

含フッ素ポリイミド膜が有するタンパク質 吸着抑制メカニズムの検討

川上 浩良、○神宮 啓介、長岡 昭二

東京都立大学 工学部

〒192-0364 八王子市南大沢1-1

E-mail: kawakami-hiroyoshi@c.metro-u.ac.jp

【概要】

血漿タンパク質、血小板の粘着を抑制し、良好な血液適合性を示す含フッ素芳香族ポリイミド(PI)膜のタンパク質吸着特性をポリスチレン(PSt)膜と比較して *in vitro* 評価した。生理的な条件下において、PI膜はPSt膜に比べ、アルブミン(BSA)、フィブリノーゲン(Fbg)吸着量を1/2以下に抑制することが明らかとなった。さらに溶液pHが変化した時のPI膜表面へのタンパク質吸着性を評価した。PSt膜へのBSA、Fbg吸着はいずれも等電点で極大値を示した。一方、PI膜の場合には等電点より酸性側で極大値を示した。このことからPI膜がタンパク質の吸着を抑制したのは主に膜表面の帯電密度に起因すると考えられる。純水中におけるPI膜のゼータ電位値はPSt膜に比べ大きな負の値を示し、PI膜表面は強く負に帯電していることが明らかとなった。以上の結果からPSt膜に比べPI膜がタンパク質の吸着を抑制したのは、PI膜とタンパク質との強い静電的な相互作用によるものと思われる。

キーワード: 含フッ素芳香族ポリイミド, 血液適合性, 血漿タンパク質, 静電的相互作用, ゼータ電位.

【緒言】

人工材料に高分子が用いられる場合には生体成分との相互作用が重要である。特に初期過程におけるタンパク質吸着は後の血栓形成に重要な役割を果たすため、材料表面と血漿タンパク質との相互作用の解明は血液適合性材料の開発において重要である。著者らは官能基としてフッ素基を導入することで膜表面を疎水性にし、また分子内・分子間で電荷移動(CT)錯体を形成させることで、表面の電荷密度・分布の制御が可能な新しい含フッ素芳香族ポリイミド(PI)を合成してきた。その結果、PI膜は血漿タンパク質、血小板の粘着を抑制し、良好な血液適合性を示すことが明らかとなった。^{1) 3)}しかしPI膜が有する血液適合性、すなわち血漿タンパク質吸着抑制のメカニズムは十分に解明されていない。PIの表面と血漿タンパク質との相互作用を明らかにすることは新しい血液適合性材料を設計する上で重要である。

本研究では分子内・分子間でCT錯体を形成することから、特異な表面電荷分布を持つと考えられる、PI膜の血漿タンパク質吸着の特性を *in vitro* で評価した。さらにPI膜の表面特性を評価し、血漿タンパク質吸着との関連を検討した。

【実験】

試料は溶媒キャスト法によって製膜した含フッ素芳香族ポリイミド(PI)膜(Figure 1)と、比較材料に代表的な疎水性材料のポリスチレン(PSt)膜とした。タンパク質溶液はリン酸緩衝液(PBS:

1/15M pH7.4)に溶解させた、ウシアルブミン(BSA: 1.0mg/ml)、ウシフィブリノーゲン(Fbg: 0.1 mg/ml)、ウシγ-グロブリン(γ-Ig: 0.3mg/ml)溶液(生理的条件の約1/40の濃度)とした。

吸着タンパク質の定量はマイクロビシコニン酸(Micro BCA)法により行なった。タンパク質溶液中で2時間、36.5℃でインキュベート後に試料膜を乾燥させ、界面活性剤溶液で吸着成分を脱着させた。溶液に Micro BCA試薬を加えた後、UV測定による吸光度から定量をおこなった。さらに微量のHClとNaOH水溶液でpH4.0, 4.5, 4.7.

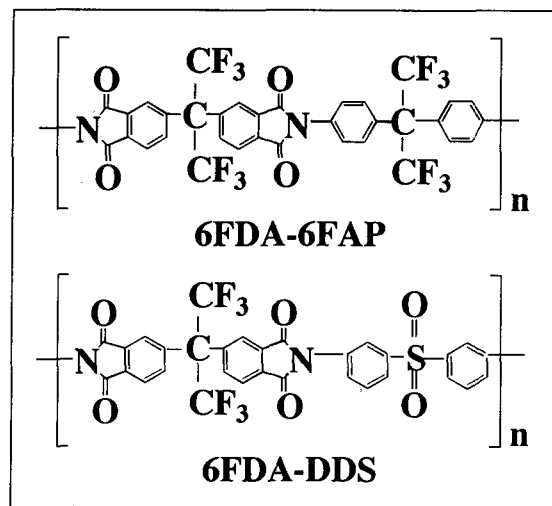


Figure 1 Structure of fluorinated polyimides

4.85, 5.0, 6.0のBSA溶液を、またpH4.5, 5.0, 5.25, 5.5, 5.75, 6.0のFbg溶液を調製し、同様に吸着タンパク質の定量をおこなった。イオン強度はNaClで0.15になるように調節した。

試料膜の電荷状態に関する知見を得るためにゼータ電位測定を行った。試料膜はPI膜とPSt膜とした。膜は十分に超音波で洗浄し、その後蒸留水で洗浄して乾燥させた膜を非対称電気泳動法でゼータ電位(純水中)を測定した。測定温度は25℃とした。

【結果】

Micro BCA法によるPI膜、PSt膜表面に吸着したタンパク質量をFigure 2 に示す。PI膜はBSAやFbgの吸着をPSt膜に比べ1/2以下に抑制することが明らかとなった。一方でPI膜への γ -Igの吸着はPSt膜に比べ、約20%の吸着抑制にとどまった。

BSA、Fbg吸着のpH依存性結果を Figure 3 に示す。PSt膜はBSAの等電点(pH 4.7)で最大吸着量を示すのに対し、PI膜表面へは若干酸性側のpH 4.5のとき最大吸着量を示した。またFbgにおいても同様に酸性側へのシフトが見られた。Tableに純水中におけるPI膜とPSt膜のゼータ電位値を示す。PI膜表面のゼータ電位値は、PSt膜に比べはるかに低い値を示し、PI膜表面は強く負に帯電していることが明らかとなった。

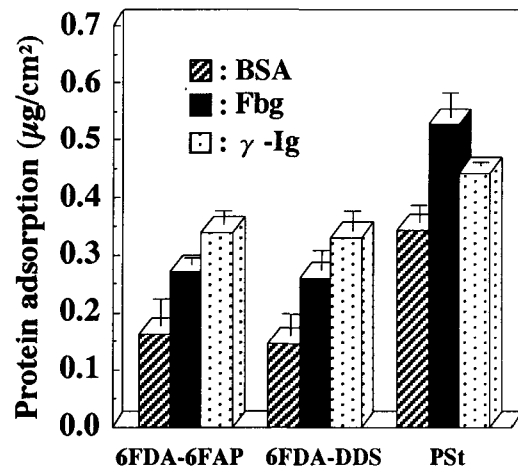


Figure 2 Amount of adsorbed protein on polymer surfaces (BSA: 1.0mg/ml, Fbg: 0.1mg/ml, γ -Ig: 0.3mg/ml, Temperature: 36.5°C)

Table Zeta potential of polymer surface in distilled water.

Polymer	Zeta potential (mV)
6FDA-6FAP	-81.8
6FDA-DDS	-77.6
PSt	-42.3

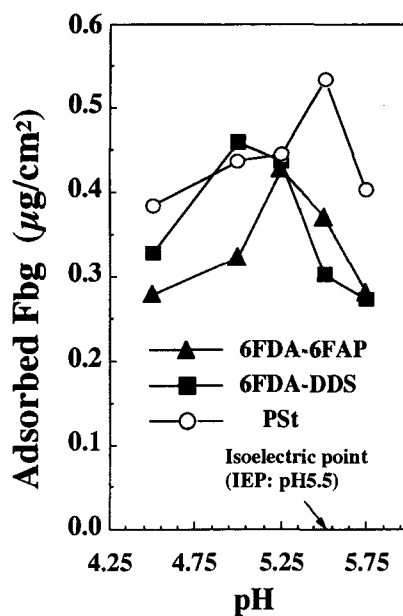
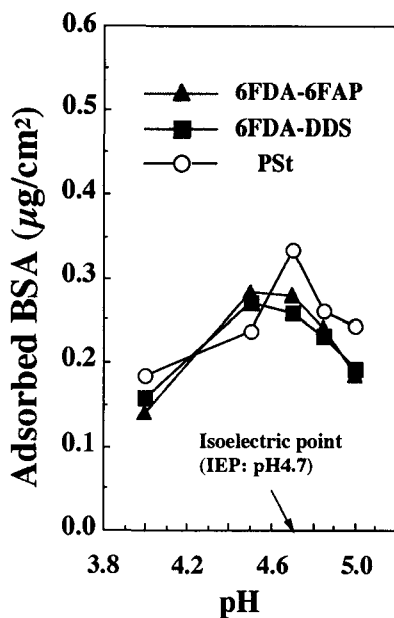


Figure 3 pH dependence of BSA and Fbg adsorption on polymer surfaces at 36.5°C for 2h. (BSA: 1mg/ml, Fbg: 0.1mg/ml, ionic strength 0.15)

【考察】

血液適合性材料に要求される特性の一つは、血栓形成を引き起こす血漿タンパク質の吸着を抑制することである。これまでの研究では親水性材料で血漿タンパク質の吸着や血小板の粘着が少ないため、良好な血液適合性を有する報告が多くなされている。⁴⁾ しかし血液中に長時間留置するとカルシウムの沈着が起こり易く、またヒドロキシル基を有する材料では補体の活性化を生起し、低血圧ショック等の合併症を誘発することが知られている。^{4), 5)} このために免疫系を含めた生体適合性材料の開発には、新しい材料の創製が望まれている。

今回作製したPI膜は水に対する接触角測定から疎水性を示し(95°)、また補体の活性を抑制することも明らかとなっている。²⁾ 一般に親水性材料と比較し疎水性材料では血漿タンパク質の吸着が多いことが知られているが、^{6), 7)} PI膜とPSt膜(水に対する接触角: 91°)との間には接触角に大きな違いが認められず、Figure 2 に示すように、PSt膜に比べPI膜表面はBSAやFbgの吸着量を抑制した。このことから、吸着には血漿タンパク質との界面エネルギーの相違以外の作用が関与していると考えられる。

前述したようにPI膜表面はPSt膜に比べ強く負に帯電していた。この原因として、電子に富んだフッ素基が熱処理により材料表面近傍へ配向し、材料表面近傍の帯電密度が高くなったことが考えられる。¹⁾ またPSt分子内・分子間では電子の移動が起こらないのに対し、ポリイミドは分子内のベンゼン環(ドナー)部分とイミド環(アクセプター)部分とで電子の授受が起こるためCT錯体が形成される。このためPI膜表面の帯電状態がPSt膜表面のそれと異なる結果、生理的条件下では負に荷電しているBSA、Fbgの吸着が抑制されたと考えられる。

このPI膜とPSt膜表面の帯電状態の違いがタンパク質吸着に影響を及ぼすかどうかを確認するため、溶液のpHの変化がBSAの吸着に与える影響を調べた。Figure 3 の結果から、PI膜表面へのBSA吸着は等電点(pH4.7)より酸性側のpH 4.5で、最大吸着量を示した。またPI膜表面へのFbg吸着でも同様の傾向が見られた。溶液のpH変化に伴う吸着タンパク質の変化に関する検討はこれまでも行われているが、一般に等電点で最大吸着量を示すことが知られている。⁸⁾ これはタンパク質分子内の電荷がゼロになり、分子内反発が最も小さくなる結果、一定の表面積により多くの分子が吸着可能になること、さらにタンパク質分子間の静電的作用も小さくなるため、吸着量が最大になると考えられている。

一方、PI膜において最大吸着量が酸性側にシフトしたのは、タンパク質分子内の電荷により分子

構造が変化し一定の表面積に吸着する分子の数が減少する効果よりも、タンパク質が正電荷を持つことにより、強く負に帯電したPI膜表面との静電的相互作用が相対的に強まることが原因と考えられ、膜表面の帯電状態がタンパク質の吸着に大きく影響していることが確認された。

以上のことから、PI膜がPSt膜に比べ、タンパク質(BSA、Fbg)の吸着をより強く抑制したのは、生理的条件(pH7.4、イオン強度(IS): 0.15)下において負に帯電しているこれらタンパク質分子と、強く負に帯電したPI膜表面との(静電的な)相互作用に起因していると考えられる。

一方、 γ -IgではBSAやFbgで見られたような吸着抑制は認められなかったが、これは γ -Igの特性によると考えられる。 γ -Igの等電点はpH7.0前後であり、高分子表面との静電的相互作用は弱い。 γ -Ig分子の定常領域(F_2)は疎水性であることが知られている。⁷⁾ このため膜との疎水相相互作用が吸着を支配したと考えられる。

今回の実験では一成分系でのタンパク質吸着の評価とPI膜が有するタンパク質吸着の抑制メカニズムの検討をおこなった。血液中には多種にわたるタンパク質が存在することから、PI膜が有するタンパク質の吸着抑制メカニズムはより複雑であると考えられる。今後は多成分系でのタンパク質吸着の評価と、コンフォメーション解析から、この試料の血液適合性機構をさらに詳細に検討したい。

【結論】

- (1) ゼータ電位測定から含フッ素芳香族ポリイミド膜表面が強く負に帯電していることが明らかになった。
- (2) 含フッ素芳香族ポリイミド膜はポリスチレン膜に比べアルブミン、フィブリノーゲンの吸着を約1/2に抑制した。
- (3) 含フッ素芳香族ポリイミド膜がポリスチレン膜に比べタンパク質の吸着を抑制したのは、タンパク質との(静電的な)相互作用の違いによると考えられる。

【文献】

- 1) 川上浩良、長岡昭二、窪田倭: 化学構造が異なる新規含フッ素ポリイミド膜のガス交換能と血液適合性に関する基礎研究. 人工臓器 25: 427 (1996).
- 2) 川上浩良、長岡昭二: 含フッ素ポリイミドの膜型人工肺の応用. 膜, 22(2): 81 (1997).
- 3) Kawakami H., Mikawa M., J. Takagi, Nagaoka S.: Gas transfer and blood compatibility of fluorinated polyimide membranes. J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 7: 1029 (1996).

- 4) 松田武久：抗血栓性材料. 循環科学 Vol. 7 No.8: 38 (1987).
- 5) I. Cifkova, L. Sprincl: The use of ⁹⁹Tc-pyrophosphate for imaging and measuring of calcification caused by implanted polymers. J. Biomed. Mater. Res., 14, 723 (1980).
- 6) 白浜博幸：高分子表面へのタンパク質の吸着性. 表面, Vol. 27 No.1: 29 (1989).
- 7) 岡野光夫、片岡一則、桜井靖久、島田昌、鵜木正夫、篠原功、赤池敏広、前田瑞夫、井上祥平、笹原靖、渡辺祐嗣、鶴田禎二：免疫工学用材料の開発 ポリマー表面上における抗体の吸着、配向の制御とその応用. 人工臓器, 10: 102 (1981).
- 8) 白浜博幸：蛋白質の高分子表面への吸着現象とそのバイオメディカル分野への応用. 脂肪 核酸 酵素, 37(2): 117 (1992).