

「高齢化社会に向けた安全・安心性を付与する抗血栓性コーティング剤の開発」

神戸大学大学院工学研究科

大谷 亨

1 研究の背景と目的

健康の維持、診断、治療などに不可欠な先端医療には、医療機器の発展がキーとなる。とりわけ脳梗塞や心筋梗塞などの心血管疾患は、高齢化社会が進行している我が国において国民が最も不安となる疾患であり、その治療には長期にわたって安全に使用可能な人工血管の実用化が不可欠である。本研究では、研究責任者が有する医療材料シーズであるポリグリセロールデンドリマー(PGDs)及びポリグリセロールデンドロン(GDs) (Fig.1) に着目し、人工血管をはじめとする医療器具を持続的かつ安全に使用可能な抗血栓性コーティング剤としての実現可能性を検証し、本格的な医療機器研究への足がかりとする。具体的には、(1) エポキシベースのシランカップリング剤を用いて PGDs、GDs、ポリエチレングリコール(PEG)固定化金基板を作製し、これら固定化基板における血中タンパク質の吸着を、表面プラズモン共鳴 (SPR)測定から検討した。さらに(2) 血液凝固時間に及ぼす PGDs 添加の効果を検討し、(3)各種アミノ酸と PGDs との相互作用を検討し、タンパク質との相互作用の基礎的知見を得ることとした。

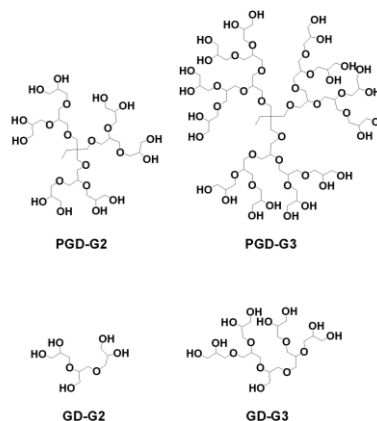


Fig.1 Chemical structures of polyglyceroldendrimers (PGDs) and glycerol dendrons (GDs).

2 研究方法

2-1: PGDs および GDs 固定化基板上での血中タンパク質吸着

第一～三世代の GDs(GD-G1、G2、G3)を、過去の報告例¹⁾を参考に合成し、1,1-メルカプト-1-ウンデカノールの SAM 膜を、SPR チップ上に形成させた後、3-グリシジルオキシプロピル-トリメトキシシランにて処理した。アセトナイド保護した各世代の GDs をエポキシ基と反応させることで固定化し、アセトナイド脱保護を行って GD 固定化基板を得た(Fig 2 (a)-(d))。同様にして、PGD-G2 および PEG (分子量 1,000: PEG1000) を固定化した基板を作製した(Fig. 2 (e), (f))。得られた基板を用い、SPR 測定から、ヒト血清アルブミン(HSA)、イムノグロブリン(IgG)、フィブリノーゲン(Fib)及びリゾチーム(Lys)の吸着を評価した。

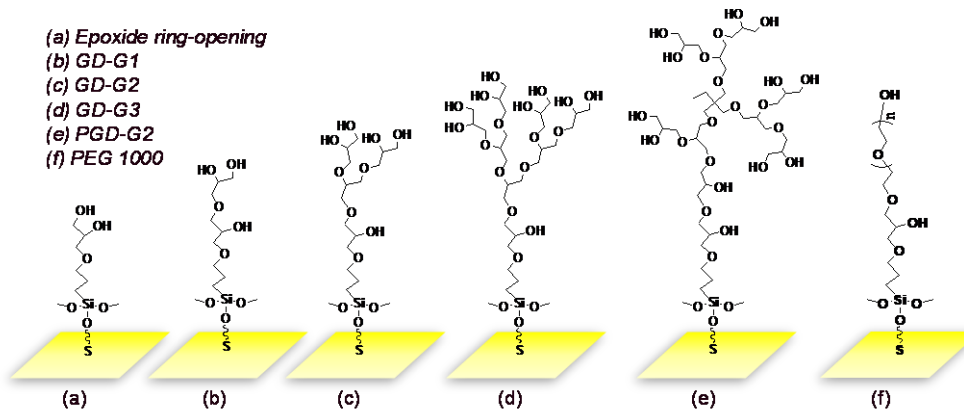


Fig 2. GDs, PGD-G2, and PEG-immobilized gold surfaces.

2-2: ウマ保存血液を用いた PGDs 存在下での血液凝固実験

ウマ保存血液を用いた Lee-White 法による血液凝固時間を測定した。この保存液には鮮血にアルセバー液 (ブドウ糖 2.05 g、食塩 0.42 g、クエン酸ナトリウム 0.80 g、クエン酸 0.055 g、精製水 100 ml ; クエン酸ナトリウム濃度 4.00 %) が 1:1 で混合されている。

予め恒温槽を 37 °C に設定した後、0.025 M CaCl₂ 水溶液 0.25 ml とリン酸緩衝生理食塩水 0.25 ml もしくはサンプル (PGD-G1 及び G2: 4mg/mL) 0.25 mL を 2 本の試験管にそれぞれ添加し、37 °C にて静置した。その後、針に血液が触れたときを 0 秒とし、凝固時間を測定し始めた。その後、30 秒毎に試験管を傾け、凝固しているかを確認した。1 本目の試験管の凝固が確認された後、2 本目の凝固時間を測定し、この合計時間を凝固時間 (Clotting time) とした。測定は 3 回行い、その平均値を算出した。

2-3: PGDs と各種アミノ酸との分子間相互作用の測定

親水性アミノ酸をゲスト分子の候補として取り上げ、等温滴定型熱量 (ITC) 測定によって分子間相互作用の熱量計測を行うことで、PGD のホスト分子としての可能性について検討した。

3 研究成果

3-1: PGDs および GDs 固定化基板上での血中タンパク質吸着

Fib 吸着の SPR 測定の結果、GDs 世代数の増加に伴って Fib 吸着が抑制された (Fig. 3)。これは、高密度の OH 基が Fib のような異方性の高いタンパク質との吸着に寄与していることを示唆していた。一方、GD-G3 表面上への IgG の吸着量は、GD-G1 や G2 への吸着量より多かったことから、GDs の世代数増加に伴い、下層周辺の疎水性が増加し、疎水性相互作用によって IgG と吸着し、さらに、エポキシ反応後に生成された二級水酸基は、疎水性環境下においてタンパク質と相互作用する水素結合のドナーとしての役割を果たしていると考えられる。HSA では、おおむねどの GD でも良好な吸着抑制効果を示した。以上のことから、エポキシベースのシランカップリング剤により固定化された GDs は、タンパク質の大きさや形状によって相互作用が異なることが明らかになった。

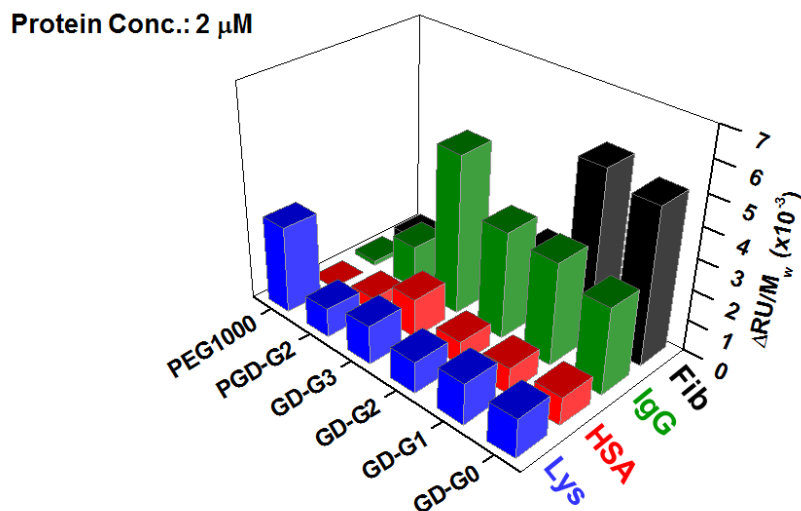


Fig 3. Proteins adsorption on GDs, PGD-G2, and PEG-immobilized gold surfaces.

一方、GDs と PGD-G2 とを比較すると、PGD-G2の方がタンパク質吸着を抑制する傾向にあった(Fig.3)。原子間力顕微鏡によって表面形状を観察したところ、GD-G3よりもPGD-G2の方がなめらかな表面であったことから、枝分かれした水酸基密度が高いPGDのほうがGDよりも疎水的環境を示す金基板表面をカバーしており、タンパク質吸着の抑制に寄与しているものと考えられた。PEG1000はLys以外の血中タンパク質を抑制する傾向がみられ、PEGの排除体積効果が大きくタンパク質吸着抑制に寄与していることが示された。

3-2: ウマ保存血液を用いた血液凝固におけるPGDsの影響

ウマ保存血液に血液凝固促進効果のあるCaCl₂を25mM加えるとおよそ2本の合計で20分28秒で凝固することを予備実験として確認した(Fig.4)。そこで、50%ウマ保存血液に6.25mM CaCl₂と最終濃度が1mg/mLであるPGD-G1およびG2存在下における血液凝固時間を測定したところ、それぞれ192.3±22.8分、24.8±2.35分であった(Fig.5)。対照であるリン酸緩衝生理食塩水(PBS)の場合は、67.9±6.8分であったことから、PGD-G1は血液凝固を抑制し、PGD-G2は促進したことになる。これらのことから、水酸基が多くなることで捕体系が活性されやすくなる可能性があり、低世代のPGDを使用することが有効である可能性が示唆された。



Fig.4 A picture of clotted house blood containing 25mM CaCl₂.

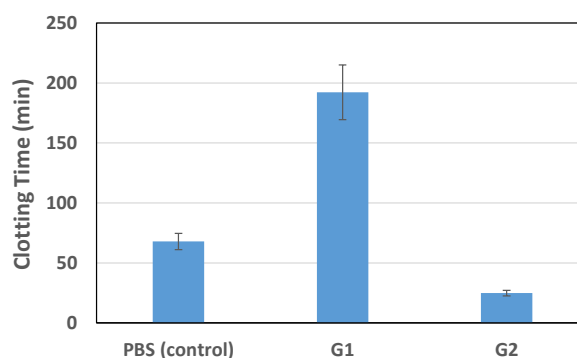


Fig.5 Clotting time of 50 % house blood containing 0.1% PGD-G1 or G2 and 4.25mM CaCl₂.

3-3: PGDs と各種アミノ酸との分子間相互作用

種々のアミノ酸およびアミノ酸類似化合物とPGDとのITC測定の結果、L-アルギニン、L-リシン、L-ヒスチジンがPGD-G3と相互作用し、 α -アミノ基の存在しないL-アルギニン、及びL-リシン類似構造化合物では相互作用がみられなかった。従って、PGDとの相互作用にはゲスト分子1分子内に2つの塩基性部位が必要であり、これら塩基性部位に付加しているプロトンがPGD内部のエーテル性酸素とファンデルワールス相互作用していることが示唆された¹⁾。

4 生活や産業への貢献および波及効果

高齢化社会が進行している我が国において血液と接する材料としては人工血管の他にカテーテルや血液バックなどがある。いずれも、血液に接すると血中タンパク質の吸着がトリガーとなって血液凝固が促進することから、通常はヘパリンなどの血液凝固抑制物質を添加またはコーティングすることが多い。しかしながらヘパリンは動物由来であることが多く、そのため、安全性が常に懸念されていた。本研究では、合成分子である

ポリグリセロールデンドリマー(PGDs)及びポリグリセロールデンドロン(GDs)に着目し、材料表面固定(コーティング)を想定して、血中タンパク質の吸着について比較検討した。その結果、PGD-G2が血中タンパク質の吸着抑制に有効であることが示された。しかしながら、血液凝固の観点からはPGD-G2は血液凝固をむしろ促進するような結果が得られ、水酸基数の少ないPGD-G1が血液凝固を抑制する傾向が示された。これらの実験結果を総合すると、人工血管をはじめとする医療器具を持続的かつ安全に使用可能な抗血栓性を示すためには、材料表面の水酸基密度を高くし、かつ水酸基数の少ないPGD-G1をヘパリンと同様に添加または溶出させるような仕組みを取り入れることで、医療器具への応用展開を推進できる可能性があると考えられる。従って、国民や県民への生活への使用には現状では及ばないものの、今後、合成由来のPGD独自の血液適合性のメカニズムを追及していくことで新たな産学連携の足がかりとなるものと期待できる。

【発表論文】

- 1) T. Ooya, H.J. Lee, Amino Acids-Dependent Host-Guest Interaction: Polyglycerol Dendrimer of Generation 3 Encapsulates Amino Acids Bearing Two Amino Groups, *ChemNanoMat*, in press (DOI: 10.1002/cnma.201500018R1).