

吸着防止ポリマー:Blockmaster™

Anti Bio Fouling Polymer:Blockmaster™

JSRライフサイエンス株式会社 研究開発部

1 はじめに

質量解析, DNAシーケンシング等の生体由来物質の分析手法の発展に伴い, 近年さまざまなバイオマーカーが発見され, 新たなバイオマーカーは抗体医薬などのバイオテクノロジー医薬用のコンパニオン診断や分子診断などの新規診断手法の発展に貢献している. さらには, この希少な生体由来物質の検出の為, 将来は生体由来物質一分子(タンパク質, 核酸)の検出が必要と予想される. 希少タンパク質, 希少細胞の検出に際しては, 対象の生体由来物質が抗原抗体反応など特異的反応で検出されるのに対して, 非特異的に吸着するタンパク質や細胞がノイズとして検出の妨げになる. この非特異吸着の低減の要求に答えるため, JSRライフサイエンス社においては, 分離, 検出を目的とした, 抗体医薬プロセス用粒子, 抗体磁性粒子等の表面に, 低非特異吸着な材料によるコーティングを用いている. 一例では, Magnosphere™ MSシリーズは親水化によりタンパク質吸着を低減させており, また, 抗体医薬プロセス用の粒子Amsphere™においては, Protein A, 粒子両方からの非特異吸着を防止するアプローチが行われている. これらのJSRライフサイエンスにおける知見を応用し, また, 粒子をベースとした製品か

ら, ポリマーベースでの広い用途展開をめざして, 非特異吸着防止ポリマーBlockmaster™を開発した.

2 Blockmaster™CE化学結合タイプ

磁性粒子表面などの固相表面に抗体を結合する際には, 通常, エポキシや活性化したカルボン酸などの活性基を用いて抗体を結合する. 一般的には生体由来物質の非特異的な吸着が起きないように, 抗体の結合後にBSA(牛血清アルブミン)などのタンパク質を用いて表面を覆うブロッキングと呼ばれる処理を行う. しかし, この方法の場合①BSAそのものが生体由来の物質であり, 品質が安定しない. ②BSE(牛海綿性脳症/狂牛病)などの問題があり, 輸出入などの取扱いに注意が必要. ③非特異的吸着の抑制が十分でない. ④タンパク質の粒子への吸着により, 凝集が起きる等の問題点があり, 代替物質が要望されていた. Blockmaster™ CEは化学結合タイプのブロッキング剤で, 図1に示すように, ポリエチレングリコール鎖とN6アミンを持つ化合物である. アミノ基部位を用いて固相上のエポキシ, カルボン酸等の官能基と結合し, 固相表面に親水性を付与, 生体由来物質の吸着を防止する役割を持つ.

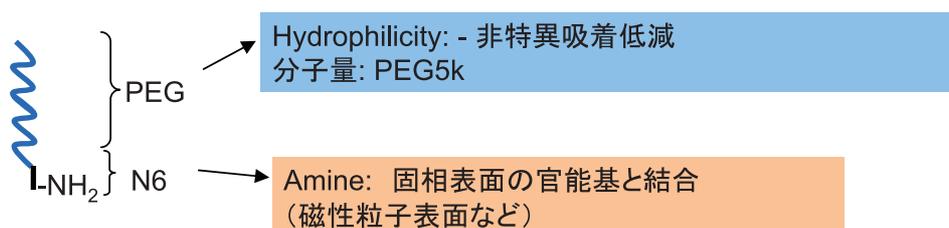


図1 Blockmaster CE510の構造と役割

表1に磁性粒子上でのELISAアッセイにおいてBSAとBlockmaster™ CE510でブロッキングを行った結果を示す。抗原量0においてBlockmaster™ CE510はよりノイズを抑制できており、非特異吸着を防止できていることが分かる。それだけでなく、抗原量100におけるシグナル量もBSA比較で大きくなり、アッセイの効果を示すシグナル/ノイズ比に大きな改善がみられる。これはBlockmaster™が非特異吸着を抑制するだけでなく、結合した抗体の配向性¹⁾にも寄与している為と考えられる。また、図2に示す通り、分散安定性についてもBSAより良好な結果が得られており、BSAを用いたブロッキングでの課題に対して、①分子量が一定のPEGを原料に用いて、品質的に安定②全合成のブロッキング剤で生体由来物質を使用していない③ノイズを低減④分散を安定化し、BSAのもつ問題点に解決策を提供するものであり、さらにシグナル増加という効果も得られる画期的なブロッキング剤である。

表1 ELISAアッセイを用いたBSAとBlockmaster™のシグナル比較

		Blocking	
		BSA	Blockmaster™ CE510
S0	0	226	146
S1	10	27044	40232
S2	100	140651	177649
	S1/S0	120	276

3 Blockmaster™ PA物理吸着タイプ

Blockmaster™ CEの開発に伴い、官能基を持たない、さまざまな基材に対するブロッキングについてのニーズが明らかになってきた。これに答える形で開発を進めているのが、Blockmaster™ PAタイプである。Blockmaster™ PAは化学結合タイプと異なり、物理吸着でタンパク質などの吸着を防止する。構造としては、基材への吸着

の役割を担う疎水性ユニットと吸着を防止する機能を発現する親水性ユニットから成り立っている。タンパク質等の生体由来物質の非特異吸着を防止するという点では、化学結合型のCEシリーズと同様であるが、基材への吸着の仕組みが異なり、疎水性である基材に対してポリマーの吸着部が疎水性相互作用により物理的に吸着する仕組みである。この疎水性部位を変更することにより、さまざまな基材への対応を可能にしている。疎水部を含むポリマーを水に対して可溶化させ、かつ生体由来物質との静電的な吸着を防止する技術として、JSR独自のノニオンかつ親水性の非常に高いユニットを用いることにより、疎水部の選択肢を広げることが可能となり、幅広い応用が期待できる。

吸着のモデルタンパク質として、抗体を用いた代表的な性能評価例を表2に示す。Blockmaster™ PAタイプでコーティング処理した、96ウェルのポリスチレン製プレートと、未処理のプレートのウェルに抗体を一定量入れ、ウェル内に吸着した抗体の量を測定した。

表2 ポリスチレンプレートに対するIgG吸着評価

処理方法	IgG抗体付着量[ng]
コートなし	4.42
Blockmaster™ S011	0.01
Blockmaster™ PA650	0.03
市販ブロッキング剤	0.88

処理を行わなかったウェルについては抗体の吸着を示しているのに対して、Blockmaster™ S011(開発品)、Blockmaster™ PA650においては、明らかな吸着防止効果が確認出来た。

また、Blockmaster™ PAタイプの濃度を最適化することにより、タンパク質のみならず、細胞の吸着を抑制することも可能である。図3にポリスチレンプレートに対する、癌細胞(Hela細胞)吸着(培養後48時間後)の例を示す。こちらの結果も、タンパク質の吸着と同様に、顕著な吸着抑

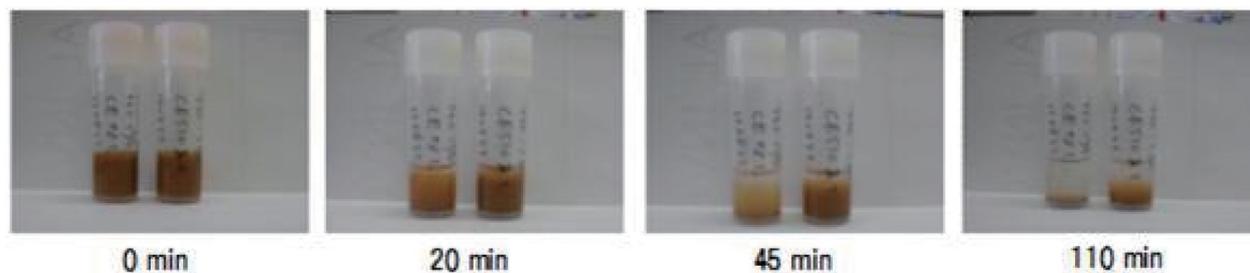


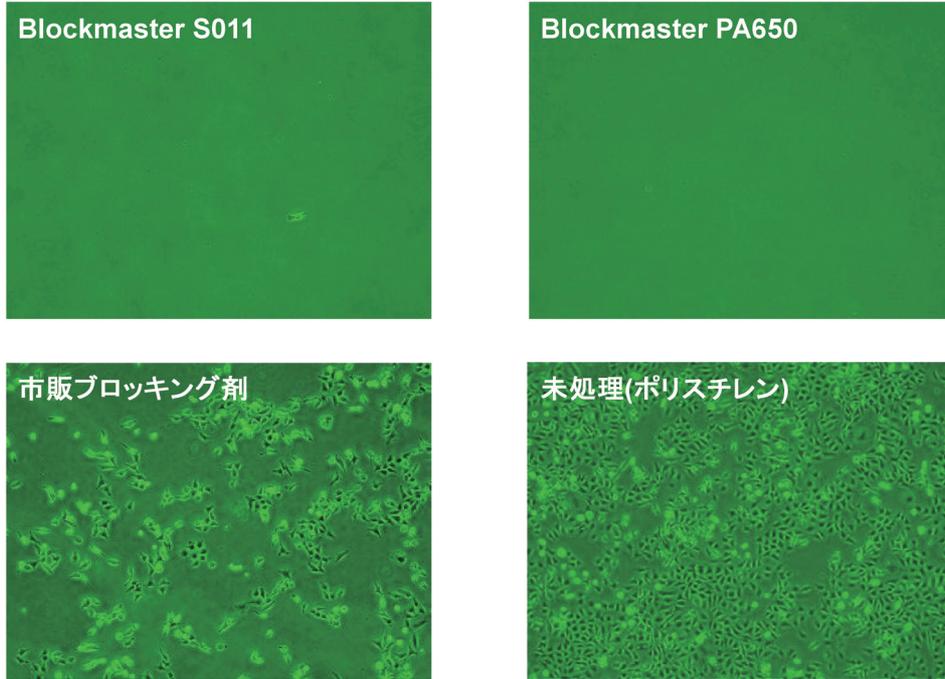
図2 BSAとBlockmaster™ CE510でブロッキングを行った磁性粒子の比較(左:BSA 右:B Blockmaster™ CE510) 時間は分散後静置した時間、Blockmaster™ でブロッキングしたものは、BSAに比較し、分散安定性が高くなっている。

制効果を確認した。

疎水性部位に種々のユニットを導入することにより、ポリスチレンだけでなく、シリコン系材料やガラスなど種々の基材向けのコーティング剤を開発中である。シリコン系材料について、水の接触角の様子を捉えた観察結果を図4に示す。シリコン系のハイドロゲルは、評価前には接触角が

80°程度であるのに対して、コーティング処理後は20°以下になり、顕著な親水化性能を示すことを確認した。

このように、種々の基材に対応した物理吸着タイプを開発することにより、生体由来物質の吸着防止のみならず、表面の親水化処理剤という大きな枠組みで、他分野への応用展開についても探索していく予定である。



実験条件

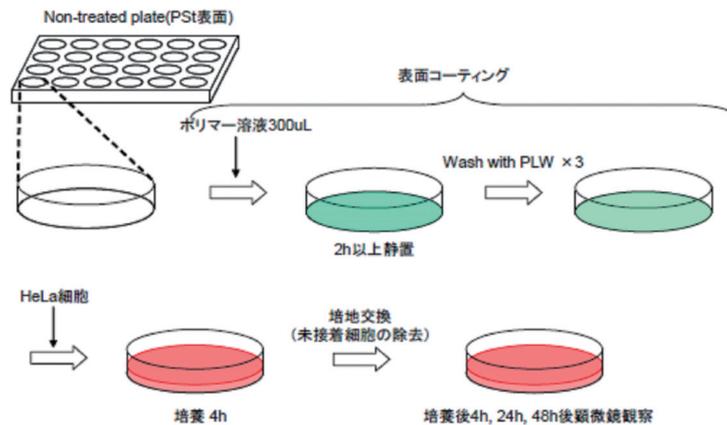


図3 ポリスチレンプレートに対するHela細胞吸着の顕微鏡観察 (48時間後)

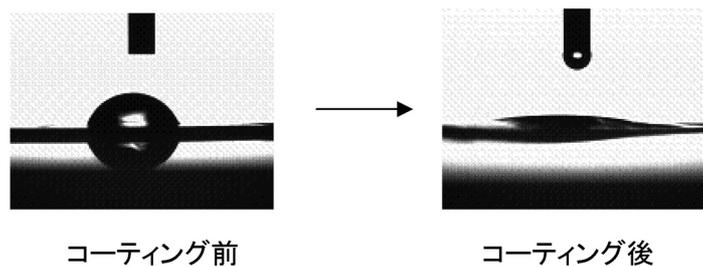


図4 シリコン系材料の表面水接触角評価

4 まとめ

JSRライフサイエンス社においては、生体由来物質の非特異吸着防止の観点から全合成のポリマーブロッキング剤Blockmaster™を開発した。Blockmaster™ CEは固相と化学結合することにより、非特異防止と抗体の活性化を実現し、BSAの代替としての要求に答えている。Blockmaster™ PAは多種の固相に有効に物理吸着し、非特異吸着の低減を行う。今後は、多様な基材に向けたBlockmaster™を開発していくとともに、対象となる生体由来物質を血小板や幹細胞などに広げて、生体適合性の材料への展開を行う。

5 謝辞

Blockmaster™ CEシリーズの開発、製品化にあたり、筑波大学長崎先生には、多大なるご協力とアイデアのご提供をいただきました。心より感謝いたします。

参考文献

- 1) Keitaro Yoshimoto, Motohiko Nishio, Hiroaki Sugasawa, and Yukio Nagasaki *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 7982–7989 (2010)

「Blockmaster」, 「Amsphere」および「Magnosphere」は、JSR株式会社の登録商標です。