

## ポピュラーサイエンス

## 医用高分子材料の表面分析

久後行平・西野 潤

甲南大学理学部 〒658 神戸市東灘区岡本 8-9-1

(1990年9月15日 受理)

Surface Characterization of  
Biomedical Polymers

Kohei KUGO and Jun NISHINO

Department of Applied Chemistry, Konan University,  
Okamoto 8-9-1, Higashinada-ku, Kobe 658

(Received September 15, 1990)

## 1. はじめに

医用高分子材料の研究において、材料と生体との相互作用が、最重要課題の一つであることはいまでもない。その相互作用の理解のため、分子レベルでの表面・界面分析手法は必要不可欠である<sup>1-3)</sup>。最近の医用材料表面解析への応用例として、ESCA (electron spectroscopy for chemical analysis) または XPS (X線光電子分光法)、SIMS (二次イオン質量分析法)、AES (オーグメント電子分光法)、ISS (イオン散乱分光法)、LEED (低速電子回折法)、STM (走査型トンネル顕微鏡)、FTIR-ATR (フーリエ変換赤外全反射分光法) などによる多くの報告が見られるが、本稿ではその中からいくつかを紹介する。

## 2. ESCA (または XPS)

Ratner ら<sup>4)</sup> はポリ塩化ビニル (PVC) やバイオマー (Biomer®)、あるいはサイラスティック (Silastic®) などの医用高分子材料の表面を ESCA 分析し、その各材料上でのトロンビンで活性化されたヒト血小板の凝集について報告している。この PVC は、高分子材料のなかで最も多量に医療に使われている素材であり、たとえば血液バッグなどに用いられている。バイオマーは、抗血栓性に優れたセグメント化ポリウレタンであり、人工心臓への応用が試みられている。またサイラスティックは、人工指関節や人工乳房などに用いられている。彼らの実験の結果、なかでも PVC が最も高い血小板凝集性を示した。しかしこの PVC の C1s の ESCA スペクトルには、このポリマーに本来存在しないカルボン酸あるいはそのエステルに基づくサブピーク (288.8 eV) が認められた。またそれ以外にも存在する筈のない酸素、シリコン、ナトリウムのピークも認められ、これらの原因として、PVC 表面の酸化や汚染などが指摘された。さらに別の原因として、たとえばこの市販ポリマー (Polysciences, Inc. 製) が、単独重合体ではなくて実は共重合体 (ミスラベルなど) であるためではないか、と推察している。このように ESCA 測定により、用いた PVC が純粋な PVC ではないことが明らかとなった。したが

って、高い血小板凝集性を示した PVC が純粋ポリマーではなくて、“PVC” とラベルされた特殊な試料であったと結論づけている。

また Gardella ら<sup>5)</sup> は人工心臓への応用が試みられている Cardiotane-51® の ESCA 測定を行なった。このポリマーは、セグメント化ポリウレタンとポリジメチルシロキサンを混合した多相系材料である。この多相系であることが抗血栓性の一因であると考えられているが、ESCA 測定の結果、表面はほとんどポリジメチルシロキサン成分で覆われていた。しかし溶媒抽出により、このポリジメチルシロキサンや他の不純物が除去でき、清浄な表面を得られることが示された。

筆者ら<sup>6)</sup> はタンパク質のモデル化合物であり種々のコンホメーションをとり得るポリペプチドの ESCA 測定を行なった。その結果、 $\alpha$ -ヘリックス形態をとるポリ ( $\gamma$ -ベンジル-L-グルタマート) (PBLG) とポリ ( $\epsilon$ -N-ベンゾキシカルボニル-L-リジン) (PBCL) の O/C 値が、光電子の脱出角  $45^\circ \sim 60^\circ$  の時にそれぞれのバルク組成値と一致した。また電子の平均自由行程を用いた計算から、測定深さとしては、その角度において PBLG の場合は約 16.3~19.9 Å, PBCL の場合は約 16.6~20.4 Å が得られ、これらの値は各ヘリックスロッドの断面の直径の文献値と良好な一致を示した。したがって、 $\alpha$ -ヘリックスという特有の二次構造の深さ方向の分布には特異性があり、脱出角  $45^\circ \sim 60^\circ$  において、ヘリックスの1ロッドの断面に相当する深さを測定していることが示唆された。これにより、 $\alpha$ -ヘリックス形態のポリペプチドを含む医用高分子材料の表面解析の際には、測定深さを十分考慮する必要があることがわかった。

## 3. SIMS

医用高分子材料表面の元素組成と化学状態についての情報を与える ESCA に対して、SIMS の高感度検出力と分子種確認能力が最近注目されるようになってきた。Briggs ら<sup>7)</sup> はポリエーテルウレタン表面の角度依存 ESCA および static SIMS 研究を行なった。前者の結果からは、ポリエーテルソフトセグメントの分子量などに依存して、図1に示したように表面層がポリエーテル成分のみのオーバーレイヤーで覆われている場合(a)と、ハード・ソフト両成分の比較的均一な混合状態であ

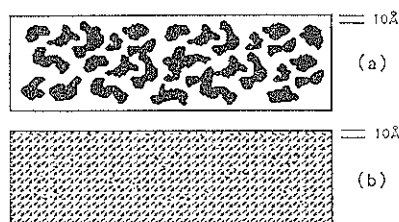


図1 バルクと表面構造の関係を示す二つのモデル図。

(a) 最表面 10 Å は、ポリエーテルソフトセグメントのオーバーレイヤーがハードセグメントのドメインを覆っている。(b) 最表面 10 Å は、ハードとソフト両セグメントが概して均一な混合状態である。

る場合(b), という二つのモデルが提案された。一方 static SIMS スペクトルから, より相分離したサンプルの表面層(図1-a)のソフト成分/ハード成分のピーク比は高く, ESCA 測定の結果と一致した。ところが, static SIMS が深さ 10~12 Å の極表面層を観察していることを考慮すれば, ハードセグメントユニット(黒色部分)が static SIMS スペクトルで常に見られるという事実は, 図1(a)のモデルと矛盾する。したがって, ソフトセグメント中にハードセグメントユニットが点在しているあるいは両セグメント界面が拡散しているというモデルが示唆された。このように static SIMS と ESCA の組み合わせにより, 医用ポリエーテルウレタンの極表面層のより詳細な情報が得られることが明らかになった。

しかしながら, これらのスペクトルは何れも真空中で測定されたものである。ポリエーテルウレタンが実際使用される水溶液中でその表面微細構造を保持したままなのか, あるいは一部のポリマーで見られるように, セグメントの大きな再配列が起こるのか, 大変興味深いところである。ESCA 測定でも行なわれているように, 水和後凍結乾燥したサンプルの static SIMS スペクトルとそのデプスプロファイルなど, 検討すべき問題は多い。このような表面構造の微妙な差異の理解が, その表面上での生体反応を研究するうえで必要不可欠である。

#### 4. STM

最近走査型トンネル顕微鏡が, 導電性基板上に吸着した有機分子の形状が観察可能であるということで注目され, 第4回 International Conference on Scanning Tunneling Microscopy (7月, 1989)でも発表件数のほぼ4分の1が, 生物学的あるいは有機的サンプルに関するものであった。Lewis ら<sup>9)</sup>は金上に吸着した血漿タンパク質フィブリノーゲンの STM 観察を行なった。図2はフィブリノーゲン添加5分後の STM 像であるが, 10~15分後には吸着は緩やかとなり, 約30分後にはほぼ全体が覆われた。このように STM ではバッファー溶液中で直接リアルタイムの観察が可能なので, 血漿タンパク質の医用高分子材料への吸着に伴う構造変化や変性の直接観察に, 大きな期待がよせられている。

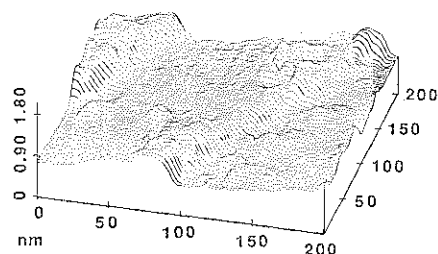


図2 リン酸緩衝溶液の添加5分後での金に吸着したフィブリノーゲンの STM 像。

#### 5. FT-IR-ATR

Ratner ら<sup>9)</sup>は分子量の異なるポリテトラメチレングリコールとジプロピレングリコールをエーテルセグメントとするポリエーテルウレタンを, ATR 用 Ge クリスタ

ル上に約 100 Å の厚さでコーティングし, これらのポリマーに対する牛血清アルブミン (BSA) の吸着性を検討した。フローシステムで吸着 BSA のスペクトルを測定した結果, Ge クリスタル自身も含めていずれの場合も, α-ヘリックスの減少と β 構造の増加が認められた。また, Ge クリスタルとポリエーテルウレタンへ吸着した BSA スペクトルには僅かな差が見られたが, 3種類のポリエーテルウレタン間で差は認められなかった。これは, Ge クリスタルとポリエーテルウレタンへの吸着 BSA スペクトルが同様の傾向を示したことも考慮して, BSA が吸着表面の性状に比較的敏感でないためであろうと考察している。

Kim ら<sup>10)</sup>はポリジメチルシロキサン, ポリエチレンオキシド, およびヘパリンから成るブロックコポリマーの ATR 測定を行なった。その結果, 試料の深さ方向で化学組成が変化すること, また水和によって表面近傍で親水性セグメント濃度が増加することを指摘した。

さらに Cooper ら<sup>11)</sup>は細胞培養用ポリスチレンとその表面を酸化させたものへのビトロネクチンの吸着性を検討している。ビトロネクチンは, RGD 配列 (Arg-Gly-Asp) を有する細胞接着分子であり, 繊維芽細胞が主に接着し, かなりの β 構造およびランダムコイル形態を含むことが知られている。前記の方法と同様にポリマーを薄くコーティングした Ge クリスタルのフローシステムで, アミド II ピークを測定した結果, 二つのポリマー間に顕著な差は見られず, ビトロネクチン自身の分子構造が吸着挙動を決定するのであろうとしている。また吸着後, ビトロネクチンの β 構造含有率が減少するが, α-ヘリックス含有率は溶液中と変わらないことが示唆された。

また Hutson や Chittur ら<sup>12,13)</sup>はチャイニーズハムスター由来の CHO 細胞の成長を, FT-IR-ATR で in situ 測定を行なった。フローセル中の Ge ATR クリスタルに吸着したタンパク質層上に細胞が接着し(図3参照), エバネッセント波は吸着タンパク層を通過して細胞内部まで達するとしている。スペクトルの時間依存性を図4に示したが, 細胞成長初期とコンフルエント状態でのスペクトルの大きな差は, 接着した細胞形態あるいは生物化学的活性を反映していると指摘している。またアミド II (1547 cm<sup>-1</sup>) の吸収強度は, 培養時間とともに増大した。別に測定した細胞総タンパク量(細胞数に比例)も同様の傾向を示し, アミド II 吸収強度が細胞数と良好に対応することがわかった。このように細胞成長・

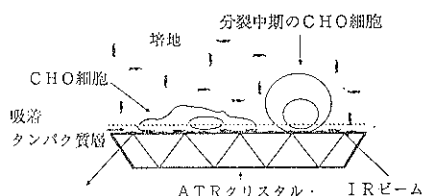


図3 ATR クリスタル上の培養 CHO 細胞の模式図。

増地中のタンパク質が Ge クリスタルに吸着し, 細胞接着の足場を与える。点線はエバネッセント波の範囲を示し, 吸着タンパク質層を介して細胞内部まで及んでいる。

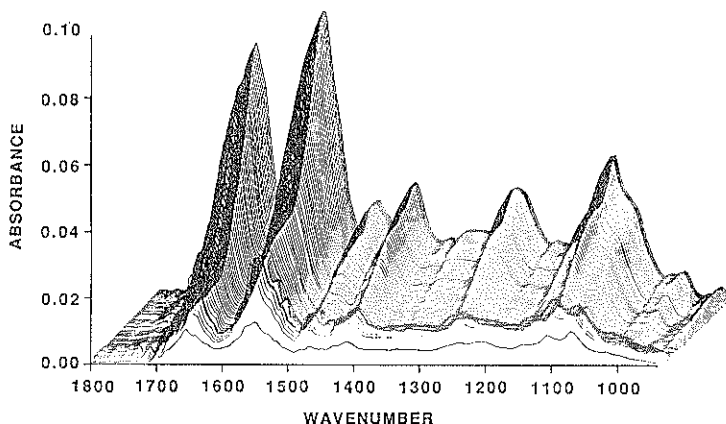


図 4 ATR 結晶上の CHO 細胞の FT-IR スペクトル。  
スペクトルは培養 60 時間まで、1 時間毎に測定された。

増殖の評価に関して、長時間必要な総タンパク量測定や操作の煩雑な RI 法に比べて FT-IR-ATR 法は非常に簡便で、リアルタイムでより詳細な情報が得られると報告している。

Ozaki ら<sup>14)</sup>は FT-IR-ATR 法でウサギの目の水晶体のスペクトルを測定した。その結果、 $3_1$  ヘリックスのアミド I およびアミド II に非常に近い  $1637$  と  $1553\text{ cm}^{-1}$  に吸収が見られ、水晶体中にいわゆるコラーゲンヘリックスが存在することが、はじめて直接的に明らかにされた。また、乾燥させたサンプルの拡散反射スペクトルでは、上記のピークが各々  $1654$  と  $1540\text{ cm}^{-1}$  にシフトし、乾燥によってコラーゲンヘリックスがランダムコイル構造に変化したことが示唆された。

ここで ATR スペクトルからは話が少しはずれるが、最近 Susi ら<sup>15)</sup>は IgG、コンカナバリン A、リボスクレアーゼ、トリプシン、ヘモグロビン<sup>16)</sup>、リソチーム、パイン、チトクロム C など、21 種類の球状タンパク質の FT-IR スペクトルについて報告している。彼らは、各タンパク質のアミド I バンドにフーリエ・セルフデコンボリューションを適用し、それらが 6—9 成分のサブピークからなることを明らかにした。これらの各成分は、その振動数から  $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$  構造、 $\beta$ -ターン、ランダムコイルなどの各構造に帰属され、 $\alpha$ -ヘリックスと  $\beta$  構造の含有率が、X 線回折の結果と良好な一致を示すことを報告している。また Koenig ら<sup>17)</sup>は  $\gamma$ -グロブリン、キモトリプシン、血清アルブミン、および  $\beta$ -ラクトグロブリンの各水溶液の FT-IR スペクトルを種々の温度で測定した。そのアミド I およびアミド II バンドへの上記と同様のデコンボリューション法の適用により、種々の温度における各コンホメーションの割合が定量的に求められた。

アミド I および II 特性吸収帯においては、 $\alpha$ -ヘリックスと  $\beta$  構造に基づくバンドも重なっているが、それに加えてバンド強度のより小さい  $\beta$ -ターンやランダムコイルに帰属される吸収が大きく重なり合い、各コンホメーションの割合を定量的に求めることはこれまで非常に困難であった。X 線回折によるタンパク質の構造解析は大きな発展が見られたが、デコンボリューションを適用した FT-IR 法は水溶液中での本来の二次構造を明らかにし、

さらに各コンホメーションの割合の定量的評価を可能にしたということで、非常に意義深いと思われる。

前述の医用高分子材料や吸着タンパク質あるいは細胞・生体組織の FT-IR-ATR 測定では、スペクトルのピーク強度で議論されているが、このようなフーリエ・セルフデコンボリューションを適用することによって、より定量的で詳細な情報が得られるものと期待される。

## 6. おわりに

医用高分子材料の表面分析に関する最近の研究を、筆者の独断でいくつか紹介した。ここ数年における上記測定法の急激な発展に加えて、今後の新しい測定や解析手法の工夫により、材料と生体との相互作用が分子レベルで理解されることが望まれている。

## 文 献

- 1) B. D. Ratner, ed., "Surface Characterization of Biomaterials" Elsevier, Amsterdam, 1988.
- 2) P. R. Griffiths and J. A. de Haseth, "Fourier Transform Infrared Spectrometry", John Wiley & Sons, Inc., 1986.
- 3) G. Loeb and M. Schroeder, eds., "Modern Approaches to Wettability: Theory and Applications", Plenum, N. Y., 1990.
- 4) I. A. Feuerstein and B. D. Ratner: Biomaterials, **11**, 127 (1990).
- 5) G. L. Grobe III, A. S. Nagel, J. A. Gardella, Jr., R. L. Chin, and L. Salvati, Jr.: Appl. Spectrosc., **42**, 980 (1988).
- 6) 久後行平, 北浦達朗, 西野潤: 高分子論文集 **45**, 441 (1988).
- 7) B. D. Ratner, D. Briggs, M. J. Hearn, S. C. Yoon, and P. G. Edelman, "Surface Characterization of Biomaterials", B. D. Ratner, ed., Elsevier, Amsterdam, 1988, p. 317.
- 8) K. B. Lewis and B. D. Ratner: Transactions of the Society For Biomaterials, May 20-23, 94 (1990).
- 9) T. J. Lenk, B. D. Ratner, R. M. Gendreau, and

- K.K. Chittur: J. Biomed. Mater. Res. **23**, 549 (1989).
- 10) D.W. Grainger, K. Knutson, S.W. Kim, and J. Feijen: J. Biomed. Mater. Res. **24**, 403 (1990).
- 11) W.G. Pitt, D.J. Fabrizio-Homan, D.F. Mosher, and S.L. Cooper.: J. Colloid Interface Sci. **129**, 231 (1989).
- 12) T.B. Hutson, M.L. Mitchell, J.T. Keller, D.J. Long, and M.J.W. Chang: Anal. Biochem. **174**, 415 (1988).
- 13) M.L. Mitchell and K.K. Chittur, 63rd Colloid and Surface Science Symposium (ACS meeting in Seattle), 213 (1989).
- 14) Y. Ozaki, F. Kaneuchi, T. Iwamoto, M. Yoshiura, and K. Iriyama: Appl. Spectrosc. **43**, 138 (1989).
- 15) D.M. Byler and H. Susi: Biopolymers **25**, 469 (1986).
- 16) T.P. Abbott, Y.V. Wu, and R. Kleiman: Appl. Spectrosc. **44**, 899 (1990).
- 17) J.L. Kirsch and J.L. Koenig: Appl. Spectrosc. **43**, 445 (1989).