

温度応答性表面の設計と そのクロマトグラフィーへの応用

(課題番号 07408030)

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金
(基盤研究(A)(2) 一般)
研究成果報告書



平成9年3月

研究代表者 桜井靖久
(東京女子医科大学 医学部 教授)

はしがき

本研究成果報告書は、平成7年度および平成8年度文部省科学研究費補助金（基盤研究（A）（2）一般）（課題番号0740830）により行った、「温度応答性表面の設計とそのクロマトグラフィーへの応用」に関する成果をまとめたものである。

本研究の遂行にあたり、共立薬科大学松島美一教授、同金澤秀子講師、早稲田大学工学部酒井清孝教授、薬師寺大二氏（大学院生）のご助力を得たことを付記し、ここに感謝いたします。

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金（基盤研究（A）（2）一般）研究成果報告書

課題名：

温度応答性表面の設計とそのクロマトグラフィーへの応用

課題番号： 0740830

研究組織：

研究代表者：桜井靖久（東京女子医科大学・医学部・教授）

研究分担者：岡野光夫（東京女子医科大学・医学部・教授）

研究分担者：鈴木 憲（東京女子医科大学・医学部・助手）

研究分担者：菊池明彦（東京女子医科大学・医学部・助手）

研究経費：

平成7年度 23,700,000 円

平成8年度 3,600,000 円

計 27,300,000 円

研究発表

(1) 学会誌等

(1) T. Okano, N. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai, Y. Sakurai

Mechanism of cell detachment from temperature-modulated hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces

Biomaterials, 16, 297-303 (1995) (平成7年3月)

(2) Y. G. Takei, T. Aoki, K. Sanui, N. Ogata, Y. Sakurai, T. Okano

Temperature-modulated platelet and lymphocyte interactions with poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces

Biomaterials, 16, 667-673 (1995) (平成7年6月)

(3) T. Okano, A. Kikuchi, Y. Sakurai, Y. Takei, N. Ogata

Temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide) as a modulator for alteration of

hydrophilic/hydrophobic surface properties to control activation/inactivation of platelets
Journal of Controlled Release, **36**, 125-133 (1995) (平成7年9月)

(4) H. Kanazawa, K. Yamamoto, Y. Matsushima, N. Takai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano
Temperature-responsive chromatography using poly(*N*-isopropylacrylamide)-modified silica
Analytical Chemistry, **68**, 100-105 (1996) (平成8年1月1日)

(5) 薬師寺大二、酒井清孝、菊池明彦、桜井靖久、岡野光夫
温度応答性高分子をグラフトした表面を用いた新しい温度制御型タンパク質クロマト
グラフィー
治療と診断のシステム 化学工学シンポジウムシリーズ55、化学工学会治療システ
ム研究会編、化学工学会、東京、1996. pp.67-70 (平成8年5月1日)

(6) H. Kanazawa, Y. Kashiwase, K. Yamamoto, Y. Matsushima, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano
Temperature-responsive liquid chromatography. 2. Effects of hydrophobic groups in *N*-
isopropylacrylamide copolymer-modified silica
Analytical Chemistry, **69**, (1997) in press (印刷中、平成9年3月1日発行予定)

(7) H. Kanazawa, K. Yamamoto, Y. Kashiwase, Y. Matsushima, N. Takai, A. Kikuchi, Y. Sakurai,
T. Okano
Analysis of peptides and proteins by temperature-responsive chromatographic system using *N*-
isopropylacrylamide polymer-modified columns
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, (1997) in press (印刷中)

(2) 口頭発表

1)国内学会

- (1) 山本一夫、柏瀬友紀、金澤秀子、松島美一、高井信治、岡野光夫、桜井靖久
機能性高分子修飾シリカゲル充填剤を用いた温度応答性クロマトグラフィー
日本薬学会第115年会、**4**、174 (1995) (平成7年3月、仙台)
- (2) 柏瀬友紀、山本一夫、金澤秀子、松島美一、高井信治、岡野光夫、桜井靖久
温度応答性HPLC充填剤の開発 (第2報)

日本薬学会第115年会、4、161(1995) (平成7年3月、仙台)

- (3) 苺草富美子、奥原美奈子、菊池明彦、桜井靖久、岡野光夫
温度応答性ディッシュからの培養ラット肝細胞シートの回収とその機能亢進
第2回肝細胞研究会、25(1995) (平成7年6月、大宮)
- (4) 薬師寺大二、酒井清孝、菊池明彦、桜井靖久、岡野光夫
温度応答性高分子の表面グラフト化とタンパク質の吸・脱着制御
第44回高分子討論会、44(11)、2780-2781 (1995) (平成7年9月17日～19日、大阪)
- (5) 奥原美奈子、苺草富美子、坂井秀昭、菊池明彦、桜井靖久、岡野光夫
温度応答性表面を用いた細胞組織の2次元マニピュレーション
第44回高分子討論会、44(11)、2786-2787 (1995) (平成7年9月17日～19日、大阪)
- (6) 薬師寺大二、酒井清孝、菊池明彦、桜井靖久、岡野光夫
温度応答性高分子をグラフトした表面を用いた新しい温度制御型タンパク質クロマトグラフィー
化学工学会第28回秋季大会、1、388(1995) (平成7年9月、札幌)
- (7) 苺草富美子、奥原美奈子、菊池明彦、桜井靖久、岡野光夫
温度応答性ディッシュからの培養ラット肝細胞の回収とその機能亢進
第17回日本バイオマテリアル学会大会、123(1995) (平成7年10月、東京)
- (8) 薬師寺大二、酒井清孝、菊池明彦、青柳隆夫、桜井靖久、岡野光夫
新しい表面グラフト法による温度反応性表面の作製とその特性
日本MRSシンポジウム、BP3、76(1996) (平成8年5月22日～5月24日、千葉)
- (9) 金澤秀子、近藤知樹、柏瀬友紀、松島美一、高井信治、菊池明彦、桜井靖久、岡野光夫
温度応答性を用いた新規クロマトグラフィーシステムの開発

日本MRSシンポジウム、BP4, 77 (1996) (平成8年5月22日～5月24日、千葉)

- (10) 薬師寺大二、酒井清孝、菊池明彦、青柳隆夫、桜井靖久、岡野光夫
新規な表面構造を有するポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) 導入表面の作製と
その温度応答性
第45回高分子学会年次大会、45(5), 931 (1996) (平成8年5月27日～29日、名古屋)
- (11) 砂本達郎、近藤知樹、金澤秀子、松島美一、岡野光夫、菊池明彦、高井信治
機能性高分子修飾充填剤を用いた温度応答性クロマトグラフィー
日本分析化学会第45年会、3E11、119 (1996) (平成8年9月19日～21日、宮城)
- (12) 菊池明彦、桜井靖久、岡野光夫、金澤秀子、山本一夫、柏瀬友紀、松島美一、高井信治
温度に応答して親水性・疎水性を変化させる表面を用いた新規水系クロマトグラフィー
第45回高分子討論会、45(11) 2912-2913 (1996) (平成8年10月1日～10月3日、広島)
- (13) 薬師寺大二、酒井清孝、青柳隆夫、菊池明彦、桜井靖久、岡野光夫
グラフト構造をもつ温度応答性表面のぬれ特性とその構造表面
第45回高分子討論会、45(11)、2914-2915 (1996) (平成8年10月1日～3日、広島)
- (14) 菊池明彦、奥原美奈子、荻草富美子、桜井靖久、岡野光夫
温度に応答して親水性・疎水性を変化させる表面からの培養組織の回収
日本化学会第71秋季年会、2U14, 329 (1996) (平成8年10月5日～11日、福岡)
- (15) 薬師寺大二、酒井清孝、菊池明彦、青柳隆夫、桜井靖久、岡野光夫
ポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) を修飾した温度応答性表面のぬれ特性とその構造効果
第8回高分子ゲル研究討論会、21-22 (1997) (平成9年1月13日～14日、東京)

- (16) 菊池明彦、桜井靖久、岡野光夫、金澤秀子、砂本達郎、山本一夫、柏瀬友紀、松島美

—
温度応答性インテリジェント界面を用いた水系クロマトグラフィー

第6回インテリジェント材料シンポジウム、印刷中 (1997) (平成9年3月21日、東京)

2)国際学会

- (1) A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, H. Kanazawa, K. Yamamoto, Y. Kashiwase, Y. Matsushima, N. Takai

Temperature-modulated surface property changes for novel hydrophobic chromatography

5th Symposium on Intelligent Materials & The UK-JAPAN Seminar on Intelligent Materials, 61-63 (1996) (平成8年3月21～22日、東京)

- (2) A. Kikuchi, M. Okuhara, F. Karikusa, H. Sakai, Y. Sakurai, T. Okano

Two-dimensional manipulation of confluent cultured cells

5th World Biomaterials Congress, Transaction, 1, 907 (1996) (平成8年5月29日～6月2日、Toronto, Canada)

- (3) H. Kanazawa, Y. Kashiwase, T. Kondo, Y. Matsushima, N. Takai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano

Development of temperature-responsive chromatographic system using *N*-isopropylacrylamide copolymers-modified silica

20th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, P-0523-M, 174 (1996) (平成8年6月16日～21日、San Francisco, USA)

- (4) H. Kanazawa, Y. Kashiwase, T. Kondo, Y. Matsushima, N. Takai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano

Analysis of peptides by temperature-responsive chromatographic system using *N*-isopropylacrylamide polymer-modified column

7th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, PT-29, 142 (1996) (平成8年8月20日～8月23日、大阪)

- (5) A. Kikuchi, H. Kanazawa, Y. Kashiwase, T. Sunamoto, Y. Matsushima, Y. Sakurai, T. Okano
Temperature-responsive chromatography system for analyses of bioactive compounds
8th International Symposium on recent advances in drug delivery systems, in press (1997) (平成9年2月24日～28日、Saly Lake City, Utah, USA)

(3) 出版物

なし

概要

高分子、金属、ガラスなどの種々の材料表面に刺激応答性高分子をその微細構造を制御して導入することにより、高機能性表面を作製することができる。この表面はpH、温度、光などの外的刺激によってその構造を変化させることができる点で従来の機能性表面をさらに進めた高機能表面と呼ぶことができる。表面構造を外的刺激によって制御することで表面の機能をも制御できる点に着目し、新しい物質分離・精製を系統的に産業化する提案をしてきている。(図1)^{1,2} とくに、多孔膜や膨潤した膜の表面に導入した刺激応答性高分子層の構造を密から疎、あるいは親水性から疎水性に変化させて物質の構造・機能制御を外的信号によって行い、この機能変化を利用して新しい分離・精製システムの可能性が検討されている(図2)。

本研究では、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)の水中での温度に応答した水溶性変化³に着目し、PIPAAmやその誘導体を構造制御して固体表面に導入した。この表面の温度に応答した親水性・疎水性変化を利用し、物質の水系での高度な分離・精製を追究した。図3に模式的に示したように、PIPAAmは水中、32℃以下で水和し分子が引き延ばされた形態をとって溶解する。温度が32℃以上になると高分子が急激に脱水和して疎水性凝集し、水に不溶となる。この水溶性、疎水性の大きく変化する温度を下限臨界

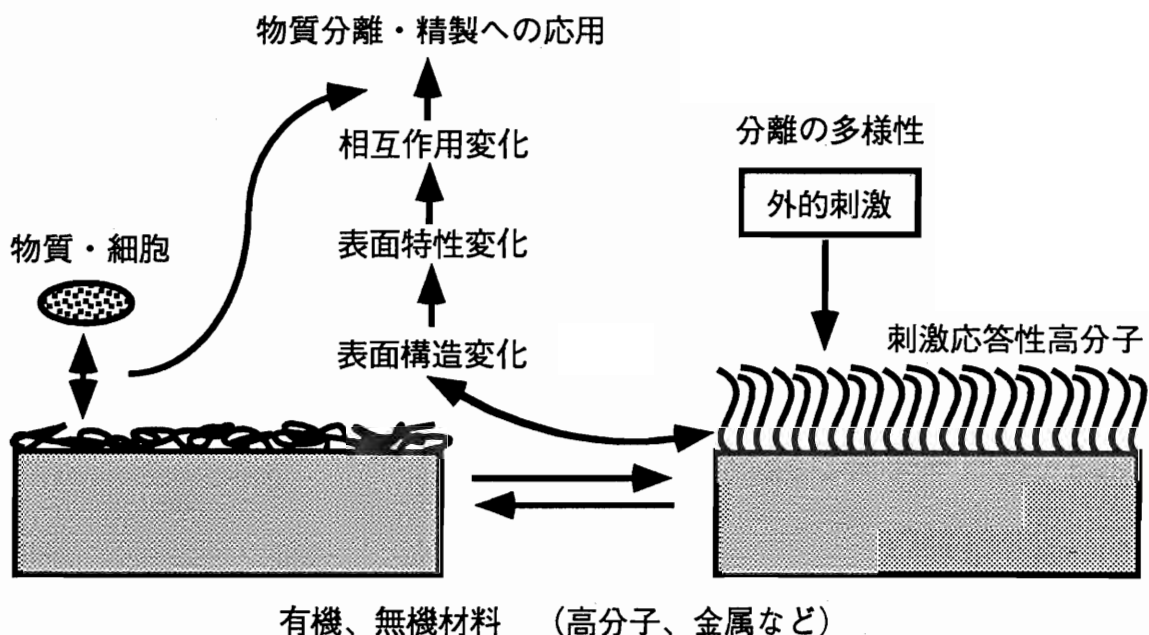
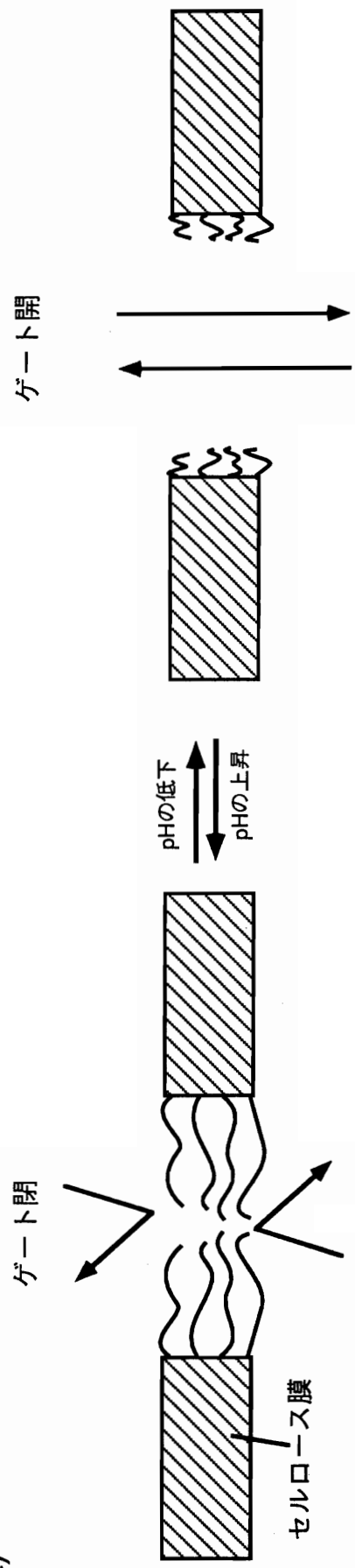


図1 刺激応答性高分子で修飾した高機能性表面の物質分離・精製への応用

a)



b)

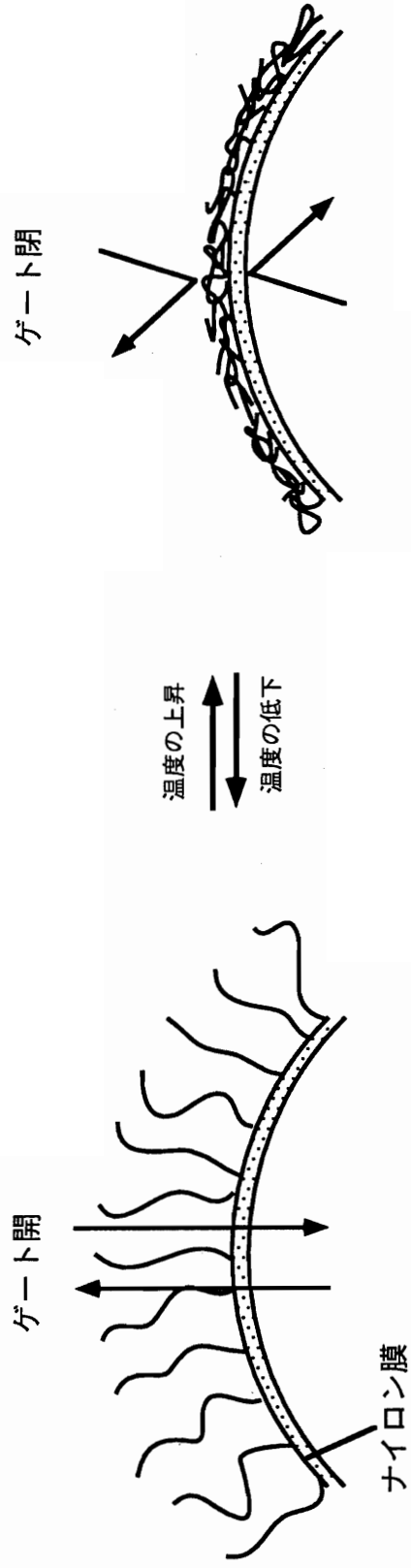
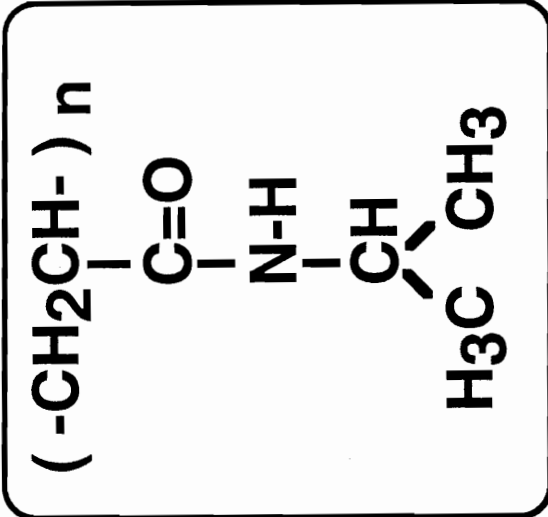
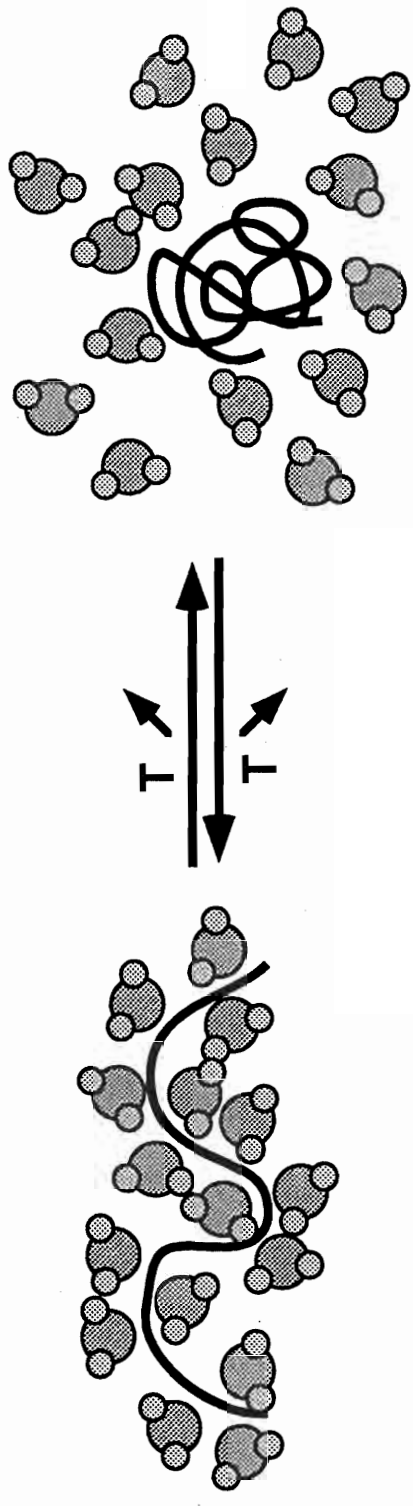


図2 刺激応答性分子バルブの概念図.

- a) pH変化によりpH応答性高分子をグラフトしたゲートの開閉をコントロール
- b) 温度変化により温度応答性高分子をグラフトしたゲートの開閉をコントロール



Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm)



水和 (水溶性、親水性)

脱水和 (不溶性、疎水性)

図3 ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) の温度に応答した溶解/不溶変化

溶液温度 (Lower Critical Solution Temperature; LCST) といい、この温度は親水性、あるいは疎水性モノマーとIPAAmとの共重合により、その共重合組成を変化させることで低温から高温まで (5℃~50℃) 制御が可能であることを我々は見いだしている⁴。さらに、この温度応答性PIPAAm分子の片末端にカルボキシル基やアミノ基などの反応性官能基を導入することも明らかにしている。これらの知見をもとに本研究では種々のLCSTを規定する組成や分子構造を変化させたPIPAAmあるいはPIPAAm誘導体をガラスやアミノシリカゲル表面に導入し、温度で表面の親水性・疎水性を変化させ (図4)、この極性変化を利用した水系温度応答クロマトグラフィーの開発を推進した。本研究では特に、生理活性物質の水系での高効率な分離、精製を目指したクロマトグラフィーシステムの構築を展開した。このような温度応答クロマトグラフィーシステムでは、溶離液に水のみを用いることができるために、表1に示すような1) 生理活性物質の機能を保持できる、2) 細胞の生存率、機能を維持できる、3) 従来の有機溶媒を用いたシステムの代替となる結果、環境汚染を回避できる、などの特性を実現できる革新的な分離・精製技術になるものと考えられる。

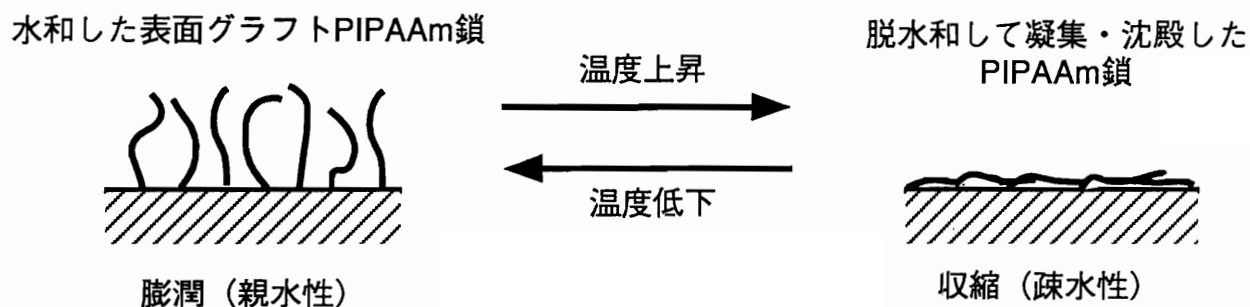


図4 温度応答性PIPAAmグラフト表面の温度に応答した親水性・疎水性変化の模式図

表 1. コマンド応答型クロマトグラフィー・膜分離の特性

-
- ・水系での高度な分離・精製
 - ・生理活性物質の構造と機能保持
 - ・細胞膜表面のタンパク質の構造・機能保持
 - ・細胞の機能保持
 - ・従来の有機溶媒を用いたシステムの代替による環境汚染の回避
-

緒言

温度変化に対して素早く応答する表面物性の変化を実現させるため、表面に修飾した高分子鎖の自由度と、表面密度を大きくする方法の効果を追究した。表面に修飾したPIPAAmの分子鎖の構築構造を設計し、以下の3種類のモデル表面を構築した。すなわち、1) PIPAAmを片末端でのみグラフトした表面、2) PIPAAmを多点で結合させた表面、3) PIPAAmを多点で結合させた表面に、さらにPIPAAmを片末端でグラフトした表面、をそれぞれ作製した。これら3つのモデル表面の表面解析、ならびに温度応答性の評価を行い、表面の濡れ特性におよぼす表面修飾したポリマー鎖の自由度と密度の影響を議論した。さらに、温度応答性表面をもつビーズをカラムに充填し、疎水性度の異なるステロイドホルモンとの相互作用を解析することで温度変化によって溶出時間を変化させることに成功した。この結果をもとに温度応答クロマトグラフィーの可能性を議論した。

実験方法

1. 片末端にカルボキシル基を有するPIPAAmの合成と活性エステル化⁴⁻⁶

IPAAm34.0g、3-メルカプトプロピオン酸(MPA)0.32g、2,2'-アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)0.08gを*N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)100mlに溶解した。この溶液を凍結溶解法により脱気したのち、70℃の恒温水槽中で2時間反応させることにより重合させた。反応溶液を減圧下で脱溶媒して濃縮し、この濃縮液を感想ジエチルエーテル中に滴下して生成したポリマーを回収した。減圧下で乾燥後、PIPAAmをテトラヒドロフラン(THF)に溶解し、これをジエチルエーテルに滴下して再沈殿した。濾過により回収したポリマーを乾燥後、5wt%の水溶液として、分子量分画500の透析膜を用いて3日間透析した。得られた溶液を凍結乾燥し片末端にカルボキシル基を有するPIPAAmを得た。末端の官能基の導入は非水系での酸-塩基滴定により確認し、また、末端基定量、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)により分子量を求め、数平均分子量は約6800であることがわかった。

末端カルボキシル基の活性化はジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)を用いて*N*-ヒドロキシスクシンイミド(*N*-SuOH)とカルボキシル基とを反応させることにより行った。すなわち、片末端カルボキシル化PIPAAm10.0g、DCC15.6g、*N*-SuOH8.7gを乾燥DMF100mlに溶解し、室温で一晩反応させた。副生成物のジシクロヘキシルウレア(DCU)を濾過により除去後、濾液を減圧下で濃縮し、ジエチルエーテル中へ再沈殿させることにより末端活性エステル化PIPAAmを得た。末端の活性エステル化はアルカリ溶液中へのスクシンイミ

ド基の遊離をUV吸収(260nm)により確認、定量した。

2.片末端にアミノ基を有するPIPAAmの合成

片末端にアミノ基を有するPIPAAmは上記と同様に、連鎖移動剤として2-メルカプトエチルアミン塩酸塩を、開始剤として過酸化ジベンゾイルをそれぞれ用いることにより、IPAAmを脱気・封管中で70℃で3時間重合することで合成した。脱塩酸化は乾燥THF中で、トリエチルアミン存在下12時間反応させることにより行い、沈殿したトリエチルアミン塩酸塩を濾別後、ジエチルエーテルに再沈殿させることによりアミノ基末端を有するPIPAAmを回収した。GPCにより得られた数平均分子量は15000程度であり、また滴定から各分子の片末端にアミノ基がほぼ定量的に導入されたことを確認した。

3.側鎖に活性エステル基を有するPIPAAm(P(IPAAm-co-NAS))の合成

IPAAm20.0g、N-アクリロキシスクシンイミド9.3g、AIBN0.12gをDMFに溶解し、脱気、封管後70℃で2時間ラジカル共重合した。反応溶液を濃縮後、内容物をジエチルエーテル中に滴下してポリマーを再沈殿させ濾過、回収した。GPCにより数平均分子量16000であることがわかった。また、アルカリ溶液中で遊離したスクシンイミド基量をUV測定(260nm)により定量し、ポリマー中に約10mol%の活性エステル基を有することを確認した。

4.ガラスプレートのアミノ化

還流冷却器を備えたセパラブルフラスコ中に、洗浄したカバーガラスをいれ、乾燥窒素雰囲気とした。さらに、乾燥トルエン250mlをいれたのち、3-アミノプロピルトリエトキシシラン5mlを加えて還流温度(100℃)で5日間反応させた。反応後、アミノ化したカバーガラスはトルエン、エタノール、蒸留水の順に洗浄し、乾燥させた。

5.PIPAAmを片末端でグラフトした表面の作製⁵⁻⁷

片末端カルボキシル基を活性エステル化したPIPAAmを蒸留水中に溶解し、ここへ、アミノプロピルシリル化したスライドガラスを浸漬して室温で1日反応させることによりガラス表面のアミノ基と活性エステルとを反応させ、PIPAAmを片末端でガラス表面に固定した。反応後、蒸留水で十分洗浄し、未反応のポリマーを除去し、乾燥させた。同様の手法によりアミノプロピルシリカゲル(西尾工業、平均粒径5 μ m)表面にもポリマーを導入した。スルホースクシニミジルジメトキシトリチルブチレート(sulfo-SDTB)はアミノ基と

特異的に反応して結合し、50%過塩素酸水溶液で酸性条件にするとジメトキシトリチルカチオンが遊離して498nmに最大吸収波長を有する発色が起こる。⁸ このsulfo-SDTBを利用して表面残存アミノ基を定量し、PIPAAmによる表面修飾率を求めた。

6.側鎖に活性エステル基を有するP(IPAAm-co-NAS)のアミノ化ガラス表面への導入

ジオキサンはPIPAAmの良溶媒であり、PIPAAm分子は伸展した状態で存在する。一方、ここへトルエンを添加していくと、トルエンはPIPAAmの貧溶媒であることから分子の伸展状態が変化し、固体表面へのPIPAAm分子の導入構造を変化させられる。そこで、以下の2通りの方法でPIPAAmを導入し、これら表面の温度に応答した濡れ特性を解析した。

6-1.ジオキサン中での導入反応

還流冷却器を備えたセパラブルフラスコ中、P(IPAAm-co-NAS)2.0gを乾燥ジオキサン200mlに溶解した。ここへ、アミノ化カバーガラスを浸漬し、80℃で12時間反応させた。反応後、カバーガラスはジオキサンの洗浄後、減圧乾燥した。表面アミノ基との反応に利用されなかった未反応の活性エステルはTHF中イソプロピルアミン(20%)と12時間反応させることによりイソプロピルアミド基に変換した。260nmにおけるUV吸収によるスクシンイミド基の定量から、この反応条件で残存活性エステルはほぼ完全にイソプロピルアミドに変換されていることを確認した。

6-2.ジオキサン-トルエン混合溶媒中での導入反応

還流冷却器を備えたセパラブルフラスコ中、P(IPAAm-co-NAS)2.0gを乾燥ジオキサン160mlに溶解し、アミノ化カバーガラスを浸漬した。装置内を窒素置換した後80℃まで加熱し、ここへ乾燥トルエン40mlを加えて(ジオキサン/トルエン：8/2v/v)、80℃のまま窒素雰囲気下で12時間反応させた。その後、ガラスを乾燥ジオキサンで洗浄して未反応のポリマーを除去した。ポリマー中の結合に関与しなかった活性エステル基はイソプロピルアミンと反応させることによりイソプロピルアミド基に変換した。これを一段階修飾表面とする。同様の手法によりアミノプロピルシリカゲル表面にもポリマーを導入した。

6-3.自由末端鎖の導入

6-2項で調製した多点でPIPAAmを結合させた表面にPIPAAmの自由末端鎖を導入し、表面の濡れに対する自由末端鎖の導入効果を検討した。還流冷却器を備えたセパラブルフラスコに片末端アミノ基を有するPIPAAmをいれ乾燥ジオキサンで溶解した。ここへ、6-2で

調製したカバーガラス（イソプロピルアミンで処理前のもの）を浸漬して窒素雰囲気下80℃で12時間反応させた。反応後、乾燥ジオキサンで修飾ガラスを洗浄し、未反応ポリマーを除去した。これを二段階修飾表面とする。同様の手法によりアミノプロピルシリカゲル表面にもポリマーを導入した。

7.表面のX線光電子分光分析(ESCA)による解析

カバーガラス表面へのPIPAAmの導入の確認はX線光電子分光分析(ESCA)により行った。ポリマーをグラフトしたカバーガラスサンプルを十分減圧乾燥し、試料台に両面テープを用いて固定した。この試料台をESCA装置(ESCA750、島津製作所)に導入し、照射角90°でX線を照射してスペクトルを測定した。スペクトルの解析には、ESPAC-210解析ソフト(島津製作所)を用い、炭素(C)、窒素(N)、酸素(O)のそれぞれのピークから各元素の存在比を求めた。

8.Wilhelmy平板法による動的接触角の測定

さまざまな温度におけるPIPAAm修飾表面の水に対する濡れ変化を動的接触角測定装置(DCA-20、Orientec Co.)をもちいて測定した。ポリマーを修飾したカバーガラスはあらかじめ所定温度のイオン交換蒸留水中に浸漬しておいた。ポリマー修飾カバーガラスを浸漬する水は循環恒温槽を用いて所定温度とし、さらに、動的接触角測定装置を定温にしたクロマトチャンバーに入れることで測定温度を制御した。カバーガラスをイオン交換蒸留水中に1cm/minの速度で浸漬-引き上げ操作を5回繰り返し、このときカバーガラスにかかる力を高感度荷重検出器を用いて測定した。

9.原子間力顕微鏡によるPIPAAm修飾表面の観察

本実験で作製したPIPAAm修飾表面を原子間力顕微鏡(AFM、NanoscopeIII、Digital Instruments, Inc.)で観察し、PIPAAm修飾前後での表面の状態を比較した。測定には非接触法(Tapping Method)を用いた。

10.PIPAAm修飾シリカゲル担体を充填したカラムを用いた疎水性物質の温度応答クロマトグラフィー

種々の手法でPIPAAmを修飾したアミノプロピルシリカゲル(平均粒径5 μ m)を内径4.6mm、長さ150mmのステンレスカラムに充填した。このカラムを高速液体クロマトグラフィーシステム(HPLC)に接続し、種々疎水性度の異なるステロイドホルモンの溶出挙動

を、254nmの吸光度から解析した。実験に用いたステロイドはコルチゾン、プレドニソロン、デキサメサゾン、酢酸コルチゾン、テストステロンで、いずれのステロイドも市販品（和光純薬工業、大阪）をそのまま用いた。実験に用いた装置図を図5に示した。

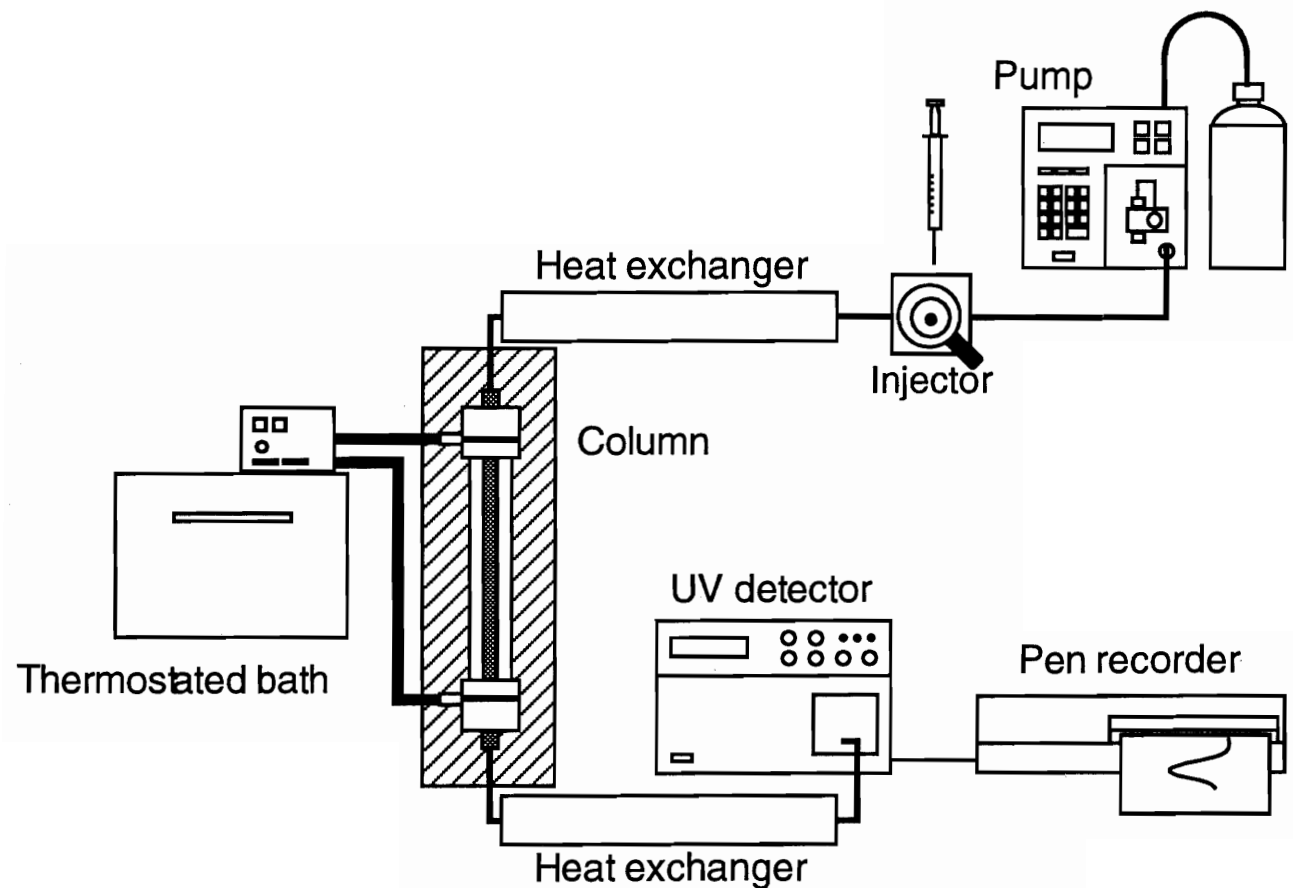


図5 水系クロマトグラフィー装置図

結果と考察

1. PIPAAm多点結合表面の濡れ特性に与える結合様式の影響

P(IPAAm-co-NAS)をジオキサン中、あるいはジオキサン/トルエン混合溶媒(8/2v/v)中で修飾した表面のESCAの結果を表に示す。ESCAより解析したC、N、Oそれぞれの元素組成とその比からポリマーの導入状態を評価した。PIPAAmではN/C=0.17であるのに対し、ジオキサン中で表面に導入した場合はN/C=0.15、ジオキサン/トルエン混合溶媒中で導入した場合はN/C=0.15といずれの場合もPIPAAm自体の元素組成比に近い値を示した。すなわち、いずれの表面もESCAで解析される表面厚の範囲ではPIPAAmで表面が覆われていることが確認できた。

表2 PIPAAm修飾表面のESCAによる解析結果

試料	元素組成(%)			元素組成比	
	C	O	N	O/C	N/C
PIPAAm	75.0	12.5	12.5	0.17	0.17
P(IPAAm-co-NAS) ¹⁾	67.1	22.8	10.1	0.34	0.15
P(IPAAm-co-NAS) ²⁾	70.8	18.7	10.5	0.26	0.15

1)ジオキサン溶媒中反応、2)ジオキサン/トルエン混合溶媒(8/2v/v)中反応

次にPIPAAmを多点で表面に結合させた場合の水に対する濡れ変化を図6に示す。図の中で接触角変化は $\cos\theta$ 値を用いて示した。いずれの表面でも、低温では $\cos\theta$ 値は高い値で親水性を示し、温度上昇にともなって $\cos\theta$ 値は小さくなり、より疎水的な表面へと変化した。しかしながら、ジオキサン中でPIPAAmを結合させた表面よりもジオキサン/トルエン混合溶媒中で反応させた表面のほうがより大きな親水性・疎水性の変化を示し、27℃付近を境に大きな不連続的な接触角変化が観察された。前述のESCA、ならびに表面残存アミノ基含量の定量からいずれの表面もPIPAAmで完全に覆われていることを確認しているため、このような2種類の表面の温度に応答した濡れ特性の相違は表面に修飾されたポリマーの構築構造の違いによるものと考えられた。良溶媒であるジオキサン中でPIPAAmを表面に反応させた場合、ポリマー分子鎖は比較的引きのばされた状態で存在し、この状態を維持したままアミノ化ガラス表面に固定化されていると考えられる。表面に固定化されたポリマー鎖のループ長が表面とポリマーとの結合点間距離に近づくほどポリマー鎖自身の運動性は束縛され、自由度は減少する。このため、温度上昇によるポリマー鎖自体の相

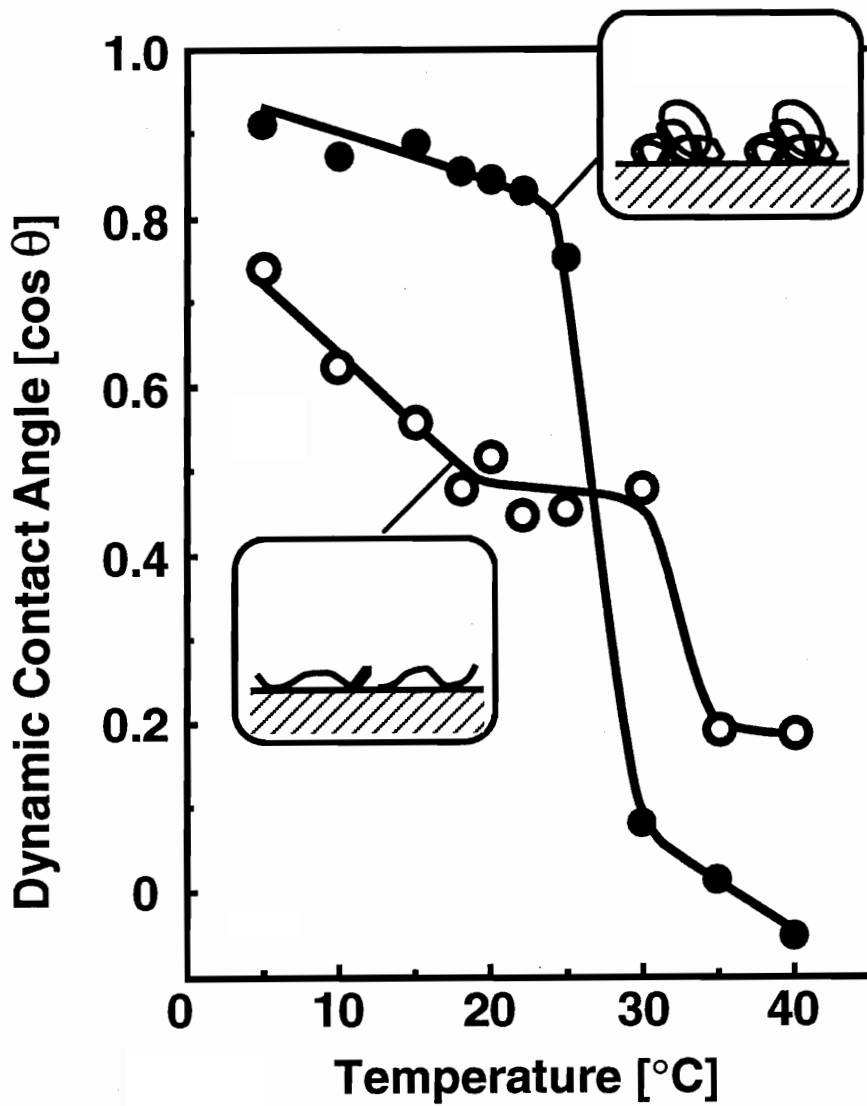


図 6 PIPAAm修飾表面の温度に応答した水に対する濡れ変化
 ○ : ジオキサン中で多点結合させた表面
 ● : ジオキサン/トルエン混合溶媒中で多点結合させた表面

転移にともなう動的運動性を妨げ、水に対する濡れ変化が小さくなったものと考えられた。これに対して、混合溶媒中ではトルエンが貧溶媒のためポリマー鎖はジオキサン単独溶媒中に比べてやや収縮した状態で表面に固定化されると考えられる。このとき、結合点間距離に対してポリマー鎖のループ長が大きくなり、ポリマー鎖自身が大きく動くことができると考えられる。すなわち、ポリマー鎖のループ長を大きくした結果その動的運動性を増大させるような表面構造を設計することでより大きな水に対する濡れ変化を誘起できることを見いだした。我々は、以前、4℃の水中でPIPAAmを多点で結合させた表面では大きな接触角の変化を示さないことを報告した⁷が、低温の水中ではPIPAAm分子は水和により引き延ばされた状態で存在する。この結果、表面に結合したPIPAAmは今回報告したジオキサン中での結合反応により調製した表面と同様の分子鎖の構造を有しているため、濡れ変化が小さかったと考えられた。

以上の結果、同じ多点結合による修飾方法であっても反応溶媒の選択により結合構造が変化し、ポリマー鎖の自由度を任意に制御しうることを示した。以下の実験では、温度に応答したPIPAAm分子の親水性・疎水性変化を大きく取り出すことが可能なジオキサン/トルエン混合溶媒で多点結合させたPIPAAm修飾表面を以下の実験に用いた。

2. 表面に導入したポリマーの構築構造と温度に応答した表面の濡れ特性：自由末端鎖の導入効果

表面のポリマー密度を大きくすることで、PIPAAmの温度に応答した水和・脱水和に基づく親水性・疎水性の大きな変化を誘起することが可能となると考えられる。そこで、モデル表面として多点結合によりポリマーを修飾した表面に自由末端PIPAAm鎖を導入した二段階修飾法を用いた表面を作製し、自由末端鎖の導入効果ならびに従来からの片末端PIPAAm修飾表面と比較検討し、表面でのポリマーの構築構造が濡れ特性に与える効果を議論した。

表3に各手法によりPIPAAm修飾表面でのポリマー導入、ならびにESCAによる表面解析結果をまとめた。また、図7には各表面の作製スキームとそのモデル図を模式的に示した。自由末端鎖を有するモデル表面としてPIPAAmを片末端でアミノ化ガラス表面にグラフトした表面の分析結果も併せて表3に示した。ポリマーの導入はポリマーの導入の結果減少した表面アミノ基量から評価した。いずれの表面でも表面アミノ基の約85%にあたる $20\mu\text{mol}/\text{m}^2$ がポリマーとの結合に使われたことがわかった。さらに、多点で結合させたPIPAAm表面に片末端PIPAAmをさらにグラフトした表面では、片末端で直接PIPAAmを導入した表面と比較して、単位表面積あたり約3倍である

表3 アミノ化ガラス表面へのPIPAAmの導入

surface	first grafting reaction			second grafting reaction			ESCA
	polymer used	amount ¹⁾ μmol/m ²	%	polymer used	amount ²⁾ μmol/m ²	%	N / C
A	PIPAAm-COOH	20	85	-	-	-	0.17
B	P(IPAAm-co-NAS)	23	98	-	-	-	0.15
C	P(IPAAm-co-NAS)	23	98	PIPAAm-NH ₂	62	44	0.15

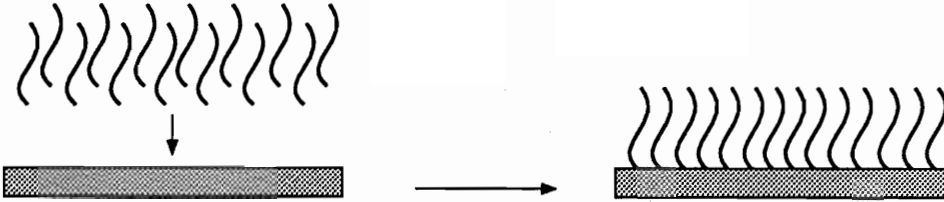
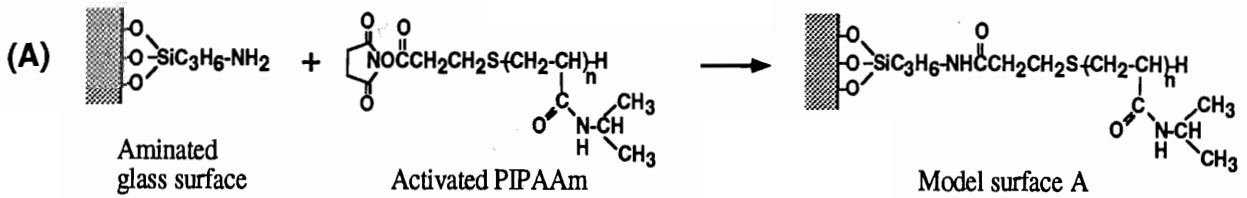
1) Estimated by consumption of the amount of primary amino groups on glass surface.

2) Estimated by consumption of the amount of residual activated ester groups in grafted polymer.

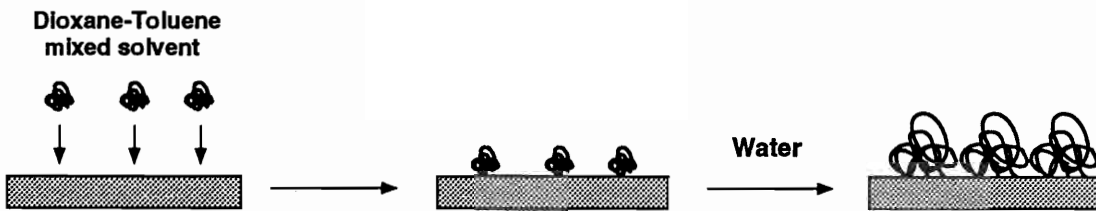
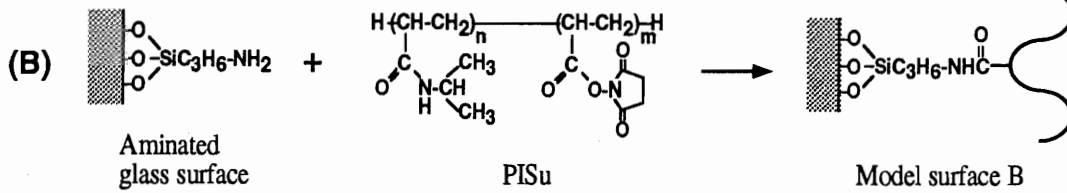
62μmol/m²の自由末端鎖が導入できた。これは、第2段階の修飾反応で、自由末端鎖の結合点となる活性エステル基が、第1段階で修飾されたPIPAAm鎖上に3次元的に存在した結果、単位面積当たりにより多くのポリマー鎖を片末端で導入できたものと考えられる。しかしながら、結合点（活性エステル基）は3次元的に配置しているために立体障害により片末端PIPAAmの導入率の低下（44%）が確認された。これには、第1段階で修飾したポリマー分子鎖の内部に存在する活性エステル基が第2段階での反応には寄与できず、グラフトPIPAAm分子界面に露出した反応部位のみが第2段階の自由末端鎖の導入反応に主に関与しているものと考えられる。ESCAの結果から、いずれの表面もPIPAAmのN/C比にはほぼ近い値を示していることから、PIPAAmで表面が充分覆われているものと考えられた。さらに、走査型電子顕微鏡による表面観察ではいずれの表面も平滑であることが確認できた。さらに細部の表面構造を原子間力顕微鏡により観察し、PIPAAm修飾表面は10nm以下の凹凸を有するのみでポリマー修飾によらずほぼ平滑な表面が作製できたと考えた。

つぎに、このようにして作製した3種類の表面の温度に応答した水に対する濡れ変化をWilhelmy平板法による動的接触角の測定から評価し、ガラス表面に導入したPIPAAmの構築構造の表面の濡れに与える効果を議論した。図8に3種類のPIPAAm修飾表面の温度に応答した濡れ変化を示す。各表面ともに低温で親水性を、温度上昇にともなって25℃から35℃の間で動的接触角が増大し急激に疎水性に変化した。自由末端鎖を有する片末端グラフトPIPAAm表面と、多点結合させたPIPAAm上にさらに片末端PIPAAmを導入した表面では動的接触角の大きく変化する温度は32℃であり、これは水溶液中でPIPAAm分子が示す下限臨界溶液温度に等しい。片末端が固定されていないためにこの自由末端鎖はきわめて高い運動性を有する。このため、32℃付近で温度変化に素早く応答して高分子鎖が脱水和

Model surface A



Model surface B



Model surface C

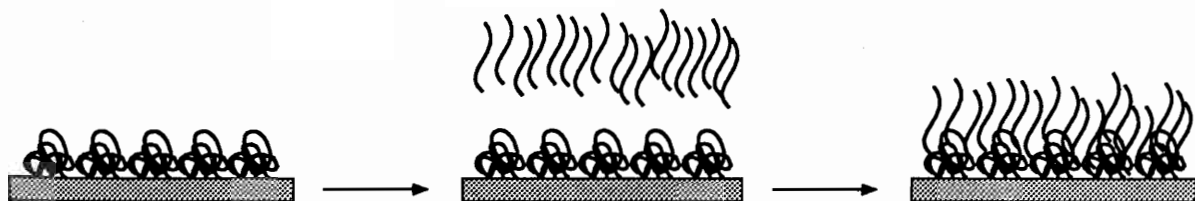
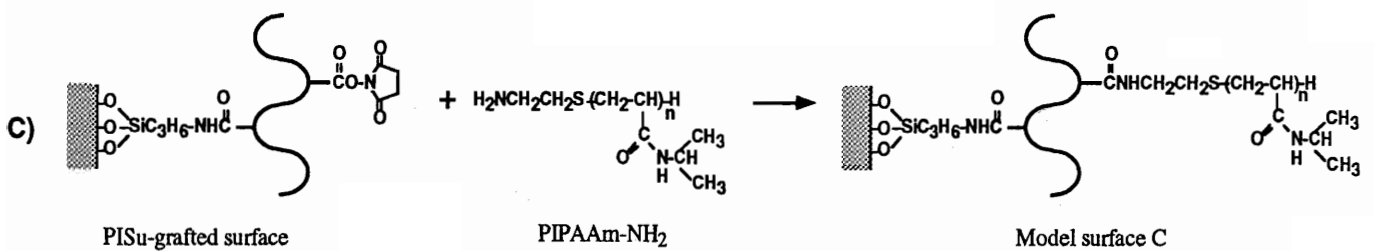


図7 PIPAAm修飾表面の模式図

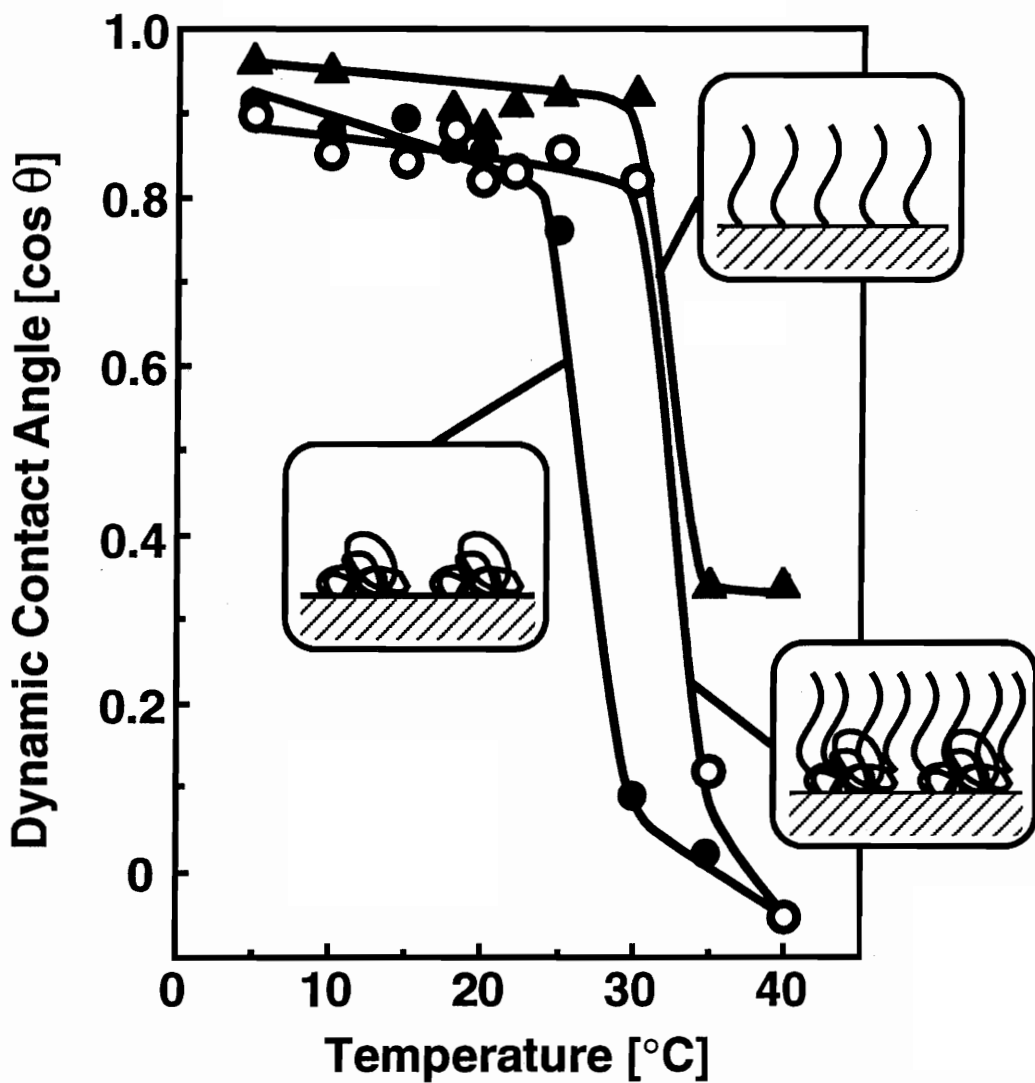


図 8 3種類のPIPAAm修飾表面の温度に応答した水に対する濡れ変化
 ▲ : PIPAAm片末端結合表面
 ● : PIPAAm多点結合表面
 ○ : PIPAAm多点結合一片末端結合表面

し、大きな親水性・疎水性変化が観察されたと考えられた。一方、多点でPIPAAmを結合させた表面では27℃付近で接触角が変化した。前項で述べたように、ジオキサン／トルエン混合溶媒系を用いて導入したPIPAAm分子の水和・脱水和に基づく動的性を増大させているものの、片末端を自由鎖として導入した表面に比べて分子の自由度が抑制されると考えられる。さらに、このようなポリマーの自由度の減少は界面に結合したポリマー層の抱え込める水分子の量の減少（膨潤度の減少）を引き起こし、その結果、疎水的な雰囲気を示したものと考察した。

以上の結果から、温度変化に対する表面の親水性・疎水性の変化は表面に修飾されたポリマー鎖の自由度、ならびに密度に大きく影響を受けることが示され、表面の構築構造を設計することで表面の温度応答特性を自由に制御することが可能であることが示唆された。

3. 温度に応答した表面の親水性・疎水性変化に対応した疎水性ステロイドの分離

前項で検討したように、温度によって表面の極性を親水性から疎水性へと変化させることが可能であるPIPAAm修飾表面では、表面と物質との相互作用を温度で制御することが可能となり、新しいクロマトグラフィーへの展開が期待できる。近年のバイオテクノロジー分野の発展にともなって生理活性物質を高効率で高純度に分離、精製することが急務である、生理活性物質、ペプチドなどの分離には、従来、逆相クロマトグラフィーが利用されてきた。逆相クロマトグラフィーでは有機溶媒を水と種々の組成で混合して移動相の極性を変化させ、疎水性の固定相と溶質との相互作用を制御している。この場合、有機溶媒の使用は、生理活性物質の活性低下や、有機廃液の処理などの問題が生じる。PIPAAmをグラフトした表面では外部の温度を変化させることでPIPAAmの水和・脱水和に基づく表面の極性変化が水中で誘起させられることから逆相クロマトグラフィーにかわるシステムを構築できることが期待される。ここでは、種々疎水性度の異なるステロイドホルモンを溶質に選び、温度に応答したPIPAAm表面の親水性・疎水性変化、ならびに、PIPAAmの表面での構築構造がステロイドホルモンの溶出挙動に与える影響を調べた。

図9、ならびに図10にP(IPAAm-coNAS)をグラフトした表面、ならびにこの表面にさらに片末端PIPAAmをグラフトした表面上でのステロイドホルモンの保持挙動を5℃から45℃までの温度範囲で測定したクロマトグラムを示した。いずれの表面でも、低温ではテストステロンを除き、ピークが重なって分離ができていないが、温度上昇にともなって、それぞれのステロイドに由来するピークが観察されるようになり、分離が達成できるようになることがわかる。さらに、図11に示すように、温度上昇にともなって、各ステロイドの保持時間が延長されることがわかった。このとき、ステロイドの疎水性度の指標となる

Model surface B

Eluent : H₂O
Flow rate : 0.5 ml/min
Detection : 254 nm

1. Cortisone, 2. Prednisolone,
3. Dexamethasone, 4. Cortisone Acetate,
5. Testosterone

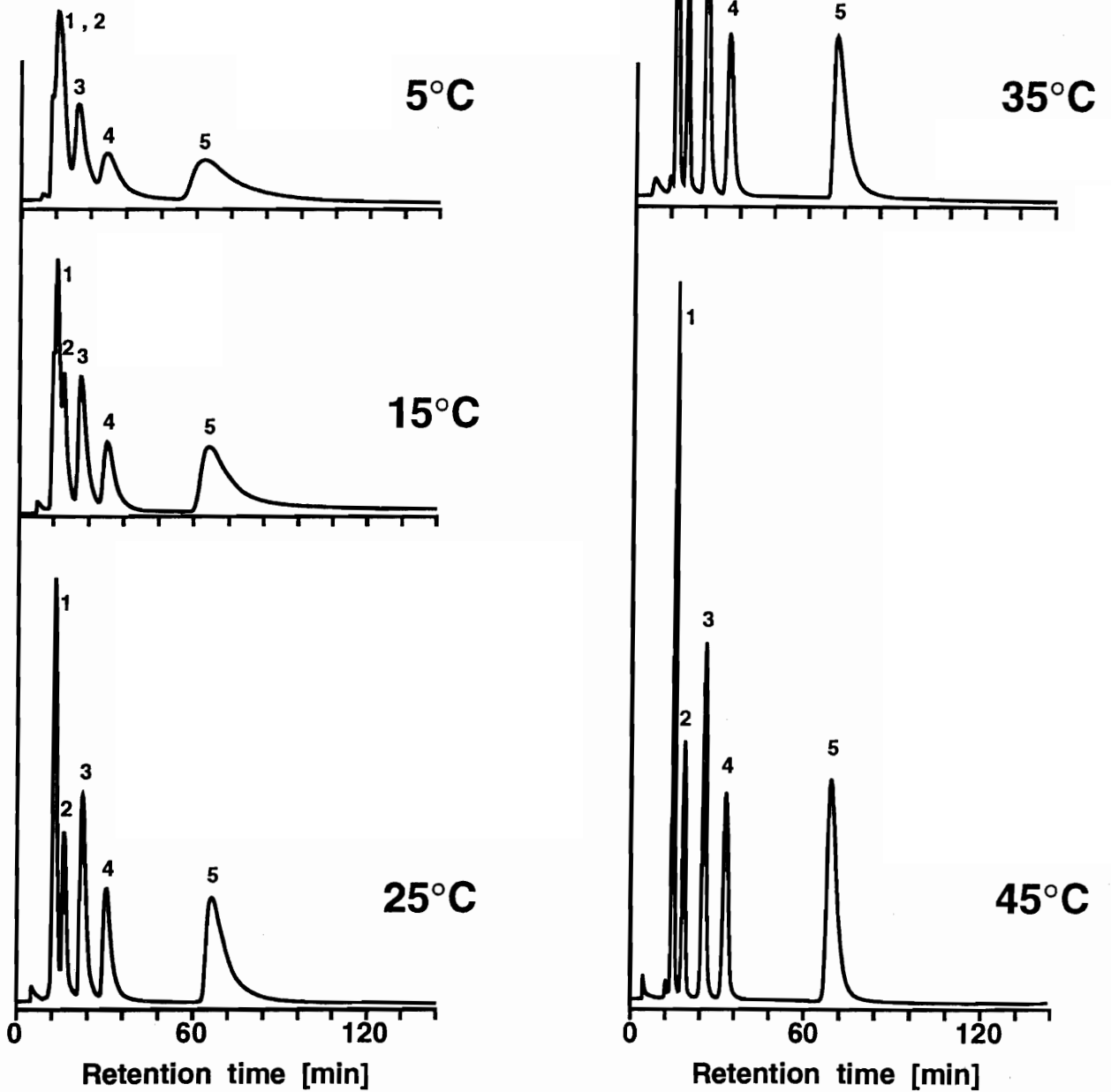


図9 PIPAAmを多点で結合した表面での温度に応答したステロイドのクロマトグラム

Model surface C

1. Cortisone, 2. Prednisolone, 3. Dexamethasone
4. Cortisone Acetate, 5. Testosterone

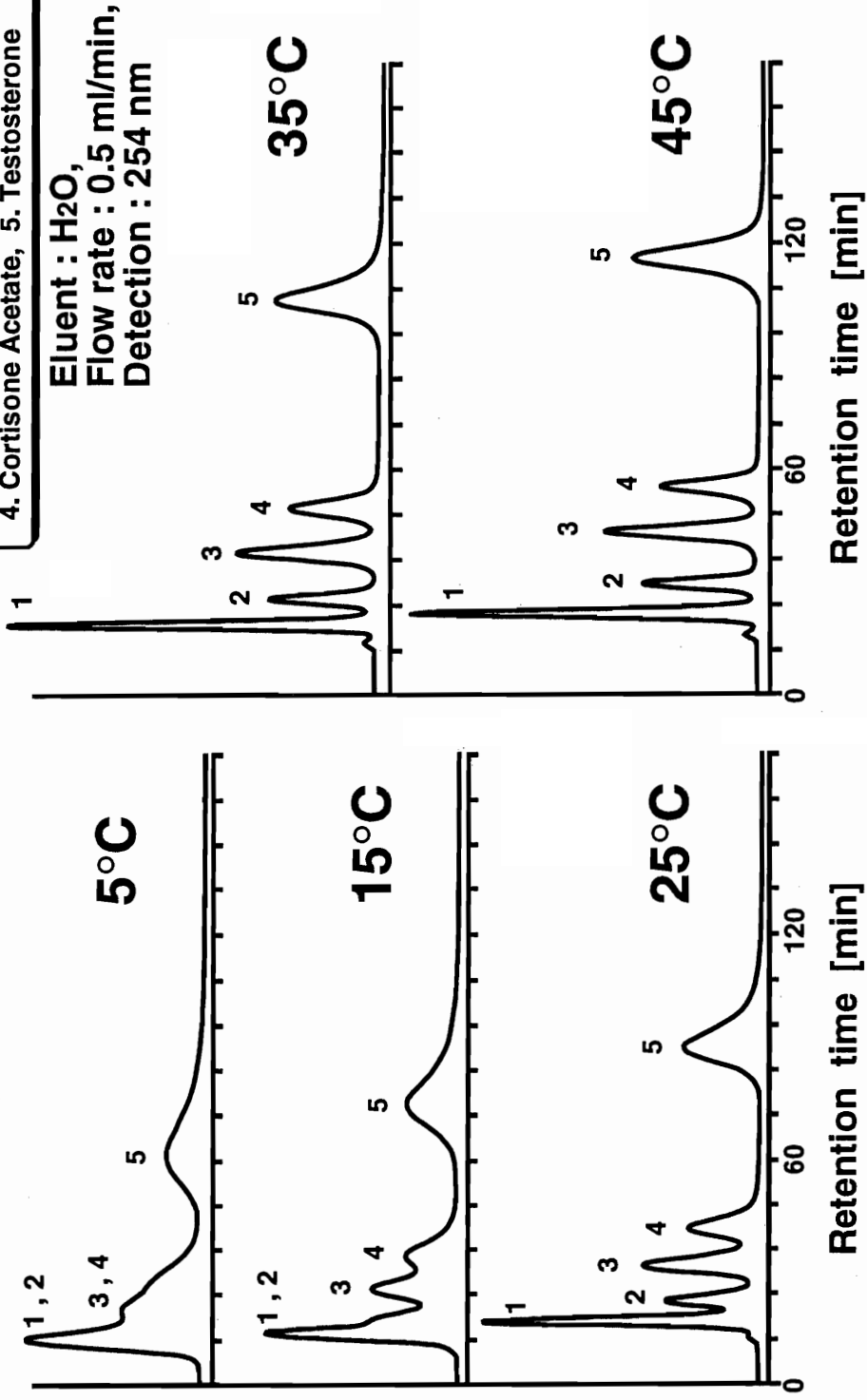


図10 PIPAAm多点結合一片末端結合表面での温度に応答したステロイドのクロマトグラム変化

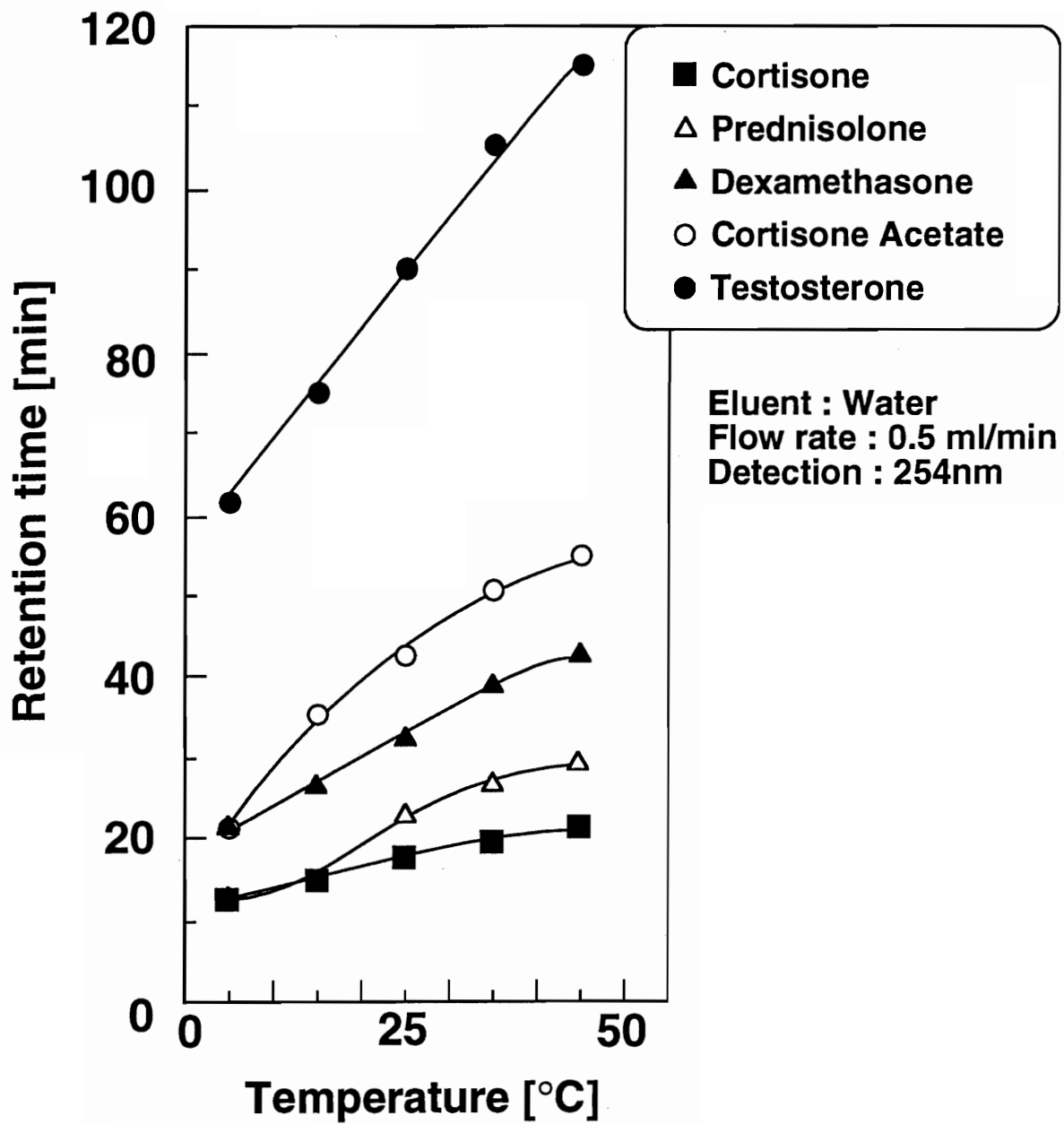


図1 1 PIPAAm多点結合一片末端結合表面での各ステロイドの温度に
 応答した保持時間の変化

オクタノール／水系での各ステロイドの分配係数(P)の対数(logP)値を比較すると、logP値の大きいものほど、すなわち疎水性の高いものほど保持時間の延長が著しいことが明らかとなった。以上の結果は、温度上昇にともなって、脱水・凝集にともなって疎水性になったPIPAAm修飾表面と疎水性のステロイドとの疎水性相互作用が主な相互作用力として働き、分離が達成されたものと考えられる。すなわち、我々の開発した水系クロマトグラフィーでは、温度変化により、溶質の疎水性度の差を敏感に検知して分離を達成するクロマトグラフィーであることが示された。

結語

温度に応答して水に対する溶解性が大きく不連続に変化するPIPAAmとその共重合体を固体表面に修飾すると、温度に応答して表面の親水性・疎水性が自在に制御できる表面を作製することができる。われわれは、PIPAAmを分子の構築構造を種々変化させて固体表面に導入することで、種々PIPAAmグラフト表面を作製し、温度変化に応答した表面の水に対する濡れ特性を調べたところ、修飾PIPAAmの構築構造を制御することにより大きな親水性・疎水性変化を取り出せることがわかった。さらに、このような表面構築構造の差は、この表面をクロマトグラフィー用の担体に用いたときに顕著に現れた。疎水性物質であるステロイドとPIPAAm修飾表面との疎水性相互作用力が変化した結果、疎水性度の高いステロイドほど保持時間が延長し、ステロイドの疎水性度の相違に基づいて分離が達成できることが明らかとなった。

PIPAAmの温度応答性は、疎水性モノマー、あるいは親水性モノマーとの共重合により自由に制御できることを明らかにしているが、このような方法によっても疎水性物質との相互作用をコントロールできることも発表している。^{9,10} このような温度応答性ポリマー修飾表面を用いると、従来は、水中の種々の組成で有機溶媒を添加して移動相の極性を変化させる逆相系クロマトグラフィーを用いることにより分離を達成していた生理活性物質を、水系で、その活性を損なうことなく分離が達成しうる新しいクロマトグラフィーとなりうることが強く示唆された。本研究で提案した温度応答性クロマトグラフィーは、ペプチドやタンパク質のような生理活性物質、さらには、逆相系では用いることの不可能であった細胞を生きたまま、その生物学的活性を維持して分離することのできるクロマトグラフィーシステムとなることが期待できる。

参考文献

1. 新エネルギー・産業技術総合開発機構、高機能表面の創製と新展開の研究動向調査報告

- 書 (平成4年度) (1993).
2. 新エネルギー・産業技術総合開発機構、高機能表面の創製と新展開の研究動向調査報告書(II)－水系における新しい分離・精製システムの開発に関する調査－ (平成5年度) (1994).
 3. M. Heskins, J. E. Guillet, E. James, *J. Macromol. Sci. Chem. A* 2, 1441-1445 (1968).
 4. Y. G. Takei, T. Aoki, K. Sanui, N. Ogata, T. Okano, Y. Sakurai, *Bioconjugate Chem.* 4, 341-346 (1993).
 5. M. Gewehr, K. Nakamura, N. Ise, H. Kitano, *Macromol. Chem.* 193, 249-256 (1992).
 6. Y. G. Takei, T. Aoki, K. Sanui, N. Ogata, T. Okano, Y. Sakurai, *Bioconjugate Chem.* 4, 42-46 (1993).
 7. Y. G. Takei, T. Aoki, K. Sanui, N. Ogata, Y. Sakurai, T. Okano, *Macromolecules*, 27, 6163-6166 (1994).
 8. R. K. Gaur, K. C. Gupta, *Anal. Biochem.* 180, 253-258 (1989).
 9. H. Kanazawa, K. Yamamoto, Y. Matsushima, N. Takai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, *Anal. Chem.* 68, 100-105 (1996).
 10. H. Kanazawa, Y. Kashiwase, K. Yamamoto, Y. Matsushima, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, *Anal. Chem.* 69, (1997) in press.