

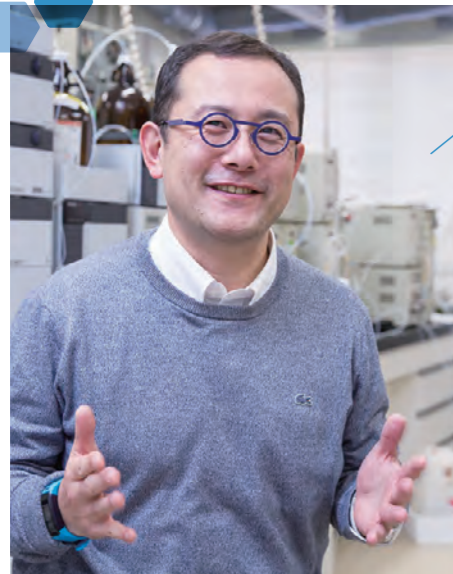
# 関大メディカルポリマーを「人に届ける」ための研究設備

KU-SMART PROJECTは、「人に届く」をテーマに関大メディカルポリマー（KUMP）の開発を進めている。では実際に、どのような設備・体制のもとでポリマーの合成や評価をしているのか。プロジェクトの機器導入に携わった柿木准教授をナビゲーターに、機器を通じた研究の現場に迫った。



上: [a] 多目的ペプチド合成機 (ResPep SL, M&S Instrument Inc.) / 左: 高速液体クロマトグラフ (SHIMADZU) / 右: ビニルモノマーの重合

生分解性ポリマーの合成



## ナビゲーター

### 柿木佐知朗

(化学生命工学部 化学・物質工学科 准教授)

関大メディカルポリマーを医療機器として「人に届ける」ためには、化学的技術を駆使したポリマーの合成や物性評価（いわゆる基礎研究）のみならず、培養細胞等を用いた *in vitro* 試験（生体外試験）と動物生体を用いた *in vivo* 試験からなる非臨床試験を経て、最終的には治験（臨床試験）によってポリマーの有効性や安全性を立証しなければなりません。限られた期間内で基礎から応用までの研究を推進するためには、一連の評価系を実施できる設備が集約されていることが望まれます。関西大学は、日本では類を見ないメディカルポリマー開発に最適な研究設備を整えています。

## 大阪医科大学との連携

### 関大メディカルポリマー研究開発の流れ



## 合成

ポリマー（高分子）は合成高分子（非生分解性と生分解性）と天然高分子に大別されます。当然、どのような医療機器の開発を目指すかによって、基材となるポリマーに要求される特性は大きく異なります。例えば、解離性大動脈瘤の治療に用いられるような大口径人工血管はペットボトルと同じポリエチレンテレフタラートの繊維製の布地でできていますが、体内に留置してから長期間血液を漏らすことなく流し続けなければなりません。そのため、現在は繊維の隙間にゼラチンをコーティングしたチューブが用いられています。

医療機器の開発には、適材となるポリマーを合成し、適所で利用されることが重要です。プロジェクトでは、非生分解性ビニル系ポリマーや生分解性ポリエステルといった合成高分子から、ペプチド、タンパク質、DNAや多糖などの天然高分子に至る、多種多様なポリマーの合成や機能化に取り組んでいます。

非生分解性ビニル系ポリマーの開発では、生体内で安全に機能するポリマーの

獲得に焦点を絞り、ビニルモノマーの合成からポリマー合成まで一貫して行っています。有機合成に用いられる基本的な器具類に加え、効率的に合成条件の最適化を図るための自動合成機や合成時間を短縮するためのマイクロウェーブ反応装置なども活用しながら新たな化合物の創出に取り組んでいます。また、ビニルモノマーの重合では、典型的なフリーラジカル重合のみならず、原子移動ラジカル重合や可逆的付加開裂連鎖移動重合などの先進的な重合法も積極的に取り入れ、ポリマーの化学構造に加え、重合度、組成、トポロジーなどを高度に制御することによって、ポリマーの特徴を最大限に引き出すための分子形態の探索も行っています。

生分解性ポリマーの合成はバルク重合（塊状重合）と呼ばれる方法で行われます。この方法では溶媒を使用せず、ポリマーの原料となるモノマーと触媒だけを反応器に入れて真空に近くして加熱し、モノマーを融解（液化）させることで反応させます。できたポリマーを溶媒に溶かし、ポリマーが溶けずモノマーが溶け

る溶媒に注いでポリマーだけを沈殿させる再沈殿という方法で精製します。

一般的に 40 アミノ酸残基以下のペプチドは、固相法と呼ばれる、直径 100  $\mu$  m ほどのポリスチレンビーズ表面上で一つ一つアミノ酸を連結させる方法で化学的に合成します。プロジェクトで導入した多目的ペプチド合成機 [a] では、50  $\mu$  mol スケールで最大 72 種類のペプチドを同時に合成することができます。この装置は大量合成には不向きですが、設計したペプチドを合成することができるかどうかの判断やタンパク質の活性部位を同定するためのペプチド断片の連続的な合成（フラグメント合成）、ランダムなアミノ酸配列を持つペプチドライブラリーの作製などに有用です。

他にも、DNAの化学合成、遺伝子組換えタンパク質の生合成をするための設備も整っています。また、合成したポリマーそのものをバルク（固体の塊）やゲル、粒子などにして用いるほか、既存の医療機器の更なる高機能化のための表面修飾に用いることも検討しています。

## 物性評価

本当に設計したポリマーが合成できているのか、合成したポリマーが期待する物性（分子量、結晶化温度、分子形態など）を有しているのかなどは、次に続く機能の評価に直結する重要事項であるため、様々な手法を駆使して解析します。

ポリマーの分子量は、加工性や溶解性、生分解性や代謝速度などの物性に大きく影響するため、正確に測定しなければなりません。私たちは、合成高分子の分子量測定に用いられるサイズ排除クロマトグラフィーや、決まった分子量をもつペプチドやDNAの同定に用いられるMALDI-TOF質量分析装置を活用しています。

ポリマー分子の構造や形態を直接観察することは、それを制御する基盤技術を開発するために重要です。

メディカルポリマーが機能すべき場合は豊富に水が存在する生体内であるため、液中観察ができる原子間力顕微鏡に加えて、全反射エバネッセント顕微鏡**【b】**を導入しました。この顕微鏡は、エバネッセント光<sup>\*1</sup>を利用して基材界面のごく近傍（約100nm）に存在する分子を直接観察できます。例えば、細胞の中に広がる骨組みの構造を通常の顕微鏡よりもさらに細かい観察が可能です。また、基材界面と細胞の接点（接着斑）を分子レベルで観察できるので、界面の分子構造や形態によって細胞の機能を制御する新しい技術の開発に有用です。

ポリマーをバルクや汎用医用材料の表面修飾分子として利用する場合は、細胞

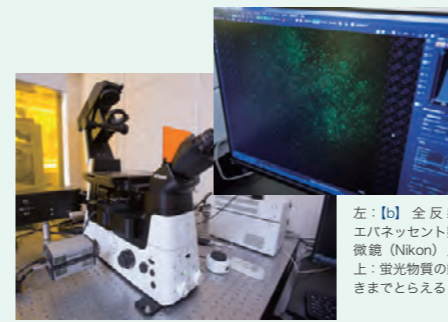
や生体組織との接点となる表面（もしくは界面）が解析の対象です。すなわち、極表面にはどのような分子が、どのような形態や性質を持った状態で存在しているのか、またどのように運動するのか、どの程度で生体分子との相互作用するのかを解析します。例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー（SPR）**【c】**を用いると、SPRセンサーチップ表面に導入したリガンド<sup>\*2</sup>と標的分子との結合・解離挙動を経時的にモニターでき、そのシグナル変化から生体分子同士の結合速度定数や解離速度定数、解離定数の決定が可能です。さらに、等温滴定型熱量計（ITC）**【d】**は、生体分子がリガンドと結合した際の微量のエンタルピー（熱含量）変化を定量でき、SPRで得られる情報とは異なる生体分子間相互作用の熱力学的パラメータを求めることができます。



上：【d】等温滴定型熱量計 (MicroCal iTC200, Malvern Panalytical) / 左：【c】表面プラズモン共鳴バイオセンサー (Biocore T200, GE Healthcare)



左：【b】全反射エバネッセント顕微鏡 (Nikon) / 上：蛍光物質の動きまでとらえる



## in vitro 評価

合成したポリマーを医療機器として利用するには、細胞毒性<sup>\*3</sup>が低くなければなりません。通常、細胞毒性試験には抽出液を使う方法（コロニー法）と、ポリマー基材に直接細胞を接着させる方法により、細胞数の増減の程度から細胞毒性を評価しますが、それでは細胞の生死しか評価できません。ポリマーが細胞の接着形態や特定の生体反応の活性などにどのように影響するのかを知るためには、蛍光分子やレーザーによる可視化技術を活用した細胞の形態観察や遺伝子レベルでの定量評価が欠かせません。プロジェクトでは、生細胞レーザー観察システムとして共焦点レーザー顕微鏡**【e】**と3D測定レーザー顕微鏡**【f】**を導入し、ポリマーと生細胞間の相互作用のリアルタ

イム観察や生細胞接着形態の3次元的な観察に活用しています。

共焦点レーザー顕微鏡は、音響光学フィルタ（AOTF）内蔵4波長固体レーザーユニット、蛍光3チャンネルと透過像を同時取得できる超高感度検出器（GaAsP-PMT）とCO<sub>2</sub>チャンバーを搭載しており、多様な蛍光分子を利用した生細胞のリアルタイム観察が可能です。この顕微鏡では細胞などの厚みのある試料のスライス画像を取得できるため、細胞に取り込まれた薬剤の局在やその動態を解析することができます。

3D測定レーザー顕微鏡は、405nmの短波長半導体レーザーを用いたレーザー顕微鏡で、0.12 μm程度の凹凸を観察できる高い平面分解能を持ちます。

また、反射するレーザーを検出して画像化する仕組みのため、光を透過しない金属などの基材表面の観察に有用です。非侵襲（観察対象を傷つけない）で3次元的な情報が得られるため、基材に接着した細胞の高さなどまで観測できます。骨治療用ポリマー医薬の開発では、破骨細胞の機能に及ぼすポリマーの影響を明らかにするために、レーザー顕微鏡を用いて破骨細胞によって形成された骨吸収窩の定量解析を行っています。

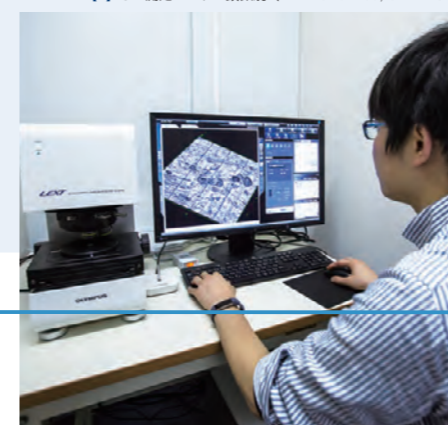
さらに、リアルタイムPCR解析システム**【g】**も導入しており、生細胞がポリマーなどと接触した際に惹起される生物学的応答を遺伝子レベルで定量し、細胞毒性や活性化に関する情報を総合的に評価しています。生細胞を用いて可能な限り多くの情報を総合的に評価することは、引き続きin vivo 評価で用いる動物の数を最小限にすることにもつながるため、極めて重要です。

【g】リアルタイムPCR解析システム (CFX96 Touch Deep Well, BIO-RAD)



【e】共焦点レーザー顕微鏡システム (Nikon)

【f】3D測定レーザー顕微鏡 (LEXT OLS4100, OLYMPUS)



【h】動物体内イメージングシステム。左端がin vivo 蛍光イメージングシステム (IVIS Lumina Series III, PerkinElmer)

## in vivo 評価

in vitro 評価で細胞毒性がない（低い）、もしくは期待する細胞応答が得られると、続いて動物生体を用いたin vivo 評価に移ります。培養した生細胞と実際の生体とは、生物学的機能や構造が全く異なります。現状では、試験管内で生体と全く同じ組織や臓器を作ることはできないので、in vivo 評価が医療機器への応用を見据えたポリマー等の安全性や機能を立証するための唯一の方法となっています。

プロジェクトでは、動物体内イメージングシステム**【h】**として、in vivo 蛍光イメージングシステム (IVIS) と小動物飼育設備を導入しています。in vivo 蛍光イメージングシステムは、非侵襲で動物生体内の蛍光分子を超高感度カメラで可視化・定量化できる装置です。IVISでは体内での濃度分布（体内動態）を調べたい分子を蛍光色素で標識して体内に導入します。生体そのものにも紫外光から可視光領域の吸収がありますが、その吸収より長い波長の光を使うと、小動物や体の浅いところであれば、生体内から標識した分子が発する蛍光を検出することによって、非侵襲的にその分子が体内の

どの場所にどれくらいあるかの情報を得ることができます。これにより、薬を結合したキャリアー（運び手）ポリマーが、どれくらいの時間体内に留まっているかや、標的とした臓器に到達したかどうかを評価できます。

また、取り出した生体組織の病理標本を作製するためのクライオスタット**【i】**やマイクローム**【j】**も導入しており、ポリマーなどを埋入した生体の臓器などを組織学的に評価する環境も整えています。



【i】クライオスタット (Leica CM1520 小型ルーチン用クライオスタット)



【j】マイクローム (Leica RM2125 RTS The Essential Microtome)

## まとめ

このように、KU-SMART PROJECTでは、ポリマーの合成から物性評価、生細胞を用いるin vitro 評価、さらに動物生体を用いるin vivo 評価に至る一連のメディカルポリマー研究に欠かせない設備を備えています。研究設備が一つの研究機関に集約されていることは、一連の工程を円滑・合理的に進めるのに有効です。また、医療機器開発を進める過程で、

ある段階で目的とする結果が得られなければ、その結果を踏まえて前工程に戻った再検討が求められます。研究設備が集約されていると、そうした際の迅速なフィードバックも可能です。プロジェクトは大阪医科大学との強力な連携体制も整えており、関大メディカルポリマーを臨床試験、さらには「人に届ける」ための最適な研究設備を構築しています。

(注) \*1 エバネッセント光：表面近傍にしか存在しない特殊な光の一種 \*2 リガンド：細胞の表面に存在する特定の受容体に特異的に結合する物質 \*3 細胞毒性：細胞に何らかの障害を与える性質