複合粒子および無機中空粒子の調製について報告 した。コア粒子表面にグラフトされたPDMAEMAシェル 層をアト(10⁻¹⁸)リットルスケールの触媒的反応容器とし て利用することにより、テンプレートの形状を反映した各 種粒子のモルフォロジーの制御が可能であった。今後 は、テンプレートの構造を厳密に分析し、機能と構造と の関連性から複合粒子および中空粒子の高機能化を 図る必要があると考えられる。これらの技術の進展ととも に反射防止材料や断熱材などの工業製品だけでなく、 バイオなどの他分野でも高分子微粒子を利用した複合 材料の開発が発展していくことを期待したい。

最後に、本稿で紹介した研究を支援していただいた 積水化学工業株式会社、花王株式会社、新日鐵住金 化学株式会社(旧新日鐵化学株式会社)、新中村化学 工業株式会社に深く感謝いたします。

参考文献

- (a) Harkins, W.D. J. Chem. Phys. 1945, 13, 381-382. (b) Harkins, W.D. J. Chem. Phys. 1946, 14, 47-48. (c) Harkins, W.D. J. Am. Chem. Soc. 1947, 69, 1428-1444. (d) Smith, W.V.; Ewart, R.H. J. Chem. Phys. 1948, 16, 592-599.
- 2) (a) Ceska, G. W. J. Appl. Polym. Sci. 1974, 18, 427-437. (b) Ceska, G. W. J. Appl. Polym. Sci. 1974, 18, 2493-2499. (c) Ganachaud, F.; Sauzedde, F.; Elaïssari, A.; Pichot, C. J. Appl. Polym. Sci. 1997, 65, 2315-2330. (d) Sauzedde, F.; Ganachaud, F.; Elaïssari, A.; Pichot, C. J. Appl. Polym. Sci. 1997, 65, 2331-2342. (e) Chu, H.-H.; Ou, E.-D. Polym. Bull. 2000, 44, 337-344. (f) Imroz Ali, A.M.; Tauera, K.; Sedlak, M. Polym. 2005, 46, 1017-1023. (g) Zurlová, E.; Bouchal, K.; Zdenkova, D.; Pelzbauer, Z.; Svec, F.; Kálal, J.; Batz, H.G. J. Polym. Sci. Polym. Chem. 1983, 21, 2949-2960. (h) Mouaziz, H.; Larsson, A.; Sherrington, D.C. Macromolecules. 2004, 37, 1319-1323. (i) Verrier-Charleux, B.; Graillat, C.; Chevalier, Y.; Pichot, C.; Revillon, A. Colloid Polym. Sci. 1991, 269, 398-405. (j) Delair, T.; Marguet, V.; Pichot, C.; Mandrand, B. Colloid Polym. Sci. 1994, 272, 962-970. (k) Kashiwabara, M.; Fujimoto, K.; Kawaguchi, H. Colloid Polym. Sci. 1995, 273, 339-345. (1) Nakahama, K.; Kawaguchi, H.; Fujimoto, K. Langmuir. 2000, 16, 7882-7886. (m) Nagai, K.; Ohashi, T.; Kaneko, R.; Taniguchi, T. Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 1999, 153, 133-136. (n) Herold, M.; Brunner, H.; Tovar, Günter E.M. Macromol. Chem. Phys. 2003, 204, 770-778.
- 3) (a) Guerrini, M.M.; Charleux, B.; Vairon, J.-P. Macromol. Rapid Commun. 2000, 21, 669-674. (b) Taniguchi, T.; Kasuya, M.; Kunisada, Y.; Miyai, T.; Nagasawa, H.; Nakahira, T. Colloids Surfaces B: Biointerfaces. 2009, 71, 194-199. (c) Taniguchi, T.; Kunisada, Y.; Shinohara, M.; Kasuya, M.; Ogawa, T.; Kohri, M.; Nakahira, T. Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 2010, 369, 240-245. (d) Jayachandran, N.K.; Takacs-Cox, A.; Brooks, D.E. Macromolecules 2002, 35, 4247-4257. (e) Cheng, Z.; Zhu, X.; Shi, Z.L.; Neoh, K.G.; Kang, E.T. Ind. Eng. Chem. Res. 2005, 44, 7098-7104. (f) Min, K.; Hu, J.; Wang, C.; Elaïssari, A. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 2002, 40, 892-900. (g) Sonmez, H.B.; Senkal, B.F.; Sherrington, D.C.; Bicak, N. React. Funct. Polym. 2003, 55, 1-8. (h) Senkal, B.F.; Bicak, N. Euro. Polym. J. 2003, 39, 327-331. (i) Zheng, G.; Stöver,

H.D.H. Macromolecules. 2002, 35, 6828-6834. (j) Zheng,
G.; Stöver, H.D.H. Macromolecules. 2002, 35, 7612-7619.
(k) Bontempo, D.; Tirelli, N.; Masci, G.; Crescenzi, V. J. A.
Hubbell, Macromol. Rapid Commun. 2002, 23, 417-422. (1)
Ahmad, H.; Saito, N.; Kagawa, Y.; Okubo, M. Langmuir. 2008,
24, 688-691. (m) Chen, Y.; Kang, E.-T.; Neoh, K.-G.; Greiner,
A. Adv. Funct. Mater. 2005, 15, 113-117.

- 4) (a) Kato, M.; Kamigaito, M.; Sawamoto, M.; Higashimura, T. Macromolecules. 1995, 28, 1721-1723. (b) Wang, J.-S.; Matyjaszewski, K. Macromolecules. 1995, 28, 7901-7910. (c) Percec, V.; Barboiu, B. Macromolecules. 1995, 28, 7970-7972. (d) Matyjaszewski, K.; Xia, J. Chem. Rev. 2001, 101, 2921-2990. (e) Coessens, V.; Pintauer, T.; Matyjaszewski, K. Prog. Polym. Sci. 2001, 26, 337-377. (f) Kamigaito, M.; Ando, T.; Sawamoto, M. Chem. Rev. 2001, 101, 3689-3746. (g) Kamigaito, M.; Ando, T.; Sawamoto, M. Chem. Rec. 2004, 3, 159-175. (h) Braunecker, W.A.; Matyjaszewski, K. Prog. Polym. Sci. 2007, 32, 93-146.
- (a) Yuan, J.-J.; Mykhaylyk, O.O.; Ryan, A.J.; Armes, S.P. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 1717-1723. (b) Zhou, F.; Li, S.; Vo, C.D.; Yuan, J.-J.; Chai, S.; Gao, Q.; Armes, S.P.; Lu, C.; Cheng, S. Langmuir. 2007, 23, 9737-9744.
- 6) Taniguchi, T.; Inada, T.; Kashiwakura, T.; Murakami, F.; Kohri, M.; Nakahira, T. Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 2011, 377, 63-69.
- Taniguchi, T.; Kashiwakura, T.; Inada, T.; Kunisada, Y.; Kasuya, M.; Kohri, M.; Nakahira, T. J. Colloid Interface Sci. 2010, 347, 62-68.
- 8) Taniguchi, T.; Murakami, F.; Kasuya, M.; Kojima, T.; Kohri, M.; Saito, K.; Nakahira, T. Colloid Polym. Sci. 2013, 291, 215-222.
- (a) Imhof, A. Langmuir. 2001, 17, 3579-3585. (b) Cheng, X.; Chen, M.; Wu, L.; Gu, G. Langmuir. 2006, 22, 3858-3863. (c) Caruso, F.; Shi, X.; Caruso, R.A.; Susha, A. Adv. Mater. 2001, 13, 740-744. (d) Agrawal, M.; Pich, A.; Zafeiropoulos, N.E.; Stamm, M. Colloid Polym. Sci. 2008, 286, 593-601. (e) Yu, J.; Liu, W.; Yu, H. Cryst. Growth Des. 2008, 8, 930-934. (f) Yang, H.G.; Zeng, H.C. J. Phys. Chem. B. 2004, 108, 3492-3495. (g) Wang, X.M.; Xiao, P. J. Mater. Res. 2005, 20, 796-800.
- (a) Taniguchi, T.; Ogawa, T.; Kamata, Y.; Kobaru, S.; Takeuchi, N.; Kohri, M.; Nakahira, T.; Wakiya, T. Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 2010, 356, 169-175. (b) Taniguchi, T.; Obi, S.; Kamata, Y.; Kashiwakura, T.; Kasuya, M.; Ogawa, T.; Kohri, M.; Nakahira, T. J. Colloid Interface Sci. 2012, 368, 107-114.

脂質ラフトに存在する糖脂質の詳細な構造解析

Structural analyses of glycosphingolipids in lipid rafts

東海大学 糖鎖科学研究所 准教授 樺山 一哉 Kazuya Kabayama (Associate Professor) Institute of Glycoscience, Tokai University

立命館大学 生命科学部 助教 小島 寿夫 Hisao Kojima (Assistant Professor) College of Life Sciences, Ritsumeikan University

日本大学 理工学部 助教 鈴木 佑典 Yusuke Suzuki (Assistant Professor) College of Science and Technology, Nihon University

1. はじめに

シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシド は、疎水性の脂質部分であるセラミドと親水性の糖鎖か ら構成され、さらに、セラミド部分はスフィンゴイド塩基と脂 肪酸から構成されている。この細胞膜に埋め込まれてい るセラミド部分は、スフィンゴミエリン、コレステロール等と 疎水性相互作用に基づいて互いに会合し、様々な情報 伝達分子が集積している微小領域(脂質ラフト)の形成 に重要な役割を果たしていると考えられている。そして、 セラミド部分の構造変化、特に脂肪酸組成変化は、膜の 流動性や膜マイクロドメインへの細胞内情報伝達因子 の集積を変化させることにより、脂質ラフトを介した情報 伝達や特異的部位への膜輸送を調節し、細胞の内外を 繋ぐ様々な生命現象を制御していると考えられている。

現在我々が進めているガングリオシドが形成する生体 膜の微小領域が膜受容体の局在及びシグナリングに影 響を及ぼすメカニズムの解明研究において、蛍光顕微 鏡を用いた分子動態解析と並行して、従来から用いら れてきた生化学的手法により得られた脂質ラフトに存在 するガングリオシドの構造解析を行い、多角的に得られ たデータをすり合わせた考察を展開していくことを目標と している。

脂質ラフトの分離精製の生化学的解析手段として は、Triton X-100, Lubrol 98, Brij 58/97, NP-40 等の非 イオン性界面活性剤を用いて、低温下でショ糖密度勾 配超遠心により界面活性剤不溶性画分(DRM)として 分画する方法が一般的に用いられている(図1)。しか し、得られたDRM中のガングリオシドの構造解析におい て、界面活性剤の除去は必須であり、各種カラムクロマ トグラフィーによる精製法等が報告されているものの、簡 便な操作で完全にガングリオシドから界面活性剤を分 離・除去できる方法は未だ報告されていない。この問題 を解決するために以下の実験を行った。





2. 各種カラムクロマトグラフィーによる界面活性剤除去¹⁾

ショ糖密度勾配超遠心による脂質ラフト分画システム の確認、及び分画後に残存する界面活性剤のMSスペ クトル測定への影響を確認するため、脂肪前駆細胞 (3T3-L1)を材料とし、ショ糖密度勾配超遠心分離及び SepPak C18カートリッジによる脱塩後、薄層クロマトグラ フィー(TLC)解析及びマトリックス支援レーザー脱離イオ ン化四重極イオントラップ飛行時間型質量分析法 (MALDI-QIT-TOF MS)によるMSスペクトル測定を行っ た。TLC解析の結果、DRMはコレステロール及びガング

リオシドGM3が集積しているフラクショ ンNo.4及び5であり、Triton X-100濃 度はショ糖濃度勾配に伴って分配され ていることが明らかになった(図1)。ま た、MALDI-QIT-TOF MSスペクトル測 定結果では、すべてのフラクションで Triton X-100に起因する44 Da間隔の ピークのみが検出され、GM3由来ピー クを検出することはできなかった(図2)。 そこで、Triton X-100の希釈倍列を作 製し、MSスペクトル測定時にGM3のイ オン化を阻害しないTriton X-100濃度 を確認した結果、1ng以下まで除去する必要があること が判った(Data not shown)。

次に、Triton X-100(4µg)- GM3(4µg)混合物を作製 し、従来から界面活性剤の除去に用いられている SepPak C18、DEAE-sephadex A-25、Iatrobeads、及び Florisilカラム(オープン)によるTriton X-100の除去率を TLC及びMALDI-QIT-TOF MSスペクトル測定によって 確認した。その結果、TLC展開後のプリムリン発色結果 では、それぞれ90%以上のTriton X-100の除去は可能 であったものの、MALDI-QIT-TOF MSスペクトルでは残 存するTriton X-100のためにGM3由来ピークを検出す

GM3 standard		910.74					
Thton X-100			I I	÷.			
No.1-3	27.71	921.73 965.75	1003 800	1053.82	141 81	1185.94	1274.01 1318.07
No.4 and 5	- 833.66	945.78	1009.80	1053.83 1069.80 1097.86	1141.29	1229.57	
No.6-9 95122	877.67 877.67 889.73	921.72 934:77 965.74	977,80 1009.78	1055.82	1141.88	1229,95	85 E 2 2 1
No 10-12	11/22	20.921.69 20.929-05	1009.74	27:5201	1141.85	1185.90	1273.57
800	1.101.101.1		1000 m/z		Contraction of the local distribution of the	1200	1000

図2 超遠心画分(脱塩後)のMALDI-QIT-TOF-MS解析

ポジティブイオンモード測定。 ▶ がガングリオシドGM3に起因するフラグメント。DRM 画分 (No.4 and 5)にGM3由来ピークが検出されない。

Solvent	Molecular formula	Polarity	Solubility for H2O	Permittivity (20°C)
Acetonitril	CH₃CN	Polar	Arbitrarily soluble	37.5
Methanol	CH₃OH	Polar	Arbitrarily soluble	31.2
Acetone	CH3COCH3	Polar	Arbitrarily soluble	21.45
1-Butanol	C4H10O	Polar	77g/L	18
Pyridine	C ₅ H ₅ N	Polar	Arbitrarily soluble	13.3 (25°C)
Tetrahydrofurane	C ₄ H ₈ O	Polar	Arbitrarily soluble	7.5 (25°C)
Methyl acetate	CH3COOCH3	Both	250 g/L	7.03
Diethyl ether	(C ₂ H ₅) ₂ O	Nonpolar	69 g/L	4.197
Hexane	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₅	Nonpolar	13 mg/L	1.89
Cyclohexane	C ₆ H ₁₂	Nonpolar	Immiscible	2.052
Heptane	H ₃ C(CH ₂) ₅ CH ₃	Nonpolar	Immiscible	1.924 (25°C)
Toluene	C6H3CH3	Nonpolar	0.47 g/L	2.24
Benzene	C ₆ H ₆	Nonpolar	1.75 g/L	2.283
Xylene	$C_6H_4C_2H_6$	Nonpolar	0.2 g/L	2.3
Diisopropylether	C ₆ H ₁₄ O	Nonpolar	9.4 g/L	4.49 (25°C)
Chloroform	CHCl3	Nonpolar	8.2g/L	4.9
Dichloromethane	CH ₂ Cl ₂	Nonpolar	20 g/L	9.1
1,2-Dichloroethane	CICH ₂ CH ₂ CI	Nonpolar	8.1 g/L	10.45

表1 本研究に使用した有機溶媒の諸性質

ることはできなかった。またカラムへのガングリオシドの吸 着が生じるため、完全に回収できていないことが判った (Data not shown)。それ故、新たな界面活性剤除去法 を確立するために以下の実験を行った。

3. 各種有機溶媒洗浄による界面活性剤の除去¹⁾

GM3-Triton X-100 混合物をTLCにより展開すると、 GM3のR_f値は約0.5であるが、Triton X-100は溶媒先 端部まで移動し、GM3とTriton X-100はTLC上で完全 に分離することから、TLC上のシリカゲルの水酸基と Triton X-100 は相互相関しないと考えられた(図1)。 TLC上のシリカゲルと同様に、ガラス表面には水酸基が 露出していることから、GM3-Triton X-100混合物をガラ ス製試験管内に乾固し、各種有機溶媒による洗浄を検討 し、水酸基と相互相関しないTriton X-100のみを除去で きるか確認を行った。検討はアセトニトリル、メタノール、ア

セトン、1-ブタノール、ピリジン、テトラヒド ロフラン、酢酸メチル、ジエチルエーテ ル、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン、 トルエン、ベンゼン、キシレン、ジイソプロ ピルエーテル、クロロホルム、ジクロロメタ ン、1,2-ジクロロエタン(DCE)の性質の 異なる有機溶媒、計18種類で行った (表1)。

その結果、極性の高い有機溶媒で洗 浄した場合、Triton X-100と同時にGM3 もガラス試験管表面(Residue, R)から除 去され、洗浄画分(Wash fraction, W)に 移行してしまう傾向が観察された(図3)。 逆に非極性の有機溶媒による洗浄では GM3は試験管表面に保持され、Triton X-100のみが除去される傾向が観察さ れた。一方で、検討した非極性有機溶 媒の中で、誘電率の低いヘキサン、シク ロヘキサン、ヘプタンによる洗浄では、 Triton X-100が試験管表面に残存する ことが確認された。

その他の非極性有機溶媒による洗 浄や Svennerholm 分配法で、Triton X-100の除去が可能であったが、多少 のGM3の損失が確認された(図3)。しかしTLCによる解 析において、DCEによる洗浄ではGM3の損失なくTriton X-100のみを完全に除去できることが確認された。さらに、 MALDI-QIT-TOF MSスペクトル測定を行った結果では、 DCE洗浄によりTriton X-100は1ngの検出限界以下ま で完全に除去され、GM3由来ピークが検出されることが 確認された(図4)。

4. DCEによる各種界面活性剤の除去¹⁾

上述のように、DCE洗浄により、ガラス試験管内で 乾固したGM3-Triton X-100混合物から完全に Triton X-100のみを除去することが可能であったこと から、次に、脂質ラフト分画に用いられる他の非イオン 性界面活性剤であるBrij 58、Brij 97、及びNP-40や、 糖脂質の糖転移酵素・糖加水分解酵素反応に用い られる3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]



図3 各種有機溶媒で洗浄後の界面活性剤 TritonX-100とGM3 複合体のTLC解析



図4 各種有機溶媒で洗浄後の界面活性剤 TritonX-100とGM3 複合体の MS 解析 ▶ がガングリオシド GM3 に起因するフラグメント。

表2本研究に使用した界面活性剤の諸性質

Name	Polarity	Critical Micelle Concentration (CMC)	hydrophile-lipophile- Balance (HLB) values	Structure
Triton X-100	Nonionic surfactant	0.24 mM	13.5	XX Dotoj.
Bnj 58	Non ionic surfactant	0.007 mM	15.7	HO(CH2CH2O)20CH2(CH)16CH3
Bnj 97	Non ionic surfactant	0.400 mM	15	HO(CH2CH2O) CH (CH-)17CH3
Nonidet P40 (NP-40)	Non ionic surfactant	0.29 mM	13.1	
CHAPS	Zwittenonic	4∼10 mM	~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	all and
Taurocholic acid	Anionic	3∼11 mM		
Deoxycholic acid	Anionic	2.4~6 mM	16	and the second s

-1-propanesulfonate (CHAPS), Taurocholic acid, Deoxycholic acidに 関して、DCE洗浄によってこれらの界 面活性剤が除去可能であるかを MALDI-QIT-TOF MSにより確認した (表2)。

その結果、Brij 58 及び CHAPS は 界面活性剤由来ピークが検出された が、大部分が除去可能であり、すべて の界面活性剤を含むサンプルで、GM3 由来ピークが検出されることを確認した (図5)。







図6 超遠心画分 (DCE 洗浄後)の MALDI-QIT-TOF-MS 解析 ポジティブイオンモード測定。 ▶ がガングリオシド GM3に起因するフラグメント。No.4 および5 (DRM 画 分)とNo.6-9 に GM3 由来ピークが検出された。

5. 脂肪前駆細胞の脂質ラフト画分 からのTriton X-100の除去¹⁾

次に当初の目的であった脂質ラフト画 分の糖脂質の構造解析を行うために、 3T3-L1脂肪前駆細胞を材料とし、ショ 糖密度勾配超遠心による脂質ラフト分 画及び脱塩後、さらにSvennerholm分 配及びDCE洗浄後、MALDI-QIT-TOF MSを行った。その結果、界面活性剤由 来ピークは検出されず、フラクション No.4-5及びNo.6-9でGM3の分子種に 由来するピークを検出した(図6)。 そして、MALDIイオン化質量分析法よりも界面 活性剤によるサンプルのイオン化が抑制されやす い液体イオン化質量分析法においても、これら GM3分子種由来イオンが検出されることを確認した (Data not shown)。さらに、上記サンプルのネガティ ブイオンモードによるMALDI-QIT-TOF MS スペクト ル解析結果から、脂肪前駆細胞の脂質ラフト上に 存在するGM3の分子種はd18:1(スフィンゴイド塩 基)-C16:0(脂肪酸)、-C18:0、-C20:0、-C22:0、 -C22:1、-C23:0、-C24:0、及び-C24:1であることを 確認した(図7)。



図7 3T3-L1 脂肪前駆細胞の DRM 画分に存在する GM3 のセラミド構造 (MS²から推定)

6. 脂肪組織/細胞における トリグリセリドの簡便な除去法の検討

1993年にSpiegelmanら²⁾により肥満マウス脂肪組織 でのTNFa産生の亢進が報告されて以降、脂肪細胞の 分子細胞生物学的な研究が進展したことにより、脂肪 細胞は多彩な生理活性物質(アディポサイトカイン)を産 生・分泌し、糖・脂質代謝および動脈壁の恒常性維持 に重要な役割を果たす器官であることが分かってきた。 肥満による脂肪の蓄積でアディポサイトカインの産生が 異常になることで、糖尿病を始めとする種々の生活習慣 病を発症することが明らかとなっている。

我々の研究室では、2型糖尿病における糖脂質の役 割の解明を上述したような様々なアプローチで進めてお り、現在までに、3T3-L1脂肪細胞をTNFa処理した2型 糖尿病の病態において、発現が亢進するガングリオシド GM33)が細胞膜上の負電荷のクラスターを形成し、イン スリン受容体の細胞膜直上のリジン残基と相互作用す ることでインスリン受容体をカベオラ構造から引き剥がす ためにインスリンシグナルが伝達されなくなることを示して いる4)。一方、肥満モデル動物の脂肪組織においても GM3の発現亢進が報告されているが、脂肪組織はエネ ルギー貯蔵臓器として大量のトリグリセリドを蓄積してい ることから、同じように極性の低い脂質である糖脂質全 般の分析がトリグリセリドの妨害を受けるために困難であ り、そのために特に中性糖脂質については明確にその 構造やプロファイルを明らかにした報告はない。しかしな がら、近年、グルコシルセラミド(GlcCer)の合成阻害剤 である AMP-Deoxynojirimycin (AMP-DNM) が TNF a 処理によりインスリン抵抗性に惹起した3T3-L1脂肪細胞のインスリン感受性を高めることが報告された⁵⁾ことから、脂肪細胞の糖脂質全般の重要性が認識されつつある。そこで、TNFa処理によりインスリン抵抗性に惹起した3T3-L1脂肪細胞において簡便にトリグリセリドを除去する方法を検討することで、脂肪細胞の糖脂質全般の分析を行った。

7. 脂肪組織でのDCE洗浄によるトリグリセリドの除去

上述したように、ショ糖密度勾配遠心法で調製した界 面活性剤不溶性画分(DRM)からの界面活性剤の効 率的かつ簡便な除去法が開発された¹⁾。この方法では Triton X-100を始めとして生化学的な研究に一般的に 多用される数種の界面活性剤についても有用であり、固 相抽出の前処理カラムおよび各種のカラムワークでは除 去しきれず質量分析でイオン化妨害を引き起こす界面活 性剤をほぼ完全に除去できることが明らかとなった。これ らの界面活性剤は順相系の薄層クロマトグラフィー (TLC)では溶媒先端付近まで展開される物質であるこ とから、同様に溶媒先端付近まで展開されるわりグリセリド への応用の可能性が考えられた。

そこで、マウス(C57BL/6J)の副睾丸脂肪組織より総 脂質を抽出し、これをトリグリセリドとみなしてDCE洗浄に よる除去を試みた。総脂質と中性糖脂質の標準品を混 合したもので試した結果、脂肪量に関わらずトリグリセリド は洗浄画分(Wash fraction, W)に移行し、ガラス表面 (Residue, R)には残らないことが分かった(図8A)。ま た、副睾丸脂肪を大量に用いてDCE洗浄を行ったとこ ろ、副睾丸脂肪由来の脂質がバンドとして可視化できた (図8B)。



- 図8 マウス副睾丸脂肪の DCE 洗浄
- (A)トリグリセリドは完全にW画分に移行し、中性糖脂質は大半がR画分に残留する。
- (B)大量の副睾丸脂肪をDCE洗浄するとR画分に副睾丸脂肪由来の脂質が 見えてくる。

8. 脂肪細胞でのDCE洗浄によるトリグリセリドの除去

DCE洗浄によりトリグリセリドの効果的 な除去が可能であることが示されたので、 次に、TNFa処理によりインスリン抵抗性を 惹起した3T3-L1脂肪細胞を用いて総脂 質を抽出し、一部(0.1mg protein相当)を 用いてDCE洗浄によるトリグリセリドの除 去効果を検証した(図9)。その結果、副 睾丸脂肪での場合と同様に、トリグリセリ ドはW画分に完全に移行し、糖脂質はR 画分に残留したことから同洗浄により効 果的に分画が行えた。

しかしながら、0.1mg protein相当分で は、糖脂質としてはGM3とGD1aのバンド しかオルシノール試薬で呈色が見られな かった。これら2種類のガングリオシドに関 しては、トリグリセリドが大量に存在する条 件下でもシアル酸残基の負電荷を利用し た陰イオン交換(DEAE)カラムクロマトグラ フィーを行ってトリグリセリドから分離が可 能であることから、既に報告がなされてい る。よって、より大量(1mg protein相当)に 処理することで未報告の中性糖脂質のバ ンドが検出できるかを試みた(図10)。 その結果、CMH(セラミドモノヘキソシド)と考えられる*R*f 値のバンドを確認した(図10左)ものの、CDH(セラミドジへ キソシド)の移動度からGM3の移動度までの間にリン脂質 と考えられる複数のバンドを認めたため(図10右)、最終目 標である糖脂質の一斉質量分析のためにはリン脂質の分 解除去が必要と考えられた。そこで、アルカリメタノリシスお



図9 TNF a処理した3T3-L1 脂肪細胞での DCE 洗浄による TG の除去(0.1mg protein 相当)



図10 TNF a処理した3T3-L1 脂肪細胞での DCE 洗浄による TG の除去(1mg protein 相当)



図 11 TNF α処理した3T3-L1 脂肪細胞での DCE 洗浄による TG の除去 (1mg protein 相当) とリン脂質の 分解除去

よび Sep-pak C18による脱塩を行ってTLC分析に処した。 その結果、溶媒先端付近にやや夾雑物が見られるものの 上述のリン脂質を除去することが出来、質量分析に供しう ると考えられる試料を調製することが出来た。(図11)

9. 脂肪細胞における中性糖脂質の検出と構造解析

上述の1,2-ジクロロエタン(DCE)洗浄法により脂肪細胞 のトリグリセリドを効果的に除去しえたことから、さらにリン脂 質を弱アルカリ処理して分解除去し、Sep-pak C18による脱 塩の後、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)でネガ ティブイオンモードにて糖脂質の分子種の解析を試みた。 本実験ではMSⁿによる構造解析が可能な装置(島津 LCMS-IT-TOF)を用い、MS³でセラミドの分子量を設定し、 脂肪酸および長鎖塩基由来のフラグメントの出現を確認す

表3 3T3-L1 脂肪細胞における主な糖脂質とその分子種

СМН		CDH	
分子種	m/z	分子種	m/z
CMH 16:0	698.55	CDH 16:0	860.62
CMH 17:0	712.57		
CMH 18:0	726.58	CDH 18:0	888.67
CMH 19:0	740.60		
CMH 20:0	754.61	CDH 20:0	916.67
CMH 21:0	768.63		
CMH 22:1	780.62		
CMH 22:0	782.65	CDH 22:0	944.70
CMH 23:0	796.66		
CMH 23:1	794.64		
CMH 24:1	808.66	CDH 24:1	970.72
CMH 24:0	810.68	CDH 24:0	972.73
CMH 25:0	824.69		
CMH h24:0	826.67		

GM	/ /3	GI	D1
分子種	m/z	分子種	m/z
		GD1 15:0	896.45
GM3 16:0	1151.70		
GM3 17:0	1165.71		
GM3 18:0	1179.73	GD1 18:0	917.47
GM3 19:0	1193.74		
		GD1 20:1	930.48
GM3 20:0	1207.76	GD1 20:0	931.49
GM3 21:0	1221.78		
GM3 22:1	1233.76		
GM3 22:0	1235.79	GD1 22:0	945.50
GM3 23:0	1249.81		
GM3 23:1	1247.80		
GM3 24:1	1261.81	GD1 24:1	958.51
GM3 24:0	1263.82	GD1 24:0	959.52

ることで分子種の同定を行った(表3)。これまでは、脂肪 組織の糖脂質については、ブタの後背部脂肪(ロインバッ ク)を用いて大量のトリグリセリドをアセトン脱脂して古典的 な糖脂質構造解析した報告⁶⁰、ブタ腹膜(大網)の内臓脂 肪の糖脂質をTLC解析した報告⁷¹、マウス副睾丸脂肪の GlcCer量をLC-MS解析した報告⁸⁰、マウスの卵巣周囲 脂肪および副睾丸脂肪のガングリオシド量をLC-MS解析 した報告⁹⁰などがあるが、糖脂質のセラミド組成を詳細に 調べた報告は見られない。よって、本報告は脂肪細胞の 糖脂質、特に中性糖脂質の詳細な構造解析を行った初 の報告である。脂肪細胞では主要な糖脂質はGM3であ り、次いでGD1a、CMH、CDHが検出されたが、いずれも 長鎖塩基はd18:1を成分とした分子種が豊富で、脂肪酸 はC16からC24の飽和脂肪酸が優勢であった。

10. 脂肪細胞におけるDRMに集積する糖脂質の分子種解析

ショ糖密度勾配遠心法で用いたTriton X-100(1%)は 質量分析に影響を及ぼすため、脂質ラフト分画後に氷冷 DCE洗浄を行い、Triton X-100を除去した(図12)。DRM 画分をそのままLC-MS解析したところ、糖脂質以外の成 分が多いためにMSの検出器が飽和し、回避するために 希釈するとベースラインノイズの影響が見られた。そこで、



図 12 TNF α処理前後での313-L1 脂肪細胞を>=糖密度勾配遠心法による分 画の後 DCE洗浄・脱塩したTLC(サンプル量は 1mg protein 相当量) 呈色試薬はオルシノール硫酸(A)およびプリムリン(B)を用いた。糖脂質 は No.5 画分を中心に No.4-6(DRM 画分)に分画され、TNF α処理によっ て GM3の量が増加した。 Svennerholm分配によって極性の低い物質を除去したのち、LC-MS解析を行った(図13)。以前に100pM 96時間のTNFa処理により脂肪細胞のGM3が約2倍に増加することを報告しているが、増加する際にセラミド鎖長の選択性は見られずほぼ一様に増加することが分かった。

今回解析した3T3-L1 脂肪細胞ではTNFa処理によっ てGM3は分子種に関わらず2倍に増加する結果を得た が、高脂肪食を与えた高齢肥満マウス(C57BL/6J)副睾 丸脂肪や高齢の糖尿病モデルマウス(KKおよびKKAy) の卵巣周囲脂肪において詳細な分子種は報告されていな いながら短鎖脂肪酸(C16やC18)の割合が増加すること が報告されている⁹⁾。また、高齢*ob/ob*マウスの脂肪組織 において短鎖脂肪酸(C16)を含むスフィンゴミエリン(SM) が増加し、長鎖脂肪酸(C24)のSMが減少することが示さ れている¹⁰⁾。このように肥満状態でスフィンゴ脂質のセラミ ド鎖長変化が報告されていることから、今後、若齢の肥満 モデルマウスを用いてGM3をはじめとする糖脂質の LC-MS解析を行うことで、肥満を引き金とする2型糖尿病 の病態のさらなる解明を行う予定である。





11. おわりに

近年、体内の脂質代謝に対する医療分野の注目度はさ らに増していると感じる。コレステロールの代謝抑制はもち ろんのこと、最近では糖脂質の生合成を抑制したり、糖脂 質分子そのものを補充したりすることで、生活習慣病や癌、 腎臓および神経疾患に対する研究開発が進行している。 しかしながらその作用機序としては、個体レベルでの表現 型解析やリスクファクターとしての定量解析が報告されるば かりであり、上記分子を構成成分とする細胞膜表面上でど のような変化が起こっているのか(細胞膜上のシグナル伝 達分子にどのような影響を及ぼすのか)に関しては、依然と して明確な説明は成されていない。

我々の研究において細胞膜脂質の体系的な解析法が 確立しつつある。細胞膜の流動性および細胞膜受容体の 側方拡散についての情報を数値化するためには、ライブセ ルイメージング技術が非常に適しており、細胞膜構成脂質 の構造解析にはLC-MSを主力とする各種質量分析技術 が不可欠であると考えている。これらの技術を併用して 様々な病態モデルを解析することが、細胞膜脂質の矯正 療法が未来の治療戦略になっていくことを願い、より一層 研究に邁進していきたい。

参考文献

- 1) Suzuki, Y.; Kabayama, K. Journal of lipid research. 2012, 53, 599-608.
- Hotamisligil, G.S.; Shargill, N.S.; Spiegelman, B.M. Science. 1993, 259, 87-91.
- 3) Tagami, S.; Inokuchi, J.; Kabayama, K.; Yoshimura, H.; Kitamura, F.; Uemura, S.; Ogawa, C.; Ishii, A.; Saito, M.; Ohtsuka, Y.; Sakaue, S.; Igarashi, Y. J. Biol. Chem. 2002, 277, 3085-3092. Epub 2001 Nov 3013.
- 4) Kabayama, K.; Sato, T.; Saito, K.; Loberto, N.; Prinetti, A.; Sonnino, S.; Kinjo, M.; Igarashi, Y.; Inokuchi, J. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007, 104, 13678-13683.
- 5) Aerts, J.M.; Ottenhoff, R.; Powlson, A.S.; Grefhorst, A.; van Eijk, M.; Dubbelhuis, P.F.; Aten, J.; Kuipers, F.; Serlie, M.J.; Wennekes, T.; Sethi, J.K.; O'Rahilly, S.; Overkleeft, H.S. Diabetes. 2007, 56, 1341-1349.
- Ohashi, M.; Yamakawa, T. Journal of biochemistry. 1977, 81, 1675-1690.
- McCluer, R.H.; Evans, J.E.; Kamarei, A.R.; Williams, M.A. Lipids. 1989, 24, 951-956.
- Wu, D.; Ren, Z.; Pae, M.; Guo, W.; Cui, X.; Merrill, A.H.; Meydani, S.N. J. Immunol. 2007, 179, 4829-4839.
- 9) Tanabe, A.; Matsuda, M.; Fukuhara, A.; Miyata, Y.; Komuro, R.; Shimomura, I.; Tojo, H. Biochemical and biophysical research communication. 2009, 379, 547-552.
- Samad, F.; Hester, K.D.; Yang, G.; Hannun, Y.A.; Bielawski, J. Diabetes. 2006, 55, 2579-2587.

プルシアンブルー;新しい応用とそのナノ粒子

Prussian blue; New applications and its nanoparticles

関東化学株式会社 技術·開発本部 中央研究所 第三研究室 室長 吉野 和典 KAZUNORI YOSHINO

Group manager, Central Research Laboratory, Technology & Development Division, Kanto Chemical Co., Inc.

1. はじめに

プルシアンブルーは約300年前に合成された古い化合物であるが、近年、機能材料として活発な研究が行われている新しい化合物でもある。

プルシアンブルーは青色顔料や青写真などに用いられて きた¹⁾。特に、青色顔料としては200年以上にわたり主役を 務め、北斎やゴッホも絵具として用いている。また、絵具以 外に新聞用インキや赤青鉛筆、プリンターのインクリボンな どにも用いられる日常生活に欠かせない化合物である。

機能材料としての研究は約40年前に始まった。結晶 構造が詳細に解析されたほか薄膜(電析膜)の製法が開 発された^{2,3)}。これらを基礎にしてエレクトロクロミック素子、 二次電池、バイオセンサーなど幅広い分野での研究が行 われてきた。そして、ナノ粒子分散液を用いた塗布成膜技 術の進展⁴⁾により、さまざまな研究が一気に実用化されつ つある。

本稿では、プルシアンブルーのさまざまな機能やその発 現機構、ナノ粒子を用いた機能の実用化などを紹介する。

2. プルシアンブルーの特徴と機能

プルシアンブルーはさまざまな機能を示す優れた材料で ある。多彩な機能の原理は、混合原子価化合物であること とフレームワーク構造を持つことである。さらに、同様の構造 を持つ「類似体」を形成できることから、材料設計の自由 度が高いことも特徴である。

2.1 プルシアンブルーとは

プルシアンブルーは濃青色の錯体である。ヘキサシアニ

ド鉄(II)酸鉄(III)、フェロシアン化鉄(III)、フェロシアン化 第二鉄、紺青などはプルシアンブルーの別名である。一般 的に化学式はFe4[Fe(CN)₆]₃で示されるが、実際には次 の二種類の化合物の総称である。一つは、「不溶性」タイ プと呼ばれFe³⁺4[Fe²⁺(CN)₆]₃·xH₂O(x=14~16)で示され る。このタイプは凝集した粒子であり水や溶媒中で沈降す る。もう一つは「可溶性」タイプでM⁺Fe³⁺[Fe²⁺(CN)₆]·yH₂O (M⁺:K⁺, NH₄+など、y=1~5)で示される。水に加えると微 細粒子が分散して青色の液体となる。これは、ろ過しても ろ紙に何も残らないほか、長時間静置しても何も沈降しな い。つまり、溶液と同様の挙動を示すため「可溶性」と呼ば れている。M⁺の種類により、カリ紺青、アンモニウム紺青な どと区別されることもある。

なお、プルシアンブルーはCN⁻を含むため土壌汚染対 策法の特定有害物質であり、水質汚濁防止法の総シアン として検出される。このため、廃棄には適切な対応が必要 である。しかし、プルシアンブルー自体に毒性はなく、毒物 及び劇物取締法でも「有毒な無機シアン化合物」から除外 されている。

2.2 機能材料としてのプルシアンブルー

プルシアンブルーの機能材料としての特徴は、混合原 子価化合物(mixed valence compound)であることとフ レームワーク構造を持つことである。これらの特徴を利用 してさまざまな応用が研究されている(表1)。例えば、混 合原子価化合物であることを利用して顔料、青写真、セ ンサーなどが、フレームワーク構造からは有害物質の吸 着剤、水素吸蔵材料および磁性材料が開発されている。 電子カーテン、電子ペーパー(エレクトロクロミック素子)、 二次電池などは両方の機能をもとにしている。さらに、光 磁性材料や強誘電強磁性材料などの複合機能材料も 研究されている。

また、プルシアンブルーは新規機能材料の基礎となる化 合物でもある。プルシアンブルーのFe³⁺を他の金属で置換 すると、同様の結晶構造を持つプルシアンブルー類似体 (Prussian Blue analogue(s))が得られる。一方、[Fe (CN)₆]⁴⁻のFe²⁺やCN⁻の配位数を変更した化合物はポ リシアノ錯体と呼ばれる錯体群となる。さらに、CN以外の 配位子を導入すると、MOF(金属有機構造体, Metal Organic Framework(s))もしくはPCP(多孔性配位高分 子、Porous Coordination Polymer(s))と呼ばれ、あらたな 研究領域として高い注目を集める材料となる⁵⁾。このような 材料設計の自由度の高さもプルシアンブルーの特徴の一 つである。なお、本稿では一部で「プルシアンブルー」の中 にプルシアンブルー類似体も含めて記している。

表1 プルシアンブルーの機能と応用例

機能	応用例
顔料	絵具、樹脂着色剤、インキ
エレクトロクロミック	電子カーテン、防眩ミラー、 電子ペーパー、表示デバイス
酸化還元	過酸化水素センサー、 グルコースセンサー、バイオセンサー
カチオン交換	リチウムイオン二次電池用電極、 ナトリウムイオン二次電池用電極、 放射性セシウム吸着剤、 タリウム吸着剤、医薬品
水素吸脱着	燃料電池用水素吸蔵材料
分子磁性材料	磁性材料、光磁気材料

2.3 混合原子価化合物

混合原子価化合物は、異なる原子価を持つ同種の元 素を含む化合物である。わかりやすい例が四酸化三鉄 (Fe₃O₄ = Fe²⁺O·Fe³⁺₂O₃)であり、プルシアンブルーも2種類 の原子価の鉄(Fe²⁺とFe³⁺)を含んでいる。プルシアンブ ルーの濃青色はFe²⁺からFe³⁺への原子価間電荷移動に 起因し⁶⁾、酸化や還元により混合原子価状態を解消すると 色が変化する(表2)。これは、青写真の原理として長年利 用されてきたほか、エレクトロクロミック現象の原理でもある。 また、複数の酸化還元状態を取ることは、過酸化水素やグ ルコースなどのセンサーへの応用が研究されている。 表2鉄の原子価と生成物の色(カッコ内は化合物名)

組成	[Fe ²⁺ (CN)6] ⁴⁻	[Fe ³⁺ (CN)6] ³⁻
Fe ²⁺	無色(白色) (ベルリンホワイト)	不安定 (プルシアンブルーに変化)
Fe ³⁺	濃青色 (プルシアンブルー)	黄色~褐色(溶液) (プルシアンイエロー)

プルシアンブルー類似体を用いることで、青色以外も発 色できる。たとえば、ニッケル置換体(M+2Ni²⁺[Fe²⁺(CN)₆] ·yH₂O)は黄色であり、部分置換体では緑色(青と黄色の 混色)である⁷⁾。ニッケルや銅の置換体はプルシアンブルー と同様にエレクトロクロミック現象を示す。また、アルカリ溶解 度などの化学的性質が変化する。このため、類似体は顔 料の耐久性向上や青写真の色変換に用いられてきたほ か、電子ペーパーのフルカラー化に有用である。

2.4 フレームワーク構造

もう一つの特徴がフレームワーク構造である。プルシアン ブルーの結晶は立方晶である(図1)¹⁾。面心立方(頂点と 面の中心)に Fe^{2+} が位置し、立方体各辺の中心に Fe^{3+} が 位置している。 Fe^{2+} と Fe^{3+} はCNにより Fe^{2+} -C-N- Fe^{3+} と架橋 されている。 Fe^{2+} - Fe^{3+} の距離は0.5nmと大きいため、ジャン グルジムのように大きな空隙を持っている。

大きな空隙はさまざまなカチオンや分子を脱挿入できる。 カチオンの脱挿入はイオン交換体として機能する。なかで も、Li+やNa+の脱挿入は二次電池への応用が研究され ている。放射性セシウム(Cs+)や毒性が高いタリウム(TI+) の吸着は、有害物質除去剤や医薬品として利用されてい る。また、水素分子の吸脱着が、燃料電池用の水素貯蔵 材料として研究されている⁸⁾。フレームワーク構造は強固で 安定であり、吸脱着による構造変化はわずかである。この ため、吸脱着を繰り返しても性能が劣化しにくい。また、脱 挿入できるカチオンや分子は空隙の大きさに依存するた め、選択性が高いことも特徴である。

この構造は分子磁性体としても機能する⁹⁾。分子磁性 体は分子構造により形成される電子軌道における電子スピ ンを利用した磁性体である。一般的な磁石と異なり、分子 構造の制御により磁性体としての特性を調整できる。プル シアンブルーでは光による電子状態の変化により磁気特性 が変化する材料などが研究されている。

プルシアンブルー類似体はプルシアンブルーと同様のフ レームワーク構造を持つ。しかし、格子定数が異なるため



図」フルンアンフルーの福韻構造[™] a):一般的な構造、b):可溶性タイプ:M⁺が空隙を占拠している。c):不溶性タイプ:Fe²⁺サイトの1/4が欠陥で、そこに水分子が配位している。

空隙の大きさや電子状態が異なる。つまり、化学組成を調 整することで、脱挿入物質に応じた空隙の大きさや、磁気 特性に応じた電子状態を設計することができる。

3. ナノ粒子を用いた塗布成膜技術の開発と プルシアンブルー機能材料の実用化

薄膜原料として使用できるナノ粒子分散液の開発によ り、機能材料としてのプルシアンブルーは急速に実用化へ と進展している。電子カーテンや電子ペーパーが実用化 段階にあるほか、二次電池やセンサーなども開発が進めら れている。

3.1 ナノ粒子を用いた塗布成膜技術の開発

薄膜はパターニングや異種材料との積層が可能で、光 学デバイスや電気化学デバイスに適した形態である。しか し、プルシアンブルーの電析膜は量産性が低く実用化の課 題となっていた。前述の様に、プルシアンブルーは水や有 機溶媒に溶解しないため、溶液を塗布して成膜することが できない。また、可溶性タイプは分散液を塗布成膜できる が、その粒径は50~100nmで、膜厚や密度などを制御し た機能材料としての薄膜は作成できなかった。 そこで、より粒径が小さいナノ粒子の安価な製造技術と それを用いた成膜技術が開発された¹⁰⁾。この技術は、不 溶性タイプを表面修飾して分散させるもので、薄膜を安価 に量産できる。従来からある不溶性タイプは約10nmのナ ノ粒子の凝集体であった。これを、フェロシアン化物イオン やオレイルアミンで表面修飾すると、水やトルエン、アルコー ル¹¹⁾などに分散できた。この分散液を塗布成膜することで 良質な薄膜が作成できた。すでに、薄膜がエレクトロクロ ミック素子として作動することが確認されている¹²⁾。また、ナ ノ粒子の量産製法が開発されている¹³⁾ほか、いくつかの 類似体にも適用できることが明らかとなっている。

このナノ粒子は、塗布成膜原料以外の用途にも展開さ れている。ナノ粒子は比表面積が大きいため、イオン交換 体、吸着剤としての性能向上が期待できる。福島第一原 発事故により、放射性セシウム吸着剤としてプルシアンブ ルーが活発に研究されている。この中で、高い吸着能を示 す吸着剤¹⁴⁾が開発されている。

3.2 電子カーテン・電子ペーパー(エレクトロクロミック 素子)

プルシアンブルーナノ粒子の機能性材料としての利用に 関しては、エレクトロクロミック素子への応用が最も先行して



図2 GESIMAT社の電子カーテン¹⁶⁾

いる。電子カーテンとしてさまざまな製品が開発されている ほか、電子ペーパーへの展開も期待されている。

プルシアンブルーのエレクトロクロミック現象は1978年に 電析膜で報告された³⁾。(1)式に従い、わずか0.8Vの印 加で電子とK+が脱挿入して色が変わる。

 $Fe^{3+}_{4}[Fe^{2+}(CN)_{6}]_{3}$ (青色) + 4e⁻ + 4K⁺ 二

 $K_4Fe^{2+}_4[Fe^{2+}(CN)_6]_3$ (無色)…(1)

電子の授受は変色時のみであり、状態の保持には電気 を消費しない。このため、大面積化しても消費電力が少な いほか、簡易な電源でデバイスを構築できる。

これを応用したのが、電子カーテンや電子ペーパーであ る。電子カーテンは開いた状態と閉じた状態を透明⇒青 色の変色で実現している。プルシアンブルーを用いた電子 カーテンは、自動車のサンルーフ、ミラー、住宅の窓、人工 衛星などに用いられている^{15,16)}。スイッチーつで開閉を制 御できる(図2)。このため、自動車では車体重量の軽減、 建物では集中管理による施設管理コストの低減や空調効 率の向上などが期待できる。

電子カーテンに白色層を設けると電子ペーパーになる¹⁷⁾。文字や図柄の部分のみを青色にすることで様々な 情報を表示できる。電子ペーパーは電子ブック市場の活 発化により需要が拡大している。軽量・フレキシブルで低価 格なデバイスが目標であり、低消費電力と高い視認性が求 められている。携帯端末よりも、値札、POP、カード、広告、 ポスターなどへの応用が期待されている¹⁸⁾。

これまでの製品はほとんどが電析膜によるものであった が、ナノ粒子を塗布成膜したデバイスもすでに実用段階 に達しつつある⁴⁾。プルシアンブルーを用いた電子ペー パーは高反射率(60%以上)かつ高寿命(100万回以上 書換可能)である。デバイスのフレキシブル化や全固体化 ¹⁹⁾なども研究が進展しており、あらたな用途の開拓が期 待されている。

3.3 二次電池

プルシアンブルーは二次電池の電極材料にも適用でき、 電池コストの低減や電池特性の向上が研究されている。 開発は研究レベルのものが多いが、現行材料を上回る結 果が得られつつある。

プルシアンブルーの電極反応は、前章に示したエレクトロ クロミック反応とほぼ同じである。つまり、フレームワーク構造 へのLi+などのイオンの脱挿入と、金属の価数変化である。 イオンの脱挿入による構造変化がわずかであることから、繰 り返し充放電特性(サイクル特性)の向上が期待できる。また、Coを用いないことやナトリウムイオン電池への適用などから、コスト低減も期待されている。

プルシアンブルーは主に正極への適用が研究されてい る。欠陥がないプルシアンブルーの理論容量は174mAh/g と計算²⁰⁾されており、現行材料と比較して遜色ない値であ る。水溶液中のLi⁺やNa⁺は水和してイオン半径が大きく なっているため、プルシアンブルーに脱挿入できない。しか し、二次電池の電解液は炭酸プロピレンなどの非極性溶 媒であり、脱挿入できることが確認されている²¹⁾。プルシア ンブルーを導電助剤(アセチレンブラック)、結着剤(PTFE) と混合・成形してリチウムイオン二次電池の正極とした場 合、電池容量(110mAh/g)やサイクル特性が劣っていた。 しかし、類似体の適用や水和数の調整などの検討により、 A_xMny[Fe(CN)₆]・nH₂O(A:K, Rb)で良好なサイクル特 性が見出されている²²⁾。

一方、電析膜を用いた正極で高い容量が得られている (128mAh/g)²³⁾。薄膜正極は100C以上の高速充放電が 可能であること、充放電により変色することなど興味深い 特性を示している²⁴⁾。ナノ粒子を塗布成膜した正極もすで に報告されており²⁵⁾、今後はプルシアンブルーに適した電 池の構造や部材の開発が進むものと予想される。

3.4 過酸化水素水センサー・グルコースセンサー

プルシアンブルーは過酸化水素やグルコースなどのセン サーとしても利用できる。過酸化水素は食品の漂白剤や 食品・設備の殺菌剤として用いられており、食品の残留濃 度分析が実施されている。一方、グルコースは血糖や尿糖 検査として健康診断などで分析が行われている。

プルシアンブルーを用いた過酸化水素センサーの特徴 は高い感度であり、イオン移動スペクトロメトリやヨウ素電量 滴定と比較してその検出感度は300倍以上である²⁶⁾。食 品中に多く存在するアスコルビン酸の妨害に強いことも特 徴である。さらに、グルコースを酵素酸化して生じる過酸化 水素を分析することで、高感度なグルコースセンサーとして も利用できる。過酸化水素やグルコース(血糖・尿糖)の分 析装置は、安全意識の向上や高齢化、健康意識の向上 により有望な市場となっている。近年では、グルコース以外 のセンサーとしても数多く報告されており²⁷⁾、プルシアンブ ルーを用いたセンサーは幅広い応用が期待されている。

センサーについても塗布成膜技術の適用が有効である²⁸⁾。すでに、ナノ粒子を塗布成膜した薄膜が過酸化

水素センサーに適用できることが確認されている。食品 や生体の分析では夾雑物によるセンサーの汚染・劣化 が避けられない。この対策にはセンサーの使い捨てが 有効であり、センサーが安価であることが重要である。ま た、微量分析への対応として、微細化も重要な課題であ る。塗布成膜技術はこれらの解決に大きく貢献する技術 である。

4. まとめ

プルシアンブルーの応用分野はエネルギー、エレクトロニ クスからバイオまで幅広いものである。この中には、青写真 のように時代の変化で衰退したものもある。しかし、それらを 上回る数の新たな応用分野が生まれてきている。プルシア ンブルーの機能はまだまだ奥が深いようである。

ナノ粒子分散液を用いた塗布成膜技術は、プルシアン ブルーのさまざまな機能を実用化できる優れた技術である。 弊社はプルシアンブルーナノ粒子の量産製法を開発し、供 給体制の構築に取り組んでいる。研究から試作・量産など のすべての開発ステージにナノ粒子を供給することで、プ ルシアンブルー研究の発展に貢献していきたい。

参考文献

- 1) Ware, M. J. Chem. Educ. 2008, 85, 612-621.
- Buser, H.J.; Schwarzenbach, D.; Petter, W.; Ludi, A. Inorg. Chem. 1977, 16, 2704-2710.
- 3) Neff, V.D. J. Electrochem. Soc. 1978, 125, 886-887.
- (独) 産業技術総合研究所 プレスリリース. http://www.aist. go.jp/aist_j/press_release/pr2012/pr20121120/pr20121120. html
- 5) 北川進 監修. 配位空間の化学 最新技術と応用-. (株)シー エムシー出版, 2009, 345p.
- 6)入江正浩監修.機能性色素の応用.(株)シーエムシー出版, 2002,312p.
- Ishizaki, M.; Gotoh, A.; Abe, M.; Sakamoto, M.; Tanaka, H.; Kawamoto, T.; Kurihara, M. Chem. Lett. 2010, 39, 762-763.
- Kaye, S.S.; Long, J.R. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 6506-6507.
- Sato, O.; Hayami, S.; Einaga, Y.; Gu, Z. Bull. Chem. Soc. Jpn. 2003, 76, 443-470.
- 10) (独) 産業技術総合研究所. 国際公開特許 WO2006/087950. 2006-08-24.; Gotoh, A.; Uchida, H.; Ishizaki, M.; Satoh, T.;

Kaga, S.; Okamoto, S.; Ohta, M.; Sakamoto, M.; Kawamoto, T.; Tanaka, H.; Tokumoto, M.; Hara, S.; Shiozaki, H.; Yamada, M.; Miyake, M.; Kurihara, M. Nanotechnology. 2007, 18, 345609.; Kurihara, M. Bull. Jpn. Soc. Coord. Chem. 2007, 49, 34-46.

- 11) Ishizaki, M.; Abe, M.; Hoshi, Y.; Sakamoto, M.; Tanaka, H.; Kawamoto, T.; Kurihara, M. Chem. Lett. 2010, 39, 138-139.
- Hara, S.; Shiozaki, H.; Omura, A.; Tanaka, H.; Kawamoto, T.; Tokumoto, M.; Yamada, M.; Gotoh, A.; Kurihara, M.; Sakamoto, M. Appl. Phys. Express. 2008, 1, 104002.
- (独) 産業技術総合研究所 プレスリリース. http://www.aist. go.jp/aist_j/press_release/pr2012/pr20120208/pr20120208. html
- 14) Kitajima, A.; Tanaka, H.; Minami, N.; Yoshino, K.; Kawamoto, T. Chem. Lett. 2012, 41, 1473-1474.:高崎幹大, 岩井良太, 北島明子,田中寿,川本徹,吉野和典."プルシアンブルーナ ノ粒子造粒体の粒径とCs吸着特性の関係".第2回環境放 射能除染研究発表会要旨集. 2013-6-5/7.環境放射能除染 学会, 2013, p152.
- 15) "SGS Lightuning® electrochromic glass". SAINT-GOBAIN 社資料. http://www.saint-gobain.com/en/group/innovationand-research/new-products/sgs-lightuning; SAINT-GOBAIN社ウェブサイト. http://www.saint-gobain-sekurit.com/ en/?nav1=PR&id=372; ECLIPS Energy systems社ウェブサイト. http://eclipsethinfilms.com/
- 16) "Elektrochrome Verbundgläser". GESIMAT 社 ウェブ サイト. http://www.gesimat.de/elektrochrom.htm
- 17) 面谷信 監修. 電子ペーパーの最新技術動向と応用展開.(株)シーエムシー出版, 2011, 201p.
- 18) "電子ペーパー". 凸版印刷(株) ウェブサイト. http://www. toppan.co.jp/denshi_paper/
- 19)(独)産業技術総合研究所. 国際公開特許 WO2011/030790. 2011-03-17.
- 20) 守友浩,栗原佑太朗. 機能材料. 2011, 31(12), 35-41.
- 21) Imanishi, N.; Morikawa, T.; Kondo, J.; Takeda, Y.; Yamamoto, O.; Kinugasa, N.; Yamagishi, T. J. Power Source. 1999, 79, 215-219.
- 22) Okubo, M.; Asakura, D.; Mizuno, Y.; Kim, J.-D.; Mizokawa, T.; Kudo, T.; Honma, I. J. Phys. Chem. Lett. 2010, 1, 2063-2071.
- 23) Matsuda, T.; Moritomo, Y. Appl. Phys. Express. 2011, 4, 047101.
- 24) Moritomo, Y.; Takachi, M.; Kurihara, Y.; Matsuda, T. Appl. Phys. Express. 2012, 5, 041801.
- 25)(独)產業技術総合研究所.特開 2011-180469. 2011-09-15.
- 26) Karyakin, A.A.; Puganova, E.A.; Budashov, I.A.; Kurochkin, I.N.; Karyakina, E.E.; Levchenko, V.A.; Matveyenko, V.N.; Varfolomeyev, S.D. Anal. Chem. 2004, 76, 474-478.
- Ricci, M.; Amine, A.; Palleschi, G.; Moscone, D. Biosens. Bioelectron. 2003, 18, 165-174.
- 28) (独) 產業技術総合研究所. 特許第4889015号. 2012-02-29.

最近のトピックス

~多様化するβ-ラクタマーゼと検査試薬に関する一考~

ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系薬などのβ-ラクタ ム系薬は様々な病原微生物に対する抗菌活性の強さと、ヒトに 対する安全性の高さからもっとも汎用されている抗菌薬である。 しかしながら、ペニシリン実用化から60年余りで様々な耐性 メカニズムによる薬剤耐性菌が出現してきている。1980年代よ り第三世代セファロスポリンが発売され、TEM型やSHV型 Extended-spectrum β-lactamase (ESBL)産生菌、イミペネムが 1980年代半ばより発売されるも、IMP-1を産生するカルバペネ ム耐性緑膿菌やセラチアが、1990年代にはCTX-M型ESBL 産生菌が出現し、2000年代より世界的に蔓延してきている。現 在、IMP型やVIM型、さらにはNDM型のMetallo-β-lactamase (MBL)、さらにはKPC型、OXA型などの様々なカルバペネ マーゼ産生菌が世界を覆いつくそうとしている。

これら武装化した微生物の侵入を早期にキャッチし、感染 対策をとるシステムの必要性はますます高まるものと考える。

薬剤耐性菌の中で特に増加傾向の著しいESBL産生菌 は、CPDXなどの第三世代セフェム薬による選択分離培地の 利用によりスクリーニングできるようになっている。また、酵素基 質を利用することにより主要なESBL産生菌をコロニーの呈色 で簡易鑑別できるようになった。本手法を利用したクロモアガー ESBL(図1)は、ESBL産生菌の検出を目的として開発され、優 一方、CPDXを基剤とし、ESBL阻害剤、AmpC阻害剤、そして両阻害剤を含有した4ディスク法によるAmpC/ESBL鑑別ディスクは、従来のDDST (Double Disc Synergy Test)法と同等の精度を有す簡易法である(図2)。ESBL産生菌の中にはAmpCを同時に産生するタイプもあり、その場合にも非常にわかりやすく判別可能である³⁾。よって、クロモアガーESBLと本試薬を組み合わせることにより、煩雑な検査の簡略化が期待される(図3)。このような手法を用いることにより、様々な腸内細菌が存在するような検体(特に便検体)から、積極的に耐性菌を検出できるようになり、アクティブサーベイランス等にも有用と考えられる。

参考文献

- Saito, R.; Koyano, S.; Nagai, R.; Okamura, N.; Moriya, K.; Koike, K. Evaluation of a chromogenic agar medium for the detection of extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae. Letters in Applied Microbiology. 2010, 51, 704-706.
- 2) 浅原 美和, 川上 小夜子, 厚川 喜子, 石垣 しのぶ, 田中 孝志, 斧 康 雄, 古川 泰司. 基質拡張型βラクタマーゼ(ESBLs) 産生菌のスクリー ニング培地クロモアガーESBLの検討. 日本臨床微生物学会総会 2012.
- 3)森千尋,川上小夜子,浅原美和,市川りさ,西野入燈,田中孝志, 中野竜一,斧康雄,古川泰司.AmpC/ESBL鑑別ディスクによるβ-ラクタマーゼ分類法の検討.日本臨床微生物学会総会 2012.





〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 室町東三井ビルディング 電話 (03)6214-1056 FAX (03)3241-1029 インターネットホームページ http://www.kanto.co.jp 編集責任者 金田 尚 平成25年7月1日 発行