

内倉22-17

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文審査報告書

論 文 題 目

Charged-Thermoresponsive Intelligent Surfaces
for Modulation of the Interaction with Bioactive Substances

荷電をもつ温度応答性インテリジェント表面による
生理活性物質との相互作用の制御

申 請 者

小林 純

Jun Kobayashi

応用化学 化学工学

2003 年 2 月

近年、分子生物学をはじめとした、分子レベルで生体の働きを解明する生命科学分野およびバイオテクノロジーが著しく進歩した。一方、医用材料のような人工材料表面に生体成分が接触したときに生じる現象を解析し、生命現象を明らかにする試みが工学的見地からなされている。生体成分が発する応答は、人工材料と接触する材料界面の物性が強く反映される。そこで、生体物質と接する材料表面を改質あるいは設計することによって、生体成分が示す応答を制御できるようになる。

本学位審査論文では、生理活性物質と材料表面に固定化された高分子との相互作用という界面化学的見地から、新規材料表面を設計している。外部からの物理的な信号に応答して、物理化学的な性質を自ら変化させる刺激応答性高分子を導入した材料表面に生体成分が接触すると、外部刺激に応答して生体成分の反応は変化すると考えられる。本研究では温度応答性高分子のポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) に注目している。PIPAAm は水中で 32℃ 付近に相転移温度 (下限臨界溶液温度: LCST) を有する高分子である。解離性官能基を分子内に導入した PIPAAm 誘導体の荷電状態が、温度による相転移にともない著しく変化することを見出し、溶質との疎水性相互作用と静電的相互作用とを温度変化で同時に制御する新しいインテリジェント表面を提案している。タンパク質、ペプチドなどの生理活性物質が、分子内に疎水性および荷電性アミノ酸残基をもつことに着目すると、疎水性および静電的相互作用を制御することで、生理活性物質-インテリジェント表面間の相互作用を、温度によって制御できることが期待できる。本学位審査論文は 6 章より構成されており、以下に順次審査要旨を述べる。

第 1 章では、固体表面にグラフトされた高分子の実験的考察から、刺激応答性高分子、特に PIPAAm をグラフトした表面の作製法およびその特性についてまとめている。さらに、温度応答性インテリジェント表面の疎水性変化を利用した疎水性相互作用クロマト担体としての応用を中心にして述べ、本論文の目的と意義を議論しており、当該分野をレビューしている。

第 2 章では、IPAAm とカチオン性の *N,N*-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド (DMAAm) が架橋した共重合体ゲルでシリカビーズ表面を修飾し、正荷電をもつ温度応答性表面の作製を検討している。高分子ゲル層で表面を修飾したシリカビーズを走査型電子顕微鏡および X 線光電子分光法で解析し、シリカビーズ表面がきわめて薄くかつ均質な高分子層で被覆されていることを確認している。さらに高分子ゲルで修飾すると、シリカビーズ自体のアルカリ耐性の顕著な向上が示唆されたことから、アルカリ性溶媒を使用できる表面設計であることを確認している。この共重合体ゲル修飾シリカビーズと酸性生理活性物質との相互作用を、クロマト的手法によって解析している。カルボキシル基を有する溶質の保持時間は持たない溶質に比して大きく、その度合は疎水性度の大きいものほど増大したことを見出している。また、アルカリ性の溶離液では、ゲル層中のアミノ基の解離

が抑制されることによって、静電的相互作用が減少したことを見出している。これらの結果は、静電的相互作用と疎水性相互作用が溶質の保持に同時に影響することを示している。以上のことから、静電的および疎水性相互作用が同時に働くグラフト表面を作製したことを示している。

第3章では、温度応答性の IPAAm とアニオン性のアクリル酸 (AAc) を架橋したハイドロゲル層を固体表面にグラフトし、pH および温度に応答して表面物性が変化する負荷電性ハイドロゲル表面を作製している。AAc 3 mol% 程度の導入量が、pH および温度応答性を維持した表面を設計するのに適当であることを、水溶性高分子の実験で確認している。次いで、その共重合体と同様の組成のハイドロゲル層を表面にもつクロマト担体を作製し、溶離液の pH、カラム温度を変えながら、神経伝達物質のカテコールアミン類との相互作用を解析している。IPAAm-AAc 共重合体ゲル修飾カラムでは、特に溶離液が pH 7.0 において溶質が保持、分離されたことを示している。また、溶離液の pH が減少すると、ビーズ表面での AAc の解離が抑制され、溶質保持が減少したことを見出している。以上のことから、表面にアニオン性基を導入することにより、主に静電的相互作用に基づく塩基性物質の保持を促進することを確認している。

第4章では、温度変化によって表面の疎水性度および荷電密度を同時に制御できるインテリジェント表面を実現するため、疎水性モノマーのブチルメタクリレート (BMA) で高分子の疎水性度および LCST を調節した IPAAm-DMAAm-BMA 三元共重合体 (IDB) ゲル層を修飾したシリカビーズを検討している。表面電位測定から、温度上昇にともなう表面荷電密度の減少を観察している。さらに、同様の表面を有するカラム担体を利用して、生物の代謝にかかわるアデノシン三リン酸 (ATP) などのアデノシンヌクレオチド混合物を分離することにより、表面物性変化を解析している。カラム温度が上昇するのにともなって、アデノシンリン酸の保持時間は減少し、特に3つのリン酸基を有した ATP で大きな温度応答性溶出変化が見出されている。溶質が有するリン酸基数が多いものほど IDB ゲル表面によく保持され、温度上昇にともない保持時間が短縮したことを見出している。また、IDB ゲルの相転移温度付近において、温度に対する保持時間変化の傾きが変化していたことを示している。これは相転移温度以上の温度上昇にともなって IDB ゲル層が疎水化し、その結果表面荷電密度が減少したことを示している。表面の荷電性を温度変化によって制御する、新規インテリジェント表面を提案している。

第5章では、IPAAm-AAc 共重合体ゲル表面の親水性度を調節するために、疎水性モノマーの *tert*-ブチルアクリルアミド (tBAAm) を導入した三元共重合体を新たに利用し、温度変化で疎水性度および荷電密度が変化する、塩基性物質を分離するために有用なインテリジェント表面を作製している。IPAAm-AAc 共重合体は親水性 AAc モノマー導入量が増加するにつれて LCST が著しく上昇し、10 mol% に達すると水中での相分離現象が観察されないことを見出している。一方、tBAAm を導入す

ることによりポリマー全体の疎水性度を適度に維持し、LCSTを任意に制御することに成功している。この三元共重合体ハイドロゲル層を固定相としたシリカビーズをクロマト担体として、温度およびpHを変化させながらカテコールアミン類の溶出挙動を検討している。三元共重合体を修飾したカラムによって、特に pH 7.0 でカテコールアミン類が保持、分離されることを確認している。このとき、固定相の AAc 由来のカルボキシル基は解離しており、プロトン化した溶質との静電的相互作用により保持されたことを見出している。また、カラム温度変化に対して保持時間および分離度の違いがあることを見出している。固定相のゲル層は温度上昇とともにより疎水的な性質を示し、このことが AAc のカルボキシル基の解離度を減少させると明らかにしている。以上の結果から、表面モノマー組成の疎水性度を制御することにより、温度変化による表面荷電密度制御が期待される。

第6章では、生理活性ペプチドの分離を目的とした、実用的なイオン性温度応答型クロマトグラフィーを提案している。非荷電性の IPAAm-tBAAm ゲル表面 (ItB) と、負荷電を有する IPAAm-AAc-tBAAm ゲル表面 (ItBA) をもった2種類のカラム充填剤を作製し、両者の温度特性を検討している。分離対象のペプチドとして、塩基性生理活性物質のアングiotenシン類を選択している。ItBA ゲル表面カラムに対するアングiotenシン類の保持挙動から、固定相-溶質間に静電的相互作用が働くことを明らかにしている。さらに、pH 7.0 で非荷電性の ItB ゲル表面カラムに比してピーク分離能が優れていたことから、疎水性および静電的相互作用を同時に利用することによって、アングiotenシンを効率的に分離できることを見出している。また、温度上昇にともなう固定相表面の疎水性度の増加および表面荷電密度の減少が保持挙動の解析から確認している。従来の HPLC における溶媒のグラジエント操作と対照的に、本章で述べた温度応答型クロマトグラフィーを利用して、温度グラジエント操作で塩基性ペプチドを分離できることが示され、きわめて実用的な分離例が期待される。

以上のように、本論文では、生体成分との相互作用を温度で制御するインテリジェント表面を設計し、この表面特性をクロマトグラフィーによって解析している。界面化学および化学工学の基礎の上に、生体分子との相互作用を制御する新しい材料として温度応答性高分子グラフト表面を開発し、インテリジェント表面へと応用・展開している本論文は、新しい分離媒体の開発に貢献する独創的なものである。したがって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める。

2003年1月

審査員（主査）	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	酒井 清孝
	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	平田 彰
	早稲田大学教授	工学博士（早稲田大学）	平沢 泉
	早稲田大学助教授	工学博士（東京大学）	常田 聡