高分子材料の官能基構造の影響にみる 粘着血小板形態の電顕的解析

阿部 一彦* 関口 守衛** 片岡 一則*** 岡野 光夫***
桜井 靖久*** 鶴田 禎二**** 丸山 厚****

Morphological analysis of platelets adhering to polymer surfaces with functional groups: A scanning and transmission electron-microscopic study

Kazuhiko ABE*, Morie SEKIGUCHI**, Kazunori KATAOKA***,
Teruo OKANO***, Yasuhisa SAKURAI***, Teiji TSURUTA****
and Atsushi MARUYAMA****

Key words: nonionic polymer, cationic polymer, albumin
coating, platelet adhesion, electron-microscopy

Progress in implantable artificial organs such as the artificial heart, artificial vessele and the artificial kidney depends greatly on the development of excellent antithrombogenic materials because prevention of thrombosis is indispensable for the successful utilization of these artificial organs. In order to design excellent antithrombogenic materials, it is important to clarify the effects of the functional groups of the material surfaces on the surface-induced activation of platelets.

For this purpose, poly(styrene) (PSt) (nonionic, hydrophobic polymer), and poly (p-dimethylaminoethylstyrene) (PMAS) (weakly cationic polymer) were prepared, and the adhesion of rat platelets to these polymer surfaces was examined. Albumin-coated as well as non-coated polymer surfaces were used in this experiment.

* 東京女子医科大学日本心臓血圧研究所理論外科〔〒162 東京都新宿区河田町 8-1〕, Department of Surgical Science, The Heart Institute of Japan, Tokyo Women's Medical College, Tokyo, Japan.

** 同 同 循環器内科, Department of Cardiology, The Heart Institute of Japan, Tokyo Women's Medical College, Tokyo, Japan.

*** 同 医用工学研究施設, Institute of Biomedical Engineering, Tokyo Women's Medical College, Tokyo, Japan.

**** 東京理科大学工学部工業化学科, Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Science University of Tokyo, Japan. 受付: 1987. 2. 13. 受理: 1987. 11. 19.

Platelets were collected from 5 rats by cardio-puncture, and were suspended in Hanks' balanced salt solution (Ca^{2+} , Mg^{2+} free). The interaction of the platelets thus prepared with the polymer surfaces was studied by the microsphere column method at 4°C and at room temperature. The morphological changes of the adhering platelets on the polymer surfaces were observed by scanning (SEM) and transmission electron-microscopes (TEM).

Platelets adhered to the albumin-coated as well as non-coated PMAS surfaces at room temperature; they were rough-surfaced, round in shape with a few long pseudopods. TEM observation revealed that the platelets on these PMAS surfaces had retained more organelles such as α -granules than those on the non-coated PSt surface, which had a spreading form. Rounded platelets were observed on the PSt surface with albumin-coating. Similar results were obtained for experiments done at 4°C . Despite their distinct morphology, there was no significant difference in the percent retention of platelets between PSt and PMAS.

Thus, it is suggested that cytological changes of the platelets do not always coincide with adhesivity of the platelets to the material surface. Consequently, this study revealed that the albumin-coated as well as non-coated PMAS surfaces with a weakly cationic amino group have a high adhesivity to platelets but have lower tendency to activate platelets than the nonionic non-coated PSt surface.

緒 言

優れた抗血栓性高分子材料の開発は臨床医学の場において大きな期待が寄せられており、人工心臓、微小口径人工血管などの循環系人工臓器、並びに人工肝臓、人工脾臓などの代謝系人工臓器などがその対照となる。しかし、抗血栓性材料の分子設計の指針はいまだ十分に確立されていないのが現状である。抗血栓性は材料表面層の化学的あるいは物理的性質に大きく影響されることからその設計指針を確固たるものにするためには、化学的あるいは物理的に修飾した多くの材料表面層と血液細胞、とりわけ血小板との相互作用を明確にすることが重要となる。

今回、ノニオン系とノニオン系に弱カチオン性の第3級アミノ基を官能基として導入した高分子材料表面、そしてそれぞれにアルブミンを吸着させた材料表面に粘着した血小板の形態変化を走査電顕 (SEM) にて、内部構造変化を透過電顕 (TEM) にて比較解析し、血小板機能に及ぼす官能基の構造の影響について検討したので報告する。

I. 方 法

(1) 実験に用いた高分子材料 (図1): ノニオン系で疎水性の均一表面を有するポリスチレン (PSt) とスチレン (St) に弱カチオン性のジメチルアミノエチル基 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{smallmatrix} \text{CH}_3 \\ < \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}$)

を導入したポリジメチルアミノエチルスチレン (PMAS), そしてそれぞれの材料表面に 1/5 生理濃度のラットアルブミン (シグマ社・フラクシオンV) を吸着させた4種類のポリマービーズ (ϕ 150 μm) を準備し実験に用いた。

(2) 粘着血小板の形態変化および内部構造変化の SEM, TEM による解析: ①各ポリマービーズをポリ塩化ビニル製のチューブ (長さ 2 cm; 内径 3 mm) に最密充填した。②5匹のウィスターラット (350 g, ♂) を用い、血液 9 容に対して 3.8% クエン酸ナトリウムを 1 容の割合で含ませたデイスポーザブルシリンジに心臓穿刺により採血した。直ちに F スピッツ管に分注し、 4°C 800 r.p.m. で 20 分間、さらに上澄みを 4°C 2000 r.p.m. で 15 分間遠心処理後、下層の血小板を Ca^{2+} , Mg^{2+} free の Hanks' balanced salt solution¹⁾ (pH 7.4) で $1 \sim 3 \times$

Fig. 1 Chemical structures of polymers examined

- (1) poly(styrene)(PSt) (nonionic, hydrophobic polymer)
 (2) poly(p-dimethylaminoethyl styrene)(PMAS) (weakly cationic polymer)

10^{11} コ/L の血小板浮遊液に調製した。③マイクロソフィアカラム法²⁾を用い、②で調製した血小板浮遊液をディスポーザブルシリンジに採取し、①で調製したチューブに室温と室温の対照群としての4℃とに分けた状態で、血小板を流速0.5ml/分で1分間流し、5分間浸漬した。④ビーズをカラムから取り出し3%グルタルアルデヒド・0.1Mリン酸緩衝溶液(pH7.4)と1% OsO₄ millonig 溶液(pH7.4)での二重固定後、エチルアルコール系列脱水などのSEM、TEM 観察のための常法処理を行い、高分子材料に導入した官能基の構造の影響にみる粘着血小板の形態変化をSEM(HHS-2R型・加速電圧25kV)にて、内部構造変化をTEM(JEM1200EX型・加速電圧80kV)にて解析した。

(3) 血小板停滞率の比較：各ポリマービーズを最密充填したカラム中への血小板の流出前後の血小板数をCoulter Counter(ZBI型)にて数え、その値をもとに各ポリマー素表面とアルブミンを吸着させた表面に対する血小板の停滞率を算出し比較検討した。

II. 結 果

(1) ポリマー素表面とアルブミン吸着表面に対する血小板停滞率の比較(図2)：[室温における比較] 室温における血小板停滞率は未コートPStで68.45±6.33%であるのに対して、

Fig. 2 Retention % of rat platelets on polymer surfaces with or without albumin-coating

アルブミンコートPStでは46.88±6.27%であり、PStにアルブミンを吸着させることによって血小板の停滞率が抑制された。また未コートPMASにおける血小板停滞率は71.07±4.82%であり、アルブミンコートPMASにおいては71.69±2.59%であった。PMASにおいては素表面、アルブミン吸着表面における血小板停滞率にほとんど差はなかった。[低温(4℃)における比較] 低温における血小板の停滞率は未コートPStにおいて44.17±11.59%であるのに対してアルブミンコートPStでは7.74±7.48%であり室温での結果と同様にPStにアルブミンを吸着させることによって血小板の停滞率が抑制された。一方、未コートPMASにおける血小板の停滞率は25.77±9.43%であり、アルブミンコートPMASでは21.02±7.06%であった。PMASの素表面、アルブミン吸着表面においては室温と同様に低温における血小

Fig. 3 Scanning electron micrographs of rat platelets adhered to polymer surfaces at room temperature

A : Albumin non-coated PSt, B : Albumin coated PSt,

C : Albumin non-coated PMAS, D : Albumin coated PMAS.

P : Platelet

* The bars in each figure indicate 1 μ m.

板の停滞率に有意差はなかった。

(2) SEM によるポリマー素表面とアルブミン吸着表面に粘着した血小板の形態変化の比較：〔室温における比較 (図 3)〕 未コート PSt 表面に粘着した血小板は伸展形をしたものが多く観察された。さらに伸展した血小板のその胞体同士が連絡した凝集像も観察された。一方、アルブミンをコートした PSt 表面に粘着した血小板はその数が極めて少なかったが、観察された血小板は偽足の短い表面の滑らかな球状形を

呈していた。また未コート PMAS 表面に粘着した血小板は長い偽足を突出し、表面に凹凸のある球状形として観察された。さらに他の血小板の偽足と連絡している凝集像も観察された。また、アルブミンをコートした PMAS 表面に粘着した血小板の形態変化は未コート PMAS 表面でのそれと同程度であった。〔低温 (4℃) における比較 (図 4)〕 未コート PSt 表面に粘着した血小板は Spiny な偽足を突出した球状形のものも多く観察された。また、アルブミン

Fig. 4 Scanning electron micrographs of rat platelets adhered to polymer surfaces at 4°C

A : Albumin non-coated PSt, B : Albumin coated PSt,

C : Albumin non-coated PMAS, D : Albumin coated PMAS.

P : Platelet

* The bars in each figure indicate 1 μ m.

をコートした PSt 表面に粘着した血小板は球状形として観察された。未コート PMAS 表面に粘着した血小板は表面の滑らかな偽足の短い球状形のものが多く観察された。また、アルブミンをコートした PMAS 表面に粘着した血小板の形態変化は未コート PMAS と同程度であった。

(3) TEM によるポリマー素表面とアルブミン吸着表面に粘着した血小板の内部構造変化の比較：〔室温における比較 (図 5)] 未コート

PSt 表面に粘着した血小板内には微小糸 (MF) が観察され、濃染顆粒 (DB), 特殊顆粒 (α G) などの貯蔵顆粒は放出した像として観察された。また、アルブミンをコートした PSt 表面に粘着した血小板については粘着数が少ないためにいまだ TEM にてとらえることはできていない。一方、未コート PMAS に粘着した血小板内には MF は観察されるものの未コート PSt 表面に粘着した血小板に比べて α G のなどオルガネラは比較的保持されていた。また、アルブ

Fig. 5 Transmission electron micrographs of rat platelets adhered to polymer surfaces at room temperature

A : Albumin non-coated PSt,

B : Albumin non-coated PMAS,

C : Albumin coated PMAS.

α G : α -granule

MF : microfilament

* The bars in each figure indicate 1 μ m.

Fig. 6 Transmission electron micrographs of rat platelets adhered to polymer surfaces at 4°C

A : Albumin non-coated PSt,

B : Albumin non-coated PMAS,

C : Albumin coated PMAS.

α G : α -granule

* The bars in each figure indicate 1 μ m.

ミンをコートした PMAS 表面に粘着した血小板の内部構造変化は未コート PMAS 表面でのものと同程度であった。〔低温(4°C)における比較(図6)] 未コート PSt 表面に粘着した血小板内ではMFと脱顆粒が観察された。また、アルブミンをコートしたPSt表面においては室温時と同様に粘着している血小板数が少ないためにいまだ TEM にてとらえることはできていない。一方、未コート PMAS 表面に粘着した血小板は未コート PSt に粘着した血小板に比べて α Gなどのオルガネラは比較的保持されていた。また、アルブミンをコートした PMAS 表面に粘着した血小板の内部構造変化は未コート

PMAS 表面での場合と同程度であった。

III. 考 察

近年, FDA(アメリカ食品医薬品局)の認可により数例の患者に対して完全人工心臓(Jarvik-7型)の移植が行われたが, ほとんどの例において血栓形成の問題を生じ抗血栓性材料に関する基礎研究の重要性が強く印象づけられた³⁾。

信頼できる抗血栓性材料の開発において重要なことは様々な化学的及び物理的性質をもつ材料表面層と血液細胞, 特に血小板との相互作用を明確にして, 抗血栓性材料の分子設計に際しての作業理論を築き上げていくことである。

そのためには血小板の生理的機能を十分に把握することが必要となる。特に血小板膜は外界との相互作用のすべてを媒介しており、血小板活性化の中心的な役割を担っている⁴⁾。また粘着と凝集の部位と考えられている⁵⁾。

血小板の表面活性化に伴う形態変化はMFの再構成による微小管(MT)のゆがみによって生じることが知られている⁶⁾。この形態変化の過程において、血小板は平円盤形から球状形、偽足を伴う膨隆、さらに伸展形へと変化し、これに開放小管系(OCS)の拡大、DB・ α Gなどの貯蔵顆粒の放出を伴う。また、球状形と伸展形の血小板とではMFの再構成の度合いが異なっており、不可逆的に付着を強固にしている伸展形の血小板はMFが細胞質内で高密度にネットワークを形成していることが高圧電顕によって明らかにされている⁷⁾。

1977年に Falb, R.D はノニオン系の PSt ビーズに $-\text{NH}_2$ 基、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基、 $-\text{NO}_2$ 基などを付着させたものと PRP (多血小板血漿)、PPP (乏血小板血漿)との相互作用の実験を行い、 $-\text{NH}_2$ 基を付着させた PSt 表面が血小板に最も強い影響を示し、多くの血小板がこの表面に吸着し、顕著な血小板破壊を生じたと報告している⁸⁾。しかし Falb はこの表面に吸着した血小板の形態ならびに内部構造の解析は試みてはいない。

今回、我々はノニオン系の PSt と St に弱カチオン性の第3級アミノ基(ジメチルアミノエチル基)を導入した PMAS、そしてそれぞれにラットアルブミンをコートした4種類のポリマービーズと Ca^{2+} 、 Mg^{2+} free の Hanks' balanced salt solution¹⁾ (pH 7.4) にて調製したラット血小板浮遊液との相互作用をマイクロスフィアカラム法²⁾を用いて室温ならびに室温の対照群としての4°Cにて行い、血小板の停滯率、形態変化、内部構造変化に着目して解析した。

血小板の停滯率に関しては、ノニオン系の PSt と St に弱カチオン性のジメチルアミノエチル基を導入した PMAS、そしてアルブミンをコートした PMAS 表面はいずれも血小板を多く吸着したが、ノニオン系の PSt 表面にアルブミンをコートすることによって血小板の吸着

が抑制された。特に、ここで注目すべきことは PSt と PMAS 表面に同じラットアルブミンをコートしたにもかかわらず血小板停滯率に顕著な差を生じたことであるが、これは、カチオン性のポリマー表面にコートしたアルブミンはノニオン系のポリマー表面にコートしたそれよりもコンホメーションの変化(α -ヘリックス量の減少)が大きいことに起因しているものと考えられる⁹⁾¹⁰⁾。この血小板吸着量と α -ヘリックス量とに負の相関性があることは荷電状態を制御したポリイオンコンプレックス膜を用いた実験によって示されている¹⁰⁾。

また形態変化、内部構造変化に関しては、未コート PMAS 表面に粘着した血小板は長い偽足を突出して表面の凹凸のある球状形の血小板として観察され、そのオルガネラは伸展形をして未コート PSt 表面に粘着した血小板のオルガネラに比較して良く保持されていた。このことは血小板の粘着の強さと血小板の内部構造変化とは必ずしも一致しないことを示唆している。また、アルブミンコートした PMAS 表面に粘着した血小板は未コート PMAS 表面での所見と同程度であったが、血小板停滯率の最も低かったアルブミンコート PSt 表面に粘着した血小板は球状形を呈しており、4種類のポリマーの中で最も活性化が弱いことを示していた。しかしこの血小板内のオルガネラはいまだ TEM にてとらえられていない。このようなアルブミンコート PMAS 表面、アルブミンコート PSt 表面に粘着した血小板の形態変化の違いは弱カチオン性の第3級アミノ基を有する PMAS 表面にコートしたアルブミンのコンホメーション変化(α -ヘリックス量の減少)はノニオン系の PSt 表面にコートしたアルブミンの変化より大きいことを示唆するものである。また、未コート PMAS 表面、アルブミンコート PMAS 表面は未コート PSt 表面に比べて粘着血小板の形態変化、内部構造変化を抑制していたが、このことは血小板膜の糖蛋白(GP)の集合規制によるMFの再構成の抑制に起因する可能性も考えられる¹¹⁾。この根拠として血小板膜の GP、特に GP Ib、GP IIb/IIIa は膜貫通性の GP であり、非刺激血小板においてこの GP Ib¹²⁾¹³⁾はアクチン結

合蛋白を介して、GPIIb/IIIa¹⁴⁾は直接膜直下に存在する MF と結合していると考えられている。また、血小板の形態変化は MF の再構成によって反映され⁶⁾⁷⁾、さらに刺激血小板において GPIb, GPIIb/IIIa はクラスターを形成することが免疫電顕によって明らかにされている¹⁵⁾ことなどがあげられる。

以上のことから、St に弱カチオン性の第3級アミノ基(ジメチルアミノエチル基)を導入した PMAS 表面は血小板に対して高い結合能を有するが、血小板の活性化はノニオン系の PSt 表面に比較して抑制されることが明らかになった。このことは、高分子材料表面に適切な官能基を導入することによって血小板の粘着挙動を制御することが可能であることを示唆するものである。また、同じアルブミンをコートした PSt, PMAS 表面に粘着した血小板はそれぞれ異なった粘着挙動を呈したことから、アルブミンは官能基の構造を認識したコンホメーション変化をとり、さらに血小板はこのようなコンホメーションの異なるアルブミンを認識した粘着挙動をとることが示唆される。

本研究を通じて、より優れた抗血栓性高分子材料を開発するためには、材料生化学¹⁶⁾を基盤として血液細胞、特に血小板と様々な物理的及び化学的性質を持つ材料表面層との解析を推進していくことの重要性が示唆された。

ま と め

ノニオン系の PSt と St に弱カチオン性の第3級アミノ基であるジメチルアミノエチル基(官能基)を導入した PMAS、そしてそれぞれにラットアルブミンをコートした4種類のポリマービーズ(ϕ 150 μ m)表面に対するラット($n=5$)血小板の停滞率並びにこれらの材料表面に粘着した血小板の形態変化と内部構造変化についてマイクロフィアラム法を用いて比較解析し、血小板機能に及ぼす官能基の構造の影響について検討した。

それによると、St に第3級アミノ基を導入した PMAS 表面はアルブミンコートの有無にかかわらず血小板に対して高い結合能を有していたが、血小板の活性化(形態変化、内部構造

変化)はノニオン系の未コート PSt 表面に比べて抑制されることが明らかになった。

以上の事実から、材料表面に対する血小板の粘着性と粘着血小板の内部構造変化とは必ずしも一致しないことが示唆された。また、血小板の粘着挙動は材料表面に適切な官能基を導入することによって制御できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Hanks, J.H. and Wallace, R.E.: Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **71**; 196~200, 1949.
- 2) Sakurai, Y., Akaike, T., Kataoka, K. and Okano, T.: *Interfacial phenomena in biomaterials chemistry* (ed. Goldberg, E.P., et al.: *Biomedical polymers*), Academic Press, New York and London, 1980, p.335~375.
- 3) Relman, A.S.: Artificial hearts-permanent and temporary. *N. Engl. J. Med.*, **314**; 644~645, 1986.
- 4) Coller, B.S.: *Disorders of platelets* (ed. Ratnoff, O.D. et al.: *Disorders of hemostasis*), Grune & Stratton, Inc., New York and London, 1984, p. 73~176.
- 5) White, J.G.: Ultrastructural defects in congenital disorders of platelet function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **201**; 205~233, 1972.
- 6) Debus, E., Weber, K. and Osborn, M.: The cytoskeleton of blood platelets viewed by immunofluorescence microscopy. *Eur. J. Cell. Biol.*, **24**; 45~52, 1981.
- 7) Loftus, J.C., Choate, J. and Albrecht, R.M.: Platelet activation and cytoskeletal reorganization-high voltage electron microscopic examination of intact and triton-extracted whole mounts. *J. Cell. Biol.*, **98**; 2019~2025, 1984.
- 8) Falb, R.D., Leininger, R.I. and Crowley, J. P.: Materials with chemically active substituents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **283**; 396~403, 1977.
- 9) 赤池敏宏, 桜井靖久, 小菅一弘, 仙波義彦, 桑名克之, 宮田清蔵, 片岡一則, 鶴田禎二: 円二色性-紫外吸収スペクトルによるポリイオンコンプレックスと血漿タンパク質の相互作用の解析. *高分子論文集*, **36**; 217~222,

- 1979.
- 10) 赤池敏宏, 桜井靖久: 医用高分子材料の化学. 化学の領域, **34**; 519~527, 1980.
 - 11) Kataoka, K., Okano, T., Sakurai, Y., Nishimura, T., Maeda, M., Inoue, S., Shinohara, I., Akaike, T. and Tsuruta, T.: Development of new biomaterials for blood cell separator. *Artificial Organs*, **5** (Suppl.); 532~539, 1981.
 - 12) Okita, J.R., Pidard, D., Newman, P.J., Montgomery, R.R. and Kunichi, T.J.: On the association of glycoprotein Ib and actin-binding protein in human platelets. *J. Cell. Biol.*, **100**; 317~321, 1985.
 - 13) Fox, J.E.B.: Identification of actin-binding protein as the protein linking the membrane skeleton to glycoproteins on platelet plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, **260**; 11970~11977, 1985.
 - 14) Wu, MP. and Stracher, A.: Partial reconstruction of the platelet membrane-cytoskeleton complex. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, **27**; 219~221, 1985.
 - 15) Polley, M.J., Leung, L.L.K., Clark, F.Y. and Nachman, R.L.: Thrombin - induced platelet membrane glycoprotein IIb and IIIa complex formation. *J. Exp. Med.*, **154**; 1058~1068, 1981.
 - 16) 桜井靖久, 赤池敏宏: 医用高分子と生体との反応の解析—材料生化学へのアプローチ (医用高分子), 共立出版, 東京, 1978, p.151~196.
-