



Title	抗血栓性を有するハイブリッド型医用材料の構築に関する研究
Author(s)	廣田, 晃一
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35348">https://hdl.handle.net/11094/35348</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	ひろ 廣	た 田	こう 晃	いち 一
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	7705	号	
学位授与の日付	昭和	62	年	3月26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	抗血栓性を有するハイブリッド型医用材料の構築に関する研究			
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 竹本 喜一			

### 論文内容の要旨

生体内器官の人工臓器による一部あるいは全置換術は近年ますます増加する傾向にある。人工臓器にはその性質上血液との接触の不可避であるものが多く、それ故、血液適合性に優れた材料の開発が強く望まれている。

材料に積極的な抗血栓性を賦与するための方法として、酵素の材料表面への固定化がある。抗血栓性を有する蛋白質を固定化することによって、基本的には材料の物性を損うことなく抗血栓性を材料に賦与することが可能である。

血管内皮細胞は積極的に生体内における抗血栓性を司っており、この性質は凝固系、線溶系因子、及び血小板との複雑な相互作用によるものであると考えられている。この抗血栓性機能を酵素固定化の手法を用いて合成高分子材料表面上に構築することを目的として以下の検討を行った。

ウシ大動脈壁は、血小板凝集抑制活性を有している。これを、ホモジナイズし、遠心分離法による分画を行った結果血小板凝集抑制活性はミクロソーム画分に局在していることが明らかになった。この活性の合成高分子材料への固定化を試みた。まず、フィブリン・ゲルへの固定化を試み良好な血小板凝集抑制活性を維持している事が明らかになった。次にミクロソーム画分を可溶化した後に材料への固定化を行った。固定化ミクロソーム・プロテイン(I-MP)も血小板凝集を顕著に抑制することが可能であった。この効果は、ウシ血清アルブミン固定化あるいは、熱処理によって失活させたミクロソームの可溶化・固定化においては発現せず、I-MPにおいても大動脈壁ミクロソーム本来の活性によって血小板凝集の抑制がおこなわれていると考えられた。また、全血機械的応力負荷下における遊離血小板数の減少に対してもI-MPは抑制効果を示した。ADP凝集に対する抑制効果は、I-MPにおいても

大動脈壁ミクロソーム画分同様濃度依存的であった。37°Cにおける安定性は、固定化によって顕著に増大した。

I-MPに含まれる酵素活性を測定したところ、PG I<sub>2</sub>産生能、及びADP分解活性が観察された。また、アキラドン酸凝集に対する抑制効果は、PG I<sub>2</sub> synthetaseの特異的阻害剤である15-HPETEによって、阻害を受けた。しかし、ADP、コラーゲン凝集に対しては、殆んど阻害効果がなかった。PG I<sub>2</sub>自体は、これらの凝集に対しても抑制効果を示すことが知られているので、I-MPにおいては、これらの凝集に対しての、別の機作が強く働いていると考えられた。

以上のように大動脈壁ミクロソーム画分の有する血小板凝集抑制活性は、固定化可能であり、材料に抗血栓性を賦与する上において有効であることが明らかになった。しかし、現実には、材料に固定化できる分子の量は限られており、また、副作用を避けるためにも、出来る限り精製した標品を用いる事が望ましいことから、大動脈壁ミクロソーム画分の血小板凝集抑制活性の分離・精製について検討を行なった。

可溶化大動脈壁ミクロソーム画分の血小板凝集抑制活性はDEAE-Sepharose CL 6Bによって、ADP凝集を抑制する画分と、アラキドン酸凝集を抑制する画分とに分離された。この活性は、各々、ADPase活性とPG I<sub>2</sub> synthetaseに由来すると考えられた。生体内における血小板凝集は主としてADPによって惹起されるという報告もあり、このADPase活性は、生体内においても血小板凝集抑制に重要な働きを担っていると考えられた。そこで、血管壁の優れた抗血栓性の機構に関する情報を得るために、次にこのADPase活性について更に詳細に検討を行った。

ADPase活性を含む画分は、非特異的phosphataseの基質を分解しなかったことから、特異的な酵素の存在が示唆された。また、adenylate kinaseの特異的阻害剤であるAp 5 Aによる阻害が観察されなかったことからadenylate kinaseとATPaseの協同作用によるものでもないと考えられた。Blue-dextran conjugated Sepharose 4Bによって、更に精製を行ない、その後、ポリアクリルアミド電気泳動によって分離、抽出した標品には、ADPase活性とATPase活性が含まれていた。この標品をポリアクリルアミド電気泳動にかけて、その純度を検定したところ、単一の蛋白質バンドを示した。以上の結果から、大動脈壁ミクロソーム画分におけるADPase活性は、単一の酵素によるものであり、その酵素はATP diphosphohydrolaseであると考えられた。

大動脈壁ミクロソーム画分のADPase活性が、ATP diphosphohydrolaseによるものである可能性が高いことから、次に、ジャガイモのATP diphosphohydrolaseをモデルとして、その固定化を試み、それが顕著な血小板ADP凝集抑制活性を有することを確認した。

血管は、血液適合性を維持するために、血液凝固系に対してもその阻害機能を有している事が知られている。この機能も血小板凝集抑制能と同様に重要であると考えられる。血管内皮細胞上には、トロンビンを阻害するのみならずトロンビンによるプロテインCの活性化によって凝固系を積極的に阻害する蛋白質トロンボモジュリンの存在が知られている。この蛋白質を固定化することによって、より効果的な凝固阻害能を材料に賦与可能であると考えられた。そこで次に、トロンボモジュリンの精製・固定化を検討した。

トロンボモジュリン固定化材料は、トロンビンに対して遊離状態と同等の  $K_a$  値を示し、それを極めて迅速に阻害することが可能であり、またその特徴的な作用として、トロンビンによるプロテイン C の活性化を促進することが可能であった。その結果として、トロンボモジュリン固定化材料は血漿の凝固時間を有意に延長することが可能であった。

以上の検討において、血管内皮細胞の有する優れた抗血栓性は、合成高分子材料に賦与することが可能な性質のものであり、また実際特定の蛋白質固定化によって抗血栓性を有する高分子医用材料の構築が可能であることが示された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は血管内皮細胞が積極的に生体内の抗血栓性をつかさどっていることに着目し、この抗血栓性機能を酵素固定化の手法を用いて高分子材料表面上に構築することを目的とした研究である。先ず大動脈ミクロソーム分画に強い血小板凝集抑制活性のあることを見出し、それがプロスタサイクリン (PG I<sub>2</sub>) 産生及び ADP 分解によるこをつきとめた。さらに大動脈ミクロソーム固定化材料も積極的に血小板凝集を抑制する活性を有することを明らかにした。また PG I<sub>2</sub> 産生は PG I<sub>2</sub> synthetase により、ADP 分解は ATP diphosphohydrolase (アピラーゼ) によるこを確かめ、それらの酵素の固定化によっても高い血小板凝集抑制活性を有する高分子材料の構築されることを示した。またトロンボモジュリンの固定化によって高い抗凝固活性を与えることを明らかにした。このようにして血管内皮細胞中の PG I<sub>2</sub> synthetase、アピラーゼ及びトロンボモジュリンの固定化によって生体血管内と同一の機構によって抗血栓性機能を高分子材料に賦与することの可能なことを明らかにした、よって本論文は博士論文に価すると認められた。