

# 抗血栓性材料としての脂質固定化複合体の形成と ウシ血清アルブミンの吸着挙動

東京職業訓練短期大学校 神 林 信太郎

## Formation of Lipid-Immobilized Polyelectrolyte Complex for Antithrombogenic Materials and Adsorption Behavior of Bovine Serum Albumin

Shintarou Kanbayashi

**要 約** 脂質と高分子電解質からなる、脂質固定化複合体(LIPC)を合成した。LIPCは、荷電バランスと親・疎水性バランスを自由に変えたものが調製できた。LIPCの抗血栓性材料としての評価を行なう意味で、ウシ血清アルブミン(BSA)の吸着挙動を、pH、イオン強度を種々に変えて検討した。LIPCとBSAの吸着力は、主に静電的相互作用、疎水性相互作用であり、その吸着量は荷電バランスとpHの影響を受けた。アニオン型のLIPCは、pH 5以上で良好な抗血栓性材料となる可能性が示唆された。イオン強度の増大は、BSA吸着量を効果的に減少させることがわかった。LIPCとBSAの吸着に、LIPC自身の膨潤度の影響が大きく寄与することが明らかになった。以上の結果から、LIPCがアニオン性荷電を持ち、親水性に富み、膨潤度の小さなものが抗血栓性材料として優れた特性を持つことが明らかになった。

### I 緒 言

人工臓器に代表される医用高分子材料は、医学、医療分野において広く使用されている。医用材料の開発に当たっては、医用機能性、高分子の実用特性はもちろんのこと、生体適合性を考慮に入れて材料設計を行う必要がある<sup>1)</sup>。

生体適合性材料のなかでも、血液適合性材料の開発、特に抗血栓性材料に関する研究は、非常に重要な問題である。

すでに良く知られているように、血液は正常な血管内皮細胞以外の異物に接触すると、(1)血小板系、(2)凝固系、(3)補体系、の三つの生体系が活性化され、これらが巧妙に作用して直ちに血栓を形成する<sup>2)</sup>。従来の抗血栓性材料では、上記すべての経路を抑制することは困難とされており、理想的な抗血栓性材料はいまだに開発されていない。したがって、血液適合性を含めた生体適合性材料の

開発には、材料と生体系との相互作用を十分把握し、分子設計していく方法を取らなければならない。

人工高分子材料が血液と接触すると、まずその表面へ血漿タンパク質の吸着が速やかに起き、それが引き続いて起こる血栓形成の引き金になる<sup>3)</sup>。したがって、ウシ血清アルブミン(BSA)などの血漿タンパク質の固体表面への吸着挙動を解明して行くことは、抗血栓性材料の開発としての重要なテーマの一つとなる。

血液中に高濃度で存在する血清アルブミンは、材料と吸着することによって、その表面を血液親性に変えることがほぼ明らかにされている。したがって、抗血栓性にとって望ましくない糖タンパクの吸着よりも、血清アルブミンの吸着が優先するような材料表面を作り出せば、抗血栓性付与の目的が達成できるはずである。しかし、実際には150種類以上も存在する血漿タンパクの中から、血清アルブミンだけを選択的に吸着するような材料の設計を行なうことは、容易なことではない。そこで、私達は血漿タンパクを吸着しにくい表面も、1つの血液親性材料と考え、その開発を進めている。

生体膜中のリン脂質分子は、水系溶媒中で二分子膜構造を形成する。このようなリン脂質の集合した表面は優れた血液適合性を示すことが知られている<sup>1)</sup>。

また、高分子電解質複合体(PEC)は、水や一般的な有機溶媒に不溶であること、物質透過性が優れていること、水との親和性が高く安定なハイドロゲルの状態を取ること、親・疎水性のミクロ不均一構造を呈すること、表面の荷電バランスが可変であることなどの、生体適合性材料を考える上で優れた特性を有することが明らかになってきた<sup>5)~8)</sup>。

以上のようなことから、本研究では、脂質分子と高分子電解質分子との間でPECを形成させ、脂質分子とPEC自身のそれぞれの優れた生体適合性を併せ持つ、新しい抗血栓性材料を作ることを試みたので報告する。

さらに、脂質固定化複合体(LIPC)の抗血栓性材料としての評価を行う意味から、BSAの吸着挙動について、pHやイオン強度を種々に変えて検討した。

生体膜中のリン脂質分子のモデルとしては、Distearyl dimethylammonium Chloride (DiSDACl)を用いた。高分子電解質としては、Chondroitin Sulfate C Sodium Salt (ChnS-Na)、Potassium Polyvinylalcohol Sulfate (PVSK)を用い、両者の分子鎖構造の違いが形成するLIPCに及ぼす影響を検討した。

このLIPCは、親・疎水性バランスや荷電バランスを系統的に変えることができるので、今までにない新しい生体適合性材料への応用が期待される。

## II 実験

### 1 試料

DiSDAClは、東京化成工業(株)の市販品をそのまま用いた。所定量のDiSDAClを少量のクロロホルムに溶解し、減圧乾固後、適量の蒸留水中へ超音波により分散させて、所定濃度の水溶液を調製した。

ChnS-Naは、ナカライテスク(株)の市販品をそのまま用いた。PVSKは、和光純薬工業(株)の市販品を使用した。

BSAは、Miles Laboratories, Inc. (USA)のAlbumin, Bovine, Fraction V, Powderをそのまま使用した。

### 2 電導度測定

PVSK溶液 ( $2.5 \times 10^{-5}$ 、 $5.0 \times 10^{-5}$ 、 $7.5 \times 10^{-5}$  mol/l)、ChnS-Na溶液 ( $0.5 \times 10^{-4}$ 、 $1.0 \times 10^{-4}$ 、 $1.5 \times 10^{-4}$  mol/l)それぞれ100ml中に、(株)平間理化学研究所製自動滴定装置ART-3により  $1 \times 10^{-3}$  mol/l DiSDACl溶液を滴下混合し、そのときの系の電導度変化を京都電子工業(株)電導度

計CM-05で測定した。

### 3 濁度測定

所定濃度のPVSK、ChnS-Na溶液100ml中に自動滴定装置を用いて  $1 \times 10^{-3}$  mol/l DiSDACl溶液を滴下混合し、(株)平間理化学研究所製光度滴定ユニットにより測定波長660nmで系の濁度変化を測定した。

PVSKまたはChnS-NaとDiSDACl間で形成される複合体濃度が、系の濁度に直接比例すると考え、濁度最大点を反応の終点とした。

### 4 脂質固定化複合体(LIPC)の調製

所定濃度のPVSK、ChnS-Na溶液中に自動滴定装置を用いて、 $1 \times 10^{-2}$  mol/l DiSDACl溶液を滴下してLIPCを合成した。生成した白色沈殿物のLIPCを30℃で乾燥し、LIPCの固形物を得た。

ポリアニオン(PVSK、ChnS-Na)とDiSDAClの混合モル比を種々に変え、荷電バランスの異なるLIPCを調製した。混合モル比が、[ポリアニオン] / [DiSDACl] = 1を等モル型、[ポリアニオン] / [DiSDACl] = 0.5をカチオン型、[ポリアニオン] / [DiSDACl] = 2をアニオン型とそれぞれした。

### 5 BSA吸着実験

ビーカー中にLIPCを一定量精秤して入れ、あらかじめpHを3~7にNaOH、HClで調製したBSA溶液を20ml加えて、30℃恒温水槽中で4時間吸着処理を行った。吸着処理後、遠心分離(3000回転、5分間)を行い、上澄み液をシリンジフィルター(0.2μm)を通して採取し、紫外吸収法(280nm)でBSA濃度を定量した。吸着量は、吸着反応前後のBSAの変化量から算出し、LIPC 1g当たりのBSA吸着量(mg)として求めた。

吸着反応におけるイオン強度( $\mu$ )は、NaCl溶液を用いて調製した。

### 6 膨潤度の測定

ビーカー中にLIPCを一定量精秤して入れ、所定のpHとイオン強度に調製した蒸留水20ml入れ、30℃恒温水槽中で6時間十分に複合体を膨潤させる。この膨潤したときのLIPC重量( $W_w$ )と、先の乾燥重量( $W_D$ )とから(1)式を用いて重量膨潤度( $Q_w$ )を求めた

$$Q_w = \frac{W_w}{W_D} \quad (1)$$

### III 結果と考察

#### 1 電導度滴定

図1は、PVSKとDiSDACIの電導度滴定の結果である。PVSK濃度が異なるいずれの系においても、混合モル比1に屈折点が見られる。屈折点より前の電導度の傾きは、反応の進行にともなって系中に放出されるKCIの電導度寄与によるものであることが確かめられた。屈折点以後の電導度の傾きは、反応系中に過剰に導入されるDiSDACIの電導度寄与によるものであることも確かめられた。同様の結果は、ChnS-NaとDiSDACIの系でも見られた。

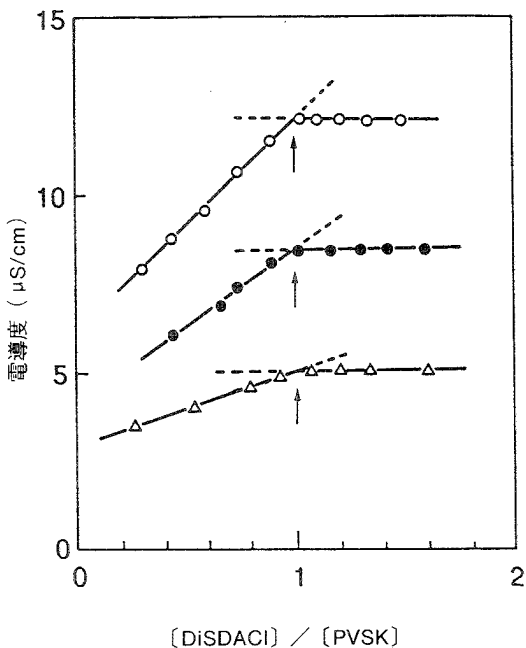


図1 DiSDACIとPVSKの電導度滴定

- ;  $7.5 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$
- ;  $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$
- △ ;  $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$

以上のことから、DiSDACIとポリアニオンとは、化学量論的なイオン反応を行うことが確かめられた。

#### 2 濁度滴定

DiSDACIとPVSKまたChnS-Naを混合すると、白色の沈澱物が生成した。この沈澱物(脂質固定化複合体、LIPC)の生成量と反応混合モル比との関係を調べた。

LIPCの生成量が最も多いと考えられる濁度最大点での混合モル比と、ChnS-Na濃度の関係を図2に示す。

ChnS-Na濃度が $4 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ 以上で $[\text{DiSDACI}] / [\text{ChnS-Na}] = 1$ の等モル混合時で反応系の濁度が最大となることがわかる。 $4 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ 以下の濃度でいくらか混合モル比が1より大きくなる傾向が見られるが、これは希薄濃度領域での微小な濁度変化の測定のために生じる誤差であると推測する。

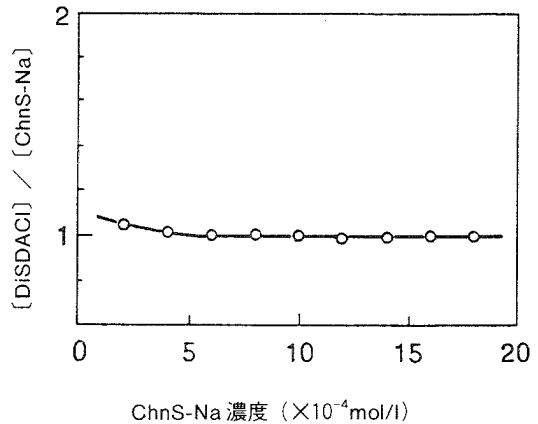


図2 ChnS-NaとDiSDACIの濁度滴定曲線

PVSKとDiSDACI混合系の濁度滴定の結果も図2と同様の傾向を示した。

以上のことから、DiSDACIとChnS-NaまたはPVSK間の複合体形成量は、両者の等モル混合時で最大になることが明らかになった。電導度滴定の結果と合わせて、脂質とポリアニオンのイオン反応の完結点と複合体形成量の最大点が、どちらも両者の等モル混合時で完結するという興味ある結果が得られた。

このことから、DiSDACIとポリアニオンを適当な混合モル比で混合し、複合体を形成させることにより、荷電バランスを自由にコントロールしたLIPCを調製することが可能になった。そこで本研究では、ポリアニオンの未反応のマイナス電荷を持つアニオン型、DiSDACIを過剰に保持しているカチオン型、DiSDACIとポリアニオンを等モル混合した等モル型の3種類のLIPCを調製した。

さらに、DiSDACIの混合モル比を変化させることで、LIPCの持つ親・疎水性バランスも自由にコントロールすることができ、今までにない新しい抗血栓性材料とし

での応用が考えられる。

### 3 BSAの吸着挙動

図3は、3種類の荷電バランスの異なる、PVSK系のLIPCに対するBSAの吸着量とpHの関係を示したものである。

BSAの等電点(約pH4.7)を境にして、酸性側ではアニオン型が、アルカリ側ではカチオン型が、それぞれ吸着量が急激に増加することがわかる。

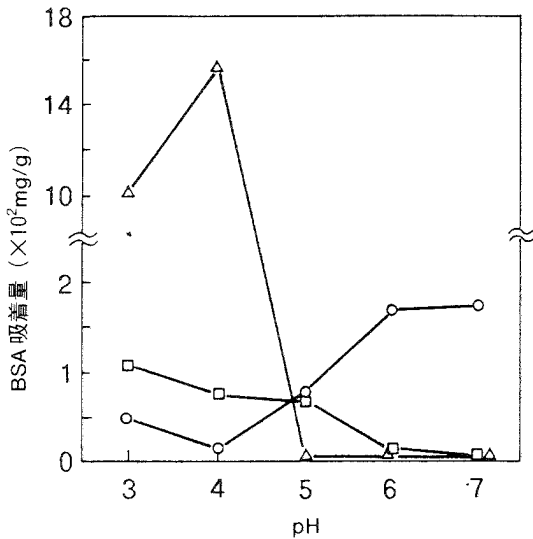


図3 PVSK系のBSA吸着量とpHの関係( $\mu=0$ )

○;カチオン型、□;等モル型、△;アニオン型

アニオン型の系のpH5以上で、BSAの吸着量がほとんどゼロになるのは、BSA分子の正味の電荷がこの領域でマイナスになるため、LIPC自身のマイナス電荷と反発することに起因するものと考えられる。pH5以下でBSA吸着量が増大するのは、この逆でBSA分子の正味の電荷がプラスとなるため、静電的引力によって吸着量が増すものと考えられる。

カチオン型の系でも、アニオン型の系と同様にpH5付近を境にして、アルカリ領域では静電的引力によってBSAとLIPCの吸着が生じ、酸性領域では静電的反発によって吸着量が減少する。しかしアニオン型のようにBSA吸着量がまったくゼロにはならない。カチオン型では、脂質を過剰に含むLIPCであるので、DiSDACIの疎水性部位にBSAが疎水性相互作用により吸着できる

ためと考えられる。

等モル型の系は他の系とは異なり、pHが大きくなるにしたがって、BSA吸着量がしだいに減少することがわかる。この系での吸着力は、主に疎水性相互作用であると考えられる。

図4は、ChnS-Na系のLIPCとBSA吸着量の関係を示したものである。図3のPVSK系と同様の傾向が、pH変化について見られる。ただし、BSA吸着量はPVSK系と比べて低く、1/2~1/4に減少する。

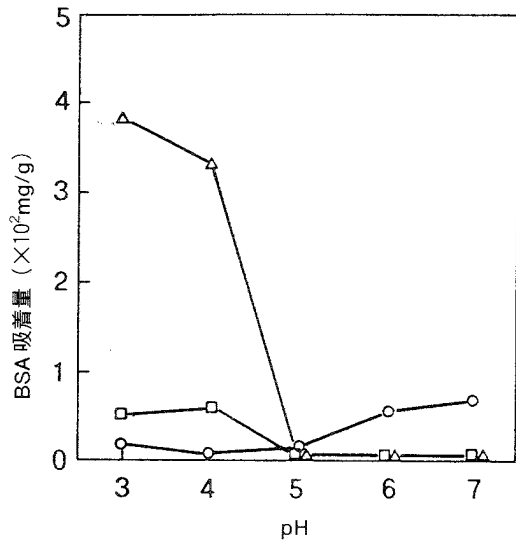


図4 ChnS-Na系のBSA吸着量とpHの関係( $\mu=0$ )

○;カチオン型、□;等モル型、△;アニオン型

形成されるLIPCは、イオン結合からなる親水性ドメインと、脂質の長鎖アルキル鎖からなる疎水性ドメインからなる、マイクロ相分離構造を持つものと推測される。

また、ポリアニオン分子鎖自身の親水性と疎水性のバランスも加わることで、ChnS-Naによって形成するLIPCは、PVSK系のLIPCよりも親水性に富むと考えられる。BSAは、一般に疎水性界面に良く吸着することが知られているので、ChnS-Na系の吸着量があるために低下したものと考えられる。

以上のことから、ChnS-Na系の方が、PVSK系より抗血栓性に優れたLIPCであることがわかった。

また、両系のアニオン型LIPCは、pH5以上のpHで良好な抗血栓性材料となりえることが示唆された。このことは、一般に弱アニオン性PECが抗血栓性に優れて

いることが報告されており<sup>9)~10)</sup>、この結果と良く一致する。

#### 4 イオン強度の影響

図5は、PVSK系アニオン型LIPCの、BAS吸着曲線に及ぼす、イオン強度の影響について示したものである。BSAとLIPC間で、静電的引力による吸着反応が起きていると考えられるpH5以下で、イオン強度( $\mu$ )が増加すると、急激にBSA吸着量は低下する。

図6は、PVSK系カチオン型LIPCのイオン強度の影響を示したものである。pH5以上の静電的引力による吸着反応の領域で、 $\mu$ の増加にともない吸着量が減少している。pH5以下の領域では、 $\mu$ の影響はほとんど見られない。

アニオン型での吸着量の減少は、 $\mu=0$ から $\mu=0.2$ の変化で $7\sim11\times10^2\text{mg/g}$ あるのに対し、カチオン型では同じ $\mu$ の変化で、最大約 $1.6\times10^2\text{mg/g}$ のごくわずかな変化しか示さない。またアニオン型は $\mu$ の増加で、吸着量が段階的に減少するのに対して、カチオン型では $\mu=0$ から $\mu=0.1$ の減少が急激で、 $\mu=0.1$ から $\mu=0.2$ の間の減少は、比較的小さいことなどが明らかになった。

図7は、PVSK系等モル型LIPCのBSA吸着曲線に及ぼす、イオン強度の影響について、示したものである。 $\mu$ が増加しても、誤差範囲内でほとんど吸着挙動に違いが見られない。このことから、この系のBSA分子の結合力は主に、疎水性相互作用によるものと考えられる。

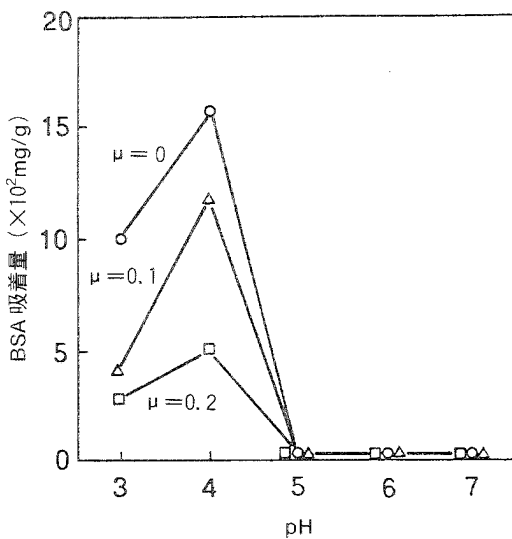


図5 PVSK系アニオン型LIPCのBSA吸着量に及ぼすイオン強度( $\mu$ )の影響

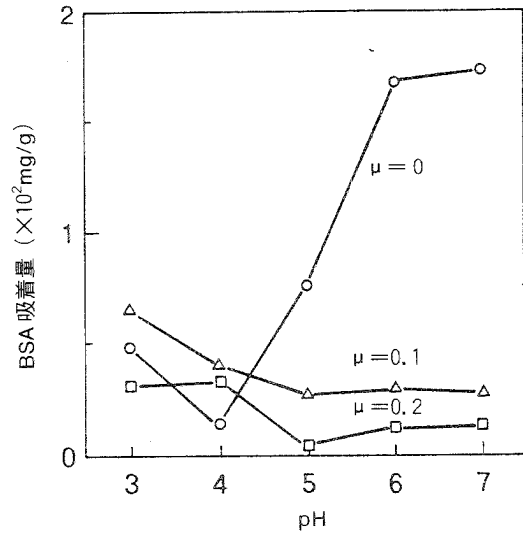


図6 PVSK系カチオン型LIPCのBSA吸着量に及ぼすイオン強度( $\mu$ )の影響

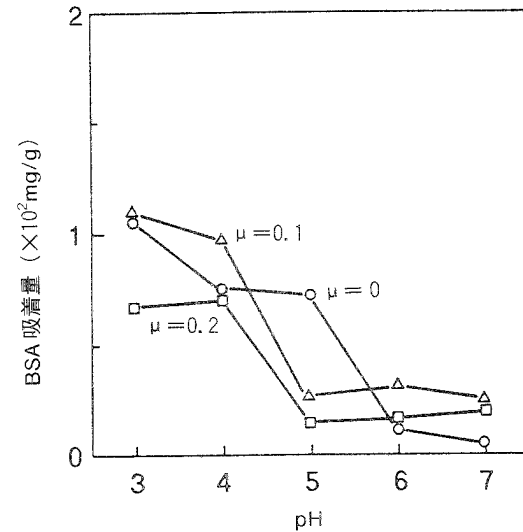


図7 PVSK系等モル型LIPCのBSA吸着量に及ぼすイオン強度( $\mu$ )の影響

図8、9は、ChnS-Na系のアニオン型、カチオン型LIPCのBSA吸着曲線に及ぼす、イオン強度の影響について示したものである。どの図も、PVSK系と良く似た傾向を示している。

PVSK系と比べて、ChnS-Naのアニオン型では、 $\mu$ の増加に伴う吸着量の減少が、最大 $1.1\times10^2\text{mg/g}$ とわずかなである。カチオン型では、最大 $0.61\times10^2\text{mg/g}$ とPVSK系と比べて、やはり吸着量の減少はわずかなであるが、その減少率はPVSK系とほとんど同じ程度を示す。

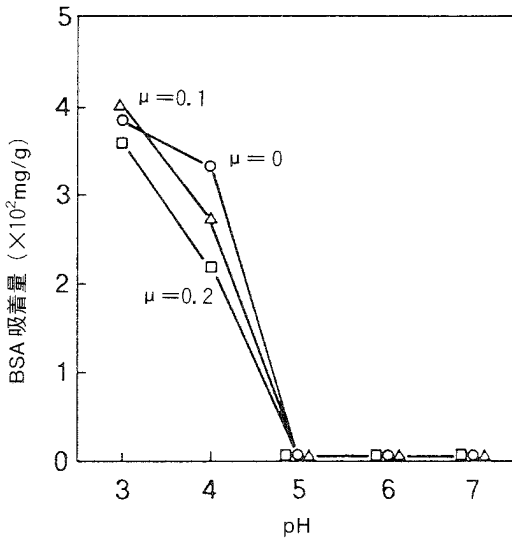


図8 ChnS-Na系アニオン型LIPCのBSA吸着量に及ぼすイオン強度( $\mu$ )の影響

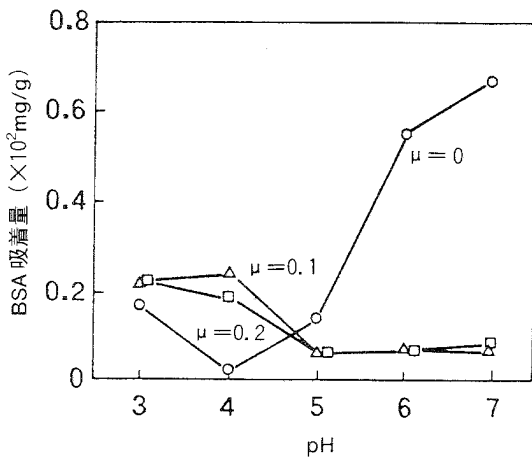


図9 ChnS-Na系カチオン型LIPCのBSA吸着量に及ぼすイオン強度( $\mu$ )の影響

以上のように、 $\mu$ の増加で、BSAの吸着量が減少することから、この範囲の吸着は、静電的相互作用による吸着反応が主であると考えられる。

ただし、BSA分子は1価の陽イオンはほとんど結合しないが、陰イオンはたとえ1価であっても結合する<sup>11)</sup>。 $\mu$ をかけるために添加したNaClの $\text{Cl}^-$ はBSAにかなり結合して、 $\mu$ の増加とともにBSA分子の実効電荷は、マイナスにかたよるものと推測される。このことから考えると、アニオン型で見られた段階的BSA吸着量の減

少は、静電的引力の遮蔽とともに、BSA分子の実効電荷のマイナスへのシフトの影響も受けている可能性が考えられる。

### 5 LIPCの膨潤度

図10は、PVSK系、ChnS-Na系のLIPCの膨潤度とpHの関係を示したものである。PVSK系と、ChnS-Na系の各荷電バランス間で比較すると、どれも良く似た傾向を示していることがわかる。また、この膨潤度とpHの関係は、先のBSA吸着量とpHの関係と非常に良くその傾向が一致している。

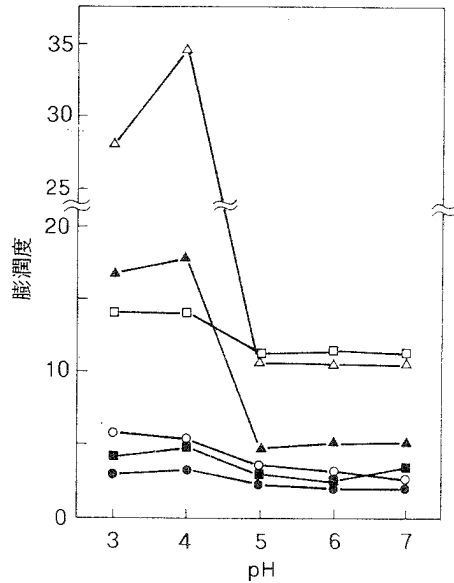


図10 各種LIPCの膨潤度とpHの関係( $\mu=0.1$ )  
PVSK系  $\Delta$ ; アニオン型、 $\square$ ; 等モル型、 $\circ$ ; カチオン型  
ChnS-Na系  $\blacktriangle$ ; アニオン型、 $\blacksquare$ ; 等モル型、 $\bullet$ ; カチオン型

図11は、PVSK系の等モル型について、 $\mu=0.1, 0.2$ の系のpHとBSA吸着量、および膨潤度の関係についてまとめて示したものである。この図から、LIPCの膨潤度のpH依存性と、BSA吸着量のpH依存性は、各系について非常に良く似た傾向を示すことが明らかである。

膨潤度の測定結果から、LIPCとBSAの吸着挙動は、静電的相互作用、疎水性相互作用の他に、LIPC自身の膨潤度の寄与も大きいことが明らかになった。膨潤度が大きいLIPCほどBSAを多く吸着することから、抗血栓性材料には、膨潤度の小さなLIPCが優れていることがわかった。

また、イオン強度の増加は、LIPCの膨潤度を下げることで、またPVSK系のほうがChnS-Na系より膨潤度の

pH、および  $\mu$  の依存性が大きいことなども明らかになった。

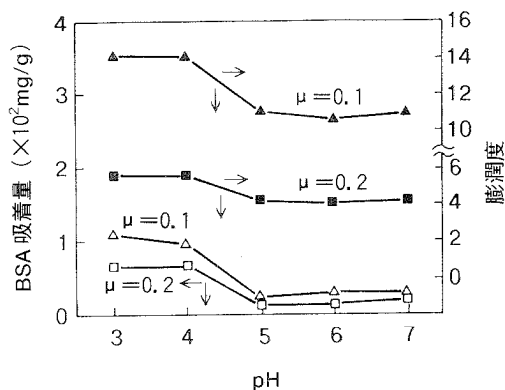


図11 PVSK系等モル型LIPCのBSA吸着量と膨潤度の比較

#### IV 結論

脂質と高分子電解質からなるLIPCの形成反応についての検討と、荷電バランスの異なるLIPCに対するBSAの吸着挙動の検討結果から、抗血栓性材料としての評価を行なった結果、以下のことが明らかになった。

- (1) 脂質とポリアニオンとは、化学量論的なイオン反応を行ない、イオン反応の完結点と、複合体生成量の最大点とが一致することが明らかになった。
- (2) (1)の結果から、荷電バランスと、親・疎水性バランスを自由に変えたLIPCが調製できた。
- (3) LIPCとBSAの吸着力は、主に静電的相互作用、疎水性相互作用であり、その吸着量は、荷電バランスとpHの影響を受けた。
- (4) ChnS-Na系のLIPCは、PVSK系のものと比べて、BSAの吸着量が少なかった。
- (5) アニオン型のLIPCは、pH 5以上で良好な抗血栓性材料となる可能性が示唆された。
- (6) イオン強度の増大は、BSA吸着量を効果的に減少させた。
- (7) LIPCとBSAの吸着に、LIPCの膨潤度の影響が大きく寄与していた。

以上のことから、親水性に富み、膨潤度の小さなLIPCが抗血栓性材料として優れた特性を持つことが明らかになった。また、LIPCがアニオン性荷電を持つことも良好な抗血栓性を示すことなどが示唆された。

#### 付記

本研究の一部は、平成元年度(1989年度)雇用促進事業団指定研究費で行った。

(1990年4月、日本化学会第59春季年会にて一部発表)

#### 参考文献

- 1) 医用高分子材料編集委員会編、「医用高分子材料」学会出版センター(1981)
- 2) Y. Ikada, T. Mita, F. Horii, I. Sakurada, M. Hatada, *Radiat. Phys. Chem.*, **9**(5), 633(1977)
- 3) Y. Ikada, K. Maejima, H. Iwata, *Makromol. Chem.*, **179**, 865(1978)
- 4) 石原一彦、小島政芳、中村宣男、*化学工業*, **41**(4), 330(1990)
- 5) E. A. Bekturov, *et al.*, *Adv. Polym. Sci.*, **41**, 99(1981)
- 6) E. Tuchida, *et al.*, *ibid.*, **45**, 1(1982)
- 7) 高分子錯体研究会編、「高分子集合体」, 学会出版センター(1985)
- 8) 阿部康次, *高分子*, **36**(11), 794, (1987)
- 9) H. J. Bixler, *et al.*, *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A4**, 675(1970)
- 10) B. K. Bhattachaya, *et al.*, *Makromol. Chem.*, **179**, 1121(1978)
- 11) G. Scatchard, E. S. Black, *J. Phys. Colloid Chem.*, **53**, 88(1949)