

# 生体膜構造をもつ高分子中の水の構造解析と生体反応の 解明に関する研究

東京医科歯科大学 医用器材研究所

石原 一彦

The amount of plasma proteins adsorbed on a phospholipid polymer having a 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) moiety was reduced compared to poly [2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)], poly [n-butyl methacrylate (BMA)], and BMA copolymers with acrylamide (AAm) or N-vinyl pyrrolidone (VPy) moieties having a hydrophilic fraction. To clarify the reason for the reduced protein adsorption on the MPC polymer, the water structure in the hydrated polymer was examined with attention to the free water fraction. Hydration of the polymers occurred when they were immersed in water. The differential scanning calorimetric analysis of these hydrated polymers revealed that the free water fractions in the poly (MPC-co-BMA) and poly (MPC-co-n-dodecyl methacrylate (DMA)) with a 0.30 MPC mole fraction were above 0.70. On the other hand, the free water fractions in the poly (HEMA), poly (AAm-co-BMA) and poly (VPy-co-BMA) were below 0.42. The conformational change in proteins adsorbed on the MPC polymers and poly (HEMA) was determined using ultraviolet and circular dichroism spectroscopic measurements. Proteins adsorbed on poly (HEMA) changed considerably but those on poly (MPC-co-BMA) with a 0.30 MPC mole fraction were almost the same as in the native state. We concluded from these results that little proteins are adsorbed and do not change their original conformation on the polymer surfaces which possess a high free water fraction.

## 1 緒言

本研究では生体膜類似表面を持つポリマー材料を用いて、その周囲に存在する水の構造を解析するとともに、タンパク質の吸着、活性化あるいは構造変化の過程を詳細に追跡することにより、生体分子と材料との反応を理解することを目的としている。

生体膜はリン脂質、糖質及び細胞に情報を与えているタンパク質で構成されている非共有結合性の分子集合体であり、この構造維持には周囲に存在する水の状態が極めて重要な役割を果たしている。生体膜の表面は細胞の機能発現、制御を中心とした反応場となっており、この特異的な生体反応も水を媒体として進行していることは言うまでもない。すなわち、生体を取り巻く環境において

水の動態や構造を解析することは、生体反応さらには生体そのものを理解する上で有効な手段である。一方、生体を対象とした場合における系の複雑さがこれらの研究の大きな障害となっていることも事実である。ここでは単純な生体膜のモデルとして、細胞表面に多いホスファチジルコリンを極性基として有する両親媒性の合成高分子を用い、その膜内及び近傍の水の状態とタンパク質の機能、構造変化との相関を見いだす。

医用デバイスを生体内あるいは生体と接触させて使用する場合、血栓形成や炎症反応などデバイスが生体に与える影響はもとより、生体がデバイスに与える影響についても十分に考慮しなければならない。タンパク質は生体内において情報伝達及び生理活性物質の産生や運搬など生命の維持に欠かせない重要な役割を担っているが、一方、医用デバイスを使用する際には、タンパク質の吸着により大きな問題が発生することが多い。たとえば、タンパク質の不可逆的な吸着はクロマトグラフィーカラムやコンタクトレンズにおける汚れの原因となり、また血液透析膜や血液ろ過膜などでは本来の膜透過性が著しく低減し、物質交換など



Studies on water state in polymer with biomembrane-like structure and bioreactions on the polymer

Kazuhiko Ishihara

Institute for Medical and Dental Engineering  
Tokyo Medical and Dental University

の機能が十分に発揮されなくなる。さらに、細胞の活性化や好ましくない免疫反応を誘起し、たちまちデバイスが異物認識を受けることになる。

従来の医用デバイス材料が血液や血漿と接触すると必ずタンパク質の吸着が生じる。タンパク質分子はアミノ酸の重合体であり、分子内でのアミノ酸残基の相互作用により血液や緩衝溶液など水を溶媒とした系では一定のコンホメーションを維持しているが、界面活性剤や変性剤の添加によりそのコンホメーションが変化することが知られている。また、油-水界面に吸着（接触）した場合においても、著しいコンホメーション変化を起こす。前者はタンパク質分子内の水素結合の破壊、後者はタンパク質分子内の疎水性アミノ酸残基に起因する疎水性相互作用のバランスの変化に対応する。すなわち、タンパク質分子を取り巻く環境が僅かに変化するだけで、微妙な分子間力のバランスで規定されているコンホメーションの変化が生じるのである。このコンホメーション変化が不可逆的な材料表面へのタンパク質吸着という現象につながる。したがって、本質的にタンパク質との相互作用の弱く、吸着させない材料により医用デバイスを作成するか、表面をこのような材料で修飾したデバイスを用いなければならない。

研究代表者らは、新しい血液適合性高分子として生体膜表面に着目し、リン脂質構造を有するポリマーを合成した<sup>1)</sup>。このポリマーの血液適合性を細胞及びタンパク質、脂質などの生体分子レベルで解析していくと、優れたタンパク質吸着抑制効果を見いだした<sup>2)</sup>。

## 2 実験

### 2.1 試薬の調製

MPCは研究代表者が確立した方法により合成し、アセト

ニトリルより再結晶して用いた<sup>1)</sup>。n-ブチルメタクリレート (BMA)、n-ドデシルメタクリレート (DMA)、N-ビニルピロリドン (VPy) 及び2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) は市販試薬を減圧蒸留により精製して用いた。アクリルアミド (AAm) は市販品をベンゼンより再結晶して用いた。2,2'-アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) はメタノールより再結晶して用いた。タンパク質類は市販品をそのまま用いた。その他の溶媒は常法により生成し用いた。

### 2.2 ポリマーの合成

MPCとBMAとの共重合体 (PMB) は対応するモノマーをエタノール中AIBNを開始剤とし60°Cで反応することにより得た。反応液を大量のジエチルエーテル中に滴下してポリマーを再沈澱精製した。MPCとDMAの共重合体 (PMD)、AAm (PAB) あるいはVPy (PVB) とBMAの共重合体も同様な方法で合成した。またHEMAを2-プロパノール中で単独重合した (Poly (HEMA))。共重合体中のモノマーユニット組成は元素分析により求めた。ポリマーの構造を図1に、合成結果を表1に示す。

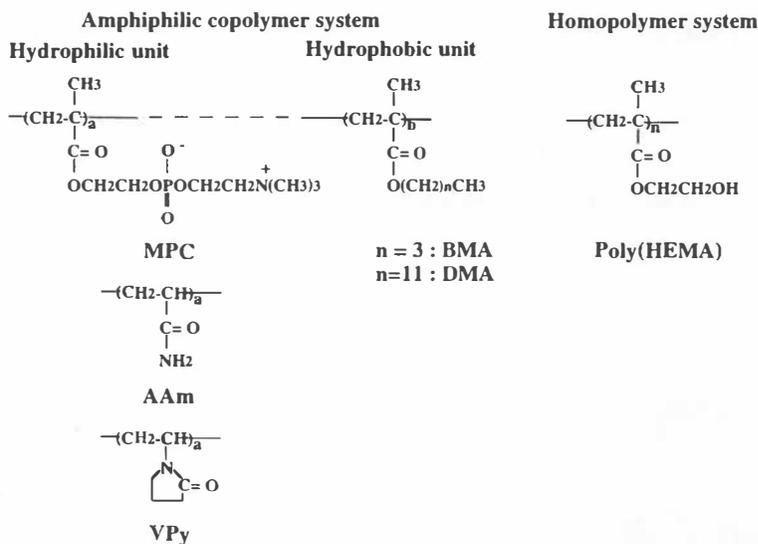


図1 Structure of amphiphilic polymers.

表 1 Synthetic results of polymers used in this study

Code	Hydrophilic monomer	Hydrophobic monomer	Mole fraction of hydrophilic unit		Time <sup>a)</sup> (h)	Conversion <sup>b)</sup> (%)	M <sub>w</sub> <sup>c)</sup> 10 <sup>5</sup>
			in feed	in polymer			
PMB10	MPC	BMA	0.10	0.07	10	40.1	1.3
PMB30	MPC	BMA	0.30	0.28	10	52.6	2.1
PMD10	MPC	DMA	0.10	0.12	6	41.1	2.0
PMD30	MPC	DMA	0.30	0.31	6	51.7	3.1
PAB70	AAm	BMA	0.70	0.58	4	30.7	1.8
PVB90	VPy	BMA	0.90	0.81	7	22.9	1.1
Poly(HEMA)	HEMA		1.0	1.0	2	18.7	4.2

a) [Monomer] = 1.0 M, [AIBN] = 5 mM at 60 °C.

b) Polymerization was carried out in ethanol for PMB10, PMB30 and PMD30, in chloroform/ethanol(3/7) for PMD10, in DMF for PAB70 and PVB90, and in 2-propanol for poly(HEMA).

c) Determined by gel permeation chromatography with polyoxyethylene standard for the MPC polymers, with polystyrene standards for PAB70, PVB90 and poly(HEMA).

### 2.3 ポリマー膜の調製と含水膜中の水の解析

ポリマーを溶媒に溶解して10wt%溶液を調製した。これをポリエチレン板上に流延し、溶媒を蒸発させてポリマー膜を調製した。得られたポリマー膜を一定重量秤量(乾燥重量)し、25°Cにて純水中に浸漬した。膜を取りだし表面の水分を軽く濾紙で拭い直ちに重量(膨潤重量)を測定した。含水率を重量増加を膨潤重量で除することにより算出した。

平衡膨潤に達した膜を一定重量熱分析用のアルミニウム容器に入れ、示差走査熱量計(DSC、セイコー電子、DSC-100)にて-50°Cより50°Cまでの範囲で冷却速度2.5°C/分にて熱量の変化を測定した。0°C付近の熱量変化を純水の値と比較して自由水の分率を求めた。さらに、ポリマー膜の含水率を0.36に一定とし、同様の測定を行った。

### 2.4 タンパク質吸着量の測定と吸着したタンパク質の二次構造の解析

タンパク質として牛血清アルブミン(BSA)及び

牛血漿フィブリノーゲン(BPF)を用いた。これらをリン酸緩衝液(PBS、pH7.4)に溶解して生体濃度の1/10の溶液を調製した。

図2にタンパク質の吸着量と吸着したタンパク質の構造を解析する、紫外(UV)一円偏光二色性(CD)スペクトル法の測定手順を示す。ポリマーを石英板にスピコートした。これをタンパク質溶液に浸漬し、37°Cにて60分間放置した後、PBSでリンスした。直ちに350nmから205nmの範囲でCDスペクトル測定(日本分光、J-720W)を行った。測定は5回繰り返した。その後、石英板をUV分光計(日本分光、V-560)にセットし280nmの吸光度を測定した。

平均分子楕円率はCDスペクトル及びUVスペクトル測定の結果より算出し、タンパク質の二次構造の尺度となる $\alpha$ -ヘリックス含量はポリ(L-リジン)の値を参考にして計算した。

## 3 結果

表2にポリマー膜の含水率を示す。MPCポリマーの場合、MPCユニットの増加にともない含

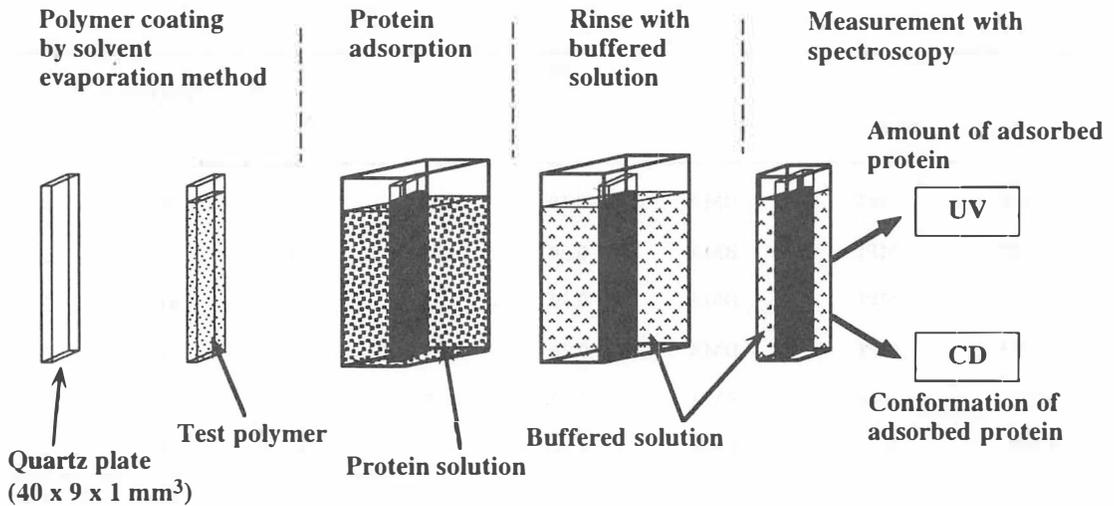


図2 Procedure for measurement of amount and conformation of protein adsorbed on polymer surface by UV-CD method.

表2 Characteristics of hydration state of polymers and protein adsorption on polymer surfaces.

	Poly(HEMA)	PMB		PMD		PAB70	PVB90
		10	30	10	30		
Heq <sup>a)</sup>	0.40 (0.39) <sup>c)</sup>	0.23	0.84	0.19	0.70	0.36	0.41
Free water fraction							
at Heq	0.34 (0.34) <sup>c)</sup>	0.25	0.84	0.22	0.70	0.42	0.39
at H = 0.36	0.28	—	0.69	—	0.62	0.42	0.31
Equilibrium amount of adsorbed protein ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) <sup>b)</sup>							
BSA	1.7 ± 0.7	0.50 ± 0.2*	0.22 ± 0.1**	0.51 ± 0.2*	0.35 ± 0.1**	1.3 ± 0.2**	1.8 ± 0.3**
BPF	3.4 ± 0.1	2.0 ± 0.5*	1.1 ± 0.2**	2.0 ± 0.4*	1.2 ± 0.3**	2.3 ± 0.4*	2.6 ± 0.3*

a) Heq = (weight of water in the polymer membrane) / (weight of polymer membrane saturated with water) at 25 °C.

b) Initial concentration of proteins in PBS : [BSA] = 0.45 g / dL, [BPF] = 0.03 g / dL.

c) The values in literature (ref. 34).

The values indicated here are mean ± S.D. for three experiments. \*p<0.01 vs poly((HEMA), \*\*p<0.01 vs PMB10.

水率が増加することがわかる。また、AAmやVPyユニットと比較してMPCユニットの親水性が大きいことが確認できた。

図3に含水したポリマー膜のDSC曲線を示す。0 °C付近に氷の融解に起因するピークが見られる。PABやPVBでは-20°Cから-40°Cの範囲にブロードな発熱ピークが認められる。一方、MPCポリマーでは0 °C付近の発熱ピークがシャープで

あった。このピーク面積よりポリマー膜中の水の融解に起因する熱量を求め、純水の値と比較して、膜に含まれる自由水含率を求めた。結果を表2に示す。MPCポリマーの自由水含率は他のポリマーに比較して大きいことが明らかとなった。タンパク質の吸着量に関して結果を表2に示す。MPCポリマーではPoly(HEMA)に比較してタンパク質の吸着量が少ない。MPCユニットが多

くなると吸着量の低下が見られた。

図4にPBS中でのBSA及びポリマー表面に吸着したBSAのCDスペクトルを示す。PBS中に溶解しているBSAでは222nmに大きな負の分子楕円率が観察される。PMB30に吸着しているBSAでもほぼ同じCDスペクトルが見られた。MPCポリマーにおいてMPCユニット組成が小さくなると222nmの負の楕円率が0に近くなり、さらにPoly(HEMA)ではこの傾向が顕著になった。

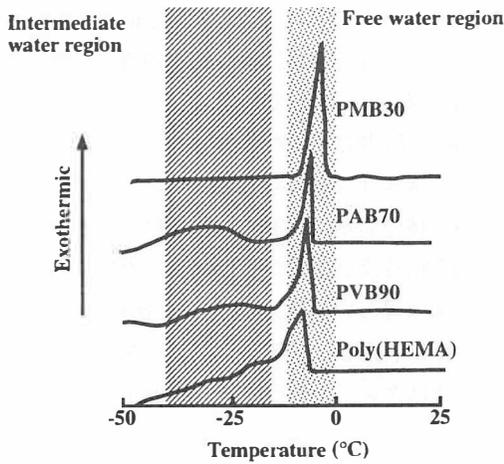


図3 DSC curves of hydrated polymer.

図5にタンパク質の二次構造の変化について $\alpha$ -ヘリックス含量に着目してポリマー間で比較した。PBS中のBSA及びBPFの $\alpha$ -ヘリックス含量はそれぞれ54%と19%であった。PMB30に吸着したBSA及びBPFの $\alpha$ -ヘリックス含量はPBS中でのそれぞれの値と有意差がない。一方、Poly(HEMA)では有意に低値を示した。このことは大きな構造変化が生じていることを示している。

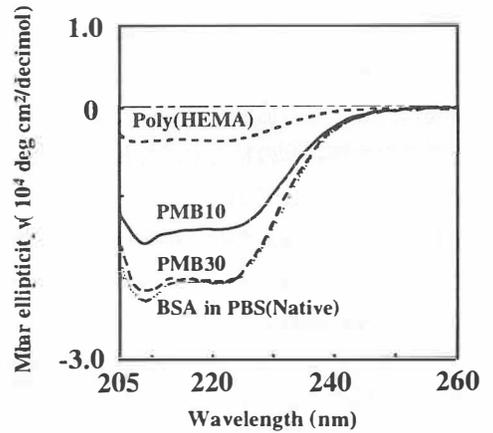


図4 CD spectra of BSA adsorbed on polymer surface and in PBS.

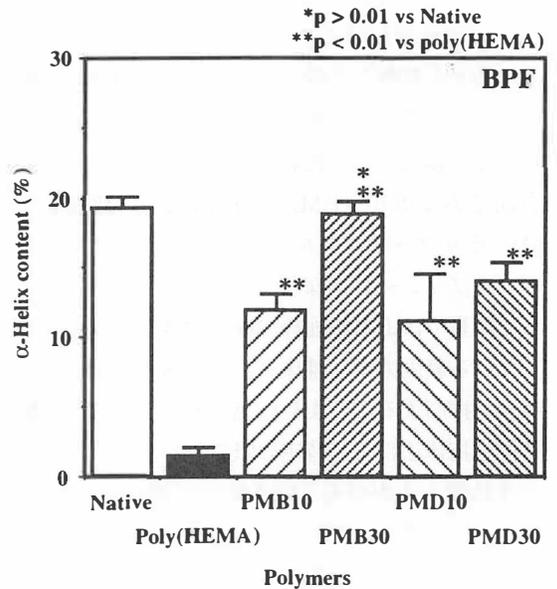
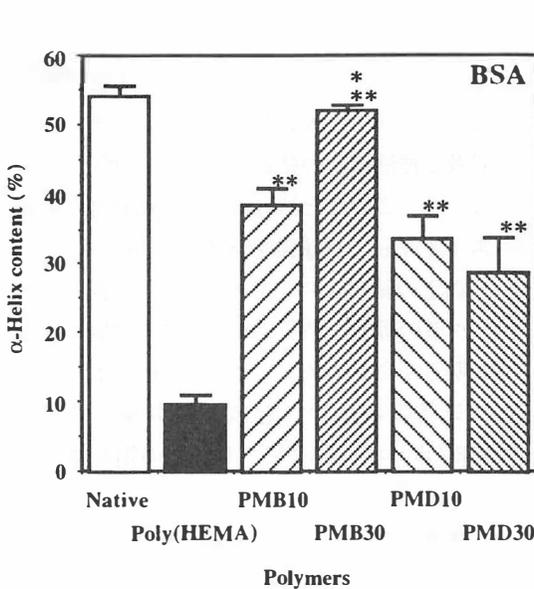


図5  $\alpha$ -Helix content of BSA and BPF adsorbed on polymer surface and in PBS. \*represents no significant difference versus the value for protein in PBS (Native) ( $p > 0.01$ ) and \*\*represents significant difference versus poly(HEMA) case ( $p < 0.01$ ).

## 4 考 察

血液適合性の表面として理想的で、模範となるものは血管内皮表面と考えられる。正常な血管内皮上では、細胞はもとよりタンパク質の吸着、活性化は生起しない。この構造を人工材料の表面に構築できれば、新しい血液適合性材料として期待できる。研究代表者は、このような観点から、リン脂質極性基をもつMPCと疎水性のメタクリル酸エステルあるいはスチレンとの共重合体を合成した<sup>1)</sup>。このMPCポリマーは溶媒に可溶であるために、従来の医用デバイス表面に被覆することが容易にでき、また血液と接触した場合においても表面での血液細胞の粘着や活性化を効果的に阻止することが見いだされている<sup>3, 4)</sup>。

材料が血液と接触した際に細胞成分が材料と相互作用する前に脂質やタンパク質のような生体分子成分が表面に吸着し、この吸着層を介して血栓形成へと進行する。したがって、血液適合性材料を設計する場合において、なるべく血液に近い状態からの生体分子成分と材料との相互作用について検討することが重要となる。

これまでにMPCポリマーへのタンパク質吸着について検討してきている<sup>2)</sup>。MPCポリマーがヒト血漿と接触した際のタンパク質吸着量及び吸着タンパク質の種類をラジオイムノアッセイ法で解析した結果、親水性表面であるガラスや疎水性表面であるポリ(BMA)(PBMA)に比較してMPCポリマーではアルブミン、 $\gamma$ -グロブリン及びフィブリノーゲンなどの主要タンパク質のみならず微量ではあるが血栓形成に重要な役割を果たしている凝固因子、補体系、細胞接着因子などの吸着も抑制することを見い出した。金コロイド粒子標識抗体法により特定の吸着タンパク質の吸着分布状態を走査型電子顕微鏡にて調べた。MPCポリマー上ではいずれのタンパク質の吸着も少なく、吸着している場合でもまばらであることが認められた。これに対してガラスやPBMAでは多くのタンパク質が吸着し、さらに一部が凝集して

いる様子が見られた。

以上の結果はMPCポリマーとタンパク質との相互作用が極めて弱いことを強く表わしている。

細胞成分の粘着、活性化及び凝集はタンパク質吸着層を介して細胞が材料の情報を得ることが引き金となって生じる。MPCポリマー表面ではタンパク質吸着を効果的に減少させることができるために細胞粘着や活性化を抑制したものと考えられる。

一般に表面自由エネルギーの低いまたは界面自由エネルギー差の小さい材料表面では生体適合性、抗血栓性あるいはタンパク質吸着抑制効果が発現するといわれている。そこで親水性基をAAm、VPy及び2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸(AMPS)ユニットとしたBMA共重合体を合成し、Poly(HEMA)も含めて血液細胞の粘着及び血漿からのタンパク質吸着を含水率がほぼ等しいMPCポリマーと比較検討した<sup>5)</sup>。その結果、AAmやVPyユニットを親水性基とした場合はタンパク質の吸着及び血小板の粘着、活性化も著しく起こることがわかった。AMPS共重合体はヘパリン様のスルホン酸基があり負電荷表面であることから、良好な血液適合性の発現が期待されたが、血液細胞の粘着はある程度抑制するものの、タンパク質の吸着が多いことが明らかとなった。一方、MPCポリマーではタンパク質吸着及び血液細胞の粘着のいずれも効果的に抑制していた。このことは材料の血液適合性が表面自由エネルギーでは議論できない事例である。

以上の結果より、MPCポリマー表面ではタンパク質の吸着、積層化が効果的に抑制されることが明らかにされた。これはMPCのホスホリルコリン基の親水性に起因する効果と考えられ、MPCポリマーとタンパク質との相互作用が弱いことを示している。

水溶性ポリマー濃厚水溶液中の水の状態をポリマー鎖に強く水和した結合水、バルク中の水と同じ自由水及びそれらの中間水(弱くポリマー鎖に相互作用している状態)に分けてDSCにより解

析してみたところ、同じ含水率の溶液でもポリマーの種類によりこれらの分率が大きく異なることが見いだされた。その結果、MPCポリマーでは他の親水性ポリマーに比較して自由水含率が極め高いことがわかった。タンパク質の吸着はタンパク質の持つ結合水と材料表面の結合水の交換反応(共有化反応)を伴う、いわゆる疎水性相互作用が重要な役割を果たしていると考えられているが、材料側に結合水がないまたは少ない場合には交換する水分子が存在しないことにより、タンパク質分子はあたかも水溶液中に留まっているかのような挙動をとる。すなわち、表面への吸着が起こり難いものと考えられる。従来、MPCポリマーのように親水性にもかかわらず結合水を持たないポリマーは全く知られておらず、MPCポリマーの特異性が示された。

## 5 結 論

生体膜表面を模倣して合成したMPCポリマーは、タンパク質との相互作用が極めて弱く、例えタンパク質と接触している場合でもタンパク質の構造変化を引き起こさない性質を持つことがわかった。これがMPCポリマーの生体適合性(生体に優しい)の要因であると考えられる。MPCポリマーのタンパク質吸着、構造変化抑制効果には水の構造が天然の状態いわゆる自由水が多いためであると結論できる。

細胞膜(生体膜)表面で生物は生命維持のための反応を行う場合が多い。この時に非特異的な反応が起こると生命維持が危うくなる。すなわち、細胞膜を構成するマトリックスであるリン脂質極

性基が集合し、高度に配向している表面では生体反応を完全に抑えることができる可能性が示唆された。この知見は今後の人工臓器、医療デバイスあるいはバイオサイエンス(タンパク質工学、遺伝子工学、脳の機能解明など)用のデバイスを製作する材料を作る分子設計概念として重要となるであろう。

## 文 献

- 1) Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N, : Preparation of phospholipid polymers and their properties as hydrogel membrane, *Polym.J.*, 22, 355-360 (1990).
- 2) Ishihara K, Ziats NP, Anderson JM, et al., : Protein adsorption from human plasma is reduced on phospholipid polymer. *J.Biomed.Mater.Res.*, 25, 1397-1407 (1991).
- 3) Ishihara K, Oshida H, Ueda T, et al., : Hemocompatibility of human whole blood on polymers with a phospholipid polar group and its mechanism, *J.Biomed.Mater.Res.*, 26, 1543-1552 (1992).
- 4) Ishihara K, Hanyuda H, Nakabayashi N, : Synthesis of phospholipid polymers having a urethane bond in the side chain as coating material on segmented polyurethane and their platelet adhesion-resistant properties, *Biomaterials*, 16, 873-879 (1995).
- 5) 上田智子, 石原一彦, 中林宣男, : リン脂質極性基を親水性基として有する高分子の血液適合性, *高分子論文集*, 48, 289-294 (1991).