

Title	蛋白質固定化による高分子材料への抗血栓性賦与に関する研究
Author(s)	青柳, 貞吉
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/32777
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	青 柳 賢 吉
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 5 2 4 8 号
学位授与の日付	昭和 56 年 3 月 25 日
学位授与の要件	薬学研究科 応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	蛋白質固定化による高分子材料への抗血栓性賦与に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 三浦 喜温 (副査) 教授 近藤 雅臣 教授 岩田平太郎 教授 青沼 繁

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

人工臓器の研究・開発及び臨床利用において、血液と人工臓器を構築する医用材料との接触により生ずる血栓形成は生体の機能・生命に弊害を及ぼすばかりではなく人工臓器としての機能をも著しく損い、きわめて重要な問題であり早急な抗血栓性材料の確保が望まれている。従来より既存の高分子材料の中からの血液適合性にすぐれた材料の選択及び分子設計の概念より血液適合性の良好な高分子材料の開発が実施されてきたが、高分子材料が人工的なものであり生体にとってはあくまでも異物であるためにその程度の如何にかかわらず血栓形成の発現は免れないものと考えられている。このようなことから、積極的に高分子材料に抗血栓性を賦与する試みがなされている。すなわち、ヘパリン、ウロキナーゼあるいは血小板機能抑制剤の固定化により材料そのものにこれらの機能を賦与する試みが企てられているが、臨床領域にて血栓形成抑制のために投与する薬物が安易に固定化されたきらいがあり未だに満足な抗血栓性は確保されていない。

このような現況において、血栓形成の機序・要因の把握及び解析にもとづき、高分子材料に固定化技術¹⁾の応用により有効的に凝固阻害能、線溶系賦活性化能及び血小板凝集阻害能を賦与させることにより積極的に医用高分子材料に抗血栓性を賦与することを追究した。

本 論

第一章 医用材料による血液凝固系の活性化

人工医用高分子材料(材料)、すなわち異物と血液との接触により生ずる血液凝固の根本的原因は、凝固系接触相第Ⅹ因子の活性化にあり²⁾、この活性化の程度は材料の血液適合性を決する一要因であ

る。したがって、材料による凝固系活性化に関する知見は、各種材料の血液適合性の評価を行ううえでも、人工臓器利用時の血栓形成の防止策を考慮するうえでもきわめて重要である。このようなことから、各種材料による血液凝固系の活性化について新たに考案した方法により検討を行った。

第Ⅷ因子の活性化にともなって活性化を受けたカリクレイン量を合成基質⁹⁾を用いて特異的にかつ精度良く測定することにより材料による凝固系活性化の程度の指標とした。家兎あるいは犬クエン酸処理全血、多血小板血漿(Platelet Rich Plasma, PRP)あるいは血漿を血液試料として、各種材料あるいは材料表面に蛋白質等を共有結合法により固定化したものによる活性化を検討した。表1に示したように各種材料による活性化量はガラス、カオリンの場合に比べてきわめて低いものの、従来比較的血液適合性が良好とされているシリコン、テフロン¹⁰⁾においても凝固系の活性化が認められた。また凝固系の活性化は蛋白質固定化による材料表面修飾によって、影響をうけることをも認めた。このような、in vitroでの材料による凝固系活性化に関する知見は、人工臓器利用時において、絶えず凝固系が活性化され、血液凝固塊が生じる危険性を常に有していることを示すものである。

Table 1. Activation of Rabbit Plasma Prekallikrein by Various Biomedical Materials

Materials	AMC Formed (nmole/45 min)		
	Plasma	PRP	Whole Blood
Glass	32.8	26.4	48.0
Silicone	0.26	0.64	0.15
Polyethylene	0.24	0.41	0.16
Polyvinyl Alcohol	0.20	0.12	0.15
Polypropylene	0.18	0.13	0.12
Polystyrene	0.27	0.16	0.16

第二章 ヘパリン固定化材料の抗血栓性

臨床上、人工臓器を利用する際には血液凝固を阻止し血液の流動状態を維持するためにヘパリンの静注投与が行われる。しかしながらヘパリンによって血液凝固は抑制されるものの、血栓形成の要因である血小板の機能を抑制することはできず、必ずしも血栓形成を阻止することは困難であると考えられている。さらにはヘパリン投与によって重篤な出血傾向が発現すること¹¹⁾はよく知られているが、ヘパリンが家兎血小板小凝集塊を形成させるという新たな知見を得、血液凝固を阻止するために投与されたヘパリンが一方では小凝集塊形成を惹起し血小板由来の血栓形成を増長させる可能性があることを認めた。

このようなことから、材料に抗凝固性を賦与するためにヘパリンの共有結合法あるいはイオン結合法による材料への固定化に関する検討がなされてきた。イオン結合法の場合、材料表面からのヘパリンの徐放性によりその効果を発現するもので根本的にはヘパリンの静注投与と同一である。長期にわたる抗凝固性を目的として検討されてきた共有結合法による固定化の場合には、結合されたヘパリンは材料表面に安定に保持され、活性化第Ⅹ因子及びトロンピンと比較的緩やかに結合することはでき

るもののこの結合により活性化凝固因子は阻害されないことを認めた。その結果、共有結合法によるヘパリン化材料は、*in vitro*での血漿凝固形成時間測定による抗凝固性の検討において、殆んど効果を示さず抗血栓性材料としての機能性を示さないことを認めた。

第三章 アンチトロピンⅢおよびヘパリン同時固定化材料による血液凝固阻害

活性化を受けた凝固因子は血漿中のアンチトロピンⅢ (ATⅢ) によって阻害を受ける。その際にヘパリン (Hep) が存在するとその阻害速度は1000倍以上増加し、瞬間的に阻害作用が認められるようになる⁹⁾。Hepの存否にかかわらず、阻害量は不変であるが、阻害が瞬間的に完了することは、全体の凝固活性を低下するうえできわめて効果的である。したがって、アンチトロピンⅢ・ヘパリン複合体(ATⅢ・Hep)を医用材料に固定化した場合に、その阻害活性が保持されておれば、すぐれた抗血栓性材料となりうる事が考えられる。

このようなことから、ATⅢ及びHepを種々結合様式により、Sephrose 4Bを担体として用いて固定化し、その阻害活性を検討した(表2)。ATⅢ・Hepを同時固定化した場合(I-ATⅢ・Hep)においてのみ、Soluble ATⅢとSoluble Hepの場合と同様な阻害効果が認められ、他の幾つかの結合系では、そのような際立った阻害効果は発現しなかった。さらにATⅢ単独固定化材料(I-ATⅢ)にSoluble Hep、もしくはI-HepとSoluble ATⅢにそれぞれトロピンを作用させても瞬間的阻害はなく、I-ATⅢ、もしくはSoluble ATⅢによる緩やかな阻害が進行するのみであった。

I-ATⅢ・Hepは図1に示したように、活性化接触相因子、活性化第X因子(Xa)、トロンピンを阻害することを確認し、その阻害速度は、I-ATⅢとは比較にならない程のもので、Soluble ATⅢとSoluble Hepとの場合に近い速度できわめて迅速な阻害が認められた。

一方、Xaについてはトロンピンよりも優先的な阻害効果を示し、かつ、Xa阻害量はトロンピンに

Table 2. Various Preparations of Immobilized Antithrombin Ⅲ and Heparin, and Their Anticoagulant Activity

Preparation no.	Immobilization procedure	Abbreviation	Schematic expression	Anti coagulant activity
1	AT Ⅲ and heparin were co-immobilized	I-AT Ⅲ・Hep		++
2	AT Ⅲ and excess heparin were co-immobilized			++
3	AT Ⅲ was immobilized, heparin was bound to AT Ⅲ			+
4	Heparin was immobilized, AT Ⅲ was bound to heparin			+
5	AT Ⅲ and heparin were immobilized separately	I-AT Ⅲ + I-Hep		+
6	Bovine serum albumin was immobilized as a control gel	Control		-

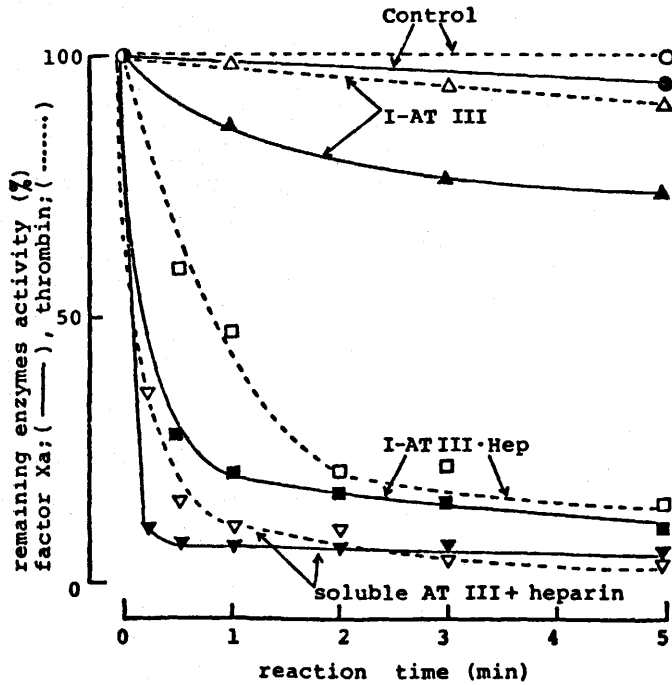


Fig.1. Neutralizations of Thrombin or Factor Xa by Immobilized Preparations, or Soluble Antithrombin III plus Heparin.

比べてはるかに多く、この特性も総合的な凝固活性を抑えるうえでは効果的である。I-ATⅢ·Hepは保存性・安定性にきわめてすぐれた特性を示し、かつ、1N Acetateの利用により再生が可能であり、そのことにより活性低下を来たさずに反復利用が可能であった。カリクレイン活性測定による凝固系接触相活性化に関する検討においても、ATⅢ·Hepの同時固定化により大幅な活性化の軽減が認められた。

Table 3. Neutralizations of Thrombin by Immobilized Preparations

Carrier Immobilized Preparation	Neutralized Thrombin (units)		
	P.V.A. (10mg)	PolyHEMA (10mg)	silicone (1.0cm ²)
Control	0	0	0
I-Hep	2.3	0.37	—
I-AT III	2.5	0.32	—
I-AT III·Hep	4.6	0.76	1.0

Thrombin was allowed to react with an immobilized preparation at 37°C for 10 min and the remaining thrombin activity in supernatant was measured by the clotting time method. The above shown values are units of thrombin neutralized when P.V.A. and PolyHEMA of 10mg and silicone-coated nylon mesh of 1.0cm² in surface were used as carriers.

第四章 医用高分子材料へのアンチトロピンⅢ・ヘパリンの同時固定化とその抗凝固性

血液適合性の比較的良好な材料であるポリビニルアルコール(PVA)、ポリヒドロキシエチルメタクリレート(Poly HEMA)そしてシリコンに対して材料の水酸基を用いて、CNBr 活性化法により、ATⅢ・Hepを同時固定化した場合には、Sephrose 4Bの場合と同様にすぐれた抗凝固活性を示した。

第5章 アンチトロピンⅢ・ヘパリン同時固定化材料とウロキナーゼ同時固定化材料との併用における抗血栓性

I-ATⅢ・Hepはすぐれた凝固阻害能を有するものの、その阻害の本態が同時固定化されたATⅢ・Hepと活性化凝固因子との結合によるものであるために、その阻害能には限度がある。このようなI-ATⅢ・Hepの欠点を補い、より広範囲に抗血栓性材料として利用するために、線溶系を賦活化できる固定化ウロキナーゼ(I-UK)^{7,8)}との併用による抗血栓性の増大を検討した。

I-UKはSephrose 4B, ナイロン, シリコンに固定化した場合に、その線溶系賦活能を示し、合成基質、プラスミノゲンに対してI-UKは、分解活性を示し、かつ凝固塊を溶解し、再流動化することができた。全血を用いての回転チューブ法による抗血栓性試験において、I-UKは凝血の抑制・阻止効果を示したが、凝血が急速に惹起するような場合は、その効果は殆んど確認できず、Sephrose 4B担体重量あたりの抗血栓性では、I-ATⅢ・Hepには及ばなかった。図2および表4に示したように、I-ATⅢ・HepあるいはI-UK単独では、それぞれ抗血栓性を示さない程度の微量でも両者を混合して併用することにより、あるいは同一固定化担体にATⅢ・HepとUKとの両者を同時固定化したものを用いることにより抗血栓性が著明に発現することを認めた。I-ATⅢ・HepあるいはI-UKに比べて、血液凝固系阻害能および線溶系賦活能の両機能を固定化により賦与された材料

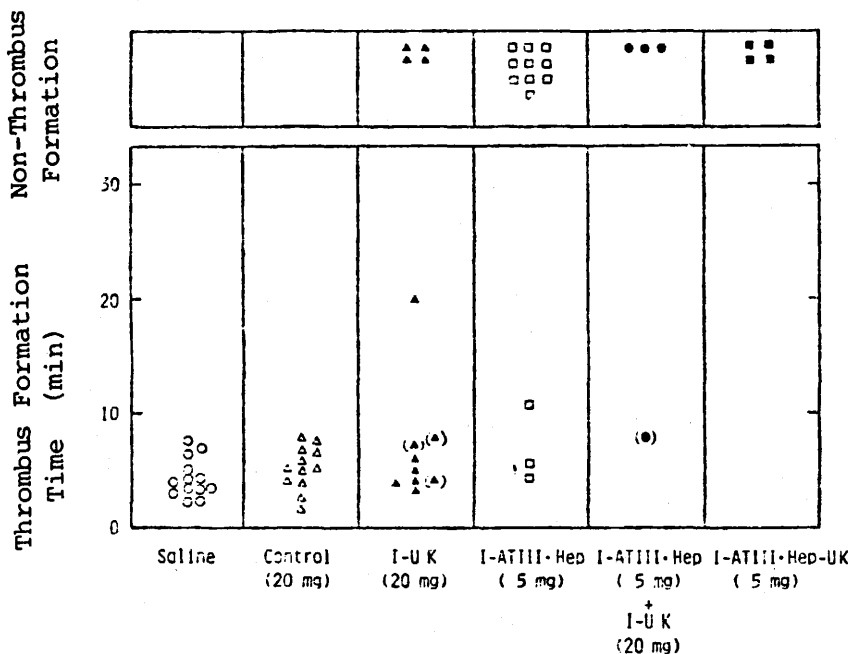








Fig. 2. Antithrombotic Activity of Various Immobilized Preparations

Table 4. Various Preparations of Immobilized Antithrombin III, Heparin and/or Urokinase, and Their Antithrombogenic Activity

No.	Immobilized Materials	Abbreviation	Schematic Expression	Anti-thrombogenic activity
1	Bovine Serum Albumin	Control		-
2	Heparin	I-Hep		+
3	AT III-Hep	I-AT III-Hep		++
4	Urokinase	I-UK		+
5	AT III-Heparin, Urokinase	I-AT III-Hep, I-UK		+++
6	AT III-Hep and Urokinase	I-AT III-Hep-UK		+++

は著明な抗血栓性を示し、両機能の併用により大幅な抗血栓性の増大をもたらすことが可能であることを認めた。

第六章 機械的応力下において、全血中で惹起する血小板凝集の原因物質の確認とその分解による凝集塊形成阻止

血小板は粘着および凝集反応において、血栓形成における重要な役割を担っている。血液の体外循環施行時においては、重篤な血栓形成に至らなくても血中血小板数の減少並びに血小板凝集塊による微小血管閉塞等が頻発する⁹⁾。人工臓器利用時に血小板による血栓が生じる場合には、血液に対して血液ポンプ等の利用により機械的応力が働くことが大きな特徴である。このような血液に対して機械的応力が作用する条件下での血小板挙動について、in vitroでのモデル実験により検討を行った。

家兎クエン酸処理全血に対して、小攪拌子、回転二重円筒装置あるいはペリスタポンプを用いて機械的応力を作用させた場合には、自然に存在する血小板の数 (Free Platelet Count, FPC) が減少し、同時に血小板凝集塊の形成が認められた。図3に示したように、小攪拌子の回転による機械的応力負荷下での全血中の凝集塊の形成の程度をFPC減少より検討した場合には、応力負荷初期のFPC減少と小攪拌子回転速度との間には相関性が認められ、かつ溶血の程度も回転数に応じて経時的に増加傾向を示した。一方、多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma, PRP) を血液試料として用いた場合には、FPC減少・凝集塊形成ともに殆んど観察されなかった。

全血あるいは、PRPに小攪拌子による機械的応力を作用させた場合の血漿中のATP, ADP濃度を測定したところ、図4に示した如く、PRPの場合には殆んどATP, ADPともに増加傾向は認められないが、全血を用いた場合にはADP濃度の大幅な上昇を認めた。これは血小板凝集を惹起するに十分なADP濃度であり、また赤血球を破碎処理して得た上清を用いて血小板凝集を惹起させることができ、血中で0.2%の溶血が生じた場合には完全な血小板凝集が生じることを認めた。この

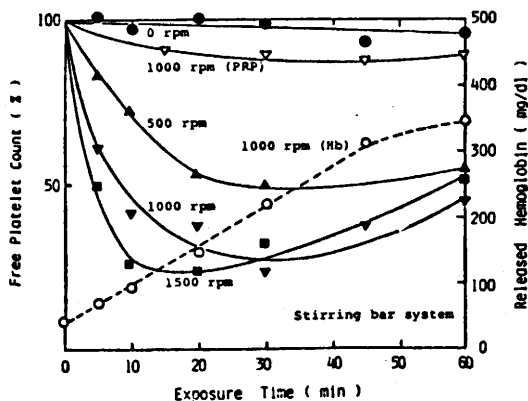


Fig. 3. Reduction in Free Platelet Count of Sheared Blood in a Stirring Bar System or Sheared PRP.

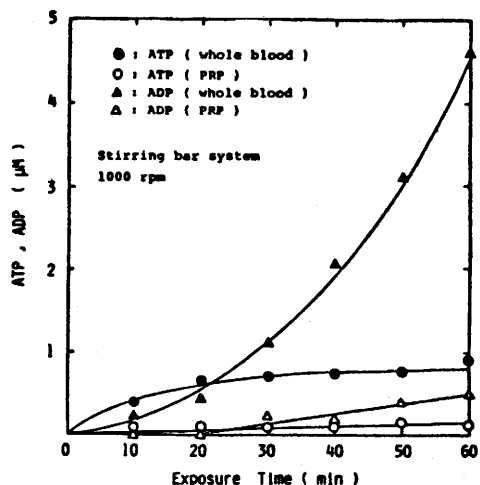


Fig. 4. Extracellular Concentration of ATP and ADP of Blood or PRP as a Function of Shearing Time.

ようなことから、血液に対して機械的応力が作用した場合には損傷を受けた赤血球よりADPが血漿中に遊離し、このADPが血小板凝集を惹起し、FPCが減少したものと考えられる。

小攪拌子による応力負荷下の血液に対して、血漿中のADPをATPに変換するために、Pyruvate Kinase及びPhosphoenolpyruvate (PK-PEP)を添加した場合には、FPC減少が大幅に軽減され、またFPCがすでに減少している試料に添加した場合にはFPCの回復、凝集塊の解離が認められた(図5)。また、ADP溶液あるいは赤血球破碎上清液にPK-PEPを作用することにより、これらの凝集惹起能が消失し、さらには、ADPもしくは上清液により惹起された血小板一次凝集はPK-PEP添加により解離した。

このような事実は、体外循環時の血液ポンプ利用により、同様な事由により、血小板凝集が生じていることを示すとともに、原因物質であるADPを分解する機能を人工臓器に組みこむことにより、血小板凝集由来の血栓を阻止することが可能であることを強く示唆するものである。

第七章 固定化アピラーゼのADP分解による血小板凝集阻止

血小板凝集原因物質のADPを凝集惹起能のないADP以外の物質に変換するには、PK-PEP等により、ATPに変換するのも一方法であるが、高エネルギー化合物の基質を添加する必要がある、さらにはPKの活性が低下・消失した場合には血漿に蓄積したATPより高濃度のADPが生成される可能性があり必ずしも望ましい方法ではない。このようなことから、ADPをADP分解酵素によ

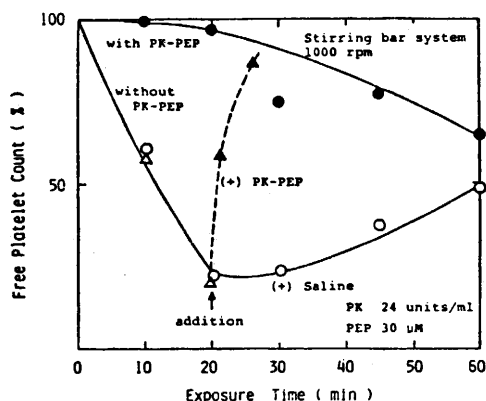


Fig. 5. Effect of Pyruvate Kinase-Phosphoenolpyruvate on the Reduction of Free Platelet Count in Sheared Blood.

りAMP等に分解することが實際上効果的である。ADP分解酵素の一例としてアピラーゼ (Type B)¹⁰⁾の効果を検討した。アピラーゼは、ADP分解により血小板凝集阻止効果を示すことを認めた。また、Sephrose 4BあるいはNylonに固定化したアピラーゼも同様な血小板凝集阻止効果が認められ(図6),さらには固定化により大幅なアピラーゼ活性の安定化がはかられ、乾燥保存後にも70%程度の活性が残存し、抗血栓性材料として有効であることを認めた。

結 論

- 1) 医用高分子材料と血液との接触による血液凝固において、種々材料との接触による血漿プレカリクレインの活性化量を合成基質を用いて測定することにより、各材料の凝固系接触相活性化に関する血液適合性の評価を行うことを認めた。従来利用されている各高分子材料表面において、凝固系接触相活性化反応が生じていることを認めた。
- 2) ヘパリンには、*in vivo*及び*in vitro*にて家兎血小板の小凝集塊の形成を惹起する作用があることを認め、さらには、これまで抗血栓性材料として検討されてきた共有結合法によるヘパリン固定化医用材料は、活性化凝固因子と結合できるものの、その結合により阻害されず抗血栓性材料としての機能を示さないことを認めた。
- 3) Sephrose 4Bに同時固定化したアンチトロピンⅢ及びヘパリンは、凝固系活性化接触相因子、活性化第X因子及びトロピンと迅速に結合し、これらを阻害することができた。特に、活性化第X因子とトロピンが共存した場合には、より多くの活性化第X因子を優先的に阻害することができ、この同時固定化材料はすぐれた血液凝固阻害能を発揮することを認めた。
- 4) 医用高分子材料であるポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルメタクリレートあるいはシリコーンにアンチトロピンⅢ及びヘパリンを同時固定化した場合においても、Sephrose 4Bの場合と同様にすぐれた凝固阻害能を発現することを認めた。
- 5) 線溶系を賦活化できるウロキナーゼ固定化材料をアンチトロピンⅢ・ヘパリン同時固定化材料と併用した場合には、その併用により、それぞれ単独の場合より大幅な抗血栓性の増大がもたらされることを認めた。
- 6) 血液に対して、機械的応力が作用した場合には、主として赤血球より遊離したADPによる血小板凝集が惹起されることが認められた。さらには、遊離したADPをATPもしくはAMPに変換する酵素を添加することにより、血小板凝集の阻止及び凝集塊の解離がもたらされることを認めた。
- 7) アピラーゼ固定化材料はADPを分解することにより、血小板凝集塊の形成を阻止し、抗血栓性

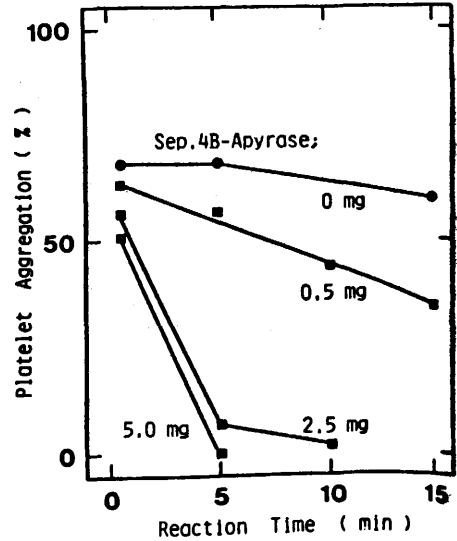


Fig. 6. Repression of Platelet Aggregation by Immobilized Apyrase Blood cell extract was incubated with immobilized apyrase for the specified time. The extract was then added to platelet rich plasma. Platelet aggregation was measured by an aggregometer.

材料として有効であることを認めた。

引用文献

- 1) T. M. S. Chang, *Inter. J. Artif. Organs* 1, 35 (1978).
- 2) R. L. Heimark, K. Kurachi, K. Fujikawa and E. W. Daive, *Nature* 286, 546 (1980).
- 3) T. Morita, H. Kato, S. Iwanaga, K. Takada, K. Kimura, K. nd S. Sakakibara, *J. Biochem J. (Tokyo)* 82, 1945 (1977).
- 4) V. L. Gott, *Fed. Proc.* 30, 1679 (1971).
- 5) G. P. M. Crawford and A. S. Douglas, In *Recent Advances in Blood Coagulation*, ed. L. Poller, p. 337. Churchill Livingstone, London and New York (1977).
- 6) P. S. Damus, M. Hicks and R. D. Rosenberg, *Nature* 246, 355 (1973).
- 7) G. W. Sobel, S. R. Mohler, N. W. Tones, A. B. C. Dowdy and M. M. Guest, *Am. J. Physiol.* 171, 768 (1952).
- 8) D. G. Deuth and T. Z. Mertz, *J. Med.* 3, 224 (1972).
- 9) T. C. Hung, R. M. Hochmuth, J. H. Joist and S. P. Sutura, *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs* 22, 285 (1976).
- 10) J. Molnar and L. Lorand, *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 353 (1961).

論文の審査結果の要旨

血栓形成には血液凝固系の活性化によるものと、血小板凝集によるものがあるが、この論文ではこの両面よりの血栓形成をそれぞれ阻止し得るような機能性高分子材料の開発を追求した。まず高分子材料の抗血栓性を検査する従来よりもはるかに精度のよい方法を見出し、それによって各種高分子材料の抗血栓性を測定し、血栓防止対策を検討した。すなわち先ず従来よりよく用いられているヘパリン化材料の特性を調べ、これは血液凝固因子Ⅹ及びトロンビンを物理的には吸着するが、その活性を阻害することのできないことを見出した。それに対しアンチトロンビンⅢ(AT・Ⅲ)、ヘパリン複合体の固定化材料は前記両凝固因子に対して非常に高い阻害活性を有することを見出した。さらに AT・Ⅲ、ヘパリン固定化材料にウロキナーゼ(UK)を固定化することによってそれぞれ単独に固定化した場合よりはるかに高い線溶系賦活化能及び凝固阻害能を有する機能性材料を開発した。又機械的応力の場合における血小板凝集の主要原因がADPであることを見出し、アピラーゼ固定化材料によって高い血小板凝集阻害能を得ることができた。以上の研究により高い抗血栓性材料を得ることができ、本研究は充分博士論文に値する。