

It is extremely important to handle cells to progress the tissue growth and engineering. In this study, we propose a new hydrogel system "cell-container" which can encapsulate and maintain the functional cells and proteins with high viability and activity. It was considered that the reversible polymeric hydrogel satisfied the requirements. Preparation of a recoverable hydrogel with water-soluble polymers will provide a new fixation method for target biomolecules, cells and tissues. Cross-linking of the polymer chains under mild condition in physiological conditions would be necessary for this purpose to avoid reduction of activity of the immobilized cells and the entrapped biomolecules. Also, cytocompatibility of the hydrogel would be important for its application as a cell container. To obtain the cytocompatibility of hydrogel, we focused on the cell membrane structure. We have reported that 2-methacryloyloxyethyl phosphocholine (MPC) polymers containing phospholipid polar group in the side chain have an excellent biocompatibility due to their ability to inhibit protein adsorption following biological responses (1).

In our previous studies, we have succeeded in spontaneous gelation of water-soluble phospholipid polymers from their aqueous solutions by hydrogen bonding without any physical treatments (2-7). Also, the hydrogel formed could be dissociated by change in pH, however, the pH inside of the hydrogel was low ($\text{pH} < 4$), which would be required in order for its application as a cell container.

It is well known that the boronic acid in a tetrahedral anionic structure makes stable complexes with diol compounds including PVA, glucose, sorbitol and so on (8-11). Moreover, the hydrogel formed by cross-linking between boronic acid and polyol compound can dissociate by addition of low molecular weight substances such as glucose. The hydrogels containing boronic acid moiety have attracted attention in the affinity chromatography of biological agents (10). Also, this reaction mechanism is well known as glucose concentration responsive hydrogels with application in glucose sensors (11). We propose the new hydrogel system based on this cross-linking mechanism will be useful to preserve the cells as cell container (Figure 1).

In this study, we synthesized a new water-soluble phospholipid polymer containing a *p*-vinylphenylboronic acid unit, that is, poly[MPC-*co*-*n*-BMA-*co*-*p*-vinylphenylboronic acid (VPBA)](PMBV). Also, we reported the synthesis and characterization of the polymer, formation and properties of polymeric hydrogel with PVA, and behavior of fibroblast cells in the hydrogel.

Materials and Method

Materials

MPC was synthesized by a previously reported method and used after recrystallization from acetonitrile (12). *n*-Butyl methacrylate (BMA) was

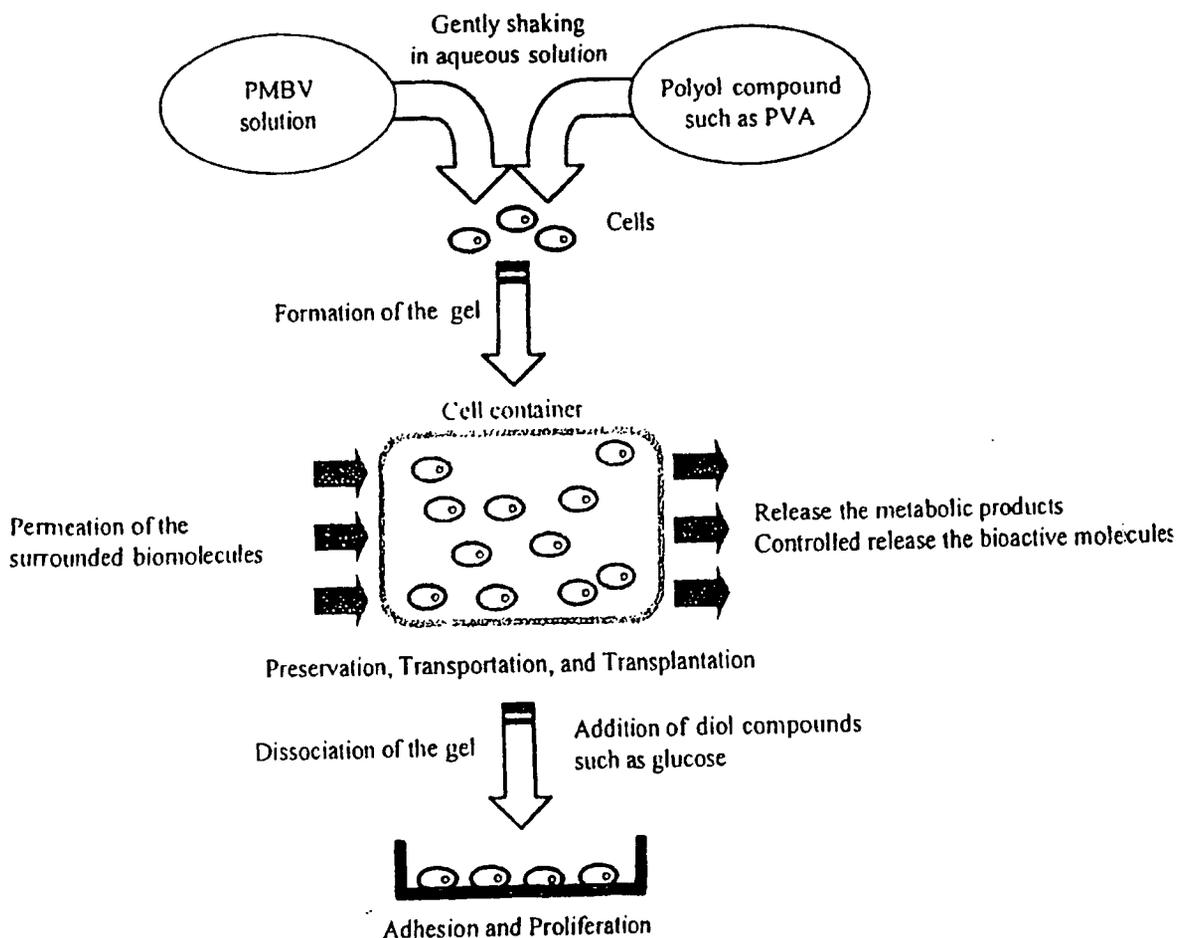


Figure 1. Basic concept of cell-container using with reversible polymer hydrogel system

purchased from Nakalai Tesque Co. Ltd. (Tokyo, Japan) and purified by distillation under reduced pressure. *p*-Vinylphenylboronic acid (VPBA) was kindly provided from Osaka Organic Chemical Industry Ltd. (Osaka, Japan). Poly(vinyl alcohol)(PVA, polymerization degree 1500, saponification value 86-90 mol%) was purchased from Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan). Other organic reagents and solvents were commercially available reagents of extra-pure grade and were used without further purification.

Cell culture medium (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM), phosphate buffered saline (PBS), and other substances for cell culture were purchased from Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA.

Synthesis of Phospholipid Polymers

Poly(MPC-*co*-*n*-BMA-*co*-VPBA)(PMBV) were synthesized by a conventional radical polymerization technique using α, α' -azobis-isobutyronitrile (AIBN) as an initiator. The synthesis procedure was as follows; MPC (M.W.=295.27), BMA (M.W.=142.2) and VPBA (M.W.=147.8) were placed in

a glass ampoule, and the mixture was diluted with ethanol to 1 mol/L of monomer concentration. AIBN was dissolved in a mixture solution (1 mmol/L). Argon gas was bubbled into the solution to eliminate oxygen for 5 min, and then the glass ampoule was sealed. The polymerization was performed at 60 °C for given time. After cooling the glass ampoule, the contents were poured into a large amount of mixture of diethyl ether and chloroform (8/2 by volume) to eliminate remaining monomer and precipitate the polymer. The polymer as a precipitate was filtered off using glass-filter and dried in vacuum. Chemical structure of the polymer was confirmed by ¹H-NMR and FT-IR measurements. The mole fraction of each component in the copolymer was determined by the ¹H-NMR measurement. Molecular weight of polymers was measured by a gel permeation chromatography system (JASCO Co. Ltd., Tokyo Japan). The chemical structure and synthetic results of polymers are summarized in Figure 2 and Table 1.

Fibroblast Cell Culture in the Hydrogel

To preserve the cells in the hydrogel, mouse fibroblast cell line, L929, was used as model cells. L929 cells were routinely cultured in Dulbecco's modified eagle minimum essential medium (GIBCO[®], Invitrogen Corp., Grand Island, NY), supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO[®], Invitrogen Corp., Grand Island, NY) at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere. After trypsinization, the cell density was adjusted to 5 × 10³ cells/mL by the cell culture medium containing 5 wt% of PMBV631. The L929/PMBV631 solution was mixed with 5 wt% of PVA solution, and gently shaken to form the PMBV hydrogel containing L929 cells. The shape and morphology of the L929 cells was observed by using a phase-contrast microscope (BX60, OLYMPUS, Tokyo, Japan). After 5 days, the hydrogel was dissociated, and the inner L929 cells were plated on the tissue culture polystyrene (TCPS).

Results and Discussion

Both water-soluble and water-insoluble phospholipid polymers containing VPBA were synthesized by the conventional radical polymerization. The water-solubility of polymers depended on the MPC mole fraction in polymer. The chemical structure and synthetic results of polymers are summarized in Figure 2 and Table 1.

The water-soluble phospholipid polymer bearing both MPC units and VPBA units, PMBV631, formed a hydrogel after mixing with PVA aqueous solution. Figure 3 shows the schematic representation of the covalent cross-linking between PMBV631 and PVA. The gelation mechanism was covalent

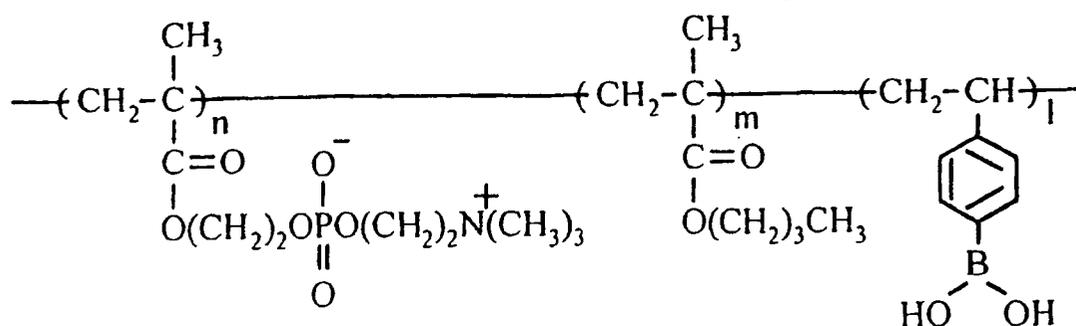


Figure 2. Chemical structure of poly(MPC-co-n-BMA-co-VPBA)(PMBV)

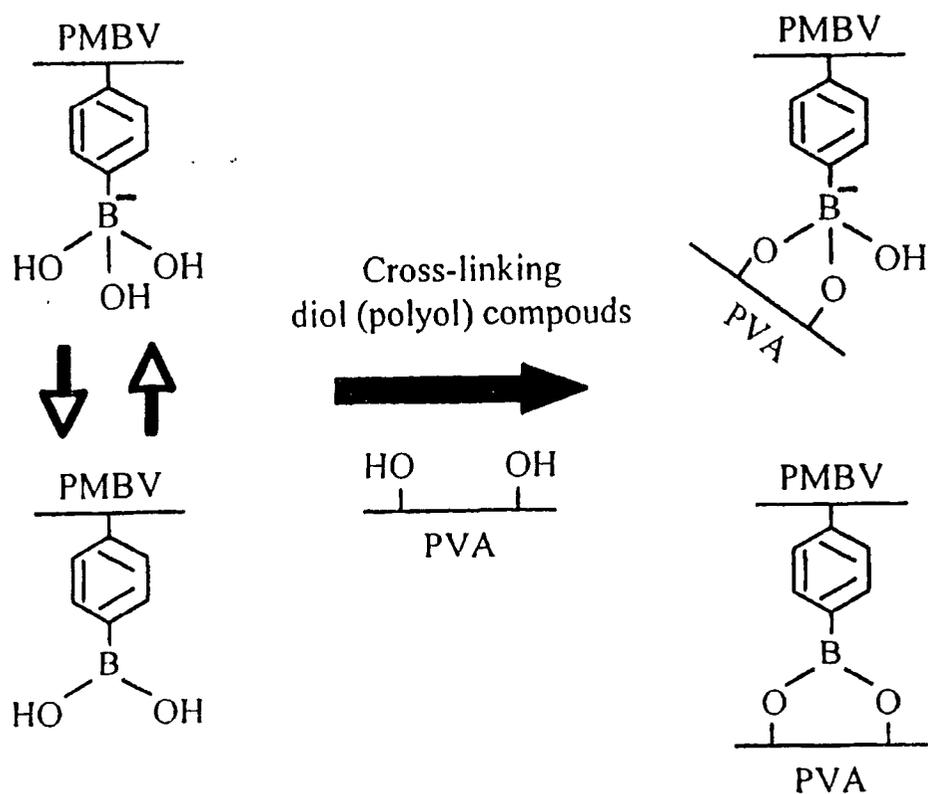


Figure 3. Cross-linking mechanism between the PMBV631 and the diol-compound (PVA)

Table 1. Synthetic results of PMBV

Abbreviation	In feed (mole fraction) MPC/BMA/VPBA	In polymer (mole fraction) MPC/BMA/VPBA	Polymerization time (h)	Yield (%)	Solubility in water	M.W. (10^3)	Mw/Mn
PMBV631	0.6/0.3/0.1	0.6/0.3/0.1	6	71	+	54	2.6
PMBV361	0.3/0.6/0.1	0.4/0.5/0.1	3	62	-	88	1.6

cross-linking between the phenylboronic acid of VPBA and hydroxyl groups of PVA. Before mixing, both polymer aqueous solutions were low viscosity liquids. After mixing, the viscosity gradually increased, and finally, the mixture formed the hydrogel. The combination of PMBV631 and PVA that formed the hydrogels are summarized in Table 2. Also, the typical image of the hydrogel is shown in Figure 4. Figure 5 shows SEM images of the cross section of the PMBV hydrogel after lyophilization. Every gel had a porous structure. The pore size of the network was almost 1 μm under the dry condition. The gelation between PMBV631 and PVA was confirmed even though phosphate buffered saline and cell culture medium were used. It is hypothesized that this hydrogelation mechanism does not affect the ionic strength of saline and medium.

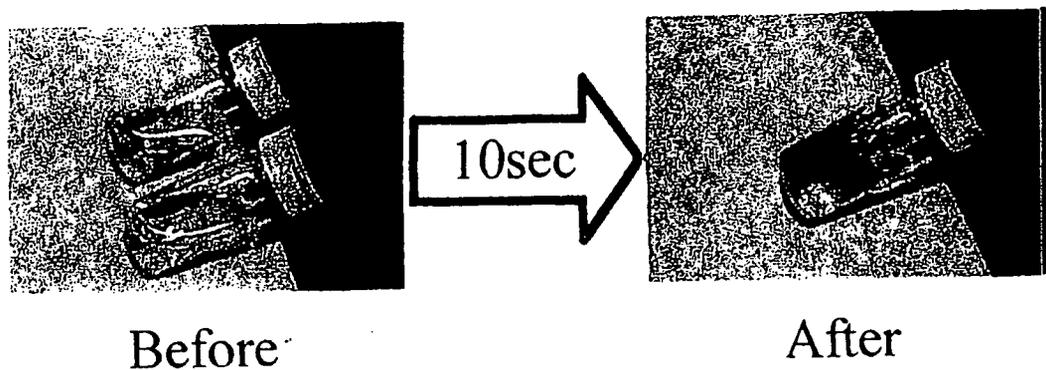


Figure 4. Typical image of PMBV hydrogel before and after shaking

Table 2. Composition dependency of hydrogel formation

(wt%)		PMBV631					Abb.	PMBV631 (wt%)	PVA (wt%)
		5.0	2.5	1.2	0.6	0.3			
PVA	5.0	○	○	×	×	×	#001	5.0	5.0
	2.5	○	○	×	×	×	#002	5.0	2.5
	1.2	○	×	×	×	×	#003	2.5	5.0
	0.6	○	×	×	×	×	#004	2.5	2.5
	0.3	×	×	×	×	×			

To demonstrate the application of the hydrogel as a cell-container, mouse fibroblast (L929) cells were cultured (preserved) in the hydrogel. In this culture method, the PMBV631 was dissolved using cell culture medium containing PBS. Previous reports have observed that the phospholipid polymer containing

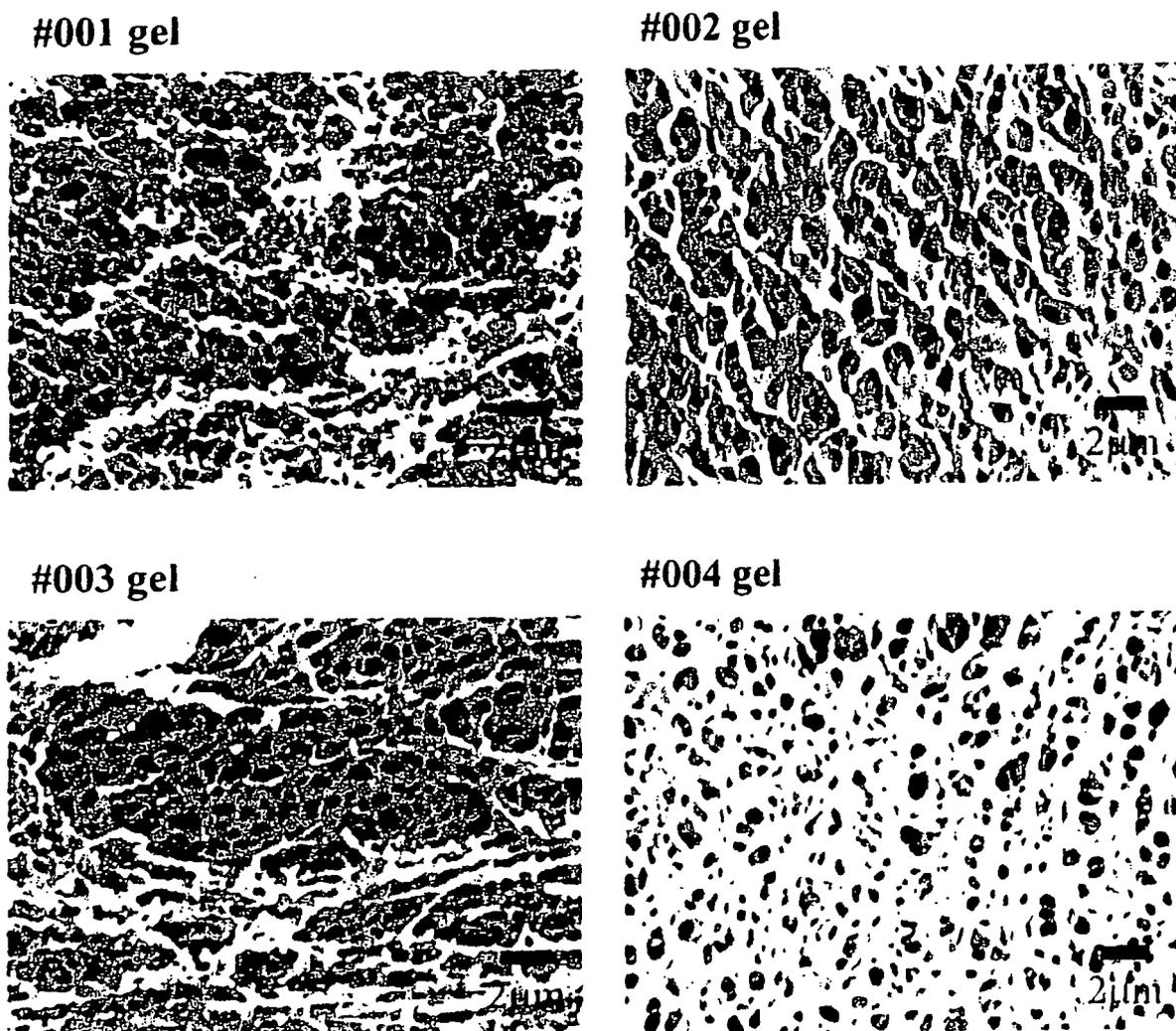


Figure 5. SEM images of the cross section of the various PMBV hydrogels

MPC units reduced the nonspecific interaction between proteins and cells (13). The cells were suspended in 2.5 wt% of PMBV631 medium solution. The PMBV medium solution containing the cells was mixed with 5.0 wt% of PVA aqueous solution. The gelation was confirmed after gently shaking. Figure 6 shows the phase contrast microscope images of the cells in the gel. The cell morphology was circular and the cells did not spread in the network. Furthermore, the cells did not aggregate each other. When the cells were cultured on the phospholipid polymer surface, they locally aggregated each other. Thus, it was considered that this hydrogel could hold the individual cells. After 5 days culture without changing the medium, the hydrogel was dissociated and the inner cells were seeded on the conventional tissue culture polystyrene plate. The cells immediately adhered and proliferated normally on the TCPS. Namely, the cells had enough viability even in the PMBV hydrogel during 5 days. It was considered that the PMBV hydrogel functioned only as a cell

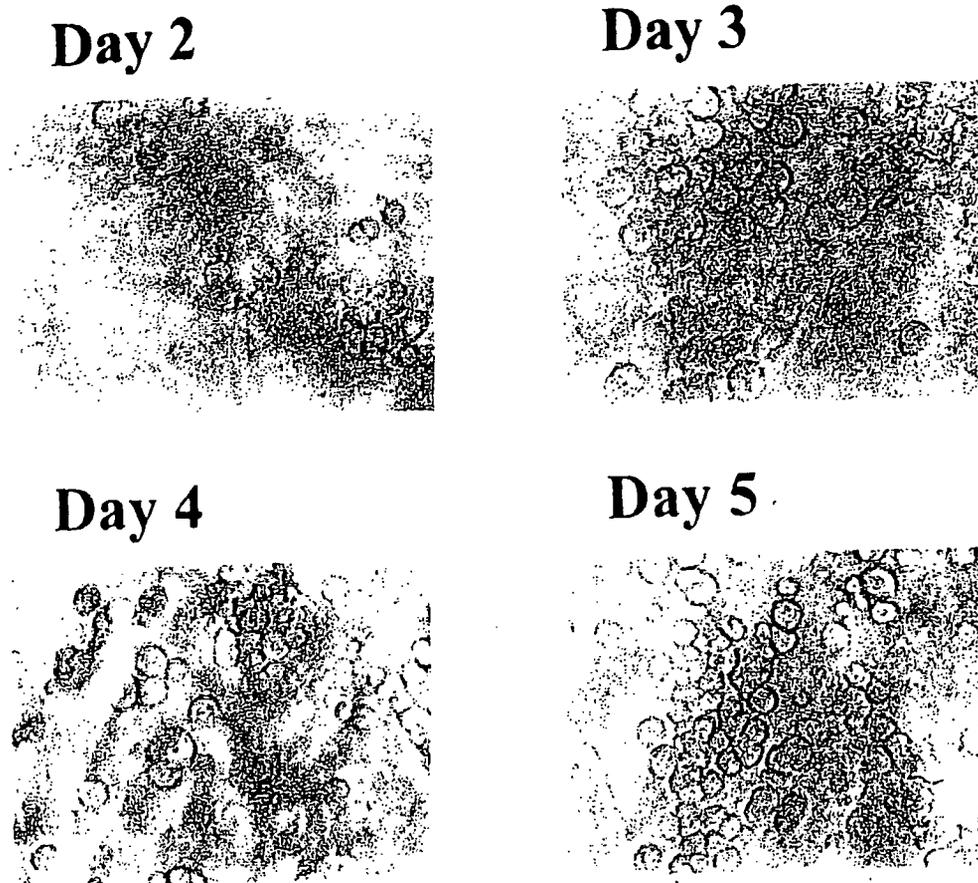


Figure 6. Phase contrast microscope images of L929 fibroblast cell cultured in the PMBV hydrogel (2.5 wt% PMBV and 5.0 wt% PVA)

holding matrix. Also, this result indicated that the PMBV hydrogel has a good cytocompatibility to apply as a platform matrix for its use as cell-container.

Conclusion

We prepared water-soluble and water-insoluble phospholipid polymers bearing both MPC units and VPBA units. The gelation between the phospholipid polymer and PVA spontaneously occurred after mixing the two kinds of polymer aqueous solutions. The gelation mechanism was based on covalently cross-linking between phenylboronic acid moiety of phospholipid polymer and hydroxyl groups of PVA. The hydrogel formed not only in water but also in saline including cell culture medium. The viability of the cells was not affected from the hydrogel. It was concluded that the novel hydrogel system based on the phospholipid polymer might be applied as cell container to preserve and transport the cells.

References

1. Ishihara, K.; Nomura, H.; Mihara, T.; Kurita, K.; Iwasaki, Y.; Nakabayashi, N. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39*, 323.
2. Nam, K.; Watanabe, J.; Ishihara, K. *Polymer* **2005**, *46(13)*, 4707.
3. Kimura, M.; Fukumoto, K.; Watanabe, J.; Takai, M.; Ishihara, K. *Biomaterials* **2005**, *26(34)*, 6853.
4. Kimura, M.; Fukumoto, K.; Watanabe, J.; Ishihara, K. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **2004**, *15(5)*, 631
5. Nam, K.; Watanabe, J.; Ishihara, K. *Eur. J. Pharm.* **2004**, *23(3)*, 261.
6. Nam, K.; Watanabe, J.; Ishihara, K. *Biomacromolecules* **2002**, *3(1)*, 100.
7. Nam, K.; Watanabe, J.; Ishihara, K. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **2002**, *13(11)*, 1259.
8. Kitano, S.; Koyama, Y.; Kataoka, K.; Okano, T.; Sakurai, J. *Control. Rel.* **1992**, *19*, 161.
9. Weith, H.; Wiebers, J.; Gilham, P. *Biochemistry* **1970**, *9(22)*, 4396.
10. Kikuchi, A.; Suzuki, K.; Okabayashi, O.; Hoshino, H.; Kataoka, K.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 823.
11. Matsumoto, A.; Yoshida, R.; Kataoka, K. *Biomacromolecules* **2004**, *5(3)*, 1038
12. Ishihara, K.; Ueda, T.; Nakabayashi, N. *Polym. J.* **1990**, *22*, 355.
13. Sawada, S.; Sakaki, S.; Iwasaki, Y.; Nakabayashi, N.; Ishihara, K. *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, *64A(3)*, 411.

ナノバイオインターフェイス

N a n o B i o e n g i n e e r i n g

医療、食料、環境あるいはエネルギーなど、現代社会が抱える問題の解決に、ナノバイオテクノロジーの発展が期待されている。ゲノム解析の終わった現在、遺伝子自体の検査、診断、解析が進み、これから生み出されるプロテオームもタンパク質試薬、創薬の可能性から、高い注目が集まっている。一方、半導体ナノテクノロジーの分野からは超精密微細加工技術が提供され、バイオ分子の分離、分析が微量で行えるようになってきた。タンパク質、DNAなどの生命の起源にかかわるバイオ分子をナノオーダーで扱うこれらの技術の複合化は、これからのバイオ関連分野に革命をもたらす。まさに、ナノバイオテクノロジー時代である。一方で、テクノロジーをエンジニアリングへと変換するためのツールを考えてみると、まだまだこれに追いついていない状況が見て取れる。バイオ分子を安全に、安定に、またその特徴である生物学的特異性を維持したまま、人工系に取り込んでこそ、社会に貢献できるバイオエンジニアリングが確立される。バイオ系と人工系の接触界面での反応を制御することが、鍵となることは間違いない事実である。これを考えると、基盤となる材料についての知識が極めて重要となる。例えば金属、セラミックスあるいはプラスチック・ゴムなどの基盤となる優れた材料はあるものの、バイオ分子の吸着がゼロである材料は存在しない。これは、ナノオーダーのバイオエンジニアリングを推進し、デバイスを開発する際には大きな障害になっている。このような観点から、バイオ系と人工系との理想的界面であるバイオインターフェイスに焦点を当てて解説する。

para-
graph

ナノバイオインターフェイスの役割

バイオ分子を1つの素子としたデバイスは、低侵襲で治療、微量検体での検査・診断への応用を目指して、高機能化・高精度化するとともに、微細加工技術と相伴ってマイクロサイズへと移行している。このデバイスを作成するためには、対象となるバイオ分子や細胞の性質を考慮した材料および表面が強く求められる。

ナノバイオインターフェイスとは、ナノメートルオーダーで構築される材料表面、ナノグラム・モルオーダーの検体を対象としたデバイス表面、ナノオーダーの時間での分子運動を考慮した表面、あるいはナノメートルサイズの粒子、ファイバーなどからなるデバイス表面などと定義できる。

本章では、バイオデバイス表面の特性を、ナノオーダーでの精密制御を可能にする生体親和性材料技術を紹介する。

医療において診断、治療に利用する医療デバイスの必要性は、超高齢社会となった我が国にとってますます重要となってきている。質の良い医療を求める声とともに、生活習慣病や高齢患者の人口増加は治療期間がかかることが懸念され、医療費の増加はとどまるところを知らず、国民負担の劇的な拡大を引き起こす。これからは予防医学の進展と治療から予防への転換、低侵襲治療のさらなる発展が問題解決の1つの方向と思われる。その中で、新しい医療デバイスの開発はより加速されるべきである。

バイオ技術を利用して生体計測する際の問題点を整理してみよう。生体の情報を確実に高感度

で得るためには、バイオ分子を素子として利用することが不可欠である。例えば血液中から糖（グルコース）濃度を測定しようとするとき、酵素を利用して混合物から糖のみを取り出すことが必要となる。この原理に基づいて、グルコースセンサーが1960年代から研究されてきた。一部ではかなり完成度が上がり、ディスプレイ仕様の血糖値計ができるまでに至った。一方で、体内に埋入して長時間計測しようとするとき、さまざまな生体反応のために機能をまったく発揮することができない¹⁾。これは、センサー表面と生体との相互作用が引き起こす生体側の異物排除反応によるところが大きい。すなわち、より生体に優しく、親和する表面を創製することが必要となる。さらに、タンパク質チップやDNAチップにおいても、対象となるバイオ分子の非特異的な吸着、構造変化に伴う生理活性の低下などを阻止する表面処理法が最終的なSignal to Noise ratio (S/N比) ²⁾を高めるために必要となる。

21世紀はバイオ技術の革命的展開が社会を大きく変えると期待されている。これに伴い、さまざまな分野においてバイオ技術に関する研究、開発が精力的に続けられてきている。すなわち、医療のみならず、製薬、食品、環境、あるいはエネルギーなど地球規模での問題解決を図り、さらに豊かで健康な社会の形成が目的となっている。少子・高齢社会となり労働人口の減少が懸念される日本においては、バイオ技術の発展と応用が極めて大切になることは間違いない。これらのバイオ技術の中で最も注目されているものの1つがナノプロセッシング技術との融合で生み出されるバイオチップ類であろう²⁾。

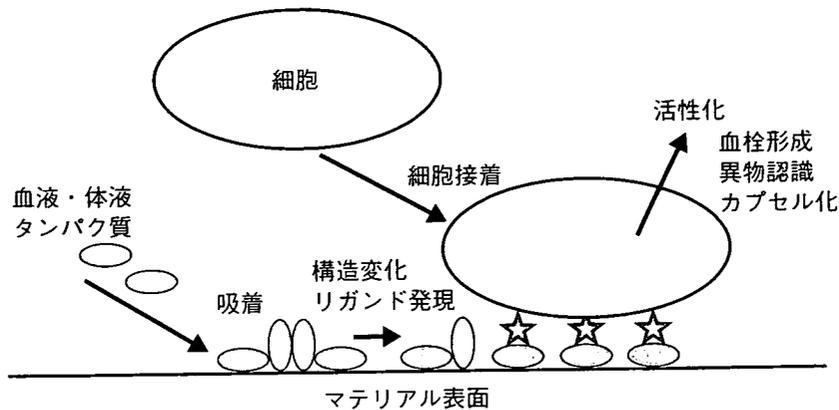
生医学分野では疾病の予防や診断、治療のために多くの臨床検査が行われており、少量の検体サンプルから多項目の検査が同時期に解析されるようになってきている。これを飛躍的に具現化するためには、適正なマテリアル設計が不可欠である。周知のようにナノレベルで生体内情報を検知するような先端計測技術に関する研究が推進されており、我が国の当該分野での競争力は支援体制を鑑みると相当に秀でている。この研究分野は生命科学技術の基盤となるだけでなく、健康寿命を増進させるという国民の率直な願いにも直結している。ナノレベルでの分子診断や治療が実現すれば、疾病の早期発見により迅速な社会復帰が実現できる体制が確立される。

半導体メーカーや精密機械メーカーなどは、これまでの精密なプロセッシング技術を基にして、バイオチップの開発に取り組みつつある。特にチップアレイ、マイクロ流路、マイクロキャピラリーなどは μ -Total Analysis System (μ -TAS) ²⁾として、極めて高度の微細加工技術が適用されている。しかし、これらだけで目的が達成されるのであろうか。答えは否定的であることはいうまでもない。これはまさに表面処理技術の欠如からくるものであり、対象がバイオ分子であることの特徴でもある。ここで提案する表面処理法は新しい概念に基づいたポリマーナノテクノロジーであり、見方を変えれば微細加工技術によるハードの作製に対応したソフトウェアの提供である。

注1：S/N比 ある環境下での望ましくない情報値（N；ノイズ）に対する、求める情報値（S；シグナル）の比。S/N比が高いほど、高感度な測定が可能となる。

注2： μ -Total Analysis System (μ -TAS) 半導体製造技術を応用し、センサなどの要素を小型化・集積化した化学分析機器のこと。システムの小型化、低コスト価はもちろん、サンプルの前処置自動化ができる、少量のサンプルで計測ができる、検出時間や反応時間を短縮するなど、作業の効率化を図ることが可能である（I部4章参照）。

図2-1 マテリアル表面での生体反応



生体親和性をマテリアルに持たせることは、医療分野で利用される人工臓器の開発の歴史に対応している。生体では自己以外の成分を排除する防御機構が作用している。例えば、血液凝固反応や免疫反応などである。これらに深くかかわる現象がタンパク質の吸着・構造変化である。生体環境に存在することで安定な構造と機能発現するタンパク質が、異物に接触すると構造変化を生じ、これが生体反応の引き金となる(図2-1)³⁾。マテリアル表面においてもこのタンパク質の吸着・構造変化が容易に生じるために、人工臓器を利用する治療の妨げとなっている。血液や体液に含まれる微量な検体を直接測定することを目的とするバイオデバイスにおいては、より厳しい状況になる。すなわち、検体と接触するマテリアルの表面でタンパク質の吸着が起こると、検体成分の組成が変化してしまい、また微量な成分の検出を妨げるためである。従って、これを避けるための表面修飾マテリアルとそのプロセスの開拓が、ナノ医療や低侵襲医療に利用するデバイスの開発には極めて重要である。



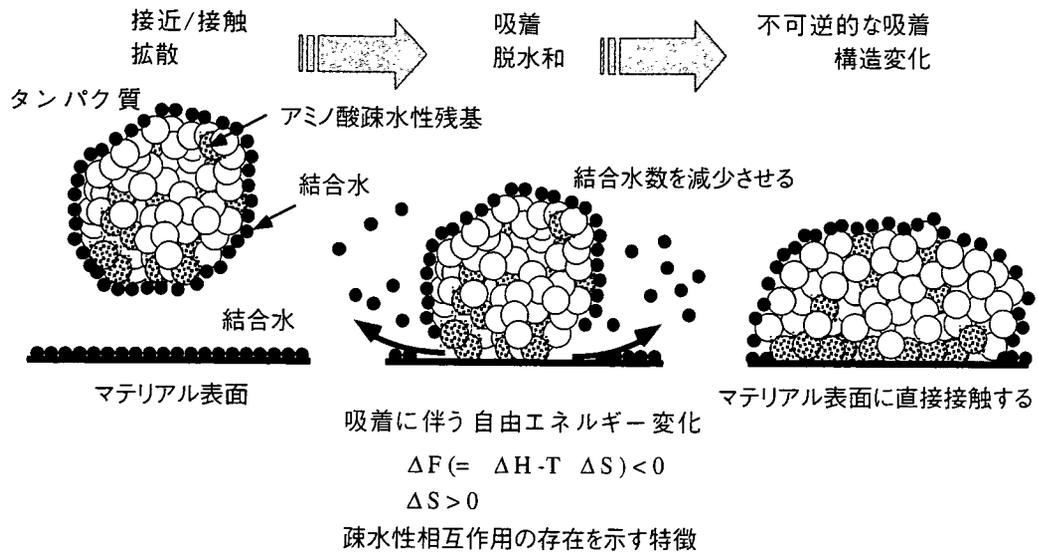
ナノバイオ界面での生体反応

1) タンパク質の構造と機能

固体表面にタンパク質を含む液相が接触すると、大抵の場合速やかにタンパク質が表面に吸着し、次第に安定な吸着層を形成する。この現象は医療、臨床検査のようないわゆるバイオ分野に限らず、食料品や医薬品製造などの工業、あるいは海洋生物の付着、汚染防止などの環境、エネルギー関連でも極めて重要な問題として、解決が望まれている。一方で、最近のバイオテクノロジーの進展は細胞や生体組織を自由に操れるようになってきている。このような研究では、細胞増殖因子などのタンパク質を効率よく利用することが望まれており、固定化や徐放化など、やはりマテリアルとタンパク質との相互作用を制御することが必要となってきている。すなわち、タンパク質の吸着を制御できるマテリアルを創製することは、広範な領域への貢献が約束されているといっても過言ではない。

タンパク質は両性電解質であるアミノ酸が縮合重合した化合物である⁴⁾。生体内で生命を維持するのに不可欠な機能分子として働くばかりか、生体を構成しているマトリックスとしての役割をする。タンパク質を作っているアミノ酸の種類はわずか20種類ほどであるが、タンパク質の種類は極めて多く、その構造もさまざまである。同じようなアミノ酸残基を持つタンパク

図2-2 マテリアル表面へのタンパク質吸着機構



質ができたとしても、違った性質を持つことがある。例えば、タンパク質水溶液を加熱してみると、水に溶けていたタンパク質が凝固し、溶けなくなる現象が認められる。これはタンパク質分子の立体構造が変化することに起因する。すなわち、タンパク質には芳香環やアルキル基などの疎水性の部分、カルボキシル基やアミノ基のような荷電を持つ部分、あるいは水酸基など水素結合に関与する部分などさまざまな分子間相互作用をするアミノ酸残基が含まれている。これらの部分が相互作用することによりお互いに微妙な空間位置をとるため、タンパク質分子全体の立体構造が決定される。このことは、ある部分の分子間力が微妙に変化すると、それがタンパク質分子全体に影響を及ぼすことになることを意味している。このように、タンパク質はアミノ酸残基の配列である一次構造、 α -ヘリクスや β -ターンなどポリペプチド鎖の構造である二次構造、タンパク質分子全体の立体構造である三次構造と極めて厳密に構造が決まっている。このような高次構造の規定が、機能分子として、高い選択性と特異性を持つタンパク質の特徴を決定している。

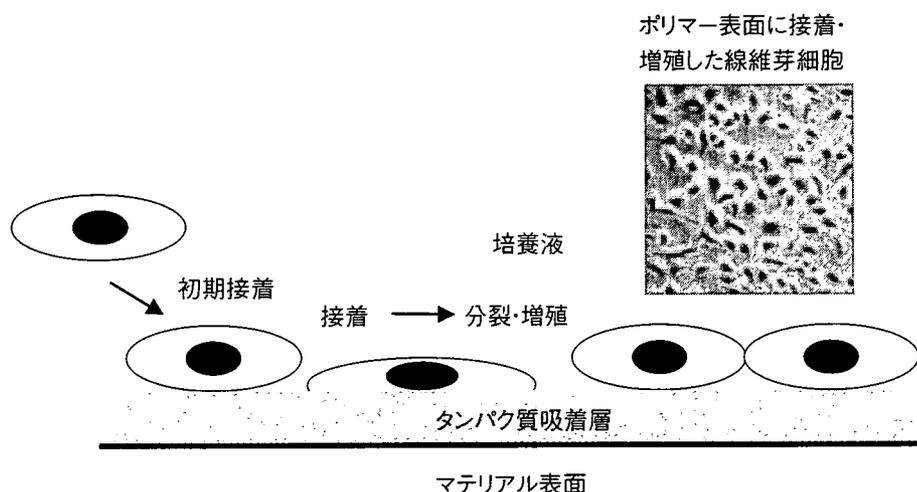
2) タンパク質の吸着挙動

タンパク質は界面活性剤や変性剤の添加によりその高次構造が変化する。また、油-水界面に吸着（接触）した場合においても、著しい構造変化を起こす。油との接触は、タンパク質分子内の水素結合の破壊、さらにタンパク質分子内の疎水性アミノ酸残基に起因する疎水性相互作用のバランスの変化の要因となる。すなわち、タンパク質分子周囲の環境がわずかに変化するだけで、微妙な分子間力のバランスで規定されている構造の変化が生じるのである。この構造変化が、不可逆的で安定なマテリアル表面へのタンパク質吸着という現象につながる（図2-2）。すなわち、ポリマー表面へのタンパク質の吸着には、ポリマーを取り巻く水の状態が大きく関与する（3節参照）⁵⁾。タンパク質が表面に疎水性相互作用で吸着する際、タンパク質と表面での結合水の交換が必要となる。これはマテリアル表面の結合水量がタンパク質吸着を規定する重要な因子となることを示している。ポリマー表面で起こるタンパク質の吸着は、表面の水のランダムネットワーク（結合水層）にトラップされることで開始する。これより、タンパク質の吸着を抑制するには、マテリアル表面近傍の水を自由水（バルク水）に維持し、タンパ

表2-1 タンパク質の分子サイズと理論的な単分子層吸着量

タンパク質	分子量	大きさ(nm)	1分子の専有面積(nm ²)	単分子層吸着量(μg/cm ²)
アルブミン	67K	4.0x11.5	縦向き 12.6 横向き 46	0.90 0.25
免疫グロブリン	169K	4.4x23.5	縦向き 15.2 横向き 103	1.85 0.27
フィブリノーゲン	340K	6.5x47.5	縦向き 33.2 横向き 309	1.70 0.18

図2-3 細胞の接着挙動



ク質側から見ると界面が存在しないようにすることが極めて重要である。表2-1に代表的な血漿タンパク質分子の大きさと、表面に単分子層で吸着したときの吸着量を示した。実際は吸着したタンパク質の構造変化とともに、吸着状態が単層から多層へと移行し、安定な吸着層を形成するために吸着量はさらに多くなる。タンパク質の吸着は決して静的な現象ではなく、吸着したタンパク質が脱着する、あるいは溶液中に存在する他のタンパク質と交換するなどの動的平衡状態にある。従って、タンパク質の吸着挙動を評価する場合には十分に注意しなければならない。

最近のバイオ工学において、タンパク質を安定にマテリアルに固定化し、これをバイオ素子として利用することも多くなってきている。この場合においても、固定化したタンパク質の機能低下につながる構造変化を阻止することは大切である。

3) 細胞の接着挙動

細胞を懸濁した液をマテリアル表面に接触させると、マテリアルへの細胞付着、細胞接着および接着細胞の増殖という一連の過程が進行する(図2-3)。これには、マテリアル表面に吸着したタンパク質が重要な役割を演じており、その種類、量、分布あるいは構造変化が細胞接着、活性化、増殖、分化などを規定している。すなわち、マテリアル表面の情報が、表面へのタンパク質吸着という過程により翻訳されて細胞に伝達される。このことは、タンパク質の吸着状態を制御する方法論で、細胞機能の発現あるいは抑制をすることができるということである。

ポリマー表面の化学構造と培養細胞の相互作用が、ポリマーに細胞が接触して軽く付着する割合（初期付着率）、強く接着する割合（接着率）および細胞数が増加する速度（増殖速度）に分けて系統的に調べられた。その結果、細胞の初期付着率には化学構造の違いに対応した結果が得られた。アルキル基の炭素数が増加すると細胞の接着率は低下し、増殖速度は大きくなる傾向がある。芳香環には、細胞の接着を促進する効果が認められる。一方、細胞を付着しにくくするには、水溶性の長いポリマー鎖の導入が有効である。一般的に水素原子をフッ素原子に換えると、表面の自由エネルギーが低下するために細胞が接着し難くなる傾向もある。接着率が増加すると増殖速度は低下する傾向が認められる。言い換えれば、マテリアルに対する細胞の親和性が大きいほど細胞は増殖し難く、また、マテリアルに対する細胞の親和性が小さいほど細胞は増殖しやすい。マテリアルに対する細胞付着と細胞増殖との関係は、細胞の増殖過程を考えれば理解できる。細胞がマテリアル表面に付着し、細胞は扁平化する。その後、細胞は球状になって分裂が起こり、分裂した細胞は再び扁平化する。このように、マテリアル表面上で細胞の形態は扁平状から球状へ、そしてまた分裂した細胞の形態も同様に経時的に変化する。細胞機能を制御することは、細胞工学的手法による組織再生医療、細胞リアクターによる有用生理活性分子の産生、あるいは薬物や生理活性分子の効果を判断する細胞アレイなどの開発に不可欠であるため、バイオインターフェイスの創製が重要な要素となっている。

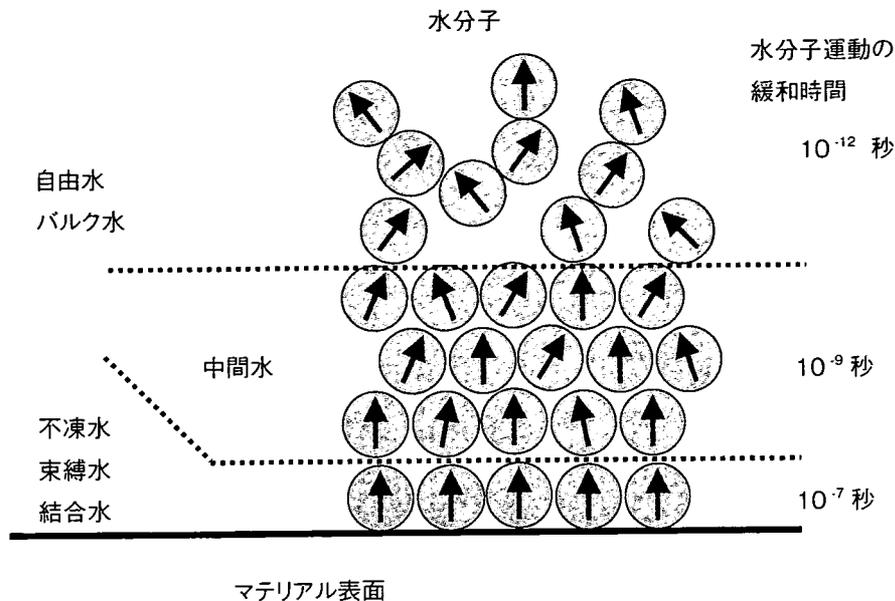


バイオインターフェイスの環境

生体成分を取り巻く環境は水環境であり、バイオマテリアルの生体親和性を判断する際には、必ず水を媒体としなければならない。水は分子量がわずか18しかないにもかかわらず、沸点が100℃と極めて高い。例えばメタン（分子量16）、エタン（分子量30）あるいはアンモニア（分子量17）など、水とほぼ同じ分子量を持つ化合物はほとんど常温で気体である。この差は生物が長い進化の過程で、常温で安定に液体として存在する水を生命活動の媒体として選択してきたことにつながるであろう。水分子は互いに強く水素結合をする性質を有する。これが高い沸点を持つ理由である⁵⁾。安定な水分子（バルク水）は、1分子が周囲の4分子の水と水素結合し、クラスター（分子の固まり）として存在する。このクラスターは 10^{-12} 秒程度の速さで、生成と消滅を繰り返しているといわれている。一方、マテリアル表面に対しても水分子は相互作用し、時には強く結合した構造となる（図2-4）。これは結合水と呼ばれ、水になじまないマテリアルと、水媒体との橋渡しのような役目を担っている。結合水の分子運動性は大きく抑制され、クラスター生成、消滅に要する時間はバルク水に比較すると100,000倍程度となる。一概に水といっても、性質の異なる状態が存在する。マテリアルが血液と接触した際に、まず血液中の水分子が表面に接触し、ついでイオン、タンパク質などが接触する。この際にタンパク質がマテリアル表面に吸着することとなり、構造変化を伴い、最終的な反応である細胞の接着につながる。すなわち、ポリマー表面へのタンパク質の吸着には、ポリマーを取り巻く水の状態が大きく関与する。

タンパク質の吸着はタンパク質の持つ結合水とポリマー表面の結合水の交換反応（共有化反応）を伴う、いわゆる疎水性相互作用が重要な役割を果たしている（図2-2参照）⁶⁾。これはマテリアル表面の結合水量がタンパク質吸着を規定する重要な因子となることを示している。ポリマー表面で起こるタンパク質の吸着は、表面の水のランダムネットワーク（結合水層）にトラップされることで開始する。これより、タンパク質の吸着を抑制するには、マテリアル表面近傍の水を自

図2-4 マテリアル表面での水の状態



由水（バルク水）に維持し、タンパク質側から見ると界面が存在しないようにすることが極めて重要である。

このようなマテリアル界面の環境を制御でき、溶存しているタンパク質に界面を認識させることがないマテリアルの獲得は、従来にない新しいバイオマテリアルを創製する。



ナノバイオインターフェイスを創る科学

1) ポリマーの構造化学的手法

生体を構成する分子の70%が水であること、血液の成分は水を主としていることなどから、水になじみやすい表面や、逆に水をはじく性質を持つ表面が血栓形成を阻止できると考えられた。確かに、表面に水の膜を安定に作り出すことができれば、界面がなくなり、タンパク質の吸着は起こらないであろう。そこで、ポリアクリルアミド (PAAm) やポリ (N-ビニルピロリドン) (PVPy) のように水に溶けるポリマーが利用された。これらのポリマーをマテリアルの表面に固定化すると、親水性の尺度である水に対する接触角は低下する。一方、汚れ防止に利用されている技術である撥水性の付与はどうであろうか。これらのマテリアルとしては、シリコーンオイルやフッ素系化合物が利用され、表面にコーティングされる。マテリアルと血液成分との直接的な相互作用がなくなると考えると、シリコーンゴムや代表的なフッ素系ポリマーであるポリ (四フッ化エチレン) (PTFE ; テフロン®) は良好な抗血栓性を示すはずである。しかし、親水性表面や疎水性表面のように、表面自由エネルギーや界面エネルギーを制御するという物理化学的な観点から分子設計され合成されてきたポリマーは、抗血栓性の獲得に成功したとはいえない³¹⁾。これらの概念により合成されたポリマーは、血栓形成の初期過程には有効であるものの、タンパク質の吸着を完全に阻止することはできず、吸着したタンパク質の種類が時間とともに変化する影響や吸着タンパク質の構造変化の誘起が問題となる。親水性表面

は血小板の粘着は抑制するが、活性化反応については阻止することができずに微小血栓を形成し毛細血管を閉塞する。ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)やポリビニルアルコールのように表面に水酸基が存在すると補体系の活性化も顕著となる。すなわち、短時間の抗血栓性は得られるものの、長期間の使用には不適當である。PAAm, PVPyあるいは同じ非イオン性の水溶性ポリマーであるポリエチレングリコール(PEG)を表面にグラフトすると、その表面はタンパク質の吸着を一時的に低減する。これは水溶性ポリマーを表面にグラフト化することによる排除体積効果やマイクロな運動がタンパク質の接近を妨げるためである。一方で、グラフトするポリマー鎖の密度や鎖長が生体親和性を大きく左右する。これらのポリマーのグラフト表面において、数カ月～年オーダーでの長期にわたる生体親和性はいまだに確認されていない。

2) ポリマーの相分離とドメイン構造形成手法

異なる性質のポリマーからなる表面が特異的に抗血栓性を示すことに着目し、研究が精力的に行われてきた。異種のポリマーを混合しようとする、均質に混ざり合わず、相分離する³⁾。このマイクロドメイン構造が抗血栓性に有効であることが発見された。人工心臓に利用されるセグメント化ポリウレタン(SPU)のように、ハードセグメントとソフトセグメントを結合したブロックポリマー^{注3}は典型的な例である(図2-5)。これを契機に、親水-疎水型、結晶-非晶あるいは荷電状態などの特性の異なる表面を持つ材料が作られている。中でも親水-疎水型のマイクロドメイン構造を持つPHEMAとポリスチレン(PSt)とのブロックポリマーは、口径3mmの小口径人工血管表面に被覆することにより2年間以上の開存実績を持つ。これは主として血漿タンパク質であるアルブミンが表面に組織化吸着する結果、接触する細胞の膜タンパク質の分布状態を安定化するためと考えられている。

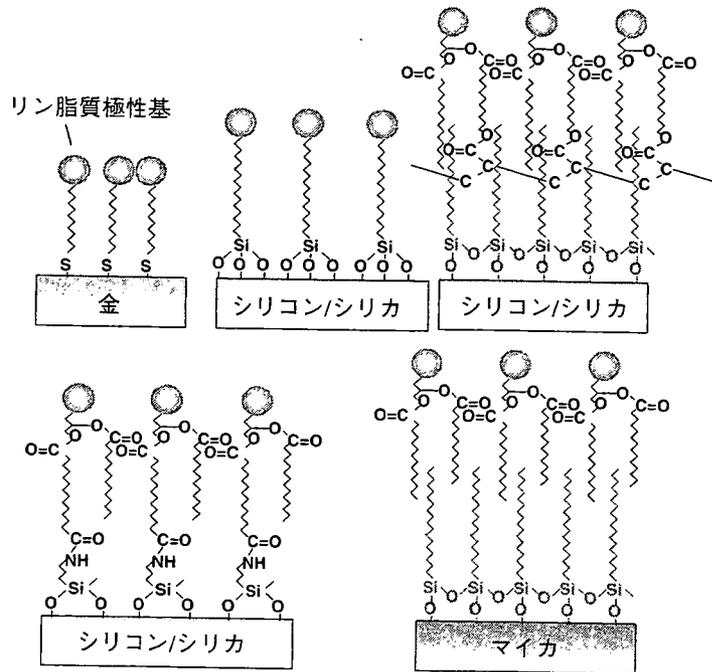
アルブミンは血漿中で最も濃度が高いタンパク質であり、血小板の活性化に対して不活性である。そこで、アルブミンを選択的かつ安定に吸着させる材料表面は血液適合性であるとの考え方がなされている。材料表面に疎水性のアルキル鎖を導入するなどの方法によりアルブミンの選択吸着が試みられているが、吸着したアルブミンの構造変化などにより重層吸着が避けられない。

一方、ポリマー多相系の利用により種類の異なるポリマーをマイクロに配向、整列させることができることから、この技術を利用して血液適合性材料の開発が行われている。PHEMAとPStからなるABA型ブロックポリマー^{注4}は、その組成比を制御することにより約20nmの幅を持つ親水-疎水型のラメラ層状のマイクロドメインを形成する。この表面には血漿タンパク質が各ドメイン構造に対応して吸着するとされており、1~2年にわたる動物実験においても血栓形成の抑制が認められている⁷⁾。この機構として、ブロックポリマーが血液と接触した際にタンパク質の吸着層が形成されるものの、長期間安定にほぼ20nmの厚みを維持する、すなわち

注3：ブロックポリマー 種類の異なる高分子鎖を化学結合させたもの。最終的な高分子鎖の配列にはさまざまなパターンがあり、同種の繰り返し単位が数個ずつつながっているものをブロックポリマーという。

注4：ABA型ブロックポリマー ブロックポリマーのうち、両端のブロックセグメントが同じAセグメントからなり、中間部分がBセグメントからなるトリブロックのポリマー。

図2-6 リン脂質分子の自己組織化表面の構築



側鎖のカルボキシル基を利用して高密度でホスホリルコリン基を導入すると血小板に対する反応が抑制できる。

これらのように、リン脂質極性基の表面への固定化はさまざまな手法により行えるようになってきている。また、組織体を形成させる条件についても詳細な検討が加えられ、新しいバイオマテリアルとしての応用に今後大きな期待が寄せられる。

マテリアル工学では表面改質が簡便な方法でできることが強く望まれる。そこで、人工細胞膜構造体の構築において、ポリマーの適用が着目されている。これによりリン脂質極性基密度を高めるとともに、基盤マテリアルとの安定な接着も可能となり、効率のよい表面修飾ができる。図2-7に示すようなリン脂質極性基を有する2-メタクリロイルオキシエチル・ホスホリルコリン (MPC) ポリマーがさまざまな分子設計により合成され、そのバイオマテリアルとしての性能、特性が評価されてきた^{9) 10)}。このMPCポリマーは血液と接触した場合においても表面での血液凝固を引き起こさない。この性質をより明確にするため、MPCポリマーがヒト血漿と接触した際の吸着タンパク質が解析された (図2-8)。親水性表面であるガラスや疎水性表面であるポリ (*n*-ブチルメタクリレート (BMA)) (PBMA) に比較して、BMAユニットが70%のMPCポリマー表面ではアルブミン、 γ -グロブリンおよびフィブリノーゲンなどの主要タンパク質のみならず、微量ではあるが血液凝固に重要な役割を果たしている凝固因子系 (VIII, XII), 補体系 (C5), 細胞因子 (フィブロネクチン; FN) などのタンパク質吸着も抑制している。吸着したタンパク質の構造変化について赤外分光^{注5}や円二色性分光により検討された。PBMAやPHEMAでは吸着時間の増加に対してタンパク質の二次構造変化が誘起されるが、

注5：赤外分光 物質に赤外線を照射してその透過光、反射光のスペクトルを解析し、対象となる物質の特性を調べる方法。赤外線の吸収される波長は、分子の官能基にほぼ固有であることから、有機化合物の構造決定に広く使われている。

図2-7 人工細胞膜表面を創るリン脂質ポリマーの基本構造

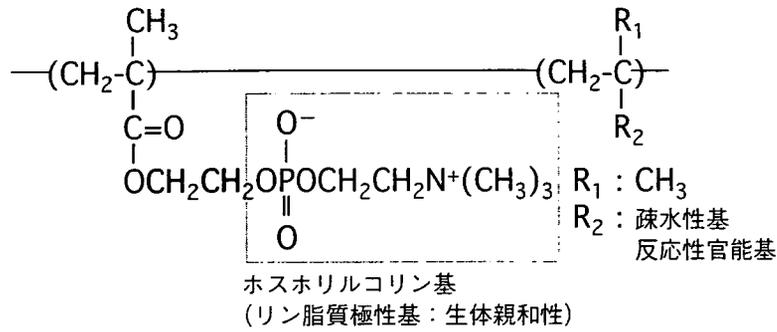
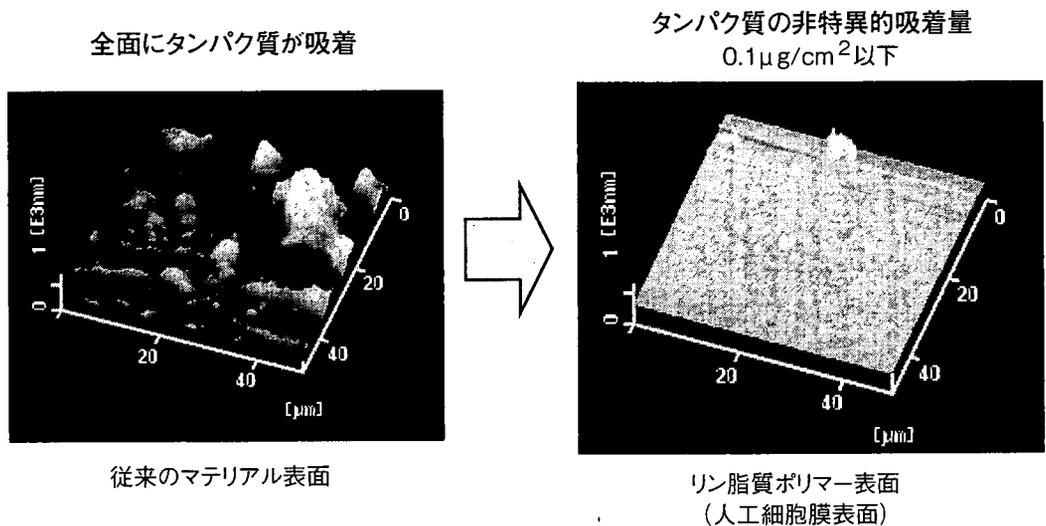


図2-8 人工細胞膜表面のタンパク質吸着性



MPCポリマー上ではまったく変化が起こらない。このような細胞膜類似表面のタンパク質吸着抑制効果が、表面での水の構造に着目して考察されている。MPCポリマーを含むさまざまな親水性ポリマーのハイドロゲル中の水の状態をポリマー鎖に強く水和した結合水と、バルク中の水と同じ自由水およびそれらの中間水（弱くポリマー鎖に相互作用している状態）に分けて解析してみたところ、含水率が同じ場合でも、ポリマーの種類により水の状態が大きく異なることが見いだされた。タンパク質吸着量と自由水分率の関係を調べると、**図2-9**に示されるように、自由水分率の増加に伴うタンパク質吸着量の減少が認められた¹¹⁾。MPCポリマーは自由水分率が0.6以上であり、この場合のタンパク質吸着は単分子層以下であることが見出された。MPCポリマーは人工血管や人工心臓などの血液適合性を改善するほか、センサー、分離膜あるいはコンタクトレンズなどのタンパク質吸着による汚染にも抑制効果があることが認められ、実際に応用されてきている。