イオン&FEL照射によるPSF表面への ヘパリンの固定化

日比野 豊¹⁾, 徐 國春¹⁾, 鈴木 泰雄¹⁾,
谷原 正夫²⁾, 今西 幸男²⁾, 栗津 邦男³⁾

¹⁾ (株)イオン工学研究所

〒573-0123 大阪府枚方市津田山手2-8-1

TEL 0720-59-6651 FAX 0720-59-6299

²⁾ 奈良先端科学技術大学院大学

³⁾ (株)自由電子レーザー研究所

Ion irradiation-assisted specific immobilization of heparin
on PSF by FEL illumination

Y. HIBINO¹⁾, G. C. XU¹⁾, Y. SUZUKI¹⁾,
M. TANIHARA²⁾, Y. IMANISHI²⁾ and K. AWAZU³⁾

¹⁾ Ion Engineering Research Institute Corporation,

2-8-1 Tsudayamate, Hirakata, Osaka 573-0128 JAPAN

²⁾ Graduate school of Materials Science Nara Institute of Science and Technology,

8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0101 JAPAN

³⁾ Free Electron Laser Research Institute Inc.,

2-9-5 Tsudayamate, Hirakata Osaka 573-0128 JAPAN

要 旨

生体用高分子材料の表面にヘパリンを固定化する方法としてイオン照射とFEL照射による複合照射を試み、生体適合のための抗血栓性付与を検討した。

イオン照射により親水性の極性基を生成し、ここにヘパリンを作用させ、波長6.18 μm のFEL照射することによりヘパリンの固定化ができ、ぬれ性の向上と血小板粘着がヘパリン単独により大幅に低減出来ることが判った。

キーワード：イオン照射，自由電子レーザー，ポリスルフォン，ヘパリン，抗血栓性，固定化，表面

Abstract

Immobilization of heparin on polysulfone (PSF) was performed via Laser illumination at wavelength of 6.18 micrometer, the typical absorption band of carboxyl group of heparin. This modification resulted in the surface hydrophilicity and resistance to adhesion of platelets. Comparing the effects on virgin sample to the ion irradiated, the ion irradiated surface offered more suitable sites for the immobilization of heparin in the experimental range. This irradiation-assistant effect was probably raised from the broad adsorption band formed around laser wavelength after ion irradiation.

The excited newly formed bonds reacts easily with the excited heparin molecules.

Key words : ion irradiation, free electron laser, polysulfone, heparin, antithrombuo, immobilization, surface

1. 目 的

イオン工学技術は半導体形成における超LSI技術、金属の耐摩耗・耐食性付与技術による高性能化技術など多くの研究が進められている。しかし高分子材料に対するイオン注入は材料の損傷が大きすぎるなどの理由から実用化に至っていない。これまでイオン注入によって起きる高分子材料表面での反応現象について次のような検討が行われてきた。

軽元素イオン注入による表面の極性基生成・導電化・高硬度化¹⁾、重イオン注入によるポリマーの穿孔、芳香族ポリマーの架橋反応²⁾、異種材料界面でのイオンミキシングによる高密着化³⁾など、従来の γ 線、電子線、紫外線等の照射技術では得られない表面処理が可能である。

一方自由電子レーザー (FELと略す) での研究は、半導体のレーザーアニール、FELによる遺伝子導入、歯象牙質の表面改質⁴⁾ など新分野での研究が進められている。

そこで2つの照射技術の特徴を生かすことにより新規な高分子接合技術が生み出される可能性を秘めており、生体用材料への利用を検討した。

イオン照射プロセスは原子レベルで制御可能なイオン工学的手法であり、またFELは原子・分子結合の特定波長エネルギーを照射することが可能であることから、生体用高分子材料表面にイオ

ン照射し表面を活性化した後、任意な生理活性物質を固定化する技術を研究開発することを狙いに、ポリサルフォン樹脂 (PSFと略す) へのヘパリンによる表面改質方法を検討した。

2. 研究方法

真空中におけるイオンやプラズマを利用した高分子材料の表面改質技術は、イオンの持つ運動エネルギーを利用して表層より深くイオン注入したり、界面でのイオンミキシングを起こさせ傾斜機能を形成したり、またイオンの持つ化学的な活性状態を生かして、反応基を形成したり、新規な薄膜材料を形成する方法が試みられている。しかしこの方法のみでは生体に対して機能性を有する任意の化合物を結合させるには不十分である。

そこでFELを利用して、高分子材料表面をイオン照射で改質した後、有用な生理活性物質と接触させ、その後FEL照射することにより化学的に固定化する方法⁵⁾を検討した。

本実験では人工透析膜等の素材として使用されているPSFを選定し、イオン照射とFEL照射により、どのような表面改質が可能であるか検討した。

イオン照射は任意な元素を任意な深さに任意な量だけ入れることにより、材料表面のモルホロジーを変化させ、化学結合状態を変え酸化による極性基生成を起こさせることが出来る⁶⁾。今回は

図1 実験用試料条件と試料No.

(株)イオン工学センター所有の200keVイオン注入装置を利用して、 He^+ 、 O^+ 、 N^+ イオン照射で反応の予備実験を行い、その中からカルボキシル基($-\text{C}-\text{OH}$)、カルボニル基($-\text{C}=\text{O}$)生成量の多い O^+ イオンを選定し実験した。また照射エネルギーとしては極表面層の改質を狙った1 keVと、数 μm 層までの改質を狙った150 keVの加速エネルギーを、さらに照射量としては 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} ions/ cm^2 で変化度合いを検討し、それらの結果より改質効果の大きかった150 keVで 10^{16} ions/ cm^2 照射条件を主体にFELとの複合照射を実施した。

FELは(株)自由電子レーザー研究所所有の電子リニアック、FEL装置を利用して下記条件で行った。本装置は0.5 nsパルスで2.3 Aの電子ビーム入射が可能な電子銃を備えた電子入射器、24 μs 長パルス・クライストロンパルサー、電子ビームの22.5度偏向輸送系及びアンジュレーターを組み合わせた装置で、100~0.23 μm の任意な波長を得ることが出来る。

今回はイオン照射により生成するPSF表面の $\text{C}=\text{O}$ の伸縮振動に由来する部分と、ヘパリンの化学結合の中で側鎖部分の $-\text{COO}$ 基とを励起して反応させることを目的として、 1618cm^{-1} (波長6.18 μm)のレーザーを選択し、これを照射して固定化することを狙った。

照射後PSF表面で起きた化学的変化、物理的変化を明らかにするため、表面接触角、SEM・AFMによるモルホロジー観察、FTIR、XPSに

よる表面極性基変化を分析調査しその後抗血栓性試験を実施し生体適合性を評価した。

具体的な機能性を付与する生理活性物質として血液凝固防止剤であるヘパリンを選定し、イオン照射との組み合わせによる固定化手法を検討した。

実験に用いたPSFは0.1 mmフィルムをエタノールで超音波洗浄後、図1の条件にて処理し評価用試料とした。イオン照射は、先行実験で効果の大きかった150 keV、 10^{16} ions/ cm^2 で O^+ を照射し、その後所定の試料にヘパリンをコーティングした。

高濃度のヘパリン水溶液では、表面張力が大きくPSF表面からはじくため、10%のエチルアルコールを含む1%ヘパリン水溶液を用い、約0.5 cm^2 当たり60 μl 滴下し乾燥することによりコーティングを行った。

さらにFEL照射試料は6.18 μm のレーザーを23 mWで0.071 cm^2 /Point、ビーム照射面積は約0.5 cm^2 を5分間照射した。

またヘパリンをコーティングした試料は、表面処理後純水で3回以上水洗して固定化されなかったヘパリンの洗い流し作業を行った。

乾燥後各試料について分析評価を行った。

3. 実験結果及び考察

高エネルギーの酸素イオン照射によってどの様に表面モルホロジーが変化するか検討を行った。過去に高分子材料表面は分解や架橋によりモルホロジーが変化することが報告されており、PTFEやSi-Rでは分解による微細な凹凸面の形成や架

図2 PSFのイオン照射によるモルホロジー変化

橋時の収縮応力によるクラック生成等が観察された。

今回島津製作所製SPM-9500原子間力顕微鏡を用い表面モルホロジーを観察した結果、芳香族系のPSFでは図2に示すようにmax 5 nm位の微細な凹凸が観察され、イオン照射により2～3 nmの表面の平滑化が見られた。しかし外観は照射量と共に黄色から褐色に着色した。

これらのモルホロジーに対してPSF表面の親水化と抗血栓性について検討した。

従来の化学的な薬品処理やコロナ処理、プラズマ処理等の親・疎水性の改質法では、環境による経時的変化や芳香族系材料では深層部まで処理しにくいという問題があり、新規なイオン注入法が注目されている。

生体用材料表面のぬれ性は体内に埋め込まれる場合や体液と接する場合に、材料表面特性として

は非常に重要な因子であり、生体適合性に大きな影響を及ぼすと考えられている⁷⁾。今回、イオン照射後2週間以上放置した試料について、協和界面科学社製CA-X型による水の接触角測定を25℃大気中にて実施して、さらに抗血栓性評価を実施した。

抗血栓性評価法には内因系のトロンビン活性化試験や血小板粘着試験等の方法があり、目的により試験方法を選定する必要がある。

今回は血小板粘着性について評価を行った。血液中に含まれる血小板は異種材料に触れたり環境が変化したりすると一過性の止血栓として働く。この血小板の緩い凝着体はフィブリンの作用によって固められ最終的な凝血となる。これらのことから表面処理したPSF表面に新鮮な血小板を作用させ、接触初期の血小板の粘着数を次の手順で調べ抗血栓性を検討した。

表1 PSFへの表面処理条件と表面特性

材 料	表 面 処 理 条 件	接 触 角 (度)	変 化 率 (%)	血小板粘着数 (ヶ/mm ²) 標準偏差	
PSF-o	PSFオリジナル	86.3	100.0	16111	1150
PSF-oh	ヘパリンのみ使用	79.7	92.4	14653	2924
PSF-ol	レーザー照射のみ	86.3	100.0	9583	1353
PSF-ohl	ヘパリン+レーザー照射	70.8	82.0	8056	2338
PSF-i	イオン照射のみ	86.7	100.5	10139	1800
PSF-ih	イオン照射+ヘパリン作用	63.8	73.9	3819	1004
PSF-il	イオン照射+レーザー照射	83.3	96.5	6667	2502
PSF-ihl	イオン照射+ヘパリン+レーザー照射	66.2	76.7	4722	1706

PSF-o

PSF-oh

PSF-ol

PSF-ohl

PSF-i

PSF-ih

PSF-il

PSF-ihl

図3 PSFへの表面処理条件と血小板粘着性

- ① 一定量のPRP溶液（新鮮血液に3.2%クエン酸ナトリウム溶液を10%添加して5分間低速で遠心分離した上澄み液に、PBSを1:1で混合したもの）をイオン照射試料表面に滴下し、37℃100%湿度の空气中で30分間静置した。
- ② その後試料表面をPBSで3回洗浄した後、

2%グルタルアルデヒドで粘着し血小板を固定化した。

- ③ 固体化後PBSと蒸留水、エタノール溶液で各3回順番に洗浄し、減圧乾燥した。
 - ④ その表面をSEMにて血小板粘着数と形状を観察した。
- それらの結果を以下に述べる。

図4 PSF表面への照射条件と血小板粘着性

図5 PSF表面の水接触角と血小板粘着相関

表1に150keV, O^+ イオンを 10^{16} ions/cm²照射後の水の接触角と血小板粘着数を示す。各試料表面における血小板粘着状態のSEM写真を図3に示す。またこれからPSF表面への処理条件と血小板粘着数の関係を図4に、血小板粘着数と水に対する接触角との相関性を図5に示した。

これからも判るようにPSFのオリジナル(未処理品)に比べ、何らかの表面処理を施すことにより、水の接触角は低下し血小板粘着数も減少する傾向にあることが判る。

SEM写真より血小板粘着形態を見ると、ヘパリンのみを作用させた試料では、若干の接触角低下、粘着数減少が認められるが、血小板の扁平化が多く認められる。さらにFEL照射やイオン照

射した試料では、接触角の低下率が大きく、また血小板粘着数の減少効果大きいことが判る。特にイオン照射後ヘパリンを作用させた試料、イオン照射後ヘパリンを作用させFEL照射で固定化した試料では接触角の低下と血小板粘着数の大幅な減少が見られた。またFEL照射した試料では血小板の扁平化がやや促進される傾向があった。

血小板粘着数は図4からも判るようにイオン照射やFEL照射により粘着数が40%減少し、さらにヘパリンを作用させることにより75%減少した。

血小板粘着の減少の原因は表面のモルフォロジー、接触角、化学結合の変化など各種の影響が考えられる。水の接触角との相関は図5に示すように、PSFへのぬれ性、すなわち親水性が高いほど血

図6 PSFへの表面処理によるFTIR

図7 PSFへの照射条件と表面元素濃度変化

小板粘着数が少なく、良好な相関性が認められた。

これらはイオン及びFEL単独照射では得られない新規な表面改質方法であり、任意な照射条件を選定することにより、親水性と抗血栓性をコントロールできることを示唆しているものである。

このような親水性と抗血栓性の関係から、PSF表面はどのような化学的な結合状態になっているのか非常に重要である⁸⁾。

そこでフーリエ変換赤外分光分析 (FTIR) と光電子分光分析 (XPS) により、イオン及びFEL照射後における材料表面の分子結合の変化について検討した。FTIRは堀場社製520型のフーリエ

変換赤外分光分析器を用い反射法による吸収スペクトルを検討した。XPSはアルバックファイ社製5400MC型を用い、各照射条件ごとの変化を約1 mmφの領域でC, O, N, S元素について分析評価した。

図6にPSF改質表面のFTIRスペクトルを示すが微細な吸収の強弱はあるものの大きなスペクトル変化は見られなかった。これは改質された化学的な結合層の厚さが非常に薄く、IR分析の感度では検出が困難な領域と思われる。

一方XPSによる分析結果では図7及び図8に示すように、イオンあるいはFEL照射のみの場

図8 PSFへの照射条件とC/O元素濃度変化

合は、酸素含有量が減少するのに対して、ヘパリンを作用させたものはいずれも酸素含有量が増加していることが判る。

これはPSFのC/O/S比は75/19/6に対して、ヘパリンはC/O/S=37/55/8と酸素含有量が多く、イオン及びFELによってヘパリンが固定化されやすくなったためと考えられる。

イオンについてはイオン照射によって減少する傾向にあり、一部分解しているものと推定されるが全体に変化が少なくはっきりした傾向はつかめない。PSF表面の酸素含有量の増加は前述の血小板粘着数の減少と相関しており、ヘパリンの固定化が抗血栓性付与に寄与したものと推察される。

4. 結 論

生体用高分子材料の高機能化を目的として、PSF表面へのイオンとFELの複合照射を試み、血液凝固阻止剤であるヘパリンを固定化する方法を検討した。その結果、150keV O⁺イオン照射によりPSF表面はスパッタリングにより平滑化され、カルボニル基、カルボキシル基等が生成した。

さらにこの表面にヘパリンをコーティングすることにより、親水化による水の接触角低下と血小板粘着数の大幅な減少が認められた。

さらに-COO結合の波長6.18 μmのFELを照

射することにより、XPSで認められた酸素含有量増加からヘパリンの固定化が推進されたと推定された。またPSF表面の水の接触角と血小板粘着数との間に良好な相関が認められ、イオン及びFELの特徴である照射のパターニングが可能であることから、任意な部分を任意な表面状態にコントロール出来ることが示唆された。

照射条件と生体適合性の関連については、まだ実験を開始したばかりであり、固定化の確認や他の波長での変化について更に検討を進める。今回のイオン照射+自由電子レーザー照射の組み合わせは、新規な機能性と生体融和性を示す材料創出を示唆しており、今後更なる発展が期待される。

参考文献

- 1) 岩本正哉：イオンビームによる表面・表層・界面の改質, Received June 14, P53-58 (1989)
- 2) S. Shukushima, S. Nishikawa, Y. Y. Hibino : Ion beam modification of aromatic polymers. Nuclear Instr. and Meth. in Physics Res. B 80/81 (1993)
- 3) 日比野豊, 細井則宏：高分子-金属複合体におけるイオンミキシング, 粒子イオンビーム研究会, DEI-91-98 (1991)
- 4) 栗津邦男, 荻野誠司, 永井昭夫：自由電子レーザーによる細胞内色素取込, IONICS, Vol 23, No.11, P89-94 (1997)

- 5) 石井忠浩, 真嶋哲朗: 高分子表面のレーザー励起反応, 化学総説: 77-93, (1991)
- 6) 鈴木嘉昭, 岩木正哉: イオン注入と生体適合性, Proc. Beams, P 83-90 (1992)
- 7) W. Zingg, A. W. Neumann, A. B. Strong, O. S. Hum: Effect of surface roughness on platelet adhesion under static and under flow conditions, Canadian J. Surgery., 25 (1), 16-19 (1982)
- 8) G. Marletta, F. Iaconna: Chemical selectivity and energy transfer mechanisms in the radiation-induced modification of polyether-sul-pho-ne. Nuclear Instr. and Meth. in Physics Res. B116 246-252 (1996)