分子インプリント膜のゲート効果は確かなものか？

吉見靖男

芝浦工業大学 工学部 応用化学科 〒108-8548 東京都港区芝浦 3-9-14

Is “Gate Effect” of Molecularly Imprinted Polymer Membrane Truly a Certain Phenomena?

Yasuo Yoshimi

Department of Applied Chemistry, Shibaura Institute of Technology,
3-9-14, Shibaura, Minato-ku, Tokyo 108-8548, Japan

Molecularly imprinted polymer (MIP) is a recognitive polymer which can be synthesized by simple procedure. Recent researches indicate that the permeability in the MIP layer can change responding to the recognition of its template. The phenomenon is termed as “gate effect”. The effect will potentially open new technologies (e.g. biomimetic chemical sensors or drug delivery systems) but its mechanism is yet to be understood. This paper discusses how certain the gate effect is in this stage.

Key words : molecularly imprinted polymer / gate effect / permeability / chemical sensor

1. はじめに

現在、筆者がメインとしている研究テーマの一つに分子インプリント高分子膜のゲート効果というものがある。言い換えれば「任意の分子を認識して、透過速度を変化させる機能を持ち、安定性に富み、しかもテーラーメイド的に調製できる」という夢のような膜を開発しているのである。ここまでの研究の経緯について大まかに記したい。

筆者は、学生時代、人工臓器制御用のバイオセンサを研究していた。バイオセンサは抗体や酵素の基質特異反応性を利用して、高選択的な検出能を実現している。この性質は、様々な物質が混在している体液の中から特定物質の濃度を選択的に測定する上で有利である。このようなバイオセンサを皮下に埋め込んで、体液中の化学組成を監視し、人工臓器を制御するという発想は古くからあった。典型的な例としては、酵素固定型グルコースセンサを皮下に埋め込んで血糖値を監視し、それに応じたインシュリンを投与することで糖尿病患者の血糖値をコントロールするというものである。センサの生体適合性の改良により、多くの研究者による動物実験で2週間以

上の連続監視が可能であることが示された¹⁾。このセンサは、さほど深いところに埋め込まれるわけではないので、交換が可能である。その点を考えれば、十分な安定性が実現されたはずだが、いまだに実用例はない。この血糖値監視法には致命的な欠点がある。体内に埋め込むデバイスは滅菌する必要がある。しかしグルコースセンサを滅菌処理すれば、固定された酵素（グルコースオキシダーゼ）が失活し、センサ機能は失われることになる。この問題が未解決である限り、グルコースセンサをはじめとするバイオセンサを体内に埋め込むことは不可能である。

そこで、筆者は酵素に代わって分子を認識するセンサ用の素子を開発する必要があると考えた。（もっとも、研究室を始めたころは、酵素や抗体を買うだけの研究費がなかったという理由もある。それらに比べるとモノマーは格段に安価だから低コストで研究できるだろうと思っていた。しかし、実際研究してみると意外とそうでもなかった。）そこで、分子認識能を担持された合成高分子である分子インプリント高分子（molecularly imprinted polymer : MIP）に目をつけた。

MIPは、Fig. 1に示すように、まず目的とする物質

Fig. 1 Example of molecular imprinting²⁾.

(一般に鋳型と呼ばれる。Fig. 1ではテオフィリンを例示) に対して親和性の高いモノマー (機能性モノマー) と可逆的に結合させる。そして機能性モノマーを、ジビニルベンゼンやエチレングリコールジメタクリレートなどの架橋性モノマーと共重合する。すると、鋳型物質と結合する官能基の位置が固定され、鋳型の立体構造が共重合体の中に記憶される。ここで鋳型を除去すれば、鋳型を象った特異結合サイトが形成される。そして特異結合のサイトに鋳型が選択的に結合する仕組みである。ターゲットとする分子構造を生成の過程で記憶して、それと特異結合するMIPの機能は、抗体とよく似ている。そのために、MIPには合成抗体という別名もある。しかし、抗体と比べると、動物飼育や培養のような煩雑な操作がなく、簡便な高分子重合で調製できる点、素材はタンパク質ではなくプラスチックと同じ合成高分子であり安定性に富む点などの利点がある。オートクレーブのような滅菌操作では、性能に影響が現れないことも分かっている。この分子インプリント高分子を分子認識素子に用いれば、体内に埋め込みが可能な化学センサが実現できると考えた。ただし、MIPには酵素のような触媒活性は一般的にない。したがって、MIPをセンサに利用するには、特異結合に対応した電気信号を発生させなければならないが、その方法論はいまだに確立されていない。

2. ゲート効果について

筆者は、MIPの薄膜を共有結合で固定した電極で、

Fig. 2 Grafting molecularly imprinted polymer (MIP) onto indium tin oxide surface by using bulk polymerization³⁾.

電気化学反応を生じさせれば、特異結合によって高分子鎖の架橋が生じて、空隙が失われ、グラフト層におけるレドックス物質の透過速度が小さくなり酸化還元電流が減少するものと予想した。

まずはインジウムスズ酸化物 (ITO) の表面にグラフト重合法でMIPの固定を試みた³⁾。Fig. 2のように、3-メタクリロキシプロピルトリメトキシシランで、表面にメタクリル基を導入した。次に、鋳型としてのテオフィリンの存在下で機能性モノマーとしてのメタクリル酸と架橋性モノマーとしてのエチレングリコールジメタクリレートおよびラジカル重合開始剤の溶液に浸し、光照射でバルク重合反応を生じさせた。ここで溶液はポリマーの固体に変わる。その後、バルク重合体を破碎し、ITOを取り出した。さらに超音波洗浄で、弱く付着しているポリマー (共有結合していないポリマー) を除去した。(つまりポリマーの大部分を棄てるのである。かなり贅沢な方法といえるだろうか。しかし重合反応が進行しているのが目に見えるので、実験者にとってはかなり安心できる方法である。) X線光電子分光法 (XPS) で表面の元素組成を分析したところ、グラフト層の厚みはXPSでの検出限界深さ (10nm) 以下であることが分かった。窒素が検出されなかったことから、鋳型のテオフィリンは、洗浄の段階で除去されたことも分かった。

このITOを電極としてフェロシアン化カリウムの

Fig. 3 Cyclic voltammograms of 5 mM ferrocyanide on the theophylline imprinted ITO as a working electrode with theophylline concentrations of 5 mM (solid line) and 0 mM (broken line) ³⁾.

サイクリックボルタメトリーを行ったところ、鋳型であるテオフィリンの存在によって、酸化電流が予想に反して著しく増大した (Fig. 3)。鋳型無しで同様のグラフト処理を施した電極には、このような反応が見られなかった。

この結果は、鋳型との特異反応に伴って、MIP薄膜の著しい構造変化が生じたことを示しているのではないかと考えた。そこで、水中でのMIPグラフト電極の表面を原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した。その結果、鋳型の存在で表面の粗さに変化が見られた (Fig. 4)。この結果から、鋳型との反応によって、グラフト層の不均一構造に変化が生じたと考えた。この構造変化が、透過速度変化をもたらし、ボルタメトリーにおいて電流変化させたのではないかと考えた。

MIPが鋳型に反応して何らかの構造変化を生ずることは、いくつかの研究によって示唆されている。例えば渡辺 (横浜国大) らは、ノルエフェドリンをインプリントされたN-イソプロピルアクリルアミドのゲルが高温収縮状態に置いて含水率を増大させることを報告している (Fig. 5) ⁴⁾。またPiletsky (英国Cranfield大学) は、分子インプリント膜 (mmもしくは μm のオーダーの厚み) の電解質水溶液中における導電性は、鋳型の存在で変化することを報告した^{5,6)}。鋳型の存在によってイオン透過速度が変化したためと考察している。

このように鋳型の存在によって、分子インプリントの構造が変化し、透過速度が変化する現象を、「ゲート効果」と命名した。この用語の中には、鋳型が鍵、特異結合サイトが鍵穴、物質が透過する空隙を門に例えている。分子を認識して、それに応じて自動的に透過速度を変化させる機能膜なら、「インテリ

Fig. 4 AFM image of the theophylline imprinted polymer layer on the ITO in 0.1 M aqueous solution. (A) : In the absence of theophylline, (B) In the presence of theophylline ³⁾.

ジェントマテリアル」と呼んでも決して大袈裟ではあるまい。またこの膜はセンサのみならず、病態の指標となる物質に応答して、薬剤を自動的に放出する薬剤送達システム用のカプセルにも利用できそうである。

このゲート効果の存在を確かめるために、ITOの場合と全く同じ処理を再生セルロース系透析膜にグラフト処理し、透析実験によって、透過速度変化を調べた。やはり、膜の透過速度は、鋳型であるテオフィリンの存在によって明らかに増大した。そして類似物質であるカフェイン対しては、ほとんど透過速度を変化させなかった⁷⁾。(セルロースをシランカップリングで処理するという方法については厳しい批判を多くの方から戴いた。しかし、他の方法をいくつか試してみたが、ゲート効果を今まで発現させることがない。)

3. ゲート効果は制御できるか？

しかし、バルク重合して、できたバルクポリマーを破碎して基材を取り出し、付着したポリマーを洗

Fig. 5 Relationship between the temperature and swelling ratio (relative volume V/V_0) of the N-isopropylacrylamide gels (A) imprinted by norephedrine and (B) imprinted by none⁴⁾ (V is the volume of the gels under a certain condition and V_0 is the volume of the gels at preparation.).

い流すという方法には、かなり乱暴な印象がある。余分なポリマーを完全に除去できているか、確認が難しい。実際、透過速度の変化率は、膜ごとのばらつきが大きく、実用上の問題を残している。また膜厚の制御も難しい。

そこで異なるグラフト処理法を試すことにした。反応を制御しやすい重合法として、リビングラジカル重合がある。これは、光重合によって高反応性ラジカルと低反応性ラジカルに非対称開裂する特殊な開始剤を使うものである。モノマー溶液中で光照射すると、高反応性ラジカル側のみモノマーが連鎖的に結合し、重合が進行する。そして光照射を停止すると低反応性ラジカルが、高分子ラジカルの末端に結合し、停止剤として機能する。そして再び光照射すると、ラジカル重合が再開する。つまり光照射による反応のON-OFF制御が可能で、また反応時間によって重合度も制御できる。(この開始剤は、開始剤 initiator のみでなく、連鎖移動剤 transfer agent, 停止剤 terminator としても働くので、イニファタニフェターと命名されている。) そこで、このリビングラジカル重合を MIP のグラフトに利用することにした。

Fig. 6 に示すように、まず 4-クロロメチルトリメトキシシランをセルロース膜に共有結合で固定し、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムと反応させた。これで典型的なイニファタであるジエチルジチオカルバミン酸ベンジルが固定された。このセルロース膜をモノマー溶液に漬け、光照射するとグラフト重合が生じた。バルク重合はほとんど起こらなかった⁸⁾。

Fig. 6 Scheme of MIP-grafting onto a cellulosic membrane by living radical copolymerization⁸⁾.

そこで透析とグラフトを交互に行い、鋳型(テオフィリン) またはその構造類似物(カフェイン) による総括物質移動係数変化の大きさ(ゲート効果の大きさ)と累積グラフト反応時間の関係を観察した。その関係を Fig. 7 に示す。反応時間の増大に伴って、ゲート効果の大きさは“波打つ”ように正負に変化した。何とも複雑な結果であったが、再現性は意外と高かった。膜ごとに、この“波の周期”に若干の変化があったものの、増減のパターンに変化はなかった。なぜこのような複雑な結果になったのか、現段階では非常に説明が難しい。AFM の画像を見る限り、MIP 薄膜はかなり不均一で粒子の集合体と見ることが出来る。MIP の薄膜の形成は、薄膜が成長する過程と、相分離など不均一構造が形成される過程など、様々な過程が織りなす複雑なもので、反応時間によってどちらかの過程が優先するか異なっているのかもしれない。

リビング重合法を使えば、光照射時間の調整によって鋳型に対する透過速度変化を正側にすることも負側にすることもできることが分かった。とはいえ、精密な透過速度制御はやはり簡単とはいえない。グラフト量を大きくすれば、大きなゲート効果が得られるというような単純なものではないことも分かった。

当初の研究のテオフィリン、カフェインというコンビネーションは、ゲート効果の評価の指標としては決して理想的ではないだろう。というのは、透過速度変化が、分子認識を反映したものか、共重合体に対するそれらの物質の化学的な作用の違いなのか、説明するのが難しい。テオフィリンでインプリント

Fig. 7 Effect of UV irradiation time on the degree of the gate effect (variation in the overall mass transfer coefficient K_L) of Theo-MIP by 5 mM theophylline (circle) or 5 mM caffeine (triangle) ⁸⁾.

した膜と、カフェインでインプリントした膜の、それぞれの鑄型に対する透過速度変化のパターンが異なったことが⁷⁾、ゲート効果に関する説得力を低くしている。

この問題は鑄型に光学異性体を用いることで、解決した。光学異性体なら、物理化学的性質は全く同じなので、膜に対する化学的作用も同じであると考えて良い。L-またはD-フェニルアラニンを経型としたMIPを同様の手順でセルロース膜表面にグラフトし、透析実験した⁹⁾。その結果、いずれの膜も、それぞれの膜に対して同程度増大した。この結果から、ゲート効果が高次元の立体構造認識に基づくものであることが実証されたといつてよいだろう。また最近では、機能性モノマーにジオールと可逆的に脱水縮合する4-ビニルフェニルボロン酸を用い、D-グルコースに対するMIPを透析膜にグラフトした。D-グルコースの存在下で選択的に透過速度を減少することが確認された¹⁰⁾。このMIP薄膜が、グルコースセンサに使える可能性を強く示唆した。(人工臓器用の埋め込み型センサに近づいたと考えるのは、あまりに脳天気というものだろうか?)

ゲート効果のレパートリーは最近になってようやく増えつつある。

4. 最後に

一連の効果によって、分子インプリントの膜が、鑄型に特異的に反応して透過速度を変化させるゲート効果は、確かめられたと考えて良いだろう。しかし、なぜそのような現象が起こるのか、今のところ全く説明できない。これが分からないため、たとえば、もっと透過速度を上げるにはどうしたら良いか

ということも分からないのである。深い基礎研究が必要であるが、そのためにはMIP膜のキャラクタリゼーションが必要である。しかし数nmのグラフト膜では、例えばその中にどれだけの量の結合の官能基が含まれているのか、どれだけの量の鑄型が結合できるのか、分析するのが難しい。高感度な分析法を開発する、あるいはもっと厚いMIP膜を作るなどのアプローチが必要だろう。

分子認識と透過性自動制御能を持つインテリジェント膜の実現に向けて、日夜努力中である。

文 献

- 1) 例えば Gilligan BC, Shults M, Rhodes RK, Jacobs PG, Brauker JH, Pintar TJ, Updike SJ : *Diabetes Technology & Therapeutics*, **6** 378-386 (2004)
- 2) Vlatakis G, Andersson LI, Müller R, Mosbach K : *Nature*, **361** 645-647 (1993)
- 3) Yoshimi Y, Ohdaira R, Iiyama C, Sakai K : *Sens. Actuat.-B : Chemicals*, **73** 49-53 (2001)
- 4) Watanabe M, Akaoshi T, Tabata Y, Nakayama D : *J. Am. Chem. Soc.*, **120** 5577-5578 (1998)
- 5) Piletsky SA, Piletskaya EV, Panasyuk TL, El'skaya AV, Levi R, Karube I, Wulff G : *Macromolecules*, **31** 2137-2140 (1998)
- 6) Sergeeva TA, Piletsky SA, Brovko AA, Slinchenko EA, Sergeeva LM, El'skaya AV : *Anal. Chim. Acta*, **392** 105-111 (1999)
- 7) Hattori K, Yoshimi Y, Sakai K : *J. Chem. Eng. Jpn.*, **34** 1466-1469 (2001)
- 8) Hattori K, Hiwatari M, Iiyama C, Yoshimi Y, Kohori F, Sakai K, Piletsky SA, : *J. Membr. Sci.*, **233** 169-173 (2004)
- 9) Hattori K, Sasaki A, Watanabe Y, Yoshimi Y, Kohori F, Sakai K : Program and Abstracts of the First World Congress on Synthetic Receptors, P2.27 (2003)
- 10) 服部浩二, 小川貴久, 赤堀裕大, 吉見靖男, 小堀 深, 酒井清孝 : 化学工学会第70年会要旨集, D320 (2005)

(Received 6 April 2005 ;

Accepted 12 April 2005)

著者略歴

吉見 靖男 (よしみ やすお)

1995年3月 早稲田大学大学院博士課程修了 (博士 (工学))

1994年4月～1995年9月 早稲田大学理工学部助手

1995年10月～1997年3月 国立循環器病センター研究所研究員

1997年4月～2005年3月 芝浦工業大学工学部応用化学科講師

2005年4月～同助教授 専門：生体化学工学 (バイオセンサ, 人工神経など)