

生体親和性に優れた診断・治療用ソフトバイオマテリアルの設計と製品化 —生体高分子と合成高分子の共通点:中間水の基礎と応用—

九州大学先導物質化学研究所 田中 賢

〒819-0395 福岡市西区元岡 744 CE41

masaru_tanaka@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp <http://www.soft-material.jp/>

1. はじめに

病気の治療や自覚症状が出る前の超早期診断など、高齢社会においてニーズの大きい医療・ヘルスケア技術や製品の開発には、製品性能を決定付ける製品の表面を形成する医療材料の機能の向上が欠かせない¹⁾。健康寿命を延伸するためには、血液などの生体成分と医療材料の接触面(バイオ界面)(図1)で引き起こされる現象を分子レベルで理解して制御する技術が必要である²⁾。本講演では、バイオ界面現象の最初のイベントである材料への水和現象に着目し、我々の身体を構成する生体高分子と特定の合成高分子の共通点である中間水を切り口とする材料開発の根本原理と応用について紹介する。

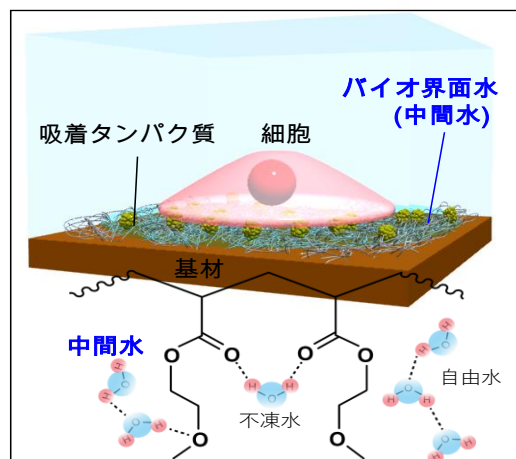


図1. バイオ界面に存在する水和構造および官能基レベルでの水分子の相互作用の模式図

2. バイオ界面で引き起こされる現象

例えば、血管治療、血液浄化・血液成分分離などを行うための医療機器を構成する医療材料が血液に接触すると、以下の3段階の現象が起こる。1) 血液中の水分子が材料表面に吸着。2) 補体系や凝固系の血漿タンパク質が吸着。3) 血球細胞の接着と活性化。つまり、材料表面で最初に起こる現象は、タンパク質の周囲に存在する水分子の吸着である。吸着した水分子は、以下の2種類に分けられる。材料に強く結合し分子運動性が低下した不凍水と材料に弱く結合し分子運動性が高い自由水である。さらに、生体を構成する生体高分子生および生体親和性(血液適合性)に優れた合成高分子には、自由水と不凍水の間接的な性質を示す中間水が形成されることが知られている^{3,4)}。

このプロセスにおいて、血液適合性に影響するフィブリノーゲン⁵⁾は、材料表面と相互作用し吸着する。その後、時間経過とともに構造変化を起こし、血球細胞である血小板の粘着部位(γ 鎖)を露出する。血小板は、細胞膜表面の受容体を介して材料表面に粘着する。つまり、吸着タンパク質の状態に応じて血球細胞の初期接着状態が変化する。この吸着タンパク質の状態は吸着した水分子の状態が支配している。

血液細胞以外の接着系細胞の場合、細胞懸濁液が材料に接触すると上記の3段階の現象が起こり、細胞-材料間および細胞-細胞間相互作用の変化により、細胞の接着、運動、増殖、機能に変化が起こる。この変化を誘導する因子として、親水性・疎水性、粘弾性、電荷、ガラス転移点(T_g)、結晶性・非晶性、含水量、表面形状、主鎖・側鎖の分子運動性などが挙げられる。全て重要な因子であるが、これらの因子では、細胞接着挙動は説明できない例が多いことがわかってきた。したがって、それぞれの界面に存在する水分子の役割の解明を行い制御する方法が望まれている。

3. バイオ界面水の解析

材料に含水した水和構造と運動性の解析手法として、熱分析法と分光分析法が挙げられる。熱分析法としては、示差走査熱量 (DSC) 法、分光分析法としては、赤外分光法や個体 NMR 法などである。含水状態の材料の DSC 測定の結果、昇温もしくは降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氷の低温融解に由来する吸熱ピークが観測された^{3, 4)}。これらの特徴的なピークは、水やリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) のみを DSC 測定した場合に観測されるピークとは転移点が異なった。材料の含水量と各転移における熱量の測定結果から、含水材料に存在する水を不凍水、自由水、中間水に分類した (表 1)。所定のサンプル調整方法および降温、昇温条件を一定にして測定した結果より、自由水は、昇温過程において 0°C 付近で融解する水、中間水は、低温結晶形成し、かつ昇温過程で低温融解する水、不凍水は、-100 °C においても凍結しない水とそれぞれ定義した。

表 1. 材料に含水した水の分類: 中間水は、高い分子運動性を有する材料に弱く束縛され、低温下でも分子運動性の高い水であり、材料表面にも安定に存在する。生体親和性に優れた材料 (生体高分子と血液適合性合成高分子) には共通して中間水が観測された。中間水は機能材料のスクリーニングに使用できる。

水和水の分類	不凍水 Tightly bound water/ Non-freezing bound water	中間水 Loosely bound water/ Freezing bound water/ Intermediate water	自由水 Scarcely bound water/ Freezing water/ Free water
温度変化による相転移特性	0°C 以下で凍結しない	0°C 以下で凍結する	0°C で融解する
固体 NMR 測定による水分子の相関時間 τ_c (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 伸縮運動 (cm ⁻¹)	3600	3400	3200
高分子鎖への結合力	強	中	弱

時間分解 *in-situ* 赤外分光法により、高分子に水素結合した水分子由来の O-H 伸縮振動領域には、3 種類の水に帰属されるバンドが観察された^{5, 6)}。また、指紋領域の解析の結果、官能基レベルでの水分子の相互作用が明らかになった (図 1)。

固体 NMR (²H および ¹³C NMR) 法により、水分子および高分子の分子運動性に相当する相関時間を計測した結果、3 種類の水に分類できた⁷⁾。血液適合性に優れた高分子および水素結合した水分子は、分子運動性が比較的高いことがわかった⁷⁾ (表 1)。一方、血液適合性に劣る高分子および水分子は、分子運動性が、含水率や温度に依存して大きく変化し、分子運動性が比較的低いことがわかった。以上の結果から、血液適合性発現には、中間水の役割が重要であることが示唆された。また、水の分子運動性を支配する駆動力のひとつは高分子の分子運動であり、血液適合性発現には水分子と協同的に運動している高分子の主鎖および側鎖の分子運動性が大きくかかわっていることが推定された。

中間水は純水で含水させた材料のみならず、PBS や血液に接触させて含水させた高分子からも同様に検出されたことから、生理環境下においても中間水が存在することが明らかになった。ま

た、原子間力顕微鏡測定の結果、中間水が形成される表面同士には、PBS 中において反発力が観測されたことから、中間水は表面に安定に存在し、バリアとしての役割を果たしていると考えられる^{8,9)}。最近、中間水を有する表面には、水分子と高分子による数十ナノメートルの面内相分離構造が形成されていることがわかった¹⁰⁾。

4. 中間水が観測される高分子: 生体高分子および生体親和性合成高分子

中間水は、生体高分子であるタンパク質（ゼラチン、アルブミンなど）、核酸（DNA、RNA など）、多糖（ヘパリン、アルギン酸など）、合成高分子であるポリ（2-メトキシエチルアクリレート）（図1）などのポリアルコキシアリルアクリレート、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリメチルビニルエーテル、ポリオキサゾリン、ポリホスファゼン、ポリテトラヒドロフルフルリルアクリレート、リン脂質（ホスホベタイン）、スルホベタイン、カルボベタインなどの双性イオン型の高分子に共通して観測された。一方、生体親和性に劣る合成高分子には、中間水は検出されなかった^{4,11)}。

上記の中間水が観測される高分子は、ヘルスケア・医療の分野において、平板、薄膜、チューブ、ファイバー、メッシュ、多孔質体、微粒子および表面コーティング材など様々な形態で使用されている。

また、生体を構成しているタンパク質、核酸、多糖に存在する中間水が、イオン、低分子化合物、生体高分子が水和環境で共存する分子クラウディング環境においてどのような役割を果たしているのかを解明することは生命科学の進歩に役に立つものと考えられる。

5. 中間水の役割は？

バイオ界面における中間水は、生体成分と高分子表面の不凍水の間が存在するバリア層としての役割があると考えられる。高分子との相互作用が弱い自由水は、不凍水と高分子を被覆できない。事実、自由水は血液のような高塩濃度溶液中では、高分子から脱離しやすいのに対して、中間水は安定に存在できることがわかっている。また、分子クラウディング環境における生体高分子には、自由水はほとんど観測されず、不凍水と中間水が観察される。生体高分子を合成高分子設計のお手本とする場合、化学構造と物性だけではなく、含水量やイオン濃度などの生理環境を

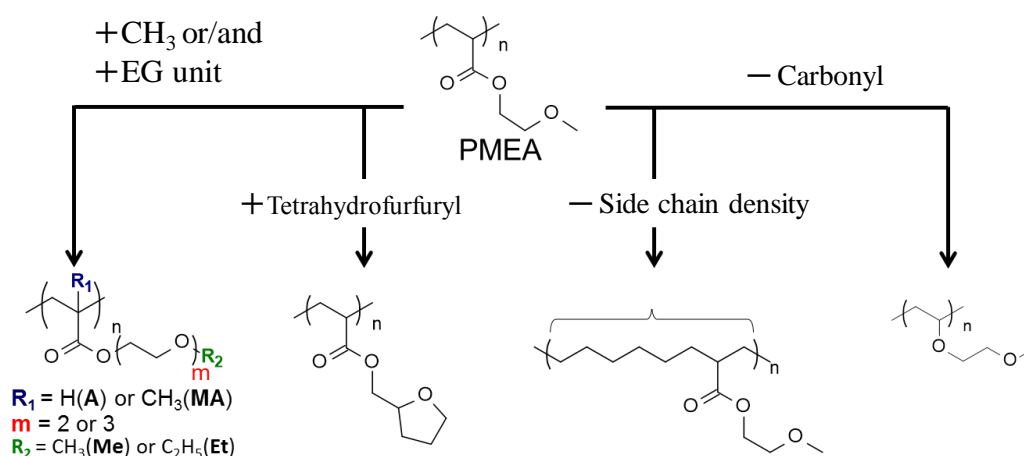


図 2. 含水時に形成される中間水量を制御する合成の例: 高分子の主鎖・側鎖の化学構造、構成元素、含水時の高分子主鎖・側鎖の分子運動性および水分子との結合力を変えることで、中間水量の制御が可能である。

考慮することも重要である。

以上の考え方を基盤として、高分子の主鎖・側鎖の化学構造、構成元素、含水時の高分子主鎖・側鎖の分子運動性および水分子との結合力を変えることで、中間水量の制御が可能である¹²⁻¹⁵⁾ (図2)。各種高分子の中から血液適合性に優れた高分子をスクリーニングすることもできる。これまでに知られている血液適合性材料は、タンパク質の吸着・変性や血球細胞接着が引き起こされない性質を示すものであったが、浮遊系の血球細胞は接着しないが、接着系細胞などは接着する材料が見出された¹⁶⁻²¹⁾。中間水の量に依存して対象となる細胞の接着性が変化した。

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の程度が、血球細胞が接着するためのフィブリノーゲンと接着系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¹⁶⁻²¹⁾。また、タンパク質の吸着とそれに伴う構造変化が、中間水の量によって制御できることを見出している。さらに、細胞のインテグリンレセプターを介した接着機構のほかに、インテグリンを介さない接着機構が存在することも明らかになっている(図3)。

中間水量の異なる高分子を用いることで、インテグリン依存的、あるいは非依存的な細胞接着性の違いが生じ、異なる細胞種が混合した系から特定の細胞を分離あるいは濃縮できる可能性が示された。

6. まとめと将来展望

材料の新しい設計概念である中間水コンセプトは、本質的には、水分子と材料の相互作用に関するものである。生体高分子と生体親和性合成高分子の共通点である中間水に着眼した本コンセプトは、生理環境における材料の物性と性能を分子レベルで理解するのに役に立つ。また、水環境で使用されるソフトエレクトロニクス、ソフトロボティクス、ソフトエネルギー分野で必要となるトレードオフの機能を両立させた多機能高分子の設計やスクリーニングに貢献できると考えられる。

8. 謝辞

バイオ界面水の役割の解明と分子設計に関する勉強会：鶴田禎二フォーラムのメンバーに感謝申し上げます。

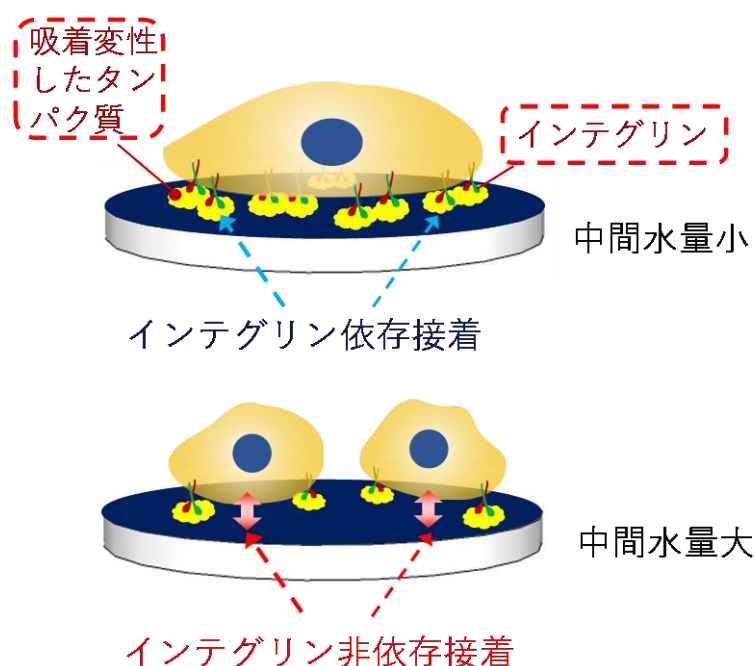


図3. 中間水量の異なる材料上での細胞の接着機構

9. 参考文献

- 1) 田畑 泰彦, 埴 隆夫, 岡野 光夫, バイオマテリアル: その基礎と先端研究への展開, 東京化学同人 2016.
- 2) Special Issue on the occasion of the 90th birthday of Prof T. Tsuruta, The roles of water molecules in the interfaces between biological systems and polymers, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 21, 1827-1970 (2010).
- 3) M. Tanaka, A. Mochizuki, N. Ishii, T. Motomura, T. Hatakeyama, Study on Blood Compatibility of Poly(2-Methoxyethylacrylate) – Relationship between Water Structure and Platelet Compatibility in Poly(2-methoxyethylacrylate-co-2-hydroxyethylmethacrylate) –. *Biomacromolecules*, 3, 36-41 (2002).
- 4) M. Tanaka, A. Mochizuki, Effect of water structure on blood compatibility – Thermal analysis of water in poly(meth)acrylate –. *J. Biomed. Mater. Res.* 68A(3), 684-695 (2004).
- 5) S. Morita, M. Tanaka, Y. Ozaki, Time-Resolved In-Situ ATR-IR Observations of Water Sorption Process into a Poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) Film. *Langmuir*, 23, 3750-3761 (2007).
- 6) S. Morita, M. Tanaka, Effect of Sodium Chloride on Hydration Structures of PMEA and P(MPC-r-BMA). *Langmuir*, 30, 10698-10703 (2014).
- 7) Y. Miwa, H. Ishida, H. Saitô, M. Tanaka, A. Mochizuki, Network structures and dynamics of dry and swollen poly(acrylate)s. Characterization of high- and low-frequency motions as revealed by suppressed or recovered intensities (SRI) analysis of ¹³C NMR. *Polymer*, 50, 6091- 6099 (2009).
- 8) T. Hayashi, Y. Tanaka, Y. Koide, M. Tanaka, M. Hara, Mechanism Underlying Bioinertness of Self-assembled Monolayers of Oligo(ethyleneglycol)-terminated Alkanethiols on Gold: Protein Adsorption, Platelet Adhesion, and Surface Forces. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14, 10194-10206 (2012).
- 9) T. Sekine, Y. Tanaka, M. Tanaka, and T. Hayashi, Evaluation of Factors to Determine Platelet Compatibility by Using Self-Assembled Monolayers with a Chemical Gradient, *Langmuir*, 31, 7100-7105 (2015).
- 10) D. Murakami, S. Kobayashi, M. Tanaka, Interfacial Structures and Fibrinogen Adsorption at Blood-Compatible Polymer/Water Interfaces. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2, 2122–2126 (2016).
- 11) T. Hatakeyama, M. Tanaka, H. Hatakeyama, Studies on bound water restrained by poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC): Comparison of the polysaccharides-water systems. *Acta Biomaterialia*, 6, 2077-2082 (2010).
- 12) K. Sato, S. Kobayashi, M. Kusakari, S. Watahiki, M. Oikawa, T. Hoshihara, M. Tanaka, The relationship between water structure and blood compatibility in poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) analogues, *Macromol. Biosci.*, 15, 1296-1303 (2015).
- 13) S. Kobayashi, K. Fukuda, M. Kataoka, M. Tanaka, Regioselective Ring-Opening Metathesis Polymerization of 3-Substituted Cyclooctenes with Ether Side-Chains. *Macromolecules*, 49, 2493-2501 (2016).
- 14) K. Osawa, S. Kobayashi, M. Tanaka, Synthesis of Sequence-Specific Polymers with Amide Side-chains via Regio-/stereoselective Ring-opening Metathesis Polymerization of 3-Substituted *cis*-Cycloocte. *Macromolecules*, 49, 8154–8161(2016).
- 15) K. Sato, S. Kobayashi, A. Sekishita, M. Wakui, M. Tanaka, Synthesis and Thrombogenicity Evaluation of Poly(3-methoxypropionic acid vinyl ester): a candidate for blood compatible polymer, *Biomacromolecules*, 18, 1609-1616 (2017).
- 16) C. Sato, M. Aoki, M. Tanaka, Blood-compatible poly(2-methoxyethyl acrylate) for the adhesion and proliferation of endothelial and smooth muscle cells. *Colloids and Surf. B: Biointerfaces*, 145, 586-596 (2016).
- 17) T. Hoshihara, M. Nikaido, M. Tanaka, Characterization of the mechanisms of attachment of tissue-derived cell lines to blood-compatible polymers. *Adv. Healthcare Mater.*, 3, 775-784 (2014).
- 18) M. Tanaka, K. Sato, E. Kitakami, S. Kobayashi, T. Hoshihara, K. Fukushima, Design of biocompatible and biodegradable polymers based on the intermediate water concept. *Polym. J.*, 47, 114-121 (2015).
- 19) T. Hoshihara, E. Nemoto, K. Sato, T. Orui, T. Otaki, A. Yoshihiro, M. Tanaka. Regulation of the contribution of integrin to cell attachment on poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) analogous polymers for attachment-based cell enrichment. *PLoS One*, 10, e0136066 (2015).
- 20) T. Hoshihara, T. Otaki, E. Nemoto, H. Maruyama, M. Tanaka. Blood compatible polymer for hepatocyte culture with high hepatocyte-specific functions toward bioartificial liver development. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7, 18096-18103 (2015).
- 21) T. Hoshihara, E. Nemoto, K. Sato, H. Maruyama, C. Endo, M. Tanaka, Promotion of adipogenesis of 3T3-L1 cells on protein adsorption-suppressing poly (2-methoxyethyl acrylate) analogous polymers. *Biomacromolecules*, 17, 3808-3815 (2016).