

1

助成番号 0101

## 高分子ゲルの相転移を利用した選択的脱塩・濃縮と生体高分子精製法の開発

Masahiko Annaka

Department of Materials Technology, Chiba University,

近年、温度、外部溶液の pH、イオン強度等の変化に対して体積、性質を変化させる水溶性高分子ゲルは、ターゲティング、薬物徐放など医学、薬学分野への応用が期待されている。これらの分野への高分子ゲルの応用では、ゲルの膨潤および収縮速度が実用上重要な要因となる。Tanaka-Fillmore の理論によれば、これらのプロセスはゲル網目の拡散が律速であり、その結果、ゲルのサイズに依存する。最近、岡野らは、ゲル網目に自由度の高いグラフト鎖を導入することで、従来のゲルに比べ100倍以上のゲルの収縮速度を達成した。これは、グラフト鎖がゲル網目より自由度が高いために、より高速に収縮し、それが疎水核となってゲル全体の収縮を高速化させたものと考えられる。さらに、ゲル網目にグラフト鎖を導入は、ゲル内の物質の拡散に影響を与えることが考えられ、分離剤としての応用が期待される。そこで本研究では、感温性グラフト型 N-isopropylacrylamide (NIPA)ゲルを用いて、albumin,  $\gamma$ -globulin および vitamin B<sub>12</sub> 溶液の濃縮、および分子サイズによる分離剤への応用について検討した。

非グラフト型 NIPA ゲルおよびグラフト型 NIPA ゲルによる Vitamin B<sub>12</sub>, albumin および  $\gamma$ -globulin の濃縮効率 $\eta$ の値を Table 2 に示す。グラフト型 NIPA ゲルの場合、albumin の 80%,  $\gamma$ -globulin の 85%が吸収されずに外部溶液に残る結果となった。モノマー仕込量から、非グラフト型 NIPA ゲルおよびグラフト型 NIPA ゲルともに、架橋点間の(統計的な)距離は同じであるため、ここで示された結果は、グラフト鎖の導入により、有効網目サイズが低下し、ゲル網目と分子との摩擦が増加したためであることが、考えられる。サイズ選択的な分離では、分離剤(ゲル)の再生、およびリサイクルが重要であり、従って、ゲルサイズの変化は大きく、速くかつリバーシブルであることが必要である。Fig. 3 に非グラフト型 NIPA ゲルおよびグラフト型 NIPA ゲルの温度スイングによる $\gamma$ -globulin 分離効率の変化を示す。グラフト型 NIPA ゲルでは、リン酸緩衝液中(pH 7.4)、20°Cと35°Cの温度スイングによるゲルの体積変化に伴い、分離効率 $\eta$ が0と85の間を再現性よく変化することが示された。一方、非グラフト型 NIPA ゲルでは、その体積変化が温度スイングに追従出来ないため、分離効率 $\eta$ の変化は小さくなることが示された。これらの結果は、グラフト鎖の導入により、温度変化に伴う吸水性および収縮速度の向上が達成されたことによるものである。



1

助成番号 0101

## 高分子ゲルの相転移を利用した選択的脱塩・濃縮と生体高分子精製法の開発

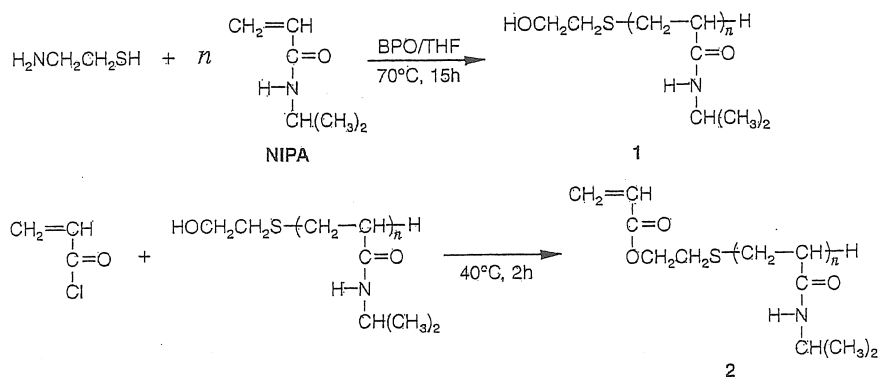
助成研究者名: 安中雅彦(千葉大学工学部)

### 1. 研究目的

近年、温度、外部溶液の pH、イオン強度等の変化に対して体積、性質を変化させる水溶性高分子ゲルは、ターゲティング、薬物徐放など医学、薬学分野への応用が期待されている。[1-15] これらの分野への高分子ゲルの応用では、ゲルの膨潤および収縮速度が実用上重要な要因となる。Tanaka-Fillmore の理論によれば、これらのプロセスはゲル網目の拡散が律速であり、その結果、ゲルのサイズに依存する。[15] 最近、岡野らは、ゲル網目に自由度の高いグラフト鎖を導入することで、従来のゲルに比べ100倍以上のゲルの収縮速度を達成した。これは、グラフト鎖がゲル網目より自由度が高いために、より高速に収縮し、それが疎水核となってゲル全体の収縮を高速化させたものと考えられる。[16, 17]さらに、ゲル網目にグラフト鎖の導入は、ゲル内の物質の拡散に影響を与えることが考えられ、分離剤としての応用が期待される。そこで本研究では、感温性グラフト型 N-isopropylacrylamide (NIPA)ゲルを用いて、albumin,  $\gamma$ -globulin および vitamin B<sub>12</sub> 溶液の濃縮、および分子サイズによる分離剤への応用について検討した。

### 2. 実験方法

#### 2-1 マクロモノマーの合成



Scheme 1 Preparation of NIPA macromonomer

NIPA マクロモノマーを Scheme 1 に従って合成した。NIPA (33.9 g, 0.3 mol), 2-

hydroxyethanethiol (0.469 g, 6.0 mmol) および benzoyl peroxide (0.121 g, 0.5 mmol) を THF (100 ml) に溶解させ、70°C で 15 h 重合させた。重合終了後、再沈殿を繰り返すを行い、NIPA マクロモノマー 1 を得た。続いて得られた 1 を大過剰の acryloyl chloride に溶解させ、窒素気流下 40°C で 2 h 反応を行った。反応終了後、再沈殿を繰り返すを行い、重合性二重結合を末端に有する NIPA マクロモノマー 2 を得た。

## 2-2 グラフト型 NIPA ゲルビーズの合成

グラフト型 NIPA ゲルビーズの合成は、Table 1 に示す処方で、sorbitan sesquioleate を非イオン性界面活性剤として、シクロヘキサン中で逆相懸濁重合法により合成した。得られたゲルビーズの平均粒径を併せて Table 1 に示す。

**Table 1.** The effect of monomer concentration on the average diameter of the NIPA gel beads.

Total monomer concentration (mM)	222	444	886	1332	1777
Average diameter (μm)	534	485	337	337	330
Conversion (%)	50.4	73.6	83.1	84.1	82.8

NIPA macromonomer = 30 mol% based on total monomer, BIS concentration = 1.5 mol% based on total monomer, Surfactant = sorbitan sesquioleate.

## 2-3 膨潤度および膨潤速度の測定

ゲルビーズの膨潤度および膨潤速度は、温度を制御されたガラスセル内で脱塩水中に分散させたゲルビーズの直径を、光学顕微鏡を用いて測定した。

## 2-4 タンパク質濃縮実験

タンパク質濃度 0.05 g/L のリン酸緩衝液溶液に凍結乾燥させたゲルビーズを加え、ゲル外部溶液の半分を吸収させた。ゲル外部のタンパク質濃度を BCA protein assay [18-21] により求めた。ゲルビーズによるタンパク質吸収効率 ( $\eta$ ) は、以下に示す式 (1) により算出した。

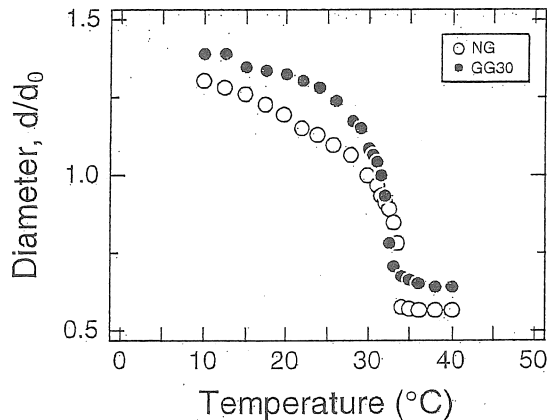
$$\eta = \frac{c - c_0}{c_0 \left( \frac{v_0}{v} - 1 \right)} \times 100 \quad (1)$$

ここで、 $c$  および  $v$  は、それぞれタンパク質濃度、溶液相の体積を示す。添字 0 はそれぞれの初期値を表す。添加した溶液の半分が、ゲルにより吸収され (i.e.  $v_0/v = 2$ )、タンパク質の外部溶液濃度が 2 倍になった場合、効率  $\eta$  は 100% となる。

### 3. 結果と考察

#### 3-1 グラフト型ゲルの平衡膨潤度

グラフト型NIPAゲルおよび非グラフト型NIPAゲルの平衡膨潤度を Fig. 1 に示す。グラフト型NIPAゲルは 34°C で体積相転移を示し、非グラフト型NIPAゲルとほぼ同様の相挙動を示した。転移温度以下では、グラフト型NIPAゲルは、非グラフト型NIPAゲルより大きな膨潤度を示した。これは、グラフト鎖がゲル網目に比べ、大きな水和能を示すことによるものと考えられる。従って、グラフト鎖の導入量により、平衡膨潤度を制御することが可能であることが明らかとなった。



**Fig. 1.** Temperature dependence of the equilibrium swelling degrees of normal-type (open circle) and comb-type grafted (solid circle) NIPA gel beads prepared under identical condition. Diameter = 330  $\mu\text{m}$ , [Total monomer] = 1777 mM, [NIPA macromonomer] = 30 mol% based on total monomer, [BIS] = 1.5 mol% based on total monomer, and surfactant = sorbitan sesquiolate.  $d_{T=20^\circ\text{C}}$  is the diameter of the gel bead in water at 20°C.

#### 3-2 膨潤収縮速度

ゲルの膨潤収縮による、そのサイズの時間変化は、Tanaka – Fillmore の理論 [15]により、以下に示す式(2)により表される。

$$\frac{d(t) - d(\infty)}{d(0) - d(\infty)} = \frac{d(t)/d_0 - d(\infty)/d_0}{d(0)/d_0 - d(\infty)/d_0} \approx \frac{6}{\pi^2} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2)$$

$d(t)$ は時刻  $t$  におけるゲルサイズ、 $\tau$ は膨潤の characteristic time を示す。この式は、さらに相分離が伴わない場合において、収縮によるゲルサイズの時間変化にも適応可能である。Fig. 2 は、ゲル外部溶液の温度を 20°C から 35°C へジャンプさせた場合のゲルサイズの時間変化、 $d/d_0$  ( $\equiv d(t)/d_0$ ) を示している。非グラフト型NIPAゲルでは、収縮に伴うゲルサイズの時間変化は、式(2)により再現されるのに対して、グラフト

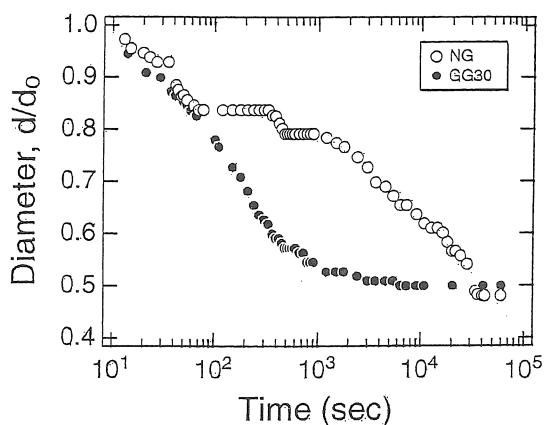


Fig. 2. The variation of the degrees of swelling,  $d/d_0$  ( $\equiv d(t)/d_0$ ), of normal-type (open circle) and comb-type grafted (solid circle) NIPA gel beads prepared under identical condition after T-jump from 20°C to 35°C. Diameter = 330  $\mu\text{m}$ , [Total monomer] = 1777 mM, [NIPA macromonomer] = 30 mol% based on total monomer, [BIS] = 1.5 mol% based on total monomer, and surfactant = sorbitan sesquioleate.  $d_{T=20^\circ\text{C}}$  is the diameter of the gel bead in water at 20°C.

型NIPAゲルでは、式(2)は適用できない結果となった。これは、Tanaka - Fillmore の式(2)が、線形領域に限定されており、膨潤・収縮それぞれの過程で協同拡散定数が同じであることを仮定している為である。そこで、式(3)に示す膨潤度が半分になるために要する時間  $t_{1/2}$  を定義し、評価を行った。[15, 22, 23]

$$\frac{d(t_{1/2}) - d(\infty)}{d(0) - d(\infty)} = \frac{d(t_{1/2})/d_0 - d(\infty)/d_0}{d(0)/d_0 - d(\infty)/d_0} = \frac{1}{2} \quad (3)$$

非グラフト型NIPAゲルおよびグラフト型NIPAゲルの「膨潤度が半分になるために要する時間  $t_{1/2}$ 」は、それぞれ 3000 秒、120 秒となり、グラフト型NIPAゲルが約25倍の収縮速度を示す結果となった。非グラフト型NIPAゲルでは、20°C から 35°C への温度ジャンプによりゲルの白濁が観測された。これは、ゲル表面に水を透過させない、ポリマー濃度の高い相が形成されたため、ゲル内部からの水の放出が抑制されたためであると考えられる。一方、グラフト型NIPAゲルでは、ゲルの白濁が観測されなかった。グラフト NIPA 鎖は、その自由度の高さにより、ゲル網目を構成する NIPA 鎖より高速で収縮、引き続き凝集を起こし、その結果ゲル内部に素早く水を放出できる空孔を形成したものと考えられる。

### 3-3 分子サイズ選択的分離剤への応用

非グラフト型 NIPA ゲルおよびグラフト型 NIPA ゲル内部の分子輸送を、Benzoic acid

(Mw = 122), vitamin B<sub>12</sub> (Mw = 1355), aprotinin (Mw = 6500), cytochrome C (Mw = 12400) および ovalbumin (Mw = 44000)を用いてゲル濾過により評価を行った. その結果, 非グラフト型 NIPA ゲルおよびグラフト型 NIPA ゲルの排除限界はそれぞれ,  $1.25 \times 10^4$  および  $1.27 \times 10^5$  となり, グラフト型 NIPA ゲルは非グラフト型 NIPA ゲルに比べ, 約 10 分の 1 の排除限界を有することが明らかになった. グラフト鎖の導入により, 有効網目の大きさが小さくなり, その結果, 拡散分子と網目との摩擦が増加した結果であると考えられる. この結果から, グラフト型 NIPA ゲルのタンパク質等の高分子水溶液の濃縮, および塩等の低分子物質の除去が期待される.

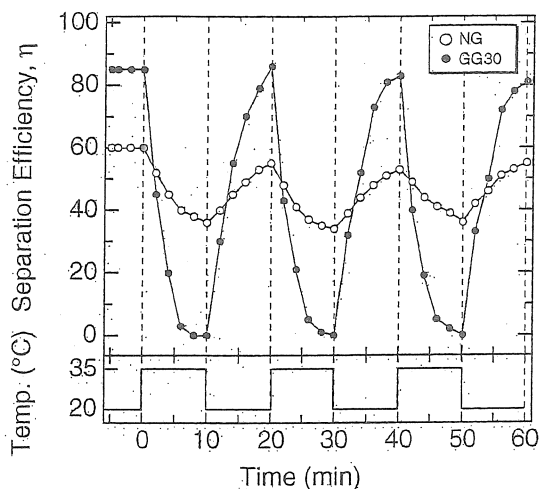
**Table 2.** The separation efficiencies,  $\eta$ , of the normal-type and the comb-type grafted NIPA gel beads at 25°C.

Solute	Molecular weight	Separation efficiencies $\eta$	
		Comb-type grafted gel	Normal-type gel
vitamin B <sub>12</sub>	1355	0	0
albumin	66000	80	55
$\gamma$ -globulin	160000	85	60

Average diameter = 330  $\mu$ m, Total monomer concentration = 1777 mM, NIPA macromonomer = 30 mol% based on total monomer, BIS concentration = 1.5 mol% based on total monomer, and sorbitan sesquioleate.

非グラフト型 NIPA ゲルおよびグラフト型 NIPA ゲルによる vitamin B<sub>12</sub>, albumin および  $\gamma$ -globulin の濃縮効率 $\eta$ の値を Table 2 に示す. グラフト型 NIPA ゲルの場合, albumin の 80%,  $\gamma$ -globulin の 85%が吸収されずに外部溶液に残る結果となった. モノマー仕込量から, 非グラフト型 NIPA ゲルおよびグラフト型 NIPA ゲルともに, 架橋点間の(統計的な)距離は同じであるため, ここで示された結果は, グラフト鎖の導入により, 有効網目サイズが低下し, ゲル網目と分子との摩擦が増加したためであることが, 考えられる.

サイズ選択的な分離では, 分離剤(ゲル)の再生, およびリサイクルが重要であり, 従って, ゲルサイズの変化は大きく, 速かつリバーシブルであることが必要である. Fig. 3 に非グラフト型 NIPA ゲルおよびグラフト型 NIPA ゲルの温度スイングによる  $\gamma$ -globulin 分離効率の変化を示す. グラフト型 NIPA ゲルでは, リン酸緩衝液中 (pH 7.4), 20°C と 35°C の温度スイングによるゲルの体積変化に伴い, 分離効率 $\eta$ が 0 と 85 の間を再現性よく変化することが示された. 一方, 非グラフト型 NIPA ゲルでは, その体積変化が温度スイングに追従出来ないため, 分離効率 $\eta$ の変化は小さくなることが示された.



**Fig. 5.** Variation of the separation efficiencies  $\eta$  and supernatant concentration of albumin, and diameter  $d/d_0$  for normal-type (open circle) and comb-type grafted (solid circle) NIPA gel beads prepared under identical condition in response to stepwise temperature change in phosphate buffer (pH 7.4). Average diameter = 330  $\mu\text{m}$ , [Total monomer] = 1777 mM, [NIPA macromonomer] = 30 mol% based on total monomer, [BIS] = 1.5 mol% based on total monomer, and surfactant = sorbitan sesquioleate. Protein concentration in the outer solution was determined by bicinchoninic acid (BCA) protein assay. The concentration of vitamin B<sub>12</sub> in the outer solution was determined with HITACHI U-3210 spectrophotometer.

#### 4. 結論

感温性グラフト型 NIPA ゲルの, 非グラフト型 NIPA ゲルに比べ albumin,  $\gamma$ -globulin および vitamin B<sub>12</sub> の効率的な濃縮が示された。これはグラフト鎖の導入により, 温度変化に伴う吸水性および収縮速度の向上が達成されたことによるものである。

#### References

- [1] T. Tanaka, Phys. Rev. Lett. 40 (1978) 820.
- [2] T. Tanaka, T. D. J. Fillmore, S. -T. Sun, I. Nishio, G. Swislow, A. Shah, Phys. Rev. Lett. 45 (1980) 1636.
- [3] Y. Hirokawa, T. Tanaka, J. Chem. Phys. 81 (1984) 6379.
- [4] M. Shibayama, T. Tanaka, Adv. Polym. Sci. 109 (1993) 1.
- [5] J. Kiler, A. B. Scranton, N. A. Peppas, Macromolecules 23 (1990) 4944.
- [6] A. Sukuki, T. Tanaka, Nature (London) 346 (1990) 345.
- [7] R. Yoshida, K. Uchida, Y. Kaneko, K. Sakai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, Nature (London) 374 (1995) 240.



- [8] T. Okano (Editor), Biorelated Polymers and Gels: Controlled Release and Applications in Biomedical Engineering. Academic Press, New York, NY, 2000.
- [9] T. Okano, N. Yui, M. Yokoyama, R. Yoshida, Advances in Polymeric Systems for Drug Delivery; Gordon & Breach Science Publishers, Yverdon, Switzerland, 1994, p 67.
- [10] K. Dusek (Editor), Responsive Gels: Volume Phase Transition II, Springer-Verlag: Berlin, 1993.
- [11] A. S. Hoffman, J. Controlled Release 6 (1987) 297.
- [12] A. S. Hoffman, A. Afrassiabi, L. C. Dong, J. Controlled Release 4 (1986) 213.
- [13] N. A. Peppas (Editor), Hydrogels in Medicine and Pharmacy Vol. III, CRC Press, Boca Raton, FL, 1987, p 122.
- [14] R. Yoshida, Y. Kaneko, K. Sakai, T. Okano, Y. Sakurai, Y. H. Bae, S. W. Kim, J. Controlled Release 32 (1994) 97.
- [15] T. Tanaka, D. Fillmore, J. Chem. Phys. 70 (1979) 1214.
- [16] Y. Kaneko, K. Sakai, A. Kikuchi, R. Yoshida, Y. Sakurai, T Okano, Macromolecules 28 (1995) 7717.
- [17] Y. Kaneko, S. Nakamura, K. Sakai, A. Kikuchi, T. Aoyagi, Y. Sakurai, T. Okano, Polymer Gels and Networks 6 (1998) 333
- [18] M. G. Redinbaugh, R. B. Turley, Anal. Biochem. 153 (1986) 267.
- [19] H. D. Hill, J. G. Straka, Anal. Biochem. 170 (1988) 203.
- [20] R. Brown, K. Jarvis, K. Hyland, Anal. Biochem. 180 (1989) 136.
- [21] T. Stich, Anal. Biochem. 191 (1990) 343.
- [22] H. Hirose, M. Shibayama, Macromolecules 31 (1998) 5336.
- [23] M. Shibayama, K. Nagai, Macromolecules 32 (1999) 7461.

## Preparation of Comb-type Grafted N-isopropylacrylamide Hydrogel Beads and their Application for Size-selective Separation Media

Masahiko Annaka

Department of Materials Technology, Chiba University,

### Summary

A series of the comb-type grafted poly(N-isopropylacrylamide) (NIPA) gel beads were prepared by inverse suspension polymerization techniques. The comb-type grafted NIPA gel beads exhibited volume phase transition at 34°C, and their deswelling rate, defined as the time required for half- shrinking was ten times faster than that of the normal-type NIPA gel beads. The gel beads were utilized to concentrate dilute aqueous solutions of albumin,  $\gamma$ -globulin and vitamin B<sub>12</sub>. The separation efficiency of albumin and  $\gamma$ -globulin with the comb-type grafted NIPA gel, respectively, were 80% and 85%. Whereas those with normal-type NIPA gel, respectively, were 55% and 60%. The incorporation of grafted chains into gel makes the effective mesh size (the apparent correlation length) smaller. Therefore it induces additional friction between the solutes and network, and excludes the high molecular weight solutes. After they have extracted water, their rapid deswelling property makes the gel regenerate effectively by warming to release the absorbed water.