ISSN 2186-5647

4-32

N-イソプロリルアクリルアミドから構成されるコア-シェル型ゲルビーズの調製と特性評価

日大生産工(院)　○桑原　岳朝
日大生産工　高橋　大輔　和泉　剛

1. 緒論

現在，高分子微粒子を用いた臨床検査が広く行われている。例えば，抗体を固定化した微粒子と抗原により形成される凝集塊の大きさから抗原を定量するラテックス凝集法がある。ラテックス凝集法は，簡便な操作で迅速な測定が可能なことからC-反応性タンパク質(CRP)などの定量に用いられている。

CRPの血中濃度は，組織破壊，感染，炎症などにより正常値の0-6 μg/cm^{3}から数千倍まで上昇し，症状の回復とともに速やかに減少する。このような性質から，CRPは疾患・炎症マーカータンパクとして疾患の重症度，経過，治療効果などの判定に用いられている。

抗体を用いたCRPの測定は高コスト，固定化による抗体の変性などの問題を有する。Tugirimanaらは，Ca^{2+}存在下でCRPと特異的に結合するホスホリルコリンを表面修飾した微粒子を用いたCRPの定量に関する研究を報告している[1)]。

粒子表面へ高分子を導入する方法として微粒子のコア-シェル化がある。コア-シェル型高分子微粒子は異なる高分子のコア(内核)とシェル(外殻)から構成されており，目的分子の分離・回収やドラッグデリバリーシステムなど様々な分野に応用可能な材料として注目されている。

本研究はコアに熱応答性高分子であるポリ*N*-イソプロピルアクリルアミド(PNIPAAm)，シェルにポリ2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(PMPC)を用いたコア-シェル型ゲルビーズ(PNIPAAm/PMPCビーズ)を調製した。動的光散乱法および吸光度測定によりビーズの平均粒径の温度依存性およびビーズとCRPの反応性の評価を行った。

2. 実験

2-1. 試薬

コア部分のPNIPAAmビーズの調製にはモノマー，架橋剤，界面活性剤および重合開始剤としてNIPAAm，*N,N'*-メチレンビスアクリルアミド(BIS)，ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(NaDBS)およびペルオキソ二硫酸アンモニウム(APS)を使用した。シェルの調製にはMPC，BISおよびAPSを使用した。

2-2. PNIPAAm/PMPCビーズの調製

Table 1に示す条件でPNIPAAm/PMPCビーズを調製した。ビーカーに所定量の蒸留水，NIPAAm，BISおよびNaDBSを溶解させた。丸底フラスコに移し入れ，60℃に昇温した。窒素雰囲気下で1時間撹拌した後，APSを添加し2時間重合した。温度を45℃に下げ，MPCおよびBISを添加した。窒素雰囲気下で1時間撹拌した後，APSを添加し2時間重合した。分散液の洗浄のため透析を行った後，凍結乾燥によりドライビーズを得た。

Table 1 Preparation condition of PNIPAAm/PMPC gel beads

Core		Shell	
NIPAAm	0.50 M	MPC	18 mM
BIS	5.0 mM	BIS	0.18 mM
APS	1.0 mM	APS	36 μM
NaDBS	25 mM		

Preparation and characterization of core-shell gel beads composed of *N*-isopropylacrylamide

Taketomo KUWABARA, Daisuke TAKAHASHI, and Tsuyoshi IZUMI

2-3. PNIPAAm/PMPCビーズの平均粒径の測定

蒸留水に分散したPNIPAAm/PMPCビーズを25-45℃で10分間静置し，動的光散乱法により平均粒径を測定した。25-45℃におけるPNIPAAm/PMPCビーズの平均粒径の温度依存性について検討した。

2-4. 吸光度測定によるPNIPAAm/PMPCビーズとCRPの反応性の評価

PNIPAAm/PMPCビーズとCRPを0.06 M Tris-HCl(0.01 M $CaCl_2$，pH 7.5)に溶解し，25℃で20分間静置して混合した。波長600 nm，45℃で混合液の吸光度を測定した。測定時間T=2 minの吸光度から単位時間当たりの吸光度変化を求めた。各CRP濃度における混合液の吸光度変化からPNIPAAm/PMPCビーズとCRPの反応性を評価した。

3. 結果および考察

Fig. 1に25-45℃におけるPNIPAM/PMPCビーズの平均粒径を示す。温度の上昇に対して平均粒径は減少し，35℃の平均粒径は30℃の場合に対して約6割であった。PNIPAAmは下限臨界溶解温度(LCST)の32℃以下において，親水部の水素結合，疎水部の疎水性水和により膨潤しているが，LCST以上になると脱水和により疎水部同士の会合が起こりやすくなるため，平均粒径が大幅に低下したと考えられる。

Fig. 2にPNIPAAm/PMPCビーズとCRPの混合液の吸光度変化量の経時変化を示す。単位時間当たりの吸光度変化量はCRP 0 ，0.50，2.0 μg/cm^3でそれぞれ0.015，0.022，0.023 min^{-1}であった。 PNIPAAm/PMPCビーズはPNIPAAmのLCSTの32℃以上で白濁するため，CRP濃度0 μg/mlにおいても吸光度が増加した。しかし，CRP濃度の増加に対して単位時間当たりの吸光度変化が増加したことから，ビーズがCRPに対して反応性を示すことが示唆された。

4. まとめ

PNIPAAm/PMPCビーズの平均粒径の温度依存性の検討およびPNIPAAm/PMPCビーズとCRPの反応性の評価を行ったところ，以下のことが明らかとなった。

・30-35℃にかけて大幅に平均粒径が減少したことから，PNIPAAm/PMPCゲルビーズの平均粒径はPNIPAAmに起因する温度依存性を示すことが分かった。

・CRP濃度の増加に対して混合液の吸光度変化が増加したことから，PNIPAAm/PMPCビーズはCRPに対して反応性を示すことが分かった。

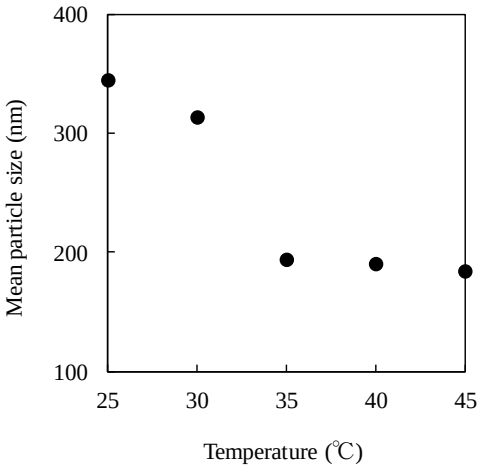

Fig. 1 Temperature dependences on mean particle size of PNIPAAm/PMPC beads
Conc of beads (μg/cm^{-3}) : 2.5 μg/cm^3

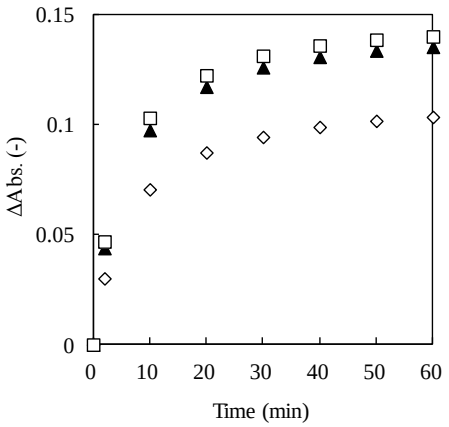

Fig. 2 Changes in ΔAbs. of solution of beads and CRP with time
Conc. of beads(μg/cm^{-3}) : 25
Conc. of CRP (μg/cm^3) : ◇0 ▲0.50 □2.0

5. 参考文献

1) P.L. Tugirimana et al.，*Clinical Chemistry and LabLabratory Medicine*，**2009**，47，1417-1422