

[研究論文] グリシジルメタクリレート-スチレン共重合体
 粒子の作製とタンパク質吸着性
 --分析電子顕微鏡システム利用研究成果、その XXII (1) --

清水秀信¹・和田理征²・岡部勝¹

¹ 応用バイオ科学科

² 基礎・教養教育センター

Preparation of Glycidyl Methacrylate-Styrene Copolymer Latex and Particle Adsorption
 -- Research works accomplished by using Electron Microscope System: XXII (1) --

Hidenobu SHIMIZU¹, Risei WADA², Masaru OKABE¹

Abstract

Glycidyl methacrylate (GMA)-styrene (St) copolymer latex has been prepared from the polymerization in an emulsifier-free aqueous medium. The effects of GMA weight fraction in the monomer feed on the particle size, and the adsorption of bovine serum albumin (BSA) onto the resulting particles were investigated. Transmission electron microscopy measurements showed that final particle size decreased with GMA weight fraction up to 70wt% and then slightly increased at fraction of 90 wt%. The amounts of adsorbed BSA for these particles significantly decreased with an increase in GMA fraction up to 30wt% and were then kept constant at 30 wt% or above. These results indicate that little non-specific protein adsorption would occur for glycidyl methacrylate-styrene copolymer latex prepared at GMA fraction at 30 wt% or above.

Keywords: Glycidyl methacrylate, Protein adsorption, Latex, Emulsifier-free emulsion polymerization

1. 緒言

酵素や抗体などの生体分子固定化ポリマー微粒子は、アフィニティ分離やバイオリクター用の担体として利用されている。このような用途に利用するために要求される表面特性は、生体分子を穏和な条件で固定化でき、かつ、非特異的吸着が起こらないことである。この条件を満たす粒子の1つとして、反応性のエポキシ基を有するグリシジルメタクリレート (GMA) を含む粒子が挙げられる。図1にGMAの構造式を示す。PGMAにより表面が覆われた粒子は、タンパク質が吸着しにくいことが報告されている¹⁾。

分離・診断用に利用される粒子の表面はクリーンであることが望ましい。クリーンな粒子は、ソープフリー乳化重合により得ることができる²⁾。そこで本研究では、今後の用途展開が期待できるGMAを含む粒子を、GMAと

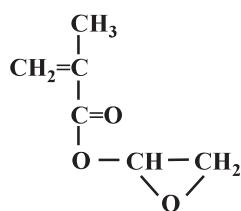


図1. GMAの構造式

スチレン(St)の仕込み割合を変えてソープフリー乳化重合させることにより作製し、得られた粒子の大きさ、形態、タンパク質吸着性について検討を行った。得られた粒子の形態観察は、透過型電子顕微鏡 (TEM) により、タンパク質吸着は、牛血清アルブミンをモデルタンパク質として評価した。

2. 実験

2.1 粒子の作製

200mL の四つ口フラスコに純水 90g を入れ、系内の酸素を除去するためにフラスコ内の窒素置換を行った。窒素置換を始めて 20 分後に、所定量の St と GMA (あわせて 4g) を入れ、その 10 分後に、0.1g の過硫酸カリウムを溶かした純水 6g を添加して重合を開始させた。重合は、温度 70°C、回転数 200rpm で行った。

2.2 粒子の大きさと形態観察

粒子の大きさや形態は、透過型電子顕微鏡 JEM-2000EX

(加速電圧 100kV)を用いて調べた。TEM 観察試料は、コロジオンで皮膜した銅メッシュ上に、希釈した粒子分散液を滴下して、乾燥させることにより作製した。

2.3 タンパク質吸着実験

タンパク質吸着実験は、モデルタンパク質として牛血清アルブミンを用い、濃度の異なるタンパク質溶液中に 5mg の微粒子を分散させ、室温で 24 時間静置することにより行った。分散媒には、0.05mol/L のトリス塩酸緩衝液 (pH8.0)を用いた。タンパク質吸着量は、粒子に吸着しなかった上澄みのタンパク質量を、BCA 法を用いて求めることにより算出した。

3. 結果及び考察

図 2 に、St と GMA の仕込み比を変えてソープフリー乳化重合を行ったときに得られたポリマー微粒子を、TEM により観察した結果を示す。モノマーの仕込み組成に関わらず、真球状で大きさの揃った粒子が得られることがわかった。GMA のエポキシ基は、重合開始剤に過硫酸塩を用いて重合した場合、15%程度開環することが松本らにより報告されている³⁾。本研究ではエポキシ基の定量は行っていないが、重合条件が松本らとほぼ同様であることから、同程度のエポキシ基は開環していることが推定される。

次に、TEM 像から粒子径を算出し、GMA の仕込み割合との相関性を調べた。結果を図 3 に示す。全モノマーに対して GMA を 5wt%加えると、粒子径は、550nm から 280nm へ急激に小さくなり、その後 70wt%までは徐々に小さくなった。この現象は次のように説明できる。GMA の割合が高いほど水に溶解しているモノマーの濃度は高くなる。濃度が高いほど、水中での重合反応が起こりやすくなるため、沈殿してくる鎖の数が増加する。その結果、粒子数が

増加したため、粒子径が小さくなったと考えられる。しかし、GMA の割合をさらに高くして 90wt%にすると、粒子径は 70wt%のときに比べて約 40nm 大きくなった。これは、水中で生成したポリマー鎖が水に溶けやすくなり、粒子数が減少したためであろう。

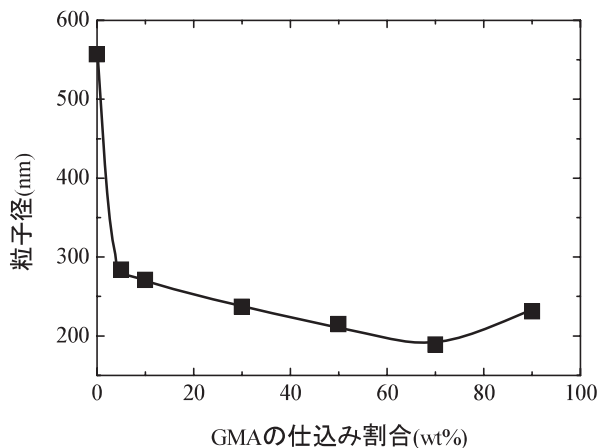


図3. GMAの仕込み割合が最終粒子径に及ぼす影響

図 4 に、仕込み GMA 割合の異なる粒子に BSA を吸着させたときの吸着等温線を示す。GMA 含量が 0wt%の粒子 (PSt 粒子) は、等温線の立ち上がり急であることから、タンパク質が吸着しやすいといえる。GMA を全モノマーに対して 5wt%添加して作製した粒子は、PSt 粒子に比べてタンパク質吸着を抑制できた。GMA の仕込み量が 30wt%までは、GMA の割合が増加するにつれ吸着量は徐々に減少する傾向が認められた。しかし、仕込み量が 30wt%と 90wt%の粒子では、吸着量の差はほとんど認められなかった。5wt%と少量の GMA を加えただけで、PSt 粒子に比べてタンパク質吸着を抑制できたのは、PGMA が粒子内部ではなく表面に多く存在しているためだと考え

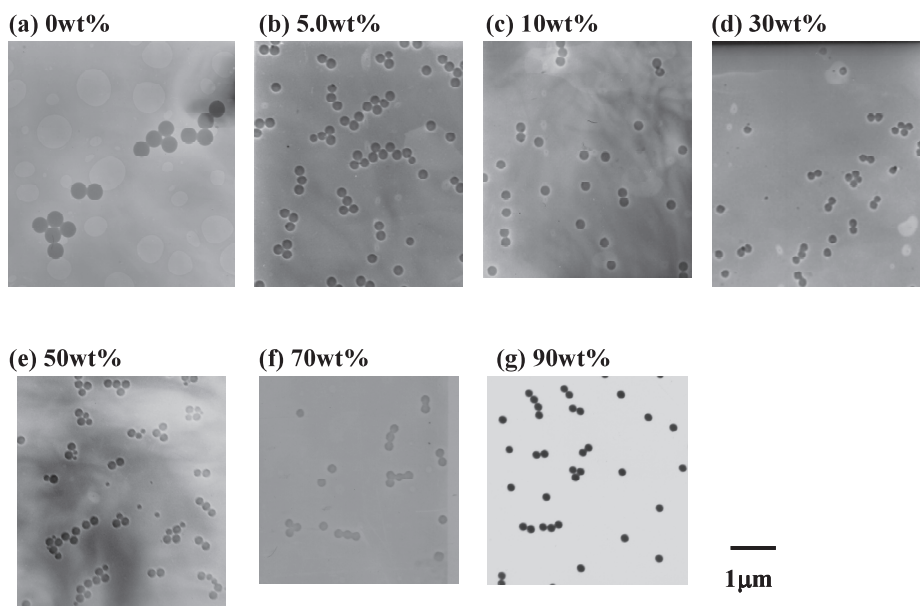


図2. GMAの仕込み比を変えたときに得られた粒子のTEM像

られる。また、30wt%以上の粒子で吸着量に差が認められなかったことから、仕込み割合が30 wt%のときには、微粒子表面がPGMAでほぼ覆われていることを示している。

以上の結果から、反応性と低タンパク質吸着性を併せ持つ粒子を、GMAとStのソープフリー乳化共重合で得るためには、GMAの仕込み割合が30wt%は必要であることがわかった。

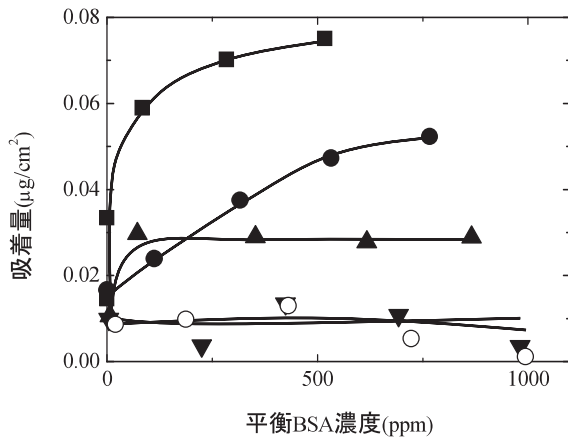


図4. P(St-co-GMA)粒子へのBSA吸着等温線
GMAの仕込み割合: ■, 0 wt%; ●, 5wt%; ▲, 10wt%;
▼, 30wt%; ○, 90wt%.

参考文献

- [1] Y. Inomata, T. Wada, H. Handa, K. Fujimoto, and H. Kawaguchi: Preparation of DNA-carrying affinity latex and purification of transcription factors with the latex, *J. Biomater. Sci., Polym. Edn.*, **5**, 293 (1994)
- [2] 川口春馬: ミクロスフェアの表面設計とその実際の応用, *高分子*, **44**, 294 (1995)
- [3] 松本恒隆, 大久保政芳, 高橋良武: エポキシ基含有高分子エマルジョン合成時におけるエポキシ基の開裂, *高分子論文集*, **34**, 571 (1977)