

新しい生体適合性材料の分子設計と人工臓器への応用

分子認識素子研究分野 田中 賢

Poly (2-methoxyethylacrylate) (PMEA) 表面は血小板粘着をはじめ各種生体適合性マーカーに対し、活性化が低く、優れた生体適合性を発現した。PMEA 表面はタンパク質の吸着が少なく、また吸着タンパク質は PHEMA に比べ変性が少ないことが分かった。また、PMEA 表面はタンパク質が吸着しにくく脱離しやすく、タンパク質との相互作用が弱い表面であることが分かった。PMEA 中の水の構造を DSC で調べたところ、水の Cold-crystallization に特徴が見られ、これが生体適合性発現のキーポイントとなると推察した。

1 はじめに

材料表面に簡便に生体適合性を付与する技術は、人工臓器や医療器の開発に有用である。

材料が血液と接触すると、直ちに血液中に存在する水やタンパク質が材料表面に吸着する。この吸着状態により材料の生体適合性が大きく左右される [1, 2]。特に血液と直接接触する吸着層は、材料と細胞系との相互作用を規定する最も重要な要因となるため、この情報を正確に把握することが重要である。本研究ではタンパク質の吸着量、吸着構造、吸着の動力学解析、血小板粘着をはじめとした各種血液適合性マーカーに対する評価、さらにポリマー中の水の構造と血液適合性との関係を議論した。

2 実験

検討した各種ポリ（メタ）アクリレートはラジカル重合により合成した。構造式を図 1 に示す。in vitro での血液適合性評価は、表面積 120 cm² の評価用回路を用いて、heparin 2U/ml 添加人新鮮血を流速 3.5 ml/min、スパーサー 270 μm、シェアレート 160/sec で 60 分間流した。血液循環後の血小板系 β-thromboglobulin (β-TG)、白血球系 (Lactoferrin)、補体系 terminal complement complex (TCC)、および凝固系 thrombin antithrombinIII complex (TAT) 各マーカーを測定し、血液循環前の値に対する比を求めた。また、血小板数を 1 × 10⁵ cells/μl に調製した 0.2 ml の血液をサンプル上に静かに滴下した。室温で 30 分放置後、PBS で 2 回リンスし、グルタルアルデヒドの 1 % PBS 溶液中で

4 °C、一昼夜固定した。電子顕微鏡で写真撮影し、5 視野の血小板数の合計を粘着血小板数とした。

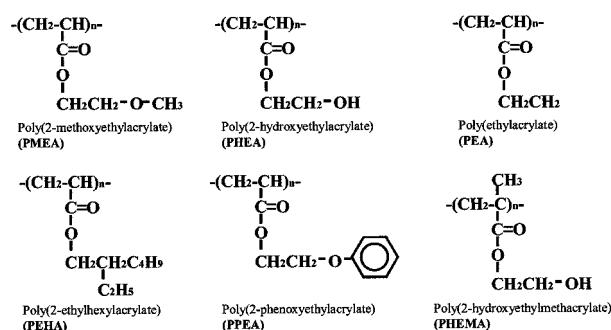


Fig.1 Chemical structures of poly (meth) acrylates

タンパク質吸着実験は、ヒト血漿溶液 15 ml にポリマーコーティング試料を浸漬し、37°C で 2 時間、ローテーターを用いて攪拌した。次いで、この試料を静かに PBS に浸漬し、5 分間攪拌してリンスを 4 回行った。SDS-PAGE Sample Buffer 中で 100°C、15 分煮沸することでタンパク質を抽出した。タンパク質溶液として、生理濃度の 4.4 g/dl に調整したアルブミン、0.3 g/dl に調整したフィブリノーゲン溶液 30 ml にポリマーコーティング済み石英板を浸漬し、37°C にて各タンパク質を 60 分間吸着させた。所定のリンスを行った後、N₂ 雰囲気下、195–250 nm の範囲で CD 測定を行った。岡畑らの水晶振動子 (QCM) による手法を改良し、タンパク質吸着の動力学解析を行い、吸着速度定数 (k_1)、脱離速度定数 (k_{-1})、結合定数 (Ka) を求めた [3]。PMEA 中の水の構造は、示差走査熱量計 (DSC) を用いて、昇温速度 2.5°C/min. で -100°C から 50°C まで行っ

た。

3 結果と考察

in vitro 血液適合性評価の結果、補体活性の指標として補体活性化最終産物で細胞障害性を持つ TCC を調べたところ、PMEA は補体活性化が少なかったことが示された。凝固系活性化に伴って形成される TAT、血小板活性化に伴って顆粒より放出される β -Tg、白血球の活性化の指標である Lactoferrin を調べたところ、いずれも PMEA は検討ポリマー群の中で最小値を示したことから、生体側からの異物認識が少ない血液適合性に優れる材料であると言える。また、血小板粘着試験の結果、PMEA 表面は、血小板粘着がほとんど観察されず (図 2)、さらに、形態変化もほとんど伴っていないことから、血小板の活性化も軽微であることがわかった [4]。

タンパク質吸着の観点からの PMEA 類似ポリマーとの比較実験の結果、他の PMEA 類似ポリマーがタンパク質の吸着量が $0.4 \sim 0.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であるのに対し、PMEA と PHEMA は $0.26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ と少ないことが分かった。さらに、CD によるポリマー表面に吸着したアルブミンのコンフォメーション変化の測定結果より、PMEA 表面に吸着したタンパク質は、PHEMA などと比較して変性が少なかった。また、血小板粘着に關与する接着活性部位 (RGD ペプチド配列) を有するフィブリノーゲンについて

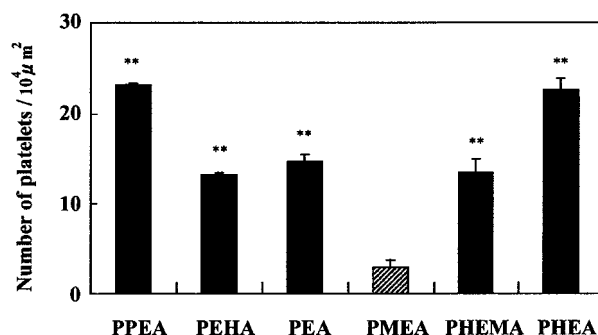


Fig.2 Number of platelets adhered to the surface of poly (meth) acrylates. (**P<0.01 vs PMEA, Mean $\pm$ standard deviation, n=5)

も同様の傾向を示した。PMEA と PHEMA では、血漿タンパク質の吸着量はほぼ同レベルであるが、吸着タンパク質のコンフォメーションが異なるため、血小板粘着に差が現れたと考えられる [5]。

PMEA 表面とアルブミンおよびフィブリノーゲンとの K_a は PHEMA のそれに比べ小さいことがわかった。また、PMEA 表面は k_{-1} の値が大きかった。つまり、PMEA 表面に吸着したタンパク質は、PHEMA 表面に吸着したタンパク質に比べ、脱離しやすいと言える。ここで、PMEA 表面に吸着したタンパク質は変性が少ないという CD の結果を考慮すると、PMEA 表面に吸着したタンパク質が脱離しやすいのは、吸着タンパク質の変性が小さいからと考えられる。以上の結果を図 3 に模式的に示した。

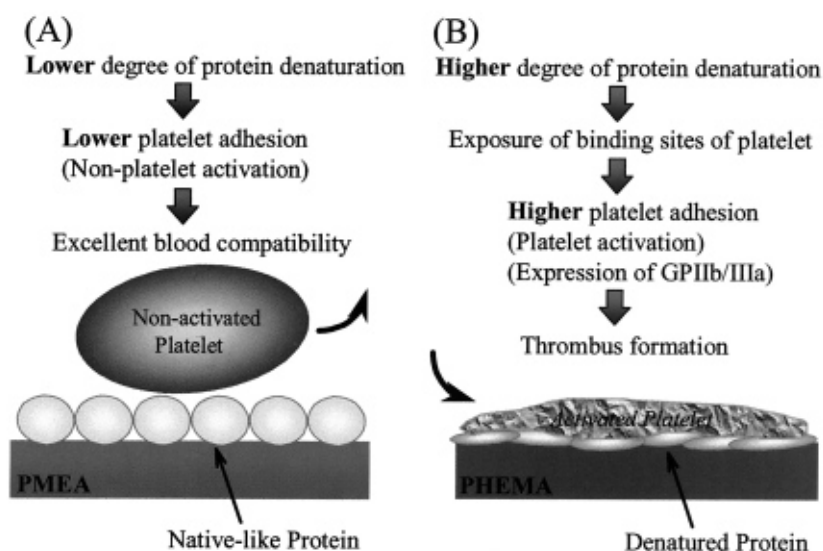


Fig.3 Schematic representation of the assumed adsorption state of protein and platelet adhesion to and spreading behavior. PMEA (A) and PHEMA (B)

以上をまとめると、PMEA 表面はタンパク質が吸着しにくく脱離しやすく、かつ変性が少ない、タンパク質との相互作用が弱い表面であると言える。したがって、このことが PMEA が優れた生体適合性を示す理由と考えられる。

「なぜ、PMEA 表面に対しタンパク質は、脱離しやすい状態で吸着し、変性が少ないのか？」の理由として、PMEA の水の構造が考えられたので、DSC でそれを調べた。昇温過程での水の Cold-crystallization による大きなピークが、含水量や分子量に依存せず安定して観測されることが特徴であることが分かった[6]。Cold-crystallization として観測される水は、ポリマー鎖に弱く束縛された不凍水と自由水の間の水分画であり、生体適合性が優れ

ている物質 (PEG, 多糖, ゼラチン) にしか観測されていないことから、適合性発現のキーポイントとなると考えられる。

4 おわりに

新規に開発した PMEA は高い粘着性を有し、水に不溶性のポリマーであるため、従来の水溶性の PEG や生体由来物質であるヘパリンのように固定化が不要であるため、医療機器の表面改質剤として有望であると考えられる。また、生体成分へのダメージが小さい、イナートな表面であるため、再生医療に必要な不可欠であるマトリックスのツールとして応用展開が期待できる。

[参考文献]

- [1] B.D. Ratner, T.A. Horbett, A.S. Hoffman, S.D. Hauschka. *J. Biomed. Mater. Res.*, **9**, 407-415, 1975.
- [2] T. Tsuruta. Contemporary topics in polymeric materials for biomedical applications. *Adv. Polym. Sci.*, **126**, 1-51, 1996.
- [3] Y. Ebara and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 11209-11214, 1994.
- [4] M. Tanaka, T. Motomura, M. Kawada, T. Anzai, Y. Kasori, T. Shiroya, K. Shimura, M. Onishi, A. Mochizuki, *Biomaterials*, **21**, 1471-1481, 2000.
- [5] M. Tanaka, T. Motomura, M. Kawada, T. Anzai, Y. Kasori, T. Shiroya, K. Shimura, M. Onishi, A. Mochizuki, Y. Okahata, *Jpn.J.Art. Org.*, **29**, 209-216, 2000.
- [6] M. Tanaka, T. Motomura, N. Ishii, K. Shimura, M. Onishi, A. Mochizuki, T. Hatakeyama, *Polymer International*, **49**, 1709-1713, 2000.