高分子科学 最近の進歩

医用高分子材料

高分子材料表面における血液 タンパク質の吸着

赤池 敏宏・桜井 靖久

Toshihiro Akaike・Yasuhisa Sakurai, 東京女子医科大学
日本心臓血管研究所

1. はじめに

近年、国内国外を問わず医用高分子材料に関連する研究が非常に活発に展開されている。そのような動きと並行して、この方面の研究に関する成書が内外であいついで出されている^{1)~5)}。抗血栓材料に代表される生体適合性材料、各種人工臓器用機能性材料に関する全般的な解説はこれらの成書に譲り、ここでは高分子材料が生体システムに接触する際に生ずる血栓形成・拒絶反応などに先がけて起こるタンパク質/材料間相互作用に焦点をあて、この領域における最近の研究をざっとふり返してみよう。

2. 生体反応における吸着タンパク質層の役割

合成高分子材料が生体組織に接触しないしは埋入された場合、その異物表面は、まず最初に血液・組織液中のタンパク質によって薄く覆われ、その後血小板、赤血球、リンパ球、好中球、マクロファージなど異物反応に関与する細胞との反応が開始される。

生体系との接触後、合成高分子表面はその個体組織由来のタンパク質などによって覆われているわけであるから、生体システムに異物認識され、血栓形成・溶

血・貪食・分解処理・拒絶等々の応答を受けるということは一見奇妙にも思われる。そのような素朴な疑問を解くかぎは、表面におけるタンパク質の吸着挙動の多様性にあるとの考え方が一般的である^{1),3),4)}。すなわち、吸着タンパク質層の厚さ(量)、タンパク質の種類・立体構造(コンホメーション)・吸着配向性・ミクロ分布、およびそれらの経時的な変化などに認められる「非生理性」が一連の異物反応を誘発しているのではないかと考えられている^{1),3),4)}。

実際、古くは 1960 年代初期に細網内皮系という生体の異物処理システムが、静注された墨汁粒子や色素粒子を処理するのに先立ち、各々の粒子に血漿タンパク質の特異的吸着および変性が生じそれが原因で粒子は異物処理を受けたり、抗体産生を引き起こしたりするのであることを、先見的に指摘する論文もあった⁶⁾。近年、血栓形成に関与する血小板の粘着・活性化現象と血漿タンパク質の吸着挙動との相関性について多くの研究がなされ^{3),4),7)}、吸着層の組成^{8)~10)}さらには構成タンパク質の糖鎖構造¹¹⁾、立体構造の変化¹²⁾、親水疎水型ミクロ相分離構造¹³⁾などの因子が重要であると指摘されている。溶血に関係する赤血球の粘着¹⁴⁾も、貪食処理・免疫現象に関係の深い単球¹⁵⁾・好中球^{16),17)}・リンパ球¹⁸⁾の異物表面識別・活性化現象も、またタンパク質の吸着状態によって大きく影響を受けることがわかっている。特に血小板・好中球・単球・マクロファージ・B-リンパ球などのように、細胞表面に γ -グロブリン IgG の F_c 部分に対する F_c レセプターを有する細胞の粘着・活性化においては、血漿タンパク質の中でも特に γ -グロブリンの吸着挙動(量・立体構造・配向状態等々)が重要な役割を果たすものと予想されるが、若干の細胞については、この観点からの検討もなされている^{19)~22)}。

以上述べたように、合成高分子との接触により生ずる各種生体反応「異物反応」においてタンパク質-材料間相互作用は極めて重要な役割を果たしているのである。それゆえに材料-生体液界面におけるタンパク質の吸着現象を解析することは、生体適合性材料、生体機能性材料の分子設計に大きく寄与するであろう。

3. 材料表面におけるタンパク質の 吸着挙動の解析

3-1. 吸着量

吸着タンパク量を種類別に定量する高感度な方法として通常よく採用されるものは、ラジオアイソトープ(RI)でラベルしたタンパク質を吸着実験に供して、シンチレーターでカウントする方法である。この方面における新しい流れは、RI法にかわる高感度で、か

つより手軽な評価法を開発しようとするものである。例えば、タンパク質にけい光色素をラベルして内部全反射 (ATR) 方式で検知しようとするけい光-ATR 法の試みが二つの研究グループによってなされた^{28),24)}。一つは、シリコーンゴム-水界面での γ -グロブリン (γ -G) の吸着過程を装置の工夫により連続的かつ real time で計測しようとしたもので、材料-生体界面相互作用に重要だという "loosely adsorbed protein layer" の解析にも成功したと主張されている²⁵⁾。もう一つは主として血清 アルブミン (Alb) のけい光ラベル法の利点と欠点に言及するもので、けい光色素の解離、ラベルタンパク質の吸着特性の変化 (疎水的性格の上昇) などが若干みられるものの、これと共通の問題が RI ラベル法にもみられること²⁶⁾を考え合わせるならば、多重反射化への工夫をも加えてけい光-ATR 法が感度の高い有効な吸着量評価法として発展する可能性が高いであろうと、指摘している²⁵⁾。

固液界面における Å オーダーのタンパク吸着層の *in situ* 連続解析法として、ellipsometry が有力な手法となりつつある^{27),28)}。金属系の表面ではあるが、疎水的表面、親水的表面に対するフィブリノゲン (Fib) の初期吸着過程が比較検討されている。疎水表面上で高密度な単分子吸着層が完成される途中に、ゆるやかにランダム吸着する特異的な過程の存在することなどが示された²⁶⁾。また白金電極表面で、表面荷電を連続的に変化させた場合、正荷電表面は Fib, Alb, γ -G のいずれの吸着量をも増加させ、一方、負荷電表面はコンホメーションの変化を引き起こすに寄与することが指摘されている²⁷⁾。他方で UV セルコーティング法を用いてポリイオンコンプレックス (PIC) 膜の荷電バランスを変えた場合の、血漿タンパク質の吸着挙動も検討されている²⁸⁾。その結果、吸着量に関しては Alb のみが前述の電極表面での実験と同様に、負荷電表面で少なく、正荷電表面で多いことが明らかとなった²⁵⁾。 γ -G, Fib については正、負荷電の両面で吸着量が多く、中性表面で吸着量が最も少ないという現象がみられている。前述の電極表面における吸着挙動との違いには、PIC 膜の荷電の局在性などが関係しているかもしれない²⁸⁾。

3-2. 吸着層の成分組成 (種類)

血液適合性に代表される生体適合性にとって表面に吸着したタンパク質層の組成も重要であると考えられている²⁹⁾。複数成分系で競争吸着したタンパク質層の組成を解析しようとする研究には二つのアプローチがある。一つは Alb, γ -G, Fib などを一種類ずつ、RI、例えば、 I^{125} でラベルし、他のラベルしていない成分と混合したうえでシンチレーターで選択吸着を検

知するのが通常の方法である³⁰⁾。もう一つは、吸着タンパク質層を界面活性剤などで溶出し、ゲル電気泳動にかけて組成分析を行なう方法である²⁹⁾。最も重要な初期吸着過程を解析するためには感度不足であったが、吸着実験後タンパク質を RI ラベルしたうえで電気泳動にかけることにより 30 秒後の吸着組成の分析に成功したとの報告³¹⁾もある。しかし、吸着タンパク質に対する完全なラベル化が成功していない可能性もあり、同時に吸着タンパク質の溶出が 100% 達成されていない疑いも持たれている。いずれにせよ、この数年競争吸着の問題に関しては特に新しい進展はみられておらず FT-ATR-IR 法³²⁾、カラムクロマトグラフィ的手法など新しい方法の開発が待望されている。

3-3. 立体構造 (コンホメーション)

酵素・ホルモン・レクチンなど種々のタンパク質の立体構造がその生理活性機能の発現と深いかわり合いを有することは、よく知られた事実である。もともとは人工的な材料表面といっても、前述したように生体組織液に接触後ただちに自己タンパク質の薄膜で覆われるのが普通である。にもかかわらず血栓形成など種々の異物反応を誘発するに至る要因の一つとして最近特に注目されているのは、吸着タンパク質の変性、すなわちコンホメーション変化である³³⁾。かつてサンブル液 100 ml の温度変化を 10^{-5}°C まで再現性よく解析できる高感度熱量計が試作され、熱力学的取り扱いからガラス粉末表面に吸着した γ -G のコンホメーション変化が示唆された³³⁾。その後マイクロ電気泳動法による解析結果も加味されて、Fib が血液適合性の高い LTI カーボン粒子に吸着した場合には血液適合性の低いガラス粒子に吸着した場合に比べ、コンホメーション変化が小さいことを示した³⁴⁾。さらに最近では、血清タンパク質・血漿タンパク質の両系でも吸着タンパク質のコンホメーション変化のあることが示唆されている³⁵⁾。この方法は、タンパク質の単分子層吸着にともなう大きな発熱が吸熱過程であるコンホメーション変化を引き起こしているはずであるという考えに基づく、いわば間接的な立証方法であるのに対し、最近では分光学的手法、とりわけ円二色性 (CD) により直接的にコンホメーション変化を立証しようとする試みがすすめられている。石英表面に吸着した血液凝固に関係の深いタンパク質である Fib、ハーゲマン因子の CD スペクトルが得られ、吸着前後で Fib はあまりコンホメーション変化を起こさないのに対し、ハーゲマン因子には顕著な立体構造変化の生ずることが指摘されている^{36),37)}。一方、被験高分子材料をコートした石英セルスパーサーの表面に各種タンパク質を吸着させ、CD と紫外吸収 (UV) のスペクトル法

を組み合わせる吸着タンパク質の量とコンホメーション変化を直接的に解析する手法も開発された²⁹⁾。これにより血栓形成の機序との関連で、ポリオンコンプレックス (PIC) 膜に対する Alb, γ -G, Fib の吸着挙動が解析された²⁹⁾。どのタンパク質も PIC 表面では相当程度のコンホメーション変化を引き起こしていることが指摘された。Alb はポリアニオン過剰表面・中性表面で吸着量が少なく、コンホメーション変化も少ないが、ポリカチオン過剰表面では吸着量が大きく、それに対応してコンホメーション変化も大きいことが明らかにされた。 γ -G, Fib については、吸着量とコンホメーション変化の間に強い相関はみられなかった。

吸着にともなうコンホメーション変化がタンパク質の種類に依存する事実も指摘されている。一定の密度で負電荷を導入し、疎水性を制御したポリスチレン粒子にリボヌクレアーゼと Alb を吸着させ、吸着量の pH 依存性が検討された。その結果からリボヌクレアーゼの方が Alb に比べ、吸着にともなうコンホメーション変化の小さいことが示唆されている³⁰⁾。一方、前述の CD と UV を組合せた方法を用いることにより、PIC 膜に吸着したリゾチームが Alb に比べてコンホメーション変化しやすいことも指摘されている³⁰⁾。

3.4. 吸着配向性

例えば、酵素分子や抗体分子に見られるように、タンパク質分子は大なり小なり異方的な機能と、それを支える異方的な立体構造を有している。それゆえ、タンパク質分子が媒介する材料-生体界面反応の様相は、タンパク質分子のどの部分が材料表面に向かって吸着するかによって大きく支配されるはずである。

かつて、材料表面の疎水性・親水性に対応してタンパク質分子は、それぞれ極性の低いドメイン、高いドメインを表面に向けて吸着することが示唆された⁴⁰⁾。さらに IgG の F_{ab} 部分は F_c 部分に比べ疎水的であると主張されたが、逆の見方も有力である。親水性の高い PIC 膜に γ -G を吸着させると主要なコンホメーションである β -構造は減少するのに対し、 α -ヘリックスにより疎水性を高めた PIC 膜に吸着させた場合は、 β -構造が増加する事実が見いだされた⁴¹⁾。偏光 ATR-IR 法によって、Ge 表面に吸着された種々の Alb に対する抗 Alb 抗体、すなわち γ -G の結合状態が解析された。 γ -G が抗体活性部位 F_{ab} を向けて表面に吸着した場合、その β -構造は溶液中の γ -G に比べて減少することが明らかにされた⁴²⁾。このような事実から γ -G は疎水面には F_c 部分を向けて吸着し、親水性荷電表面に対しては F_{ab} 部分を向けて吸着しているものと推測される。Alb, γ -G, Fib の緩衝溶液のポリ (2-ヒドロキシエチルメタクリレート) (PHE

MA)、およびポリスチレン (PSt) 表面に対するぬれも検討され、各種タンパク質の存在による材料-水界面エネルギーの安定化の程度が評価された。どのタンパク質によっても疎水表面 PSt と水との界面が安定化される中で、 γ -G の存在による安定化の程度が最も顕著であり、疎水性ドメインの選択的な吸着配向が示唆されている⁴³⁾。またポリテトラフルオロエチレン表面に *N*-ビニルピロリドンがグラフト重合され、グラフト率と血漿タンパク質の吸着量との関係が検討された。その結果、グラフトによる表面の親水化が進むにつれ、Alb 吸着量は単純増加し、Fib 吸着量は単純減少する一方、 γ -G 吸着量には一定のグラフト率で極少値が存在することが明らかにされた⁴⁴⁾。 γ -G の異常な吸着挙動は、 γ -G の親水疎水型の異方性構造に基づく吸着配向性の違いを示唆しているようで興味深い。

3.5. ミクロ相分離構造とタンパク質吸着

Avcothane 51, Segmented Polyether-urethane-urea (PEUU) のような抗血栓性の高い材料がミクロ相分離構造をとることはよく知られているが、抗血栓性の発現機序についてはほとんど何もわかっていない。すでにポリエーテル部分 (ポリプロピレングリコール) の重合度を変化させた一連の PEUU について血漿タンパク質の競争吸着が検討され、アルブミンの優先的吸着の大きいものほど血小板粘着の小さいことが指摘されている³⁾。最近 Alb, Fib の PTFE 表面上への吸着が透過電顕を用いて解析された結果、Alb の広がり方が Fib に比べ小さく、その吸着の形態が PTFE の持つ結晶ドメイン-非晶ドメインのミクロ不均一性を反映しているものと推測された⁴⁵⁾。また、親水-疎水型ミクロ相分離構造を有する HEMA-スチレンブロックコポリマーフィルムに対する血漿タンパク質の吸着が解析されている。オスミウム酸染色法を併用した透過電顕法によって、種々の形態をとるミクロ相分離ポリマーへの吸着が経時的に観察された。比較的長時間にわたって Alb が親水性の HEMA ドメインに選択的に吸着し、 γ -G および Fib は疎水性ドメインに吸着していることが明らかになった^{46), 46)}。ちなみに、疎水性ポリマー表面に対する各タンパク質の初期吸着過程における親和性は Fib > γ -G > Alb であるのに対し、親水性ポリマー表面の場合はまったくこの逆であった⁴⁶⁾。なおミクロ相分離型 HEMA-スチレンコポリマーに対しては血小板との相互作用が検討され、各ホモポリマーに比べ著しい粘着性、凝集性の低下を示すことが明らかとなった¹⁸⁾。ミクロドメインの形態とサイズが大きな役割を果たすことも指摘された⁴⁷⁾。

4. お わ り に

以上、異物反応を解析するという観点から材料表面におけるタンパク質の吸着の問題を論じた。タンパク質吸着現象と細胞レベル、組織レベルの異物反応との間にははがゆいぐらいのギャップがあるようにみえるかもしれない。各段階における反応のパラメータの相関性も不明であることも多い。しかしながら、近年急速に関心が持たれるに至り、着実な実験事実の蓄積がはかられつつある。材料表面でのタンパク質の吸着現象の解析は、各種人工臓器の引き起こす様々な異物反応をとりのぞくためだけでなく、正常・異常を問わず、細胞を分離し診断・治療に利用するシステムを確立するためにも重要な課題であろう。

おわりに本稿を呈くにあたり、種々のご教示をいただいた東京女子医大、医用工学研究施設、岡野光夫、片岡一則両博士に厚く感謝致します。

文 献

- *文献名中、TASAIO は *Transactions of American Society for Artificial Internal Organs* の略
- 1) R. E. Baier, Ed.: "Applied Chemistry at Protein Interfaces", *Advances in Chemistry Series No. 145*, A. C. S., Washington D. C. (1975)
 - 2) J. D. Andrade, Ed.: "Hydrogels for Medical and Related Applications", *ACS Symposium Series No. 71*, A. C. S., Washington D. C. (1976)
 - 3) L. Vroman, E. F. Leonard, Ed.: "The Behavior of Blood and its Components at Interfaces", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **283**, New York Academy of Science, New York (1977)
 - 4) 妹尾 学編: "医用高分子", 共立化学ライブラリー, **14**, 共立出版, 東京 (1978)
 - 5) 日本化学会編: "医用材料の化学", 化学総説, No 21, 学会出版センター, 東京 (1978)
 - 6) 今井 大: 日本血液学会誌, **25**, 705 (1962)
 - 7) S. K. Chang, et al.: *Med. Progr. Technol.*, **5**, 57 (1977)
 - 8) D. J. Lyman, et al.: *TASAIO*, **21**, 49 (1975)
 - 9) S. W. Kim, et al.: *J. Biomed. Mater. Res.*, **8**, 23 (1977)
 - 10) D. J. Lyman, et al.: *TASAIO*, **20**, 474 (1974)
 - 11) S. W. Kim, et al.: *ibid.*, **20**, 449 (1974); *J. Biomed. Mater. Res.*, **8**, 393 (1974)
 - 12) 片岡一則, 他: 人工臓器, **7**, 1070 (1978)
 - 13) 岡野光夫, 他: 同上, **8**, 292 (1979)
 - 14) J. N. George, et al.: *J. Cell Physiol.*, **77**, 51 (1971); *ibid.*, **79**, 457 (1972)
 - 15) M. J. Cline, et al.: *Blood*, **32**, 423 (1968)
 - 16) Y. Rabinowitz: *ibid.*, **23**, 811 (1964)
 - 17) R. Hällgren, et al.: *J. Lab. Clin. Med.*, **90**, 786 (1977)
 - 18) 前田瑞夫, 他: *Polymer Preprints, Japan*, **28**, 260 (1979)
 - 19) C. Kiyotaki, et al.: *Immunology*, **35**, 613 (1978)
 - 20) S. L. Pfueller, et al.: *J. Immunology*, **118**, 514 (1977)
 - 21) R. P. Messner, et al.: *J. Clin. Invest.*, **49**, 2165 (1970)
 - 22) 片岡一則, 他: 繊維学会年次大会研究発表会講演要旨集, (1979) p 98
 - 23) R. W. Watkins, et al.: *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 915 (1977)
 - 24) E. Brynda, et al.: *ibid.*, **12**, 55 (1978)
 - 25) W. H. Grant, et al.: *ibid.*, **11**, 33 (1977)
 - 26) P. A. Cuypers, et al.: *Anal. Biochem.*, **84**, 56 (1978)
 - 27) B. W. Morrissey, et al.: *J. Colloid Interface Sci.*, **56**, 557 (1976)
 - 28) 赤池敏宏, 宮田清蔵, 他: 高分子論文集, **36**, 209 (1979)
 - 29) D. Lyman, et al.: *TASAIO*, **20**, 474 (1974)
 - 30) S. W. Kim, et al.: *ibid.*, **20**, 449 (1974)
 - 31) A. S. Hoffman, et al.: *ibid.*, **22**, 242 (1976)
 - 32) T. Matsui, S. Tanaka, et al.: *J. Bioengineering*, **2**, 539 (1978); *Polymer Preprints, Japan*, **28**, 255 (1979)
 - 33) E. Nyilas, et al.: *TASAIO*, **20**, 480 (1974)
 - 34) T. H. Chiu, E. Nyilas, et al.: *ibid.*, **22**, 498 (1976)
 - 35) T. H. Chiu, E. Nyilas, et al.: *ibid.*, **24**, 389 (1978)
 - 36) A. G. Walton, et al.: *J. Colloid Interface Sci.*, **48**, 345 (1974)
 - 37) A. G. Walton, et al.: *J. Clin. Invest.*, **54**, 1312 (1974)
 - 38) N. Norde, et al.: 17th Prague Microsymposium, "Medical Polymer: Chemical Problem" Preprints, Prague (August 1977) PC37/1
 - 39) 加藤 革, 他: 繊維学会年次大会研究発表会講演要旨集 (1979) p 97
 - 40) L. Vroman: *Nature*, **196**, 476 (1962); *J. Biomed. Mater. Res.*, **3**, 669 (1969)
 - 41) T. Akaike, S. Miyata, et al.: *ACS/CSJ Chem. Cong. Polymer Preprints*, **20**, 581 (1979)
 - 42) N. Ockman: *Biopolymers*, **17**, 1273 (1978)
 - 43) 岡野光夫, 他: 高分子論文集, **36**, 209 (1979)
 - 44) G. A. Boffa, et al.: *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 317 (1977)
 - 45) R. C. Eberhart, et al.: *TASAIO*, **23**, 134 (1977)
 - 46) T. Okano, et al.: *Polymer J.*, **10**, 223 (1978)
 - 47) T. Okano, et al.: *ACS/CSJ Chem. Cong. Polymer Preprints*, **20**, 571 (1979)