

9230 外部塩濃度に応答して徐放性を制御できるマイクロカプセル

助成研究者: 岡畑 恵雄(東京工業大学 生命理工学部)

1. 研究目的

マイクロカプセルは古くからインクや薬物の包括剤として、また最近では酵素を封入した人工細胞膜モデルとして注目されている。古くから注目され、数多くの研究がなされて来たにもかかわらず、カプセル膜を化学修飾したり、高機能化する試みはほとんどなされていない。昨年度は、高分子カプセル膜と脂質二分子膜ベクシルの両者の長を合わせもった、二分子膜被覆カプセル膜を作成し、外部イオン濃度の変化に応答した膜透過性の変化について報告した。今年度は、カプセル膜表面にポリマー鎖をグラフトし、ポリマー鎖のコンフォメーション変化を利用した徐放性の制御について報告する。

2. 研究方法

カプセル膜としてはナイロンカプセルを界面重合法で作成し、多孔質なカプセル膜中にポリメタクリル酸等の高分子をグラフト重合した。カプセル膜上でポリマー鎖は一種のバルブとして働き、pH変化やイオン強度変化などの外部刺激に応答して徐放性を可逆的にコントロールできることがわかった。

3. 研究結果と考察

図に示すように、ポリマーをグラフトしたカプセル膜では、外部のpH変化に応答してカプセル内部からの塩(NaCl)の徐放性が可逆的に変化することがわかった。詳しくは、講演時に議論する。

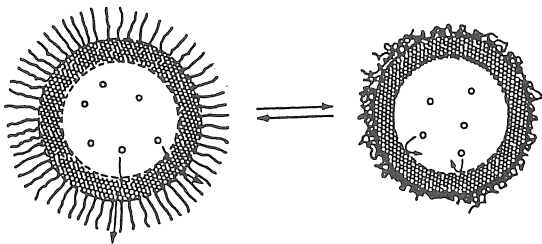


Fig. 1 表面グラフトポリマー鎖のコンフォメーション変化を利用するカプセル膜からの透過制御の模式図

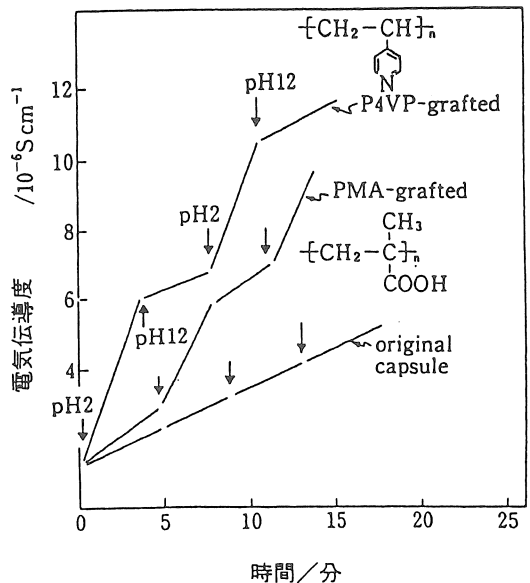


Fig. 2 外部 pH 変化に応答したポリマーグラフトカプセルからの NaCl 徐放性の可逆的变化

9230 外部塩濃度に応答して徐放性を制御できるマイクロカプセル

助成研究者: 岡畑 恵雄(東京工業大学 生命理工学部)

1. 研究目的

マイクロカプセルは古くから、インクや固形薬物の包埋剤として使用されてきた。カプセル化された芯物質は多孔質な膜壁を通して内容物を徐々に放出することになる。これまでのように芯物質として固体や粘性の高い液体をカプセル化するには、カプセル膜が多孔質であることは欠点にならずに、逆に徐放性を与える長所であった。しかし、これからの展開が予想される医学、薬物分野への応用、たとえば内水相に酵素や水溶性薬物をトラップする場合、多孔質のカプセル膜では水溶液中で溶質を長時間保持できないので何らかの工夫が必要である。マイクロカプセルは古くから注目され実用化もされてきたが、カプセル膜を化学修飾して高機能化する試みはほとんどなされていない。

我々は、前回の報告で、ナイロンカプセルの丈夫さと、リポソーム(脂質二分子膜小胞体)の両者の長所を合わせ持つ二分子膜被覆カプセル膜について報告した

このカプセル膜では、多孔質のナイロンカプセル膜中に脂質二分子膜ラメラ相を埋め込み、二分子膜の相転移などを利用してカプセル内水相のグルコースやNaClの徐放性を可逆的にコントロールできる。二分子膜はカプセル膜上で透過バルブとして働いていることになる²⁻⁵⁾。

本報告では、マイクロカプセルの新しい機能化として、表面に種々のポリマーをグラフト重合したナイロンカプセル膜の調製と、それらを用いた外からの刺激(pH変化、温度変化、Redox反応、抗原-抗体反応など)に応答した放出制御について紹介する。すなわち、このカプセルではグラフトポリマーが透過バルブの役割をしていることになる。模式図をFig.1に示した。またグラフトしたポリマー側鎖に触媒や酵素を固定化し、油-水界面を利用したりアクターとしての利用についても報告する。

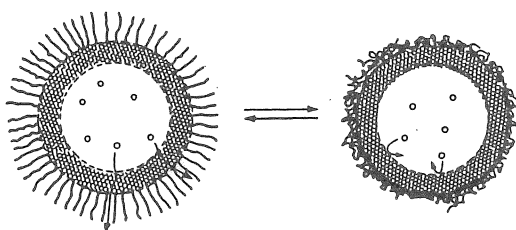


Fig. 1 表面グラフトポリマー鎖のコンフォメーション変化を利用するカプセル膜からの透過制御の模式図

2. 実験

エチレンジアミンと1,10-デカン(ジカルボニルクロリド)の界面重合により、直径2mm、膜厚1 μ mのナイロンカプセル膜を合成した²⁻⁵⁾。

ナイロンカプセル膜へのポリマーのグラフト重合は、以下のようにして行った。カプセルをエチレングリコールジメタクリレートの水/エタノール溶液につけ、これに開始剤としてCe^{IV}塩を加えて、ナイロンカプセル膜上にビニル基をカプセル1個(目重20 μ g)あたり1~2 μ g導入した。このカプセルに、相当するビニルモノマーを水溶液中ラジカル開始剤を用いて50 $^{\circ}$ Cでグラフト重合した。反応後、未反応のモノマーや、膜上にグラフトしていないホモポリマー等を透析により除いて使用した。カプセル1個あたり5~50 μ gを条件を変えてグラフト重合している。グラフトポリマーの平均分子量は約3万~5万であった。

3. 結果と考察

3.1 pH 応答性^{6,7)}

ポリ(4-ビニルピリジン) (P4VP), ポリメタクリル酸 (PMA) を約20 μ g グラフトしたカプセルを用い、内水相からの NaCl の透過速度が pH により大きく変化する様子を Fig. 2 に示した。P4VP をグラフトしたカプセルでは、外部 pH 2 の時には NaCl の透過が速くなり、pH12 の時には 1/20 に膜透過性が低下した。PMA-グラフトカプセルでは、逆に pH2 で遅くなり、pH12 で速くなった。

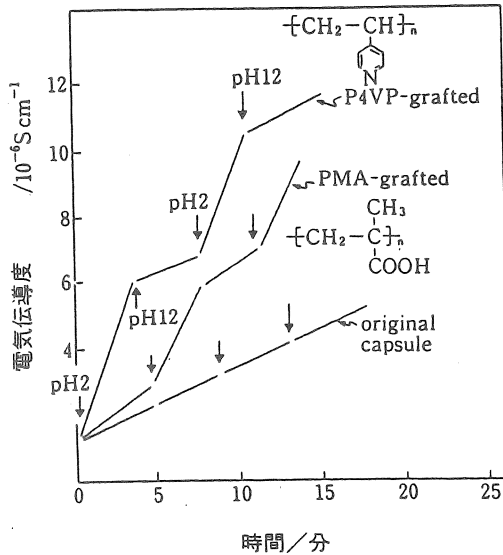


Fig. 2 外部 pH 変化に反応したポリマーグラフトカプセルからの NaCl 徐放性の可逆的变化
(NaCl の透過は外部水溶液の電気伝導度から測定した, 25 $^{\circ}$ C)

Fig. 3 には NaCl の透過速度の pH 依存性を示した。図から明らかなように、外部 pH の変化に伴う透過性の変化はグラフトポリマーの酸塩基解離に依存している。すなわち P4VP-グラフトカプセルでは、外部 pH < 7 の時には側鎖ピリジン基はプロトン化され、親水的であり、側鎖間の静電反発により伸びたコンフォメーションをとっていると考えられるので、NaCl の透過も速い。

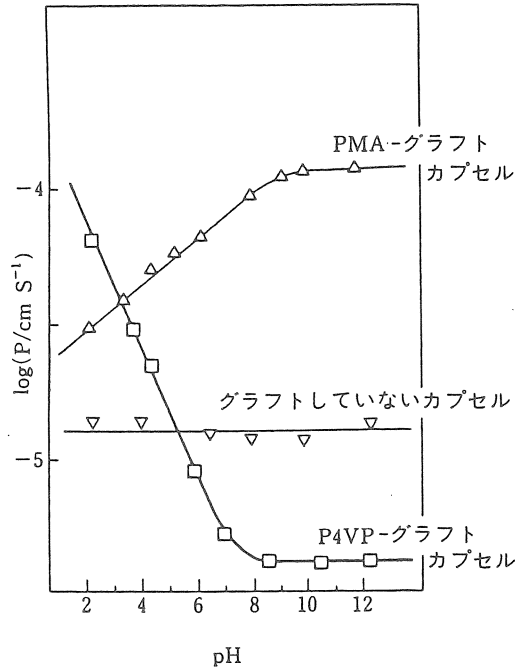


Fig. 3 ポリマーグラフトカプセルからの NaCl 徐放性の pH 依存性 (25 $^{\circ}$ C)。

一方、pH > 8 のアルカリ性水溶液中では、側鎖ピリジン基は中性の疎水的な状態にあり、ポリマーは収縮したコンフォメーションとなり、カプセル膜細孔をふさぎ、そのため NaCl の透過は大きく抑制されると考えられる (Fig. 4 参照)。PMA の場合には、逆にアルカリ性でアニオン型側鎖となり、伸びたコンフォメーションのため透過が速くなり、酸性側で縮んだコンフォメーションのため透過が遅くなると説明できる。このような外部 pH 変化による NaCl 透過性の変化は、可逆的で、内水相の NaCl がほとんど放出されるまで何度もくり返し可能である。もちろんポリマーをグラフトしていないカプセルでは外部 pH を変えても NaCl 透過性はほとんど変化しなかった。

カプセル膜上のグラフトポリマーのコンフォメーション変化は、XPS (ESCA) でカプセル表面を分析することにより直接確かめられる。すなわち、P4VP-グラフトカプセルを酸性溶液につけたものの表面を XPS 分析すると、主にナイロン組成に近い C,N,O 元素組成を示す。一方、カプセルをアルカリ性水溶液につけたものでは、N 元素比が大きく増加し、ポリビニルピリジンがカプセ

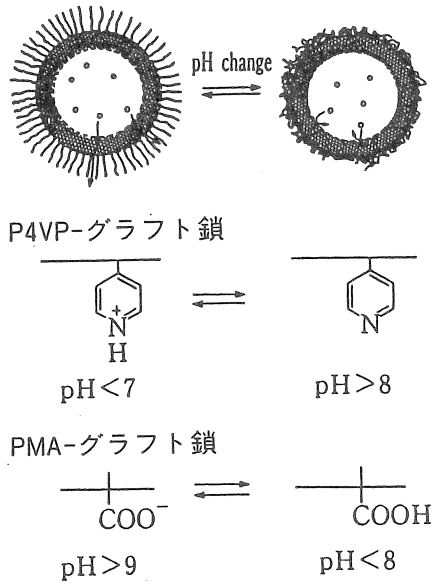


Fig. 4 グラフト鎖のコンフォメーション変化による pH 応答性透過制御の模式図

ル膜を覆っていることがわかった。

PMA-グラフトカプセルでは外部 pH の他にも、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} イオンなどの 2 価カチオンを添加することによるキレート形成や、ポリエチレンオキシドとのポリマーコンプレックスの形成によるグラフトポリマー鎖のコンフォメーション変化により透過性を制御できることもわかっている。

3.2 温度応答性⁸⁾

N-置換アクリルアミド型ポリマーは、低温では水溶性であるが、高温では水に溶けなくなる性質がある。このようなポリマーを、カプセル膜上にグラフトできれば、温度による透過性の制御が可能となる。Fig. 5 には、35°C に曇点をもつ N-イソプロピルアクリルアミドポリマー (PPrAm) をグラフトしたカプセルを用いた NaCl、水溶性透過プローブ 3, 4 の内水相から外水相への透過速度の Arrhenius プロットを示した。曇点温度 ($C_p=35^\circ\text{C}$) 以下では、PPrAm-グラフトカプセルの透過性はポリマーをグラフトしていないカプセルにくらべて少し大きい、 $C_p=35^\circ\text{C}$ 以上の高温では急に遅くなり、その程度は透過種の大きさに大きく依存した。透

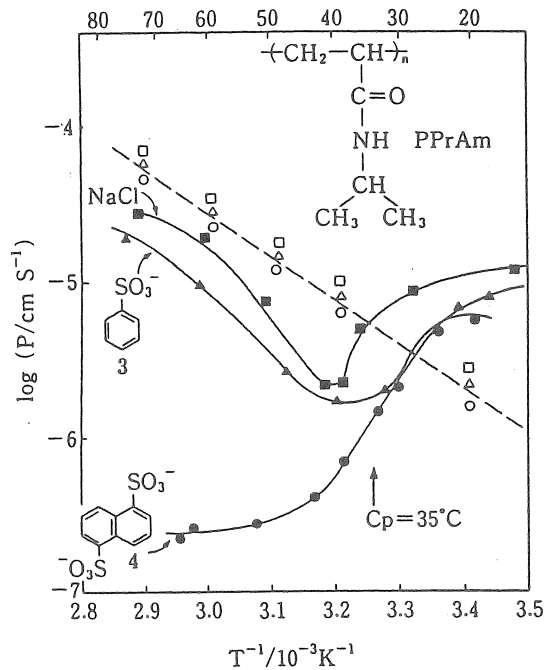


Fig. 5 温度応答性 PPrAm-グラフトカプセルからの各種プローブ透過速度の Arrhenius プロット

過種が NaCl のように小さいものでは C_p 前後の透過性は大きく変わらないが、透過種が 3, 4 と大きくなるにしたがって C_p 前後での透過性の差は大きくなった。これはグラフトポリマーの曇点以上でアミド基が脱溶媒して水溶性が失われ、収縮したコンフォメーションをとり、カプセル膜細孔をふさぐことで説明できる。つまりカプセルを 25°C と 40°C のお湯に交互につけると、25°C にくらべて 40°C で約 1/20 に透過性が低下し、この温度による制御は何回もくり返し可能である。高温で不溶化してカプセル膜上に析出したポリマーは、穴を完全にふさぐことができないので、NaCl のような小さい分子の透過制御は十分にはできないのであろう。

3.3 たんぱく-糖分子認識を用いた透過制御⁹⁾

細胞膜表面には脂質やタンパク質の上に結合したオリゴ糖が存在し、免疫反応などの分子認識に重要な働きをしていることが明らかになりつつある。コンカナバリン A (Con A) と呼ばれるタンパク質は、細胞膜表面のオリ

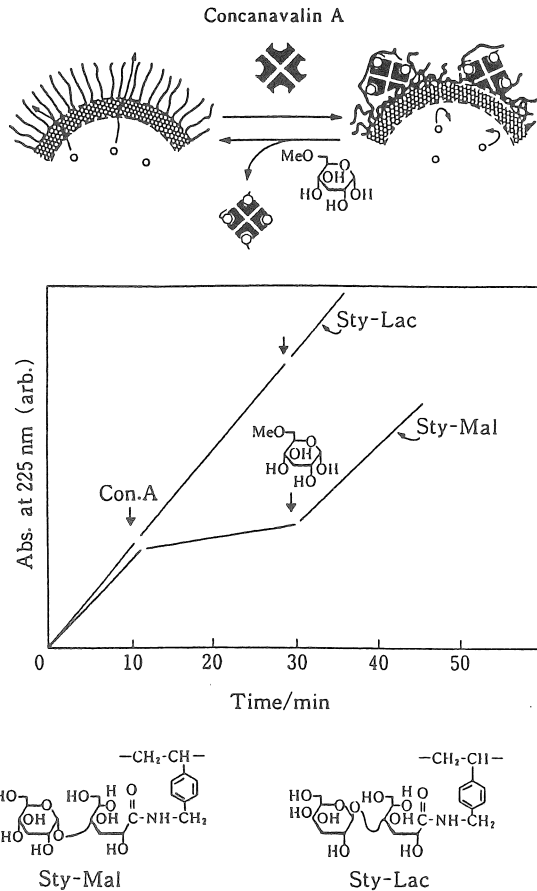


Fig. 6 糖ポリマーグラフトカプセル膜のコンカナバリ
ン A (Con A) による透過制御

多糖の α -マンノースやグルコース末端に対して特異的に結合することが知られている。Con A の一分子中に 4 カ所存在する結合サイトにはグルコースと少し立体構造が異なるガラクトース残基は認識されない。

カプセル膜表面にグルコース残基を側鎖にもつ Sty-Mal ポリマーや、ガラクトース残基をもつ Sty-Lac ポリマーをグラフト重合し、外側から Con A タンパクを加えた時の透過性の変化を Fig. 6 に示した。グルコース残基をもつ Sty-Mal をグラフトしたカプセルでは Con A を少量添加することにより、水溶性プローブ 4 の透過性は約 1/10 に減少した。次に拮抗阻害剤である低分子の α -メチル-D-グルコシドを大過剰加えると、

透過速度は元の早い状態に戻った。Con A タンパクに認識されない Sty-Lac をグラフトしたカプセルでは Con A を添加しても透過速度は変化しなかった。

Sty-Mal のホモポリマーの水溶液に Con A を添加すると水溶液は直ちに白濁し、次第にポリマーの沈澱が生じた。この溶液に大過剰の低分子 α -メチル-D-グルコシドを加えるとすぐに元の透明な溶液に戻った。これらの結果を考え合わせると Con A による透過制御は Fig. 6 の模式図のように表わせる。すなわち、Con A を添加すると、Con A はグラフトポリマー側鎖のグルコース残基を認識して 4 カ所の結合サイトで結合してポリマー鎖を架橋して、カプセル膜上の細孔を埋めることにより透過性を減少させる。これに低分子糖を加えると拮抗阻害剤として働き、Con A に強く結合することにより Con A をカプセル膜から離し、そのためグラフト鎖が元のように伸びた状態に戻り、透過性も元の早い状態に戻ると考えられる。Con A に認識されないガラクトシル基をもつグラフトポリマー (Sty-Lac) ではこのような変化は起こらない。すなわち、Con A はグラフト側鎖の糖残基のわずかな立体構造の差を認識して透過性をコントロールしていることになる。

3.4 抗原-抗体反応を利用した透過制御¹⁰⁾

アミノメチルスチレンをグラフト重合したカプセルのポリマー側鎖に Woodward 試薬を用いてヒト IgG を固定化した。このカプセルをヒッジ抗 IgG (Anti-IgG) 水溶液中に浸すと、カプセル内水相からのけい光プローブ 1 のもれが Anti-IgG 濃度に依存して減少することがわかった。Fig. 7 に示すように、カプセルからの透過速度の減少比 P/P_0 を指標にすると 10^{-15} mg/ml 程度の Anti-IgG をけい光プローブの透過速度から検出できることになる。このカプセルでは抗原-抗体反応を利用して透過性が変化しているが、透過速度の減少比から外水溶液中の抗原量が推定でき、免疫診断法としても注目できる。

カプセル表面のアミノ基に直接 IgG を固定化した系では 10^{-5} mg/ml 程度の Anti-IgG しか検出できないことから考えて、抗原-抗体反応に続くポリマー鎖のコンフォメーション変化による透過性の減少が極微量の IgG 抗体の検出に大きな役割を果たしていることになる。

炎症をおこした時に血液中に増加するタンパクである CRP の抗体をカプセルに固定化した系では、血清中の CRP を 10^{-10} mg/ml のオーダーで検出可能である。

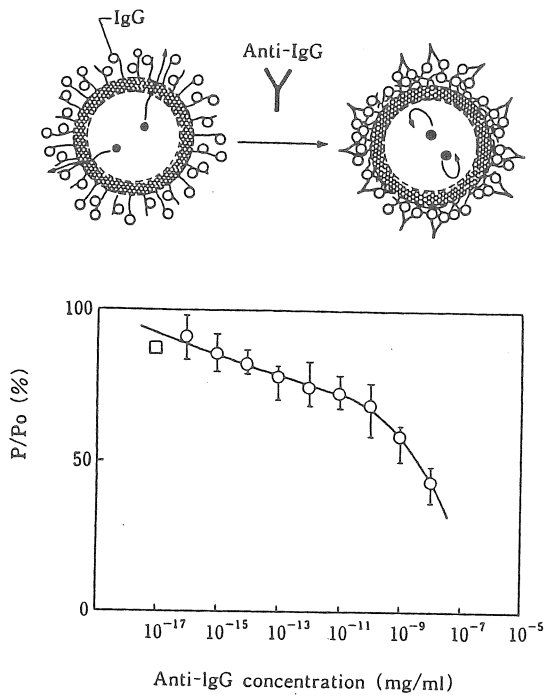


Fig. 7 IgG-固定化カプセルからのけい光プローブ透過性の抗体による制御

3.5 酵素固定化カプセル膜¹¹⁾

加水分解酵素が水溶液中でペプチドやデンプンの加水分解を行うことはすでに良く知られている。最近、少量の水と一緒に酵素を有機溶媒中に懸濁させると、加水分解の逆反応が加速され、アミノ酸からペプチドが生成する合成反応を触媒することが明らかになり興味もたれている。酵素を有機溶媒中で使うためには失活しないように種々の工夫が必要である。これまで、(i) W/Oエマルジョンの内水相に可溶化させる、(ii) イオン交換樹脂やアクリルアミドゲル内の水相に酵素を可溶化させて有機溶媒中に懸濁させる、(iii) 酵素のアミノ残基などに共有結合でポリエチレングリコールを結合させて、水を含ませた後、有機溶媒にとかす、などの方法が検討されている。しかし、方法(i)ではエマルジョンがあまり安定でないために酵素が失活しやすい、(ii)ではゲル内に酵素があるので基質の拡散が遅く、反応が遅い、方法(iii)ではポリエチレングリコールで修飾する時に酵素の失活がおこりやすい、などの欠点がある。

そこで我々はアミノメチルスチレンをグラフトしたカプセル上のアミノ基にサーモライシン酵素を固定化した。この方法で固定化すると中性 pH 領域では未反応のアミノ基はプロトン化するのでカプセル表面を親水的にして酵素を有機溶媒から守ることができる。サーモライシン固定化カプセルの内水相に pH 7 の緩衝溶液を入れ、アミノ基をベンジルオキシカルボニル基で保護したアスパラギン酸 (Z-Asp, 6×10^{-3} M) と過剰のフェニルアラニンメチルエステル (PheOMe, 0.3 M) のクロロホルム溶液に入れて振とうすると40°Cで24時間後には

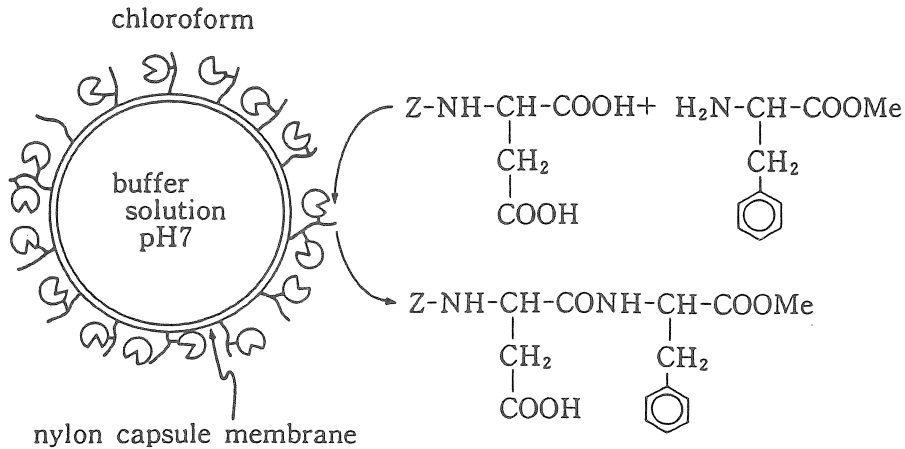


Fig. 8 サーモライシン固定化カプセル膜を用いた油-水界面でのジペプチド合成の模式図

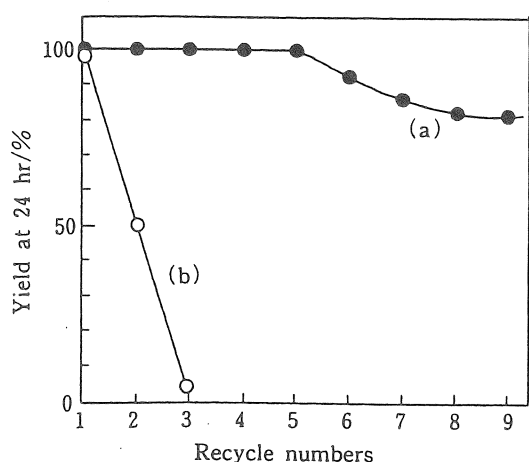


Fig. 9 油水界面でのジペプチド合成時におけるサモライシンの安定性

(a) サモライシン固定化カプセル

(b) W/O エマルジョン中のサモライシン

100%の収率でジペプチド (Z-Asp-PheOMe) がクロロホルム相に生成することがわかった (Fig. 8)。このジペプチドは人工甘味料のアスパルテムの前駆体としても重要な化合物である。サモライシン固定化カプセルは、遊離の酵素を W/O エマルジョンの水相に可溶化した場合と遜色なくジペプチドを合成することができる。一般に酵素は固定化すると活性が低下することはよく知られているが、サモライシンを用いたペプチドの合成では固定化による活性の低下は認められないことになる。これは、カプセル上の酵素はまわりの $-NH_3^+$ 基や内水相からしみ出す緩衝溶液に常に囲まれているので失活しにくいことや、動きの自由なグラフト鎖に固定化されているためであろう。事実、酵素を固定化したカプセルを細かく砕いて W/O エマルジョン中で使うと反応性は 2/3 くらいに低下した。これは砕いたカプセルでは酵素はいつも油水界面に存在できないために反応性も低下し、失活もおこりやすいためと考えられる。

遊離サモライシンを W/O エマルジョン系で用いた場合とサモライシン固定化カプセルをクロロホルム中で用いた場合の活性はほとんど変わらなかったが、両者のちがいは繰り返し使用時に明確に表われた。Fig. 9 に示すように、酵素固定化カプセルでは 9 回連続して使用しても (1 回の反応は 24 時間)、ジペプチドの収率は

100~90% でほぼ一定であった。しかし、W/O エマルジョン系では 3 回目の使用ではほとんどジペプチドを生産しなかった。これは W/O エマルジョン系での酵素の失活のしやすさを表わしている。すなわち、サモライシン固定化カプセルでは何回も繰り返し使用可能であり、これは酵素は常に油-水界面にありながら、内水相からしみ出てくる緩衝液に守られているためだと考えられる。

4. 結 論

以上述べてきたように、カプセル膜表面にポリマー鎖をグラフト重合すると、ポリマー鎖のコンフォメーション変化を利用してカプセル膜の徐放性をコントロールできることがわかった。前回報告した²⁾ 脂質二分子膜被覆カプセルでは埋め込んだ二分子膜部分がバルブの役割を果たしている。今回の報告ではグラフトポリマー鎖がバルブの役割を果たしている。また、ポリマー鎖に酵素を固定化すればバイオリクターとしてもカプセル膜を利用できることが明らかになった。

最後に、2 年間にわたり、研究助成を続けていただいた (財) ソルト・サイエンス研究財団に深く感謝いたします。

Signal-receptive, Permeability-controllable Capsule Membranes. Polymer-Grafted Capsule Membranes

Yoshio Okahata

Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuda, Midori-ku, Yokohama 227

Nylon capsule membranes (diameter: 2 mm, membrane thickness: 1 μm) were prepared by an interfacial polymerization, and polymer chains were grafted on the capsule membrane. When the polymer having dissociate side chains, such as $-\text{COOH}$ and $=\text{NH}$, was grafted on the capsule, permeability of water-soluble probes such as NaCl in the inner aqueous phase could be controlled reversibly responding to changes of ambient pH of the outer aqueous phase. This is explained by the conformation changes of the grafted polymer chains on the membrane responding to the pH changes. The capsule membrane responding to temperature changes, redox reactions, protein-saccharide interactions, and antigen-antibody interactions could be prepared by changing the grafted polymer. When enzymes were immobilized on the side chains of the grafted polymers, the capsule acts as a bioreactor.