



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	https://hdl.handle.net/11094/35348
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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

廣 田 晃 一

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

目 次

緒 論	1
本 論	5
第一章 血管の血小板凝集抑制活性	5
第一節 緒言	
第二節 大動脈ミクロソームによる血小板凝集抑制	
第三節 大動脈ミクロソームの血小板凝集抑制活性	
第四節 考察および小括	
第二章 大動脈ミクロソーム固定化材料の血小板凝集抑制活性	15
第一節 緒言	
第二節 大動脈ミクロソーム包括固定化材料の血小板凝集抑制活性	
第三節 可溶化大動脈ミクロソーム固定化材料の血小板凝集抑制活性	
第三章 大動脈ミクロソームの血小板凝集抑制活性の性質	26
第一節 緒言	
第二節 血小板凝集抑制活性の可溶化	
第三節 血小板凝集抑制活性の分離	
第四節 大動脈ADP分解活性の性質	
第五節 アピラーゼ固定化材料の血小板凝集抑制活性	
第六節 考察および小括	
第四章 トロンボモジュリン固定化材料の抗血栓性	43
第一節 緒言	
第二節 トロンボモジュリン固定化材料のトロンビン凝固促進作用に対する阻害効果	
第三節 トロンボモジュリン固定化材料のプロテインC活性化促進効果	
第四節 トロンボモジュリン固定化材料の抗凝固能	
第五節 考察および小括	
結 語	52
謝 辞	53
引用文献	54

著 論

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。これは、人工臓器の質的向上と、その臨床における適用・管理法の進歩に負うところが大きい¹⁾。人工臓器は本質的に生体適合性を有していることを要求されるが、従来この方面の生理・生化学的知見は極めて限られており、従って材料の構築においても、試行錯誤的な色合いが強かったことは否めない。

近年こうした材料と生体との相互作用に関する研究が進み、それに伴って材料の構築も、より理論的に行なえるようになってきた。

人工臓器には、人工心臓、人工腎臓をはじめとして、血液との接触が不可避であるものが多い。これらの臓器においては、生体適合性のうちでも、特に血液適合性に優れている事が重要な問題となる。いうまでもなくこれらの材料は、単に血液適合性に優れているだけでなく、機械的強度、透過性といった物理的性質をも満足させる必要がある。臓器移植のように、生体由来の材料をそのまま用いる事は、生体適合性という意味においてはもっとも優れていると考えられるが、現在のレベルにおいては、臓器提供者の恒久的な不足といった問題があり、それはそれで、また別種の問題を提供している²⁾。

血液適合性に優れた材料の開発においては、大別して二種のアプローチが考えられる。一つは、血栓形成を惹起しないような表面構造を有する材料を分子設計によって、化学的に合成するものである。この分野においては近年ミクロ相分離構造の開発によって、分子レベルにおける血液適合性と材料構造との相関関係に対する知見が増大しつつあり、より論理的な分子設計が可能になりつつある²⁾。しかし、この場合における血液適合性とはあくまでも材料が生体と良好な親和性を有するという意味においてのみであり、従って、材料が生体側（血液）に対して、積極的に適合性を獲得していくということは考えられない。

勿論このような消極的な適合性といえども、決しておろそかにされるべきことではないのは当然であるが、後に述べるように、近年の生化学的研究の

進展によって、血液と接触する細胞が、単にこのような消極的な方法によってのみ血液適合性を獲得しているのではないことが明らかになってきた³⁾。

血液適合性材料開発のもう一つの方法は、抗血栓性を有する生理活性分子の材料表面への固定化、あるいは血液と直接接触する細胞（内皮細胞）の材料表面上での培養によって、合成材料と生体由来の物質との二層性を持つ、いわゆるハイブリッド型の材料を構築しようとするものである。このような方法による利点は、材料の生体適合性に対する要求を材料表面の修飾によってカバーすることから、より自由な材料の選択が可能になることと、生理活性分子（例えば酵素蛋白質）や細胞の働きによって、材料が積極的に生体側に働きかけることが可能となることである。これは実際の生体において取られている血液適合性獲得の戦略に非常に近い。そしてその意味では組織培養による方法が、生理活性分子固定化によるよりも優れていると言い得るが、細胞培養による方法は、安定な培養基質となり得る材料の開発、培養法、培養にかかる時間的な問題や、そうして調製した材料の維持、保存など、未だ多くの問題を抱えているのが現状である。それに対して、生理活性分子固定化による方法は、固定化によって生理活性分子の安定性を増すことが可能であり、材料の保存も比較的容易であることから、既に様々な固定化例が報告されており、また、いくつかの材料が臨床的にも用いられている⁴⁻⁹⁾。

細胞培養法の場合には、血液適合性を得るために培養すべき細胞の種類は最初から内皮細胞にほぼ限定されている。そしてまた、その内皮細胞のみによって十分な血液適合性を期待する事ができる。しかし、生理活性分子固定化による方法においては、固定化する分子種の選定が非常に重要な問題である。

現在までに報告されている分子種としては、抗凝固能を有するムコ多糖類であるヘパリン⁴⁻⁶⁾と、線溶系賦活酵素ウロキナーゼ⁷⁻⁹⁾がその主なものである。この二種の分子が、抗凝固剤あるいは血栓溶解剤として臨床的に汎用されており、安全性の面で優れていること、また大量入手が容易であることがその主な理由であろう。

ところで、上にも述べたように、血管内皮細胞は、血液との相互作用によっ

て生体内における血栓の形成を抑制していると考えられている。このメカニズムは、まだ完全に解析された訳では無いが、そのうちの特に重要と思われるものの一つに、血小板凝集・粘着の抑制がある¹⁰⁾。血小板は血液中の有形成分の一つとして、体内における血栓形成に重要な役割を果たしていることが知られている。また、材料の惹起する血栓形成においても同様に血小板は重要な役割を担っていることが知られており、血小板の活性化を惹起しない様な性質を有する材料について、分子設計の立場から様々な検討がなされてきている。しかし、このような分子設計によって構築された材料は、血小板に対する反応性を持たないものではありえても、積極的に血小板の活性化を抑制するものではない。従って、例えば材料によって活性化された微量のトロンビンによって、血小板凝集が惹起されたとしても、この材料は、それを阻止することができない訳である。これに対して、実際の血管内皮細胞においては、PGI₂の放出¹⁰⁾、ADPの分解¹¹⁾、あるいはトロンビンの不活化といった作用によって¹²⁾、かなり積極的な血小板活性化の抑制がなされている。このような作用は、血管内皮細胞に存在する酵素の働きによるものと考えられ、それを、分子設計のみによって構築しようとすることは現時点では、ほとんど不可能と言ってよい。

このような積極的な作用が本当に必要なのか、あるいはまた材料の分子設計のみによって、十分な血液適合性を得る事が可能であるのかについては、残念ながら、現在の知見のみによってでは、判断することが出来ない。これは、血液適合性に限らず、生体適合性材料すべての開発においていい得る事である。しかし、真の意味での生体適合性を材料に賦与する上においては、実際に生体において行なわれている方法に可能な限り近い方法で行なうことが、生体に与えるダメージ、あるいは副作用を最小にする為には、最良であると考えられる。

以上のような方法論にのっとり、本研究においては、血管の有する優れた抗血栓性を、酵素固定化の手法を用いることによって、合成高分子材料に賦与することを試みた。まず、第一章において血管の有する血小板凝集抑制活性について検討し、第二章において、この活性が合成高分子材料に固定化

可能である事を示した。ついで、第三章において、この活性について更に詳細に検討するとともに、より効率的な固定化をめざして、この活性を担う酵素の一つについての部分精製と特徴付けを行ない、また、その固定化についての基礎的な検討を行なった。最後に第四章においては、血管に存在し、凝固系の調節を司る事によって、血液の流動性を維持していると考えられる蛋白質トロンボモジュリンの固定化による、材料への抗血栓性賦与について検討した。

本 論

第一章 血管の血小板凝集抑制活性

第一節 緒 言

生理活性分子固定化による材料への血液適合性賦与においては、固定化する分子種の選定が重要な意味を持つと考えられる。材料に固定化できる分子の量は限られており、また、遊離状態で活性を有する分子が、固定化しても活性を発現するとは限らないからである。

血液適合性において、最も問題となるのは血栓の惹起であり、そのなかでも、血小板の凝集・粘着を抑制すること^{1,2)}が、特に重要であると考えられる。従来報告されている固定化材料は、しかし、凝固系及び線溶系に関するものが主であった⁴⁻⁹⁾。これは、ひとつにはこの二つの系が比較的良く解析されていたためであり、また、固定化によってはっきりと活性を示すような血小板機能抑制物質がほとんど知られていなかった事によると考えられる。

緒論においても述べた様に、血管には、血小板凝集抑制活性の存在することが知られており、それは、数種の酵素の働きによるものである可能性が高いと考えられている^{10,11)}。この血小板凝集抑制活性を材料に固定化することが可能であれば、実際の生体における血液適合性獲得の方法に近いやり方で、材料に血液適合性を賦与でき、また、基本的に材料設計を血液適合性の問題と切り離して、機械的強度などの物性の問題として考えることが可能になる。

そこでまず、本章においては、血管の含有する血小板凝集抑制活性についての検討を行ない、次章においてその固定化についての検討を行なった。

第二節 大動脈ミクロソームによる血小板凝集抑制

血管が保持している血小板凝集抑制活性を材料に賦与するためには、その活性が固定化可能な性質のものでなければならない。細胞レベルにおいては、その活性は明らかであるが、細胞をそのまま固定化(培養)することは、調製、

維持の問題もあって、現時点では、現実的な方法ではないと考えられる。しかし、細胞の示す活性が、細胞下のレベルにおいても保持されているとは限らず、また、それが実際の場面に適用可能であるかも明らかでないので、ここでは、まず、準細胞レベルにおける血小板凝集抑制活性の局在性と、その全血中における効果を検討した。

実 験 方 法

〈血液試料調製法〉

1容量の3.8%クエン酸を含むプラスチック・シリンジに9容量の血液を、23 G×1"の針を用いて、家兎耳梁静脈より採血した。これを150×g、7分の遠心にかけて、多血小板血漿(PRP)を調製した。残りの血液をさらに2,300×g、15分の遠心にかけて乏血小板血漿(PPP)を調製した。PRPはPPPによっておよそ 4×10^5 血小板/ μl の濃度になるように調整した。

〈血小板凝集及び遊離血小板数測定法〉

血小板凝集(P.A.)は、3.8%クエン酸処理家兎多血小板血漿250 μl を用い、Born¹⁴⁾の方法に従ってアグリゴメーター(Husm System Platelet Aggregometer、RIKADENKI)で測定した。血小板凝集抑制活性(I.P.A.)は、試料を添加した後に凝集を惹起させ、その最大凝集率から、以下の式を用いて計算した。

$$\text{I.P.A.(\%)} = \frac{[\text{P.A.(\%)}]_{\text{control}} - [\text{P.A.(\%)}]_{\text{sample}}}{[\text{P.A.(\%)}]_{\text{control}}} \times 100$$

但し、 $[\text{P.A.(\%)}]_{\text{control}}$ は磷酸緩衝液添加時における凝集率を、 $[\text{P.A.(\%)}]_{\text{sample}}$ は試料添加時における凝集率を各々表わしている。

コラーゲン懸濁液は100mgのウシアキレス腱コラーゲンを10mlの0.145M塩化ナトリウムと共に4℃でホモジナイズし、65×g、5分間遠心した上清を使用した。

遊離血小板数(FPC)は、20 μl の血液試料を980 μl のCD液と混合した後に150×g、7分間の遠心に向け、その上清の100倍希釈液の血小板数をPlatelet

Counter(PL-100、東亜医用電子)で測定することによって求めた。

機械的応力の負荷は、0.75mlの3.1%クエン酸処理家兎全血を37℃に保持したポリスチレン製キュベット(φ9.5×42mm)中でステンレス製の攪拌子(φ1×8mm)を用いて1000rpmで攪拌することによって行なった。

〈血管試料調製法〉

血管には、屠殺場より入手したウシ大動脈の、心臓から約30cmまでの部分を使用した。この大動脈から外膜を除去したものを、液体窒素によって凍結状態を保ちながらハンマーをもちいて破碎し、4倍量(w/v)の10mM磷酸カリウム(以下特に断わらない限り全てカリウム塩)緩衝液(pH7.4)と共にBiomixer(日本精機)によって、ホモジナイズした。このホモジネートを遠心分離法によって、1,000×g、15分、10,000×g、15分、25,000×g、30分、34,000×g、1時間、100,000×g、1時間のフラクションに分け、その血小板凝集抑制活性を測定した。ミクロソーム画分は、蒸留水に懸濁し凍結乾燥を行なって保存したものを使用した。ウシ血清アルブミンを標準としてLowryら¹⁵⁾の方法によって蛋白量の測定を行なった結果、このミクロソーム画分に占める蛋白質の割合は57%であった。

実 験 結 果

〈ウシ大動脈血小板凝集抑制活性の細胞内局在性〉

ウシ大動脈のホモジネートは、強い血小板凝集活性を示した。このホモジネートを遠心分離法によって、幾つかの画分に分離したところ、34,000×g、1時間以下の遠心によって沈殿する全ての画分に血小板凝集活性が認められた。この血小板凝集活性は、34,000×g、35分の遠心によっても完全には沈殿せず、34,000×g、1時間の遠心によって完全に沈殿した。また、100,000×g、1時間の沈殿(ミクロソーム画分)には、顕著な血小板凝集抑制活性が認められた。100,000×gの上清には、血小板凝集活性も血小板凝集抑制活性も認められなかった。

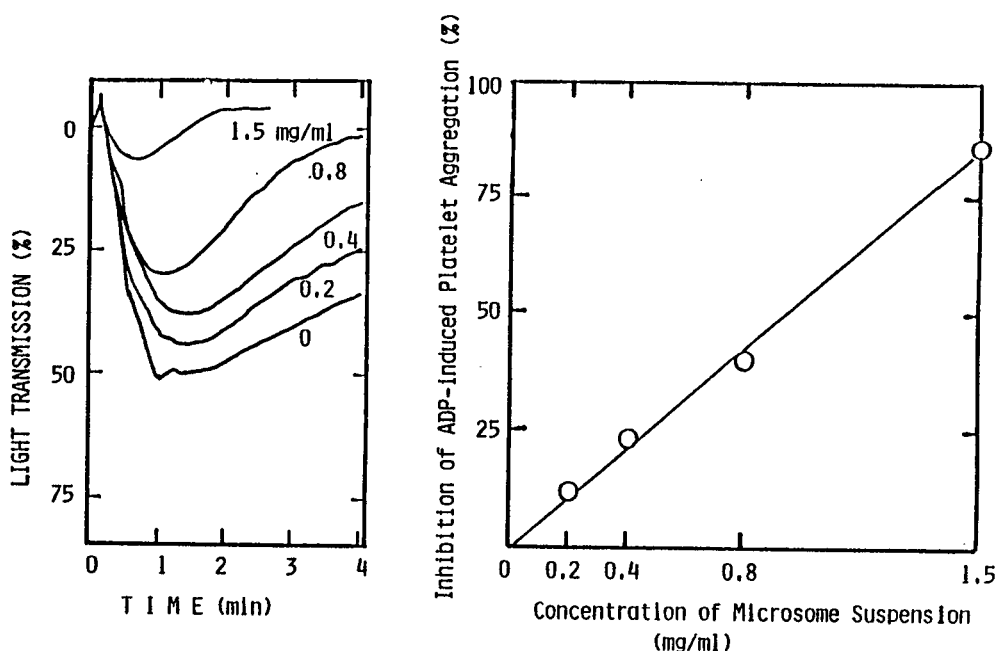


Figure 1-1 Inhibition of ADP-induced platelet aggregation by bovine aorta microsomes. Microsomes were added to PRP ($250\mu\ell$) and incubated for 3 min prior to the addition of ADP ($5\times 10^{-6}M$)

〈大動脈ミクロソームによる血小板凝集抑制〉

大動脈ミクロソーム画分をあらかじめPRPに添加しておくことにより、Figure 1-1に示したように、ADPによって惹起される血小板凝集を濃度依存的に抑制することが可能であった。また大動脈ミクロソーム画分は、Figure 1-2に示したようにコラーゲン、トロンビンによる凝集、あるいはFigure 1-4に示したようにアラキドン酸による凝集をも抑制することが可能であった。

次に、大動脈ミクロソーム画分の血小板凝集抑制活性が、より臨床に近い実的な場においても発現可能かどうかを確認する為に、多血小板血漿の代わりに全血を用い、血液ポンプ等血液に機械的応力が負荷された場合に惹起されるFPCの減少に対して、この大動脈ミクロソーム画分が効果を発揮するかどうかを検討した。

全血機械的応力負荷下における、FPCの減少は、主として傷害を受けた赤

血球から放出されるADPに起因する血小板凝集を主原因としていると考えられる¹⁶⁾が、Figure 1-3に示したように大動脈壁ミクロソーム画分5mg/mlの添加によって、最初はコントロール同様のFPCの急激な減少が観察されたものの、応力負荷開始1時間後にはコントロールのFPCが50%弱まで減少するのに対し、約80%のレベルを維持することが、可能であった。

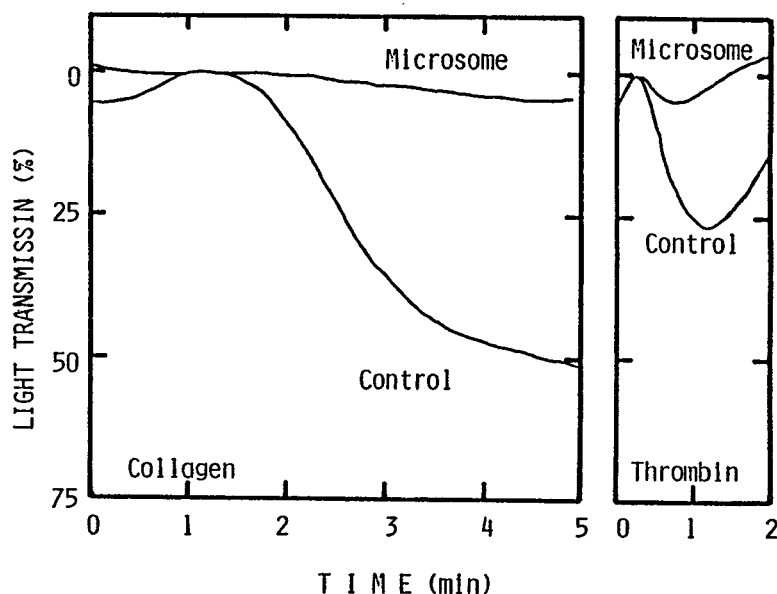


Figure 1-2 Inhibition of collagen- and thrombin-induced platelet aggregation by bovine aorta microsomes. Microsomes (1.5 mg/ml) were added to PRP (250 μ l) and incubated for 3 min prior to the addition of aggregation inducer (collagen, 1/10 volume; thrombin, 0.8 units/ml).

第三節 大動脈ミクロソーム画分の血小板凝集抑制活性

前節において大動脈が、細胞下のレベルにおいても強い血小板凝集抑制活性を有することが明らかになったが、それがどのような物質によるものであるかは明らかでなく、依然固定化可能であるかどうかは、不明であった。しかし、その活性が遠心分離によって沈殿することから、膜結合性の蛋白質か、膜を構成する脂質によるものである可能性が示唆された。もしそれが、蛋白質、特に酵素の働きによるものであるならば、固定化によっても十分に活性

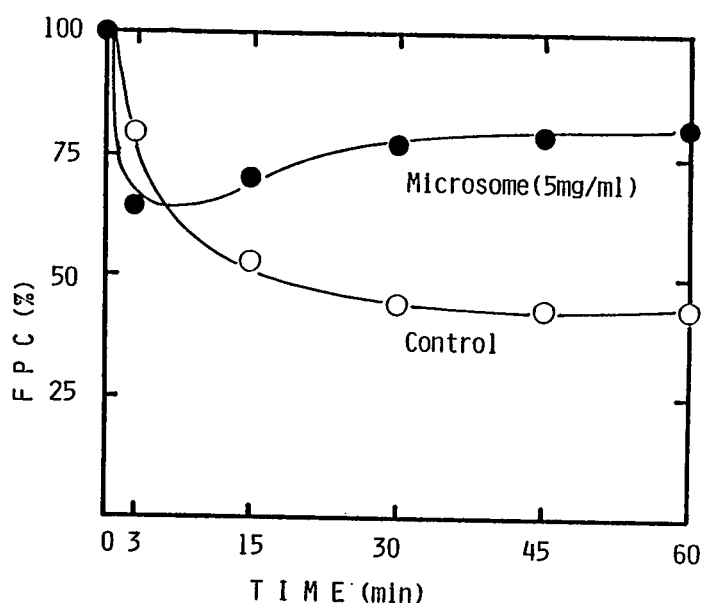


Figure 1-3 Inhibition of the decrease of FPC on whole blood by bovine aorta microsomes. Microsomes (5 mg/ml) were added to citrated whole blood (750 μ l) prior to inducing a shear.

を発現し得ると考えられる。そこで本節において、この活性が酵素の働きによるものである可能性を検討した。

実 験 方 法

〈蛋白定量法〉

標準物質としてウシ血清アルブミンを用い、Bradford¹⁷⁾の方法によって行なった。

〈ADP分解活性測定法〉

ADP分解活性は2.0mM ADP、5.0mM塩化カルシウムを含むpH7.4の50mMトリス塩酸緩衝液中、30℃で試料を一定時間反応させ、7.78%のトリクロロ酢酸で反応を停止させた後、遊離した無機リン酸の量をFiskeとSubbarow¹⁸⁾の方法によって定量することによって測定した。

〈PGI₂産生活性測定法〉

アラキドン酸を基質としたPGI₂の産生は、30 μ Mアラキドン酸(遊離酸)、5.0mMトリプトファン、2 μ Mヘモグロビンを含むpH8.0の0.1Mトリス塩酸緩衝液中、30℃で試料を10分間反応させた後に、2容量の氷冷したアセトンを添加して反応を停止させた。これに2容量の石油エーテルを添加、その下層(水層)を分取し、pHを3.5~4に調整してから、2容量のクロロホルムによって、2回抽出を行なった¹⁹⁾。この抽出液をN₂気流によって濃縮乾固し、0.2% 9-anthryldiazomethane(ADAM)²⁰⁾の酢酸エチル溶液を添加し、ダブル・キャップで密栓して1時間反応させることによって、蛍光ラベルした。この蛍光ラベルしたプロスタグランジンは、同様にラベルした6-keto PGF_{1 α} と共に薄層クロマトグラフィーによって展開し(酢酸エチル:2,2,4-トリメチルペンタン:酢酸:水=100:50:20:100, v/v/v/v)¹⁹⁾、同定した。また、HPLCを用いて定量を行なった。まず、SEP-PAKシリカゲル・カラムを用いて、不純物を除去した。ジクロロメタン、酢酸エチルで、不純物を溶出させた後に、アセトニトリル:メタノール混液(85:15, v/v)で、プロスタグランジン類を溶出させた。これを試料として直接HPLC(LC-6A、島津製作所)にインジェクションした。但しカラムにはShimpack CLC-ODSを使用し、移動相はアセトニトリル:水の混液(80:20, v/v)を、流速は1ml/minで、また、蛍光の検出は励起波長365nm、測定波長412nmで行なった。検量線は、市販の6-ketoPGF_{1 α} を用いて作成し、15ngから1 μ gの範囲で直線性(r=0.998)が得られた。

〈15-hydroperoxyeicosatetraenoic acidの効果〉

15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid(15-HPETE)はFunkら²¹⁾の方法によって調製した。試料と15-HPETEを室温で10分間インキュベートすることによって、PGI₂ synthetaseの阻害を行なった後にその混合液を用いて、血小板凝集抑制活性を測定した。

実 験 結 果

大動脈ミクロソーム画分の血小板凝集抑制活性は、100℃、5～7分の熱処理によって、完全に消失した。Table 1-1に示したように、この画分には、

Table 1-1 PGI₂ production and ADP hydrolysis of bovine aorta microsomes

Items	Activity (per mg protein)
PGI ₂ production	832 pmoles/10min
ADP hydrolysis	163 nmoles/min

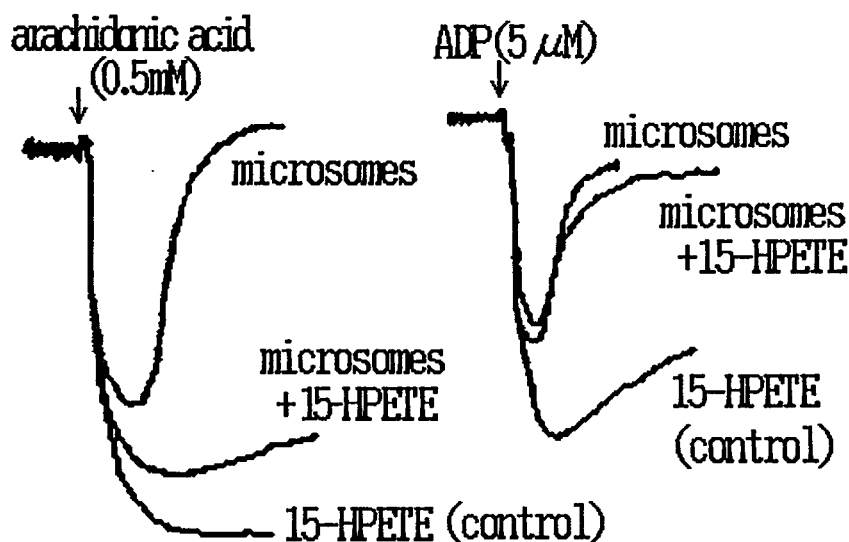


Figure 1-4 Effect of 15-HPETE on anti-aggregatory activity of bovine aorta microsomes. 15-HPETE, microsomes, and 15-HPETE treated microsomes were added to PRP (250 μl) and incubate for 3 min prior to the addition (arrows) of aggregation inducers (arachidonic acid, 0.5mM; ADP, 5×10^{-6} M).

ADP分解活性が認められた。また、シクロオキシゲナーゼの補酵素であるヘモグロビンおよびトリプトファンを添加する事によって、アラキドン酸を基

質としたPGI₂の産生が認められた。しかし、ヘモグロビンおよびトリプトファンを添加しない場合にはPGI₂の産生は検出できなかった。そこで、これらの酵素活性が血小板凝集抑制に関与しているかどうかを知るために、酵素阻害剤を用いた検討を行なった。Figure 1-4に示したように、PGI₂ synthetaseの特異的阻害剤²²⁾である15-HPETEで処理することによって、ミクロソーム画分のアラキドン酸凝集抑制活性は阻害され、凝集解離促進現象はほぼ消失した。しかし、ADP凝集抑制活性にはほとんど影響が観察されなかった。

第四節 考察および小括

血管の保持する血小板凝集抑制活性を材料に賦与するためには、その活性が固定化可能なものでなければならない。血管は、PGI₂を産生することが知られている¹⁰⁾が、PGI₂は血小板に結合してその活性を発現する²³⁾のであり、それ故、PGI₂の固定化によって血小板凝集を抑制するためには、まず、十分な血小板と材料(PGI₂の固定化されている)との接触を前提しなければならない。これは、材料と接触することによって起こり得る血小板の活性化を阻止するためには有効であると考えられるが、血小板の活性化は、血液ポンプによる機械的応力などの物理的要因、ポンプによって破壊された血球からの凝集惹起物質の遊離、あるいは、材料の凝固系活性化によって生成するトロンビンによるものなど、材料と血小板の直接的な相互作用には無関係の要因が、数多く考えられる。これら全ての状況において血小板の活性化を抑制・阻止するためには、現実の血管がそうであるように、常時少量のPGI₂を放出するような材料を考えねばならない。実際、そのようなPGI₂徐放性のポリマーも考案されてはいる²⁴⁾が、持続性やその放出量の調節において多くの問題点を残している。別の解決法としては、細胞をそのままの状態に固定化する(培養する)ことが考えられるが、現時点ではまだまだ実用的ではない。

しかし、徐放性によらないで、しかも血小板と材料の直接の接触を前提としないで血小板凝集を抑制するための方法は他にもある。それは、酵素的な方法によって、血小板凝集を抑制する物質を常時産生することと、血小板凝集惹起物質を分解してしまうことである。前者の場合には産生のための基質の供給が、後者の場合には惹起物質を特定することが各々問題になる。また、

それ以前に、現在知られている酵素によってそれが可能であるかどうかが問題になる。そこでまず、既に精製されている酵素から選択するのではなく、優れた血小板凝集抑制活性を保持し、それが酵素作用によると考えられる血管を用いて、それが固定化可能であるかどうかを検討した。

その結果、血管は細胞を破壊した後にも、血小板凝集を抑制する活性が保持されていた。その活性は可溶性画分ではなく、 $100,000 \times g$ の遠心によって沈殿するものであったことから、膜結合蛋白質あるいは膜そのものの働きによるものである可能性が示唆された。また、その活性が 100°C の熱処理によって消失したことから、酵素によるものである可能性が高いと考えられた。実際このミクロソーム画分には、ADPを分解する活性と、トリプトファン、ヘモグロビン存在下にアラキドン酸を基質として PGI_2 を産生する活性が認められた。ADP分解活性が存在することは、この活性によってADP凝集が抑制されている可能性を、そして PGI_2 産生活性が存在することは、凝集抑制に PGI_2 が関与している可能性を示唆している。15-HPETEによってアラキドン酸凝集抑制活性が明らかに阻害されたことから、 PGI_2 の産生が、実際に起きている可能性が示唆された。シクロオキシゲナーゼの補酵素を添加しない場合には、アラキドン酸を基質とした PGI_2 の産生は観察されなかったが、今回用いた定量法によって測定不能の微量の産生が起きている可能性は充分考えられる。

いずれにしても、これらの結果から、この大動脈ミクロソーム画分の固定化によって材料に血小板凝集抑制活性を賦与できる可能性が示唆された。そこで次章においては、それを実際に固定化することによってその可能性を検討した。

第二章 大動脈ミクロソーム固定化材料の血小板凝集抑制活性

第一節 緒 言

大動脈ミクロソーム画分は、強い血小板凝集抑制活性を有しており、また、この画分には、 PGI_2 産生能および、ADP分解活性が含有されていた。 PGI_2 の産生¹⁰⁾および、ADPの分解¹¹⁾は、血管内皮細胞の、生体内における血小板活性化抑制作用の主要な機作であると考えられており、したがってこの大動脈ミクロソーム画分の血小板凝集抑制活性は、内皮細胞のそれと類似の酵素活性に由来していると思われた。この大動脈ミクロソーム画分を材料へ固定化することによって、材料に実際の血管に近いやり方で抗血栓性を賦与できると考えられたので、本章においてその方法を検討した。

第二節 大動脈ミクロソーム包括固定化材料の血小板凝集抑制活性

人工血管の臨床使用においては、人工血管に血漿あるいはフィブリンを注入し、カルシウムあるいはトロンビンでプレクロッティング処理してから用いる事によって、血液適合性を高められる事が知られている²⁵⁾。しかし、フィブリンそのものは、積極的な抗凝固活性を有しているわけではなく、その効果はあくまでも人工材料の生体に及ぼす影響をフィブリンによって遮蔽するところにあると考えられる。しかし、実際の血管においては、既に第一章において見られたように積極的な血液適合性獲得の方法が採られている。プレクロッティングに使用されるフィブリンはまた、生理的条件下においてゲル化させることが可能であり、包括固定化の担体としても使用し得る。さらにミクロソームは、細胞内果粒と膜断片の集合体であり、充分ゲル中に保持し得ると考えられることから、これを組み合わせることによって積極的な血液適合性獲得能を人工血管に賦与することが可能であると考え、それを検証すべく検討を行なった。

実 験 方 法

〈フィブリン・ゲル包括固定化法〉

0.4Mグルコース、2mMシステイン、50mM塩化カルシウムを含む0.1Mクエン

酸緩衝液(pH7.0)に溶解した5%フィブリノーゲン(プラスミノゲン・フリー)溶液2.29mlにミクロソーム懸濁液(6.96mg/ml)2.17mlを混和し、これに80NIH units/mlのウシ・トロンビン0.114mlを添加することによってゲル化させた。このフィブリン・ゲルを圧力によって膜状に整形した。蒸留水中で、4時間洗浄した後、シリカゲルによって4°Cで乾燥させたものを使用した。

〈材料評価法〉

血小板凝集抑制活性の評価は第一章、第二節において使用した方法によった。但し、ゲルが光透過率の測定を妨害したことから、アグリコメーターによる凝集の測定もFPCの変化を指標として行なった。

実 験 結 果

Figure 2-1に示したように、フィブリン・ゲル単独添加によっては、ADPによって惹起されるFPCの減少は全く回復を示さなかったのに対して、ミク

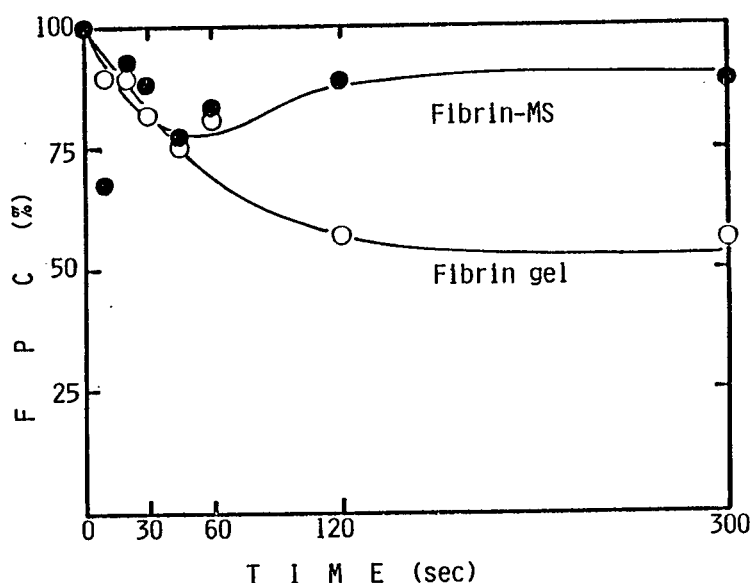


Figure 2-1 Inhibition of ADP-induced platelet aggregation by microsomes entrapped within fibrin gel. Immobilized microsomes were added to PRP (250 μ l) and incubated for 3 min prior to the addition of ADP (10^{-6} M).

ロソームを包括固定化したゲルを添加した場合には、最初FPCの減少を示したものの、2分後には90%近くまでの回復を示し、以後そのレベルを維持していた。

第三節 可溶化大動脈マイクロソーム固定化材料の血小板凝集抑制活性

前節において、大動脈マイクロソームが、フィブリンへの包括固定化によっても、その活性を保持し、凝集を抑制し得ることが示された。しかし、人工血管の場合にはその材質が繊維性のものであるために包括法による固定化も可能であるが、一般的な人工臓器においては平滑で隙間のない材料を使用することが多く、この方法の適用は困難である。また、包括法ではなくて、共有結合法によって直接材料に固定化したほうが、機械的な強度の面からみて、より好ましいと考えられる。しかし、前節において述べたようなマイクロソームが巨大分子の集合体であるという特徴が、逆に共有結合法の適用には不利になることは明らかであった。即ち、たとえマイクロソームと材料の間に共有結合が形成されても、その数がよほど多数でない限り材料はマイクロソームを保持し得ないと云う訳である。

そこで、本節においては、大動脈マイクロソーム画分をTriton X-100によって可溶化し、これを高分子材料に共有結合法によって直接固定化することを試みた。ここでは、高分子材料のモデルとして、固定化において汎用されるアガロース・ビーズを使用した。固定化法はOH基を有する材料(例えば、生体適合性の良好なpolyHEMA等)一般に応用可能な方法を使用した。

実 験 方 法

〈固定化マイクロソーム・プロテイン調製法〉

1. 臭化シアン活性化法²⁶⁾ : ミクロソーム30mgを、10mℓの0.5% Triton X-100を含む10mM磷酸緩衝液と共にホモジナイズし、4℃で30分～2時間放置した。これに、膨潤させた100mgの臭化シアン活性化セファロース4Bを添加し、4℃で一晩攪拌した後、エタノールアミンで過剰の活性基をブロックし、0.5Mの塩化ナトリウムを含む0.1M酢酸緩衝液(pH4.0)と0.1M炭酸水素ナトリウム(pH

8.3)で交互に数回洗浄し、0.145Mの塩化ナトリウムを含む10mM磷酸緩衝液(pH7.4)中に懸濁、保存した。

2.カルボジイミド結合法：CM-セファロースCL-6B 0.5mlを10mlの0.1Mカルボジイミド(pH4.5)中で30分間反応させゲルを活性化した後、蒸留水で洗浄した。ミクロソーム15mgを0.5% Triton X-100(pH5.5)4mlと共にホモジナイズし、4℃、30分放置した後に活性化ゲルを添加し、4℃、12時間反応させた後に、1.と同様にブロック・洗浄・保存操作を行なった。

3.グルタルアルデヒド担体架橋法：DEAE-セファロースCL-6B 0.5mlを10mlの10%グルタルアルデヒドを含む0.1M磷酸緩衝液(pH8.0)中で4℃、20分攪拌して活性化した後、0.2M磷酸緩衝液(pH8.0)で洗浄した。この活性化ゲルを用いて、0.5% Triton X-100を含む10mM磷酸緩衝液(pH7.4)中で、2.と同様に固定化を行なった。

4.イオン結合法：DEAE-セファロースCL-6Bを0.5% Triton X-100を含む10mM磷酸緩衝液(pH7.4)で平衡化した。15mgのミクロソームを同じ緩衝液で、ホモジナイズし、4℃、30分放置した後にゲル0.5mlを添加して、4℃、2時間振盪した。その後、同じ緩衝液によって、洗浄・保存した。

〈その他の固定化材料調製法〉

ウシ血清アルブミン、熱処理(100℃、7分)ミクロソーム、エタノールアミン固定化材料は、上記1.の方法に準じて調製した。

〈蛋白質測定法〉

固定化材料の蛋白質含量は、3Nの塩酸中、60℃で3時間加水分解を行なった後、可溶化された蛋白質をLowryら¹⁵⁾の方法によって測定することによって決定した。

〈材料評価法〉

血小板凝集抑制活性の評価は第一章、第二節において使用した方法によった。対照にはエタノールアミン固定化材料(I-EA)を用いた。但し、ゲルが光

透過率に影響を与えたので、アグリコメーターによる凝集の測定時には、FPCの変化をも指標として行なった。15-HPETEによる阻害実験は、第一章、第三節と同様に行なった。

〈I-MPの安定性〉

57mgのI-MPあるいは遊離のミクロソームを0.145Mの塩化ナトリウムを含む10mM磷酸緩衝液(pH7.4)中で、37℃で任意の時間インキュベーションし、その後活性測定まで、-80℃において保存した。血小板凝集抑制活性は、ADP凝集に対する効果を指標として測定した。

〈酵素活性測定法〉

第一章、第三節と同様に行なった。但し、反応はマグネチック・スターラーを用いて、十分に攪拌しながら行なった。

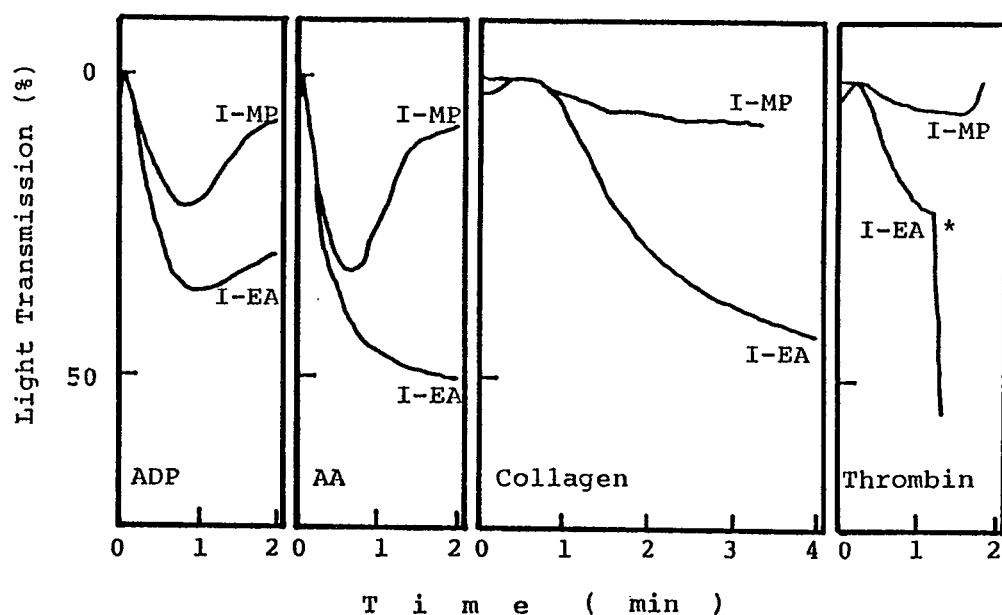


Figure 2-2 Inhibition of platelet aggregation by I-MP. Immobilized microsomal proteins or I-EA was added to PRP (250 μ l) and incubated for 3 min prior to the addition of aggregation inducer. The added amounts of I-MP and I-EA were 75 mg/ml for ADP (5×10^{-6} M), 69 mg/ml for arachidonic acid (0.5 mM), 55 mg/ml for collagen, and 92 mg/ml for thrombin (1.6 NIH units/ml), respectively. Signal star (*) indicates that fibrin clot was formed.

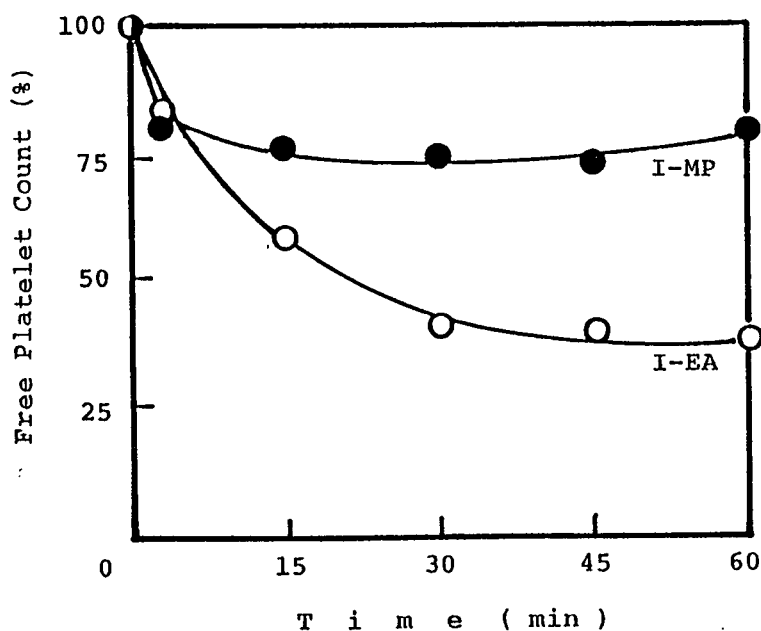


Figure 2-3 Inhibition of the decrease of FPC in whole blood by I-MP. Immobilized microsomal proteins (57 mg) or I-EA was added to citrated whole blood (750 $\mu\ell$) prior to inducing a shear (1000 rpm).

実 験 結 果

臭化シアン活性化法によって調製した固定化ミクロソーム・プロテイン (I-MP) は、1mgの担体当たり、25 μg の蛋白質が結合していたことから、使用した蛋白質の17%が固定化されたと考えられる。

Figure 2-2に示したように、I-MPは、ADP、アラキドン酸、コラーゲン、トロンビンによって惹起される血小板凝集を抑制する事が可能であった。光透過率の代わりにFPCを指標とした場合にも、明らかにFPCの減少は軽減され、血小板凝集が抑制されていることが示唆された。また、ADP、アラキドン酸凝集においては、I-MPは凝集解離を促進した(Figure 2-2)。これらの効果は、ウシ血清アルブミン固定化、エタノールアミン固定化、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・固定化材料においては観察されなかった。従って、I-MPにおいても、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る。また、Figure 2-3に示したよ

うに、全血機械的応力負荷下におけるFPCの減少に対する効果もミクロソームと同様、それを顕著に軽減することが可能であった。Figure 2-4に示したように、ADP凝集に対する抑制効果は、I-MPにおいてもミクロソーム同様濃度依存的であった。また、Figure 2-5に示したように、37℃において遊離のミクロソームが約72時間後には活性が半減するのに対し、I-MPの活性低下は20%以下であり、固定化によって安定性が増大することが示唆された。

臭化シアン活性化法以外に、カルボジイミド結合法、グルタルアルデヒド

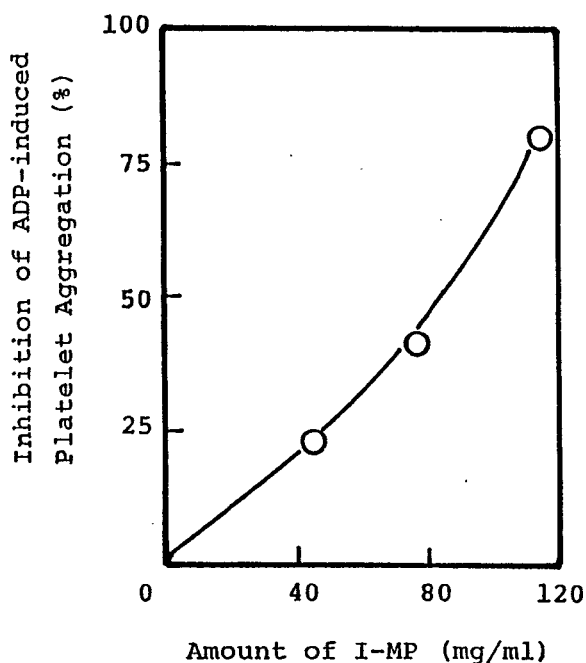


Figure 2-4 Inhibition of ADP-induced platelet aggregation by I-MP. Immobilized microsomal proteins was added to PRP (250 μ l) and incubated for 3 min prior to the addition of ADP (5×10^{-6} M).

架橋法によって共有結合を行なった場合にも、またイオン結合法によって固定化した場合にも、I-MPとほぼ同じADP凝集抑制活性が保持されており、様々な材料に固定化できる可能性のあることが示唆された(Table 2-1)。

I-MPにおいてもミクロソーム同様、 PGI_2 産生能、及びADP分解活性が観察され(Table 2-2)、これらの酵素が活性を保持していることが示唆された。

Table 2-1 Inhibition of ADP-induced platelet aggregation
by various immobilized microsomal proteins

Immobilization methods	% inhibition of platelet aggregation*
covalent	
cyanogen bromide	48.8
carbozymide	47.3
glutaraldehyde	47.9
ion-binding	51.0

*, immobilized materials (75 mg/ml) was added to
PRP (250 μ l) and incubated for 3 min prior to
the addition of ADP (10^{-6} M).

Table 2-2 PGI₂ production and ADP hydrolysis of
immobilized microsomal proteins.

Items	Activity (per mg gel)
PGI ₂ production	4.05 pmoles/10min
ADP hydrolysis	1.21 nmoles/min

Table 2-3 Effect of 15-HPETE on anti-aggregatory activity of
immobilized microsomal proteins

Treatment	% inhibition of platelet aggregation		
	ADP (5 μ M)	arachidonic acid (0.5mM)	collagen
I-bovine serum albumin	0	0	0
I-MP	43.4	47.3	100
15-HPETE-treated I-MP	33.9	9.2	100

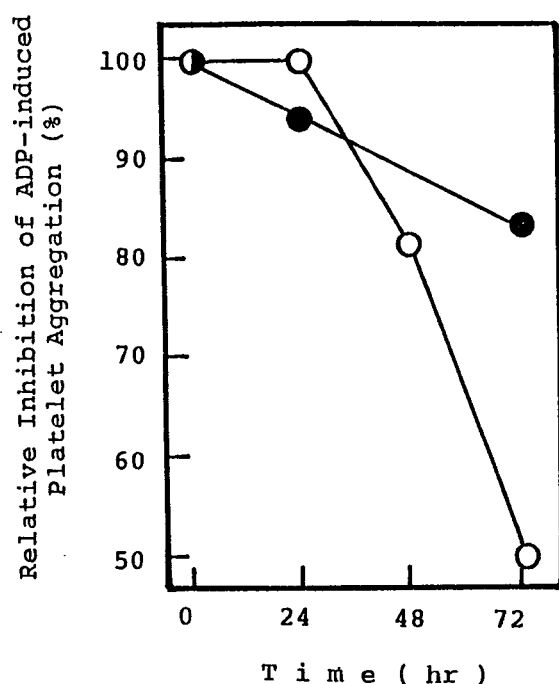


Figure 2-5 Stability of I-MP. Immobilized microsomal proteins (●) or free microsomes (○) was incubated at 37°C for the periods indicated on abscissa, and then stored at -80°C until the activity measurement.

また、アラキドン酸凝集に対する抑制効果は、PGI₂ synthetaseの特異的阻害剤である15-HPETEによって80%以上の阻害を受けた(Talbe 2-3)。しかし、ADP凝集の抑制活性に対する阻害効果は、20%程度であり、コラーゲン凝集抑制活性に対しては、殆ど阻害効果がなかった。これらのことから、I-MPにおいてもミクロソーム同様複数の酵素によって血小板凝集抑制活性が担われている可能性が示唆された。

第四節 考察および小括

人工血管は、その性質上半永久的な使用を目的とすること、およびその機能が単純であるために多少の血栓形成は無視し得ることから、現在用いられている他の臓器とは異なり、一旦血栓を形成させることによって血液適合性を高める方法が採られている。プレクロッティング処理もそうした目的のた

めに行なわれる²⁵⁾のであるが、直径4mm以下の小口径人工血管においては、血栓形成による適合性獲得法は成功しておらず、他の臓器同様の血栓を形成させないためのアプローチのほうが有効ではないかと考えられている。その可否はともかくとして、実際の血管においては内皮細胞によって積極的に血栓形成の阻害が行なわれていると考えられることから、まず既存の臨床に使用される人工血管にそうした積極的な抗血栓性を賦与するための検討を行なった。その結果、第二節において示したように、フィブリンゲルへのミクロソーム固定化によって、顕著な血小板凝集抑制活性を材料に賦与し得ることが示された。この固定化が包括法によるものであることから、ミクロソームの血小板凝集抑制活性はミクロソームと血小板の直接の相互作用ではないと思われ、このことは、ミクロソームの効果が酵素によるものである可能性を支持すると考えられ、材料と血小板が接触しない場合の血小板凝集に対しても効果のある可能性が示唆される。

人工血管以外の臓器に使用される材料は、密な構造を持ったものであり、このような場合には包括法による固定化は、包括材料をベースの材料上にコーティングすることによって行なうことになる。生体適合性の良好な材料をコーティングすることによって材料の適合性を高めようとする試みも数多く行なわれている²⁷⁾。しかし、このような場合、特にコーティング材料がゼラチンやフィブリンのようにベース材料との間に相互作用を持たない場合には、ベースとなる材料とコーティング材料の接着の強さが問題となり、単にコーティングを施しただけでは、剥離してしまう可能性が強い。これは特に人工心臓のように激しい運動に対する機械的強度が要求される臓器においては重要な問題である。したがって、人工血管以外の人工臓器用材料として固定化材料を使用する場合には、包括法ではなくて、共有結合法によってベース材料表面に直接固定化することが望ましいと考えられる。

第三節において、その可能性を検討したところ、Triton X-100によって可溶化したミクロソームを固定化することで、それが可能であることが明らかになった。予備的な検討においてミクロソームを可溶化せずに固定化することも試みたが、活性は保持されていたものの、明らかにミクロソームと思わ

れる固まりがビーズに付着しており、血流や激しい機械的応力に晒された場合にそれが材料上に保持されることは困難であると考えられた。

データには示さなかったが、可溶化ミクロソームの $100,000 \times g$ 、1時間の
上清を固定化した場合にもI-MPと同様の活性が認められたことから、I-MPの
効果は明らかに可溶化された物質によるものであると考えられた。これはお
そらく蛋白性の分子であると思われるが、そのようなミクロソームに比べて
極端に低い分子量の物質であるなら共有結合法によって十分に材料表面に保
持し得ると考えられる。この蛋白性の因子についての詳細な検討は次章にゆ
ずるが、I-MPがミクロソーム同様、いくつかの酵素活性を保持していたこと、
また15-HPETEによって、血小板凝集抑制活性のあるものについては阻害され
たことから、I-MPの効果はミクロソームと同じ酵素の働きによるものであり、
これらの結果は、材料に積極的な機能を賦与することによって、優れた抗血
栓性材料の構築が可能であることを示唆している。

第三章 大動脈ミクロソームの血小板凝集抑制活性の性質

第一節 緒 言

大動脈ミクロソーム画分の有する血小板凝集抑制活性が固定化可能であり、また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、前章までの検討において明らかになった。さらに、この血小板凝集抑制活性が、その一部はPGI₂ synthetaseの阻害剤によって阻害されること、また、I-MPがPGI₂産生能、およびADP分解活性を保持していることから、この二つの酵素活性によってミクロソームが、あるいはI-MPが、血小板凝集抑制を発現している可能性が示唆された。しかし、ADP分解活性については、その特異的な阻害剤が知られていないので凝集抑制に寄与していることを示し得ておらず、またこれら以外にも凝集抑制に寄与する酵素あるいはそれ以外の要素の存在する可能性も否定できない。

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く、その意味からもミクロソームの血小板凝集抑制活性を担う因子について十分な解析を行なうことが必要であると思われる。

そこで、本章においては、大動脈ミクロソーム画分の血小板凝集抑制活性についての解析を行ない、さらに精製酵素標品による材料への血小板凝集抑制活性の賦与について検討した。

第二節 血小板凝集抑制活性の可溶化

まず血小板凝集抑制活性のTriton X-100による可溶化について検討した。

実 験 方 法

10mg/mlのミクロソームを任意の濃度のTriton X-100を含む10mM磷酸緩衝液(pH7.4)中で4℃、1時間攪拌した後、100,000×g、1.5時間の遠心を行ない、その上清を取り、これに膨潤した0.5gのBio-Beads SM-2(Bio-Rad)²⁸⁾を添加して4℃、2時間攪拌し、Triton X-100を除去した。この上清を試料として、血小板凝集抑制活性の測定を行なった。

実 験 結 果

膜可溶化サンプルの血小板凝集抑制活性の測定においては、界面活性剤の血小板に及ぼす影響が問題になる。Bio-Beads SM-2で処理することによって、見掛け上、界面活性剤の影響はなくなった。

Table 3-1 Solubilization of anti-aggregatory activity in aorta microsomes

condition	% inhibition of platelet aggregation	
	ADP (5 μ M)	arachidonic acid (0.5mM)
microsomes (10 mg/ml)	73.8	87.0
solubilized with		
Triton X-100 (0.1%)	6.6	1.5
(0.5%)	60.2	53.2
(1.0%)	40.4	22.3

Table 3-1に示したようにミクロソームの血小板凝集抑制活性は、アラキドン酸凝集抑制、ADP凝集抑制活性共に、0.1% Triton X-100によっては殆ど可溶化されず、0.5% Triton X-100によって可溶化された。活性収率はADP凝集抑制活性が81.6%、アラキドン酸凝集抑制活性が61.1%であった。Triton X-100の濃度を上げてても収率は、上昇しなかった。以下の検討においては、0.5% Triton X-100可溶化画分を使用した。

第三節 血小板凝集抑制活性の分離

可溶化ミクロソームはADP、アラキドン酸凝集を共に抑制可能であったが、前章までの検討において、この二つの凝集に対する抑制活性は各々別の酵素に由来すると考えられた。そこで、本節において、この血小板凝集抑制活性が、二つの酵素に由来するものであることを検証するために、カラム・クロマトグラフィーを用いてその分離を試みた。

実 験 方 法

0.1% Triton X-100を含む10mM磷酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したDEAEセファロースCL-6Bカラム($\phi 2.7 \times 11$ cm)に40ml/hrの流速で30ml(ミクロソーム 300 mg)の可溶化上清を添加し、同じ緩衝液で洗浄した。蛋白質の溶出が観察されなくなった後、同じ緩衝液を用いて0~0.5Mの塩化ナトリウムの濃度勾配(200ml)によって血小板凝集抑制活性を溶出させた。分画は8mlずつ行ない、蛋白量、ADP分解活性の測定は第一章、第三節の方法に準じて行なった。血小板凝集抑制活性の測定は、各分画を0.1% Triton X-100を含む10mM磷酸緩衝液(pH7.4)で透析した後にBio-Beads SM-2によって界面活性剤を除去してから行なった。

実験結果

0.1% Triton X-100存在下DEAEセファロースCL6Bを用いて、可溶化ミクロソーム上清の分画を行なった(Figure 3-1)。血小板凝集抑制活性は完全にゲ

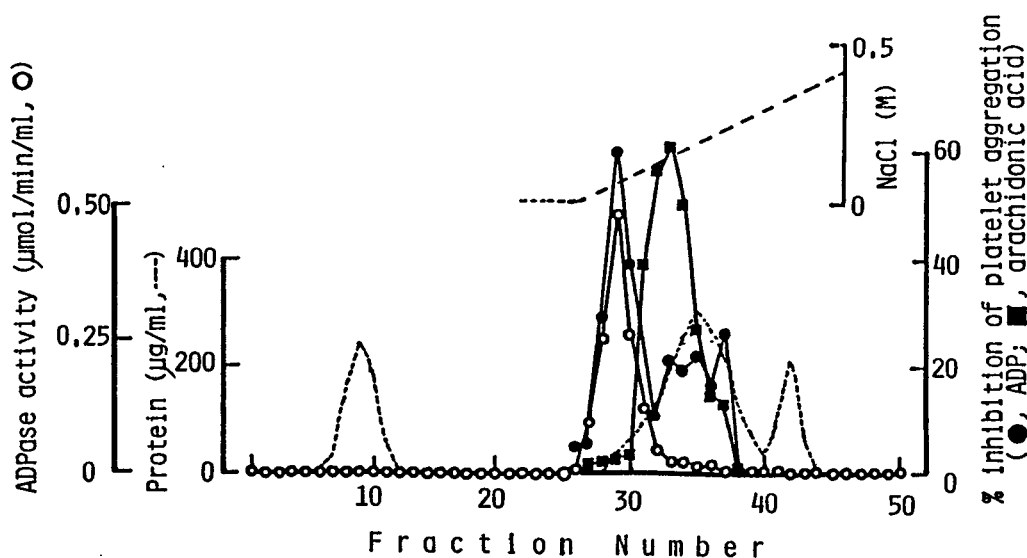


Figure 3-1 Chromatography of the bovine aorta microsomal anti-aggregatory activity on DEAE-Sepharose CL-6B (2.7×10 cm) equilibrated with 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 7.4.

ルに吸着され、0～0.5Mの塩化ナトリウムによる濃度勾配によって、2つの活性ピークに分離された。1つは主としてADP凝集を抑制する画分であり、ADP分解活性のピークと完全に一致していた。この活性は15-HPETEによって阻害されなかった。もう1つは主としてアラキドン酸凝集を抑制する画分であり、ADP凝集に対しても弱い抑制活性を有していた。この活性は、15-HPETEによって完全に阻害された。さらに塩化ナトリウムの濃度を上昇させても(～2M)、これ以上の血小板凝集抑制活性及びADP分解活性の溶出は、観察されなかった。

第四節 大動脈ADP分解活性の性質

PGI₂ synthetaseについては、既に精製に関する報告が為されているが、ADP分解活性を担う酵素に関しては精製はされておらず、それがどのような性質を有するものであるのかは不明である。しかし、Bornら²⁹⁾も報告しているように、特に小口径血管においては、血小板凝集は主としてADPによって惹起され则认为られること、さらにコラーゲン凝集やエピネフリン凝集においては、血小板から放出されるADPが重要な役割をはたしていると考えられる³⁰⁾ことから、ADPを分解する酵素を固定化することによって効率的な血小板凝集抑制能を材料に賦与し得ると考えられる。

そこで本節においては、この大動脈のADP分解活性を担う酵素について更に精製を行ない、その特徴の検討を行なった。

実 験 方 法

〈ADP分解酵素の精製〉

0.1% Triton X-100を含む10mMトリス・マレート緩衝液(pH5.5)で平衡化したBlue-Dextran固定化セファロース4Bカラム(φ2.7×10cm)に40ml/hrの流速で40ml(蛋白38mg)の平衡化緩衝液で透析したDEAEクロマトグラフィー分離試料を添加し、同じ緩衝液で洗浄した。蛋白質の溶出が観察されなくなった後、同じ緩衝液を用いて0～1.0Mの塩化ナトリウムの濃度勾配(200ml)によってADP分解活性を溶出させた。分画は8mlずつ行ない、蛋白質はLowryら¹⁵⁾の方

法によって定量した。

〈酵素活性測定法〉

5.0mMの基質、5.0mM塩化カルシウムを含むpH8.0の50mMトリス塩酸緩衝液中、30℃で試料を一定時間反応させ、7.78%のトリクロロ酢酸で反応を停止させた後、遊離の無機磷酸量をFiskeとSubbarow¹⁸⁾の方法によって定量した。

この条件下で1分間に1 μ molの P_i を遊離させる酵素量を1 unitと定義した。

〈電気泳動法〉

Triton X-100ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、8%のゲルと0.1%のTriton X-100を用いてHoekとZail³¹⁾の方法にしたが行なった。蛋白質の染色はクーマシー・ブルーを用いてFairbanksら³²⁾の方法で、またアデノシン・ヌクレオチド分解活性の染色はPilcherとScott³³⁾の方法で行なった。ゲルからの蛋白質の抽出は、ゲル・スライサーで切断した小片を1mLの0.1% Triton X-100を含むpH8.0のトリス塩酸緩衝液と共に4℃でホモジナイズし、10,000×g、30分の遠心を行うことによって行なった。

実 験 結 果

〈ADP分解酵素の精製〉

DEAEセファロースCL6Bによって分離されたADP分解活性画分をプールして、さらにBlue-Dextran固定化セファロース4Bによる精製を行なった(Figure 3-2)。ADP分解活性は完全にゲルに吸着され、0~1.0M塩化ナトリウムによる濃度勾配によって、塩濃度約0.5~0.7Mの位置に溶出された。さらに塩濃度をあげてもさらなる活性の溶出は観察されなかった。ピーク・フラクション(47)の比活性は4 units/mg proteinであった。またこの画分をTriton X-100ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけたところ、蛋白は1本のメジャー・バンドと数本のマイナー・バンドが染色され、ADP分解活性およびATP分解活性染色バンドは共に、このメジャー・バンドと同じ位置に泳動されていた。このことから、このADP分解酵素が、ATP分解活性をも有していることが示唆された。

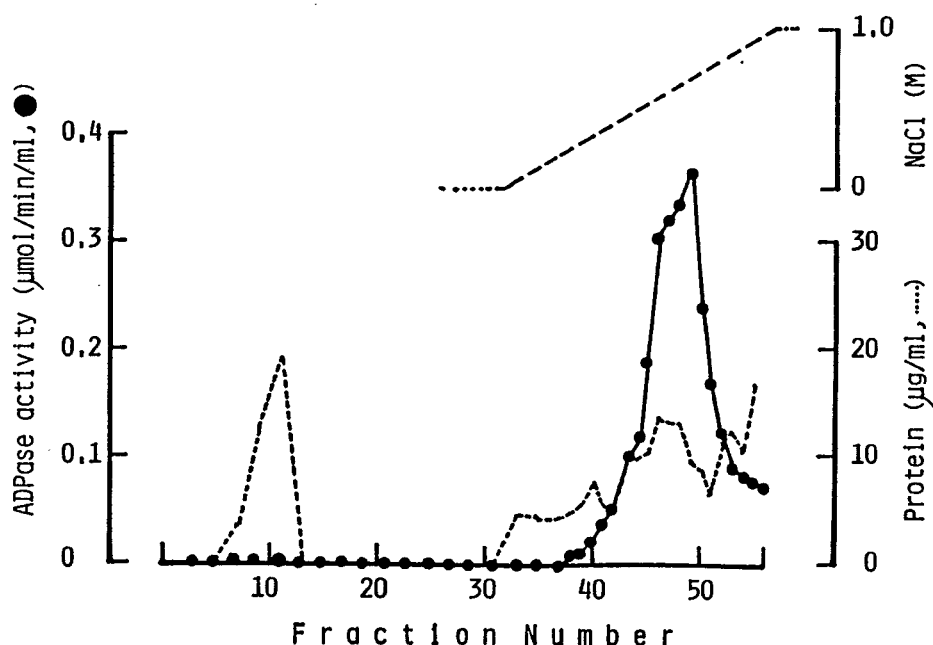


Figure 3-2 Chromatography of the bovine aorta microsomal ADPase activity on Blue-Dextran-conjugated Sepharose 4B (2.7×11cm) equilibrated with 0.01 M Tris-malate buffer, pH 5.5.

精製の結果をTable 3-2にまとめた。

〈ADP分解酵素の特徴〉

精製されたADP分解酵素を合わせて(32 units/mg protein)、その特徴を検討した。このADP分解酵素は Ca^{++} 依存性があり、その至適濃度は2.5mM(ADP)、3.5mM(ATP)であった(Figure 3-3)。またADP分解活性、ATP分解活性ともに1.0mM EDTAの添加によって完全に阻害された。両活性に対する至適pHは8であった(Figure 3-4)。アデニレート・キナーゼの特異的阻害剤³⁴⁾である P^1 , P^5 -di(adenosine-5')pentaphosphate(Ap_5A)は0.5mMの濃度においてもこの活性を阻害しなかった。Table 3-3に示したように AMP、pyrophosphate、p-nitro-phenylphosphate、 β -glycerophosphateに対する活性は存在しなかったが、ヌクレオシド・ジおよびトリリン酸を分解することが明らかになった。

このプールされた画分をTriton X-100ポリアクリルアミド電気泳動にかけたのち、ゲルを切断して、各小片の活性を測定したところ、ADP分解活性とATP分解活性は同一の画分に泳動されており、その活性比は、1:1であった (Figure 3-5)。このピーク・フラクションから蛋白を抽出し、再度泳動をおこなったところ、単一の蛋白バンドを示した。

Table 3-2 Purification of ADPase from bovine aorta microsomes

Step	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Purification	Yield (%)
Triton X-100 solubilization	58.4	0.228	1	100
DEAE-Sepharose	52.7	1.380	6	90.2
Blue-Sepharose				
peak fraction		43.8	192	
pooled fraction	20.5	32.0	140	35.1

Table 3-3 Substrate specificity of ADPase from bovine aorta microsomes

Substrate	Relative activity
ADP	1.0
ATP	1.1
AMP	0.0
IDP	0.84
GDP	0.75
UDP	0.61
UTP	0.76
p-nitrophenyl phosphate	0.0
β -glycerophosphate	0.0
sodium pyrophosphate	0.0

* ADP was taken as 1.0, which corresponds to 32.0 $\mu\text{mol/min/mg}$ protein of P_i released.

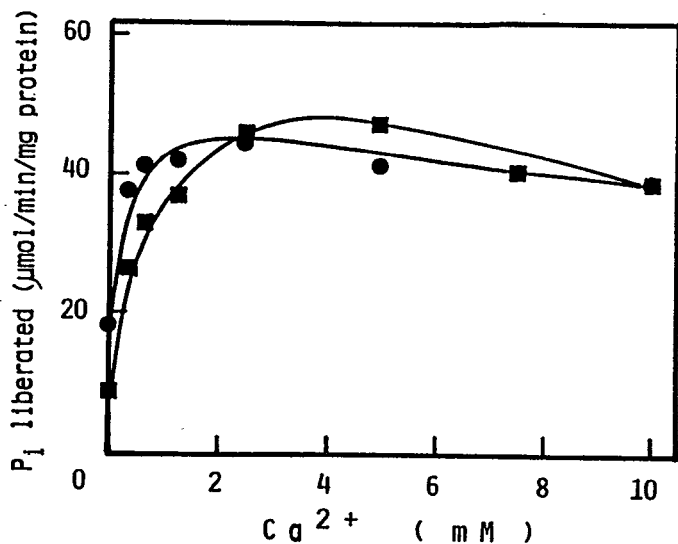


Figure 3-3 Influence of Ca^{2+} concentration on the activity of ADPase(●) and ATPase (■) from bovine aorta microsomes.

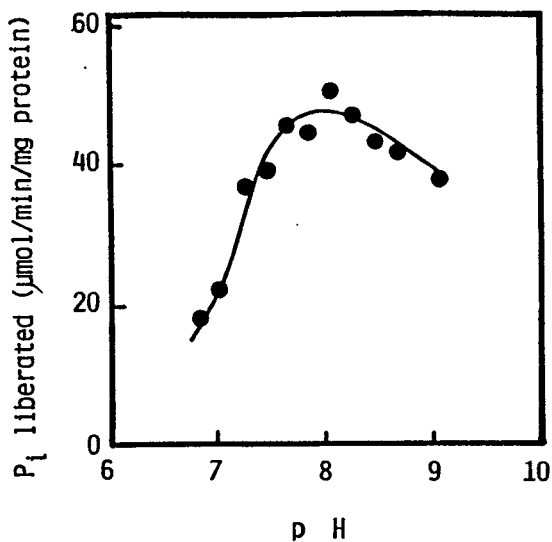


Figure 3-4 Influence of pH on the activity of ADPase from aorta microsomes.

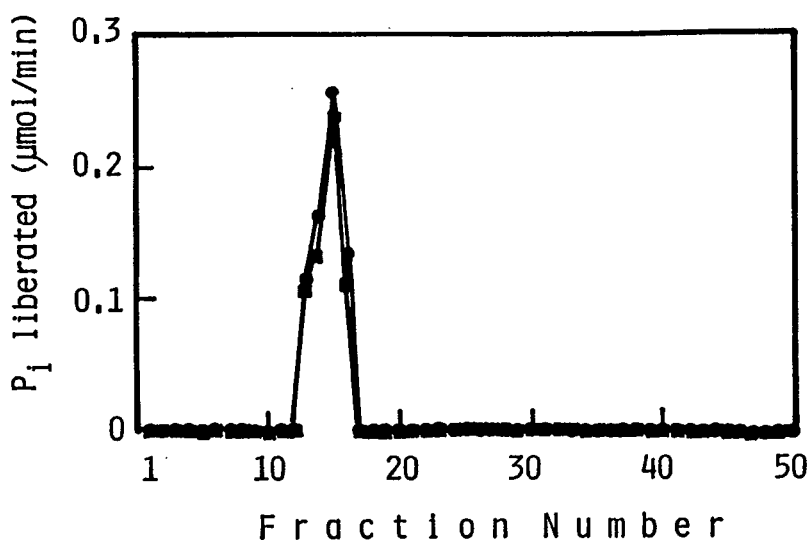


Figure 3-5 Triton X-100 polyacrylamide gel electrophoresis of the ADPase(●) and ATPase(■) activity from bovine aorta microsomes.

第五節 アピラーゼ固定化材料の血小板凝集抑制活性

本節においては、ADP分解酵素を固定化することによる材料への抗血栓性賦与について検討した。固定化、特に平滑な構造を有するチューブ内面への固定化においては、大量の酵素標品が必要になるが、大動脈ADP分解酵素の大量精製法が確立されていないことから、ここではADP分解酵素のモデルとして、大動脈ADP分解酵素同様ATPをも分解するジャガイモ由来の酵素アピラーゼ(E.C.3.6.1.5)を用いて検討を行なった。

実 験 方 法

〈酵素活性測定法〉

2.0mMの基質、5.0mM塩化カルシウムを含むpH6.8の50mMトリス塩酸緩衝液中、30℃で試料を一定時間反応させ、7.78%のトリクロロ酢酸で反応を停止させた後、遊離の無機リン酸量をFiskeとSubbarow¹⁸⁾の方法によって定量した。この条件下で1分間に1μmolのPiを遊離させる酵素量を1 unitと定義した。

ナイロン・チューブ固定化アピラーゼのみは、チューブ中に反応溶液を7 ml/minで循環させたのち、遊離の無機磷酸量を定量した。

〈酵素調製法〉

市販のジャガイモよりTraverso-Coriら³⁵⁾の方法によって抽出、精製を行なった。

〈酵素固定化法〉

セファロース4B、エチレンビニルアルコール共重合体(EVOH)への固定化は、Axenら²⁶⁾の方法によって、担体100mg当たり75 unitsのアピラーゼを使用し行なった。ナイロン・チューブ(ϕ 2mm)への固定化は、InmanとHornby³⁶⁾の方法によって行なった。

〈機械的応力負荷下におけるFPC減少測定法〉

第一章、第二節の方法によって行なった。

〈In vitro血液循環系〉

Figure 3-6に図示したような、ペリスターポンプとシリコンあるいはナイロン・チューブからなる単純な構成とし、必要に応じてEVOHビーズを充填したシリコン・カラムを全体の長さを変化させないように接続した。ペリスターポンプはTAITEC 120typeを使用した。この系においては血液と空気の接触は避け得ないが、短時間の実験では特に問題は起こらなかった。

血小板挙動の解析は、FPCを測定することによって行なった。

〈トロンビン活性測定法〉

3.1%クエン酸処理PRPあるいはPPP 0.4mlに25mM塩化カルシウム0.4mlを添加し、同時に37°C、1000rpmで機械的応力を負荷し、経時的に0.1mlずつ採取して試料とした。0.1mM Boc-Val-Pro-Arg-MCA溶液1mlにこれを添加し、37°C、10分間反応させた後、17%酢酸2mlを添加して反応を停止させ、励起波長380

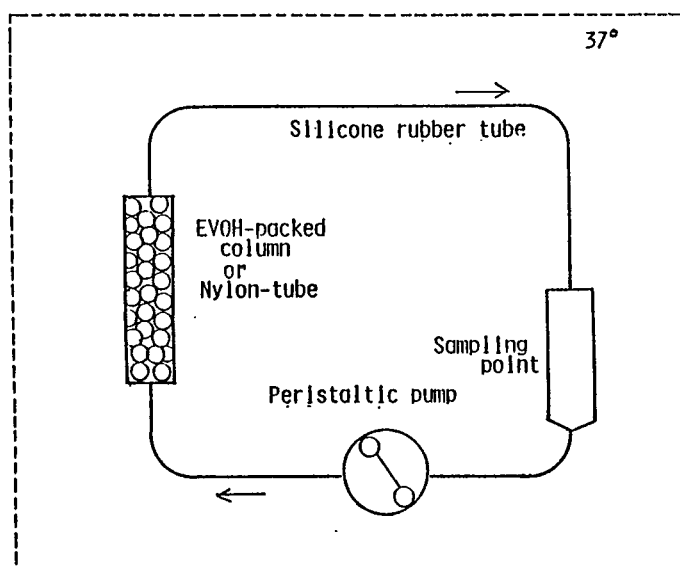


Figure 3-6 Blood recirculation system

nm、測定波長460nmで、蛍光測定しAMCの遊離量を求めた³⁷⁾。

実 験 結 果

最終的にセファデックスG-100のゲル濾過によって、最高 700 units/mg proteinの標品を得た。このアピラーゼは、ATPase/ADPase比が0.45であった。この標品を用いて、種々の材料への固定化を試みたところ、Table 3-4にまとめたように、いずれの場合においてもアピラーゼは固定化可能であった。

Table 3-4 Activity of immobilized apyrase

Carrier (method)	ADPase activity
Sepharose 4B (CNBr-activation)	0.04 units/mg gel
EVOH beads* (CNBr-activation)	0.04 units/100 beads
Nylon tube (glutaraldehyde)	0.044 units/cm ²

*, ethylene-vinyl alcohol copolymer

アピラーゼ固定化材料を用いて、その機械的応力負荷下におけるFPCの減少に対する効果を検討したのが、Figure 3-7である。I-MPの場合とは異なり、応力負荷直後においても明らかにFPCの減少を抑制していた。この差異は、両材料に固定化されたADP分解活性量の大小に起因すると思われる。

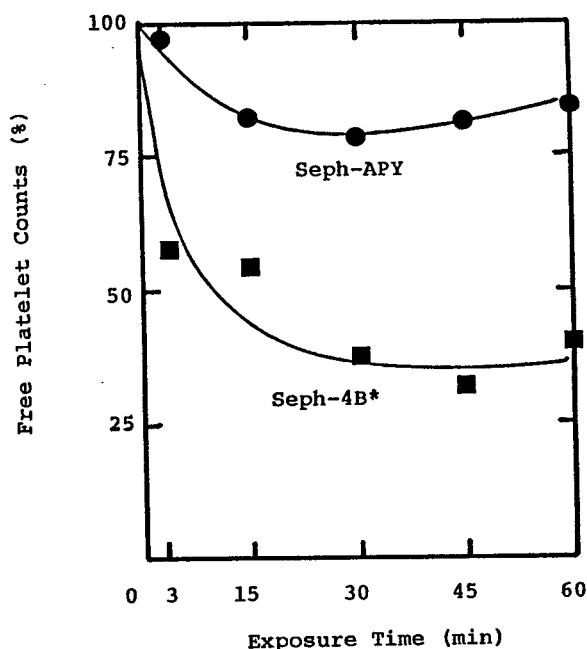


Figure 3-7 Inhibition of the decrease of FPC in whole blood by immobilized apyrase (Seph-APY). Immobilized apyrase was added to citrated whole blood prior to inducing a shear.

次により実際の系としてアピラーゼ固定化材料を回路の一部に組み込んだin vitroの血液循環回路を作成し、ポンプによる血液循環を行ない、そこで受ける血小板の変化をFPCを指標として検討した。

この系においても、FPCの急激な減少が観察されたが、このFPCの減少は、EDTAを添加して血小板凝集を阻害しても、完全には阻止されなかった。血液循環後のチューブ内面を位相差顕微鏡で観察すると多数の血小板の粘着が観察されたことから、この系のFPC減少には血小板凝集だけでなく、血小板粘着の寄与が大きいことが示唆された。

Table 3-5に示したように、回路の一部にアピラーゼ固定化ナイロン・チュー

Table 3-5 Decrease of free platelet counts in a blood recirculation system

Condition*	FPC \pm s.d. after 30 min (% of initial counts)
No addition	38 \pm 11 (n= 9)
Soluble apyrase added	68 \pm 13 (n=12)
Nylon tube-apyrase**	65 (n= 2)

* Citrated rabbit whole blood was circulation in a loop of silicone tube (2 mm in inner diameter, 35 cm long) by a peristaltic pump. The flow rate was 7 ml/min. Activity of soluble apyrase was varied in a range of 0.2 to 11 units.

** A part of silicone tubing (15 cm) was replaced by nylon tube carrying apyrase on its inner surface.

ブを組み込むことによって、FPCの減少は明らかに抑制された。この効果はアピラーゼ固定化EVOHを用いた場合にも同様であった。

血小板は活性化されることによって、血小板第3因子を放出し、トロンビンの活性化を促進することが知られている。そこで、次にアピラーゼによっ

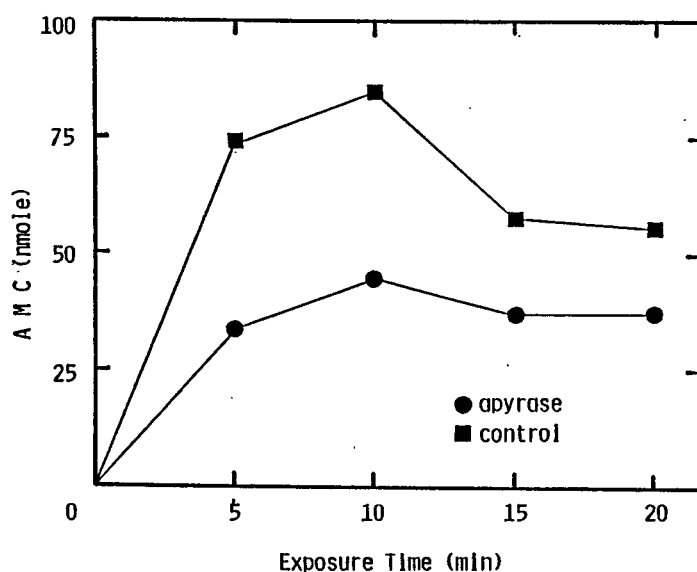


Figure 3-8 Effect of apyrase on thrombin activity after recarcification in sheared platelet-rich plasma.

てこのトロンビンの活性化を抑制することを試みた。方法に示したようにして、ここでは遊離状のアピラーゼをあらかじめ添加しておくことによって、その効果を検討した。その結果、Figure 3-8に示したように、アピラーゼはトロンビンの最大活性化量を半減させることが可能であった。

第六節 考察および小括

Figure 3-1に示した様に可溶化ミクロソームの血小板凝集抑制能は、明らかに2つの活性の複合されたものであった。1つは、主としてアラキドン酸凝集を抑制し、またADP凝集に対しても弱い抑制活性を示した。この画分は15-HPETEによって完全に阻害されたことからPGI₂ synthetaseによるものであると考えられる。もう1つは、アラキドン酸凝集を全く抑制しないこと、しかしADP凝集に対しては強い凝集抑制活性を示したこと、また、ADP分解活性と完全に一致することから、ADP分解酵素によるものであると、考えられる。

ADP分解活性が大動脈に存在することは、すでにヒト(Heynsら³⁸⁾、ウサギ(Liebermanら³⁹⁾)について報告されているが、この活性を保持する酵素については不明の点が多い。Montagueら⁴⁰⁾は、ラット肝臓のミトコンドリアに存在するADP分解活性が、アデニレート・キナーゼとATPaseによる複合活性であることを明らかにした。しかし、アデニレート・キナーゼの特異的阻害剤であるAp5AによってADP分解活性は全く阻害されないこと、また、電気泳動的に単一を示す状態においてもその活性が失われないことから、ウシ大動脈ミクロソームのADP分解活性は、ラット肝臓ミトコンドリアとは異なり、単一の酵素によるものであると考えられる。Liebermanら³⁹⁾は、放射性同位元素によってラベルしたADPを用いた検討において、ウサギ大動脈ミクロソームのADP分解活性がATPあるいはその安定化アナログである β - γ ATPによって濃度依存的に阻害を受けることを報告している。これは、ADP分解活性とATP分解活性が、同じ1つの酵素によるものである可能性を示唆している。本章の検討においてもADP分解活性とATP分解活性は、精製のどの段階の標品を用いても、常に電気泳動によって、同じ位置に泳動され、またATPase/ADPase比は、1:1で変化しなかった。これが、非特異的な酵素によるものでないこ

とはAMPおよび非ヌクレオチドに対する分解活性が全く観察されなかったこと、またアルカリ・フォスファターゼ活性が検出されなかったことから明らかであると思われる。また、ADP分解活性とATP分解活性はともに Ca^{++} によって促進され、EDTAによって阻害された。さらに電気泳動的に単一な状態においても可溶化ミクロソームとほぼ同じ1:1のATPase/ADPase比を維持していた。これらの結果から、ウシ大動脈ミクロソームのADP分解活性は、非特異的フォスファターゼによるものでも、アデニレート・キナーゼとATPaseの複合作用によるものでもない特異的なものであるが、ADPのみを分解する酵素ではなくて、LeBelら⁴¹⁾がブタ脾臓に存在すると報告しているような、カルシウム依存性ATP diphosphohydrolase (アピラーゼ、EC 3.6.1.5)によるものである可能性が高いと考えられる。

血小板に種々の凝集惹起剤が作用するとホスホリパーゼの活性化が起こり膜磷脂質からアラキドン酸が遊離する。このアラキドン酸は幾つかの酵素によって代謝を受ける。この代謝物の内、 PGH_2 、 PGG_2 、トロンボキサン A_2 (TXA_2)はイオノホアとして細胞質内へカルシウムを遊離させる働きがあり、この遊離されたカルシウムが収縮蛋白などに働いて凝集、放出反応などを引き起こすと考えられる。また TXA_2 にはdense bodyに働いて、ADP、セロトニ

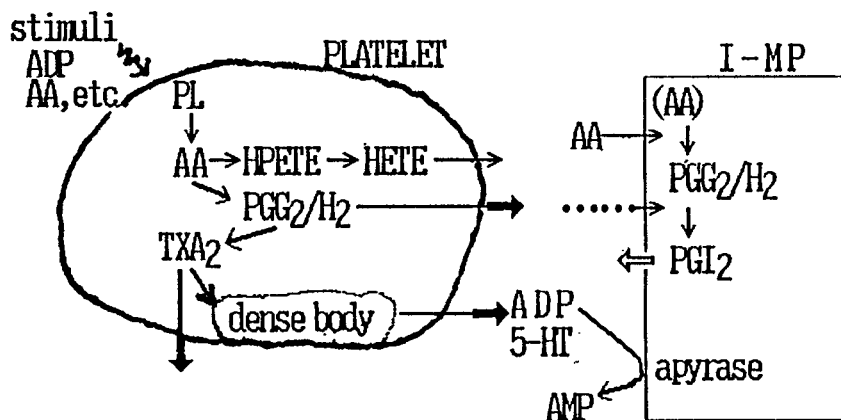


Figure 3-9 Mechanisms of the anti-aggregatory activity of bovine aorta microsomes and immobilized microosomal proteins. AA, arachidonic acid; TXA_2 , thromboxane A_2 ; \rightarrow , aggregation induces; \Rightarrow , aggregation inhibits

ン(5-HT)などを放出させる働きがあり、これらが他の血小板に働いて、さらに凝集を促進すると思われる。しかしADP凝集においては、アラキドン酸から PGG_2 を産生する酵素シクロオキシゲナーゼをアスピリンによって阻害しても凝集が惹起される(一次凝集)ことから、アラキドン酸代謝とは無関係な凝集機構も存在すると考えられる。

他方、血管においても血小板同様に磷脂質からアラキドン酸を遊離させ代謝する酵素系の存在が知られている。この場合最終的に生成するのは PGI_2 である。 PGI_2 は非常に強い凝集抑制剤であり、ほとんど全ての凝集惹起剤による血小板凝集に対して強い凝集抑制効果を発揮する。 PGI_2 は血小板のレセプターと結合して細胞内のサイクリックAMP(cAMP)濃度を高める働きがあるので、このcAMPが細胞内のカルシウム濃度を低下させることによって血小板凝集抑制機構となんらかの関連を持っていると考えられている。また血管にはADPを分解する活性があり、この活性は細胞膜の外側にあるecto-enzymeの働きによるものであると考えられている。本章での検討からそれが、ATP diphosphohydrolaseと考えられることは既に述べたが、この酵素はADPそれ自体を分解することによって、血小板の活性化を阻止する働きを担っていると考えられる。

以上のことをまとめるとFigure 3-9のようになる。大動脈ミクロソームあるいはI-MPにおいては、この図に示すような機構によって、血小板凝集抑制活性が発現していると思われる。すなわち(1)外因性のアラキドン酸あるいは、活性化血小板から放出された PGH_2 を基質として PGI_2 が産生され、これが血小板凝集を阻害する。このような血小板に由来する基質によって PGI_2 産生が増大することは、培養内皮細胞においても証明されている⁴²⁾。また(2)外因性のADPあるいは活性化血小板から放出されたADPをアピラーゼが、分解することによって血小板凝集が抑制される。正常な血管内皮細胞は常時少量の PGI_2 を産生していることが知られているので、これらの抑制活性に占める重要性の割合はミクロソームあるいはI-MPの場合とは異なることが予想されるが、これらの機構は生体内においてもそのまま働いていると考えられ、従ってI-MPは実際の生体とよく似た方法で、血小板凝集を抑制することが可能で

あり、それゆえ、優れた血液適合性材料に成り得ると考えられる。

しかし、材料に固定化する標品は、出来る限り純度の高いものを用いることが、副作用の発現を避けるためにも望ましいと考えられることから、次にジャガイモ由来のアピラーゼを使用して、ADP分解酵素の固定化による材料への血小板凝集抑制活性の賦与を試みた。その結果、アピラーゼの固定化によってI-MPと同様に機械的応力負荷下における血小板凝集を顕著に抑制することが可能であった。さらに、アピラーゼ固定化材料をその一部に組み込むことにより、血液循環中に惹起されるFPCの減少をも軽減することが可能であった。しかし、この系においては、血小板粘着が無視し得ない割合で起きており、これに対してはアピラーゼは効果を示さなかった。これは遊離状のアピラーゼを添加したときにも同様であり、血小板粘着においては、ADPは重要な役割をはたしていないことが示唆された。しかし、血小板粘着は血小板と材料の直接の相互作用であり、これを抑制するためには、血液適合性の良好な材料を固定化担体に用いることによって充分解決可能と思われる。

また遊離状のアピラーゼを用いてトロンビンの活性化に及ぼす血小板活性化の影響を検討したところ、アピラーゼによって、明らかにトロンビンの活性化は抑制された。トロンビンによる血小板の活性化にはADPの関与が示唆されていることから、アピラーゼはこの血小板活性化を抑制し、血小板第3因子活性の発現するのを妨げることによってトロンビンの活性化量を低下させたと考えられる。このことから、ADP分解活性の材料への賦与によって凝固系をも抑制し得る可能性が示唆された。しかし、その抑制はトロンビンの活性化を完全に阻止し得るものではなく、凝固系に対しては、やはり別にその活性化を抑制することが必要であると思われた。

第四章 トロンボモジュリン固定化材料の抗血栓性

第一節 緒 言

血管は、血液適合性を維持するために、血小板凝集抑制機能のみならず、血液凝固系に対しても阻害機能を有している事が知られている。特に血液の流速が極めて遅い部位においては、凝固系の活性化が血小板よりも血栓形成に対して支配的であると考えられることから、この血管の抗凝固作用が特に重要な機能を果たしていると考えられる。

最近、トロンビンが、血管内皮細胞膜蛋白質であるトロンボモジュリンと結合することによってその凝固促進活性を失うことが報告された⁴³⁾。トロンボモジュリンはトロンビンと非共有結合による複合体を形成する。その結果トロンビンは、フィブリンノーゲン、第Ⅴ因子、血小板と云ったその本来の基質に対する反応性を消失するが⁴³⁾、プロテインCの活性化能のみは約1000倍に促進される⁴⁴⁾。このプロテインCの活性化型は、プロトロンビン、第Ⅹ因子活性化の各々補因子である蛋白質、第Ⅴ_A因子および第Ⅷ_A因子を分解することによってトロンビンの生成を抑制する⁴⁵⁾。つまり、トロンビンは、トロンボモジュリンと結合することによって基質特異性に変化を受け、凝固促進因子から凝固阻害因子へと転換するのである。このことは、トロンボモジュリンを人工材料に固定化することによって、材料に抗凝固活性を賦与できる可能性を示唆する。そこで本章においては、トロンボモジュリンの材料への固定化を試み、その性質について検討した。

第二節 トロンボモジュリン固定化材料のトロンビン凝固促進作用に対する阻害効果

トロンボモジュリン固定化材料の抗凝固活性について検討するために、ウシ肺からの精製を行ない、アガロース・ビーズへの固定化を試みた。

実 験 方 法

〈材 料〉

ウシ・トロンビン⁴⁶⁾、プロテインC⁴⁷⁾、アンチトロンビンⅢ⁴⁸⁾の精製

は、既報の方法によった。ウシ肺トロンボモジュリンはウサギ肺トロンボモジュリンの精製法⁴⁴⁾に基づいて精製した。

〈トロンボモジュリン活性測定法〉

プロテインC(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、トロンビン(400 NIH units/ml)、0.1M塩化ナトリウムと3.5mM塩化カルシウムを含む0.02Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、およびトロンボモジュリン試料各10 μl を混合し、37°Cで10分間インキュベーションし、これに10 μl のアンチトロンビンIII(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ヘパリン(100 units/ml)混合液を添加して反応を停止した。さらに500 μl の100mM Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCAを添加し、37°Cで10分間インキュベートを行なったのち、1mlの15%酢酸を添加して反応を停止して、遊離したAMC量を測定した³²⁾。1nmoleのAMCを1分間に遊離するプロテインC_uを活性化するのに必要なトロンボモジュリン量を1unitのトロンボモジュリンと定義した。

〈固定化材料調製法〉

トロンボモジュリンあるいはウシ血清アルブミンを0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M炭酸水素ナトリウムに懸濁したトレシル活性化セファロース4B⁴⁹⁾に添加し、室温で4時間反応させた後、各々0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M炭酸水素ナトリウム、および0.1M酢酸緩衝液(pH4.0)で洗浄し、0.145M塩化ナトリウムを含む0.01Mトリス塩酸緩衝液(pH7.4)に懸濁して4°Cで保存した。

〈フィブリン凝固時間測定法〉

100 μl の固定化トロンボモジュリン懸濁液を100 μl の1%フィブリンノーゲン溶液に添加し、37°Cで3分間インキュベーションした後、100 μl のトロンビン(終濃度0.17 units/ml)を添加しフィブ्रोメーターによって、凝固時間を測定した。

〈血小板放出反応測定法〉

ウサギ洗浄血小板は、Tollefsenら⁵⁰⁾の方法によって調製した。¹⁴Cセロトニンの放出は、Davidら⁵¹⁾の方法によって測定した。セロトニン放出の阻害はアグリゴメーター中で250 μ l の洗浄血小板に固定化トロンボモジュリンを添加し、その後トロンビン(終濃度0.2 units/ml)を添加することによって測定した。

実 験 結 果

ウシ肺トロンボモジュリンは1920倍に精製され、比活性は19800 units/mg proteinであった。この部分精製トロンボモジュリンを固定化に使用した。

トロンボモジュリンは、トレシル活性化法によって良好に固定化された。比活性は0.31 units/mg gelであり、活性収率は40%であった。

Figure 4-1はトロンビンのフィブリノーゲン活性化能に及ぼすトロンボモ

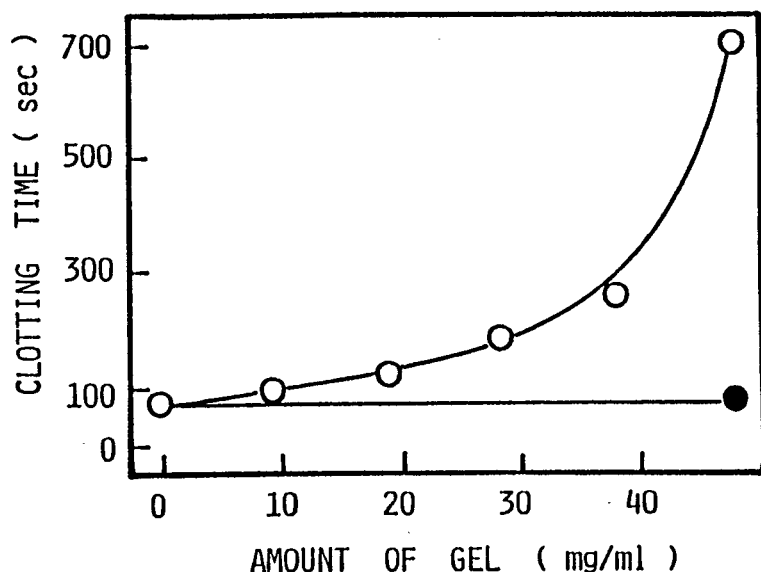


Figure 4-1 Inhibition of thrombin-catalyzed fibrin formation by immobilized thrombomodulin. O, immobilized thrombomodulin; ●, immobilized albumin.

ジュリンの影響を示している。47mg/mlの固定化アルブミンが凝固時間に影響を与えないのに対し、固定化トロンボモジュリンは10mg/mlで凝固時間を延長することが可能であった。トロンボモジュリンの量の増加に伴って、凝固時間は漸進的な延長を示した。47mg/mlの固定化トロンボモジュリンは、

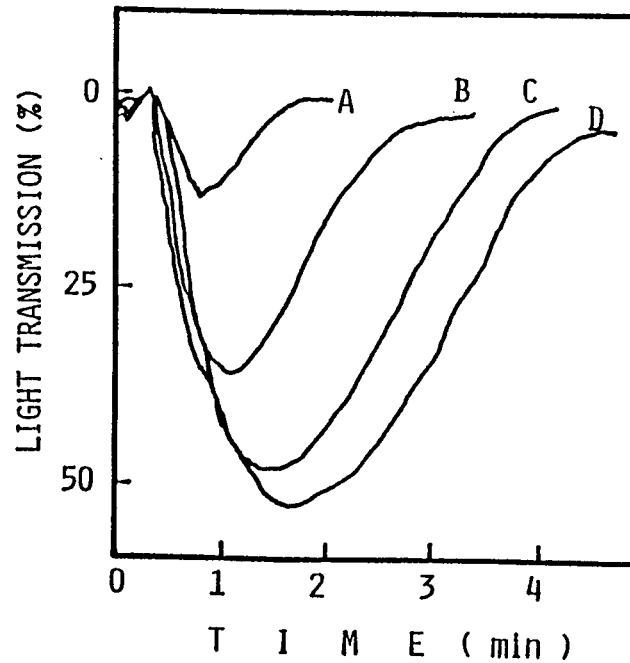


Figure 4-2 Inhibition of thrombin-catalyzed platelet aggregation by immobilized thrombomodulin. Immobilized thrombomodulin (A, 42mg/ml; B, 21mg/ml; and C, 8.5 mg/ml) and immobilized albumin (D, 42 mg/ml) were added to PRP prior to the addition of thrombin (0.3 units/ml).

同量の固定化アルブミンが75秒であるのに対して、700秒までの延長を示した。

Figure 4-2は固定化トロンボモジュリンの血小板トロンビン凝集に対する効果を示している。固定化アルブミンはトロンビン凝集に影響を与えなかった。トロンビン凝集は、固定化トロンボモジュリンによって濃度依存的に阻害された。42mg/mlの固定化トロンボモジュリン添加によって75%の阻害が観察された。

次にトロンビンによって惹起される血小板のセロトニン放出反応に対する

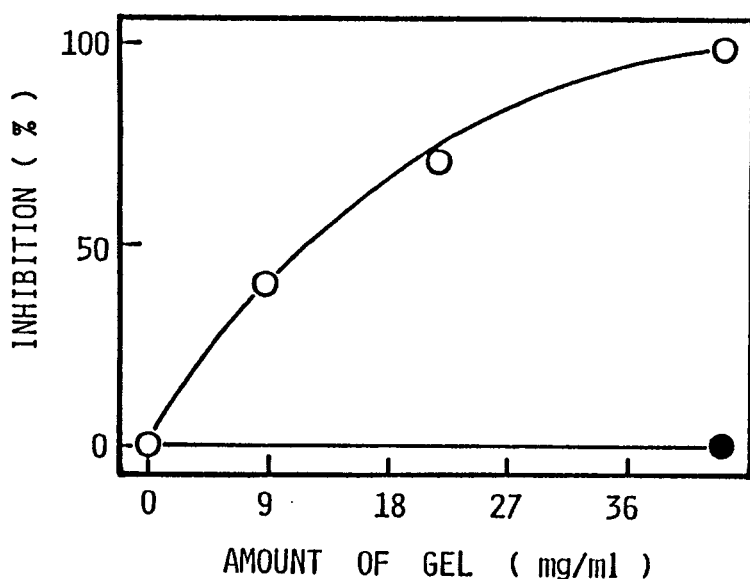


Figure 4-3 Inhibition of thrombin-induced platelet serotonin release by immobilized thrombomodulin. ○, immobilized thrombomodulin; ●, immobilized albumin.

固定化トロンボモジュリンの効果を検討した。Figure 4-3は、固定化トロンボモジュリンが、セロトニン放出反応を濃度依存的に阻害したことを示している。42mg/mlの固定化トロンボモジュリンによって約100%の阻害が観察された。

第三節 トロンボモジュリン固定化材料のプロテインC活性化促進効果

トロンボモジュリンはトロンビンと結合することによって、凝固促進活性を阻害されるのみならず、トロンビンのプロテインC活性化を飛躍的に促進する。これは他のトロンビン阻害剤には存在しないトロンボモジュリンの優れた性質である。そこで、本節において、このプロテインC活性化の促進について検討を行なった。

実 験 方 法

第二節に示した方法によって測定した。

実 験 結 果

Figure 4-4に示したように固定化トロンボモジュリンはトロンビンによるプロテインCの活性化を顕著に促進した。トロンビン濃度を一定にしたとき、プロテインCの活性化は固定化トロンボモジュリンの量に依存していた。

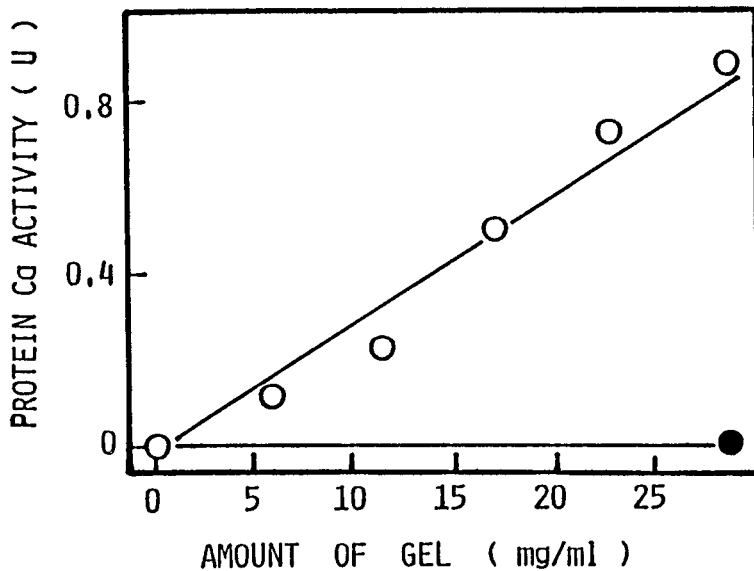


Figure 4-4 Acceleration of thrombin-catalyzed protein C activation by immobilized thrombomodulin. ○, immobilized thrombomodulin; ●, immobilized albumin.

Figure 4-5に示したように、固定化トロンボモジュリン量を一定にすると、プロテインCの活性化はトロンビン濃度に依存していた。Figure 4-5のデータから見掛け上の K_a を計算したところ(Figure 4-6)、トロンボモジュリンは、固定化によってもそのトロンビンに対する親和性が変化しなかった。

第四節 トロンボモジュリン固定化材料の抗凝固能

トロンボモジュリン固定化によってもその特徴的な活性を保持しており、また、トロンビンに対する親和性が変化しなかったことから、血中において抗凝固能を発現しうると考えられた。そこで本節において、この固定化トロ

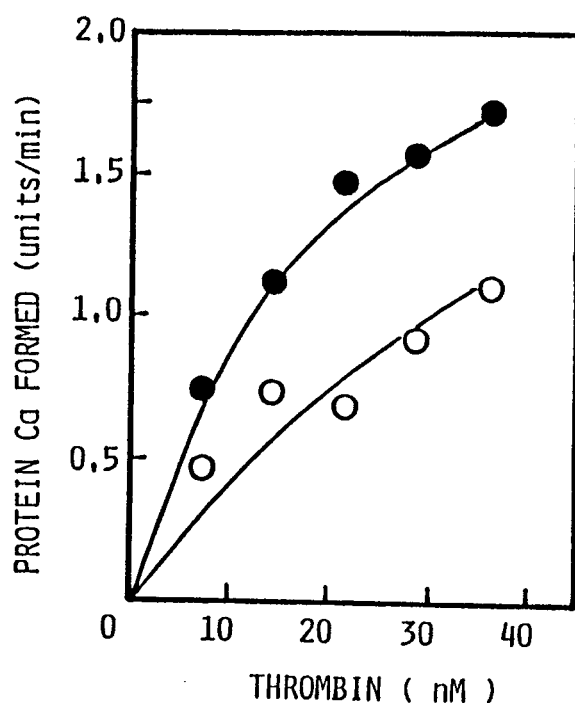


Figure 4-5 Thrombin dependence of protein C activation in the presence of thrombomodulin or immobilized thrombomodulin. O, immobilized thrombomodulin ; ●, free thrombomodulin.

ンボモジュリンが実際の血液凝固に対して効果があるか否かを検討した。

実 験 方 法

〈血漿カルシウム再加時間測定法〉

100 μ l の固定化トロンボモジュリン懸濁液(14mgのゲルを含む)を100 μ l のクエン酸処理ウシ血漿に添加し、37°Cで3分間インキュベーションした後、100 μ l の25mM塩化カルシウムを添加しフィブrometerによって、凝固時間を測定した。

実 験 結 果

固定化トロンボモジュリンの抗凝固能を血漿カルシウム再加時間法によって評価した。Table 4-1に示したように、固定化トロンボモジュリンは、固

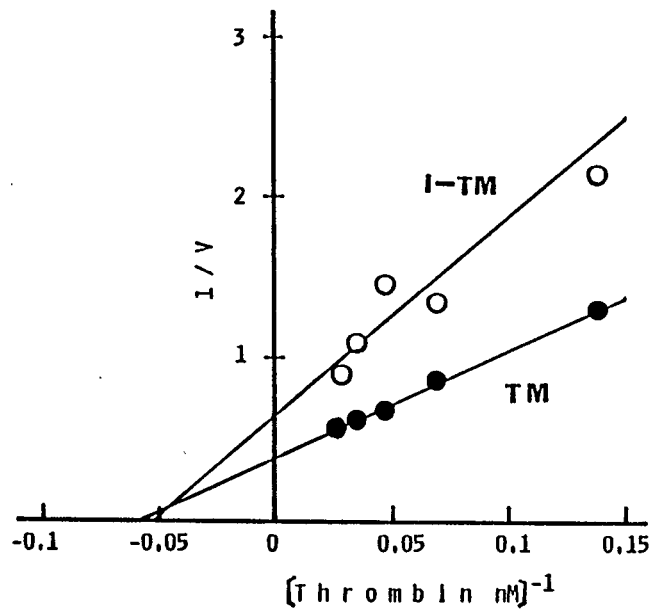


Figure 4-6 Determination of the dissociation constant for the thrombin-thrombomodulin complex. Double-reciprocal plot for the data shown in Figure 4-5. ○, immobilized thrombomodulin; ●, free thrombomodulin.

Table 4-1 Effect of immobilized thrombomodulin on plasma clotting time

Materials	Clotting time (sec)*
Immobilized bovine serum albumin	323.5 ± 26.9
Immobilized thrombomodulin	450.4 ± 52.3**

*, values are means ± s.d. (n=5 or 6)

**, p < 0.01

定化アルブミンと比較して、有意に血漿の凝固時間を延長することが可能であった。

第五節 考察および小括

凝固系を阻害するような材料としては、既にヘパリン固定化材料⁴⁻⁶⁾が広く検討されているが、ヘパリンは、共有結合によって材料に固定化するとそ

の抗凝固活性を発現し得ないと考えられている。また、ヘパリンは、アンチトロンビンⅢと結合することによってトロンビンの活性を阻害するが、トロンボモジュリンとは異なり、プロテインCの活性化を促進する働きはない。このことは、つまり、ヘパリン固定化材料には、凝固因子の活性化そのものを積極的に抑制することは期待できないことを意味する。

トロンボモジュリンは固定化によってもトロンビンに対する親和性が変化せず、遊離状の時と同様にトロンビンの凝固促進活性を速やかに阻害できることが示された。また、トロンボモジュリン固定化材料は、トロンビンのプロテインC活性化を顕著に促進することが可能であり、プロテインCは、トロンビン活性化の補因子である活性型第Ⅴ因子を分解することが知られている⁴⁵⁾ので、凝固系第Ⅹ_a因子、及びトロンビンのさらなる生成を抑えることが可能である。また、トロンボモジュリンとトロンビンの結合は可逆的であり⁴³⁾、トロンビン濃度が低下してくれば自然に解離が起こって、それ以上のプロテインC活性化は抑制されることが期待出来る。プロテインC自体は血中に存在するプロテインCインヒビター⁵²⁾によって速やかに阻害を受けることが知られている。

すなわち、ヘパリンが活性化凝固因子を阻害するのみで、またその効果が凝固因子と(アンチトロンビンⅢと)の不可逆的な結合によって一回的なものに限られると考えられるのに対して、トロンボモジュリンは凝固因子の活性化そのものを抑制することが可能であり、その効果もトロンビンとの結合の可逆性及びプロテインCの酵素作用によって一回に限られない持続性を期待出来る。これらのことから、トロンボモジュリンの固定化は、トロンビンの生成が惹起されたときにのみその酵素活性を阻害し、同時に凝固系因子のさらなる活性化を抑制する極めて効果的な血栓形成の制御機構を材料に賦与することを可能にすると考えられる。このような材料は血小板の関与が少ない場においては、優れた抗血栓性材料に成り得ると考えられる。

結 論

1. 大動脈ミクロソームは、強い血小板凝集抑制活性を有しており、また、機械的応力負荷下におけるFPCの減少に対しても顕著な効果のあることを明らかにした。この活性は、血管内皮細胞の有するそれと、基本的に同一の、 PGI_2 産生とADP分解によるものであると考えられた。
2. 大動脈ミクロソームは、包括法によってフィブリンゲルに、また、共有結合法によって、アガロースビーズに固定化可能であり、これらの固定化材料は、従来の血小板活性化抑制性材料とはことなる積極的な方法によって顕著な血小板凝集抑制活性および機械的応力負荷下におけるFPCの減少抑制活性を示すことを明らかにした。
3. 大動脈ミクロソームの血小板凝集抑制活性は、 PGI_2 synthetase活性とADP分解活性に由来するものであり、各々アラキドン酸凝集とADP凝集を主として抑制することを明らかにした。またADP分解活性は、特異的な酵素によるものであり、その酵素はATP diphosphohydrolase(アピラーゼ)であると考えられた。更に、アピラーゼ固定化材料は、ミクロソーム固定化材料同様機械的応力負荷下におけるFPC減少を顕著に軽減し、血液循環系における血小板凝集の抑制が可能であることを明らかにした。
4. トロンボモジュリン固定化材料は、トロンビンの凝固促進活性を速やかに阻害し、プロテインCの活性化を飛躍的に促進することが可能であることを明らかにした。またトロンボモジュリン固定化材料は抗凝固能を有し、血漿中において抗血栓性を発揮することが可能であることを明らかにした。
5. 以上の結果から、生体血管が示す優れた抗血栓性は、高分子材料に固定化可能な性質のものであり、その固定化によって生体と基本的に同一の機作で抗血栓性を発揮する高分子材料の構築が可能であると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり終始御指導御鞭撻賜りました恩師大阪大学薬学部三浦喜温教授に謹んで感謝の意を表します。

また研究を行なうに際し有益な御助言御協力をいただきました宮本和久助教授、八木清仁助手、藏野憲秀助手、梅田房子技官、共同実験者として御協力いただいた青柳貞吉博士、北堀不二子、藤野登史子、森喜るみ子、笹木伸美、山崎伸二、上井明子、荒井幸規の諸氏ならびに大阪大学薬学部薬品製造工学教室の諸兄に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. 『新・人工臓器』、醫學のあゆみ、134(第5土曜特集) (1985).
2. 今井庸二:人工臓器、12、963-971 (1983).
3. K.A. Jorgensen: Danish Medical Bulletin, 29, 169-197 (1982).
4. E.W. Salzman, W.G. Austen, B.J. Lipps, E.W. Merrill, E.R. Gilliland, and J. Joison: Surgery, 61, 1-10 (1967).
5. H.R. Lagergren, and J.C. Eriksson: Trans. Am. Soc. Art. Int. Org., 17, 10-13 (1971).
6. G. Schmer: Trans. Am. Soc. Art. Int. Org., 18, 321-324 (1972).
7. S. Watanabe, Y. Shimizu, T. Teramatsu, T. Murachi, and T. Hino: J. Biomed. Mater. Res., 15, 553-563 (1981).
8. R. Aoshima, Y. Kanda, A. Takada, and A. Yamashita: J. Biomed. Mater. Res., 16, 289-299 (1982).
9. F.F. Senatore, and F.R. Bernath: Biotechnol. Bioeng., 28, 58-63 (1986).
10. S. Moncada, R. Gryglewski, S. Bunting, and J.R. Vane: Nature, 263, 663-665 (1976).
11. G.E. Lieberman, G.P. Lewis, and T.J. Peters: Lancet, ii, 330-332 (1977).
12. J.A. Marcum, and R.D. Rosenberg: Biochemistry, 23, 1730-1737 (1984).
13. 水野明:『血小板』(山中学、植田譲編)、医歯薬出版、東京、1982.
14. G.V.R. Born: Nature, 194, 927-929 (1962).
15. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall: J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951).
16. Y. Miura, S. Aoyagi, F. Ikeda, and K. Miyamoto: Japan. J. Artif. Organs, 9, 314-317 (1980).
17. M.M. Bradford: Anal. Biochem., 72, 248-254 (1976).
18. C.H. Fiske, and Y. Subbarow: J. Biol. Chem., lxvi, 375-400 (1925).
19. J. A. Salmon, and R. J. Flower: Methods in Enzymology, 86, 477-

- 493 (1982).
20. M. Hatsumi, S. Kimata, and K. Hirose: J. Chromatogr., 253, 271-275 (1982).
 21. M.O. Funk, R. Isaac, and N.A. Porter: Lipid, 11, 113-117 (1976).
 22. J.A. Salmon, D.R. Smith, R.J. Flower, S. Moncada, and J.R. Vane: Biochim. Biophys. Acta, 523, 250-262 (1978).
 23. M. Lombroso, S. Nicosia, R. Paoletti, B.J.R. Whittle, S. Moncada, and J.R. Vane: Prostaglandins, 27, 321-333 (1984).
 24. J.C. McRea, and S.W. Kim: Trans. Am. Soc. Art. Int. Org., xxiv, 746-751 (1978).
 25. 和泉裕一、久保良彦、笹嶋唯博、稲葉雅史、西岡洋、鮫島夏樹: 人工臓器, 12, 217-220 (1983).
 26. R. Axen, J. Porath, and S. Ernback: Nature, 214, 1302-1304 (1967).
 27. H. Kambic, S. Murabayashi, R. Yozu, T. Morimoto, M. Furuse, H. Harasaki, C. George, M. Helmus, R. Snyder, and Y. Nose: Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, xxx, 406-410 (1984).
 28. P.W. Holloway: Anal. Biochem., 53, 304-308 (1973).
 29. G.V.R. Born, D. Berquist, and K.-E. Arfors: Nature, 259, 233-235 (1976).
 30. W.R. Figures, L.M. Searce, Y. Wachtfogel, J. Chen, R.F. Colman, and R.W. Colman: J. Biol. Chem., 261, 5981-5986 (1986).
 31. A.K. van den Hoek, and S.S. Zail: Clin. Chim. Acta, 79, 7-14 (1977).
 32. G. Fairbanks, T.L. Steck, and D.F.H. Wallach: Biochemistry, 10, 2606-2617 (1971).
 33. C.W.T. Pilcher, and T.G. Scott: Biochem. J., 104, 41C-42C (1967).
 34. P. Feldhaus, T. Froelich, R.S. Goody, M. Isakov, and R.H. Schirmer: Eur. J. Biochem., 57, 197-204 (1975).
 35. A. Traverso-Cori, S. Traverso, and H. Reyes: Arch. Biochem. Biophys., 137, 133 (1970).
 36. D.J. Inman, and W.E. Hornby: Biochem. J., 129, 255 (1972).

37. T. Morita, H. Kato, S. Iwanaga, K. Takada, T. Kimura, and S. Sakakibara: J. Biochem. (Tokyo), 82, 1495 (1977).
38. A.P. Heyns, D.J. Berg, G.M. Potgieter, and F.P. Retief: Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.), 32, 417-431 (1974).
39. G.E. Lieberman, and G.P. Lewis: Artery, 8, 374-380 (1980).
40. D.J. Montague, T.J. Peters, and H. Baum: Biochim. Biophys. Acta, 771, 9-15 (1984).
41. D. LeBel, G.G. Poirier, S. Phaneuf, P.St.-Jean, J.F. Laliberte, and A.R. Beaudoin: J. Biol. Chem., 255, 1227-1233 (1980).
42. A.I. Schafer, D.D. Crawford, and M.A. Gimbrone, Jr: J. Clin. Invest., 73, 1105-1112 (1984).
43. C.T. Esmon, N.L. Esmon, and K.W. Harris: J. Biol. Chem., 257, 7944-7947 (1982).
44. N.L. Esmon, W.G. Owen, and C.T. Esmon: J. Biol. Chem., 257, 859-864 (1982).
45. W. Kisiel, W.M. Canfield, L.H. Ericsson, and E.R. Davie: Biochemistry, 16, 5824-5831 (1977).
46. R.L. Lundblad, L.C. Uhteg, C.N. Vogel, H.S. Kingdon, and K.G. Mann: Biochem. Biophys. Res. Comm., 66, 482-489 (1975).
47. N. Hashimoto, T. Morita, and S. Iwanaga: J. Biochem., 97, 1347-1355 (1985).
48. W.C. Mahoney, K. Kurachi, and M.A. Hermodson: Eur. J. Biochem., 105, 545-552 (1980).
49. K. Nilsson, and K. Mosbach: Biochem. Biophys. Res. Comm., 102, 449-457 (1981).
50. D.M. Tollefsen, J.R. Feagler, and P.W. Majerus: J. Biol. Chem., 249, 2646-2651 (1974).
51. J.L. David, and F. Herion: Platelet Function and Thrombosis, Plenum Press, New York-London (1972).
52. K. Suzuki, J. Nishioka, and S. Hashimoto: J. Biol. Chem., 258, 163-168 (1983).

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

1987年 4月 1日 初版一刷

著 者 廣 田 晃 一

印刷・製本 株式会社きたがわぷりんと
