

抗原応答性高分子ゲルの創製とその物質透過制御機能

Preparation of Novel Antigen-Responsive Gels and Controlled Permeation of Solutes through Their Membranes

研究代表者 関西大学工学部教養化学 助教授 宮田隆志
Associate Professor, Faculty of Engineering, Kansai University
Takashi MIYATA

Using an antigen-antibody binding as a stimuli-responsive cross-linking point, we have prepared novel antigen-responsive hydrogels that undergo swelling changes in response to a free antigen. This paper describes the effect of network structures of the hydrogels having an antigen-antibody binding on their antigen-responsive swelling behavior. Furthermore, we discussed the mechanism for the antigen-responsiveness of the hydrogels by investigating their structural changes in the presence and absence of a free antigen. The antigen-antibody hydrogel with a semi-interpenetrating polymer network (semi-IPN) structure exhibited a reversible change in swelling ratio in response to stepwise changes in the antigen concentration, but the hydrogel without a semi-IPN structure did not. Some investigations revealed that the antigen-responsive swelling behavior of their hydrogels results from changes in their cross-linking density due to the formation and dissociation of the antigen-antibody binding in response to the free antigen. In addition, the pulsatile permeation of solutes in response to the specific antigen concentration was achieved by using the antigen-antibody semi-IPN hydrogel.

1. 研究目的

近年, pHや温度などの外部刺激に応答して可逆的に構造変化を誘起する刺激応答性高分子ゲルがインテリジェント材料として注目されている。特に, 最近では特定の分子の存在を感知して膨潤率を変化させるゲルが合成されており, 医療分野をはじめとする広範な領域での利用が期待されている。一方, われわれは抗体が特定の抗原を認識して特異的に結合することに着目し, この抗原抗体結合をゲルの架橋点として利用することによって, 抗原応答性を示す新規な高分子ゲルの合成を試みてきた。その結果, このゲルは特定の抗原存在下でのみ膨潤し, その膨潤率が明確な抗原濃度依存性を示すことが明らかとなった。

本研究では, 抗原応答性ゲルに可逆性を付与するため, 抗原抗体結合をゲルの架橋点として利用する際に semi-Interpenetrating Polymer Networks (semi-IPN) 構造を形成するようにゲル構造を設計構築した。さらに, 得られた抗原抗体 semi-IPN ゲルの膨潤挙動を,

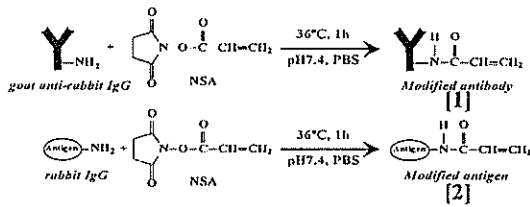
semi-IPN構造を持たない entrapment ゲルのそれと比較することによって, ゲル構造がその抗原応答性に及ぼす影響について調べた。また, 同様の方法でゲル膜を調製し, 抗原濃度に応答した溶質透過制御機能についても検討した。

2. 研究経過

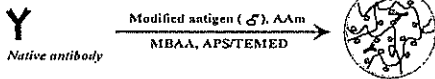
2.1 実験方法

抗原抗体 entrapment ゲルおよび semi-IPN ゲルは Scheme 1 に従って合成した。リン酸緩衝液 (PBS, pH7.4) 中で抗体 (goat anti-rabbit IgG) と *N*-succinimidylacrylate (NSA) とを反応させることによって合成したビニル基導入抗体 [1] に, acrylamide (AAm) を加え, レドックス開始剤として ammonium persulfate (APS) / *N*, *N*, *N*'-tetramethylethylenediamine (TEMED) を用いて重合することにより, ポリマー化抗体 [3] を合成した。次に, [3] に先と同様の方法で合成したビニル基導入抗原 (rabbit IgG) [2], AAm, 架橋剤 (*N*, *N*'-methylenebisacrylamide (MBAA)) およびレドッ

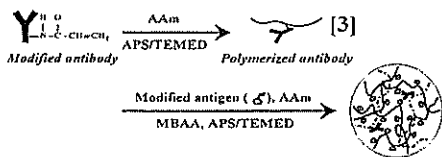
MODIFICATION OF ANTIGEN AND ANTIBODY



1) Antigen-Antibody Entrapment Gel



2) Antigen-Antibody Semi-IPN Gel



Scheme 1. Synthesis of antigen-antibody hydrogels.

クス開始剤 (APS/TEMED) を加え、ガラス管内にて重合させることにより、抗原抗体 semi-IPN ゲルを調製した。また、抗原抗体 entrapment ゲルは、semi-IPN ゲルの合成方法と同様にしてポリマー化抗体 [3] の代わりにネイティブな抗体を用いて合成した。

抗原濃度に応答した溶質透過制御機能については、膜状のゲルをダイヤフラム型セルに挟み、一方に透過溶質であるビタミン B₁₂ あるいはヘモグロビンをいれ、もう一方の抗原濃度を変化させたときの透過挙動を調べることで検討した。

2.2 結果および考察

抗原応答性ゲルの構造と可逆的応答性

Fig. 1 には、PBS 中で平衡膨潤に達した抗原抗体 entrapment ゲルおよび抗原抗体 semi-IPN ゲルを抗原濃度 4 mg/ml の PBS に浸漬した場合の膨潤率変化と外部溶液の吸光度 (280nm) 変化を示した。図より、いずれのゲルも抗原溶液に入れると急激に膨潤し、明確な抗原応答性を示すことがわかる。また、抗原抗体 semi-IPN ゲルの場合には、抗原溶液中にゲルを浸漬させると溶液の吸光度が減少し、外部溶液の抗原濃度は単調に低下した。したがって、ゲルを抗原溶液に浸漬するとフリーの抗原がゲル内に拡散し、それらがゲル内の抗原抗体結合を切断することによってゲ

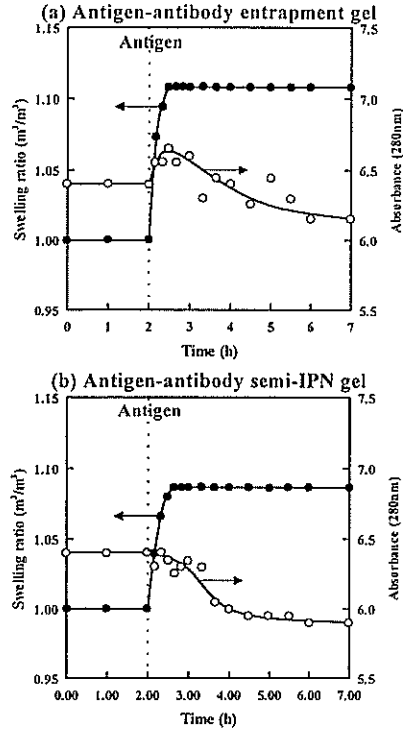


Fig. 1. Swelling ratio changes (●) of antigen-antibody entrapment hydrogel (a) and antigen-antibody semi-IPN hydrogel (b), and absorbance changes (○) of the phosphate buffer solution containing rabbit IgG after their hydrogels were immersed in the solution.

ルが膨潤したと考えられる。一方、抗原抗体 entrapment ゲルの場合も同様にゲル内に拡散してきた抗原によってゲルが膨潤するが、抗原抗体 semi-IPN ゲルとは異なって抗原溶液にゲルを浸漬後すぐに外部溶液の吸光度が増加した。これは、抗原抗体 entrapment ゲルが膨潤する際にゲル内の抗体が溶出するためと推察される。以上の結果より、抗原抗体ゲルが抗原に応答して膨潤する際にゲル内の抗原抗体結合が解離しても semi-IPN ゲルからポリマー化抗体は溶出しませんが、entrapment ゲルからはフリーとなった抗体が溶出することがわかった。

次に、それらの抗原抗体ゲルを PBS および抗原 PBS 溶液に交互に浸漬させ、その膨潤変化を調べることで抗原応答性の可逆性について検討した。その結果、抗原抗体 entrapment ゲルは、最初に抗原濃度が増減したときにはそれに応答して膨潤収縮したが、2回目以降では可逆的な膨潤率変化が認めら

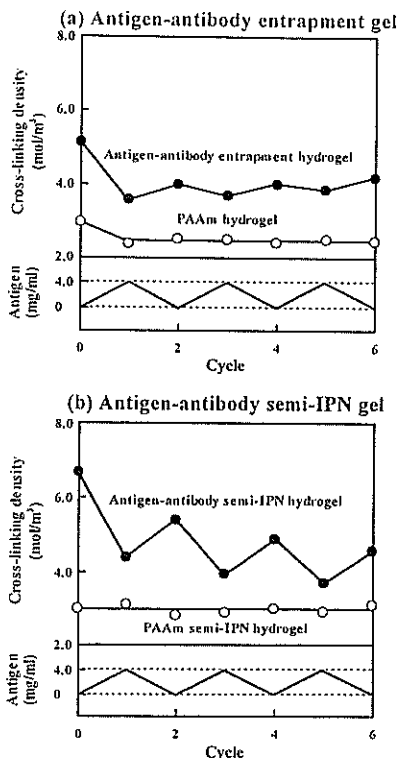


Fig. 2. Changes in the cross-linking density of the PAAm hydrogel (○) and antigen-antibody hydrogel (●) in response to stepwise changes in the antigen concentration between 0 and 4mg/ml.

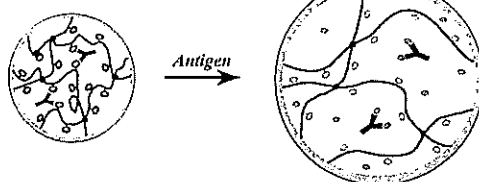
れなかった。しかし、抗原抗体semi-IPNゲルは外部抗原濃度の周期的な変化にตอบสนองして可逆的に膨潤収縮を繰り返し、明確な可逆的応答性を示した。したがって、抗原抗体ゲルにsemi-IPN構造を導入することによって、その抗原応答性に可逆性を付与できることが明らかとなった。そこで、これらの抗原応答性ゲルの可逆性について検討するため、外部抗原濃度を変化させた場合のゲルの架橋密度変化を調べ、その結果をFig. 2に示した。図より、外部抗原濃度を周期的に変化させた場合、抗原抗体entrapmentゲルの架橋密度はほとんど可逆的変化を示さなかったが、抗原抗体semi-IPNゲルのそれは可逆的に増減することがわかった。したがって、抗原抗体semi-IPNゲルが外部抗原濃度に応答して可逆的に膨潤変化を示したのは、ゲル内の架橋点として作用していた抗原抗体結合が可逆的に形成、解離するためと考えられる。

以上の結果より、抗原抗体entrapmentゲル

および抗原抗体semi-IPNゲルの抗原応答性機構は次のように説明できる(Fig. 3)。すなわち、フリーの抗原存在下では、いずれの抗原抗体ゲルの場合もゲル内で架橋点として作用している抗原抗体結合がフリーの抗原との交換反応によって解離し、ゲルの架橋密度が減少するために膨潤する。さらに、抗原抗体entrapmentゲルでは抗原にตอบสนองしていったん膨潤すると抗体がフリーとなってゲルから溶出するため、外部抗原濃度を低下させても再び収縮することが困難である。しかし、抗原抗体semi-IPNゲルではsemi-IPN構造内に取り込まれたポリマー化抗体が網目に結合した抗原と再び結合できるため、可逆的に収縮できると考えられる。

以上の結果より、抗原抗体ゲルを調製する際にsemi-IPN構造を導入することによって可逆的に抗原応答性を示すゲルが得られることが明らかとなった。

a) Antigen-antibody entrapment gel



b) Antigen-antibody semi-IPN gel

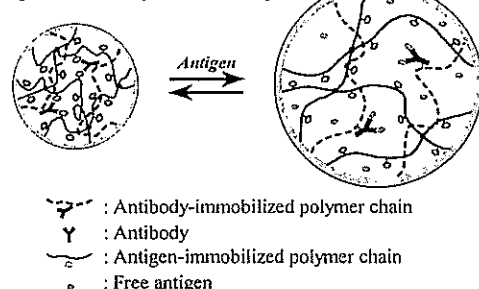


Fig. 3. Tentative schema for the swelling of an antigen-antibody entrapment and semi-IPN hydrogels in response to a free antigen.

抗原応答性ゲルによる溶質透過制御

次に、抗原抗体entrapmentゲル膜および抗原抗体semi-IPNゲル膜を用いてビタミンB₁₂(分子量1355)とヘモグロビン(分子量64500)の透過実験を行った。Fig.4には、ダイヤフラム型透過セルを用いて二種類の抗原抗体ゲル

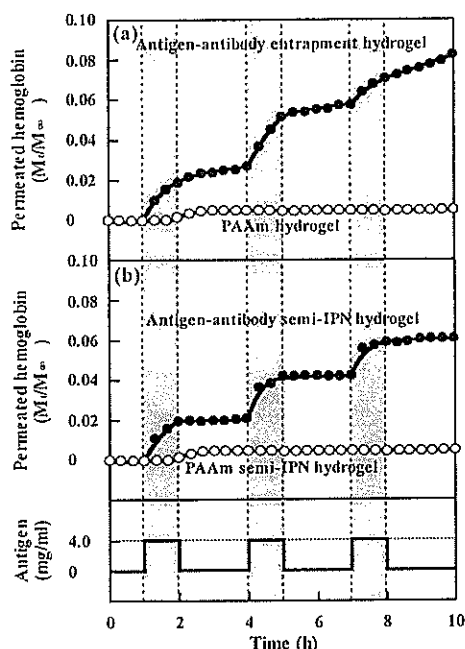


Fig. 4. Permeation profiles of hemoglobin through the antigen-antibody gel membranes and PAAm gel membranes in response to stepwise changes in the antigen concentration between 0 and 4 mg/ml. (a) Antigen-antibody entrapment gel membrane, (b) antigen-antibody semi-IPN gel membrane.

膜によりヘモグロビンの透過実験を行った結果を示した。ここで、いずれの場合も外部抗原濃度を0mg/mlと4mg/mlとの間を周期的に変化させた場合のヘモグロビン透過量を示している。図より、いずれの抗原抗体ゲル膜でも外部抗原濃度の変化に応答してヘモグロビン透過量が変化していることがわかる。また、entrapmentゲル膜では外部抗原濃度がゼロの場合もヘモグロビンの透過は完全にストップしなかったが、semi-IPNゲル膜では抗原濃度の変化に応答してヘモグロビン透過を明確にON-OFF制御できることが明らかとなった。これは、外部抗原濃度の変化に応答してsemi-IPNゲルの膨潤率が可逆的に変化できるためと考えられる。さらに、ヘモグロビンよりも分子サイズの小さなビタミンB₁₂を透過した場合には、抗原不在下でも若干量の透過が観察され、抗原存在下でその透過が促進された。したがって、今回合成した二種類の抗原抗体ゲルはヘモグロビンの分子サイズを境に網目サイズが変化していると推察さ

れた。以上の結果より、抗原抗体ゲル膜は外部抗原濃度に応答して溶質の透過挙動を制御できるインテリジェント膜であることがわかった。

3. 研究成果

本研究では、抗原抗体結合を有する高分子ゲルが外部抗原濃度に応答して膨潤率を変化させる際、そのゲルのネットワーク構造がその可逆性に大きく影響することが明らかとなった。特に、抗原応答性ゲルにsemi-IPN構造を導入することによって外部抗原濃度に応答して可逆的に膨潤収縮するゲルを合成することがわかった。また、そのような抗原応答性ゲルを用いることによって、外部抗原濃度に応答したインテリジェントな溶質透過制御が可能であった。

4. 今後の課題と発展

本研究によって、外部抗原濃度に応答して可逆的に膨潤収縮する抗原応答性ゲルを合成するための基礎的知見が得られた。しかし、それらの膨潤変化はまだ小さく、センサー素子やドラッグデリバリーシステムなどに利用するためには、より厳密にゲル構造設計を行う必要がある。さらに実用化に際してはその応答性の感度なども向上させることが要求されるため、今後、最適なゲル構造設計を行うことにより特定の抗原を感知するセンサー素子などを構築する。また、これらの成果に基づいて特定の生体分子を認識する新規な刺激応答性ゲルを合成するための方法を確立する予定である。

5. 発表論文リスト

1. T. Miyata, N. Asami, T. Uragami, A Novel Biomolecule-Responsive Hydrogel Having Antigen-Antibody Bindings as Cross-linking Points. (投稿準備中)
2. T. Miyata, N. Asami, T. Uragami, Pulsatile Permeation of Solutes through Antigen-Responsive Membranes. (投稿準備中)