

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390012

研究課題名（和文）環境応答型ナノ界面制御技術を応用したバイオセパレーションシステムの開発

研究課題名（英文）Development of Bioseparation Systems utilizing Environmentally Responsive Nano-interface Controlled Technology

研究代表者

金澤 秀子（KANAZAWA HIDEKO）

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：10240996

研究成果の概要（和文）：環境変化を自ら認識し応答するインテリジェントな高分子を分子設計し、新しい概念のバイオセパレーションシステムの実現と手術室などの医療現場において on-site で計測可能な生体機能解析システムへの応用を行った。機能性高分子修飾分離担体のナノ界面制御技術に基づき、タンパクとの相互作用調節するテクノロジーを発展させ、バイオセパレーションシステムを構築し生体高分子の分離精製へ応用した。さらに手術室でリアルタイムに麻酔薬のモニタリングを行う on-site 計測に成功した。有機溶媒を使用しない本分離システムは患者の安全はもとより環境面でも優れていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have been developed a novel bioseparation systems, based on environmentally responsive nano-interface controlled technology. We designed environmentally responsive copolymer with N-isopropylacrylamide and various monomers. These polymers responded to external stimuli. Our system is possible to separate the analytes by using only an aqueous solution. These separation systems could provide highly useful for bioactive molecules such as steroids, amino acids and peptides separation. We achieved the bed-side monitoring of pharmaceutical anesthetic agent in operation room. Analysis without organic solvent is advantageous from the point of view of patient safety and environmental reason.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：高分子合成， ナノ材料， 環境対応， 生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム研究の成果を創薬や医薬品生産など社会へ還元するためには、遺伝子の実態であるタンパクの調製と、その機能解析が重要である。本研究は、タンパクの精製と解析法に革新的改革をもたらすことが期待される。タンパクは構造や物性は均一ではなく、きわめて多様である。したがって、個々のタンパクの性質に対応したテーラーメイドな精製に対応可能な技術の構築を図る。さらに超高速システムにより臨床現場での生体機能解析を実現する。

## 2. 研究の目的

環境変化を自ら認識し応答するインテリジェントな高分子を分子設計し、既存の方法にはない全く新しい概念のバイオセパレーションシステムの実用化と手術室などの医療現場において on-site で計測可能な生体機能解析システムへの応用を目指す。

これまでの研究で得られた機能性高分子修飾分離担体のナノ界面制御技術に基づき、刺激応答性高分子によるタンパクとの相互作用調節を進展させ①バイオ医薬品生産に重要な鍵となる新規バイオセパレーションシステムの構築と抗体の分離精製技術への応用、②臨床現場での超高速分析によりリアルタイムに薬物モニタリングを行う on-site 生体機能解析を実現する。

## 3. 研究の方法

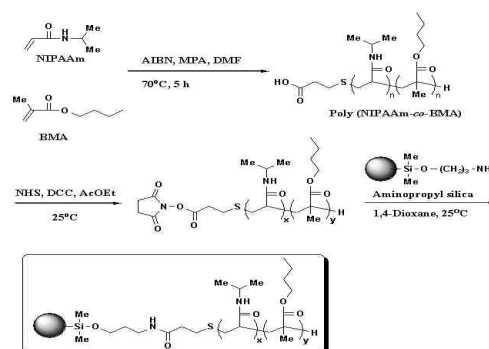
(1)外部環境変化によって2種類以上の構造(状態)・性質の変化を示す材料表面を設計し、物理・化学的な信号刺激(温度、pH等)に応答して、それぞれの構造に対応した特性・機能を必要なときに必要なだけ引き出せる表面を有する革新的分離システムの開発。(2)実際のバイオセパレーションへ適用可能な環境応答性ナノ基材の機能・高効率製造基

盤技術を確立し、下記の各分野への応用。

- ①抗体精製等、生体分子機能を損なわないグリーンバイオセパレーションシステム
- ②On-Site 型薬物動態・生体機能解析用超高速分離システム

## 4. 研究成果

機能性高分子修飾分離担体のナノ界面制御技術に基づき、タンパクとの相互作用調節するテクノロジーによる新規バイオセパレーションシステムの構築と臨床現場で薬物モニタリングを行う on-site 生体機能解析の実現を図った。研究成果の一部は、学術誌に論文として報告した。



Scheme1 Synthesis of P(NIPAAm-co-BMA5%) modified aminopropyl silica

(1)高密度温度応答性ポリマーブラシを用いた効率的なペプチド分離固定相の開発：表面開始精密重合法により多孔性ポリマービーズ上に種々の温度応答性高分子ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を修飾し、温度応答性クロマトグラフィー固定相としての評価を行った。高分子修飾ビーズによるペプチドの分離は、修飾量、鎖長、細孔径、修飾部位、基材ビーズの性質により大きく影響を受けることが示された。本研究で調製した固定相により緩衝液のみを移動相とした際のペプチド分離度の向上、塩基性移動相を用いた塩基性ペプチドの保持制御を達成した。耐久性が問題となるシリカゲルに替わる新しい

バイオセパレーション用固定相として期待できる。(Biomacromolecules 2009, J. Chromatogr. A 2010)

(2) 温度応答性クロマトグラフィーによる麻酔薬プロポフォールの血中濃度測定：超短時間作用型静脈麻酔薬であるプロポフォールは、外科手術における全身麻酔薬として汎用されている。本剤投与時には麻酔深度の調節が必須であることから、リアルタイムでの血中濃度測定が望まれている。本研究では、プロポフォールを静脈投与したサル血中濃度の経時変化を測定し、得られた定量値を従来法による結果と比較したところ、両者の値は良好に合致しており、温度グラジエントによる分析時間短縮も可能であった。本法は移動相に水のみを使用し、カラム温度によって溶質の保持時間を制御できることから、患者や医療従事者に対する有機溶媒暴露がなく、煩雑な移動相条件の検討が不要なため多忙な臨床現場でも容易に使用可能であることが確認された。(J. Chromatogr. A 2009)

(3) 機能性高分子の開発と高機能表面の設計：分子認識能の向上を目的として、フェニルアラニン及びトリプトファンを基盤としたアミノ酸誘導体を温度応答性高分子 poly-*N*-isopropylacrylamide (PNIPAAm)に

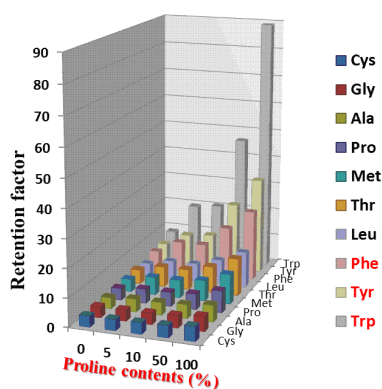


図 1 ポリマー鎖中のプロリン誘導体導入量による PTH-アミノ酸の保持係数変化

ランダム共重合させた機能性高分子を開発し、固定相表面へ修飾し、HPLC用分離担体を作成した。

(4) 高密度表面修飾法の検討：固体表面に機能性高分子を修飾する方法としてコーティングによる方法を検討した。層厚みを変えることが可能であり、高機能表面と物質との相互作用もコントロールできることが分かった。

(5) 抗体精製用アフィニティークロマトグラフィー：PNIPAAmの体積変化を利用して、タンパクを回収し、抗体精製を可能にする新しいアフィニティークロマトグラフィー法を試みた。リガンドとしてリゾチームを修飾した温度応答性アフィニティークラムを作成し、抗リゾチーム抗体による親和性評価を行ったところ、相互作用が強く回収できたタンパクは60-70%程度であった。これまでのシリカゲル担体ではリガンドの結合条件に適合しない可能性があり、ポリマー基材についても検討を行なった。

(6) on-site 計測用超高速分離システムの構築：粒径の小さい充填剤 (2 $\mu$ m 以下) を用いた高性能カラムを作製し超高速分離システムへ応用した。

(7) 前処理用固相抽出カラムの作成：ディスポーザブルなシリンジに新たに設計した分離担体を充てんし、生体試料の前処理などへ応用した。(特許出願：特願2009-221536)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 27 件)

1. Takako Miyabe-Nishiwaki, Tadashi Nishio, Hideko Kanazawa, et al. (6 名中 6 番目), Evaluation of the predictive performance of a pharmacokinetic model for propofol in Japanese macaques (*Macaca fuscata fuscata*), *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 査読有, in press 2012
2. Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, et al. (6 名中 5 番目), High Stability of Thermoresponsive Polymer-Brush-Grafted Silica Beads as Chromatography Matrices. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4 (4), 2012, 1998-2008.

査読有, DOI:10.1021/am201832b

3. Tadashi Nishio, Akari Nojima, Hideko Kanazawa, et al. (5 名中 4 番目), Effect of Polymer Containing a Naphthyl-Alanine Derivative on the Separation Selectivity for Aromatic Compounds in Temperature-Responsive Chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1228, 2012, 148-154. 査読有, DOI:10.1016/j.chroma.2011.07.047
4. Hideko Kanazawa, Teruo Okano, Temperature-responsive Chromatography for the Separation of Biomolecules, *J. Chromatogr. A*, 1218, 2011, 8738-8747, 査読有, DOI:10.1016/j.chroma.2011.04.015
5. Kenichi Nagase, Aya Mizutani Akimoto, Hideko Kanazawa, et al. (7 名中 6 番目), Effect of reaction solvent on the preparation of thermoresponsive stationary phase through a surface initiated atom transfer radical polymerization, *J. Chromatography A*, 1218, 2011, 8617-8628, 査読有, DOI:10.1016/j.chroma.2011.09.082
6. Eri ayano, Miyuki Karaki, Tsutomu Ishihara, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, Poly (N-isopropylacrylamide)-PLA and PLA blend nanoparticles for temperature-controllable drug release and intracellular uptake, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, in press. 査読有, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.10.003
7. Kenichi Nagase, Jun Kobayashi, Hideko Kanazawa, et al. (6 名中 5 番目), Thermoresponsive Polymer Brush on Monolithic-Silica-Rod for the High-Speed Separation of Bioactive Compounds, *Langmuir*, 27(17) 2011, 10830-9. 査読有, DOI:10.1021/la201360p
8. Shinobu Ito, Tomohisa Mori, Hideko Kanazawa, Toshiko Sawaguchi, Estimation of the postmortem duration of mouse tissue by electron spin resonance spectroscopy," *Journal of Toxicology*, 2011, in press. 査読有,
9. Yoshiko Nagata, Tadashi Nishio, Hideko Kanazawa, Reaction monitoring of tocopherols with active nitrogen oxides by ultra high-speed liquid chromatography., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55 2011, 241-246, 査読有, DOI:10.1016/j.jpba.2010.12.036
10. Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, et al. (7 名中 6 番目) Thermo-responsive protein adsorbing materials for purifying pharmaceutical protein on exposed charging surface. *J. Mater. Chem.*, 21, 2011, 2590-2593, 査読有, DOI:10.1039/c0jm03453c
11. Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, et al. (6 名中 5 番目) Thermally-modulated on/off-adsorption materials for pharmaceutical protein purification, *Biomaterials*, 32, 2011, 619-627, 査読有, DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.09.012
12. Tadashi Nishio, Eri Ayano, Yusuke Suzuki, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, Separation of phosphorylated peptides utilizing dual pH-and temperature-responsive chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1218, 2011, 2079-2084, 査読有, DOI:10.1016/j.chroma.2010.10.076
13. Shigemi Kai, Takeshi Akaboshi, Masumi Waki, Teruhisa Fuzimaki, Hideko Kanazawa, LC-MS/MS による畜水産物中のメトリブジンおよび代謝物の分析, *食品衛生学雑誌* 52(1), 2011, 28-33, 査読有.
14. Aya Mizutani, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, et al. (8 名中 5 番目)Preparation of thermo-responsive polymer brushes on hydrophilic polymeric beads by surface-initiated atom transfer radical polymerization for a highly resolute separation of peptides, *J. Chromatogr. A*, 1217, 2010, 5978-5985, 査読有, DOI:10.1016/j.chroma.2010.07.067
15. Kenichi Nagase, Mio Kumazaki, Hideko Kanazawa, et al. (8 名中 3 番目)Thermoresponsive polymer brush surfaces with hydrophobic groups for all-aqueous chromatography. *ACS Appl Mater Interfaces.*, 2(4), 2010, 1247-53, 査読有, DOI:10.1021/am100122h
16. Yusuke Hattori, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, et al. (7 名中 6 番目) Hydration of Poly(N-isopropylacrylamide) Brushes on Micro-silica Beads Measured by a Fluorescent Probe. *Chemical Physics Letters*, 491,2010, 193-198, 査読有, DOI:10.1016/j.cplett.2010.03.082
17. Aya Mizutani, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa, et al. (8 名中 4 番目) Effective separation of peptides using highly dense thermo-responsive polymer brush-grafted porous polystyrene beads, *J. Chromatogr. B*, 878, 2010, 2191-2198, 査読有 DOI:10.1016/j.jchromb.2010.06.026
18. Aya Mizutani, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa, et al. (8 名中 4 番目) Thermo-responsive polymer brush-grafted porous polystyrene beads for all-aqueous chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1217, 2010, 522-529, 査読有, DOI:10.1016/j.chroma.2009.11.073
19. Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, et al. (7 名中 5 番目), Preparation of Thermoresponsive Anionic Copolymer Brush Surfaces for Separating Basic Biomolecules, *Biomacromolecules*, 11 (1), 2010, 215-223, 査読有, DOI:10.1021/bm9010744
20. Takako Miyabe-Nishiwaki, Hideko Kanazawa, et al. (6 名中 6 番目), Anesthetic effects and pharmacokinetics of a single slow bolus dose of propofol in Japanese macaques (*Macaca fasciata*)

- fsucata), *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 37, 2010, 501-510, 査読有, DOI:10.1111/j.1467-2995.2010.00564.x
21. Hiroki Kobayashi, Mayumi Nishikawa, Chikako Sakamoto, Tadashi Nishio, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, Dual Temperature- and pH-Responsive Fluorescence Molecular Probe for Cellular Imaging utilizing a PNIPAAm- Fluorescein Copolymer, *Anal. Sci.* 25, 2009, 1043-1047, 査読有, DOI:10.2116/analsci.25.1043
  22. Tadashi Nishio, Rie Suzuki, Yuko Tsukada, Hideko Kanazawa, Teruo Okano, Takako Miyabe-Nishiwaki, Aqueous chromatographic system for the quantification of propofol in biological fluids using a temperature-responsive polymer modified stationary phase, *J. Chromatogr. A*, 1216, 2009, 7427-7432, 査読有, DOI:10.1016/j.chroma.2009.04.047
  23. Tsutomu Ishihara, Hideko Kanazawa, et al. (7名中6番目) Polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate with different release profiles and stealthiness. *Int J Pharm.*, 375(1-2), 2009, 148-154, 査読有, DOI:10.1016/j.ijpharm.2009.04.001
  24. Tsutomu Ishihara, Hideko Kanazawa, et al. (7名中4番目) Intracellular delivery of siRNA by cell-penetrating peptides modified with cationic oligopeptides, *Drug Delivery*, 16(3), 2009, 153-159, 査読有, DOI:10.1080/10717540902722774
  25. Tsutomu Ishihara, Maoko Goto, Hideko Kanazawa, Megumu Higaki, Yutaka Mizushima, Efficient entrapment of poorly water-soluble pharmaceuticals in hybrid nanoparticles, *J. Pharm. Sci.*, 98(7), 2009, 2357-2363, 査読有, DOI:10.1002/jps.21605
  26. Hideko Kanazawa, Development of Novel Thermally Responsible Separation Systems using Functional Polymers, *Chromatography*, 30(1), 2009, 1-9, 査読有
  27. 西尾忠, 金澤秀子, 多機能性ポリマーを用いる環境低負荷型クロマトグラフィシステムの開発, *分析化学 (BUNSEKI KAGAKU)* 59(3), 2010, 163-173, 査読有
- [学会発表] (計 25 件)
1. T. Nishio, H. Kanazawa et al. (4名中3番目) Temperature-Responsive Chromatography utilizing Amino-Acid Based Functional Copolymer. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011. 2011.05.23-05.26. Kyoto, Japan.
  2. H. Kanazawa, T. Nishio et al. (4名中1番目) Aqueous Chromatographic System Utilizing Dual Temperature and pH-Responsive Polymer. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011. 2011.05.23-05.26. Kyoto, Japan.
  3. T. Nishio, H. Kanazawa et al. (5名中4番目) Preparation of Novel Solid-Phase Extraction Cartridge utilizing Temperature-Responsive Polymer. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 2011.05.23-05.26. Kyoto, Japan.
  4. K. Nagase, H. Kanazawa et al. (6名中5番目) Thermoresponsive Polymer Brush Modified Monolithic Silica for Separating Bioactive Compounds. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 2011.05.23-05.26. Kyoto, Japan.
  5. A. Nojima, T. Nishio, H. Kanazawa et al. (6名中4番目) Development of Novel Temperature-Responsive Chromatographic Stationary Phase with Tunable the Aromatic Selectivity. 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2011.06.19-06.24, Budapest, Hungary.
  6. M. Shimamura, T. Nishio, H. Kanazawa et al., (5名中3番目) The Synthesis and Design of Temperature-responsive Polymer for Aqueous and Green Chromatography. 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2011.06.19-06.24, Budapest, Hungary.
  7. T. Nishio, H. Kanazawa et al., (5名中3番目) The Synthesis and Design of Temperature-responsive Polymer for Aqueous and Green Chromatography. 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2011.06.19-06.24, Budapest, Hungary.
  8. 金澤秀子, ソフト界面の動的特性を活かした分析化学. 日本分析化学会第60年会特別シンポジウム"ソフト界面を活かした分析化学" 2011.09.14. 名古屋.
  9. H. Kanazawa, Green Chromatography -An Environmentally Friendly HPLC system utilizing Temperature-responsive Polymer modified Stationary Phase-. The 37th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Dalian, China. 2011.10.11.
  10. 西尾忠, 金澤秀子 他 (4名中3番目). 芳香族アミノ酸を導入した機能性ポリマーによる温度応答性クロマトグラフィ. 日本薬学会第131年会 2011.03.29.-03.31. 静
  11. H. Kanazawa, T. Nishio, E. Ayano. Dual Temperature and pH-Responsive Chromatography Utilizing Functional Polymer. 35th International Symposium on High

- Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2010), 2010.06.19.-06.24. Boston, USA.
12. K. Kondo, T. Nishio, H. Kanazawa. Development of a Novel Pretreatment Column Utilizing Temperature-Responsive Polymer for Maintaining Bioactivity of the Analytes. 35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2010), 2010.06.19.-06.24. Boston, USA.
  13. R. Kanazashi, T. Nishio, H. Kanazawa et al., (5名中5番目) Temperature-Responsive Chromatography Utilizing Amino-Acid Based Polymers. 35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2010), 2010.06.19.-06.24. Boston, USA.
  14. T. Nishio, Y. Ueda, H. Kanazawa. Novel Aqueous Chromatographic System for Quantification of Pharmaceutical Compounds using Temperature-Responsive Polymers as the Stationary Phase. 35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2010), 2010.06.19.-06.24. Boston, USA.
  15. 金刺良祐, 西尾 忠, 金澤秀子 他 (7名中5番目) 芳香族アミノ酸誘導体修飾カラムを用いた温度応答性クロマトグラフィー. 日本薬学会第130年会, 2010.03.28-03.30. 岡山
  16. 西尾 忠, 小林浩規, 金澤秀子, 岡野光夫. 機能性ポリマーを用いた環境応答型蛍光プローブの開発. 日本薬学会第130年会, 2010.03.28-03.30. 岡山
  17. 金澤秀子, 環境負荷を低減するグリーンクロマトグラフィーシステムの開発. 慶應義塾「地球環境に優しい科学技術」シンポジウム. 2010.07.08. 東京
  18. 金刺良祐, 西尾 忠, 金澤秀子 他 (5名中3番目). アミノ酸誘導体高分子を用いた分子認識型温度応答性クロマトグラフィーシステムの開発. 日本分析化学会第59年会 2010.09.15.-09.17. 仙台
  19. 近藤賢治, 西尾 忠, 金澤秀子, 岡野光夫. 温度制御を用いた試料吸脱着法による新規固相抽出法の確立. 日本分析化学会第59年会 2010.09.15.-09.17. 仙台
  20. 金澤秀子, 環境負荷を低減するグリーンクロマトグラフィーシステムの開発. 新潟大学理学部化学科講演会 2010.7.28 新潟
  21. 金澤秀子, 環境応答型ナノ界面制御技術を応用したクロマトグラフィーシステム. 第220回液体クロマトグラフィー研究懇談会 2009.4.14 東京
  22. 金澤秀子, 温度で薬物の放出を制御できるナノ粒子 DDS. 社団法人高分子学会高分子同友会勉強会. 2009.6.8. 東京
  23. 石川 真, 西尾 忠, 金澤秀子 他 (7名中4番目) アミノ酸誘導体を用いた機能性高分子による温度制御型クロマトグラフィーシステム. 日本分析化学会第58年会. 2009.09.24-09.26. 札幌
  24. 小林浩規, 西尾 忠, 金澤秀子, 岡野光夫. 機能性高分子を用いた環境応答型新規蛍光プローブの基礎研究. 日本分析化学会第58年会. 2009.09.24-09.26. 札幌
  25. C. Sakamoto, H. Kanazawa et al., (8名中7番目) Temperature-dependent drug release utilizing functional polymer introduced liposome. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009, Fukuoka, 2009.10.15-18.
- [図書] (計 1 件)  
Hideko Kanazawa, et al., Willey & Sons, Handbook of Green Analytical Chemistry, 2012, pp 427-444 .
- [産業財産権]  
 ○出願状況 (計 1 件)  
 名称: 物質分離用前処理カートリッジ及びそれを利用した前処理方法  
 発明者: 金澤秀子、岡野光夫  
 権利者: セルシード (株)、金澤秀子  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2009-221536  
 出願年月日: 2009年9月1日  
 国内外の別: 国内
- 取得状況 (計 0 件)  
 名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:
6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 金澤 秀子 (KANAZAWA HIDEKO)  
 慶應義塾大学・薬学部・教授  
 研究者番号: 10240996
- (2) 研究分担者  
 西尾 忠 (NISHIO TADASHI)  
 慶應義塾大学・薬学部・助教  
 研究者番号: 80401892