自由電子レーザーとイオン照射によるポリスルホン表面へのヘパリンの固定化

日比野 豊, 徐 國春, 栗津 邦男*

(株)イオン工学研究所 (〒573-0128 大阪府枚方市津田山手2-8-1)

*大阪大学大学院 工学研究科 自由電子レーザー研究施設 (〒573-0128 大阪府枚方市津田山手2-9-5)

Specific Immobilization of Heparin on Polysulfone Films by Free Electron Laser and Ion Irradiation

Yutaka HIBINO, Guochun XU, and Kunio AWAZU*

Ion Engineering Research Institute Corporation, 2-8-1 Tsuda-Yamate, Hirakata, Osaka 573-0128

**Institute of Free Electron Laser, Graduate School of Engineering, Osaka University,
2-9-5 Tsuda-Yamate, Hirakata, Osaka 573-0128*

(Received August 31, 2000)

A novel way for specific immobilization of heparin on polysulfone (PSF) via laser irradiation is summarized. Free Electron Laser (FEL) wavelengths tuned to 6.18 and 6.31 μm , the typical absorption band of carboxyl group of heparin and stretching absorption of aromatic rings in polysulfone respectively, were chosen to illuminate thin heparin film formed on PSF surfaces. The modification at the wavelength of 6.18 μm resulted in surface hydrophilicity and resistance to platelet adhesion. Surface elemental analysis on XPS implied the bounding of heparin on polymer surface. On the contrary, the modification at the wavelength of 6.31 μm showed no statistical difference with controls in terms of hydrophilicity as well as elemental composition. This effect of variation in laser wavelengths is considered as coming from the structural and environmental differences of light-absorbing groups.

Key Words: Free electron laser (FEL), Ion irradiation, Polysulfone, Heparin

1. はじめに

生体用高分子表面に対する改質反応は、グラフト重合、化学接合、単分子膜形成など種々の手法が検討され、臨床でも polyethylene oxide、ビタミンE修飾したポリスルホン血液透析器が使用されている¹⁻⁷⁾。しかしながら現状では何れの場合でも血液と接する材料表面での血栓形成を防止するには、抗血栓剤を同時に投与するなどの方法を講じなければならない。

この時の抗血栓剤として多くはヘパリンが使用されるが、大量にかつ継続的に使用すると、副作用が見られることが問題視されている。このため、ヘパリンを生体用材料表面へ固定化することが可能になれば非常に有用である。

Fig. 1に本実験に用いたヘパリンとポリスルホン(PSFと略す)の分子構造を示す。ヘパリンは人体の血液に含まれる血液凝固阻止作用をもつ多糖類の一種であるが、糖鎖のヒドロキシル基が硫酸基、アミン硫酸基、カルボキシ

Fig. 1 Molecular structure of heparin and PSF.

ル基に置き換えられたものである。PSFは酸素、スルホンとイソプロピルを介在したベンゼン環を4ヶ結合した高分子である。

このような分子構造を示すヘパリンの固定化方法は今までに2つの方法が採用されている⁸⁻¹²⁾。その1つは、イオン相互作用による方法で、マイナス電荷のヘパリンを材料表面に化学的に作用させアンモニウム塩を固定する方法である。しかし静電的に結合したヘパリンは、血流中で繰り返し使用すると容易に脱落するために、抗血栓性が短期間しか持続し得ない欠点がある。2つ目は共有結合による方法である。共有結合であることから長期間抗血栓性を維持することが可能であるが、ヘパリンは水とフォルムアミドしか溶解することができないため、固定化反応時にいくつかの変性が同時に起こり、抗血栓性が低下する報告がある。

そこで我々は自由電子レーザー(FEL)とイオンビーム照射とのそれぞれの特徴を組み合わせ、ヘパリンを固定化する方法を検討した。

FELは任意の波長での発振が可能であることから、特定の官能基だけを励起して活性化して反応させることができる¹³⁾。一方、イオンビーム照射は任意の元素を任意の深さに任意の量だけ入れることにより、材料表面の形態(モルホロジー)を変化させたり、化学結合状態を変え酸化による極性基を生成させたりすることができる¹⁴⁾。

本研究では任意の生理活性物質を選択的に固定化する技術を研究開発することを狙い、イオン照射により親水化されたPSF表面にヘパリンをコーティングし、ヘパリンのカルボキシル基とPSFのベンゼン環の吸収波長に対応するFELを用いて、ヘパリンをPSF表面に選択的に固定化する手法を検討した。

2. イオン, FEL照射試料及び試験条件

本研究においては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、人工透析膜等の素材として使用されているPSFを選定した。実験では、イオン工学センター所有の200 keVイオン注入装置を利用して、イオン照射における反応の予備実験を行いその中から条件を選定した。FELは自由電子レーザー研究所所有の電子リニアック、FEL装置を利用した。

本装置は0.5 nsパルスで1~4 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 μ s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 μ mの任意な波長を得ることができるものである。そこで前述したヘパリンとPSFの分子構造からどのような波長で照射すれば効果的に反応できるか検討を行った。

ヘパリンとPSFのFTIRスペクトルをFig. 2に示す。この中で波長6.18 μ mの大きな吸収ピークは、ヘパリンのカルボキシル基の吸収によるものであり、波長6.31 μ mはPSFのベンゼン環の伸縮振動による吸収ピークであることが知られている。

ヘパリンのスルホン基やアミノ基に由来する側鎖は、

Fig. 2 IR absorption spectra of heparin and PSF.

抗血栓性に寄与していると言われており、この部分を変化させると抗血栓性に影響を及ぼす恐れがあることから、カルボキシル基を励起して固定化させることを目的として、波長6.18 μ mのレーザーを選定し、またエーテル結合、スルホン結合を変化させずにPSFの芳香族環部分を励起して反応させることを狙い、波長6.31 μ mのレーザーを選定した。

2.1 ヘパリンコーティング方法

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、Table 1の条件にて処理した。フィルムへの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⁺を照射した。またフィルムへのヘパリン水溶液をコーティングする際に、水溶液のみでは表面張力が大きくPSF表面からはじかれるため、10%のエタノールを含む1%ヘパリン水溶液を用い、約0.5 cm^2 当たり60 μ l滴下し、自然乾燥させてコーティング作業を行った。

さらにFEL照射条件は出力23 mW(平均)の特定波長のレーザーで、パルス幅数ps(マイクロパルス)、繰り返し数330パルス(マイクロパルス/マクロパルス)、10パルス(マイクロパルス/sec)、照射強度46 mW/ cm^2 (平均)、照射面積0.5 cm^2 で5分間スキャンングすることにより試料全面を照射した。またすべての試料は、表面処理後純水で3回以上洗浄して、固定化されなかったヘパリンを取り除き、乾燥後に分析評価を行った。

2.2 固定化されたヘパリンの定量

固定化されたヘパリンの測定はトルイジンブルー(TB)法で実施した。ヘパリンはトルイジンブルーと反応して複合物を形成し、形成した複合物はヘキサンで分液すると有機層に移転する。これにより水溶液に残っている未反応なトルイジンブルーの吸収減少からヘパリンの量を計算した。具体的には3 mlの一定濃度のTB溶液と2 mlの一定濃度のヘパリン溶液を10分間ミキサーで混合して、3 mlのヘキサンを加え5分間ミキシングして遠心分液した。その後水溶液層をUVセルに移しUVスペクトルを測定した。ヘパリンの量によるUV吸収の変化から検量線を引き固定化されたヘパリンの量を計算した。

Table 1 Combination of experiments and names of the samples.

	Ion irradiation	Heparin coating	Laser illumination
PSF-orig	no	no	no
PSF-oh	no	yes	no
PSF-ol	no	no	yes
PSF-ohl	no	yes	yes
PSF-i	yes	no	no
PSF-ih	yes	yes	no
PSF-il	yes	no	yes
PSF-ihl	yes	yes	yes

PSF-orig : no disposal. PSF-oh : only heparin coating. PSF-ol : only laser illumination. PSF-ohl : laser illumination after heparin coating. PSF-i : only ion irradiation. PSF-ih : heparin coating after ion irradiation. PSF-il : laser illumination after ion irradiation. PSF-ihl : laser illumination after ion irradiation and heparin coating.

2.3 表面の濡れ性

生体用高分子表面に対する水に対する前進接触角は血液の凝固性と関係することが知られており、光学的接触角測定装置を用い純水で25℃大気中にて測定した。

2.4 表面の化学的構造変化

イオン照射後における生体用高分子材料の分子結合の変化は赤外分光分析器(FT-IR)法では検出できないため、表面元素組成と化学結合状態を光電子分光分析装置(XPS)により分析評価した。

2.5 抗血栓性評価

血液中に含まれる血小板は血液凝固阻止剤によって凝固しないが、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。これらのことから試料表面に新鮮な血液を作用させ、血小板の粘着数を調べることによって抗血栓性が評価される。今回は新鮮血液に3.2%クエン酸ナトリウム溶液を添加したリン酸緩衝溶液を用いて、照射試料表面への血小板粘着性を一定時間作用させた後、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて形状と粘着数を観察した。

3. 実験結果及び考察

3.1 イオン及びFEL照射表面のモルホロジー

高エネルギーのイオン照射によって材料表面で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、今回のPSF表面では、照射後に表面粗さが2~3 nmになると言うこと、また照射量が増大するに従い黄色から褐色に着色して表面層でグラファイト構造化することが観察された。このような表面にFEL照射すると、PSF表面はFig. 3に示すようにレーザーの波長により大きく変わることが観察された。すなわちPSFの主骨格の芳香族環に影響しないカルボキシル基の6.18 μm 波長では、外観上ほとんど変化しない平滑な表面であるのに対して、PSF主骨格の芳

Fig. 3 Morphology of PSF surface irradiated by 6.18 μm -FEL (left) and 6.31 μm -FEL (right).

香族環の励起波長6.31 μm では、表面層が数十 μm サイズで破壊され、アモロファス化したカーボン層も分解により白化した。

またPSF表面には、両表面共にヘパリンがコーティングされているにもかかわらず、6.18 μm 波長で照射したサンプルは、コーティングされたヘパリンの外観変化は認められず、ヘパリンそのものには大きなダメージを与えていないものと推察された。

これらのことから分子構造面から励起波長を選定することは非常に重要であり、ヘパリンの固定化には6.31 μm では母材そのものへの影響があり、固定化には適さないことが判り、6.18 μm の励起波長はヘパリンを破壊しないで固定化できるものと考えられる。

3.2 固定されたヘパリンの測定

上記理由から6.31 μm 照射ではヘパリンの測定が困難であることから、6.18 μm 照射による固定されたヘパリンの量をトルイジンブルー(TB)法で測定した。その結果をFig. 4に示す。

この結果、イオン未照射でレーザー照射したPSF表面(PSF-ohl)に固定化されたヘパリンの量は1.17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。一方これにイオン照射したPSF表面(PSF-ihl)に固定化されたヘパリンの量は1.38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であるが、レーザー照射しなくても、イオン照射のみのPSF表面(PSF-ih)に固定化されたヘパリンの量は0.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。これらか

Fig. 4 Amount of heparin immobilized on the PSF surface.

ら、各々のデータの有意差を統計分析した結果をTable 2に示す。

表のFELIはFEL照射、PBIIはイオン照射を意味する。ANOVA (ANalysis of VARIation) とtTest (Student test) 共に $p < 0.05$ を示しており解析方法の有意差を確認した。この結果から、FEL照射とイオン照射はヘパリンの固定化に貢献することが判り、この中でFEL照射のF-ratioがより大きいことから、FEL照射は特にヘパリンの固定化に大きく貢献することが判った。

以上の結果から、イオンもFELも照射しないPSF表面では、ヘパリンをコーティングしても水溶性のヘパリンは洗い流されてほとんどPSF表面に付着しないし、またイオン照射後にヘパリンコーティングするのみでもわずかな付着量しか得られないことが判った。これに対して波長6.18 μm のFEL照射を行った表面、およびイオン照射とFEL照射を併用したPSF表面では、未処理の20倍以上の量が固定化されていることが判った。この原因はFEL照射がヘパリンのカルボニル基を励起してラジカルを生成し、イオン照射によってPSF表面の生成しているヒドロキシル基やカルボキシル基と再結合したものと推定され、これによりヘパリンの固定化量が多くなったものと考えられる。

3.3 表面の濡れ特性

各照射試料について水の接触角測定結果をFig. 5に示す。この結果、イオン未照射試料やそれぞれの単独処理のみでは接触角が80度以上を示し、それらの変化は誤差範囲内であった。一方ヘパリンをコーティングしてレーザー照射した試料では接触角が71度に下がり、PSF表面はより親水性になった。イオン照射試料後ヘパリンコーティングした試料では低い接触角の値(64度)が見られ、イオン照射+ヘパリンコーティング+レーザー照射した試料では接触角が66度となり、いずれも親水性表面が得られること

Fig. 5 Contact angle of water on the sample surface.

が判った。このことは上記のヘパリン固定化量と関係しているものと考えられる。

3.4 XPSによる表面化学分析

PSF表面層の化学組成を調査するため、室温乾燥させた試料を 10^{-7} Torrの真空中に16時間脱気してから 5×10^{-9} Torrの真空中でXPS分析を行った。その典型的な照射条件における炭素、酸素、窒素と硫黄の原子存在比(%)をTable 3に示す。

これからも判るように、イオン照射により表面酸素ピークが増加し硫黄ピークが低下した。ヘパリンコーティングした試料にFEL照射した試料では、酸素ピークが大幅に増加し、元々含んでいない窒素も検出され、ヘパリンが表面に固定化されたことを裏付けていると思われる。

Fig. 6にヘパリン材料とPSFオリジナル、PSF-ohlのS2p XPSスペクトル、Fig. 7にPSFオリジナルとPSF-i、PSF-ihlのS2p XPSスペクトルを示す。このヘパリンとPSFのS2p XPSスペクトルをピーク分離すると、ヘパリンのS2p_{1/2}とS2p_{3/2}は168.2, 169.5 eVで、PSFのS2p_{1/2}とS2p_{3/2}は167.5, 168.7 eVであることが判る。これらのピーク分離結果を用い、PSF-ohlのS2p XPSスペクトルを分離した結果を破線で示す。このことからPSF表面のオリジナルとヘパリンのオリジナルスペクトルの中間的なエネルギーシフトパターンを示していることが判り、PSF表面に対してヘパリンのサルファと考えられる結合形式が存在しているものと思われる。

Fig. 7から、PSFへイオン照射するとS2p XPSスペクトルのS2pピークは低い結合エネルギー側にシフトすることが判る。この現象はイオン照射により一部の結合が切断されたり、脱水素や酸化が起きたりして、スルホンがサルファイドに変わったものと見られた。PSF-iとPSF-ihlのS2p XPSスペクトルを比較すると、PSF-ihlの方は168.7 eVでの

Table 2 Examination of statistical difference of heparin immobilized on the PSF surface.

Source	Analysis of Variance			t Test	
	Sum of square	F-ratio	Probability	t Value	Probability
FELI	18.871	455.330	0.000	-18.614	0.000
PBII	1.324	31.949	0.000	-2.048	0.046
FELI*PBII	0.074	1.779	0.186		

Table 3 Elemental composition of each sample surface obtained from XPS analysis.

Substrates	C1s	O1s	S2p	N1s
Heparin	46.2	45.5	4.9	3.3
PSF	82.6	14.8	2.6	
PSF-ohl	64.1	29.1	3.8	3.0
PSF-i	80.0	17.9	2.1	
PSF-ihl	67.0	26.7	3.3	2.9

Fig. 6 S2p XPS spectra of heparin, PSF-o and PSF-ohl.

Fig. 7 O1s XPS spectra of heparin, PSF-o, PSF-i, PSF-ohl and PSF-ihl.

ピークが見られる。これらのことからPSF表面にイオン照射しヘパリンを作用させてFEL照射することにより、ヘパリンのサルファと考えられる結合形式がPSF-ihl表面に形成されたものと思われる。同様に酸素と炭素についても同様にXPSスペクトルのピーク分離を行った結果、十分な分解能が得られにくいため信頼性があるピーク分離ができないが、スペクトルの形だけを比較するとヘパリンの固定化はされていると考えられた。

3.5 抗血栓性評価の結果

PSF表面への処理条件と血小板粘着数の関係をFig. 8に示す。イオン注入直後にヘパリンをコーティングすることによりPSF表面に親水性となり、血小板の粘着に大きい影響を与えることが判った。

このためイオン照射有無により、FEL照射(FELI)とヘパリンのみ(HEP)とその相乗効果(FELI*HEP)によって、血小板粘着性にどのように影響するかを統計的に解析した。統計分析した結果をTable 4に示す。

Fig. 8 Conditions of Treatments for PSF surface and number of immobilized blood platelets.

PSF表面にイオン照射しない組(No)では、FEL照射に対し、ANOVAとtTest共に $p < 0.05$ の値を示し、FELを照射する方法の有意差を確認した。すなわちFEL照射はPSF表面へのヘパリンの固定化に貢献していることが判った。またヘパリンのコーティングに対しては、 $p > 0.05$ の値を示しており有意差がないと判断された。

一方、イオン照射した組(Yes)では、FEL照射に対し、 $p > 0.05$ の値を示しており有意差がないと判断されたが、ヘパリンのコーティングに対しては、ANOVAとtTest共に、 $p < 0.05$ を示しイオン注入法の有意差を確認した。

以上のことから、イオン照射によってPSF表面では分子切断が起き、生成ラジカルが空気中の酸素や水分と反応してヒドロキシル基やカルボキシル基が生成され、これがヘパリンのコーティング性を改善し、さらにFEL照射がヘパリンの特定部位を励起してヘパリンの固定化に寄与しているものと考えられる。

4. まとめ

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。

各種分析結果及び統計的解析結果から、イオン照射とFEL照射はヘパリンの固定化に貢献することが判り、最高 $1.38 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ のヘパリンを固定化できることがわかった。

このようなヘパリンの固定化プロセスは、イオン照射、ヘパリンのコーティングとFEL照射の3つのステップを通して次のような反応を起こしているものと考えられる。

PSFフィルムは150 keVのエネルギーで照射されること

Table 4 Examination of statistical difference of ion and laser irradiation methods.

PBII	Source	Analysis of Variance			t Test	
		Sum of square	F-ratio	Probability	t Value	Probability
No	FELI	3.53x10 ⁸	80.270	0.000	8.654	0.000
	HEP	1.83x10 ⁷	4.160	0.051	1.073	0.292
	FELI*HEP	9.88x10 ³	0.002	0.963		
Yes	FELI	1.35x10 ⁷	3.936	0.057	1.214	0.236
	HEP	1.40x10 ⁸	40.710	0.000	5.308	0.000
	FELI*HEP	3.92x10 ⁷	11.410	0.002		

により、PSF表面では一部の分子結合が切断され、その部位でラジカルなどが生じて活性化される。この生成ラジカルはその後ヘパリンをコーティングするとき、特にイオン照射した直後に活性化された状態で、溶媒とする水、溶質とするヘパリンと接することにより一部反応して親水性となり、乾燥してもヘパリン膜との密着性が優れたものとなる。FEL照射においては、その照射波長は重要で、波長6.31 μm ではPSF表面そのものが破壊されるが、波長6.18 μm で照射すると、ヘパリン表面のカルボニル基($-\text{C}=\text{O}$)がFEL光を吸収し励起され、PSF表面と化学的に反応することによりヘパリンが固定化されるものと考えられる。これらのことからイオン照射とFEL照射の複合照射の有用性が明らかになった。また本実験材料以外にポリエチレン材料、ポリテトラフルオロエチレン材料についても評価を行った結果、同様な結果を得ており、このような技術は他の材料表面の改質にも有用と考えられる。

謝 辞

本研究は科学技術庁の平成11年度科学技術振興調整費による「QOLを指向した生体融和材料の新創出に関する研究」の一環として実施したものである。関係各位に感謝します。有益な助言を戴いた奈良先端大学院大学今西 幸男教授、谷原 正夫教授に深謝します。また原稿整理に協力を得た深見 裕子氏に感謝します。

参考文献

- 1) R. J. Zdrahala: J. Biomater. Appl. **10** (1996) 309.
- 2) Y. Ito and Y. Imanishi: J. Biomater. Appl. **6** (1992) 293.
- 3) G. Khang, J. B. Park, and H. B. Lee: Biomed. Mater. Eng. **6** (1996) 47.
- 4) G. Clarptti, F. Schue, J. Sledz, A. ait ben Aoumar, K. E. Geckeler, A. Orsetti, and G. Paleirac: Biomaterials **13** (1992) 832.
- 5) K. J. Kim, A. G. Fane, and C. J. D. Fell: J. Membrane Sci. **43** (1989) 187.
- 6) T. Aoike, I. Teramura, Y. Suzuki, F. Gejyo, and M. Arakawa: Jpn. J. Artif. Organs **24** (1995) 685.
- 7) Y. Sato, K. Ito, H. Amemiya, T. Kobayashi, S. Uda, F. Koiwa, K. kino, E. Kinugasa, T. Akizawa, T. Ideura, and K. Tanigaki: Jpn. J. Artif. Organs **26** (1997) 858.
- 8) D. K. Han, S. Y. Jeong, and Y. H. Kim: J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater. **23** (1989) 211.
- 9) M. Amiji and K. Park: J. Biomater. Sci. Polymer Edn. **4** (1993) 217.
- 10) K. Kang, O. H. Kwon, M. K. Kim, Y. M. Lee, and Y. K. Sung: Biomaterials **18** (1997) 1099.
- 11) M. Yang, Y. J. Jong, K. Y. Hsu, and C. H. Chang: J. Biomed. Mater. Res. **39** (1998) 86.
- 12) W. Marconi, F. Benvenuti, and A. Piozzi: Biomaterials **18** (1997) 885.
- 13) H. Mirzadeh, A. A. Katbab, M. T. Khorasani, R. P. Burford, E. Gorgin, and A. Golestani: Biomaterials **16** (1995) 642.
- 14) Xu. Guo-chun, Y. Hibino, Y. Suzuki, Y. K. Kurotobi, M. Osada, M. Iwaki, M. Kaibara, M. Tanihara, and Y. Imanishi: Colloids & Surfaces B: Biointerfaces (in press).