

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700399
 研究課題名（和文）精密設計された機能性表面によるマイクロ・バイオアナリシスデバイスの開発
 研究課題名（英文）Design of micro-bioanalysis devices using well defined functional surfaces
 研究代表者
 長瀬 健一（NAGASE KENICHI）
 東京女子医科大学・医学部・助教
 研究者番号：10439838

研究成果の概要（和文）：本研究では、温度応答性高分子ポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）とアクリル酸、ブチルメタクリレートの共重合体を精密重合法によってシリカ表面に高密度に修飾し、温度にตอบสนองして低分子薬剤・ペプチド・タンパク質などの生理活性物質を分析・分離するシステムの構築をおこなった。

研究成果の概要（英文）：Bio-analysis systems for analyzing various bioactive compounds such as medicine and pharmaceutical peptides and proteins were developed using poly(*N*-isopropylacrylamide), temperature-responsive polymer, and its copolymer modified surfaces.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：インテリジェント材料、温度応答性表面、相互作用、分析、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

温度応答性高分子である poly(*N*-isopropylacrylamide)(PIPAAm) は、生体内温度に近い 32 の Lower Critical Solution Temperature (LCST) を境に親水性 / 疎水性が劇的に変化する性質を有するため、Drug Delivery System (DDS) や (Bae Y.H. et al., J Polym. Sci. 1990)、細胞培養基材 (Yamato et al., Mater Today, 2004) への応用がおこなわれている。一方で PIPAAm の温度による疎水性変化を利用した研究とし

て温度応答性クロマトグラフィーの研究がおこなわれている (Kikuchi et al., Prog. Polym. Sci. 2002)。この研究では、シリカビーズ表面に PIPAAm をカップリング反応、ラジカル重合により導入したものをクロマト担体として用いる事で、温度によりクロマト担体と溶質間の相互作用を制御する新しい概念のクロマトグラフィー担体である (図 1)。従来の生理活性物質の分離では、移動相に有機溶媒を添加して溶質の分離度を調節していたのに対し、カラム温度変化のみによ

り分離度を調節できるため、生体試料の活性を損なわずに分離・分析をおこなうことが可能である。

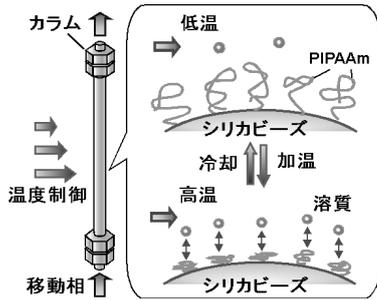


図1 温度応答性クロマトグラフィー概念図

この温度応答性クロマト担体の新規調製方法として原子移動ラジカル重合(ATRP)が取り入れられている。ATRP 開始剤をシリカビーズ表面に導入して ATRP をおこなうことで、PIPAAm の鎖長を制御しながら、高密度に PIPAAm を修飾したシリカビーズを調製することができた(図2)。ATRP で調製した担体の PIPAAm 修飾量は 3.5 mg/m^2 であり、ラジカル重合で調製した PIPAAm ハイドロゲル表面 ($571 \mu\text{g/m}^2$) よりも 1 桁多い PIPAAm の修飾量が得られた。これにより、従来法で調製した担体と比較して顕著に大きな担体-溶質間の相互作用が得られ、必要カラム長を大幅に短く ($150 \text{ mm} \rightarrow 50 \text{ mm}$) することが可能になった(K. Nagase *et al.*, Langmuir 2007)。また、ATRP 開始剤の修飾密度を変化させることで、PIPAAm グラフト密度を調節可能であり、目的物質の分離に適したグラフト鎖長・グラフト密度を任意に調節することが可能である(K. Nagase *et al.*, Langmuir, 2008)。

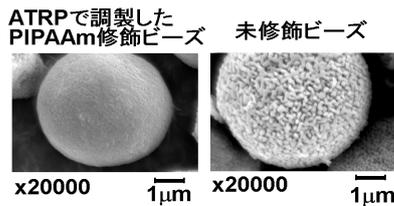


図2 ATRP により調製した PIPAAm 修飾シリカビーズ

2. 研究の目的

ATRP により PIPAAm を精密にグラフトした機能性表面は、従来までの PIPAAm 修飾表面とは顕著に異なる性能を有することを発見し、従来の PIPAAm 修飾表面では成し得なかった生理活性物質の分離も可能である。この機能性表面は HPLC 用クロマト担体だけでなく、医療用分析チップへの応用や医薬品製造工程に用いる精製プロセスへの応用まで、様々な用途での使用が期待できると考える。

そこで、本研究では、IPAAm とアクリル酸、

ブチルメタクリレートとの共重合体を精密重合合法によってシリカ表面に高密度に修飾し、温度にตอบสนองして低分子薬剤・ペプチド・タンパク質などの生理活性物質を分析・分離するシステムの構築をおこなった。ATRP 法により調製した温度応答性高分子表面は、少ない単位面積あたりに高密度なポリマーを修飾することができるので、分離に必要な相互作用の面積を少なくすることができる。これにより、生理活性物質の分析・分離に要するサンプル量、移動相の量を少なくできるため、マイクロ・アナリシスといわれる分離に適していると考えられる。

3. 研究の方法

シリカビーズ(平均粒径 $5 \mu\text{m}$ 、細孔径 300 \AA) を塩酸で洗浄し、表面に 2-(*m/p* クロロメチルフェニル)エチルトリクロロシランを反応させ、ATRP 開始剤固定化シリカビーズを調製した。このシリカビーズ表面で、触媒の CuCl 、 CuCl_2 、 Me_6TREN 存在下 2-プロパノール中で反応時間 4h の ATRP 反応を行い、IPAAm、*tert* ブチルアクリレート(tBA)、疎水性モノマーの *tert* ブチルアクリルアミド(tBAAm) もしくはブチルメタクリレート(BMA) の三元共重合体 P(IPAAm-*co*-tBA-*co*-tBAAm) または P(IPAAm-*co*-tBA-*co*-BMA) を修飾した(図3)。さらにジクロロメタン中でメタンスルホン酸により tBA の *tert* ブチル基の脱保護をおこない、P(IPAAm-*co*-AAc-*co*-BMA) プラシ修飾シリカビーズを調製した。これを充填したカラム ($4.6 \times 50 \text{ mm}$) を HPLC システムに接続し、恒温槽でカラム温度を制御しながら、ステロイド、カテコールアミン、アンジオテンシン、リゾチームの溶出実験を行った。

また、同様に IPAAm と疎水性モノマーのブチルメタクリレート(BMA) との共重合体を 16h の ATRP で修飾したシリカビーズを調製した(図4)。これを充填したカラム ($4.6 \times 50 \text{ mm}$) を HPLC システムに接続し、恒温槽でカラム温度を制御しながら、安息香酸類、フェノール類の溶出実験を行った。

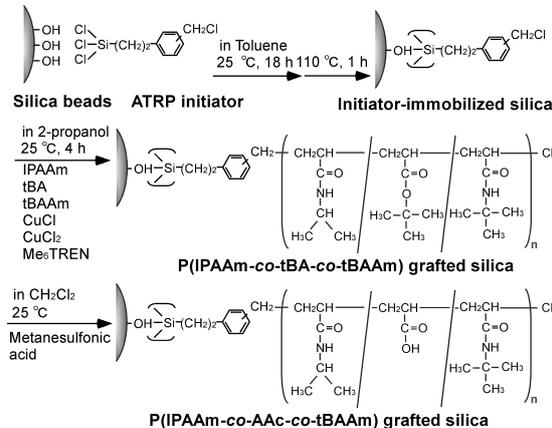


図3 ATRP による P(IPAAm-*co*-AAc-*co*-tBAAm) 修飾シリカビーズの調製

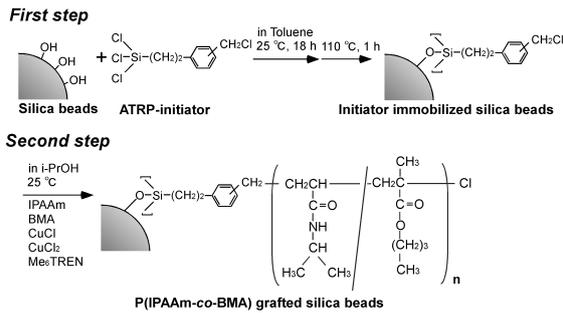


図4 ATRPによるP(IPAAm-co-BMA)修飾シリカビーズの調製

4. 研究成果

アニオン性の官能基を有するアクリル酸(AAc)と温度応答性のIPAAmならびに疎水性モノマーであるブチルメタクリレート(BMA)およびtertブチルアクリルアミド(tBAAm)の共重合体であるP(IPAAm-co-AAc-co-BMA)およびP(IPAAm-co-AAc-co-tBAAm)を表面開始ATRPにより高密度に修飾した表面を調製し、塩基性の生体内物質との相互作用を解析した。

塩基性の物質としてカテコールアミン、アンジオテンシン、リゾチームを用いて相互作用を解析したところカテコールアミン、アンジオテンシンは温度により保持時間が変化した。これは、温度によってコポリマーブラシ修飾表面の静電的性質、疎水的な性質が変化していることに起因することがわかった。またリゾチームに関しては、低温で非吸着、高温で吸着を起こすことがわかった。これは、修飾している高分子の脱水和によるリゾチームとの疎水性相互作用に起因すると考えられる。これにより、塩基性の低分子生理活性物質、ペプチド、タンパク質とインテリジェント表面との相互作用を温度により制御可能であることが示された(図5)。

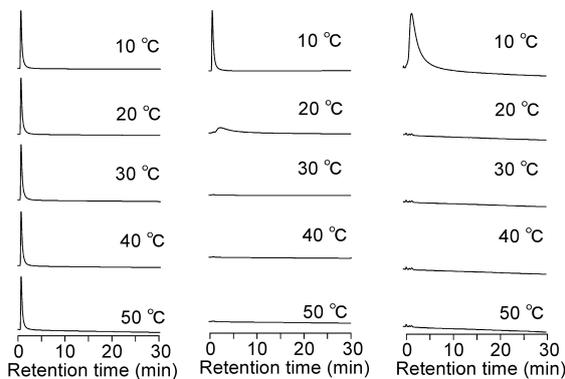


図5 IPAAm、アクリル酸共重合体修飾シリカビーズからのリゾチーム溶出挙動

また、疎水性モノマーであるブチルメタクリレート(BMA)とIPAAmとの共重合体P(IPAAm-co-BMA)を修飾した系では、BMAの組成比が多くなるに従い、共重合体と安息香酸との相互作用が強くなることが示された。これにより、温度応答性高分子に疎水性モノマーを導入することで溶質との疎水性相互作用を強くすることが示された(図6)。

現在、これらの知見を利用して、小スケールで高速分離をおこなうモノリスシリカカラムにインテリジェント表面を設計することを行っており、これにより高速分離が行える分離システムの開発をおこなっている。

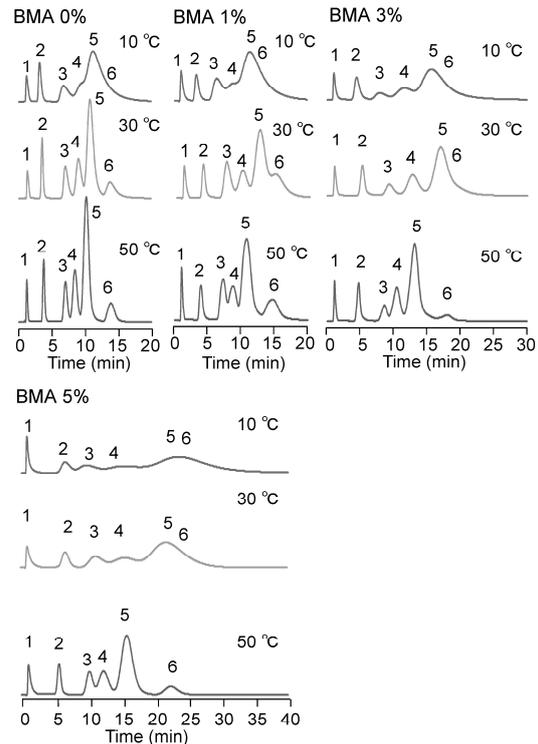


図6 IPAAm、BMA共重合体修飾シリカビーズからの安息香酸の溶出挙動

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3件)

Kenichi Nagase, Mio Kumazaki, Hideko Kanazawa, Jun Kobayashi, Akihiko Kikuchi, Yoshikatsu Akiyama, Masahiko Annaka, Teruo Okano, "Thermoresponsive Polymer Brush Surfaces with Hydrophobic Groups for All-Aqueous Chromatography", *ACS Applied Materials & Interfaces*, (2010), 2, 1247-1253

Kenichi Nagase, Jun Kobayashi, Akihiko Kikuchi, Yoshikatsu Akiyama, Hideko Kanazawa, Masahiko Annaka, Teruo Okano, "Preparation of Thermoresponsive Anionic Copolymer Brush Surfaces for Separating Basic Biomolecules", *Biomacromolecules*, (2010), 11, 215-223

Kenichi Nagase, Jun Kobayashi, Teruo Okano, "Temperature-responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell sheet engineering", *Journal of the Royal Society Interface*, (2009), 6, S293-S309

[学会発表](計4件)

Kenichi Nagase, Simuck Yuk, Jun Kobayashi, Akihiko Kikuchi, Yoshikatsu Akiyama, Hideko Kanazawa, Masahiko Annaka, Teruo Okano, "Thermoresponsive Anionic Copolymer Brush Surfaces for Adsorption Chromatography", 8th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, 2009年5月20日-23日, 東レ総合研修センター(三島)

Kenichi Nagase, Simuck Yuk, Jun Kobayashi, Akihiko Kikuchi, Yoshikatsu Akiyama, Hideko Kanazawa, Masahiko Annaka, Teruo Okano, "Preparation of Temperature-Responsive Anionic Copolymer Brush For Separation of Basic Biomolecules" GelSympo 2009, 2009年12月2日-4日, 関西大学(大阪)

長瀬健一、Yuk Simuck、小林 純、菊池明彦、秋山義勝、金澤秀子、安中雅彦、岡野光夫、"温度応答型アニオン性表面の調製とタンパク質の吸脱着制御"、第58回高分子討論会、2009年9月16日-18日、熊本大学(熊本)

長瀬健一、Yuk Simuck、小林 純、菊池明彦、秋山義勝、金澤秀子、安中雅彦、岡野光夫、"タンパク質精製を目的とした温度応答型アニオン性コポリマーブラシ表面の調製"、第31回日本バイオマテリアル学会大会、2009年11月16日-17日、京都テルサ(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長瀬 健一 (NAGASE KENICHI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10439838