

生体親和性高分子のハイスループットスクリーニング —バイオ界面水の役割と中間水コンセプトによる材料設計—



田中 賢

山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻
[992-8510]米沢市城南4-3-16
教授, 博士(理学).
専門はバイオマテリアル設計工学.
tanaka@yz.yamagata-u.ac.jp
www.bio-material.jp/

1. はじめに

1.1 医療現場のニーズ

日本人の3大死因である「がん、心疾患、脳血管疾患」の増加にともない、健康で安心して暮らせる社会の構築が急務である。国際的に高齢社会が急速に進み、病気の超早期診断機器や生体接触型のフレキシブル医療材料・デバイスが求められている¹⁾。しかし、材料が生体成分と接触すると、炎症反応、免疫反応、アレルギー反応、血栓形成反応、感染などの異物反応が引き起こされる¹⁾。したがって、超早期診断ヘルスケアセンサ・治療技術の開発のためには、生体から異物と認識されず、生体を損傷しない性質を有する副作用のない生体適合性・血液適合性を有する生体親和性高分子の開発が望まれている¹⁾。しかし、精度が高く簡便な高分子設計・スクリーニング技術は確立されていない。

医療現場での喫緊の課題である診断・治療技術の高度化に必要な高分子材料の開発には、バイオ界面における生体側および高分子側における、マクロから分子レベルまでの多種多様な情報の統合が必要である。また、高付加価値な医療分野においても国際競争力が問題となっており、材料やプロセスコストを考慮した研究開発が課題である。

1.2 医療材料のスクリーニング方法

これまでの医療材料の開発は、無限の候補材料の中から、開発者の経験と勘に頼って一次スクリーニングを行うことで、リード材料を抽出し、動物実験・臨床試験を経て行われてきた。したがって、スクリーニングの精度が低く、開発に時間とコストがかかっていた。また、最終候補材料の生体親和性などの機能発現機構

が不明であるため、副作用の予測が困難であった。このような材料開発の現状から、医療現場が必要としている“血栓が形成されない”、“感染しない”、“副作用がない”デバイスの開発が遅れていた。生体親和性合成高分子材料の開発分野において、生体成分の接触界面：バイオ界面で起こるイベント(図1)の高感度解析技術と分子設計技術を連結することで、精度の高いスクリーニング手法の確立が期待されている。

本稿では、医療高分子材料設計におけるバイオ界面水の役割および精度の高いスクリーニング手法に関連した研究について紹介する。

2. 生体親和性合成高分子表面

これまでに、生体親和性合成高分子の表面²⁾としては、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルピロリドン(PVP)、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)などの親水性表面、親水・疎水、ソフト・ハード、結晶・非晶などの相分離表面、ポリ(2-メトキシエチルメタクリレート)(PMEA)³⁾および類似体の表面などが報告されている。近年、ノニオン性のPEG誘導体で水酸基を多く含むポリグリセロール⁴⁾、ホスホベタイン・スルホベタイン・カルボキシベタイン(図2)などの1分子中にプラス荷電とマイナス荷電の両方の官能基を有する両性イオン性高分子表面のタンパク質吸着や血球細胞の粘着の抑制についての報告⁵⁾が相次いでいる。生体親和性発現の機構として、表面自由エネルギー、分子運動性、粘弾性などのファクターの影響が指摘されている¹⁾。表面の微細形状、親水・疎水性、粘弾性などを組み合わせたスクリーニング技術も報告されている⁶⁾。しかし、生体親和性を規定するタンパ

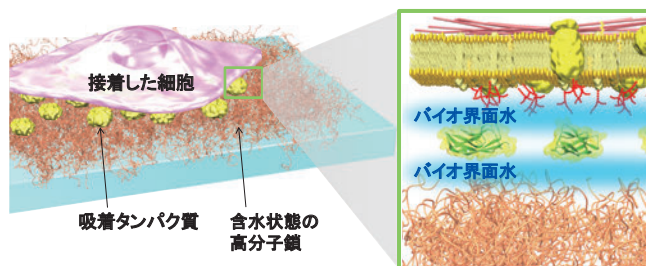


図1 バイオ界面の模式図

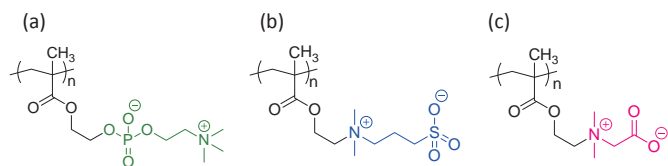


図2 両性イオン型メタクリレート高分子の化学構造例 (a) ホスホベタイン (b) スルホベタイン (c) カルボキシベタイン

ク質の吸着や細胞の接着性、増殖性に対しては必ずしも明確な相関性が見られず、生体側、材料側のさまざまな因子が複合的に影響する生体親和性の発現機構は十分に解明されていない。一般に、材料のバルクと表面の特性は、乾燥状態もしくは真空状態での解析結果を元に議論される。しかし、ほとんどの医療製品は滅菌された乾燥状態から含水状態へ環境が変化する。したがって、高分子材料の表面特性と生体親和性との相関を明らかにし、優れた医療材料を開発するためには、上述のパラメーターに加え、材料に水が吸着した含水状態での物性解析が重要である。

3. バイオ界面の水和状態

ヒト血液中には、血小板、白血球、赤血球などの細胞成分と血漿タンパク質成分が、緩衝溶液 (37℃、pH 約 7.4、塩濃度約 0.16 M) に分散、溶解している。医療製品を構成する合成高分子表面に血液が接触すると、血液に存在する水分子やイオンが材料表面にただちに吸着し、材料の表面近傍は数秒から数分のうちに飽和含水状態になる。ついで、血液中に存在するタンパク質が吸着、変性し、これにより生体防御系の活性化が起き、血栓形成などが引き起こされる。したがって、材料に吸着した水分子の状態が医療製品の性能に大きな影響を与えると考えられる。

水和状態の議論の際には、言葉の定義の統一化が図られていないので注意が必要²⁾であるが、細胞生物学や医療材料における水和状態の重要性は古くから指摘されてきた⁷⁾。Bruckら⁸⁾は、HEMAやポリアクリルアミドハイドロゲルの血液適合性発現のためには適切な含水量が存在することを示した。Andrade⁹⁾やRatnerら¹⁰⁾は、血液適合性発現には表面に吸着した水の量だけでなく吸着した水の構造も重要因子であると提案している。丹沢ら¹¹⁾は、poly(ethyleneglycol methacrylate) ハイドロゲル中の水や高分子鎖の分子運動性の重要性を指摘している。Luら¹²⁾は、高分子表面の水とタンパク質表面の水の交換がタンパク質吸着に影響することを述べている。Israelachviliら¹³⁾は材料表面の水の安定性、密度、配向がタンパク質吸着や細胞接着に対する材料の能力の違いをもたらすと報告している。また、Grunzeら¹⁴⁾は、PEGの薄膜界面に存在する水の層の安定性がタンパク質吸着を抑制する因子の一つであることを予測している。Kataokaら¹⁵⁾は、飽和含水量から不凍水量を引いた水の量が血液適合性発現にとって重要であると提案している。Ishiharaら¹⁶⁾は、リン脂質に類似したメタクリロイルホスファチジルコリン (MPC) とブチルメタクリレートとの共重合体がタンパク質の吸着が少なく、吸着タンパク質の二次構造が維持され、血小板適合性に優れた理由として、この共重合体中の自由水の割合が多いことを理

由に挙げている。MPCポリマーの結合水の割合に注目した報告例もある¹⁷⁾。Yuiらは、ポリロタキサンプロック共重合体の水和状態での分子運動性と細胞接着や幹細胞分化挙動との相関について明らかにしている¹⁸⁾。

4. 水和状態の解析と材料スクリーニング

高分子材料に吸着した水の構造の評価法¹⁹⁾として、核磁気共鳴法、誘電緩和法、振動分光法 (赤外、ラマン、和周波発生 (SFG))、示差走査熱量法 (DSC)、X線回折法、中性子散乱法などが知られている。たとえば、DSC、固体NMR、時間分解能に優れたその場合全反射赤外分光 (*in situ* ATR-IR) 測定により、材料に吸着した水分子の構造を分類することができる。含水した状態の天然高分子および生体親和性を有する合成高分子のDSC測定を行った結果、昇温過程において水の低温結晶形成に由来する発熱ピークおよび水の低温融解に由来する吸熱ピークが共通して観測された^{2), 3)} (図3)。含水量とDSCによる各転移における熱量から、高分子材料に吸着した水を1) 自由水、2) 不凍水、3) 中間水に分類した (表1)。純水のみを測定した場合、0℃に融解ピークが観測される。1) 自由水は、高分子に吸着しているもののバルク水に近い性質で、高分子材料と弱い相互作用をしている水であり、0℃付近で融解する水、2) 不凍水は、高分子材料と強く相互作用し、-100℃においても凍結しない水、3) 中間水は、自由水でも不凍水でもなく、高分子材料と中間的な相互作用をしている水であり、0℃よりも低い温度で低温結晶形成し、かつ0℃よりも低い温度で低温融解する水、とそれぞれ定義した (表1)。図3に示したように、含水PMEAに存在する中間水は、-50℃以下では、氷を形成していないが、-50~-20℃付近で発熱をともなって結晶形成を示し、その後吸熱をともなって融解する水であることがXRD-DSC同時測定により証明されている¹⁹⁾。

In situ ATR-IR法により、材料の官能基レベルで吸

表1 高分子材料に含水した水の分類と特徴

水の分類	不凍水	中間水	自由水
	Tightly bound water/ Non-freezing bound water	Loosely bound water/ Freezing bound water/ Intermediate water	Scarcely bound water/ Freezing water/ Free water
天然高分子 (タンパク質、糖類、核酸など)	○	○	○
合成高分子	生体親和性あり	○	○
	生体親和性なし	○	○
温度変化による 相転移特性	0℃以下で 凍結しない	0℃以下で 凍結する	0℃で 融解する
固体NMR 測定による 水分子の緩和時間 τ_2 (s)	$10^8 \sim 10^6$	$10^{10} \sim 10^9$	$10^{12} \sim 10^{11}$
ATR-IR測定による 水分子のOH伸縮振動 (cm ⁻¹)	3600	3400	3200
高分子鎖への結合力	強	中	弱

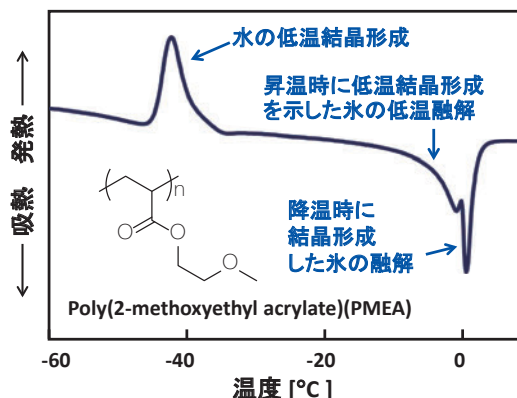


図3 飽和含水状態のPMEAのDSC昇温カーブ

着した水の構造が明らかになっている²⁾。赤外スペクトルは水素結合による水の構造を反映してその形が変わるので、得られたスペクトル形状から吸着した水の構造を分子レベルで予測することができる。生体親和性材料の飽和含水状態を示す水の吸着後期では、バルク水と類似した水素結合構造をもつ水が吸着していた。また、吸着中期では、自由水ほど大きなクラスターではないが、不凍水ほど孤立していない中間的な大きさの水和構造が示された。

固体NMRの温度可変測定の結果²⁾、含水した生体親和性高分子のDSC測定により観測された低温結晶形成を示す中間水が検出された。この水は、分子運動性が高いことがわかった。一方、生体親和性に劣る高分子材料に吸着した水の分子運動性は、含水率や温度に依存して大きく変化し、含水率が低く、測定温度が低いほど吸着水の分子運動性が低いことがわかった。また、水の分子運動性を支配する駆動力の一つは高分子の主鎖と側鎖の分子運動であり、これに吸着した水は高分子との協同運動をしていると考えられる。すなわち、生体親和性発現には高分子の主鎖と側鎖そのものの運動性も大きくかかわっていることが示唆された。

NMR、IR、SFG、表面自由エネルギーなどの測定の結果、(1) 高い分子運動性を有する高分子鎖に弱く束縛され、低温下でも分子運動性の高い中間水の存在、(2) 中間水は自由水と不凍水の間のものである、(3) 中間水は高分子表面にも安定に存在することが示された。つまり、中間水は、生体親和性を有する合成高分子と天然高分子に共通して観測される、自由水と不凍水の間のものであると定義できる。

原子間力顕微鏡 (AFM) 探針にタンパク質を固定し、高分子との相互作用を検討した結果、生体親和性高分子とタンパク質の相互作用が小さいことが明らかになった。高分子-タンパク質間に作用する接着力の測定をさまざまなpH、イオン濃度の溶液条件で行ったところ、高分子-タンパク質間の弱い相互作用は、疎水性相互作用・親水性相互作用、水素結合や静電的相互作用では説明できず、高分子およびタンパク質表面の中間水が物理的

なバリアーとして重要な役割を果たしていることが示唆された^{1),2)}。なお、生理環境下において、高分子表面での中間水の存在は、各種表面・界面解析・計算によって示されている^{1),2)}。

以上の結果より、これまで報告されてきた各種物性では説明がつかなかった生体親和性のより上位の指標として、中間水が位置づけられる可能性が考えられる。

5. 中間水を有する高分子

上述のような特徴を有する中間水は、以下に示す高分子に共通して観測された(表1)。

天然高分子としては、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリンなどの多糖、ゼラチン、アルブミン、チトクロームCなどのタンパク質、デオキシリボ核酸、リボ核酸などの核酸などに観測されている。

合成高分子としては、PEG、PVP、PMEA、ポリメチルビニルエーテル、ポリテトラヒドロフルフリルアクリレート、図2に示した両性イオン型高分子などに共通して観測された。一方、生体親和性が劣る高分子には、親水性、疎水性にかかわらず中間水は認められなかった。また、中間水が形成されるためには、含水状態でのガラス転移温度、水和力、分子運動性の組み合わせが重要であることがわかった。中間水は、天然高分子と生体親和性合成高分子の共通点であることから、優れた高分子材料の簡便なスクリーニング方法としても有用である。

共重合体の場合、水のプライミング効果により最表面とバルク物性が大きく異なるケースに注意が必要であるが、HEMAをベースとするアミン系モノマーとの共重合体および長崎らにより合成されたHEMAグラフト共重合体²⁾にも中間水が観測され、HEMAホモポリマーに比べて優れた血液適合性を示した。これは、少量のアミンや高分子鎖の分子運動性により、不凍水を形成している水素結合が破壊され、中間水が形成されやすくなったためと考えられる²⁾。

最近、水と高分子の界面の分子構造と配向を解析できるSFG装置が開発されつつあるので、バイオ界面の水の配向構造の解析への期待が高まっている²⁰⁾。

6. 材料の中間水量と細胞選別

超早期診断用ヘルスケアセンサの実現のためには、生体接触面での炎症の回避やシグナル/ノイズ(S/N)比の向上が必要不可欠である。このS/N比向上のためには、目的以外のタンパク質の基板への吸着、構造変化および目的以外の細胞の接着を抑制する必要がある。

これまでに知られている生体親和性材料の中でもとりわけ血液適合性高分子は、タンパク質の吸着・変性や細胞接着が引き起こされない性質を示すもので

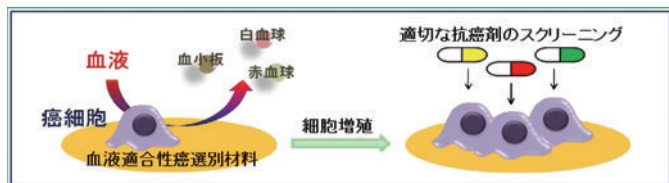


図4 血液適合性と癌細胞接着性を併せもつ高分子材料による早期癌診断・薬剤スクリーニングシステム

あった。PMEA およびその類似体は、血球細胞は接着しないが、癌細胞は接着する現象が見いだされた²¹⁾ (図4)。高分子材料に吸着するタンパク質の量および細胞接着を誘起する構造変化が、血球細胞が接着するためのリガンドであるフィブリノーゲンと癌細胞が接着するためのフィブロネクチンでは異なることが機構の一つであることがわかった²¹⁾。さらに、高分子へのタンパク質の吸着とそれにともなう構造変化は、中間水の量によって制御できることが見出された。この中間水の量は、高分子側鎖の化学構造および側鎖間隔²²⁾により制御できることが明らかにされている。

近年、国民の2人に1人が罹患する癌の早期診断技術として、血中循環癌細胞 (CTC) が注目されている。これまでに検討されてきたCTCの検出方法としては、上皮細胞接着分子 (EpCAM) に対する抗体を用いた方法が知られている²³⁾。しかし、EpCAMを喪失した癌細胞が多く、すべての種類のCTCが検出できない問題がある。また、CTCを生体外で増殖後に、抗癌剤の評価を行う場合、抗体との反応により、細胞の薬剤への応答が変化することが問題となっている。これらの課題を克服する手法として、細胞の基材への接着強度の差を利用したハイスループットな細胞選別の可能性が提案されている^{21), 24)}。最近、バイオ界面での現象を光の回折現象をはるかに超える空間分解能を有するハイスループット三次元超解像顕微鏡²⁵⁾が登場しており、含水状態でのバイオナノ空間の高解像解析が進められている。

バイオ界面水：中間水コンセプトによる材料スクリーニング技術は、医療・ヘルスケア分野のみならず、環境・エネルギー分野における汚れの付着防止技術、安全な抗菌性・抗感染性材料の設計²⁶⁾にもつながる可能性が考えられる。

7. おわりに

以上本稿では、生体親和性材料に形成される水和状態に着目したスクリーニングの例などを紹介した。優れた材料に普遍的な特徴を明らかにするためには、理論科学と実験科学を有機的につなぐ必要がある。最後に、文部科学省学術調査官の立場からの宣伝として、高分子材料に関する最近の文部科学省新学術領域には、ソフト界面 (前田瑞夫領域代表H20～H24)、融合マテリアル (加藤隆史領域代表H22～H26)、ナノメディシン分子科学 (石原一彦領域代表H23～H27)、元素ブロック (中條善

樹領域代表H24～H28)、生物規範工学 (下村政嗣領域代表H24～H28)、柔らかな分子系 (田原太平領域代表H26～H30) など、いずれの領域に関しても、材料設計に関する新しい学理の追及が行われている。材料開発における上位パラメーターに関して基礎研究が進むことにより、わが国のものづくりへの波及効果が期待できる。

文 献

- 1) a) “生体適合性制御と要求特性掌握から実践する高分子バイオマテリアルの設計・開発戦略”, サイエンス&テクノロジー (2014), b) 田中 賢ら, “バイオマテリアル-生体材料-”, **32** (2), 74 (2014)
- 2) T. Tsuruta, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **21**, 1827 (2010)
- 3) a) M. Tanaka, T. Hayashi, and S. Morita, *Polymer J.*, **45**, 701 (2013), b) K. Haraguchi, K. Kubota, T. Takada, and S. Mahara, *Biomacromolecules*, in press, c) I. Javakhishvili, M. Tanaka, K. Jankova, and S. Hvilsted, *Macromol. Rapid Commun.*, **33**, 319 (2012)
- 4) A. Thomas, S. S. Mueller, and H. Frey, *Biomacromolecules*, in press
- 5) a) T. Xiang, R. Wang, W. Zhao, S. Sun, and C. Zhao, *Langmuir*, in press, b) J. B. Schlenoff, *Langmuir*, in press, c) X. Yu, Z. Liu, J. Janzen, I. Chafeeva, and S. Horte, *et al.*, *Nature Mater.*, **11**, 468 (2012), d) M. C. Sin, Y. M. Sun, and Y. Chang, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6**, 861 (2014)
- 6) Y. Mei, K. Saha, S. R. Bogatyrev, J. Yang, and A. L. Hook, *et al.*, *Nature Mater.*, **9**, 768 (2010)
- 7) a) M. Chaplin, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 861 (2006), b) 上平 恒, “水の分子工学”, 講談社サイエンティフィック (1998), c) パスカル・マントレ, “細胞の中の水”, 東京大学出版会 (2006)
- 8) S. D. Bruck, *J. Biomed. Mater. Res.*, **7**, 387 (1973)
- 9) J. D. Andrade, H. B. Lee, M. S. Jhon, S. W. Kim, and J. B. Hibbs, *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, **19**, 1 (1973)
- 10) B. D. Ratner, A. S. Hoffman, S. R. Hanson, L. A. Harker, and J. D. Whiffen, *J. Polym. Sci.*, **66**, 363 (1979)
- 11) N. A. Yamada, K. Ishikiriyama, M. Todoki, and H. Tanzawa, *J. Appl. Polym. Sci.*, **39**, 2443 (1990)
- 12) D. R. Lu, S. J. Lee, and K. Park, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **2**, 127 (1991)
- 13) J. Israelachvili and H. Wennerstrom, *Nature*, **379**, 219 (1996)
- 14) K. Feldman, G. Hahner, N. D. Spencer, P. Harder, and M. Grunze, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10134 (1999)
- 15) K. Kataoka, H. Ito, H. Amano, Y. Nagasaki, and M. Kato, *et al.*, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **9**, 111 (1998)
- 16) K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki, and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 323 (1998)
- 17) T. Morisaku, J. Watanabe, T. Konno, M. Takai, and K. Ishihara, *Polymer*, **49**, 4652 (2008)
- 18) J.-H. Seo and N. Yui, *Biomaterials*, **34**, 55 (2013)
- 19) a) T. Hatakeyama, A. Kishi, and M. Tanaka, *Thermochim Acta*, **532**, 159 (2012), b) T. Hatakeyama, M. Tanaka, and H. Hatakeyama, *Acta Biomaterialia*, **6**, 2077 (2010)
- 20) a) H. Kitano, *Polymer Preprints, Japan*, **63**, 27 (2014), b) S. Nihonyanagi, T. Ishiyama, T. Lee, S. Yamaguchi, and M. Bonn, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 16875 (2011)
- 21) a) T. Hoshiba, M. Nikaido, and M. Tanaka, *Adv. Healthcare Mater.*, **3**, 775 (2014), b) 田中 賢ら, 特開2012-105579 他
- 22) a) S. Kobayashi, L. M. Pitet, and M. A. Hillmyer, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 5794 (2011), b) 田中 賢ら, 特開2014-105221 他
- 23) a) H. J. Yoon, M. Kozminsky, and S. Nagrath, *ACS Nano*, **8**, 1995 (2014), b) H. Wang, G. Yue, C. Dong, F. Wu, and J. Wei, *et al.*, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6**, 4550 (2014)
- 24) a) A. Singh, *et al.*, *Nature Methods*, **10**, 438 (2013), b) A. D. Celiz, *et al.*, *Biomater. Sci.*, in press
- 25) a) S. J. Holdena, T. Pengoa, K. L. Meiboma, and C. F. Fernandezb, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, in press, b) J. Lippincott-Schwartz, *et al.*, *Science*, **343**, 653 (2014)
- 26) a) K. Fukushima, *et al.*, *Nature Commun.*, **4**, 2861 (2014), b) 福島和樹ら, 特願2014-097237 他