ペギュレーションの新展開

PEGylation and Its Biomedical and Biotechnical Applications

恵本和法 東京理科大学基礎工学部
Kazunori EMOTO

ポリエチレングリコール (PEG) は半世紀の歴史をもつ高分子である。ワインにでも混ぜた
ら中毒にでもなりそうな響きの高分子である。ところが、タンパク質や細胞そして生物に
対して特異な応答を示すことから、ここ最近生体適合性高分子としてブームを呼んでい
る。PEG にはどのような性質があり、どのような利用がなされているのだろうか。

①——はじめに

昨年(1997)の4月サンフランシスコで行われたアメリカ化
学会 (ACS) 春期大会で、ポリマー部門にポリエチレング
リコール (PEG) のセッションが3日間にわたって開催
された。PEG あるいは PEO (ポリエチレンオキシド)、
ポリオキシエチレンと呼ばれる高分子は、合成されてか
らすでに半世紀が経過し、粘土、金属や酸化物などの無
機コロイドの分散や凝集など工業的に使用されてきた。
ところが、20年前から PEG のもつ特異な性質が生化学
の分野に応用され始め、今日ではさまざまなバイオの分
野で幅広く利用され、特にここ最近では、PEGylation
とか PEGnology など PEG にまつわる単語まで登場し
ている。ペギュレーションはおもにタンパク質の修飾に
使われる表現であるが、ここでは PEG の性質や応用に
ついて、なるべく最近の論文や発表から抜粋して記述し
てみる。

②——PEG の物理化学的性質

PEG はたいていの場合、アニオン重合によって合成
され、分散度は1に近い。分子量は数百から数百万のも
のが製造されているが、バイオ関連への応用では数百か
ら約2万までのものが多く用いられている。PEG は生
理活性温度領域で水に可溶性で、分子量によって差はあ
るものの上限臨界溶液温度は約 -5°C 、また下限臨界溶
液温度は約 100°C である¹⁾。PEG はポリエーテル系の高
分子で主鎖の酸素原子の対電子によって1モノマーユ
ニットにつき6つの水分子が吸着している²⁾。また水溶
液中では、C-O 結合に関して *trans*、C-C 結合に関して
は *gauche* をとり、分子全体としては極性が高くなるら
せん構造をとる³⁾。このような構造をとることができる
のは、水分子との相互作用や分子構造との兼ね合いによ

るためであり、ポリエーテルの中では PEG だけである。
また、極性の高い溶媒だけでなく、ベンゼン、トルエン、
クロロホルム、エタノールなど多くの有機溶媒にも可溶
である。しかし、ポリエーテルであるにもかかわらず、
構造のよく似たエーテルやエチレングリコールには不溶
である。この特異な溶解性は、PEG 誘導体の合成に非常
に都合が良い。PEG 誘導体はベンゼンや THF などの有
機溶媒中で合成され、エーテルなどの非溶媒中で沈殿さ
せて分離する。また、ベンゼン-水系では水中に、メチレ
ンクロリド-水系ではメチレンクロリド中に抽出される。
この性質を利用して、誘導体と残留物や副生成物の分離
を行うことができる。PEG 中の酸素原子は、水分子と水
素結合するだけではなく、主鎖の酸素原子の対電子によ
り電子欠乏性の金属イオンや原子を取り巻いて、クラウ
ンエーテルのような構造をとる⁴⁾。PEG は両親媒性なの
で、PEG に取り囲まれた金属イオンや原子は有機溶媒
にも可溶となる。この性質を利用して PEG を相間移転
触媒として利用することができる。たとえば、KOH や
 K_2MnO_4 などは、脱離反応や酸化還元反応など有機反応
において重要な役割をするが、有機溶媒に不溶か良くて
も難溶であるため、反応速度が遅い⁴⁾。PEG 中でこのよ
うな金属化合物の錯体を形成すると、PEG-金属錯体は
さまざまな有機溶媒に可溶になり、反応を促進すること
ができる。また、錯体の形成は PEG のイオン伝導体と
しての性質にも関与している。

PEG は水中で、速い動き、高い排除体積を示す。他の
水溶性の高分子と違って、PEG には側鎖がないため、柔
軟度が高い。この高い柔軟性、構造の自由度が水中にお
ける高い排除体積に関与し、タンパク質や他の水溶性高
分子を退ける性質につながっている。

このような性質に加えて、産学官をあげて活発に研究
されているのは毒性がまったくといってよいほどないこ

とであろう。PEG は化粧品や洗顔料等のデイケア製品の成分として使用されているだけでなく、Food and Drug Administration (FDA) で認可されていることから薬品の成分としても使用されている。フリーの PEG は体内にはいっても免疫反応、アレルギー反応をひき起こすことなく腎臓を通して体外に排出される。

PEG は両末端が OH 基のもの、もしくは一方の末端がメトキシ、他の末端が OH 基のものが一般的に販売されている。これらの PEG の OH 基をさまざまな官能基に置換してペグレーションが行われる。両末端が OH 基の場合、同質や異質な PEG 誘導体が合成される。異質官能基の付いた PEG は反応性の違う二つの官能基をもつため、タンパク質と官能基のある表面や蛍光分子や脂質などの小さな分子に結合させるのに都合が良い。ただし、両末端の OH 基を置換すると、反応に手間がかかる、収率が低いなどの問題がある。そこで最近、合成の開始反応および終止反応に官能基を導入する方法が報告され、合成後の誘導反応の手間が省けること、収率が高いことから評価を受けている⁹⁾。またリニアなものほかに、ひとつの誘導体から複数の PEG がでているもの、高分子鎖にグラフトされたもの、コアから多数の高分子が放射状にでているスターポリマーなどもペグレーションに利用されている。

③—タンパク質のペグレーション

今日タンパク質を利用した技術が数多くある。たとえばバイオリアクタやバイオセンサでは酵素や抗原、抗体をマトリックスに閉じ込めたりあるいは表面に固定化してタンパク質の活性を利用している。また、化学療法としてタンパク質を使用したタンパク療法などもある。このようなタンパク質の利用で固定化されたタンパク質がその活性を失ったり、また体内に注入された場合、免疫反応やアレルギーをひき起こすなどの毒性を示したり、高価なタンパク質が体内から短時間で排出されるため多量の投与を強いられることなどが問題となる。これらは、(1) タンパク質を固定化するとマトリックスや表面と疎水性効果や静電作用等によってタンパク質やペプチドの 2 次元構造 3 次元構造が変わる、(2) タンパク質表面にある水分子が奪われる、(3) 薬物として使用するタンパク質は人体以外で精製されることが多いため体内で免疫がつくられる、(4) タンパク質のサイズが小さいため腎臓でクリアされる、等が原因する。このような問題は、PEG を修飾することにより解決することができる。

水溶性高分子がタンパク質にグラフトされると、そのサイズは 2, 3 倍となり腎臓でのクリアランスは阻害され、循環時間は増加する。また、体外でつくられたタンパク質 (たとえば、仔ウシや *E. coli*) でも PEG の立体障

害効果で抗原-抗体反応が起こりにくく、アレルギー反応も抑制される。このような性質を利用して、プロテインドラッグの開発が進められている。最初に FDA に認可されたのは、先天性の免疫症候群の一つである Severe Combined Immuno Deficiency の治療薬で PEG で修飾されたアデノシンデアミナーゼ (PEG-ADA) でそれに引き続き、PEG-アスパラギナーゼ、PEG-スーパーオキシドジスムターゼ、PEG-カタラーゼ、PEG-アルカリホスファターゼなどがある。また、PEG で修飾したタンパク質は物理的、化学的条件に対して安定となる。例えば、PEG で修飾された西洋ワサibel オキシダーゼ (HRP) は未修飾の酵素が活性を失う高温 (~70°C) や pH 領域においても、常温時に近い活性を示す⁹⁾。また、アルコールやさらに極性の低い有機溶媒中ではほとんどの酵素は活性を失うが、PEG で修飾されたタンパク質は活性を保つ⁹⁾。また、極性の低い溶媒中では、タンパク質は凝集を起こしてしまうが PEG を修飾することによって、有機溶媒中でも分散状態を保ち活性を維持する。これらのペグレーションによるタンパク質の物理的・化学的安定性の向上、有機溶媒中での溶解度の増加は、バイオテクノロジーやバイオエンジニアリングにおいて有益である。

PEG で修飾されたタンパク質は、タンパク質に付加された PEG の数、分子量、誘導体によって変わってくる。ほとんどの場合 NHS エステルで修飾された PEG とタンパク質の Lys との反応で、塩基であるアミノ基はペグレーションによって中性のアミド基になり、タンパク質の電荷が変化する。またタンパク質の疎水性のドメインは、ペグレーションによって親水化したり、活性部位にある Lys と PEG とが結合して活性が著しく低下したり逆に増加したりする。タンパク質の修飾は、このような要素を考慮して誘導体や分子量の選択、PEG の修飾の位置や付加数のコントロールが必要である。特異的な修飾、また単量体、二量体、三量体等の振分けが重要になってくる。タンパク質の修飾は主として NHS エステルやエポキシドなど求電子的な PEG 誘導体と求核的な Lys との反応が主体である。Lys はその周囲の極性や立体障害などの影響により位置によって反応性が違ってくる。また、求電子基も加水分解による半減率が変わってくる。よって、PEG 誘導体の選択とタンパク質の割合を調整することによってある程度の特異性をもたせることが可能である。また、DNA 組み換え法を利用して、Lys の数を調整したタンパク質を合成し、これに PEG を修飾することもできる。しかし、このような求電子基は Cys (SH 基) や Ser (OH 基) とも反応するため特異性は低い。さらに特異性を高くし、タンパク質の活性の低下を抑制する方法としてビニルスルホン

でタンパク質の Cys と反応させるものもある。Cys はタンパク質の活性に関与する割合が低いことから、この誘導体の使用は効果的である。修飾に利用できる (S-S 結合に関わらない) Cys のない場合は、DNA 組み換え法によって N 末端に Cys を導入し、これとビニルスルホンとを反応させることも可能である。ただし反応条件によっては S-S 結合の還元が起これ、これとビニルスルホンとが反応することを考慮しなければならない。これらの方法で修飾したタンパク質は、さらに PEG のグラフト量によって分離する必要がある。前述したように、ペグレートされたタンパク質は、その修飾度合によって表面電荷や親水性の度合が違ってくる。この性質を利用したクロマトグラフィにより分離することが可能である。また PEG で修飾されたタンパク質は PEG に対する親和性が高くなることから PEG/デキストランによる phase partitioning による分離も行われている⁷⁾。これらの方法でペグレート、分離精製されたタンパク質は、電気泳動、HPLC、MALDI-TOF、アミノ酸配列分析などで分析されている⁸⁾。

④——薬物キャリアとしての PEG-リポソームおよびミセル

リポソームはその大きさが数十 nm で細胞膜を容易に透過できることから水溶液に不溶な薬物をターゲットでかつコントロールに運ぶキャリアとして研究が行われてきた。しかし、*in vivo* では腎臓からの排出や網内皮細胞による攻撃などによって循環時間が短いことがその発展を妨げてきた。水溶性高分子をリポソームやベシクルの表面にグラフトすると、その循環時間は増加することから、PEG-リポドをグラフトしかつその内部に抗がん剤等を導入した研究が盛んに行われている。がん細胞を植え付けたマウスに抗がん剤を挿入したリポソームを注入すると PEG のないものはがん細胞の発育が進んだが、PEG がグラフトされたものは大幅な発育の抑制さらには縮小がみられる。また、PEG の自由末端に抗体やそのフラグメント、オリゴ糖などのリガンドを導入することで生体内で活性なりポソームをつくることができる。肺の内皮細胞に対する抗体やそのフラグメントを導入したリポソームをマウスに注入すると、脂質に直接導入したものに比べて肺への集積が高い⁹⁾。PEG-リポソームは長い循環時間をもち、薬物の投与を少量かつ効果的になるだけでなく、PEG 末端にリガンドを導入することにより特異的に薬物を運ぶことが可能である。脂質だけでなく、ブロックポリマーも薬物のキャリアとして働く。PEG と水に不溶な高分子とのブロックポリマーは水中で疎水性セグメントの疎水性効果による凝集力と水溶性高分子の水中での浸透圧とのバランスによっ

てミセルを形成する。ミセルの疎水性コアに薬物を導入もしくは会合させてキャリアとすることが可能である。PEG ミセルもリポソームと同様に血液中の循環時間も長くなりがん細胞に対して高い集積を示す。PEG-ポリアスパラギン酸 (PAsp) の PAsp 側末端にドキソルビシンを固定化してできたミセルはがん細胞への集積が筋細胞に対して 50 倍にもなる。未処理のドキソルビシンの場合は約 1.5 倍である¹⁰⁾。

PEG 等の水溶性高分子を導入するとリポソームの安定性が増すのは、立体障害によるリポソームとプラズマ中の粒子との相互作用の減少とプラズマタンパクの吸着の減少に起因すると考えられている^{11), 12)}。リポソームと他のコロイド粒子とは、相互作用による凝集沈殿が起こる。コロイド粒子のまわりに水溶性高分子が高い密度で吸着していると粒子どうしの凝集が起こりにくくなることと同様に、脂質でできたベシクルに水溶性高分子がグラフトされていると立体障害により、ベシクルどうしまたはベシクルと他のコロイド粒子とが凝集を起こすことが妨げられる。この現象は、microtiter technique や表面間力によって確認されている¹²⁾。また、プラズマ中のタンパク質の吸着によってリポソームのクリアランスも起こると考えられているが、後述の表面への PEG のグラフトと同様に立体障害や浸透圧によって抑えられる。ただし、PEG の導入によって水/空気界面においてリポソームが壊れやすくなること、機械的強度は PEG の有無によって変化がないことが報告されておりリポソームの形状の安定性は変化しないか逆に低下しているようである¹¹⁾。

PEG-リポソームは、安定に薬物を体内の目的地に効率良くかつ安定に運ぶキャリアとして研究がすすめられているが、制御リリースには循環時間や薬物のリークのコントロールが重要となってくる。特に血中では、プラズマタンパクの吸着などのほかに毛細管内を通るときにかかるストレス等機械的な影響も重要になってくる。コレステロールやリポドの配合の調整と、その機械特性や物質の透過性などの研究も進められている。

⑤——表面のペグレーション

物質表面と生態系の非特異的な相互作用は、医療や分析、生化学工業などにおいて悪影響を及ぼす。非特異的に吸着したタンパク質や細胞は血液凝集をひき起こし、人工臓器の欠陥の原因となりうる。また、ELISA など免疫測定法、キャピラリー電気泳動やクロマトグラフィなどの分析法において、非特異的に吸着した生体分子は、分解能の低下を起こしてしまう。このような、吸着を防ぐために中性の水溶性高分子の表面コーティングが行われている。デキストランやポリアクリルアミド等がその

例であるが、タンパク吸着の抑制効果はPEGが最も高いといわれている。PEGのタンパク吸着の抑制はNagaokaらによって最初に発表された¹³⁾。水溶性高分子を表面にコートすることにより、物質表面の親水性は向上し表面電荷も抑えられる。また、表面コートされた高分子上にタンパク質が吸着することによって、高分子は水との相互作用が減少することからエンタルピーが増加し、吸着により立体構造の自由度の減少および浸透圧の増加によりエントロピーが減少する¹⁴⁾。また最近の論文では、タンパク質の吸着はPEGのまわりの環境を疎水性に変えるものであり、PEGを極性の高い構造から極性の低い構造に変化させる活性化エネルギーが非常に高いことがPEGのタンパク吸着の抑制の原因との見方もある¹⁵⁾。

タンパク質の吸着を防止するPEGコーティングは、バイオマテリアルやさまざまな生化学分析へ応用されている。インプラントにプラズマタンパク(おもにフィブリノーゲン)が吸着すると、それが引き金となって細胞(血小板)が吸着し、これが原因して血栓が起こる。また、表面と相互作用を起こしたタンパク質はその2次構造、3次構造を変化させ、その機能を失う。ガラスやプラスチックの表面にさまざまな形でPEGをコートすることで、プラズマタンパク、血小板やトロンビンなどの細胞の吸着が妨げられる報告が数多く報告されている。ただし、実験によっては、PEGコーティングの効果が見られないというものもある。またPEGをコートした生体材料を体内に入れると、Fgnの消費が確認されている。PEGの分子量や表面密度はもちろんだが、サンプルの保存法や取り扱いの違いなどが影響を及ぼしているものと考えられる。さらに十分な表面の解析、および表面と生体の相互作用のメカニズムの解明を進めていく必要がある。

PEGコーティングは、生化学分析にも応用される。キャピラリー電気泳動では、毛管の表面電荷が引き起こす電気浸透や表面と試料との相互作用により分解能が低下する。毛管表面にPEGをコートすると表面電荷は減少し、タンパク質の吸着も減少するので高い分解能を示す¹⁶⁾。また、シランによってアミノ化したガラス表面に末端にエポキシドをもつPEGをグラフトすると、pH2から11までの領域で低い電気浸透を示すとともに、常温下pH11で3週間保存していても低い電気浸透は保たれている¹⁷⁾。このようなコーティングは、クロマトグラフィや体内で用いるイオン電極の表面修飾などにも応用できる¹⁸⁾。またPEGで覆われた表面は、非特異的なタンパク質の吸着が抑制され、また固定化されたタンパク質は表面からの影響を受けにくいのでその活性を維持する。グラフトしたPEGの末端にタンパク質やペプチド、多糖類やオリゴ糖などのリガンドやイオンコンプレック

スなどを導入して、免疫測定法など表面でタンパク質の分析や、固定化酵素によるセンサ、化学療法の装置、ペプチド合成等の研究が行われている^{19)~22)}。

⑥—おわりに

ここで紹介できたベギュレーションはごく代表的なものにすぎない。その他、PEGを利用したヒドロゲルやハイブリッドポリマーなどの研究も数多くある。ただし、生体適合性高分子で問題になるのは*in vitro*と*in vivo*とでは結果が異なってくる、またさまざま複雑な反応があるために思わぬ結果を招きかねないことである。このようにPEGで修飾された物質は、物理化学的な特性を明確にすること、さらには生体で起こる反応のメカニズムを明解にすることが必要である。

文 献

- 1) F. E. Jr. Bailly, R. W. Callard: *J. Appl. Polym. Sci.*, **1**, 56 (1959)
- 2) K. P. Antonsen, A. S. Hoffman, in *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris (Ed.): Plenum, New York (1992), p. 15
- 3) G. Karlström: *J. Phys. Chem.*, **89**, 4962 (1985)
- 4) J. M. Harris, in *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris (Ed.): Plenum, New York (1992), p. 1
- 5) Y. Nagasaki, et al.: *Bioconjugate Chem.*, **6**, 702 (1995)
- 6) M. Laliberté, et al.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **20**, 397 (1994)
- 7) J. M. Van Alstine, M. Malmsten: *Langmuir*, **13**, 4044 (1997)
- 8) J. Bullock, et al.: *Anal. Chem.*, **68**, 3258 (1996)
- 9) K. Maruyama, et al.: *Polymer Preprints*, **38**(1), 541 (1997)
- 10) K. Kataoka, in *Controlled Drug Delivery: Challenges and Strategies*, K. Park (Ed.): American Chemical Society, Washington D.C. (1997), p. 49
- 11) D. Polo, et al.: *Langmuir*, **13**, 3953 (1997)
- 12) D. Needham, et al.: *J. Liposome Res.*, **2**, 411 (1992)
- 13) Y. Mori, et al.: *Trans. Am. Soc. Artif. Internal. Organs*, **28**, 459 (1982)
- 14) J. D. Andrade, et al., in *Hydrophilic Polymers: Performance with Environmental Acceptance*, J. E. Glass (Ed.), American Chemical Society, Washington D.C. (1996), p. 51
- 15) S. R. Sheth, et al.: *Prod. Sci. USA*, **94**, 8399 (1997)
- 16) K. O'Neill, et al.: *Anal. Biochem.*, **222**, 185 (1994)
- 17) K. Emoto, et al.: *Langmuir*, **1997**, submitted
- 18) C. Espadas-Torre, M. Meyerhoff: *Anal. Chem.*, **67**, 3108 (1995)
- 19) S.-C. Huang, et al.: *Langmuir*, **12**, 4292 (1996)
- 20) G. B. Sigal, et al.: *Anal. Chem.*, **68**, 490 (1996)
- 21) K. Holmberg, et al.: in *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris (Ed.): Plenum, New York (1992), p. 303
- 22) E. Bayer, W. Rapp: in *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J. M. Harris (Ed.): Plenum, New York (1992), p. 325

恵本和法 東京理科大学基礎工学部材料工学科(278-0022 野田市山崎2641) 博士研究員, Ph. D.
1986年筑波大学第三学群基礎工学類卒, 1986年チタン工業(株)入社, 1992年退社, 1997年米国アラバマ大学にてPh. D.取得, 同年より現職。専門は高分子および表面科学。〈趣味〉スポーツ, 音楽鑑賞, 旅行。