

博士論文（要約）

**Study on Polyion Complex Vesicles
as Functional Materials**

（機能性材料としてのポリイオンコンプレックス型
ベシクルに関する研究）

末吉 大輝

近年、自己組織化を基盤とする材料・システムの特異な機能性や動的性質が大きく注目されており、その基礎・応用研究が様々な分野で盛んに行われている。中でも、人工の自己組織化分子膜から成る中空微粒子(ベシクル)は、生体膜のモデルとしてその基礎物性への関心が集まるのみならず、種々の性質の分子をその内水相もしくは膜中に保持できることから、薬剤キャリア、ナノ/マイクロリアクター、人工オルガネラ等への応用が期待されている。しかしながら、リポソーム、ポリマーソームといった両親媒性分子に基づく従来のベシクルは、調製時の有機溶媒の使用や超音波処理等の強力な物理刺激を伴う煩雑な調製過程、またリアクター等としての応用においてはベシクル内外での物質のやり取りに高度な制限が生じる点などが課題であった。一方最近、互いに反対電荷を有する高分子電解質間の自発的会合(ポリイオンコンプレックス(PIC)形成)を駆動力として形成するPIC型ベシクル(PICsome)が開発された。PICsomeは生体適合性のポリエチレングリコール(PEG)とポリアミノ酸由来の荷電性部位から成るブロック共重合体を基盤に調製され、水溶性物質に対して半透性を示すPIC膜から構成されるという特徴を有し、水中で渦流攪拌等の機械的刺激に応答した形で可逆的な解離/再生を起こすなど、両親媒性分子を主要の構成単位とする従来のベシクルには見られない顕著な挙動を示す。本論文では、これらPICsomeの特異な性質・動的挙動に関する知見を深めるとともに、それらを最大限に活かして生体機能材料・刺激応答材料としての新規展開を図ることを目的とした。

まずPICsomeの半透性、可逆的な解離/再生挙動を利用した簡便な物質封入法、膜の架橋により付与される長期血中滞留性といった特徴を最大限に活用することに着目し、血流中のような厳しい生理環境下で機能する酵素ナノリアクターへの応用を指向したL-asparaginase封入PICsome (ASNase@PICsome)の調製および物性評価を行った。動的光散乱測定および透過型電子顕微鏡観察により、調製された粒子が粒径100 nm程度で単分散なベシクル構造を有することを確認した。次に形成したPICsomeにASNaseが担持されたことを、蛍光相関分光法による並進拡散性の評価から確認した。また蛍光相互相関分光法により、調製時の酵素濃度が高いほど空のPICsomeの形成割合が低下する傾向が見出され、一方microBCA法による評価から調製時の酵素濃度の増加に伴う酵素担持効率の低下が見られた。これらの結果から、PICsomeはその可逆的な解離/再生挙動により、系中に添加した酵素分子を確率的に捕捉するが、限られた内水相の空間内に少数の酵素分子を担持するという区画化の機構が推察された。さらに、保持されたASNaseのベシクル中での局在に関する知見を得るため、蛍光分子の熱的な回転運動を反映する蛍光異方性測定を用いた評価を行った。種々の検討の結果、担持されたASNaseは一定の回転挙動を維持しており、主にPICsomeの内水相に存在することが示唆された。このことは封入酵素の活性の維持、および生体内へ投与した際の免疫認識からの回避という観点から重要であると考えられる。

続いて、調製したASNase@PICsomeが血流中のような厳しい生理環境下においてナノリ

アクターとして機能することを *in vitro*, *in vivo* での評価を通して検討した。 *in vitro* での評価の結果、ASNase@PICsomeは封入前後で酵素活性が維持され、さらに10%ウシ胎児血清の存在下、生理温度下の擬似生理環境において構造体および活性が維持されることが見出された。次にマウスでの血中滞留性について評価したところ、ASNase@PICsomeはフリーのASNaseに比べ著しく長い血中半減期を示した。さらに *in vivo* での酵素反応の評価のため、ASNaseをマウスに尾静脈投与した際の主要の基質であるAsn、および副産物として生じるNH₃の血漿中濃度を評価した。その結果、ASNase@PICsomeを投与したマウス群ではフリーのASNaseを投与したマウス群よりも持続した酵素反応を示した。以上の結果により、ASNase@PICsomeが血流中で酵素ナノリアクターとして持続的に機能することを実証した。

これまで酵素のような物質を封入したPICsomeの主要な製法として、渦流攪拌により与えられるせん断応力に対するPICsomeの可逆的な応答挙動を利用していた。一方、PICsomeの運動性・刺激応答性と、架橋を組み合わせた際の物性に関する総合的な理解は不足しており、その機能を十分に引き出すには至っていない。そこでこのような機械的な刺激の代替となる外部物理刺激の利用を鑑み、PICsomeの動的性質に関する知見を深め、より高度な機能を発現させることを目的として、定量的制御および遠隔作用に有利である外部電場に着目した。そこでPICsomeの外部電場に対する応答能をその場観察により評価するため、マイクロサイズのPICsomeの調製および電場印加を可能とするマイクロ流体デバイスを設計・作製した。これを用い、種々の印加条件に対する未架橋PICsomeの応答挙動を光学顕微鏡により直接観察した。その結果、PICsomeは正弦波交流電場の印加時、比較的低い周波数の条件下において顕著な膜の摂動および凝集体様の構造への形態変化が誘起された。一方矩形パルス波電場の印加時には、比較的長いパルス幅の条件下において、ベシクル形状の緩やかな変化が誘起され、電場印加停止後に真球へと形態緩和する様子が観察された。またベシクル膜の顕著な形態変化が観察されなかった比較的短いパルス幅の条件下においても、互いに近接した2つのベシクル間の融合が誘起され、微視的な膜の変化が生じることが示唆された。このようなPICsomeの電場応答機構に関する知見を得るため、予め蛍光標識化したPEG-ポリアニオンを構成分子として用いたPICsomeを調製し、電場印加時の蛍光観察による評価を行った。その結果、印加電場の時間変化に追従した形での蛍光ポリマーの泳動および局在化が誘起され、このような特異な挙動がPICsomeの顕著な電場応答挙動に関与している可能性が示唆された。またPICsomeの膜に架橋を施した場合、未架橋PICsomeの顕著な形態変化を誘起した条件下においても顕著な形態変化が誘起されず、安定性の向上が見られた。一方、静置時には膜透過を示さない蛍光デキストラン(MW = 40,000)の存在下で架橋PICsomeに対し一定条件下で電場を印加したところ、この物質がPICsomeへ封入されたことを蛍光観察により確認した。以上の結果により、外部電場がPICsomeの会合状態や物性を制御する物理刺激として有用であることが示された。

以上により、本研究ではPICsomeの特異な性質をより一層引き出す試みとして、血流中のような厳しい生理環境下で働くナノリアクターとしての酵素封入PICsomeの確立、およびPICsomeの動的挙動に基づく外部電場応答能の実証に成功した。これらはPICsomeの生体機能材料・刺激応答材料としての知見を深め、その有用性を高める点で有意義な成果であり、その医療・産業応用に向けた開発に大いに貢献するものと考えられる。