

論文の内容の要旨

論文題目 Colloidal functions of amphiphilic 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers in aqueous system and their biomedical applications

(リン脂質ポリマーによる水中での疎水性ドメイン構築とコロイドバイオマテリアルとしての応用)

氏名 金野 智浩

本研究は両親媒性リン脂質ポリマーによる水中での疎水性ドメイン構築とコロイドバイオマテリアルとしての応用を目的とする。

側鎖に細胞膜と同様のリン脂質極性基を有するメタクリル酸エステル，2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)は高い親水性を有し，これを一成分として分子設計した MPC ポリマーは優れた生体適合性を有するバイオインスパイアードポリマーである。

これまでに水不溶性 MPC ポリマーは医療デバイスへのコーティングマテリアルとして世界的にトップレベルの生体適合性を示すことが判明している。これを礎とした派生研究も近年のナノテクノロジーの隆盛とともに精力的に行われている。これは MPC ポリマーがナノテクノロジー時代に必須のバイオマテリアルであることを予見する流れである。一方，水中でそれ自身が一定の溶存状態を構築することで機能する MPC ポリマーに関する研究例は少ない。細胞は生体を構成する最小単位であり，マテリアル工学的観点からはコロイドバイオマテリアルと見なせる。本研究におけるコロイドバイオマテリアルとは水中で一定の溶存状態を構築することで機能するマテリアルであると定義する。また細胞はリン脂質二重層を形成しており，その最表面はリン脂質極性基の高集積表面である。本研究ではこれをバイオインターフェースと定義する。

本研究は大きく以下5つの内容に分類される。

第1章は本研究の背景と意義，またこれまでのポリマーバイオマテリアルに関する研究例，特に会合体，ナノ粒子に関して記述している。

第2章では MPC ポリマーの特長を水溶液系に演繹することを目的に両親媒性 MPC ポリマーの分子設計を行った。合成から物性評価，難水溶性薬物可溶化剤としての応用を検討した。両親媒性 MPC ポリマーを合成するにあたり疎水性モノマーの化学構造に着目して系統的に合成した。その結果，疎水性 *n*-ブチルメタクリレート(BMA)を 70mol%有するにもかかわらず水溶性である MPC ポリマー(PMB30W，図1)を合成した。

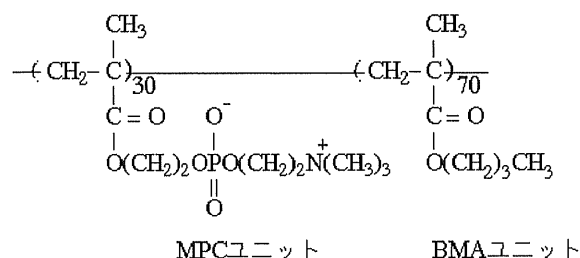


図 1 両親媒性 PMB30W の構造式

これまでの研究例では BMA を 70mol%含む MPC ポリマーは水不溶性コーティング材料として最も高い生体適合性を示す組成比であることが判明している。同様の組成比，かつ水溶性である PMB30W の水中での溶存状態を検討した。その結果，溶存状態は水中で疎水性相互作用を駆動力とした安定な疎水性ドメインを 5 分子程度で構築した会合体であった。会合体の粒径は 23nm であった。PMB30W 会合体はタンパク質共存下でも構造を安定に維持する一方，タンパク質の変性を誘起せず，血小板の活性化も有意に抑制した。このような特長を有することから難水溶性薬物可溶化剤として展開した。近年創製される薬物は難水溶性のものが多く，その代表であるパクリタキセル(PTX)の可溶化を試みた。PTX は鋭い生理活性を示す一方で難水溶性であることから可溶化剤を必要とし，それによる副作用の発現が問題とされている。PMB30W は種々の MPC ポリマーのうち最も高い可溶化能を示した。また BMA ユニットの 70mol%有する特長から造膜性に優れており，フィルムとして得ることができた。フィルムは透明で PTX が PMB30W 内に分子レベルで溶解していた。このフィルムは水への再溶解性も高く新しい剤形として期待できた。PMB30W/PTX コンジュゲート水溶液の動物実験を行った結果，全ての検体において急性毒性や溶血性などの現象は確認されなかった。これら一連の物性評価，応用研究の結果，PMB30W が新しいコロイドバイオマテリアルであることを明らかにした。

第 3 章はマテリアル表面をリン脂質極性基の高集積表面（バイオインターフェース）とするという発想の元，PMB30W を表面被覆剤として用いたポリ乳酸(PLA)ナノ粒子(PMB30W/PLA ナノ粒子，図 2)に関する研究である。

PMB30W/PLAナノ粒子

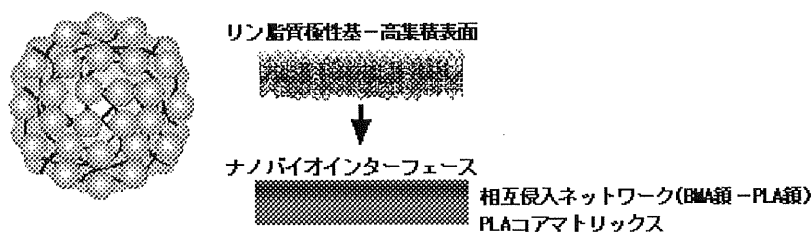


図 2 PMB30W/PLA ナノ粒子の模式図

PLA ナノ粒子は薬物送達システムにおける薬物担体として大きな期待が寄せられていたが、血液適合性の低さから実用化に至っている研究例は少ない。本章では PMB30W/PLA ナノ粒子の調製から薬物担体としての基礎評価までを行った。ナノ粒子はポリマーの段階から調製できる溶媒蒸発法により行い、PLA 鎖と BMA 鎖が絡み合った粒径 200nm の安定なナノ粒子を得ることができた。また調製時の PMB30W 濃度を制御することで粒径制御も可能であった。表面解析を行った結果、リン脂質極性基の高集積表面であることを明らかにした。また表面電位は弱アニオンであり、生体成分との非特異的相互作用が弱いことが期待できた。これらの表面解析はナノ粒子とすることにより会合体とは異なり明確な界面を規定したことによるものである。全ての生体反応はマテリアル表面上で進行することから、バイオインターフェースを有する PMB30W/PLA ナノ粒子は優れた血液適合性の発現、薬物担体としての応用が期待できた。PMB30W/PLA ナノ粒子はタンパク質の非特異的吸着を抑制し、接触したタンパク質の構造変化も誘起しなかった。また血小板の活性化も有意に抑制した。つまりナノ粒子表面に生体膜類似構造を有するコロイドバイオマテリアルであった。これまでのナノ粒子は異物認識細胞であるマクロファージによる非特異的補足が血流中からの非特異的消失の要因であったが、PMB30W/PLA ナノ粒子はそれを回避することができた。薬物担体として応用する際には薬物担持方法も機能発現には重要な因子である。担持方法としてナノ粒子表面への低分子物質の吸着を利用した。これはナノ粒子最表面の MPC ユニットの高水和層を通過して PLA コア部に吸着する方法である。具体的には分子内に疎水性部位を有するアドリアマイシン (ADR) の吸着を行った。担持後においても表面特性は変化せず、ADR は PLA コア部に吸着していた。ADR 担持ナノ粒子を培養細胞に添加した結果、薬理活性は粒子からの ADR 自身の拡散に依存するため、単独時よりもその発現に遅延がみられた。この結果、担持した ADR の薬理活性を維持していることを明らかにした。この方法は担持の際に薬物を化学的に修飾する必要がなく、物理的に担持できることから幅広い薬物に対し適応できる。これらの結果、PMB30W/PLA ナノ粒子はあたかも細胞類似ナノ粒子であり、さらにナノバイオインターフェースを兼備したコロイドバイオマテリアルとして応用することができた。

第 4 章ではバイオ分子をコンジュゲートしたポリマーナノ粒子の創製と診断担体への展開についてである。ヒトゲノム解析の終了に伴い、今後は様々なバイオ分子が精力的に開発されることは明らかである。今後の発展はいかにそれらを有効に利用していくかである。ナノバイオインターフェース表面にバイオ分子をコンジュゲートしたバイオコンジュゲートナノ粒子は分子指向性薬物担体、診断担体として期待できる。具体的には側鎖に活性エステル基 (*p*-ニトロフェニルカーボネート基) を有する新規モノマー (MEONP) を導入した MPC-co-BMA-co-MEONP (PMBN) を表面被覆剤として用いた PMBN/PLA ナノ粒子 (図 3) を創製した。

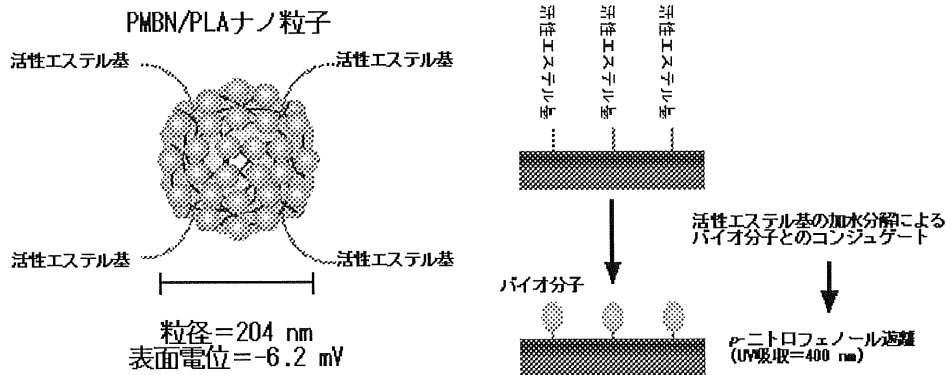


図 3 PMBN/PLA ナノ粒子の模式図

PMBN/PLA ナノ粒子の物性評価を行った結果、PMB30W/PLA ナノ粒子と同様、粒径 200nm、表面電位は弱アニオンのナノ粒子であり、ナノバイオインターフェースを兼備していた。さらに表面に配向した活性エステル基を介して加水分解によりバイオ分子とコンジュゲートできた。コンジュゲートナノ粒子の応用分野の一つとして本研究では新しいマクロダイアリスシステム (MDS) を構築した。MDS は脳科学を推進する有望な分析手法である。PMBN/PLA ナノ粒子表面にバイオ分子としてアセチルコリンエステラーゼ (AchE)、コリンオキシダーゼ (ChO)、ルシフェラーゼ (Luc) をコンジュゲートした。ChO/PMBN/PLA ナノ粒子を微小透析膜内部に充填し、目的検体であるコリンをナノ粒子表面上での酵素反応により検出した。生成した過酸化水素を白金電極上での還元反応により電流値として検出することができた。また Luc/PMBN/PLA ナノ粒子では目的検体である ATP との酵素反応によりナノ粒子表面上での発光を光ファイバーにより集光することができた。つまり PMBN/PLA ナノ粒子表面に特定のバイオ分子の導入が可能であった。2 種類の酵素分子の連続酵素反応 (AchE と ChO) により目的検体としてアセチルコリンの検出を行ったが、生成物の拡散や酵素分子の導入率に問題があることを認めた。これは複数の酵素分子を同時にコンジュゲートすることで酵素分子の局在化および基質拡散距離の短縮を狙うことで解決できると考える。

第 5 章は一連の系統的研究のまとめである。本研究では新規に創製した両親媒性 MPC ポリマーが水中で疎水性相互作用を駆動力とした自己組織化体 (会合体) を形成することで疎水性ドメインを構築できることを証明し、さらに難水溶性薬物可溶化剤として応用できた。PMB30W/PLA ナノ粒子はリン脂質極性基が高集積化したナノバイオインターフェースを有する細胞類似ナノ粒子であり、薬物担体として応用できた。PMBN/PLA ナノ粒子はバイオ分子とのコンジュゲートが可能であり、新しい MDS を構築した。

本研究の遂行によりナノテクノロジーやバイオテクノロジーに大きな波及効果を持つコロイドバイオマテリアルを具現化できたと考える。