〔総 合 論 文〕

リン脂質極性基を基盤としたバイオ界面の設計と
バイオ機能解析

渡邊 順司

(受付 2006 年 4 月 3 日・審査終了 2006 年 5 月 30 日)

要 旨 生体膜はリン脂質分子を高度に配向・集積させることによって、膜の内外を隔離し恒常性を維持し続けている。この中で、外界の環境変化に関する情報を迅速かつ高効率に伝達できる高度なシステムが成立している。このようなリン脂質分子は極性の低いアルキル鎖と極性の高いヘッドグループから構成されている。本報では、極性基に着目してマテリアル界面に高度に濃縮配向させることにより、新規のバイオ界面を構築して培養細胞の安全性と培養液および細胞の浸潤性に優れた足場材料の創製を行った。得られた足場材料の界面は水環境下にて瞬時に極性の高いホスホリルコリン基が分子の再配列によって濃縮してくるのを見いだした。この材料では、培養液が接触した界面が直ちに高親水性表面に変化するため、数分以内に浸透することも見いだした。また、このバイオ界面をナノ粒子に展開させて分散安定性に優れたナノ粒子を創製し、酵素の固定化による連続酵素反応系を構築した。ナノ粒子表面にリン脂質極性基が高度に配向し、かつ粒子 1 mg あたり 1 nmol のバイオ分子の固定化部位を導入することが可能であった。この粒子に固定化されたバイオ分子は連続的な酵素反応解析結果からバイオ分子どうしが協同的に作用することを明らかにした。その一方で、固定化されたバイオ分子は分子間での凝集が抑制されるとともに高次構造の維持によって 2 週間にわたって 80% 以上の残存酵素活性を維持していることも明らかにした。これら細胞やバイオ分子を対象とした材料設計には、リン脂質極性基を基盤とした界面構築が不可欠であると考えられた。

1 はじめに

バイオマテリアルは生体の内外を問わず水媒体と接触するような環境下で使用される。そのためポリマーを基盤とした材料設計において、生体成分と接触する界面の作り込みが必然的に重要となってくる。極論すればバルクの材料によらず界面の性質によってのみタンパク質や細胞との相互作用が規定されているといえる。しかしながら単に生体を模倣(バイオミメティック)した環境を調えるだけであれば、リン脂質分子を自己組織化させて界面を構築するという研究の流れになる。これまでにリン脂質分子の Langmuir-Blodgett (LB) 膜の調製や金基板上にアルカンチオールを固定化し、その末端基を化学修飾することによりバイオミメティックな環境を構築する研究が数多くなされてきた^{1),2)}。この中で生体内に類似した環境の構築とバイオ反応の解析ツールとしての機能解析に関して報告がなされてきている。しかしこのようなバイオミメティックな考え方だけでは生命活動やバイオ反応を静的な反応場としてとらえているため、一つのモデルケースを観察しているに過ぎなかった。一方で、実際の生体は多種多様な成分・要素が混在し、協同的な

ネットワーク関係を成立させて構成されている。これらは極めて複雑かつ動的な環境であるため、界面の安定性とはもとよりマテリアルとしての汎用性・拡張性の観点を材料設計思想に付与しなければ、高分子科学を基盤とした基礎研究が医療現場を支える医療機器開発のような応用研究にまで展開できない。このため生体内環境を構成している要素一つひとつをいったん抽出して組み立てるバイオインスパイアードの発想をもとにしたバイオマテリアル設計が不可欠であり、さらに材料を構成するバルクとの統合(バイオインテグレーション)によってデバイスとして作り込まれたバイオ界面が必要とされる。本報では、このようなバイオインスパイアードによる考え

渡邊順司(WATANABE, Junji) 大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻・特任助教授(☎565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1) 平成 5 年 3 月大阪府立大学工学部卒業、平成 7 年 3 月大阪府立大学大学院工学研究科博士前期課程修了、平成 7 年 4 月グンゼ株式会社アパレル事業本部入社、平成 9 年 3 月同社退社、平成 9 年 4 月北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科研究生、平成 12 年 6 月北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科博士後期課程修了(博士(材料科学))、平成 12 年 7 月東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻助手、平成 17 年 5 月大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻特任助教授、現在に至る

Figure 1. Schematic illustration of fundamental biointegration process via bioinspired approach.

Figure 2. Schematic illustration of fundamental biointegration process via bioinspired approach: (a) biointegration with polymer backbone and their dissociation, (b) biointegration with nanoparticle, and (c) sequential enzymatic reaction.

方をもとにバイオマテリアルとインテグレートすることによってバイオデバイスに実装された新たなバイオ界面をバイオマテリアル設計の新潮流として提唱し、その設計概念から再生医療用の細胞の足場(スキャホールド)やバイオ反応ナノ粒子におけるバイオ機能解析を取り上げる。

第2章では、リン脂質極性基を基盤としたバイオ界面の設計概念と特徴について報告する。

第3章では、再生医療用のスキャホールドとして重要な細胞浸潤性と細胞接着性に優れたバイオ界面の設計と機能解析について報告する。

第4章では、高効率な連続的酵素反応とバイオ分子の活性を維持できるバイオ反応ナノ粒子の設計について報告する。

2 リン脂質極性基を基盤としたバイオ界面の設計

Figure 1(a)に示すように膜タンパク質や糖タンパク質が貫通したリン脂質二分子膜から構成される生体膜が知られている。このリン脂質分子には、極性の高いヘッドグループが存在しており、その代表として分子内で電荷が中和されているホスホリルコリン基が知られている。この生体膜の構造を単に模倣するのではなく、この

構造の一つの特徴であるリン脂質極性基が高度に集積した界面という構成要素を抽出し、化学的に組み立て直すことがバイオインスパイアードの考え方の基本となっている。このホスホリルコリン基をメタクリル酸の側鎖にエステル結合を介して導入した 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)が中林らによって設計され、細胞との相互作用に関して報告された経緯がある³⁾。その後、石原らによって高純度かつ大量合成ルートが新たに開拓されたことにより⁴⁾、種々のモノマーとの共重合体(リン脂質ポリマー)が系統的に検討されたことから、バイオマテリアルとしての基礎研究ならびに血液適合性材料としての応用研究が本格的に展開し、バイオインスパイアードマテリアルのさきがけ的存在となった^{5)~7)}。リン脂質ポリマーから安定なリン脂質極性基集積界面を構築するためには、基板に対してコーティングもしくはグラフトさせる手法が一般に検討されている。その結果、Figure 1(b)に示すような界面が基材の表面に容易に調製され、リン脂質極性基を基盤とした界面が創製される。最近では、このような界面を巧みに活用した新しい切り口のバイオマテリアル研究が基礎から応用まで幅広く推進され、人工関節やバイオチップなどの先端医療デバイスの表面加工に応用されてきている^{8)~12)}。

このリン脂質極性基が集積した表面の特徴は、非特異的なタンパク質吸着と細胞接着をほぼ完全に抑制することであり、その作用機序は界面付近の水の構造に起因すると報告されている^{13),14)}。また、リン脂質極性基近傍に存在するタンパク質の安定化に寄与することも明らかにされており¹⁵⁾、バイオインスパイアードリン脂質ポリマーの優れた特性を活用した応用研究もすでに始まっている。このような背景のもと、筆者はリン脂質ポリマーを単にバルク材料の表面にコーティングするだけでなく、マテリアルと分子レベルでインテグレートさせ、かつバイオマテリアルとして価値のあるデバイスが創製できないかと検討した。この中で、リン脂質ポリマー鎖間に架橋点となるセグメントを分子設計して導入することで物理的な架橋点を有する再生医療用のスキャホールド(Figure 2(a))を考案した。一方で、リン脂質ポリマーが自発的にバルク材料と相溶し、界面に分配・濃縮される系を活用してナノ粒子を調製し(Figure 2(b))、その表面での連続酵素反応場(Figure 2(c))として展開することを設計した。これらはともに生体膜構造からインスパイアされたリン脂質ポリマーをデバイスとなる基盤材料にインテグレートしたことにより最高の性能が発揮できるように設計されている。第 3 章以降では、その詳細について報告する。

3 細胞と培養液の浸潤に優れた再生医療用スキャホールド

リン脂質極性基を有する基材表面で培養された細胞には、基材から受けた刺激により産生されるストレス性のサイトカイン(インターロイキン- 1β , IL- 1β)の遺伝子発現が既往の細胞培養基材と比較して低いことが見いだされ、報告されるようになってきた¹⁶⁾。この知見は極めて重要な意味を含んでおり、筆者はいち早くこのリン脂質極性基が高度に集積した界面に着目した。ここ数年、ヒトから採取された各種の幹細胞を分化・増殖させるための細胞調製施設(Cell Processing Center, CPC)が国内の大学および研究施設、医療機関に設置され、本格的にヒト細胞試料の製造が始まっており、トランスレーショナルリサーチとよばれる未来医療が確実に進行しつつある。この調製施設では、患者から採取した細胞を厳密な環境のもとで管理され取り扱われており、培養細胞の安全性を担保することが不可欠なものとなっている。この点でリン脂質極性基を基盤としたバイオ界面は、培養後の細胞の安全性が保証できる全く新しい再生医療用マテリアルとして有用な界面を提供すると期待される。しかしながらリン脂質極性基のみで被覆された表面への細胞の接着数は、細胞接着がマテリアル表面へ吸着したタンパク質層を介しているために、非特異的なタンパク質吸着がほぼ完全に抑えられている条件では高くはない。したがって、タンパク質吸着や細胞接着を積極的に促すような分子設計が必要となる。一方で、スキャホールドの内部に効率よく細胞や培養液を浸潤させることが一つの重要課題となっている。たとえば高含水率のヒドロゲルのようなスキャホールドでは内部への浸透性が高いと考えられるが、実際には浸透する前にスキャホールドの表面から大部分の細胞が培養容器に容易に脱落してしまう。一方、乾燥状態で浸透させようとすると、マクロなスポンジ構造を有するスキャホールドは水媒体の表面張力が高いために容易には浸透しない。このため弱く減圧環境にしておいて減圧解除時に強制的に浸透させる手法などが考案されてきているが決定的な解決策とはいえない。このため、培養細胞の安全性と培養液の浸潤性に優れたスキャホールドが創製できれば、未来医療の推進に大きく貢献できる。

そこで MPC と *n*-ブチルメタクリレート(BMA)からなるリン脂質ポリマーに、タンパク質の吸着を促すような疎水性の付与とポリマーマテリアルが生体内にて加水分解を受け、最終的に溶解、排出されることを考慮して、オリゴ乳酸鎖からなるマクロモノマー(OLAMA)を設計し共重合を行った(Figure 3)¹⁷⁾。オリゴ乳酸鎖を有するマクロモノマーは、*n*-ドデシルアルコールのヒドロキシル基から、高真空下、130°C にて環状モノマーであ

Figure 3. Chemical structure of bioinspired polymer.

Table 1. Synthetic results of phospholipid polymers with oligo(lactic acid) segment

	Monomer unit composition (mol%)						Chirality ^{b)}	Yield (%)
	In feed			In polymer ^{a)}				
	MPC	BMA	OLAMA	MPC	BMA	OLAMA		
PMBLLA	5	85	10	16	68	16	L-	55
PMBDLA	5	85	10	16	72	12	D-	69

Preparative condition: [Monomer] = 0.5 mol/L, [AIBN] = 2.5 mmol/L, 60°C, 24 h. ^{a)} Determined by ¹H NMR. ^{b)} Oligo(lactic acid) segment.

る L-ラクチドおよび D-ラクチドを開環重合してオリゴ乳酸を合成後、2-イソシアネートエチルメタクリレートを加付することによりマクロモノマー化した。オリゴ乳酸鎖の重合度は ¹H NMR による解析から 30 と見積もられた。共重合体中の MPC ユニットの 16 mol% 程度であり、オリゴ乳酸の導入率は仕込みの量を変えることにより 10 mol% から 30 mol% 程度まで調整が可能であった。澤田らの報告によると、MPC が 10 mol% の組成であっても、ストレス性のサイトカインの産生がほぼ完全に抑えられると報告している¹⁶⁾。したがって、ここでは 16 mol% の MPC 組成にて調製されたポリマーが細胞への為害性が低く、かつ細胞接着数もある程度確保できると判断し、以後の解析を行った (Table 1)。オリゴ乳酸鎖には光学異性体 (D 体および L 体) が存在し、オリゴ乳酸鎖の間にて特異的に形成されるステレオコンプレックスを利用すると、ポリマー鎖間が物理架橋できると判断し、以後の解析を行った (Table 1)。オリゴ乳酸鎖には光学異性体 (D 体および L 体) が存在し、オリゴ乳酸鎖の間にて特異的に形成されるステレオコンプレックスを利用すると、ポリマー鎖間が物理架橋できると判断し、以後の解析を行った (Table 1)。オリゴ乳酸鎖には光学異性体 (D 体および L 体) が存在し、オリゴ乳酸鎖の間にて特異的に形成されるステレオコンプレックスを利用すると、ポリマー鎖間が物理架橋できると判断し、以後の解析を行った (Table 1)。

得られたポリマーのクロロホルム溶液をポリエチレンテレフタレート (PET) 基材上にディップコーティングすることにより薄膜を調製した。バイオマテリアルは水媒

Table 2. Results of surface elemental analysis by XPS

	Percentage of each element			
	C _{1s}	N _{1s}	O _{1s}	P _{2p}
PMBLLA dry	69.14	0.62	30.11	0.14
PMBLLA wet	68.28	1.88	29.57	0.26
PMBDLA dry	70.67	0.36	28.80	0.16
PMBDLA wet	67.84	0.98	31.06	0.12

体と接触する環境下にて使用されるため、乾燥状態と湿潤状態における親水性および疎水性モノマーユニットの配向性を解析しておく必要がある。一般に高真空化にて測定する解析機器が多いためにバイオマテリアルの表面解析は乾燥状態で検討されることが多い。しかしながら実際に使用される環境を考慮すると、湿潤状態を反映するような工夫が必要となる。たとえば X 線光電子分光法 (XPS) による表面解析を行う場合、材料をいったん湿潤環境下でインキュベートしておいて、直ちに凍結乾燥を行うことで湿潤状態での分子レベルの配向性を凍結して観察することが可能となる。その結果を Table 2 に示す。調製したポリマー中に含まれる窒素原子の源は、リン脂質極性基に含まれている末端のトリメチルアンモニウム基 (N_{1s} の結合エネルギー: 402.0 eV) とオリゴ乳酸セグメントがメタクリル酸ユニットと結合しているスパーサー部分のカルバメート結合 (同 399.6 eV) に存在している。このうち極性が高く、水に対する親和性が高いホスホリルコリン基が乾燥状態と湿潤状態の変化におい

Figure 4. Surface enrichment of phosphorylcholine groups on phospholipid polymer-coated surface.

Figure 5. Change in dynamic contact angle measured at 25°C and 40°C.

てXPSにて検出可能な深さ領域にて分子鎖が反転することが考えられる。そこで、窒素原子と炭素原子の比の値(N/C)をFigure 4に示すように整理すると乾燥状態と湿潤状態でどの程度のホスホリルコリン基が表面近傍に濃縮されたかを推察することが可能となる。その結果、乾燥状態ではN/C値が0.1未満であったのに対して、湿潤状態で凍結乾燥処理を行い界面の分子鎖を凍結して解析した結果ではおよそ3倍程度の高いN/C値が得られた。このことは、湿潤状態においてMPCに含まれているホスホリルコリン基のような親水性ユニットが膜の表面近傍に再配向して濃縮されていることを示していた。

次に別の視点から膜表面の分子運動性を見積もるために動的接触角測定を行い評価した(Figure 5)。動的接触角測定は乾燥状態での表面接触角を反映した前進接触角と湿潤状態での接触角を反映した後退接触角が観察される。これらの接触角の差がヒステリシスとしてその履歴が記録される仕組みになっている。この方法でヒステリシスが大きいほど乾燥状態と湿潤状態における分子の再配列がより活発であることを示している。また、浸漬する超純水を室温と40°Cの条件にて検討した。これは、細胞培養や生体内で使用するバイオマテリアルの使用温度が37°Cであるため体温付近での挙動を解析するためである。はじめに、25°Cの条件下で前進接触角はおよ

Figure 6. Fibroblast cell adhesion on phospholipid polymer surface with enantiomeric oligo(lactic acid) segment.; black bar: 6 h, grey bar: 24 h, and white bar: 48 h. N = 3, mean value and S.D. was indicated.

そ90度、後退接触角はおよそ45度を示していた。ここでは45度のヒステリシスが観察されたことになり、コーティング膜の最表面層のホスホリルコリン基の運動性が極めて高いことが示された。同様の測定を40°Cの条件で行ったところ、前進接触角は25°Cで測定した場合とほとんど変化が見られなかったのに対して、後退接触角は30度程度を示していた。25°Cでの測定よりも大きなヒステリシス(60度)が観察された。このことは、生理的条件に近い温度領域では膜表面の親水性ユニットの再配列がより加速することが明らかとなった。この結果は、ここで使用したポリマーのガラス転移温度が30°C程度であったことから¹⁸⁾、40°Cでの測定条件下で直ちにホスホリルコリン基が表面に濃縮されたためであると結論づけられた。このため、細胞培養条件において培養液や細胞の浸潤性が高いことが期待される。

このようなホスホリルコリン基の表面濃縮挙動は培養細胞の安全性と培養液や細胞の浸潤には極めて効果が高い反面、細胞の接着数の減少が懸念される。そういう事態を回避するために、オリゴ乳酸マクロモノマーを疎水性の付与に誘起された非特異的な細胞接着を促進することを目的として分子設計を行い、導入している。そこで基本的な細胞接着挙動を見積もるために繊維芽細胞(L-929)の接着数を検討した。ウシ胎児血清を10%含む基礎培地を使用し、細胞播種6時間後の初期接着とともに24時間後および48時間後の接着数を比色法により定量した。比較として、再生医療用材料として広く検討されているポリ(乳酸-co-グリコール酸)共重合体(PLGA)を用いた。その結果、細胞の播種密度 4.0×10^3 cells/cm²にて行ったところ、L体およびD体のオリゴ乳酸のセグメントを含むポリマー(PMBLLAとPMBDLA)では、6時間後におよそ 8.0×10^2 cells/cm²、24時間後

Figure 7. Polymer aggregation of phospholipid polymer: (a) in CDCl_3 and (b) in $\text{CDCl}_3 : \text{CD}_3\text{OD} = 1 : 2$.

および 48 時間後ではそれぞれ 3.0×10^3 および 5.0×10^3 cells/cm² となった。この値は比較として用いた PLGA の値と 6 時間後の初期接着数では 2 倍程度の差が見られたものの、24, 48 時間後では大きくは異ならなかった（それぞれ 1.5×10^3 , 3.5×10^3 , 6.0×10^3 cells/cm²）。このことは、細胞接着においてホスホリルコリン基が培養条件のような 37°C にて表面に濃縮するにもかかわらず、オリゴ乳酸セグメントを導入している効果により、非特異的な細胞接着が確保されていたことを示していた。

スキャホールドの分子設計として光学活性なオリゴ乳酸セグメント間でのステレオコンプレックス形成による物理架橋の一つの特徴としている (Figure 2(a))。スキャホールド調製時にオリゴ乳酸セグメントがステレオコンプレックス形成に効果的な配向性を示し、かつ培養液が効果的に浸潤できるようなホスホリルコリン基の配向性を確認するために、調製したポリマーの良溶媒である重クロロホルム中での ¹H NMR 解析を行った (Figure 7(a))。その結果、1.5 ppm 付近に乳酸ユニットのメチル基に帰属されるピークがシャープに見られたのに対して、ホスホリルコリン基中のトリメチルアンモニウム由来のメチル基は 3.3 ppm 付近にブロードなシグナルとして得られた。このことはポリマー鎖が重クロロホルム溶媒中においてホスホリルコリン基を内核に配向した溶存状態であると考えられた¹⁹⁾。この状態ではステレオコンプレックスは形成できると考えられるものの、ホスホリルコリン基が分子レベルで遮へいされた状態におかれているためにスキャホールドの最表面への濃縮が抑制されてしまう可能性がある。そこで、極性の高いホスホリルコリン基に対する溶媒和を促進させるために重クロロホルムに対して 2 当量の重メタノールを添加して同様の ¹H NMR 解析を行った。その結果、乳酸ユニット由来のメチル基のピークはシャープに保ちつつトリメチルアン

モニウム由来のメチル基のピークもシャープに観察されるようになった。これは低極性であった重クロロホルム溶媒が重メタノールの添加により極性が高くなったため、極性基であるホスホリルコリン基の溶媒和が促進し、結果としてポリマー鎖の溶存状態が Figure 7(b) に示すような拡がりをもったためであると考えられた。これらの結果を受けてステレオコンプレックス形成を駆動力としたスキャホールド調製には、クロロホルムとメタノールの混合溶媒系で行うことが重要であると判断した²⁰⁾。

前述の溶媒条件のもと、L 体および D 体のオリゴ乳酸セグメントを有するポリマー溶液 (20 wt%) を調製し、テフロン製の成型器を用いてスキャホールドを調製した。Figure 8(a) に示すように、直径 1.4 cm 高さが 4 mm のスキャホールドが得られた。スキャホールド内部にマクロな孔を作製するために 200 μm の塩化ナトリウムの結晶をクロロホルム-メタノール混合溶媒中に分散後、成形して純水中に浸漬する際に溶出して多孔質構造とした (Figure 8(b))。このマクロな孔とともに、スキャホールドにはミクロな孔が無数に確認され、スキャホールド自体は粒径が数ミクロン程度の粒子が凝集したような構造を有していた。この 10 μm 程度の孔はスキャホールドの表面から中心部に至るまで全体に続いており、いわゆる連通管構造をとっていた。これにより細胞培養液はもとより細胞自身もスキャホールドの表面にとどまらず、内部にまで侵入することが可能と考えられた。

スキャホールド内部への培養液の浸潤性を見積もるために静的接触角測定を活用した表面濡れ性を一つの指標として検討した (Figure 9)。材料表面に滴下した水滴が材料内部に浸透することによって接触角が低角度にシフトする。この角度変化を経時的に追跡することで評価できる。ここではスキャホールドの表面に 10 μL の超純水を滴下し、6 秒ごとに接触角の変化を記録した。その結

Figure 8. SEM picture of scaffold by stereocomplex formation.

Figure 9. Water intrusion property on porous material; stereocomplex: open circle and PLGA: closed circle.

Figure 10. SEM picture of cell invasion into stereocomplex.

果、オリゴL乳酸とオリゴD乳酸のセグメント間でのステレオコンプレックス形成により調製されたスキャホールドでは、滴下後速やかに接触角の低下が見られ、水のような表面張力の高い溶媒が容易に浸透していくことが明らかとなった²¹⁾。一方、多孔質度などすべての調製条件をそろえて調製したPLGAでは、観察していた2分間ではほとんど接触角の変化が見られなかった。このことはスキャホールドの表面に滴下した水滴が全く内部に浸透していかないことを示していた。これまでに多くの研究者によって議論されてきた多孔質構造を有するスキャホールドの内部への培養液の浸潤が難しいことが接触角の時間変化から裏付けられた。

このような高い浸透力により細胞自体も内部に浸潤することが予想される。そこで、スキャホールドの表面に細胞懸濁液 (1.0×10^5 cells/mL) を1 mL滴下して浸透後、5日間培養した後にスキャホールドの内部を走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。その結果、スキャホールドの内部に細胞が浸潤し、接着している様子が確認された(Figure 10, 矢印部分)²²⁾。

このようにリン脂質極性基を基盤としたスキャホールドでは、速やかにホスホリルコリン基が反転し表面に濃

縮される。この結果、スキャホールド内部に培養液が速やかに浸透・拡散することが明らかとなった。このようなバイオ界面特性によって、スキャホールド内部にも細胞が浸潤できることがわかった。

4 バイオ分子の安定な固定化に基づいた連続酵素反応系の構築

次にリン脂質極性基を基盤としたバイオ界面を効果的に活用すべく、大きな比表面積が得られるナノ粒子の表面への展開を考えた。ナノ粒子を用いたバイオツールは、特に医療分野において抗原などのマーカー分子やウイルスの検出・診断、ワクチンアジュバントとして開発が進められている^{23)~25)}。ミリメートルオーダーの粒子が有する比表面積は 6 mm^2 (1 mmの立方体と仮定した場合) であり、筆者が取り扱うサブミクロンオーダーのナノ粒子では10000倍 ($6 \times 10^4 \text{ mm}^2$) と計算される(Figure 11)。マクロな粒子をミクロに作り込んでいくトップダウン的な微細加工においても、ポリマーの自発的な会合を駆動力としたボトムアップ的な手法であっても、創り出されたナノ粒子における界面設計が重要となってくる。特にバイオ分野での機能解析は水媒体中で行われるため、ナ

Figure 11. Change in specific surface area.

Figure 12. Chemical structure of phospholipid polymer for bioconjugation, containing oxyethylene spacer ($n=4$): (a) PMBN and (b) its reaction scheme for bioconjugation.

ノ粒子を効果的に水中で分散させることが重要となってくる。リン脂質極性基を基盤としたバイオ界面は高親水性表面を構築でき、かつバイオ分子を安定に固定化することが期待できるためナノ粒子の界面として最適と考えられる。

そこでバイオ分子を固定化できるバイオコンジュゲートポリマーを設計した (Figure 12)。ここでは、バイオ分子がもつアミノ基と生理的条件下で選択的に反応する活性エステル基を有する機能性モノマー (NPMA) をポリオキシエチレンモノメタクリレート (オキシエチレンユニットが平均 4 のもの) と *p*-ニトロフェニルクロロホルメートとから合成し、MPC、BMA とともに共重合を行った (PMBN)²⁶⁾。このポリマーはアミノ基との反応

によって、*p*-ニトロフェノール ($\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ nm}$) を系中に遊離してくるため、バイオ分子の固定化率を上澄みの吸光度変化から、容易に算出することができる。

¹H NMR の積分値の比から算出したモノマー組成は、MPC ユニットが 45 mol%，BMA が 43 mol%，活性エステル基を有するモノマーが 12 mol% と見積もられ、ポリマーは水に対して容易に溶解した。また臭化リチウム水溶液 (10 mmol/L) を溶離液としたゲル浸透クロマトグラフィー測定から、分子量は 5.0×10^4 (ポリエチレングリコール換算) と算出された。このポリマーは分子内に高親水基であるホスホリルコリン基とオキシエチレンスパーサーを有し、また疎水基である *n*-ブチル基を有しているため、水中で会合体を形成する可能性があ

Figure 13. Change in maximum fluorescence wavelength by formation of phospholipid polymer aggregation.

る。そこで8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム(ANS)を蛍光プローブとして用い、水中での溶存状態を解析した。ANSは疎水場におかれると蛍光強度の増大と最大蛍光波長の短波長シフトが観測される²⁷⁾。ここでは種々のポリマー濃度に対するANSの最大蛍光波長をプロットすることにより、ポリマーの会合状態を検討した(Figure 13)。その結果、希薄なポリマー溶液中(10⁻³ mg/mL)においては、純水中と同様の最大蛍光波長(515 nm)が観測された。このことは希薄溶液中においてポリマー鎖が形成する疎水場は存在しないことを示している。ポリマーの濃度を徐々に高くしていくにつれて、最大蛍光波長が短波長側にシフトしていくことが明らかとなった(1 mg/mLでは478 nm)。この濃度領域で観察された最大蛍光波長は*n*-ブタノール中で測定されたANSの最大蛍光波長(473 nm)と同程度であった。このことは高濃度領域で疎水基(ブチル基)が会合し、疎水場を形成していることを意味していた。このようにバイオコンジュゲートリン脂質ポリマーは水中において安定な疎水場を形成することが明らかとなった。なお、このポリマーによる会合体の大きさは、類似の組成のポリマーによる光散乱解析からおおよそ30 nm程度と見積もられており²⁸⁾、本ポリマーについても同程度の大きさの会合体を形成していると考えられる。

ポリマーの溶存状態の解析結果から疎水基である*n*-ブチル基が水中において疎水場を構築しており、特に10 mg/mL以上のポリマー濃度では、安定な疎水場を形成していると考えられた。ナノ粒子を作製するためのバルクのマテリアルとしてポリスチレンを選択した。これは、水中において安定かつ水とほぼ比重が同じであるためエマルションとしてハンドリングが良いからである。また、ポリスチレンは水と相溶しない塩化メチレンに可溶であるため、リン脂質ポリマーを溶解した水中に分散、超音波照射することにより容易に懸濁液を調製でき

Figure 14. SEM picture of phospholipid polymer nanoparticles.

る。またこの懸濁液を減圧下において塩化メチレンを留去することによって、ポリスチレンを再析出させると同時にリン脂質ポリマーがその界面を安定化させるべく自発的に濃縮してきた。このような溶媒留去プロセスにより、リン脂質極性基を界面に有するナノ粒子を調製できる^{29),30)}。Figure 14に得られたナノ粒子のSEM像を示す。粒径がサブミクロンオーダーの粒子が得られていることがわかる。この粒径は用いたリン脂質ポリマー濃度に依存する傾向を示し、ポリマー濃度が高くなるにつれて、粒径は小さくなった。増大する比表面積を安定化するためには調製時のリン脂質ポリマー濃度が重要となってくる。特に10 mg/mLのリン脂質ポリマー濃度で調製されたナノ粒子は、静置状態で1ヶ月以上にわたり分散していることが確認でき、安定性に優れており、その粒径は150~300 nmの範囲であった。この粒径のナノ粒子を用いて、バイオ分子の固定化と連続酵素反応を検討した。

ナノ粒子の表面解析をX線光電子分光測定(XPS)およびゼータ電位測定により行ったところ、粒子の表面にはホスホリルコリン基が濃縮配向しており、それが示すゼータ電位はほぼゼロであることが明らかとなった^{31),32)}。通常コロイドナノ粒子が水媒体中で分散安定性を確保するためには表面ゼータ電位が負電荷をもつことにより、互いに静電反発する必要があることがよく知られている。しかしながら本系ではゼータ電位がゼロ付近であるために粒子間の静電反発は期待できない。ところが高親水性のホスホリルコリン基が濃縮配向していることによって長期間の分散安定性が確保された。また、粒子表面に存在しアミノ基と特異的に反応する活性エステル基量をアルカリ加水分解により定量したところ、ナノ粒子1 mgあたり1 nmolの活性エステル基が粒子表面に存在し、バイオ分子を粒子表面に固定化できること

Figure 15. Change in bioconjugation at each temperature. Black bar is total amount of peroxidase-labeled IgG, hatched bar is hydrolysis of active ester groups, and white bar is residual active ester groups.

が明らかとなった。

活性エステル基のバイオ分子に対する反応率は、IgGのような抗体をモデルタンパク質として用いて見積もった。タンパク質に含まれるアミノ基と活性エステル基が反応する一方で、水による単なる加水分解が副反応として進行する。Figure 15には各反応温度による反応率を検討した結果を示している。4°Cや25°Cでは表面に存在する活性エステル基の40%程度がアミノ基と反応した。その一方で、アミノ基との反応率が高まると予想された37°Cでは、20%の反応率にとどまった。この結果を解析してみると、25°C以下の低温では、アミノ基との反応が優勢であって単純な加水分解は20%程度にとどまっていた。これに対し、37°Cでは副反応である加水分解が40%を占めるようになっていた。もっとも、このアミノリシス反応においてタンパク質中のアミノ基が塩基触媒として作用して加水分解を促進させる可能性がある。ここでは簡単のために塩基触媒として作用しないとして見積もっている。その一方で、未反応の活性エステル基が40%程度残存していることも明らかとなった。この残存した活性エステル基の反応性を調べるべく、グリシンのような低分子量のアミノ酸と反応させたところ、ほぼすべての活性エステル基と反応を起こすことが明らかとなった。これはIgGが分子量15万程度の高分子量体であるため、ナノ粒子表面での反応時に立体障害が生起していることによると考察された。

バイオ分子を対象にした粒子の研究はMerrifieldによるペプチドの固相合成用担体の開発が歴史的に大きな役割を果たしてきた³³⁾。続いて固定化酵素担体として多孔性粒子が研究され³⁴⁾、最近ではナノテクノロジー研究戦略とあいまって革新的バイオツールへと展開されてきている。筆者はナノ粒子の表面に複数の酵素を同時に固定化して連続的な酵素反応が生起するかどうかを検討した。このような反応が誘起できる界面が構築されること

Figure 16. Sequential enzymatic reactions with addition of each substrate. White and black bars indicate reaction on nanoparticle and in enzyme-mixed solutions, respectively. (n = 5, *P < 0.05)

により、従来多段階のプロトコルによってなされてきた定量・診断を目的としたバイオ反応が粒子の表面において一段階でかつ自動的に完了できるようになる。具体的には、アセチルコリンエステラーゼ、コリンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ標識IgGのバイオ分子を固定化した(Figure 2(c))。このバイオ分子の組み合わせは、アセチルコリンエステラーゼの基質となる塩化アセチルコリンを添加することにより、塩化コリンが酵素反応により生成する。この塩化コリンはコリンオキシダーゼの基質となるために酵素反応を受けて過酸化水素を生成する。最後のバイオ分子であるIgGにはペルオキシダーゼが標識されており、同時に添加しておいたテトラメチルベンジジンが生成してきた過酸化水素存在下で酵素反応を受けて発色し、450 nmにおける吸光度変化により定量できる。これらの酵素反応は連続的であり、かつ生成してきた分子が酵素反応の基質として直ちに利用される特徴を有している。

Figure 16には基質分子の組合せを変えた場合における450 nmの吸光度変化を連続酵素反応が期待されるナノ粒子の系と酵素の混合溶液の系において比較した結果を示している。酵素の終濃度は混合溶液の系の方が2.5倍程度高くなるように設定されている。これはナノ粒子に酵素を同時固定する際の酵素の仕込量を酵素の混合溶液における濃度として設定している。ナノ粒子に固定化されるバイオ分子は平均40%であるため、計算上は酵素混合液内には2.5倍の酵素が存在していることになる。しかしながら各々の酵素がどの割合で固定化されているかは見積もることが困難であった。ペルオキシダーゼの基質となるテトラメチルベンジジンと過酸化水素のみを添加した場合では、ナノ粒子の系の方が酵素の混合

液の場合と比較して4倍程度大きな吸光度変化が観察された。ナノ粒子の系の方が酵素濃度が低いにもかかわらず高い吸光度変化を示したことは、ナノ粒子の表面では酵素濃度が局所的に高濃度化しているために効率よくテトラメチルベンジジンの酵素反応が生じたためであると考察された。次に、コリンオキシダーゼの基質である塩化コリンとペルオキシダーゼの基質であるテトラメチルベンジジンの二つを同時に添加した場合でも同様に、ナノ粒子の系の方が高い吸光度変化を示した。しかもテトラメチルベンジジンのみを加えた場合と異なり、吸光度変化は有意に大きくなった。このことはコリンオキシダーゼとペルオキシダーゼの二つの酵素間で連続的な酵素反応が生起し、コリンオキシダーゼの酵素反応により生成された過酸化水素がペルオキシダーゼに対して効果的に拡散し利用されたことを示していた。同様にアセチルコリンエステラーゼの基質である塩化アセチルコリンと塩化コリン、テトラメチルベンジジンの三つの基質を同時に添加したところ、ナノ粒子の系では有意に吸光度変化が増大した。一方の混合溶液系では有意差が見られなかった。以上をまとめると、連続的な酵素反応が生起するような組合せの酵素をナノ粒子に固定化することにより、基質の添加によって連続的な酵素反応が混合溶液系とは異なり高効率で起こることが明らかとなった。

このような連続酵素反応が生起するナノ粒子に固定化されたバイオ分子の保存安定性を見積もるために、ペルオキシダーゼ標識 IgG をナノ粒子に固定化し、所定温度において2週間までインキュベートした結果を Figure 17 に示す。4°C で保存した場合では、保存開始1週間後では90%以上、2週間後でも80%以上のペルオキシダーゼの酵素活性が維持されていた。保存温度が常温である25°Cの場合では、1週間後では80%以上、2週間後でも60%以上の活性を維持していた。一方、酵素溶液として保存した場合では、保存温度と期間にかかわらず IgG の凝集により酵素反応がほとんど起こらなかった。これに対して、ナノ粒子の系ではこのような凝集の抑制と、バイオ分子の高次構造が維持されていると示唆された。

これらのことから、リン脂質極性基を界面に濃縮配向させたナノ粒子により、連続的な酵素反応系を構築することが可能であり、また低濃度のバイオ分子を安定に維持できるバイオ界面としても価値があることが明らかとなった。

5 おわりに

本報では、リン脂質極性基を基盤とした新規なバイオ界面の創製により初めて達成できる高浸潤性細胞培養スキャホールドとバイオ分子安定化連続酵素反応システムをポリマーの分子レベルでの設計からインテグレートす

Figure 17. Residual enzymatic activity on peroxidase-labeled IgG stored at 4°C (closed circle) and 25°C (open circle).

ることにより創製した。細胞のようなバイオ成分や酵素などのバイオ分子を扱う界面として、リン脂質極性基が濃縮配向した界面をバルクのマテリアルと分子レベルでインテグレートさせる独創的なアイデアにより、再生医療材料やバイオ反应用ナノ粒子の界面に応用できることを見いだした。

このようなバイオマテリアルとして重要な機能発現の作用機序について、次の要素が必要要件であると考えられる。水環境下でマテリアルの界面が速やかにホスホリルコリン基のような極性の高いグループで配向されること。これとともに機能発現を担うグループも界面に濃縮すること。この両者を同時に満たすことが不可欠である。従来、バイオマテリアルの界面がドメイン構造を形成しているとの多相系高分子を基盤とした研究が展開されてきた経緯がある。これをふまえ本報においては極性が比較的高い媒体を用いた環境下でホスホリルコリン基とともに機能発現グループを濃縮配向させたことが、期待を上回るバイオ機能の発現に結びついたと確信している。

謝 辞 本研究は筆者が東京大学大学院工学系研究科石原一彦教授の研究室にて助手として在籍していた期間に行ったものである。本研究を推進するにあたり、ご指導を賜りました石原一彦教授に感謝いたします。また、本研究の一部は独立行政法人 NEDO による産業技術研究助成事業費助成金 (03A23011a) により行いました。

文 献

- 1) J. M. Orban, K. M. Faucher, R. A. Dluhy, and E. L. Chaikof, *Macromolecules*, **33**, 4205 (2000).
- 2) V. A. Tegoulia and S. L. Cooper, *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, 291 (2000).
- 3) 福島重人, 門磨義則, 中林宜男, 高分子論文集, **40**, 785 (1983).
- 4) K. Ishihara, T. Ueda, and N. Nakabayashi, *Polym. J.*, **22**, 355 (1990).
- 5) K. Ishihara, *Sci. Tech. Adv. Mater.*, **1**, 131 (2000).

- 6) T. Hasegawa, Y. Iwasaki, and K. Ishihara, *Biomaterials*, **22**, 243 (2001).
- 7) S. H. Ye, J. Watanabe, Y. Iwasaki, and K. Ishihara, *J. Membr. Sci.*, **210**, 411 (2002).
- 8) T. Moro, Y. Takatori, K. Ishihara, T. Konno, Y. Takigawa, T. Matsushita, U.-I. Chung, K. Nakamura, and H. Kawaguchi, *Nature Mater.*, **3**, 829 (2004).
- 9) T. Konno, H. Hasuda, K. Ishihara, and Y. Ito, *Biomater.*, **26**, 1381 (2005).
- 10) T. Ito, Y. Iwasaki, T. Narita, K. Akiyoshi, and K. Ishihara, *Colloid and Surfaces, B: Biointerfaces*, **41**, 175 (2005).
- 11) S. Abraham, S. Brahim, K. Ishihara, and A. Guiseppe-Elie, *Biomaterials*, **26**, 4767 (2005).
- 12) W. Feng, S. Zhu, K. Ishihara, and J. L. Brash, *Langmuir*, **21**, 5980 (2005).
- 13) H. Kitano, K. Sudo, K. Ichikawa, M. Ide, and K. Ishihara, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 10425 (2000).
- 14) T. Morisaku, T. Ikehara, J. Watanabe, M. Takai, and K. Ishihara, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn*, **30**, 835 (2005).
- 15) S. Sakaki, Y. Iwasaki, N. Nakabayashi, and K. Ishihara, *Polym. J.*, **33**, 637 (2000).
- 16) S. Sawada, S. Sakaki, Y. Iwasaki, N. Nakabayashi, and K. Ishihara, *J. Biomed. Mater. Res.*, **64A**, 411 (2003).
- 17) J. Watanabe, T. Eriguchi, and K. Ishihara, *Biomacromolecules*, **3**, 1109 (2002).
- 18) J. Watanabe, F. Nederberg, B. Atthoff, T. Bowden, J. Hilborn, and K. Ishihara, *Mater. Sci. Eng., C*, in press.
- 19) K. Miyazawa and F. M. Winnik, *Macromolecules*, **35**, 2440 (2002).
- 20) J. Watanabe and K. Ishihara, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn*, **28**, 845 (2003).
- 21) J. Watanabe and K. Ishihara, *Chem. Lett.*, **32**, 192 (2003).
- 22) J. Watanabe, T. Eriguchi, and K. Ishihara, *Biomacromolecules*, **3**, 1375 (2002).
- 23) B. T. Kurien and R. H. Scofield, *J. Immunol. Methods*, **274**, 1 (2003).
- 24) T. Akagi, M. Kawamura, M. Ueno, K. Hiraishi, M. Adachi, T. Serizawa, M. Akashi, and M. Baba, *J. Med. Virology*, **69**, 163 (2003).
- 25) T. Akagi, M. Ueno, K. Hiraishi, M. Baba, and M. Akashi, *J. Controlled Release*, **109**, 49 (2005).
- 26) K. Sakai-Kato, M. Kato, K. Ishihara, and T. Toyo'oka, *Lab on a Chip*, **4**, 4 (2004).
- 27) K. Ishihara, Y. Iwasaki, and N. Nakabayashi, *Polym. J.*, **31**, 1231 (1999).
- 28) T. Konno, J. Watanabe, and K. Ishihara, *J. Biomed. Mater. Res.*, **65A**, 210 (2003).
- 29) A. Maruyama, T. Ishihara, N. Adachi, and T. Akaike, *Biomaterials*, **15**, 1035 (1994).
- 30) T. Konno, K. Kurita, Y. Iwasaki, N. Nakabayashi, and K. Ishihara, *Biomaterials*, **22**, 1883 (2001).
- 31) 渡邊順司, 石原一彦, 高分子論文集, **61**, 547 (2004).
- 32) J. Watanabe and K. Ishihara, *Biomacromolecules*, **7**, 171 (2006).
- 33) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149 (1963).
- 34) A. Pollak, H. Blumenfeld, M. Wax, R. L. Baughn, and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6324 (1980).

[Comprehensive Papers]

Design of Biointerface Based on Phospholipid Polar Groups and Its Biofunctions

Junji WATANABE^{*1}^{*1}Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University (2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

The phospholipid molecule is the typical component in the construction of the biomembrane. In particular, one of the major phospholipid polar groups on the bio-membrane is phosphorylcholine, which is an electrically neutral head group. In biomimetic chemistry, phospholipid molecules have been used in the preparation of the bio-membrane structure such as liposome as drug delivery carrier. However, the major disadvantage of the liposome is chemical and/or physical stability. In this comprehensive paper, bioinspired phospholipid polymers for biomedical applications are systematically summarized. These phospholipid polymers are not biomimetic polymers but bioinspired polymers. The bioinspired approach to nano-structured biomaterials is widely applicable in the preparation of biointerfaces, bioconjugations, and biomatrices. Thus, a novel biointerface based on phospholipid polar groups was designed and integrated with bulk materials. In this paper, a scaffold for regenerative medicine and a nanoparticle for bio-reaction were reported. In the case of the scaffold, surface enrichment of the phosphorylcholine group was observed under physiological environment. Therefore, cell culture medium and cells could easily come into the scaffold within a few minutes. On the other hand, a water-soluble phospholipid polymer was integrated with polystyrene to prepare nanoparticles. The nanoparticles contained bioconjugate site onto the surface and three kind of enzymes were immobilized. The bioconjugate nanoparticles showed sequential enzymatic reactions, and the enzymatic reaction on the nanoparticles was found to be significantly more efficient than that by the enzyme mixture. This result indicates that the diffusion of the degradation products and localization of immobilized enzymes are dominant factors for the reaction. From these results, the bioinspired surface integrated with bulk materials was capable of several kinds of biofunctions, such as cell culture scaffold and sequentially enzymatic reaction.

KEY WORDS Biointerface / Phospholipid Polymer / Surface Enrichment / Scaffold / Sequential Enzymatic Reaction/

(Received April 3, 2006: Accepted May 30, 2006)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **63**(8), 548—559 (2006)]