

解説



温度応答性クロマトグラフィー

環境変化を認識し応答する機能性高分子を分離に応用することにより、外部刺激に応答して試料との相互作用を変化させ分離選択性を制御する全く新しい概念の分離システムの開発を行っている。これまでに温度応答性高分子を用いた温度応答性クロマトグラフィーを実現した。温度により分離担体表面の性質を制御し、水のみでの移動相でステロイドなど医薬品やタンパク、DNAなどの生体高分子を含む複雑な系における分析が可能であった。

金澤 秀子

1 はじめに

近年、高分子科学の分野では、光、熱、pH、電氣的刺激等の環境変化を感知し、それに対応して自身の機能をコントロールするような刺激応答性高分子の研究開発が盛んである。このような機能性高分子は、インテリジェント・マテリアルと呼ばれている。中でも、温度応答性高分子として知られているポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (poly-*N*-isopropylacrylamide: PNIPAAm) は、1981年にマサチューセッツ工科大学のTanakaら¹⁾が、*Science*にPNIPAAmゲルのユニークな性質を報告して以来、多くの研究者が新規分野への応用に取り組んでいる。岡野らは、PNIPAAmを培養皿表面にグラフト重合し、温度変化による表面の相変化により細胞の吸着および剝離に成功している²⁾³⁾。この方法によりタンパク分解酵素を用いずに温度変化のみで培養した細胞をシート状のまま回収することが可能となり、再生医療の分野において大変注目されている。また、PNIPAAmを薬物送達システム(DDS)に用いた研究も盛んである。このようにPNIPAAmは様々な分野における研究が行われているが、これまで分離システムに用いて実用化した例はほとんど報告がない。クロマトグラフィーの担体として高分子は古くから用いられ、ポリスチレン、メタクリル酸高分子などをベースとした充填剤が数多く開発されているが、高分子自身の刺激応答性を分離に応用した例は少ない。

一方ゲノム解析終了後、解明された遺伝子から発現する膨大なタンパクの機能解析とその利用が重要な課題となるが、従来の分離システムでは、タンパクの分離に有機溶媒や多量の塩を用いるため生理活性を損なう恐れがあり、新しい分離システムの開発が望まれている。さらに、大量分取などの際には、経済性や環境面への影響を

考慮すると、簡便かつ有機溶媒の使用をできるだけ少なくした方法が望まれる。

筆者らは、環境応答性高分子用いた高機能表面を分離の技術に応用し、既存の方法にはない全く新しい概念の分離システムの開発を行ってきた。これまでPNIPAAmを用いた温度応答性の高機能表面をもつ高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の充填剤を開発し、温度制御型のクロマトグラフィーシステムを構築した^{4)~8)}。本稿では、筆者らが開発した新しい分離システムである温度応答性クロマトグラフィーについて解説する。

2 高機能表面の作製

温度やpHなどの環境変化を自ら認識し応答する高分子を分子設計し、固体表面に修飾することにより、環境応答性を付与したインテリジェントな高機能表面を作製することが可能である。

ある種のポリ(*N*-置換アクリルアミド)、ポリ(*N*-置換メタクリルアミド)やメチルセルロース等の高分子水溶液は、下限臨界溶液温度(lower critical solution temperature, LCST)以上の温度に加熱すると白濁し、それ以下の温度に冷却すると再び溶解して透明に戻るといふ可逆的な相分離挙動を示すことが知られている^{9)~11)}。またこのような相分離現象は、コイル-グロビュール転移と呼ばれる高分子鎖の収縮現象を伴うことが報告されている¹²⁾。すなわち、LCST以下ではアミド基と水との強い相互作用により、高分子鎖は溶解してランダムコイル状のコンフォメーションをとるが、水温の上昇によりアミド基と水との水素結合が不安定になるため脱水和が起り、高分子鎖が収縮してグロビュール状になる。さらに疎水性相互作用により高分子が会合し、相分離が起こる。

中でもPNIPAAmは、外部からの温度刺激に応答し鋭敏で可逆的な変化を起こすため、温度応答性高分子と

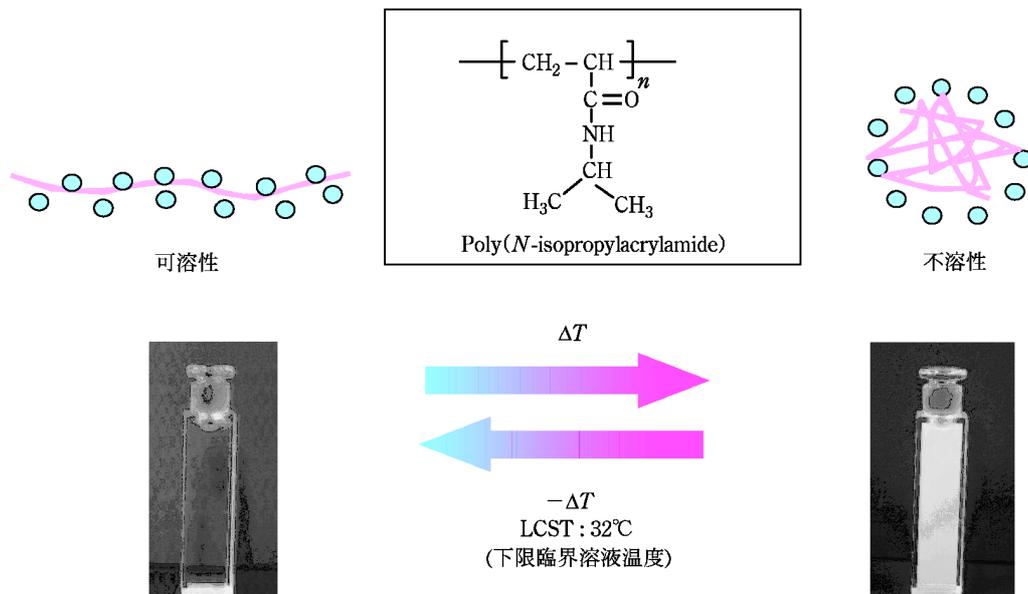


図1 PNIPAAmの構造と性質

して広く用いられている。PNIPAAmは、水中において、水素結合性部位をもっているため、低温側では水分子が高分子鎖のまわりに強く付着し水に溶解する。しかし、温度を上げると、水と相分離し不溶性となり沈殿する。したがってPNIPAAmは、高分子の相転移温度より低温では伸展し水和するが、高温では収縮し脱水するというように、外部からの温度刺激に応答し鋭敏で可逆的な変化を起こす。図1に、温度変化に伴うPNIPAAmの溶解-沈殿変化を示す。32°C以上の温度に加熱すると白濁し、それ以下の温度に冷却すると再び溶解して透明に戻る。この溶解-沈殿変化を引き起こす温度（LCST）は、高分子の共重合組成によって自由に変えることができ、しかも狭い温度範囲で制御できる。LCSTは、高分子鎖の分子構造に強く依存するため、疎水性モノマーとNIPAAmを共重合させ、疎水性共重合体とすることによって低温側に、親水性モノマーと共重合させ親水性高分子とすることによって高温側にシフトする。すなわち、共重合において導入するNIPAAmモノマー、疎水性物質、親水性物質のバランスを調整することで、合成する共重合体の性質を自由に制御することが可能である。例えば、モル比で5%程度の疎水性物質であるメタクリル酸ブチル（BMA）とNIPAAmを共重合させると、得られる共重合体のLCSTは21°C付近へと低温側にシフトする（図2）。この機能性高分子を固体表面に修飾すると、温度刺激により表面の性質が高分子の相転移温度より低温側では親水性に、高温側では疎水性に可逆的に変化する高機能表面を作製することができる。

3 温度応答性クロマトグラフィー

筆者らは、高機能表面における親水性・疎水性変化を

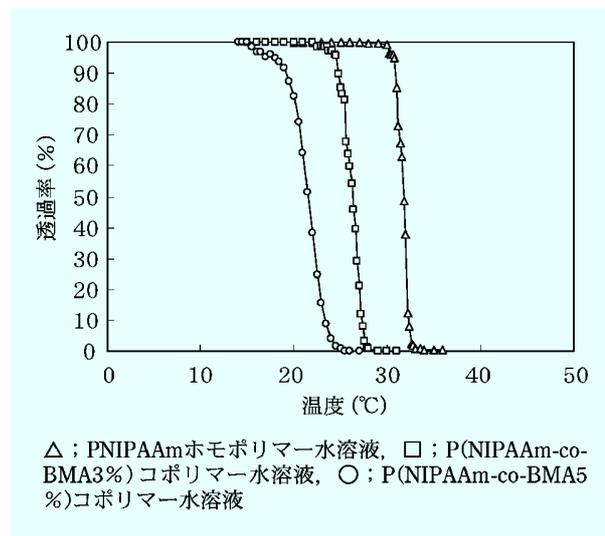


図2 温度応答性高分子水溶液の500 nmにおける透過率に対する温度の影響

HPLCの充填剤へ応用することにより、外部刺激により試料との相互作用を変化させ分離を制御する新しい分離システムを開発した。本システムでは、疎水性相互作用による物質の保持挙動において、従来のクロマトグラフィー分離とは逆に、転移温度に基づき低温での保持時間の減少、高温での延長が確認され、担体表面に修飾した高分子の性質が分離に大きく反映されることが実証されている。このシステムを用いることにより、例えば、プロテインセンサーなどに広く使われている20種類以上のPTH-アミノ酸（フェニルチオヒダントイン誘導体）の分離も、水のみを用いて行うことが可能であった¹³⁾。従来のHPLCの概念にはない新しい手法として、外部からの温度刺激により充填剤表面の性質を変

化させ、結果として固定相と試料との相互作用を制御する新しい分離システムを確立した(図3)。

本システムでは、温度により固定相表面の性質が変化するため、分離の最適化のために移動相組成を考える必要がない。したがって、水のみでの移動相でも温度によって分離選択性の制御が可能であるため、様々な分離が行えるという特徴がある。最近市販の逆相系カラムでも、水100%の移動相が使えるカラムが出てきているが、移動相組成を変化させなければ最適化は行えない点、本システムとは原理的にも大きく異なる。本システムにより、水のみでの移動相で5種のステロイド医薬品(ヒドロコルチゾン、プレドニゾロン、デキサメタゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、テストステロン)の分離を行った例を図4に示す。温度の上昇により分析したすべての

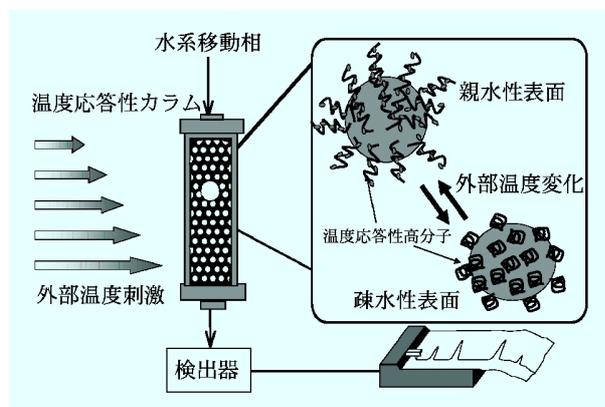


図3 温度応答性クロマトグラフィー概念図

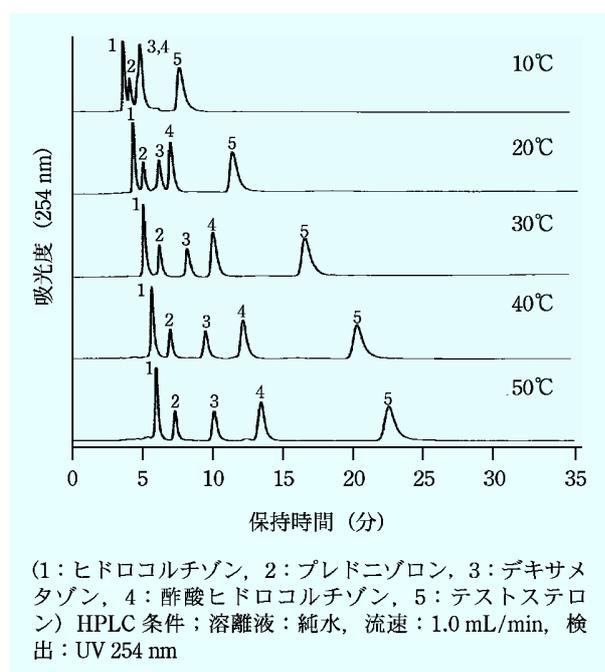


図4 温度応答性クロマトグラフィーを用いたステロイド医薬品の分離における温度の影響

ステロイドにおいて保持時間の延長が確認され、特に、疎水性度を表す $\log P$ 値(水/*n*-オクタノール分配係数)が大きい試料ほど保持時間も大きくなることがわかった。保持挙動は使用した高分子の相転移温度に基づいており、低温での相互作用の減少、高温での増大が確認され、担体表面に修飾した高分子の性質が分離に大きく反映されることが証明された。図5にステロイドの保持と温度の関係(van't Hoff plot)を示すが、LCSTを境に分離機構が変化している可能性が示唆された。

図6に、PNIPAAm単独重合体を修飾した場合と、疎水性の共重合体を導入したカラムでの温度による保持時間変化を示す。疎水性基としてBMAを導入することにより、高分子のLCSTが32°Cから21°Cへと低温側にシフトし、そのため低い温度でも固定相表面の性質が疎水性となり、保持が増大する。

疎水性の高い試料ほど保持が大きいこと、また使用する高分子の疎水性度をあげることに試料の保持時間が延長することから、温度応答性高分子修飾カラムにおける分離機構には、疎水性相互作用が大きく関与していることが明らかとなった。

筆者らは、図3のように機能性高分子PNIPAAmを片末端で担体に固定した充填剤のほか、効率良くシリカゲル表面に高分子を導入する方法として、表面ゲル層の構築を行い、PNIPAAmゲル修飾カラムを作製した。その結果、片末端で導入した場合と同様に温度による保持時間の制御が可能であり、アルカリ側での安定性が向上し耐久性が増した¹⁴⁾¹⁵⁾。PNIPAAm表面ゲルカラムによるPTH-アミノ酸の分離例を図7に示す。

現在、バイオテクノロジーの進歩に伴い、生理活性物質の活性を損なわない分離法が求められているが、本法は、移動相組成を変化させる従来のクロマトグラフィーとは異なり、移動相に水または水溶液を用いて分離を行

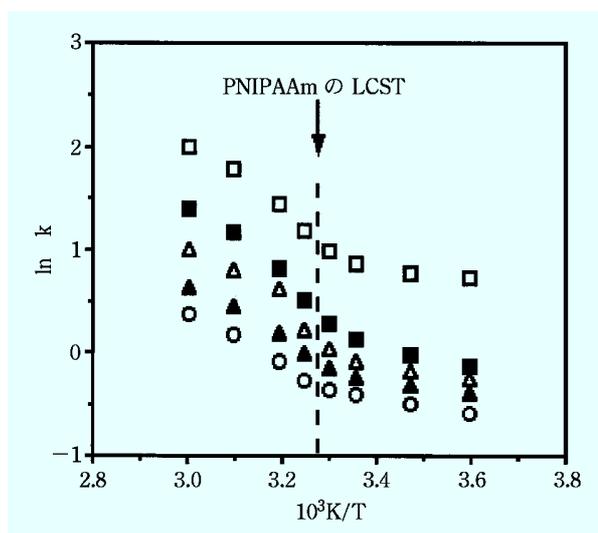


図5 ステロイドの保持と温度の関係(van't Hoff plot)

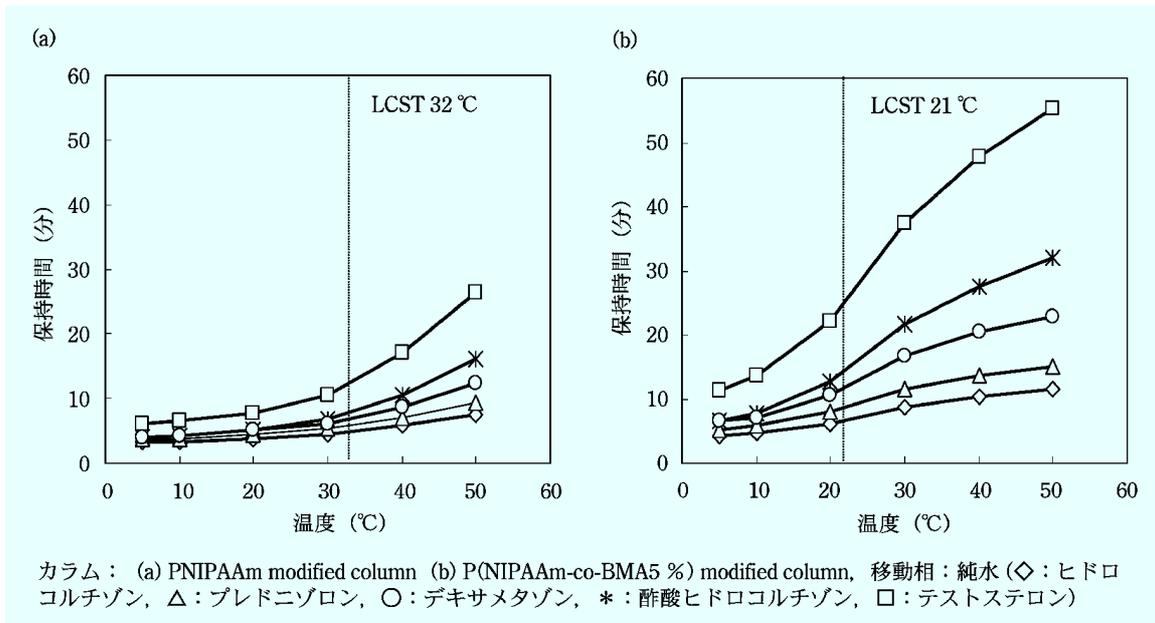


図6 疎水性基の導入による保持時間の変化に対する温度の影響

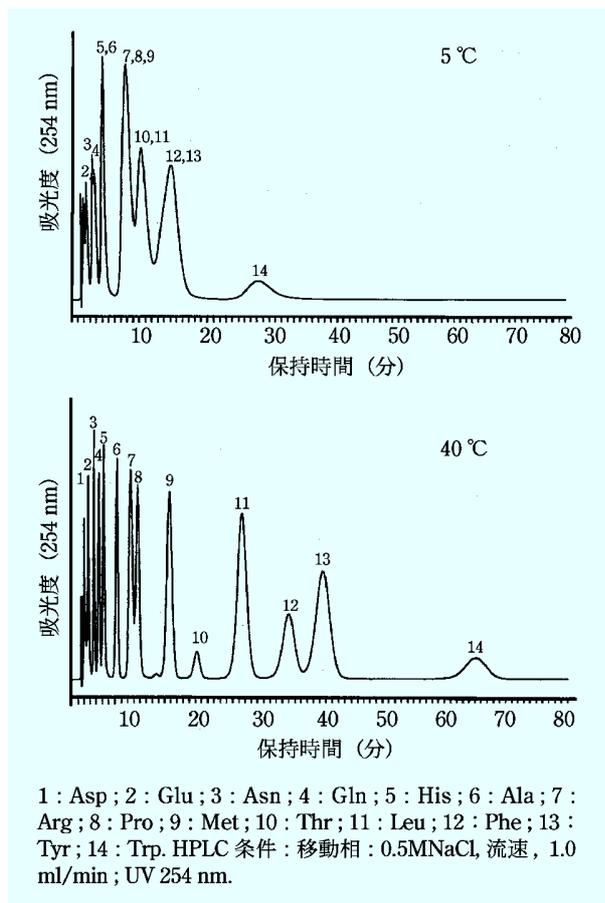


図7 PNIPAAm 表面ゲルカラムを用いた PTH-アミノ酸の分離

うため、タンパク質を変性させる有機溶媒や移動相の調製を必要としない。例えば、タンパク質などは、32°C以上では、疎水性相互作用で高機能表面に吸着するが、

温度を下げると高分子鎖の急激な水和に伴い脱着させることができる。ポストゲノム、遺伝子解析終了後に、今後ますます重要となる発現タンパク質の分離分析技術への応用が期待される¹⁶⁾¹⁷⁾。

4 温度グラジエント

温度による分離選択性の制御はガスクロマトグラフィー (GC) では多用されているが、液体クロマトグラフィー (LC) ではこれまであまり重要視されてこなかった。この理由として、通常の LC の系においては溶質の保持に対して温度による影響より、溶媒による影響の方がはるかに大きいことなどが挙げられる。すなわち、LC では移動相組成を変化させることで保持時間を制御することができるために、従来溶媒プログラミングが主に用いられてきた。一般に、カラム温度を高くすると、溶媒粘度が下がり、それに伴い移動相中の溶質の拡散速度が増加し、保持が減少することが知られている。

筆者らは、温度応答性クロマトグラフィーシステムを用いて、HPLC における新しい手法である温度グラジエント法を確立した。通常の HPLC システムにおいて、従来温度グラジエントは、あまり使われていなかった。これは、前述のように温度のファクターよりも溶離液中の有機溶媒量のほうが保持挙動に大きく影響するためである。本システムでは、カラム温度に対して溶質の保持挙動が顕著に変化し、応答速度も速いことから、温度変化により溶媒グラジエントと同様の効果を得ることが可能である。例えば、図 8 に示すように、5°C ではステロイドは迅速に分離可能であったが、ピーク 2 と 3 の分離が悪い。30°C では、すべての成分がベースライン分離されているが、分析時間が長い。このような場

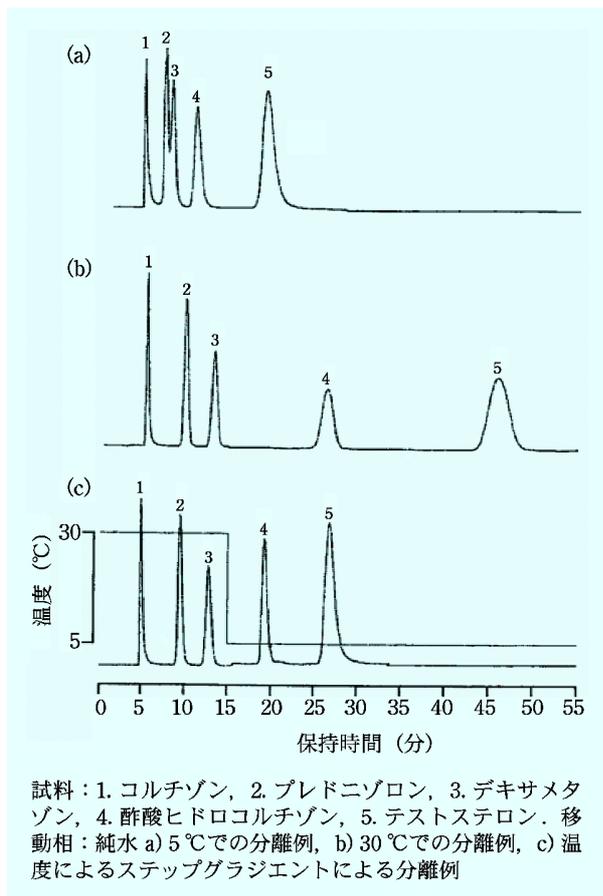


図8 温度グラジエントによるステロイド類の分離例

合、通常のHPLCでは、溶媒グラジエントを用いて最適化するが、本システムでは、温度によるステップグラジエントにより最適化が可能である。すなわち、初めは30°Cで分析し、ピーク3が溶出した後、カラム温度を5°Cに切り替えることによって、後半のピーク4と5の溶出を速くすることができる。温度グラジエントを用いることにより、30°Cで分析した場合の約1/2の分析時間となった。カラム温度を制御し、温度による表面変化の速度を観察した結果、温度応答性高分子修飾充填剤の外部からの温度刺激に対する表面の応答は、非常に速いことが示唆された。また、通常の溶媒グラジエントと同様に、温度によるリニアグラジエントも有効であった。

通常のHPLCで用いられている溶媒グラジエントのデメリットとして、初期条件への復帰時間が長いこと、溶離液の調製が必要（グラジエント条件の設定が必要）などが挙げられるが、これに対して本システムの温度グラジエントのメリットとしては、短時間で初期条件へ復帰が可能、設定温度への追従性が高い、溶離液の調製が不要（誤調製がない）、単一移動相で行うことが可能であるためグラジエント装置が不要であり、再現性、定量性が良いなどが考えられる。従来の溶媒グラジエント法と同様に、極性の大きく異なる複数成分を同時に分離することができる。

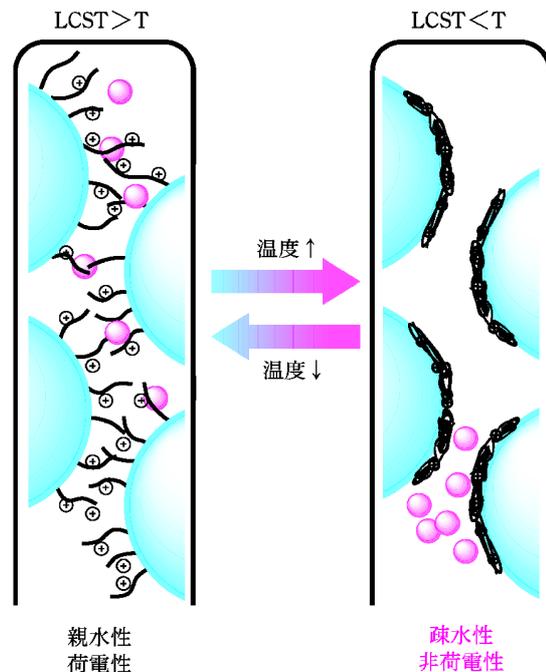


図9 イオン交換モードの温度制御型クロマトグラフィー概念図

5 環境応答性クロマトグラフィー

筆者らは、さらに温度応答性高分子PNIPAAm側鎖に、疎水性基であるBMA、陰イオン交換樹脂であるジメチルアミノプロピルアクリルアミド(DMAPAAm)を導入した3元共重合体を分子設計した。この共重合体をHPLCの充填剤に用いて、核酸の分離に応用した結果、ヌクレオチドやオリゴヌクレオチドの保持挙動は、温度およびpHに反応し変化することが確認された^{18)~20)}。DNAなどの生体高分子の分離分析への応用が期待できる。本システムでは、従来のイオン交換体と異なり、担体に結合した機能性高分子によりイオン交換基の性質を外部から制御することが可能である(図9)。すなわちイオン交換基DMAPAAmを導入したカラムでは、試料の pK_a より高い溶離条件において低温での保持の増大、温度上昇に伴う保持時間の短縮が観察された²¹⁾。これは高分子のLCSTより低温側では、担体表面に固定した高分子鎖が水和伸展し、さらに導入したDMAPAAmのアミノ基のプロトン化により、静電的相互作用が働き、高温側では、高分子鎖の収縮によりイオン交換基が隠されたためであると考えられる。これに対してDMAPAAmを導入していない高分子を用いたカラムでは、試料の pK_a より低い溶離条件において温度の上昇に伴い保持時間の延長が確認できた。溶質の解離が抑制され、高温側においては、疎水性相互作用による保持が働いていると考えられた。以上の結果より本システムでは、温度応答性に加えて、pH応答性を有することが確認され、これによりイオン性の化合物の検出も可

能となった。イオン交換モードは、タンパクの分離などに広く用いられているが、本システムでは、温度によりイオン交換基の性質を外部から制御可能である点が、既存の方法による分離とは大きく異なり、新しい分離モードが実現したと言える。このように、温度やpH等の外部環境に応答する高分子を修飾した高機能表面を分離担体に用いることにより、さらに複雑な系における分離への応用が期待される。

機能性高分子を用いた分離としては、筆者ら以外にも Gewehr²²⁾ や Hosoya²³⁾ らが、PNIPAAmによる担体の細孔径変化をクロマトグラフィーを利用してゲルパーミエーションクロマトグラフィーモードで用いた報告、及び Galaev²⁴⁾ や Yoshizako²⁵⁾ がアフィニティークロマトグラフィーに用いた例があり、今後の展開が期待される。現在筆者らのグループでは、新たにキャピラリーモノリスへの応用や温度応答性マイクロチップの開発を行っている。

6 おわりに

筆者らが開発した外部刺激により固定相の性質が変化する新しい概念のクロマトグラフィーは、移動相組成を変化させて行う従来のクロマトグラフィーとは異なり、単一の移動相で温度により分離を制御するため、有機溶媒や移動相の調製を必要としない。また、温度によりグラジエントが行えるため、特別なグラジエント装置も必要としない。現在“Green Chemistry”が注目されているが、本システムは、移動相に水または水溶液を用いて分離を行うため環境にやさしい分離方法と言える。医学や薬学など様々な分野での応用が期待される。

本研究は、東京女子医科大学先端生命医学研究所の岡野光夫教授、菊池明彦助教授との共同研究であり、本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金 (No. 15590049) によるものである。

文 献

- 1) T. Tanaka, I. Nishio, S. Sun, S. Ueno-Nishio : *Science*, **218**, 467 (1981).
- 2) T. Okano, N. Yamada, H. Sakai, Y. Sakurai : *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1243 (1993).
- 3) T. Okano, N. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai, Y. Sakurai : *Biomaterials*, **16**, 297 (1995).
- 4) H. Kanazawa, K. Yamamoto, Y. Matsushima, N. Takai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano : *Anal. Chem.*, **68**, 100 (1996).
- 5) H. Kanazawa, Y. Kashiwase, K. Yamamoto, Y. Matsushima, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano : *Anal. Chem.*, **69**, 823 (1997).
- 6) H. Kanazawa, Y. Matsushima : *YAKUGAKU ZASSHI*, **117**, 817 (1997).

- 7) H. Kanazawa, Y. Matsushima, T. Okano : *Trends in Anal. Chem.*, **17**(7), 435 (1998).
- 8) K. Yamamoto, H. Kanazawa, Y. Matsushima, K. Oikawa, A. Kikuchi, T. Okano : *Environ. Sci.*, **7**(1), 47 (2000).
- 9) M. Heskins, J. E. Guillet, E. James : *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A2**, 1441 (1968).
- 10) L. D. Taylor and L. D. Cerankowski : *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, **13**, 2551 (1975).
- 11) Y. H. Bae, T. Okano, R. Hsu, S. W. Kim : *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, **8**, 481 (1987).
- 12) S. Fujishige, K. Kubota, I. Ando : *J. Phys. Chem.*, **93**, 3311 (1989).
- 13) H. Kanazawa, T. Sunamoto, Y. Matsushima, A. Kikuchi, T. Okano : *Anal. Chem.*, **72**, 5961 (2000).
- 14) H. Kanazawa, E. Ayanao, T. Sunamoto, Y. Matsushima, A. Kikuchi, T. Okano : *Anal. Sci.*, **18**(1), 45 (2002).
- 15) T. Yakushiji, K. Sakai, A. Kikuchi, T. Aoyagi, Y. Sakurai, T. Okano : *Anal. Chem.*, **71**, 1125 (1999).
- 16) H. Kanazawa, Y. Kashiwase, K. Yamamoto, Y. Matsushima, N. Takai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15**, 1545 (1997).
- 17) H. Kanazawa, Y. Matsushima, T. Okano : *Temperature-Responsive Chromatography : "Advances in Chromatography"* Vol. 41, ed. by P. R. Brown and E. Grushka, pp. 311-336, (2001), (Marcel Dekker Inc).
- 18) E. Ayano, H. Kanazawa, A. Kikuchi, T. Okano : *Anal. Sci.*, **17**, 873 (2001).
- 19) J. Kobayashi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano : *Anal. Chem.*, **73**, 2027 (2001).
- 20) J. Kobayashi, A. Kikuchi, K. Sakai, T. Okano : *J. Chromatogr. A.*, **958**, 109 (2002).
- 21) C. Sakamoto, Y. Okada, H. Kanazawa, E. Ayano, T. Nishimura, M. Ando, A. Kikuchi, T. Okano : *J. Chromatogr. A*, **1030**, 247 (2004).
- 22) M. Gewehr, K. Nakamura, N. Ise, H. Kitano : *Makromol. Chem.*, **193**, 249 (1992).
- 23) K. Hosoya, K. Kimata, T. Araki, N. Tanaka, J. M. J. Fréchet : *Anal. Chem.*, **67**, 1907 (1995).
- 24) I.Y. Galaev, C. Warrol, B. Mattiasson : *J. Chromatogr. A*, **684**, 37 (1994).
- 25) K. Yoshizako, Y. Akiyama, H. Yamanaka, Y. Shinohara, Y. Hasegawa, E. Carredano, A. Kikuchi, T. Okano : *Anal. Chem.*, **74**, 4160 (2002).
- 26) 本システムは、(株)セルシード (東京都新宿区) より市販される予定である。



金澤秀子 (Hideko KANAZAWA)

共立薬科大学 (〒105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30)。共立薬科大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。薬学博士。<現在の研究テーマ>環境応答性高分子の分子設計と分離及び薬物送達システムへの応用。<主な著書>“薬学物理化学” (共著) (廣川書店)。<趣味>美味しいものを食べる。

E-mail : kanazawa-hd@kyoritsu-ph.ac.jp